

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

Direktor: Prof. Dr. med. Christian Hagl



**In-vitro Evaluierung von Prozessierungsmethoden und  
Optimierung der Endothelialisierung von Perikardpatchen  
für die herzchirurgische Anwendung**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

**Linda Sophia Grefen**

aus

**Hamburg**

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Christian Hagl

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Christoph Schmitz  
Prof. Dr. med. Ralf Sodian  
PD Dr. med. Florian Weiß

Mitbetreuung durch den

promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Nikolaus Thierfelder  
Dipl.-Ing. Fabian König

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 23.06.2022

*Meiner Familie in Dankbarkeit*

# Inhaltsverzeichnis

<b>I. Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>VI</b>
<b>II. Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>VIII</b>
<b>I. Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>IX</b>
<b>II. Kurzzusammenfassung</b> .....	<b>XI</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>12</b>
1.1. Kardiovaskuläre Erkrankungen.....	12
1.2. Herz-Kreislauf-System.....	12
1.2.1. Angeborene Herzfehler.....	12
1.2.2. Herzklappenerkrankungen.....	14
1.3. Therapeutische Intervention.....	16
1.3.1. Gewebepatche.....	16
1.3.2. Therapie der Herzklappenerkrankungen.....	18
1.4. Regenerative Medizin.....	22
1.5. Prozessierung biologischer Gewebe.....	23
1.5.1. Fixierung mit Glutaraldehyd.....	23
1.5.2. Dezellularisierung.....	26
1.5.3. Sterilisation.....	28
1.6. Endothelzellen.....	29
1.7. Zielsetzung.....	32
<b>2. Methoden</b> .....	<b>33</b>
2.1. Gewebe.....	33
2.2. Gewebeprozessierung.....	34
2.2.1. Fixierung.....	34
2.2.2. Dezellularisierung.....	34
2.2.3. Sterilisierung.....	36

2.3.	Zellkultur.....	36
2.3.1.	Isolierung humaner Endothelzellenlinien .....	37
2.3.2.	Allgemeine Zellkultivierung.....	38
2.4.	Biokompatibilitätstestung.....	41
2.4.1.	Statische Kultivierung von Endothelzellen .....	41
2.4.2.	Statische Besiedelung von Gewebe mit Endothelzellen .....	42
2.5.	Flusseexposition.....	43
2.5.1.	Dynamische Kultivierung von Endothelzellen.....	43
2.5.2.	Dynamische Besiedelung von Gewebe mit Endothelzellen .....	45
<b>3.</b>	<b>Auswertung.....</b>	<b>48</b>
3.1.	Färbemethoden.....	48
3.1.1.	Anfertigen von Paraffinschnitten .....	48
3.1.2.	Histologische Färbungen.....	48
3.1.3.	Fluoreszenzfärbungen.....	50
3.1.4.	Immunfluoreszenz .....	53
3.2.	Rasterelektronenmikroskopie.....	55
3.3.	DNA-Quantifizierung .....	58
3.4.	Biomechanische Analyse.....	59
3.5.	Sterilitätstestung .....	60
3.6.	Statistische Analyse.....	60
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>61</b>
4.1.	Gewebeprozessierung.....	61
4.1.1.	Histologische Evaluierung.....	61
4.1.2.	Analyse der Oberflächenstruktur mittels Rasterelektronenmikroskopie.	66
4.1.3.	Ermittlung des DNA-Gehaltes .....	69
4.1.4.	Biomechanische Analyse.....	70
4.1.5.	Prüfung der Sterilität .....	73

4.2.	Biokompatibilitätstestung.....	75
4.2.1.	Statische Kultivierung von Endothelzellen .....	75
4.2.2.	Statische Endothelialisierung von Gewebepatchen .....	78
4.3.	Flusseexposition.....	80
4.3.1.	Dynamische Kultivierung von Endothelzellen.....	80
4.3.2.	Dynamische Endothelialisierung von Gewebepatchen.....	84
<b>5.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>87</b>
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>96</b>
<b>III.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>98</b>
<b>IV.</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>113</b>
<b>V.</b>	<b>Vorveröffentlichungen .....</b>	<b>126</b>
<b>VI.</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>128</b>

# I. Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Aufbau des Herzens</i> .....	13
<i>Abbildung 2: Darstellung eines Ventrikelseptumdefekts</i> .....	14
<i>Abbildung 3: Ventilebene des Herzens mit Herzklappen</i> .....	15
<i>Abbildung 4: Schematische Darstellung der Perikardschichten</i> .....	18
<i>Abbildung 5: Verschiedene Arten von Herzklappenprothesen</i> .....	21
<i>Abbildung 6: Schematische Darstellung des kardiovaskulären Tissue Engineering</i> .....	22
<i>Abbildung 7: Kalzifizierungsvorgänge der Zelle in schematischer Darstellung</i> .....	25
<i>Abbildung 8: Schematische Darstellung der GA-Fixierung</i> .....	26
<i>Abbildung 9: Grundlegendes Prinzip der Dezellularisierung</i> .....	28
<i>Abbildung 10: Schematischer Aufbau einer Arterie</i> .....	30
<i>Abbildung 11: Endothelzellen mit Adhärens-Kontakten und Stressfasern (Schema)</i> .....	31
<i>Abbildung 12: Übersicht der Probenbezeichnung und der angewandten Methoden</i> .....	33
<i>Abbildung 13: Dezellularisierungsaufbau</i> .....	36
<i>Abbildung 14: Kanülierung eines Segments der Vena Saphena magna</i> .....	38
<i>Abbildung 15: Skizze eines <math>\mu</math>-Slides</i> .....	42
<i>Abbildung 16: Schema der Ventilmechanismen für unidirektionalen Fluss</i> .....	44
<i>Abbildung 17: Flusskammer zur dynamischen Besiedelung von Gewebepatchen</i> .....	46
<i>Abbildung 18: Flusskammer mit ibidi-System</i> .....	47
<i>Abbildung 19: Schematische Darstellung des Prinzips der Immunfluoreszenz</i> .....	53
<i>Abbildung 20: Histologische Evaluierung mit HE- und DAPI-Färbung</i> .....	63
<i>Abbildung 21: Histologische Evaluierung mit MPC- und PSR-Färbung</i> .....	64
<i>Abbildung 22: Quantitative DAPI-Analyse</i> .....	65
<i>Abbildung 23: Rasterelektronenmikroskopie der Gewebepatche</i> .....	68
<i>Abbildung 24: DNA-Quantifizierung</i> .....	69
<i>Abbildung 25: Biomechanische Analyse durch Zugversuche</i> .....	71
<i>Abbildung 26: Perikarddicke</i> .....	72
<i>Abbildung 27: Bakterielle Kontamination der GA-Proben im Rasterelektronenmikroskop</i> .....	74
<i>Abbildung 28: Quantifizierung der LD-Färbung nach statischer EC-Kultivierung</i> .....	75
<i>Abbildung 29: LD-Färbung nach statischer EC-Kultivierung</i> .....	76
<i>Abbildung 30: Statische Kultivierung von Endothelzellen – Immunfluoreszenzfärbung</i> .....	77
<i>Abbildung 31: Histologische Evaluierung der Gruppen DEZ, RP<sub>i</sub> und PP<sub>i</sub> nach statischer Besiedelung mit EC</i> .....	78
<i>Abbildung 32: Histologische Evaluierung der Gruppen GA und DEZ-GA nach statischer Besiedelung mit EC</i> .....	79
<i>Abbildung 33: Lichtmikroskopische Evaluation der EC-Adhäsion</i> .....	80
<i>Abbildung 34: Quantifizierung der LD-Färbung nach dynamischer EC-Kultivierung</i> .....	81
<i>Abbildung 35: LD-Färbung nach dynamischer Kultivierung von Endothelzellen</i> .....	81
<i>Abbildung 36: Dynamische Kultivierung von Endothelzellen – Immunfluoreszenzfärbung</i> .....	83

<i>Abbildung 37: LD-Färbung eines DEZ-Patches nach dynamischer Besiedelung .....</i>	<i>85</i>
<i>Abbildung 38: Versuchsaufbau mit Flusskammer und eingespanntem Patch .....</i>	<i>86</i>
<i>Abbildung 39: HE-Färbung und REM-Analyse von Perikard mit verschiedener GA-Konzentration.....</i>	<i>122</i>
<i>Abbildung 40: Mikrobielles Wachstum in der Sterilitätstestung der GA-Patche.....</i>	<i>123</i>

## II. Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Übersicht des Dezellularisierungsprotokolls</i> .....	35
<i>Tabelle 2: Mengenangaben für entsprechende Kulturflaschen bei der Zellpassagierung</i> .....	39
<i>Tabelle 3: Eigenschaften des <math>\mu</math>-slide <sup>10.6</sup> Luer Quelle: [103]</i> .....	41
<i>Tabelle 4: Druckprotokoll für Flussversuche</i> .....	45
<i>Tabelle 5: Färbeprotokoll HE-Färbung Quelle: [108]</i> .....	49
<i>Tabelle 6: Färbeprotokoll PSR-Färbung Quelle: [106]</i> .....	49
<i>Tabelle 7: Färbeprotokoll MPC-Färbung Quelle: [107]</i> .....	50
<i>Tabelle 8: DAPI-Färbeprotokoll Adaptiert nach [111]</i> .....	51
<i>Tabelle 9: Protokoll der Immunfluoreszenzfärbung im <math>\mu</math>-Slide Adaptiert nach [120]</i> .....	54
<i>Tabelle 10: Daten der biomechanischen Analyse im Detail</i> .....	70
<i>Tabelle 11: Ergebnisse der Sterilitätstestung nach 14 Tagen Inkubation</i> .....	73
<i>Tabelle 12: Formblatt zur Kalibrierung der Flussrate</i> .....	124

## I. Abkürzungsverzeichnis

3D	Dreidimensional
AD	Aqua destillata
Anti/Anti	Antibiotika/Antimykotikum
ASD	Vorhofseptumdefekt
BSA	Rinderalbumin
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEZ	Versuchsgruppe: dezellularisierte und sterilisierte Rinderperikardpatche
DEZ-GA	Versuchsgruppe: dezellularisierte und GA-fixierte Rinderperikardpatche
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dyn	Physikalische Krafteinheit Dyn
EC	Endothelzellen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EZM	Extrazellulärmatrix
FKS	Fökales Kälberserum
GA	Glutaraldehyd Versuchsgruppe: GA-fixierte Rinderperikardpatche
H <sub>2</sub> O	Wasser
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HSA	Humanalbumin
LD	Live/Dead <sup>®</sup>
M199	Medium 199
mM	Millimolar
MPC	Pentachromfärbung nach Movat
n	Stückzahl
Na-CaCO	<i>Sodium cacodylate trihydrate</i> , Cacodylsäure Natriumsalz-Trihydrat

NaCl	Natriumchlorid
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OCT	Octenidindihydrochlorid
PBS	<i>Phosphate buffered solution</i> , phosphatgepufferte Lösung
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PET	Polyethylenterephthalat
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumjodid
PO <sub>2</sub> <sup>3-</sup>	Phosphat
PP <sub>i</sub>	Industriell dezellularisierte Pferdeperikardpatche
PSR	Pikro-Siriusrot-Färbung
PTFE	Polytetrafluorethyln
PU	Polyurethan
REM	Rasterelektronenmikroskop
RNA	Ribonukleinsäure
RP <sub>i</sub>	Industriell dezellularisierte Rinderperikardpatche
rpm	<i>Rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SD	<i>Sodium deoxycholate</i> , Desoxycholsäure
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumlaurylsulfat
TAVI	<i>Transcatheter aortic valve implantation</i> , Transkatheter-Aortenklappenimplantation
TBS	TRIS-buffered solution, TRIS-gepufferte Lösung
TRIS	Tris-aminomethan
VE	Vollentsalztes Wasser
VSD	Ventrikelseptumdefekt

## II. Kurzzusammenfassung

**Hintergrund:** Perikard findet als Biomaterial einen weiten Anwendungsbereich in chirurgischen Disziplinen. Da es sich meist um tierisches Gewebe handelt, sind Methoden zur Prozessierung des Perikards zur klinischen Anwendung unabdingbar. Im Rahmen dieser Dissertation wurden verschiedene Prozesse entwickelt, angewandt und systematisch verglichen.

**Material und Methoden:** Native Perikardproben wurden durch Glutaraldehyd (Gruppe GA) fixiert oder einer Dezellularisierung unterzogen. Nach der Dezellularisierung erfolgte entweder eine Sterilisation (Gruppe DEZ) mit einem neu entwickelten Protokoll oder ebenfalls die Fixierung mit Glutaraldehyd (Gruppe DEZ-GA). Die Auswirkungen der applizierten Protokolle auf strukturelle Eigenschaften des Gewebes wurden durch histologische und biomechanische Analysen untersucht. Zudem wurde der Erfolg der Dezellularisierung sowie die Effizienz des Sterilisationsprotokolls evaluiert. Als Vergleichsgruppe dienten industriell dezellularisierte und sterilisierte Rinder- (Gruppe RP<sub>i</sub>) und Pferdeperikardpatche (Gruppe PP<sub>i</sub>). Durch statische und dynamische Besiedelung mit Endothelzellen (EC) konnten sowohl die Biokompatibilität als auch die Endothelialisierung des Gewebes evaluiert werden.

**Ergebnisse:** Die Fixierung mit GA wies keine verlässliche Sterilität auf und führte zu strukturellen Gewebeschäden und Zytotoxizität. Dahingegen wiesen DEZ-Proben Sterilität und eine signifikante Reduzierung des DNA-Gehaltes nach der Dezellularisierung auf. Die vergleichende Analyse bestätigte die Sterilität der Proben der Gruppen RP<sub>i</sub> und PP<sub>i</sub>, wobei die Effizienz der Dezellularisierung der RP<sub>i</sub>-Proben große Unterschiede aufwies. Die Biokompatibilität der Proben DEZ, RP<sub>i</sub> und PP<sub>i</sub> konnte aufgrund von Zelladhäsion durch EC bestätigt werden. Durch die dynamische Konditionierung von EC konnte die Zelladhäsion optimiert werden.

**Zusammenfassung:** Dezellularisierte Perikardpatche zeigten sich als zu bevorzugendes Biomaterial für den medizinischen Einsatz. Eine Flusskonditionierung zur Endothelialisierung solcher Patche stellt eine denkbare Zukunftslösung dar. Im Allgemeinen zeigte sich die Notwendigkeit eines standardisierten multi-modalen Protokolls zur Vorauswahl der Gewebe zur Herstellung von Biomaterialien für die medizinische Anwendung

# 1. Einleitung

## 1.1. Kardiovaskuläre Erkrankungen

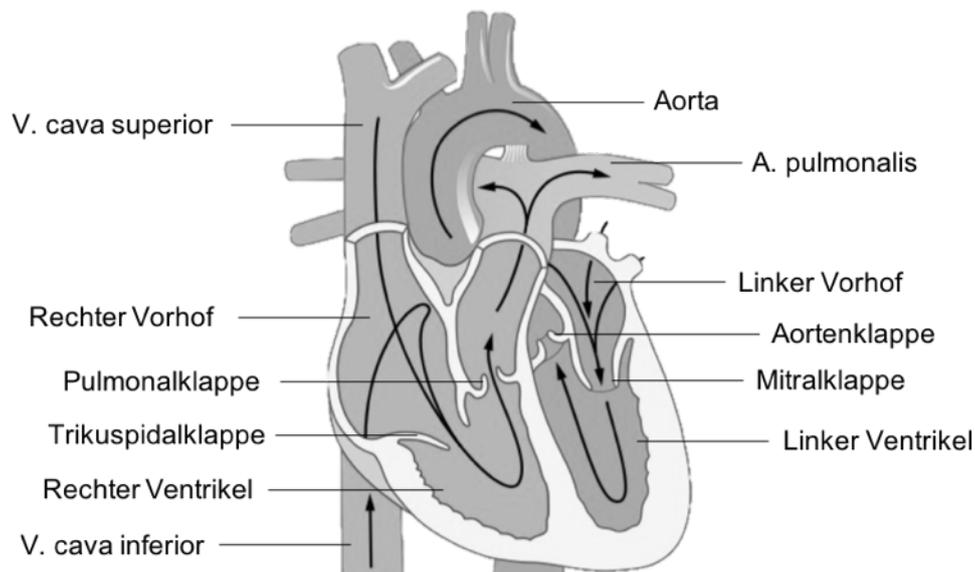
Trotz immer fortschrittlicherer Therapieansätze und -interventionen stellen kardiovaskuläre Erkrankungen die häufigste Todesursache weltweit dar. Jährlich sterben mehr als 17 Millionen Menschen (2016) an Herz-Kreislauf-Erkrankungen, wobei diese Zahl bis zum Jahr 2030 voraussichtlich auf mehr als 23 Millionen ansteigen wird [1]. Dies liegt nicht nur an der steigenden Lebenserwartung, sondern auch an westlichen Ernährungs- und Lebensstilen. In Deutschland liegen die kardiovaskulären Erkrankungen mit 37,2 % ebenfalls an erster Stelle der Todesursachen, mit weitem Abstand zu malignen Neubildungen (25,3 %). Eine steigende Tendenz der stationären Aufenthalte zeichnet sich besonders bei den Herzklappenerkrankungen ab (+ 5,8 % im Jahr 2018). Aber auch angeborene Herzfehler verzeichnen eine Zunahme von 1,4 %, was jährlich ca. 22.600 Behandlungen entspricht. [2]

## 1.2. Herz-Kreislauf-System

### 1.2.1. Angeborene Herzfehler

Zur Darstellung angeborener Herzfehler und der Erkrankungen der Herzklappen erfolgt an dieser Stelle ein kurzer Überblick über die Physiologie des Herzens.

Sauerstoffarmes Blut aus der Körperperipherie gelangt über die große obere und untere Hohlvene (V. cava superior und inferior) in den rechten Vorhof und passiert die Trikuspidalklappe auf seinem Weg in die rechte Kammer (Ventrikel) (Abbildung 1). Über den rechten Ventrikel gelangt das Blut durch die Pulmonalklappe und die Lungenarterien (Aa. pulmonales) in die Lunge, wo der Gasaustausch stattfindet. Über die Lungenvenen (Vv. pulmonales) gelangt das nun sauerstoffreiche Blut zurück zum Herzen in den linken Vorhof und über die Mitralklappe in den linken Ventrikel. Die Versorgung des Körperkreislaufes erfolgt nun über den Blutaustrom durch die Aortenklappe und letztlich die Hauptschlagader (Aorta).



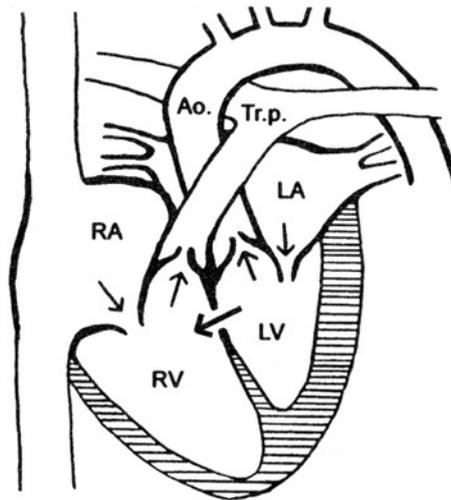
**Abbildung 1: Aufbau des Herzens**

Die Pfeile zeigen den Weg des Blutstroms. Sauerstoffarmes Blut aus dem Körper erreicht über die V. cava superior und inferior den rechten Vorhof des Herzens. Durch die Trikuspidalklappe fließt das Blut in den rechten Ventrikel und passiert die Pulmonalklappe, um über die Lungenarterien (A. pulmonalis) in die Lunge zu gelangen. Hier erfolgt die Oxygenierung des Blutes. Sauerstoffreiches Blut gelangt über die Lungenvenen zum Herzen zurück und fließt vom linken Vorhof durch die Mitralklappe in den linken Ventrikel. Von hier aus strömt das Blut durch die Aortenklappe in die Aorta und versorgt den gesamten Körper mit sauerstoffreichem Blut. Quelle: Adaptiert nach [3]

Angeborene Herzfehler stellen die häufigsten angeborenen Fehlbildungen dar und deren Ätiologie ist auf eine Vielzahl verschiedener Ursachen zurückzuführen. So seien an dieser Stelle beispielhaft fehlerhafte Chromosomensätze, Infektionen während der Schwangerschaft oder auch Medikamente zu nennen [4]. Hierdurch kann es zu vielseitigen Fehlbildungen am Herzen kommen, wobei zu den häufigsten die Ventrikel- und Vorhofseptumdefekte gehören [5].

Das Septum trennt die zwei Ventrikel des Herzens voneinander. Bei einem Septumdefekt liegt eine Verbindung zwischen den zwei Herzkammern (Ventrikelseptumdefekt, VSD) oder den zwei Vorhöfen (Vorhofseptumdefekt, ASD) vor. Kleinere Defekte zeigen meist klinisch keine Auswirkungen und ein selbstständiger Verschluss des Defektes ist in den ersten Lebensjahren möglich. Bei einem großen Ventrikelseptumdefekt (Abbildung 2) kommt es durch höhere Druckverhältnisse im linken System meist zu einem sogenannten Links-Rechts-Shunt: Sauerstoffreiches Blut fließt vom linken Ventrikel durch den Defekt im Ventrikelseptum in den rechten Ventrikel und durchläuft erneut den Lungenkreislauf. Langfristig kann dies bei größeren Defekten zu einer Überbelastung des Lungensystems

führen und kann u.a. eine erhebliche Beeinträchtigung der Lungenfunktion und eine Gedeihstörung hervorrufen. Bei einem Vorhofseptumdefekt fließt das Blut vom linken zum rechten Vorhof. Hierdurch kommt es ebenfalls zu einer vermehrten Lungendurchblutung und ggf. zu Entzündungen der Atemwege sowie zu Leistungsminderungen. [4]



**Abbildung 2: Darstellung eines Ventrikelseptumdefekts**

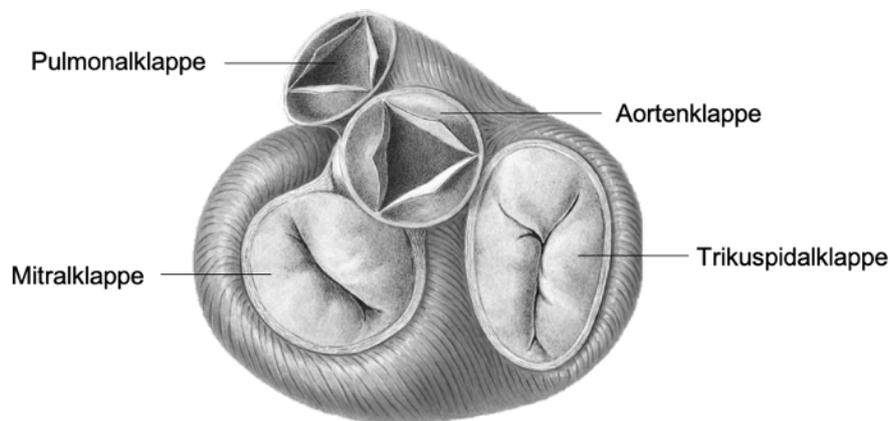
Durch einen Septumdefekt kommt es meist zu einem Links-Rechts-Shunt und einer damit einhergehenden erhöhten Lungendurchblutung, die je nach Ausmaß des Defektes eine Beeinträchtigung der Lungenfunktion zur Folge hat. RA = rechtes Atrium (Vorhof), RV = rechter Ventrikel, LV = linker Ventrikel, LA = linkes Atrium, Tr.p. = Truncus pulmonalis, Ao. = Aorta. Quelle: [4]

### 1.2.2. Herzklappenerkrankungen

Die Herzklappen agieren als Ventile während der mechanischen Kontraktion des Vorhofs und Ventrikels (Abbildung 3). Ihre Aktion, die einen gerichteten Blutstrom ermöglicht, ist abhängig von den Druckverhältnissen in den Vorhöfen, Kammern und angrenzenden Gefäßen des Herzens.

Fehler der Herzklappen (Vitien) äußern sich in Form von Insuffizienzen oder Stenosen, wobei auch kombinierte Herzklappenfehler auftreten können. Von einer insuffizienten Klappe spricht man, wenn die Klappe nicht effizient schließt und Blut zurückfließen kann. Beispielsweise kommt es bei einer Mitralklappeninsuffizienz zu einer Volumenbelastung des linken Vorhofs. Eine Stenose, also eine Verengung der Klappenöffnung, führt zu einem Blutstau vor der betroffenen Herzklappe und somit zu einer erhöhten Druckbelastung. Eine Aortenklappenstenose führt dadurch z.B. auf Dauer zu einer chronischen

Druckbelastung des linken Ventrikels einhergehend mit einer insuffizienten Pumpleistung und letztlich zu einer Herzinsuffizienz.



### Abbildung 3: Ventilebene des Herzens mit Herzklappen

Der Querschnitt durch die Ventilebene des Herzens zeigt die Aorten- und Pulmonalklappe, die sogenannten Taschenklappen. Die Klappen bestehen aus jeweils drei Taschen, die sich bei Klappenschluss aneinanderlegen. Diese sind zwischen den großen Gefäßen und den Ventrikeln positioniert. Die Mitralklappe und Trikuspidalklappe sind hingegen Segelklappen, die sich in Richtung des Ventrikels öffnen. Sie trennen die Ventrikel und Vorhöfe voneinander. Quelle: Adaptiert nach [3]

Die Entstehung (Ätiologie) von Herzklappenerkrankungen kann angeboren oder erworben sein. Letztere sind auf vielfältige Ursachen zurückzuführen, von denen der altersbedingte Abbau des Gewebes (Degeneration), die bakterielle Entzündung des Herzklappengewebes (Endokarditis) und lebensstilbedingte arteriosklerotische Veränderungen die häufigsten darstellen [6]. Hierbei kommt es im Verlauf meist zu Verkalkungen und Verhärtungen (Fibrosierung) des Gewebes, die wiederum Insuffizienzen oder Stenosen hervorrufen können. Die Aortenklappenstenose weist unter den Herzklappenerkrankungen die höchste Inzidenz auf gefolgt von der Mitralklappeninsuffizienz [7].

## 1.3. Therapeutische Intervention

### 1.3.1. Gewebepatche

Gewebepatche (*patch* = Flicken) werden in operativen Fachbereichen wie der Herz-, Neuro- und Gefäßchirurgie vielfach routiniert eingesetzt. In herzchirurgischen Operationen werden Gewebepatche beispielsweise genutzt, um VSD oder ASD zu verschließen [8]. Allgemein chirurgisch werden sehr häufig Patche verwendet, um beispielsweise den Nahtverschluss einer Anastomose zu unterstützen [9]. Hierbei unterscheidet man synthetische und biologische Materialien. Die Suche nach alternativen Materialien hat unzählige Entwicklungen hervorgebracht, die in variabler Größe und Form verfügbar sind.

#### Synthetische Materialien

Die zunehmende Vielfalt der Anwendungsgebiete synthetischer Materialien im Bereich von Medizinprodukten und Implantaten bedarf der ständigen Neu- und Weiterentwicklung sowie der Anpassung an die jeweiligen Anforderungen. In der Kardiologie und Herzchirurgie kommt es häufig zum Einsatz von metallischen Werkstoffen, z.B. in Stents, Herzklappenprothesen oder Herzschrittmachern [10]. Darüber hinaus kommen synthetische Polymere insbesondere in den Schlauchsystemen der extrakorporalen Zirkulation (Herz-Lungen-Maschine), aber auch als Patche zum Einsatz [11]. Anforderungen, die das Material im Bereich der herzchirurgischen Anwendung erfüllen muss, sind beispielsweise Biokompatibilität und Anpassung an die hämodynamischen Verhältnisse des Herz-Kreislauf-Systems [12]. Die Suche nach alternativen synthetischen Materialien brachte eine Vielzahl verschiedener Patche auf den Markt. Synthetische Polymere, wie beispielsweise Polyethylenterephthalat (PET, Dacron<sup>®</sup>), Polyurethan (PU) oder Polytetrafluorethyln (PTFE, Teflon<sup>®</sup>), haben besonders die Gefäßchirurgie mit der Entwicklung von großen Gefäßprothesen revolutionieren können [13]. Auch in der Herzchirurgie finden die synthetischen Materialien Anwendung, beispielsweise bei der operativen Versorgung angeborener Herzfehler in Form von Patchen, als Grundbestandteil von Herzklappenprothesen oder als Gefäßprothese zum Aortenersatz [14]. Vorteilhaft sind die industrielle und serielle Produktion, schnelle Verfügbarkeit und die vielen Auswahl- und Anpassungsmöglichkeiten der Materialeigenschaften (z.B. abbaubare, durchlässige oder nicht-durchlässige

Materialien). Allerdings weisen diese eine geringere Biokompatibilität als biologische Materialien auf und unterliegen Degenerationsprozessen, die in der Folge zur Freisetzung toxischer Abbauprodukte und Immunreaktionen führen können. Zudem fördert ihre meist poröse Oberfläche die Entstehung von Thromben (Thrombogenität) [15, 16]. Zusätzlich stellt sich die ausreichende Sterilisation der Gewebe aufgrund von fehlender thermischer Stabilität mit der Folge der Degradation als Herausforderung dar [10].

Synthetische Materialien werden heutzutage vielfach angewendet; die genannten Nachteile, insbesondere aber die Sorge vor toxischen Abbauprodukten und immunologischen Reaktionen, führen zur Etablierung weiterer biologischer und somit physiologischer Alternativen [17].

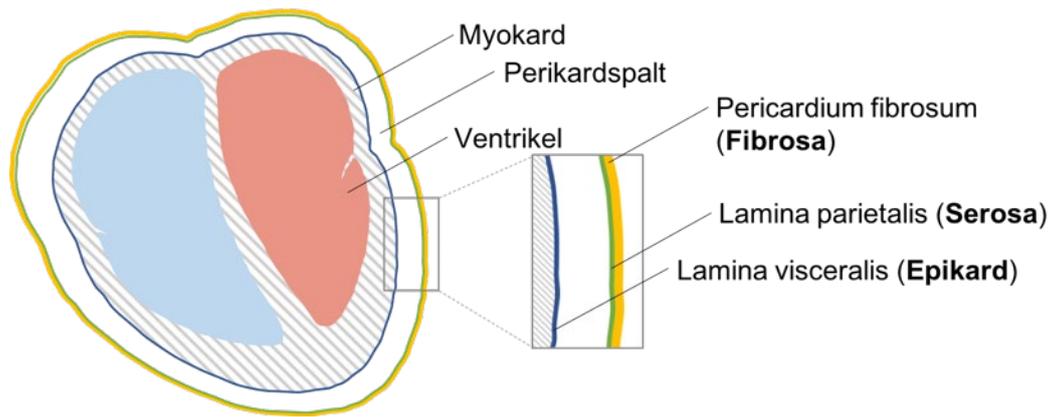
Neben synthetischen Polymeren seien auch die biologischen Polymere genannt, wobei Letztere natürlichen Ursprungs sind. Zu ihnen gehören beispielsweise Kollagen oder Fibrin, die im menschlichen Körper vorkommen und als Biomaterial genutzt werden [13].

