

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

Direktor: Prof. Dr. med. Christian Hagl

Tissue Engineering:

*Die Dezellularisierung zellbeschichteten Polyurethans*

*Ein experimenteller Ansatz für die Herstellung eines biohybriden  
Materials als Bestandteil zukünftiger kardiovaskulärer Implantate*

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

**Francisco Yniguez**

aus  
Wiesbaden

2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof Dr. med. Christian Hagl

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Ralf Sodian

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

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

Tag der mündlichen Prüfung: 30.01.2020

# Inhaltsverzeichnis

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| <b>1.</b> | <b>Abstract .....</b>  | <b>3</b>  |
| <b>2.</b> | <b>Einleitung.....</b>   | <b>4</b>  |
| 2.1.      | <i>Herausforderungen in der Transplantationsmedizin.....</i>   | 4         |
| 2.2.      | <i>Tissue Engineering.....</i>   | 7         |
| 2.3.      | <i>Anforderungen an tissue engineeretes Gewebe .....</i>   | 8         |
| 2.4.      | <i>Non-Hybrid Prothesen .....</i>  | 11        |
| 2.5.      | <i>Hybridprothesen .....</i>   | 16        |
| 2.6.      | <i>Extrazelluläre Matrix und Dezellularisierung .....</i>  | 18        |
| <b>3.</b> | <b>Material und Methoden .....</b>   | <b>25</b> |
| 3.1.      | <i>Enzymatische Isolierung der Fibroblasten aus Venensegmenten.....</i>  | 25        |
| 3.2.      | <i>Zellpassage und Kultivierung.....</i>   | 26        |
| 3.3.      | <i>Einfrieren und Auftauen der Zellen.....</i>   | 28        |
| 3.4.      | <i>Zellbeschichtung- und Kultivierung auf Polyurethan.....</i>   | 29        |
| 3.5.      | <i>Immunhistochemische Färbung .....</i>   | 31        |
| 3.6.      | <i>Rasterelektronenmikroskopie.....</i>  | 34        |
| 3.7.      | <i>DAPI-Färbung .....</i>  | 34        |
| 3.8.      | <i>Proliferationsevaluation .....</i>  | 35        |
| 3.9.      | <i>Dezellularisierung .....</i>  | 37        |
| 3.10.     | <i>Permeabilitätstestung .....</i>   | 39        |
| <b>4.</b> | <b>Ergebnisse.....</b>   | <b>40</b> |
| 4.1.      | <i>Proliferationsevaluation .....</i>  | 40        |
| 4.2.      | <i>Dezellularisierung .....</i>  | 42        |
| 4.2.1.    | <i>Immunhistochemie .....</i>  | 42        |
| 4.2.2.    | <i>Rasterelektronenmikroskopie.....</i>  | 49        |
| 4.2.3.    | <i>DAPI Färbung .....</i>  | 53        |
| 4.2.4.    | <i>Permeabilitätstestung .....</i>   | 56        |
| <b>5.</b> | <b>Diskussion.....</b>   | <b>58</b> |
| 5.1.      | <i>Dynamische versus statische Zellbeschichtung .....</i>  | 58        |
| 5.2.      | <i>Effektive Dezellularisierung durch SDS .....</i>  | 61        |
| 5.3.      | <i>Materialgrundlage und Anwendungsform von DP als Ko-faktoren für eine effektive Dezellularisierung .....</i> | 62        |
| 5.4.      | <i>Enzymatische Komponenten verursachen Schäden an der EZM .....</i>   | 63        |
| 5.5.      | <i>Fehlen von Matrixkomponenten nach der Anwendung von SDS mit SD .....</i>                                    | 64        |
| 5.6.      | <i>Quantifizierung von Matrixkomponenten als ergänzende Auswertungsmethode .....</i>                           | 65        |

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| 5.7.      | <i>Mechanische und physikalische Eigenschaften des Scaffolds .....</i> | 66        |
| 5.8.      | <i>Bedeutungen für den klinischen Alltag.....</i>                      | 66        |
| <b>6.</b> | <b>Fazit und Ausblick.....</b>   | <b>68</b> |
| <b>7.</b> | <b>Quellen .....</b>   | <b>70</b> |
| 7.1.      | <i>Textnachweise .....</i>   | 70        |
| 7.2.      | <i>Abbildungsnachweise .....</i>                                       | 79        |
| <b>8.</b> | <b>Anhang .....</b>  | <b>80</b> |
| 8.1.      | <i>Technische Zeichnungen .....</i>                                    | 80        |
|           | <b>81</b>  |           |
| 8.2.      | <i>Vorveröffentlichungen.....</i>                                      | 83        |
| 8.3.      | <i>Einverständniserklärungsmuster.....</i>                             | 84        |
| 8.4.      | <i>Materialliste .....</i>   | 85        |
| 8.4.1.    | <i>Geräte und Zubehör.....</i>   | 85        |
| 8.4.2.    | <i>Verbrauchsmaterialien .....</i>                                     | 86        |
| 8.4.3.    | <i>Lösungen bzw. Reagenzien.....</i>                                   | 86        |
| 8.5.      | <i>Danksagung.....</i>   | 88        |
| 8.6.      | <i>Eidesstaatliche Erklärung .....</i>                                 | 89        |

# 1. Abstract

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, ein neues Prothesenmaterial für kardiovaskuläre Implantate in Form eines biohybriden Materials mit Extrazellulärer Matrix (EZM) herzustellen, indem zellbeschichtetes Polyurethan (PU) durch unterschiedliche Methoden dezellularisiert wurde. Die Kultivierung der Fibroblasten (FB) auf PU erfolgte vorab über drei unterschiedlich lange Zeiträume. Hierbei konnte eine effektive Dauer der Zellbeschichtung bestimmt werden. Anschließend wurden sechs verschiedene Dezellularisierungsprotokolle (DP) mit unterschiedlichen Komponenten an zellbeschichtetem PU parallel angewandt, um eine effiziente Methode der Zell- und DNA-Entfernung bei Erhalt der EZM zu ermitteln.

Für die Proliferationsevaluation wurden FB von Segmenten der V. Saphena Magna ( $n_1=3$ ) isoliert und auf 9 PU Scaffolds für 7, 14 bzw. 21 Tage kultiviert. Durch die Evaluation mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) und Immunhistochemie (IHC) erwies sich eine Kultivierungsdauer von zehn Tagen als optimal. Für die Dezellularisierung wurden FB isoliert ( $n_2=4$ ) und auf 28 PU Scaffolds für zehn Tage kultiviert. Die Anwendung einzelner DP erfolgte an verschiedenen PU Scaffolds ( $n_3=16$ ; 4/Zelllinie), welche anschließend sechs 24h Waschzyklen mittels Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) unterzogen wurden. Die Proben wurden mittels REM, IHC sowie Kern- (Haematoxylin; HE) und DNA-Färbung (4',6-Diamidino-2-phenylindole; DAPI) ausgewertet. Unter einem Druck von 120 mmHg wurde die Wasserpermeabilität des dezellularisierten Materials bewertet. DP basierend auf Natriumdodecylsulfat (SDS) dezellularisierten am effizientesten, während EZM-Komponenten erhalten werden konnten. Die Anwendung von SDS in Kombination mit Triton X-100 (TX-100) erzeugte Ergebnisse, bei denen Proben negativ für das fibroblastenspezifische Antigen TE-7 färbten, während EZM-spezifische Färbungen (Fibronectin, Laminin, Elastin, Kollagen I und IV) positiv ausfielen. DAPI Färbungen bestätigten diese Ergebnisse, da keine bis sehr wenige Zellkerne auf diesen Proben nachgewiesen wurden. Färbungen mittels HE zeigten keine Nuklei, dafür aber eine konstante Schicht an EZM. Im anschließenden Permeabilitätstest zeigte sich eine Abnahme der Flüssigkeitspermeabilität. Andere DP wiesen inkonstante Ergebnisse auf und führten entweder zum Verlust von EZM oder dem Verbleib von Zellen bzw. DNA. Diese Arbeit verdeutlicht, dass SDS, besonders in

Kombination mit TX-100, effektiv zellbeschichtetes Polyurethan dezellularisiert, während EZM erhalten wird. Durch die Eigenschaften des biohybriden Materials sind erste Grundvoraussetzungen für die zukünftige Anwendung als kardiovaskuläre Prothese erfüllt.

## 2. Einleitung

### 2.1. Herausforderungen in der Transplantationsmedizin

Der Gedanke, pathologisches Gewebe durch gesundes zu ersetzen, stellt ein Urkonzept der chirurgischen Therapie dar und hat bis heute eine große Bedeutung für die Medizin. Einer Legende zu Folge, welche sich im dritten Jahrhundert nach Christus ereignete, transplantierten die heiligen Zwillinge und Ärzte St. Kosmas und St. Damian, das Bein eines verstorbenen Mannes, um das verfaulte Bein eines anderen zu ersetzen (siehe Abb. 1). Ähnliche Versuche, wie die der Brüder Kosmas und Damian, wurden über die folgenden Jahrhunderte dokumentiert. Deren Auswertungen skizzieren wissenschaftliche Errungenschaften für die Wissenschaft der Transplantationsmedizin [1–3].



**Abbildung 1:** Kosmas und Damian transplantieren dem verletzten Soldaten Justinian ein allogenes Bein.<sup>1</sup>

Meilensteine setzte z.B. der schottische Chirurg und Zahnarzt John Hunter im 18. Jahrhundert, indem er Zähne transplantierte. Mit finanziellem Anreiz motivierte er junge Zahnsender zu Zahnxtraktionen, um den Zahnaparat anderer aufzuwerten. Seine Beobachtungen resümieren in der wertvollen Erkenntnis, dass Empfängersiten Regenerationskapazitäten besitzen, um frisch implantiertes Material zu adoptieren. Die Kürze der Zeit, in der explantiertes Gewebe neu implantiert wird, sei ebenso erfolgsbestimmend. Wenige Zeit später offenbarte das Prozedere zahlreiche Risiken: Dazu zählte in erster Linie die hohe Gefahr der Mitübertragung von Infektionen, deren Konsequenz oft der Tod war [4]. Skepsis gegenüber der Implantation körperfremden Materials der gleichen Spezies (=allogene Transplantation) äußerte der Physiologe Paul Bert Ende des 19ten Jahrhunderts. Dieser beobachtete, dass ein Transplantat in Abhängigkeit des Spenders in unterschiedlichem Ausmaß abgestoßen werde. Bert machte dafür

das Fehlen eines nativen Milieus für das Transplantat dafür verantwortlich [5]. Im selben Zusammenhang formulierte Gaspare Tagliacozzi, Chirurg und Anatom aus Bologna, dass der singuläre Charakter eines Individuums Transplantationen an einer anderen Person erschwert [6].

Diesen singulären Charakter auf wissenschaftlicher Ebene aufzuschlüsseln begann im 20. Jahrhundert. 1900 beschrieb Karl Landsteiner das Blutgruppensystem (A-B-0), woraufhin meist kompatible Bluttransfusionen durchführbar waren [7]. In Bezug auf allogene Gewebetransplantation veröffentlichten 1943 Peter Brian Medawar und Thomas Gibson die Arbeit *The fate of skin homografts in man*. Darin wurde nachgewiesen, dass der Erfolg von Transplantationen auf immunologischen Prinzipien beruhte [8]. Wenige Jahre später konkretisierte sich diese Annahme durch die Entdeckung des HLA-Systems (Human Leukocyte Antigen-System), welches dem Immunsystem anhand von spezifisch-vererbaren Merkmalen die Unterscheidung zwischen Fremd- und Eigengewebe erlaubt [9]. Erst die Entwicklung der Immunsuppressiva und intensivmedizinischen Beatmungstechniken, deren Anwendung der Unterdrückung von Abstoßungsreaktionen und Stabilisation komatöser Zustände dient, ermöglichen allogene Organtransplantationen im klinischen Alltag. Auch wenn Leber, Herz- und Nierentransplantationen heute lebenserhaltende Therapiekonzepte darstellen können, ist deren Durchführung von zahlreichen Nachteilen behaftet. Ein fundamentales Problem ist die begrenzte Verfügbarkeit an Transplantatmaterial bzw. Transplantaten (siehe Abb.4) [10]. Wenn vorhanden, muss dieses zusätzlich Empfängerkompatibel und in physiologisch gutem Zustand sein. Im Vordergrund steht das Risiko einer immunologischen Abstoßungsreaktion. Dabei kann allogen Material sowohl von Seiten des Empfängers (Host vs. Graft) als auch des Spenders ausgehen (Graft vs. Host) [11, 12]. Limitierende Auswirkungen hat, neben dem Allgemeinzustand des Empfängers, das weitreichende Komplikationsspektrum der oftmals unumgänglichen Immunsuppression. Durch die nephro-, neuro-, hepato- und myelotoxischen Eigenschaften vieler Immunsuppressiva entstehen zahlreiche Risiken, z.B. die einer Panzytopenie, die Entwicklung von Malignomen und Nicht-Melanomen, sowie die Reaktivierung einer latenten Tuberkulose [13]. Hinzu kommt das Fehlen von allogenen Transplantaten in der Akutsituation. Anders als bei autologen Transplantationen (körpereigenes Gewebe), muss Fremdgewebe ggf. erst isoliert, modifiziert oder transportiert werden. Neben der direkten Verfügbarkeit bietet die Abwesenheit von immunogenen Komplikationen erfolgsversprechende Umstände bei der Verwendung körpereigener Strukturen [14]. Die Autotransplantation findet heute in zahlreichen Gebieten

seine Anwendung: z.B. bei Spalthauttransplantationen, Lappen- und Sehnenerersatzplastiken, Haarwurzelverpflanzungen und aortocoronaren Venen-bypässen (siehe Abb. 2) [15–17]. In letzterem Fall wird jedoch deutlich, warum die Zukunft auf neue Materialquellen angewiesen ist, um derzeitige Hindernisse zu überwinden: Die Atherosklerose schädigt als progressive systemische Erkrankungen nicht nur Koronarien, sondern gleichermaßen größere Gefäße (wie die V. Saphena Magna oder A. thoracica interna). Besteht die Indikation zur Bypass-OP, sind

**Abbildung 2:** Präparation einer *Vena saphena magna in-situ*, um sie anschließend als autologen aortocoronaren Venenbeipass zu verwenden. Venensegmente dieser Patienten dienten als Quelle für Fibroblasten in unserer Versuchsreihe.<sup>2</sup>



**Abbildung 3:** Beispiele einer Graft-versus-Host Reaktion. Pädiatrischer Patient mit Hautmanifestation einer akuten Graft-versus-host-Krankheit (GVHD) trotz HLA Übereinstimmung des Spenders und prophylaktischer Immunsuppression (A). Chronische GVHD in Form von großflächigen Erosionen nach allogener Stammzelltransplantation (B).<sup>3</sup>



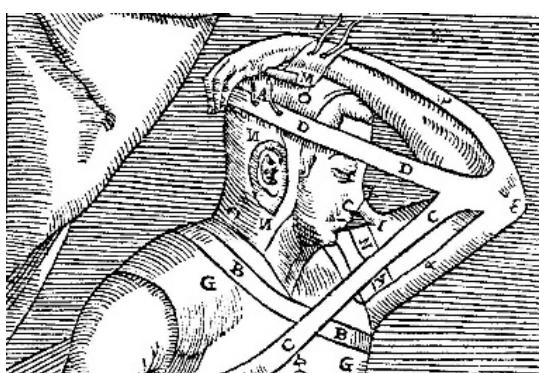
| Active heart waiting list (at year-end) in All ET, by year, by country |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |
|--|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Active heart waiting list  | 2007        | 2008        | 2009        | 2010        | 2011        | 2012        | 2013        | 2014        | 2015        | 2016        |
| Austria  | 52          | 59          | 66          | 74          | 67          | 76          | 84          | 57          | 52          | 55          |
| Belgium  | 34          | 43          | 58          | 67          | 59          | 76          | 95          | 89          | 118         | 117         |
| Croatia  | 12          | 18          | 14          | 11          | 21          | 21          | 23          | 14          | 24          | 34          |
| Germany  | 839         | 873         | 974         | 981         | 1039        | 1012        | 929         | 858         | 790         | 725         |
| Hungary  |             |             |             |             |             | 6           | 38          | 34          | 41          | 48          |
| Netherlands  | 47          | 54          | 60          | 67          | 57          | 64          | 84          | 91          | 102         | 101         |
| Slovenia   | 30          | 17          | 19          | 26          | 34          | 32          | 30          | 21          | 43          | 50          |
| <b>Total patients</b>  | <b>1014</b> | <b>1064</b> | <b>1191</b> | <b>1226</b> | <b>1277</b> | <b>1287</b> | <b>1283</b> | <b>1164</b> | <b>1170</b> | <b>1130</b> |

**Abbildung 4:** Tabellarische Übersicht von Patienten im europäischen Raum, welche auf ein Spenderherz zum Jahresende warteten.<sup>4</sup>

Chirurgen auf die Verwendung bereits geschädigter autologer Transplantate angewiesen. Im Falle von Bypass-OPs an größeren Arterien, z.B. im Stromgebiet der A. Femoralis, stehen zusätzlich prothetische oder biologische Ersatzprothesen zur Verfügung. Letztere weisen im Vergleich zu autologem Gewebe jedoch schlechtere Langzeitergebnisse auf [18, 19]. Zum einen sollen zukünftige alternative Prothesen nicht der Ressourcenknappheit und dem hohen Kosten- oder Schmerzaufwand unterliegen. Zum anderen sollten sie der Leistung autologer Transplantate entsprechen, indem sie z.B. kein Risiko einer zellvermittelten Immunreaktion oder das eines vorzeitigen Materialversagens tragen. Sich diesen Herausforderungen annehmend formte sich während der letzten drei Dekaden ein interdisziplinäres Forschungsfeld, in welchem Ärzte, Ingenieure und weitere Wissenschaftler mit kombinierten Methoden die Konstruktion biologischen Gewebes beabsichtigen. Dies hat den Namen: Tissue Engineering (TE) [20].

## 2.2. *Tissue Engineering*

TE bezeichnet die Idee der Geweberekonstruktion bzw. Gewebezüchtung in-vitro und dient als Überbegriff für die künstliche Herstellung biologischer Gewebe. Durch die Herstellung biologischen Gewebes unter Miteinbezug körpereigener Regenerationskapazitäten versucht TE sich über diese bestehenden Grenzen in der Transplantationsmedizin hinweg zu setzen. Im Vordergrund steht die Herstellung biologischen Materials, welches komplexe Interaktionsprozesse mit dem Empfängersitus induziert, um im Zeitverlauf zu körpereigenem Material zu avancieren. Ungleich einer statischen Ersatzprothese, besitzt durch TE hergestelltes Gewebe Umbau- und Regenerationspotenzial in-situ. Dies erweitert das klassische Verständnis einer statischen Prothese um eine biodynamische Komponente [21].



**Abbildung 5:** Skizze zur Nasenrekonstruktion mittels autologem Gewebe durch Tagliacozzi.<sup>5</sup>



**Abbildung 6:** Eine durch Tissue Engineering hergestellte Gefäßprothese.<sup>6</sup>

Zu welchem Zeitpunkt Methoden des TE erstmalig ihre Anwendung fanden ist umstritten. Einige Quellen verweisen zurück bis in das 16.te Jahrhundert. Hier beschrieb Gasparo Tagliacozzi die Methode einer Nasenrekonstruktion durch die Modulation des Unterarmes (siehe Abb. 5) [22]. Andere verweisen auf eine Publikation aus dem Jahre 1933, welche das Implantieren von Zellen in das Abdomen eines Schweins dokumentiert. Der Begriff TE formte sich jedoch erst in den 80er Jahren in den USA. Experten aus den Feldern der Regenerativen- und Transplantationsmedizin diskutierten im Rahmen einer Konferenz über zukünftige Therapiemöglichkeiten von körperlich behinderten Patienten. Bis zu diesem Zeitpunkt wurde das Ersetzen von Organen und die Kultivierung von Zellmaterial als zwei getrennte Forschungsansätze betrachtet. Im Zuge der Diskussion formte sich der Konsens, beide Ideen zu kombinieren. Somit erweiterte sich der Horizont an möglichen Therapieoptionen, in dessen Mittelpunkt der Begriff Tissue Engineering stand [23].

Aus dem Englischen lautet die übersetzte Definition: Ein interdisziplinäres Feld welches die Prinzipien der Ingenieurs- und Lebenswissenschaften zugunsten der Herstellung biologischer Ersatzimplantate, mit der Funktion Gewebe wiederherzustellen, aufrechterhalten oder zu verbessern, einsetzt [21]. Um diesen hohen Erwartungen gerecht zu werden, müssen Anforderungen bzw. Qualitätskriterien für künstlich hergestelltes Gewebe formuliert werden. Im folgenden Kapitel werden drei wichtige Kriterien vorgestellt. Es ist sehr wichtig, hierbei zu beachten, dass diese Kriterien individuelle Anforderungen darstellen, welche z.B. durch Zielfunktion- und Ort in-situ variieren können.

### ***2.3. Anforderungen an tissue engineeretes Gewebe***

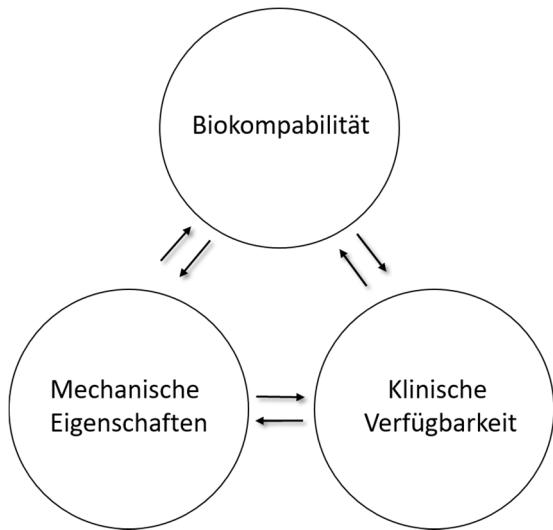
Damit eine Prothese langfristig ihre Zielfunktion aufrechterhalten kann, bestehen Anforderungen an ihre Biokompatibilität. Tissue engineeretes Gewebe besitzt, anders als z.B. Herzschrittmacher oder Knieprothesen, bioaktive Substrate welche mit dem Empfängersitus auf molekularer und/oder zellulärer Ebene in Kontakt treten. Diese kleiden meist die Oberfläche, bzw. die direkt mit dem Empfängersitus in Kontakt tretende Fläche aus. Das können (körperfremde) Zellen sein, oder zumindest eine von Zellen produzierte Matrix, EZM. Die Biokompatibilität solcher Substrate bzw. der EZM bewertet deren Fähigkeit, Regenerationsprozesse in-situ zu initiieren bzw. zu optimieren, ohne dabei schädigende Wirkung

auf lokaler oder systemischer Ebene zu erzeugen [24]. Obwohl zahlreiche Begriffsdefinitionen der Biokompatibilität existieren, konnte sich die Wissenschaft bisher auf keine allgemeingültige einigen [25–27]. Gemeinsamer Konsens besteht jedoch in der Voraussetzung, dass implantiertes Material komplikationslos im Empfängersitus langfristig überdauern soll, ohne dabei z.B. eine Immunreaktion zu Lasten der Prothesenfunktion auszulösen [28, 29]. Andere Definitionen priorisieren das Auslösen einer adäquaten Empfängerreaktion abhängig von den physiologischen Anforderungen der Implantatstelle [30, 31].

Ähnliches Prinzip gilt für synthetische Bestandteile einer Prothese, welche im TE oft als Trägermaterial für bioaktive Substanzen dienen: das sogenannte backbone bzw. Rückgrat (Scaffold). Dessen Zusammensetzung und Abbauprodukte sollte toxische bzw. schädigende Komponenten vermeiden [32]. Zur Veranschaulichung dient das Beispiel einer Gefäßprothese, welche als kavopulmonärer Conduit Patienten mit nur einem Ventrikel implantiert wurde. Das Rückgrat bestand aus biologisch abbaubaren Polyglykolsäuren. Deren Oberfläche wurde mit autologen Stammzellen beschichtet [33]. Die Intention bestand darin, die Stammzellen zu Endothelzellen und FB in-vivo zu differenzieren, sodass eine native vaskuläre (Mikro-) Anatomie entsteht. Voraussetzung für diesen Prozess sind molekulare Interaktionsmuster zwischen Situs und Zellen, deren Details bis heute noch aufzuschlüsseln sind [34]. Durch den Einsatz biologisch abbaubarer Polymere besteht das langfristige Ziel, nur körpereigenes Gewebe in-situ zu belassen [35].

Ein weiteres Kriterium ist die mechanische Durabilität bzw. Stabilität des Materials. Durch TE hergestellte Prothesen sind physiologischen Druckbelastungen ausgesetzt. Diesen Belastungen muss nicht nur standgehalten werden, viel mehr muss die adaptive Fähigkeit vorhanden sein, variablen Stressstimuli gerecht zu werden [36]. Dabei spielt die Implantatstelle eine wesentliche Rolle: Sie definiert ein individuelles Stressmuster, welches die Prothese bewältigen muss. In Bezug auf kardiovaskuläre Prothesen dient folgendes Beispiel der Veranschaulichung: Mittels TE hergestellte Herzklappen (tissue engineered heart valve; TEHV) müssen einerseits der Druckbelastung während der systolischen Auswurfphase als auch der Druckdifferenz in der Diastole standhalten, ohne dabei Materialschäden zu erleiden. Gleichzeitig sollen die Klappensegel das adäquate Öffnen und Schließen der Klappe ermöglichen, also relative Klappeninsuffizienz- und Stenose vermeiden, um über Jahre die Zielfunktion aufrechterhalten zu

können [37]. Im Vergleich hierzu besteht die Herausforderung einer Gefäßprothese eher darin, genügend Elastizität aufzuweisen um die Windkesselfunktion der arteriellen Strombahn imitieren zu können [38]. Je nach Bauweise bzw. Architektur der Prothese haben festere Bestandteile, wie z.B. das Rückgrat, höheren Einfluss auf das mechanische Verhalten, sodass diese eine Schlüsselrolle bezüglich der Stabilität einnehmen.



**Abbildung 7:** Anforderungen an tissue engineerete Prothesen. Die drei Kriterien sind Überbegriffe und haben je nach Kategorie der Prothese unterschiedlichen Einfluss aufeinander.

Neben dem Anwendungserfolg in-situ, welcher in erster Linie von der Biokompatibilität, dem mechanischen Profil und dessen Wechselwirkung konstituiert wird, hat die zeitnahe Verfügbarkeit und ein effektiver Herstellungsprozess der Prothese im klinischen Alltag eine wichtige Rolle [39, 40]. Bei dem Beispiel des kavopulmonären Conduits werden autologe Zellpopulationen verwendet, da sie das geringste Risiko einer Immunreaktion tragen. Konsequenz dessen ist die gezielte und patientenspezifische Isolation und Kultivierung von Zellen. Diese ist zeitintensiv und im Einzelfall nicht vorhersehbar, weswegen solch einem Produktionsansatz z.B. im Akutfall wenig Bedeutung

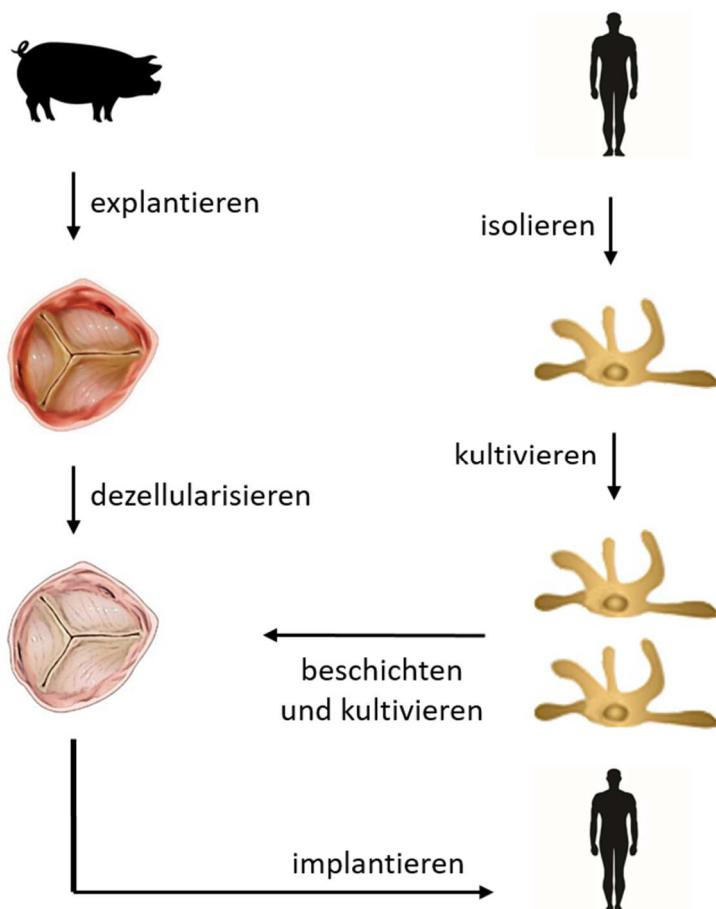
zukommt. Für die klinische Routine ist die Prothese im Idealfall als „off-the-shelf“ Prothese sofort vorhanden, da keine patientenspezifischen Modifikationen unternommen werden müssen [41]. Zusammenfassend entsteht eine Wechselwirkung von Anforderungskriterien: Biokompatibilität, mechanisches Profil und klinische Verfügbarkeit (siehe Abb.7). Diese werden von der Architektur bzw. Bauweise bestimmt. Implantate aus dem kardiovaskulären TE können in zwei Subtypen unterteilt werden: Hybrid- und non-Hybrid Prothesen. Non-Hybrid Typen bestehen entweder aus biologischen oder synthetischen Bestandteilen, während Hybride aus einer Kombination beider Elemente bestehen. Beide Entwicklungsansätze sind heute Gegenstand aktueller Forschung um der geringen Verfügbarkeit bzw. mangelnden Leistung kardiovaskulärer Prothesen entgegen zu wirken.

## 2.4. Non-Hybrid Prothesen

Diese Prothesen können in biologische und synthetische Subtypen unterteilt werden. Biologische Implantate sind stets das Resultat einer Zellproduktion. Im Mittelpunkt steht dabei die Extrazelluläre Matrix (EZM), ein Konglomerat an Makromolekülen welches von Zellen synthetisiert wird und diese umgibt [42]. Sie ist essentieller Bestandteil tissue engineerter Prothesen, da sie durch ihre dynamischen Wechselwirkungen mit umliegenden Strukturen Ädhasions-, Proliferations- und Differenzierungsprozesse induziert. 1986 kreierten Weinberg und Bell ein Hydrogel für die Herstellung einer Gefäßprothese (tissue engineered vascular graft; TEVG), dessen Hauptbestandteil EZM war [43]. Seit 1990 wird das Gel auch verwendet, um detaillierte Einsicht in myokardiale Kontraktionsmuster und der zugrunde liegenden Elektrophysiologie zu gewinnen [44]. Einzelne Bestandteile der Matrix, wie z.B. Fibrin, wurden verwendet um in Form eines Gels mesenchymale Stammzellen auf Infarktregionen des Myokards eines Schweins zu applizieren. Selbiges Gel wurde verwendet, um elastische TEVG vom kleinkalibrigen Typ zu produzieren [45, 46]. Nachteile der Gelformen sind die mangelhafte mechanische Stabilität und physikalische Compliance. Diese wurden zwar über die letzten Jahre optimiert, stellen aber in vielen Anwendungsbereichen limitierende Faktoren dar [47]. Um dem zu kontern, kommt der Verwendung von allogenem und xenogenem Gewebe eine große Bedeutung zu. Letzteres ist in großem Umfang vorhanden und findet Einsatz in der klinischen Routine, wird im Kontext von TE jedoch durch seine immunologischen Eigenschaften für den Empfängersitus kontrovers diskutiert.

Als Beispiel dient die Diskussion um das Disaccharid  $\alpha$ -Gal. Es ist als Oberflächenmolekül von Zellen vieler Spezies vorhanden. Menschen und Altweltaffen sind dabei die einzige Ausnahme, sie bilden  $\alpha$ -Gal-Antikörper [48, 49]. Im klinischen Alltag verwendete Prothesen xenogenen Ursprungs, wie z.B. Herzklappen oder Kreuzbänder, enthalten das Epitop und zeigen dennoch selten Komplikationen, welche auf  $\alpha$ -Gal zurück zu führen sind. Grund hierfür ist die vorangegangene Fixierung des Materials in Glutaraldehyd. Dieser Prozess verursacht u.a. die Quervernetzung von Kollagenen, wodurch im Falle von  $\alpha$ -Gal Antigene zugunsten des immunologischen Risikos maskiert werden [50, 51]. Zudem können akute Abstoßungsreaktionen auch durch „nicht-Gal“ Antigene ausgelöst werden [52, 53]. Die in-vivo Synergraft Studie liefert weitere Befunde: Hierbei wurden kryokonservierte und dezellularisierte Herzklappen von

Schweinen als Ersatz für Pulmonalklappen pädiatrischen Patienten implantiert (tissue engineered heart valve; TEHV). Drei der Patienten verstarben innerhalb des ersten postoperativen Jahres auf Grund fortschreitender Degeneration bzw. Ruptur der Prothesen, während die vierte Prothese prophylaktisch frühzeitig entfernt wurde. Anschließende histologische Untersuchungen der Prothesen zeigten ausgeprägte Entzündungsreaktionen in unterschiedlichen Stadien. Native Proben der Synergraft Prothesen wiesen zudem eine unvollständige Dezellularisierung auf. Neben der Anwesenheit von Zellen vermuteten erste Schlussfolgerungen die Präsenz xenogener EZM als Auslöser für die Entzündungsprozesse [54]. Darauffolgende Publikationen wiesen das Epitop ( $\alpha$ -Gal) in den Prothesen nach und erwähnten dessen Mitverantwortung für die inflammatorische Reaktion der Empfängersiten [55].



**Abbildung 8:** Vereinfachtes Beispiel einer non-hybrid TEHV anhand einer dezellularisierten xenogenen Aortenklappe. Organe bzw. Organstrukturen werden entnommen, in-vitro dezellularisiert und anschließend Patienten implantiert. Zusätzlich können autologe Zellpopulationen isoliert und in-vitro kultiviert werden, um anschließend dezellularisiertes Gewebe vor Implantation zu beschichten.

Das Beispiel verdeutlicht, dass der Wahl des zu dezellularisierenden Ausgangsmaterials eine wichtige Rolle zukommt. Je nach Art (biologisch oder synthetisch) und Herkunft des Materials (allogen vs. xenogen) können immunologische Risiken für den Empfänger der Prothese entstehen. Um diese Risiken weiterhin zu minimieren, sind effektive Dezellularisierungsprozesse erforderlich. Eine effektive Dezellularisierung wird dadurch definiert, dass durch diesen Prozess Zellen und ihre Bestandteile (z.B. DNA) entfernt werden, ohne dabei die EZM und mechanische Eigenschaften des Materials zu verändern. Hierfür existieren zahlreiche Ansätze: Dazu zählt u.a. die Anwendung von Detergenzien (z.B. Desoxycholsäure oder Natriumdodecylsulfat) und enzymatischen Lösungen. O'brien und Dohmen et al. verwendeten Detergenzien um xenogene Herzklappen zu dezellularisieren, um sie anschließend Schweinen bzw. Menschen zu implantieren (Abbildung 8 skizziert den Herstellungsprozess einer TEHV) [56, 57]. Matheny et. al. dezellularisierten intestinale Submukosa um die Pulmonalklappe in Schweinen zu ersetzen [58]. Komplikationen dieser Klappen entstanden primär durch eine unzureichende Dezellularisierung. Dies begünstigt Entzündungsprozesse in-vivo, wodurch die native EZM durch fibröse Strukturen ersetzt wurde. Daraus wird deutlich, dass durch Dezellularisierung ein breites Anwendungsgebiet für xenogenes Material geschaffen wird.

