

Aus der Herzchirurgischen Klinik und Poliklinik
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Christian Hagl

**Optimierung physikalischer Einflussfaktoren auf die Dezellularisierung zur
Herstellung xenogener Implantate**

-

**Systematische Evaluation der gekühlten Lagerung und der
Dezellularisierungstemperatur auf den Dezellularisierungsprozess**

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

vorgelegt von
Elena Kuster
aus
Albstadt-Ebingen

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Christian Hagl
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Hans Theiss PD Dr. Heiko Methe
Dekan:	Prof. Dr. med. Thomas Gudermann
Tag der mündlichen Prüfung:	24.03.2022

Ich widme diese Arbeit meinem Großvater Siegfried Neidhardt, der mich während des Studiums immer begleitet hat und die Fertigstellung meiner Arbeit gerne miterlebt hätte.

Kurzzusammenfassung

Einleitung: Dezellularisiertes, bovines Perikard ist ein vielversprechendes Gewebe auf dem Gebiet der Regenerativen Medizin. Die verwendeten Dezellularisierungsprotokolle bestehen dabei aus einer Kombination physikalischer, chemischer und enzymatischer Methoden. In dieser Arbeit soll die Abhängigkeit der Temperatur auf die Dezellularisierung (DZ) und den Erhalt der Extrazellulär Matrix (EZM) untersucht werden. Zudem soll eine Untersuchung des Einflusses einer gekühlten Lagerung der Perikarde vor der DZ auf das Gewebe nach der Dezellularisierung erfolgen.

Methoden: Es wurde ein bereits etabliertes Dezellularisierungsprotokoll für bovines Perikard verwendet. Die DZ erfolgte dabei über 16 Stunden bei kontinuierlichem Fluss. Als Detergenzien wurden Sodiumdodecylsulfat (SDS) und Sodiumdeoxycholat (SD) in jeweils 0,5%iger Konzentration verwendet. Insgesamt wurden sechs Gruppen (n=5) bei unterschiedlichen Temperaturen (4°C, 13°C, 21°C, 29°C, 37°C, 56°C) dezellularisiert. Für die Untersuchung der Lagerung wurde die Hälfte der Perikarde zunächst für 24 Stunden bei 4°C gelagert und am Folgetag dezellularisiert. Die Auswertung der Dezellularisierungseffektivität erfolgte mit der DAPI-Fluoreszenzfärbung. Zur Beurteilung der strukturellen Integrität der EZM wurden die Hämatoxylin-Eosin (H.E.) -Färbung, die Pentachrom- und Pikrosirius-Rot-Färbung, die Rasterelektronenmikroskopie und die Zugfestigkeitsprüfung verwendet.

Ergebnisse: Die Lagerung der Proben vor der DZ hatte keinen Einfluss auf die Dezellularisierungseffektivität. Es zeigten sich jedoch nach den Dezellularisierungen bei 21°C, 29°C und 37°C eine verstärkte Zunahme der Gewebedicke um 59% bis 67% und eine Abnahme der Zugfestigkeit mit Medianwerten zwischen 4,40 N/mm² und 10,74 N/mm². Zudem konnte eine Abhängigkeit der DZ von der Temperatur gezeigt werden. Die höchste Dezellularisierungseffektivität zeigte sich nach der Dezellularisierung bei 21°C. Hier konnte ebenfalls ein guter Erhalt der EZM in der H.E.-Färbung und Rasterelektronenmikroskopie beobachtet werden. Niedrigere und höhere Temperaturen resultierten jeweils in einer niedrigeren Dezellularisierungseffektivität und einer stärkeren Beschädigung der EZM. Wir beobachteten einen Zusammenhang zwischen einer verminderten Probendicke vor der Dezellularisierung und einer erhöhten Dickenzunahme der Proben um im Durchschnitt +123% nach der Dezellularisierung sowie einer verminderten Dezellularisierungseffektivität. Zudem konnten Unterschiede zwischen den nativen Perikarden in den Gewebeeigenschaften bezüglich der Zellkerndichte und dem Kollagengehalt festgestellt werden. Es konnte kein direkter

Einfluss auf die Dezellularisierungseffektivität oder den Erhalt der EZM nach der Dezellularisierung gezeigt werden.

Schlussfolgerung: Durch die verstärkte Dickenzunahme und die Abnahme der Zugfestigkeit konnten wir zeigen, dass die Lagerung der Proben zu Veränderungen in der Gewebeschaffenheit führte, weshalb eine direkte Weiterverarbeitung des Gewebes nach der Schlachtung empfohlen wird. Es konnte zudem ein Einfluss der Temperatur auf die Dezellularisierungseffektivität und den Erhalt der EZM beobachtet werden. Durch die Ergebnisse unserer Arbeit definierten wir das Temperaturoptimum bei der Dezellularisierung von bovinem Perikard bei 21°C. Hier zeigte sich die höchste Dezellularisierungseffektivität bei gleichzeitig bestem Erhalt des Gewebes. Des Weiteren vermuteten wir einen Einfluss von Gewebeeigenschaften auf die Dezellularisierungseffektivität und das Gewebe nach der Dezellularisierung und konnten Unterschiede in den Gewebeeigenschaften zwischen nativen Perikarden feststellen. Dadurch konnte gezeigt werden, dass neben der Optimierung des Dezellularisierungsprozesses ebenfalls Gewebeeigenschaften wie das Alter oder Geschlecht der Tiere berücksichtigt werden sollten.

Abstract

Objectives: Decellularized bovine pericardium is a highly promising scaffold in the field of regenerative medicine. Decellularization (DC) protocols include different physical, chemical and enzymatic methods. This study focuses on the influence of temperature, as a physical factor, on DC efficiency of bovine pericardium. Further, the influence of tempered storage of native pericardium prior DC and its effect on tissue condition after DC is evaluated.

Methods: An established DC procedure for bovine pericardia, based on a stream induced whirling in a solution of 0.5% Sodiumdodecylsulfat (SDS) and 0.5% Sodiumdeoxycholol (SD) for 16 hours was applied. Six groups (n=5) were treated at different thermal conditions (4°C, 13°C, 21°C, 29°C, 37°C, 56°C). Additionally, the influence of storing the pericardia for 24 hours at 4°C before DC was investigated. The efficiency of cell removal was analyzed by DAPI staining. Scanning electron microscopy (SEM), H&E staining, pentachrome- and pikrosirius-red staining as well as tensile tests were applied for a comprehensive analysis of the specimens.

Results: Storage of the pericardia had no effect in regard to cell removal but increased the tissue thickness after DC at 21°C, 29°C und 37°C by 59% up to 67% and led to decreased ultimate tensile strength (UTS) with a median value from 4,40 N/mm² up to 10,74 N/mm. Results showed a high correlation between successful DC and the temperature of the DC detergent. Successful DC is defined as total cell removal in combination with preserved structural integrity and maintained UTS. The highest DC efficiency was achieved after DC at 21°C with highly preserved ECM that was observed via H&E staining and SEM. Higher as well as lower temperatures lead to a decreased efficiency in DC and more damage to the structural integrity of the ECM. A relationship between reduced tissue thickness prior DC and an increase of tissue thickness by 123% after DC was observed, as well as reduced DC efficiency. Additionally, we could determine differences in tissue factors as cell density and collagen amount between native pericardia. A correlation to DC efficiency and preservation of ECM could not be shown.

Conclusion: The increase of tissue thickness and the decrease of UTS showed that storage before processing lead to changes in tissues condition thus, we recommend the processing in short cycle times after slaughter. We could observe a dependency of DC temperature on the DC efficiency and the preservation of the ECM. Based on the results of this study an optimum temperature at 21°C for DC of bovine pericardium could be defined with highest DC efficiency and best preservation of the ECM. Furthermore, we could assume an influence of tissue factors

on the DC efficiency and the tissue condition after DC and observed differences between tissue factors of native pericardia. This demonstrates that besides optimization of the DC process, tissue factors as the animals age and gender should also be considered.

Inhaltsverzeichnis

1	Abbildungsverzeichnis.....	1
2	Tabellenverzeichnis.....	3
3	Abkürzungsverzeichnis.....	4
4	Einleitung.....	6
5	Theoretische Grundlagen	7
5.1	Regenerative Medizin und Tissue Engineering	7
5.2	Trägermaterialien	8
5.2.1	Anforderungen	8
5.2.2	Synthetische vs. biologische Trägermaterialien.....	9
5.2.3	Bovines Perikard als Trägermaterial in der Herzchirurgie	11
5.3	Umgang mit biologischem Gewebe.....	13
5.3.1	Postmortale Abbauvorgänge	14
5.3.2	Dezellularisierung	14
6	Zielsetzung	18
7	Material und Methoden.....	19
7.1	Materialvorbereitung.....	19
7.2	Lagerung	20
7.3	Dezellularisierung	20
7.3.1	Versuchsaufbau	20
7.3.2	Dezellularisierungsprotokoll	22
7.3.3	Versuchsgruppen.....	23
7.4	Analysemethoden.....	25
7.4.1	Biometrie	25
7.4.2	Histologie	26
7.4.3	Rasterelektronenmikroskopie	36
7.4.4	Zugfestigkeitsprüfung.....	38
7.4.5	Statistische Auswertung.....	39
8	Ergebnisse.....	41
8.1	Biometrie	41
8.2	Histologie.....	43
8.2.1	4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)-Fluoreszenzfärbung	43
8.2.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	44

8.2.3	Pikrosirius-Rot-Färbung	47
8.2.4	Movats-Pentachrom-Färbung	50
8.3	Rasterelektronenmikroskopie	51
8.4	Zugfestigkeitsprüfung	53
9	Diskussion	58
10	Zusammenfassung und Ausblick.....	64
11	Literaturverzeichnis	66
12	Anhang.....	74
	Vorveröffentlichungen	87
	Danksagung.....	89
	Eidesstattliche Versicherung	91

1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Anforderungen an Trägermaterialien	9
Abb. 2	Aufbau der Herzwandschichten, Abbildung aus [57].	12
Abb. 3	Schematischer Aufbau von Bindegewebe, Abbildung aus [58]	13
Abb. 4	Probenentnahme	19
Abb. 5	Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus	21
Abb. 6	Schematische Darstellung des Dezellarisierungsprotokolls	23
Abb. 7	Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus in E_I	24
Abb. 8	Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus in E_{II}	25
Abb. 9	Bestimmung der Dezellarisierungseffektivität	28
Abb. 10	Kriterien für die Bewertung der strukturellen Beschaffenheit in der H.E.-Färbung	30
Abb. 11	Entnahme von drei repräsentativen Bereichen pro Probe	33
Abb. 12	Definition der Helligkeitsgrenze (<i>Brightness-Threshold</i>).....	33
Abb. 13	Berechnung des relativen Kollagengehalts	34
Abb. 14	Zugproben und Zugprüfmaschine zur Bestimmung der Zugfestigkeit	39
Abb. 15	Perikardproben vor und nach der Dezellularisierung.....	42
Abb. 16	Dezellularisierung in Abhängigkeit von der Dezellularisierungstemperatur in E_I	44
Abb. 17	Beurteilung der EZM in der H.E.-Färbung in E_I	46
Abb. 18	Veränderung im relativen Kollagengehalt in Abhängigkeit von der Dezellularisierungstemperatur in E_I	48
Abb. 19	Beurteilung des Kollagengehalts mit der Pikrosirius-Rot-Färbung in E_I	49
Abb. 20	Beurteilung der elastischen Fasern und der Kollagenfasern in der Movats- Pentachrom-Färbung	50
Abb. 21	Fehlende Auswertbarkeit des Gehalts an elastischen Fasern in der Movats- Pentachrom-Färbung	51
Abb. 22	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Perikardinnenseiten in E_I	52
Abb. 23	Zugfestigkeit der Zugproben mit Faserverlauf in Zugrichtung in Abhängigkeit von der Dezellularisierungstemperatur in E_I	55
Abb. 24	Vergleich der Zugfestigkeiten der Zugproben mit Faserverlauf in Zugrichtung in Abhängigkeit von der Dezellularisierungstemperatur von E_I und E_{II}	56
Abb. 25	Dezellularisierung in Abhängigkeit von der Dezellularisierungstemperatur in E_{II}	74
Abb. 26	Beurteilung der EZM in der H.E.-Färbung in E_{II}	75
Abb. 27	Veränderungen im relativen Kollagengehalt in Abhängigkeit von der Dezellularisierungstemperatur in E_{II}	76

Abb. 28	Beurteilung des Kollagengehalts mit der Pikrosirius-Rot-Färbung in E _{II}	77
Abb. 29	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Perikardinnenseiten in E _{II}	77
Abb. 30	Postervortrag	88

2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Probendicken in E _I	41
Tab. 2	Score zur Beurteilung der strukturellen Beschaffenheit der Innen- und Außenseiten in der H.E.-Färbung in E _I	47
Tab. 3	Probendicken in E _{II}	74
Tab. 4	Veränderung der Zellkerndichte nach der Dezellularisierung in E _{II}	75
Tab. 5	Vergleich des Kollagengehalts der nativen Proben in E _{II}	76
Tab. 6	Entparaffinierung	78
Tab. 7	4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)- Fluoreszenzfärbung	78
Tab. 8	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	79
Tab. 9	Pikrosirius-Rot-Färbung	79
Tab. 10	Movats-Pentachrom-Färbung	80
Tab. 11	Aufsteigende Alkoholreihe	81
Tab. 12	Lösungen	82
Tab. 13	Färbekits	83
Tab. 14	Lösungszusammensetzungen	84
Tab. 15	Geräte/Hilfsmittel	85

3 Abkürzungsverzeichnis

ABKÜRZUNG	BEDEUTUNG
Abb.	Abbildung
BGW	Bindegewebe
CMC	critical micelle concentration (kritische Mizellenkonzentration)
DAPI	4'-6-diamidin-2-phenylindol
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DZ	Dezellularisierung
E _I	Experiment I
E _I I	Experiment I, Gruppe „Instant“- Dezellularisierung am Schlachtungstag
E _I S	Experiment I, Gruppe „Storage“- Dezellularisierung am Folgetag
E _{II}	Experiment II
EZM	Extrazellulärmatrix
GAG	Glucosaminoglykane
H.E.-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
K _{abs}	absoluter Kollagengehalt
K _{rel}	relativer Kollagengehalt
KQ	Kollagenquotient
LED	light-emitting diode (lichtemittierende Diode)
PBS	phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Saline)
Px	Pixel
REM	Rasterelektronenmikroskop
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
SD	Sodiumdeoxycholat
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SE	Sekundärelektronen
Tab.	Tabelle

Einheiten:

ABKÜRZUNG	BEDEUTUNG
cm	Zentimeter
g	Gramm
h	hour (Stunde)
kHz	Kilohertz
kN	Kilonewton
kPa	Kilopascal
l	Liter
MPa	Megapascal
mA	Milliamper
min.	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
ms	Millisekunde
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
n	Anzahl
nm	Nanometer
N/mm ²	Newton pro Quadratmillimeter
V	Volt
W	Watt
°C	Grad Celsius

4 Einleitung

Die Regenerative Medizin ist in den letzten Jahren immer mehr in den Fokus der Forschung gerückt. [1-3] Ihr Ziel ist es, krankes oder beschädigtes Gewebe zu regenerieren oder zu ersetzen und dadurch die normale Funktion wiederherzustellen. [4, 5] Das Potential liegt in der Fähigkeit von Zellen, neues Gewebe zu schaffen. [2, 4] Die Zellen benötigen ein geeignetes Umfeld, welches das Überleben, das Wachstum und die Proliferation fördert. [2, 6] Dafür werden sogenannte Trägermaterialien benötigt. [7, 8] Trägermaterialien sind Implantate, welche den Zellen ein geeignetes Umfeld bieten und die Zellfunktion und die Gewebebildung steuern können. Um diesen Aufgaben gerecht zu werden, müssen sie gewisse Anforderungen erfüllen, welche in drei Kategorien unterteilt werden können: der strukturelle Aufbau, spezifische mechanische Eigenschaften, sowie die Biokompatibilität des Gewebes. Ein vielversprechender Forschungsansatz zur Herstellung von Trägermaterialien besteht in der Dezellularisierung von biologischem Gewebe. [1, 9] Dabei werden zelluläre Strukturen und weitere Antigene aus dem Gewebe entfernt. [10] Abstoßungsreaktionen durch körperfremdes Material können so verhindert werden. Die dezellularisierte EZM eignet sich mit ihren Eigenschaften ideal als Trägermaterial. [11] Im kardiovaskulären Bereich wird aufgrund seiner Gewebeeigenschaften häufig Perikard eingesetzt. [12-16] Zur Dezellularisierung biologischen Gewebes existieren bereits eine Vielzahl von Dezellularisierungsprotokollen. Diese setzen sich aus einer Kombination physikalischer, chemischer und enzymatischer Methoden zusammen. [10, 17] Die Definition einer erfolgreichen Dezellularisierung besteht in der Kombination von Zellfreiheit bei gleichzeitig erhaltener EZM. [3, 17, 18] Konstant erfolgreiche Dezellularisierungsergebnisse konnten bislang nicht erzielt werden. [19-21] Ziel dieser Arbeit war deshalb die Optimierung eines Dezellularisierungsprotokolls für die Dezellularisierung von bovinem Perikard.

5 Theoretische Grundlagen

5.1 Regenerative Medizin und Tissue Engineering

Der Begriff der Regenerativen Medizin beschreibt einen relativ jungen Ansatz in der Geschichte der Medizin. [1-3] Sie hat zum Ziel, krankes oder beschädigtes Gewebe zu regenerieren oder zu ersetzen und damit die normale Funktion wiederherzustellen. Die Regenerative Medizin steht damit im Gegensatz zur Reparativen Medizin. [22] Die Grundlage liegt in dem Potential, mit Hilfe von Zellen neues Gewebe zu schaffen. [4, 5]

In der Embryogenese entwickelt sich der menschliche Organismus aus einer Ursprungszelle. Noch im adulten Organismus besitzt jede Zelle bis zu einem gewissen Grad das Potential sich zu differenzieren und neues Gewebe zu formen. [23] Dafür benötigt sie ein geeignetes Umfeld, welches Überleben, Wachstum und Proliferation fördert und damit die Zellfunktion und die Gewebebildung steuert. Dies wird in der Regenerativen Medizin durch die Kopplung der Zellen an Trägermaterialien ermöglicht. Diese sollen die Funktion des nativen Umfelds übernehmen und somit die Zellfunktion stimulieren und steuern. [6-8] Der Erfolg von Zelltransplantationen in der Regenerativen Medizin hängt damit maßgeblich von der Entwicklung funktionaler Trägermaterialien ab. [24] Mit der Entwicklung solcher Trägermaterialien und deren Besiedelung mit Zellen befasst sich das Teilgebiet des Tissue Engineerings. Das Tissue Engineering vereinigt dabei die Prinzipien der Ingenieurs- und der Naturwissenschaft mit dem Ziel der Schaffung neuen, funktionalen und lebenden Gewebes. [25-27] Im Gegensatz zu permanenten Implantaten, wie zum Beispiel mechanischen Herzklappen, können die Trägermaterialien auch als temporäre Implantate dienen, welche sukzessive abgebaut und durch von den implantierten Zellen neu gebildetes Gewebe ersetzt werden. Dadurch werden Regenerierungs- und Heilungsprozesse ermöglicht. Diese Eigenschaft birgt einen großen Vorteil gegenüber den bisherig eingesetzten, permanenten Implantaten, weshalb das Tissue Engineering als vielversprechendes Forschungsgebiet betrachtet wird. [28]

Das Einsatzgebiet des Tissue Engineerings ist mittlerweile sehr breit. Es umfasst statische Organe und Systeme wie Haut [29-31], Hornhaut [32], Knorpel [6, 33, 34] oder Knochen [33], aber auch Organe wie Leber [35, 36], Pankreas [37], Niere [6, 38] sowie Organe des Herzkreislaufsystems. [39-41]

5.2 Trägermaterialien

5.2.1 Anforderungen

Um erfolgreich als Trägermaterialien eingesetzt werden zu können, müssen die Gewebe bestimmte Anforderungen erfüllen (siehe Abb. 1). Ein zentraler Aspekt ist dabei die Biokompatibilität. Das Gewebe sollte nach der Implantation keine negativen Reaktionen im Empfängerorganismus hervorrufen. Zudem sollte das Gewebe vom Körper biologisch abgebaut werden können, wobei die Abbauprodukte ebenfalls keine toxische Wirkung auf den Organismus aufweisen dürfen. [6, 24, 42] Dabei sollte die Abbaurate im Gleichgewicht mit der Gewebeneubildung durch die Zellen stehen, um diese nicht zu behindern. [43] Ein weiterer zentraler Punkt sind die mechanischen Eigenschaften des Gewebes. Die Trägermaterialien müssen einen gewissen Grad an Stabilität aufweisen, um nach der Implantation die volle Funktion des zu ersetzenden Gewebes übernehmen zu können. Die mechanische Eigenschaft des Gewebes hat zudem einen großen Einfluss auf die Regulation des Zellverhaltens. Eine weitere Herausforderung ist der strukturelle Aufbau des Gewebes. Die Oberflächenbeschaffenheit sollte die Bindung von Zellen an das Trägermaterial ermöglichen und das Überleben, sowie die Differenzierung und Funktion der Zellen fördern. Dafür können biologische Liganden im Gewebe dienen, die den Zellen eine natürliche Umgebung simulieren. Manche Gewebe benötigen zudem Poren, um das Zellwachstum, die Nährstoffversorgung, sowie den Abtransport von Stoffwechselendprodukten zu gewährleisten. [24, 28, 42]

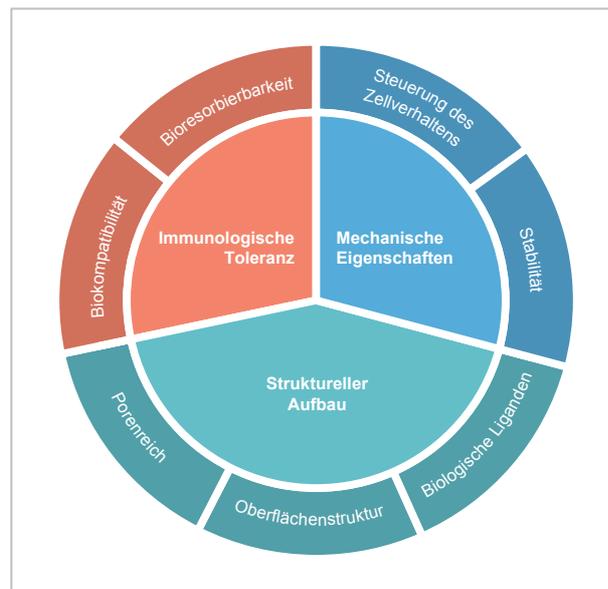


Abb. 1 Anforderungen an Trägermaterialien

Die Anforderungen an Trägermaterialien können in drei Kategorien gegliedert werden. Eine Kategorie stellt dabei die Biokompatibilität dar. Die Trägermaterialien sollten im Empfängerorganismus keine negativen Immunreaktionen hervorrufen. Weiter sollten sie vom Körper abbaubar sein, wobei die Abbauprodukte wiederum keine Toxizität aufweisen dürfen. Die zweite Kategorie bilden die mechanischen Eigenschaften des Gewebes. Dabei werden eine ausreichende Stabilität zur Funktionsübernahme und eine gleichzeitige Steuerung des Zellverhaltens gefordert. Die dritte Kategorie befasst sich mit den Anforderungen an den strukturellen Aufbau. Das Gewebe sollte das Wachstum und den Stoffwechsel der Zellen ermöglichen.

5.2.2 Synthetische vs. biologische Trägermaterialien

Trägermaterialien können in synthetische und biologische Trägermaterialien unterteilt werden. Der wesentliche Vorteil synthetischer Trägermaterialien liegt in ihrer unbegrenzten Verfügbarkeit. Zudem können die Eigenschaften des Materials in der Produktion kontrolliert werden, sodass idealerweise jedes Produkt identische Eigenschaften besitzt. [25, 27] Die Eigenschaften des Gewebes können dabei gezielt an die Anforderungen der Trägermaterialien angepasst werden, welche abhängig vom zu ersetzenden Gewebe variieren. [6, 8, 44, 45] Allerdings erfüllen bislang keine der eingesetzten synthetischen Gewebe die geforderten Anforderungen. Potentielle, unerwünschte Begleiterscheinungen sind deshalb Entzündungsreaktionen, ein inkompletter Abbau der Polymere oder Narbenbildung. [8, 25]

Es wird deshalb angenommen, dass biologische Trägermaterialien gegenüber den Synthetischen wesentliche Vorteile besitzen. Ein Vorteil biologischer Materialien ist ihr komplexer Aufbau bis in den Nanometerbereich. Sie besitzen biologische Liganden, welche die

Bindung von Zellen ermöglichen. Zudem stimulieren und steuern diese das Wachstum und die Funktion der Zellen. [6, 7, 27] Biologische Gewebe simulieren dadurch ein natürliches extrazelluläres Milieu. [24] Sie benötigen keine zusätzlichen Modifikationen, um die Zellbindung und die Zellfunktion zu ermöglichen. [45] Ein wesentlicher Nachteil biologischer Trägermaterialien liegt in der Variabilität des Gewebes. Da biologische Trägermaterialien aus dem Gewebe lebender Organismen erzeugt werden, können starke Unterschiede in der Gewebequalität und den Gewebeeigenschaften auftreten. Ein weiterer Aspekt sind körperfremde Antigene in biologischem Gewebe. Diese werden vom Empfängerorganismus als fremd erkannt und können destruktive Entzündungsreaktionen und Abstoßungsreaktionen auslösen. Um diese immunologischen Reaktionen zu verhindern, beziehungsweise zu minimieren, sind Verarbeitungsprozesse notwendig, welche wiederum den Aufbau des Gewebes negativ beeinflussen können. [24, 27]

Biologische Trägermaterialien. Biologische Gewebe können aus dem Organismus des Empfängers (autolog), aus der gleichen Spezies (allogen) oder aus dem Organismus einer fremden Spezies (xenogen) stammen. [46] Autologes Gewebe stellt dabei aufgrund seiner überlegenen Funktionalität und Biokompatibilität den Goldstandard dar. Der limitierende Faktor in der Verwendung autologen Gewebes liegt allerdings in einem meist reduzierten Gesundheitszustand des Patienten. Der Nachteil autologer und allogener Gewebe ist zudem die begrenzte Verfügbarkeit. Aus diesem Grund wird zunehmend Gewebe tierischen Ursprungs verwendet. [47, 48] Dabei wird bevorzugt Gewebe vom Pferd (equin), vom Schwein (porcin) oder vom Rind (bovin) eingesetzt. [47]

Gewebe setzen sich aus Zellen und der Extrazellulärmatrix zusammen. Zellen sind die kleinste Funktionseinheit eines Organismus und sind der Grundbaustein aller Gewebe. Sie sind von einer Zellmembran umgeben und besitzen einen Zellkern. Dieser enthält die DNA und damit die Erbsubstanz der Zelle. Die Zellmembran ist 5-8 μm dick und lichtmikroskopisch damit nicht zu sehen. Sie wird aus einer doppelten Lage polarer Lipide, hauptsächlich Phospholipiden, gebildet, wodurch eine stabile und gleichzeitig flexible Doppelschicht entsteht. Proteine sind ebenfalls Bestandteil der Zellmembran und übernehmen Funktionen wie den Stoffaustausch oder die interzelluläre Kommunikation. Die Zellen regulieren durch die Synthese und den Abbau der Komponenten den Stoffwechsel der EZM. Sie füllt den Raum zwischen den Zellen und fasst alle von den Zellen sezernierten Moleküle zusammen. Diese bilden eine komplexe Organisation aus und übernehmen abhängig von der Gewebeart spezifische Funktionen. Über Rezeptoren sind die Moleküle mit den Zellen verbunden. Dadurch nimmt die EZM Einfluss auf das Zellverhalten und die Zellen werden zudem fixiert. [49, 50] Die Komponenten der EZM haben sich in ihrem Aufbau im Laufe der Evolution kaum verändert, weshalb sie in fremden Organismen keine Abstoßungsreaktionen auslösen. [51, 52]

5.2.3 Bovines Perikard als Trägermaterial in der Herzchirurgie

In der Herzchirurgie wird als Trägermaterial häufig Perikardgewebe eingesetzt [12-16]. Es besitzt gute Verarbeitungs- und Nahteigenschaften und eine natürliche Resistenz gegenüber Infektionen. Seine Oberfläche ist zudem nicht-thrombogen. [47] Vor allem bovines Perikard scheint ideale Eigenschaften für die Anwendung im kardiovaskulären Bereich zu besitzen und dabei anderen xenogenen Geweben überlegen zu sein. [53-55]

Perikard ist der lateinische Begriff für Herzbeutel. Er ummantelt das Herz und die in das Herz mündenden Gefäße. Seine Aufgabe ist es, ein Gleiten des Herzens zu ermöglichen und eine Überdehnung des Herzens zu verhindern. Perikardgewebe setzt sich aus geflechtartigem, straffen Bindegewebe (BGW) und einschichtigem Plattenepithel zusammen. Das Plattenepithel ist dabei dem Herzen zugewandt. Zusammen mit dem Epithel des Epikards bildet es die Perikardhöhle (siehe Abb. 2). Das Epithel bildet Flüssigkeit und ermöglicht dadurch das Gleiten des Herzens. Das Epithel ist auf der herzabgewandten Seite einer Basalmembran aufgesetzt, welche dem Epithel Flexibilität und gleichzeitig Stabilität verleiht. [49, 50, 56]

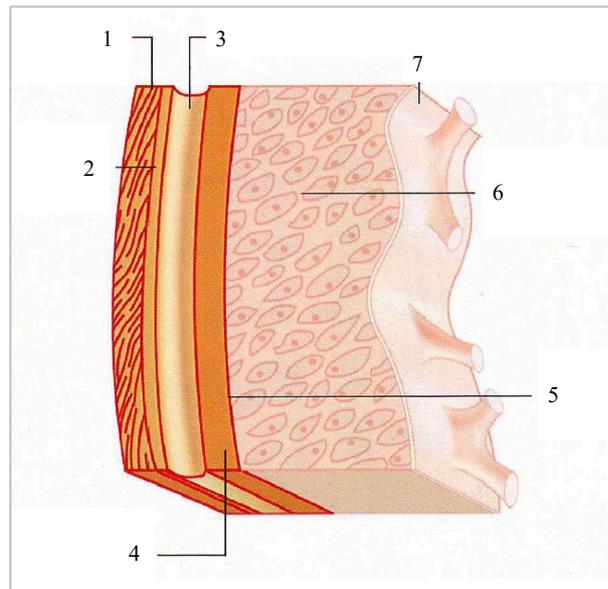


Abb. 2 Aufbau der Herzwandschichten, Abbildung aus [57]

Das Perikard gliedert sich in einen bindegewebigen Anteil und einen serösen Anteil aus Epithelgewebe. Der seröse Anteil gliedert sich dabei in das *pericardium serosum viscerale* (4) und das *pericardium serosum parietale* (2). Das *pericardium serosum viscerale* sitzt als Epithelschicht dem Myokard (6) des Herzens auf. Das *pericardium serosum parietale* ist über eine Basalmembran mit dem bindegewebigen Anteil (1) des Perikards verbunden. *Pericardium serosum viscerale* und *pericardium serosum parietale* bilden gemeinsam die Perikardhöhle (3), welche ein Gleiten des Herzens ermöglicht. Für die Herstellung von Trägermaterialien wird der Bindegewebsanteil mit dem *pericardium serosum parietale* verwendet. Epikard (5), Endokard (7).