### **Biologische Materialien**

Während in den chirurgischen Fachdisziplinen viele verschiedene biologische Materialien als Patche verwendet werden [18], wird in der Herzchirurgie hauptsächlich Perikard verwendet.

Das Perikard bildet den Herzbeutel, der das Herz umgibt. Anatomisch lässt es sich in zwei Blätter, ein sogenanntes *Pericardium fibrosum* und *Pericardium serosum*, unterteilen. Das *Pericardium serosum* lässt sich wiederum in zwei Schichten (*Laminae*) unterteilen. Zunächst die *Lamina visceralis*, die dem Herzen direkt aufliegt und damit die oberflächliche Schicht des Herzens bildet, das sogenannte Epikard. Darunter liegt das Herzmuskelgewebe (Myokard), mit dem das Epikard fest verwachsen ist und somit die Oberfläche des Herzens bildet. Die zweite Schicht ist die *Lamina parietalis* (Serosa), die mit der Innenseite des *Pericardium fibrosum* (Fibrosa) fest verwachsen ist, weshalb diese beiden Schichten klinisch als Perikard bezeichnet werden. Somit bildet die Serosa die Innenseite des Perikards und die Fibrosa die Außenseite (Abbildung 4). Die Serosa besitzt eine glatte Oberfläche, während die Fibrosa durch ihren ausgeprägten Faserverlauf deutlich von der Serosa unterschieden werden kann.

Zwischen der *Lamina visceralis* und der *Lamina parietalis* liegt ein mit seröser Flüssigkeit gefüllter Raum, der ein reibungsloses Aneinandergleiten der Häute ermöglicht. [19]



#### Abbildung 4: Schematische Darstellung der Perikardschichten

Serosa und Fibrosa werden im klinischen Gebrauch zusammengefasst als Perikard bezeichnet. Die *Lamina visceralis* des *Pericardium serosum* überzieht die Oberfläche des Herzes und bildet das sogenannte Epikard mit dem darunter liegenden Myokard. Zwischen dem Epikard und der Serosa ist ein Perikardspalt angedeutet, der mit seröser Flüssigkeit gefüllt ist. Quelle: Eigene Darstellung adaptiert nach [20]

Da sich Rinder- oder Pferdeperikard nicht wesentlich von der menschlichen Anatomie und Histologie unterscheidet, ist es besonders geeignet für kardiovaskuläre Anwendungen. Durch verschiedene Prozessierungsmethoden wird das tierische Gewebe entsprechend aufbereitet. Es ist von vielen verschiedenen Herstellern käuflich zu erwerben [21, 22].

#### 1.3.2. Therapie der Herzklappenerkrankungen

Die chirurgische Behandlung von Herzklappenerkrankungen stellt nach der koronaren Bypass-Operation die zweithäufigste herzchirurgische Operation dar [23]. An erster Stelle stehen hier die Operationen an der Aortenklappe bei Vorliegen einer Aortenklappenstenose, dicht gefolgt von Operationen an der Mitralklappe bei Bestehen einer Mitralklappeninsuffizienz. An dieser Stelle sei erwähnt, dass sowohl Rekonstruktionen als auch kathetergestützte interventionelle Verfahren zur Therapie der Herzklappenerkrankungen angewendet werden, auf die später weiter eingegangen wird. Sollte eine Rekonstruktion nicht möglich sein, kommen verschiedene Arten des Herzklappenersatzes in Frage. [2]

### **Mechanischer Herzklappenersatz**

Grundsätzlich bieten mechanische Herzklappen eine lange Haltbarkeit und gute hämodynamische Ergebnisse [24]. Aktuell werden meist sogenannte Doppelflügelklappen genutzt (Abbildung 5, A). Da es sich bei mechanischen Klappen gänzlich um Fremdmaterial handelt, besteht die Notwendigkeit einer dauerhaften Blutverdünnung (Antikoagulation) mit Cumarinderivaten (z.B. Marcumar®), um der Bildung von Blutgerinnseln (Thromben) vorzubeugen [25]. Diese Thrombogenität entsteht dadurch, dass Blutgefäße an der Innenseite mit sogenanntem Endothel ausgekleidet sind. Sobald Blut und die darin enthaltenen Bestandteile mit Oberflächen von Endothel-freien Materialien in Kontakt kommen, löst dieses fremde Material die gleiche Kaskade wie eine Gefäßverletzung aus und es kommt somit zur Blutgerinnung [26]. Außerdem entsteht durch die Bewegung der mechanischen Flügel durch den Blutstrom ein nicht zu vernachlässigendes Klick-Geräusch, das den Patienten psychisch belasten kann. [4, 27, 28]

Der mechanische Herzklappenersatz stellt die Therapie der Wahl bei jungen Patienten dar, die dann im Regelfall keine weiteren Re-Operationen benötigen [25]. Letztlich wird die Prothesenwahl aber aufgrund einer Vielzahl von individuellen Faktoren, z.B. Kinderwunsch bei jungen Frauen, risikoreiche Hobbys oder nicht erwünschte Lebensstilanpassungen durch Antikoagulation, patientenspezifisch und unter Berücksichtigung des Patientenwunsches getroffen [29]. Die Art der Operation und der Zugangsweg über das Brustbein (Sternotomie) unterscheiden sich dabei nicht von der des biologischen Herzklappenersatzes.

### **Biologischer Herzklappenersatz**

Mittlerweile gibt es viele verschiedene Arten von biologischen Klappen, die sich vor allem in ihrem Material unterscheiden. Diese können auf einem tragenden Gerüst (Stent) platziert oder gerüstlos sein.

Bei sogenannten Homo-/Allografts handelt es sich um komplette menschliche Herzklappen von Organspendern, die durch spezielle Aufbereitungsmethoden bei Patienten mit Herzklappenerkrankungen implantiert werden können. Weiterhin besteht die Möglichkeit patienteneigenes (autologes) Gewebe zu nutzen [29]. Hierbei kann entweder Gewebe des Herzbeutels (Perikard) zur Rekonstruktion einer Herzklappe

genutzt werden oder eine sogenannte Ross-Operation durchgeführt werden. Diese beschreibt die Implantation der Pulmonalklappe an Stelle der Aortenklappe, wobei dies wiederum mit der Notwendigkeit eines biologischen Herzklappenersatzes anstelle der ursprünglichen Pulmonalklappe einhergeht [30]. Vor allem jüngere Patienten profitieren von dem Vorgehen der Ross-Operation [31]. Zusätzlich kann aus einer Vielzahl verschiedener aufbereiteter und konservierter Tiermaterialien (Xenograft) ausgewählt werden. So sind beispielsweise komplette Aortenklappen des Schweines (inklusive Aortenwurzel) oder gerüstgestützte Aortenklappen (ohne Aortenwurzel) aus Schweine-, Rinder- oder Pferdeperikard erhältlich [32]. Häufig werden Herzklappenprothesen verwendet, die ein Gerüst aus synthetischen Materialien und Klappensegel aus biologischem Material aufweisen (Abbildung 5, B) [33].

Die Indikation zum biologischen Herzklappenersatz wird insbesondere bei Patienten über 65 Jahren gestellt, da die Zeit, bis eine Re-Operation notwendig wird und die Lebensdauer des Implantats zwischen 10-15 Jahren beim Aortenklappenersatz liegt [34]. Studien zeigen jedoch, dass es bei einem biologischen Mitralklappenersatz schneller zu einer strukturellen Degeneration der Herzklappenprothese kommen kann [35]. Zudem ist keine dauerhafte Antikoagulation erforderlich. Insbesondere im höheren Alter stellt die medikamentöse Antikoagulation einen erheblichen Risikofaktor für das Auftreten von Blutungen dar [34]. Der chirurgische Mitralklappenersatz mit einer biologischen Herzklappenprothese erfordert laut Leitlinien eine dreimonatige Antikoagulation im Anschluss an die Operation. Bei einem biologischen Aortenklappenersatz wird hingegen leitliniengerecht lediglich eine postoperative Therapie mit Acetylsalicylsäure für drei Monate durchgeführt. [36] Somit sinkt das Risiko für Antikoagulanzen-assoziierte Blutungen bei der Implantation biologischer Herzklappenprothesen [37]. Zu beachten ist, dass biologisches Material einer altersbedingten Degeneration unterliegt, was häufig zu erneuten Operationen führen kann und somit das Risiko peri- oder postoperativer Komplikationen erhöhen kann. Besonders bei jungen Patienten scheinen biologische Herzklappen schneller zu degenerieren, weshalb, wie oben bereits beschrieben, bei jüngeren Patienten ein mechanischer Herzklappenersatz empfohlen wird. [38]

### **Kathetergestützter Herzklappenersatz**

Bei Aortenklappenstenosen wird das Verfahren des transkatheter-Aortenklappenersatzes (*transcatheter aortic valve implantation, TAVI*) insbesondere bei

Patienten mit hohem Alter, vielen Komorbiditäten und einem erhöhten Operationsrisiko eingesetzt. Hierbei wird durch ein interdisziplinäres Team von Kardiologen, Herzchirurgen und Herzanästhesisten im Herzkatheterlabor ein ballonexpandierbares Stentgerüst mit einer darin fixierten biologischen Aortenklappe beispielsweise über die Leistenarterie (A. femoralis) bis zur Aortenklappenposition geführt. Hier folgt die Expansion der Klappe, die letztlich als vollfunktionsfähige neue Aortenklappe dient. Bei dem TAVI-Verfahren werden ebenfalls biologische Herzklappen aus den oben genannten Materialien genutzt (Abbildung 5, C). [4, 39]

In den vergangenen Jahren hat die Anzahl des kathetergestützten Aortenklappenersatzes bei Aortenklappenstenose stetig zugenommen. Während im Jahre 2008 noch 637 TAVI-Verfahren in Deutschland durchgeführt wurden, stieg die Zahl auf 24321 Durchführungen im Jahr 2019 mit einer weiterhin steigenden Tendenz. Das Alter der Patienten liegt in etwa 60 % der Fälle zwischen 80 und 89 Jahren, wobei insbesondere in den letzten Jahren die Ausweitung der Indikationsstellung für jüngere Patienten mit einem niedrigeren Risiko diskutiert wurde. [40] Die aktuellen Leitlinien wurden entsprechen angepasst. Eine TAVI wird hierbei bereits für Patienten über 75 Jahren empfohlen. Die Leitlinien ermöglichen und befürworten an dieser Stelle die individuelle Entscheidungsfindung durch das interdisziplinäre Herzteam auch bei Patienten unter 75 Jahren. [41]

Mit weiterem technischem Fortschritt können TAVI-Operationen durchaus auch für jüngere Patienten als minimal-invasive Therapiemöglichkeit der Zukunft gelten.



**Abbildung 5: Verschiedene Arten von Herzklappenprothesen**

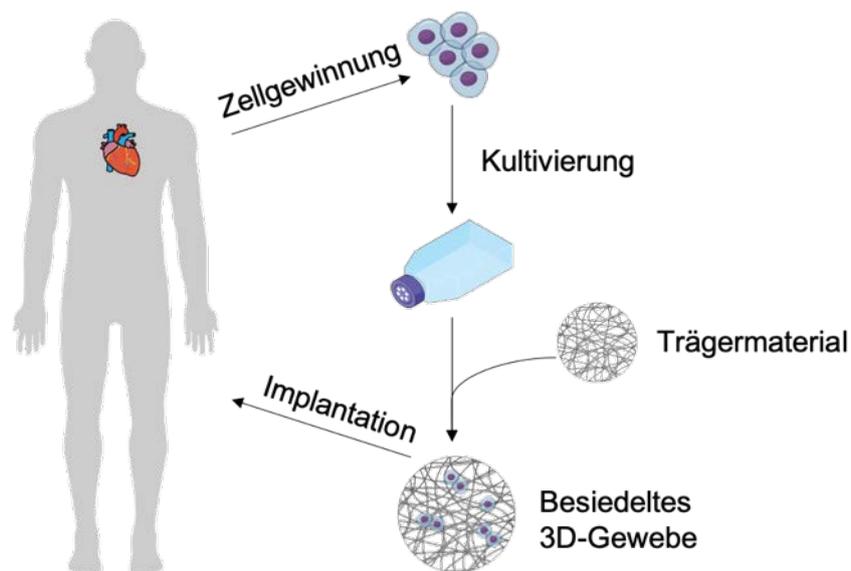
**(A)** mechanische Doppelflügel-Herzklappe Carbomedics®, **(B)** biologische Herzklappe Avalus™, **(C)** biologische Herzklappe Sapien 3® mit Stentgerüst für den kathetergestützten und minimalinvasiven Herzklappenersatz. Quelle: Nach Reihenfolge [42-44]

## 1.4. Regenerative Medizin

Die regenerative Medizin stellt einen relativ neuen Therapieansatz dar, dessen Grundidee auf der Wiederherstellung erkrankter oder geschädigter Gewebe basiert. Besonders im Hinblick auf den vorherrschenden Organmangel in Kombination mit einem immer höher werdenden Bedarf, stellt der Ansatz des *Bioengineering* zur Therapie eine vielversprechende Möglichkeit dar. Ziel ist es, körpereigene Reparaturmechanismen gezielt zu aktivieren und erkranktes Gewebe vollständig zu ersetzen. Die Erfolge der Stammzelltherapie der letzten Jahre brachten große Fortschritte auf dem Teilgebiet der Zellgewinnung und -kultivierung. [10]

Aus diesem Ansatz ist auch das Gebiet des *in-vitro Tissue Engineering* entstanden. Vereinfacht dargestellt soll durch die Kultivierung von gewebespezifischen Zellen außerhalb des Körpers (in entsprechenden Bioreaktoren) und dem richtigen Trägermaterial (Matrix, *Scaffold*) ein dreidimensionales (3D), vollfunktionsfähiges und implantationsfertiges Gewebe entstehen (Abbildung 6).

Kardiovaskuläres *Tissue Engineering* stellt insofern einen vielversprechenden Therapieansatz dar, als dass einmal geschädigtes Myokard über keine wesentlichen Regenerationsfähigkeiten verfügt [45].



**Abbildung 6: Schematische Darstellung des kardiovaskulären Tissue Engineering**

Durch Biopsien können gewebespezifische Zellen außerhalb des Körpers kultiviert werden. Hierbei können durch die Applikation verschiedenster Stimuli, z.B. biomechanischer Einflüsse, individuelle Anforderungen erfüllt werden. Sobald ein passendes dreidimensionales

Trägermaterial gefunden wurde, kann dieses besiedelt und anschließend anstelle des erkrankten Materials implantiert werden. Quelle: Adaptiert nach [46], Grafik erstellt mit [47]

Durch Fortschritte in der Stammzellforschung und der Programmierung von Stammzellen, wird die Gewinnung von Kardiomyozyten, Endothelzellen und Fibroblasten immer effektiver. So werden bereits Stammzellen unterschiedlichen Ursprungs erfolgreich genutzt [48]. Als Scaffold können im *Tissue Engineering* sowohl synthetische Polymere als auch biologische Materialien, wie Kollagen, Fibrin oder dezellularisierte (azelluläre) Gewebe dienen [49].

Durch die Kultivierung in Bioreaktoren können Zellen auf zu besiedelnden Scaffolds durch eine Reihe von Stimuli zur Zellvermehrung und Adhäsion angeregt werden (Endothelialisierung). Hierbei kann es sich um hormonelle Signale oder Wachstumsfaktoren handeln aber auch mechanische und bio-physikalische Stimuli werden angewandt. Sobald zelluläre 3D-Konstrukte an Größe zunehmen, stellt sich das Problem der ausreichenden Versorgung des Gewebes sowohl mit Sauerstoff als auch mit Metaboliten dar. Denn in statischen Kulturen des *Tissue Engineering* findet die Versorgung von besiedelten Scaffolds meist über Diffusion statt, weshalb man bei größeren Konstrukten auch von einer Diffusionslimitierung spricht. [50]

Durch dynamische Kultivierung lassen sich Konstrukte im kardiovaskulären *Tissue Engineering* zum einen besser und länger kultivieren, da die Diffusionslimitierung überwunden werden kann und die Zellen ausreichend versorgt werden. Zum anderen liegen biomimetische, physiologischere Verhältnisse vor, da kardiovaskuläre Implantate im Herz-Kreislauf-System angewandt werden und somit einem kontinuierlichen Blutstrom ausgesetzt sind. [51]

## **1.5. Prozessierung biologischer Gewebe**

### **1.5.1. Fixierung mit Glutaraldehyd**

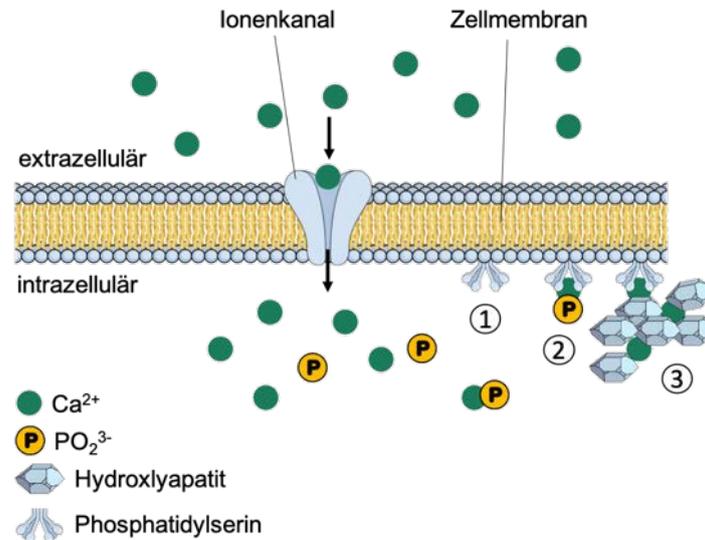
Die Extrazellulärmatrix (EZM) von biologischem Gewebe besteht aus vielen verschiedenen Strukturproteinen, wobei Kollagen eines der wichtigsten und häufigsten darstellt. Mit einem speziellen Verhältnis von Festigkeit und Elastizität verleiht u.a. Kollagen dem Gewebe seine organspezifische Konsistenz [52]. Um eine höhere

biomechanische Stabilität des Gewebes zu erlangen und um immunologische zelluläre und humorale Vorgänge zu reduzieren, wird sowohl autologes als auch xenogenes Perikard vor dem Gebrauch einer Fixierung unterzogen [53]. In der Herzchirurgie wird dies seit den 1960er Jahren in erster Linie durch die chemische Verbindung Glutaraldehyd (1,5-Pentandial) erreicht, die maßgeblich durch die Versuche von Alain Carpentier entwickelt und optimiert wurde. [54-56]

Glutaraldehyd (GA) bewirkt eine Quervernetzung von Kollagenfasern und EZM-Molekülen (Abbildung 8). Hierdurch wird beispielsweise verhindert, dass das Gewebe im Empfänger durch immunologische Vorgänge degradiert wird. Zusätzlich führt die Quervernetzung zu einer chemischen Stabilisierung und damit zu einer längeren Haltbarkeit der behandelten Gewebe. GA findet zudem Anwendung in der Desinfektion, da es sowohl gegen Pilze als auch gegen Viren und Bakterien effektiv wirksam ist. Nach der Behandlung sind die Zellen im Gewebe fixiert und Enzyme blockiert. [57-60]

Heutzutage wird die Mehrzahl der käuflich erwerblichen biologischen Gewebe und Herzklappenprothesen weiterhin mit dieser in den 1960er-Jahren etablierten Methode aufbereitet. Eine Vielzahl von Evaluierungsstudien zeigte allerdings erhebliche Nachteile der GA-Fixierung auf [61, 62].

So ist die Fixierung durch GA mit einer deutlichen Kalzifizierung des Gewebes assoziiert, die zu einem frühzeitigen Versagen des Biomaterials *in-vivo* führt und somit Re-Operationen zur Folge haben kann [61]. Besonders ausgeprägt ist das Auftreten der Kalzifizierung bei jungen Patienten. Hierfür wird zum einen die Exposition von Kalzium-Bindungsstellen im phosphatreichen ( $\text{PO}_2^{3-}$ ) Gewebe (insbesondere DNA-Reste und Membranen) und die dadurch resultierende erhöhte Kalzium( $\text{Ca}^{2+}$ )-Aufnahme im Gewebe verantwortlich gemacht. Zum anderen fehlen  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulationsmechanismen der fixierten Zellen [63]. Der physiologische  $\text{Ca}^{2+}$ -Gradient zwischen dem Inneren der Zelle (intrazellulär,  $<10^{-4}$  mmol/l  $\text{H}_2\text{O}$ ) und dem Äußeren (extrazellulär, 1,25 mmol/l  $\text{H}_2\text{O}$ ) wird durch passive und aktive Ionenkanäle in der Zellmembran aufrechterhalten und streng reguliert [64]. Durch die GA-Behandlung und Fixierung der Zellen kommt es zu einem massenhaften  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zelle. Im Verlauf bilden sich Komplexe aus  $\text{Ca}^{2+}$ , phosphatreichen Membranproteinen (z.B. Phosphatidylserin) und freiem  $\text{PO}_2^{3-}$ , die schließlich zur Bildung von Hydroxylapatit (hydroxyliertes Kalziumphosphatsalz, das u.a. Knochenbestandteil ist) führen (Abbildung 7). [65]

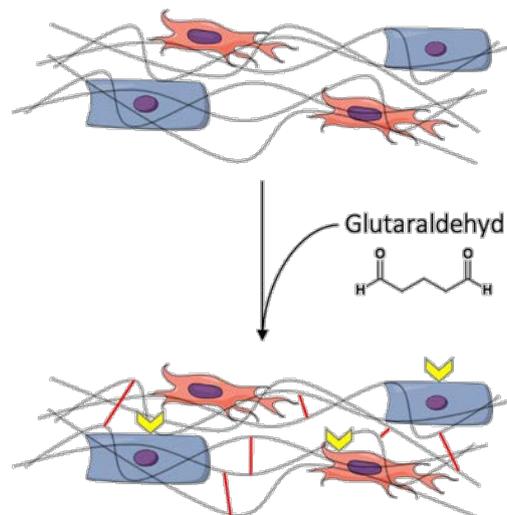


**Abbildung 7: Kalzifizierungsvorgänge der Zelle in schematischer Darstellung**

Freies Ca<sup>2+</sup> strömt in die fixierten Zellen und reichert sich intrazellulär an. Auf der Innenseite der Zellmembran sind freie Phosphatreste von gebundenen Membranproteinen exponiert (Phosphatidylserin, 1). Mit der Zeit bilden sich zunächst Kalziumphosphat-Komplexe (2), die schließlich Hydroxylapatit (3) bilden und zur Verhärtung und Kalzifizierung des Gewebes führen. Quelle: Eigene Darstellung adaptiert nach [65], Grafik erstellt mit [47]

Um Kalzifizierungen möglichst gering zu halten, wurden verschiedene Anti-Kalzifizierungs-Protokolle entwickelt. Ziel ist es hierbei, freie GA-Stellen möglichst zu blockieren und somit unschädlicher zu machen, um eine Endothelialisierung der Gewebe zu ermöglichen. Dazu werden verschiedene Detergenzien, wie z.B. Ethanol, Triton X-100 oder *sodium dodecyl sulfate* (SDS, Natriumlaurylsulfat) genutzt. Ebenso wurden neuere Ansätze mittels Coating der GA-behandelten Gewebe, z.B. mit Wachstumsfaktoren für Endothelzellen, beschrieben. Die kommerziell genutzten Verfahren der Herzklappenprothesenhersteller sind allerdings Firmengeheimnisse. [65-68]

Trotz der Entwicklung von Anti-Kalzifizierungs-Protokollen ist die ausgeprägte toxische Wirkung von GA und die damit einhergehende geringe Biokompatibilität nicht zu vernachlässigen. Studien belegen, dass eine GA-Behandlung die Immunogenität eines Gewebes nicht aufheben kann, sondern immunologische Reaktionen nach der Implantation hervorruft. [69-71]



**Abbildung 8: Schematische Darstellung der GA-Fixierung**

Fixierung mit GA von nativem Gewebe (graue Fasern) mit exemplarischen Zellen (blau und rot). Durch Zugabe von GA kommt es zu einer Kollagen-Quervernetzung (rote Linien) und zu der Freilegung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstellen (gelbe Pfeile). Grafik erstellt mit [47]

### 1.5.2. Dezellularisierung

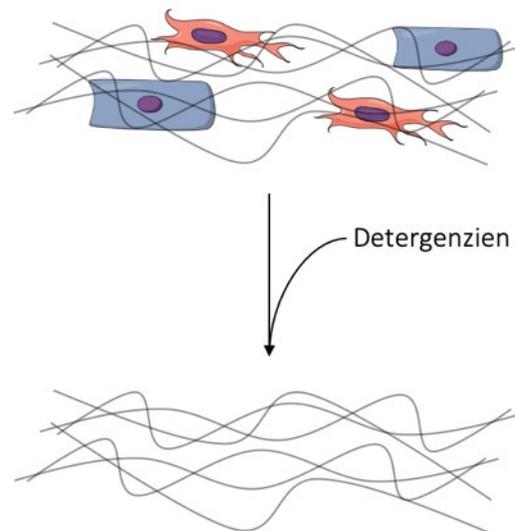
Um die Limitierungen der GA-Fixierung zu überkommen, etablierte sich der alternative Ansatz der Dezellularisierung von biologischen Geweben. Ziel ist es hierbei, Zellen und zelluläre Bestandteile durch verschiedene Verfahren vollständig zu eliminieren und gleichzeitig die dreidimensionale Struktur des Gewebes zu erhalten (Abbildung 9). Endprodukt ist hier ein azellulärer Scaffold, der wiederum durch vielseitige Methoden und unterschiedliche Zellen besiedelt werden kann. Gängige dezellularisierte Gewebe im kardiovaskulären Bereich sind z.B. Herzklappen, Perikard und Gefäße [49].

Mittlerweile wurden zahlreiche Vorgehensweisen zur erfolgreichen Dezellularisierung von biologischem Gewebe publiziert. Die Methoden lassen sich grob unterteilen in physikalisch-mechanische, chemische und biologische, wobei meist eine Kombination aus diesen angewendet wird. Das Applizieren von Gefrier-Auftau-Zyklen, Agitation, Perfusion oder die Verwendung von Druck gehören u.a. zu den physikalisch-mechanischen Anwendungen. Zur chemischen Dezellularisierung stehen eine Vielzahl von Detergenzien zur Verfügung. So werden Säure (z.B. Peressigsäure) und Basen, ionische (SDS) und anionische Lösungen (*sodium deoxycholate*, SD, Desoxycholsäure) sowie Alkohole angewendet, um nur einige zu nennen. Zum weiteren Aufspalten von Zellbestandteilen kommen Enzyme, wie DNasen, RNasen oder Proteinasen, zur Verwendung. [72]

Einen entscheidenden Bestandteil jedes Dezellularisierungsprotokolls stellt das Waschen des prozessierten Gewebes dar, das meistens mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (*phosphate buffered saline*, PBS) durchgeführt wird. Mehrmalige Waschschriffe sollen das gründliche und endgültige Herauswaschen von Prozesssubstanzen und zellulären Resten aus dem biologischen Material gewährleisten. Weiterhin sind Applikationszeiten der oben genannten Protokolle entscheidend für den Dezellularisierungserfolg. Sie unterscheiden sich von Protokoll zu Protokoll. [73]

Bisher wurden keine einheitlichen Qualitätskriterien für dezellularisierte Gewebe definiert. Von entscheidender Bedeutung ist die Menge an DNA, die nach der Dezellularisierung weiterhin im Gewebe verbleibt, da diese residuelle DNA immunologische Reaktionen im Gewebe hervorrufen kann [74, 75]. Aus diesem Grund finden u.a. histologische Färbemethoden zur Evaluierung der residuellen DNA im zu untersuchenden Gewebe Anwendung [76].

Während die klinische Evaluierung von dezellularisierten Patches gute Ergebnisse zeigten [77, 78], sind die Ergebnisse von dezellularisierten Herzklappen noch kontrovers. Studien von dezellularisierten Aorten- oder Pulmonalhomografts zeigten gute Haltbarkeit und annähernd physiologische hämodynamische Verhältnisse [79, 80]. Klinische Studien zur Evaluation dezellularisierter Xenografts zeigten in den Langzeituntersuchungen eher enttäuschende Ergebnisse und konnten die Erwartungen und klinischen Anforderungen noch nicht erfüllen. [81, 82]



**Abbildung 9: Grundlegendes Prinzip der Dezellularisierung**

Zellen und Zellbestandteile biologischer Gewebe werden durch verschiedene Dezellularisierungsverfahren herausgewaschen, während das ursprüngliche dreidimensionale Gerüst des Gewebes erhalten bleibt. Dieses kann wiederum neu durch Zellen besiedelt und als Implantat verwendet werden. Grafik erstellt mit [47]

### 1.5.3. Sterilisation

Implantierbare Biomaterialien müssen einen hohen Sterilitätsstandard gewährleisten. Ähnlich der Dezellularisierung, zielt die Sterilisation des biologischen Gewebes darauf ab, jegliche Kontamination zu beseitigen, gleichzeitig aber die Struktur und mechanischen Eigenschaften des Gewebes möglichst unverändert zu belassen. Die Literatur umfasst viele verschiedene Konzepte der Sterilisation von Biomaterialien [83]. Definitionsgemäß werden bei dem Verfahren der Sterilisation Erreger aller Formen abgetötet oder zerstört und somit mindestens um den Faktor  $10^6$  reduziert [84].