Für vaskuläre Prothesen vom mittleren Durchmesser (drei bis sechs mm) stellen Gefäße von Schweinen und Hunden ein großes Reservoir an Ausgangsmaterial dar [59]. Große Bedeutung kommt auch dezellularisierter intestinaler Submucosa von Schweinen zu, da diese seit 20 Jahren in verschiedenen kardiovaskulären Prothesen zum Einsatz kommt [60]. In weiteren Schritten bietet sich die Option, dezellularisiertes Material mit autologen Zellen des Empfängers zu besiedeln. Quint et al. verwendeten konservierte glatte Muskelzellen von Schweinen um in-vitro Gefäße zu konstruieren. Dieses Gewebe wurde zunächst mit verschiedenen Detergenzien dezellularisiert. Anschließend konnte das Lumen mit autologen Zellen (Endothelzellen oder deren Progenitorzellen) des Empfängers besiedelt werden, sodass die Prothese in Bezug auf den Empfängersitus allogene Eigenschaften besaß und als Karotidenersatz implantiert wurde. Als Ergebnis blieben alle Lumina für 30 Tage frei von Verschlüssen, erst dann okklidierten manche Prothesen auf Grund von neointimalen Hyperplasien [61]. Des Weiteren existiert die Möglichkeit, Gewebe in-vitro mittels konservierter Zellen zu konstruieren. Dieses wird dezellularisiert, um es anschließend in-vitro oder in-vivo mit autologen Zellen zu besiedeln. Durch diesen Versuchsansatz kann womöglich das immunologische Risiko der Prothese reduziert werden.

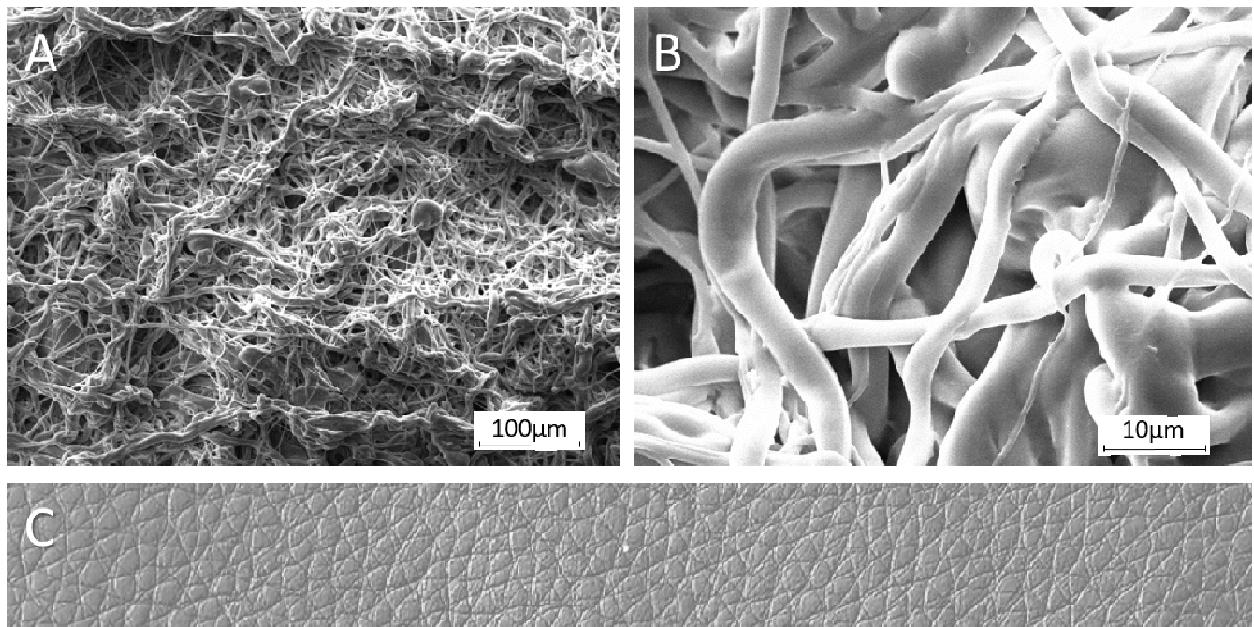
Dabei muss erwähnt werden, dass für die autologe Zellisolation- und Kultivierung ein kosten- und zeitintensiver Prozess erforderlich ist.

Rein Synthetische Prothesen vervollständigen die Liste der non-hybridnen Materialien und haben großen Einfluss auf die aktuellen Möglichkeiten im TE (siehe Tabelle 1). Synthetische Ersatzprothesen für Blutgefäße fanden erstmals 1954 ihre klinische Anwendung. Patienten mit symptomatischem Bauchaortenaneurysma erhielten Prothesen aus Vinyon-N, welches aus synthetischem Polyvinylchlorid besteht [62]. Nachfolger dieses Prototyps heißen Dacron® (Polyethylenterephthalate) und Gore-Tex® (Polytetrafluorethylen) welche den großen Vorteil hatten, bei Bedarf sofort verfügbar zu sein. Sie sind heute Bestandteil vieler Prothesen. Ihr Nachteil besteht darin, dass ihre Funktionalität bei kleiner werdendem Gefäßdurchmesser abnimmt. Grund hierfür ist das vom Durchmesser abhängige Auftreten von thrombotischen Verschlüssen [18, 19]. Bedeutender Vorteil der synthetischen Materialien ist jedoch deren zuverlässige Produktion und Verfügbarkeit. Hierdurch lässt sich das Problem der Spenderabhängigkeit vermeiden, während gleichzeitig Struktureigenschaften des Produktes

| Synthetisches Backbone | Zellbeschichtung  | Anwendung   | Merkmale  | Quelle |
|------------------------|---|---|---|--------|
| Dacron®                | EC, glatte Muskelzellen, FB (Schwein)                     | In vitro  | Erster Bericht einer TEVG   | [43]   |
| PGA                    | EC, glatte Muskelzellen, FB (Schaf)                       | Pulmonalarterie (Schaf)   | Erster Bericht eines resorbierbaren backbones in einer TEVG   | [64]   |
| PGA                    | glatte Muskelzellen, Endothelzellen, FB (Schaf)           | In vitro Kultivierung, in vivo Anwendung als A. Saphena (Schwein)     | Erste in vitro Beschichtung durch pulsatilen Bioreaktor   | [65]   |
| PGA / P (CL/LA)        | Autologe menschliche Zellen aus peripheren Venen (Mensch) | In vitro Kultivierung, in vivo Anwendung als Pulmonalarterie (Mensch) | Erster Bericht einer klinischen Anwendung   | [66]   |
| PGA / P (CL/LA)        | Autologe Knochenmarksstammzellen (Mensch)                 | In vivo als extrakardialer kavopulmonärer Conduit (Mensch)            | Erste klinische Anwendung mit Langzeitergebnissen   | [33]   |
| PGA                    | Allogene glatte Muskelzellen (Mensch)                     | In vitro Kultivierung, Anwendung als Arteriovenöser Shunt in Pavianen | Allogenes statt Autogenes Zellmaterial, anschließende Dezellularisierung mit guter Durchgängigkeit ohne Immunreaktion | [39]   |

**Tabelle 1:** Schematischer Überblick von hybriden TEVG basierend auf verschiedenen synthetischen Rückgraten. Abkürzungen: PGA = polyglykolische Säure; P (CL/LA) = Polymilchsäure und Polycaprolacton.

moduliert werden können [63]. Aus diesen Gründen kommt dem Einsatz von Polymeren wie PU, Polyglycerol sebacate (PGS) oder Poly (lactat-co-glykol, PGLA) im TE eine hohe Bedeutung zu.



**Abbildung 9:** Synthetisches Polyurethan. REM Aufnahmen in 500x (A) und 5000x-facher (B) Vergrößerung. C zeigt ein makroskopisches Bild.

Polyurethan-basierte Materialien sind bereits Bestandteil kardiovaskulärer Prothesen und wurden auch in dieser Versuchsreihe verwendet [67]. (Abbildung 9 zeigt REM Aufnahmen des Materials.) Die Herstellung erfolgte durch das Elektrospinnen, welches neben dem blow spinning zu den neueren Herstellungsmethoden gehört. Beim Elektrospinnen werden aus Polymerlösungen durch ein elektrisches Feld Nano- oder Mikrofasern erzeugt. Die Methode gilt als besonders kosteneffizient, gut steuerbar und erlaubt Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften als auch auf die Mikro- und Makroarchitektur des PU zu nehmen. Hierdurch lassen sich wichtige Charakteristika wie Orientierung, Größe der Fasern, Porengröße- und Geometrie, Porosität, und Oberflächenstruktur für individuelle Zwecke anpassen [68]. Des Weiteren können mechanische Eigenschaften wie z.B. die Elastizität des Materials sowie das Vorhandensein von Adhäsionskomplexen und somit auch die Dynamik molekularer Signalwege innerhalb eines Zellverbandes beeinflussen. So kann das Verhalten ausgereifter Zellen, als auch der Differenzierungsweg von Stammzellen beeinflusst werden [69–71]. Beispielsweise wurden mesenchymale Stammzellen je nach Elastizität des Grundmaterials entweder zu myogenen oder osteogenen Vorläuferzellen ausdifferenziert [72]. Auch das Verhalten von Kardiomyozyten kann beeinflusst werden: Ein hartes Rückgrat, welches den mechanischen Eigenschaften einer

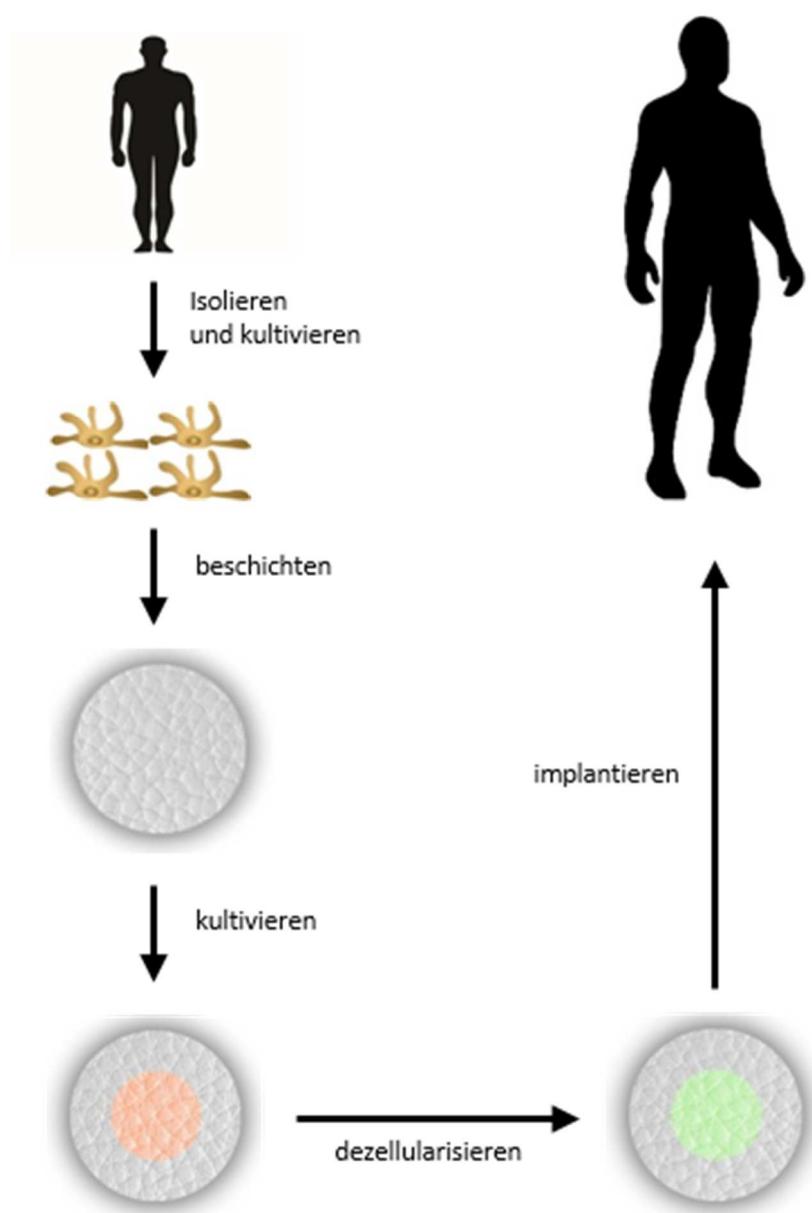
fibrotischen Narbe entspricht, führte zur Überbeanspruchung der Zellen, wodurch sie ihre Kontraktion einstellten. Herzähnliches, elastisches Material hingegen gewährte die kontinuierliche Kontraktilität der Kardiomyozyten [73]. Darüber hinaus kann die Größe und Oberflächenarchitektur synthetischer Fasern die Orientierung und Ausrichtung von Zellen modulieren [74–76]. Aus diesem Grund konzentrieren sich Studien auf den Nutzen mechanosensitiver Eigenschaften, als auch auf die Faserarchitektur von synthetischem Grundmaterial und deren Einfluss auf das Zellverhalten [77][78].

Trotz dieser Fortschritte bleibt zu beachten, dass z.B. beim Ersatz kleinkalibriger Gefäße ( $d < 6$  mm) synthetische Oberflächen in-vivo eine frühzeitige Thrombosierung des Lumens begünstigen können [19]. Zudem kann bei Fehlen von Bindungsproteinen die zelluläre Adhäsion erschwert werden, während im Langzeitverlauf neointimale Hyperplasien entstehen können. TE hat die Absicht, Nachteile der synthetischen Materialien zu minimieren, um von dessen Vorteilen zu profitieren. Daraus entsteht die Idee, synthetische und biologische Komponenten als Prothese zu kombinieren; die Hybrid-Prothesen.

## 2.5. *Hybridprothesen*

Eine Möglichkeit Hybridprothesen zu erschaffen besteht z.B. darin, die lumrale Oberfläche des synthetischen Rückgrats in-vitro mit autologen Zellpopulationen zu besiedeln, da diese in-vivo der Thrombosierung entgegen wirken können [18]. Andere beschichteten synthetische Oberflächen mit Glykosaminoglykanen, Fibronectin oder Antibiotika zugunsten der Biokompatibilität. Um dies zu ermöglichen, gibt es Voraussetzungen: Zum Beispiel der gezielte Umgang mit Zellkulturen. Diese müssen isoliert, kultiviert, auf Oberflächen beschichtet und kultiviert werden können. Chemische Liganden (z.B. Arg-Gly-Asp Sequenzen) können den Beschichtungsprozess erleichtern, sodass Zellen mit dem Rückgrat interagieren. Davon sind umso mehr vorhanden, desto größer die zu besiedelnde Oberfläche des Rückgrats ist, die sogenannte (specific surface area, SSA). Dem gegenüber steht eine dritte Notwendigkeit, die Porengröße (mean pore size, MPS): Zellen müssen das Material durchwandern können, genauso wie Moleküle uneingeschränkt in die Tiefe penetrieren müssen um den Stoffaustausch zu gewährleisten. Daraus folgt: Je größer die MPS, desto kleiner die SSA, desto kleiner die

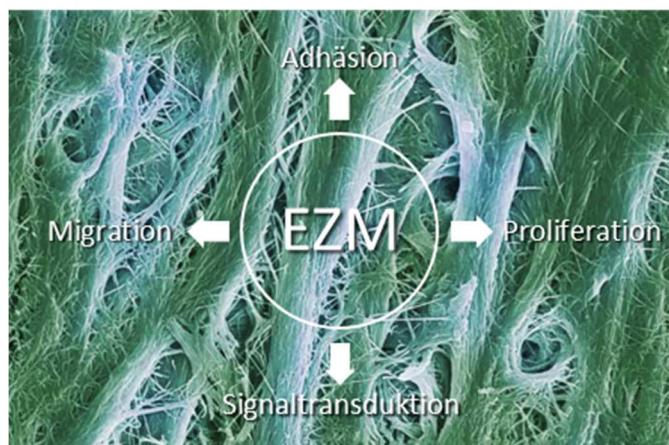
Ligandendichte [79, 80]. Die MPS eines hybriden scaffolds wird demnach durch Art des Rückgrats, dem Zelltyp und der Zielfunktion beeinflusst [81, 82]. Der synthetische Anteil hybrider Scaffolds kann weiterhin in resorbierbare und nicht-resorbierbare scaffolds unterteilt werden. Letztere degradieren im Laufe der Zeit in-vivo um von neuem Gewebe ersetzt zu werden [83–85]. Oft verwendete Polymere sind Polyglycolsäure (PGA), Polymilchsäure (PLA) und Polycaprolacton (PCL). Diese degradieren unterschiedlich schnell. Ein Polymer, welches anders als PGA, PLA etc., exklusiv für den Einsatz im TE konzipiert wurde, ist die Phosphoglycerinsäure (PGS) [86]. (Abbildung 10 zeigt ein vereinfachtes Schema für den Herstellungsansatz hybrider Prothesen.)



**Abbildung 10:**  
Vereinfachtes Prinzip einer Hybridprothese. Zellmaterial kann aus allogenen Spendern isoliert und in vitro kultiviert werden. Das synthetische Material bzw. Rückgrat wird mit den Zellkulturen beschichtet und diese ein weiteres Mal kultiviert, sodass EZM auf dem Material produziert wird. Anschließend werden die Proben dezellularisiert, sodass nur EZM auf dem für den Patienten bestimmten Material zurück bleibt.

## 2.6. Extrazelluläre Matrix und Dezellularisierung

Eine Vielzahl der durch TE hergestellten kardiovaskulären Prothesen, sowohl hybride als auch nicht hybride, entfalten ihr Potenzial durch die Anwesenheit bzw. den Nutzen einer EZM. Folgt man dem Entwurf der Natur, stellt die EZM die bestmögliche Umgebung für Zellverbände dar, sodass diese ihre physiologische Funktion erfüllen können [34]. Sie ist Allgegenwärtig, umfasst fast jedes Gewebe und leitet die Kommunikation der Zellen mit ihrer Umgebung. Durch Signalkaskaden erlaubt sie einen direkten Einfluss auf die Zelladhäsion, -migration, -proliferation und -differenzierung [87]. Sie ist weniger statisch, sondern ermöglicht die biodynamischen Interaktionen eines Gewebes, sodass Fibrosierungs-, Disseminierungs-, und Wundheilungsprozesse stattfinden können (siehe Abb. 11). Ein komplikationsloser Ablauf dieser Prozesse ist für das TE einer Prothese von zentraler Bedeutung. Grundsätzlich besteht die EZM aus zwei Bestandteilen: Der Grundsubstanz und den Fasern. Die Grundsubstanz bildet den ungeformten Teil und beinhaltet Glykosaminoglykane (GAG), Proteoglykane und Adhäsionsproteine wie Integrin und Fibronectin. Sie bilden eine Schnittstelle zwischen Matrix und Zellrezeptoren um Umbauprozesse im Gewebe zu ermöglichen. GAG und Proteoglykane binden als Polysaccharide, je nach Vorhandensein, unterschiedliche Mengen Botenstoffe und Wasser. Durch die variable hydrophile Eigenschaft besitzt die Grundsubstanz Einfluss auf die Gewebekonsistenz [88]. Der Anteil an Grundsubstanz kann, je nach physikalischen Anforderungen an das Gewebe, unterschiedlich groß sein und sich anpassen. Diese Anpassungsvorgänge erfordern einerseits die Registrierung von Stressstimuli und andererseits deren Übertragung bzw. Translation auf Zellverbände. Integrine und Fibronectine nehmen dabei eine Schlüsselrolle ein, da sie physikalische Stimuli aus der Umgebung für Zellen übersetzen, indem sie intrazelluläre Signalkaskaden initiieren [89, 90]. Hierdurch haben Zellen die



**Abbildung 11:**  
Rasterelektronenmikroskopische  
Aufnahme von Kollagenfibrillen der  
EZM.

Möglichkeit, auf eine veränderte Umgebung zu reagieren und Umbauprozesse in Gang zu setzen. Das Zusammenspiel von Zellen und umgebender EZM wird deutlicher, betrachtet man den Einfluss verschiedener Matrixkompositionen auf einen identischen Zelltyp: Pluripotente, embryogene Stammzellen, umgeben von einer kollagenreichen Matrix können als solche erhalten werden, wohingegen das mehrheitliche Vorhandensein von Laminin oder Fibronectin die Zelldifferenzierung induziert [87, 91]. Zudem können verschiedene Subtypen Laminins sogar den Differenzierungsweg beeinflussen: Unter Anwesenheit von Laminin-111 erfolgt eine neuronale Differenzierung, während Laminin-322 eine osteogene Stammzelldifferenzierung induziert [92]. Proteine der Grundsubstanz binden zusätzlich Botenstoffe und Wachstumsfaktoren wie FGF (fibroblast growth factor) und VEGF (vascular endothelial growth factor). Dabei müssen Proteoglykane zuerst FGF binden, um FGF-assoziierte Signalkaskaden in Gang zu setzen. Je nach Zusammensetzung der Grundsubstanz ändert sich auch Verteilung, Präsentation und Aktivierung der Wachstumsfaktoren. Die Verteilung der Wachstumsfaktoren wiederum bestimmt das Organisationsmuster von Zellen (cell patterning) [93].

Zweiter großer Bestandteil der EZM sind die Fasern, hierzu gehören in erster Linie Kollagen- und Elastinfasern. Kollagene sind allgegenwärtig und von allen Proteinen die meist vorhandenen im menschlichen Körper [94]. Sie verleihen dem Gewebe Zugfestigkeit, da sie in ihrer Längsrichtung nicht dehnbar sind. Jedes auf Zug beanspruchte Bindegewebe enthält Kollagenfasern in belastungsadaptierter Ausrichtung. Von den insgesamt 27 bekannten verschiedenen Proteinen aus der Familie der Kollagene sind Typ I und IV am weitesten verbreitet [95]. Sie sind u.a. Bestandteil der Basallamina. Diese ist eine spezialisierte EZM-Schicht in welche manche Zellen an ihrer Basis verankert sind. Zudem ist sie eine Leitschiene für Zellmigration und übt Einfluss auf Zellstoffwechsel und -Differenzierung aus [96]. Die biochemischen Interaktionsprozesse und Eigenschaften der EZM verdeutlichen deren Relevanz für künstlich hergestelltes Gewebe, sodass eine Vielzahl der Versuchsansätze im TE auf der Anwesenheit einer EZM basieren. Dabei ist deren Synthese durch Zellen wie z.B. den FB eine Grundvoraussetzung, da eine vollwertige EZM bis heute nicht synthetisch hergestellt werden kann. Vereinzelt wurde versucht, Prothesen mit einzelnen Bestandteilen der Matrix wie z.B. Fibronectin zu beschichten. Dabei wird jedoch das Auftreten von neointimalen Hyperplasien in-situ beobachtet [97]. Die Synthese von EZM durch FB ist dahingehend ein Problem, als dass TE Prothesen zugunsten der immunologischen Verträglichkeit bei der Implantation (mit der Ausnahme autologer Herkunft)

frei von Zellen sein sollten. Hier wird nach Wegen geforscht, Zellen nach ausreichender Synthese der EZM von den synthetischen oder biologischen Materialien zu entfernen. Im Mittelpunkt stehen daher Dezellularisierungsprotokolle (DP), welche Zellen beseitigen und gleichzeitig die EZM erhalten. Es existieren unzählige DP. (Tabelle 2 und 3 geben einen Überblick von oft eingesetzten Substanzen bzw. Protokollen im TE.) Komponenten und Abläufe der Protokolle unterscheiden sich in Abhängigkeit vom zu dezellularisierendem Material. Dabei kommen Detergenzien, osmotische oder enzymatische Lösungen zum Einsatz [98, 99]. Detergenzien sind Moleküle mit amphiphilem Charakter, d.h. sie sind hydrophil und zugleich hydrophob. Sie binden mit Hilfe von Wasser schwerlösliche hydrophobe Substanzen, so dass diese entfernt werden können. Zelluläre Strukturen werden aufgelöst und Proteine denaturiert [100]. Natriumdodecylsulfat (SDS), Desoxycholsäure (SD) und Triton X-100 (TX-100) werden in unterschiedlicher Kombination und Konzentration oft im Rahmen von Dezellularisierungsprozessen genutzt. SDS ist ein anionisches Tensid und denaturiert Proteine, indem es nichtkovalente Bindungen unterbricht und so Quartär- und Tertiärstrukturen auflöst [101]. SD ist ebenfalls ein anionisches Tensid und gehört zu den sekundären Gallensäuren. Es wird als Stoffwechselprodukt von intestinalen Bakterien synthetisiert und dient dem Zellaufschluss sowie dem Lösen von Membranproteinen [102]. TX-100 ist ein nicht-ionischer Surfactant und hat ein breites Anwendungsspektrum im Labor: Hierzu gehört die Zelllyse, Extraktion von Proteinen und Organellen, Membranpermeabilisierung etc. [103]. Enzymatische Komponenten wie z.B. Trypsin oder Nukleaseen hydrolisieren Peptidbindungen bzw. lösen Nukleinsäuren, wodurch besonders die Degradation von genetischem Material gefördert wird [104]. Fremde DNA kann, ähnlich wie andere Zellbestandteile, Abstoßungsreaktionen provozieren [105, 106]. Eine effektive Dezellularisierung umfasst also auch die Entfernung genetischen Materials. Enzyme werden selten isoliert angewandt. Wenn DP Enzyme enthalten, dann meist in Kombination mit Detergenzien. Eine weitere Methode zur Dezellularisierung besteht in der Anwendung von osmotisch wirksamen Lösungen. Hierbei wird der Intrazellulärraum mit kleinmolekularen Substanzen aufgesättigt, um die Zelle anschließend einem hypotonen Medium auszusetzen. Im Zuge dessen provoziert ein hoher Wasserinflux das Anschwellen der Zelle, wodurch eine Ruptur der Zellmembran oder die Apoptose ausgelöst werden kann [107]. Diese und weitere Dezellularisierungsmethoden sind Gegenstand aktueller Forschungen.

**Tabelle 2:** Tabellarische Übersicht häufig verwendeter Dezellularisierungskomponenten.

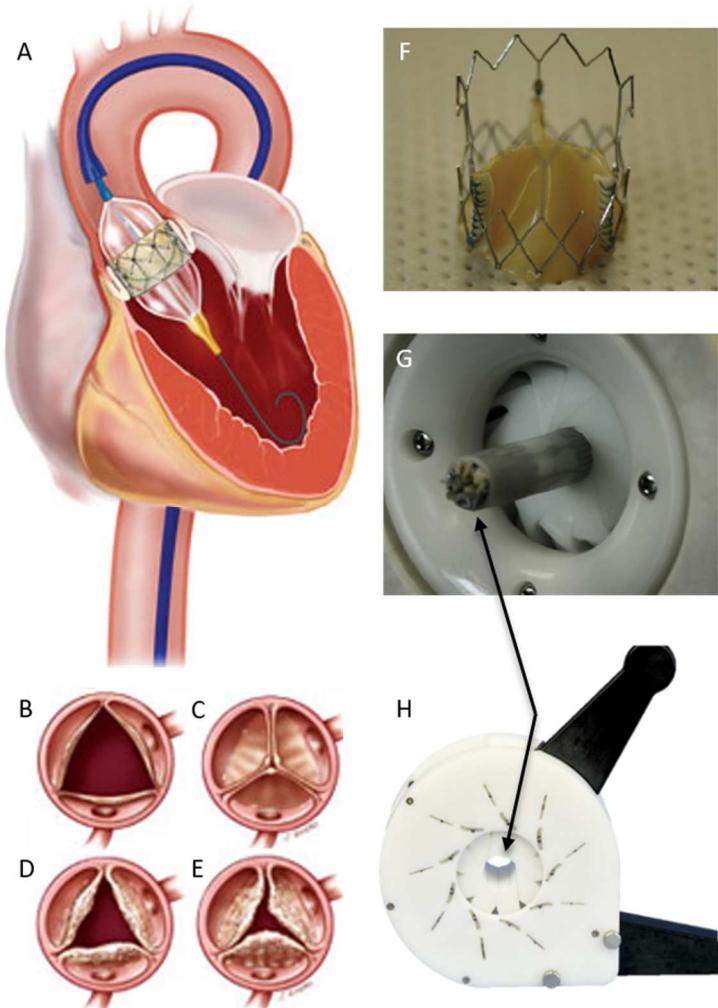
| Komponente                    | Typ                                 | Funktion  |
|-------------------------------|-------------------------------------|---|
| SD                            | Anionisches Tensid                  | Zellaufschluss und Solubilisierung von Membranproteinen |
| SDS                           | Anionisches Tensid                  | Denaturierung von Proteinen                             |
| Triton X-100 bzw. Octoxinol 9 | Nichtionisches Tensid               | Löst Membranproteine ohne Denaturierung                 |
| EDTA                          | Komplexbildner und Oxidationsmittel | Komplexierung von Calcium- und Magnesiumkationen        |
| Nukleasen                     | Enzymgruppe                         | Abbau von Nukleinsäuren                                 |
| Trypsin                       | Enzym                               | Lösung bestimmter Aminosäuresequenzen (Serinprotease)   |
| Hypertone / Hypotone Lösungen | Osmotischer Effekt                  | -   |

| Gewebequelle                          | Dezellularisierungs methode                            | Rezellularisierungs methode                                    | Merkmale  | Literaturquelle |
|---------------------------------------|--|--|---|-----------------|
| Mitralklappen (Schwein)               | SD   | In vivo (Schwein)  | Großflächige Fibrin- und Erythrozytenablagerungen. Limitierte Proliferation von Endothelzellen in vivo. | [108]           |
| Pulmonalklappen (Schwein)             | SD   | In vivo (Schaf)  | Zellyse bei Erhalt von Proteoglykanen   | [109,110]       |
| Aorten- und Pulmonalklappe (Schwein)  | TOPOE <sup>1</sup> + SD vs. Trypsin + SDS <sup>2</sup> | In vitro mit menschlichen Endothelzellen und Myofibroblasten   | Toxischer Einfluss von SDS auf EC. TOPOE + SD entfernen alle Zellen, Rezellularisierung möglich         | [111]           |
| Pulmonalklappen (Schwein)             | TX-100 + Ammoniumhydroxid                              | In vitro mit autologen endothelialen Progenitorzellen          | Endothelialisierung ohne Thrombus- oder Kalkformation. Gute mechanische Eigenschaften                   | [112]           |
| Aorten- und Pulmonalconduit (Schwein) | TX-100 + Hypotone Waschlösung                          | Keine  | Inhomogene Verteilung von Elastin und GAG6  | [113]           |
| Aortenklappen (Schwein)               | TX-100 vs. Trypsin                                     | In vitro mit EC <sup>3</sup>                                   | Veränderungen der EZM Komposition durch beide Protokolle  | [114]           |
| Pulmonalconduit (Schwein und Schaf)   | Trypsin + EDTA <sup>4</sup>                            | In vivo nach Implantation in Schweine                          | Wiederherstellung einer luminalen Endothelzellschicht. Kalzifikationen.                                 | [115]           |
| Aortenklappen (Schwein)               | Polyethylen glycol + Gammastrahlung                    | In vivo in Subkutis von Ratten und Aorta descendens von Hunden | Gute Rezellularisation. EZM Gehalt und mechanische Eigenschaften ähnlich einer nativen Prothese         | [116]           |

**Tabelle 3:** Beispielversuche mit Dezellularisierungsprotokollen für die Herstellung von TEHV.

Abkürzungen: 1= *Tert-octylphenyl-polyoxyethylene*, 2= *Natriumdesoxycholsäre*, 3= *Endothelzellen*, 4= *Ethyldiamintetraessigsäure*

Dabei muss betont werden, dass unterschiedliche Protokolle selten in vergleichender Absicht am selben Material angewandt wurden. Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht deshalb eine vergleichende Studie von DP an zellbeschichtetem Polyurethan um die Grundlage für ein neues Prothesenmaterial zu schaffen. Als langfristiges Ziel beabsichtigen wir dessen Einsatz in kardiovaskulären Prothesen, z.B. Aortenklappenimplantaten. Bisher verwendete Prothesen sind biologischer oder mechanischer Natur [117]. Erstere sind xenogener Herkunft und besitzen durch die Fixations- und Demineralisierungsprozesse eine begrenzte Haltbarkeit. Mechanische Prothesen, meist auf Karbon basierend, sind lebenslang haltbar. Das Kunstmaterial birgt allerdings das Risiko hämorrhagischer und thrombembolischer Komplikationen, sodass nach Implantation eine lebenslange medikamentöse Prophylaxe notwendig wird [118, 119]. Als Reaktion auf diese Nachteile und Komplikationen reagiert das Feld um TE mit zahlreichen Versuchen, neuartige Herzklappenprothesen basierend auf DP herzustellen. Weitere Herausforderungen entstehen durch neue Operationstechniken- und Indikationen, welche im Folgenden vorgestellt werden.



**Abbildung 12:** Schematische Darstellung einer Transkatheter-Aortenklappen-Implantation (TAVI) über die arterielle Strombahn (A). Offene und geschlossene Aortenklappe in physiologischem (B, C) bzw. stenosiertem Zustand (D, E). Gestentete Aortenklappe vor Implantation (F). Mit einem crimper (G, H) wird die Klappe unter mechanischem Druck auf ein Minimum des Durchmessers eingefalzt (Pfeile).<sup>7</sup>

## **2.7. Neue Herausforderungen durch minimalinvasiven Aortenklappenersatz**

Hauptindikationen für den Klappenersatz sind die Aortenklappenstenose und Aortenklappeninsuffizienz. Unter den Herzklappenfehlern ist die Aortenstenose mit 43,1% die häufigste Form (Abb. 12). Aortenklappeninsuffizienzen stellen 13,3% der Klappenerkrankungen dar. Über einem Alter von 65 Jahren hat die Stenose eine Prävalenz von 3% in der europäischen Bevölkerung. Der Pathogenese liegen meist atherosklerose-ähnliche Prozesse zu Grunde, welche auch Gefäße betreffen. 50% aller Aortenstenosen im Alter über 70 sind auf diese Prozesse zurückzuführen. Daneben existieren rheumatische und kongenitale Ursachen [120]. Die am häufigsten eingesetzte Therapieoption für diese Erkrankungen sind chirurgische Interventionen, während medikamentöse Therapieansätze eine untergeordnete Rolle spielen. Von insgesamt 98.860 Eingriffen am Herzen im Jahre 2005, hatten Klappenoperationen einen Anteil von 19% (alle Daten beziehen sich auf Deutschland, sofern nicht anders angegeben). Mit einem Anteil von 31% im Jahre 2014 ist diese Tendenz bis heute steigend. Die Gesamtzahl der Operationen stagniert dabei. Von allen Klappenoperationen bildet der isolierte Aortenklappenersatz mit 65% den größten Anteil, dieser wurde im Jahre 2015 20.512-mal durchgeführt. Für den Klappenersatz existieren zwei Operationsmethoden: Zum einen der konventionelle, „offene“ Aortenklappenersatz mittels Thorakotomie und Einsatz einer Herz-Lungen-Maschine. Zum anderen die Implantation einer Herzklappe über einen perkutan eingebrachten Katheter (transcatheter aortic valve implantation, TAVI). Mit Umgehung der offenen Thorakotomie wird der Katheter über die arterielle Strombahn (oder die Herzspitze) bis bzw. über die Herzkammer vorgeführt, sodass die neue Aortenklappenprothese über diesen auf Höhe der nativen Aortenklappe positioniert und fixiert werden kann (siehe Abb. 12) [121]. Diese Form des minimalinvasiven Eingriffs wurde in Deutschland erstmals 2006 dokumentiert und hatte damals einen Anteil von 0,7% der isolierten Aortenklappenersatzoperationen. Dieser Anteil nahm im Laufe der Jahre zu: 7,0% (2008), 23,9% (2010), 35,5% (2012) [117]. TAVI sind bisher überwiegend Patienten mit hohem Operationsrisiko vorbehalten, allerdings sind Indikationsausweiterungen Gegenstand aktueller Diskussionen [122].