Die EZM von BGW besteht aus Kollagenfasern und elastischen Fasern, Glucosaminoglykanen (GAG) und Proteoglykanen, sowie Adhäsionsproteinen (siehe Abb. 3). Die EZM des Perikardgewebes besitzt einen sehr hohen Anteil an Kollagen, weshalb es auch als kollagenes BGW bezeichnet wird. Kollagene sind eine Proteinfamilie mit ca. 40 Subtypen. In der EZM von Perikard kommt hauptsächlich Kollagentyp I und III vor. Kollagenfasern sind über kovalente Bindungen stabil untereinander vernetzt und daher sehr zugfest. Sie sind im Durchschnitt 2-20 μm groß und im Lichtmikroskop als Fasern sichtbar. Ultrastrukturell besteht jede Faser aus parallel angeordneten Kollagenfibrillen, welche wiederum aus Kollagenmolekülen aufgebaut sind. Die Kollagenmoleküle werden von den Zellen des BGW, den Fibroblasten, synthetisiert. [49, 50, 56]

Elastische Fasern sind kleiner als Kollagenfasern und haben einen Durchmesser von 0,2-5 μm . Sie haben einen netzförmigen Aufbau und sind dadurch reversibel dehnbar. Sie lassen sich

bereits bei geringen Zugkräften auf maximal das Zweieinhalbfache ihrer Ursprungslänge dehnen. Durch elastische Rückstellkräfte kehren die Fasern nach dem Wegfall der Zugkraft wieder in ihren Ausgangszustand zurück. [49, 50]

Proteoglykane sind Proteine. GAG sind lange, negativ geladene Polysaccharidketten. Beide sind über kovalente Bindungen miteinander verbunden. Durch die negative Ladung der GAG lagern sich Kationen und Wasser an die Moleküle an. Damit dienen die Proteoglykane und GAG hauptsächlich der Bindung von Wasser als Wasserspeicher und für mechanische Zwecke. Sie übernehmen zudem mechanische und zellbiologische Funktionen. Adhäsionsproteine stellen eine weitere Komponente der EZM dar und verbinden die Zellen mit der EZM. [49]

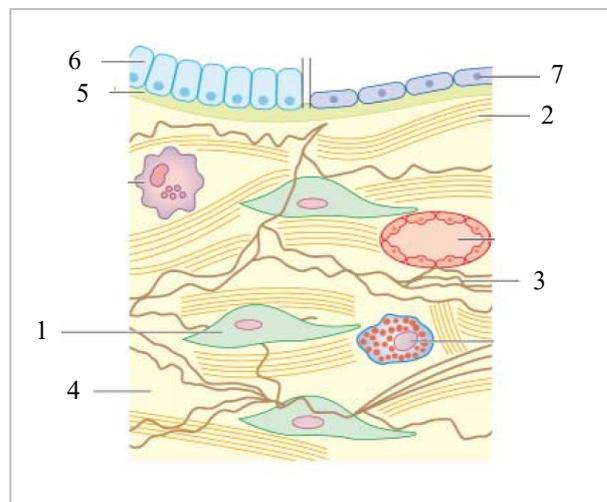


Abb. 3 Schematischer Aufbau von Bindegewebe, Abbildung aus [58]

BGW setzt sich aus Zellen und der EZM zusammen. Die ortsständigen Zellen im BGW sind die Fibroblasten (1), welche die Komponenten der EZM produzieren: Kollagenfasern (2), elastische Fasern (3), Proteoglykane und GAG (4). BGW sind meist über eine Basalmembran (5) mit einem Epithel- (6) oder Endothelgewebe (7) verbunden.

5.3 Umgang mit biologischem Gewebe

Bei der Verwendung von biologischem Gewebe als Trägermaterial müssen zwei Aspekte berücksichtigt werden. Zum einen unterliegt biologisches Gewebe nach der Explantation Abbauvorgängen, welche einen negativen Einfluss auf die Struktur und die Funktion des Gewebes haben. Zudem befinden sich im Gewebe körperfremder Organismen Antigene, welche vom Empfänger als fremd betrachtet und abgestoßen werden können. [17] Um eine solche Abstoßungsreaktion zu verhindern, sind Verarbeitungsprozesse notwendig. Sie sollen die immunogenen Strukturen entfernen und dadurch das antigene Potential minimieren. Ein

großer Fortschritt in der Entwicklung biologischer Trägermaterialien war die Etablierung von Dezellularisierungsverfahren. [1, 9]

5.3.1 Postmortale Abbauvorgänge

Die biologischen Gewebe werden aus Tierkadavern gewonnen. Die Entnahme erfolgt dabei unmittelbar nach der Schlachtung der Tiere. Durch die Schlachtung kommt es zu einem Stillstand des Herzkreislaufsystems, weshalb die Gewebe des Körpers nicht mehr mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt werden. Der Sauerstoffmangel führt zu einem Erliegen der Zellatmung, weshalb die Energiegewinnung der Zelle auf anaerobe Glykolyse umgestellt wird. Laktat steigt an und der pH-Wert sinkt. Die Zellfunktion wird gestört, die Zellen schwellen an und gehen unter. [59, 60] Der niedrige pH-Wert führt zudem zu einer Freisetzung von Enzymen aus der Zelle. Die freien körpereigenen Enzyme bewirken eine Zersetzung des Gewebes. Dieser Prozess wird Selbstverdauung, Autolyse, genannt. Es kommt zu einer Auflösung der Zellmembranen und einer Freisetzung intrazellulärer Moleküle. Diese dienen wiederum als Nährstoffe für Mikroorganismen und fördern dadurch die Besiedelung durch Bakterien oder Pilze. [61, 62] Der Eintritt und die Geschwindigkeit der Autolyse ist abhängig vom Enzymgehalt des jeweiligen Gewebes. [61] Bindegewebe besitzen einen niedrigen Gehalt an proteolytischen Enzymen und durchlaufen die Autolyse daher als eines der letzten Gewebe im Organismus. [63] Autolytische Veränderungen in BGW werden deshalb erst nach Stunden, bei bestimmten Umweltbedingungen erst nach Tagen, sichtbar. [62]

Wie alle enzymatischen Prozesse ist auch die Autolyse temperaturabhängig. [64, 65] Die Reaktionsgeschwindigkeit der proteolytischen Enzyme steigt zwischen 10°C und 50°C exponentiell an. Oberhalb einer gewissen Temperatur setzt eine Denaturierung der Enzyme ein, wodurch sie inaktiviert werden. [66] Niedrigere Temperaturen führen dagegen durch das Herabsetzen der Reaktionsgeschwindigkeit zu einer verzögerten Autolyse. In Studien konnte gezeigt werden, dass durch eine Kühlung des Gewebes im Kühlschrank das Einsetzen autolytischer Prozesse deutlich hinausgezögert werden kann. [61, 67, 68]

5.3.2 Dezellularisierung

Eine Möglichkeit, die Immunogenität von körperfremdem Gewebe zu minimieren, ist die Dezellularisierung. Sie beschreibt einen Verarbeitungsprozess, bei dem Zellen aus dem Gewebe entfernt werden. Durch die Entfernung der Zellen werden die Hauptantigene des Gewebes, DNA, RNA und Zellmembranproteine, herausgelöst. Die Struktur und Funktion der

EZM bleiben dabei idealerweise erhalten. [10, 11, 17] Die Dezellularisierung reduziert zudem das Übertragungsrisiko von Infektionen und Krankheiten durch das Gewebe. [69] Um die Zellen aus dem Gewebe zu entfernen, müssen während der Dezellularisierung mehrere Schritte erfolgen. Dazu gehören die Lyse der Zellmembranen, die Auftrennung der zellulären Komponenten von der EZM, die Erhöhung der Löslichkeit von zytoplasmatischen und nukleären Strukturen und die Entfernung des Zelldebris aus dem Gewebe. [17]

Aufbau von Dezellularisierungsprotokollen. Dezellularisierungsprotokolle bestehen dabei üblicherweise aus chemischen, enzymatischen und physikalischen Methoden oder deren Kombination. Chemische Dezellularisierungsansätze umfassen die Anwendung von Säuren und Basen, Alkoholen, hypo- und hypertonen Lösungen und Detergenzien, welche sich in ihrer Funktionsweise unterscheiden. Säure und Basen führen durch ihre Ladung zu einem Auflösen von Zellmembranen und nukleärem Material. Alkohole bewirken dagegen eine Dehydratation und Zellyse. Hypotone Lösungen können bereits durch einfache osmotische Effekte zu einer Lyse der Zellen führen, wogegen hypertone Lösungen die Auftrennung von DNA und Proteinen bewirkt. [10, 17, 18]

Detergenzien sind Moleküle mit einem polaren, hydrophilen Molekülanteil und einem unpolaren, lipophilen Anteil. In wässriger Lösung können sich die einzelnen Moleküle zu Aggregaten zusammenlagern. Dabei orientieren sich die lipophilen Anteile nach innen und die hydrophilen nach außen. Diese Aggregate werden Mizellen genannt und interagieren mit den Lipiden und den Proteinen der Zellmembran. Sie bewirken eine Öffnung und Fragmentierung der Zellmembran und erhöhen die Löslichkeit der Zellmembranbestandteile. [70-72] Mizellen bilden sich ab einer bestimmten Konzentration aus. Diese Konzentration ist spezifisch für jedes Detergenz und wird kritische Mizellenkonzentration (CMC) genannt. Einer der Einflussfaktoren auf die CMC ist die Temperatur. [73-75]

Sodiumdodecylsulfat (SDS) und Sodiumdeoxycholat (SD) gehören zu den anionischen Detergenzien. SDS ist das am häufigsten verwendete Detergenz in der Dezellularisierung und entfernt effektiv Zellbestandteile und genetisches Material aus dem Gewebe. Im Zusammenhang mit der Verwendung von SDS wurde bereits mehrfach über Veränderungen in der Struktur der EZM und einem Verlust der Kollagenintegrität berichtet. [17, 18, 76] Diese Veränderungen waren abhängig von der verwendeten Konzentration und nahmen mit steigender Konzentration zu. [10] Um diese Veränderungen zu verhindern und dennoch eine ausreichende dezellularisierende Wirkung zu erzielen, kann SDS mit SD kombiniert werden. Durch die Kombination zweier Detergenzien mit dem gleichen Wirkansatz kann ein additiver Effekt erzielt werden. [77] SD werden in der Literatur zum Teil schwächere

Dezellularisierungseigenschaften zugesprochen, es führt jedoch zu einem besseren Erhalt der EZM. [10, 78]

Die Konzentrationen von Dezellularisierungslösungen können aufgrund der damit einhergehenden Veränderungen nicht unendlich gesteigert werden, weshalb sie mit enzymatischen oder physikalischen Dezellularisierungsansätzen kombiniert werden. Beide bewirken alleine keine vollständige Dezellularisierung, steigern jedoch die Wirkung chemischer Dezellularisierungsansätze. [10, 79] Häufig eingesetzte Enzyme sind dabei Trypsin, DNase und RNase. Trypsin führt zu einer Spaltung von Zell-Matrix-Verbindungen, DNase und RNase bewirken eine Fragmentierung von DNA und RNA. Durch ihre gezielten Angriffspunkte kann eine hohe Wirkungsspezifität erzielt werden. Nachteile von Enzymen sind deren negative Wirkung auf Komponenten der EZM, sowie Enzymreste im Gewebe, welche die Rebesiedelung beeinträchtigen und Immunreaktionen auslösen können. Physikalische Dezellularisierungsansätze besitzen zum Teil dezellularisierende Eigenschaften, werden jedoch hauptsächlich aufgrund ihrer verstärkenden Wirkung auf chemische Dezellularisierungsansätze eingesetzt. Gefrier-Tau-Vorgänge oder die Anwendung von Druck wirken dabei vor allem durch eine direkte Zellyse selbst dezellularisierend. Ultraschall und die Mobilisation der Dezellularisierungslösung durch Schütteln oder Spülen erhöhen die Wirkung durch eine verbesserte Exposition des Gewebes mit der Lösung. Zudem wird der Abtransport des Zelldebris gesteigert, wodurch die dezellularisierende Wirkung weiter optimiert wird. [17, 18] Ultraschall erzeugt dabei Vibrationen in der Dezellularisierungslösung, was das Eindringen der Lösung in das Gewebe erleichtert. Es werden zudem Kavitationsblasen erzeugt, welche an Größe zunehmen und platzen. Dabei entsteht Scherstress, welcher Zellmembranen beschädigt und dadurch zusätzlich eine Zellyse bewirkt. [80, 81] Durch die Verwendung von Ultraschall kann die Dezellularisierungszeit reduziert werden, was sich positiv auf den Erhalt der EZM auswirkt. [10]

Mitentscheidend für den Erfolg einer Dezellularisierung sind Waschphasen. Sie lösen den Zelldebris aus dem Gewebe und entfernen die für die Dezellularisierung verwendeten Chemikalien. SDS und SD sind zytotoxisch und müssen vor Implantation in den Organismus aus dem Gewebe entfernt werden. [10, 17] Es konnte gezeigt werden, dass durch das Waschen mit PBS eine Reduktion der Chemikalien-Konzentration erzielt werden konnte, was die Rebesiedelung mit humanen Endothelzellen ermöglichte. Dabei ließ sich die Kombination aus SDS und SD schneller aus dem Gewebe entfernen als SDS oder SD allein. [82]

Beurteilung des Dezellularisierungserfolgs. Die Kriterien einer erfolgreichen Dezellularisierung sind Zellfreiheit bei gleichzeitigem Erhalt der EZM. Der Grad der Zellfreiheit kann dabei entweder durch DNA-Quantifizierung oder durch histologische und

immunhistochemische Färbungen bestimmt werden. Die Färbungen binden dabei an Zellkernbestandteile wie zum Beispiel die DNA. Eine erfolgreiche Dezellularisierung stellt sich deshalb in Form von fehlenden Zellkernen im Gewebeschnitt dar. Durch die Dezellularisierung kommt es unweigerlich zu Veränderungen in der EZM, weshalb der Erhalt wichtiger EZM-Komponenten überprüft werden muss. Dazu gehören elastische Fasern und Kollagen. Gängige histologische Färbungen zur Darstellung von EZM-Komponenten sind die H.-E.-Färbung und die Movats-Pentachrom-Färbung. Die H.E.-Färbung wird dabei vor allem als Übersichtsfärbung verwendet, die Movats-Pentachrom-Färbung als spezielle Bindegewebsfärbung.[3, 17, 18] Die Pikrosirius-Rot-Färbung ist zudem ein sensitives Verfahren zur Darstellung von Kollagen, das die Abbildung bereits kleiner Mengen an Kollagen erlaubt. [83] Für die Beurteilung der Mikro- und Nanoarchitektur des Gewebes wird die Rasterelektronenmikroskopie eingesetzt. Die Funktionalität der EZM-Komponenten kann mit mechanischen Tests untersucht werden. [3, 17] Bei der Untersuchung von biologischem Gewebe werden biaxiale Testungen bevorzugt, da die Gewebeeigenschaften abhängig von der gemessenen Richtung variieren. Diese Eigenschaft wird als Anisotropie bezeichnet. Die biaxiale Testung erlaubt somit eine Beurteilung der Gewebeeigenschaften in zwei Richtungen. [84, 85]

6 Zielsetzung

Für die Dezellularisierung von biologischem Gewebe existieren bereits eine Vielzahl von Dezellularisierungsprotokollen. Konstant erfolgreiche Dezellularisierungsergebnisse konnten bislang jedoch nicht erzielt werden. [19-21] Ein Fokus dieser Arbeit lag auf der Untersuchung der gekühlten Lagerung vor der Dezellularisierung auf die Gewebebeschaffenheit nach der Dezellularisierung. Die verzögerungsfreie Verarbeitung des Gewebes nach der Schlachtung stellt häufig ein logistisches Problem dar. Nach der Schlachtung treten jedoch autolytische Prozesse ein, welche sich mit zunehmender Dauer negativ auf die Gewebebeschaffenheit auswirken können. Durch eine Kühlung der Proben können diese Prozesse bis zu einem gewissen Grad verzögert werden, weshalb die gekühlte Lagerung als Alternative zur direkten Verarbeitung untersucht wurde. [61, 67, 68] In bereits veröffentlichten Studien an Nierengewebe konnte gezeigt werden, dass die Dezellularisierungstemperatur einen Einfluss auf die Dezellularisierung und den Erhalt der EZM hat. [86, 87] Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des Einflusses der Dezellularisierungstemperatur auf die Dezellularisierung von bovinem Perikard, welches aufgrund seiner Gewebeeigenschaften häufig im kardiovaskulären Bereich eingesetzt wird. [12-16] Es sollte zudem ein Temperaturoptimum für das von uns verwendete Dezellularisierungsprotokoll definiert werden.

Diese Arbeit gliedert sich in zwei separat durchgeführte Experimente. Das erste Experiment E_I diente der Untersuchung der gekühlten Lagerung auf die Gewebebeschaffenheit nach der Dezellularisierung und der Untersuchung des Einflusses der Temperatur auf die Dezellularisierung und den Erhalt der EZM. Im zweiten Experiment E_{II} sollte die Definition eines Temperaturoptimums für das von uns verwendete Dezellularisierungsprotokoll erfolgen. Zudem wurden weitere Gewebeeigenschaften der Perikarde und deren Einfluss auf die Dezellularisierung untersucht.

7 Material und Methoden

7.1 Materialvorbereitung

In dieser Arbeit wurden Rinderperikarde verwendet. Diese stammten aus dem lokalen Schlachtbetrieb „Münchner Schlachthof Betriebs GmbH“. Nach der Schlachtung erfolgte der verzögerungsfreie Transport zur Weiterverarbeitung in das Labor der Herzchirurgischen Klinik und Poliklinik. Die Transportzeit betrug dabei im Maximum 30 Minuten. Im Labor wurde sichergestellt, dass die Perikarde unbeschädigt und frei von pathologischen Veränderungen waren. Im Anschluss erfolgte die Präparation der Perikarde. Anhaftendes Fett- und Fasergewebe musste schonend vom Perikard getrennt werden. Dafür wurden sterile Pinzetten und Mullkompressen (Gazin Mullkompressen 7,5 x 7,5 cm, Lohmann & Rauscher GmbH & Co. KG, Neuwied, Deutschland) verwendet. Die Probenentnahme erfolgte anhand definierter Kriterien. Die Proben waren aneinander angrenzend und in ihrer Struktur und Dicke vergleichbar. Der Entnahmebereich lag dabei außerhalb der Umschlaglinien im dorsalen Bereich des Perikards (siehe Abb. 4). In E_I erfolgte die Entnahme von zwei 10 x 10 cm großen Proben je Perikard. In E_{II} wurden pro Perikard insgesamt vier 10 x 3 cm große Proben entnommen. Bis zur weiteren Verarbeitung erfolgte die Zwischenlagerung der Proben in PBS (PBS, Apotheke Klinikum der Universität München, München, Deutschland), um Austrocknungen zu verhindern.

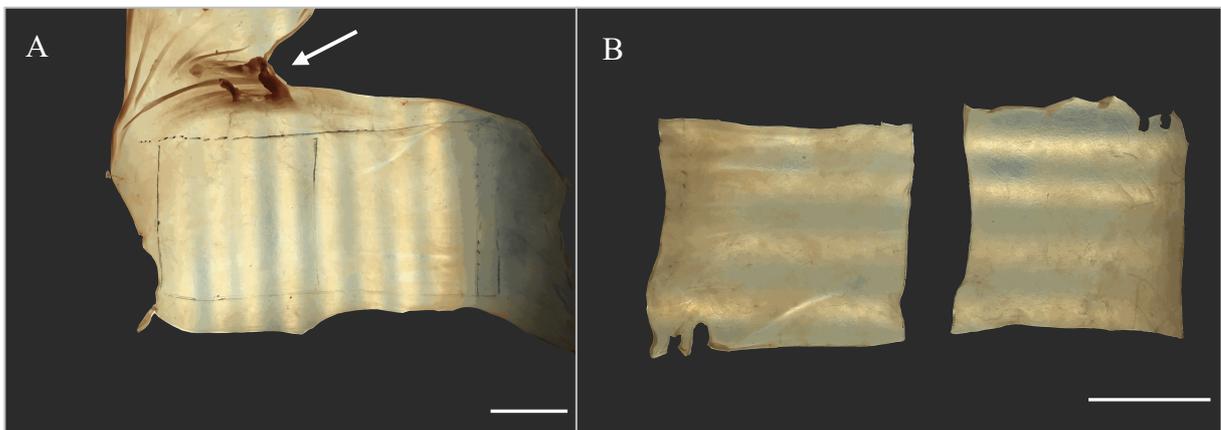


Abb. 4 Probenentnahme

(A) Präpariertes Perikard frei von Fett- und Fasergewebe. In E_I wurden aus einem Perikard zwei 10 x 10 cm große Proben entnommen. Diese waren aneinander angrenzend. Die Entnahmestelle lag außerhalb der Umschlagfalten im dorsalen Bereich des Perikards (Pfeil). (B) Vorbereitete Proben mit vergleichbarer Struktur und Dicke.

Maßstabsbalken = 5 cm.

7.2 Lagerung

Die Dezellularisierung der Proben der Gruppe E_II erfolgte am Schlachtungstag. Bis zum Dezellularisierungsbeginn wurden die Proben für drei Stunden bei Raumtemperatur in PBS aufbewahrt. Die Proben der Gruppe E_IS wurden zunächst für 24 Stunden bei 4°C in PBS zwischengelagert. Die Dezellularisierung erfolgte am Folgetag.

7.3 Dezellularisierung

7.3.1 Versuchsaufbau

Für den Versuchsaufbau wurde ein Inkubationsbehältnis (Duran GLS 80 Laborflasche Weithals 1000 mL, DWK Life Science GmbH, Wertheim/Main, Deutschland), sowie ein Flüssigkeitsreservoir (Duran Becher mit Ausguss 3000 mL, DWK Life Science GmbH) verwendet (siehe Abb. 5). Beide Gefäße standen über drahtverstärkte Schläuche miteinander in Verbindung. Mit Hilfe eines Anschluss-Systems (Duran GLS 80 Anschluss-System, DWK Life Science GmbH) konnte das Inkubationsbehältnis fest mit den Schläuchen verbunden werden. Mit Hilfe einer Tauchkreiselpumpe (10 l/min; Eden Aquariumpumpe 114-11 W, PFG GmbH, Hörstel, Deutschland) erfolgte der Aufbau eines kontinuierlichen Flusses zwischen dem Flüssigkeitsreservoir und dem Inkubationsbehältnis. Die Proben wurden vor Beginn der Dezellularisierung mit sterilem chirurgischem Nahtmaterial (Prolene-Nahtmaterial 5-0, 90 cm, Johnson & Johnson Medical GmbH, Ethicon Deutschland, Norderstedt, Deutschland) an eine speziell für diesen Versuchsaufbau konstruierte Vorrichtung (siehe Abb. 5C) im Inkubationsbehältnis angenäht. Diese verhinderte ein Ansaugen der Perikarde durch die Pumpe und ermöglichte gleichzeitig die Beweglichkeit der Perikarde.

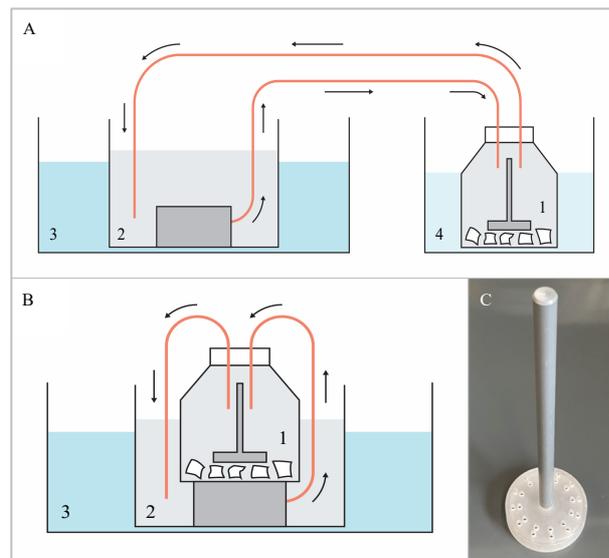


Abb. 5 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus

(A) Versuchsaufbau während der Ultraschallbehandlung. Zwischen dem Inkubationsbehälter (1) und dem Flüssigkeitsreservoir (2) wurde ein Flüssigkeitskreislauf aufgebaut. Die Proben im Inkubationsbehälter wurden so mit einem kontinuierlichen Fluss von 10 l/min. von der Detergenzlösung umspült. Das Flüssigkeitsreservoir befand sich zur Temperierung der Detergenzlösung während des gesamten Dezellarisierungsprozesses im Kälte-/Wärmebad (3). Das Inkubationsbehälter stand im Ultraschallbad (4). (B) Versuchsaufbau während den Dezellarisierungs- und Waschphasen ohne Ultraschallbehandlung. (C) Vorrichtung zur Fixierung der Proben im Inkubationsbehälter. Vor Beginn der Dezellarisierung wurden die Proben mit chirurgischem Nahtmaterial an den Löchern der Vorrichtung festgenäht. Durch die Fixierung konnte ein Ansaugen der Perikarde durch die Pumpe verhindert werden, gleichzeitig wurde die Beweglichkeit der Perikarde gewährleistet.

Temperaturregulation. Um die Dezellarisierungstemperatur während des Prozesses konstant zu halten, wurden zwei unterschiedliche Verfahren verwendet. Abhängig von der jeweiligen Dezellarisierungstemperatur musste die Detergenzlösung in Bezug zur Raumtemperatur entweder gekühlt oder erhitzt werden. Für die Dezellarisierungstemperaturen 4°C, 13°C und 21°C wurde ein Kältebad aufgebaut. Dieses setzte sich aus einem Wasserbad und einem zusätzlichen Reservoir, welches mit einem Eis-Wasser-Gemisch gefüllt war, zusammen. Die Temperatur im Wasserbad wurde konstant gehalten, indem kaltes Wasser aus dem mit dem Eis-Wasser-Gemisch gefüllten Reservoir kontrolliert dem Wasserbad zugeführt wurde. Das Wasserbad und das Reservoir für das Eis-Wasser-Gemisch bestanden zur besseren Isolierung aus Styroporboxen. Beide Boxen standen über zwei Schläuche miteinander in Verbindung. Einer der Schläuche wurde mit einer Tauchkreiselpumpe gekoppelt, welche sich im Reservoir mit dem Eis-Wasser-Gemisch befand

und so kaltes Wasser in das Wasserbad pumpen konnte. Der zweite Schlauch diente dem passiven Rückfluss. Ein Temperatursensor registrierte kontinuierlich die Temperatur des Detergenz im Inkubationsbehältnis. Stieg diese über die geforderte Dezellularisierungstemperatur, startete die Pumpe. Dadurch wurde 0°C kaltes Wasser in das Wasserbad gepumpt. Die Pumpe war so lange aktiv, bis die Detergenzlösung wieder die geforderte Temperatur erreichte. Bei den Dezellularisierungstemperaturen 29°C, 37°C und 56°C wurde ein handelsübliches Wasserbad (Wasserbad, SW22, 18- 99,9°C, $\pm 0,2^\circ\text{C}$, Julabo GmbH, Seelbach, Deutschland) verwendet, wobei das Inkubationsbehältnis und das Flüssigkeitsreservoir im Wasserbad platziert wurden. Es erfolgte die regelmäßige Kontrolle der Temperatur der Detergenzlösung mit Hilfe eines Thermometers (Allgebrauchs-Rührthermometer, Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland). Bei beiden Verfahren wurde eine Abweichung von $\pm 1^\circ\text{C}$ von der geforderten Dezellularisierungstemperatur toleriert.

7.3.2 Dezellularisierungsprotokoll

Das verwendete Dezellularisierungsprotokoll für bovines Perikard basierte auf einem bereits etablierten Protokoll für die Dezellularisierung von porcinen Aortenklappen. [88] Ein Dezellularisierungsdurchlauf dauerte insgesamt 18,5 Stunden (siehe Abb. 6). Dieser untergliederte sich in zwei Dezellularisierungsphasen und einer anschließenden Waschphase. Die erste Dezellularisierungsphase dauerte insgesamt vier Stunden, die zweite 12 Stunden. Dazwischen erfolgte ein Wechsel der Detergenzlösung. Als Detergenzien wurden Natriumdodecylsulfat, SDS, (SDS- Pellets $\geq 99,5\%$, Carl Roth GmbH und Co. KG) und Natriumdeoxycholat, SD, (Natrium deoxycholat BioXtra $\geq 98,0\%$, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland,) verwendet, welche in 0,5%iger Konzentration eingesetzt wurden.

Die Proben wurden mit einem kontinuierlichen Fluss von zehn Litern pro Minute von der Detergenzlösung umströmt. Jeweils in den ersten 30 Minuten jeder Dezellularisierungsphase erfolgte eine zusätzliche Behandlung im Ultraschallbad (Ultraschall- Reinigungsgerät USC600T 120 W, 45 kHz, VWR International GmbH, Darmstadt, Germany). Im Anschluss an die Dezellularisierungsphase folgte eine zweieinhalbstündige Waschphase mit PBS. Diese setzte sich aus zehn Waschzyklen à 15 Minuten zusammen, wobei das PBS zwischen jedem Waschzyklus ausgetauscht wurde.

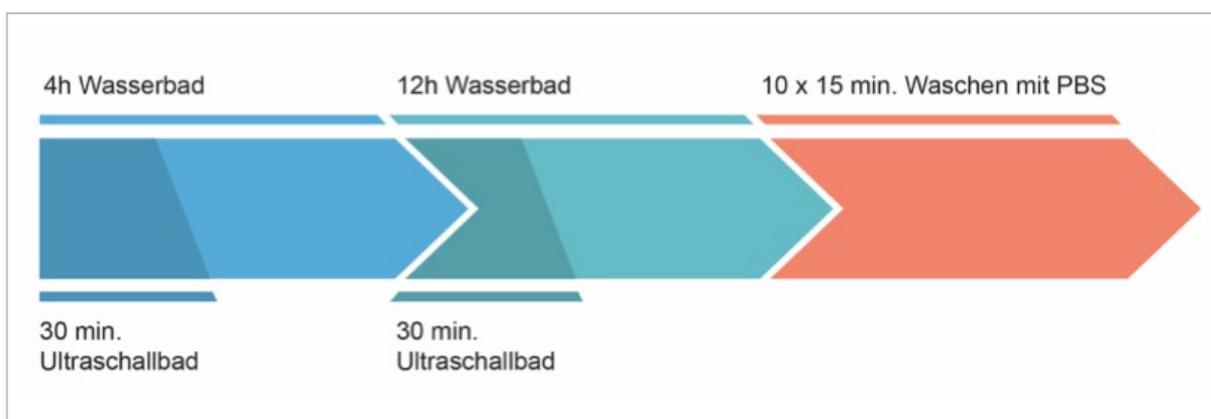


Abb. 6 Schematische Darstellung des Dezellularisierungsprotokolls

Das Dezellularisierungsprotokoll untergliederte sich in zwei Dezellularisierungsphasen und einer Waschphase. Die erste Dezellularisierungsphase dauerte 4 h, die zweite 12 h. Dazwischen erfolgte ein Wechsel der Detergenzlösung. Jeweils in den ersten 30 min. nach Beginn der Dezellularisierungsphase erfolgte zusätzlich eine Behandlung im Ultraschallbad. Die anschließende Waschphase mit PBS dauerte insgesamt 2,5 h und bestand aus 10 Waschzyklen à 15 min. Die PBS wurde zwischen jedem Waschzyklus ausgetauscht.

7.3.3 Versuchsgruppen

In E_1 erfolgte die Aufteilung in die zwei Gruppen E_{1I} und E_{1S} . Die beiden Proben eines Perikardes wurden dabei per Zufallsprinzip auf die beiden Gruppen aufgeteilt. Die Dezellularisierung der Proben aus E_{1I} erfolgte am Schlachtungstag. Das „I“ steht dabei für „Instant“ und beschreibt die direkte Dezellularisierung des Gewebes. Die Proben der Gruppe E_{1S} wurden am Folgetag, nach der 24-stündigen Lagerung bei 4°C , dezellularisiert. Das „S“ steht hier für „Storage“. Die Dezellularisierung beider Gruppen erfolgte bei der gleichen Dezellularisierungstemperatur. Insgesamt wurden sechs Dezellularisierungstemperaturen untersucht, wobei pro Temperatur fünf Perikarde verwendet wurden (siehe Abb. 7).

Als Unter- und Obergrenze wurden 4°C und 37°C verwendet, welche aus bereits veröffentlichten Studien übernommen wurden. [86, 87] Zur Ermittlung einer Abhängigkeitskurve legten wir drei weitere Temperaturen fest. Dadurch ergaben sich die Temperaturen 13°C , 21°C und 29°C mit Temperaturabständen von jeweils $8^\circ\text{C}/9^\circ\text{C}$. Es erfolgte zusätzlich in beiden Gruppen die Dezellularisierung bei 56°C , um eine bewusste Denaturierung des Gewebes zu provozieren. Die Dezellularisierung bei 13°C erfolgte zwei Mal, da nach der ersten Durchführung Auffälligkeiten am Gewebe festgestellt wurden. Zur Untersuchung, ob diese Auffälligkeiten temperaturbedingt auftraten, wurde die Dezellularisierung wiederholt. Der erste Dezellularisierungsdurchlauf wurde als $13^\circ\text{C}'$ bezeichnet.