Während Hitzesterilisation eine der effektivsten Methode, ist und jegliche Art von Mikroorganismen abtötet, verändert die Applikation maßgeblich die Struktur biologischen Gewebes und ist daher nicht empfehlenswert. Ebenso ist Exposition des Gewebes durch Gamma- oder UV-Bestrahlung schwer zu dosieren und führt schnell zu irreversiblen Schädigungen des Gewebes. Die chemische Sterilisation bietet viele Kombinations- und Dosierungsmöglichkeiten von den hierfür üblicherweise verwendeten Lösungen. Dabei handelt es sich meist um Ethylenoxid, Peressigsäure oder Ethanol. Auch Antibiotika finden Anwendung in der Sterilisierung und Desinfektion von

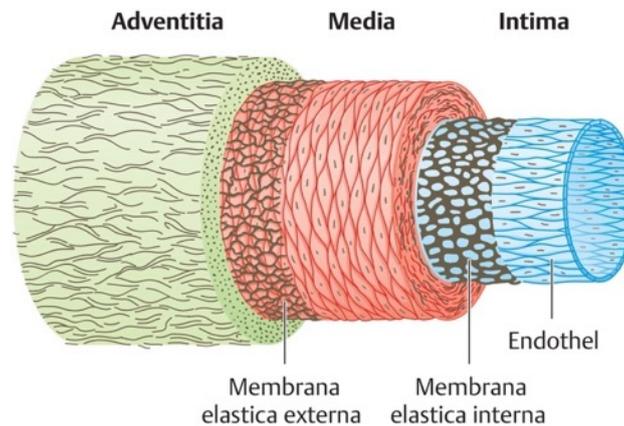
Biomaterialien, sind aber aufgrund des Risikos von Resistenzbildungen eher untergeordnet zu betrachten. [85]

Grundsätzlich gilt, dass jedes Sterilisierungsprotokoll und die Kombination verschiedener Substanzen/Methoden für jedes Biomaterial spezifisch getestet werden muss [86]. Zur Evaluierung eines Sterilisationsverfahrens können entsprechend den Leitlinien der *European Pharmacopoeia Commission* verschiedene bakterielle Nährmedien genutzt werden. So ist beispielsweise Thioglykolat besonders geeignet für anaerobische Bakterienkulturen, Trypton-Soja eignet sich für aerobische Bakterienkulturen und Pilze. Die Sterilität des Materials gilt als gesichert, wenn nach vierzehntägiger Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kein bakterielles oder fungales Wachstum zu erkennen ist. [87]

## 1.6. Endothelzellen

In der Entwicklung von Biomaterialien für die kardiovaskuläre Anwendung spielt nach erfolgreicher Dezellularisierung und Sterilisation auch die Möglichkeit der Endothelialisierung eine entscheidende Rolle [88].

Blutgefäße sind aus drei Schichten aufgebaut, der *Tunica intima, media* und *adventitia* (Abbildung 10). Das Lumen ist durch eine einzelne Endothelzellschicht ausgekleidet. Diese Endothelschicht wird zusammen mit der *Membrana elastica interna*, einer elastischen Membran, als *Tunica intima* bezeichnet. Die *Tunica media* besteht aus querangeordneten glatten Muskelzellen, die für die Kontraktionskraft des Gefäßes verantwortlich sind und der *Membrana elastica externa*. Eine Bindegewebsschicht, die *Tunica adventitia*, verankert das Gefäß im umliegenden Gewebe. Die detaillierte Wandschichtung des Gefäßes unterscheidet sich je nach Kaliber und Art, wobei Arterien eine dickere Muskelschicht besitzen, um dem arteriellen Druck standzuhalten. [89]



### Abbildung 10: Schematischer Aufbau einer Arterie

Eine einzelne Endothelzellschicht kleidet das Blutgefäß aus und bildet mit der *Membrana elastica interna* (braun/schwarz) die *Intima* (blau). Querangeordnete glatte Muskelzellen bilden zusammen mit der *Membrana elastica externa* (braun/schwarz) die *Media* (rot). Das Gefäß ist außerdem von einer Bindegewebsschicht umgeben, der *Adventitia* (grün). Quelle: [90]

Das kontinuierliche, parallel zum Blutstrom ausgerichtete Endothel übernimmt viele regulierende Funktionen. So stellt es mit seiner selektiven Permeabilität insbesondere für große Moleküle eine wichtige Barriere zwischen Blut und Gewebe dar. Durch zahlreiche zusammenwirkende Mechanismen verhindert das Endothel zum einen die Bildung von Thromben an der Gefäßwand und fördert andererseits die Blutgerinnung bei einer Verletzung der Gefäßwand. Durch das Anheften weißer Blutkörperchen (Leukozyten) nimmt das Endothel maßgeblich an der Vermittlung der Immunantwort teil. Die Muskelschicht der *Media* reguliert u.a. durch endotheliale Signale den Gefäßtonus und die entsprechende Durchblutung. [91]

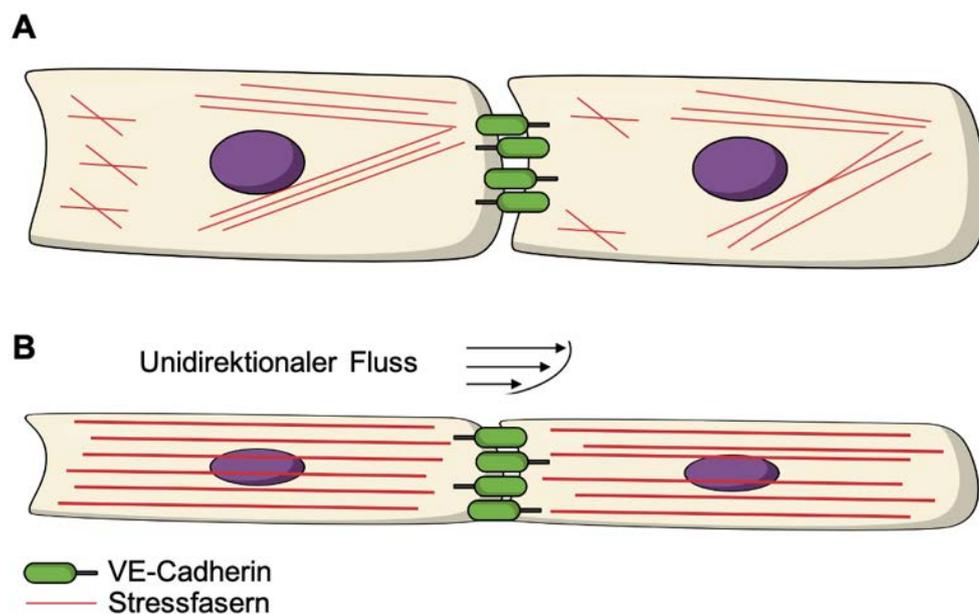
Grundlage für all diese Funktionen ist die Ausbildung von Zellverbänden durch Zell-Zell-Kontakte (Adhärens-Kontakte). Hierzu zählt u.a. das Protein VE-Cadherin (*vascular endothelial cadherin*). VE-Cadherin reguliert nicht nur die Verankerung der Endothelzelle im Zellverband, sondern auch die Morphologie des Zytoskeletts (Faserwerk der Zelle) und übernimmt genregulatorische Eigenschaften. Maßgeblich beteiligt an der Änderung der Morphologie sind Aktinomyosin-Fasern, sogenannte Stressfasern, die durch Mechanotransduktion (Übertragung der mechanischen Reize führt zum Ablauf spezieller Signalkaskaden) u.a. zum Umbau des Zytoskeletts führen können. Sie bestehen aus kontraktionsfähigen Aktinfilamenten. [92, 93]

Endothelzellen sind dem stetigen Blutstrom ausgesetzt, können dessen Stärke durch verschiedene Mechanismen detektieren und sich diesem anpassen. Zu dieser Anpassung gehört beispielsweise die Zunahme des Durchmessers der Stressfasern und deren Ausrichtung in Flussrichtung (Abbildung 11). Außerdem sind die Zellen durch Regulation der VE-Cadherin-Expression in der Lage, ihre Verankerung im Zellverband zu stärken oder zu lockern. [94-96]

In kleinen bis mittelgroßen, gesunden und nicht-verzweigten Blutgefäßen liegt meist ein unidirektionaler, laminarer Fluss ohne Turbulenzen vor [97]. Das Hagen-Poiseuille-Gesetz (I) wird als Annäherung zur Berechnung der Scherspannung in Blutgefäßen angewandt. Hierbei beschreibt  $\tau$  die Scherspannung ( $\text{dyn}/\text{cm}^2$ ),  $Q$  die Flussrate ( $\text{ml}/\text{min}$ ),  $\eta$  die Viskosität ( $\text{dyn s}/\text{cm}^2$ ) und  $r$  den Radius ( $\text{cm}$ ).

$$\tau = \frac{4 Q \eta}{r^3} \quad \text{(I)}$$

Da Blut definitionsgemäß keine Newton'sche Flüssigkeit darstellt, die Flussbedingungen physiologischerweise variieren und Blutgefäße keine starren Rohre sind, gilt die obengenannte Formel lediglich als Annäherung. [98-100]



**Abbildung 11: Endothelzellen mit Adhärenz-Kontakten und Stressfasern (Schema)**

**(A)** Endothelzellen unter statischen Bedingungen. VE-Cadherin (grün) als Adhärenz-Kontakt zwischen den Zellen. Aktiomyosin-Fasern (Stressfasern, rot) liegen verteilt vor. **(B)** Durch unidirektionalen Fluss und Scherspannungen liegen die Endothelzellen elongiert vor und die Stressfasern richten sich in Flussrichtung aus. Grafik erstellt mit [47]

## 1.7. Zielsetzung

Die bereits dargestellten Nachteile der Gewebekonservierung mit Glutaraldehyd führten zur fokussierten Suche nach Alternativen. Als grundlegende Arbeitshypothese wurde angenommen, dass dezellularisierte Perikardpatche eine optimierte Biokompatibilität und Hämodynamik aufweisen und daher ein geeigneteres Biomaterial zur kardiovaskulären Anwendung darstellen. Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines optimierten Prozessierungsprotokolls zur klinischen Anwendung von biokompatiblen Perikardpatchen.

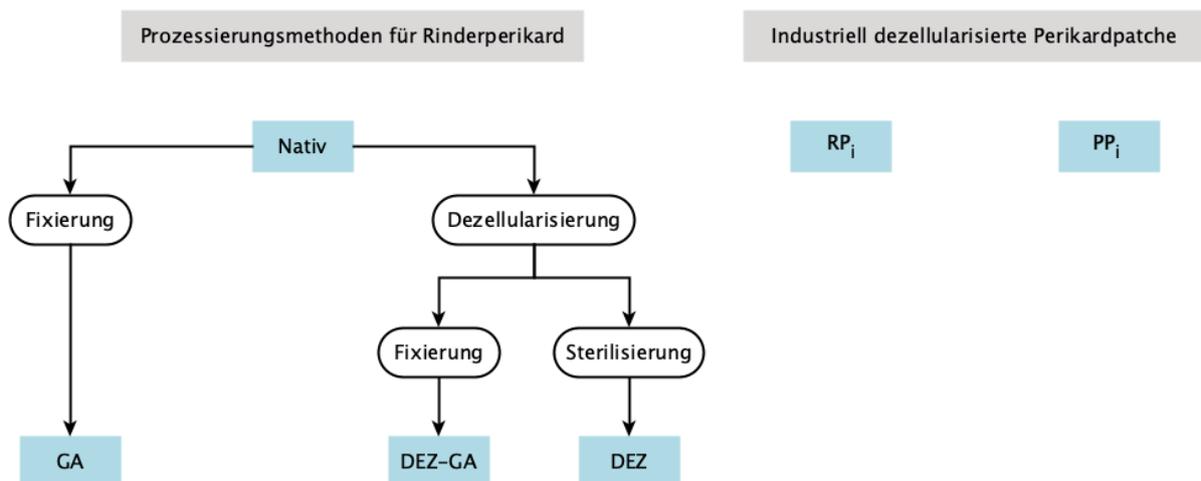
In dieser Arbeit ist daher zunächst eine vergleichende Analyse von bereits etablierten und neu entwickelten Prozessierungsmethoden durchgeführt worden. Dabei erfolgte die Aufbereitung von Rinderperikard sowohl herkömmlich mit Glutaraldehyd (Kapitel 2.2.1) als auch nach einem neuen Ansatz durch Dezellularisierung (Kapitel 2.2.2). Zur Analyse standen außerdem industriell dezellularisierte und sterilisierte Rinder- und Pferdeperikardpatche zur Verfügung, die als Kontrollgruppe dienten. Veränderungen der Gewebestruktur durch Prozessierungsmethoden sind anhand von histologischen Evaluierungen (Kapitel 4.1.1 und 4.1.2) und biomechanischen Analysen (Kapitel 4.1.4) untersucht worden. Zusätzlich wurde die Zellfreiheit der Gewebe evaluiert (Kapitel 4.1.3). Die Anwendung eines neu etablierten Sterilisierungsprotokolls nach erfolgter Dezellularisierung von Rinderperikardpatchen war Teil dieser Arbeit (Kapitel 2.2.3). Eine Validierung dessen fand durch eine Sterilitätstestung (Kapitel 4.1.5) statt.

Weiterhin erfolgte die *in-vitro* Toxizitäts- und Biokompatibilitätstestung der aufbereiteten Perikardpatche durch Experimente zur statischen (Kapitel 4.2) und dynamischen Endothelialisierung mit humanen Endothelzellen (Kapitel 4.3). Hierfür wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Flusskammermodell etabliert und validiert, das zusätzliche Analysen zum möglichen Potential der *in-vivo* Endothelialisierung der prozessierten Gewebepatche erbrachte.

## 2. Methoden

### 2.1. Gewebe

Native Rinderperikarde ( $n = 5$ ) wurden während des regulären Schlachtbetriebes von einem Schlachthof (Münchner Schlachthof Betriebs GmbH, Deutschland) bezogen, direkt zum Labor transportiert und innerhalb von drei Stunden verarbeitet. Anhaftendes Fett- und Bindegewebe ist vor der weiteren Verarbeitung manuell mit Mullbinden entfernt worden, ohne das zu Grunde liegende Perikard zu beschädigen. Zu Beginn wurden native Proben entnommen und in PBS bei 4 °C bis zur zeitnahen Verarbeitung gelagert. Darauf folgten verschiedene Methoden zur Gewebeprozessierung (Abbildung 12).



**Abbildung 12: Übersicht der Probenbezeichnung und der angewandten Methoden**

Eckige Umrandungen stellen Gruppen und Probenbezeichnung dar, runde Umrandungen stellen Prozessierungsmethoden dar. Native Proben wurden entweder mit Glutaraldehyd fixiert (Gruppe GA) oder dezellularisiert. Im Anschluss an die Dezellularisation sind die Gewebeprobe(n) entweder zusätzlich mit Glutaraldehyd fixiert (Gruppe DEZ-GA) oder sterilisiert worden (Gruppe DEZ). Für weitere Evaluierungen wurden die Eigenschaften der oben genannten Gruppen mit denen von industriell dezellularisierten und sterilisierten Perikardpatchen verglichen (RP<sub>i</sub> und PP<sub>i</sub>).

Dadurch ergaben sich folgende Gruppen: Perikard mit Glutaraldehyd fixiert (GA), dezellularisiertes Perikard, das anschließend mit Glutaraldehyd fixiert wurde (DEZ-GA) sowie dezellularisiertes und sterilisiertes Perikard (DEZ).

Zusätzlich standen industriell dezellularisierte Rinder- und Pferdeperikardpatche zur Verfügung (Auto Tissue Berlin GmbH, Matrix Patch™ [101], n = 5 x 5 cm). Jegliche Evaluierungsmethoden sind ebenfalls anhand der industriell dezellularisierten Rinderperikardpatche (RP<sub>i</sub>) und Pferdeperikardpatche (PP<sub>i</sub>) durchgeführt worden.

## **2.2. Gewebeprozessierung**

### **2.2.1. Fixierung**

Die Fixierung mit Glutaraldehyd erfolgte direkt im Anschluss an die Probenentnahme. Hierbei wurden Proben ( $\varnothing = 10$  mm) der nativen sowie dezellularisierten Gewebe mit einer Biopsiestanze entnommen und einzeln in Wells einer 24-Wellplatte mit jeweils 1 ml einer 0,1 %igen Glutaraldehyd-Lösung (gelöst in sterilem PBS) für 48 Stunden bei 4 °C inkubiert. Bis zur zeitnahen Weiterverarbeitung sind die fixierten Proben ebenfalls bei 4 °C gelagert worden.

### **2.2.2. Dezellularisierung**

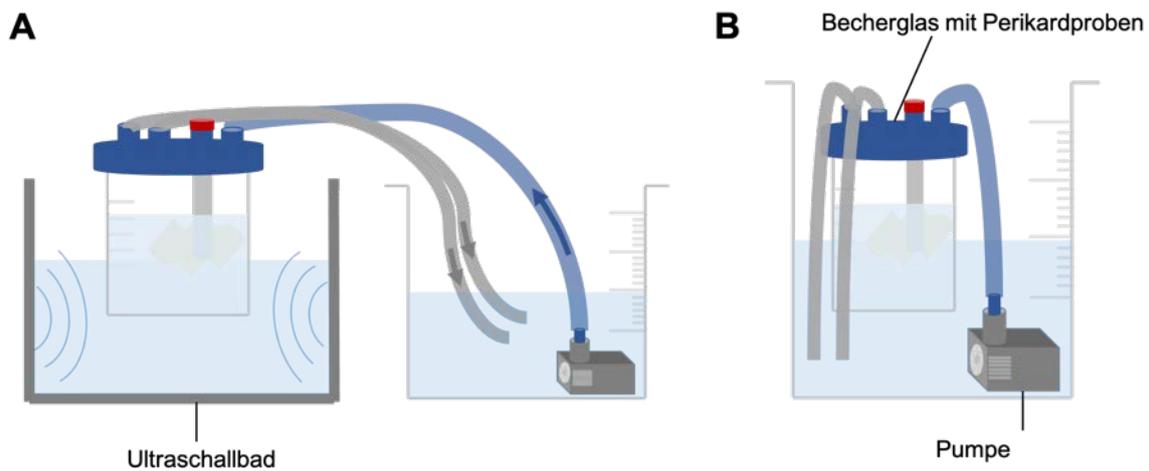
Der Dezellularisierungsprozess wurde nach einem zuvor bereits etablierten Protokoll durchgeführt. Das Protokoll beinhaltet die Applikation von Ultraschall und die ständige Umspülung der Perikarde mit Dezellularisierungslösung durch eine Pumpe, wodurch in anderen Versuchen bereits sehr vielversprechende Ergebnisse erzielt werden konnten. [102]

Die Dezellularisierung von Rinderperikardpatchen der Größe 10 x 10 cm erfolgte mit einer Dezellularisierungslösung, bestehend aus 0,5 % SD und 0,5 % SDS in PBS gelöst für insgesamt 16 Stunden bei Raumtemperatur. Das Protokoll bestand aus zwei Zyklen (4 und 12 Stunden), mit einem dazwischenliegenden Medienwechsel (Tabelle 1).

**Tabelle 1: Übersicht des Dezellularisierungsprotokolls**

<b>Aufbau</b>	<b>Lösung</b>	<b>Dauer</b>
<b>A</b>	Dezellularisierungslösung	30 Minuten
<b>B</b>	Dezellularisierungslösung	3,5 Stunden
Medienwechsel		
<b>A</b>	Dezellularisierungslösung	30 Minuten
<b>B</b>	Dezellularisierungslösung	11,5 Stunden
<b>B</b>	PBS	10 x 15 Minuten

Zu Beginn erfolgte zunächst die Befestigung der Perikarde (n = 5) an einer stabförmigen Halterung mit einem chirurgischen Faden. Anschließend sind die Perikarde in ein Laborglas (1 L) mit der Dezellularisierungslösung gegeben worden. Es kam ein Deckel mit Anschluss-System zur Verwendung, worüber einerseits die Pumpe und zusätzlich zwei Schläuche für den Rückfluss angeschlossen werden konnten. Ein weiteres Becherglas (3 L), das ebenfalls mit Dezellularisierungslösung befüllt war, diente als Reservoir. Die Pumpe, die Enden der beiden Schläuche (Rücklauf) und das verschlossene Laborglas mit den Perikarden wurden in dieses Reservoir eingelassen (Versuchsaufbau A, Abbildung 13, A). In ihrer Lösung verbleibend, sind die Proben während der ersten 30 Minuten eines jeden Zyklus einem mit Aqua destillata (AD) befülltem Ultraschallbad ausgesetzt worden (Versuchsaufbau B, Abbildung 13, B). Nach Abschluss des 16-stündigen Dezellularisierungsprotokolls erfolgten zehn Waschschrte mit PBS für jeweils 15 Minuten mit dem Versuchsaufbau B und anschließend wurden die Proben bei 4 °C in PBS gelagert.



**Abbildung 13: Dezellularisierungsaufbau**

**(A)** Versuchsaufbau A: Dezellularisierung in einem externen Ultraschallbad für die ersten 30 Minuten eines jeden Zyklus. **(B)** Versuchsaufbau B: Perikarde sind in ein verschlossenes Laborglas gegeben worden, das in einem Reservoir mit Dezellularisierungslösung platziert wurde. Durch eine Pumpe fand ein ständiges Umspülen der Perikarde mit Dezellularisierungslösung statt. Zwei Schläuche dienten hierbei als Rückläufe in das Reservoir.

### 2.2.3. Sterilisierung

Alle Schritte dieses Protokolls sind unter aseptischen Bedingungen ausgeführt worden. Die vorausgehend dezellularisierten Proben sind in sterile Behältnisse gegeben und mit dem folgenden Versuchsprotokoll sterilisiert worden: zunächst erfolgte die Inkubation in 0,5 %igem Octenidindihydrochlorid (*Octenidin*, OCT) und daraufhin die Inkubation in 0,1 %iger Peressigsäure für jeweils 1 Stunde bei Raumtemperatur. Nach dieser Inkubationszeit erfolgte die Waschung der Proben. Hierbei wurden diese mit einer sterilen Pinzette in sterile Behältnisse mit sterilem PBS überführt und durch drei Waschdurchgänge für jeweils je 15 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte die Lagerung in sterilen Röhrchen mit sterilem PBS bei 4 °C bis zur weiteren Verarbeitung. Proben der Gruppe DEZ-GA wurden nach der Durchführung des Sterilisierungsprotokolls wie bereits beschrieben (Kapitel 2.2.1) mit GA fixiert.

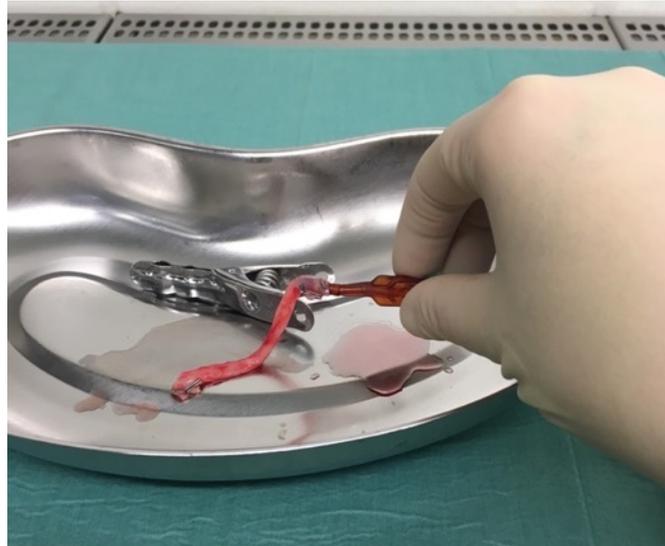
### 2.3. Zellkultur

Die Arbeiten der Zellkultur erfolgten stets unter aseptischen Bedingungen an der Sterilbank. Wenn nicht anders angegeben, ist die Inkubation von Zellkulturen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> und die Zentrifugation für 5 Minuten bei 500 x g durchgeführt worden.

### 2.3.1. Isolierung humaner Endothelzellenlinien

Primäre humane Endothelzelllinien (n = 10) sind mit einem enzymatischen Verfahren aus Segmenten der Vena Saphena magna isoliert worden. Übriggebliebene, nicht weiterverwendete und irreversibel anonymisierte Segmente der Vena Saphena magna wurden nach Bypass-Operationen aus dem herzchirurgischen OP bezogen. Es sind nur Proben genutzt worden, bei denen die unterschriebene Einverständniserklärung des Patienten vorlag. Diese Methode ist von der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München als unbedenklich eingestuft worden.

Nur Gefäße, die mindestens 4 cm lang waren und deren Zeit im Lagerungsmedium (siehe Anhang, Lagerungsmedium für Venen) 4 Tage nicht überschritten hatte, kamen bei dieser Arbeit zur Verwendung. Zunächst erfolgte die Überprüfung auf Dichtigkeit der Venen. Anschließend wurden diese mit einer Knopfkanüle kanüliert (Abbildung 14) und ein Dreiwegehahn angebracht. Die Flussrichtung konnte durch Spülen festgestellt werden, da ein Widerstand spürbar ist, wenn entgegen der Öffnungsrichtung der Venenklappen gespült wird. Anschließend wurden die Venen in Flussrichtung mit 20 ml „Spüllösung“, einer Mischung aus M199-Medium, Heparin und Gentamycin (siehe Anhang), von Blut- und Geweberesten befreit. Um Endothelzellen zu isolieren, sind die Vene, nun am unteren Ende, also gegenüber der Kanülierung, geklemmt und mit 10 ml Humanem Serum Albumin mit 7 mg Kollagenase vollständig gefüllt worden. Nach einer erneuten Überprüfung der Dichtigkeit des Gefäßes fand die Inkubation für 15 Minuten in einem Becherglas mit bereits erwärmtem, sterilem PBS statt.



**Abbildung 14: Kanülierung eines Segments der Vena Saphena magna**

Das Venensegment wurde hier mit einem chirurgischen Faden an der Knopfkanüle befestigt, alternativ kamen auch Bulldog-Klemmen zur Verwendung.

Nach dieser Inkubationszeit erfolgte die Spülung des Gefäßes mit „Stoppmedium“, einer Mischung aus M199-Medium und fötalem Kälberserum (FKS, Anhang), um die enzymatische Reaktion zu beenden. Die erhaltene Lösung wurde anschließend zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes konnte das Zellpellet mit 2 ml Endothelzellmedium (EC-Medium) resuspendiert und in eine 12,5 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche überführt werden. Um die Zellisolationsrate zu erhöhen, ist der Schritt der Inkubation mit Kollagenase ein zweites Mal durchgeführt worden.

### **2.3.2. Allgemeine Zellkultivierung**

Die gewonnenen Zellkulturen sind stets im Brutschrank inkubiert worden, ein partieller Medienwechsel sowie die lichtmikroskopische Kontrolle erfolgte alle 2-3 Tage.

Sobald eine Konfluenz von ca. 90 % erreicht war, ist eine Zellpassagierung durchgeführt worden (Tabelle 2). Um die adhärenenten Zellen vom Boden der Zellkulturflasche enzymatisch abzulösen, ist nach dem Spülen mit PBS die Protease Trypsin genutzt worden. Nach Zugabe des Trypsins folgte eine Inkubationszeit von 3-5 Minuten im Brutschrank. Das Ablösen der Zellen wurde anschließend lichtmikroskopisch überprüft. Falls noch nicht alle Zellen abgelöst waren, konnte an dieser Stelle entweder eine erneute Inkubation von 2 Minuten erfolgen oder durch vorsichtiges Beklopfen der

Zellkulturflasche ein Lösen der Zellen erreicht werden. Die durch das Trypsin hervorgerufene enzymatische Reaktion konnte dann durch das Hinzugeben von EC-Medium mit Zusatz von FKS gestoppt werden. Nach erfolgter Zentrifugation, Verwerfen des Überstandes und Resuspendieren des Zellpellets konnte dieses in die entsprechende Zellkulturflasche überführt werden.

Hierbei fand die Zellpassagierung nach einem festen Schema statt (Tabelle 2). Das Zellpellet einer 12,5 cm<sup>2</sup> Kulturflasche wurde dabei in eine 75 cm<sup>2</sup> Kulturflasche überführt (1. Passage). Nachdem die Zellen auch in dieser Kulturflasche eine ausreichende Konfluenz erreicht haben, ist der Vorgang der Zellpassagierung wiederholt worden und das Zellpellet wurde auf zwei 162 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen aufgeteilt (2. Passage) und erneut kultiviert. Als letzter Schritt erfolgte die Aufteilung einer 162 cm<sup>2</sup> Kulturflasche auf jeweils drei 162 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen (3. Passage).

**Tabelle 2: Mengenangaben für entsprechende Kulturflaschen bei der Zellpassagierung**

<b>Medium</b>	<b>12,5 cm<sup>2</sup> Kulturflasche</b>	<b>75 cm<sup>2</sup> Kulturflasche</b>	<b>162 cm<sup>2</sup> Kulturflasche</b>
PBS	6 ml	12 ml	15 ml
Einwirkzeit 1-2 Minuten			
Trypsin	1,5 ml	3 ml	5 ml
Einwirkzeit 3 Minuten			
Stopplösung	7 ml M199 2 ml FKS	8 ml M199 3 ml FKS	9 ml M199 5 ml FKS
EC-Medium	5 ml	16 ml	30 ml
Passagierung	→ 1 x 75 cm <sup>2</sup>	→ 2 x 162 cm <sup>2</sup>	→ 3 x 162 cm <sup>2</sup>

Nach dreimaliger Passagierung der jeweiligen Zelllinien folgte die Kryokonservierung, um die Zellen bei Bedarf verwenden zu können. Unter Kryokonservierung versteht man das Einfrieren und Lagern von Zellen. Dafür werden die adhärennten Zellen erneut mit Trypsin gelöst und nach dem Zentrifugieren mit einem „Einfriermedium“, bestehend aus 70 % EC-Medium, 20 % FKS und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO), resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Damit es beim Einfrierprozess nicht zu Gefrierschäden an den Zellen kommt, wie z.B. intrazelluläre Kristallbildung, sind folgende Vorgehensweisen unabdingbar: Zum einen dient DMSO als Gefrierschutzmittel, das die Zelle vollständig penetriert und eine kryoprotektive Wirkung aufweist. Zum anderen wird ein spezieller

Kryocontainer benutzt, um eine optimale Kühlrate von ca. 1 °C pro Minute zu gewährleisten. Der Kryocontainer, der die Kryoröhrchen samt Zellen beinhaltet, wird zunächst bei – 80 °C gelagert. Spätestens nach sechs Monaten erfolgt die Überführung der Kryoröhrchen in einen Tank mit Flüssigstickstoff, wo diese bei – 196 °C dauerhaft gelagert werden können.