Die zunehmende Relevanz des Eingriffs geht mit neuen Anforderungen an das Prothesenmaterial einher. Voraussetzung für den Zugang über den kleinen Durchmesser einer

Arterie oder der Herzspitze ist das sogenannte Crimping (Abb. 12). Dieser Prozess beschreibt das „Zusammendrücken“ oder „Einfalten“ des Materials auf einen minimalen Durchmesser. Dieser ist notwendig, um die Prothese über die arterielle Strombahn, z.B. über Leistenarterien zu führen. Durch die hohe mechanische Belastung während des Crimpens können relevante Strukturschäden entstehen. Alavi et al. zeigten, dass auf Grund der mechanischen Belastung signifikante Schäden in Form von Rissen, besonders in den äußeren Schichten biologischer Prothesen entstehen [123]. Zu dem selben Fazit kommen Khoffi et al., wobei anschließende mechanische Stresstests eine deutliche Abnahme um bis zu 50% in Materialstärke- und Resilienz im Vergleich zu nicht-gecrimpnten Kontrollen zeigen [124]. Um die Folgen der Schäden zu präzisieren, untersuchten Convelbo et al. die Auswirkungen bezüglich der Flüssigkeitspermeabilität des Materials. Hierbei wurde eine deutliche Zunahme der Permeabilität in Folge des crimpens beobachtet [125].

## 2.8. *Ziel der Arbeit*

Zahlreiche Nachteile von derzeitigen Prothesen als auch neue Operations- bzw. Applikationsstrategien betonen die Dringlichkeit für eine neue Generation von Implantaten. Um dieser Aufgabe beizutragen, versuchen wir mittels TE neue Lösungsansätze zu entwerfen. Im Rahmen von drei Versuchen untersuchen wir die Effektivität unterschiedlicher Dezellularisierungsprotokolle an mit FB beschichtetem PU. Im ersten Versuch, der Proliferationsevaluation, wird die Voraussetzung der Dezellularisierung geschaffen: PU wird mit FB besät und anschließend die optimale Dauer der Kultivierungszeit bestimmt, sodass eine konfluente Zell- und EZM-Schicht vorhanden ist. Für den Dezellularisierungsversuch werden sechs verschiedene Dezellularisierungsprotokolle angewandt. Die resultierenden Proben werden in Hinblick auf Verbleib von DNA, FB und EZM untersucht. Proben, welche die besten Ergebnisse liefern, werden bei der Permeabilitätstestung in Bezug auf ihre Wasserpermeabilität untersucht.

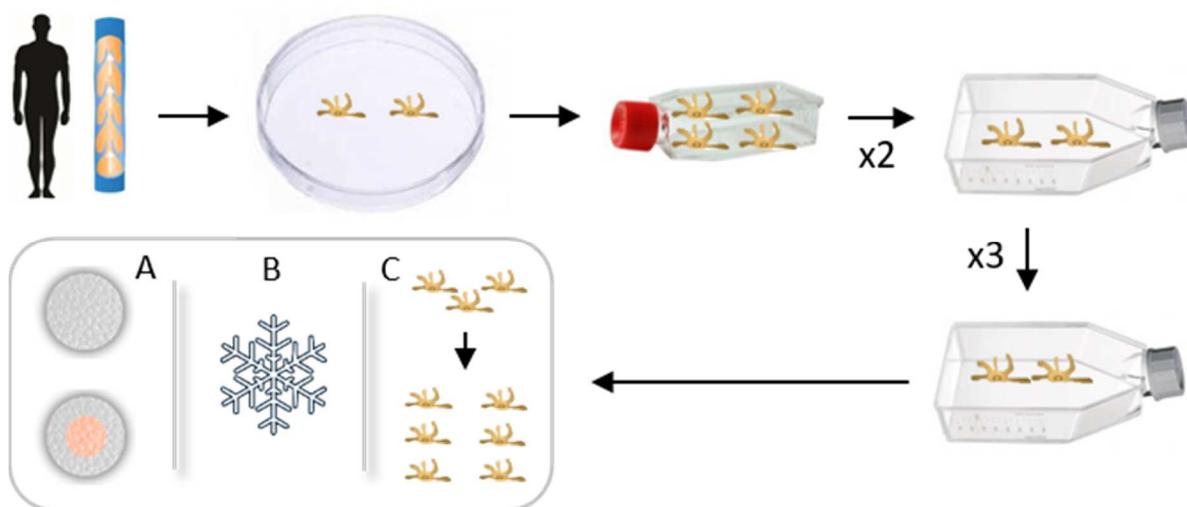
### **3. Material und Methoden**

#### **3.1. Enzymatische Isolierung der Fibroblasten aus Venensegmenten**

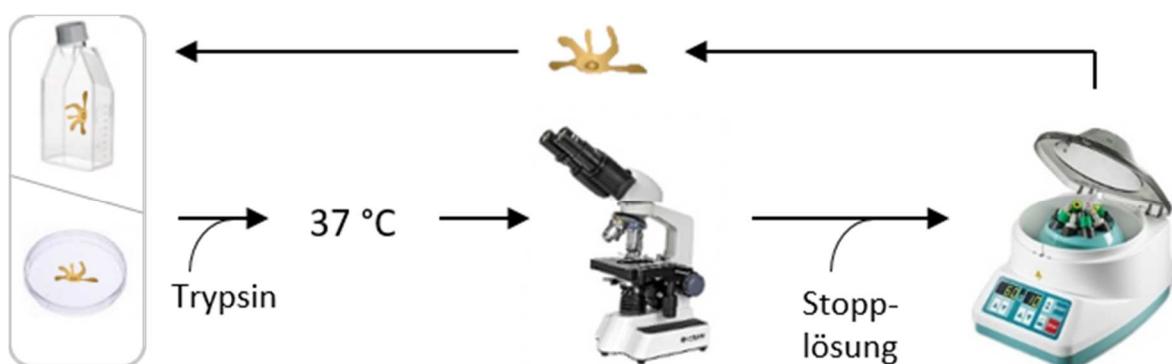
Aus Bypass-OPs verbleibende Segmente der V. saphena magna wurden für maximal 10 Tage in einem 50 ml Röhrchen (Schraubröhre 50 ml, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland) mit 20 ml Earle's 199 Medium (M199; Biochrom AG, Berlin, Deutschland) und 0,2% Penicillin-Streptomycin (PenStrep; Sigma-Aldrich GmbH, St.Louis, USA) bei 4 °C gelagert. Die Einwilligung für den Gebrauch von Venensegmenten (Restmaterial) der Patienten wurde vor der Operation eingeholt, anschließend wurden diese Proben irreversibel anonymisiert. Diese Vorgehensweise wurde durch die Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München genehmigt. Unter der Abzugshaube wurde der Stempel einer 2 ml Spritze (Sarstedt) mit hochviskoser Silikonpaste (Baysilone Paste 25 g, GE Bayer Silicones, Leverkusen, Deutschland) bedeckt. Danach auf einer 100 mm Petrischale (Sarstedt) randständig zweimal vier Tropfen der Paste platziert, sodass 4 Tropfen im Abstand von 2 cm die Ecken eines Quadrates bilden. Von dem Venensegment wurde ein ca. 1,5 cm großes Stück mit Skalpell (Skalpell Nr. 20, Feather Safety, RazorCo. LTD, Japan) abgetrennt, im Längsschnitt eröffnet und wieder in ca. 1 x 1 mm große Fragmente geschnitten um anschließend in gleicher Anzahl innerhalb der durch Silikontropfen gebildeten Quadrate platziert zu werden. Dann wurden die 2 Quadrate durch ein 24 x 24mm Deckglas (Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) fest abgedeckt. 12 ml Fibroblastenkulturmedium (FKM) wurde daraufhin an die Ränder der Quadrate pipettiert, damit dieses luftblasenfrei unter die Deckgläser lief. FKM bestand aus folgenden Anteilen: Zu 89,1% aus Fibroblast Growth Medium (Promocell GmbH, Heidelberg, Deutschland), zu 8,9% aus fetal calf serum (Biochrom AG), zu 1,8% aus supplement growth mix (Promocell GmbH) und zu 0,2% aus PenStrep. Anschließend wurde die Petrischale mit Deckel verschlossen und bei 37 °C / 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Nach fünf Tagen entnahm man die Hälfte des FKM (6 ml) und ersetzte es durch neues. Danach wurde alle 2 bis 3 Tage das FKM zur Hälfte ersetzt.

### *3.2. Zellpassage und Kultivierung*

Bei Zellkonfluenz erfolgte die erste Passage, sodass die Zellen mittels Trypsinlösung auf Kulturflaschen mit größerer Wachstumsfläche verteilt wurden. Die Lösung enthielt zu 5% Trypsin (Sigma-Aldrich) in PBS (Sigma-Aldrich). Für die erste Passage wurde FKM aus der Petrischale abpipettiert, 12 ml PBS hinzugegeben und die mit Silikon haftenden Deckgläser mit einer Kanüle vorsichtig abgehoben und umgeklappt. PBS wurde dann abpipettiert, 5 ml Trypsinlösung hinzugegeben und bei offener Petrischale 2 min in den Brutschrank gestellt. Anschließend wurde die Petrischale leicht geklopft und die gelöste Zellmenge im Lichtmikroskop (Axiovert 35, Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland) bei 100-facher Vergrößerung beurteilt: Sofern alle Zellen von der Petrischale gelöst waren (ggf. wieder für eine min in den Brutschrank stellen), konnten sofort 15 ml Stopplösung hinzugegeben und die Zellsuspension in ein 50 ml Röhrchen überführt werden. Die Stopplösung bestand zu 60% aus M199 und zu 40% aus FCS. Anschließend wurde die Zellsuspension 5 min bei 500 g zentrifugiert (Rotina 46R, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland), der Überstand abpipettiert, das Zellpellet mit 7 ml FKM resuspendiert und in eine T25 Kulturflasche (T25; TC Flask 25 Vented Cap, Sarstedt) überführt. Die Lagerung im Brutschrank erfolgte bis zum Erreichen der Zellkonfluenz, während alle 2 bis 3 Tage FKM zur Hälfte ersetzt wurde. Die zweite Passage folgte dem gleichen Protokoll. Nach Zentrifugation resuspendierte man das Zellpellet in 20 ml FKM, jeweils 10 ml davon wurden anschließend in eine T175 Kulturflasche (T175; TC Flask 125 Vented Cap, Sarstedt) überführt, sodass die Zellsuspension zu gleichen Anteilen auf 2 T175 verteilt wurde. Unter Hinzugabe von 20 ml FKM in beide T175 (insgesamt 30 ml pro T175) konnten die Kulturflaschen bis zum Erreichen der Zellkonfluenz bei regelmäßigem Austausch des FKM im Brutschrank verwahrt werden. Ab der dritten Passage wurde die Zellsuspension einer T175 auf 3 neue T175 aufgeteilt. Je nachdem wie viele Zellen für einen Versuch erforderlich waren, erfolgten maximal 7 Passagezyklen. (Abbildung 13A und B zeigen ein vereinfachtes Schema für die Isolierung, Kultivierung und Trypsinierung von FB.)



**Abbildung 13A:** Isolierungs- und Kultivierungszyklen von FB. FB wurden in der ersten Passage mittels Trypsin aus der Vene isoliert und für bis zu 14 Tage auf einer Petrischale bis zur vollständigen Zellkonfluenz kultiviert. In der zweiten Passage erfolgte die Kultivierung der FB auf einer T25 Kulturflasche für 10 bis 14 Tage. In der dritten Passage wurden die Zellen einer T25 auf 2 T175 trypsiniert. Nach Erreichen der Zellkonfluenz konnten beide Kulturflaschen in der vierten Passage jeweils auf 3, also insgesamt 6 T175 trypsiniert und erneut kultiviert werden. Anschließend konnte für die Versuche PU beschichtet (A), die Zellen kryokonserviert (B) oder weiter kultiviert werden (C).



**Abbildung 13B:** Vereinfachtes Schema der Zelltrypsinierung. Die mit Trypsin bedeckte Zellkultur wurde bei 37°C im Brutschrank inkubiert und via Lichtmikroskop beurteilt. Unter Hinzugabe der Stopplösung konnte die Zelllösung zentrifugiert und der Zellüberstand ggf. für neuen Kultivierungszyklus verwendet werden.

### *3.3. Einfrieren und Auftauen der Zellen*

Zellen konnten bis zur Verwendung für die Versuche kryokonserviert werden. Je nach Zellmengenbedarf wurden zellkonfluente T175 (enthalten ~3 Mio. Zellen) trypsiniert und bei -80 °C kryonserviert. Zum Trypsinieren und Einfrieren von Zellen einer T175 wurde das FKM abpipettiert, 90 s mit 14 ml PBS gespült, anschließend wieder entfernt und letztlich 5 ml Trypsinlösung hinzugegeben und die T175 für 5 min in den Brutschrank gestellt um die gelöste Zellmenge im Lichtmikroskop zu beurteilen. Nach Hinzugabe von 15 ml Stopplösung wurde die T175 hochkant aufgestellt, die Zellsuspension in ein 50 ml Röhrchen überführt und 5 min bei 500 g zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Verteilung von Zellen einer T175 auf 3 1,8 ml Kryovials (Sarstedt). Hierzu wurden pro Kryovial 1,5 ml Kryomedium benötigt (4,5 ml insgesamt). Die Lösung bestand zu 70% aus FKM, zu 20% aus FCS und zu 10% aus Dimethylsulfoxid (DSMO; Sigma-Aldrich). Nach Zentrifugation wurde das Zellpellet mit dem gesamten Kryomedium resuspendiert, zügig jeweils 1,5 ml in ein Kryovial pipettiert (~1 Mio. Zellen pro Kryovial) und bei -80°C in flüssigem Stickstoff gelagert. Kryokonservierte Zellen wurden in Abhängigkeit vom Versuchsaufbau in unterschiedlicher Menge aufgetaut. Folgendes beschreibt das Auftauen am Beispiel zweier Kryovials: Nach Ansetzen einer Auftaulösung, welche zu 2/3 aus M199 und zu 1/3 aus FCS bestand, erfolgte das Antauen der Kryovials für ca. 3 min im 37°C Wasserbad (Julabo SW23, Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland). Anschließend wurden 6 ml der Auftaulösung aufgezogen, vorsichtig in das Kryovial auf- und abpipettiert und die gesamte Zelllösung zurück in das 50 ml Röhrchen der Auftaulösung gegeben. Gleiches Vorgehen wurde beim nächsten Kryovial wiederholt, bis alle Zellen gelöst waren, um nach Zentrifugation für 5 min bei 500 g der gesamten Auftaulösung (ca. 15 ml) den Überstand zu verwerfen. Das Zellpellet konnte entweder zur weiteren Kultivierung mit FKM resuspendiert oder einer Zellzählung zur Besiedelung des PU unterzogen werden.

### **3.4. Zellbeschichtung- und Kultivierung auf Polyurethan**

Um kultivierte Zellpopulationen auf das elektrogesponnene PU zu übertragen bedarf es zuerst einer Zellzählung. Aus Erfahrungswerten vergangener Versuche des Labors wurde festgelegt, dass 1 cm<sup>2</sup> PU mit ~750.000 FB beschichtet wird [126]. Im Rahmen dieser Versuche betrug die zu besiedelnde kreisförmige Oberfläche der Patche 1,038 cm<sup>2</sup>. Somit wurden aufgerundet 780.000 FB pro Patch benötigt. Frühere Versuche des Labors zählten pro konfluenter T175 ~3 Mio. Zellen. Dieser Richtwert diente für eine grobe Zellzählung im Voraus. Als erstes wurden PU Matten (ITV Denkendorf GmbH, Denkendorf, Deutschland) mittels Skalpell unter sterilen Bedingungen in Quadrate mit einer Seitenlänge von ca. 1,3 cm zerschnitten und die Ecken abgetrennt, sodass Achtecke entstanden. Nachdem die Patche in 12-well Zellkulturplatten (ZK, Zellkultur Testplatten 6-92406, TPP Techno Plastic Products AG Tissue, Trasadingen, Schweiz) gelegt wurden, konnten zylindrische Teflonringe (Durchmesser d = 1,15 cm, Wandstärke 1 mm, h = 1 cm) mittig auf die Patche platziert und für 1 min fest angedrückt werden.

Im Folgenden wird die Zellzählung anhand eines Beispiels dargestellt: Ziel war es, 20 PU Patche mit jeweils ~780.000 FB zu besiedeln. Hierzu benötigte man insgesamt 15.600.000 FB (6 konfluente T175). Nach Trypsinierung und Zentrifugation resuspendierte man alle Zellen mit 10 ml FKM (Lösung #1). Mittels Einmalpipette wurde davon 1 Tropfen in ein Eppendorfröhrchen (Sarstedt) überführt, wovon man 20 µl mit 80 µl einer Trypanblaulösung (Trypan Blue solution 0,4%, Sigma-Aldrich) in einem neuen Eppendorfröhrchen mischte (insg. 100 µl = Lösung #2). Davon wurden 10 µl in eine Neubauer-Zählkammer (C-Chip, Biochrom AG) pipettiert, um unter dem Lichtmikroskop mit 100x Vergrößerung alle Zellen innerhalb der 4 Eckquadranten zu zählen. Diese Zellzahl (in diesem Beispiel Y=133) musste nun auf die in der Ursprungslösung (10ml) vorhandenen Zellen (Z<sub>gesamt</sub>) hochgerechnet werden. Dazu diente folgende Formel:

$$Z_{\text{gesamt}} = \frac{Y}{4} \times 5 \times 100.000$$

$$\text{bzw. } Z_{\text{ges}} = \frac{133}{4} \times 5 \times 100.000 = 16.650.000 \text{ (Beispiel)}$$

Erklärung: Zellzahl Y musste durch die Anzahl der Quadranten (n=4) dividiert und mit dem Verdünnungsfaktor der Lösung #2 multipliziert (100:20 = 5) werden. Der Multiplikationsfaktor 100.000 errechnet das Volumen der Zellzählkammer (0,1mm<sup>3</sup>), hochgerechnet auf 10ml:

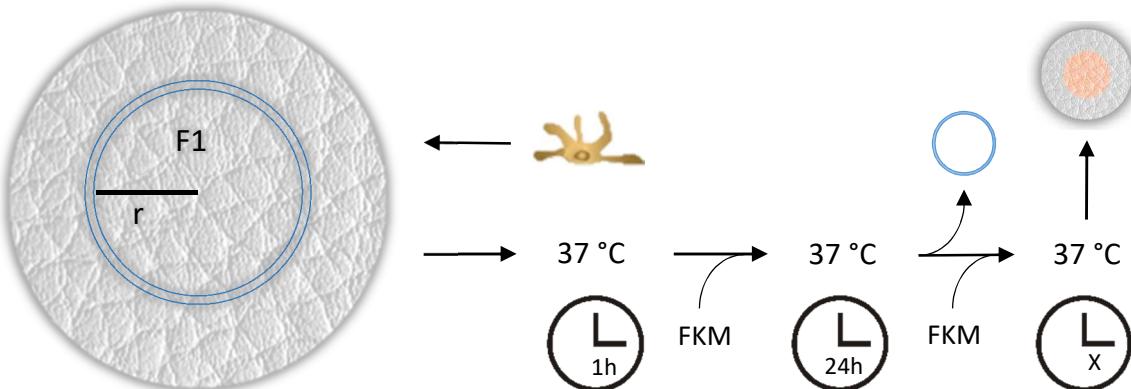
$$0,1\text{mm}^3 \times 100.000 = 10000\text{mm}^3 = 0,01L = 10\text{ml (Beispiel)}$$

Im Beispiel beträgt  $Z_{\text{gesamt}} = 16.650.000$ . Als nächstes wurde errechnet, welches Volumen  $\sim 780.000$  Zellen enthielt ( $V$ ). Hierzu musste der Faktor  $F$  bestimmt werden, welcher mit 10ml verrechnet wurde. Um  $F$  zu erhalten, musste man  $Z_{\text{gesamt}}$  im Verhältnis zu 780.000 setzen.

$$\frac{780.000}{Z_{\text{gesamt}}} = F \quad \text{bzw.} \quad \frac{780.000}{16.650.000} = 0,046847 \text{ (Beispiel)}$$

In Bezug auf 10ml:

$$10 \text{ ml} \times F = V \text{ in ml} \quad \text{bzw.} \quad 10 \text{ ml} \times 0,046847 = 0,46847 \text{ ml} = 468 \mu\text{l}$$



**Abbildung 14:** Vereinfachte Darstellung des Beschichtungsprozesses von PU mit FB. Durch den festgelegten Radius  $r = 0,575 \text{ cm}$  des Teflonrings (blau) ergibt sich die mit  $\sim 780.000$  FB zu beschichtende Fläche  $F1 = 1,038 \text{ cm}^2$ . Die Zelllösung wurde auf diese pipettiert und für eine Stunde bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach Hinzugabe der individuellen Restmenge von FKM wurde weitere 24 h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert, um anschließend den Teflonring zu entfernen, FKM hinzuzugeben und die Proben für eine definierte Zeit (abhängig vom Versuch) bei  $37^\circ\text{C}$  zu kultivieren

Anschließend pipettierte man auf jeden Patch V ml aus Lösung #1 innerhalb des Teflonrings und stellte ihn in den Brutschrank, um nach einer Stunde die pipettierte Lösung (468 µl) auf 1 ml mit FKM zu ergänzen (hier: +532 µl) und wieder im Brutschrank zu verwahren. Nach 24h wurden die Teflonringe mittels steriler Pinzette entfernt, weitere 1,5 ml FKM pro PU-Probe hinzugegeben und die ZK zur weiteren Kultivierung in den Brutschrank gestellt (Abb. 14). Das FKM wurde alle 2 Tage zur Hälfte ersetzt. Nach Ablauf der Kultivierungsdauer mussten die Patches mit PBS gespült werden, hierzu hat man das FKM abpipettiert und durch die gleiche Menge an PBS ersetzt. Die ZK wurden anschließend kurz geschwenkt und das Vorgehen einmal wiederholt. Daraufhin konnten die Proben dezellularisiert oder ausgewertet werden. Die Proben wurden halbiert und jede Hälfte in ein 15 ml Röhrchen (Sarstedt) überführt, um die anschließende Auswertung mit immunhistochemischer Färbung (IHC) und Rasterelektronenmikroskopie zu ermöglichen. Die für die IHC bzw. REM bestimmten Röhrchen wurden mit 5 ml 37% Formalinlösung (SAV Liquid Production GmbH, Flintsbach am Inn, Deutschland) bzw. FIX2-Lösung (REM) befüllt und bis zur Auswertung bei -4°C gelagert. Für die DAPI-Färbung konnten ganze Patches in Kryovials ohne Zusatz bei -80°C eingefroren werden.

### ***3.5. Immunhistochemische Färbung***

Die Proben wurden zunächst einer aufsteigenden Alkoholreihe unterzogen, um diese in Paraffinblöcke einzubetten und Schnitte für die Färbungen zu gewinnen. Hierfür gab man die Proben zuerst in (beschriftete) Histologiekassetten, um sie bis zum nächsten Schritt in Formalin zu verwahren. Die Kassetten wurden dann ca. 6 Sekunden in destilliertem Wasser gewaschen und anschließend 30 Sekunden in Hämalaunlösung gebadet. Die Hämalaunlösung bestand zu 25% aus Hämalaun (Mayers Hämalaun, Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland) in PBS. Daraufhin erfolgte die Spülung der Kassetten für ca. 30 Sekunden mit Leitungswasser, bis alle Farbrückstände entfernt waren. Anschließend wurden 200 ml von Alkohollösungen (SAV-Liquid Production) mit unterschiedlichem Ethanolgehalt (EtOH) in einzelne Glasschalen gefüllt: 2x 70% EtOH, 2x 96% EtOH und 1x 100% EtOH. Die Kassetten wurden anschließend nacheinander in der aufsteigenden Alkoholreihe gebadet und anschließend 3 min in 200 ml Xylol (SAV-Liquid Production) überführt. Daraufhin wurden die Proben 12-16 h im flüssigen Paraffinbad bei 62°C

(Model E-650, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) verwahrt. Beim Einbetten einer Probe wurde der Deckel der Kassette verworfen und der Boden aufgehoben. Anschließend wurde Paraffin (Paraffin 42-44, Merck KgaA) in eine dichte Gussform aus Metall gegeben und die Probe darin senkrecht und mittig platziert. Nun konnte der undichte Boden der Kassette oben aufgesetzt und erneut mit ca. 3 ml Paraffin übergossen werden, sodass das Metallbett einschließlich Probe auf gekühlter Fläche bei -10°C für mindestens 10 min ruhte. Danach wurde der Paraffinblock vom Metallbett gelöst und bei -5°C gelagert. Von jeder Probe (ein Paraffinblock) wurden am Microtom (Microm KS 34, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) 20 x 5 bis 7 µm dicke Schnitte angefertigt und für 5 min in 48°C warmes und destilliertes Wasser (Ampuwa, Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Deutschland) gegeben. Mit einem Objektträger (OT; Superfrost, Thermo Fisher Scientific) konnten jeweils 2 Schnitte aus dem Wasserbad gesammelt und beschriftet werden. Anschließend wurden diese für 10 min bei Raumtemperatur (RT) und 12-16 h bei 37°C getrocknet und bei RT verwahrt. An 6 der 10 OT erfolgten unterschiedliche Färbungen, 4 dienten als Reserve.

Für die IHC Färbung mussten die OT in Färbekuvetten für 30 min bei 50°C zunächst inkubiert werden. Zur Entparaffinierung wurden die OT 2x 7 min in Roti®-Histol (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) gebadet. Dann wurden jeweils 2 vierminütige Badezyklen in 200 ml 100%, 96% und 70% EtOH (insg. sechs Zyklen, also 24 min) in wechselnden Färbekuvetten vollzogen. Zur Entfernung des Alkohols wurden die OT 2x 3 min in 200 ml destilliertem Wasser und 2x 3 min in 200 ml PBS gebadet (Waschzyklus #1). Die Zellmembranpermeabilisierung erfolgte durch das Baden der OT in 200 ml Lösung bestehend aus 0,5% TX-100 in PBS für 10 min, daran schloss sich der Waschzyklus #1 an. Darauf folgte der antikörperspezifische Demaskierungsprozess. Dabei wurde je nach primärem Antikörper 2,5% Proteaselösung (Protease XIV, Sigma-Aldrich) in destilliertem Wasser oder 0,1% Trypsinlösung in PBS verwendet. Unter Hinzugabe eines Verdünners (Dako Antibody Diluent, Agilent, Santa Clara, Kalifornien, USA) zum primären Antikörper erfolgte das Ansetzen der erforderlichen Menge Antikörperlösung (ca. 150 µl pro OT) in definierter Menge (Tabelle 4). Nach Waschzyklus #1 wurden die OT 10 min in einer Lösung aus 200 ml PBS + 0,8 ml 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich) inkubiert, um nach einem weiteren Waschzyklus mit primärer Antikörperlösung beschichtet und für 10-14 h bei 4°C im Kühlschrank feucht und luftdicht inkubiert zu werden. Waschzyklen beinhalteten ab hier zusätzlich zum destilliertem Wasser und PBS die Anwendung von Brij-Lösung (Brij 35-Lösung,

Merck KgaA) für 2x 3 min (Waschzyklus #2). Nach Waschzyklus #2 wurde der zweite Antikörper (Sekundärantikörper) aufgetragen, welcher sich gegen den Primärantikörper richtete (Cytoscan Biotynylated Link, Cell Marque, Rocklin, Kalifornien, USA). Anschließend wurden die Proben 10 min bei RT luftdicht inkubiert und dem Waschzyklus #2 unterzogen. Für die indirekte Detektion des an das Antigen gebundenen primären AK diente ein Farbsubstrat. Dieses wurde bei kovalenter Bindung von sekundärem an primärem AK vom HRP-Enzym (horseradishperoxidase) zu einem sichtbaren Produkt umgesetzt. Hierfür inkubierten die OT 10 min in der HRP-Enzymlösung (HRP Detektionssystem, Medac Diagnostika, Tornesch, Deutschland) gefolgt von einem Waschzyklus #2. Danach wurde das Farbsubstrat bzw. die AEC-Lösung (AEC SK-4200, Vector Laboratories INC) angesetzt: 5 ml destilliertes Wasser wurden mit 2 Tropfen Pufferlösung und 3 Tropfen AEC plus 2 Tropfen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vermischt. Nun erfolgte die Inkubation der OT mit dieser Lösung für 10 min bei RT, um sie anschließend 2 min in Leitungswasser und 4 min in 200 ml Hämalaunlösung zu baden. Abschließend mussten die OT in leicht fließendem Leitungswasser für ca. 4 min gewaschen werden, bis die Hämalaunrückstände entfernt waren. Mittels Eideckmedium (Dako Mounting Medium, Agilent) und Deckgläsern konnten die Schnitte bedeckt und für 30 min bei RT trocknen, um zuletzt bei 100x und 1000x Vergrößerung im Lichtmikroskop beurteilt zu werden.

| Antikörper  | Firma                          | Demaskierung                                    | Antikörpermenge |
|-------------|--------------------------------|---|-----------------|
| Elastin     | Sigma<br>Best Nr. E 4013       | 15 min Trypsinlösung,<br>37°C                   | 0,1%            |
| Kollagen I  | Sigma<br>Best Nr. C 2456       | 5 min Proteaselösung, RT                        | 0,5%            |
| Kollagen IV | Sigma<br>Best. Nr. C 1926      | 5 min Proteaselösung, RT                        | 0,4%            |
| Laminin     | Sigma<br>Best. Nr. L 9393      | 5 min Proteaselösung, RT                        | 1%              |
| Fibronectin | Sigma,<br>Best. Nr. F 3648     | 5 min Proteaselösung, RT                        | 0,04%           |
| TE-7        | Millipore,<br>Best. Nr. CBL271 | 20 min in Lösung mit<br>PH=8 bei 90 Watt kochen | 1,7%            |

**Tabelle 4:** Herstellernamen, Demaskierungsprozesse und Antikörpermenge je nach primärem Antikörper.

### **3.6. Rasterelektronenmikroskopie**

Die Patchhälften wurden in aufsteigender Alkoholreihe entwässert und getrocknet, sodass sie mit einer Edelmetallschicht versehen werden konnten. Hierfür halbierte man die Hälften ein weiteres Mal, wovon 1/4 als Reserve zurück in die FIX2-Lösung gegeben und das Andere in einen Metallbehälter platziert wurde. Diesen plazierte man in einen Standzylinder mit Ablaufhahn und gab 100 ml 30% EtOH hinzu, um nach 10 min 100 ml 50% EtOH hinzugeben und nach 10 min 100 ml der Gesamtmenge (200 ml) ablaufen zu lassen. Unmittelbar darauf wurden 100 ml 70% EtOH hinzugeben und nach 10 min wieder 100 ml abgelassen um direkt 100 ml 96% EtOH hinzuzufügen. 10 min später erfolgte zuletzt das Ablassen von 100 ml, welche man durch 96% EtOH ersetzte. Anschließend gab man den Metallbehälter rasch in -20° C vorgekühlten 100% EtOH. Für den Trocknungsprozess (Baltec critical point dryer 030, BAL-TEC AG, Balzers, Liechtenstein) wurde die Trockenkammer bis zur unteren Markierung mit 100% EtOH (unvergällt) gefüllt, der Metallbehälter darin rasch versunken und bis zur oberen Markierung weiter gefüllt, sodass bei 8°C KammerTemperatur das EtOH mittels Überdruck durch CO<sub>2</sub> über 10 Zyklen ersetzt werden konnte. Anschließend erhitzte man die Kammer auf 42° C bis der Druck 80 Bar betrug. Abschließend wurde die Kammer über 30 min langsam entlüftet bis der Druck 0 Bar betrug. Nach der Platzierung der Proben in der Unterdruckkammer eines Sputtergerätes (Sputter Coater SCD050, BAL-TEC), wurde ein Unterdruck von ca. 10<sup>-2</sup> mbar hergestellt und die Proben innerhalb von 140 s mit Gold beschichtet, um sie anschließend im REM (REM; Evo LS 10, Carl Zeiss AG) beurteilen zu können.