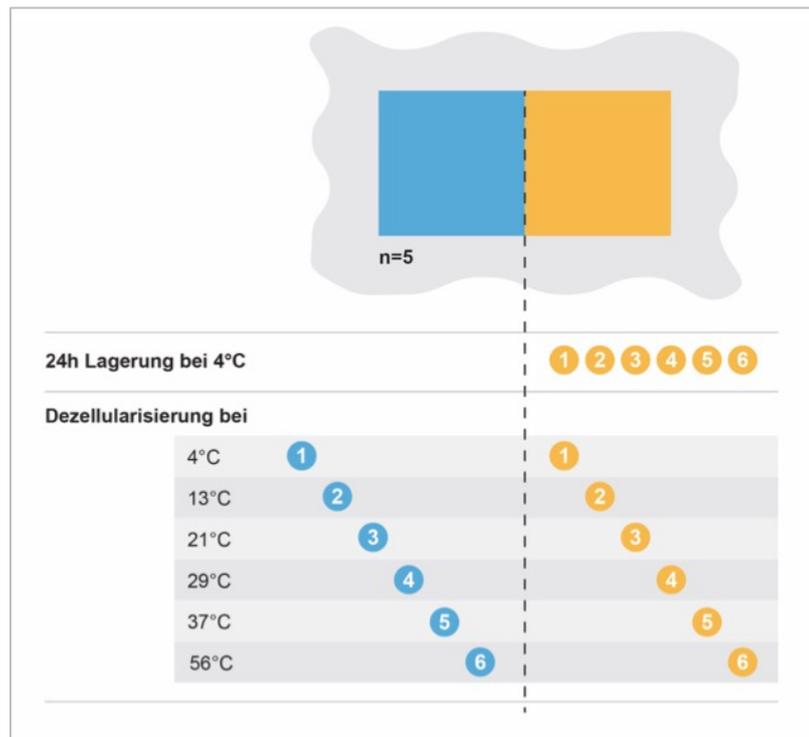


Abb. 7 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus in E₁

Die beiden Proben eines Perikardes wurden per Zufallsprinzip auf die beiden Gruppen E_{1I} und E_{1S} aufgeteilt. Die Dezellularisierung der Proben aus E_{1I} erfolgte am Schlachtungstag, die Dezellularisierung der Proben aus E_{1S} am Folgetag, nach der Lagerung der Proben für 24 h bei 4°C. Die Dezellularisierungen beider Gruppen erfolgten bei der gleichen Dezellularisierungstemperatur. Insgesamt wurden sechs Temperaturen untersucht: 4°C, 13°C, 21°C, 29°C, 37°C und 56°C. Pro Dezellularisierungstemperatur wurden fünf Perikarde verwendet.

In E_{1II} entnahmen wir aus einem Perikard vier Proben, welche per Zufallsprinzip auf drei Dezellularisierungstemperaturen und eine Kontrollgruppe aufgeteilt wurden. Insgesamt verwendeten wir fünf Perikarde. Die drei Dezellularisierungen erfolgten zeitgleich am Schlachtungstag. Verwendet wurden die Dezellularisierungstemperaturen 21°C und 29°C aus E_{1I}. Zudem konnte das Temperaturintervall auf 4°C reduziert werden, wodurch sich eine zusätzliche Dezellularisierungstemperatur bei 25°C ergab (siehe Abb. 8)

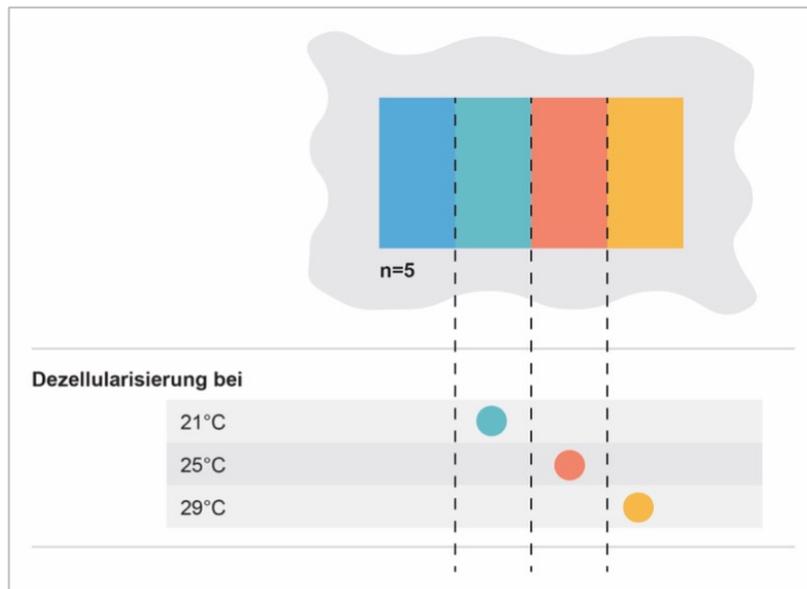


Abb. 8 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus in EII

Aus einem Perikard wurden insgesamt vier Proben entnommen, welche per Zufallsprinzip auf die drei Dezellularisierungstemperaturen 21°C, 25°C und 29°C und eine Kontrollgruppe aufgeteilt wurden. Die drei Dezellularisierungen fanden zeitgleich und am Schlachtungstag statt.

7.4 Analysemethoden

7.4.1 Biometrie

Makroskopisch sichtbare Veränderungen der Proben können einen ersten Hinweis auf eine Schädigung der EZM durch den Dezellularisierungsprozess geben. Zur Erfassung morphologischer Veränderungen wurden die Maße der einzelnen Proben vor und nach der Dezellularisierung erhoben.

Die Messung der Materialdicken erfolgte an den fixierten Proben. Hierfür wurden die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der DAPI-Färbung verwendet. Mit der Computersoftware AxioVision (AxioVision, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) konnte durch das Werkzeug „Längenmessung“ die Dicke der Gewebeschnitte gemessen werden. Pro Probe wurden drei Werte an unterschiedlichen Stellen des Schnittes erhoben, aus welchen ein Mittelwert gebildet wurde. Verfälschungen durch punktuelle Strukturveränderungen konnten dadurch vermieden werden. In E_I erfolgte zudem die Messung der Längen und Breiten der Proben. Hierfür wurden die Außenkanten der Proben mit einem handelsüblichen Lineal vermessen.

7.4.2 Histologie

Histologie heißt aus dem altgriechischen übersetzt die „Lehre der Gewebe“ oder „Gewebelehre“. Sie befasst sich mit der Zusammensetzung verschiedener Gewebe und der mikroskopischen Anatomie der Organe. Dabei bedient sich die Histologie unterschiedlichster Färbemethoden, um Zell- oder Gewebestandteile unter dem Mikroskop gezielt darstellen zu können. Diese binden sich an definierte Gewebestrukturen und erzeugen dadurch kontrastreiche Schnittpräparate. [89, 90]

In dieser Arbeit wurden die 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)-Fluoreszenzfärbung, sowie die Hämatoxylin-Eosin-, die Pikrosirius-Rot- und die Movats-Pentachrom-Färbung verwendet. In der Vorbereitung müssen die Proben zunächst fixiert werden. Dies führt zu einem Stillstand der Zellfunktionen, sowie zu einem möglichst naturgetreuen Erhalt und zu einer Stabilisierung des Gewebes. Fäulnis- und Verwesungsprozesse werden verhindert und es kommt zu einer Härtung des Materials. Etwaig vorhandene Mikroorganismen werden zudem abgetötet. Das Gewebe wird dann durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert. Um feinste Gewebeschnitte anfertigen zu können, erfolgt im Anschluss die Einbettung in Paraffin. Vor der eigentlichen Färbung wird das Paraffin mit dem Lösungsmittel Roti-Histol und einer absteigenden Alkoholreihe wieder entzogen. [90, 91]

Paraffineinbettung. Es wurden 5 x 5 mm große Perikard-Proben entnommen und für 24 Stunden in Formalin 4% (Roti-Histofix 4%, Carl Roth GmbH und Co. KG) gelagert. Die Proben wurden anschließend in Einbettkassetten aus Kunststoff (Lab Logistics Group GmbH, Meckenheim, Deutschland) gegeben. Die Kassetten mussten in Häkalaun (Mayers Häkalaunlösung, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) getaucht werden, bevor sie mit destilliertem Wasser gewaschen und erneut in Formalin gelegt wurden. Das Häkalaun führte zu einer Anfärbung der Probenränder, wodurch die Proben später im Paraffinblock besser sichtbar waren. Die Proben durchliefen im Anschluss eine maschinelle Alkoholreihe. Diese beinhaltete die Inkubation der Proben in Ethanol 70% (Ethanol 70%, CLN GmbH, Langenbach/Niederhummel, Deutschland) für zwei Stunden, die dreimalige Inkubationen in Ethanol 96% (Ethanol 96%, CLN GmbH) für je eine Stunde, sowie die dreimalige Inkubation in Isopropanol (2-Propanol Rotipurán® ≥ 99,8%, Carl Roth GmbH und Co. KG) für je eine Stunde. Es folgte die zweimalige Inkubation in Roti-Histol (Roti-Histol, Carl Roth GmbH und Co. KG) für je eine Stunde. Die Proben wurden vier Mal für je 60 Minuten in Paraffin inkubiert und im Anschluss im Paraffinbad aufbewahrt. Das Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung der LMU München übernahm die Durchführung der maschinellen Alkoholreihe, sowie die Inkubation in Paraffin. Die Proben konnten von uns im Anschluss zu Paraffinblöcken gegossen werden. Dafür platzierten wir die Proben in senkrechter Position in der Gussform. Die

Gussform wurde mit Paraffin aufgefüllt, welches auf Kälteplatten aushärtete. Mit Hilfe eines Mikrotoms (Microm International GmbH, Walldorf, Deutschland) erfolgte die Anfertigung von 7 µm dicken Schnitten transversal durch das Perikard. Nachdem die Schnitte in ein auf 48°C temperiertes Streckbad gelegt wurden, konnten sie auf Objektträgern (Thermo Scientific, Super Frost Ultra Plus®, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland) aufgebracht werden. Diese mussten über Nacht bei 40°C im Wärmeschrank (Präzisions-Wärmeschrank WTB, Fa. Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland) getrocknet werden.

Entparaffinierung. Vor der Entparaffinierung mussten die zu färbenden Objektträger zunächst für 30 Minuten bei 50°C im Wärmeschrank getrocknet werden. Die Objektträger wurden nacheinander für zwei Mal fünfzehn Minuten in Roti-Histol, gefolgt von je zwei Mal fünf Minuten in Ethanol 100% (Ethanol absolute for analysis EMSURE®, Merck KGaA), Ethanol 96% und Ethanol 70% inkubiert. Nachdem die Proben mit destilliertem Wasser und PBS gewaschen wurden, konnten sie im Anschluss gefärbt werden. Das Protokoll zur Entparaffinierung wurde im Anhang hinterlegt (siehe Anhang, Tab. 6).

4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)-Fluoreszenzfärbung. DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, welcher spezifisch DNA anfärbt. Er bindet bevorzugt an Adenin- und Thymin-reiche Regionen in der kleinen Furche der DNA-Doppelhelix. Ultraviolette Strahlung im Fluoreszenzmikroskop führt zu einer Anregung des Farbstoffes. In Verbindung mit doppelsträngiger DNA besitzt DAPI ein Emissionsmaximum von 448 nm und fluoresziert damit im blauen Spektrum des sichtbaren Lichts. RNA ist ebenso in der Lage Komplexe mit DAPI zu bilden, wobei die Fluoreszenz deutlich schwächer ist als in der Bindung mit doppelsträngiger DNA. Lipofuszin besitzt eine starke Eigenfluoreszenz, welche das Spektrum der DAPI-Fluoreszenz überlappt. Es entsteht durch oxidativen Stress als Abfallprodukt von Proteinen und Lipiden und reichert sich mit höherem Alter im Gewebe an. Die Behandlung mit Sudanschwarz führt zu einer Reduktion dieser Autofluoreszenz von Lipofuszin. [90, 92-94]

Zur Visualisierung persistierender DNA wurden die entparaffinierten Gewebeschnitte in der DAPI-Lösung (4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, c= 0,1 µg/ml in PBS, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) inkubiert (siehe Anhang, Tab. 7). Die Inkubationszeit betrug fünf Minuten und erfolgte unter Lichtabschirmung. Reste der Lösung wurden mit PBS entfernt. Um Hintergrundfluoreszenz zu minimieren, erfolgte eine zweite Färbung in einem Gemisch aus Sudanschwarz 0,3% (Sudanschwarz B, Carl Roth GmbH und Co. KG) in Ethanol 70%, ebenfalls unter Lichtabschirmung. Die Lösung konnte nach zwei Minuten mit destilliertem Wasser abgewaschen werden. Die Objektträger wurden anschließend mit einem Fluoreszenz-Eindeckmedium (ibidi Mounting Medium, ibidi GmbH, Martinsried, Deutschland) und Deckgläsern (Deckgläser, 24 x 50 mm, Carl Roth GmbH und Co. KG) eingedeckt.

Die gefärbten Schnitte wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop (AxioObserver, Carl Zeiss AG) ausgewertet. Dafür erstellten wir repräsentative Bilder mit einer hundertfachen Vergrößerung und einer Belichtungszeit von 100 ms. Zur Quantifizierung der Dezellularisierungseffektivität konnten wir mit der AxioVision Mikroskopsoftware die dezellularisierten Bereiche der Innen- und Außenseiten der Proben messen (siehe Abb. 9). Dezellularisierte Bereiche wiesen kein Fluoreszenzsignal in der EZM auf. Die dezellularisierten Bereiche der Innen- und Außenseiten wurden ins Verhältnis zur Probendicke der jeweiligen Stelle gesetzt. Daraus errechnete sich die relative Dezellularisierung der Probe, welche als Dezellularisierungseffektivität bezeichnet wurde. Diese wurde pro Probe an drei Stellen bestimmt. Der Mittelwert entsprach der Dezellularisierungseffektivität der Probe.

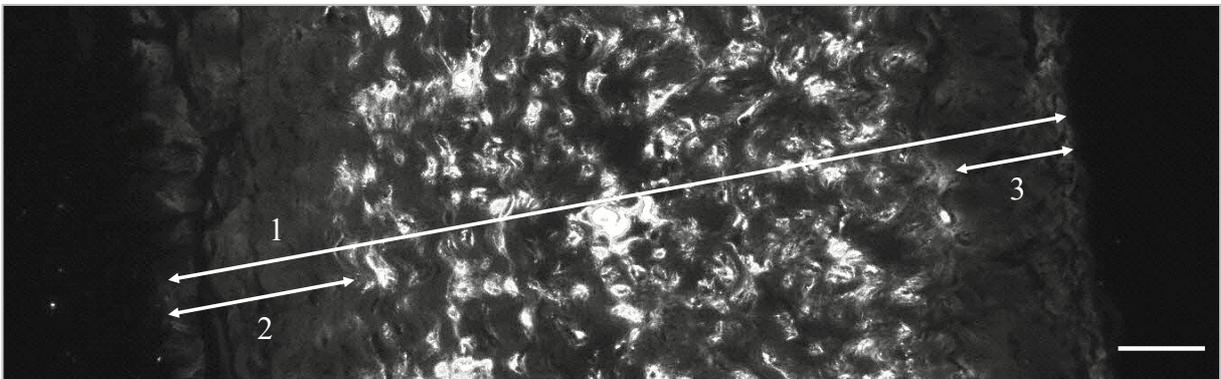


Abb. 9 Bestimmung der Dezellularisierungseffektivität

Mit dem DAPI-Fluoreszenzfarbstoff wurde persistierende DNA in der Probe nach der Dezellularisierung dargestellt. Zur Quantifizierung der Dezellularisierungseffektivität wurden die dezellulierten Bereiche der Innen- (3) und Außenseite (2) der Proben gemessen. Diese wurde ins Verhältnis zur Probendicke (1) der jeweiligen Stelle gesetzt. Daraus errechnete sich die Dezellularisierungseffektivität. Pro Probe wurde die Dezellularisierungseffektivität an drei Stellen gemessen und ein Mittelwert gebildet.

Maßstabsbalken = 100 μ m.

In E_{II} erfolgte zusätzlich eine Zellkerndichtemessung. Dafür wurden pro Probe drei 300 x 300 Pixel große repräsentative Ausschnitte aus dem Inneren der Probe ausgewählt. Die Zellzahl konnte manuell mit der Computersoftware Image J gezählt werden. Eine automatisierte Zählung war aufgrund einer mangelnden Erkennung der Zellkerngrenzen nicht möglich. Die Zellkerndichten wurden für die Nativproben und die dezellulierten Proben erhoben.

Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung dient als Übersichtsfärbung. Sie besteht aus dem natürlichen Farbstoff Hämatoxylin und dem synthetischen Farbstoff Eosin.

Ersterer wird in der basischen Form, dem Hämalaun, verwendet. Es besitzt eine blaue Farbe und färbt saure Strukturen in einer bisher noch nicht vollständig verstandenen Reaktion an. Dadurch erscheinen Nukleinsäuren, Zellkerne, sowie das raue Endoplasmatische Retikulum blau. Eosin ist ein negativ geladenes, saures Färbemittel. Azidophile Strukturen werden rot angefärbt. Dazu gehören das Zytoplasma, sowie die Extrazelluläre Matrix. [90, 95, 96]

Die entparaffinierten Gewebeschnitte wurden zunächst für fünf Minuten in Hämalaun angefärbt. Danach erfolgten kurze Waschschriffe mit Leitungswasser und Ethanol 70% zur Entfernung übriger Farbe. Die Objektträger wurden dabei unter fließendem Leitungswasser abgespült, anschließend für fünf Minuten in lauwarmem Leitungswasser inkubiert und dreimalig in Ethanol 70% getaucht. Es folgte die Färbung der Schnitte mit Eosin für zwei Minuten (Eosin Y Lösung alkoholisch, Sigma-Aldrich Chemie GmbH). Bevor die Objektträger mit Eindeckmedium (Leica CV Mount, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland) und Deckgläsern manuell eingedeckt werden konnten, mussten sie zuvor nochmals gereinigt werden. Dies erfolgte durch viermaliges Eintauchen in Ethanol 70%, zehnmaliges Eintauchen in Ethanol 96%, die Inkubation in Ethanol 100% für zwei Mal fünf Minuten und zweimaliges Eintauchen in Roti-Histol. Das Färbeprotokoll mit genauen Zeitangaben wurde im Anhang hinterlegt (siehe Anhang, Tab. 8).

Mit dem Lichtmikroskop (Leica DMR Lichtmikroskop, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) wurden Bilder in hundert- und zweihundertfacher Vergrößerung aufgenommen. Die Analyse erfolgte semiquantitativ anhand eines Scores. Bewertet wurde die strukturelle Beschaffenheit der Innen- und Außenseiten der Proben. Anhand definierter Kriterien wurden Punkte vergeben. Bei der Beurteilung der Innenseiten legten wir den Fokus auf die Durchgängigkeit der Basalmembran: Durchgängige Basalmembran = 2 Punkte, vereinzelte Risse in der Basalmembran = 1 Punkt, unterbrochene Basalmembran = 0 Punkte. Die Außenseiten bewerteten wir anhand der Kompaktheit der EZM. Dabei wurden ebenfalls drei Abstufungen vorgenommen: Kompakte EZM = 2 Punkte, leichtgradig aufgelockerte EZM mit vereinzelten Lücken in der EZM = 1 Punkt, stark aufgelockerte EZM mit deutlichen Lücken in der EZM = 0 Punkte (siehe Abb. 10). Der Score errechnete sich durch die Subtraktion des Punktwertes der nativen Probe vom Punktwert der dazugehörigen dezellularisierten Probe. Für jede Probe berechneten wir einen Score-Wert. Aus den Score-Werten einer Dezellularisierungstemperatur wurde der Mittelwert gebildet. Je höher der gemittelte Score, desto weniger wurden die Proben durch den Prozess beschädigt.

$$\text{Score-Wert} = \text{Punktwert (dezell.)} - \text{Punktwert (nativ)}$$

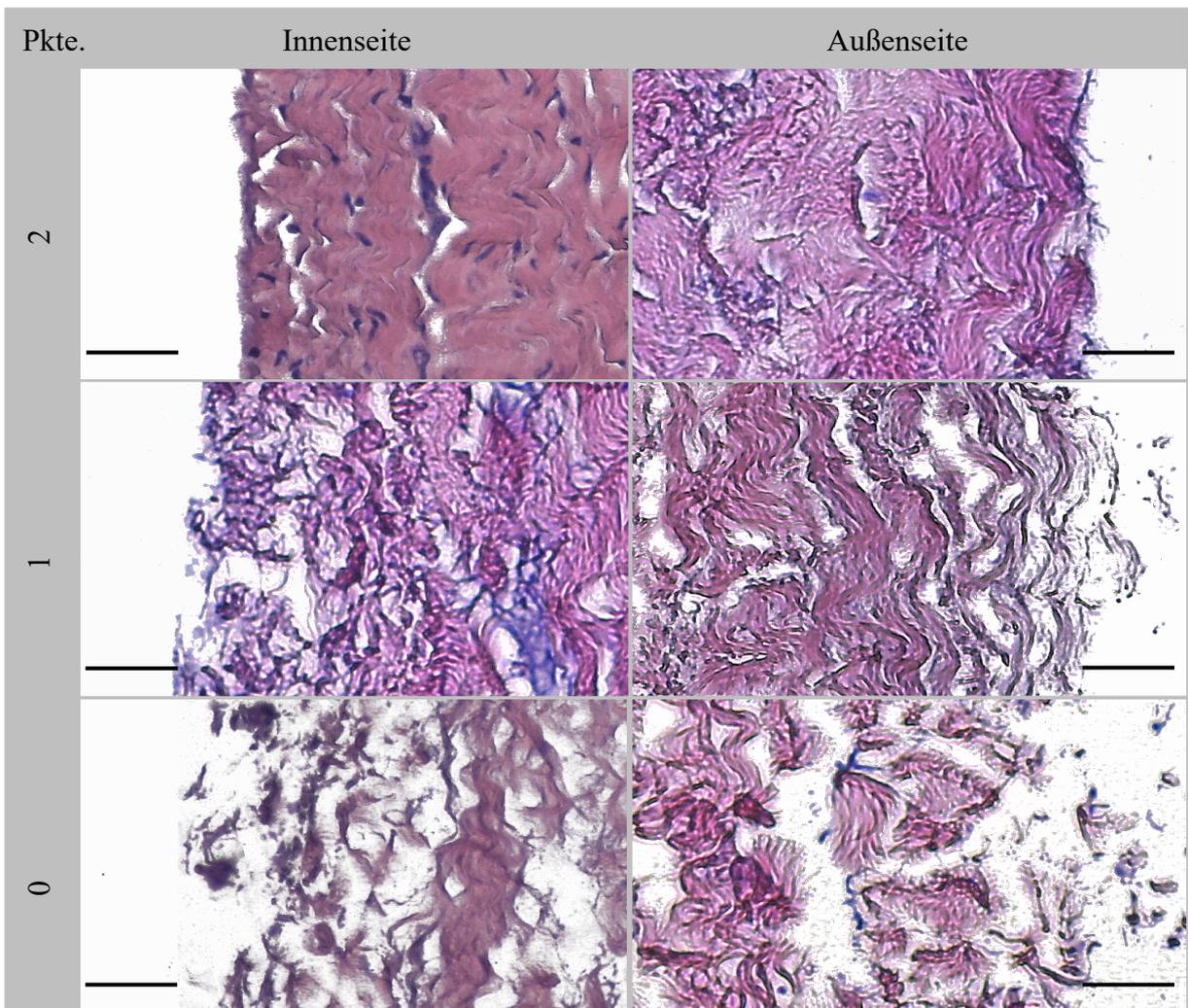


Abb. 10 Kriterien für die Bewertung der strukturellen Beschaffenheit in der H.E.-Färbung

Bewertet wurden die Innen- und Außenseite jeder Probe. Bei der Bewertung der Innenseite legten wir den Fokus auf die Durchgängigkeit der Basalmembran: durchgängige Basalmembran = 2 Punkte, vereinzelte Risse in der Basalmembran = 1 Punkt, unterbrochene Basalmembran = 0 Punkte. Bei den Außenseiten wurde auf die Kompaktheit der EZM geachtet: kompakte EZM = 2 Punkte, leichtgradig aufgelockerte EZM mit vereinzelten Lücken in der EZM = 1 Punkt, stark aufgelockerte EZM mit deutlichen Lücken in der EZM = 0 Punkte. Maßstabsbalken = 50 µm.

Pikrosirius-Rot-Färbung. Die Pikrosirius-Rot-Färbung ist ein Verfahren zur Darstellung von Kollagen in Gewebeschnitten. Sie ermöglicht eine Visualisierung der Verteilung und Orientierung von Kollagenfasern, sowie eine Bestimmung des Kollagengehalts. Bei Exposition des Kollagens mit polarisiertem Licht kommt es zu einer Doppelbrechung. Diese wird durch

die Bindung des Sirius-Rot-Farbstoff an das Kollagen verstärkt. Kollagenfasern vom Typ I erscheinen orange- gelb, dünnere Fasern vom Typ III erscheinen grün. [83, 97-100]

Die getrockneten Objektträger wurden mit einer wie folgt modifizierten, absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert. Sie beinhaltete Inkubationsschritte in Roti-Histol für zwei Mal 10 Minuten und Ethanol 96%, 80% (Ethanol 80%, CLN GmbH), 70% und 60% (Ethanol 60% mit MEK vergällt, Apotheke Klinikum der Universität München) für jeweils vier Minuten. Im Anschluss erfolgte die Färbung für acht Minuten mit Eisenhämatoxylin (Weigert Stammlösung A : Weigert Stammlösung B im Verhältnis 1:1, Morphisto GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland). Es folgten Waschschrte mit destilliertem Wasser für fünf Sekunden, Leitungswasser für zehn Minuten und erneut destilliertem Wasser für eine Minute. Danach wurden die Schnitte für 60 Minuten mit Pikrosirius-Rot (Pikro-Siriusrot-Lösung, Morphisto GmbH) gefärbt. Übrige Pikrosirius-Rot-Farbe wurde mit der Inkubation in Essigsäure 30% (Essigsäure 30%, Morphisto GmbH) für zwei Mal eine Minute entfernt. Bevor die Objektträger mit Eindeckmedium und Deckgläsern manuell eingedeckt werden konnten, mussten sie zuvor zweimalig für vier Minuten mit Ethanol 96%, einmalig für vier Minuten mit Isopropanol und zwei Mal zehn Minuten mit Roti-Histol entwässert werden. Das Färbeprotokoll mit genauen Zeitangaben wurde im Anhang hinterlegt (siehe Anhang, Tab. 9).

Mit dem Lichtmikroskop und einem Polarisationsfilter wurden in hundert- und zweihundertfacher Vergrößerung Bilder erstellt. Die Aufnahmeparameter wurden im Vorfeld definiert. Diese mussten abhängig vom Gewebe, der histologischen Färbung und dem Polarisationsfilter einmalig an die zu untersuchende Fragestellung angepasst werden. [100] Bei hundertfacher Vergrößerung wurde eine Belichtungszeit von 110 ms, bei zweihundertfacher Vergrößerung eine Belichtungszeit von 250 ms verwendet. Alle Bilder wurden mit denselben Aufnahmeparametern aufgenommen.

Die verwendete Analysemethode wurde an bereits beschriebene Verfahren zur Quantifizierung des relativen Kollagengehalts mit der Pikrosirius-Rot-Färbung angelehnt. [98, 99] Es eignet sich dabei speziell für den Vergleich von unbehandelten mit behandelten Proben. Die Analyse basiert auf dem Zusammenhang des Kollagengehalts mit der Doppelbrechung des Kollagens und der Helligkeit der gefärbten Probe. Veränderungen im Kollagengehalt können durch Veränderungen in der Helligkeit gemessen werden. Für die quantitative Auswertung wurde das Computerprogramm Image J verwendet. Dabei wurde das Verfahren zu Intensitätsmessung mittels Image J von der Eberhard Karls Universität Tübingen an unsere Fragestellung angepasst. [101] Zunächst wählten wir pro Bild drei Rechtecke mit einer Größe von 200 x 500 Pixeln aus. Zur Vergleichbarkeit waren die Rechtecke in jeder Probe mit ihrer kurzen Seite an die Basalmembran des Perikards angrenzend. Die Größe des Rechtecks wurde so festgelegt,

dass es bis ins Innere des Perikardes reichte und die Auswertung somit die äußeren und inneren Bereiche der Probe abbildete (siehe Abb. 11). Angefärbtes Kollagen stellte sich in den Proben hell dar. Um den Kollagengehalt zu messen, musste daher die Anzahl der hellen Pixel gezählt werden. Die Helligkeit wird mit Werten zwischen 0 und 255 definiert. Wir werteten Pixel ab einer Helligkeit von 60 als hell. Die Definition diese Helligkeitsgrenze (*Brightness-Threshold*) erfolgte experimentell. Dabei testeten wir unterschiedliche Helligkeitsgrenzen. Die Grenze wurde so festgelegt, dass alle visuell hellen Areale vom Programm erfasst wurden (siehe Abb. 12). Die Anzahl der hellen Pixel entsprach dem absoluten Kollagengehalt im Rechteck (*Area*). Um den relativen Kollagengehalt des Rechtecks zu berechnen, wurde die Anzahl heller Pixel ins Verhältnis zur Gesamtzahl der Pixel im Rechteck gesetzt. Um Veränderung durch die Dezellularisierung zu untersuchen, berechneten wir den Quotienten aus dem relativen Kollagengehalt der dezellularisierten Probe und dem relativen Kollagengehalt der dazugehörigen Nativprobe. Bei einem Wert von 1 kam es zu keiner Veränderung durch die Dezellularisierung, bei Werten < 1 zu einer Abnahme, bei Werten > 1 zu einer Zunahme des relativen Kollagengehalts (siehe Abb. 13). In E_{II} wurde zur Untersuchung der Gewebeeigenschaften zusätzlich der relative Kollagengehalt der nativen Perikarde miteinander verglichen.

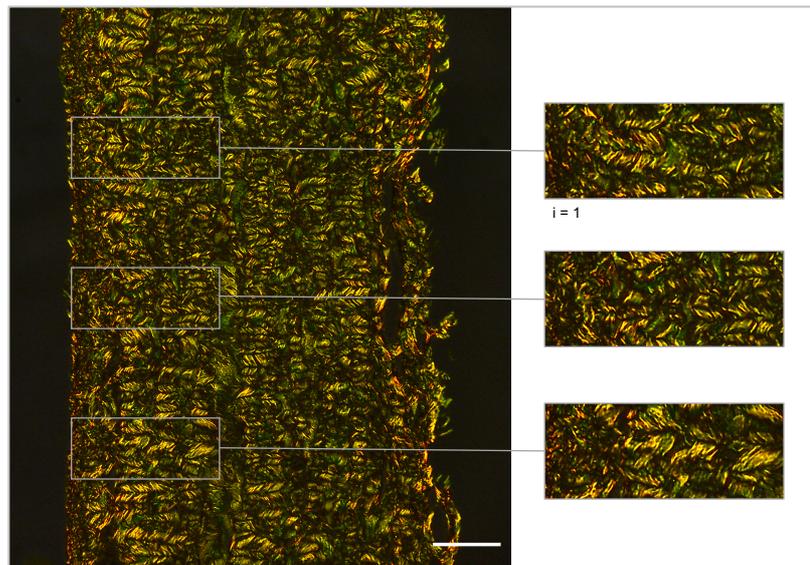


Abb. 11 Entnahme von drei repräsentativen Bereichen pro Probe

Pro Probe wurden drei repräsentative Rechtecke i mit einer Größe von 200×500 Pixeln ausgewählt. Zur Vergleichbarkeit waren die Rechtecke in jeder Probe mit ihrer kurzen Seite an die Basalmembran des Perikards angrenzend. Die Größe des Rechtecks wurde so festgelegt, dass es bis ins Innere des Perikardes reichte und die Auswertung somit die äußeren und inneren Bereiche der Probe abbildete. Aus dem relativen Kollagengehalt der drei Rechtecke wurde ein Mittelwert gebildet. Maßstabsbalken = $100 \mu\text{m}$.