Da DMSO bei Raumtemperatur zelltoxisch wirkt, ist beim Auftauen der Zellen ein schnelles Arbeiten erforderlich. Hierfür wurden 8 ml EC-Medium mit 4 ml FKS gemischt und im Wärmebad bei 37 °C warmgestellt. Auch die Kryoröhrchen sind direkt im Wasserbad erwärmt worden. Nach Überführen der Zellsuspension in das vorgewärmte EC-Medium-FKS-Gemisch und der anschließenden Zentrifugation, konnte das resuspendierte Zellpellet in eine 162 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche überführt und wie bereits beschrieben inkubiert werden.

Das Auszählen der Zellen erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer und Trypanblau. Trypanblau durchdringt nur die Zellmembran von bereits toten Zellen und färbt diese unter dem Lichtmikroskop blau. Lebende Zellen nehmen den Farbstoff nicht auf und dieser kann auch nicht durch die intakte Zellmembran diffundieren, sodass vitale Zellen unter dem Lichtmikroskop weiterhin weiß erscheinen. Nach dem Trypsinieren, Zentrifugieren und Resuspendieren sind 10 µl dieser Zelllösung nun zu 40 µl Trypanblau gegeben und vermischt worden, sodass eine 1:5-Verdünnung vorlag (Verdünnungsfaktor). Wiederum 10 µl dieser Mischung konnten in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und nach standardisierten Vorgaben ausgezählt werden.

$$Z \times VF \times 10^4 = \text{Gesamtzellzahl/ml} \quad \text{(II)}$$

Durch Hinzuziehen der obigen Formel (II) konnte die Zellzahl bestimmt werden. Hierbei ist  $Z$  der Mittelwert der Zellenzahl aller 4 Quadranten der Zählkammer,  $VF$  der Verdünnungsfaktor und  $10^4$  der spezifische Kammerfaktor.

## 2.4. Biokompatibilitätstestung

Zur *in-vitro* Evaluierung der Biokompatibilität und der Auswirkungen der jeweiligen Prozessierungsmethoden der Gewebeprouen erfolgte die statische Besiedelung von Gewebepatches mit Endothelzellen. Als Kontrollgruppe dienten hierbei statische Zellkultivierungen, die in speziellen Flusskammern durchgeführt wurden, um in einem zweiten Versuchsaufbau den direkten Vergleich zur dynamischen Kultivierung ziehen zu können.

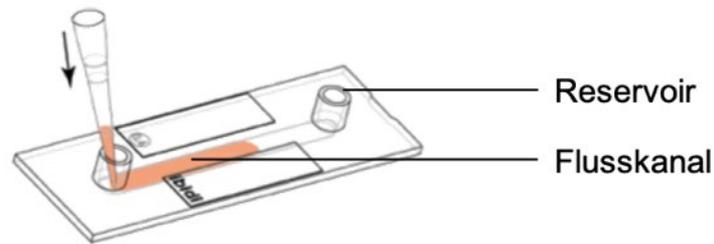
### 2.4.1. Statische Kultivierung von Endothelzellen

Die hier genutzten Flusskammern – ibidi  $\mu$ -Slide I<sup>0.6</sup> Luer (Abbildung 15) – können sowohl zum Kultivieren der Zellen unter statischen oder dynamischen Bedingungen genutzt werden als auch zur anschließenden Auswertung mittels Immunfluoreszenz oder LD-Färbung (Kapitel 3.1.3) direkt in der Flusskammer.

**Tabelle 3: Eigenschaften des  $\mu$ -slide I<sup>0.6</sup> Luer** Quelle: [103]

<b>Eigenschaften</b>	<b>Empfehlung</b>
Volumen Flusskanal	150 $\mu$ l
Fläche Flusskanalboden	5,6 cm <sup>2</sup>
Zellkonzentration für Flussversuch	2-4,5 x 10 <sup>5</sup> Zellen/ml

Für einen reibungslosen Versuchsablauf wurde stets darauf geachtet, dass beim Befüllen des Flusskanals, also beim Besiedeln mit Zellen, Medienwechsel und Auswertungsmethoden, keine Luftblasen entstanden. Insgesamt bezog sich das Volumen eines Medienwechsel auf 450  $\mu$ l, da für einen kompletten Medienaustausch die dreimalige Menge des Flusskanalvolumens benötigt wird (Tabelle 3). [104]



**Abbildung 15: Skizze eines  $\mu$ -Slides**

Flusskammer mit Reservoir (je 60  $\mu$ l Volumen) und Flusskanal (150  $\mu$ l Volumen). Beim Befüllen des Flusskanals mit EC-Medium wurde die Pipettenspitze an einem Reservoir schräg angesetzt, sodass die Pipettenspitze in Verlaufsrichtung des Flusskanals zeigte. Durch inverses Pipettieren konnte das Einbringen von Luftblasen verhindert werden. Bei einem Medienwechsel sind insgesamt 450  $\mu$ l EC-Medium verwendet worden. Dabei erfolgte das Befüllen wie bereits beschrieben. Beim Abnehmen des alten Mediums wurde die Pipettenspitze am anderen Reservoir am Ende des Flusskanals angesetzt und vorsichtig aspiriert. Quelle: Adaptiert nach [104]

Zu Beginn der Versuchsdurchführung konnten die Zellreihen bei vorliegender Konfluenz in der Zellkulturflasche trypsinisiert und anschließend nach der oben beschriebenen Methode ausgezählt werden. Für die Besiedelung der  $\mu$ -Slides wurde entsprechend den Herstellerempfehlungen eine Zellzahl von 300.000 Zellen/ $\mu$ -Slide (150  $\mu$ l) gewählt [104]. Zur Durchführung der statischen Kultivierungsversuche sind die  $\mu$ -Slides besiedelt und für die entsprechenden Versuchszeiten (24, 48 oder 72 Stunden) im Inkubator gelagert worden. Medienwechsel sind alle 24 Stunden durchgeführt worden. Zu Versuchsende folgte die direkte Auswertung und Färbung mittels LD-Färbung und Immunfluoreszenz in den  $\mu$ -Slides selbst.

#### **2.4.2. Statische Besiedelung von Gewebe mit Endothelzellen**

Die statische Besiedelung wurde mit Gewebeproben der Gruppen GA, DEZ-GA, DEZ, RP<sub>i</sub> und PP<sub>i</sub> (nach Anwendung der jeweiligen Prozessierungsmethode) unter der Sterilbank durchgeführt. Hierfür sind Proben ( $\varnothing = 10$  mm, n = 10) der Gewebe entnommen und für 2 x 60 Sekunden in steriler Kochsalzlösung inkubiert worden. Anschließend sind die Gewebeproben jeder Versuchsgruppe einzeln in die Wells einer eigenen zellkulturbehandelten 48-Wellplatte gegeben und mit Endothelzellen (n = 5) besiedelt worden. Hierbei wurde darauf geachtet die Serosa des Perikards zu besiedeln, da diese durch ihre glatte Oberfläche optimierte hämodynamische Eigenschaften vorzuweisen hat. Die Perikardproben sind mit sterilen Teflon-Ringen ( $\varnothing = 10$  mm) beschwert worden. Für eine Zelldichte von 30.000 Zellen/cm<sup>2</sup> wurde das entsprechende Verhältnis von EC und

EC-Medium zuvor berechnet. Zusätzlich erfolgte die Zugabe von 1 %iger Penicillin/Streptomycin-Lösung zu dem EC-Medium für die Zellversuche mit Gewebeproben. Ein Well mit einer Gewebeprobe ohne Zugabe von Zellen galt als Kontrollgruppe, ebenso wie entsprechende Kontrollgruppen der verwendeten Zelllinien ohne Gewebe. Hierdurch konnte das EC-Wachstum der Kontrollgruppen unter dem Lichtmikroskop observiert werden. Die besiedelten Patche sind für 72 h inkubiert und anschließend mit histologischen Färbemethoden und der Rasterelektronenmikroskopie evaluiert worden. Native Proben wurden mangels Sterilität nicht mit EC besiedelt.

## **2.5. Flusseexposition**

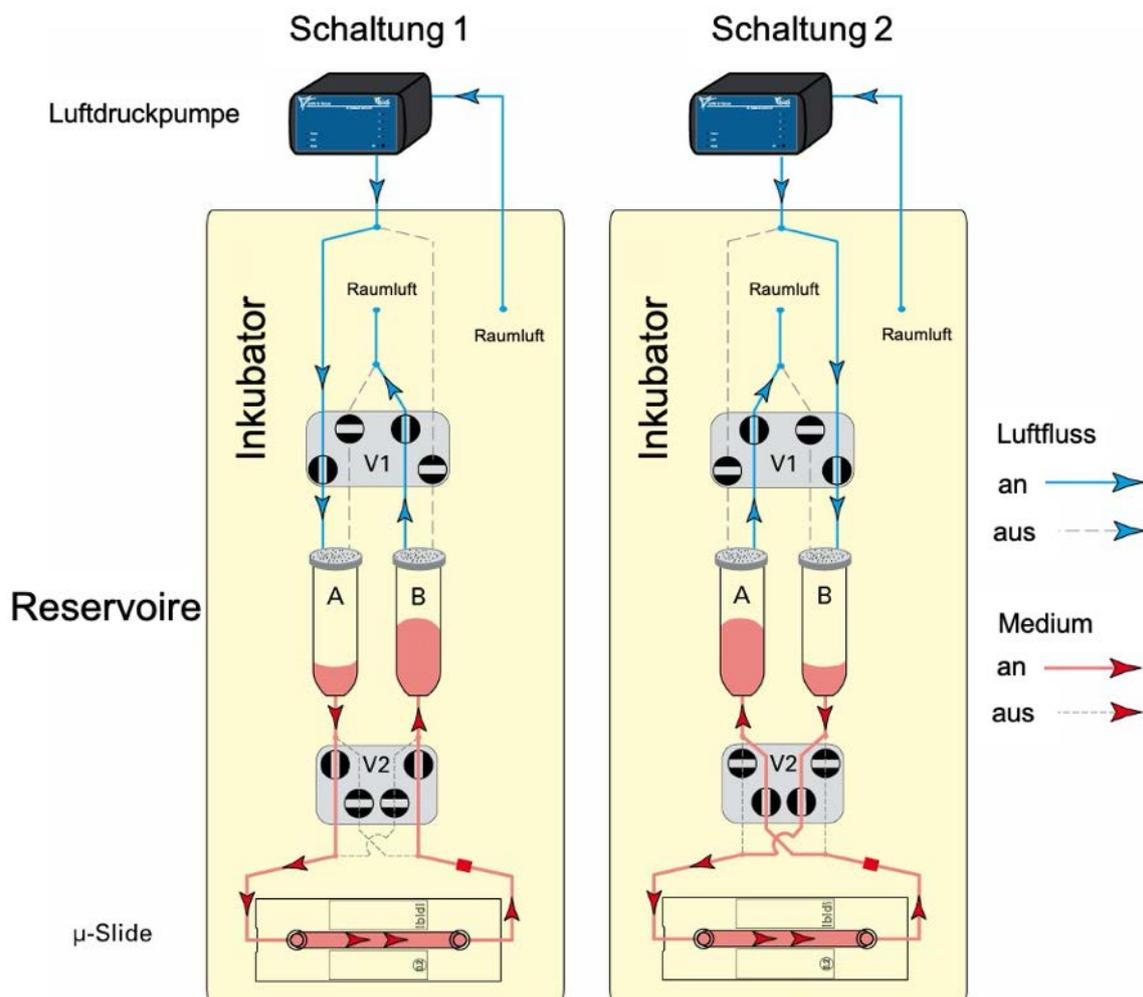
Eine möglichst physiologische Simulation der im Körperkreislauf herrschenden Flussbedingungen ist unumgänglich zur detaillierten *in-vitro* Untersuchung von Biomaterialien für den kardiovaskulären Einsatz. Eine ebenfalls wichtige Rolle spielen die Endothelzellen und deren Verhalten unter physiologischen Flussbedingungen. Um dies zu untersuchen, wurden die bereits erwähnten Flusskammern sowie dazugehörige Flusspumpen genutzt. Bei dieser Versuchsreihe fand sowohl die dynamische Endothelzellkultivierung in den Flusskammern (Kontrollgruppe) als auch die dynamische Besiedelung von prozessiertem Gewebe mit Endothelzellen statt.

### **2.5.1. Dynamische Kultivierung von Endothelzellen**

Wie bereits erwähnt, herrscht in gesunden, nicht-verzweigten Blutgefäßen meist ein unidirektionaler Blutfluss. Um diesen Blutfluss im Experiment rekonstruieren zu können, werden bei dem ibidi-System zwei Reservoirs, die mit EC-Medium gefüllt sind, durch eine Luftdruckpumpe angesteuert (Abbildung 16). Die Reservoirs und Perfusionsschläuche sind an sogenannten Fluidic Units angebracht, die mit der Luftdruckpumpe verbunden sind und damit Ventilmechanismen steuern. Durch die jeweilige Schaltung der Ventile wird unter Beibehaltung der Flussrichtung entweder das erste oder das zweite Reservoir mit Medium gefüllt. Dies gewährleistet nicht nur den unidirektionalen Fluss mit gleichbleibenden Flussraten und Wandschubspannungen, sondern auch eine effiziente Einsparung an EC-Medium. Der gesamte Aufbau, abgesehen von der Luftdruckpumpe, befindet sich während der Versuchsdurchführung im Inkubator bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>.

Die automatische Schaltung der Ventile ist über eine Software gesteuert. In dieser Software (ibidi PumpControl, V 1.5.4) lassen sich auch die Parameter Wandschubspannung, Flussrate und Zyklusdauer (Dauer eines Zyklus mit vordefinierter Flussrate) bestimmen und anpassen.

Die Versuchsprotokolle zur Versuchsdurchführung wurden gemäß den Herstellerempfehlungen [103, 104] erstellt und dem individuellen Aufbau des Experiments angepasst (Siehe Anhang: Pumpen Set-Up, Versuchsdurchführung Flusseexperiment). So wurde sowohl u.a. das Besiedeln der  $\mu$ -Slides mit Zellen und das Kalibrieren der Pumpen bei jedem Versuch nach einem definierten Schema durchgeführt und überprüft.



**Abbildung 16: Schema der Ventilmechanismen für unidirektionalen Fluss**

Die Spritzenreservoire (A + B), die mit EC-Medium gefüllt sind, werden je nach Schaltung (Schaltung 1 oder 2) der Ventile (V1 + V2) durch Luftdruck gefüllt oder geleert. Somit kann ein

unidirektionaler Fluss in dem  $\mu$ -Slide erreicht werden. Abgesehen von der Luftdruckpumpe befindet sich der gesamte Aufbau in einem Inkubator. Quelle: Adaptiert nach [103]

Die dynamische Konditionierung von Endothelzellen wurde je Zellreihe für 24, 48 und 72 Stunden durchgeführt. Die Durchführung erfolgte anhand eines standardisierten Protokolls (Siehe Anhang: Versuchsdurchführung Flussexperiment).

Die Besiedelung der  $\mu$ -Slides fand nach dem oben bereits beschriebenen Prozess statt. Nach Aussähen der Zellen erfolgte die statische Inkubation dieser  $\mu$ -Slides für 30 Minuten. Nach der Inkubationszeit sind die Reservoirs der  $\mu$ -Slides mit je 60  $\mu$ l EC-Medium aufgefüllt worden. Um eine gewisse Zelladhärenz zu erreichen und dem sofortigen Wegspülen der Zellen beim Starten des Flussversuches vorzubeugen, wurden die besiedelten  $\mu$ -Slides für weitere 2 Stunden statisch inkubiert. Die Konnektierung der  $\mu$ -Slides mit den Perfusionssystemen und Fluidic Units erfolgte unter der Sterilbank. Die beim Flussversuch angewandte Scherspannung ist zu Beginn des Versuchs langsam gesteigert worden, um auch an dieser Stelle ein Ablösen und Wegspülen der Zellen zu verhindern (Tabelle 4).

**Tabelle 4: Druckprotokoll für Flussversuche**

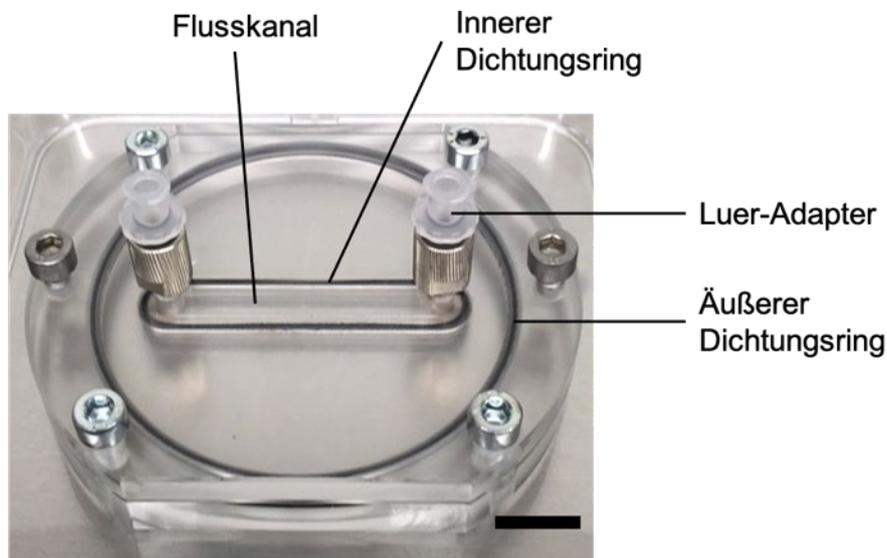
<b>Dauer</b>	<b>Scherspannung</b>
Stunde 1	2 dyn/cm <sup>2</sup>
Stunde 2	5 dyn/cm <sup>2</sup>
Stunde 3	10 dyn/cm <sup>2</sup>
Stunde 4 - Ende	15 dyn/cm <sup>2</sup>

### **2.5.2. Dynamische Besiedelung von Gewebe mit Endothelzellen**

Viele Funktionen von Endothelzellen werden erst durch die kontinuierliche mechanische Stimulation durch den unidirektionalen Blutfluss in Blutgefäßen stimuliert und hervorgerufen, so beispielweise die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten. Zur Optimierung der Endothelialisierung von Geweben werden daher dynamische Bedingungen eingesetzt.

Hierfür wurde eine eigene Flusskammer entwickelt, die es ermöglicht Patche verschiedener Gewebe einzuspannen. Die Flusskammer ist durch Autoklavieren

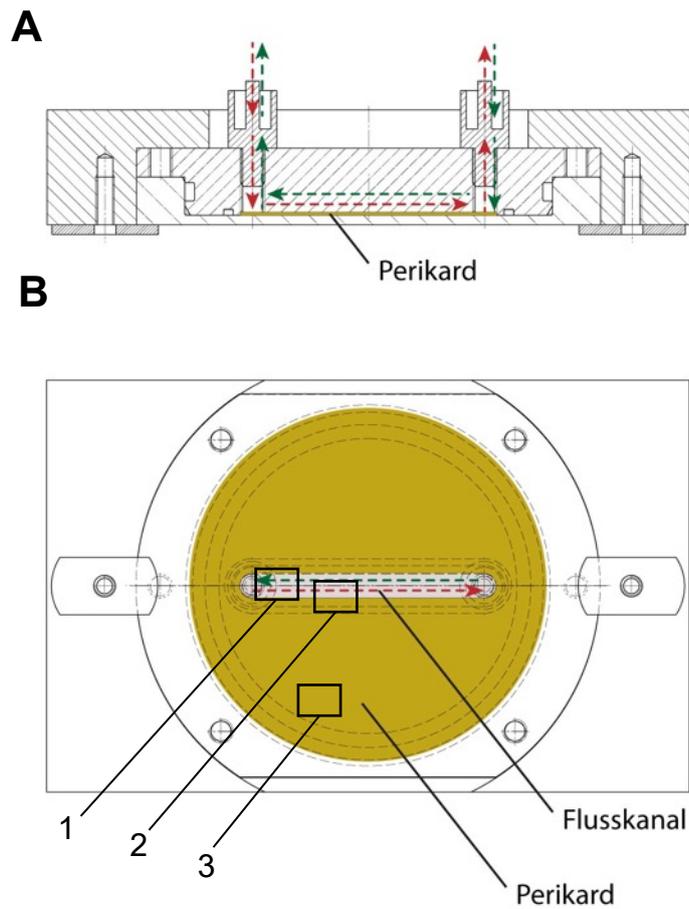
sterilisierbar und somit wiederverwendbar, die Abdichtungsringe sind in Ethanol sterilisierbar (Abbildung 17).



**Abbildung 17: Flusskammer zur dynamischen Besiedelung von Gewebepatches**

Zwei Dichtungsringe, ein innerer und ein äußerer, sorgen für einen dichten Versuchsaufbau. Durch Öffnen der Schrauben wird die Innenseite zum Einspannen des Gewebes zugänglich. Über die Luer-Adapter erfolgt die Verbindung zum ibidi-Flusssystem. Maßstabsbalken = 10 mm.

Der Flusskanal der Flusskammer wurde den Abmessungen eines  $\mu$ -Slides<sup>0.6</sup> Luer der Firma ibidi (ibidi GmbH, Planegg, Anhang) nachempfunden, sodass das bereits etablierte System auch hierfür verwendet werden konnte (Abbildung 18, A). Die Flusskammer besteht aus zwei Teilen, die nach Einbringen des Gewebepatches durch Schrauben fixiert werden. Ein innerer und ein äußerer Dichtungsring sorgen für den dichten Aufbau der beiden Teile. Durch den inneren Dichtungsring wird der Flusskanal vom umliegenden Gewebe abgegrenzt, um definierte Flussraten und Scherspannungen gewährleisten zu können. Die Dichtungsringe konnten mit Ethanol 70 % für 10 Minuten sterilisiert werden. Getestet wurde die Flusskammer mit GA-fixiertem Perikard und dezellularisiertem Perikard. Nach den dynamischen Konditionierungen erfolgte die Probenentnahme an drei verschiedenen Gewebepunkten (Abbildung 18, B).



**Abbildung 18: Flusskammer mit ibidi-System**

**(A)** Flusskammer im Querschnitt mit eingespanntem Perikard schematisch angedeutet und dem Flusskanal. Der Flusskanal hat die gleichen Abmessungen wie ein  $\mu$ -Slide und kann über Luer-Adapter an das Perfusionssystem angeschlossen werden. **(B)** Flusskammer in der Draufsicht. Probenentnahmestellen nach dynamischer Kultivierung ist durch Rechtecke gekennzeichnet. **1** Probe direkt aus dem Flusskanal, **2** Probe am Übergang vom Flusskanal zum übrigen Gewebe, **3** Probe von der Außenseite.

## **3. Auswertung**

### **3.1. Färbemethoden**

#### **3.1.1. Anfertigen von Paraffinschnitten**

Zur mikroskopischen Analyse wurden die Proben zunächst in 4 %igem Formaldehyd fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Am Schlittenmikrotom sind diese Paraffinblöcke mit einer Schnittdicke von 5 µm geschnitten und auf Objektträger aufgebracht worden.

#### **3.1.2. Histologische Färbungen**

Um verschiedene Gewebestrukturen lichtmikroskopisch zu evaluieren, wurden mehrere histologische Färbemethoden durchgeführt. Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) gilt als Routinemethode und färbt basophile (saure) Strukturen, z.B. Zellkerne, blau-violett und eosinophile (basische) Strukturen, wie z.B. Plasmaproteine oder Kollagene, rosa-rot [105]. Mit der Pikro-Siriusrot-Färbung (PSR) lassen sich Kollagene darstellen. Diese können bei Betrachtung unter einem linearen Polarisationsmikroskop in Kollagen I (rot-gelb) und III (grün) unterteilt werden [106]. Durch die Pentachromfärbung nach Movat (MPC) lassen sich verschiedene intra- und extrazelluläre Bestandteile anfärben (Zellkerne: Blau-schwarz, elastische Fasern: Rot, Kollagen: Gelb, Muskelfaser: Rot) [107].

Für Waschvorgänge wurde AD oder demineralisiertes Wasser (vollentsalztes Wasser, VE) verwendet. Nach jedem spezifischen Färbeprotokoll sind die Objektträger abschließend in Xylol eingetaucht worden bis das Glas der Objektträger klar war. Es folgte das Eindecken der Objektträger mit Eindeckmedium und Deckgläsern.

## HE-Färbung

Zunächst sind die Objektträger zur Entparaffinierung für 2 x 15 Minuten in Xylol getaucht und anschließend zur Wässerung in einer absteigenden Alkoholreihe (100 %, 96 % und 70 %) für jeweils 10 Minuten inkubiert worden. Nach einer Waschung in AD und einem kurzen Spülen unter VE erfolgte die Durchführung des HE-Färbeprotokolls (Tabelle 5).

**Tabelle 5: Färbeprotokoll HE-Färbung** Quelle: [108]

<b>Lösung</b>	<b>Dauer</b>
Hämalaun	5 Minuten
Leitungswasser	12 Minuten
Eosin	5 Minuten
Leitungswasser	5 Minuten
Ethanol 70 %	4 x eintauchen
Ethanol 96 %	10 x eintauchen
Ethanol 100 %	2 x 5 Minuten

## Pikro-Siriusrot-Färbung

Nach Entparaffinierung in Xylol für 2 x 10 Minuten, Wässerung in einer absteigenden Alkoholreihe (96 %, 80 %, 70 % und 60 % vergällt) für je 4 Minuten und Spülen in AD für 2 Minuten wurde das Pikro-Siriusrot-Protokoll angewandt (Tabelle 6).

**Tabelle 6: Färbeprotokoll PSR-Färbung** Quelle: [106]

<b>Lösung</b>	<b>Dauer</b>
Weigerts Eisenhämatoxylin	8 Minuten
AD	5 Sekunden
Leitungswasser	10 Minuten
AD	1 Minute
Pikro-Siriusrot	60 Minuten
Essigsäure 30 %	2 x 1 Minute
Ethanol 96 % vergällt	2 x 4 Minuten
Isopropanol	4 Minuten

### Movat's Pentachrom-Färbung

Die Entparaffinierung und Wässerung wurden nach oben beschriebenem Protokoll (PSR) durchgeführt. Anschließend erfolgte die Färbung nach Herstellerangaben (Tabelle 7).

**Tabelle 7: Färbeprotokoll MPC-Färbung** Quelle: [107]

<b>Lösung</b>	<b>Dauer</b>
Alcianblau 1 %	12 Minuten
Leitungswasser	5 Minuten
Alkalischer Alkohol	60 Minuten
Leitungswasser	10 Minuten
Weigerts Eisenhämatoxylin	10 Minuten
Leitungswasser	15 Minuten
Brilliant-Crocein-Säurefuchsin	10 Minuten
Essigsäure 1 %	30 Sekunden
Phosphorwolframsäure 5 %	20 Minuten
Essigsäure 1 %	30 Sekunden
Ethanol 99 % vergällt	1 Minute
Ethanol 99 % vergällt	6 Minute
Safron du Gatinais	6 Minuten
Ethanol 99 % vergällt	2 x 2 Minuten
Isopropanol	2 Minuten

### 3.1.3. Fluoreszenzfärbungen

Die Fluoreszenzmikroskopie detektiert die Photonenemission nach kurzzeitiger Erregung von Elektronen. Wird ein fluoreszierendes Molekül durch eine spezifische Wellenlänge erregt, absorbieren Elektronen Photonen und gelangen somit auf ein höheres Energieniveau. Dieser Zustand hält nur kurz an und beim Rückfall auf das ursprüngliche Energieniveau wird Energie in Form von Photonen freigesetzt, die als energieärmere spezifische Wellenlänge detektiert werden kann. [109]

## Färbung mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol

Um Aussagen über die Morphologie und das Vorhandensein oder Fehlen von Zellkernen treffen zu können, wurden Färbungen mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) an Paraffinschnitten durchgeführt (Tabelle 8). DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der in die DNA interkaliert und bei Anregung mit Licht (358 nm) unter dem Fluoreszenzmikroskop Licht einer spezifischen Wellenlänge (461 nm) emittiert. Daher wird DAPI bevorzugt für die Detektion von Zellkernen eingesetzt. [110]

Während die Entparaffinierung der Objektträger zunächst wie oben beschrieben erfolgte, wurde DAPI lichtgeschützt aufgetaut und schließlich eine Färbelösung mit 1 µl DAPI/ 1 ml PBS (1:1000 Verdünnung) angefertigt. Die Färbung ist unsteril bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt worden. Eine Glasküvette ist mit dem benötigten Volumen der Färbelösung gefüllt und die Objektträger sind in dieser im Dunklen inkubiert worden.

**Tabelle 8: DAPI-Färbeprotokoll** Adaptiert nach [111]

<b>Lösung</b>	<b>Dauer</b>
DAPI (1:1000) in PBS	5 Minuten
PBS	2 x 5 Minuten
Sudanschwarz	2 Minuten
AD	2 x 5 Minuten

Anschließend erfolgte die Eindeckung der Objektträger und die kurzzeitige Lagerung in einer lichtgeschützten Feuchtkammer bis die zügige Analyse am Fluoreszenzmikroskop durchgeführt wurde. Hierbei ist stets die gleiche Belichtungszeit von 100 ms für Gewebeschnitte angewendet. Aufnahmen wurden mit 10-facher Vergrößerung durchgeführt.