### **3.7. DAPI-Färbung**

Die bei -80°C gelagerten PU-Proben wurden in Zellkulturplatten gelegt und jeder Patch für 2 min mit 500 µl PBS gewaschen. Für die Zellpermeabilisierung entfernte man dieses und ersetzte es für 2 min mit 500 µl Methanol-Aceton (1:1) Gemisch (SAV-Liquid Production), um die Patches anschließend 2x2 min mit 500 µl PBS zu waschen. Anschließend konnte jede Probe für 20 min mit einem ml DAPI-Lösung bei RT inkubiert werden. Für die DAPI-Lösung wurde 0,1 µg DAPI (DAPI dilactate, Sigma-Aldrich) mit einer Konzentration von 0,1 µg/mol mit 1 ml 0,1% Albumin (Bovine Albumin, Sigma-Aldrich) in PBS gemischt. Nach Inkubation ersetzte man die DAPI-Lösung durch 100 µl PBS, wodurch die Proben flach auf dem Wellboden lagen und anschließend im

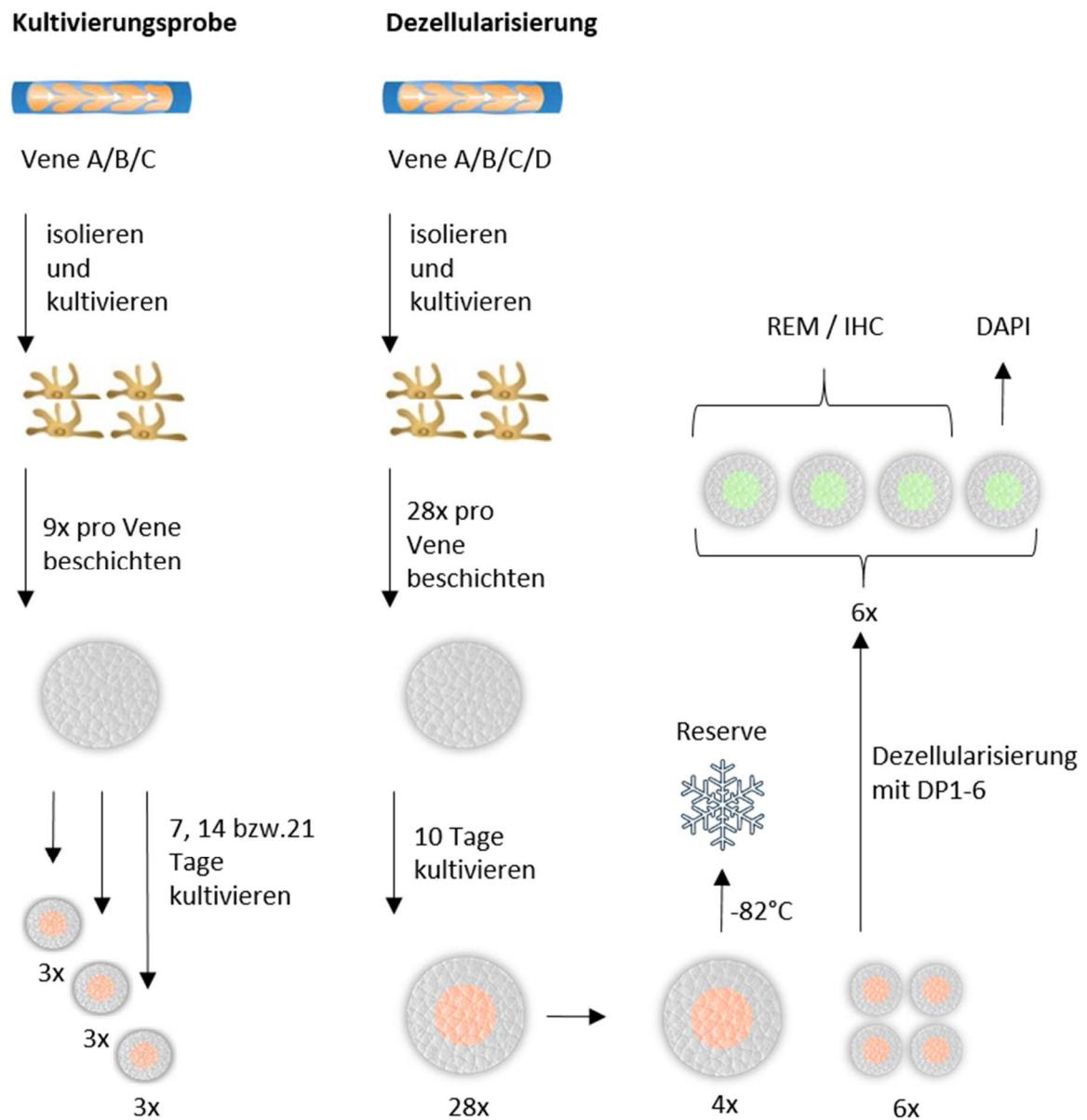
Fluoreszenzmikroskop (FM; Axio Observer.Z1, Carl Zeiss AG) beidseitig beurteilt werden konnten (Objektiv: EC Plan-Neofluar 10x/0.30 Ph 1, Anregungswellenlänge: 359, Emissionswellenlänge: 461, Imaging-Gerät: AxioCamMR3, Schärfentiefe 10,24 µm, Belichtungszeit: Automatikmodus).

| Einheit                          | Kultivierungsprobe | Dezellularisierung | Permeabilitätstest |
|----------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Venen                            | 3                  | 4                  | 2                  |
| FB bzw. T175 pro Vene            | ~9. Mio bzw. 3     | ~24. Mio bzw. 8    | ~9. Mio bzw. 3     |
| FB insg.                         | ~27. Mio           | ~96. Mio           | ~18. Mio           |
| PU-Proben pro Vene               | 9                  | 28                 | 10                 |
| PU-Proben insg.<br>(beschichtet) | 27                 | 112                | 20                 |
| Venen                            | 3                  | 4                  | 2                  |

**Tabelle 5:** Tabellarische Übersicht der benötigten Venen, Zellmengen und PU-Proben in Abhängigkeit des Versuchs.

### 3.8. Proliferationsevaluation

Für den ersten Versuch wurden aus 3 unterschiedlichen Venen FB isoliert und jeweils bis zu einer Anzahl von ~9.Mio FB kultiviert, das entspricht ca. 3 zellkonfluenten T175 (siehe Tabelle 5). Mit jeweils einer FB-Reihe (eine Vene) beschichtete man 9 PU-Patche mit jeweils 780.000 FB, wofür 7.020.000 FB benötigt wurden. Jeweils 3 der beschichteten Patche wurden anschließend für 7, 14, bzw. 21 Tage im Brutschrank bei 37°C kultiviert. Nach 7 bzw. 14 Tagen lagerte man die erste bzw. zweite Gruppe für die Auswertung via REM und IHC, um nach 21 Tagen alle Proben auszuwerten. (Abbildung 15 stellt den Ablauf der Kultivierungs- und Dezellularisierungsprobe schematisch dar).



**Abbildung 15:: Vereinfachtes Durchführungsschema der Kultivierungs- und Dezellularisierungsprobe.**  
 Für die Versuche wurden aus drei bzw. vier Venen unterschiedlicher Spender FB isoliert und kultiviert. Anschließend erfolgte die Beschichtung und Kultivierung auf PU für unterschiedlich lange Zeiträume. Bei der Proliferationsevaluation wurden alle Proben mittels REM und IHC ausgewertet. Bei der Dezellularisierung erfolgte die Beschichtung von 28 PU-Proben pro FB-Reihe, wovon 4 als Reserve konserviert wurden. Die restlichen 26 unterteilte man in vier Subgruppen. An jeder Subgruppe erfolgte die Anwendung eines DP. Anschließend konnten aus jeder Subgruppe (mit Ausnahme der Reserve) drei Proben mittels IHC und REM und eine via DAPI-Färbung ausgewertet werden.

### **3.9. Dezellularisierung**

Aus 4 verschiedenen Venen isolierte man zunächst FB und kultivierte sie bis zu einer Anzahl von ~24. Mio. Zellen, das entspricht ca. 8 zellkonfluenten T175 Flaschen. Pro FB-Reihe (einer Vene) besiedelte man 28 PU-Patche mit jeweils 780.000 FB, wofür insgesamt 21.840.000 FB pro Vene benötigt wurden. Anschließend kultivierte man die Patche für 10 Tage und sortierte sie in Vierer-Einheiten, sodass 7 Gruppen entstanden. An Gruppen 1 bis 6 erfolgte die Anwendung der Dezellularisierungsprotokolle (siehe Tabelle 6), Gruppe 7 diente als Reserve und wurde bei -82 °C kryokonserviert. Anschließend konnten dezellularisierte Proben aus den Gruppen 1 bis 6 für die Auswertung mittels REM, IHC, und DAPI-Färbung vorbereitet werden.

6 verschiedene DP wurden im Rahmen des Dezellularisierungsversuchs an mit FB beschichteten PU-Proben angewandt. Die Anwendung der Lösung erfolgte in unsterilen 250 ml Plastikbechern, welche man für den protokollspezifischen Zeitraum auf eine rotierende und in der Horizontalebene wankende Platte setzte. Nach der Anwendung wirksamer Lösungen wurden individuelle Waschzyklen durchgeführt (siehe Tabelle 6).

Das erste Protokoll (DP1) wurde erstmals von Ott H.C. et al angewandt: Ganze Herzen wurden dezellularisiert und anschließend mit Myoblasten erneut beschichtet [127]. Basierend auf diesem Protokoll gaben wir beschichtete Polyurethanstücke zuerst in 1% SDS (Sigma-Aldrich) für 16 h und anschließend in 1% TX-100 (Sigma-Aldrich) für 30 min. Beide Detergenzien wurden mit destilliertem Wasser verdünnt.

Vergangene Versuche unseres Labors konzentrierten sich auf die Dezellularisierung von Homografts und Herzklappen [128]. Als Standardprotokoll etablierte sich eine Kombination aus 0,5% SDS und 0,5% SD (Sigma Aldrich) in destilliertem Wasser [129]. Für diese Arbeit wurde das Protokoll für 16 h angewandt (DP2).

Das dritte Protokoll stammt von einer Firma, welche durch TE hergestellte kardiovaskuläre Produkte für den offenen Markt vertreibt [130]. Hierbei kommt zuerst 1% SD (Sigma-Aldrich) in destilliertem Wasser für 16h zur Anwendung. Danach folgen Waschzyklen. Die anschließende Komponente kann aus patentrechtlichen Gründen nicht näher bezeichnet werden. Anschließend wurden die Proben in 70% EtOH (SAV Liquid Production GmbH) für 10 min gegeben (DP3).

Das vierte Protokoll entstammt einer vergleichenden Studie, in welcher Kasimir et al. mittels SD und TX-100 Aortenklappen von Schweinen dezellularisierten [131]. In unserem Versuch verwendeten wir 0,5% SD und 0,5% TX-100 kombiniert in destilliertem Wasser für 16 h (DP4).

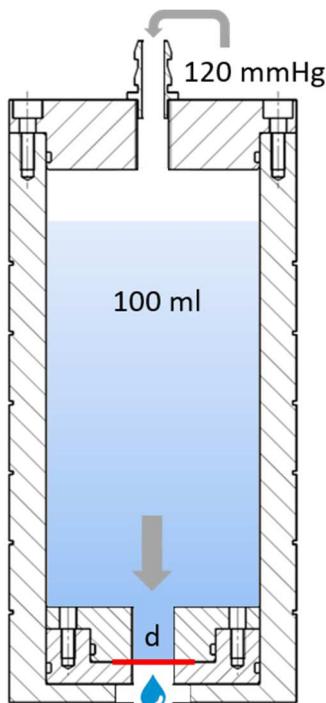
Das fünfte Protokoll besteht aus osmotisch wirksamen Lösungen. Die Proben wurden zunächst in hyperosmolarem, 20%igem Mannitol (Serag-Wiessner GmbH & Co. KG, Naila, Deutschland) und anschließend in hypoosmolarem destilliertem Wasser für jeweils 30 min eingelegt (DP5).

Um die Versuchsreihe um eine enzymatische Komponente zu ergänzen, erfolgte im sechsten Protokoll die Anwendung von Accutaselösung (Sigma-Aldrich). Accutase® enthält proteolytische Enzyme und findet routinemäßige Anwendung bei der Lösung von Zellen von künstlichen Oberflächen. Für den Dezellularisierungsversuch wurden Proben bei 37°C für 10 min in Accutaselösung eingelegt.

|      |                    |  |   |  |  |                       |  |
|------|--------------------|--|---|--|--|-----------------------|--|
| DP 1 | SDS<br>+<br>TX-100 | 125 ml<br>1% SDS<br>16 h                       | 125 ml<br>1% TX<br>30 min                 | Wasch-<br>zyklus<br>A  |  |                       |  |
| DP 2 | SDS<br>+<br>SD     | 60 ml<br>0,5% SD<br>60 ml<br>0,5% SDS<br>16h   | Wasch-<br>zyklus<br>A                     | Waschzyklus A:<br>6x 24 h 200 ml PBS +<br>0,1% Penicillin-Streptomycin |  |                       |  |
| DP 3 | SD                 | 125 ml<br>1% SD<br>16h                         | Wasch-<br>zyklus<br>B                     | 125 ml<br>?<br>3h  | 125 ml<br>70% EtOH<br>10 min   | Wasch-<br>zyklus<br>B |  |
| DP 4 | SD<br>+<br>TX-100  | 60 ml<br>0,5% SD<br>60 ml<br>0,5% TX<br>16h    | Wasch-<br>zyklus A                        | Waschzyklus B:<br>6x 15 min 200 ml PBS                                 |  |                       |  |
| DP 5 | Osmotisch          | 125 ml<br>20%<br>Mannitol-<br>lösung<br>30 min | 125 ml<br>Wasser<br>destilliert<br>30 min | Wasch-<br>zyklus<br>A  | <b>Tabelle 6:</b> Tabellarische Übersicht für den Ablauf der Dezellularisierungsprotokolle 1 bis 6. Protokollüberschriften (links) und die einzelnen Versuchsschritte chronologisch von links nach rechts. |                       |  |
| DP 6 | Enzym-<br>lösung   | 125 ml<br>Accutase®<br>10 min<br>37° C         | Wasch-<br>zyklus<br>A                     |  |  |                       |  |

### 3.10. Permeabilitätstestung

Aus zwei verschiedenen Venen isolierte man FB und kultivierte sie bis zu einer Anzahl von ~9. Mio. Zellen, das entspricht ca. 3 zellkonfluenten T175 Flaschen. Vor Beschichtung und Kultivierung erfolgte die Dickenmessung des PU. Hierbei wurden mithilfe eines Messgerätes (Mitutoyo 543-396B IDC Digimatic Indicator, Mitutoyo Europe GmbH, Neuss, Germany) mindestens drei Messungen pro Charge durchgeführt und gemittelt. Pro FB-Reihe wurden anschließend 10 PU-Proben mit jeweils 780.000 FB beschichtet und für 10 Tage kultiviert, wofür man insgesamt 7.800.000 FB benötigte. Von den 10 Proben dezellularisierte man 8. 4 davon mittels DP1 und weitere 4 mittels DP2. Die 2 restlichen PU-Proben wurden unbehandelt bei -80°C als Reserve Kryokonserviert. Nach Abschluss der Dezellularisierung und einem Waschzyklus konnte der Wasserpermeabilitätstest durchgeführt werden. Hierfür diente ein individuell angefertigter Plexiglaszylinder, welcher mit 100 ml Leitungswasser gefüllt wurde (Abb. 16). Über den Anschluss an ein Lufteinlassventil konnten konstante 120 mmHg Druck appliziert werden, sodass die Wassersäule den Zylinder über eine im Durchmesser 8 mm breite Öffnung, in welcher die Probe eingespannt war, verlassen konnte. Die Zeit, in der das Wasser den Zylinder verlässt, wurde zweimalig manuell gemessen. 4 native PU-Proben (unbeschichtet, unbehandelt) dienten als Kontrollgruppe.

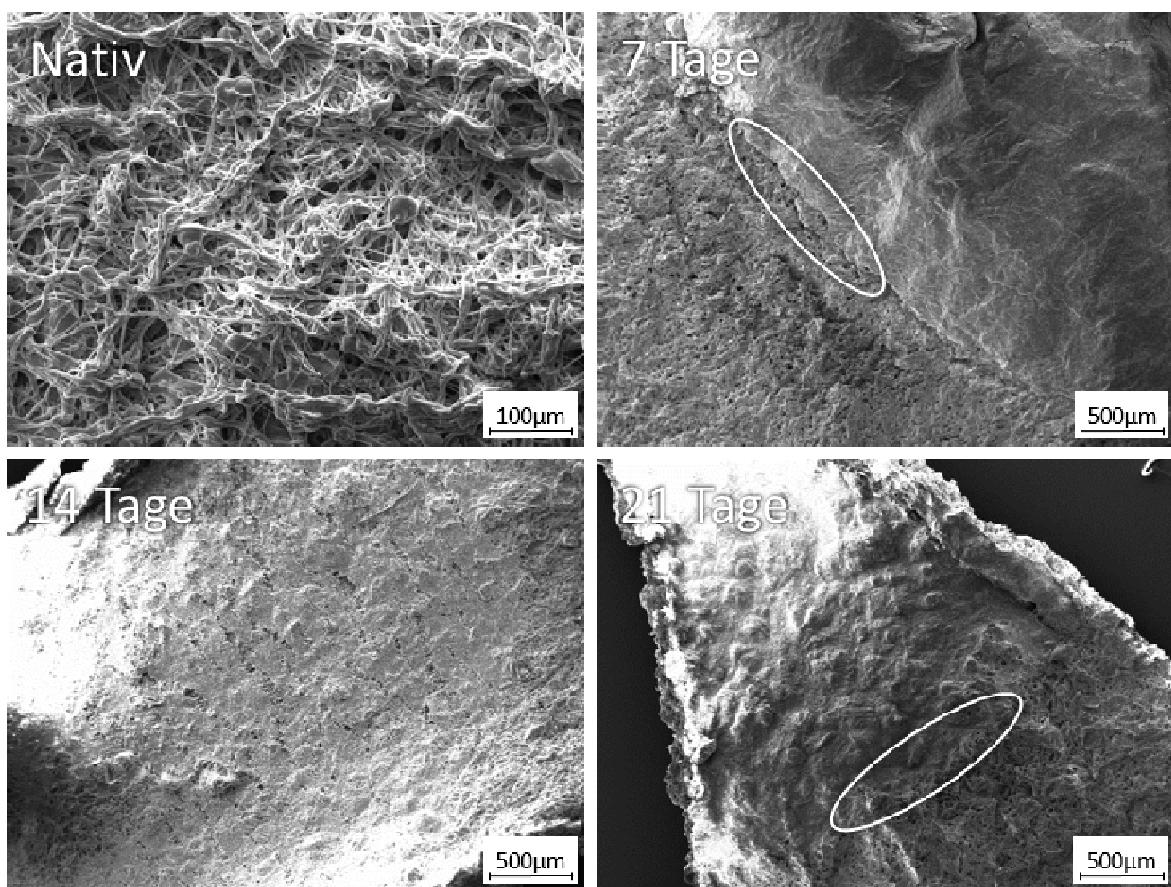


**Abbildung 16:** Aufbau des Plexiglaszylinders anhand einer modifizierten technischen Zeichnung. 120 mmHg Druck werden auf 100 ml Wasser appliziert, welche den Zylinder über die im Ausflusstrakt ( $d = 8 \text{ mm}$ ) eingespannte Probe (roter Strich) verlässt.

# 4. Ergebnisse

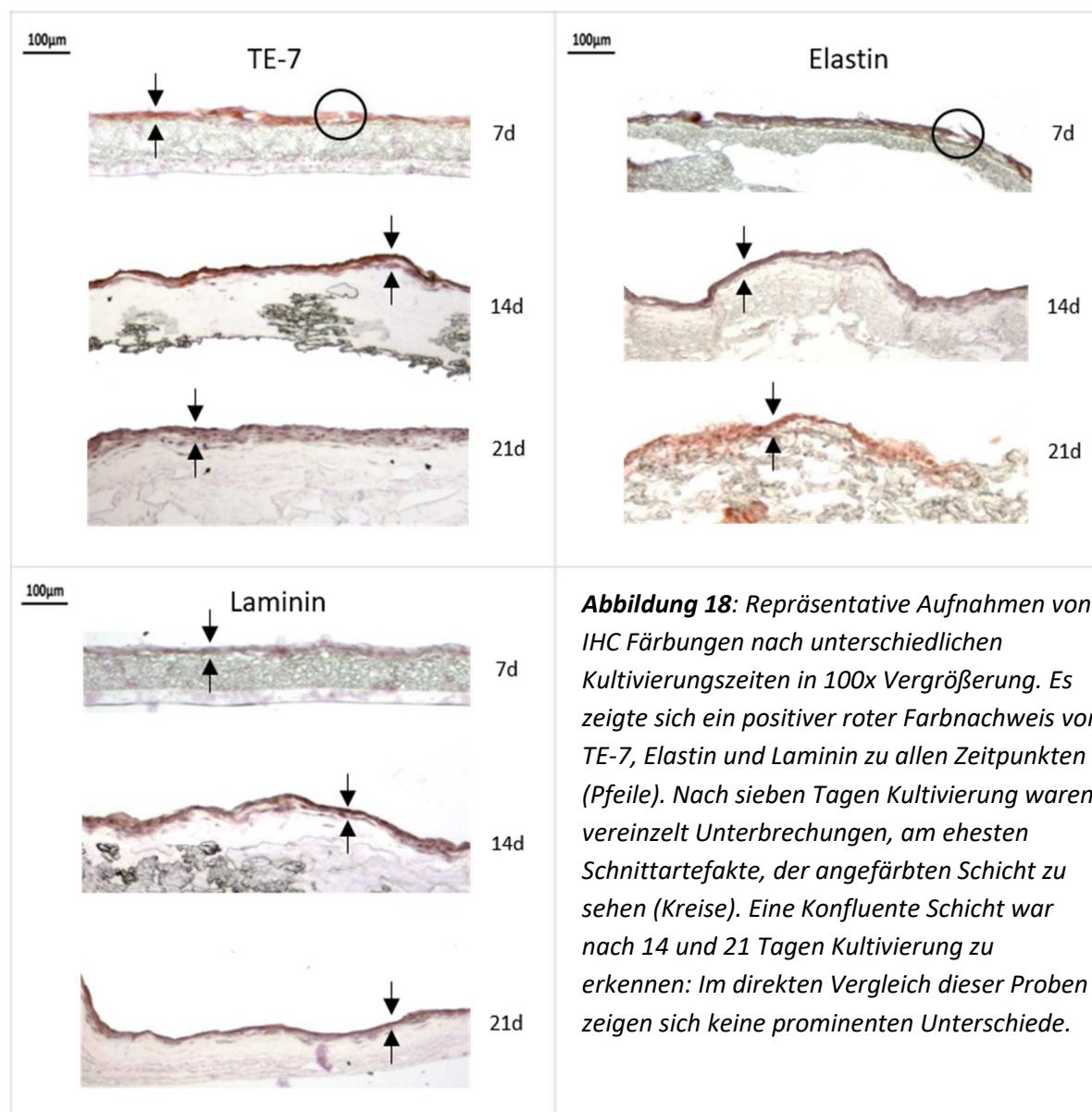
## 4.1. Proliferationsevaluation

Im REM stellte sich eine konfluente biologische Schicht zu allen Zeitpunkten dar (Abb. 17). Unterschiede zwischen den einzelnen Proben waren nicht erkennbar. Die Ergebnisse der IHC zeigten positive Färbungen gegen das FB spezifische Antigen TE-7, als auch gegen EZM spezifische Komponenten (Kollagene, Elastin, Laminin, Fibronectin, Kollagen I und IV) zu allen Zeitpunkten (Abb. 18). Positive Färbungen gegen TE-7 waren nach sieben Tagen Kultivierung nachweisbar. Gleiches gilt für EZM-spezifische Färbungen. Proben resultierend aus 14 und 21 Tagen Kultivierung zeigten im Vergleich leicht prominentere Nachweise. Die Ergebnisse weisen die Kultivierbarkeit von FB auf PU nach.



**Abbildung 17:** REM Aufnahmen nach sieben, 14 und 21 Tagen Kultivierung in 100x Vergrößerung. Im Vergleich hierzu ein Nativbild in 500x Vergrößerung. Markierte Areale zeigen den Übergang von beschichtetem zu unbeschichtetem PU (ehemalige Position des Teflonrings).

Weiterhin wurde für darauf folgende Versuche eine effektive Kultivierungsdauer festgelegt, in welcher eine konfluente Beschichtung in möglichst kurzer Zeit erfolgen kann. Nach 7 bzw. 14 Tagen Kultivierungszeit ausgewertete Proben zeigten im Vergleich minimale Unterschiede: Nach 7 Tagen zeigten die Proben positive Farbnachweise gegen FB als auch EZM-Komponenten. Diese Farbnachweise zeigten gelegentlich Kontinuitätsunterbrechungen auf. Obwohl es sich dabei womöglich um Schnittartefakte handelte, zeigten Proben nach 14 Tagen keine Unterbrechungen der Oberflächenstruktur. Zudem wiesen diese Proben mehrere Schichten von Zellkernen auf, sodass sich die biologische Schicht insgesamt konfluenter und prominenter andeutete. Proben verglichen nach 14 und 21 Tagen Kultivierungszeit zeigten keine Unterschiede. Auf Grund dieser Ergebnisse beträgt die Kultivierungsdauer von FB auf PU in den folgenden Versuchen zehn Tage.

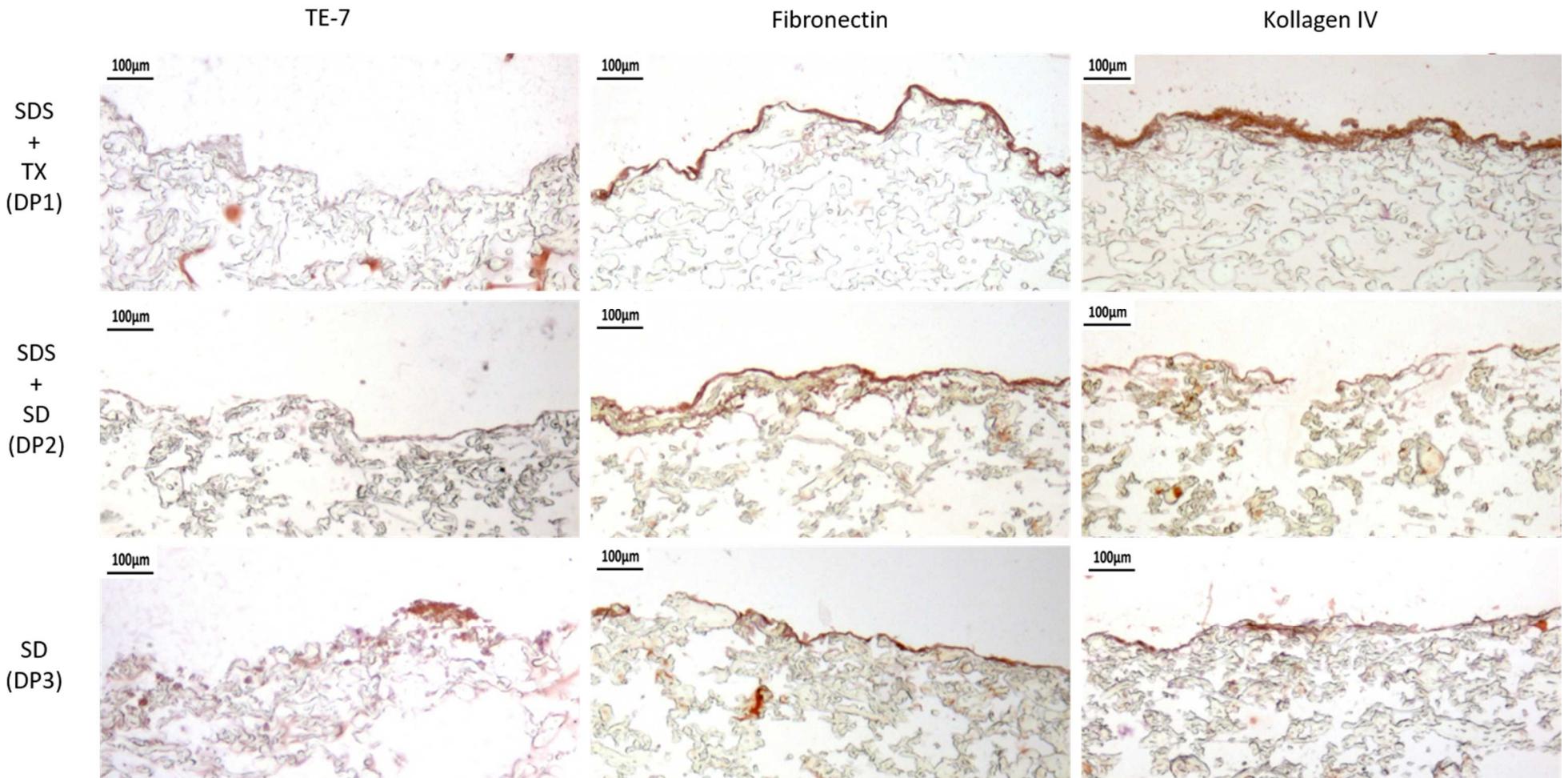


## *4.2. Dezellularisierung*

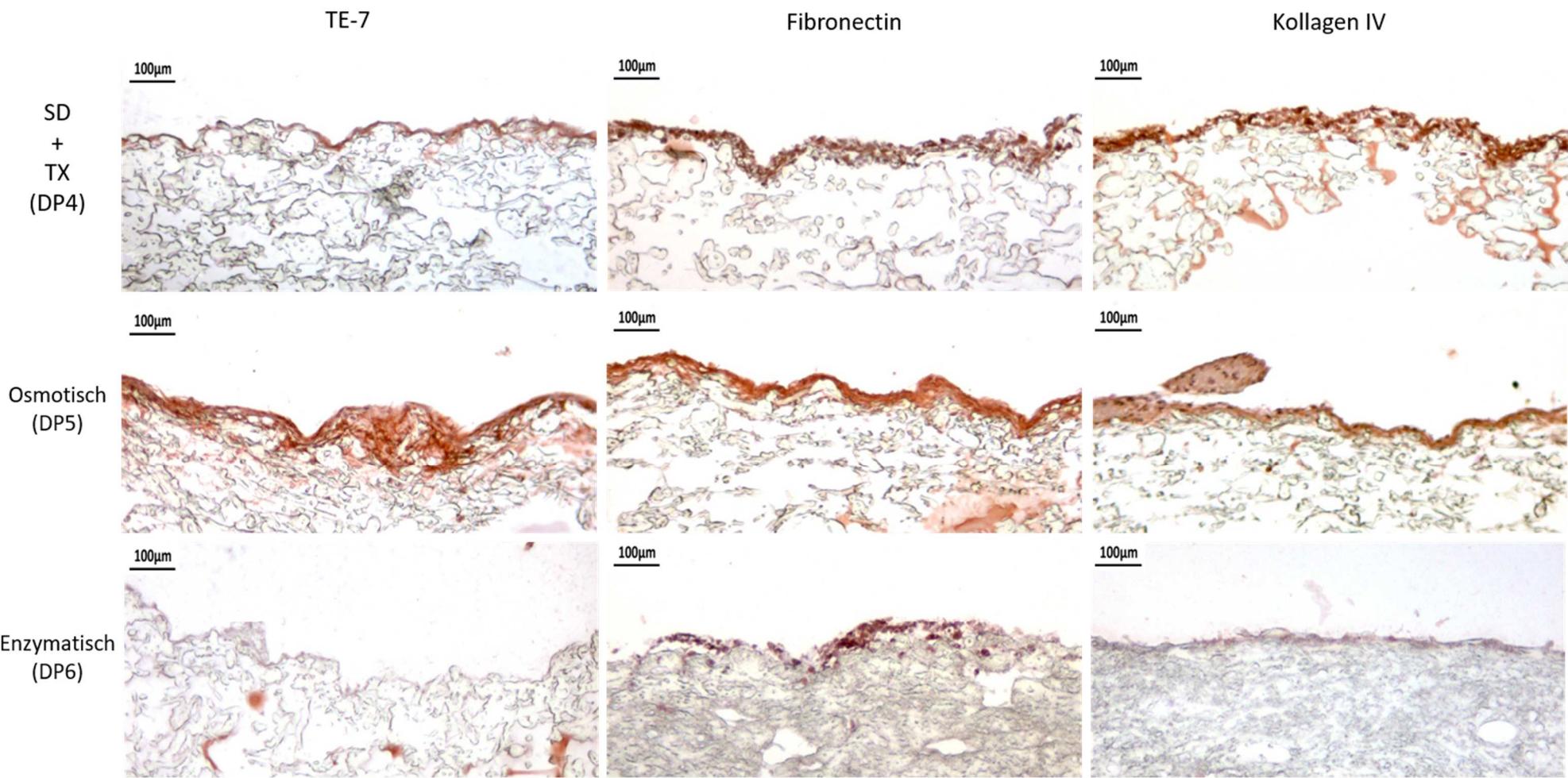
### *4.2.1. Immunhistochemie*

Im Rahmen der Dezellularisierung wurden Proben nach der Anwendung von DP mittels IHC evaluiert. IHC-Färbungen gegen TE-7 fielen je nach angewandtem DP sehr unterschiedlich aus (siehe Abb. 19 A und B). Beispielsweise zeigten 90% der Proben an denen osmotische Lösungen (DP5) angewandt wurden positive Färbungen gegen TE-7. Im Kontrast dazu stehen Proben resultierend aus der Behandlung mittels SDS + SD (DP2) und Accutase® (DP6): Hier wurde nie TE-7 nachgewiesen. Ähnlich zeigten 92% der Proben nach Dezellularisierung mittels SDS und TX-100 (DP1) keine positive Färbung gegen TE-7. Die Anwendung von SD, sowohl alleine als auch in Kombination mit TX-100 (DP3, DP4) erzeugte diesbezüglich sehr heterogene Ergebnisse: Einige Proben wiesen positive Färbungen, andere hingegen negative Färbungen gegen TE-7 auf. Die Anzahl positiver TE-7 Färbungen überwiegte.

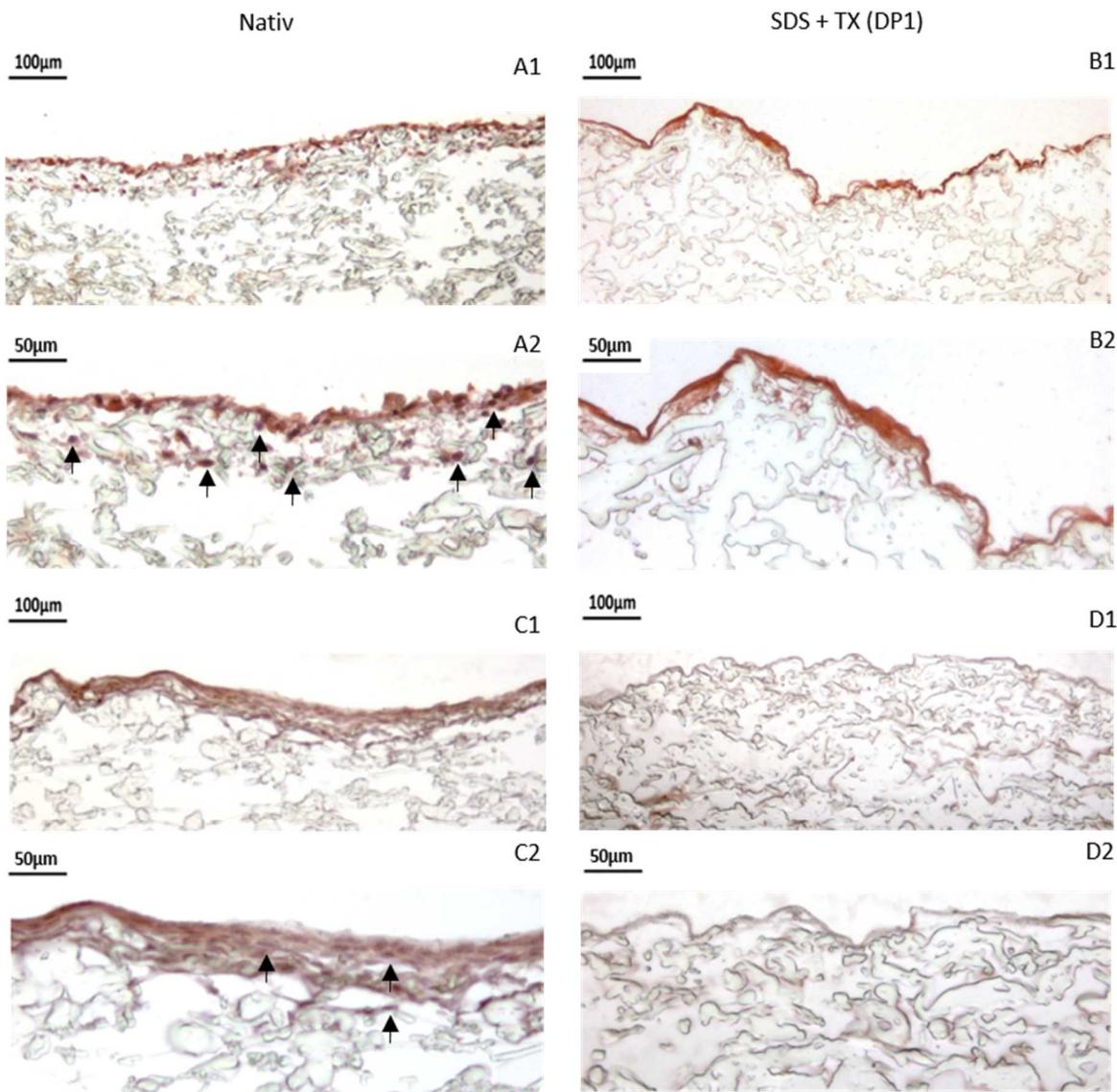
Auch der Verbleib von EZM-Komponenten unterscheidet sich in Abhängigkeit des DP. 91,7% der Proben welche mit SDS und TX-100 (DP1) dezellularisiert wurden zeigten positive Färbungen gegen alle untersuchten Komponenten der EZM, also Kollagen I und IV, Laminin, Fibronectin und Elastin. Auch die Anwendung von SD in Kombination mit TX-100 (DP4) erzeugte Proben, von denen 75% positive Farbnachweise gegen alle untersuchten Komponenten enthielten. Nach dem Einsatz von SDS + SD (DP2) zeigten die Hälfte der Polyurethanstücke einen positiven Farbnachweis für die fünf Komponenten. Gleiche Aussage gilt für die Proben nach Anwendung der osmotisch wirksamen Lösungen (DP5). 71% der Proben resultierend aus der Behandlung mit SD (DP3) zeigten positive Farbnachweise für mindestens drei der fünf EZM-Komponenten. Im Gegensatz hierzu stehen die Ergebnisse der IHC von Proben nach Behandlung mit enzymatischer Lösung (DP6): 43% der Proben zeigten positive Färbungen für maximal zwei Komponenten der EZM.