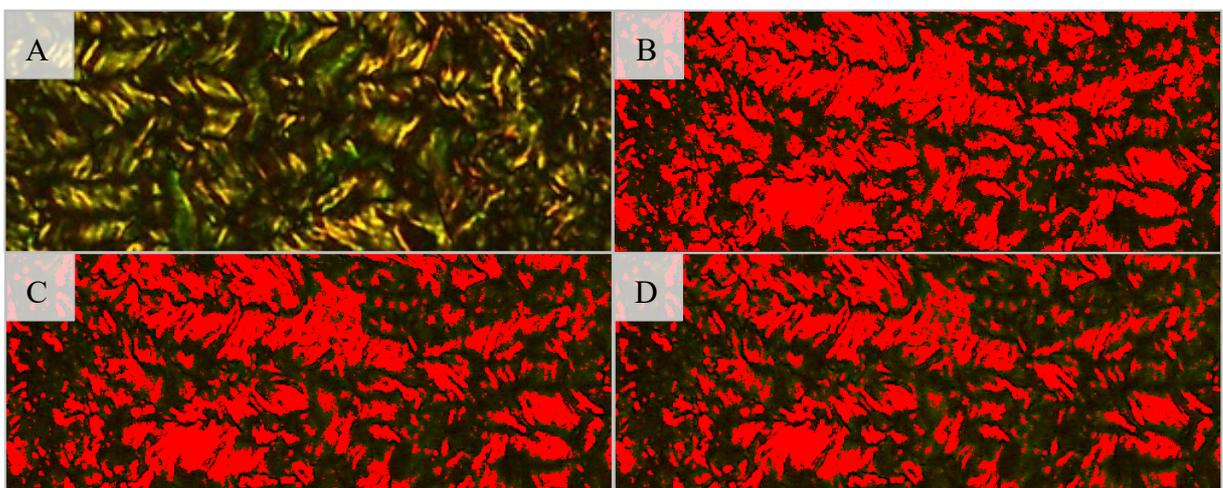


Abb. 12 Definition der Helligkeitsgrenze (*Brightness-Threshold*)

Es wurde eine Helligkeitsgrenze bestimmt, bei der die rot markierte Fläche mit der kollagengefärbten Fläche in (A) übereinstimmte. (B) zeigt die Helligkeitsgrenze bei 50. Hier wurden zusätzliche Pixel rot markiert, die nicht Kollagen entsprechen. (C) zeigt die verwendete Helligkeitsgrenze bei 60. (D) zeigt die Helligkeitsgrenze bei 70. Hier wurden nicht alle Kollagenflächen rot markiert.

Beschreibung	Berechnung
1. Auswahl von $n = 3$ Rechtecken. Jedes Rechteck besitzt $y = 500 \times 200$ Pixel	$n = 3$ $y = 500 * 200 = 100.000$
2. Auswahl aller Pixel x mit Helligkeit ≥ 60 je Rechteck ergibt den absoluten Kollagengehalt $Kabs$ pro Rechteck i	$Kabs_i = x_i$
3. Mitteln des absoluten Kollagengehalts $Kabs$	$Kabs = \bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$
4. Berechnung des relativen Kollagengehalts $Krel$	$Krel = \frac{\bar{x}}{y}$
5. Erstellung des Kollagenquotients KQ zur Messung der Veränderung des relativen Kollagengehalts durch Dezellularisierung. Mit $KrelD$ = Relativer Kollagengehalt der dezellularisierten Probe und $KrelN$ = Relativer Kollagengehalt der Nativprobe	$KQ = \frac{KrelD}{KrelN}$ Für $KQ > 1$ Zunahme von $Krel$ durch DZ Für $KQ = 1$ Keine Änderung in $Krel$ durch DZ Für $KQ < 1$ Abnahme von $Krel$ durch DZ

Abb. 13 Berechnung des relativen Kollagengehalts

Die Kollagendichte wurde mit dem Programm Image J gemessen. Aus einer Probe wurden zunächst drei Rechtecke i ausgewählt. Es wurde der absolute Kollagengehalt ($Kabs$) in jedem Rechteck ermittelt und ein Mittelwert gebildet. Durch die Division des absoluten Kollagengehalts ($Kabs$) durch die Gesamtzahl der Pixel im Rechteck errechnete sich der relative Kollagengehalt ($Krel$). Durch den Vergleich des relativen Kollagengehalts der dezellularisierten Probe ($KrelD$) mit dem relativen Kollagengehalt der zugehörigen Nativprobe ($KrelN$) konnten Veränderungen durch den Dezellularisierungsprozess dargestellt werden.

Movats-Pentachrom-Färbung. Die Movats-Pentachrom-Färbung ist eine polychromatische Bindegewebsfärbung. Die Verwendung mehrerer Färbelösungen ermöglicht eine Darstellung verschiedener zellulärer und extrazellulärer Gewebekomponenten. Zellkerne werden blauschwarz abgebildet, Zytoplasma, Muskulatur und elastische Fasern rot. Kollagenfasern

färben sich hellgelb, was eine Differenzierung zu den elastischen Fasern erlaubt. [102] Wir verwendeten das Färbekit des Herstellers Morphisto (Movats-Pentachrom, Art.-Nr. 12057, Morphisto GmbH).

Die getrockneten Objektträger wurden mit einer modifizierten, absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert. Dabei inkubierten wir die Schnitte für zwei Mal fünf Minuten in Roti-Histol und anschließend nacheinander für jeweils zwei Minuten in Ethanol 96%, Ethanol 80%, Ethanol 70% und Ethanol 60%. Nach einer zweiminütigen Wässerung mit destilliertem Wasser erfolgte die Färbung mit Alcianblau 1% (Alcianblau 1% pH 2,0 mit Essigsäure, Morphisto GmbH) für zwölf Minuten. Die Schnitte wurden fünf Minuten unter fließendem Leitungswasser gereinigt, dann 60 Minuten in alkalischem Alkohol (Alkalischer Alkohol mit Ammoniak 90/10, Morphisto GmbH) inkubiert und erneut für zehn Minuten unter fließendem Leitungswasser gereinigt. Es folgten die Färbungen mit Eisenhämatoxylin für zehn Minuten, Eisen(III)-Chlorid-Lösung (Eisen(III)-Chlorid-Lösung 2%, Morphisto GmbH) für drei Minuten und Natriumthiosulfat (Natriumthiosulfat 5%, Morphisto GmbH) für eine Minute. Nach jeder Färbung wurden die Schnitte jeweils für eine Minute in destilliertem Wasser gereinigt. Die Schnitte mussten im Anschluss zunächst für 15 Minuten unter fließendem Leitungswasser gespült werden, bevor sie mit Brilliant-Crocein-Säurefuchsin (Brilliant-Crocein-Säurefuchsin, Morphisto GmbH) für zehn Minuten gefärbt werden konnten. Es folgte die Inkubation in Essigsäure 1% (Essigsäure 1%, Morphisto GmbH) für 30 Sekunden, die Inkubation in Phosphorwolframsäure 5% (Phosphorwolframsäure 5%, Morphisto GmbH) für 20 Minuten und erneut die Inkubation in Essigsäure 1% für zwei Minuten. Vor der letzten Färbung mit Safron du Gâtinais (Safron du Gâtinais, Morphisto GmbH) für sechs Minuten behandelten wir die Schnitte für eine Minute und anschließend für sechs Minuten mit Ethanol 99% (Ethanol 99% vergällt mit 1% MEK reinst, AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland). Zur Entwässerung wurden die Schnitte abschließend für je zwei Minuten zweimalig in Ethanol 99%, einmalig in Isopropanol und für zwei Mal fünf Minuten in Roti-Histol inkubiert. Es erfolgte die manuelle Eindeckung der gefärbten Schnitte. Das Färbeprotokoll mit genauen Zeitangaben wurde im Anhang hinterlegt (siehe Anhang, Tab. 10).

Mit dem Lichtmikroskop wurden in hundert- und zweihundertfacher Vergrößerung Aufnahmen erstellt. Den Fokus der Auswertung legten wir auf die Beurteilung der elastischen Fasern. Wir beurteilten deskriptiv die Verteilung und die Struktur der elastischen Fasern, sowie den Gehalt an elastischen Fasern jeder Probe. Durch Vergleich der dezellularisierten mit den dazugehörigen nativen Proben sollten Veränderungen durch die Dezellularisierung erfasst werden.

7.4.3 Rasterelektronenmikroskopie

Vorbereitung. Mit der Rasterelektronenmikroskopie wurden Proben aus nativen und dezellularisierten Perikarden untersucht. Dafür verwendeten wir 0,5 x 0,5 cm große Proben, welche zunächst in FIX II-Lösung fixiert und gelagert wurden. Die Fixierung verhinderte das Einsetzen postmortaler Abbauvorgänge im Gewebe und führte zu einem Erhalt der Struktur. Die Untersuchung der Proben mit dem Rasterelektronenmikroskop erfolgt im Vakuum. Die Proben müssen deshalb frei von Wasser sein, um Verdampfungsvorgänge im Vakuum zu verhindern. Die Proben wurden nach einer Lagerungszeit von 24 Stunden mittels aufsteigender Alkoholreihe entwässert (siehe Anhang, Tab. 11). Hier wurde in mehreren Schritten die Fix II-Lösung mit vorgekühltem (-20°C), unvergälltem Ethanol 99,9% ersetzt. Dafür wurden die Proben zunächst in eine Metallfassung mit einem Fassungsvermögen von maximal neun Proben gegeben. In dieser Metallfassung verblieben die Proben während der gesamten Vorbereitung und des Kritisch-Punkt-Trocknens. Es erfolgten mehrere Inkubationsschritte in Ethanol mit aufsteigender Konzentration: Ethanol 30% (Ethanol 30% vergällt mit 1% MEK, Morphisto GmbH), Ethanol 50% (Ethanol 50% mit MEK vergällt, Apotheke Klinikum der Universität München), Ethanol 70% und Ethanol 96%. Die Proben wurden anschließend in vorgekühltem Ethanol 99,9% zum Kritisch-Punkt-Trockner überführt.

Kritisch-Punkt-Trocknen. Trocknungsprozesse können zu einer Schrumpfung des Volumens der Proben und zu Artefaktbildungen führen, weshalb ein schonendes Verfahren verwendet werden muss. Eine Möglichkeit ist die überkritische Trocknung mit dem Kritisch-Punkt-Trockner. Sie wird zur kontrollierten Trennung von Flüssigkeiten und Feststoffen eingesetzt. Dabei wird die im Gewebe enthaltene Flüssigkeit zunächst langsam durch ein hierfür vorgesehenes Medium ersetzt. Im nächsten Schritt muss die Temperatur auf Werte oberhalb des kritischen Punktes des Mediums erhöht werden. Bei entsprechendem Druck entsteht ein so genanntes überkritisches Fluid, bei welchem eine Unterscheidung zwischen flüssiger und gasförmiger Phase nicht mehr möglich ist. Die Ausbildung von Oberflächenspannungen zwischen den Phasen, welche bei anderen Trocknungsvorgängen für die Beschädigungen der Proben verantwortlich sind, wird dadurch verhindert. Wir verwendeten Kohlenstoffdioxid als Medium. Überkritische Bedingungen werden hier bei einer Temperatur von 31°C und einem Druck von 7,4 MPa erreicht. [90, 103-106]

Die in 99,9% unvergälltem Ethanol gelagerten und gekühlten Proben wurden in der Metallfassung in den Innenraum der Kammer des Kritisch-Punkt-Trockners platziert. Die Kammer musste vollständig mit 99,9% unvergälltem Ethanol gefüllt werden. In mehreren Schritten erfolgte der Austausch des Ethanols gegen Kohlenstoffdioxid. Nach der vollständigen Entfernung des Ethanols wurde die Temperatur auf 42°C und der Druck auf 8,00 MPa erhöht.

Über einen Zeitraum von 30 Minuten wurde der Druck über ein Ventil kontinuierlich dem Umgebungsdruck angepasst. Nach Erreichen des Umgebungsdrucks konnten die getrockneten Proben entnommen werden.

Sputtern. Bevor die getrockneten Proben unter dem REM betrachtet werden können, müssen sie zunächst mit einer leitfähigen Schicht überzogen werden. Dieser Vorgang wird als „Sputtern“ bezeichnet. Er verhindert eine lokale elektrostatische Aufladung der Proben während der Rasterelektronenmikroskopie. Schäden im Präparat durch den Elektronenbeschuss werden verringert und durch eine verbesserte Emission von Sekundärelektronen kann eine höhere Bildqualität erzeugt werden. [90, 104]

Hierfür wurden die getrockneten Proben vorsichtig in der Sputterkammer platziert. Ein Vakuum wurde aufgebaut und Argongas wurde eingeströmt. Zwischen der positiv geladenen Anode und der negativ geladenen Kathode wurde eine Spannung von 570 V (28 mA) angelegt, wodurch freie Elektronen zur Anode hin beschleunigt wurden. Diese kollidierten mit den Argonatomen und führten zu einer Ionisierung, wodurch die ionisierten Argonatome zur Kathode hin beschleunigt wurden. Durch das Auftreffen auf der Kathode wurden Goldatome freigesetzt. Diese verteilen sich gleichmäßig in der Kammer und als dünne Schicht auf den Proben. [90, 107, 108] Dieser Vorgang dauerte 180 Sekunden. Die Proben konnten anschließend entnommen werden.

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen. Im REM wird ein Elektronenstrahl erzeugt. Dieser wird mit elektromagnetischen Linsen gebündelt und auf die Probe gelenkt. In der Probenkammer herrscht ein Hochvakuum, um Wechselwirkungen zwischen dem Elektronenstrahl und Luftmolekülen in der Kammer zu vermeiden. Der Elektronenstrahl rastert die Oberfläche der Probe ab. Dadurch kommt es zu Wechselwirkungen mit Elektronen und Atomen der Probe. Das Muster dieser Wechselwirkungen variiert abhängig von der Probenoberfläche und kann mit Hilfe von Detektoren registriert werden. Die Informationen werden in Grauwerte umgewandelt und auf einem Bildschirm abgebildet. Damit lassen sich Auflösungen von bis zu 0,1 nm erreichen. [90, 109-112]

Nach dem Einsetzen der Proben in die Probenkammer wurde ein Hochvakuum aufgebaut. Pro Probe erstellten wir Aufnahmen der Perikardinnen- und Außenseite in hundert-, tausend-, zweitausend- und fünftausendfacher Vergrößerung. Die Beurteilung der Proben erfolgte deskriptiv. Dabei wurden die freigelegten Fasern der Innenseite und die Fasern der Außenseite nach der Dezellularisierung bewertet.

7.4.4 Zugfestigkeitsprüfung

Für die mechanische Testung der Proben wählten wir die Zugfestigkeitsprüfung. Dabei handelt es sich um ein standardisiertes Verfahren im Rahmen von Werkstoffprüfungen. Mit Hilfe einer Prüfmaschine erfolgte die Dehnung der Probe mit kontinuierlicher Kraft. Gemessen wurde die Kraft, welche die Probe dem langsamen Dehnen entgegensetzt. Gesucht wurde nach der maximalen Kraft der Probe, welche vor dem Ausreißen des Gewebes erreicht wird. Zur besseren Vergleichbarkeit erfolgte eine Normierung der gemessenen Kräfte. Dafür musste die Kraft durch die Querschnittsfläche S der Probe geteilt werden. Dabei ergab sich eine Spannung σ mit der Einheit Newton pro Quadratmillimeter (N/mm^2). Die maximale Spannung einer Probe wird Zugfestigkeit genannt. [113]

Mit einer Stanze (ZCP020, Zwick GmbH & Co. KG, Ulm, Deutschland) wurden die Zugproben mit der Form DIN 53504 S3A ausgestanzt (siehe, Abb. 14A). In E_I wurde pro Probe je eine Zugprobe mit Faserverlauf in Zugrichtung und eine zweite mit Faserverlauf 90° zur Zugrichtung ausgestanzt. In E_{II} entnahmen wir je nur eine Zugprobe mit Faserverlauf in Zugrichtung. Zur Darstellung des Faserverlaufs wurde ein Lichtbrett verwendet. Dieses bestand aus LEDs unterhalb einer Plexiglasscheibe. Die LED bestrahlten das Perikard von unten und erhöhten dadurch die Transparenz des Gewebes, wodurch der Verlauf der Fasern sichtbar wurde. Um die Querschnittsfläche zu berechnen, wurde die Probendicke in der Mitte der Zugprobe mit einem Dickenmessgerät (Dickenschnellmessgerät Absolute digimatic, Mitutoyo Deutschland GmbH, Neuss, Deutschland) gemessen. Bis zur Durchführung der Zugfestigkeitsprüfung erfolgte die Lagerung der Proben bei 4°C in PBS. Die Zugproben mussten zwischen der beweglichen und der feststehenden Traverse der Prüfmaschine (zwickiLine bis $F_{\text{max}} 2,5 \text{ kN}$, ZwickRoell GmbH & Co. KG, Ulm, Deutschland) eingespannt werden (siehe, Abb. 14B). Mit einer kontinuierlichen Vorschubgeschwindigkeit von 30 mm pro Minute wurde das Material gleichmäßig und stoßfrei bis zum Ausreißen der Probe gedehnt. Die zuvor gemessenen Probendicken mussten in die Computersoftware (testXpert V12.3, Zwick GmbH & Co. KG) eingetragen werden, wodurch sich die Querschnittsfläche S durch die Software automatisch berechnete. Die Software errechnete im Anschluss die Zugfestigkeit der Probe. In E_I wurden als Referenzwerte die Zugfestigkeiten von Zugproben aus fünf unabhängigen, nativen Perikarden verwendet. In E_{II} stammten die nativen Zugproben aus demselben Perikard wie die dezellularisierten Zugproben.

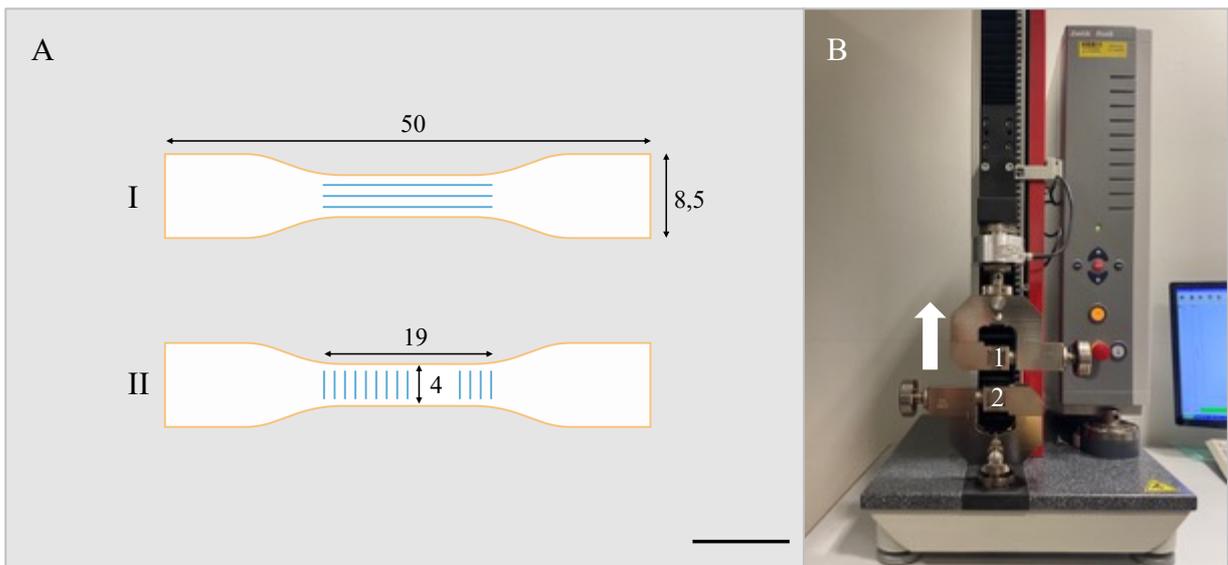


Abb. 14 Zugproben und Zugprüfmaschine zur Bestimmung der Zugfestigkeit

(A) Form DIN 53504 S3A der Zugproben. Pro Probe wurde in E_I je eine Zugprobe mit Faserverlauf in Zugrichtung (I) und eine mit Faserverlauf 90° zur Zugrichtung (II) getestet. In E_{II} wurde pro Probe je eine Zugprobe mit Faserverlauf in Zugrichtung (I) getestet. Maßstabsbalken = 10 mm.

(B) Verwendete Zugprüfmaschine. Die gestanzten Zugproben wurden zwischen der feststehenden (2) und der beweglichen (1) Traverse der Prüfmaschine eingespannt. Durch die Bewegung der beweglichen Traverse nach oben (entlang der Pfeilrichtung) wurde die Probe mit einer Vorschubgeschwindigkeit von 30 mm/min. gedehnt. Gemessen wurde die maximale Spannung vor dem Ausreißen der Probe.

7.4.5 Statistische Auswertung

Zur Überprüfung auf Normalverteilung verwendeten wir den Kolmogorov-Smirnov-Test. [114] Zusätzlich wurde der *t*-Test, die *ANOVA*, der Tukey-Test als Post-Hoc-Testverfahren und die lineare Regression zur Regressionsanalyse verwendet.

Der *t*-Test ist ein Lagetest. Er überprüft Mittelwertunterschiede zweier normalverteilter Stichproben. Er ermöglicht dadurch eine objektive Entscheidung, ob die Mittelwerte beider Stichproben aus zwei Population stammen. Es wird die Wahrscheinlichkeit berechnet, mit welcher der beobachtete Mittelwertunterschied durch Zufall entstanden ist. Liegt diese unterhalb des Signifikanzniveaus, wird angenommen, dass beide Stichproben aus zwei unterschiedlichen Populationen stammen. Die Stichproben unterscheiden sich dann signifikant voneinander. Man unterscheidet mehrere Unterformen des *t*-Tests. Zunächst wird der einseitige vom zweiseitigen *t*-Test unterschieden. In dieser Arbeit wurde der zweiseitige *t*-Test verwendet. Er untersucht Unterschiede in zwei Richtungen und muss verwendet werden, wenn die Richtung der zu untersuchenden Änderung vor der Untersuchung nicht bekannt ist. Es wird

zudem der t -Test bei abhängigen und unabhängigen Stichproben unterschieden. [114-116] Beim Vergleich der nativen mit den dezellularisierten Proben und der Gruppe E_II mit E_IS handelte es sich abgesehen von der Zugfestigkeitsprüfung um abhängige Stichproben.

Als unabhängiger t -Test wurde der Welch-Test verwendet. Er ist eine Sonderform des unabhängigen t -Tests und testet Unterschiede bei unabhängigen Stichproben mit unterschiedlichen Varianzen. [114] Er wurde in der Zugfestigkeitsprüfung für den Vergleich zwischen den nativen Proben und E_II und E_IS verwendet.

ANOVA ist ein Akronym für „Analysis of Variance“. Die Varianzanalyse wird für die Testung von mehr als zwei Stichproben verwendet. Sie ist eine Erweiterung des t -Tests und wird bei normalverteilten Stichproben mit gleichen Varianzen angewendet. Je weniger die Mittelwerte der Stichproben voneinander abweichen, desto eher stammen die Stichproben aus einer Population. [114] Die *ANOVA* wurde in E_I zum Vergleich der Dezellularisierungstemperaturen untereinander eingesetzt. Für die abhängigen Stichproben in E_{II} wurde die *ANOVA for repeated measurements* verwendet. Bei signifikanten Ergebnissen in der Varianzanalyse wurde ergänzend ein Post-Hoc-Testverfahren durchgeführt. Dieses gibt an, welche Gruppen sich paarweise unterscheiden. Wir verwendeten dafür den Tukey-Test. Das Signifikanzniveau wurde bei $\alpha \leq 5\%$ festgelegt.

Es wurde zusätzlich eine Regressionsanalyse durchgeführt. Diese wird zur Ursachen- und Wirkungsanalysen angewendet. Wir verwendeten dafür das statistische Verfahren der linearen Regression. Dabei wird untersucht, inwieweit aus den Werten einer unabhängigen Variablen X die Werte einer abhängigen Variablen Y vorhergesagt werden können. In unserer Arbeit war die Dezellularisierungstemperatur die unabhängige Variable X. Es wurde das Bestimmtheitsmaß R^2 bestimmt. Dieses ist ein Indikator für die Modellgüte der einfachen linearen Regression und liegt zwischen 0 und 1. R^2 von 0 bedeutet, dass die Variable Y nicht durch das Modell vorhergesagt werden kann. R^2 von 1 bedeutet, dass die Werte von Y gänzlich durch das Modell erklärt werden. [114, 116] Der lineare Zusammenhang wird dabei bei einem R^2 von $< 0,3$ als fehlend oder sehr schwach bezeichnet, bei einem R^2 von $0,3 < R^2 < 0,5$ als schwach, bei einem R^2 von $0,5 < R^2 < 0,7$ als moderat und bei einem R^2 von $> 0,7$ als stark. [117]

8 Ergebnisse

8.1 Biometrie

Für die Analyse der Veränderungen der biometrischen Maße wurde für jede Probe die Dicke gemessen. Außerdem wurden bei den Temperaturen 13°C, 13°C', 29°C und 56°C in der Gruppe E_IS die Längen und Breiten der Proben vor und nach der Dezellularisierung erfasst.

Tab. 1 Probendicken in E_I

E _I	4°C	13°C	21°C	29°C	37°C	56°C	13°C'
nativ (µm)	613,0 ± 90,9	631,0 ± 163,4	693,6 ± 192,7	746,9 ± 289,4	687,7 ± 297,6	648,5 ± 46,5	530,5 ± 80,6
E _I I	54%* ± 35% (p=0,0233)	73%** ± 38% (p=0,0028)	21% ± 30% (p=0,2521)	50% ± 69% (p=0,3266)	36%** ± 19% (p=0,0072)	195%** ± 60% (p=0,0015)	123%*** ± 22% (p=0,0007)
E _I S	51%* ± 35% (p=0,0263)	60%** ± 23% (p=0,0013)	59% ± 50% (p=0,0579)	61% ± 71% (p=0,1806)	67%** ± 23% (p=0,0062)	222%* ± 136% (p=0,0236)	155%** ± 47% (p=0,0011)

Native Proben: Die Dicken der Proben vor der Dezellularisierung betragen in E_I zwischen 530,5 µm bis 746,9 µm (siehe Tab. 1). Die Dicken der nativen Proben in E_{II} lagen bei 639,4 µm. Die Längen der Proben wurden in E_I mit 9,26 cm bis 10,38 cm, die Breiten mit 8,68 cm bis 9,54 cm gemessen.

Dezellularisierte Proben: Bei allen Dezellularisierungstemperaturen kam es zu einer Dickenzunahme des Gewebes. In E_I lag die relative Zunahme in der Gruppe E_II bei Werten zwischen 21% bis 73% und in der Gruppe E_IS zwischen 51% bis 67%. Diese Dickenzunahme war bei den Versuchen bei 4°C (E_II: p=0,0233; E_IS: p=0,0263), 13°C (E_II: p=0,0028; E_IS: p=0,0013), und 37°C (E_II: p=0,0072; E_IS: p=0,0062) statistisch signifikant. Bei der Dezellularisierung 13°C' fiel nach der Dezellularisierung eine verstärkte Dickenzunahme mit einer durchschnittlichen Zunahme von 123% und 155% in Gruppe E_II und E_IS auf. Durch die Dezellularisierung bei 56°C kam es ebenso zu einer erhöhten Zunahme der Probendicken. So beobachteten wir bei den Proben nach der Dezellularisierung bei 56°C eine Zunahme der Dicken um 195% in Gruppe E_II und 222% in Gruppe E_IS. Für die Untersuchung der Temperaturabhängigkeit wurde eine Varianzanalyse mittels *ANOVA* durchgeführt. Dabei unterschieden sich die Dickenzunahmen in E_I signifikant zwischen den Dezellularisierungstemperaturen (E_II: p=9,02x10⁻⁷; E_IS: p=0,0009). Im Tukey-Test war die Dickenzunahme bei der Dezellularisierung bei 56°C zu allen übrigen Temperaturen in E_II und E_IS, mit Ausnahme zu 13°C' in E_IS, signifikant. In E_II ergab sich zudem zwischen den Dickenzunahmen bei 21°C und 13°C' ein signifikanter Unterschied (p=0,0282). E_II lag das Bestimmtheitsmaß R² bei 0,73 und beschreibt einen starken linearen Zusammenhang zwischen der Dezellularisierungstemperatur und der Dickenzunahme. E_IS lag das Bestimmtheitsmaß R² bei

0,53 und spricht für einen moderaten linearen Zusammenhang. In E_I wurde bei den Temperaturen 21°C, 29°C, 37°C eine verstärkte Dickenzunahme in E_{IS} mit einer Zunahme zwischen 59% bis 67% gegenüber 21% bis 50% in E_{II} beobachtet. Diese war bei den Dezellularisierungen bei 21°C ($p=0,0304$) und 37°C ($p=0,0305$) statistisch signifikant.

In E_{II} kam es zu einer relativen Dickenzunahme um 44% bis 79% (siehe Tab. 3). Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Dickenzunahme zwischen den drei Dezellularisierungstemperaturen festgestellt werden. R^2 lag bei 0,07.

Die Größe der Proben wurden in E_I durch die Dezellularisierungen bei 13°C, 13°C' und 29°C nicht verändert. Die Längen der Proben lagen zwischen 9,32 cm und 10,28 cm, die Breiten zwischen 8,58 cm und 9,44 cm. Bei der Dezellularisierung bei 56°C kam es zu einer Schrumpfung der Proben. Die Längen nahmen um 36% auf 6,34 cm und die Breiten um 46% auf 5,1 cm ab (siehe Abb. 15).

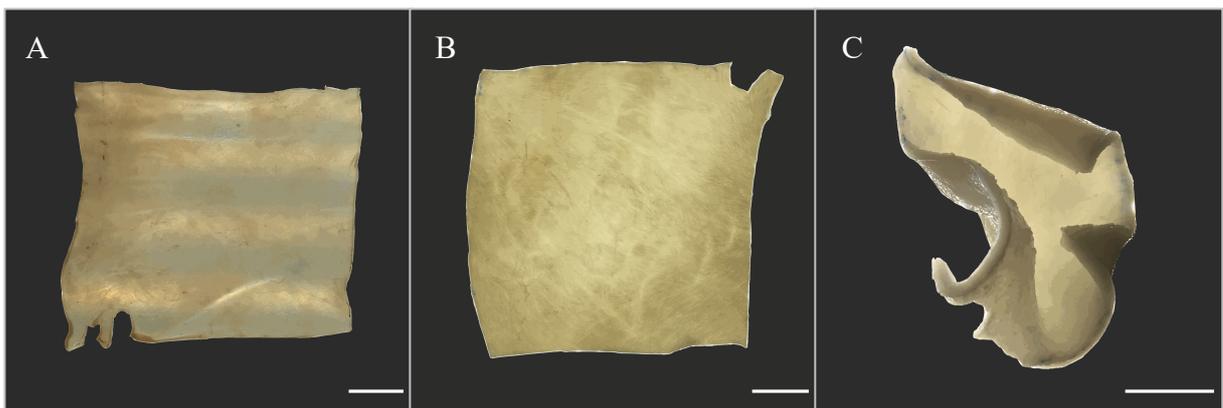


Abb. 15 Perikardproben vor und nach der Dezellularisierung

(A) Native Probe vor der Dezellularisierung. (B) und (C) Probe nach der Dezellularisierung bei 4°C und 56°C.

Die Größe der Proben wurde durch die Dezellularisierung bei 13°C, 13°C' und 29°C nicht verändert. Bei der Dezellularisierung bei 56°C kam es zu einer Schrumpfung der Proben.

Maßstabsbalken = 2 cm.

8.2 Histologie

8.2.1 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)-Fluoreszenzfärbung

Native Proben: Die nativen Proben zeigten eine homogene Verteilung der Zellkerne im gesamten Perikard. Die Zellkerndichten in E_{II} lagen zwischen 848 pro mm² und 1233 pro mm² (siehe Anhang, Tab. 4)

Dezellularisierte Proben: Die Proben aller Dezellularisierungstemperaturen zeigten dezellularisierte Bereiche (siehe Abb. 16). Die Dezellularisierungseffektivität bei der Dezellularisierung bei 4°C betrug 20% (± 4%) in E_II und 47% (± 33%) in E_IS. Bei der Dezellularisierung bei 13°C lag diese bei 76% (± 34%) in E_II und 78% (± 31%) in E_IS, bei der Dezellularisierung bei 13°C bei 32% (± 9%) in E_II und 33% (± 6%) E_IS. Die Dezellularisierung bei 21°C resultierte in beiden Gruppen in vollständig dezellularisierten Proben. Die Proben nach der Dezellularisierung bei 29°C wiesen eine relative Dezellularisierung von 86% (± 31%) in E_II und 89% (± 26%) in E_IS auf. Nach der Dezellularisierung bei 37°C wurden Werte von 70% (± 41%) in E_II und 44% (± 32%) in E_IS gemessen. Die Dezellularisierung bei 56°C resultierte in vollständig dezellularisierten Proben. In E_I konnte ein signifikanter Unterschied zwischen der Dezellularisierungseffektivität (E_II: $p=1,76 \times 10^{-5}$; E_IS: $p=9,01 \times 10^{-5}$) der unterschiedlichen Dezellularisierungstemperaturen gemessen werden. In E_II lag die Dezellularisierungseffektivität bei 4°C signifikant unter den Ergebnissen der übrigen Temperaturen, mit Ausnahme von 13°C. Die Dezellularisierungseffektivität bei 13°C zeigte sich zudem zu den Temperaturen 21°C ($p=0,0017$), 29°C ($p=0,0182$) und 56°C ($p=0,0017$) signifikant erniedrigt. In E_IS zeigte sich die Dezellularisierungseffektivität bei 4°C zu den Temperaturen 21°C ($p=0,0180$) und 56°C ($p=0,0180$) ebenfalls signifikant erniedrigt. Die Ergebnisse bei 13°C lagen signifikant unterhalb der Ergebnisse bei 21°C ($p=0,0017$), 29°C ($p=0,0126$) und 56°C ($p=0,0017$). In E_IS ergaben sich zudem signifikante Unterschiede zwischen den Ergebnissen der Dezellularisierungen bei 21°C und 37°C ($p=0,0112$) sowie 37°C und 56°C ($p=0,0112$). In E_II lag R^2 bei 0,66, in E_IS bei 0,61. Beide Werte sprechen jeweils für einen moderaten linearen Zusammenhang zwischen der Dezellularisierungstemperatur und der Dezellularisierungseffektivität. Es zeigte sich bei keiner Dezellularisierungstemperatur ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen E_II und E_IS.