Um quantitative Aussagen über die DAPI-Färbung treffen zu können, sind die Bilder mit der ImageJ Software (V. 1.51 s, National Institutes of Health, USA, <http://imagej.nih.gov/ij>) analysiert worden und die Quantität des DAPI-Signals wurde gemessen. Orientierend an verschiedenen Studien [112, 113] ist die Hintergrundfluoreszenz durch die Anwendung eines Thresholds eliminiert worden. Letzterer wurde so gewählt, dass nur sicher zuzuordnende Zellkerne detektiert wurden und Zelltrümmer oder kleinere Artefakte außer Acht gelassen worden sind. Zur Auswertung sind die Bilder zunächst segmentiert, ein entsprechender Threshold ist

gesetzt und ein binäres Bild (schwarz-weiß Bild) ist ausgegeben worden, das zur weiteren Analyse genutzt wurde. Um vergleichende Schlüsse zwischen den Bildern ziehen zu können, ist der gleiche Threshold für jedes Bild eingestellt worden. Nach der Signalintensitätsmessung folgte die Skalierung der Bilder, um anschließend die Fläche des Gewebes im Schnitt zu messen und einen DAPI-Signalwert zuzuordnen. Als Einheit wurde hier DAPI-Signal/mm<sup>2</sup> gewählt. Durch die DAPI-Färbung werden sowohl Zellfragmente, Zelltrümmer als auch intakte Zellkerne detektiert. Zusätzlich erfolgte die Ausmessung des Gewebes in dreifacher Ausführung mit dem Messwerkzeug von ImageJ und daraus erfolgte die Berechnung des Mittelwertes.

### **Live/Dead®-Färbung**

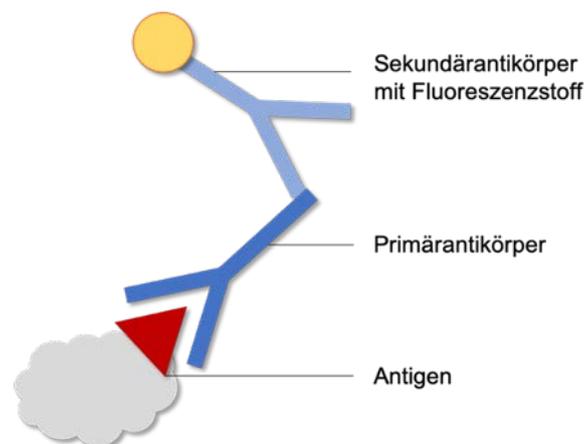
Die Live/Dead®-Färbung (LD-Färbung) gehört zu den Vitalfärbeverfahren und ist eine gängige Methode zur Evaluierung der Zellvitalität. Hierbei werden die zwei Stoffe SYTO™ 9 und Propidiumjodid (PI) verwendet. SYTO™ 9 penetriert hierbei die Zellmembranen vitaler Zellen und färbt DNA sowie RNA, wohingegen PI intakte Zellmembranen nicht durchdringen kann und durch Interkalation mit der DNA letale Zellen anfärbt. SYTO™ 9 fluoresziert im Bereich der grünen Wellenlänge (Absorption 485 nm/ Emission 498 nm) und PI fluoresziert im Bereich der roten Wellenlänge (Absorption 535 nm/ Emission 617 nm). Vitale Zellen sind adhärent, während letale Zellen bereits im Kulturmedium suspendiert sind. Daher wird das Kulturmedium selbst als Ansatzmedium verwendet. [114, 115]

Diese Färbung erfolgte ebenfalls unter unsterilen Bedingungen, bei RT und wurde an die Herstellerangaben adaptiert [116]. Die besiedelten µ-Slides sind direkt nach Versuchsende gefärbt worden. Da das Volumen der µ-Slides (150 µl) bereits nach 24 h-Versuchen Verdunstungsvorgängen unterlag und somit nicht 150 µl abpipettiert werden konnten, wurde für dieses Protokoll ein Lösungsvolumen von 100 µl festgelegt. Zu Beginn sind 100 µl Kulturmedium vorsichtig aus dem µ-Slide abpipettiert und in ein Reaktionsgefäß überführt worden. Diesem wurden anschließend 1 µl PI und 0,5 µl SYTO™ 9 hinzugefügt. Da hierbei keine Inkubationszeit nötig ist, wurden die µ-Slides mit der vorher vorsichtig abgenommenen Lösung wieder befüllt und schließlich bei 10-facher Vergrößerung am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Die Belichtungszeit ist immer gleich eingestellt worden.

Eine quantitative Auswertung der LD-Färbung erfolgte durch Bildanalyse mit der ImageJ-Software. Alle Bilder sind hierbei nach einem festen Schema analysiert worden. Zunächst ist das RGB-Bild (*red, green, blue*, 24-bit) in die einzelnen Farbkanäle aufgesplittet worden (ergibt ein 8-bit Bild). Für die Analyse der vitalen Zellen wurden die Intensitätsmaxima des grünen Kanals gemessen. Nach entsprechender Anpassung des Thresholds konnten damit die angefärbten Zellen ausgezählt werden. Gleiches wurde mit dem roten Kanal (letale Zellen) durchgeführt; der blaue Kanal ist nicht analysiert worden, da sich bei dieser Färbung hier kein Signal zeigte. Durch einfache Addition konnte die Gesamtzellzahl bestimmt werden und in einem nächsten Schritt der Anteil der vitalen und letalen Zellen am Gesamtzellanteil.

### 3.1.4. Immunfluoreszenz

Mit der Antikörper-basierten Immunfluoreszenzfärbung können einzelne intra- und extrazelluläre Proteine gezielt detektiert (Abbildung 19) werden.



#### Abbildung 19: Schematische Darstellung des Prinzips der Immunfluoreszenz

Das grundlegende Prinzip beinhaltet im ersten Schritt die spezifische Bindung eines Primärantikörpers an ein Protein (Antigen). Im zweiten Schritt bindet ein Sekundärantikörper, der seinerseits mit einem fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt ist, spezifisch an den Primärantikörper. Durch ein Anregungslicht einer bestimmten Wellenlänge kommt es unter dem Fluoreszenzmikroskop zur Photonenemission wie oben bereits beschrieben.

Um die Konditionierung der Endothelzellen gezielt untersuchen zu können, wurde der Primärantikörper Anti-Human CD144 gewählt, der an VE-Cadherin, ein endotheliales Adhäsionsmolekül, bindet [117]. Zusätzlich wurde das fluoreszierende SiR-Actin (Absorption 652 nm/ Emission 674 nm) gewählt, das an Aktin bindet, ein

Strukturprotein, das einen wichtigen Bestandteil des Zytoskeletts darstellt [118]. Um bessere Ergebnisse bei der Anfärbung von Aktin zu erhalten, ist zusätzlich Verapamil hinzugefügt worden [119].

**Tabelle 9: Protokoll der Immunfluoreszenzfärbung im  $\mu$ -Slide** Adaptiert nach [120]

<b>Lösung</b>	<b>Dauer</b>	<b>Umgebung</b>
PBS (steril)	3 x 1 Minute	RT
4%iges Paraformaldehyd	10 Minuten	RT
PBS (steril)	3 x 1 Minute	RT
Puffer A	15 Minuten	RT
PBS (steril)	3 x 1 Minute	RT
Puffer B	30 Minuten	RT
1. AK: VE-Cadherin (in Puffer B)	12 Stunden	4 °C, Feuchtkammer
PBS (steril)	3 x 1 Minute	RT
2. AK: AlexaFluor555 (in Puffer C) Zytoskelettfärbung: SiR-Actin + Verapamil	60 Minuten	Dunkle Feuchtkammer
PBS (steril)	3 x 1 Minute	RT
DAPI	5 Minuten	RT
PBS (steril)	3 x 1 Minute	RT

Nach Versuchsende erfolgte die Durchführung des Färbeprotokolls der Immunfluoreszenz (Tabelle 9). Hierbei konnte die Immunfluoreszenzfärbung nach statischen und dynamischen Endothelzellversuchen direkt im entsprechenden und besiedelten  $\mu$ -Slide durchgeführt werden.

Nach Abnahme des EC-Mediums aus dem Flusskanal des  $\mu$ -Slides und einem kurzen Waschschrift mit PBS wurde die Fixierung mit 4 %igem Paraformaldehyd durchgeführt. Um die Zellmembranen nach dieser Fixierung für die ausgewählten Antikörper durchlässig zu machen, erfolgte die Zugabe von Permeabilisierungspuffer (Puffer A: bovines Serumalbumin (BSA), Triton-X, siehe Anhang) direkt in den Flusskanal des  $\mu$ -Slides für eine Inkubationszeit von 15 Minuten. Im Anschluss folgte die Inkubation mit Blockierungspuffer (Puffer B: BSA, Tween 20, siehe Anhang) für 30 Minuten, um unspezifische Bindungsstellen der Antigene zu blockieren.

Die Zellen wurden nun über 12 Stunden bei 4 °C mit dem Primärantikörper VE-Cadherin (2 µg/ml) in Blockierungspuffer gelöst inkubiert.

Am 2. Tag ist initial ein Waschgang mit sterilem PBS durchgeführt worden. Die anschließende Inkubation des Sekundärantikörpers AlexaFluor555 (2 µg/ml, Absorption 555 nm/Emission 565 nm), der in 1 % BSA/PBS gelöst wurde, erfolgte in einer lichtgeschützten Feuchtkammer für 60 Minuten. Hier folgte das Hinzufügen von SiR-Actin (1:1000) zur Anfärbung des Zytoskeletts und Verapamil (1:1000). Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS ist außerdem noch eine Zellkernfärbung mit DAPI (1:1000) in PBS verdünnt durchgeführt und diese bei RT für 5 Minuten ebenfalls lichtgeschützt inkubiert worden. Nach einem letzten Waschschrift mit PBS wurde Eindeckmedium vorsichtig unter dem Ausschluss von Luftblasen in die Flusskammer der µ-Slides gegeben. Diese wurden lichtgeschützt in einer Feuchtkammer gelagert und zügig mit dem Fluoreszenzmikroskop bei 40-facher Vergrößerung ausgewertet.

### **3.2. Rasterelektronenmikroskopie**

Zur Beurteilung der morphologischen Gegebenheiten der Gewebepatche wurden Aufnahmen mit dem Rasterelektronenmikroskop durchgeführt.

Die Rasterelektronenmikroskopie ermöglicht die detaillierte Analyse von Objektoberflächen. Durch eine Elektronenquelle wird hierbei ein feiner Elektronenstrahl erzeugt, der im Hochvakuum durch angelegte Spannung beschleunigt wird und auf das zu untersuchende Objekt trifft. Die Probe wird nach einem spezifischen Raster untersucht, wobei die verschiedenen Wechselwirkungen der Elektronen mit der Oberfläche mit Hilfe von Detektoren analysiert und am Computer in entsprechende Graustufen umgewandelt werden können. Hierdurch entsteht ein Bild der Objektoberfläche. [121]

Zur Durchführung einer rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung ist initial eine entsprechende Aufbereitung der zu evaluierenden Proben unabdingbar. Im Vordergrund stehen hierbei die Entwässerung sowie die schonende Trocknung der Präparate. Der hohe Wassergehalt biologischer Gewebe würde ohne Aufbereitung zu Strukturschädigungen durch Verdampfungsvorgänge sowohl während des Trocknungsprozesses als auch im Hochvakuum des Rasterelektronenmikroskops führen.

Die Entwässerung der Gewebepatche erfolgte mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe als erster Schritt der Vorbereitung zur Rasterelektronenmikroskopie. Die Trocknung der Proben anhand des Prinzips der Kritisch-Punkt-Trocknung bietet die schonendste Aufbereitung für biologische Proben. Der kritische Punkt beschreibt den Aggregatzustand eines Stoffes, an dem sowohl im flüssigen als auch im gasförmigen Zustand die gleiche Dichte vorliegt. Hierbei entstehen keine Oberflächenspannungen und entsprechend wird das zu untersuchende Material im Verdampfungsprozess nicht beschädigt. Der kritische Punkt des CO<sub>2</sub> liegt bei einer Temperatur von 31 °C und einem Druck von 73,8 bar. Sobald die Proben in der Druckkammer des Kritisch-Punkt-Trockners eingebracht sind, erfolgt nach und nach der Einstrom von CO<sub>2</sub> in die Druckkammer. Es folgt die langsame Temperaturerhöhung mit einhergehender Druckerhöhung in der Kammer, wodurch letztlich der kritische Punkt des CO<sub>2</sub> erreicht wird. Im Anschluss wird der Druck in der Kammer langsam reduziert, um Risse und Artefaktbildung der Proben durch einen zu schnellen Druckabfall zu vermeiden. Anschließend können die Proben entnommen werden und im nächsten Schritt erfolgt die Beschichtung der Gewebeproben mit einem leitfähigen Stoff durch den sogenannten Sputter-Vorgang. [122]

Die Leitfähigkeit des Probematerials ist nötig, um die oben beschriebenen Wechselwirkungen durch den eintreffenden Elektronenstrahl auf der Objekt Oberfläche auszulösen und analysieren zu können. Hierfür wird im Gerät des Sputter Coaters ein Unterdruck mit Argon-Zusatz aufgebaut, das letztlich durch Anlegen einer Spannung zu einer Beschleunigung der Argon-Atome führt, welche wiederum auf eine Goldkathode treffen. Durch das Herauslösen einzelner Goldatome bildet sich ein feiner Nebel, der zur gleichmäßigen und dünnen Beschichtung der Probenoberfläche führt.

Nach erfolgreicher Aufbereitung der Proben konnten diese im Vakuum-System des Rasterelektronenmikroskops untersucht werden und digital am Computer betrachtet und aufgenommen werden.

### **Fixierung und Alkoholreihe**

Die Proben sind nach Versuchsende zunächst in Fix-II-Lösung (Mischung aus GA, NaCaCo und PBS, siehe Anhang) fixiert und bei 4 °C bis zur weiteren Behandlung, mindestens aber für 48 Stunden, gelagert worden. Durch die Fixierung des Gewebes nach Versuchsende wurde sichergestellt, dass die Proben keinen weiteren Denaturierungsprozessen unterlagen. Um die Proben nach der Fixierung zu entwässern, sind diese für jeweils

10 Minuten in einer aufsteigenden Alkoholreihe (jeweils 30 %, 50 %, 70 %, 90 % und 96 %igem Ethanol) eingetaucht worden. Im Anschluss erfolgte die Überführung der Proben in Aceton, das vorher bei -20 °C gekühlt gelagert wurde.

### **Kritisch-Punkt-Trocknung**

Ein Metallbehälter mit den Proben wurde in die Druckkammer des Kritisch-Punkt-Trockners gegeben, die ebenfalls mit Aceton befüllt worden ist. Nach Herunterkühlen auf 8 °C wurde das Aceton durch wiederholtes Ein- und Ausschleusen gegen flüssiges CO<sub>2</sub> in der Druckkammer ausgetauscht. Zwischen den Episoden des CO<sub>2</sub>-Einstroms erfolgten Pausen von ca. 2 Minuten, um ein Eindringen des CO<sub>2</sub> in die Probe zu gewährleisten. Entscheidend für diese Trocknungsmethode ist das anschließende Erhitzen der Druckkammer auf 42 °C, wodurch der Druck auf ca. 80 bar ansteigt. Hierbei wurde der kritische Punkt des CO<sub>2</sub> überschritten. Daraufhin erfolgte das langsame, mindestens für 30 Minuten andauernde, Ablassen des nun gasförmigen CO<sub>2</sub> über ein Ventil bei gleichbleibender Temperatur.

### **Sputter-Vorgang**

Die getrockneten Proben wurden entnommen und mit einem Skalpell geteilt, sodass jeweils die Vorder- und Rückseite der Gewebeprobe (Serosa und Fibrosa) auf einem Probenteller mit Klebefolie fixiert werden konnte. Nach Überführen in die Kammer des Sputter-Gerätes folgte zunächst der Aufbau eines Unterdrucks mit einem Argon-Zusatz. Anschließend wurden die Argon-Atome durch Anlegen einer Spannung (570 V) beschleunigt, um Atome aus der Goldkathode zu lösen. Der Prozess des Sputterns dauerte insgesamt 180 Sekunden. Nach Entlüftung des Systems konnten die Proben entnommen werden und mit dem Rasterelektronenmikroskop, wie oben bereits beschrieben, betrachtet werden.

### 3.3. DNA-Quantifizierung

Die Bestimmung des DNA-Gehaltes in den Gewebepatchen erfolgte mittels eines DNA-Isolierungs-Kit (Isolate II Genomic DNA Kit, Bioline GmbH), wobei die Herstellerangaben stets befolgt worden sind [123]. Die hier verwendete Methode basiert auf dem Silikagel-Verfahren. Hierbei binden die lysierten Nukleinsäuren an die Silikamembranen bei gleichzeitigem Vorliegen chaotroper Salzionen, die vorher hinzugegeben wurden. Dieses Verfahren bietet eine einfache und zuverlässige Methode zur DNA-Isolierung. [124]

Zunächst wurden Gewebeproben mit einem Gewicht von exakt 25 mg in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Um ausreichend DNA aus Gewebeproben gewinnen zu können, war die Durchführung einer Prä-Lyse notwendig. Hierfür erfolgte die Inkubation der Proben in Lysepuffer (Fertigprodukt aus DNA-Isolierungs-Kit), dem zusätzlich Proteinkinase K hinzugefügt wurde, bei einer Temperatur von 56 °C in einem Thermomixer. Dieser Schritt hielt zwischen 3 und 6 Stunden an bis die Gewebeproben vollständig aufgelöst erschienen. Im Anschluss erfolgte ein weiterer Lyseschritt durch Zugabe eines weiteren Lysepuffers des Kits und die Inkubation bei 70 °C für 10 Minuten. Nach einem Waschschrift mit alkoholhaltigem Puffer ist die gesamte Lösung in ein Sammelgefäß mit Silikasäulenmembran überführt worden. Nach mehrmaligem Waschen, Zentrifugieren und Trocknen konnte in einem letzten Schritt die DNA gewonnen werden.

Der DNA-Gehalt wurde schließlich mit einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Alle Messungen sind dreimal wiederholt worden und es sind nur Messungen eingeschlossen worden, bei denen das Verhältnis von  $E_{260}/E_{280}$  zwischen 1,7 und 2,0 lag, was für die Reinheit der gemessenen DNA spricht. Werte  $< 1,7$  weisen auf eine Verunreinigung der Probe mit Proteinen hin. Die endgültige Angabe der DNA-Menge erfolgte als ng/mg Probengewicht.

### 3.4. Biomechanische Analyse

Um die biomechanischen Eigenschaften des Perikards analysieren zu können, erfolgte die Durchführung von Zugversuchen mit allen Proben. Hierbei handelt es sich um ein häufig genutztes genormtes Standardverfahren, das der Untersuchung mechanischer Eigenschaften eines Stoffes dient. Die Probe wird hierfür in die Klemmbacken der Zugmaschine eingesetzt und durch eine stetige Zugkraft gedehnt, bis es zum Bruch des Materials kommt. [125]

Zur Vorbereitung der Perikardproben für die Zugversuche wurden diese zunächst auf einem Durchleuchtungstisch betrachtet. Hierdurch konnte der Verlauf der Kollagenfasern evaluiert werden und entsprechende Proben aus Bereichen mit transversalen und longitudinalen Faserverläufen entnommen werden. Hierbei beschreibt ein transversaler Faserverlauf den Verlauf quer zur Länge des Probenkörpers und ein longitudinaler Faserverlauf den Verlauf entlang der Länge des Probenkörpers. Die Probenentnahme wurde mithilfe einer manuellen Schneidpresse durchgeführt, sodass genormte Probenkörper (Stanzform: DIN 53504-S2A) entstanden. Nachdem die Materialdicke der Probe erhoben wurde, erfolgte die Lagerung der Probenkörper in PBS bis zur weiteren Analyse. Zur Lagerung der Nativproben fügten wir der PBS-Lösung eine 1%ige Anti/Anti-Lösung hinzu, um bakteriellen/fungalen Wachstumsprozessen bis zur zügigen Weiterverarbeitung der Proben vorzubeugen.

Die Probenkörper sind spannungsfrei in die Klemmbacken der Zugmaschine befestigt worden und eine Dehnungsgeschwindigkeit von 30 mm/min wurde eingestellt. Mithilfe der verwendeten Software (testXpert V. 12.3, Zwick GmbH & Co. KG) erfolgte die Durchführung der Zugversuche, wobei die vorab gemessene Materialdicke jeder einzelnen Probe vor dem Start der Zugversuche durch die Software abgefragt wurde. Durch die Software sind die Ergebnisse in einem Spannungs-Dehnungs-Diagramm aufgezeichnet und verschiedene Werte, u.a. die Maximalkraft ( $F_{\max}$  [N]) der Probe, aufgezeigt worden.

### 3.5. Sterilitätstestung

Zur Überprüfung der Sterilität der behandelten Gewebe wurden Proben ( $n = 5$ ) der Gruppen GA, DEZ-GA, DEZ, RP<sub>i</sub> und PP<sub>i</sub> leitliniengerecht nach den Vorgaben der *European Pharmacopoeia Commission* untersucht [87]. Nach Anwendung der jeweiligen Prozessierungsmethode und Probenentnahme, erfolgte die Inkubation in zwei unterschiedlichen flüssigen bakteriellen Nährmedien (Thioglykolat und Trypton-Soja). Alle Schritte fanden unter aseptischen Bedingungen statt. Der Deckel der Nährmedien-Reagenzgläser ist abgenommen und die Öffnung dieses Reagenzglases durch die Flamme eines Bunsenbrenners gezogen worden. Nach der Hinzugabe der Probe in das Nährmedium, wurde die Öffnung des Reagenzglases erneut durch die Flamme gezogen und schließlich der Deckel wieder aufgesetzt. Die genutzte anatomische Pinzette wurde zwischen den Schritten und verschiedenen Proben für jeweils 10 Minuten in Ethanol 70 % eingelegt und anschließend ebenfalls durch die Flamme gezogen.

Die anschließende Inkubation der Nährmedien mit Proben erfolgte für 14 Tage bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Nach dieser Zeit konnte die Trübung des flüssigen Nährmediums im Reagenzglas beurteilt werden. Ein klares, durchsichtiges Medium gilt hierbei als steril, während ein trübes, gegebenenfalls mit Ausfällen versehenes, Medium als unsteril und kontaminiert gilt.

### 3.6. Statistische Analyse

Alle Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben. Nach Überprüfung der Normalverteilung durch den Kolmogorov-Smirnov-Test wurden die Gruppen durch eine einseitige Varianzanalyse mit einem anschließenden Bonferroni post-hoc Test verglichen. Der direkte Gruppenvergleich erfolgte mit Hilfe eines t-Tests: Ein  $p$ -Wert  $< 0,05$  wurde als statistisch signifikant gewertet, ein  $p$ -Wert  $< 0,01$  als statistisch hochsignifikant und ein  $p$ -Wert  $< 0,001$  als statistisch höchst signifikant. Das alpha-Level für alle angewendeten Tests lag bei 0,05. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe der GraphPad Prism Software durchgeführt (GraphPad Software v7.0c, La Jolla, CA, USA).

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Gewebeprozessierung

#### 4.1.1. Histologische Evaluierung

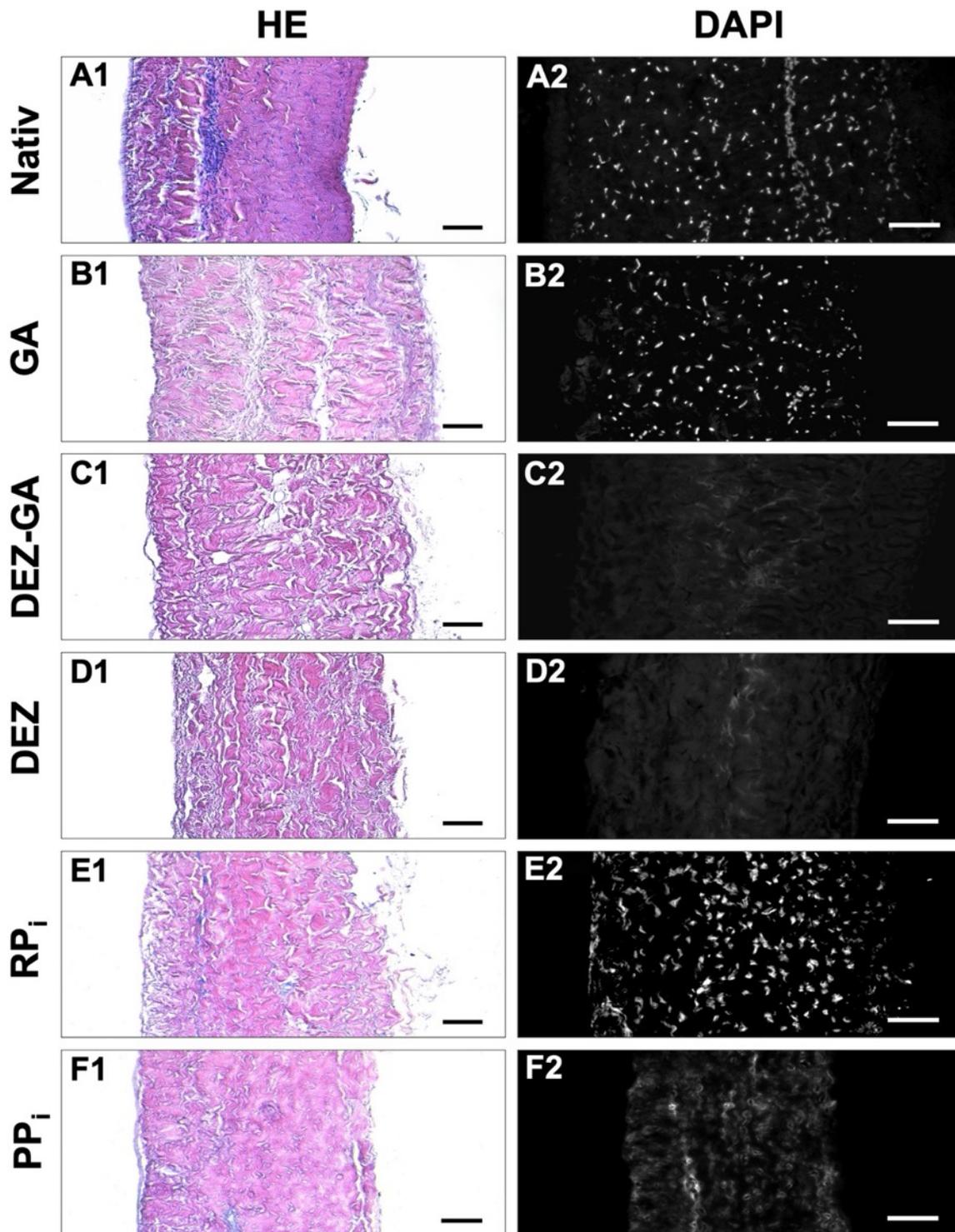
Die Färbung der nativen Proben zeigte eine gleichmäßige Verteilung von Zellkernen in der HE- und DAPI-Färbung (Abbildung 20, A1+2). Die Kollagenfasern erschienen in der PSR- und MPC-Färbung der nativen Proben in paralleler und dichter Anordnung (Abbildung 21, A1+2). In der MPC-Färbung zeigten sich größtenteils Kollagenfasern (gelb) und ein kleiner Anteil elastischer Fasern (rot). In der PSR-Färbung überwog der Anteil des Kollagen Typ I (rot-gelb) im Vergleich zum Kollagen Typ III (grün).

Nach der GA-Fixierung wurde keine Reduzierung der Zellkerne beobachtet (Abbildung 20, B1+2). Es zeigten sich weiterhin blau-violette Zellkernstrukturen innerhalb der Extrazellulärmatrix (EZM) in der HE-Färbung und deutliche Zellkerne in der DAPI-Färbung der GA-Proben. Die allgemeine Struktur der Proben erschien in der MPC-Färbung im Vergleich zur Nativprobe etwas aufgelockerter (Abbildung 21, B1), wohingegen die PSR-Färbung keine wesentlichen Veränderungen der Ausrichtung der Kollagenfasern zeigte (Abbildung 21, B2). In der PSR-Färbung stellten sich die Kollagenfasern dicht angeordnet dar; zu erkennen war hier ein etwas höherer Anteil an Fasern des Kollagen Typ III verglichen zu Fasern des Kollagen Typ I.

Die DEZ-Proben zeigten in der HE-Färbung keine Anzeichen von residualen Zellkernen oder -fragmenten sowie eine deutliche Abnahme des DAPI-Signals (Abbildung 20, D1+2). In der DAPI-Färbung waren Signal-Schleier, aber keine umschriebenen Strukturen zu erkennen. Die Struktur der EZM von DEZ-Proben konnte im Vergleich zu nativen Proben gut erhalten werden und zeigte sich in der MPC-Färbung nur leicht aufgelockert (Abbildung 21, D1). Es konnte ein ausgeglichenes Verhältnis von Kollagen Typ I und III in der PSR-Färbung der DEZ-Proben beobachtet werden (Abbildung 21, D2). In der histologischen Evaluierung von DEZ-GA, also Proben, die nach der Dezellularisierung mit GA fixiert wurden, ergaben sich keine qualitativen Unterschiede im Vergleich zu Proben der Gruppe DEZ (Abbildung 21, Abbildung 20, C1+2).