**Abbildung 19 A:** Repräsentative IHC Aufnahmen in 100x Vergrößerung nach Anwendung der DP 1 bis 3 nach Dezellularisierung in Hinblick auf FB-spezifischem Antikörper TE-7 und Komponenten der EZM.



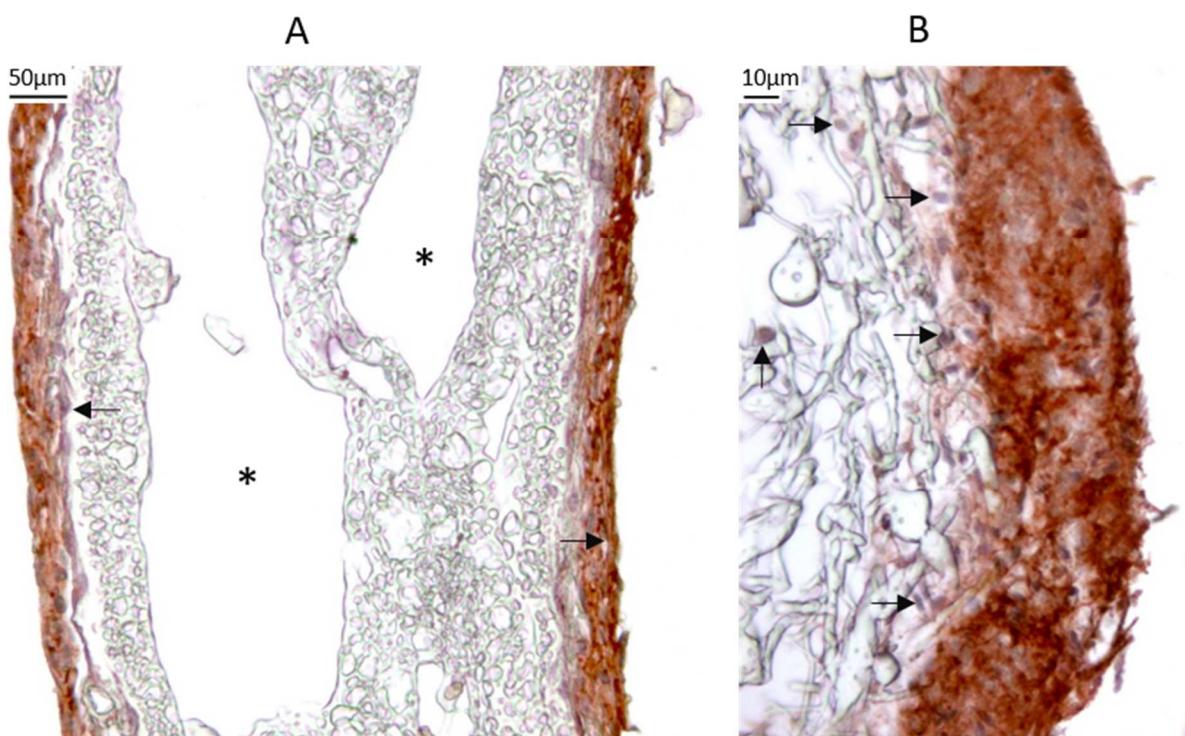
**Abbildung 19 B:** Repräsentative IHC Aufnahmen in 100x Vergrößerung nach Anwendung der DP 4 bis 6 nach Dezellularisierung in Hinblick auf FB-spezifischem Antikörper TE-7 und Komponenten der EZM.



**Abbildung 20:** IHC Vergleich zwischen nativen und mittels SDS + TX-100 dezellularisierten Proben. Färbungen A1 – B2 stellen Färbungen gegen Laminin, C1 – D2 Färbungen gegen FB spezifisches TE-7 dar. A2, B2, C2, D2 zeigen jeweils vergrößerte Aufnahmen. Pfeile weisen auf kernähnliche Formation hin.

Gemeinsamkeiten und Unterschiede zeigten sich bei der immunhistochemischen Auswertung von nativen und mittels SDS+TX-100 (DP1) dezellularisierten Proben (Abb. 20). In Bezug auf Färbungen gegen EZM spezifische Antigene (A1 – B2) demonstrierten sowohl native als auch dezellularisierte Proben einen konfluентen positiven Farbnachweis an der Oberfläche des PUs. In vergrößerter Aufnahme der nativen Proben (A2) wurden kernähnliche, oval geformte Strukturen in unterschiedlichen Tiefen des PUs sichtbar (Pfeile). Diese hatten eine für die Hämalaunfärbung typische blass violette Farbgebung, sodass sie an einen Zellkern erinnerten. Auch beim positiven Farbnachweis gegen das FB

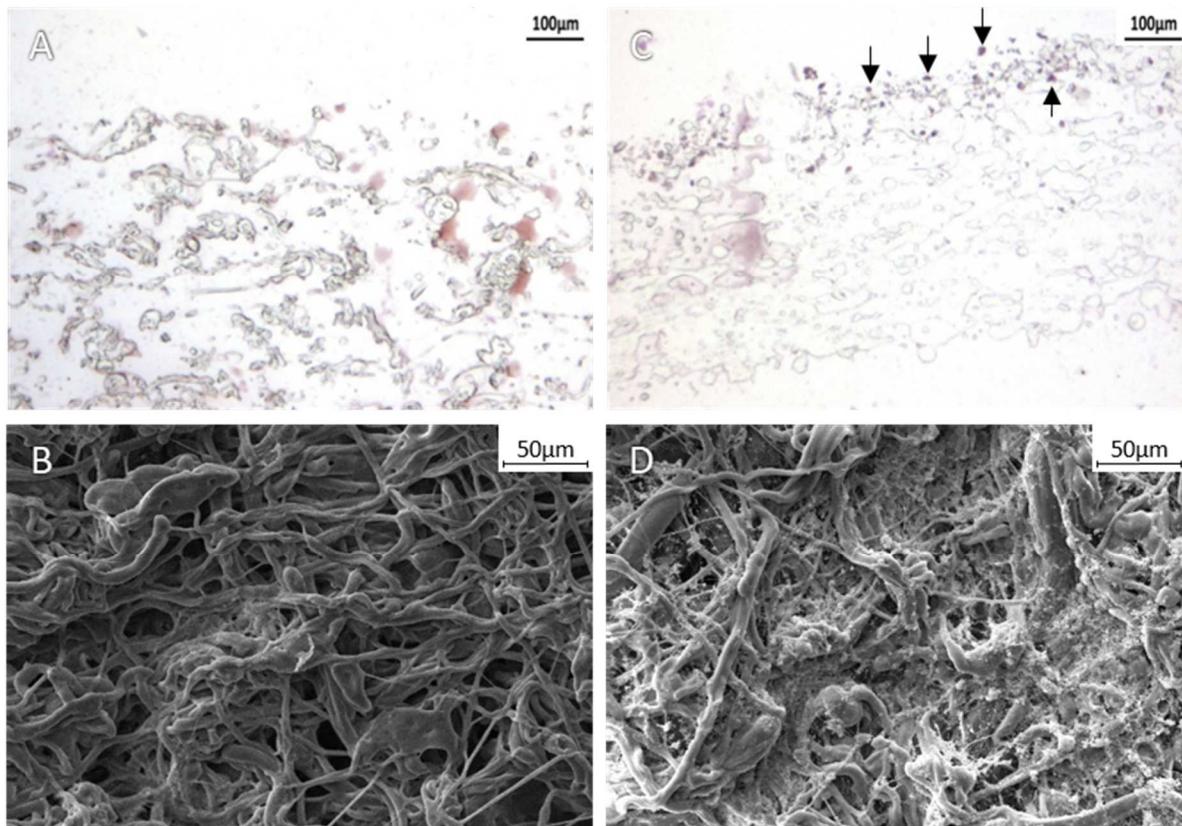
spezifische Antigen TE-7 wiesen native Proben diese zellkernähnlichen Strukturen auf (C2). Die positiv angefärbte Oberflächenschicht stellte sich im Vergleich zu Färbungen gegen EZM spezifische Antigene prominenter dar. Im Kontrast dazu präsentierte dezellularisiertes Material ein anderes Bild. Hier zeigte sich in Bezug auf das Antigen TE-7 kein positiver Farbnachweis auf der Oberfläche des PU. Anstelle dessen war ein schmälerer, blass violetter Saum ohne Kontinuitätsunterbrechungen sichtbar (D1, D2). Ovale, kernähnliche Strukturen waren in vergrößerter Aufnahme nicht zu erkennen.



**Abbildung 21:** Besonderheiten von Proben im Rahmen der Auswertung durch IHC (Färbung gegen TE-7). A: Eine im Rahmen der Proliferationsevaluation erzeugte Aufnahme mit doppelter Beschichtung und Kontinuitätsunterbrechungen im PU (Sterne). In tieferen Ebenen des PUs deuteten sich kernähnliche, oval konfigurierte Formationen mit blass violetter Farbgebung an (Pfeile). B: Deutlichere Aufnahmen solcher zeigten sich bei einer im Rahmen der Dezellularisierung gewonnenen Probe in 1000x Vergrößerung.

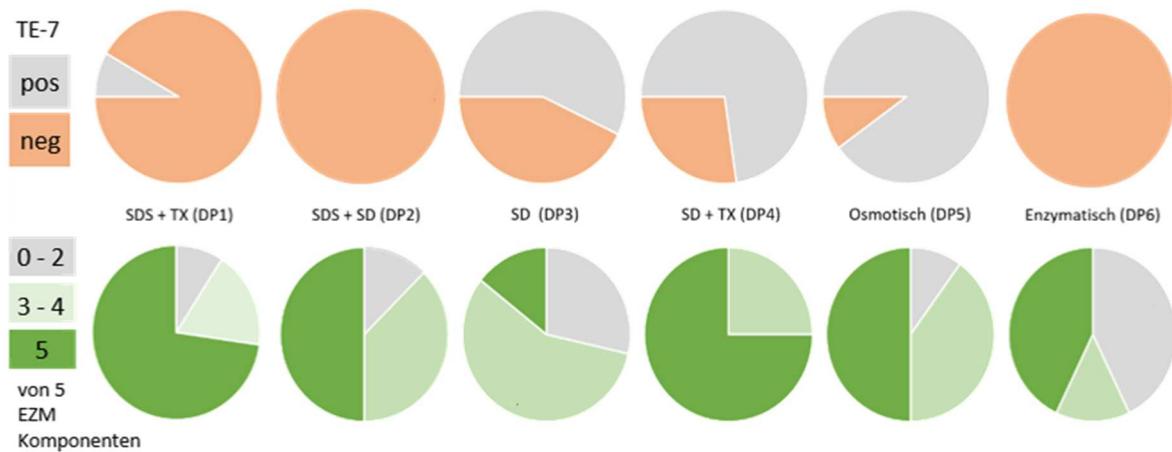
Zu den Besonderheiten einiger Proben gehörten die (in Abb. 21) dargestellten Befunde. Einige Proben zeigten positive Farbnachweise gegen das FB-spezifische Antigen TE-7 auf beiden Seiten der Proben. Gleichzeitig konnten vereinzelt zellkernähnliche Strukturen nach Hämalaunfärbung in tiefer gelegenen Abschnitten des PUs nachgewiesen werden. Des Weiteren zeigten sich im PU Kontinuitätsunterbrechungen im Sinne von Lufteinschlüssen. Die (in Abb. 22) dargestellten Proben zeigten zudem eine veränderte Struktur des PU:

Einzelne Bestandteile bzw. Fragmente dessen lagen weiter auseinander und erschienen zerstreut, während ein immunhistochemischer Farbnachweis fehlte und nicht ausgewertet werden konnte. Diese Befunde können Hinweise auf die Interaktion von PU mit dem im Rahmen der Entparaffinierung eingesetztem Roti®-Histol darstellen. Diese Proben, welche einen Gesamtanteil von 22 % hatten, wurden von der Auswertung ausgeschlossen.



**Abbildung 22:** Beispiele von nicht auswertbaren Proben mit korrelierenden REM Aufnahmen (A+B, C+D). Bei der lichtmikroskopischen Betrachtung zeigte sich eine aufgelockerte Architektur des PU bei nicht abgrenzbarer Probenoberfläche (A). Mittels IHC oder Hämalaun angefärbte Strukturen deuteten sich in zerstreutem Muster an (Pfeile), eine homogene Schicht fehlte (C). Korrespondierende REM Aufnahmen zeigten ein raues, inkomplettes Oberflächenmuster welches nativen Proben ähnelte (B+D)

Die folgenden Abbildungen bzw. Tabellen (23 bzw. 7) widmen sich der immunhistochemischen Auswertung von Proben resultierend aus der Anwendung unterschiedlicher DP. Die Kreisdiagramme (Abb. 23) zeigen den Anteil von Proben, welche nach Anwendung der DP einen negativen Farbnachweis für TE-7 bzw. einen positiven für EZM-Komponenten aufzeigten. Die Tabelle spezifiziert diese Darstellung. Hier wird gezeigt, durch welche Anwendung eines DP Proben entstanden, welche bei Abwesenheit eines FB-spezifischen Farbnachweises positive Färbungen für einen Großteil der Matrixkomponenten aufweisen konnten. Anhand dieser Darstellung können Rückschlüsse auf die Effektivität einzelner DP gezogen werden.



**Abbildung 23:** Zusammenfassendes Tortendiagramm der immunhistochemischen Auswertung in Hinblick auf FB-spezifische TE-7 Färbung und Komponenten der EZM. In der oberen Reihe Darstellung von Anteilen negativer bzw. positiver TE-7 Färbungen. In der unteren Reihe Darstellung der Anzahl von Proben, welche für null bis zwei (grau), drei bis vier (hellgrün) oder für alle fünf (dunkelgrün) der untersuchten Matrixkomponenten, unabhängig von den Befunden der TE-7 Färbung, einen positiven Farbnachweis erbrachten. Eine Spalte bezieht sich auf ein DP.

| DP                 | Anzahl auswertbarer Proben von 12 | Davon TE-7 Färbung negativ | Davon EZM positiv 5/5 | bzw. EZM positiv 4/5 |
|--------------------|-----------------------------------|----------------------------|-----------------------|----------------------|
| DP1 : SDS + TX     | 11                                | 9                          | 6                     | 2                    |
| DP 2 : SDS + SD    | 8                                 | 8                          | 3                     | 1                    |
| DP 3 : SD          | 7                                 | 3                          | 1                     | 0                    |
| DP 4 : SD + TX     | 12                                | 3                          | 2                     | 1                    |
| DP 5 : Osmotisch   | 10                                | 1                          | 0                     | 1                    |
| DP 6 : Enzymatisch | 8                                 | 7                          | 2                     | 2                    |

**Tabelle 7:** Tabellarische Übersicht der immunhistochemischen Auswertung unter Berücksichtigung der Ergebnisse der FB- spezifischen Färbung gegen TE-7. Beispiel: 9 von 11 Proben, an welchen SDS + TX (DP1) angewandt wurde, zeigten keine positive Färbung gegen TE-7. 6 dieser 9 Proben wiesen positive Färbungen gegen alle 5 untersuchten EZM-Komponenten auf. Weitere zwei Proben zeigten einen positiven Farbnachweis gegen vier der maximal fünf Komponenten.

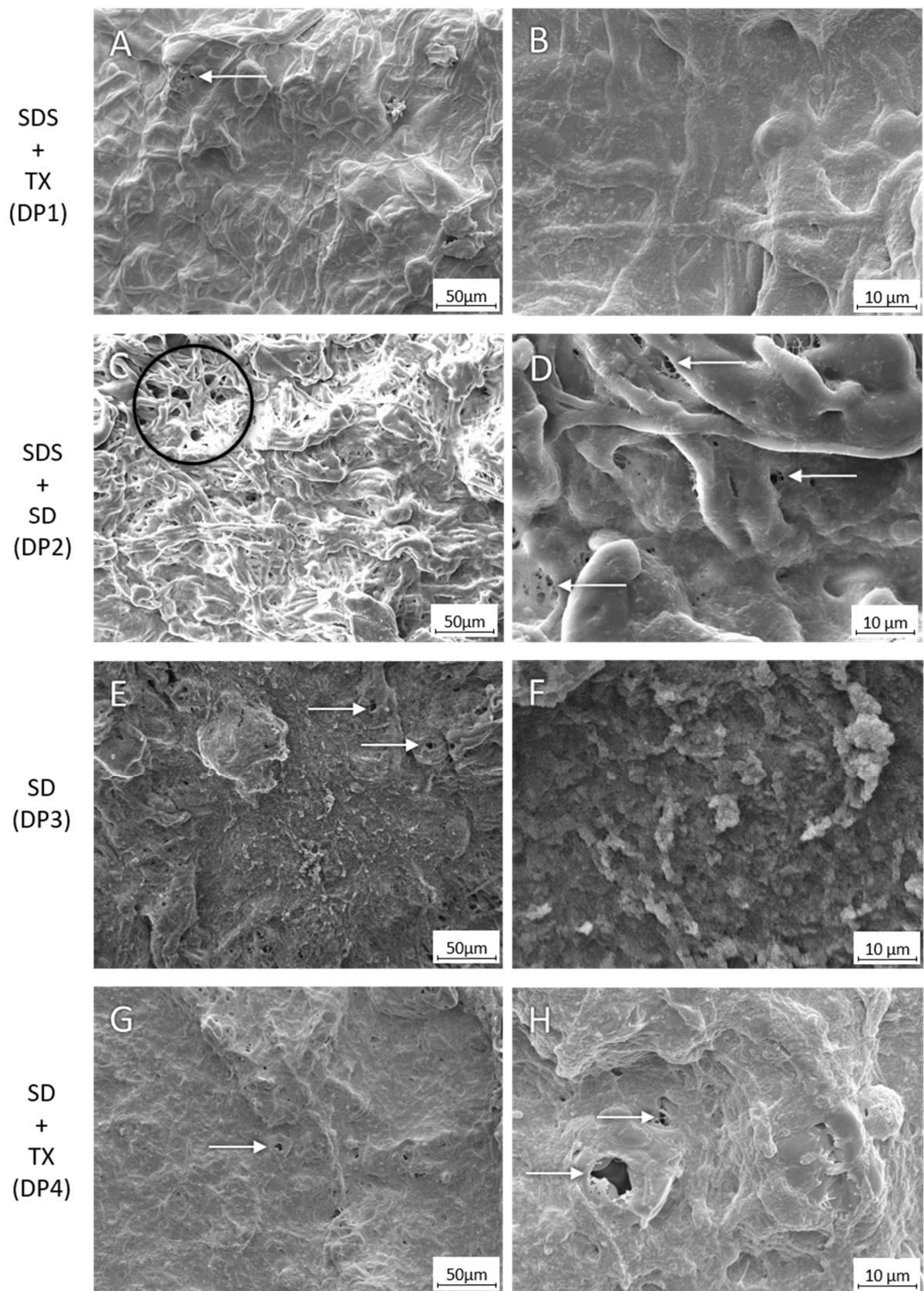
#### 4.2.2. Rasterelektronenmikroskopie

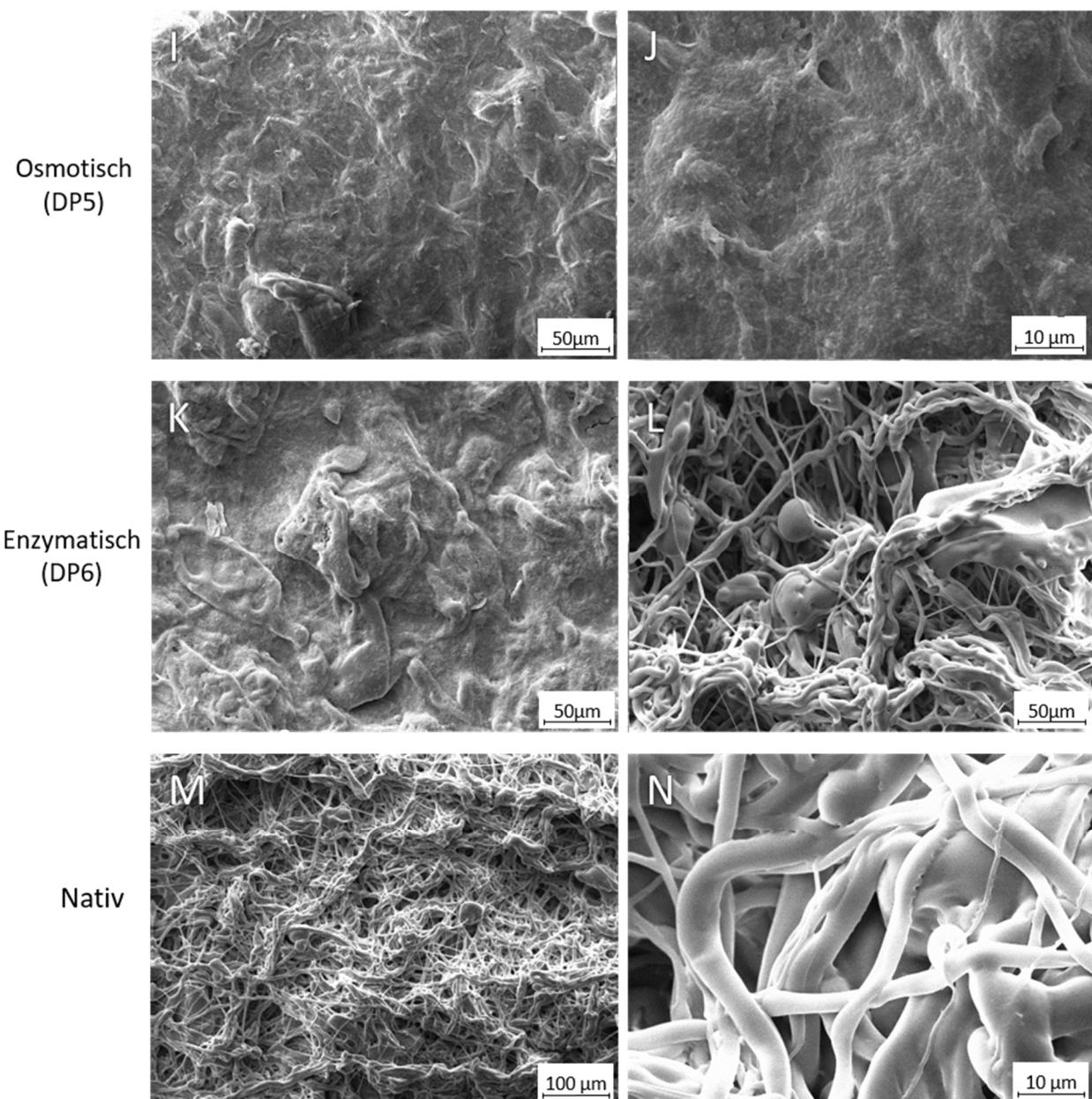
Mittels REM wurde die Oberflächentopographie der dezellularisierten Probenoberfläche evaluiert. Unbeschichtete, native Proben zeigten in einer Übersichtsaufnahme zufällig angeordnete PU Fasern mit leeren Zwischenräumen. Einzelne Fasern waren klar voneinander abgrenzbar, sodass sich eine netzartige Struktur darstellte (Abb 24. M, N). In der vergrößerten Aufnahme wurden die unterschiedlichen Größendimensionen der Fasern untereinander erkennbar. Grenzten die Fasern nicht direkt aneinander, waren sie ausschließlich durch leere Zwischenräume voneinander getrennt. Die Oberflächenstruktur einzelner Fasern stellte sich stets glatt dar.

Proben, welche mittels osmotisch-wirksamen Lösungen behandelt wurden (DP5), zeigten im Gegensatz dazu eine konfluente Schicht an biologischem Material, welche die Fasern bedeckte. In der Übersichtsaufnahme deuteten sich PU-Fasern an, welche nicht eindeutig voneinander abgrenzbar waren (I). Zwischenräume stellten sich nicht dar. Aufnahmen in höherer Vergrößerung zeigten anstatt der Fasern und ihren Zwischenräumen

eine konfluente Schicht biologischen Materials, welche diese lückenlos überzog bzw. bedeckte. Die Oberflächenstruktur dieser Schicht stellte sich in vergrößerter Aufnahme wenig glatt, sondern rau und körnig dar (J). Die Anwendung von SDS in Kombination mit TX-100 (DP1) bzw. SD mit TX-100 (DP4) generierte vergleichbare, jedoch nicht identische Ergebnisse: Eine glatte, konfluente Schicht aus Zellmaterial bedeckte größtenteils die zufällig angeordneten PU Fasern (A, G). Selten stellten sich einzelne Risse der biologischen Beschichtung dar (Pfeile bzw. Kreise), sodass vereinzelt Zwischenräume sichtbar wurden. Die Oberfläche erschien rau, während Fasern nicht klar voneinander abgegrenzt werden konnten (B, H). Im Kontrast hierzu stehen Proben, welche mit SDS in Kombination mit SD (DP2) behandelt wurden. Hier zeigte sich ein sehr heterogenes Muster an Oberflächenstrukturen. Die Mehrzahl der Proben wiesen Risse und Kontinuitätsunterbrechungen der Beschichtung auf. In der Folge konnten Fasern und biologisches Material voneinander unterschieden werden (C, D). Ein ähnlich raues Bild war bei Proben zu sehen, welche mit SD dezellularisiert wurden (DP3) (E, F). Die Anwendung der enzymatischen Lösung (DP6) erzeugte sehr inhomogene Aufnahmen. Einige Proben zeigten Oberflächenstrukturen vergleichbar mit den Aufnahmen resultierend aus DP1 und 4, wohin gegen andere Proben überwiegend PU-Fasern entsprechend den Nativaufnahmen aufwiesen (K, L).

Im letzten Schritt der rasterelektronenmikroskopischen Auswertung wurden Aufnahmen unter Miteinbezug immunhistochemischer Ergebnisse verglichen. Proben welche durch die Anwendung von SDS + TX-100 (DP1) positiven bzw. negativen Farbnachweis für EZM-Komponenten bzw. TE-7 zeigten, wurden mit solchen verglichen, welche für beide Kriterien einen positiven Farbnachweis erbrachten. Letzteres gilt z.B. für Proben resultierend aus der Anwendung von DP5. Beim Vergleich dieser Proben waren keine Unterschiede hinsichtlich der Oberflächentopographie darstellbar: Einzelne PU Fasern deuteten sich an, waren jedoch einschließlich ihrer Zwischenräume von einer biologischen Schicht bedeckt.



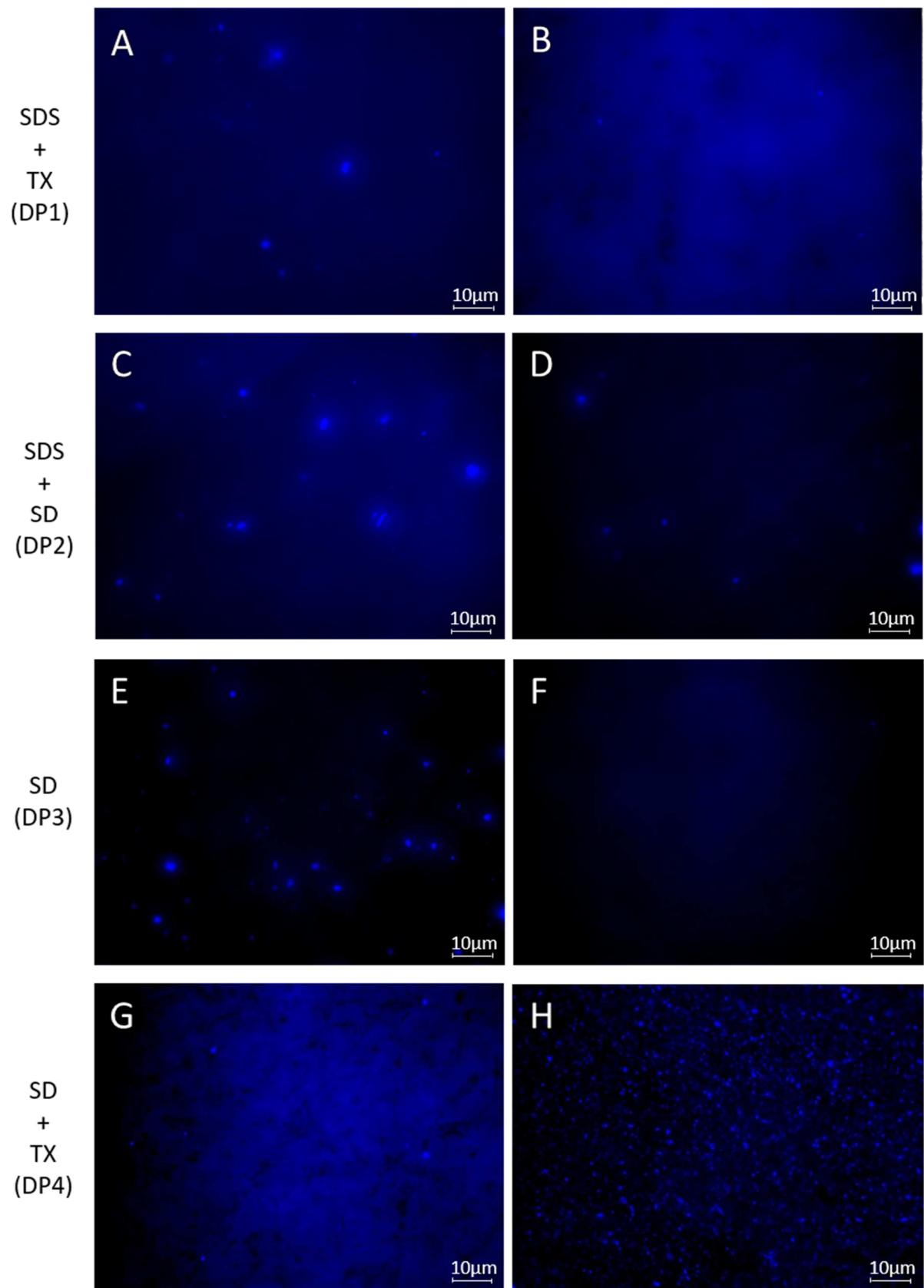


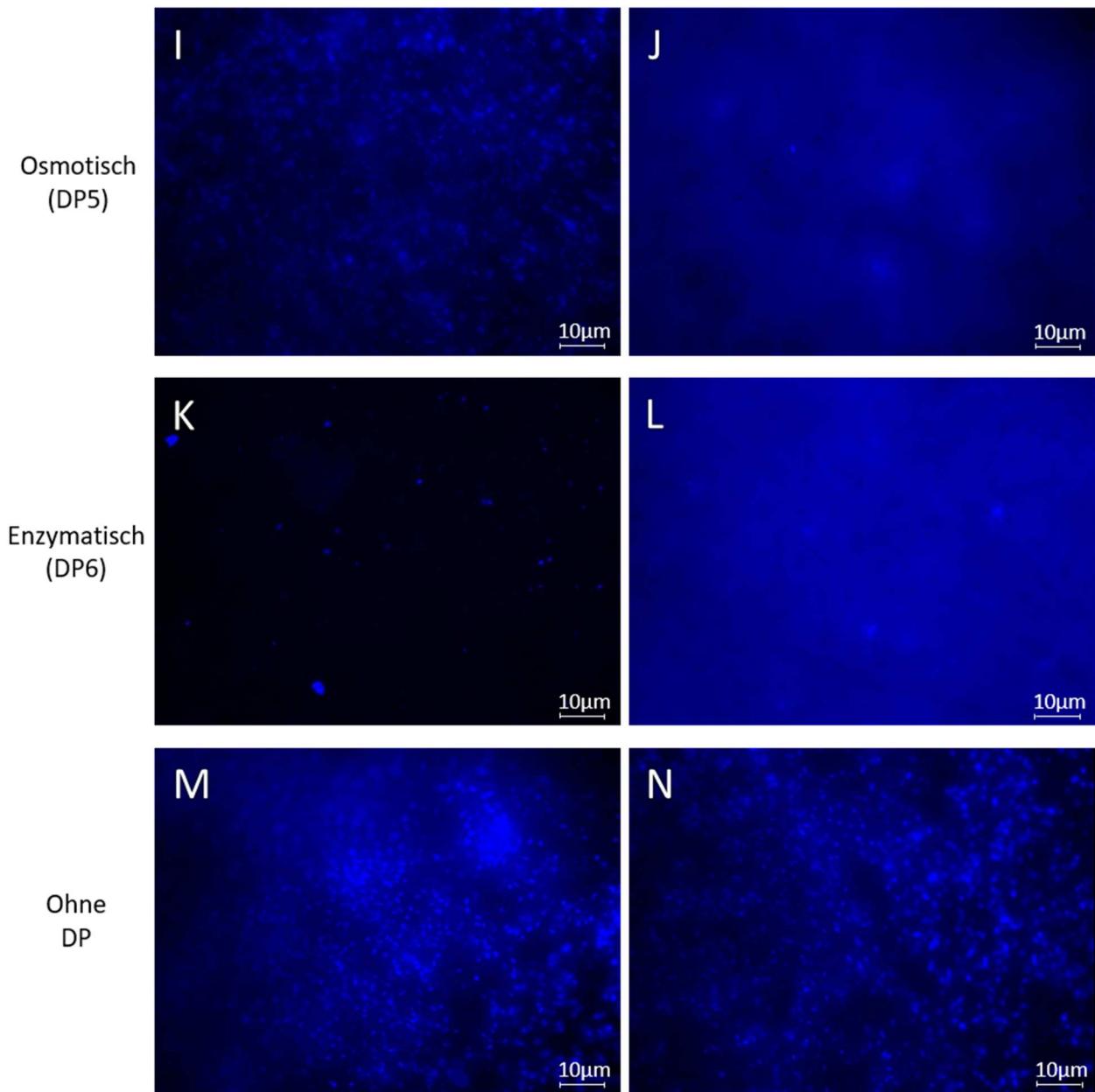
**Abbildung 24:** Repräsentative rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen nach der Dezellularisierung in 1000x und 5000x Vergrößerung. Nach der Anwendung von osmotisch wirksamen Lösungen (DP5) zeigte sich eine konfluente biologische Schicht. Ähnliche Aufnahmen entstanden nach Dezellularisierung mittels SDS + TX-100 (DP1) und SD + TX-100 (DP4). Hier wurden vereinzelt Unterbrechungen der Beschichtung bzw. kleine Löcher mit einem Durchmesser von ca. 1 bis 7 µm in dieser sichtbar (Pfeile). Nach Anwendung von SDS + SD (DP2) bzw. SD (DP3) waren diese Defekte häufiger vorzufinden. Die enzymatische Dezellularisierung erzeugte sehr inhomogene Aufnahmen. Native Proben zeigten im Vergleich unbeschichtete PU Fasern und ihre Zwischenräume bei 500x bzw. 1000x Vergrößerung.