In E_{II} ergab sich eine Dezellularisierungseffektivität von 53% (± 27%) nach der Dezellularisierung bei 21°C, 38% (± 14%) nach der Dezellularisierung bei 25°C und 37% (± 35%) nach der Dezellularisierung bei 29°C (siehe Anhang, Abb. 25). Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Dezellularisierungseffektivität zwischen den drei Dezellularisierungstemperaturen. R^2 lag bei 0,07.

In E_{II} beobachteten wir bei den dezellularisierten Proben eine verminderte Zellkerndichte in den nicht-dezellularisierten Bereichen im Vergleich zu den nativen Proben. Diese war bei den Dezellularisierungen bei 21°C und 25°C für alle Proben, bei der Dezellularisierung bei 29°C für drei der fünf Proben statistisch signifikant. Dabei nahm die Zellkerndichte nach der Dezellularisierung bei 21°C um 62% ($\pm 30\%$) nach der Dezellularisierung bei 25°C um 43% ($\pm 10\%$) und nach der Dezellularisierung bei 29°C um 36% ($\pm 39\%$) ab.

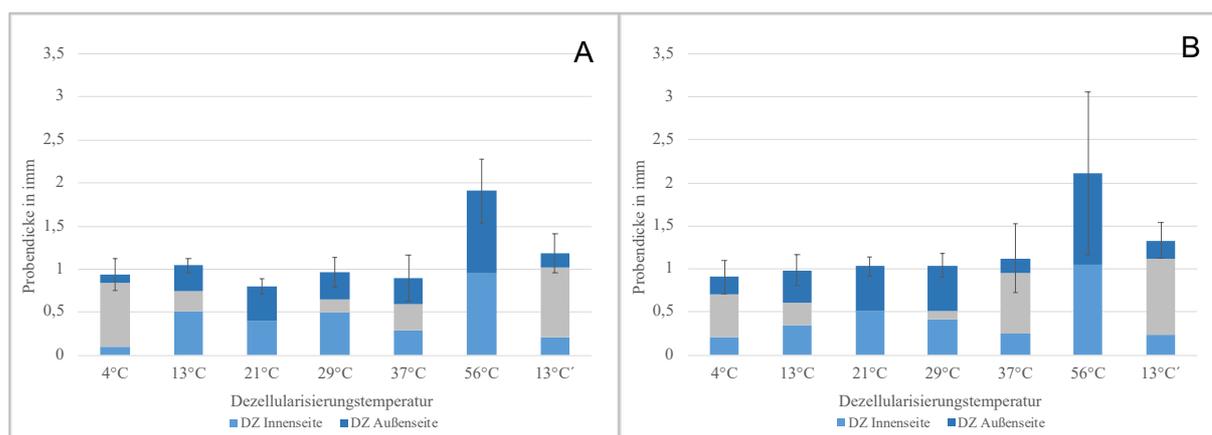


Abb. 16 Dezellularisierung in Abhängigkeit von der Dezellularisierungstemperatur in E_I

(A) und (B) Dezellularisierung in E_II und E_IS.

Die blau markierten Bereiche zeigen die dezellularisierten, zellfreien Bereiche unterhalb der Innen- und Außenseite, der graue Bereich entspricht dem nicht-dezellularisierten Bereich im Inneren der Probe. Die Dezellularisierung bei 21°C resultierte in beiden Gruppen in einer vollständigen Dezellularisierung. Bei niedrigeren und höheren Temperaturen kam es zu einer Abnahme der Dezellularisierungseffektivität. Die Proben nach der Dezellularisierung bei 56°C waren ebenfalls vollständig dezellularisiert.

8.2.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Native Proben: Die nativen Proben zeigten einen kompakten Aufbau der EZM. Die Bindegewebsfasern präsentierten sich als geschlängelte und längliche Strukturen in der EZM, welche parallel zum Verlauf der Basalmembran der Innenseite ausgerichtet waren. Die Basalmembran auf der Innenseite des Perikardes war durchgängig.

Dezellularisierte Proben: Die Proben nach der Dezellularisierung bei 4°C zeigten eine aufgelockerte EZM und bei einem Teil der Proben war die Basalmembran nicht durchgängig. Wir konnten einen Score-Wert von -0,4/-0,4 in E_II und -0,6/-0,6 in E_IS für die Innen- und Außenseiten der Proben berechnen. Bei der Dezellularisierung bei 13°C errechnete sich für die Innen- und Außenseiten beider Gruppen E_II und E_IS jeweils ein Score-Wert von -0,2. In E_II

und E₁S zeigten sich in einer der fünf Proben mehrere kleine Brüche entlang der Basalmembran. Die Struktur der Außenseiten war überwiegend kompakt. Eine Probe wies Lücken innerhalb der EZM auf, wodurch sich das Gewebe hier aufgelockert zeigte. Bei den Dezellularisierungstemperaturen 13°C, 21°C und 29°C blieb die Basalmembran der Innenseite bei allen Proben durchgängig. Daraus ergab sich für beide Gruppen E₁I und E₁S einen Score-Wert von 0. An der Außenseite der Probe zeigte sich jeweils bei einer Probe eine Auflockerung des Gewebes mit vereinzelt Lücken innerhalb der EZM. Die Struktur der übrigen Proben zeigte sich kompakt. Für die Außenseiten der Proben ergab sich daher nach der Dezellularisierung bei 13°C, 21°C und 29°C in E₁I und E₁S ein Score-Wert von -0,2. Nach der Dezellularisierung bei 37°C betrug der Score-Wert für E₁I und E₁S -0,4 für die Innenseiten und -0,6 für die Außenseiten der Proben. Bei jeweils zwei der fünf Proben in E₁I und E₁S zeigten sich Beschädigungen an der Basalmembran, bei jeweils drei der fünf Proben konnte eine allgemeine Auflockerung der EZM beobachtet werden. Die strukturelle Beschaffenheit der Proben nach der Dezellularisierung bei 56°C zeigten sich im Vergleich zu den nativen Proben deutlich verändert. Die EZM wirkte verschmolzen, wodurch einzelne Bindegewebsfasern nicht mehr differenziert werden konnten. Innerhalb der EZM zeigten sich zudem große Lücken. Die Basalmembran der Innenseiten blieb durchgängig (siehe Abb. 17). Für die Dezellularisierung bei 56°C wurde kein Score-Wert berechnet, da die Veränderungen durch die Score-Kriterien nicht erfasst wurden. Im Vergleich von E₁I und E₁S zeigten sich nach der Dezellularisierung bei 4°C in E₁S stärkere Veränderungen nach der Dezellularisierung als in E₁I (E₁I: -0,4/-0,4; E₁S: -0,6/-0,6). Bei allen anderen Dezellularisierungen ergaben sich zwischen den Gruppen E₁I und E₁S keine Unterschiede (siehe Tab. 2).

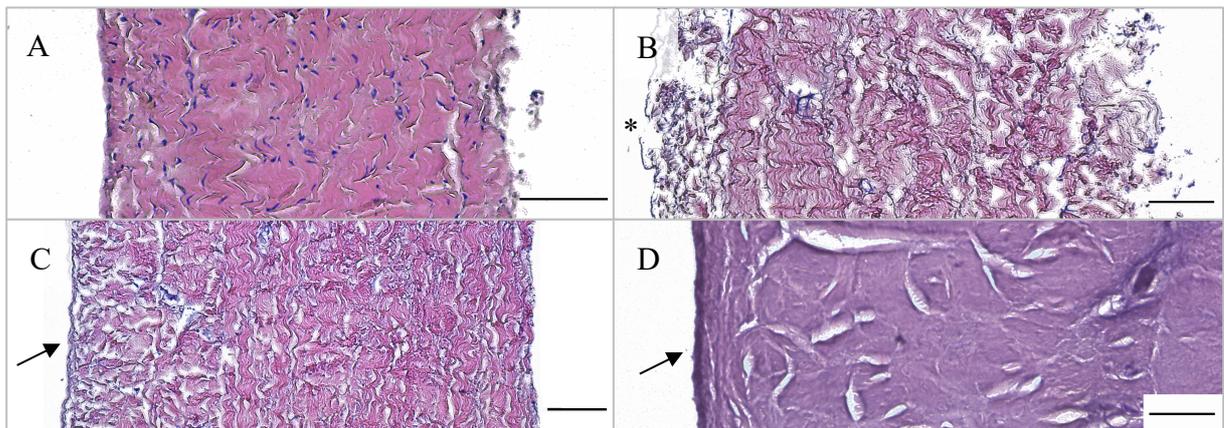


Abb. 17 Beurteilung der EZM in der H.E.-Färbung in E_I

(A) Native Probe vor der Dezellularisierung. (B), (C) und (D) Probe nach der Dezellularisierung bei 4°C, 21°C und 56°C.

Die Probe nach der Dezellularisierung bei 4°C zeigte eine unterbrochene Basalmembran (*) und eine aufgelockerte EZM mit deutlichen Lücken zwischen den Fasern. In der Probe nach der Dezellularisierung bei 21°C präsentierte sich die Basalmembran durchgängig (Pfeil), die EZM zeigte sich deutlich kompakter. Bei der Probe nach der Dezellularisierung bei 56°C wirkte die EZM verschmolzen, einzelne Fasern konnten nicht mehr differenziert werden. Die Basalmembran blieb durchgängig (Pfeil). Die Probe nach der Dezellularisierung bei 56°C zeigt die Innenseite des Perikards. Bei der Dezellularisierung bei 56°C kam es zu einer deutlichen Dickenzunahme der Proben.

Maßstabsbalken = 100 µm.

In E_{II} errechnete sich für die drei Dezellularisierungstemperaturen ein Score-Wert von -0,2 und -1 für die Innen- und Außenseiten der Proben. Jeweils eine der fünf Proben jeder Dezellularisierungstemperatur zeigte kleine Brüche in der Basalmembran. Die Proben wiesen zudem Lücken zwischen den Bindegewebsfasern auf, wodurch die EZM aufgelockert erschien (siehe Anhang, Abb. 26). Zwischen den drei Dezellularisierungstemperaturen in E_{II} konnte kein Unterschied beobachtet werden.

Tab. 2 Score zur Beurteilung der strukturellen Beschaffenheit der Innen- und Außenseiten in der H.E.-Färbung in E_I

E _I	4°C	13°C	21°C	29°C	37°C	56°C	13°C'
E_II							
Innenseite	-0,4	-0,2	0	0	-0,4	n.g.	0
Außenseite	-0,4	-0,2	-0,2	-0,2	-0,6	n.g.	-0,2
E_IS							
Innenseite	-0,6	-0,2	0	0	-0,4	n.g.	0
Außenseite	-0,6	-0,2	-0,2	-0,2	-0,6	n.g.	-0,2
E_{II}	21°C	25°C	29°C				
Innenseite	-0,2	-0,2	-0,2				
Außenseite	-1	-1	-1				n.g.: nicht gewertet

8.2.3 Pikrosirius-Rot-Färbung

Native Proben: Der relative Kollagengehalt der nativen Proben in E_{II} lag zwischen 32% und 56% (siehe Anhang, Tab. 5).

Dezellularisierte Proben: Nach der Dezellularisierung bei 4°C in E_I zeigte sich der relative Kollagengehalt mit -6% in E_II und +9% in E_IS nahezu unverändert. Der relative Kollagengehalt der Proben nach der Dezellularisierung bei 13°C zeigte sich in E_II nicht verändert, in E_IS konnten wir eine Abnahme um 16% beobachten. Die Dezellularisierung bei 13°C' resultierte in einem niedrigeren relativen Kollagengehalt mit einer Abnahme von -20% in E_II und einer statistisch signifikanten Abnahme von -26% in E_IS ($p=0,0475$) gegenüber den nativen Proben. Bei den Proben nach der Dezellularisierung bei 21°C zeigte sich ebenfalls eine signifikante Abnahme des relativen Kollagengehalts um 34% in Gruppe E_II ($p=0,0027$) und 42% in E_IS ($p=0,0360$). Nach der Dezellularisierung bei 29°C kam es zu einer Zunahme im relativen Kollagengehalt um 46% in Gruppe E_II und 23% in E_IS. Der relative Kollagengehalt nach der Dezellularisierung bei 37°C resultierte in einer Abnahme um -38% in E_II und -22% in E_IS. Nach der Dezellularisierung bei 56°C beobachteten wir eine signifikante Abnahme des relativen Kollagengehalts mit durchschnittlichen Werten von -81% in E_II ($p=0,0027$) und -80% in E_IS ($p=0,0360$). Die Veränderungen im relativen Kollagengehalt unterschieden sich zwischen den Dezellularisierungstemperaturen in E_II ($p=2,64 \times 10^{-5}$) und E_IS ($p=0,0058$) signifikant voneinander (siehe Abb. 18). Die Zunahme im relativen Kollagengehalt nach der Dezellularisierung bei 29°C zeigte sich in E_II gegenüber den Temperaturen 13°C' ($p=0,0222$), 21°C ($p=0,0036$), 37°C ($p=0,0023$) und 56°C ($p<0,0001$) sowie in E_IS gegenüber den Veränderungen nach der Dezellularisierung bei 56°C ($p=0,0034$) signifikant. Die Abnahme im

relativen Kollagengehalt nach der Dezellularisierung bei 56°C war in E_II zu den Veränderungen nach den Dezellularisierungen bei 4°C ($p=0,0082$), 13°C ($p=0,0037$), 13°C' ($p=0,0489$) und 29°C, in E_IS zu den Veränderungen nach der Dezellularisierung bei 4°C ($p=0,0139$) und 29°C statistisch signifikant. In E_II konnte mit einem Bestimmtheitsmaß R^2 von 0,65 ein moderater linearer Zusammenhang, in E_IS mit einem Bestimmtheitsmaß R^2 von 0,46 ein schwacher linearer Zusammenhang festgestellt werden. Zwischen den Gruppen E_II und E_IS zeigte sich nach der Dezellularisierung bei 4°C ein signifikanter Unterschied ($p=0,0315$) in den Veränderungen im relativen Kollagengehalt der Proben. Bei allen anderen Dezellularisierungen konnten wir zwischen den Gruppen E_II und E_IS keine Unterschiede feststellen (siehe Abb. 19).

In E_{II} zeigte sich eine Abnahme im relativen Kollagengehalt der Proben bei 25°C um -21%. Bei 21°C änderte sich der relative Kollagengehalt um -5% und bei 29°C um -3% (siehe Anhang, Abb. 27). Es konnte kein signifikanter Unterschied in den Veränderungen im relativen Kollagengehalt zwischen den drei Dezellularisierungstemperaturen festgestellt werden (siehe Anhang, Abb. 28). R^2 lag bei 0,06.

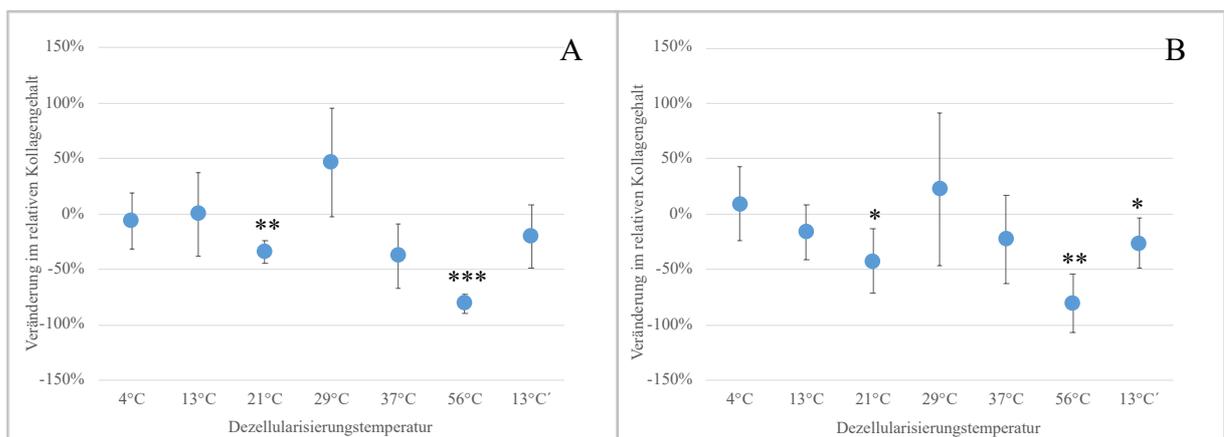


Abb. 18 Veränderung im relativen Kollagengehalt in Abhängigkeit von der Dezellularisierungstemperatur in E_I

(A) und (B) Veränderung im relativen Kollagengehalt in E_II und E_IS.

Es zeigte sich eine Abnahme im relativen Kollagengehalt der Proben nach der Dezellularisierung bei 13°C in E_IS, bei 13°C', 21°C, 37°C und 56°C in E_II und E_IS. Die Veränderungen im relativen Kollagengehalt unterschieden sich zwischen den Dezellularisierungstemperaturen in E_II ($p=2,64 \times 10^{-5}$) und E_IS ($p=0,0058$) signifikant voneinander.

Hypothesentestung: $p < 0,05^*$; $p < 0,01^{**}$; $p < 0,001^{***}$

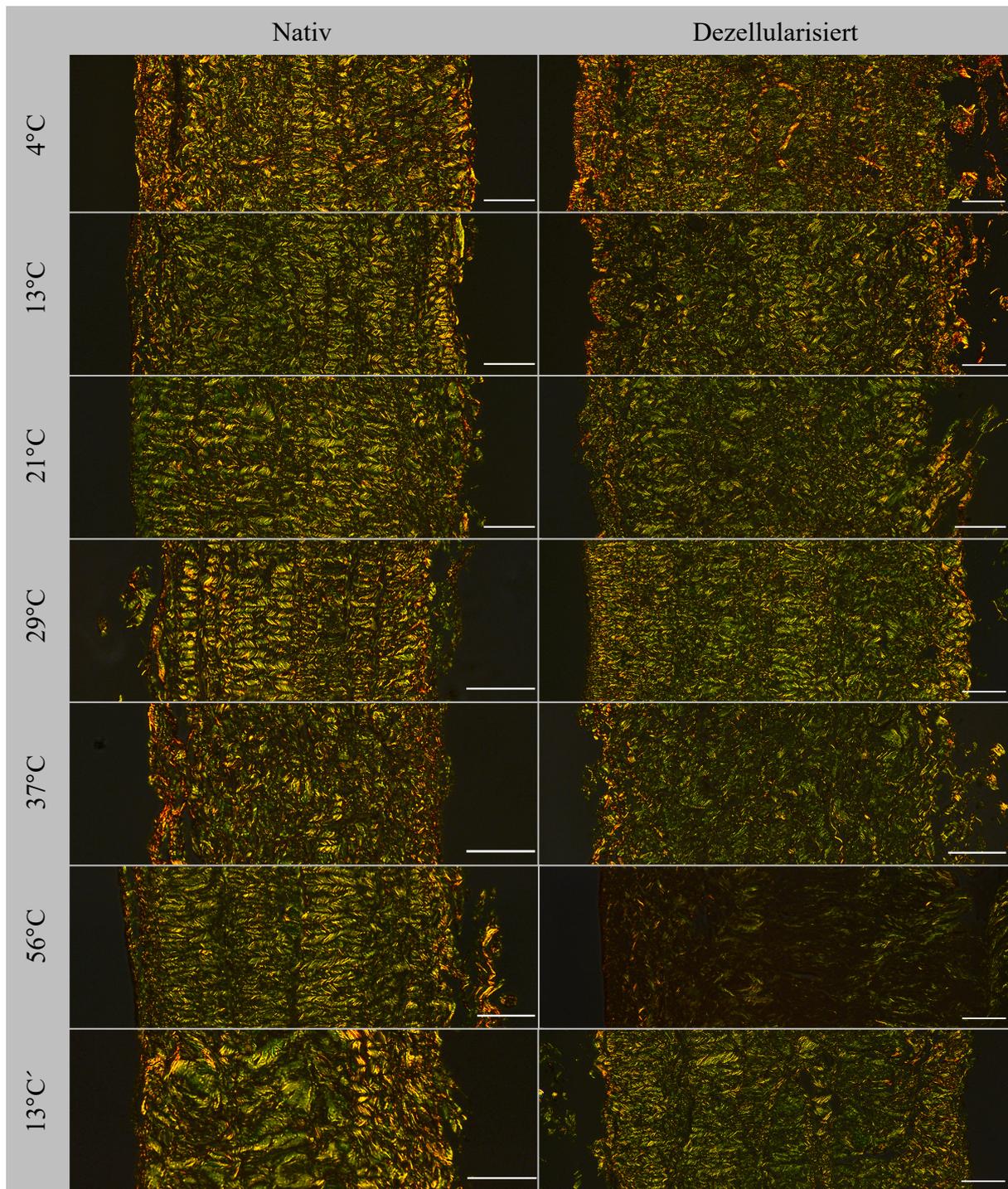


Abb. 19 Beurteilung des Kollagengehalts mit der Pikrosirius-Rot-Färbung in E₁

Vergleich des Kollagengehalts der Proben vor und nach der Dezellularisierung. Die erste Spalte zeigt jeweils die nativen Proben, die zweite Spalte die Proben nach der Dezellularisierung in E₁. Die Probe nach der Dezellularisierung bei 56°C zeigt die Innenseite des Perikards. Bei der Dezellularisierung bei 56°C kam es zu einer deutlichen Dickenzunahme der Proben.

Maßstabsbalken = 100 µm.

8.2.4 Movats-Pentachrom-Färbung

Native Proben. Die EZM der nativen Proben präsentierte sich kompakt mit einem dichten Aufbau an hellgelb gefärbten Kollagenfasern. Die elastischen Fasern waren über die gesamte Breite des Perikards verteilt und parallel zum Verlauf der Basalmembran der Innenseite ausgerichtet. Sie stellten sich als rot gefärbte, geschlängelt verlaufende und längliche Strukturen in der EZM dar.

Dezellularisierte Proben. Die Kollagenfasern und elastischen Fasern der EZM waren bei den dezellularisierten Proben in E_I und E_{II} insgesamt loser angeordnet. Die Verteilung und der Verlauf der elastischen Fasern zeigte sich weiterhin über die gesamte Breite des Perikardes und parallel zur Basalmembran ausgerichtet. Im Vergleich der Faserndicke vor und nach der Dezellularisierung konnten Unterschiede festgestellt werden. Dabei präsentierten sich die Fasern der dezellularisierten Proben wesentlich dünner als die der nativen Proben (siehe Abb. 20). Unterschiede zwischen den Dezellularisierungstemperaturen, sowie E_II und E_IS konnten nicht beobachtet werden.

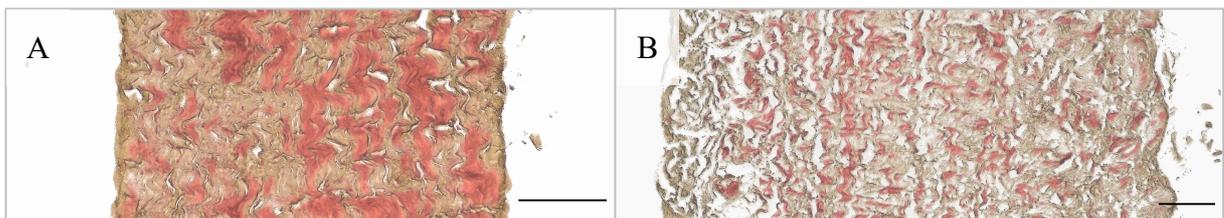


Abb. 20 Beurteilung der elastischen Fasern und der Kollagenfasern in der Movats-Pentachrom-Färbung

(A) Native Probe vor der Dezellularisierung. (B) Probe nach der Dezellularisierung bei 4°C.

Die Kollagenfasern und elastischen Fasern der EZM zeigten sich nach der Dezellularisierung loser angeordnet. Die elastischen Fasern in der dezellularisierten Probe präsentierten sich im Vergleich zur nativen Probe dünner.

Maßstabsbalken = 100 µm.

Eine Auswertung des Gehalts an elastischen Fasern war nicht möglich. Die elastischen Fasern im Perikard verlaufen parallel zur Schnittfläche der Proben im Paraffinblock, weshalb die Fasern nicht in jeder Schnittebene angeschnitten wurden. Die Menge variierte daher sehr stark zwischen den Schnitten einer Probe, weshalb keine Aussage über die Menge der elastischen Fasern und deren Veränderung nach der Dezellularisierung getroffen werden konnte (siehe Abb. 21).

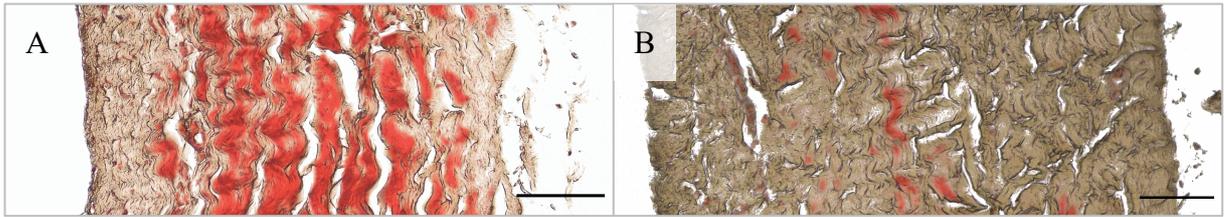


Abb. 21 Fehlende Auswertbarkeit des Gehalts an elastischen Fasern in der Movats-Pentachrom-Färbung

(A) und (B) Gewebeschnitte der gleichen nativen Probe.

Der Gehalt an elastischen Fasern (rot) variierte sehr stark zwischen den Schnitten einer Probe, weshalb keine Aussage über die Menge an elastischen Fasern und deren Veränderung nach der Dezellularisierung getroffen werden konnte.

Maßstabsbalken = 100 μm .

8.3 Rasterelektronenmikroskopie

Native Proben: Die nativen Proben zeigten die Endothelschicht auf der Innenseite der Perikarde als glatte und homogene Oberfläche. Auf der Außenseite zeigten sich Fasern mit einheitlichem Verlauf, welche sich zu Bündeln zusammenlagerten.

Dezellularisierte Proben: Bei allen Proben war nach der Dezellularisierung keine Endothelschicht mehr zu sehen. Bei den Proben nach den Dezellularisierungen bei 4°C, 13°C, 13°C', 21°C, 29°C und 37°C zeigte sich auf den Innenseiten der Proben eine kompakte Faserstruktur. Die Fasern waren regelmäßig und dicht angeordnet. Hinweise auf Beschädigungen konnten nicht beobachtet werden. Nach der Dezellularisierung bei 56°C zeigte sich die Oberfläche zusammengeschmolzen. Einzelne Fasern waren nicht mehr zu erkennen. Die Oberfläche erschien dadurch glatt und glänzend (siehe Abb. 22). Im Vergleich zwischen den Gruppen E_II und E_IS konnten keine Unterschiede beobachtet werden.

Die Proben in E_{II} zeigten sich nach den Dezellularisierungen bei 21°C und 25°C homogen und kompakt. Nach der Dezellularisierung bei 29°C wirkten die Fasern auf der Innenseite der Proben insgesamt etwas unregelmäßiger angeordnet (siehe Anhang, Abb. 29).

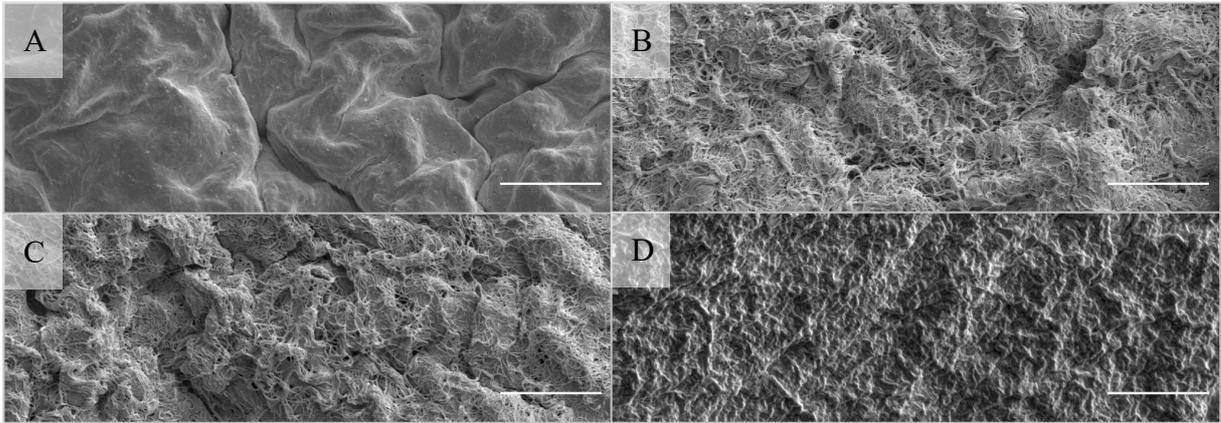


Abb. 22 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Perikardinnenseiten in E_I

(A) Native Probe vor der Dezellularisierung. (B), (C) und (D) Probe nach der Dezellularisierung bei 4°C, 21°C und 56°C.

Die Innenseite der nativen Probe war von einer glatten Schicht aus Endothelzellen bedeckt. Bei allen Proben war nach der Dezellularisierung keine Endothelschicht mehr zu sehen. Bei den Proben nach der Dezellularisierung bei 4°C und 21°C zeigte sich eine kompakte Faserstruktur. Die Fasern waren regelmäßig und dicht angeordnet. Hinweise auf Beschädigungen konnten nicht beobachtet werden. Die Oberfläche der Probe nach der Dezellularisierung bei 56°C erschien glänzend und verschmolzen, einzelne Fibrillen konnten nicht mehr abgegrenzt werden. Maßstabsbalken = 10 µm.

Auf den Außenseiten der Proben präsentierten sich nach der Dezellularisierung bei 13°C, 13°C', 21°C und 29°C eine leichte Auflockerung der Faserstruktur. Die Zusammenlagerung der Fasern zu Bündeln blieb erhalten, zeigte sich jedoch insgesamt loser. Bei den Proben nach der Dezellularisierung bei 4°C und 37°C wurde eine stärkere Auflockerung beobachtet. Bei den Proben nach der Dezellularisierung bei 4°C zeigten sich die Fasern nicht mehr zu Bündeln zusammengelagert. Die Fasern verteilten sich ungeordnet über die Oberfläche. Bei den Proben bei 37°C beobachteten wir sichtbare Abstände zwischen den Fasern, wobei die Zusammenlagerung zu Bündeln noch vereinzelt sichtbar war. Eine Beschädigung der Fasern selbst wurde bei den oben genannten Dezellularisierungstemperaturen nicht festgestellt. Bei den Proben nach der Dezellularisierung bei 56°C kam es zu einer ausgeprägten Beschädigung der ursprünglichen Faserstruktur. Die Anordnung zu Bündeln blieb erhalten. Die einzelnen Fasern konnten jedoch nicht mehr abgegrenzt werden und wirkten miteinander verschmolzen. Die Oberfläche der Fasern wirkte rau. Zwischen E_II und E_IS ließen sich bei keiner Dezellularisierungstemperatur Unterschiede in der Faserstruktur der Außenseiten feststellen.

In E_{II} zeigten sich die Außenseiten der Proben bei allen drei Dezellularisierungstemperaturen aufgelockert. Die Bündel konnten deutlich abgegrenzt werden. Die Fasern innerhalb der Bündel waren loser angeordnet, jedoch nicht beschädigt.