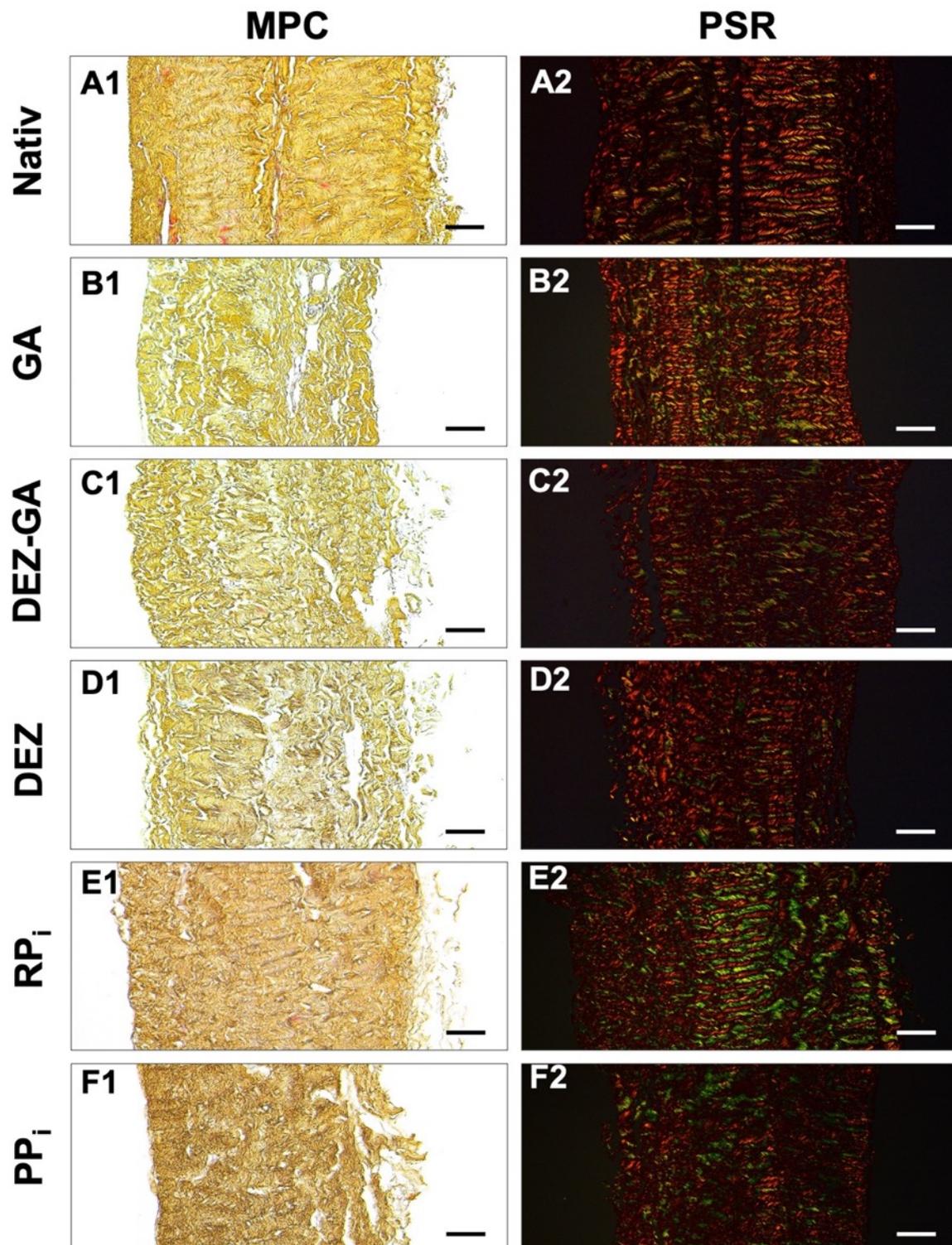
Die Proben der Gruppe RP<sub>i</sub> wiesen in der HE-Färbung Zellkernstrukturen auf und auch deutlich umschriebene Zellkerne in der DAPI-Färbung (Abbildung 20, E1+2). Der Anteil an sichtbaren DNA-Resten in der DAPI-Färbung der RP<sub>i</sub>-Gruppe ließ kaum einen Unterschied zu den hier verwendeten Nativproben der Rinderperikarde erkennen. In der MPC-Färbung stellte sich eine dicht und parallel angeordnete Kollagenarchitektur dar (Abbildung 21, E1), die EZM erschien nicht aufgelockert. In der PSR-Färbung ließ sich ein deutlich höherer Anteil an Fasern des Kollagen Typ III erkennen (Abbildung 21, E2) im Vergleich zu den verwendeten nativen und prozessierten Rinderperikarden, die entweder ein ausgeglichenes Verhältnis oder einen leicht erhöhten Anteil an Fasern des Kollagen Typ I aufwiesen.

PP<sub>i</sub>-Proben zeigten in der HE-Färbung hingegen nur wenige Zellkernstrukturen und in der DAPI-Färbung erschienen schleierhafte und nur teilweise umschriebene DNA-Strukturen (Abbildung 20, F1+2). Die Analyse der MPC-Färbung erbrachte eine dichte EZM-Struktur mit wenigen Auflockerungen (Abbildung 21, F1). Die Kollagenstrukturen erwies sich in der PSR-Färbung intakt und das Verhältnis von Kollagen Typ I und III war ausgeglichen (Abbildung 21, F2).



**Abbildung 20: Histologische Evaluierung mit HE- und DAPI-Färbung**

Repräsentative Bilder aller experimentellen Gruppen mit HE (A-F1) und DAPI (A-F2). Die Nativproben zeigten eine deutliche und einheitliche Verteilung von Zellkernen (A1+2). Proben der Gruppe GA wiesen keine eindeutige Reduzierung der Zellkerne (B1+2) auf, die Gruppen DEZ und DEZ-GA hingegen zeigten eine deutliche Abnahme von Zellkernstrukturen (C1+2, D1+2). Die Färbungen der Gruppe RP<sub>i</sub> offenbarte zahlreiche residuale DNA-Reste (E1+2), wohingegen PP<sub>i</sub>-Proben nur wenige Schlieren an DNA-Resten aufwiesen (F1+2). Maßstabsbalken = 100 µm

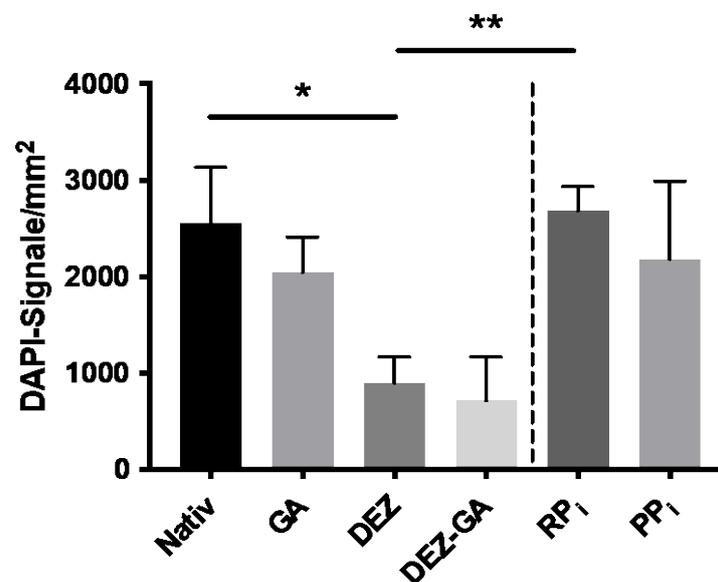


**Abbildung 21: Histologische Evaluierung mit MPC- und PSR-Färbung**

Repräsentative Bilder aller experimenteller Gruppen mit MPC (A-F1) und PSR (A-F2). Die Nativproben zeigten eine einheitliche und regelmäßige Anordnung von Kollagenfasern (A1+2). Alle behandelten Proben schienen in der MPC-Färbung (B-F1) etwas aufgelockert, schwerwiegende Veränderungen der Struktur wurden allerdings nicht beobachtet. Das Verhältnis der Kollagen Typen I und III erschien in der PSR-Färbung (A-F2) generell ausgeglichen. Maßstabsbalken = 100 µm

### Quantitative DAPI-Analyse

Um weitere Aussagen über den Dezellarisierungseffekt treffen zu können, wurden Bilder der DAPI-Färbung wie oben beschrieben automatisiert analysiert (Abbildung 22). Hierbei spricht eine Reduktion der Signalintensität für eine Reduzierung von DNA-Resten und somit zu einem effektiveren Dezellarisierungsergebnis. Die Proben sind stets mit den Nativproben verglichen worden; die dezellularisierten Proben (DEZ, RP<sub>i</sub> und PP<sub>i</sub>) wurden noch einmal gesondert hinsichtlich statistisch signifikanter Unterschiede untereinander verglichen.



**Abbildung 22: Quantitative DAPI-Analyse**

Automatisierte Evaluierung der Quantität der DAPI-Signale mittels Bildanalyse. Da keine nativen Proben von RP<sub>i</sub> und PP<sub>i</sub> vorhanden waren, wurden diese hier mit den dezellularisierten Proben (DEZ) verglichen. Daten angegeben als Mittelwert ± Standardfehler, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ .

Nach der Fixierung mit GA ergab sich keine signifikante Änderung der DAPI-Signale ( $2047,74 \pm 359,04$  DAPI-Signale/mm<sup>2</sup>) im Vergleich zu nativen Proben ( $2561,96 \pm 571,16$  DAPI-Signale/mm<sup>2</sup>,  $p = 0,4349$ ). Die bereits visuell aufgefallene Reduktion des DAPI-Signals in DEZ-Proben (Abbildung 20, D2) hingegen wurde mittels der quantitativen Auswertung der DAPI-Signale bestätigt. Hierbei zeigten die Ergebnisse der DEZ-Proben ( $896,97 \pm 266,91$  DAPI-Signale/mm<sup>2</sup>,  $p = 0,0197$ ) eine signifikante Abnahme der DAPI-Signale im Vergleich zu nativen Proben.

Die Fixierung mit GA nach bereits erfolgter Dezellularisierung zeigte in der Gruppe DEZ-GA trotz deutlicher Abnahme ( $715,03 \pm 449,98$  DAPI-Signale/mm<sup>2</sup>) keine

signifikante Veränderung der Signale zu nativen Proben ( $p = 0,1102$ ). Die Betrachtung der DAPI-Bilder der  $RP_i$ -Proben erweckte den Eindruck, dass die Intensitäten ähnlich denen der nativen Rinderperikarde waren. Die quantitative Analyse bestätigte diese Annahme mit entsprechenden Werten ( $RP_i = 2686,93 \pm 246,74$  DAPI-Signale/ $mm^2$ ) und ergab somit signifikant niedrigere DAPI-Signale für die DEZ-Gruppe ( $p = 0,0012$ ). Die Evaluierung der Intensität der DAPI-Färbung der Gruppe  $PP_i$  ergab keine signifikante Reduzierung ( $2180,86 \pm 809,38$  DAPI-Signale/ $mm^2$ ,  $p = 0,1704$ ) bezogen auf DEZ-Proben.

Da keine Nativproben der industriell dezellularisierten Rinder- oder Pferdeperikardpatche vorlagen, konnte lediglich eine orientierende statistische Analyse als unverbundene Stichprobe mit den hier verwendeten nativen Rinderperikardproben durchgeführt werden. Hierbei zeigte sich keine statistisch signifikante Reduzierung der DAPI-Signale der Proben der Gruppe  $RP_i$  als auch der Gruppe  $PP_i$  im Vergleich zu den nativen Proben ( $RP_i p = 0,8470$ ,  $PP_i p = 0,7105$ ).

#### **4.1.2. Analyse der Oberflächenstruktur mittels Rasterelektronenmikroskopie**

Die Evaluierung mit dem Rasterelektronenmikroskop (REM) ergab eine regelmäßige, eher glatt erscheinende und geschlossene Oberflächenstruktur der Lamina Serosa der Nativproben (Abbildung 23, A1). Die Lamina Fibrosa offenbarte eine eher raue, aber geschlossene, Oberflächenbeschaffenheit und ließ einzelne, teils dicke, Faserstränge erkennen. Hierbei wiesen die Kollagenfasern einen fortlaufenden Verlauf ohne plötzliches Abreißen oder Ausfransen der Fasern auf (Abbildung 23, A2). Diese Nativproben galten als Vergleichsproben zur Evaluierung der prozessierten Perikarde.

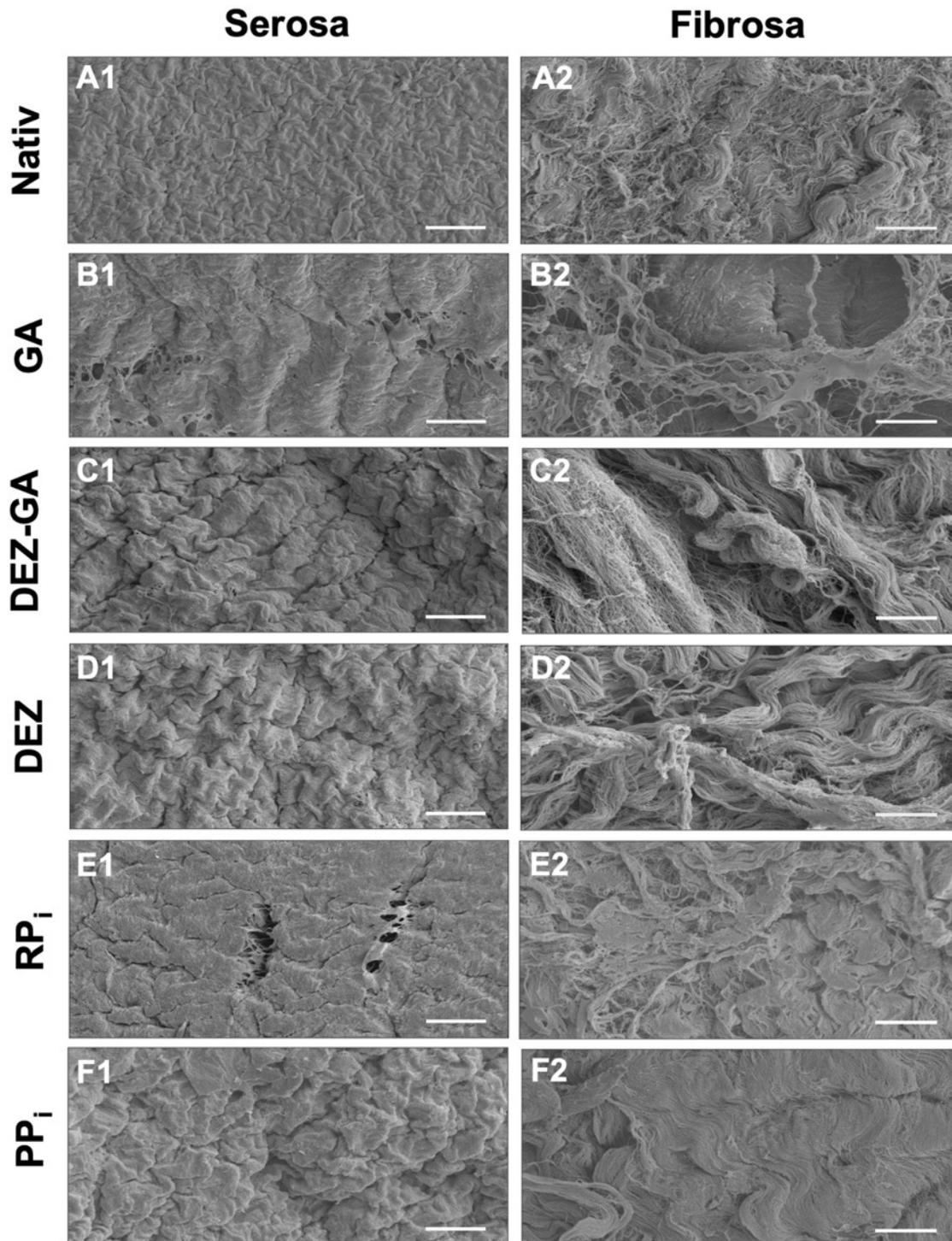
Proben, die mit GA behandelt wurden, wiesen eine stark veränderte Lamina Serosa auf (Abbildung 23, B1). Anders als bei den Nativproben zeigte sich die Oberfläche hier nicht durchgehend geschlossen, sondern wies zahlreiche Perforationen in der Oberflächenstruktur auf. Diese Perforationen maßen eine Größe von 5-10  $\mu m$ , erstreckten sich über die gesamte Oberfläche der Lamina Serosa und waren auf allen GA-Proben vorzufinden. Auch die Lamina Fibrosa erschien bei den GA-Proben stellenweise perforiert (Abbildung 23, B2). So zeigten sich hier aufgelockerte Faserverläufe, die teilweise keinen fortlaufenden Charakter wie die Nativproben der Lamina Fibrosa aufwiesen.

Die Proben der Gruppe DEZ zeigten hingegen eine homogene Innenseite und ein intaktes Kollagennetzwerk ohne bemerkenswerte Veränderungen (Abbildung 23, D1) im Vergleich zu den Nativproben des verwendeten Rinderperikards. Auch im Vergleich zu den GA-behandelten Proben erschienen die Kollagenfaserbündel der Gruppe DEZ einen intakten Faserverlauf vorzuweisen (Abbildung 23, D2), ähnlich den Nativproben.

Die REM-Analyse der Gruppe DEZ-GA wies einige kleinere Perforationen der Lamina Serosa auf (Abbildung 23, C1), erschien bei der weiteren Untersuchung aber vergleichbar mit den Proben der Gruppe DEZ. Weiterhin zeigten sich keine abrupten Kollagenfaserabrisse wie bei den GA-Proben, allerdings schienen die Kollagenfaserbündel der Lamina Fibrosa ausgefranster und aufgelockerter (Abbildung 23, C2) als die Nativproben und die GA-Proben.

Ähnlich wie bei den GA-Proben wiesen auch die RP<sub>i</sub>-Proben Veränderungen und Perforationen der Lamina Serosa auf (Abbildung 23, E1). Diese Perforationen zeigten stellenweise eine Größe > 20 µm. Bei der Betrachtung der Lamina Fibrosa erwiesen sich die Kollagenfasern als kompakte Bündel, die nicht von Perforationen und Auflockerungen durchzogen waren (Abbildung 23, E2).

Die Pferdeperikardpathe (PP<sub>i</sub>) zeigten eine regelmäßige und geschlossene Strukturierung der Lamina Serosa ohne Perforationen oder sonstige Veränderungen (Abbildung 23, F1). Die Kollagenarchitektur der Lamina Fibrosa der PP<sub>i</sub>-Proben erwies sich als dicht angeordnetes, intaktes Faserwerk ohne wesentliche Abnormalitäten (Abbildung 23, F2) im Vergleich zu den nativen Rinderperikardproben. Durch die REM-Analyse konnten keine wesentlichen Unterschiede von Rinder- zu Pferdeperikard festgestellt werden.

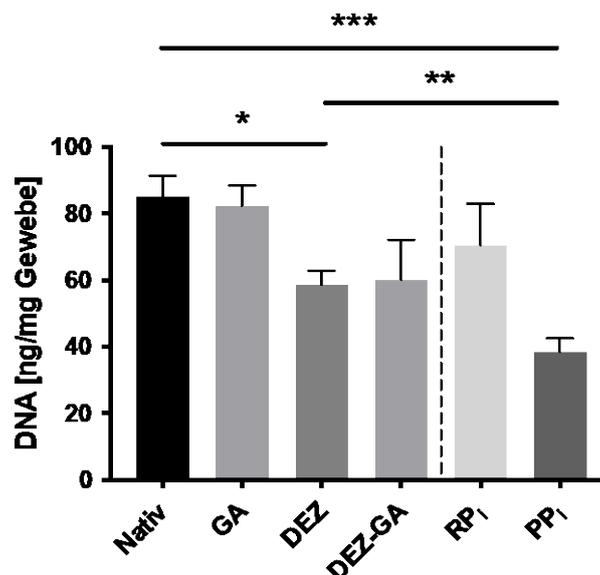


**Abbildung 23: Rasterelektronenmikroskopie der Gewebepatche**

Repräsentative Bilder der Analyse der Oberflächenbeschaffenheit der Lamina Serosa und Fibrosa. Die nativen Proben galten als Vergleichsproben. Proben der Gruppe GA wiesen deutliche Perforationen entlang der Lamina Serosa (B1) auf. Die Oberflächenbeschaffenheit der Gruppen DEZ-GA und DEZ erschien homogen und wies ein intaktes Fasernetzwerk auf (C1+2, D1+2). Auffällig waren Alterationen der Lamina Serosa in der Gruppe RP<sub>i</sub> (E1). Hier fielen ähnliche Perforationen wie bei Perikarden der Gruppe GA (B1) auf und erstreckten sich ebenfalls über die gesamte Oberfläche der Probe. PP<sub>i</sub>-Proben zeigten eine gleichmäßige Oberfläche und ein intaktes Faserwerk (F1+2). Maßstabsbalken = 20 µm.

### 4.1.3. Ermittlung des DNA-Gehaltes

Um die Auswirkungen der verschiedenen Prozessierungsmethoden auf den DNA-Gehalt des Gewebes beurteilen zu können, wurde eine DNA-Quantifizierung durchgeführt (Abbildung 24). Hier zeigten GA-Proben eine minimale, aber nicht signifikante, Abnahme des DNA-Gehaltes im Gewebe ( $82,48 \pm 6,12$  ng/mg Gewebe) im Vergleich zu den Werten der Nativproben ( $85,19 \pm 6,28$  ng/mg Gewebe). Die Proben der Gruppe DEZ offenbarten andererseits eine signifikante Abnahme ( $58,69 \pm 4,06$  ng/mg Gewebe,  $p = 0,0492$ ) des DNA-Gehaltes. Proben der Gruppe DEZ-GA wiesen leicht erhöhte Werte ( $60,24 \pm 5,34$  ng/mg Gewebe) im Vergleich zur DEZ-Gruppe auf. Bei dem Vergleich von RP<sub>i</sub>- zu DEZ-Proben ergaben sich keine signifikanten Veränderungen (RP<sub>i</sub> =  $70,60 \pm 12,32$  ng/mg Gewebe,  $p = 0,3856$ ). Im Gegensatz dazu zeigte die Analyse der PP<sub>i</sub>-Proben einen signifikant niedrigeren DNA-Gehalt ( $38,51 \pm 1,82$  ng/mg Gewebe) im Vergleich zu DEZ-Ergebnissen. Da keine Nativproben der industriell dezellularisierten RP<sub>i</sub>-oder PP<sub>i</sub>-Gruppe vorlagen, konnte lediglich eine orientierende statistische Analyse als unverbundene Stichprobe mit den hier verwendeten nativen Rinderperikardproben durchgeführt werden. Die Analyse ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied des DNA-Gehaltes der Gruppe RP<sub>i</sub> ( $p = 0,3225$ ) zu den Nativproben. Die PP<sub>i</sub>-Proben zeigten hingegen eine höchst signifikante Reduktion der DNA-Menge im Gewebe ( $p < 0,0001$ ).



**Abbildung 24: DNA-Quantifizierung**

Photometrische Bestimmung des DNA-Gehaltes in Nativproben und behandeltem Gewebe. Daten angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler, \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , \*\*\* =  $p < 0,0001$ .

#### 4.1.4. Biomechanische Analyse

Die Ergebnisse der biomechanischen Analyse, die als Zugversuche durchgeführt wurde, erbrachten Werte für die transversale und longitudinale Beurteilung (Tabelle 10). In dieser Analyse sind sowohl die longitudinalen und transversalen Werte einer jeden Gruppe mit den entsprechenden Nativproben verglichen worden als auch die longitudinalen und transversalen Werte einer jeden Gruppe untereinander. Letzterer Vergleich zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede.

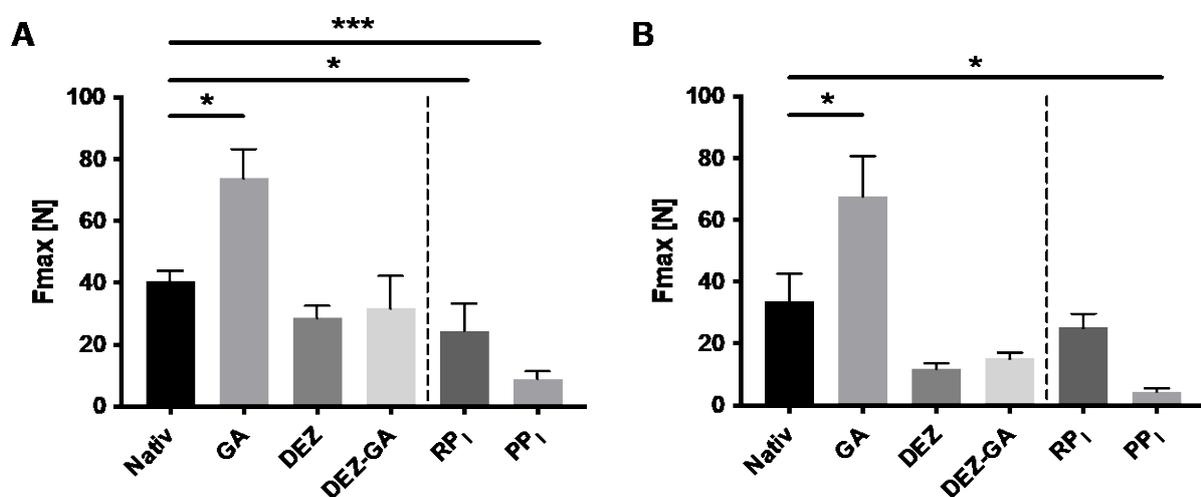
**Tabelle 10: Daten der biomechanischen Analyse im Detail**

Ergebnisse der biomechanischen Analyse. Werte aus longitudinalen und transversalen Faserverläufen unter Angabe der  $p$ -Werte im Vergleich mit den Nativproben. Die Spalte longitudinal vs. transversal vergleicht die entsprechenden Daten einer jeden Gruppe untereinander. Daten angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler, \* =  $p < 0,05$ , \*\*\* =  $p < 0,0001$ .

Probe	longitudinal		transversal		longitudinal vs. transversal
	$F_{max}$ [N]	$p$ -Werte	$F_{max}$ [N]	$p$ -Werte	$p$ -Werte
Nativ	40,54 $\pm$ 3,30	-	33,70 $\pm$ 9,04	-	>0,9999
GA	73,78 $\pm$ 9,46	*0,0227	67,66 $\pm$ 12,93	*0,0251	>0,9999
DEZ	28,72 $\pm$ 3,80	0,1906	11,96 $\pm$ 1,70	0,2167	0,1331
DEZ-GA	31,75 $\pm$ 10,55	>0,9999	15,20 $\pm$ 1,86	0,3631	>0,9999
RP <sub>i</sub>	24,37 $\pm$ 3,10	*0,0141	25,24 $\pm$ 4,49	0,4267	>0,9999
PP <sub>i</sub>	8,80 $\pm$ 1,14	***<0,0001	4,54 $\pm$ 1,06	*0,0126	0,1243

Die Auswertung der Zugversuche (Abbildung 25) ergab eine signifikante Zunahme der longitudinalen und transversalen Maximalkraft von GA-Proben im Vergleich zu Nativproben. Die Analyse der Proben der Gruppe DEZ ergab keine signifikante Änderung in der Maximalkraft. Eine leichte Zunahme der Maximalkraft, wenn auch nicht statistisch signifikant, wurde bei dezellularisierten Proben mit anschließender GA-Fixierung (DEZ-GA) gemessen. Die Ergebnisse der biomechanischen Eigenschaften der industriell dezellularisierten Rinderperikardpathe (RP<sub>i</sub>) zeigten ähnliche Eigenschaften wie die DEZ-Proben. Die Pferdeperikardproben wiesen die geringsten Werte der biomechanischen Analyse auf.

Da keine Nativproben der industriell dezellularisierten RP<sub>i</sub>-oder PP<sub>i</sub>-Gruppe vorlagen, konnte lediglich eine orientierende statistische Analyse als unverbundene Stichprobe mit den hier verwendeten nativen Rinderperikardproben durchgeführt werden. Dabei zeigte sich eine statistisch signifikante Abnahme der longitudinalen Maximalkraft ( $p = 0,0141$ ) bei Proben der Gruppe RP<sub>i</sub> im Vergleich zu den Nativproben. Ebenso ergaben die Untersuchungen der PP<sub>i</sub>-Proben eine höchst signifikante Abnahme der longitudinalen Maximalkraft ( $p < 0,0001$ ) und eine signifikante Abnahme in der Testung der biomechanischen Eigenschaft der transversalen Faserverläufe ( $p = 0,0126$ ). Hierbei ist allerdings zu beachten, dass es sich um den Vergleich unverbundener Stichproben.



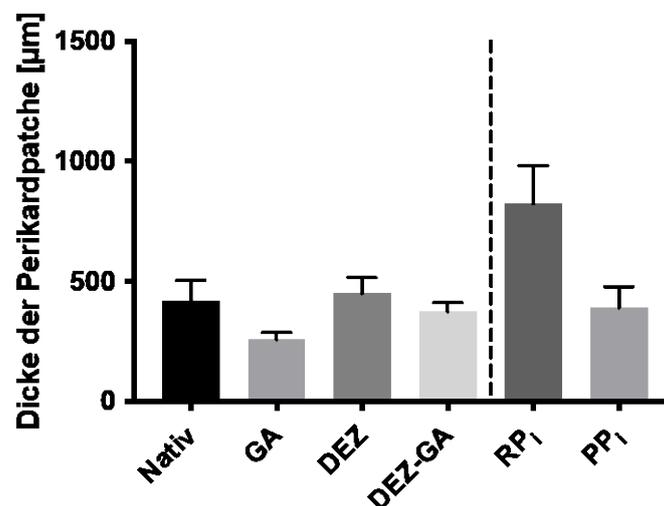
**Abbildung 25: Biomechanische Analyse durch Zugversuche**

Angabe der **(A)** longitudinalen und **(B)** transversalen Änderungen der Maximalkraft von Nativproben und prozessierten Gewebegruppen. Native Proben der Gruppen RP<sub>i</sub> und PP<sub>i</sub> waren nicht vorhanden. Daten angegeben als Mittelwert ± Standardfehler, \* =  $p < 0,05$ , \*\*\* =  $p > 0,0001$ .

### Dicke der Perikardpatche

Trotz statistisch nicht signifikanten Unterschieden zeigte die Evaluierung der Dicke der unterschiedlich behandelten Perikardpatche einen deutlichen Unterschied (Abbildung 26). Dieser fiel bereits während des Arbeitens mit dem Gewebe auf. So konnten beispielsweise deutliche Unterschiede in der Haptik der Gewebe unterschieden werden; einige Perikarde wiesen unbehandelt bereits eine höhere Festigkeit oder Steifigkeit als andere auf.

Beim Vergleich der Werte der Gewebedicke nativer Proben ( $419,90 \pm 84,77 \mu\text{m}$ ) und der Dicke von GA-fixierten Proben ( $258,53 \pm 28,65 \mu\text{m}$ ) zeigte sich ein deutlicher Unterschied. Proben der Gruppe DEZ wiesen ähnliche Werte ( $451,10 \pm 64,63 \mu\text{m}$ ) wie Nativproben auf, bei Proben die zusätzlich zur Dezellularisierung fixiert wurden (DEZ-GA) konnte allerdings eine erneute Abnahme der Dicke gemessen werden ( $374,01 \pm 37,53 \mu\text{m}$ ). Endgültige Aussagen zur Dickenmessung der Gruppen  $\text{RP}_i$  und  $\text{PP}_i$  konnten nicht getroffen werden, da keine Nativproben vorlagen. Eine ausgeprägte Varianz der Perikarddicke innerhalb der Gruppe  $\text{RP}_i$  selbst konnte beobachtet werden. Die Proben wiesen große Schwankungen bei der Messung der Gewebedicke auf ( $824,16 \pm 159,90 \mu\text{m}$ ).  $\text{PP}_i$ -Proben zeigten hingegen eine homogene Verteilung der Dicke ( $390,10 \pm 38,95 \mu\text{m}$ ), die denen der nativen Rinderperikarde ähnlich war.