#### **4.2.3. DAPI Färbung**

Mithilfe dieser Färbung konnten verbleibende DNA Bestandteile auf den Proben markiert und mithilfe des Fluoroszenzmikroskops dargestellt werden (Abb. 25). Beschichtete, aber unbehandelte Patche dienten als Kontrollgruppe und zeigten eine sehr dichte Verteilung von fluoreszierenden Partikeln. Diese schienen symmetrisch und rundlich bis oval konfiguriert, waren klar zur Umgebung abgrenzbar und erinnerten an die Form eines Zellkerns (Bild M, N).

Die Anwendung von osmotischen Lösungen (DP5) führte zu einem fast identischen Fluoroszenzsignal: Die Proben wiesen ein sehr dichtes Muster an fluoreszierendem Material auf. Die einzelnen Partikel waren symmetrisch konfiguriert, wirkten jedoch schmäler bzw. länglicher und hatten dadurch eine eher ovalere als rundliche Form (Bild I, J). Durch die enzymatische Lösung dezellularisierte Proben (DP6) zeigten deutlich weniger Partikel mit anderem Erscheinungsbild. Diese waren, im Vergleich zu bisher beschrieben Proben, unsymmetrisch und inhomogen konfiguriert (Bild K, L). Ovale Formen waren hier nicht zu erkennen. Die Applikation von SDS in Kombination mit TX-100 (DP1) oder SD (DP2) erzeugte Proben, bei denen ein positives Fluoroszenzsignal sehr selten erbracht wurde (Bild A-D). Diese Partikel zeigten untereinander eine inhomogene Form: Darunter oval als auch unsymmetrisch konfigurierte Fluoroszenzsignale. Gleiches Bild kennzeichnete die Oberflächen der Proben, welche mittels SD dezellularisiert wurden (DP3) (Bild E,F). Die Hälfte der Proben aus den Versuchen mit SD in Kombination mit TX-100 (DP4) zeigten, ähnlich den Kontrollproben, ein dichtes Muster aus fluoreszierenden Partikeln (Bild G, H). Unabhängig von der Art des angewendeten DPs waren in direkter Umgebung scharf eingestellter Partikel stets unscharfe sichtbar.





**Abbildung 25:** Repräsentative Aufnahmen der DAPI Färbungen von Vorder- und Rückseite einer Probe nach Anwendung der DP. Sowohl unbehandelte Kontrollproben als auch mittels osmotisch wirksamen Lösungen (DP5) dezellularisierte Proben zeigten ein dichtes Muster an fluoreszierenden Partikeln mit ovaler, kernähnlicher formation. Nach Anwendung von DP1, DP2, DP3 und DP4 waren diese sehr vereinzelt mit unregelmäßiger Form erkennbar. Die enzymatische Dezellularisierung erzeugte inhomogene Bilder.

#### **4.2.4. Permeabilitätstestung**

Im Rahmen dieser Untersuchung wurde mithilfe eines konstanten Druckes von 120 mmHg 100 ml destilliertes Wasser auf dezellularisierte Proben appliziert. Dabei wurde die Flussgeschwindigkeit des Wassers in Abhängigkeit der einzelnen Proben gemessen (siehe Tabelle 8). Vier unbeschichtete PU-Proben dienten als Kontrolle. Alle untersuchten PU-Proben hatten eine Dicke von 0,12 mm ( $\pm 0,02$  mm). Kontrollen zeigten im Mittelwert eine Flussrate von  $299,71 \pm 142,11$  ml/min. Proben, welche man mittels SDS und TX-100 (DP1) dezellularisierte hatten eine maximale bzw. minimale Flussrate von 291,26 ml/min bzw. 39,87 ml/min. Als Mittelwerte ergaben sich  $149,72 \pm 98,21$  ml/min (Vene #1) bzw.  $111,05 \pm 78,43$  ml/min (Vene #2), sodass insgesamt eine durchschnittliche Flussrate von  $130,38 \pm 130,31$  ml/min gemessen wurde. Mittels SDS und SD (DP2) dezellularisierte Proben zeigten Flussraten von 24,99 ml/min bis 472,44 ml/min. Die Mittelwerte betragen  $270,08 \pm 135,20$  ml/min (Vene #1) bzw.  $172,58 \pm 104,53$  ml/min (Vene #2). Die durchschnittliche Flussrate dieser Proben lag bei  $221,33 \pm 130,31$  ml/min.

| Native Kontrollen     | ml/min |
|-----------------------|--------|
| Patch #1              | 219,78 |
| Patch #2              | 228,14 |
| Patch #3              | 205,48 |
| Patch #4              | 545,45 |
| Mittelwert pro Spalte | 299,71 |
| STD-Abweichung        | 142,11 |

**Tabelle 8:** Tabellarische Übersicht der Flussgeschwindigkeiten in ml/min einzelner Proben in Abhängigkeit des DP nach Venenreihe.

| SDS + SD (Vene#1)         | ml/min | ml/min |
|---------------------------|--------|--------|
| Patch #1                  | 326,09 | 335,20 |
| Patch #2                  | 312,50 | 314,14 |
| Patch #3                  | 145,99 | 120,48 |
| Patch #4                  | 472,44 | 465,12 |
| Patch #5                  | 107,14 | 101,69 |
| Mittelwert pro Spalte     | 272,83 | 267,32 |
| STD-Abweichung pro Spalte | 132,51 | 137,78 |
| Mittelwert Vene 1         |        | 270,08 |
| STD-Abweichung Vene 1     |        | 135,20 |

| SDS+TX (Vene#1)           | ml/min | ml/min |
|---------------------------|--------|--------|
| Patch #1                  |        | 54,55  |
| Patch #2                  |        | 212,77 |
| Patch #3                  |        | 13,92  |
| Patch #4                  |        | 216,61 |
| Patch #5                  |        | 199,34 |
| Mittelwert pro Spalte     |        | 139,43 |
| STD-Abweichung pro Spalte |        | 87,04  |
| Mittelwert Vene 1         |        | 149,72 |
| STD-Abweichung Vene 1     |        | 98,21  |

| SDS + SD (Vene#2)         | ml/min | ml/min |
|---------------------------|--------|--------|
| Patch #1                  | 31,02  | 24,99  |
| Patch #2                  | 188,68 | 185,19 |
| Patch #3                  | 192,31 | 174,42 |
| Patch #4                  | 405,41 | 265,49 |
| Patch #5                  | 125,52 | 132,74 |
| Mittelwert pro Spalte     | 188,59 | 156,56 |
| STD-Abweichung pro Spalte | 123,15 | 78,59  |
| Mittelwert Vene 2         |        | 172,58 |
| STD-Abweichung Vene 2     |        | 104,53 |

| SDS+TX (Vene#2)           | ml/min | ml/min |
|---------------------------|--------|--------|
| Patch #1                  |        | 39,87  |
| Patch #2                  |        | 246,91 |
| Patch #3                  |        | 103,45 |
| Patch #4                  |        | 43,07  |
| Patch #5                  |        | 120,00 |
| Mittelwert pro Spalte     |        | 110,66 |
| STD-Abweichung pro Spalte |        | 75,21  |
| Mittelwert Vene 2         |        | 111,05 |
| STD-Abweichung Vene 2     |        | 78,43  |

|                                  |        |        |
|----------------------------------|--------|--------|
| mittelwert SDS+ SD pro Spalte    | 230,71 | 211,94 |
| Stdabweichung SDS +SD pro Spalte | 134,67 | 125,09 |

|                                 |        |        |
|---------------------------------|--------|--------|
| mittelwert SDS+TX pro Spalte    | 125,05 | 135,72 |
| stdabweichung SDS+TX pro Spalte | 82,60  | 98,31  |

| SDS + SD (Vene 1 und 2)          | ml/min | ml/min |
|----------------------------------|--------|--------|
| mittelwert SDS+ SD insgesamt     | 221,33 |        |
| STD-Abweichung SDS +SD insgesamt | 130,31 |        |

| SDS+TX (Vene 1 und 2)           | ml/min | ml/min |
|---------------------------------|--------|--------|
| mittelwert SDS+TX insgesamt     |        | 130,38 |
| STD-Abweichung SDS+TX insgesamt |        | 90,95  |

# *5. Diskussion*

TE widmet sich der Aufgabe, funktionelles und biokompatibles Prothesenmaterial mit einem Minimum an immunologischen Risikofaktoren zu entwerfen. Die in der Einleitung beschriebenen Herstellungsansätze sind ebenso zahlreich wie unterschiedlich. Hierzu gehört die Verwendung rein biologischer Gewebe bzw. ganzer Organe, aber auch synthetische Materialien bzw. eine Kombination beider kommt zum Einsatz: Die sogenannten Hybridprothesen (siehe Einleitung). Trotz der zahlreichen Herstellungsansätze- und Erfolge bleibt eine Vielzahl an Fragen unbeantwortet. Diese richten sich sowohl an die mechanischen als auch biokompatiblen Eigenschaften neuer Prothesen. Diese Arbeit leistet ihren Beitrag, indem wir die Grundlage für ein neues Hybridmaterial untersuchten bzw. entwarfen. Höchste Priorität liegt darin, immunologische Risikofaktoren zugunsten der Biokompatibilität auf ein Minimum zu reduzieren.

## *5.1. Dynamische versus statische Zellbeschichtung*

Vorangegangene Versuche des herzchirurgischen Labors basierten bereits auf der Erkenntnis, dass FB auf PU kultiviert werden konnten [132]. Diese Möglichkeit wurde im Rahmen dieser Arbeit (Proliferationsevaluation und Dezellularisierungsversuch) erneut bestätigt. Um die Befunde zu ergänzen, richtete sich die Fragestellung der Proliferationsevaluation an den erforderlichen Zeitraum, welcher eine effektive Beschichtung ermöglicht. Diese Zeitspanne sollte so kurz wie möglich und so lang wie nötig gehalten werden. Nach zehn Tagen Kultivierungszeit unter statischen Bedingungen zeigte sich eine konfluente Zellschicht, welche die einzelnen PU Fasern als auch ihren Zwischenraum bedeckt. Ähnliche Studien der letzten Jahre beobachteten zwar die Kultivierbarkeit von FB auf einem biologischen bzw. synthetischen Rückgrat, setzten die Frage nach dem optimalen Zeitraum (bei statischen Bedingungen) dabei aber nicht in den Fokus der Versuche. Vitacolonna et. al. untersuchten verschiedene statische Beschichtungsmethoden [133]. Dabei wurden FB auf nativer bzw. eingeschnittener Dermis bei unterschiedlichen Druckbedingungen über mehrere Tage kultiviert. Die Proben wurden

direkt nach Beschichtung bzw. nach vier, acht und 12 Tagen Kultivierung immunhistochemisch und via MTT-Test ausgewertet, welcher Aufschluss über die metabolische Aktivität im Zellverband gibt. Hierbei zeigte sich in allen Proben eine steigende Proliferationsrate der FB bis zum vierten Tag. Im Anschluss sank diese kontinuierlich bis zum Tag 12. Die höchste Zelldichte und metabolische Aktivität war zwar am letzten Tag der Auswertung nachweisbar, unterschied sich jedoch nur gering im Vergleich zu Proben, welche nach 8 Tagen Kultivierung ausgewertet wurden. In einer anderen Studie von Xiao et. al. wurde die Effektivität von statischer bzw. dynamischer Beschichtung und Kultivierung von FB auf synthetischem Material über einen Zeitraum von 21 Tagen beobachtet [134]. Die Auswertung erfolgte täglich, beginnend am sechsten Tag, durch IHC und quantitativer Zellzahlbestimmung. Nach dynamischer Beschichtung und zehn Tagen statischer Kultivierung wurde eine prominente Schicht aus EZM nachgewiesen. Sowohl die Zelldichte als auch histologische Merkmale änderten sich in den darauf folgenden Tagen nur geringfügig. Die Ergebnisse dieser Studien stehen mit unseren im Einklang. In Bezug auf eine statische Kultivierung von FB ist ein Zeitraum von 10 Tagen ausreichend, um eine prominente Beschichtung zu ermöglichen. Zukünftige Versuche könnten die Proliferationsraten von FB auf PU zusätzlich untersuchen, sodass je nach Resultat ein kürzerer Zeitraum für die Kultivierung in Betracht gezogen werden kann.

Darüber hinaus gibt es weitere Möglichkeiten die Zellbeschichtung zu gestalten. Dazu zählen dynamische Methoden, in denen Zellmedien unter ständiger Bewegung mit Trägermaterial und Zellen in Kontakt treten. Im Vergleich zu statischen Bedingungen sind Zell- und Nährmedien weniger von Diffusionskapazitäten begrenzt. Zum Einsatz kommen z.B. Bioreaktoren, in denen die Zellsuspension mittels pulsatilem Fluss appliziert wird [135, 136]. Sie bilden somit einen Kontrast zu dem hier verwendeten Ansatz, Trägermaterial unter statischen Bedingungen Zellmedien auszusetzen. Eine Studie von Warnock et al. vergleicht diese verschiedenen Ansätze in Hinblick auf ihre Effektivität [137]. Eine Gruppe von synthetischen, unbeschichteten Scaffolds rotierte um 360° in Zellmedium mithilfe eines Bioreaktors. Die Kontrollgruppe wurde ebenfalls im Bioreaktor fixiert, rotierte jedoch nicht. Proben, welche unter Rotation beschichtet wurden zeigten nach Kultivierung im Vergleich die dreifache Zellzahl von FB. Gleichzeitig besaßen sie den höchsten Anteil von Glykosaminoglykanen (GAG). Eine nach demselben Prinzip vergleichende Studie von Haykal et al. untersuchte die Rezellularisierung von dezellularisierter Schweinetrachea [138]. Eine

Gruppe von Proben wurde für die Zellbesiedelung (mit mesenchymalen Stammzellen) zuerst einem wechselnden bidirektionalen Fluss einer Zelllösung im Bioreaktor ausgesetzt. Anschließend erfolgte die Zellkultivierung bei unidirektionalem Fluss im Inkubator. Die Kontrollgruppe wurde keinem Fluss ausgesetzt, drehte sich aber im Bioreaktor für den gleichen Zeitraum in der Horizontalebene um die gleiche Achse. Die Beschichtung und Kultivierung der länglichen Tracheasegmente, welche einem Flussprofil ausgesetzt waren, zeigten eine signifikant erhöhte Anzahl an Zellen auf der gesamten luminalen Fläche. Zhao F. et al. ziehen ein ähnliches Fazit: Im 3D-Bioreaktor beschichtete Polyethylenscaffolds zeigten eine  $4.22 \times 10^7$  (Zellen/ml) höhere Zelldichte im Vergleich zu statisch beschichteten Proben [139].

Diese Studien liefern wertvolle Erkenntnisse für die Zellbeschichtung und Kultivierung. Zu beachten bleibt die Tatsache, dass kein Versuchsaufbau unserem gleicht. Oftmals wurden nicht nur andere Zelltypen, sondern auch andere Trägermaterialien verwendet. Darunter auch bereits dezellularisierte, dessen DP ebenso variabel sind [108–116]. Der statische Aufbau unseres Versuches ermöglichte uns das exakte Areal einer Oberfläche für die Zellbeschichtung zu definieren. Daraus ergab sich der wichtige Vorteil, beschichtete und nicht-beschichtete Areale eindeutig zu bestimmen und in der Auswertung zu vergleichen (siehe Abb. 17). Desweiteren erleichtern statische Bedingungen die zelluläre Adhäsion während der Beschichtung [138]. Gleichzeitig ist zu vermerken, dass sie inhomogene Beschichtungsmuster innerhalb eines Modells verursachen können [140, 141]. Die nach zehn Tagen Kultivierung vorhandene konfluente Zellschicht von FB auf dem PU liefert ausreichenden Nachweis einer erfolgreichen Beschichtung mit Zellen. Die Voraussetzungen für den anschließenden Dezellularisierungsversuch sind erfüllt, sodass verschiedene DP in vergleichender Absicht angewendet werden können. Zukünftige Untersuchungen, z.B. die Beschichtung von 3D-Modellen, erfordern evtl. eine höhere Zellzahl. Die jetzige statische Methode wird diesen Ansprüche sehr wahrscheinlich nicht gerecht, weswegen der hier vorgestellte Ansatz re-evaluierter und um eine dynamische Komponente erweitert werden sollte.

## 5.2. *Effektive Dezellularisierung durch SDS*

Mit dem Ziel immunologische Risikoeigenschaften des Prothesenmaterials zu reduzieren, fällt das Augenmerk auf den Kern dieser Arbeit: Die vergleichende Dezellularisierung durch verschiedene Komponenten. Die Effektivität eines DP wird im Rahmen dieser Arbeit folgendermaßen definiert: Je kleiner die Menge von allogenem Zell- und DNA-Rückstand bei Erhalt von EZM-Komponenten, desto höher die Effektivität. Es wurden sechs verschiedene DP angewandt und das resultierende Material in Hinblick auf histologische und morphologische Eigenschaften untersucht und verglichen.

Mittels IHC Färbungen konnten wir nachweisen, dass DP1 und DP2 das beschichtete PU von Zellen befreien konnte. Beide Protokolle enthielten SDS. Der FB-spezifische immunhistochemische Marker, TE-7, wurde sehr selten nachgewiesen. Dazu kommen die Befunde der DAPI-Färbung, welche vereinzelt Fluoreszenzsignale zeigten. Diese waren nicht mit den Kernformationen nativer Kontrollproben vergleichbar, sodass es sich hierbei wahrscheinlich um Artefakte handelte. Die Wirksamkeit von SDS wird durch ähnliche Ergebnisse belegt, welche in der Vergangenheit publiziert wurden: Khorramirouz et al. demonstrierten die erfolgreiche Dezellularisierung xenogener Aortenconduits [142]. SDS wurde dabei mit SD kombiniert und mit zwei weiteren Protokollen verglichen: Einerseits einer Kombination aus Detergenzien, Komplexbildnern und Enzymen (Trypsin+RNase+DNAse+EDTA), andererseits einer rein enzymatischen Lösung (Trypsin+RNase+DNAse). Die Lösung basierend auf Detergenzien dezellularisierte die Conduits am effektivsten. Dabei wurden Zellen komplett entfernt, während die EZM und deren Kollagen erhalten blieben. Die rein enzymatische Lösung entfernte zwar auch einen Großteil der Zellbestände, schädigte dabei aber auch EZM-Komponenten, insbesondere Kollagen. Oberwallner et al. dezellularisierten humanes linksventrikuläres Myokard mit verschiedenen Protokollen [143]. Diese basierten entweder auf den Detergenzien SDS, Triton-X, SD oder osmotisch wirksamen Lösungen. Mittels SDS wurde das Myokard nahezu zellfrei, während EZM erhalten bleib. Im Anschluss konnte das dezellularisierte Myokard mit drei verschiedenen Zellpopulationen neu beschichtet werden, darunter auch mesenchymale Stammzellen. Zahlreiche weitere Studien integrieren aus diesem Grund SDS als festen Bestandteil ihrer DP, oft in Kombination mit TX-100 [144–146]. Obwohl in der vorliegenden Arbeit SDS nicht bei biologischen Scaffolds angewendet wurde, stehen unsere

Resultate in Einklang mit diesen Erkenntnissen: SDS besitzt ein hohes Potenzial, Gewebe effektiv zu dezellularisieren. Wir konnten zeigen, dass dies auch für mit FB beschichtetem Polyurethan gilt.

### *5.3. Materialgrundlage und Anwendungsform von DP als Ko-faktoren für eine effektive Dezellularisierung*

Das Risiko einer entzündlichen Immunreaktion durch eine Prothese wird minimiert, wenn sie keine fremden DNA Bestandteile mehr aufweist [105, 106]. Aus diesem Grund evaluierten wir mittels DAPI-Färbung, inwiefern DNA nach Dezellularisierung nachweisbar war. DP1 (SDS+TX-100) und DP2 (SDS+SD) lieferten dabei die besten Ergebnisse, indem nur sehr wenige Fluoreszenzsignale auf diesen Proben nachgewiesen werden konnten. Im Kontrast hierzu zeigten einige Proben nach Anwendung von DP4 (SD+TX-100) ein dichtes Muster an fluoreszierender DNA. In einer anderen Studie dezellularisierten Akhyari et al. Rattenherzen anhand von vier verschiedenen DP, um diese anschließend auf verbleibende DNA zu untersuchen [147]. Eines der vier Protokolle, basierend auf SDS+TX-100, erzielte im Vergleich mangelhafte Resultate: Nur 43% der nativen DNA der Herzen wurde durch diese Kombination entfernt. Im Gegensatz hierzu entfernte die Kombination aus EDTA, SDS, SD und TX-100 mehr als 99,5%. Darüber hinaus wurden Proteine non-kollagenen Ursprungs nach Dezellularisierung quantifiziert und mit denen nativer Herzen verglichen. SDS+TX-100 entfernten nur 86,10% der Proteine, das umfangreichere Protokoll hingegen 96%. Diese Ergebnisse erscheinen im Vergleich zu unseren zunächst widersprüchlich. Vergleicht man den konkreten Versuchsaufbau, verdeutlichen die variierenden Resultate die einflussreiche Rolle des Ausgangsmaterials. Unser Experiment bestand daraus, zarte PU-Proben unter Schwenk- und Rotationsbewegung in Dezellularisierungslösung zu baden. Akhyari et al. kanülierten die Rattenherzen, sodass die Detergenzien mittels retrograder Perfusion appliziert wurden. Dabei mussten die Lösungen zuerst Perfusions- und Diffusionsstrecke überwinden, um an richtiger Stelle zu wirken. Bei der retrograden Perfusion könnte diese Bedingung die Wirksamkeit von Detergenzien in tiefer gelegenen Myokardschichten herabsetzen. Im Umkehrschluss kann das Auswaschen der Lösung erschwert sein, sodass Detergenzien über die vorgesehene Anwendungszeit hinaus im Organ bzw. Material verbleiben.

Caamaño S et. al untersuchten in diesem Zusammenhang die Nachweisbarkeit von SDS in Waschlösungen dezellularisierter Schweineperikarde [148]. Diese wurden anfangs mit SDS in variierender Konzentration behandelt, um sie anschließend für 96h zu waschen. Obwohl die Konzentration an SDS im Laufe des Waschvorgangs sank, war sie selbst nach Anwendung von 0,01% SDS bis zum Ende nachweisbar. In einem separaten Versuch wurde gezeigt, dass SDS Konzentrationen von  $\geq 10$  microM in einer Endothelzellkultur die Zellzahl um ein signifikantes Maß senkten. Diese Ergebnisse liefern Hinweise darauf, dass durch die Dezellularisierung verbliebene Detergenzien wie SDS die Rezellularisierung erschweren könnten. Demgegenüber bleibt zu beachten, dass zahlreiche Dezellularisierungsversuche xenogenen Materials in der Vergangenheit, u.a. mit SDS, trotzdem eine anschließende Rezellularisierung ermöglichten [111, 129, 149, 150]. Im Idealfall lassen sich zukünftig Anzahl und Konzentrationen von Komponenten eines DP senken, während Waschzyklen verlängert oder effektiver gestaltet werden.

#### *5.4. Enzymatische Komponenten verursachen Schäden an der EZM*

Der Erhalt der EZM ist ein weiteres Kriterium für die Effektivität der Dezellularisierung. In unserem Vergleich konnten wir je nach Protokoll sehr variable Ergebnisse in diesem Zusammenhang erzeugen. Wichtiger Befund dieser Arbeit ist die Tatsache, dass wir Zellen und DNA von beschichtetem PU mittels SDS+TX-100 (DP1) entfernten, um dabei gleichzeitig EZM auf synthetischem Material zu erhalten. SDS+SD (DP2) erzeugte ähnliche Resultate. Der Anteil der Proben, welche alle untersuchten Matrixkomponenten enthielten, war dabei jedoch geringer. Auch die Anwendung von Accutase® als enzymatische Komponente erzeugte eine Zellfreiheit in unserem Versuch. Die verbleibende Schicht von EZM zeigte sich, im Vergleich zu Proben nach Anwendung anderer DP, jedoch weniger prominent bzw. war auf den Probenoberflächen nur vereinzelt darstellbar. Andere Studien untersuchten den Effekt kombinierter Protokolle, welche sowohl Detergenzien als auch enzymatische Lösungen enthalten. Wainwright et al. dezellularisierten Schweineherzen via Perfusion einzelner Komponenten [151]. Angefangen mit Trypsin folgte EDTA, dann TX-100 und zum Abschluss SD. Die resultierende kardiale EZM enthielt reichlich Kollagene, v.a. I, III und IV, als auch Elastin und GAG. Die mechanische Integrität der Herzen blieb ebenfalls erhalten,

welches die Effektivität des Prozesses zusätzlich betont. Im Gegenzug wurde gezeigt, dass enzymatische Komponenten negativen Einfluss auf die Qualität der EZM ausüben können, indem sie Veränderung der Matrix hervorrufen. Quervernetzungen von Elastin und Kollagen werden aufgehoben, wodurch modifizierte EZM Fragmente freigesetzt werden. Diese Fragmente können kostimulatorisch Entzündungsreaktionen durch neutrophile Zellen auszulösen [152]. Dies birgt ein erhöhtes Risiko ungewollte Immunreaktionen zu provozieren, wodurch die Biokompatibilität der Prothese vermindert werden kann [153]. Zum selben Fazit kommen Grauss et al., indem Trypsin und TX-100 getrennt bei von Schweinen stammenden Herzklappen angewandt wurden [114]. Dabei deformierte Trypsin elastische Fasern. TX-100 veränderte das Verteilungsmuster von Kollagenfasern. Beide Komponenten führten zum Verlust von Adhäsionsmolekülen, insbesondere Laminin und Fibronectin. Gegensätzliche Ergebnisse publizierten Mallis et. al: Menschliche Nabelschnüre wurden mit zwei unterschiedlichen DP behandelt [154]. Einerseits durch 3-[*(3-cholamidopropyl)dimethylammonio*]-1-propansulfat (CHAPS) in Kombination mit SDS, andererseits mit SDS und Nuklease. Beide Protokolle konnten reichlich EZM, insbesondere Fibronectin und Kollagen I erhalten. Der Verlust einer Vielzahl von Matrixkomponenten durch Accutase® in unserem Versuch bestärkt die These, dass enzymatische Komponenten für die Dezellularisierung ungeeigneter sind als Detergenzen.

## *5.5. Fehlen von Matrixkomponenten nach der Anwendung von SDS mit SD*

Im Rahmen der Auswertung zeigte sich, dass insbesondere Kollagene durch den Gebrauch von Detergenzen erhalten werden konnten. Dies gilt besonders für die Kombination aus SDS+TX-100 (DP1) und SD+TX-100 (DP4). Im Kontrast hierzu stehen Proben, welche mit SD+SDS (DP2) behandelt wurden. Obwohl kein einziger Zellnachweis erfolgte, wurden Kollagene, Fibronectin und Laminin im Vergleich zu DP1 und DP4 seltener nachgewiesen, sodass dieses Protokoll eher schädliche Auswirkungen auf die Matrix hat. Kollagene sind neben der mechanischen Stabilität auch für Quervernetzungen innerhalb der EZM-Komponenten verantwortlich. Hierdurch wird die Zelladhäsion, ihre Interaktion und das Wachstum zugunsten der Gewebedifferenzierung gefördert [155]. Dies sind entscheidende Prozesse, um die Interaktion und Modellierung von Prothesenmaterial in

situ zu ermöglichen. Dabei kann nicht ausgeschlossen werden, ob andere Komponenten wie SDS oder TX-100 Schäden an der EZM ausrichten. Liao et. al. untersuchten die Auswirkungen von TX-100, SDS und Trypsin auf die strukturellen Eigenschaften xenogener Aortenklappen [156]. Alle Komponenten veränderten die räumliche Ausrichtung von Kollagenfibrillen. Trypsin zeigte ähnlichen Einfluss auf Elastinfasern, sodass ihre Organisationsstruktur kaum erkennbar war. TX-100 und Trypsin führten zum Verlust von GAG und beeinflussten die Dicke des dezellularisierten Gewebes. Dabei wurde eine Zu- bzw. Abnahme des Gewebedurchmessers gemessen. Im REM zeigte sich nach Anwendung von SDS ein dichtes Netzwerk an EZM, welches mit nativen Proben vergleichbar war. TX-100 und Trypsin hingegen lockerten dieses Netzwerk auf, sodass die Oberflächenstruktur inkonstanter erschien.

## *5.6. Quantifizierung von Matrixkomponenten als ergänzende Auswertungsmethode*

Die immunhistochemische Beurteilung verschiedener EZM-Komponenten ist eine wichtige Methode, um die Effektivität eines DP zu beurteilen. Sie gibt nicht nur Aufschluss über das Vorhandensein einzelner Komponenten, sondern zeigt auch deren Verteilungsmuster. Anhand dieser Methode konnten wir eine konfluente Schicht an EZM durch den Nachweis mehrerer ihrer Komponenten nachweisen. Zukünftig besteht die Option, diesen Nachweis durch Quantifizierung zu konkretisieren. Methoden zur Quantifizierung von Matrixkomponenten finden bereits Anwendung [147]. Dabei kommen jedoch u.a. enzymatische Komponenten wie Pepsin zum Einsatz, welche die EZM nachträglich schädigen können, weshalb dieser Ansatz hinterfragt werden sollte. Neben der Quantität stellt sich zusätzlich die Frage nach dem Qualitätserhalt der EZM. Aktuelle Publikationen bewerten EZM nicht nur nach Menge, sondern auch nach ihrer Komposition und Raumkonfiguration. Unterschiede in diesen Qualitätskriterien kennzeichnen den Unterschied zwischen Regenerationsprozessen und Narbenbildung [157, 158]. Durch unsere Methode konnten wir zunächst eine konfluente Schicht mehrerer EZM-Komponenten nach Dezellularisierung nachweisen, sodass zukünftig Qualitätskriterien der EZM untersucht werden können.

## *5.7. Mechanische und physikalische Eigenschaften des Scaffolds*

Je nach zukünftigem Anwendungsspektrum des Materials unterscheiden sich dessen mechanische Ansprüche. Hierfür sollten gewisse Grundvoraussetzungen erfüllt sein. Zu diesen gehört z.B. eine begrenzte Wasserpermeabilität, sodass Flüssigkeit in-vivo von intra- und extraluminalem Milieu effektiv getrennt wird. Scaffolds resultierend aus der Anwendung von DP1 und DP2 wurden bei 120 mmHg Druck einer 100 ml Wassersäule ausgesetzt. Native Patche hatten eine durchschnittliche Flussrate von  $299,71 \pm 142,11$  ml/min, dezellularisierte Patche hingegen eine von  $130,38 \pm 90,95$  ml/min (DP1) bzw.  $221,33 \pm 130,31$  ml/min (DP2). Dabei wurden hohe Standardabweichungen festgestellt. Ursächlich können hierfür variierende Schichtdicken der Proben sein. Der Herstellungsprozess des PU kann für zukünftige Versuche optimiert werden, sodass konstantere Bedingungen erfüllt sind. Trotzdem ist zu verzeichnen, dass PU mit erhaltener EZM-Schicht nach Dezellularisierung eine reduzierte Flussrate in diesem Zusammenhang ermöglicht. Obwohl der robuste Charakter des PU als auch die Anwesenheit zahlreicher EZM-Komponenten aussichtsreiche Eigenschaften suggerieren, sollten diese in Zukunft mithilfe physikalischer Stresstests wie z.B. Zugversuchen untersucht werden, um Materialeigenschaften konkreter beurteilen zu können [156].

## *5.8. Bedeutungen für den klinischen Alltag*

Die Anforderung an Prothesenmaterial übersteigen Aspekte der mechanischen Eigenschaften und Biokompatibilität. Für die klinische Relevanz einer Prothese sind Produktionskosten und zeitnahe Verfügbarkeit wichtige Einflussfaktoren. Im Idealfall kann das Material serienweise mit konstanter Qualität produziert werden, ohne dass dabei zeitintensive, empfängerspezifische Modifikationen vorgenommen werden müssen [159]. Theoretisch könnten Hybridprothesen zugunsten der Biokompatibilität mit Endothelzellen des Empfängers beschichtet werden. Das mag in Einzelfällen sinnvoll sein, behindert aber die serielle Produktion und damit die Zugriffszeit der klinischen Verfügbarkeit. Operateure bevorzugen Prothesen welche für den sofortigen Gebrauch gelagert zur Verfügung stehen (der sog. „off-the-shelf“ Ansatz). Besteht diese Möglichkeit, ist auch der Einsatz in Notfallsituationen möglich. Der Einsatz von synthetischem PU und einer allogenen EZM in

unseren Versuchen umgeht diese Hindernisse. PU ist jederzeit und in großen Mengen produzierbar. Hinzu kommt die Erkenntnis, dass die Proliferationsrate von FB nicht negativ mit dem Spenderalter korreliert [160]. Patienten in gutem physiologischem Zustand könnten als verlässliche Spenderquelle für Zellen dienen. Zell- bzw. Venenentnahme kann im Rahmen von operativen Eingriffen beiläufig stattfinden, um anschließend PU mit allogener EZM zu beschichten. Langfristig müssen neben der Verträglichkeit in vivo auch Fragen bezüglich der Haltbarkeit bzw. des Verfallsdatum der Hybridprothese beantwortet werden.

## *6. Fazit und Ausblick*

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass sich PU als Trägermaterial für FB eignet. Nach zehn Tagen statischer Beschichtung zeigte sich eine konfluente Zellschicht von FB mit prominenter Schicht einer EZM. Optional kann zukünftig durch Verwendung von Bioreaktoren der Beschichtungsprozess um eine dynamische Komponente erweitert werden. Durch die vergleichende Dezellularisierungsstudie am beschichteten PU können wir unterschiedliche Methoden bewerten. Protokolle ohne Einsatz von Detergenzien erzielten dabei unzureichende Ergebnisse. Accutase® als enzymatische Komponente führte zu einer inkonstanten An- bzw. Abwesenheit von FB und EZM-Komponenten. Die Anwendung von hyper- und hypotonen Lösungen entfernte weder Zellen noch DNA. SD in Kombination mit Ethanol (DP3) schädigte die EZM beim Erhalt von DNA. Protokolle basierend auf SDS waren am effektivsten. Die Kombination mit TX-100 (DP1) oder SD (DP2) entfernte FB und DNA vollständig, wobei nur DP1 alle untersuchten EZM-Komponenten erhalten konnte. REM Aufnahmen dieser Proben zeigen eine konfluente Schicht der EZM. Eine Quantifizierung derer Komponenten erlauben ergänzende Aussagen und sollten zukünftig untersucht werden. Da der Gebrauch von Roti®-Histol als auch das Etablieren von Standardprotokollen zum Verbrauch von Reserveproben führte, sollten zukünftig der Versuchsumfang erhöht werden und die Anwendung von Roti®-Histol vermieden werden.