8.4 Zugfestigkeitsprüfung

Es werden jeweils die durchschnittlichen, sowie die medianen Zugfestigkeiten jeder Dezellularisierungstemperatur und Gruppe angegeben. Der Median ist im Vergleich zum Mittelwert robust gegenüber Ausreißern, weshalb die medianen Zugfestigkeiten für die Interpretation der Ergebnisse verwendet wurden. [114]

Native Proben: In E_I stammten die nativen Proben aus fünf unabhängigen Perikarden. Die Zugfestigkeiten dieser nativen Proben verwendeten wir als Vergleichswert, mit dem Veränderungen nach der Dezellularisierung verglichen werden konnten. Die Zugfestigkeit der nativen Proben lag bei den Proben mit Faserverlauf in Zugrichtung im Durchschnitt bei 9,88 N/mm² ($\pm 5,03$ N/mm²) und im Median bei 11,62 N/mm² und bei den Proben mit Faserverlauf 90° zur Zugrichtung im Durchschnitt bei 7,82 N/mm² ($\pm 5,88$ N/mm²) und im Median bei 8,80 N/mm². In E_{II} entnahmen wir die nativen Proben und die dezellularisierten Proben aus einem Perikard, wodurch ein direkter Vergleich möglich war. Die durchschnittliche Zugfestigkeit der nativen Proben lag hier bei 9,26 N/mm² ($\pm 4,22$ N/mm²) die mediane Zugfestigkeit bei 7,82 N/mm².

Dezellularisierte Proben: Nach der Dezellularisierung bei 4°C kam es bei den Proben mit Faserverlauf in Zugrichtung in der Gruppe E_II zu einer Zunahme mit einer durchschnittlichen Zugfestigkeit von 13,99 N/mm² ($\pm 5,90$ N/mm²) und einer medianen Zugfestigkeit von 15,33 N/mm². In E_IS betrug die Zugfestigkeit nach der Dezellularisierung im Durchschnitt 9,72 N/mm² ($\pm 4,55$ N/mm²) und im Median 10,74 N/mm². Bei den Proben nach der Dezellularisierung bei 13°C beobachteten wir in E_II eine Zunahme der Zugfestigkeit auf im Durchschnitt 12,89 N/mm² ($\pm 4,67$ N/mm²) und 14,12 N/mm² im Median. In E_IS zeigte sich nach der Dezellularisierung eine leichte Abnahme mit einer durchschnittlichen Zugfestigkeit von 9,11 N/mm² ($\pm 3,10$ N/mm²) und einer medianen Zugfestigkeit von 9,17 N/mm². Die Proben nach der Dezellularisierung bei 13°C zeigten in E_II eine Abnahme auf im Durchschnitt 7,61 N/mm² ($\pm 1,70$ N/mm²) und 8,29 N/mm² im Median. In E_IS ließ sich eine Zunahme auf im Durchschnitt 12,97 N/mm² ($\pm 4,25$ N/mm²) und 12,33 N/mm² im Median beobachten. Nach der Dezellularisierung bei 21°C kam es in der Gruppe E_II zu einer Zunahme der durchschnittlichen Zugfestigkeit auf 15,04 N/mm² ($\pm 8,66$ N/mm²) und der medianen Zugfestigkeit auf

15,21 N/mm². In E_IS betrug die Zugfestigkeit nach der Dezellularisierung im Durchschnitt 11,86 N/mm² ($\pm 5,60$ N/mm²) und im Median 10,34 N/mm². Die Proben nach der Dezellularisierung bei 29°C zeigten in E_II eine Zugfestigkeit von im Durchschnitt 11,55 N/mm² ($\pm 5,87$ N/mm²) und im Median von 10,86 N/mm². In E_IS lagen die Werte deutlich niedriger mit einer durchschnittlichen Zugfestigkeit von 6,64 N/mm² ($\pm 4,47$ N/mm²) und einer medianen Zugfestigkeit von 4,95 N/mm². Bei den Proben nach der Dezellularisierung bei 37°C beobachteten wir eine starke Abnahme der Zugfestigkeit in E_II und E_IS. Diese lag in E_II im Durchschnitt bei 4,92 N/mm² ($\pm 3,25$ N/mm²) und bei 5,38 N/mm² im Median, in E_IS im Durchschnitt bei 5,21 N/mm² ($\pm 2,74$ N/mm²) und bei 4,40 N/mm² im Median. Nach der Dezellularisierung bei 56°C konnten wir eine deutliche Abnahme der Zugfestigkeit mit einem durchschnittlichen Wert von 1,32 N/mm² ($\pm 0,37$ N/mm²) und einem medianen Wert von 1,42 N/mm² in Gruppe E_II und einem durchschnittlichen Wert von 1,78 N/mm² ($\pm 0,85$ N/mm²) und einem medianen Wert von 1,41 N/mm² in Gruppe E_IS beobachten. Für die Untersuchung der Temperaturabhängigkeit wurde eine Varianzanalyse mittels *ANOVA* durchgeführt. Dabei konnten signifikante Unterschiede zwischen den Zugfestigkeiten der Dezellularisierungstemperaturen in E_II ($p=0,0012$) und E_IS ($p=0,0014$) festgestellt werden. Die Abnahme der Zugfestigkeit nach der Dezellularisierung bei 56°C war zu den Zugfestigkeiten nach den Dezellularisierungen bei 4°C ($p=0,0076$), 13°C ($p=0,0179$), 21°C ($p=0,0033$) und 29°C ($p=0,0475$) in E_II sowie nach den Dezellularisierungen bei 4°C ($p=0,0471$), 13°C ($p=0,0018$) und 21°C ($p=0,0058$) in E_IS signifikant. In E_II und in E_IS konnte ein moderater linearer Zusammenhang zwischen den Dezellularisierungstemperaturen und der Zugfestigkeit bei einem R² von jeweils 0,52 festgestellt werden. Zwischen E_II und E_IS beobachteten wir bei den Dezellularisierungen bei 4°C, 13°C, 21°C und 29°C höhere durchschnittliche und mediane Zugfestigkeiten in E_II im Vergleich zu E_IS (siehe Abb. 23).

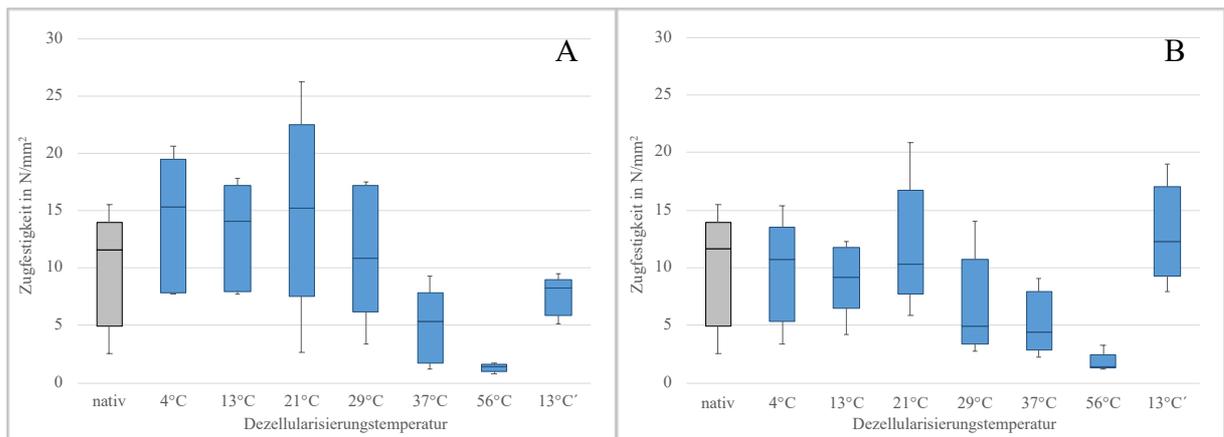


Abb. 23 Zugfestigkeit der Zugproben mit Faserverlauf in Zugrichtung in Abhängigkeit von der Dezellularisierungstemperatur in E_I

(A) und (B) Zugfestigkeiten in E_{I} und $E_{I,S}$.

Bei den Dezellularisierungen bei 4°C, 13°C, 21°C und 29°C zeigten sich höhere Zugfestigkeiten in E_{I} im Vergleich zu $E_{I,S}$. Die Dezellularisierung bei 56°C resultierte in einer starken Abnahme der Zugfestigkeit auf im Median 1,42 N/mm² in E_{I} und 1,41 N/mm² in $E_{I,S}$ (vgl. native Proben = 11,62 N/mm²).

In E_{II} zeigte sich bei allen drei Dezellularisierungstemperaturen eine leichte Zunahme der durchschnittlichen und medianen Zugfestigkeit (siehe Abb. 24). Diese betrug nach der Dezellularisierung bei 21°C im Durchschnitt 14,81 N/mm² ($\pm 7,75$ N/mm²) und im Median 12,11 N/mm², nach der Dezellularisierung bei 25°C im Durchschnitt 16,75 N/mm² ($\pm 11,11$ N/mm²) und im Median 15,44 N/mm² und nach der Dezellularisierung bei 29°C im Durchschnitt 11,57 N/mm² ($\pm 5,70$ N/mm²) und im Median 12,08 N/mm². Zwischen den drei Dezellularisierungstemperaturen konnte kein signifikanter Unterschied in den Veränderungen der Zugfestigkeit festgestellt werden. R^2 lag bei 0,06.

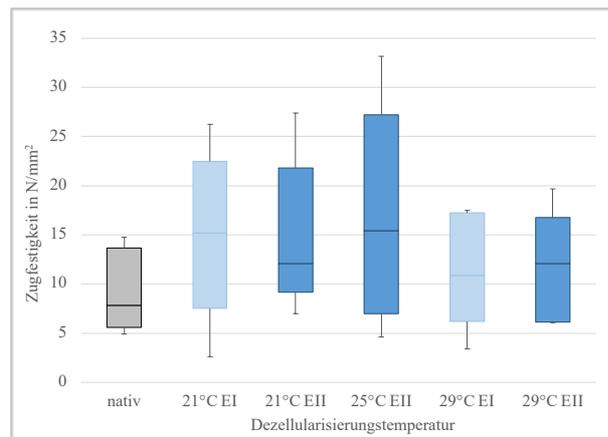


Abb. 24 Vergleich der Zugfestigkeiten der Zugproben mit Faserverlauf in Zugrichtung in Abhängigkeit von der Dezellularisierungstemperatur von E_I und E_{II}

Die dunkelblauen Kästen zeigen die Zugfestigkeit in E_{II} , die hellblauen Kästen zeigen zum Vergleich die Zugfestigkeit in E_I .

Bei allen drei Dezellularisierungstemperaturen in E_{II} zeigte sich eine Zunahme der Zugfestigkeit im Vergleich zur Nativprobe ($7,82 \text{ N/mm}^2$). Die mediane Zugfestigkeit lag bei der Dezellularisierung bei 21°C bei $12,11 \text{ N/mm}^2$, bei 25°C bei $15,44 \text{ N/mm}^2$ und bei 29°C bei $12,08 \text{ N/mm}^2$. Die Werte in E_{II} lagen dabei im Bereich der Werte in E_I .

Nach der Dezellularisierung bei 4°C wurde eine Zunahme der Zugfestigkeit bei den Proben mit Faserverlauf 90° zur Zugrichtung beobachtet. Die Zugfestigkeit lag in E_{II} im Durchschnitt bei $11,17 \text{ N/mm}^2$ ($\pm 5,54 \text{ N/mm}^2$) und im Median bei $11,61 \text{ N/mm}^2$, in E_{IS} im Durchschnitt bei $8,42 \text{ N/mm}^2$ ($\pm 4,11 \text{ N/mm}^2$) und im Median bei $9,15 \text{ N/mm}^2$. Die Proben nach der Dezellularisierung bei 13°C resultierten in E_{II} in einer Abnahme auf im Durchschnitt $5,90 \text{ N/mm}^2$ ($\pm 3,43 \text{ N/mm}^2$) und $6,66 \text{ N/mm}^2$ im Median. In E_{IS} kam es zu einer leichten Zunahme auf im Durchschnitt $8,65 \text{ N/mm}^2$ ($\pm 2,75 \text{ N/mm}^2$) und $10,18 \text{ N/mm}^2$ im Median. Die Proben nach der Dezellularisierung bei $13^\circ\text{C}'$ zeigten eine Abnahme auf im Durchschnitt $7,23 \text{ N/mm}^2$ ($\pm 3,63 \text{ N/mm}^2$) und im Median $7,63 \text{ N/mm}^2$ in E_{II} , sowie auf im Durchschnitt $7,02 \text{ N/mm}^2$ ($\pm 6,07 \text{ N/mm}^2$) und im Median $3,73 \text{ N/mm}^2$ in E_{IS} . Nach der Dezellularisierung bei 21°C kam es in E_{II} und in E_{IS} ebenfalls zu einer leichten Abnahme der Zugfestigkeit. Die Zugfestigkeit betrug in E_{II} im Durchschnitt $7,39 \text{ N/mm}^2$ ($\pm 4,10 \text{ N/mm}^2$) und $7,42 \text{ N/mm}^2$ im Median, in E_{IS} im Durchschnitt $6,76 \text{ N/mm}^2$ ($\pm 4,99 \text{ N/mm}^2$) und $6,25 \text{ N/mm}^2$ im Median. Die Zugfestigkeit der Proben nach der Dezellularisierung bei 29°C lag in E_{II} im Durchschnitt bei $5,03 \text{ N/mm}^2$ ($\pm 4,50 \text{ N/mm}^2$) und bei $3,14 \text{ N/mm}^2$ im Median, in E_{IS} im Durchschnitt bei $8,25 \text{ N/mm}^2$ ($\pm 7,34 \text{ N/mm}^2$) und bei $8,11 \text{ N/mm}^2$ im Median. Nach der Dezellularisierung bei 37°C kam es ebenfalls zu einer Abnahme auf einen durchschnittlichen Wert von $4,73 \text{ N/mm}^2$.

($\pm 3,31 \text{ N/mm}^2$) und einen medianen Wert von $3,57 \text{ N/mm}^2$ in E_II und einen durchschnittlichen Wert von $5,20 \text{ N/mm}^2$ ($\pm 3,10 \text{ N/mm}^2$) und einen medianen Wert von $4,92 \text{ N/mm}^2$ in E_IS. Die Dezellularisierung bei 56°C resultierte in einer starken Abnahme der Zugfestigkeit. Die Zugfestigkeit betrug in der Gruppe E_II im Durchschnitt $1,53 \text{ N/mm}^2$ ($\pm 0,52 \text{ N/mm}^2$) und $1,67 \text{ N/mm}^2$ im Median, in der Gruppe E_IS im Durchschnitt $1,53 \text{ N/mm}^2$ ($\pm 0,37 \text{ N/mm}^2$) und $1,54 \text{ N/mm}^2$ im Median. Die ANOVA zeigte lediglich zwischen den Dezellularisierungstemperaturen in E_II einen signifikanten Unterschied ($p=0,0235$) zwischen den Zugfestigkeiten der Proben 90° zum Faserverlauf. Dabei unterschieden sich die Zugfestigkeiten nach den Dezellularisierungen bei 4°C und 56°C ($p=0,0077$) signifikant voneinander. In E_II konnten wir mit einem Bestimmtheitsmaß R^2 von $0,39$ einen moderaten, in E_IS mit einem R^2 von $0,24$ einen schwachen linearen Zusammenhang feststellen. Zwischen den Gruppen E_II und E_IS beobachteten wir keine signifikanten Unterschiede.

9 Diskussion

Die Dezellularisierung von biologischem Gewebe ist ein vielversprechender Ansatz zur Herstellung von Trägermaterialien im Bereich der Regenerativen Medizin. [1, 9] Es existieren bereits eine Vielzahl von unterschiedlichen Dezellularisierungsprotokollen, dennoch konnten konstant erfolgreiche Dezellularisierungsergebnisse bislang nicht erzielt werden. [19-21] Ziel dieser Arbeit war deshalb die Optimierung eines Detergenzien-basierten Dezellularisierungsprotokolls für bovines Perikard. Dabei wurde die Abhängigkeit der Temperatur auf den Dezellularisierungsprozess untersucht und ein Temperaturoptimum definiert. Der zweite Fokus lag auf der Untersuchung der gekühlten Lagerung auf die Gewebeeigenschaften nach der Dezellularisierung. Da eine verzögerungsfreie Verarbeitung des Gewebes oft eine logistische Herausforderung darstellt, wurde die Kühlung der Proben für 24 Stunden bei 4°C vor der Dezellularisierung als mögliche Alternative untersucht.

Umgang mit biologischem Gewebe

Als Ausgangsmaterial wurde bovines Perikard verwendet. Vor allem im kardiovaskulären Bereich ist bovines Perikard das am meisten verwendete tierische Gewebe. Es besitzt eine hohe Verfügbarkeit und kann in großen Gewebestücken gewonnen werden, sodass es als Trägermaterial individuell an vielfältige Anforderungen angepasst werden kann. [47, 55] Zudem scheint es in seinem Gewebeaufbau und seinen Gewebeeigenschaften anderen tierischen Geweben überlegen zu sein. [53, 54] Die Perikarde wurden wie in vergleichbaren Arbeiten über Dezellularisierungsverfahren beim lokalen Schlachthof abgeholt. [20, 118] Die Transportzeit der Perikarde vom Schlachthof bis zur Weiterverarbeitung im Labor betrug maximal 30 Minuten. Xu et al. beschreiben in ihrer Arbeit im Vergleich dazu eine deutlich längere Transportzeit von 2 Stunden. [97] Zu Beginn der Verarbeitung musste das Perikard von anhaftendem Fett- und Myokardgewebe getrennt werden. Dafür wurde das anhaftende Gewebe schonend abgezogen, wodurch das Perikard nicht beschädigt wurde. [55, 119] Die zugeschnittenen Proben wurden zunächst mit PBS gewaschen und bis zur anschließenden Dezellularisierung ebenfalls in PBS gelagert. PBS ist durch seine isotonische Eigenschaft ein gängiges Medium für die Reinigung und Lagerung von biologischem Gewebe. [79, 81]

Einfluss der gekühlten Lagerung auf die Gewebeeigenschaften nach der DZ

Nach der Explantation der Perikarde aus dem Organismus kommt es zum Einsetzen von Abbauvorgängen im Gewebe. Durch die Unterversorgung des Gewebes mit Nährstoffen und Sauerstoff kommt es zu einer Zellschwellung mit Zelluntergang. [59, 60] Freie körpereigene Enzyme führen zudem zu einer Autolyse des Gewebes. [61, 62] Der Prozess der Autolyse verläuft temperaturabhängig und kann durch die Kühlung des Gewebes verlangsamt werden.

[61, 68] George et al. konnten anhand der histologischen Analyse von Fischkadavern aufzeigen, dass die Kühlung bei 4°C bis zu einer Lagerdauer von 24 Stunden die geeignetste Lagermethode für den Erhalt der Histoarchitektur des Gewebes darstellt. Ein besserer Erhalt konnte lediglich nach direkter Weiterverarbeitung des Gewebes beobachtet werden. [67]

Durch die Analyse der gelagerten Proben konnten wir beobachten, dass es durch die Lagerung zu Veränderungen in den Gewebeeigenschaften der Proben nach der Dezellularisierung kam. Durch Vergleich der beiden Gruppen E_II und E_IS zeigte sich bei den Dezellularisierungstemperaturen 21°C, 29°C und 37°C eine verstärkte Dickenzunahme der gelagerten Proben nach der Dezellularisierung. Diese lag bei den gelagerten Proben zwischen 59% und 67%, bei den nicht-gelagerten Proben zwischen 21% und 50%. Dieser Unterschied war bei den Dezellularisierungen bei 21°C ($p=0,0304$) und 37°C ($p=0,0305$) statistisch signifikant. Dieses Ergebnis steht dabei in Einklang mit den Beobachtungen von Viidik et al. Sie beschreiben eine signifikante Zunahme des Wassergehalts in Sehngewebe nach der 24-stündigen Lagerung bei 4°C. [120] In unserer Arbeit zeigte sich neben den Veränderungen in der Probendicke eine Abnahme der Zugfestigkeit durch die Lagerung. Dabei lag die mediane Zugfestigkeit bei allen Dezellularisierungstemperaturen unterhalb der Werte der nativen Proben sowie, mit Ausnahme der Dezellularisierung 13°C, unterhalb der nicht-gelagerten Proben. Stemper et al. beschreiben in ihrer Arbeit ebenfalls den negativen Einfluss der gekühlten Lagerung auf die mechanischen Eigenschaften von Weichgeweben und konnten zudem eine Überlegenheit des Einfrierens der Proben als alternative Lagermethode beobachten. [121, 122] Es existieren jedoch gegenteilige Studien, die ebenfalls Veränderungen der mechanischen Eigenschaften nach dem Einfrieren der Proben beschreiben, weshalb weitere Studien zur Untersuchung von Lagermethoden ergänzt werden sollten. [123, 124]

Veränderungen durch den Dezellularisierungsprozess

Die Ergebnisse unserer Arbeit zeigten weitere Veränderungen in den Gewebeeigenschaften der Proben nach der Dezellularisierung, welche vermutlich durch den Dezellularisierungsprozess selbst bedingt wurden. So konnte bei allen Proben eine Zunahme der Probendicke durch den Dezellularisierungsprozess beobachtet werden. Courtman et al. bringen das Aufquellen der Proben mit der Dezellularisierung mit SDS in Verbindung. SDS bindet während der Dezellularisierung an Proteine und überträgt dabei negative Ladungen, wodurch das Gewebe vermehrt Wasser binden kann. [55] Diese Hypothese wird von Xu et al. unterstützt. Sie konnten eine erhöhte Wasseraufnahmekapazität des Gewebes nach der Dezellularisierung mit SDS messen. [97] Bei der Analyse der Ergebnisse zeigte sich zudem eine Zunahme der medianen Zugfestigkeit der Proben bei den Dezellularisierungen bei 4°C, 13°C und 21°C. Diese Zunahme wurde bei der Dezellularisierung mit SD und SDS bereits beschrieben. [125]

Untersuchung der Temperaturabhängigkeit des Dezellularisierungsprozesses

Die Temperatur ist vor allem durch ihren Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften des Gewebes ein wichtiger zu berücksichtigender Faktor bei Dezellularisierungsprozessen. Dennoch werden viele Dezellularisierungsprotokolle bei 37°C durchgeführt, um eine hohe Enzym- und Detergenzaktivität zu erzielen. [126] Nakyama et al. und Fischer et al. haben bereits die Dezellularisierung von Nierengewebe mit SD und SDS bei unterschiedlichen Temperaturen getestet. Sie konnten bezüglich der Dezellularisierungseffektivität und dem Erhalt der EZM Unterschiede zwischen den Dezellularisierungen bei 4°C, Raumtemperatur und 37°C beobachten. [86, 87] In unserer Arbeit wurde erstmals der Einfluss der Temperatur auf die Dezellularisierung von bovinem Perikard untersucht. Insgesamt führten wir in E_I Dezellularisierungen bei sechs, in E_{II} bei drei unterschiedlichen Temperaturen durch. Die 4°C und 37°C in E_I wurden aus bereits veröffentlichten Studien zur Untersuchung der Temperaturabhängigkeit von Dezellularisierungsprozessen übernommen. [86, 87] Zur Ermittlung einer Abhängigkeitskurve legten wir drei weitere Temperaturen im Bereich zwischen 4°C und 37°C mit Temperaturintervallen von jeweils 8°C/9°C fest: 13°C, 21°C und 29°C. Wir führten zudem eine Dezellularisierung oberhalb der Denaturierungsgrenze bei 56°C durch, um eine bewusste Denaturierung des Gewebes zu provozieren und die Eigenschaften denaturierten Gewebes zu untersuchen. Das Ziel in E_{II} war die Definition eines Temperaturoptimums für das von uns verwendete Dezellularisierungsprotokoll. Hierzu wurden die beiden Temperaturen mit den besten Ergebnissen hinsichtlich der Dezellularisierungseffektivität und dem Erhalt der EZM aus E_I ausgewählt. Um das Temperaturoptimum genau definieren zu können, wurde das Temperaturintervall zudem auf 4°C reduziert, wodurch sich die Dezellularisierungstemperaturen 21°C, 25°C und 29°C ergaben.

Wir konnten mit unserer Arbeit den Einfluss der Temperatur auf die Dezellularisierungseffektivität und den Erhalt der EZM zeigen. Dieser Einfluss folgte dabei einem bogenförmigen Verlauf. So kam es zunächst mit steigenden Temperaturen zu einer Zunahme der Dezellularisierungseffektivität mit dem Maximum bei 21°C. Hier erfolgte eine komplette Dezellularisierung der Proben. Die Dezellularisierungen bei 29°C und 37°C zeigten dagegen erneut eine Abnahme der Dezellularisierungseffektivität und eine unvollständige Dezellularisierung. Diese Ergebnisse wurden durch den Vergleich mit in E_{II} bestätigt. Die maximale Dezellularisierung konnte hier ebenfalls bei 21°C gemessen werden. Die Dezellularisierungen bei 25°C und 29°C resultierten in schlechteren Dezellularisierungsergebnissen. Starnecker et al. beschreiben in ihrer Arbeit als Ursache einer unvollständigen Dezellularisierung die unzureichende Eindringtiefe der Detergenzien. [88] Die Auswertung unserer Ergebnisse ergab demgegenüber eine unzureichende Wirkung der

Detergenzien. In E_{II} wurde zur Untersuchung von Gewebeeigenschaften und deren Einfluss auf die Dezellularisierung die Zellkerndichten gemessen. Die Messung erfolgte an den nativen Proben und den unvollständig dezellularisierten Proben. Durch den Vergleich der Zellkerndichten einer Probe vor und nach der Dezellularisierung zeigte sich eine Abnahme der Zellkerndichte durch die Dezellularisierung. Diese war bei den Dezellularisierungen bei 21°C und 25°C bei allen fünf Perikarden statistisch signifikant. Bei der Dezellularisierung bei 29°C konnte ebenfalls eine Abnahme beobachtet werden, welche bei drei der fünf Perikarde statistisch signifikant war. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass das Detergenz erfolgreich das Perikard durchdringen konnte, die dezellularisierende Wirkung im Probeninneren jedoch nicht ausreichte, um eine komplette Dezellularisierung zu bewirken. Ein Denkansatz ist die Erhöhung der Detergenzien-Konzentration, wobei berücksichtigt werden sollte, dass die Beschädigung der EZM durch SDS mit zunehmender Konzentration zunimmt. [10] Den Einfluss der Temperatur auf den Erhalt der EZM zeigte die Analyse der histologischen Schnitte in der H.E.-Färbung. Die EZM nach der Dezellularisierung bei 21°C und 29°C war im Vergleich zu den anderen Temperaturen am besten erhalten. Die Basalmembran auf der Innenseite der Proben war bei allen Proben durchgängig, die EZM war mit Ausnahme eines Perikardes kompakt. Lediglich in jeweils einer Probe zeigte sich die EZM auf der Außenseite leicht aufgelockert mit vereinzelt kleinen Lücken. Die EZM der Proben nach der Dezellularisierung bei 13°C ergaben ähnlich gute Ergebnisse. Lediglich bei einem Perikard waren mehrere kleine Brüche entlang der Basalmembran zu erkennen. Durch die Dezellularisierungen bei 4°C und 37°C kam es dagegen zu ausgeprägteren Veränderungen in der EZM. Die EZM war deutlich aufgelockert und die Basalmembran der Proben überwiegend undurchgängig. Die Rasterelektronenmikroskopie wurde unterstützend zur Beurteilung der EZM eingesetzt. Die freigelegten Fasern auf der Innenseite der Proben zeigten sich bei allen Dezellularisierungstemperaturen unbeschädigt. Die Außenseiten der Proben der nativen Perikarde wiesen eine kompakte Anordnung der Fasern auf. Diese wurde durch die Dezellularisierung aufgelockert. Dabei ließen sich Unterschiede zwischen den Dezellularisierungstemperaturen feststellen, wobei sich die stärksten Veränderungen nach der Dezellularisierung bei 4°C beobachten ließen, gefolgt von der Dezellularisierung bei 37°C. Die Proben nach den Dezellularisierungen bei 13°C, 21°C und 29°C wiesen lediglich eine leichte Auflockerung der Faserstruktur auf.

Durch die Zusammenschau aller Ergebnisse unserer Arbeit konnten wir für die Dezellularisierung von bovinem Perikard ein Temperaturoptimum bei 21°C definieren. Verglichen mit den anderen Temperaturen resultierte die Dezellularisierung bei 21°C in der höchsten Dezellularisierungseffektivität und dem besten Erhalt der EZM. In E_I wurden alle Perikarde komplett dezellularisiert. In E_{II} zeigten sich ebenfalls die höchsten

Dezellularisierungsergebnisse verglichen mit den Dezellularisierungen bei 25°C und 29°C. Die EZM präsentierte sich in der H.E.-Färbung und der REM am besten erhalten. Lediglich im Kollagengehalt ließ sich in E_I eine Abnahme beobachten. Diese zeigte sich in E_{II} deutlich geringer, sollte dennoch beachtet und in anschließenden Studien berücksichtigt werden.

Pagoulatou et al. beschreiben eine Abnahme der mechanischen Zugfestigkeit nach der Dezellularisierung von bovinem Perikard bei 37°C. Als mögliche Ursache ziehen sie dabei die hohe Dezellularisierungstemperatur in Betracht. [119] Wir konnten ebenfalls niedrigere mediane Zugfestigkeiten nach der Dezellularisierung bei 29°C und 37°C beobachten, weshalb wir die Vermeidung hoher Temperaturen während des Dezellularisierungsprozesses empfehlen. Bei der Dezellularisierung bei 29°C traten diese lediglich bei den gelagerten Proben auf. Wir vermuten deshalb, dass die Lagerung dazu führen kann, dass die negativen Einflüsse hoher Dezellularisierungstemperaturen auf die mechanischen Eigenschaften des Gewebes bereits bei niedrigeren Dezellularisierungstemperaturen einsetzen oder diese verstärkt werden.

Auswertung des Kollagengehalts mittels Image J

Zur Beurteilung der EZM wurde zusätzlich zur H.E.-Färbung und REM die Pikrosirius-Rot-Färbung verwendet. Mit Hilfe des Computerprogramms Image J war es möglich, Veränderungen im Kollagengehalt durch den Dezellularisierungsprozess zu quantifizieren. Bei den Dezellularisierungen bei 4°C und 13°C in E_II wurde der Kollagengehalt durch die Dezellularisierung nicht verändert. Nach der Dezellularisierung bei 13°C in E_IS und nach den Dezellularisierungen bei 13°C', 21°C, 37°C und 56°C zeigte sich eine Abnahme, welche bei 13°C' in E_IS, sowie bei 21°C und 56°C statistisch signifikant war. Die Proben nach der Dezellularisierung bei 29°C resultierten in einer Zunahme im relativen Kollagengehalt. Diese wurde nach der Dezellularisierung mit SD und SDS bereits beschrieben. [127] Ein bereits in der Literatur beschriebener Erklärungsansatz ist die Veränderung der Kollagen-Ratio durch das Herauslösen zellulärer Strukturen während der Dezellularisierung. In den Nativproben wurde vermutlich ein Teil der Kollagenfasern von Zellen überlagert. Durch das Herauslösen der Zellen durch die Dezellularisierung wurde dieser Teil sichtbar und der Anteil von sichtbarem Kollagen gegenüber den anderen Strukturen im Gewebe nahm zu. [55, 128] Ein zweiter Erklärungsansatz vermuteten wir in der Heterogenität von biologischem Gewebe. Die nativen Proben und die Proben nach der Dezellularisierung wurden aus unterschiedlichen Bereichen im Perikard gewonnen, da für die Bestimmung des Kollagengehalts histologische Schnitte benötigt wurden. Es erscheint daher möglich, dass Unterschiede im Kollagengehalt innerhalb eines Perikardes existierten, wodurch eine scheinbare Zunahme im Kollagengehalt gemessen wurde. [129, 130]

Untersuchung von Gewebeeigenschaften und deren Einfluss auf die DZ

Nakayama et al. beschreiben in ihrer Arbeit einen Einfluss des Tialters und damit einhergehende Unterschiede in der Zusammensetzung von Zellen und der EZM des Gewebes auf die Dezellularisierung. [86] Bei der Analyse der Dezellularisierung bei 13°C' zeigten sich Auffälligkeiten an den dezellularisierten Proben. Um temperaturbedingte Veränderungen auszuschließen wurde die Dezellularisierung bei 13°C wiederholt, wobei die Veränderungen nicht reproduziert werden konnten. Zur besseren Unterscheidung wurde der erste Dezellularisierungsdurchlauf bei 13°C in den Ergebnissen als 13°C` beschrieben. Durch den Vergleich der Ergebnisse beider Dezellularisierungsdurchläufe bestätigte sich der Verdacht des Einflusses von Gewebeeigenschaften auf die Dezellularisierung. Beobachtet wurden eine deutlich verstärkte Dickenzunahme und eine herabgesetzte Dezellularisierungseffektivität bei 13°C' bei dünneren Perikarden vor der Dezellularisierung. In E_{II} wurden deshalb weitere Gewebeeigenschaften und deren Einfluss auf die Dezellularisierung untersucht. Gemessen wurden die Kollagendichten und die Zellkerndichten der nativen Perikarde. Dabei zeigten sich Unterschiede zwischen den Perikarden. Eine Korrelation mit der Dezellularisierungseffektivität und dem Erhalt der EZM konnte allerdings nicht festgestellt werden. Der Vergleich der Dezellularisierungseffektivitäten zwischen E_I und E_{II} ließ vermuten, dass weitere Faktoren teils starken Einfluss auf die Dezellularisierung haben. Dabei ließen sich in E_{II} Dezellularisierungsergebnisse von mehr als 45% unter denen in E_I beobachten. Unterschiede in den Gewebeeigenschaften konnten wir mit den verwendeten Analysemethoden nicht feststellen. In anschließenden Studien könnten weitere Gewebeeigenschaften und deren Einfluss auf die Dezellularisierung untersucht werden. Allgemein empfehlen wir die Definition strenger Kriterien bei der Verwendung von biologischem Material und stehen dabei im Einklang mit den Empfehlungen von Grefen et al. [20]

10 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit untersuchten wir den Einfluss der gekühlten Lagerung des Gewebes vor der Dezellularisierung auf die Gewebeschaffenheit nach der Dezellularisierung. Zudem wurde der Einfluss der Dezellularisierungstemperatur auf den Dezellularisierungsprozess getestet. Basierend auf diesen Ergebnissen formulierten wir ein Temperaturoptimum für die Dezellularisierung von bovinem Perikard.