**Abbildung 26: Perikarddicke**

Die Messung der Gewebedicke der Perikardpatche zeigte bemerkenswerte Unterschiede. Diese bezogen sich nicht nur auf die Effekte der unterschiedlichen angewendeten Methoden, sondern auch auf Schwankungen innerhalb der Gruppen selbst. Daten angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler.

#### 4.1.5. Prüfung der Sterilität

Nach 14 Tagen Inkubation konnten die bakteriellen Flüssignährmedien mit den zu prüfenden Proben auf Sterilität untersucht werden (Tabelle 11). Wie bereits beschrieben, wird das Flüssigmedium auf Klar- oder Trübheit geprüft, wobei ein klares Medium nach 14 Tagen Inkubation auf Sterilität schließen lässt. Ein trübes Medium weist hingegen auf eine bakterielle Kontamination hin.

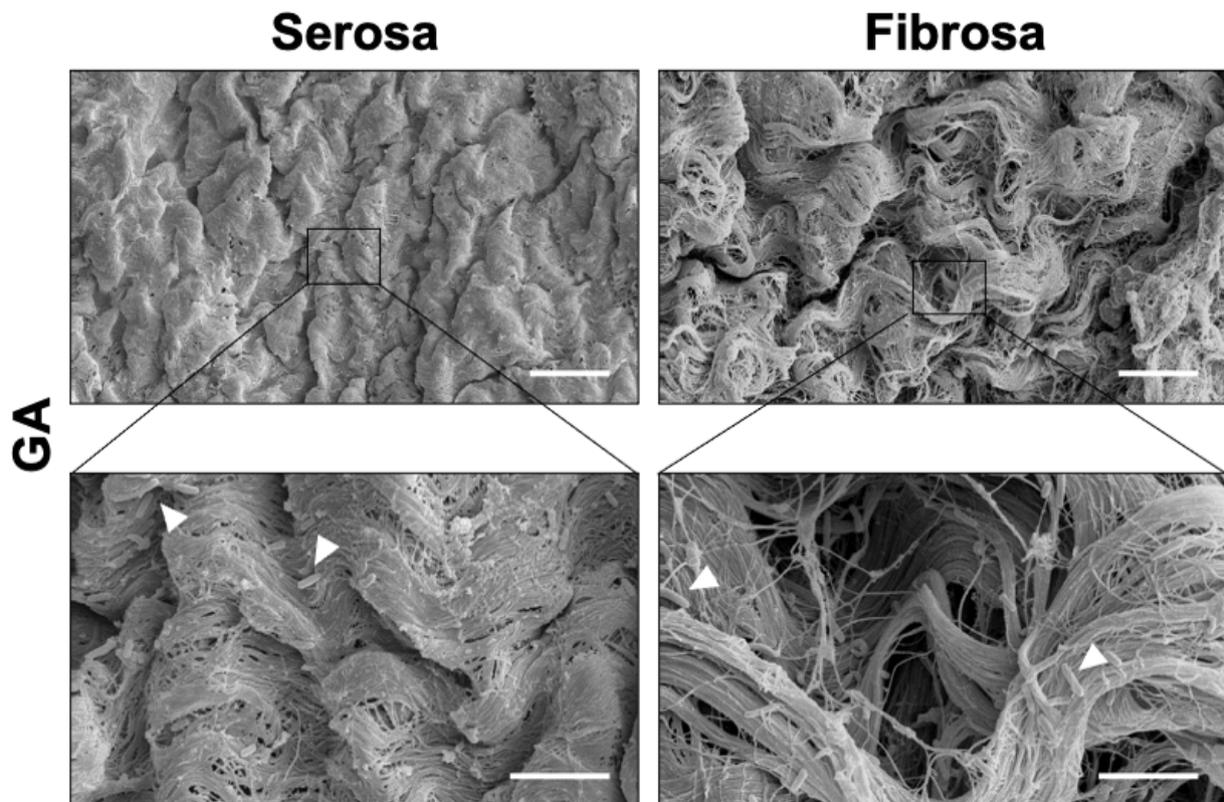
Bei dieser visuellen Evaluierung konnte nach der Inkubationszeit ein klares Medium aller Proben der Versuchsgruppen DEZ, DEZ-GA, RP<sub>i</sub> und PP<sub>i</sub> observiert werden. Somit gab es bei diesen Gruppen keinen Anhalt von bakteriellem oder fungalem Wachstum und Sterilität wurde angenommen.

Die Proben der Gruppe GA hingegen wiesen keine einheitliche Sterilität auf. Bereits nach weniger als 24 Stunden Inkubationszeit zeigten sich 3 von 5 Proben verunreinigt. Hierbei fiel ein trübes Medium mit bakteriellem Wachstum ausgehend von den Proben selbst auf (siehe Anhang: Ergebnisse der Sterilitätstestung der GA-Patche). Diese Beobachtungen wurden unterstützt durch kontaminierte EC-Medien in der statischen Besiedelung von GA-Proben. Bereits nach wenigen Stunden nach EC-Besiedelung und Inkubation zeigte sich das gesamte Well gelblich-trüb verfärbt. Diese Ergebnisse konnten mehrmals reproduziert werden und bestätigten die unzureichende Sterilitätsprüfung der GA-Proben.

**Tabelle 11: Ergebnisse der Sterilitätstestung nach 14 Tagen Inkubation**

<b>Probe</b>	<b>Medium (Anzahl)</b>	<b>Sterilität</b>
GA	Trüb (3/5)	Nein
DEZ	Klar (5/5)	Ja
DEZ-GA	Klar (5/5)	Ja
RP <sub>i</sub>	Klar (5/5)	Ja
PP <sub>i</sub>	Klar (5/5)	Ja

Darüber hinaus wurden die Beobachtungen durch REM-Analysen der GA-Proben untermauert. Hierbei waren deutliche Ansammlungen von bakteriellen Stäbchen auszumachen (Abbildung 27). Diese fanden sich sowohl auf der Lamina Serosa als auch auf der Lamina Fibrosa. Stellenweise konnten massenhafte Ansammlungen der bakteriellen Stäbchen beobachtet werden.



**Abbildung 27: Bakterielle Kontamination der GA-Proben im Rasterelektronenmikroskop**

REM-Evaluierung der kontaminierten GA-Proben. Die oberen Bilder zeigen die Übersichtsaufnahmen der Lamina Serosa und Fibrosa. Die unteren Bilder zeigen eine Vergrößerung der markierten Fläche und zeigen deutliche Ansammlungen von bakteriellen Stäbchen (Pfeilspitzen). Maßstabsbalken = 20 µm (obere Bilder), 5 µm (untere Bilder).

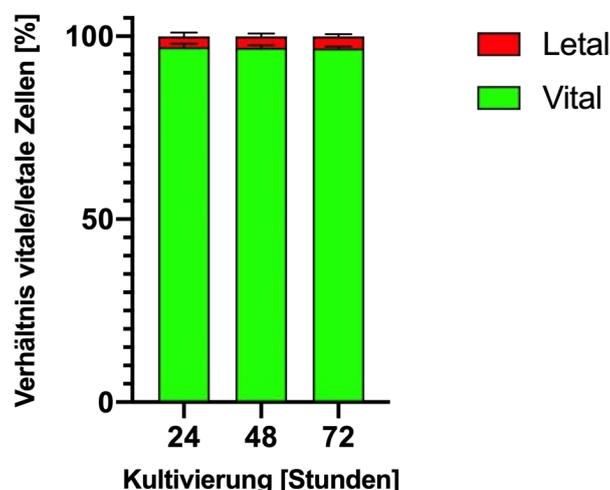
## 4.2. Biokompatibilitätstestung

Die Durchführung dieser Versuche erfolgte zur Evaluierung der Biokompatibilität der prozessierten Gewebe. Als Kontrollgruppe diente die statische Kultivierung von Endothelzellen.

### 4.2.1. Statische Kultivierung von Endothelzellen

Die statische Kultivierung von EC erfolgte als Kontrollgruppe zu der statischen Besiedelung von Geweben mit EC. Hierbei ist die Kultivierung der EC in den bereits beschriebenen Flusskammern durchgeführt worden, um einen direkten Vergleich zur dynamischen Kultivierung zu haben. Die Evaluierung der EC-Kultivierung erfolgte mittels LD- und Immunfluoreszenz-Färbung.

Die Live/Dead®(LD)-Färbung erlaubt Aussagen über die Vitalität einer Zellkultur. Wie bereits beschrieben, wurde diese Färbung mit EC durchgeführt, die sowohl statisch als auch dynamisch kultiviert worden sind.

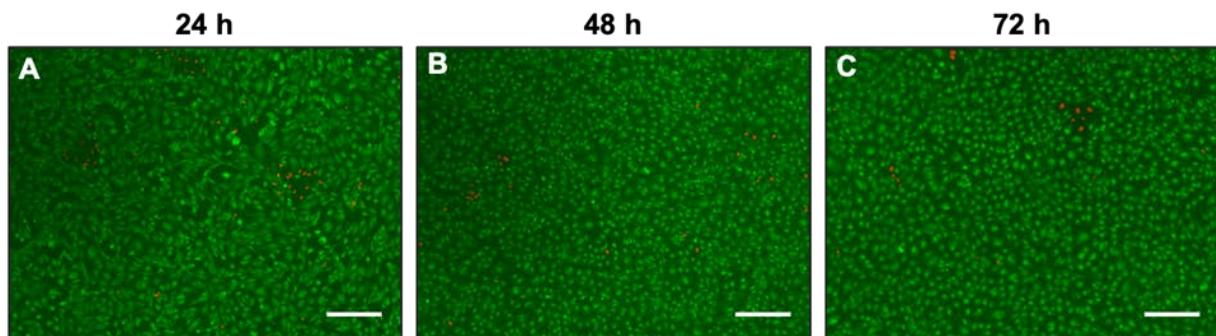


**Abbildung 28: Quantifizierung der LD-Färbung nach statischer EC-Kultivierung**

Die statische Kultivierung von EC zeigte eine durchgehend hohe Zellvitalität sowohl nach 24 als auch nach 48 und 72 Stunden. n = 10, Daten angegeben als Mittelwert ± Standardfehler.

Die statische EC-Kultur zeigte eine hohe Zellvitalität (Abbildung 28) nach 24 Stunden statischer Kultivierung in den verwendeten Flusskammern (97,05 ± 0,98 % vital). Ähnliche Werte der Zellvitalität konnten nach 48 Stunden statischer Kultivierung (96,91 ± 0,73 % vital) und auch nach 72 Stunden (96,73 ± 0,55 % vital) Versuchsdurchführung beobachtet werden. Einzelne letale Zellen waren zu erkennen.

Diese sammelten sich gehäuft in gleicher Umgebung an. Auch mit dieser Färbung ließ sich die typische Morphologie der EC, das als Kopfsteinpflaster-Muster bezeichnet wird, beobachten. Bei allen EC-Kulturen lag eine konfluente Schicht vitaler Zellen vor (Abbildung 29, A-C).

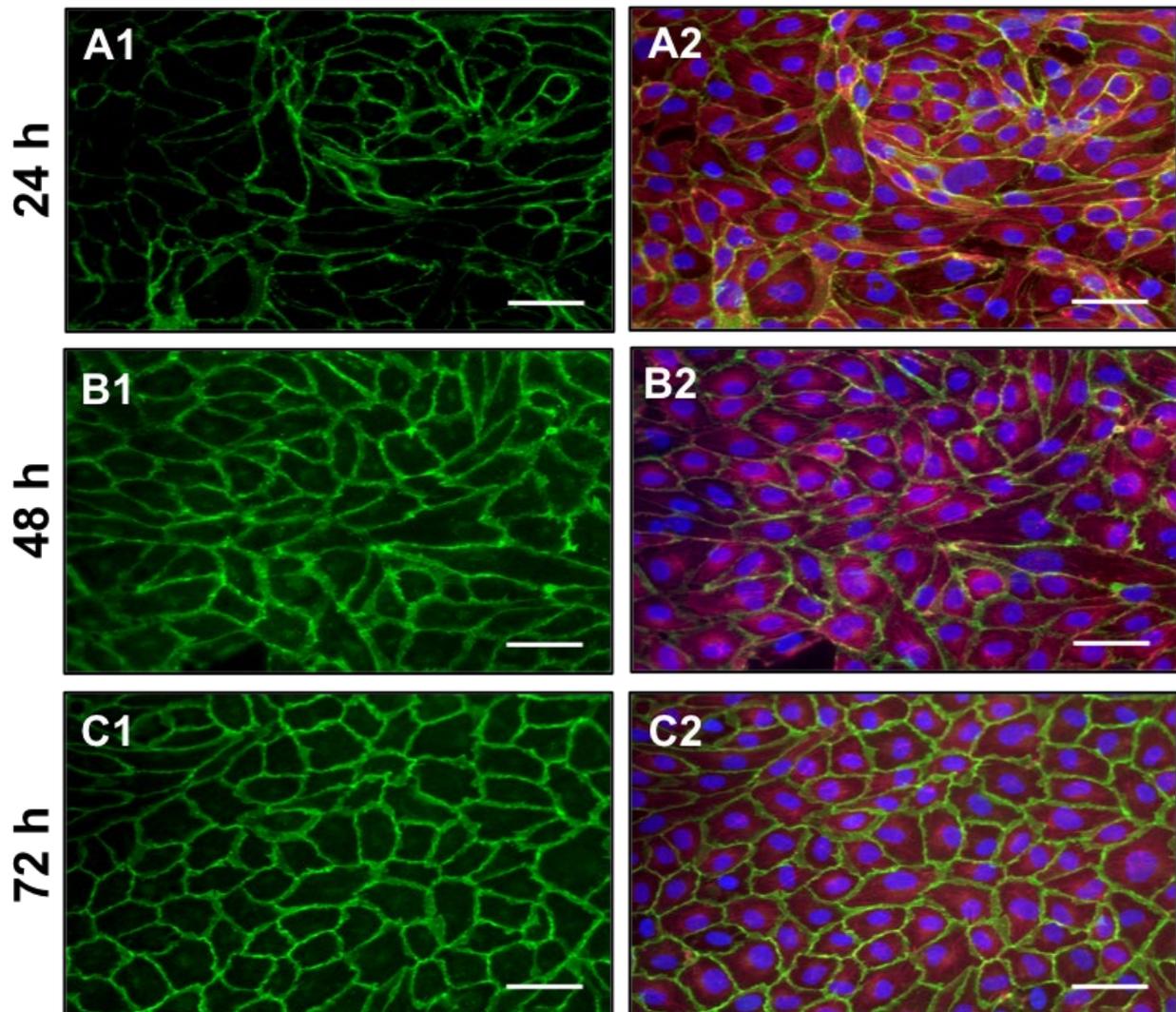


**Abbildung 29: LD-Färbung nach statischer EC-Kultivierung**

Zur Evaluierung der Zellvitalität stellen sich vitale Zellen in dieser Färbung grün und letale Zellen rot dar. Insgesamt lag hier bei statischer Kultivierung eine gute Zellvitalität vor und eine konfluente Schicht vitaler Zellen konnte beobachtet werden. Maßstabsbalken = 200 µm.

Durch die Immunfluoreszenz-Färbung des Adhärens-Proteins VE-Cadherin und dem Zytoskelettbestandteil Aktin lässt sich das Verhalten von Endothelzellen unter Flussbedingungen evaluieren. Als zusätzliche Färbung, um Zellkerne abzugrenzen, erfolgte die Kernfärbung mittels DAPI.

Die statische Kultivierung von Endothelzellen zeigte bereits nach 24 Stunden ein deutliches und homogenes Expressionsmuster von VE-Cadherin und Stressfasern (Abbildung 30). Im Versuchsverlauf von 24 bis 72 Stunden nahm die Expression von VE-Cadherin und die Zelldichte weiter zu. Nach 72 Stunden statischer Kultivierung lag eine gleichmäßige und dichte Endothelzellschicht mit vielen Adhärens-Kontakten vor (Abbildung 30, C1+2). Die Stressfasern waren locker und ungerichtet orientiert und zeichneten sich deutlich ab. Teilweise sind punktförmige Aktin-Fokal-Kontakte angefärbt.



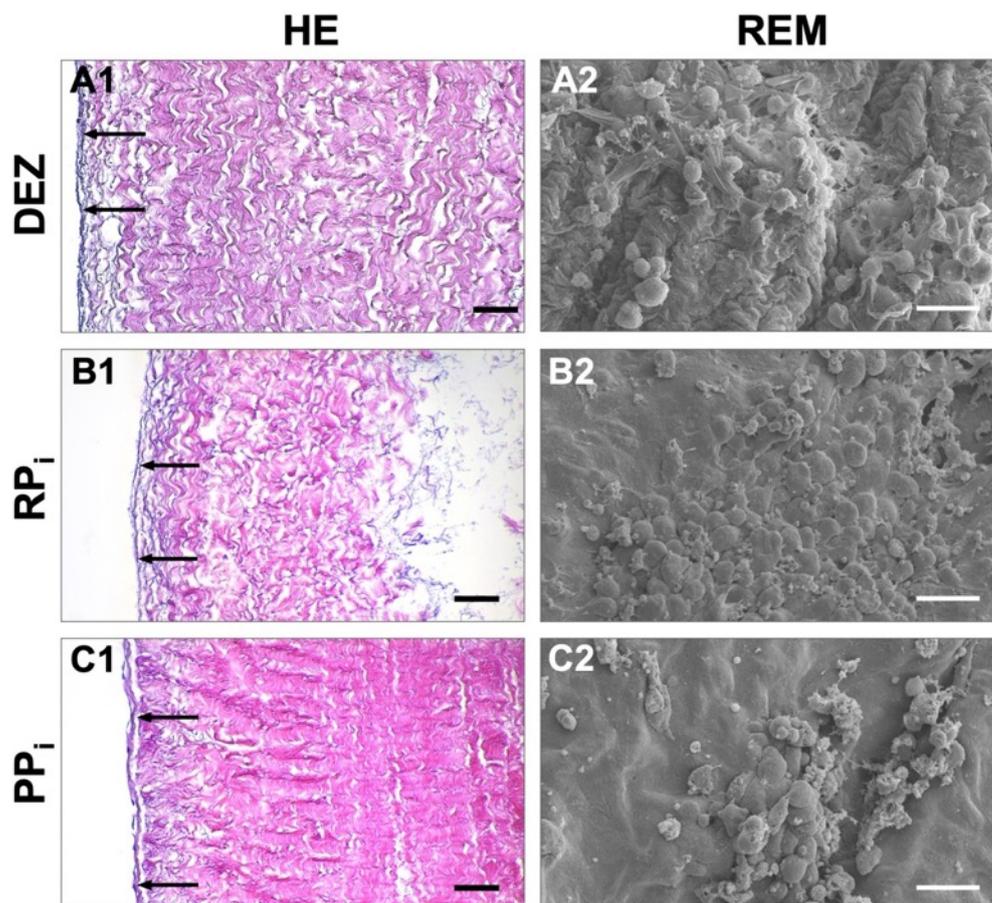
### Abbildung 30: Statische Kultivierung von Endothelzellen – Immunfluoreszenzfärbung

Repräsentative Fluoreszenzbilder nach 24, 48 und 72 Stunden statischer Kultivierung von Endothelzellen. VE-Cadherin (grün), Aktin (Stressfasern, rot), Zellkerne (DAPI, blau). Links alleinige Darstellung von VE-Cadherin, rechts gesamte Darstellung mit VE-Cadherin, Aktin und Zellkernen. Nach 24 Stunden Kultivierung war eine deutliche Expression von VE-Cadherin und Aktin zu erkennen (A1, A2). Diese nahm mit längerer Versuchszeit zu. Nach 72 Stunden war eine homogene und dichte Expression (C1) von VE-Cadherin zu erkennen. Die Endothelzellen zeigen das typische Kopfsteinpflaster-Muster (C2). Maßstabsbalken = 200  $\mu\text{m}$ .

#### 4.2.2. Statische Endothelialisierung von Gewebepatchen

Nach 72 Stunden statischer Besiedelung und Biokompatibilitätstestung mit EC ließ sich in der HE-Färbung bereits eine zarte Zellschicht (Abbildung 31, A-C1) der Proben der Gruppen DEZ, RP<sub>i</sub> und PP<sub>i</sub> erkennen. Diese nicht-konfluente Zellschicht zeigte sich in der HE-Färbung durch Verdichtung der Zellkerne als violette Linie (Pfeile in der Abbildung 31, A-C1). Einzelne Ansammlungen von Zellkernen sind ebenfalls innerhalb der EZM zu erkennen.

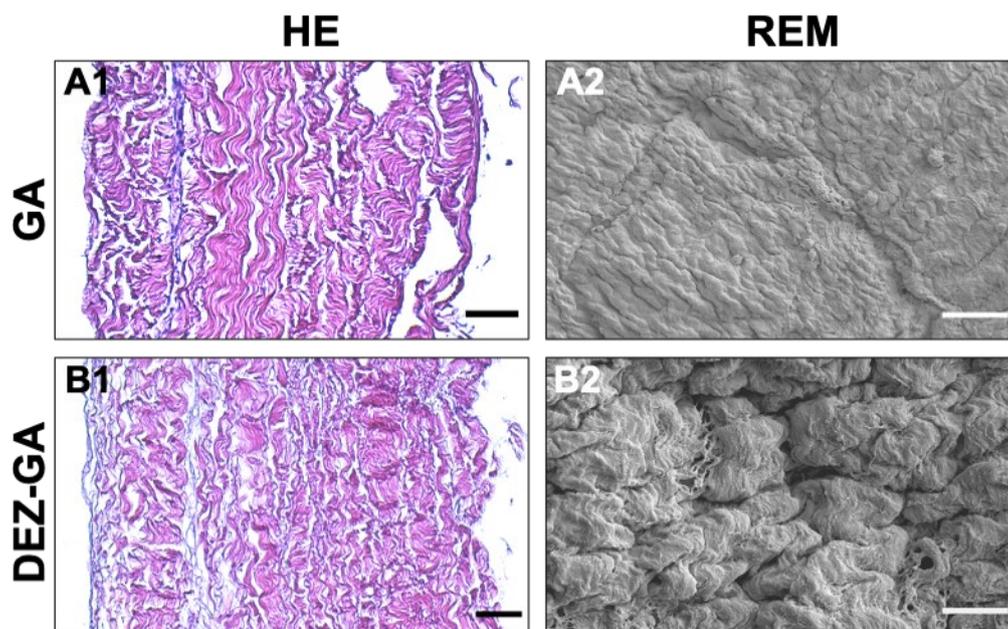
Die weitere Analyse mittels REM bestätigte die Ausbildung einer einlagigen Zellschicht. Hierbei zeigte sich eine homogene Gewebeoberfläche mit adhärennten Zellen, die sich zu einer Schicht formierten (Abbildung 31, A-C2).



**Abbildung 31: Histologische Evaluierung der Gruppen DEZ, RP<sub>i</sub> und PP<sub>i</sub> nach statischer Besiedelung mit EC**

Nach 72 Stunden Inkubation und statischer Besiedelung mit EC zeichnete sich eine beginnende Formierung einer Zellschicht in der HE-Färbung der Proben DEZ, RP<sub>i</sub> und PP<sub>i</sub> (A-C1) ab. Pfeile deuten hier auf die verdichteten Zellkerne hin. Die REM-Analyse zeigte ebenfalls den Beginn einer dichten Zellbesiedelung (A-C2). Maßstabsbalken HE = 100 µm, REM = 20 µm.

Proben der Gruppe GA und DEZ-GA ergaben nach 72 Stunden keinerlei Anzeichen von adhärennten Zellen, weder in der HE-Färbung noch in der REM-Analyse. In Abbildung 32 sind REM-Proben ohne bakterielle Kontamination gewählt worden, um die Oberflächenstruktur und die fehlende Endothelialisierung klar darzustellen. Lediglich vereinzelte geschädigte Zellen konnten in der REM-Untersuchung beobachtet werden. Wie oben bereits erwähnt zeigte sich sowohl in der Sterilitätstestung als auch in der statischen Besiedelung mit EC und der REM-Analyse eine bakterielle Kontamination einiger GA-Patche (siehe Prüfung der Sterilität).



**Abbildung 32: Histologische Evaluierung der Gruppen GA und DEZ-GA nach statischer Besiedelung mit EC**

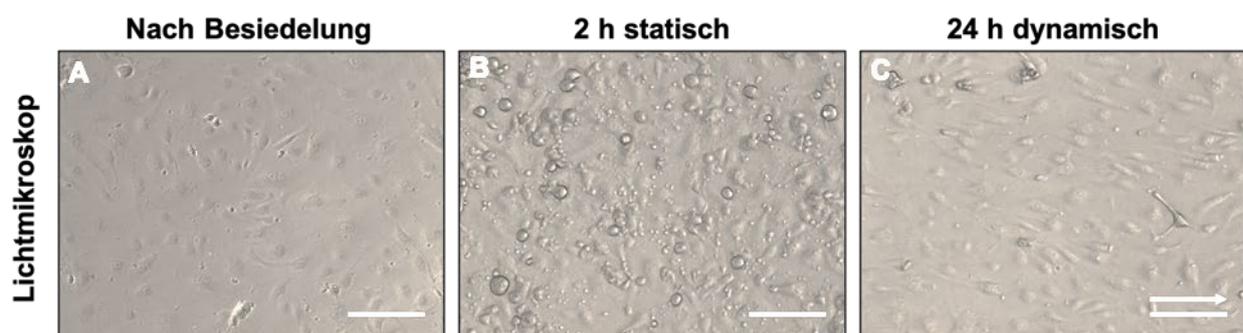
Nach 72 Stunden Inkubation und statischer Besiedelung mit EC zeigte sich keine Formation einer Zellschicht in der HE-Färbung (A1-2). Auch in der REM-Analyse der Perikardpatche der Gruppe GA und DEZ-GA ergab sich kein Anzeichen adhärennten Zellen oder Zellgruppenformatierungen (B1-2). Maßstabsbalken HE = 100  $\mu$ m, REM = 20  $\mu$ m.

### 4.3. Flusseexposition

#### 4.3.1. Dynamische Kultivierung von Endothelzellen

Um einen generellen Überblick über den Zustand der EC zu erhalten und um sicherzustellen, dass eine Adhärenz der EC am Boden der Flusskammer vorlag, wurden die  $\mu$ -Slides nach der EC-Besiedelung und vor dem Beginn des Flussversuches zunächst unter dem Lichtmikroskop betrachtet.

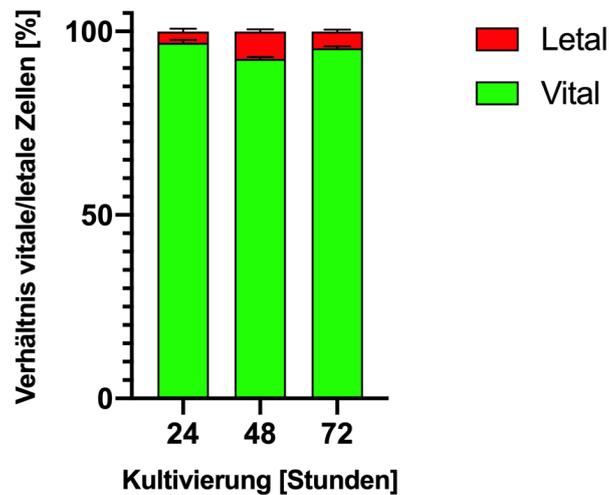
Direkt nach der Besiedelung zeigten sich bereits EC in dem Flusskanal. Ähnlich wie bei der Zellkultivierung in Zellkulturflaschen schienen diese Zellen sich auf dem Boden des Flusskanals anzusammeln (Abbildung 33, A). Um sicherzustellen, dass die EC durch die Applikation einer definierten Flussrate während des Flussexperiments nicht direkt die Adhärenz zum Boden des Flusskanals verlieren, musste vorher eine gewisse Grundadhärenz sichergestellt werden. Dazu wurden die besiedelten  $\mu$ -Slides vor jedem Flussexperiment 2 Stunden lang statisch inkubiert. Nach abgeschlossener Inkubationszeit konnte man unter dem Lichtmikroskop zum einen bereits adhären, eher flache und teilweise mit Ausläufern versehene, Zellen erkennen. Zum anderen waren Zellen vorhanden, die rundlich erschienen und sich noch in Lösung befanden (Abbildung 33, B). Nach 72 Stunden dynamischer Kultivierung mittels Flussexperiment konnte eine Ausrichtung und Elongierung der EC in Flussrichtung beobachtet werden (Abbildung 33, C). Zudem zeigten sich nur noch sehr wenige Zellen in Lösung.



**Abbildung 33: Lichtmikroskopische Evaluation der EC-Adhäsion**

EC sind in  $\mu$ -Slides kultiviert worden. Zur Beurteilung der Adhäsion wurde die Fläche des Flusskanals zu verschiedenen Zeitpunkten unter dem Lichtmikroskop betrachtet. Es konnte eine deutliche Zunahme an Zelldichte direkt nach der Aussaat bis 2 Stunden später erkannt werden. Nach 24 Stunden dynamischer Kultivierung ließ sich eine entsprechend der Flussrichtung klare Ausrichtung der EC erkennen. Pfeil zeigt Flussrichtung an. Maßstabsbalken = 300  $\mu$ m.

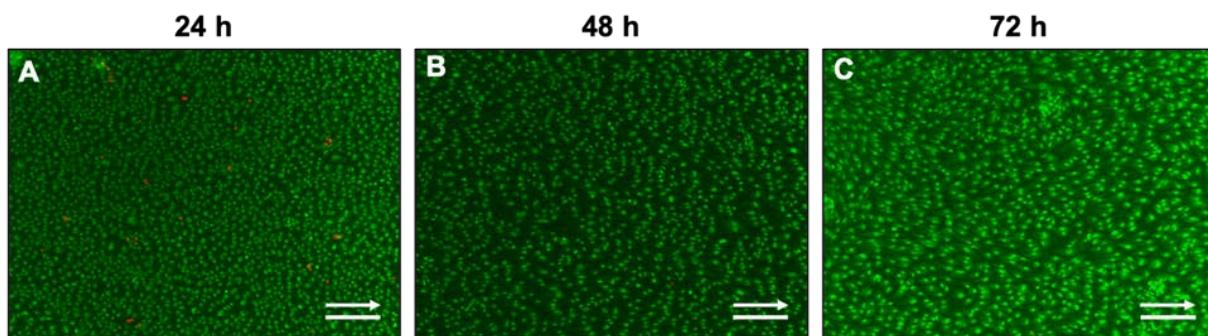
Wie bereits bei der statischen EC-Kultivierung beschrieben, fand die Evaluierung der dynamischen Kultivierung von EC mittels LD- und Immunfluoreszenz-Färbung statt.