Der Vergleich zu Resultaten anderer Arbeitsgruppen bzgl. der Dezellularisierung offenbart die Bedeutsamkeit versuchsabhängiger Faktoren wie z.B. Ausgangsmaterial und Anwendungsform. DP versprechen keinen universellen Erfolg, sondern müssen für individuelle Anwendungsbereiche modifiziert werden. Die Wasserpermeabilitätstestung deutet auf eine Abnahme der Permeabilität durch die Beschichtung mit EZM hin. PU Proben sollten zukünftig mit einheitlicher Dicke produziert werden um Standardabweichungen der Messwerte zu reduzieren. Zusätzlich können Ergebnisse mit Hilfe von z.B. Zugbelastungstests um mechanisch-physikalische Materialeigenschaften ergänzt werden. Langfristig können Zell- oder Venenspenden junger Patienten in gutem Allgemeinzustand als verlässliche Spenderquelle dienen. Die Kombination mit schnell produzierbarem PU ermöglicht gleichbleibende Qualitätsstandards bei höheren Produktionszahlen. Darüber

hinaus sind keine empfängerspezifischen Modifikationen des Prothesenmaterials notwendig, sodass die spontane Verwendung im klinischen Alltag wahrscheinlicher wird.

Durch die Anwendung von SDS mit TX-100 konnten wir ein mit EZM beschichtetes hybrides Grundmaterial schaffen, welches unter Abwesenheit von allogenem Zellen und DNA biokompatible Eigenschaften suggeriert. Das langfristige Anwendungspotenzial als Bestandteil zukünftiger kardiovaskulärer Implantate ist aussichtsreich und sollte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein. Kurzfristig bietet sich an, die effektive Dezellularisierung mit SDS + TX-100 genauer zu untersuchen. Hierzu sollten weitere DP in größerem Versuchsumfang verglichen werden. SDS sollte in jedem DP enthalten sein. Dieses kann mit anderen Detergenzien und variierenden Konzentrationen ergänzt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollten dabei einerseits reproduzierbar sein und andererseits detaillierte Aussagen bezüglich der Wirkung von Detergenzien auf zellbeschichtetes PU erlauben. Im Idealfall können die Konzentrationen der Komponenten erniedrigt werden (< 0,5%), sodass Schäden bzw. Alterationen an der verbleibenden EZM minimiert werden.

# 7. Quellen

## 7.1. Textnachweise

- [1] Crubézy E, Murail P, Girard L and Bernadou J P 1998 False teeth of the Roman world *Nature* **391** 29
- [2] Dieffenbach J F 1822 *Nonnulla de Regeneratione et Transplantatione: Dissertatio inauguralis* (Heripoli: Richter)
- [3] Paré A, Johnson T, Cecil T and Baker G anno 1634 *The workes of that famous chirurgion Ambrose Parey.: Johnson* (London: Printed by Th Cotes and R. Young)
- [4] Hunter J, Webb F C and Hulme R T 1865 *The natural history of the human teeth: Explaining their structure, use, formation, growth, and disease* (London: Hardwicke)
- [5] Gross C G 2016 Claude Bernard and the Constancy of the Internal Environment *Neuroscientist* **4** 380–5
- [6] Susser M and Stein Z 2009 *Eras in epidemiology: The evolution of ideas* (Oxford: Oxford Univ. Press)
- [7] Karl Landsteiner 1901 Ueber Agglutinationserscheinungen normalen menschlichen Blutes *Wiener klinische Wochenschrift*
- [8] Gibson T and Medawar P B 1943 The fate of skin homografts in man *Journal of Anatomy* **77** 299–310.4
- [9] Neumann J 2008 *Immunbiologie: Eine Einführung* (Springer-Lehrbuch) (Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag)
- [10] Abouna G M 2008 Organ shortage crisis: problems and possible solutions *Transplantation proceedings* **40** 34–8
- [11] Niethammer D, Kümmerle-Deschner J and Dannecker G E 1999 Side-effects of long-term immunosuppression versus morbidity in autologous stem cell rescue: Striking the balance *Rheumatology* **38** 747–50
- [12] Shlomchik W D 2007 Graft-versus-host disease *Nature reviews. Immunology* **7** 340–52
- [13] Riminton D S, Hartung H-P and Reddel S W 2011 Managing the risks of immunosuppression *Current opinion in neurology* **24** 217–23
- [14] Vacanti J P 1988 Beyond transplantation. Third annual Samuel Jason Mixter lecture *Archives of surgery (Chicago, Ill. : 1960)* **123** 545–9
- [15] Janis J E (ed) 2017 *Essentials of plastic surgery* 2nd edn (New York, NY: Thieme)
- [16] Khanna M 2008 Hair transplantation surgery *Indian Journal of Plastic Surgery : Official Publication of the Association of Plastic Surgeons of India* **41** S56-63
- [17] Hegemann G, Gall F, Bachmann K and Kaltenbach M 1970 Direkte Rekonstruktion bei Koronarsklerose durch aorto-koronaren Venen-Bypass *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)* **95** 662-6 passim
- [18] Cittadella G, Mel A de, Dee R, Coppi P de and Seifalian A M 2013 Arterial tissue regeneration for pediatric applications: inspiration from up-to-date tissue-engineered vascular bypass grafts *Artificial organs* **37** 423–34
- [19] Hoerstrup S P, Zund G, Sodian R, Schnell A M, Grunenfelder J and Turina M I 2001 Tissue engineering of small caliber vascular grafts *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery* **20** 164–9

- [20] Langer R and Vacanti J P 1993 Tissue engineering *Science (New York, N.Y.)* **260** 920–6
- [21] Vacanti C A and Vacanti J P 1991 Functional Organ Replacement, The New Technology of Tissue Engineering *Surgical technology international* **1** 43–9
- [22] Zimbler M S 2001 Gaspare Tagliacozzi (1545-1599): Renaissance Surgeon *Arch Facial Plast Surg* **3** 283–4
- [23] Fuchs J R, Nasseri B A and Vacanti J P 2001 Tissue engineering: a 21st century solution to surgical reconstruction *The Annals of thoracic surgery* **72** 577–91
- [24] Klinkmann H, Wolf H and Schmitt E 1984 Definition of biocompatibility *Contributions to nephrology* **37** 70–7
- [25] Mertz L 2013 What is biocompatibility?: a new definition based on the latest technology *IEEE pulse* **4** 14–5
- [26] Vacanti C A 2006 The history of tissue engineering *J Cellular Mol Med* **10** 569–76
- [27] Skalak R (ed) 1988 *Tissue engineering: Proceedings of a workshop held at Granlibakken, Lake Tahoe, California, February 26 - 29, 1988 (UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology N.S.,107)* (New York, NY: Liss)
- [28] Jablonski S, Webb S and Dorland W A N 2016 *Dorland's dictionary of medical acronyms & abbreviations* 7th edn (Philadelphia, Pa.: Elsevier)
- [29] Black J 2006 *Biological performance of materials: Fundamentals of biocompatibility* 4th edn (Boca Raton: CRC Taylor & Francis)
- [30] Williams D 2003 Revisiting the definition of biocompatibility *Medical device technology* **14** 10–3
- [31] Williams D F 2008 On the mechanisms of biocompatibility *Biomaterials* **29** 2941–53
- [32] Lavik E and Langer R 2004 Tissue engineering: Current state and perspectives *Applied Microbiology and Biotechnology* **65** 1–8
- [33] Hibino N, McGillicuddy E, Matsumura G, Ichihara Y, Naito Y, Breuer C and Shinoka T 2010 Late-term results of tissue-engineered vascular grafts in humans *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* **139** 431–6, 436.e1-2
- [34] Nakayama K H, Hou L and Huang N F 2014 Role of extracellular matrix signaling cues in modulating cell fate commitment for cardiovascular tissue engineering *Advanced healthcare materials* **3** 628–41
- [35] Generali M, Kehl D, Capulli A K, Parker K K, Hoerstrup S P and Weber B 2017 Comparative analysis of poly-glycolic acid-based hybrid polymer starter matrices for in vitro tissue engineering *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* **158** 203–12
- [36] Hung B P, Hutton D L and Grayson W L 2013 Mechanical control of tissue-engineered bone *Stem cell research & therapy* **4** 10
- [37] Shinoka T, Ma P X, Shum-Tim D, Breuer C K, Cusick R A, Zund G, Langer R, Vacanti J P and Mayer J E JR 1996 Tissue-engineered heart valves. Autologous valve leaflet replacement study in a lamb model *Circulation* **94** II164-8
- [38] Mitchell S L and Niklason L E 2003 Requirements for growing tissue-engineered vascular grafts *Cardiovascular Pathology* **12** 59–64
- [39] Dahl S L M et al 2011 Readily Available Tissue-Engineered Vascular Grafts *Science Translational Medicine* **3** 68ra9-68ra9
- [40] Meyer U, Meyer T, Handschel J and Wiesmann H P 2009 *Fundamentals of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* (Springer Berlin Heidelberg)
- [41] Smit F E and Dohmen P M 2015 Cardiovascular tissue engineering: where we come from and where are we now? *Medical science monitor basic research* **21** 1–3
- [42] DeSimone D W and Mecham R P (eds) 2013 *Extracellular Matrix in Development* (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg)

- [43] Weinberg C B and Bell E 1986 A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells *Science (New York, N.Y.)* **231** 397–400
- [44] Souren J E, Schneijdenberg C, Verkleij A J and van Wijk R 1992 Factors controlling the rhythmic contraction of collagen gels by neonatal heart cells *In vitro cellular & developmental biology : journal of the Tissue Culture Association* **28A** 199–204
- [45] Yao L, Swartz D D, Gugino S F, Russell J A and Andreadis S T 2005 Fibrin-based tissue-engineered blood vessels: Differential effects of biomaterial and culture parameters on mechanical strength and vascular reactivity *Tissue engineering* **11** 991–1003
- [46] Swartz D D, Russell J A and Andreadis S T 2005 Engineering of fibrin-based functional and implantable small-diameter blood vessels *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **288** H1451-60
- [47] Weber M, Heta E, Moreira R, Gesche V N, Schermer T, Frese J, Jockenhoevel S and Mela P 2014 Tissue-engineered fibrin-based heart valve with a tubular leaflet design *Tissue engineering. Part C, Methods* **20** 265–75
- [48] Cooper D K, Good A H, Koren E, Oriol R, Malcolm A J, Ippolito R M, Neethling F A, Ye Y, Romano E and Zuhdi N 1993 Identification of alpha-galactosyl and other carbohydrate epitopes that are bound by human anti-pig antibodies: relevance to discordant xenografting in man *Transplant immunology* **1** 198–205
- [49] Galili U 2005 The alpha-gal epitope and the anti-Gal antibody in xenotransplantation and in cancer immunotherapy *Immunology and cell biology* **83** 674–86
- [50] Human P and Zilla P 2001 Characterization of the immune response to valve bioprostheses and its role in primary tissue failure *The Annals of thoracic surgery* **71** S385-8
- [51] Manji R A, Zhu L F, Nijjar N K, Rayner D C, Korbutt G S, Churchill T A, Rajotte R V, Koshal A and Ross D B 2006 Glutaraldehyde-fixed bioprosthetic heart valve conduits calcify and fail from xenograft rejection *Circulation* **114** 318–27
- [52] Elkins R C, Lane M M, Capps S B, McCue C and Dawson P E 2001 Humoral immune response to allograft valve tissue pretreated with an antigen reduction process *Seminars in thoracic and cardiovascular surgery* **13** 82–6
- [53] Konakci K Z et al 2005 Alpha-Gal on bioprostheses: xenograft immune response in cardiac surgery *European journal of clinical investigation* **35** 17–23
- [54] Simon P, Kasimir M T, Seebacher G, Weigel G, Ullrich R, Salzer-Muhar U, Rieder E and Wolner E 2003 Early failure of the tissue engineered porcine heart valve SYNERGRAFT in pediatric patients *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery* **23** 1002-6; discussion 1006
- [55] Kasimir M-T, Rieder E, Seebacher G, Wolner E, Weigel G and Simon P 2005 Presence and elimination of the xenoantigen gal (alpha1, 3) gal in tissue-engineered heart valves *Tissue engineering* **11** 1274–80
- [56] Dohmen P M, Costa F d, Lopes S V, Yoshi S, Souza F P d, Vilani R, Costa M B d and Konertz W 2005 Results of a decellularized porcine heart valve implanted into the juvenile sheep model *The heart surgery forum* **8** E100-4; discussion E104
- [57] O'Brien M F, Goldstein S, Walsh S, Black K S, Elkins R and Clarke D 1999 The SynerGraft valve: A new acellular (nonglutaraldehyde-fixed) tissue heart valve for autologous recellularization first experimental studies before clinical implantation *Seminars in thoracic and cardiovascular surgery* **11** 194–200
- [58] Matheny R G, Hutchison M L, Dryden P E, Hiles M D and Shaar C J 2000 Porcine small intestine submucosa as a pulmonary valve leaflet substitute *The Journal of heart valve disease* **9** 769-74; discussion 774-5

- [59] Swartz D D and Andreadis S T 2013 Animal models for vascular tissue-engineering *Current opinion in biotechnology* **24** 916–25
- [60] Badylak S F, Freytes D O and Gilbert T W 2009 Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function *Acta biomaterialia* **5** 1–13
- [61] Quint C, Kondo Y, Manson R J, Lawson J H, Dardik A and Niklason L E 2011 Decellularized tissue-engineered blood vessel as an arterial conduit *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108** 9214–9
- [62] Blakemore A H and Voorhees A B 1954 The Use of Tubes Constructed from Vinyon “N” Cloth in Bridging Arterial Defects—Experimental and Clinical \* *Annals of Surgery* **140** 324–33
- [63] Akbari M, Tamayol A, Bagherifard S, Serex L, Mostafalu P, Faramarzi N, Mohammadi M H and Khademhosseini A 2016 Textile Technologies and Tissue Engineering: A Path Toward Organ Weaving *Advanced healthcare materials* **5** 751–66
- [64] Shinoka T, Shum-Tim D, Ma P X, Tanel R E, Isogai N, Langer R, Vacanti J P and Mayer J E JR 1998 Creation of viable pulmonary artery autografts through tissue engineering *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* **115** 536–45; discussion 545–6
- [65] Niklason L E, Gao J, Abbott W M, Hirschi K K, Houser S, Marini R and Langer R 1999 Functional arteries grown in vitro *Science (New York, N.Y.)* **284** 489–93
- [66] Shin'oka T, Imai Y and Ikada Y 2001 Transplantation of a tissue-engineered pulmonary artery *The New England journal of medicine* **344** 532–3
- [67] Kucinska-Lipka J, Gubanska I, Janik H and Sienkiewicz M 2015 Fabrication of polyurethane and polyurethane based composite fibres by the electrospinning technique for soft tissue engineering of cardiovascular system *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* **46** 166–76
- [68] Liu W, Thomopoulos S and Xia Y 2012 Electrospun nanofibers for regenerative medicine *Advanced healthcare materials* **1** 10–25
- [69] Assoian R K and Klein E A 2008 Growth control by intracellular tension and extracellular stiffness *Trends in cell biology* **18** 347–52
- [70] Discher D E, Mooney D J and Zandstra P W 2009 Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells *Science (New York, N.Y.)* **324** 1673–7
- [71] Wang J, Laschinger C, Zhao X H, Mak B, Seth A and McCulloch C A 2005 Mechanical force activates eIF-2alpha phospho-kinases in fibroblast *Biochemical and biophysical research communications* **330** 123–30
- [72] Engler A J, Sen S, Sweeney H L and Discher D E 2006 Matrix elasticity directs stem cell lineage specification *Cell* **126** 677–89
- [73] Engler A J, Carag-Krieger C, Johnson C P, Raab M, Tang H-Y, Speicher D W, Sanger J W, Sanger J M and Discher D E 2008 Embryonic cardiomyocytes beat best on a matrix with heart-like elasticity: scar-like rigidity inhibits beating *Journal of cell science* **121** 3794–802
- [74] Hwang C M, Park Y, Park J Y, Lee K, Sun K, Khademhosseini A and Lee S H 2009 Controlled cellular orientation on PLGA microfibers with defined diameters *Biomedical microdevices* **11** 739–46
- [75] Sheets K, Wang J, Meehan S, Sharma P, NG C, Khan M, Koons B, Behkam B and Nain A S 2013 Cell-Fiber Interactions on Aligned and Suspended Nanofiber Scaffolds *j biomat tissue engng* **3** 355–68
- [76] Sinclair K D, Webb K and Brown P J 2010 The effect of various denier capillary channel polymer fibers on the alignment of NHDF cells and type I collagen *Journal of biomedical materials research. Part A* **95** 1194–202
- [77] O'Brien F J 2011 Biomaterials & scaffolds for tissue engineering *Materials Today* **14** 88–95

- [78] Keogh M B, O'Brien F J and Daly J S 2010 Substrate stiffness and contractile behaviour modulate the functional maturation of osteoblasts on a collagen-GAG scaffold *Acta biomaterialia* **6** 4305–13
- [79] Yannas I V, Lee E, Orgill D P, Skrabut E M and Murphy G F 1989 Synthesis and characterization of a model extracellular matrix that induces partial regeneration of adult mammalian skin *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86** 933–7
- [80] O'Brien F J, Harley B A, Yannas I V and Gibson L J 2005 The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds *Biomaterials* **26** 433–41
- [81] Murphy C M, Haugh M G and O'Brien F J 2010 The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering *Biomaterials* **31** 461–6
- [82] Murphy C M and O'Brien F J 2014 Understanding the effect of mean pore size on cell activity in collagen-glycosaminoglycan scaffolds *Cell Adhesion & Migration* **4** 377–81
- [83] Chen G, Ushida T and Tateishi T 2002 Scaffold Design for Tissue Engineering *Macromolecular Bioscience* **2** 67–77
- [84] Chung S and King M W 2011 Design concepts and strategies for tissue engineering scaffolds *Biotechnology and applied biochemistry* **58** 423–38
- [85] Cleary M A, Geiger E, Grady C, Best C, Naito Y and Breuer C 2012 Vascular tissue engineering: the next generation *Trends in molecular medicine* **18** 394–404
- [86] Lee K-W and Wang Y 2011 Elastomeric PGS scaffolds in arterial tissue engineering *Journal of visualized experiments : JoVE*
- [87] Watt F M and Huck W T S 2013 Role of the extracellular matrix in regulating stem cell fate *Nature reviews. Molecular cell biology* **14** 467–73
- [88] Abedin M and King N 2010 Diverse evolutionary paths to cell adhesion *Trends in cell biology* **20** 734–42
- [89] Lewin B 2007 *Cells* (Sudbury, Mass. [u.a.]: Jones and Bartlett Publ)
- [90] Puklin-Faucher E and Sheetz M P 2009 The mechanical integrin cycle *Journal of cell science* **122** 179–86
- [91] Huang N F and Li S 2011 Regulation of the matrix microenvironment for stem cell engineering and regenerative medicine *Annals of biomedical engineering* **39** 1201–14
- [92] Mruthyunjaya S, Manchanda R, Godbole R, Pujari R, Shiras A and Shastry P 2010 Laminin-1 induces neurite outgrowth in human mesenchymal stem cells in serum/differentiation factors-free conditions through activation of FAK-MEK/ERK signaling pathways *Biochemical and biophysical research communications* **391** 43–8
- [93] Shi Y and Massagué J 2003 Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus *Cell* **113** 685–700
- [94] Di Lullo G A, Sweeney S M, Korkko J, Ala-Kokko L and San Antonio J D 2002 Mapping the ligand-binding sites and disease-associated mutations on the most abundant protein in the human, type I collagen *The Journal of biological chemistry* **277** 4223–31
- [95] Karsenty G and Park R W 1995 Regulation of type I collagen genes expression *International reviews of immunology* **12** 177–85
- [96] Kumar V, Abbas A K, Fausto N, Robbins S L and Cotran R S (eds) 2005 *Robbins and Cotran pathologic basis of disease: [now includes Bonus! Interactive clinical cases CD-ROM, Bonus! Access to www.robbinspathology.com]* 7th edn (Philadelphia, Pa.: Elsevier Saunders)
- [97] Assmann A *et al* 2013 Acceleration of autologous in vivo recellularization of decellularized aortic conduits by fibronectin surface coating *Biomaterials* **34** 6015–26
- [98] Crapo P M, Gilbert T W and Badylak S F 2011 An overview of tissue and whole organ decellularization processes *Biomaterials* **32** 3233–43

- [99] F M and T M 2014 Decellularized matrices for cardiovascular tissue engineering *Am J Stem Cells* **3** 1–20
- [100] Smith B J 1984 SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **1** 41–55
- [101] Henderson L E, Oroszlan S and Konigsberg W 1979 A micromethod for complete removal of dodecyl sulfate from proteins by ion-pair extraction *Analytical biochemistry* **93** 153–7
- [102] Haynes W M 2016 *CRC Handbook of Chemistry and Physics, 97th Edition* 97th edn (Milton: CRC Press)
- [103] Koley D and Bard A J 2010 Triton X-100 concentration effects on membrane permeability of a single HeLa cell by scanning electrochemical microscopy (SECM) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107** 16783–7
- [104] Barrett A J (ed) 1994 *Proteolytic enzymes: Serine and cysteine peptidases (Methods in Enzymology vol 244)* (San Diego, Calif.: Acad. Press)
- [105] Gilbert T W, Freund J M and Badylak S F 2009 Quantification of DNA in biologic scaffold materials *The Journal of surgical research* **152** 135–9
- [106] Zheng M H, Chen J, Kirilak Y, Willers C, Xu J and Wood D 2005 Porcine small intestine submucosa (SIS) is not an acellular collagenous matrix and contains porcine DNA: possible implications in human implantation *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* **73** 61–7
- [107] Lang K, Lang P, Bauer C, Duranton C, Wieder T, Huber S and Lang F 2005 Mechanisms of Suicidal Erythrocyte Death *CPB* **15** 195–202
- [108] Honge J L, Funder J A, Jensen H, Dohmen P M, Konertz W F and Hasenkam J M 2010 Recellularization of decellularized mitral heart valves in juvenile pigs *The Journal of heart valve disease* **19** 584–92
- [109] Bloch O, Erdbrugger W, Volker W, Schenk A, Posner S, Konertz W and Dohmen P M 2012 Extracellular matrix in deoxycholic acid decellularized aortic heart valves *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research* **18** BR487–92
- [110] Erdbrugger W et al 2006 Decellularized xenogenic heart valves reveal remodeling and growth potential in vivo *Tissue engineering* **12** 2059–68
- [111] Rieder E, Kasimir M-T, Silberhumer G, Seebacher G, Wolner E, Simon P and Weigel G 2004 Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* **127** 399–405
- [112] Jordan J E, Williams J K, Lee S-J, Raghavan D, Atala A and Yoo J J 2012 Bioengineered self-seeding heart valves *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* **143** 201–8
- [113] Naso F, Gandaglia A, Formato M, Ciglano A, Lepedda A J, Gerosa G and Spina M 2010 Differential distribution of structural components and hydration in aortic and pulmonary heart valve conduits: Impact of detergent-based cell removal *Acta biomaterialia* **6** 4675–88
- [114] Grauss R W, Hazekamp M G, Oppenhuizen F, van Munsteren C J, Gittenberger-de Groot A C and DeRuiter M C 2005 Histological evaluation of decellularised porcine aortic valves: Matrix changes due to different decellularisation methods *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery* **27** 566–71
- [115] Leyh R G, Wilhelmi M, Rebe P, Fischer S, Kofidis T, Haverich A and Mertsching H 2003 In vivo repopulation of xenogeneic and allogeneic acellular valve matrix conduits in the pulmonary circulation *The Annals of thoracic surgery* **75** 1457–63; discussion 1463
- [116] Ota T, Taketani S, Iwai S, Miyagawa S, Furuta M, Hara M, Uchimura E, Okita Y and Sawa Y 2007 Novel method of decellularization of porcine valves using polyethylene glycol and gamma irradiation *The Annals of thoracic surgery* **83** 1501–7

- [117] Beckmann A, Funkat A-K, Lewandowski J, Frie M, Ernst M, Hekmat K, Schiller W, Gummert J F and Cremer J T 2015 Cardiac Surgery in Germany during 2014: A Report on Behalf of the German Society for Thoracic and Cardiovascular Surgery *The Thoracic and cardiovascular surgeon* **63** 258–69
- [118] Hoffmann G, Lutter G and Cremer J 2008 Durability of bioprosthetic cardiac valves *Deutsches Arzteblatt international* **105** 143–8
- [119] Johnston D R, Soltesz E G, Vakil N, Rajeswaran J, Roselli E E, Sabik J F, Smedira N G, Svensson L G, Lytle B W and Blackstone E H 2015 Long-term durability of bioprosthetic aortic valves: implications from 12,569 implants *The Annals of thoracic surgery* **99** 1239–47
- [120] Herold G 2016 *Innere Medizin: Eine vorlesungsorientierte Darstellung : unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung : mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis* 2016th edn (Köln: Herold)
- [121] Leon M B et al 2010 Transcatheter aortic-valve implantation for aortic stenosis in patients who cannot undergo surgery *The New England journal of medicine* **363** 1597–607
- [122] Rosato S et al 2016 Transcatheter Aortic Valve Implantation Compared With Surgical Aortic Valve Replacement in Low-Risk Patients *Circulation. Cardiovascular interventions* **9** e003326
- [123] Alavi S H, Groves E M and Kheradvar A 2014 The effects of transcatheter valve crimping on pericardial leaflets *The Annals of thoracic surgery* **97** 1260–6
- [124] Khoffi F and Heim F 2015 Mechanical degradation of biological heart valve tissue induced by low diameter crimping: an early assessment *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials* **44** 71–5
- [125] Convelbo C, Guetat P, Cambillau M, Allam B, Bruneval P, Lafont A and Zegdi R 2013 Crimping and deployment of balloon-expandable valved stents are responsible for the increase in the hydraulic conductance of leaflets *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery* **44** 1045–50
- [126] Aleksieva G et al 2012 Use of a special bioreactor for the cultivation of a new flexible polyurethane scaffold for aortic valve tissue engineering *Biomedical engineering online* **11** 92
- [127] Ott H C, Matthiesen T S, Goh S-K, Black L D, Kren S M, Netoff T I and Taylor D A 2008 Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart *Nature medicine* **14** 213–21
- [128] Haller N, Hollweck T, Thierfelder N, Schulte J, Hausherr J-M, Dauner M and Akra B 2013 Noninvasive analysis of synthetic and decellularized scaffolds for heart valve tissue engineering *ASAIO journal (American Society for Artificial Internal Organs : 1992)* **59** 169–77
- [129] Cebotari S, Tudorache I, Jaekel T, Hilfiker A, Dorfman S, Ternes W, Haverich A and Lichtenberg A 2010 Detergent decellularization of heart valves for tissue engineering: toxicological effects of residual detergents on human endothelial cells *Artificial organs* **34** 206–10
- [130] Perri G, Polito A, Esposito C, Albanese S B, Francalanci P, Pongiglione G and Carotti A 2012 Early and late failure of tissue-engineered pulmonary valve conduits used for right ventricular outflow tract reconstruction in patients with congenital heart disease *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery* **41** 1320–5
- [131] Kasimir M T, Rieder E, Seebacher G, Silberhumer G, Wolner E, Weigel G and Simon P 2003 Comparison of different decellularization procedures of porcine heart valves *The International journal of artificial organs* **26** 421–7
- [132] Thierfelder N, Koenig F, Bombien R, Fano C, Reichart B, Wintermantel E, Schmitz C and Akra B 2013 In vitro comparison of novel polyurethane aortic valves and homografts after

- seeding and conditioning *ASAIO journal (American Society for Artificial Internal Organs : 1992)* **59** 309–16
- [133] Vitacolonna M, Belharazem D, Hohenberger P and Roessner E D 2013 Effect of static seeding methods on the distribution of fibroblasts within human acellular dermis *Biomedical engineering online* **12** 55
- [134] Xiao Y L, Riesle J and van Blitterswijk C A 1999 Static and dynamic fibroblast seeding and cultivation in porous PEO/PBT scaffolds *Journal of materials science. Materials in medicine* **10** 773–7
- [135] VeDepo M, Buse E, Quinn R, Hopkins R and Converse G 2018 Extended bioreactor conditioning of mononuclear cell-seeded heart valve scaffolds *Journal of tissue engineering* **9** 2041731418767216
- [136] Lin S and Mequanint K 2017 Bioreactor-induced mesenchymal progenitor cell differentiation and elastic fiber assembly in engineered vascular tissues *Acta biomaterialia* **59** 200–9
- [137] Warnock J J, Fox D B, Stoker A M, Beatty M, Cockrell M, Janicek J C and Cook J L 2014 Culture of equine fibroblast-like synoviocytes on synthetic tissue scaffolds towards meniscal tissue engineering: A preliminary cell-seeding study *PeerJ* **2** e353
- [138] Haykal S, Salna M, Zhou Y, Marcus P, Fatehi M, Frost G, Machuca T, Hofer S O P and Waddell T K 2014 Double-chamber rotating bioreactor for dynamic perfusion cell seeding of large-segment tracheal allografts: comparison to conventional static methods *Tissue engineering. Part C, Methods* **20** 681–92
- [139] Zhao F and Ma T 2005 Perfusion bioreactor system for human mesenchymal stem cell tissue engineering: Dynamic cell seeding and construct development *Biotechnology and bioengineering* **91** 482–93
- [140] Wendt D, Riboldi S A, Cioffi M and Martin I 2009 Bioreactors in tissue engineering: scientific challenges and clinical perspectives *Advances in biochemical engineering/biotechnology* **112** 1–27
- [141] Wendt D, Stroebel S, Jakob M, John G T and Martin I 2006 Uniform tissues engineered by seeding and culturing cells in 3D scaffolds under perfusion at defined oxygen tensions *Biorheology* **43** 481–8
- [142] Khorramirouz R, Sabetkish S, Akbarzadeh A, Muhammadnejad A, Heidari R and Kajbafzadeh A-M 2014 Effect of three decellularisation protocols on the mechanical behaviour and structural properties of sheep aortic valve conduits *Advances in medical sciences* **59** 299–307
- [143] Oberwallner B, Brodarac A, Choi Y-H, Saric T, Anić P, Morawietz L and Stamm C 2014 Preparation of cardiac extracellular matrix scaffolds by decellularization of human myocardium *Journal of biomedical materials research. Part A* **102** 3263–72
- [144] Caralt M *et al* 2015 Optimization and critical evaluation of decellularization strategies to develop renal extracellular matrix scaffolds as biological templates for organ engineering and transplantation *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* **15** 64–75
- [145] Cheng Y, Wang Y, Kang Y Z, Hu P Y, Gao Y and Pan M X 2013 In vitro culture of tumour-derived hepatocytes in decellularised whole-liver biological scaffolds *Digestion* **87** 189–95
- [146] Fischer I, Westphal M, Rossbach B, Bethke N, Hariharan K, Ullah I, Reinke P, Kurtz A and Stachelscheid H 2017 Comparative characterization of decellularized renal scaffolds for tissue engineering *Biomedical materials (Bristol, England)* **12** 45005
- [147] Akhyari P, Aubin H, Gwanmesia P, Barth M, Hoffmann S, Huelsmann J, Preuss K and Lichtenberg A 2011 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 engineering. Part C, Methods* **17** 915–26
- [148] Caamaño S, Shiori A, Strauss S H and Orton E C 2009 Does sodium dodecyl sulfate wash out of detergent-treated bovine pericardium at cytotoxic concentrations? *The Journal of heart valve disease* **18** 101–5
- [149] Kim W G, Park J K and Lee W Y 2002 Tissue-engineered heart valve leaflets: An effective method of obtaining acellularized valve xenografts *The International journal of artificial organs* **25** 791–7
- [150] Wilcox H E, Korossis S A, Booth C, Watterson K G, Kearney J N, Fisher J and Ingham E 2005 Biocompatibility and recellularization potential of an acellular porcine heart valve matrix *The Journal of heart valve disease* **14** 228–36; discussion 236–7
- [151] Wainwright J M, Czajka C A, Patel U B, Freytes D O, Tobita K, Gilbert T W and Badylak S F 2010 Preparation of cardiac extracellular matrix from an intact porcine heart *Tissue engineering. Part C, Methods* **16** 525–32
- [152] Adair-Kirk T L and Senior R M 2008 Fragments of extracellular matrix as mediators of inflammation *The international journal of biochemistry & cell biology* **40** 1101–10
- [153] Zou Y and Zhang Y 2012 Mechanical evaluation of decellularized porcine thoracic aorta *The Journal of surgical research* **175** 359–68
- [154] Mallis P, Gontika I, Poulogiannopoulos T, Zoidakis J, Vlahou A, Michalopoulos E, Chatzistamatiou T, Papassavas A and Stavropoulos-Giokas C 2014 Evaluation of decellularization in umbilical cord artery *Transplantation proceedings* **46** 3232–9
- [155] Valenick L V, Hsia H C and Schwarzbauer J E 2005 Fibronectin fragmentation promotes alpha4beta1 integrin-mediated contraction of a fibrin-fibronectin provisional matrix *Experimental cell research* **309** 48–55
- [156] Liao J, Joyce E M and Sacks M S 2008 Effects of decellularization on the mechanical and structural properties of the porcine aortic valve leaflet *Biomaterials* **29** 1065–74
- [157] Eddy A A 2000 Molecular basis of renal fibrosis *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)* **15** 290–301
- [158] Ghosh A K, Quaggin S E and Vaughan D E 2013 Molecular basis of organ fibrosis: potential therapeutic approaches *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)* **238** 461–81
- [159] Lee T C and Niederer P F 2010 *Basic engineering for medics and biologists: An ESEM primer (Studies in health technology and informatics vol 152)* (Amsterdam u.a.: IOS Press)
- [160] Cristofalo V J, Allen R G, Pignolo R J, Martin B G and Beck J C 1998 Relationship between donor age and the replicative lifespan of human cells in culture: A reevaluation *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95** 10614–9
- [161] Yniguez F, König F, Haas U, Dauner M, Hagl C and Thierfelder N 2015 Remove Cells, Maintain Extracellular Matrix: The search for an Optimized Protocol to Decellularize a Cell-Seeded Synthetic Scaffold *Thorac cardiovasc Surg* **63**