Bei der Lagerung der Proben zeigten sich im Vergleich zur direkten Weiterverarbeitung bei einigen Dezellularisierungstemperaturen eine verstärkte Dickenzunahme, sowie insgesamt eine Abnahme in der medianen Zugfestigkeit der Proben. Wir konnten somit zeigen, dass die Lagerung der Proben zu Veränderungen in der Gewebeschaffenheit der Proben nach der Dezellularisierung führte und empfehlen deshalb eine direkte Weiterverarbeitung des Gewebes nach der Schlachtung. Nach der Dezellularisierung konnten wir zudem Veränderungen im Gewebe beobachten, welche vermutlich durch den Dezellularisierungsprozess selbst bedingt wurden. Die gelagerten Proben wiesen dabei insgesamt eine erhöhte Probendicke und bei einigen Dezellularisierungstemperaturen eine verminderte Zugfestigkeit nach den Dezellularisierungen auf. Des Weiteren konnten wir einen Einfluss der Dezellularisierungstemperatur auf die Dezellularisierungseffektivität und den Erhalt der EZM darstellen. Dabei zeigte sich eine bogenförmige Abhängigkeit, welche in der DAPI-Färbung, der H.E.-Färbung und der REM beobachtet wurde. Durch die Analyse beider Experimente E_I und E_{II} definierten wir für die Dezellularisierung von bovinem Perikard das Temperaturoptimum bei 21°C. Hier zeigte sich die höchste Dezellularisierungseffektivität bei gleichzeitig bestem Erhalt der EZM. Zusätzlich beobachteten wir einen Zusammenhang zwischen einer verminderten Probendicke vor der Dezellularisierung und einer erhöhten Dickenzunahme der Proben nach der Dezellularisierung, sowie einer verminderten Dezellularisierungseffektivität. Deshalb vermuteten wir einen Einfluss von Gewebeeigenschaften auf die Dezellularisierungseffektivität und das Gewebe nach der Dezellularisierung. Bei der Untersuchung der Gewebeeigenschaften nativer Perikarde zeigten sich Unterschiede bezüglich des Kollagengehalts und der Zellkerndichte. Es ergab sich jedoch keine Korrelation zur Dezellularisierungseffektivität und zum Erhalt der EZM nach der Dezellularisierung. Wir vermuten dennoch weitere Gewebefaktoren mit Einfluss auf den Dezellularisierungsprozess, welche mit den von uns verwendeten Analysemethoden nicht dargestellt werden konnten. Wir empfehlen deshalb in fortführenden Studien die Ergänzung weiterer Analysemethoden sowie die Definition strenger Kriterien bei der Verwendung biologischen Materials.

In Zusammenschau der Ergebnisse dieser Arbeit konnten wir aufzeigen, dass die Kühlung der Proben vor der Dezellularisierung keine gleichwertige Alternative zur verzögerungsfreien Weiterverarbeitung des Gewebes darstellt. Da eine direkte Weiterverarbeitung vor allem in der Serienproduktion eine enorme Herausforderung darstellen kann, könnten hier weiterführende Studien zur Untersuchung anderer Lagermethoden, wie das Einfrieren des Gewebes, erfolgen. Des Weiteren zeigte sich, dass die Berücksichtigung der Dezellularisierungstemperatur obligat ist, um maximale Dezellularisierungsergebnisse zu erzielen. Für die zuverlässige Herstellung konstant azellulärer Trägermaterialien sollten jedoch noch weitere Faktoren und deren Einfluss auf die Dezellularisierung untersucht werden. Diese könnten zum einen den Dezellularisierungsprozess selbst betreffen. Daneben haben vermutlich die Gewebeeigenschaften des biologischen Materials wie Alter oder Geschlecht der Tiere erheblichen Einfluss auf den Dezellularisierungsprozess. Ebenfalls Unterschiede bezüglich Tierrassen oder dem Gesundheitszustand der Tiere sind denkbar.

Die Dezellularisierung von bovinem Perikard ist aufgrund der vielen Einflussfaktoren ein komplexes Thema. Mit der Untersuchung der Lagerung und dem Einfluss der Dezellularisierungstemperatur auf den Dezellularisierungsprozess konnten wir einen Beitrag zur Optimierung des Dezellularisierungsprotokolls für bovines Perikard leisten. Die Empfehlung zur verzögerungsfreien Verarbeitung des Gewebes nach der Schlachtung sowie die Durchführung der Dezellularisierung bei 21°C tragen bereits maßgeblich zur Materialverbesserung bei. Eine weitere Optimierung zur Gewährleistung des Qualitätsanspruchs in der Implantationsmedizin ist nötig. Dennoch ist dezellularisiertes Perikard schon heute ein hochpotentes und vielseitig einsetzbares Hilfsmittel im Bereich der regenerativen Medizin.

11 Literaturverzeichnis

1. Vacanti, J. and Vacanti, C.A., *The History and Scope of Tissue Engineering*, in *Principles of Tissue Engineering* R. Lanza, R. Langer, and J. Vacanti, Editors. 2014, Academic Press: Burlington. p. 3-5.
2. Berthiaume, F., Maguire, T.J., and Yarmush, M.L., *Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress, and challenges*. Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering, 2011. 2: p. 403-430.
3. Garreta, E., et al., *Tissue engineering by decellularization and 3D bioprinting*. Materials Today, 2017. 20(4): p. 166-178.
4. Mason, C. and Dunnill, P., *A brief definition of regenerative medicine*. Regen. Med., 2008. 3(1): p. 1-5.
5. Mao, A.S. and Mooney, D.J., *Regenerative medicine: Current therapies and future directions*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015. 112(47): p. 14452-14459.
6. Koh, C.J. and Atala, A., *Tissue engineering, stem cells, and cloning: opportunities for regenerative medicine*. Journal of the American Society of Nephrology, 2004. 15(5): p. 1113-1125.
7. Huebsch, N. and Mooney, D.J., *Inspiration and application in the evolution of biomaterials*. Nature, 2009. 462(7272): p. 426-432.
8. Hodde, J., *Naturally occurring scaffolds for soft tissue repair and regeneration*. Tissue Engineering, 2002. 8(2): p. 295-308.
9. Breuer, C.K., et al., *Application of tissue-engineering principles toward the development of a semilunar heart valve substitute*. Tissue Engineering 2004. 10(11-12): p. 1725-1736.
10. Gilpin, A. and Yang, Y., *Decellularization Strategies for Regenerative Medicine: From Processing Techniques to Applications*. BioMed Research International, 2017. 2017: p. 9831534, 13 pages.
11. Badylak, S.F., Taylor, D., and Uygun, K., *Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds*. Annual Review of Biomedical Engineering, 2011. 13: p. 27-53.
12. Inoue, H., et al., *Right hemi-reconstruction of the left atrium using two equine pericardial patches for recurrent malignant fibrous histiocytoma: report of a case*. Surgery Today, 2009. 39(8): p. 710-712.
13. Shinn, S.H., et al., *Results of annular reconstruction with a pericardial patch in active infective endocarditis*. The Journal of Heart Valve Disease, 2009. 18(3): p. 315-320.
14. Nistal, F., et al., *Comparative study of primary tissue valve failure between Ionescu-Shiley pericardial and Hancock porcine valves in the aortic position*. The American Journal of Cardiology, 1986. 57(1): p. 161-164.
15. Pelletier, L.C., et al., *Porcine versus pericardial bioprostheses: a comparison of late results in 1,593 patients*. The Annals of Thoracic Surgery, 1989. 47(3): p. 352-361.
16. Masuda, M., et al., *Comparison of long-term results between Hancock porcine bioprosthesis and Carpentier-Edwards pericardial bioprosthesis in the aortic and the mitral positions*. Journal of Artificial Organs, 2001. 4(3): p. 226-230.

17. Gilbert, T.W., Sellaro, T.L., and Badylak, S.F., *Decellularization of tissues and organs*. Biomaterials, 2006. 27(19): p. 3675-3683.
18. Crapo, P.M., Gilbert, T.W., and Badylak, S.F., *An overview of tissue and whole organ decellularization processes*. Biomaterials, 2011. 32(12): p. 3233-3243.
19. Rieder, E., et al., *Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells*. The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, 2004. 127(2): p. 399-405.
20. Grefen, L., et al., *Pericardial tissue for cardiovascular application: an in-vitro evaluation of established and advanced production processes*. Journal of Material Science: Materials in Medicine, 2018. 29(11): p. 172.
21. Gilbert, T.W., Freund, J.M., and Badylak, S.F., *Quantification of DNA in biologic scaffold materials*. Journal of Surgical Research, 2009. 152(1): p. 135-139.
22. Bairlein, F., *Wachstum: Eskalation, Steuerung und Grenzen: Verhandlungen der Gesellschaft Deutscher Naturforscher und Ärzte eV: 125. Versammlung, 19.-22. September 2008 in Tübingen*. Vol. 125. 2009: Georg Thieme Verlag. p. 171.
23. Haseltine, W.A., *The Emergence of Regenerative Medicine: A New Field and a New Society*. e-biomed: The Journal of Regenerative Medicine, 2001. 2(4): p. 17-23.
24. Yang, S., et al., *The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors*. Tissue Engineering, 2001. 7(6): p. 679-689.
25. Mendelson, K. and Schoen, F.J., *Heart valve tissue engineering: concepts, approaches, progress, and challenges*. Annals of Biomedical Engineering, 2006. 34(12): p. 1799-1819.
26. Bioengineering, N.I.o.B.I.a. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. o.J. [cited 09.10.2018; Available from: <https://www.nibib.nih.gov/science-education/science-topics/tissue-engineering-and-regenerative-medicine>.
27. Langer, R. and Vacanti, J.P., *Tissue engineering*. Science, 1993. 260(5110): p. 920-926.
28. Luo, Y., et al., *Three-Dimensional Scaffolds*, in *Principles of Tissue Engineering* R. Lanza, R. Langer, and J. Vacanti, Editors. 2014, Academic Press: Burlington. p. 475-486.
29. MacNeil, S., *Progress and opportunities for tissue-engineered skin*. Nature, 2007. 445(7130): p. 874-880.
30. Plotner, A.N. and Mostow, E.N., *A review of bioactive materials and chronic wounds*. Cutis, 2010. 85(5): p. 259-266.
31. Horch, R.E., et al., *Tissue engineering of cultured skin substitutes*. Journal of cellular and molecular medicine, 2005. 9(3): p. 592-608.
32. Germain, L., et al., *Can we produce a human corneal equivalent by tissue engineering?* Progress in Retinal Eye Research, 2000. 19(5): p. 497-527.
33. Roberts, S.J., et al., *Clinical applications of musculoskeletal tissue engineering*. British medical bulletin, 2008. 86(1): p. 7-22.
34. Risbud, M.V. and Sittinger, M., *Tissue engineering: advances in in vitro cartilage generation*. Trends Biotechnology, 2002. 20(8): p. 351-356.
35. Kulig, K.M. and Vacanti, J.P., *Hepatic tissue engineering*. Transplant Immunology, 2004. 12(3-4): p. 303-310.

36. Allen, J.W. and Bhatia, S.N., *Engineering liver therapies for the future*. Tissue Engineering, 2002. 8(5): p. 725-737.
37. Kobayashi, N., *Bioartificial Pancreas for the Treatment of Diabetes*. Cell Transplantation, 2008. 17(1-2): p. 11-17.
38. Rastogi, A. and Nissenson, A.R., *Technological advances in renal replacement therapy: five years and beyond*. Clinical Journal of the American Society of Nephrology, 2009. 4 p. S132-S136.
39. Sacks, M.S., Schoen, F.J., and Mayer, J.E., *Bioengineering challenges for heart valve tissue engineering*. Annual Review of Biomedical Engineering, 2009. 11: p. 289-313.
40. Sarraf, C.E., et al., *Tissue Engineering of Biological Cardiovascular System Surrogates*. Heart Lung & Circulation, 2002. 11(3): p. 142-150.
41. Zimmermann, W.H. and Eschenhagen, T., *Cardiac tissue engineering for replacement therapy*. Heart Failure Reviews, 2003. 8(3): p. 259-269.
42. Bouten, C.V., et al., *Substrates for cardiovascular tissue engineering*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2011. 63(4-5): p. 221-241.
43. Kim, B. and Mooney, D.J., *Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering*. Trends in biotechnology, 1998. 16(5): p. 224-230.
44. Hopkins, R.A., *Tissue engineering of heart valves: decellularized valve scaffolds*. Circulation, 2005. 111(21): p. 2712-2714.
45. Bajaj, P., et al., *3D biofabrication strategies for tissue engineering and regenerative medicine*. Annual Review of Biomedical Engineering, 2014. 16: p. 247-276.
46. Braun, K.F., et al., *Was gibt es Neues bei Gewebeersatz und Tissue-Engineering in der Unfallchirurgie?*, in *Was gibt es Neues in der Chirurgie? Berichte zur chirurgischen Fort- und Weiterbildung*, K. Meßmer, J. Jähne, and P. Neuhaus, Editors. 2011, ecomed-Storck GmbH. p. 32.
47. Lam, M.T. and Wu, J.C., *Biomaterial applications in cardiovascular tissue repair and regeneration*. Expert review of cardiovascular therapy, 2012. 10(8): p. 1039-1049.
48. Mendoza-Novelo, B., et al., *Decellularization of pericardial tissue and its impact on tensile viscoelasticity and glycosaminoglycan content*. Acta Biomaterialia, 2011. 7(3): p. 1241-1248.
49. Lüllmann-Rauch, R. and Asan, E., *Taschenlehrbuch Histologie* Vol. 6. 2019, Stuttgart: Georg Thieme Verlag. p. 20-23, 147-167, 323.
50. Deller, T., Welsch, U., and Kummer, W., *Histologie-Das Lehrbuch*. 5. Auflage ed. 2018: Elsevier Health Sciences. p. 15-19, 22, 35, 93-98, 118, 122-128.
51. van der Rest, M. and Garrone, R., *Collagen family of proteins*. The FASEB Journal, 1991. 5(13): p. 2814-2823.
52. Chung, M.I.S., et al., *Sequences and domain structures of mammalian, avian, amphibian and teleost tropoelastins: Clues to the evolutionary history of elastins*. Matrix Biology, 2006. 25(8): p. 492-504.
53. Liao, K., et al., *Bovine pericardium versus porcine aortic valve: comparison of tissue biological properties as prosthetic valves*. Artificial Organs, 1992. 16(4): p. 361-365.
54. Braga-Vilela, A.S., et al., *Extracellular matrix of porcine pericardium: biochemistry and collagen architecture*. The Journal of Membrane Biology, 2008. 221(1): p. 15-25.

55. Courtman, D.W., et al., *Development of a pericardial acellular matrix biomaterial: biochemical and mechanical effects of cell extraction*. Journal of Biomedical Materials Research, 1994. 28(6): p. 655-666.
56. Bommas-Ebert, U., Teubner, P., and Voß, R., *Kurzlehrbuch Anatomie und Embryologie*. Vol. 2. 2006, Stuttgart: Georg Thieme Verlag. p. 289.
57. kompakt, M. *Herzwand (Herzschichten)*. o.J. [cited 20.05.2020; Available from: <http://www.krug-markus.de/wp-content/uploads/2010/11/Herzschichten.jpg>.
58. Wagener, C. and Müller, O., *Molekulare Onkologie*. 3 ed. 2010: Georg Thieme Verlag. p. 285.
59. Sterne, G.D., Titley, O.G., and Christie, J.L., *A qualitative histological assessment of various storage conditions on short term preservation of human split skin grafts*. British Journal of Plastic Surgery, 2000. 53(4): p. 331-336.
60. Madea, B. and Mußhoff, F., *Basiswissen Rechtsmedizin*. 2007: Springer Berlin Heidelberg. p. 77f.
61. Sorg, M.H. and Haglund, W.D., *Forensic Taphonomy: The Postmortem Fate of Human Remains*. 1996: Taylor & Francis. p. 153-160.
62. Schotsmans, E.M.J., Márquez-Grant, N., and Forbes, S.L., *Taphonomy of Human Remains: Forensic Analysis of the Dead and the Depositional Environment*. 2017: Wiley. p. 27.
63. Cocariu, E.A., et al., *Correlations Between the Autolytic Changes and Postmortem Interval in Refrigerated Cadavers*. Romanian Journal of Internal Medicine, 2016. 54(2): p. 105-112.
64. Karadzic, R., et al., *Autolytic ultrastructural changes in rat and human hepatocytes*. Romanian Journal of Legal Medicine, 2010. 18: p. 247-252.
65. Hostiuic, S., et al., *Usefulness of ultrastructure studies for the estimation of the postmortem interval. A systematic review*. Romanian Journal of Morphology and Embryology, 2017. 58(2): p. 377-384.
66. Christen, P., Jaussi, R., and Benoit, R., *Biochemie und Molekularbiologie*. Vol. 1. 2016: Springer Spektrum. p. 36f., 50.
67. George, J., et al., *Histopathologic evaluation of postmortem autolytic changes in bluegill (*Lepomis macrochirus*) and crappie (*Pomoxis anularis*) at varied time intervals and storage temperatures*. PeerJ, 2016. 4: p. e1943.
68. Roessner, A., Pfeifer, U., and Müller-Hermelink, H.K., *Allgemeine Pathologie und Grundlagen der Speziellen Pathologie*. 2008: Elsevier, Urban&Fischer-Verlag. p. 12.
69. Schmidt, C.E. and Baier, J.M., *Acellular vascular tissues: natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering*. Biomaterials, 2000. 21(22): p. 2215-2231.
70. Richter, G., *Praktische Biochemie: Grundlagen und Techniken; 19 Tabellen*. 2003: Georg Thieme Verlag. p. 34-36.
71. Kragh-Hansen, U., le Maire, M., and Møller, J.V., *The mechanism of detergent solubilization of liposomes and protein-containing membranes*. Biophysical Journal, 1998. 75(6): p. 2932-2946.
72. Nazari, M., Kurdi, M., and Heerklotz, H., *Classifying surfactants with respect to their effect on lipid membrane order*. Biophysical Journal 2012. 102(3): p. 498-506.

73. Hiemenz, P.C. and Rajagopalan, R., *Principles of Colloid and Surface Chemistry*. 1997, Boca Raton, United Kingdom: CRC Press LLC. p. 359.
74. Kim, H. and Lim, K., *A model on the temperature dependence of critical micelle concentration*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2004. 235(1): p. 121-128.
75. Flockhart, B.D., *The effect of temperature on the critical micelle concentration of some paraffin-chain salts*. *Journal of Colloid Science*, 1961. 16(5): p. 484-492.
76. Kasimir, M.T., et al., *Comparison of different decellularization procedures of porcine heart valves*. *The International Journal of Artificial Organs*, 2003. 26(5): p. 421-427.
77. Beck, A., et al., *Additive Action of Two or More Solutes on Lipid Membranes*. *Langmuir*, 2008. 24(16): p. 8833-8840.
78. Zhou, J., et al., *Impact of heart valve decellularization on 3-D ultrastructure, immunogenicity and thrombogenicity*. *Biomaterials*, 2010. 31(9): p. 2549-2554.
79. Syazwani, N., et al., *Decellularization of Aorta Tissue Using Sonication Treatment as Potential Scaffold for Vascular Tissue Engineering*. *Journal of Medical and Biological Engineering*, 2015. 35(2): p. 258-269.
80. Yusof, F., Sha'ban, M., and Azhim, A., *Development of decellularized meniscus using closed sonication treatment system: potential scaffolds for orthopedics tissue engineering applications*. *International Journal of Nanomedicine*, 2019. 14: p. 5491-5502.
81. Azhim, A., et al., *The use of sonication treatment to decellularize aortic tissues for preparation of bioscaffolds*. *Journal of Biomaterials Applications*, 2014. 29(1): p. 130-141.
82. Cebotari, S., et al., *Detergent decellularization of heart valves for tissue engineering: toxicological effects of residual detergents on human endothelial cells*. *Artificial Organs*, 2010. 34(3): p. 206-210.
83. Montes, G.S. and Junqueira, L.C., *The use of the Picrosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1991. 86 Suppl 3: p. 1-11.
84. Holzapfel, G.A., *Biomechanics of soft tissue*. *The handbook of materials behavior models*, 2001. 3: p. 1049-1063.
85. Stüwe, H.P., *Mechanische Anisotropie*. 2013: Springer-Verlag. p. 1.
86. Nakayama, K.H., et al., *Decellularized rhesus monkey kidney as a three-dimensional scaffold for renal tissue engineering*. *Tissue Engineering. Part A*, 2010. 16(7): p. 2207-2216.
87. Fischer, I., et al., *Comparative characterization of decellularized renal scaffolds for tissue engineering*. *Biomedical Materials*, 2017. 12(4): p. 1-11.
88. Starnecker, F., et al., *Tissue-engineering acellular scaffolds-The significant influence of physical and procedural decellularization factors*. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*, 2018. 106(1): p. 153-162.
89. Ulfig, N., *Kurzlehrbuch Histologie*. 4., korrigierte Auflage ed, ed. N. Ulfig. 2015: Georg Thieme Verlag. p. 15.
90. Mulisch, M. and Welsch, U., *Romeis-Mikroskopische Technik*. Vol. 19. 2015: Springer-Verlag. p. 28-288.

91. Welsch, U., *Atlas Histologie: Zytologie, Histologie, Mikroskopische Anatomie* 2005, Elsevier Urban & Fischer. p. 1, 4.
92. Kapuściński, J. and Szer, W., *Interactions of 4', 6-diamidine-2-phenylindole with synthetic polynucleotides*. *Nucleic Acids Research*, 1979. 6(11): p. 3519-3534.
93. Kapuscinski, J. and Yanagi, K., *Selective staining by 4', 6-diamidine-2-phenylindole of nanogram quantities of DNA in the presence of RNA on gels*. *Nucleic Acids Research*, 1979. 6(11): p. 3535-3542.
94. Kapuscinski, J., *DAPI: a DNA-specific fluorescent probe*. *Biotechnic & Histochemistry*, 1995. 70(5): p. 220-233.
95. Fischer, A.H., et al., *Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections*. *CSH Protocols*, 2008. 2008: p. pdb.prot4986.
96. Chan, J.K., *The wonderful colors of the hematoxylin-eosin stain in diagnostic surgical pathology*. *International Journal of Surgical Pathology*, 2014. 22(1): p. 12-32.
97. Xu, H., et al., *Comparison of decellularization protocols for preparing a decellularized porcine annulus fibrosus scaffold*. *PLoS One*, 2014. 9(1): p. e86723.
98. Vogel, B., et al., *Determination of collagen content within picosirius red stained paraffin-embedded tissue sections using fluorescence microscopy*. *MethodsX*, 2015. 2: p. 124-134.
99. Pickering, J.G. and Boughner, D.R., *Quantitative assessment of the age of fibrotic lesions using polarized light microscopy and digital image analysis*. *American Journal of Pathology*, 1991. 138(5): p. 1225-1231.
100. Coelho, P.G.B., et al., *Evaluation of dermal collagen stained with picosirius red and examined under polarized light microscopy*. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 2018. 93(3): p. 415-418.
101. Steinmetz, D. *Wissenschaftlich Arbeiten mit Computer und Internet- Bildbearbeitung*. o.J. [cited 25.05.2019; Available from: http://www.ipb.uni-tuebingen.de/kurs/comp/5_bildbearb/kurs05_06.html#gus.
102. Torzewski, M., *Die Movat-Pentachromfärbung*. *Mikroskopie*, 2015. 2(4): p. 204-208.
103. Müller, M. *Elektronenmikroskop.net*. o.J. [cited 17.09.2020; Available from: <http://www.elektronenmikroskop.net/probenvorbereitung.html>.
104. Bozzola, J.J. and Russell, L.D., *Electron microscopy: principles and techniques for biologists*. 1999: Jones & Bartlett Learning. p. 53f., 63.
105. Anderson, T.F., *Techniques for the preservation of three-dimensional structure in preparing specimens for the electron microscope*. *Transactions of the New York Academy of Sciences*. Vol. 13. 1951: Wiley/Blackwell p. 130-134.
106. Schwedt, G., Schmidt, T., and Schmitz, O., *Analytische Chemie: Grundlagen, Methoden und Praxis*. 2016: Wiley. p. 428.
107. Kashin, A.S. and Ananikov, V.P., *A SEM study of nanosized metal films and metal nanoparticles obtained by magnetron sputtering*. *Russian Chemical Bulletin*, 2011. 60(12): p. 2602-2607.
108. Martin, P.J., *Ion-based methods for optical thin film deposition*. *Journal of Materials Science*, 1986. 21(1): p. 1-25.

109. Reimer, L., *Scanning Electron Microscopy: Physics of Image Formation and Microanalysis*. Vol. 45. 2013: Springer-Verlag. p. 3-7, 13.
110. Goldstein, J.I., et al., *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*. Vol. 4. 2017: Springer-Verlag. p. 2-4, 16, 30, 40.
111. Slayter, E.M. and Slayter, H.S., *Light and electron microscopy*. 1992: Cambridge University Press. p. 1f.
112. Von Ardenne, M., *Elektronen-Übermikroskopie: Physik· Technik· Ergebnisse*. Vol. 1. 2013: Springer-Verlag. p. 23.
113. Schwab, R., *Werkstoffkunde und Werkstoffprüfung für Dummies*. Vol. 87. 2011: John Wiley & Sons. p. 143-155.
114. Weiß, C., *Basiswissen medizinische Statistik*. Vol. 7. 2019: Springer-Verlag. p. 44, 63-66, 142-147, 163, 170-181.
115. Hilgers, R., Bauer, P., and Scheiber, V., *Einführung in die medizinische Statistik*. Vol. 2. 2007: Springer-Verlag. p. 159-172.
116. Schäfer, A. and Schöttker-Königer, T., *Statistik und quantitative Methoden für Gesundheitsfachberufe*. Vol. 1. 2015: Springer-Verlag. p. 96-100, 166-170.
117. Moore, D.S., Notz, W.I., and Flinger, M.A., *The basic practice of statistics*. Vol. 6. 2013, New York, NY: W. H. Freeman and Company. 138.
118. Li, N., et al., *Efficient decellularization for bovine pericardium with extracellular matrix preservation and good biocompatibility*. *Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery*, 2018. 26(5): p. 768-776.
119. Pagoulatou, E., et al., *Biomechanical and structural changes following the decellularization of bovine pericardial tissues for use as a tissue engineering scaffold*. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*, 2012. 23(6): p. 1387-1396.
120. Viidik, A. and Lewin, T., *Changes in tensile strength characteristics and histology of rabbit ligaments induced by different modes of postmortal storage*. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 1966. 37(2): p. 141-155.
121. Stemper, B.D., et al., *Mechanics of fresh, refrigerated, and frozen arterial tissue*. *Journal of Surgical Research*, 2007. 139(2): p. 236-242.
122. Chow, M.J. and Zhang, Y., *Changes in the mechanical and biochemical properties of aortic tissue due to cold storage*. *Journal of Surgical Research*, 2011. 171(2): p. 434-442.
123. Giannini, S., et al., *Effects of freezing on the biomechanical and structural properties of human posterior tibial tendons*. *International Orthopaedics*, 2008. 32(2): p. 145-151.
124. Clavert, P., et al., *Effects of freezing/thawing on the biomechanical properties of human tendons*. *Surgical and Radiologic Anatomy*, 2001. 23(4): p. 259-262.
125. Wang, B., et al., *Fabrication of cardiac patch with decellularized porcine myocardial scaffold and bone marrow mononuclear cells*. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 2010. 94(4): p. 1100-1110.
126. Negishi, J., et al., *Effect of treatment temperature on collagen structures of the decellularized carotid artery using high hydrostatic pressure*. *Journal of Artificial Organs*, 2011. 14(3): p. 223-231.

127. Illien-Jünger, S., et al., *Development of a bovine decellularized extracellular matrix-biomaterial for nucleus pulposus regeneration*. Journal of Orthopaedic Research, 2016. 34(5): p. 876-888.
128. Fischer, I., et al., *Comparative characterization of decellularized renal scaffolds for tissue engineering*. Biomedical Materials, 2017. 12(4): p. 045005.
129. Hiester, E.D. and Sacks, M.S., *Optimal bovine pericardial tissue selection sites. II. Cartographic analysis*. Journal of Biomedical Materials Research, 1998. 39(2): p. 215-221.
130. Hiester, E.D. and Sacks, M.S., *Optimal bovine pericardial tissue selection sites. I. Fiber architecture and tissue thickness measurements*. Journal of Biomedical Materials Research, 1998. 39(2): p. 207-214.

12 Anhang

Tab. 3 Probendicken in E_{II}

E _{II}	nativ (μm)	21°C	25°C	29°C
	639,4 ± 129	49% ± 49% (p=0,0701)	79% ± 72% (p=0,0839)	44% ± 40% (p=0,0573)

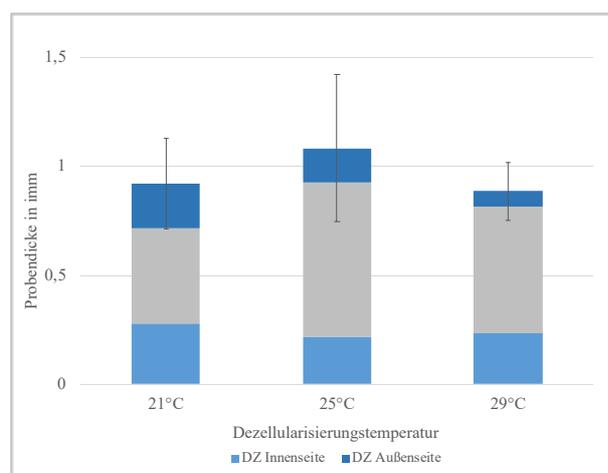


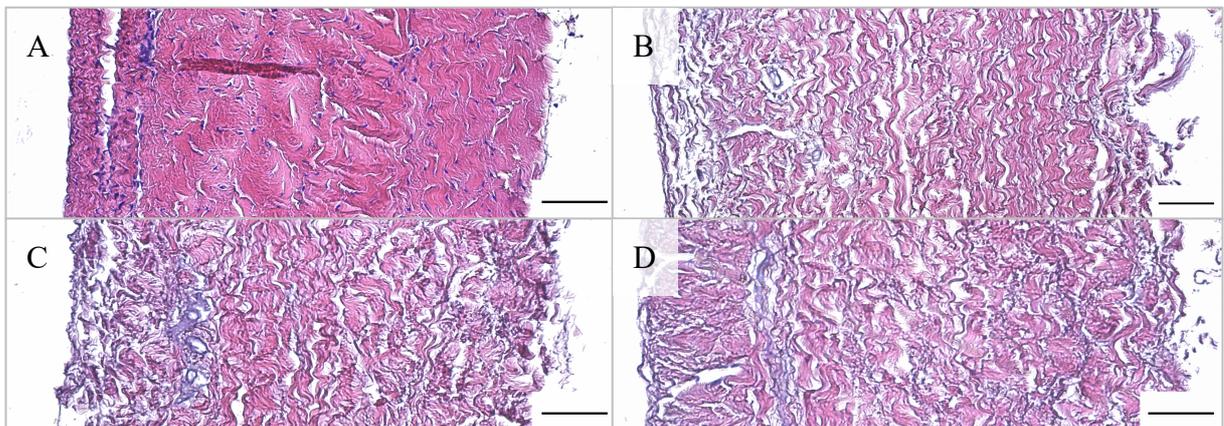
Abb. 25 Dezellularisierung in Abhängigkeit von der Dezellularisierungstemperatur in E_{II}

Die blau markierten Bereiche zeigen die dezellulierten, zellfreien Bereiche der Innen- und Außenseiten, der graue Bereich entspricht dem nicht-dezellulierten Bereich im Inneren der Probe.

In E_{II} wurden mit 53% bei der Dezellularisierung bei 21°C, 38% bei der Dezellularisierung bei 25°C und 37% bei der Dezellularisierung bei 29°C insgesamt niedrigere Dezellularisierungseffektivitäten erzielt als in E_I. Zwischen den drei Dezellularisierungstemperaturen konnte kein signifikanter Unterschied in der Dezellularisierungseffektivität festgestellt werden (p=0,484).

Tab. 4 Veränderung der Zellkerndichte nach der Dezellularisierung in E_{II}

E _{II}					
Probe	1	2	3	4	5
nativ					
(Zellkerne/mm ²)	848,03	869,23	1233,17	992,9	964,63
21°C					
(Zellkerne/mm ²)	176,67	395,75	530,02	798,56	v.d.
	-79%	-54%	-57%	-20%	x
p-Wert	0,0010**	0,0034**	0,0042**	0,0233*	x
25°C					
(Zellkerne/mm ²)	381,61	565,35	752,62	473,48	650,15
	-55%	-35%	-39%	-52%	-33%
p-Wert	0,0113*	0,0281*	0,0020**	0,0039**	0,0182*
29°C					
(Zellkerne/mm ²)	791,49	773,82	653,69	830,36	v.d.
	-7%	-11%	-47%	-16%	x
p-Wert	0,4684	0,0276*	0,0010**	0,1068	x
			v.d.: vollständig dezellularisiert		

Abb. 26 Beurteilung der EZM in der H.E.-Färbung in E_{II}

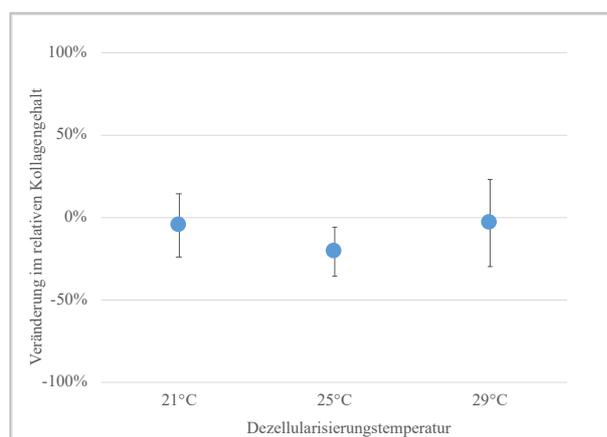
(A) Native Probe. (B), (C) und (D) Proben nach der Dezellularisierung bei 21°C, 25°C und 29°C.

Die Proben nach den Dezellularisierungen bei 21°C, 25°C und 29°C präsentierten eine Auflockerung der EZM. Es waren Lücken zwischen den Fasern zu erkennen, die Struktur war weniger kompakt. Zwischen den Dezellularisierungstemperaturen zeigte sich kein Unterschied.

Maßstabsbalken = 100 µm.

Tab. 5 Vergleich des Kollagengehalts der nativen Proben in E_{II}

E _{II}					
Probe	1	2	3	4	5
<i>Kabs</i> (px)	55808	39859	31801	39670	37483
<i>Krel</i>	56%	40%	32%	40%	37%

Abb. 27 Veränderungen im relativen Kollagengehalt in Abhängigkeit von der Dezellularisierungstemperatur in E_{II}

Bei der Dezellularisierung bei 25°C zeigte sich eine Abnahme im relativen Kollagengehalt der Proben um -21%. Bei 21°C änderte sich der relative Kollagengehalt um -5%, bei 29°C um -3%. Zwischen den Dezellularisierungstemperaturen bestand kein signifikanter Unterschied im relativen Kollagengehalt ($p=0,5072$).

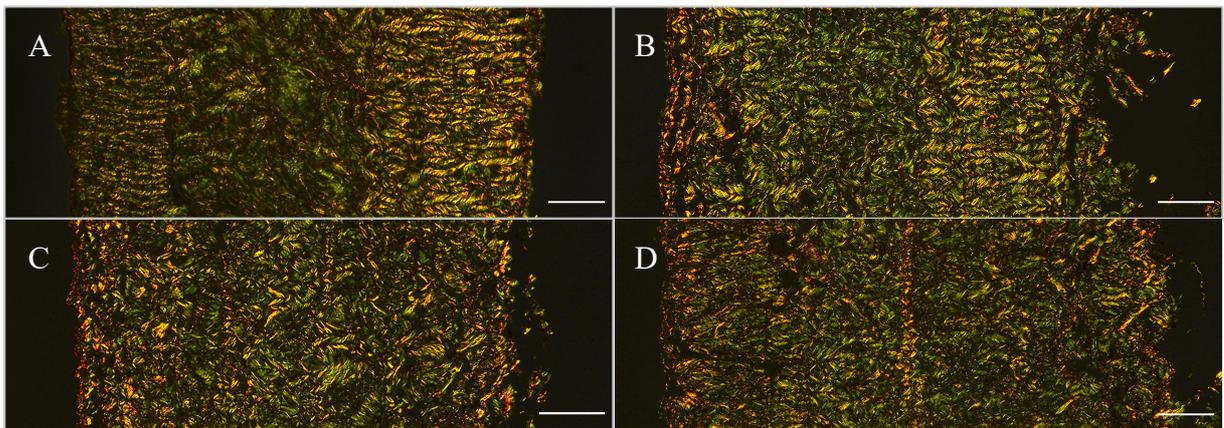


Abb. 28 Beurteilung des Kollagengehalts mit der Pikrosirius-Rot-Färbung in E_{II}

(A) Native Probe. (B), (C) und (D) Proben nach der Dezellularisierung bei 21°C, 25°C und 29°C.

In E_{II} zeigte sich nach der Dezellularisierung bei 25°C eine Abnahme im relativen Kollagengehalt um -21%. Bei 21°C änderte sich der relative Kollagengehalt um -5%, bei 29°C um -3%. Die Veränderungen zeigten sich zwischen den Dezellularisierungstemperaturen nicht signifikant.

Maßstabsbalken = 100 µm.

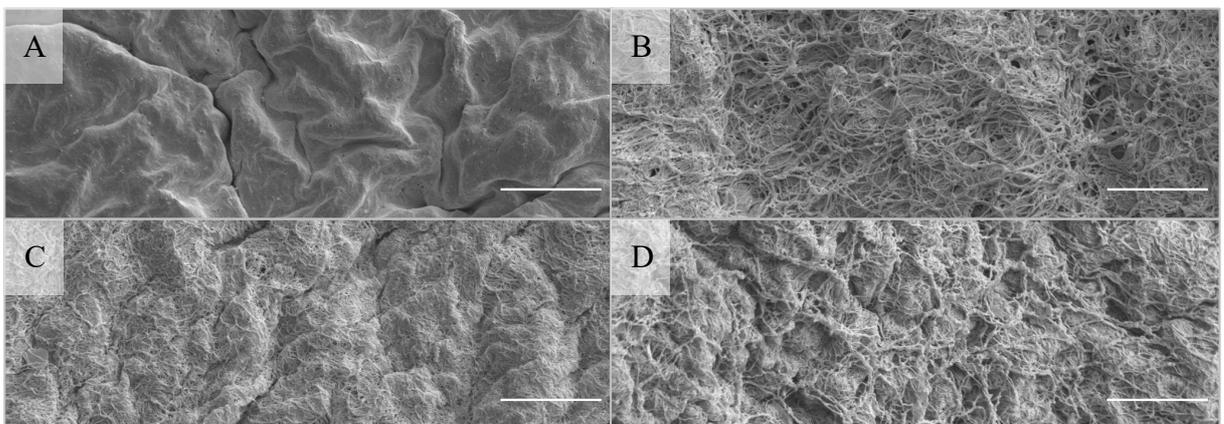


Abb. 29 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Perikardinnenseiten in E_{II}

(A) Native Probe. (B), (C) und (D) Proben nach der Dezellularisierung bei 21°C, 25°C und 29°C.

Die Innenseite der nativen Proben war von einer glatten Schicht aus Endothelzellen bedeckt. Bei allen Proben war nach der Dezellularisierung keine Endothelschicht mehr zu sehen. Die Proben nach der Dezellularisierung bei 21°C und 25°C präsentierten sich kompakt, die Fasern waren gleichmäßig und dicht angeordnet. Die Fasern der Probe nach der Dezellularisierung bei 29°C wirkten insgesamt unregelmäßiger verteilt.

Maßstabsbalken = 10 µm.

Tab. 6 Entparaffinierung

SCHRITT	INKUBATIONSDAUER
Roti-Histol	15 min.
Roti-Histol	15 min.
Ethanol 100% (absolut)	5 min.
Ethanol 100% (absolut)	5 min.
Ethanol 96% (vergällt)	5 min.
Ethanol 96% (vergällt)	5 min.
Ethanol 70% (vergällt)	5 min.
Ethanol 70% (vergällt)	5 min.
Aqua dest.	3 min.
Aqua dest.	3 min.

Tab. 7 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)- Fluoreszenzfärbung

SCHRITT	INKUBATIONSDAUER
<i>alle Schritte müssen unter Lichtabschirmung erfolgen</i>	
DAPI-Lösung (1:1000)	5 min.
PBS	5 min.
PBS	5 min.
PBS	5 min.
0,3% Sudanschwarz mit Ethanol 70%	2 min.
Aqua dest.	3 min.
Aqua dest.	3 min.
Eindecken	

Tab. 8 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

SCHRITT	INKUBATIONSDAUER
<i>Entparaffinierung bis einschließlich dem zweiten Schritt Ethanol 70%</i>	
vollentsalztes Wasser	kurz spülen
Hämalaun	5 min.
fließendes Leitungswasser	kurz spülen
lauwarmes Leitungswasser	5-10 min.
Ethanol 70%	3x tauchen
Eosin	2 min.
Leitungswasser	2x tauchen
Ethanol 70%	4x tauchen
Ethanol 96%	10x tauchen
Ethanol 100% (absolut)	5 min.
Ethanol 100% (absolut)	5 min.
Roti-Histol	2-3x tauchen
Eindecken	

Tab. 9 Pikrosirius-Rot-Färbung

SCHRITT	INKUBATIONSDAUER
Roti-Histol	10 min.
Roti-Histol	10 min.
Ethanol 96% (vergällt)	4 min.
Ethanol 80% (vergällt)	4 min.
Ethanol 70% (vergällt)	4 min.
Ethanol 60% (vergällt)	4 min.
Ethanol 60% (vergällt)	4 min.
Leitungswasser	4 min.
Weigerts Eisenhämatoxylin	8 min.

Aqua dest.	5 sek.
Leitungswasser	10 min.
Aqua dest.	1 min.
Pikro-Siriusrot	60 min.
Essigsäure 30%	1 min.
Essigsäure 30%	1 min.
Ethanol 96% (vergällt)	4 min.
Ethanol 96% (vergällt)	4 min.
Isopropanol	4 min.
Roti-Histol	10 min.
Roti-Histol	10 min.
Eindecken	

Tab. 10 Movats-Pentachrom-Färbung

SCHRITT	INKUBATIONSDAUER
Roti-Histol	5 min.
Roti-Histol	5 min.
Ethanol 96% (vergällt)	2 min.
Ethanol 80% (vergällt)	2 min.
Ethanol 70% (vergällt)	2 min.
Ethanol 60% (vergällt)	2 min.
Aqua dest.	2 min.
Alcianblau 1%	12 min.
Leitungswasser	5 min. fließend
Alkalischer Alkohol	60 min.
Leitungswasser	10 min. fließend
Weigerts Eisenhämatoxylin	10 min.
Aqua dest.	1 min.

Eisen(III)-Chlorid-Lösung	3 min.
Aqua dest.	1 min.
Natriumthiosulfat 5%	1 min.
Aqua dest.	1 min.
Leitungswasser	15 min. fließend
Brilliant-Crocein-Säurefuchsin	10 min.
Essigsäure 1%	30 sek.
Phosphorwolframsäure 5%	20 min.
Essigsäure 1%	2 min.
Ethanol 99% (vergällt)	1 min.
Ethanol 99% (vergällt)	6 min.
Safron du Gateis	6 min.
Ethanol 99% (vergällt)	2 min.
Ethanol 99% (vergällt)	2 min.
Isopropanol	2 min.
Roti-Histol	5 min.
Roti-Histol	5 min.
Eindecken	

Tab. 11 Aufsteigende Alkoholreihe

SCHRITT	INKUBATIONSDAUER
<i>Gewebestücke in Metallfassung legen und in ein Glasgefäß mit Auslassventil stellen</i>	
100 ml Ethanol 30%	10 min.
mit 100 ml Ethanol 50% bis 200 ml auffüllen	10 min.
bis zur Marke 100 ml auslaufen lassen	
mit 100 ml Ethanol 70% bis 200 ml auffüllen	10 min.
bis zur Marke 100 ml auslaufen lassen	
mit 100 ml Ethanol 90% bis 200 ml auffüllen	10 min.

bis zur Marke 100 ml auslaufen lassen	
mit 100 ml Ethanol 96% bis 200 ml auffüllen	10 min.
nicht auslaufen lassen	
Metallhalterung schnell in ein Gefäß mit vorgekühltem unvergälltem Ethanol 99,9% (-20°C) überführen	
<i>Die Proben müssen innerhalb der nächsten Stunde bespült werden.</i>	

Tab. 12 Lösungen

LÖSUNGEN	Art.-Nr.	HERSTELLERFIRMA
Aqua destillata (Ampuwa)	1214482	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, GER
4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI)	D9542-5MG	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, GER
Eosin Y solution, alcoholic	HT110116-500ML	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, GER
Ethanol 30%, vergällt mit 1% MEK	12607	Morphisto GmbH, Frankfurt am Main, GER
Ethanol 50% mit MEK vergällt	L13488	Apotheke Klinikum der Universität München, München, GER
Ethanol 60% mit MEK vergällt	L0147	Apotheke Klinikum der Universität München, München, GER
Ethanol 70%, 80%, 96%, vollst. Vergällt		CLN GmbH, Langenbach/Niederhummel, Deutschland
Ethanol 99%, denatured with 1% MEK pure	A5007,2500	AppliChem GmbH, Darmstadt, GER
Ethanol absolute for analysis	1.009.832.500	Merck KGaA, Darmstadt, GER
Glutardialdehyde solution 25%	1.042.390.250	Merck KGaA, Darmstadt, GER
Hydrochloric acid 1N	1.099.700.001	Merck KGaA, Darmstadt, GER

Isopropanol (2-Propanol) ≥99,8%	6752.4	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, GER
Mayer´s Hämalaunlösung	1.092.490.500	Merck KGaA, Darmstadt, GER
PBS Medium 10x	P210	Apotheke Klinikum der Universität München, München, GER
Roti®-Histofix Formaldehydlösung 4%	P087.3	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, GER
Roti-Histol	6640.4	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, GER
Sodium cacodylate trihydrate ≥98%	C0250	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, GER
Sodiumdeoxycholat ≥98,0%	30970-500G	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, GER
Sodiumdodecylsulfat Pellets ≥99,5%	8029.4	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, GER
Sudanschwarz B (C.I. 26150) für die Mikroskopie	0292.1	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, GER

Tab. 13 Färbekits

Movats-Pentachrom, Art.-Nr. 12057, Morphisto GmbH, Frankfurt am Main, GER	
LÖSUNGEN	Art.-Nr.
Alcianblau 1 Vol.-%	10126
Alkalischer Alkohol mit Ammoniak (90/10)	10132
Weigert Stammlösung A/B	10225 A/B
Eisen (III)-Chlorid 2%	12019
Brilliant-Crocein-Säurefuchsin	10156
Phosphorwolframsäure 5%	10324
Safron du Gatinais	10369
Natriumthiosulfat 5%	10288
Essigsäure 1%	10180

Pikro-Siriusrot für Kollagen I & III Nachweis, Art.-Nr. 13425, Morphisto GmbH, Frankfurt am Main, GER	
Weigert Stammlösung A/B	10225 A/B
Pikro-Siriusrot-Lösung	13422
Essigsäure 30%	13428

Tab. 14 Lösungszusammensetzungen

DAPI-Lösung, Verdünnung 1:1000 der 0,1 mg/ml-Stocklösung	
DAPI, $c_{\text{DAPI}} = 0,1 \text{ mg/ml}$	160 μl
PBS Medium 1x	160 ml
FIX-II-Lösung	
Sodium Cacodylate Trihydrate	11,3 g
Aqua destillata	912,0 ml
HCL 1N	1,5 ml
Glutaraldehydlösung 25%	1,5 ml
Hämalaun-Lösung	
Mayer's Hämalaunlösung	50 ml
PBS Medium 1x	150 ml
PBS Medium 10x	
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	115,0 g
Kaliumdihydrogenphosphat	20,0 g
Natriumchlorid 80,0 g	800,0 g
Kaliumchlorid 2,0 g	20,0 g
Wasser gereinigt zu	10.000 ml
PBS Medium 1x	
PBS Medium 10x	1 l
vollentsalztes Wasser	9 l

Tab. 15 Geräte/Hilfsmittel

GERÄTE/HILFSMITTEL	MODELLBEZEICHNUNG	HERSTELLERFIRMA
Anschluss-System	Duran GLS 80 Anschluss-System	DWK Life Science GmbH, Wertheim/Main, GER
Deckgläser 24 x 50 mm	100 Deckgläser 24 x 50 mm, Art.-Nr. 1871	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, GER
Dickenmessgerät	Dickenschnellmessgerät Absolute digimatic	Mitutoyo Deutschland GmbH, Neuss, GER
Einbettkassetten		Lab Logistics Group GmbH, Meckenheim, GER
Eindeckmedium für die Fluoreszenzmikroskopie	ibidi Mounting Medium	ibidi GmbH, Gräfelfing, GER
Eindeckmedium für die Lichtmikroskopie	Leica CV Mount	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, GER
Fluoreszenzmikroskop	AxioObserver	Carl Zeiss AG, Oberkochen, GER
PC Software Fluoreszenzmikroskopie	AxioVision Rel. 4.8	Carl Zeiss AG, Oberkochen, GER
Flüssigkeitsreservoir	Duran Becher mit Ausguss 3000mL	DWK Life Science GmbH, Wertheim/Main, GER
Inkubationsbehältnis	Duran GLS 80 Laborflasche Weithals 1000mL	DWK Life Science GmbH, Wertheim/Main, GER
Kritisch-Punkt-Trockner	CPD 30	BalTec, Schalksmühle, GER
Lichtmikroskop	Leica DMR	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, GER
Mullkompressen 7,5 x 7,5 cm	Gazin Mullkompressen 7,5 x 7,5 cm	Lohmann & Rauscher GmbH & Co. KG, Neuwied, GER
Nahtmaterial	Prolene-Nahtmaterial 5-0, 90cm	Johnson & Johnson Medical GmbH, Ethicon Deutschland, Norderstedt, GER
Objektträger 25 x 75 x 1,0 mm	Thermo Scientific, Superfrost Ultra Plus ®	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, GER
Präzisions-Waage	Präzisionswaage EW	Kern & Sohn GmbH, Balingen, GER

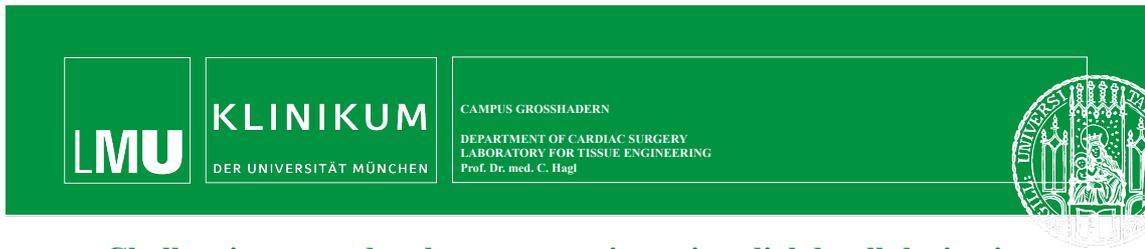
Präzisions-Wärmeschrank	WTC	Fa. Binder GmbH, Tuttlingen, GER
Pumpe	10L/min; Eden Aquariumpumpe 114-11W	PfG GmbH, Hörstel, GER
Rasterelektronenmikroskop	Zeiss Evo LS10	Carl Zeiss AG, Oberkochen, GER
Schlittenmikrotom	HM 400 R	Microm International GmbH, Walldorf, GER
Schraubenröhren 50 ml	Schraubenröhre 50 mL, 115 x 28 mm	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, GER
Sputter Coater	SCD 50	BalTec, Schalksmühle, GER
Thermometer	Allgebrauchs- Rührthermometer	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, GER
Ultraschallbad	Ultraschall- Reinigungsgerät USC600T 120 W, 45kHz	VWR International GmbH, Darmstadt, GER
Wasserbad	Julabo SW22	Julabo GmbH, Seelbach, GER
Wasserbad	Labortechnik Medingen W22	GK Sondermaschinenbau GmbH, Labortechnik medingen, Dresden, GER
Zugprüfmaschine	zwickiLine bis Fmax 2,5 kN	ZwickRoell GmbH & Co. KG, Ulm, GER
PC Software Zugfestigkeitsprüfung	testXpert V12.3	Zwick GmbH & Co. KG, Ulm, GER
Zugprobenstanze	ZCP020	Zwick GmbH & Co. KG, Ulm, GER

Vorveröffentlichungen

Ein Teil dieser Dissertation wurde bereits im Rahmen von Postervorträgen bei den *Cardiovascular Research Days 2018* in Debresin, Ungarn, und im *Munich Heart Alliance Meeting 2018* in München, Deutschland, veröffentlicht.

Kuster, E., König, F., Hagl, C., Thierfelder N., 2018. Challenging procedural parameters in pericardial decellularization: The influence of pre-processing storage and treatment temperature. Poster- Cardiovascular Research Days, Debresin, 2018.

Kuster, E., König, F., Hagl, C., Thierfelder N., 2018. Challenging procedural parameters in pericardial decellularization: The influence of pre-processing storage and treatment temperature. Poster- Munich Heart Alliance Meeting, München, 2018.



Challenging procedural parameters in pericardial decellularization: The influence of pre-processing storage and treatment temperature

E. Kuster¹, F. König^{1,2}, M. Grab^{1,2}, C. Hagl¹, N. Thierfelder¹

¹ Laboratory for Cardiovascular Tissue Engineering, Ludwig-Maximilians University Munich

² Institute of Medical and Polymer Engineering, Technical University Munich

Objectives

Decellularized bovine pericardium is a highly promising tissue engineered scaffold in the field of reconstructive heart surgery. The aim of this experimental trial was to demonstrate the influence of temperature on decellularization (DC) protocols. Furthermore, the impact of pre-processing storage of the pericardium on a successful DC, in terms of efficiency in cell removal and integrity of the extra cellular matrix (ECM), was illustrated.

Methods

Fresh pericardia of adult cattle were obtained from a local slaughter house and instantly processed under hygienic conditions. Per pericard two squares of size 10cmx10cm were extracted and divided into two Groups (Fig. 1). We applied an established DC protocol for bovine pericardium, based on a jet induced whirling (10 L/min.) in a solution of 0.5% SD and 0.5% SDS for 16 h. The procedure included a detergent replacement after 4 h as well as two sonication exposures (30 min/exposure) in an ultrasonic bath (45kHz). Six groups (n=5) were treated at different thermal conditions (4°C, 13°C, 21°C, 29°C, 37°C, 56°C). By water bath, we ensured a constant defined solution temperature during the DC process. After DC, all scaffolds were purged by 10 x 15 min washing cycles with PBS. For a successful integration of the DC process in future workflows for commercial production we investigated the influence of pre-processing storage for 24 h at 4°C before DC. Results were compared to the immediate treated group. The efficiency of cell removal was analysed by DAPI and H&E staining. Scanning electron microscopy (SEM), pentachrome- and pikrosirius-red staining (PSR) as well as tensile tests were used for a comprehensive analysis of the ECM.

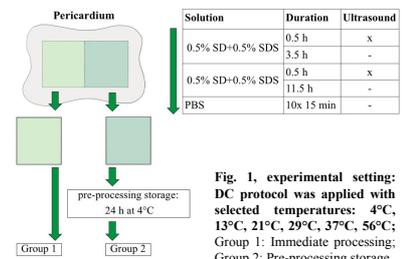


Fig. 1, experimental setting: DC protocol was applied with selected temperatures: 4°C, 13°C, 21°C, 29°C, 37°C, 56°C; Group 1: Immediate processing; Group 2: Pre-processing storage

Results

Successful DC is defined as total cell removal in combination with preserved ECM. Results showed a high correlation between the temperature of the DC process and the extent of cell removal as well as to the preservation of the ECM. The DAPI analysis (Fig. 2) showed the dependence of temperature and the removal of pericardial cells. At 21°C, the DC process obtained a total cell removal, while higher and lower temperatures lead to a decreased DC performance. The SEM images (Fig. 3) illustrate 21°C as most effective and least invasive temperature by removal of the superficial cell layer and the preservation of the underneath located fibre network. All the other temperatures resulted in preserved cell layers or damage of the fibres. Analysing the decellularized specimen in H&E staining (Fig. 3), no nuclei were detected in all groups. The DC process lead to a loosening of the pericardial structure which is least at 21°C. Processing the specimen with 56°C resulted in denaturation of the ECM. A complete destruction of the pericardial structure was observed, which could be approved by a massive loss of collagen in PSR (Fig. 3). The images of the other temperatures showed a major and comparable amount of collagen and therefore no significant loss of structure is detectable. Storage of the pericardia before DC had neither positive nor negative effects in regard to cell removal but to UTS. UTS measures the maximum of strength, that an area of 1 mm² pericardial tissue is able to withstand. Group 2 resulted in lower values in all temperatures (except to 37°C) compared to Group 1 (Fig. 4).

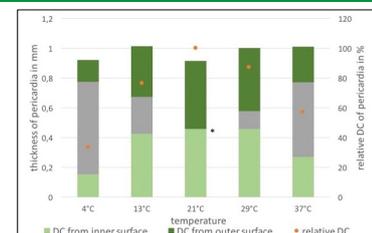


Fig. 2, DAPI evaluation: 21°C resulted in complete DC; lower (4°C, 13°C) and higher (29°C, 37°C) temperatures lead to decreased DC and detectable nuclei inside the pericardia (grey); DAPI; thickness of the pericardial tissues and DC (%); *percentual distribution mathematically derived

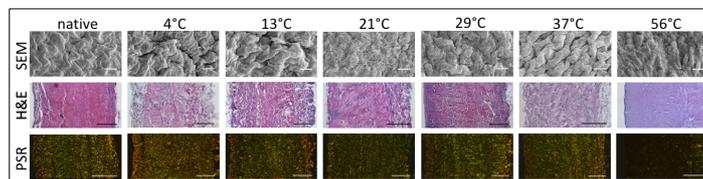


Fig. 3, histological evaluation: 21°C shows removal of cell layer (SEM), loss of nuclei (H&E) and preservation of collagen (PSR); 56°C shows denaturation of ECM (H&E) and massive loss of collagen (PSR); 4°C, 13°C, 29°C, 37°C show preserved cell layers (SEM), loosening of the ECM (H&E) and preservation of collagen (PSR); scale bars: SEM= 10µm; H&E= 200µm; PSR= 200µm; PSR: collagen type I: yellow, type III: green

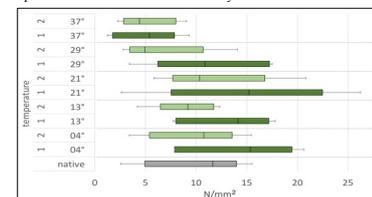


Fig. 4, mechanical assessment: 21°C resulted in highest values; Group 2 lead to decreased results compared to Group 1 in all temperatures (except to 37°C); Ultimate tensile strength (UTS); longitudinal samples; 1: Immediate processing, 2: Pre-processing storage

Conclusion

DC process at 21°C results in superior outcomes regarding cell removal and preservation of the ECM. Moreover, the decrease of UTS and consequently the damage of the pericardial structure by pre-processing storage demonstrate the importance of smart and conscious handling of biological tissues.

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Christian Hagl, bedanken, der mir als Direktor der Herzchirurgischen Klinik und Poliklinik der Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München die Promotion ermöglichte. Durch die Unterstützung meiner Arbeitsgruppe für Tissue Engineering und kardiovaskuläre Medizintechnik wurde mir eine strukturierte Promotion auf höchstem Niveau ermöglicht.

Mein zweiter Dank geht an meine Betreuer, Herr Dipl.-Ing. Fabian König, Herrn Dr. med. Nikolaus Thierfelder, und Herrn M.Sc. Maximilian Grab für ihr außergewöhnliches Engagement. Während meiner gesamten Zeit in der Arbeitsgruppe hatten sie stets ein offenes Ohr und haben mich und meine Arbeit unterstützt. In Situationen, in denen ich selbst nicht weiterkam, haben sie mich motiviert und hatten stets eine Problemlösung parat. Ich lernte während meiner Zeit der Promotion, Eigenverantwortung zu übernehmen und strukturiert zu arbeiten. Ich bin sehr dankbar für diese außergewöhnliche Betreuung und möchte mich herzlichst dafür bedanken. Ohne Herr Dipl.-Ing. Fabian König, Herrn Dr. med. Nikolaus Thierfelder, und Herrn M.Sc. Maximilian Grab wäre diese Promotion so nicht möglich gewesen.

Weiterer Dank geht an die Mitarbeiterinnen in der Arbeitsgruppe Eike Petersen, Barbara Steinl und Bettina Wimmer. Frau Petersen hat mich während der ersten Tage im Labor mit Geduld und Leidenschaft in die Laborarbeit eingearbeitet. Durch ihre sorgsame und korrekte Arbeitsweise hat sie damit die Grundlage für meine Arbeit gelegt. Frau Steinl und Frau Wimmer standen mir während der gesamten Laborzeit mit ihrem fachlichen Wissen und ihrer Erfahrung mit Rat und Tat zur Seite. Zudem fanden sie in manch frustrierenden Situationen immer die richtigen Worte und haben es geschafft mich neu zu motivieren.

Ich möchte mich zudem bei meinen Mitdoktoranden während meiner Zeit im Labor und bei Barbara Messner bedanken. Wir sind während der gemeinsamen Zeit im Labor sehr zusammengewachsen, haben uns gegenseitig unterstützt und aufgebaut. Durch sie wurde meine Promotion zu einer unvergesslichen Zeit.

Ein Dank geht ebenfalls an die Mitarbeiter des Zentrums für Neuropathologie und Prionforschung der Universität München für ihre Unterstützung bei der histologischen Probenaufbereitung.

Ich möchte mich zudem herzlich bei meiner Freundin Sophie bedanken, die mich durch ihr Studium in Computervisualistik und Design bei der Erstellung meiner Abbildungen unterstützen konnte.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Familie, meine Eltern und meinen Bruder, ohne die diese Promotion nicht realisierbar gewesen wäre. Sie haben mir zu jeder Zeit den Rücken freigehalten, sich unzählige Gedanken und Lösungsvorschläge angehört und mich nach den ein oder anderen Rückschlägen immer wieder neu aufgebaut. Sie haben mir ermöglicht, meinen Traum zu erfüllen und dafür bin ich ihnen zutiefst dankbar.

Eidesstattliche Versicherung

Kuster, Elena

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

*Optimierung physikalischer Einflussfaktoren auf die Dezellularisierung zur Herstellung
xenogener Implantate*

-

*Systematische Evaluation der gekühlten Lagerung und der Dezellularisierungstemperatur auf
den Dezellularisierungsprozess*

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

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

Schliersee, den 31.03.2022

Ort, Datum

Elena Kuster

Unterschrift Doktorandin