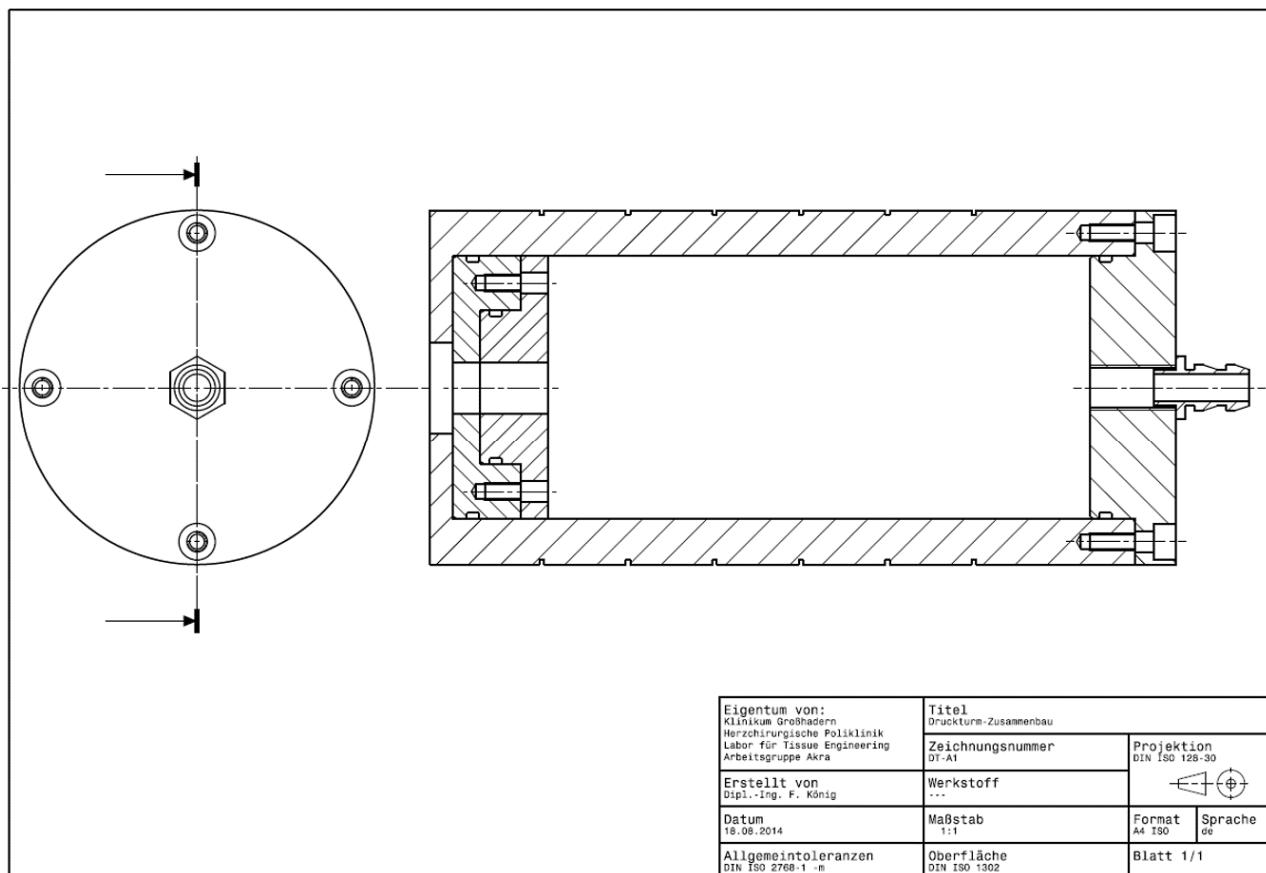
## 7.2. Abbildungsnachweise

- 1 : Wikipedia 2017 *Kosmas und Damian* <https://de.wikipedia.org/w/index.php?oldid=164255998> (accessed 21 Jul 2017)
- 2 : 2013 *Herz- und gefäßchirurgische Basistechniken* (Basel, Freiburg, Br., Paris, London, New York, NY, New Delhi, Bangkok, Beijing, Tokyo, Kuala Lumpur, Singapore: Karger)
- 3 : Modifiziert nach: 2017 *Dermatologic Manifestations of Graft Versus Host Disease: Overview, Patient History, Physical Examination* <http://emedicine.medscape.com/article/1050580-overview> (accessed 21 Jul 2017)
- 4 : Modifiziert nach: 3071P\_All ET\_heart: Active heart waiting list (at year-end) in All ET, by year, by country. Online verfügbar unter <http://statistics.eurotransplant.org/reportloader.php?report=56893-6141-5853&format=html&download=0>, zuletzt geprüft am 18.12.2017.
- 5 : Modifiziert nach: *DGPRÄC: Plastische Chirurgie* <http://alt.dgpraecl.de/dgpraecl/historie/plastische-chirurgie/> (accessed 24 Jul 2017)
- 6 : Modifiziert nach: Wikipedia (Hg.) (2017): *Tissue Engineering*. Online verfügbar unter <https://de.wikipedia.org/w/index.php?oldid=165680119>, zuletzt aktualisiert am 13.12.2017, zuletzt geprüft am 18.12.2017.
- 12 : A: Modifiziert nach: *Transcatheter Aortic Valve Replacement | West Tennessee Heart & Vascular Center* <https://secure.wth.org/heart-vascular-center/areas-of-expertise/valve-clinic/tavr1> (accessed 24 Jul 2017)  
B-E : Modifiziert nach: *Aortic Valve Stenosis | Heart Care | Intermountain Healthcare* <https://intermountainhealthcare.org/services/heart-care/conditions/aortic-valve-stenosis/> (accessed 24 Jul 2017)  
F-H : Modifiziert nach: Alavi S H, Groves E M and Kheradvar A 2014 The effects of transcatheter valve crimping on pericardial leaflets *The Annals of thoracic surgery* **97** 1260–6

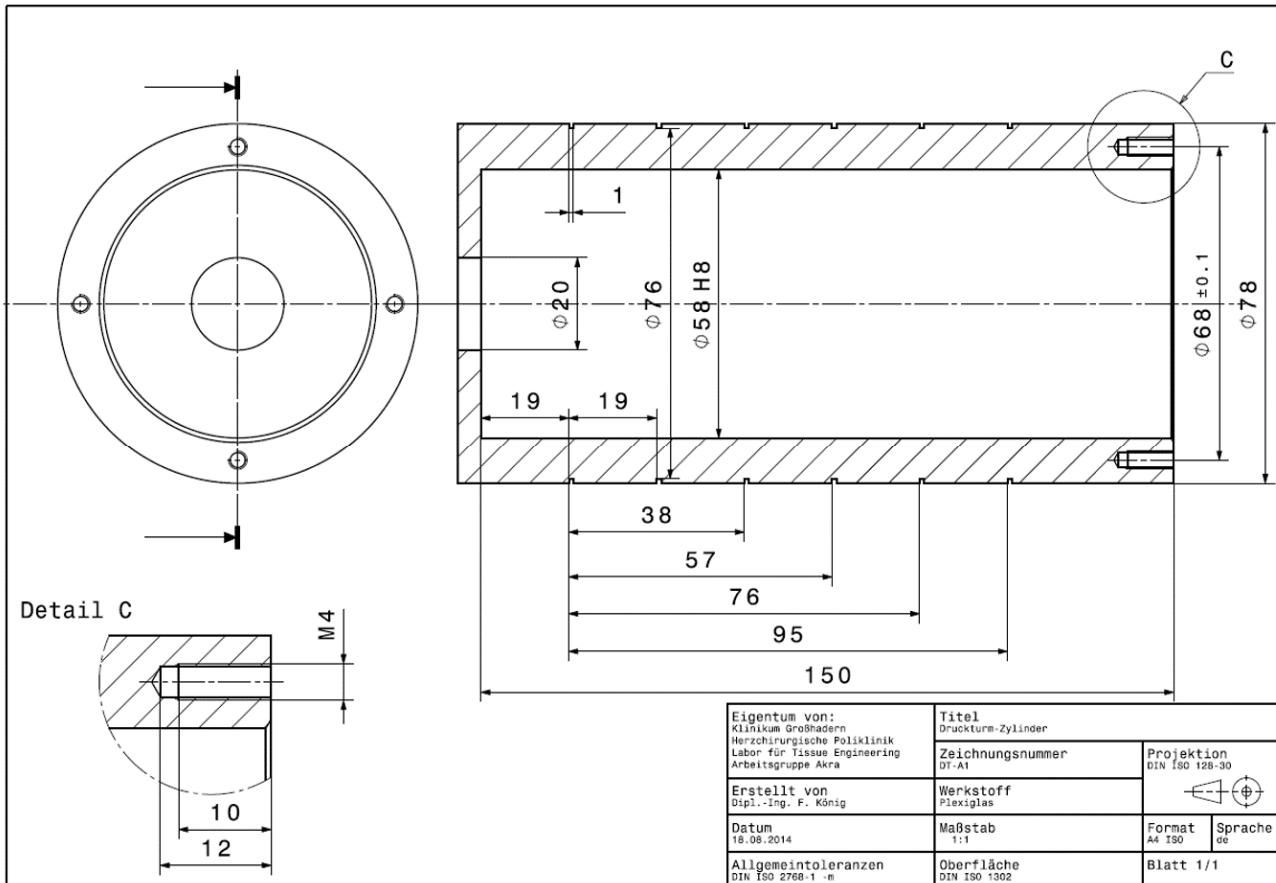
# 8. Anhang

## 8.1. Technische Zeichnungen

Die folgenden Seiten zeigen eine durch Herrn Dr. Fabian Koenig angefertigte technische Zeichnung zur Herstellung des im Rahmen der Permeabilitätstestung benötigten Plexiglaszylinders.

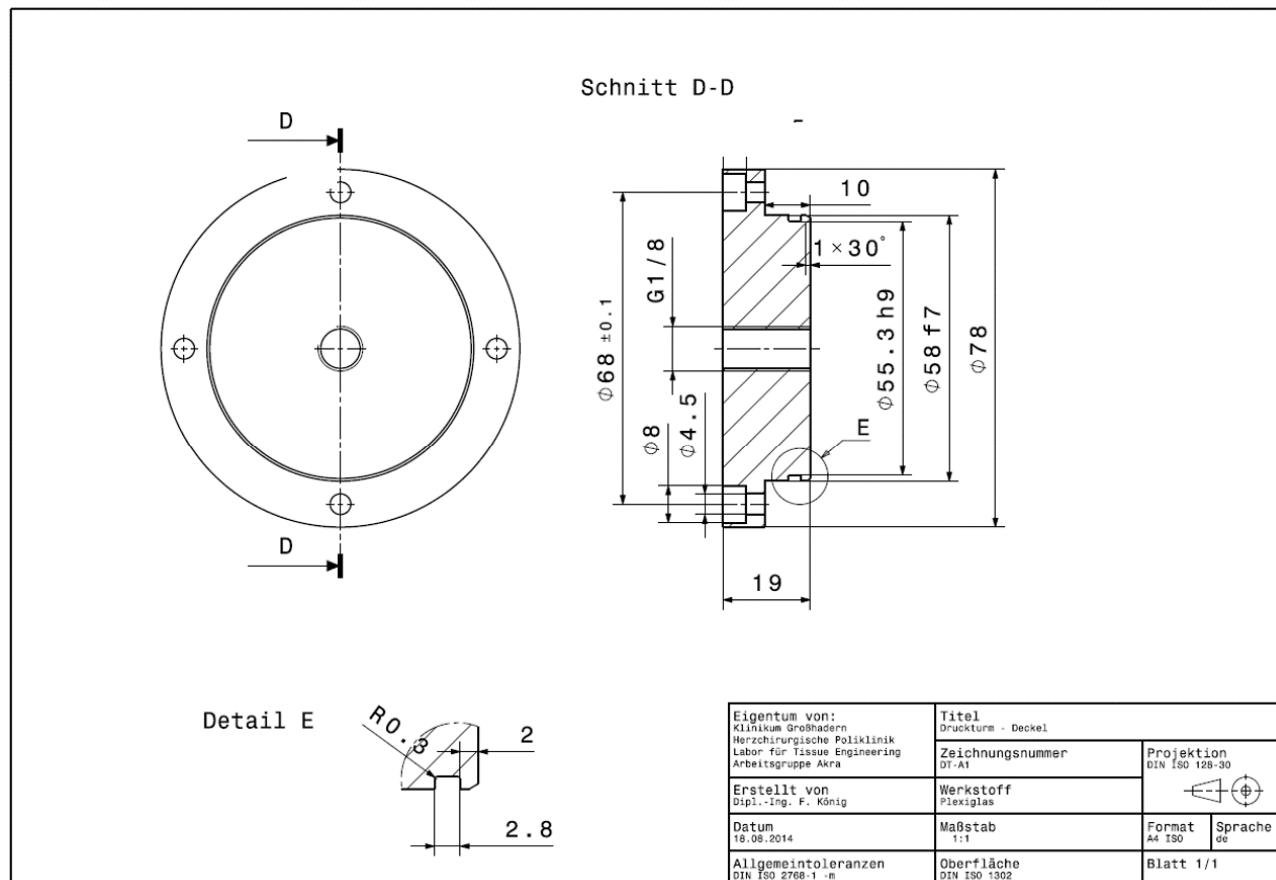


**Abbildung 26 A:** Übersichtszeichnung des Druckturms mit Ansicht auf den Längsschnitt. Über die rechte Seite erfolgt die Applikation von 120mmHg Druck, während sich am linken Ende des Turmes eine im Zusatzzyliner fixierte PU-Probe befindet.

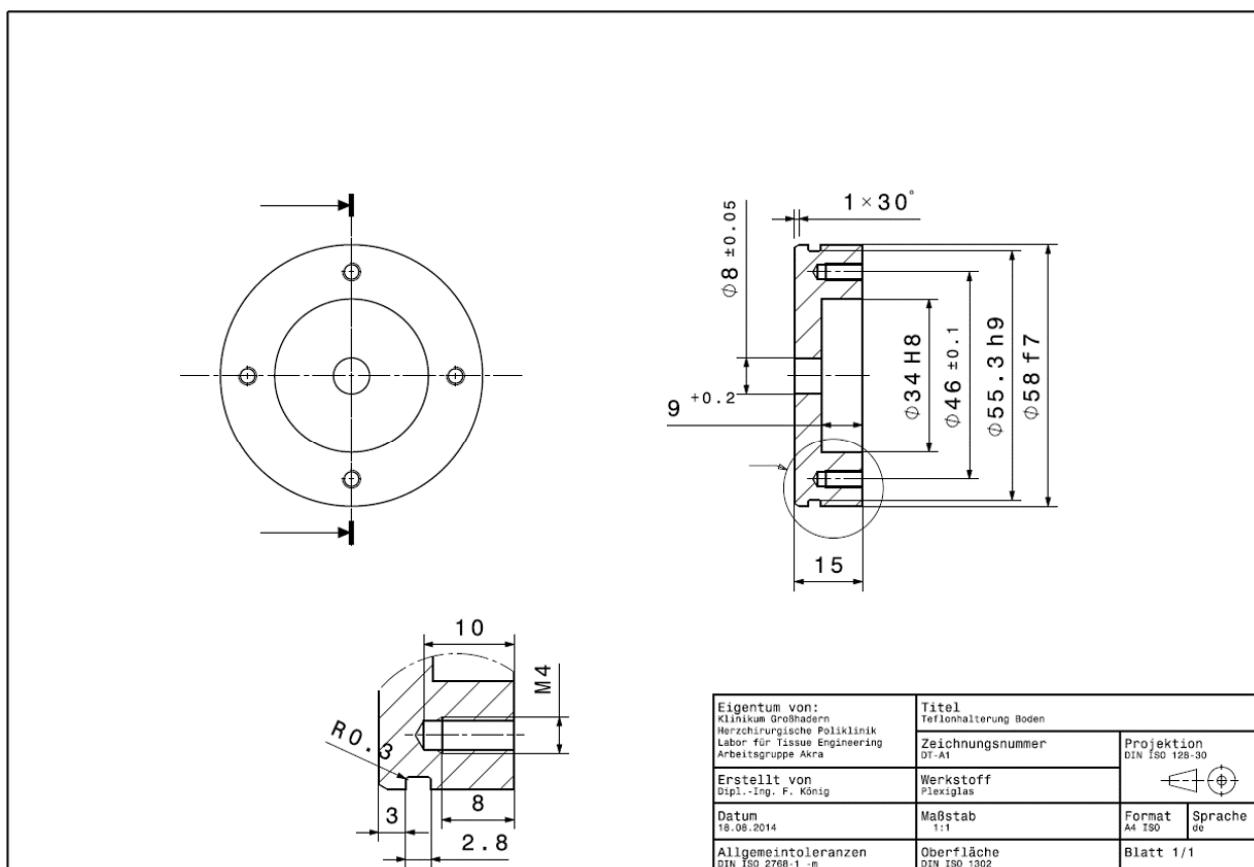


**Abbildung 26 B:** Zeichnung des Druckturms ohne den Zusatzzylinder, in welche PU Proben fixiert wurden.

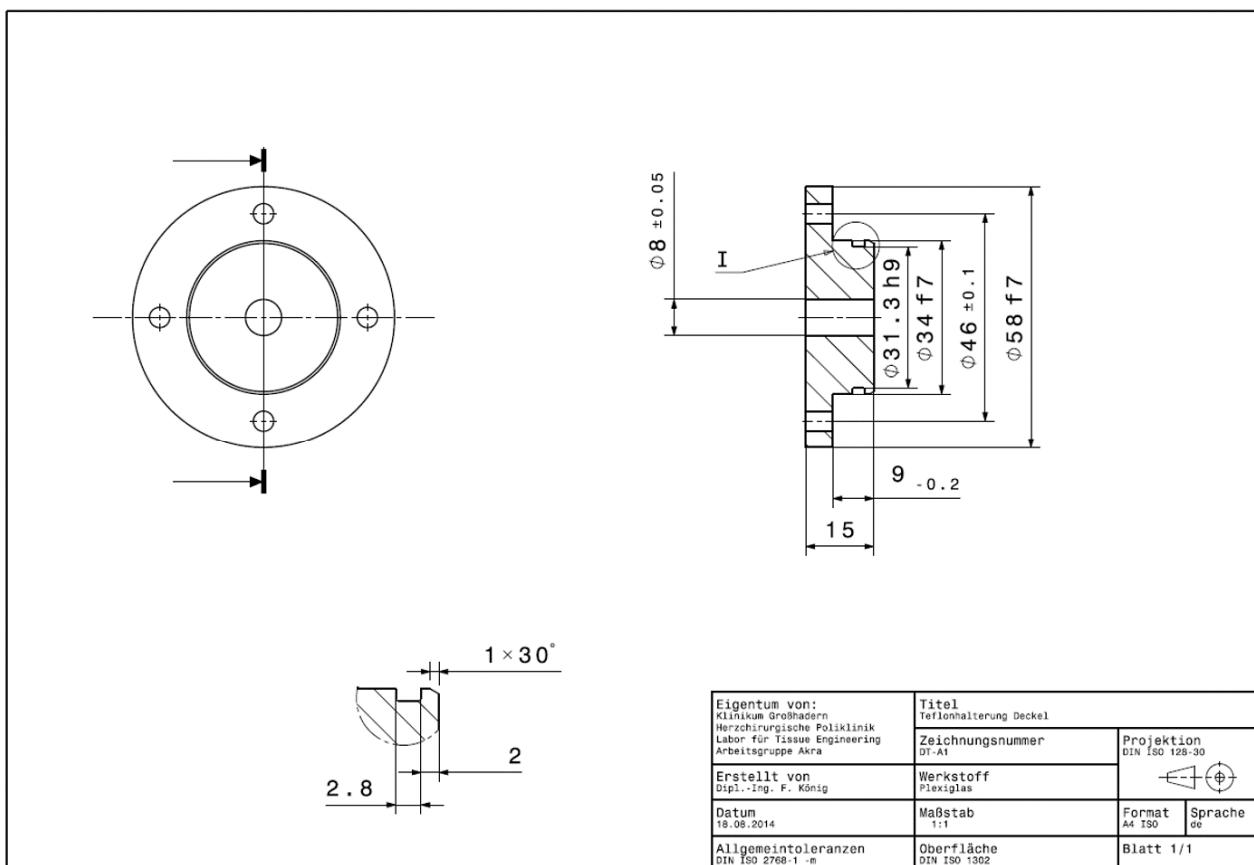
Detail C zeigt einen Schraubensockel für den Deckel des Druckturms.



**Abbildung 26 C:** Zeichnung für den Deckel des Druckturms.



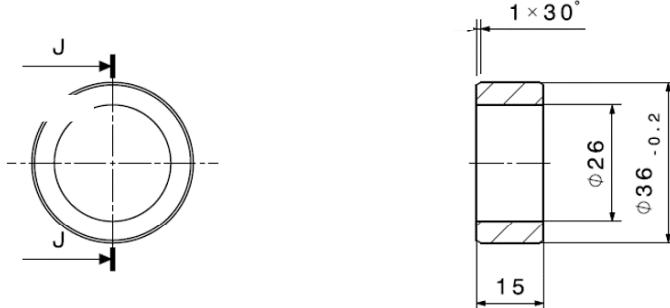
**Abbildung 26 D:** Zeichnung für die Unterseite des Zusatzzyinders in welche PU Proben fixiert wurden.



**Abbildung 26 E:** Zeichnung für die Oberseite des Zusatzzyinders in welche PU Proben fixiert wurden.

## 12 Stück

Schnitt J-J



|   |                            |                                   |                              |
|---|----------------------------|-----------------------------------|------------------------------|
| Eigentum von:<br>Klinikum Großhadern<br>Herzchirurgische Poliklinik<br>Labor für Tissue Engineering<br>Arbeitsgruppe Akra | Titel<br>Besiedelungsring  | Zeichnungsnummer<br>DT-A1         | Projektion<br>DIN ISO 128-30 |
| Erstellt von<br>Dipl.-Ing. F. König   | Werkstoff<br>Teflon        |                                   |                              |
| Datum<br>19.09.2014   | Maßstab<br>1:1             | Format<br>A4 ISO<br>Sprache<br>de |                              |
| Allgemeintoleranzen<br>DIN ISO 2768-1-m   | Oberfläche<br>DIN ISO 1302 |                                   | Blatt 1/1                    |

**Abbildung 26 F:** Zeichnung für einen Ring, welcher auf die beschichteten PU Proben gelegt und mit Hilfe des Zusatzzylinders fixiert wurde. Der Innendurchmesser des Ringes definierte die Fläche, durch welche Wasser das PU passieren musste.

### 8.2. Vorveröffentlichungen

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden 2015 und 2017 im Rahmen von Kongressbeiträgen vorgestellt. Die erste Vorstellung erfolgte im Rahmen der Jahrestagung der DGTHG [161]. Weiterhin beinhaltete folgendes Poster u.a. die Ergebnisse dieser Arbeit und wurde im Sommer 2017 im Rahmen der TERMIS Konferenz (Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society) in Davos vorgestellt.

### 8.3. Einverständniserklärungsmuster

Folgendes Dokument diente der Einverständniserklärung zur Spende von Venensegmenten zur Durchführung dieser Dissertation.



#### Patienteneinverständniserklärung zur Spende von Biomaterial für die herzchirurgische Forschung

Dr. med. Nikolaus Thierfelder  
Leiter medizinische Forschung der  
AG „Kardiovaskuläres Tissue Engineering“  
Telefon +49 (0)89 4400-74791  
Telefax +49 (0)89 4400-78671  
Email: [Nikolaus.Thierfelder@med.uni-muenchen.de](mailto:Nikolaus.Thierfelder@med.uni-muenchen.de)  
<http://hch.klinikum.uni-muenchen.de>  
Postanschrift:  
Marchioninstr. 15  
81377 München

Sehr geehrter Patient,

die Forschungsgruppe „Kardiovaskuläres Tissue Engineering“ der herzchirurgischen Klinik versucht neuartige, individualisierte Therapiekonzepte für die Zukunft zu entwickeln und zu etablieren. Hierfür sind wir auf die Verwendung von gespendetem Gewebe, insbesondere Zellen, angewiesen. Es ist möglich, dass im Rahmen ihrer Bypass-Operation nicht verwertbare Reststücke von Gefäßen anfallen. Wir würden sie bitten, dieses Gewebe für Forschungszwecke freizugeben.

Ich, ..... , geboren am, ..... , wurde von meinem Arzt um die Spende von Biomaterial gebeten. Ich hatte die Möglichkeit Fragen zu stellen und habe die Antworten verstanden.

Ich hatte ausreichend Zeit, mich für die Spende der übrig bleibenden/gebliebenen Gefäßstücke aus meiner Operation frei zu entscheiden und weiß, dass die Verwendung nur zu medizinischen Forschungszwecken dient.

Darüber hinaus bin ich darüber informiert worden, dass mir aus einer Verweigerung meines Einverständnisses keinerlei Nachteile erwachsen. Ich bin darüber informiert worden, dass mein Gewebe nur in vollständig anonymisierter Form verwendet wird. Im Falle eines Widerrufs dieser Einwilligung ist eine Vernichtung der Proben deshalb nicht möglich.

Ich erkläre hiermit mein freiwilliges Einverständnis zur Verwendung der übrig bleibenden/gebliebenen Gefäßstücke aus meiner Operation.

Eine Kopie der Einverständniserklärung habe ich erhalten.

München, den .....

Unterschrift des Patienten:

Unterschrift des aufklärenden Arztes:

Für ihre Unterstützung der Wissenschaft möchten wir uns im Namen unserer Forschungsabteilung bei Ihnen bedanken!

Dr. med. Nikolaus Thierfelder

Prof. Dr. med. Christian Hagl (Klinikdirektor)

Das Klinikum der Universität München ist eine Anstalt des öffentlichen Rechts

Leiter der Klinik: Prof. Dr. med. Christian Hagl  
Öffentl. Verkehr: U6, 56, 266, 269 oder N41 bis Haltestelle Klinikum Großhadern

## 8.4. Materialliste

### 8.4.1. Geräte und Zubehör

| Artikel bzw. Gegenstand   | Herstellernname  |
|---|--|
| Laminar Airflow – Hera Safe                                       | Kendro Laboratory Products, Hanau, GER                   |
| REM - Evo LS 10   | Zeiss Microlimaging GmbH, Jena, GER                      |
| REM-Pinzelze  | Baltic Präparation, Koppelheck, GER                      |
| Sputter Coater SCD50  | BalTec, Schalksmühle, Germany                            |
| Wasserbad - Julabo SW23   | Kendro Laboratory Products, Hanau, GER                   |
| Zentrifuge - Rotina 46R   | Hettich, Tuttlingen, GER                                 |
| Probenkarussell   | Zeiss Microlimaging GmbH, Jena, GER                      |
| Lichtmikroskop - Axiovert 35                                      | Zeiss Microlimaging GmbH, Jena, GER                      |
| AxioObserver  | Zeiss Microlimaging GmbH, Jena, GER                      |
| Critical PointDryer - CPD30                                       | BalTec, Schalksmühle, GER                                |
| Floureszenzlampe – HXP120   | Zeiss Microlimaging GmbH, Jena, GER                      |
| Computer  | Fujitsu Technology Solutions GmbH,<br>Augsburg, GER      |
| Kühlschrank - Glass Line  | Liebherr Hausgeräte GmbH,<br>Ochsenhausen, GER           |
| Gefrierschrank -80°C  | Kendro Laboratory Products, Hanau, GER                   |
| Inkubator - APT line TM CB  | Heraeus, Kendro Laboratory Products,<br>Hanau, GER       |
| Inkubator - Hera Cell   | Heraeus, Kendro Laboratory Products,<br>Hanau, GER       |
| Pipettboy   | Eppendorf, Eppendorf AG, Hamburg,<br>GER                 |
| Objektiv (Fluoroszenzmikroskop) - EC<br>Plan-Neofluar 10x/0.30 Ph | Zeiss Microlimaging GmbH, Jena, GER                      |
| Microtom - Microm KS 34   | Thermo Fisher Scientific, Waltham,<br>Massachusetts, USA |
| Mitutoyo 543 - 396B IDC Digimatic<br>Indicator                    | Mitutoyo Europe GmbH, Neuss, GER                         |
| Paraffinbad - Model E-650   | Therma Scientific, Waltham,<br>Massachusetts, USA        |

#### 8.4.2. Verbrauchsmaterialien

| Artikel bzw. Gegenstand                 | Herstellername  |
|---|---|
| Pipette 0,1-3µl, 100-200µl, 100-1000µl, | Biohit, Sartorius Lab Instruments GmbH, Göttingen, GER      |
| 50 ml Röhrchen                          | Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, GER                            |
| Paraffin 42-44                          | Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland                          |
| Spritze, 2ml, 20ml                      | Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, GER                            |
| Silikonpaste - Baysilone                | GE Bayer Silicones, Leverkusen, GER                         |
| 100 mm Petrischale                      | Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, GER                            |
| Skalpell Nr. 20                         | Feather Safety, RazorCo. LTD, Japan                         |
| 24 x 24mm Deckglas                      | Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, GER                     |
| Objekträger - Superfrost®               | Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA       |
| T25 Kulturflasche                       | Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, GER                            |
| T175 Kulturflasche                      | Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, GER                            |
| Kryovial                                | Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, GER                            |
| Polyurethan                             | ITV Denkendorf GmbH, Denkendorf, GER                        |
| 12-well Zellkulturplatten 6-92406       | TPP Techno Plastic Products AG Tissue, Trasadingen, Schweiz |
| Neubauer-Zählkammer - C-Chip            | Biochrom AG, Berlin, GER                                    |
| Sterile Handschuhe                      | Semperit GmbH, Wien, AUT                                    |
| Pipettenspitzen, 10µl, 100µl, 1250µl    | Sarstedt AG&Co., Nümbrecht, GER                             |
| Zentrifugenröhrchen                     | Falcon, Corning Inc., Corning, USA                          |

#### 8.4.3. Lösungen bzw. Reagenzien

| Artikel bzw. Gegenstand  | Herstellername                          |
|--------------------------|---|
| Earle's 199 Medium       | Biochrom AG, Berlin, GER                |
| Penicillin-Streptomycin  | Sigma-Aldrich GmbH, St.Louis, USA       |
| Fibroblast Growth Medium | Promocell GmbH, Heidelberg, Deutschland |
| Fetal Calf Serum         | Biochrom AG, Berlin, GER                |
| Supplement Growth Mix    | Promocell GmbH, Heidelberg, GER         |
| Trypsin (Sigma-Aldrich)  | Sigma-Aldrich GmbH, St.Louis, USA       |

|  |   |
|--|---|
| PBS  | Sigma-Aldrich GmbH, St.Louis, USA                         |
| Dimethylsulfoxid                                   | Sigma-Aldrich GmbH, St.Louis, USA                         |
| 37% Formalinlösung                                 | SAV Liquid Production GmbH, Flintsbach am Inn, GER        |
| Hämalaun   | Merck KgaA, Darmstadt, GER                                |
| Alkohollösungen 30%,50%,70%, 96%                   | Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, GER               |
| Roti®-Histol                                       | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, GER                            |
| 2,5% Proteaselösung                                | Sigma-Aldrich GmbH, St.Louis, USA                         |
| Antikörperverdünner                                | Agilent, Santa Clara, Kalifornien, USA                    |
| Wasserstoffperoxid 30%                             | Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, GER               |
| Brij 35-Lösung                                     | Merck KgaA, Darmstadt, GER                                |
| Sekundärantikörper - Cytoscan<br>Biotynylated Link | Cell Marque, Rocklin, Kalifornien, USA                    |
| HRP Detektionssystem                               | Medac Diagnostika, Tornesch, GER                          |
| AEC-Lösung   | Vector Laboratories INC, California, USA                  |
| Eindeckmedium                                      | Agilent, Santa Clara, Kalifornien, USA                    |
| Aceton   | Merck Millipore KGaA, Darmstadt, GER                      |
| Methanol   | Merck Millipore KGaA, Darmstadt, GER                      |
| Zentrifugenröhrchen                                | Falcon, Corning Inc., Corning, USA                        |
| DAPI   | Sigma-Aldrich GmbH, St.Louis, USA                         |
| Bovine Serum Albumin                               | Sigma-Aldrich GmbH, St.Louis, USA                         |
| SDS  | Sigma-Aldrich GmbH, St.Louis, USA                         |
| TX-100   | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, GER                            |
| SD   | Sigma-Aldrich GmbH, St.Louis, USA                         |
| 20% Mannitol                                       | Sigma-Aldrich GmbH, St.Louis, USA                         |
| Accutase®  | Sigma-Aldrich GmbH, St.Louis, USA                         |
| Destilliertes Wasser - Ampuwa                      | Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v.d. H., GER |
| Trypanblau Solution 0,4%                           | Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, GER                        |
| Monoclonal Anti-Elastin antibody                   | Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, GER               |
| Monoclonal Anti-Fibronectin antibody               | Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, GER               |
| Monoclonal Anti-TE-7 Fibroblast antibody           | Merck Millipore KGaA, Darmstadt, GER                      |

|                                      |  |
|--------------------------------------|--|
| Monoclonal Anti-Kollagen I antibody  | Sigma Aldrich Chemie GmbH,<br>Taufkirchen, GER |
| Monoclonal Anti-Kollagen IV antibody | Sigma Aldrich Chemie GmbH,<br>Taufkirchen, GER |
| Monoclonal Anti-Laminin antibody     | Sigma Aldrich Chemie GmbH,<br>Taufkirchen, GER |
| Monoclonal Anti-Fibronectin antibody | Sigma Aldrich Chemie GmbH,<br>Taufkirchen, GER |

## 8.5. *Danksagung*

Zuerst möchte ich mich bei meinem Doktorvater *Prof. Dr. med. Christian Hagl* bedanken, welcher mir die wertvolle Möglichkeit gab im Herzchirurgischen Labor der LMU München zu promovieren. Die Tätigkeiten im Labor und am Schreibtisch haben mich um sehr wichtige Erfahrungen bereichert: Mein Sinn für wissenschaftliche Arbeit wurde geschärft, während der Promotionsprozess mit all seinen Höhen und Tiefen wertvolle Selbstreflektion und Persönlichkeitsentwicklungen hervorbrachte.

Besonderem Dank gilt meinen Betreuern *Dr. med. Nikolaus Thierfelder* und *Dipl.-Ing. Fabian König* für die zeitintensive Unterstützung bei der Durchführung meiner medizinischen Dissertation. Vom Entwurf bzw. Planung der Versuchsdurchführung, über die Auswertung bishin zum Verfassen der Arbeit habe ich in allen Aspekten der Promotion von einer sehr intensiven Betreuung profitiert. Durch die verlässliche Kommunikation und zeitnahem Feedback konnte ich wertvolle Kritik und Anregung schnell umsetzen bzw. meine Arbeit um diese ergänzen. Spezieller Dank geht auch an *Frau Ulrike Haas*, welche mir bei der praktischen Arbeit im Labor eine große Hilfestellung geleistet hat, sowie der Firma Auto Tissue GmbH aus Berlin als auch der ITV Denkendorf für das Bereitstellen des Polyurethans.

Zum Schluss bedanke ich mich herzlichst bei meiner Familie und meinen Freunden . Danke *Carlos und Consuela Yniguez*, sowie *Ernst Adams* für die Unterstützung in jeglicher Hinsicht und Lebenslage über die letzten Jahre. Danke *Hannah Henric-Petri*, für deine Geduld und Aufmerksamkeit. Danke an meine Freunde *Lennard Kropf, Kawan Darvishan, Maximilian Zandt, Phillip Görg und Arash Panahi*.

## **8.6. Eidesstaatliche Erklärung**

**Francisco Yniguez**

**Ehrenwörtliche Erklärung zu meiner Dissertation  
mit dem Titel:**

*Die Dezellularisierung zellbeschichteten Polyurethans*

*Ein experimenteller Ansatz für die Herstellung eines biohybriden  
Materials als Bestandteil zukünftiger kardiovaskulärer Implantate*

Sehr geehrte Damen und Herren,

hiermit erkläre ich, dass ich die beigefügte Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel genutzt habe. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet.

Ich versichere außerdem, dass ich die beigefügte Dissertation nur in diesem und keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht habe und, dass diesem Promotionsverfahren keine endgültig gescheiterten Promotionsverfahren vorausgegangen sind.

Köln, 18.02.2020

Francisco Yniguez

---

Ort, Datum

---

Unterschrift