**Abbildung 34: Quantifizierung der LD-Färbung nach dynamischer EC-Kultivierung**

Die dynamische EC-Kultivierung zeigte eine leicht erniedrigte Zellvitalität. Besonders nach 48 Stunden nahm der Anteil der vitalen Zellen im Vergleich zur statischen Kultivierung ab, nach 72 Stunden stieg der Anteil der vitalen Zellen allerdings wieder. n = 10, Daten angegeben als Mittelwert ± Standardfehler.

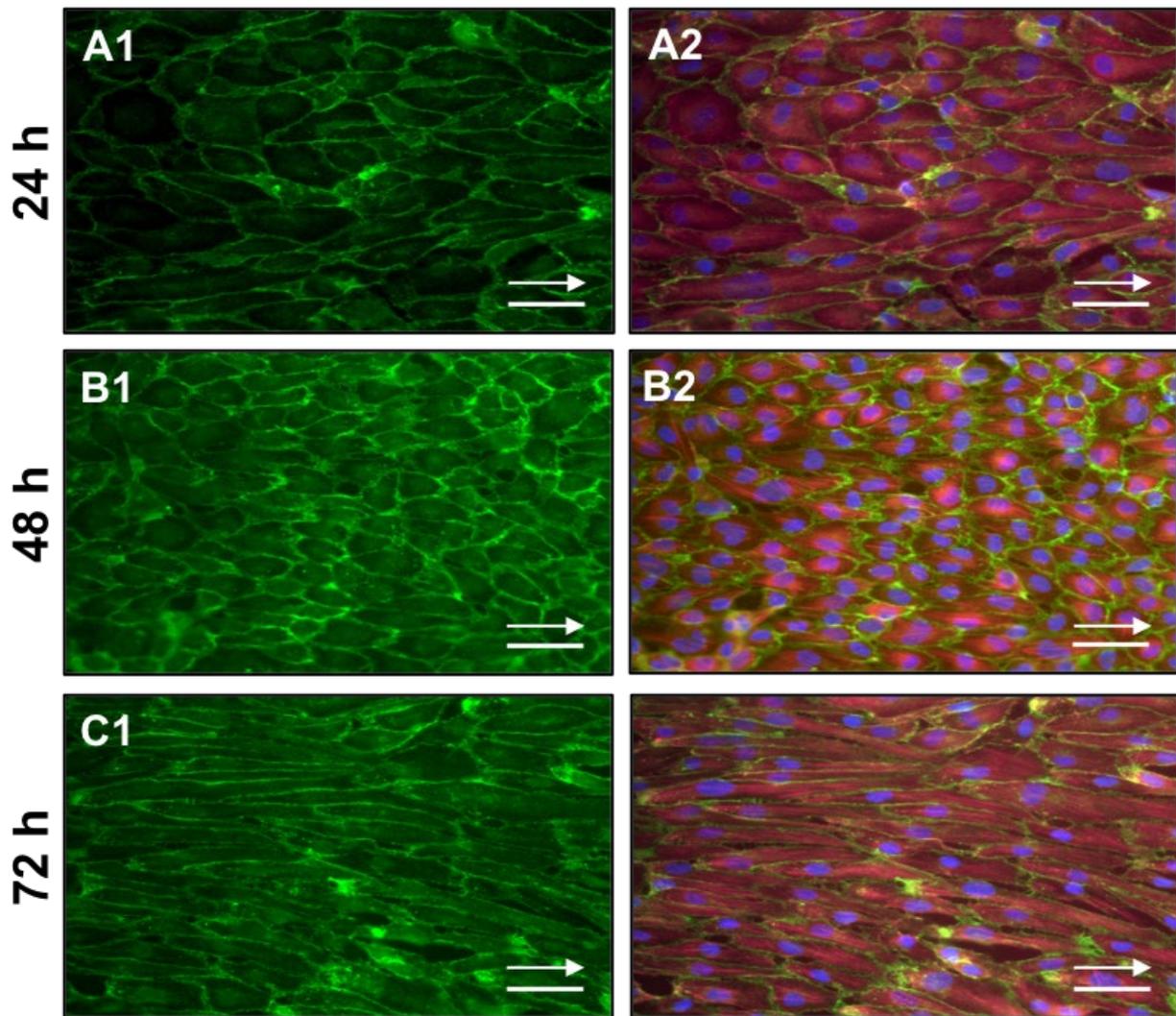
Insgesamt führte die dynamische Kultivierung der EC zu einer geringen Abnahme (Abbildung 34) der Zellvitalität nach 24 Stunden dynamischer Kultivierung (96,90 ± 0,76 % vital). Auffällig war insbesondere die Abnahme des Anteils der vitalen Zellen nach 48 Stunden dynamischer Kultivierung (92,54 ± 0,56 % vital) im Vergleich zur statischen Kultivierung. Nach 72 Stunden nahm dieser Anteil allerdings wieder zu (95,41 ± 0,52 % vital). Nach dynamischer Kultivierung von 48 Stunden ließ sich auch in der LD-Färbung ein Ausrichten der EC in Flussrichtung erkennen (Abbildung 35,B-C).



**Abbildung 35: LD-Färbung nach dynamischer Kultivierung von Endothelzellen**

Insgesamt lag nach der dynamischen EC-Kultivierung eine gute Zellvitalität vor. Nach 48 und 72 Stunden ließ sich auch in dieser Färbung eine Ausrichtung der EC in Richtung des Flusses ausmachen. Pfeile zeigen Flussrichtung an. Maßstabsbalken = 200 µm

Nach 24 Stunden dynamischer Kultivierung der Endothelzellen zeigte sich ebenfalls ein deutliches und homogenes Verteilungsmuster von VE-Cadherin und Stressfasern. Bereits nach der ersten Versuchsreihe (24 Stunden) ließ sich eine leichte Orientierung sowohl der Stressfasern als auch der Zellen selbst in Richtung des applizierten Flusses verzeichnen (Abbildung 36, A1+2). Ebenso wie bei der statischen Kultivierung konnte auch hier eine Zunahme der VE-Cadherin-Expression nach 48 Stunden im Vergleich zu 24 Stunden observiert werden (Abbildung 36, B1+2). Zusätzlich war eine Verdickung der Stressfasern erkennbar. Die dynamische Kultivierung von Endothelzellen zeigte nach 72 Stunden eine sehr deutliche Ausrichtung der Zellen und der Stressfasern in Verlaufsrichtung des Flusses (Abbildung 36, C1+2). Die Zellen lagen elongiert vor und es waren deutlich weniger Zellkerne als nach 24 und 48 Stunden Kultivierung in einem Gesichtsfeld zu erkennen.



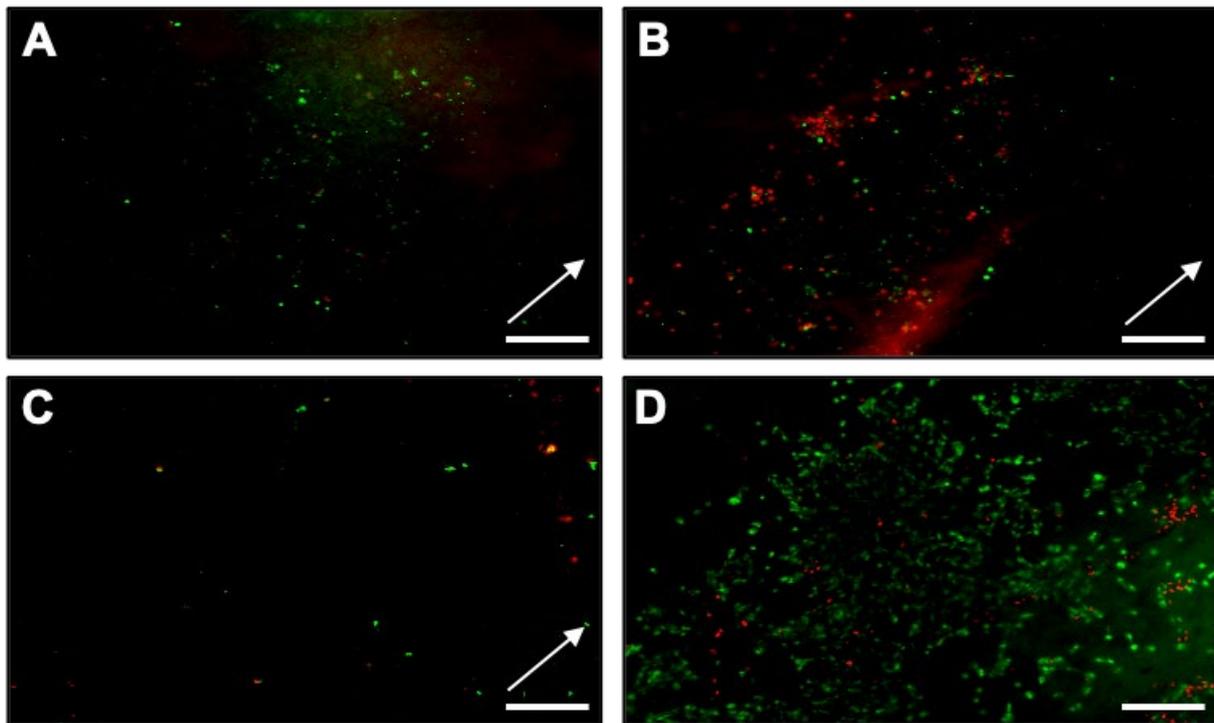
### Abbildung 36: Dynamische Kultivierung von Endothelzellen - Immunfluoreszenzfärbung

Repräsentative Fluoreszenzbilder nach 24, 48 und 72 Stunden dynamischer Kultivierung von Endothelzellen. VE-Cadherin (grün), Aktin (Stressfasern, rot), Zellkerne (DAPI, blau). Links alleinige Darstellung von VE-Cadherin (A-C1), rechts gesamte Darstellung mit VE-Cadherin, Aktin und Zellkernen (A-C2). VE-Cadherin und Aktin waren stets deutlich exprimiert. Bereits nach 24 Stunden kontinuierlicher dynamischer Kultivierung war eine Orientierung der Endothelzellen entlang der Flussrichtung zu erkennen (A2). Diese nahm mit längerer Versuchsdauer (72 Stunden) noch weiter zu (C2). Pfeile zeigen Flussrichtung an. Maßstabsbalken = 200  $\mu\text{m}$ .

#### 4.3.2. Dynamische Endothelialisierung von Gewebepatchen

Die Konzipierung der Flusskammer erfolgte als individueller Lösungsansatz, um geeignete Bedingungen zur dynamischen Kultivierung von Gewebepatchen zu schaffen und die Limitierungen der  $\mu$ -Slides zu überkommen. Hierbei wurde insbesondere auf ein geeignetes, leicht zu sterilisierendes Material sowie auf einen modularen Aufbau geachtet. Letzteres sollte die Möglichkeiten der Materialtestung durch einfaches Ein- und Ausspannen des Gewebes, ohne Beschädigung dessen, ermöglichen. Zu Beginn wurde die Flusskammer mit PU-Patchen getestet, um den Umgang mit sterilem Gewebe und der Flusskammer zu evaluieren. Im Anschluss daran sind Versuche mit sterilisierten dezellularisierten Perikardpatchen und GA-fixiertem Patch durchgeführt worden.

Nach 24 Stunden dynamischer Kultivierung zeigten sich in dem Bereich des Flusskanals spärliche Zellansammlungen in der LD-Färbung von vitalen und wenigen letalen Zellen (Abbildung 37, A). Eine homogene Besiedelung des Patches mit Endothelzellen konnte nach 24 Stunden nicht festgestellt werden. Durch eine weitere Probenentnahme am Übergang vom Flusskanal zum übrigen Gewebe konnte allerdings ein klarer Unterschied zwischen besiedeltem und nicht-besiedeltem Patch beobachtet werden (Abbildung 37, B). Hier konnte keine durchgängige Endothelzellschicht festgestellt werden und es lagen weitaus mehr letale als vitale Zellen vor. Eine weitere Probe aus dem äußeren Bereich des verwendeten DEZ-Patches, das nicht mit dem Flusskanal in Kontakt kam, diente als Kontrolle. Hier wurden vereinzelt vitale und letale Zellen festgestellt, jedoch keine Ansammlung derer (Abbildung 37, C). Zur generellen Kontrolle der Endothelzellviabilität und der Gewebeverträglichkeit ist noch eine weitere separate Probe des Perikardpatches statisch in einer Wellplatte mit Endothelzellen besiedelt worden (Abbildung 37, D). Hierbei zeigte sich nach 24 Stunden statischer Kultivierung eine beginnende Formation einer Endothelzellschicht. Außerdem konnten einige Ansammlungen letaler Zellen beobachtet werden.

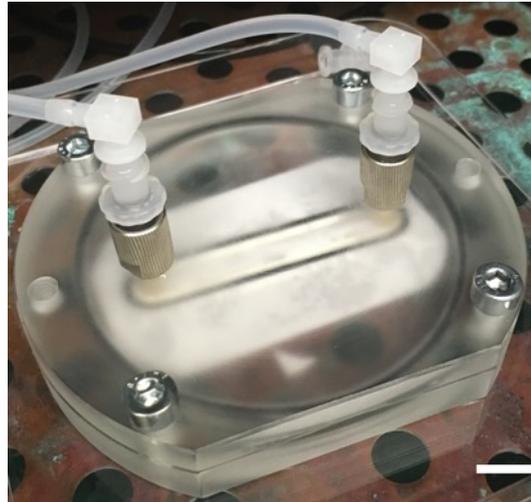


**Abbildung 37: LD-Färbung eines DEZ-Patches nach dynamischer Besiedelung**

Nach 24 Stunden dynamischer Besiedelung. **(A)** Probe aus der Mitte des Flusskanals. Hier konnte keine homogene Besiedelung oder die parallele Ausrichtung der Endothelzellen beobachtet werden. Eine Mischung aus vitalen (grün) und letalen (rot) Zellen war zu erkennen. **(B)** Probenentnahme erfolgte hier am Rand vom Flusskanal. Hier fielen insbesondere letale Zellen und nur einzelne vitale Zellen auf. Eine Elongierung oder Orientierung der Zellen entlang der Flussrichtung ließ sich nach 24 Stunden nicht feststellen. **(C)** Kontrollprobe am äußersten Rand des Patches, abseits des Flusskanals. Hier zeigten sich einzelne letale und vitale Zellen. **(D)** Kontrollprobe, bei der ein Teil des verwendeten DEZ-Patches in einer separaten Wellplatte statisch für 24 Stunden mit Endothelzellen kultiviert wurde. Hier konnte ein gleichmäßiges Zellwachstum festgestellt werden mit einem deutlich überlegenden Anteil an vitalen Zellen, aber auch einzelne Zellverbände letaler Zellen. Pfeile zeigen Flussrichtung an. Maßstabsbalken = 200  $\mu\text{m}$ .

Bei den aufgeführten Ergebnissen ist zu beachten, dass von insgesamt 5 Versuchen der dynamischen Besiedelung von Patches über 24 Stunden, drei vorzeitig abgebrochen werden mussten und die Ergebnisse der anderen zwei hier aufgeführt wurden. Grund für die vorzeitigen Abbrüche der Versuche war das Volllaufen der gesamten Flusskammer, wodurch kein definierter Flusskanal mehr vorhanden war. Somit konnte nicht garantiert werden, dass die tatsächlich auftretenden Flussraten und Scherspannungen den vordefinierten und geplanten entsprachen. Dadurch war weder eine Konditionierung der EC möglich noch ein Flusskanal abzugrenzen.

Problematisch war insbesondere bei den Versuchen mit den DEZ-Proben, dass die Gewebe in die Adapter, die in den Flusskanal mündeten (Abbildung 38), gesogen worden sind. Da die dezellularisierten Proben deutlich elastischer waren als die GA-Patche, trat diese Komplikation ausschließlich bei Proben der Gruppe DEZ auf. Hierbei kam es zu einer deutlichen Quetschung und Schädigung des Materials.



**Abbildung 38: Versuchsaufbau mit Flusskammer und eingespanntem Patch**

Darstellung des Versuchsaufbaus im Inkubator mit der neu entwickelten Flusskammer und einem PU-Patch. Maßstabsbalken = 10 mm.

## 5. Diskussion

Die Nutzung von Perikard als Biomaterial in der Herz- und Gefäßchirurgie ist heutzutage als Standard anzusehen [8, 126, 127]. So steht Perikard nicht nur als Patch für chirurgische Interventionen zur Verfügung, sondern bietet auch das Grundmaterial kommerzieller biologischer Herzklappen [128, 129]. Die breiteste Anwendung findet hierbei Rinderperikard [130]. Um für den medizinischen Einsatz zugelassen zu werden, müssen biologische Materialien eine Vielzahl an Standards erfüllen [131]. Dabei spielen u.a. Aufbereitungsprozesse der Biomaterialien eine entscheidende Rolle.

In der vorliegenden Dissertation sind verschiedene bereits etablierte und neue Methoden der Gewebeprozessierung von Rinderperikard angewandt und evaluiert worden. Des Weiteren wurden Endothelzellen als Zellquelle für einen Ansatz des *Tissue Engineering* analysiert und unter optimierten sowohl statischen als auch dynamischen Bedingungen konditioniert, um die Biokompatibilität der Materialien zu evaluieren.

Die Anwendung von GA-fixiertem Perikard ist in der Medizin weit verbreitet [132, 133]. Mehrere Studien zeigten jedoch bereits eine zelltoxische Wirkung des GA und eine daraus resultierende fehlende Zelladhäsion [134]. So konnten McDade et al. zeigen, dass GA-Patche nach Besiedelungsversuchen deutlich weniger adhärente und zudem morphologisch veränderte Zellen aufwiesen, die zusätzlich im höheren Ausmaß proinflammatorische Zytokine sezernierten [135]. Diese Ergebnisse untermauernd, wiesen die GA-Patche (Proben der Gruppe GA und DEZ-GA) dieser Studie ebenfalls keinerlei Anzeichen von Zelladhäsion auf. Wie ebenfalls in anderen Forschungsarbeiten gezeigt werden konnte [136], wiesen die GA-Proben dieser Versuchsreihe Veränderungen der Extrazellulärmatrix im Sinne einer „Auflockerung“ in den histologischen Färbungen und einer Vergrößerung der Gewebeoberfläche im REM auf.

Die Gewebeprozessierung mit GA führt zur Stabilisierung der Kollagenstruktur und beugt proteolytischer Degradation vor [137]. Ähnlich wie bereits in anderen Arbeiten aufgezeigt, führte die GA-Behandlung des Gewebes zu einer signifikanten Zunahme der mechanischen Belastbarkeit in den Ergebnissen der biomechanischen Testungen [138, 139]. Die Quervernetzung der Kollagenstrukturen und die damit einhergehende Stabilisierung des Gewebes durch GA ermöglicht eine bessere Handhabung des Materials und das präzise Design von Herzklappensegeln in der Entwicklung von biologischen

Herzklappen. Zudem wird die Stabilisierung des Gewebes mit einer längeren Haltbarkeit assoziiert [140]. So wiesen die GA-Patche in den Versuchen der dynamischen Besiedelung mit der entwickelten Flusskammer für Gewebe durch ihre stabilere Gewebestruktur deutlich bessere Versuchsbedingungen auf als die zum Vergleich verwendeten eher elastischen dezellularisierten Patche. Im Hinblick auf die Haltbarkeit liegt der Fokus insbesondere auf dem wiederholten Öffnen und Schließen der Segelklappen unter stetigem Druck im arteriellen System. Sugimoto et al. postulierten, dass Biomaterialien einer chemischen Modifikation unterzogen werden mussten, um Gewebeschäden und damit einhergehendem Versagen der Herzklappe vorzubeugen [141]. Insbesondere in einem exakt regulierten System, wie dem kardiovaskulären Kreislauf, sind Hämokompatibilität und mechanische Gegebenheiten des Gewebes von essentieller Bedeutung. Diesbezüglich zeigten GA-behandelte Patche in den Ergebnissen der Biokompatibilitätstestung allerdings eine fehlende Adhäsion von Endothelzellen sowie die Beschädigung der Gewebeoberfläche. Die genannten Faktoren können zu gerinnungsaktivierenden Vorgängen führen und somit die Hämokompatibilität des Patches maßgeblich beeinträchtigen [142]. Nachteile der Fixierung mit GA sind, neben der zelltoxischen Wirkung, die Kalzifizierung des behandelten Gewebes [143]. Initiale Kalziumablagerungen nehmen im Verlauf an Größe zu und können zu Knötchen an den Kanten der Segelklappen verschmelzen, die letztlich zur strukturellen Schädigung und Fehlfunktion (Insuffizienz oder Stenose) der Bioprothese führen und mit der Notwendigkeit einer Re-Operation einhergehen [61, 63].

Zudem ist bekannt, dass die Zellkerne und Zellbestandteile bei einer Fixierung mit GA weiterhin im Gewebe verbleiben, was sich auch in unseren Experimenten bestätigte [58]. Zellkerne konnten in Proben der GA-Gruppe sowohl in der HE-Färbung sowie in der DAPI-Kernfärbung klar identifiziert werden. Quantitativ bestätigte sich diese Beobachtung durch die Analyse des DNA-Gehaltes, die lediglich eine minimale Abnahme des DNA-Gehaltes in GA-Proben im Vergleich zu nativen Rinderperikardproben zeigte.

Die Herstellerangaben GA-fixierter Biomaterialien suggerieren, dass die Produkte nach der GA-Behandlung steril seien [144, 145]. Konträr dazu wiesen 3 von 5 Rinderperikarden, die mit GA behandelt wurden, in den Versuchen der Sterilitätstestung keine Sterilität auf. Zusätzlich zu diesen 5 Rinderperikarden, die bei der Sterilitätstestung verwendet wurden, erwiesen sich weitere mit GA behandelte Rinderperikarde in der Analyse der Zellkultur und auch der REM-Untersuchung als unsteril.

In dieser Studie wurde eine GA-Konzentration von 0,1 % verwendet, da in vorherigen Experimenten bereits mit dieser geringen Konzentration Sterilität der Proben erreicht werden konnte (siehe Anhang). In der Literatur ist die Verwendung einer niedrigeren Konzentration ebenfalls beschrieben, um strukturelle Schädigungen möglichst minimal zu halten [59]. Konzentrationen, die bei kommerziellen Produkten verwendet werden, unterliegen Firmengeheimnissen. In der Literatur finden sich meist Angaben von älteren Protokollen, die mit 0,6 % durchgeführt wurden [61, 62]. Studien, die sich mit Sterilisierungsprotokollen von medizinischen Geräten beschäftigen, zeigten, dass auch GA-Konzentrationen von 2 % nicht ausreichend sterilisierend wirken und berichteten von GA-resistenten Mycobakterien [146, 147]. Diese Ergebnisse sind von hoher klinischer Relevanz, da sich eine ineffektive Desinfektion durch den Gebrauch von GA bereits in nosokomialen Infektionen äußerte und somit fatale Auswirkungen haben könnte, sofern Perikard für den medizinischen Gebrauch mit GA-resistenten Mycobakterien infiziert sein sollte [148, 149].

Im Hinblick auf Limitierungen der Behandlung von biologischem Gewebe mit GA stellt die Methode der Dezellularisierung einen vielversprechenden Ansatz zur Herstellung eines biokompatiblen dreidimensionalen Trägermaterials dar.

Anders als nach der Prozessierung des Gewebes mit GA, zeigten sich keine wesentlichen Veränderungen der Kollagenstrukturen und die EZM blieb nach durchgeführter Dezellularisierung intakt. Durch die histologischen Färbemethoden und DAPI-Kernfärbung konnten keine Zellkerne oder Zellfragmente in den dezellulierten Proben (DEZ und DEZ-GA) festgestellt werden. Nach der Durchführung der Dezellularisierung wiesen die Perikardproben eine leicht reduzierte Maximalkraft in der biomechanischen Testung auf. Diese Ergebnisse sind übereinstimmend mit bereits veröffentlichten Studien [150]. In der Arbeit von Keane et al. führten die Autoren die Bedeutung eines zellfreien dreidimensionalen Gewebekonstrukts auf und damit eine entscheidende Überlegenheit dezellularisierter Biomaterialien gegenüber GA-fixierter Gewebe im Hinblick auf Kalzifizierung und struktureller Veränderungen [72]. Damit einhergehend zeigte sich auch in der quantitativen DNA-Analyse eine signifikante Reduzierung des DNA-Gehaltes in dezellulierten Gewebepatchen, wenn auch keine vollständige DNA-Elimination vorlag. Wie bereits erwähnt, spielt die Oberflächenbeschaffenheit von Biomaterialien eine entscheidende Rolle im Hinblick auf die Hämostabilität. Proben der Gruppe DEZ wiesen in der REM-Untersuchung eine

intakte Oberflächenstruktur auf, wohingegen die Proben der Gruppe DEZ-GA, die nach der Dezellularisierung mit GA fixiert worden sind, eine aufgelockerte Struktur der Kollagenbündel aufzeigten.

Mittels REM-Analyse konnte auch die Oberflächentopographie der industriell dezellulierten und sterilisierten Perikardpathe evaluiert werden. Während Proben der Gruppe PP<sub>i</sub> einen guten Erhalt der Oberflächenstruktur aufwiesen, zeigten sich Perforationen verteilt über die gesamte Oberfläche der Proben der Gruppe RP<sub>i</sub>. Nach erfolgter histologischer Auswertung zeigten sich keine grundlegenden Unterschiede im Aufbau der Kollagenstruktur oder Anordnung der EZM zwischen den industriell dezellulierten Rinder- und Pferdeperikardpaten. Die durchgeführten Tests zur Bestimmung der biomechanischen Eigenschaften offenbarten eine geringere mechanische Belastbarkeit der Pferdeperikardproben im Vergleich zu den anderen Proben. Die Zugkraft der RP<sub>i</sub>-Pathe war vergleichbar mit der Zugkraft der Gruppe DEZ und DEZ-GA. Generell sind die Ergebnisse der biomechanischen Untersuchungen im Einklang mit bereits durchgeführten Studien [138]. Lediglich für die Untersuchung der Zugkraft von Pferdeperikardpaten gibt es bis dato keine Vergleichswerte in der Literatur. Eine Studie von Rassoli et al. untersuchte zwar mechanische Eigenschaften von Pferdeperikard, dieses wurde zuvor allerdings GA-fixiert [151]. Die Ergebnisse der DAPI-Kernfärbung suggerierten einen hohen Anteil an im Gewebe verbliebener DNA der RP<sub>i</sub>-Proben und zeigten verschmierte DNA-Reste in den Färbungen der PP<sub>i</sub>-Gruppe. Die Pathe der RP<sub>i</sub>-Gruppe präsentierten in der quantitativen DNA-Analyse ähnlich hohe Werte wie die hier verwendeten nativen Rinderperikardproben. Eine definitive Aussage kann ohne entsprechende Nativproben der industriell dezellulierten Pathe allerdings nicht getroffen werden. Die Pferdeperikardproben (PP<sub>i</sub>) wiesen einen sehr niedrigen DNA-Gehalt auf und stellten somit die einzige Gruppe dar, die mit den postulierten Kriterien von Crapo et al. per definitionem als dezelluliert gelten [76]. Gemäß diesen Kriterien sollte u.a. der DNA-Gehalt im dezellulierten Gewebe < 50 ng/mg Gewebe liegen und es sollten keine klar erkennbaren Zellkerne in den HE-Färbungen oder DAPI-Kernfärbungen vorliegen.

In vorherigen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass im Gewebe verbliebene DNA, aber auch Mitochondrien und Zellmembranreste, proinflammatorische Kaskaden im Empfängergewebe auslösen. Durch eine effektive Dezellularisierung des Gewebes und einer damit einhergehenden Reduzierung der residuellen DNA konnten diese

immunologischen Reaktionen reduziert werden. [152] Viele kommerziell erhältlichen Biomaterialien enthalten nachweislich unterschiedliche Mengen an DNA-Resten. Die meisten dieser residuellen DNA-Fragmente sind beschrieben als kleiner als 300 Basenpaare, sodass deren Vorhandensein im Gewebe höchstwahrscheinlich eine untergeordnete Rolle spielt und keinen Umbau des Gewebes auslösen oder gar Übertragung von Krankheiten hervorrufen würde [153]. Da, wie oben beschrieben, auch Mitochondrien oder andere Zellfragmente proinflammatorische Reaktionen hervorrufen können, ist die Bestimmung der DNA wohlmöglich nicht der sensitivste Marker [76]. Ebenso werden durch die DAPI-Färbung möglicherweise kleine DNA-Fragmente angefärbt, die ebenfalls keine ausreichend hohe Antigenität vorweisen, um zu einer Abstoßungs- oder Umbaureaktion des Gewebes zu führen, sodass aktuelle Vorgaben postulieren, dass DAPI nicht zur Evaluation dezellularisierter Biomaterialien geeignet ist [154]. Zahlreiche Arbeiten nutzen die DAPI- und HE-Färbung zur Evaluierung der Effektivität eines Dezellularisierungsprotokolls im Hinblick auf die Entfernung von Zellen aus dem Gewebe [76, 155, 156]. So wurde auch in dieser Arbeit neben der DNA-Quantifizierung und HE-Färbung die DAPI-Färbung als Evaluation genutzt, nicht zuletzt, um einen Vergleich mit den Werten der vorhandenen Literatur zu ermöglichen. Nichtsdestotrotz fehlt bis zum aktuellen Zeitpunkt eine klar regulierte Vorgabe oder ein Threshold zur Evaluation der Antigenität von residuellen Zellfragmenten des Spendergewebes, da immunologische Antworten auch bei kleinsten verbliebenen Fragmenten nicht ganz ausgeschlossen sind. [157, 158]

In der Literatur besteht eine große Spanne der Werte des DNA-Gehaltes nativer Perikardproben [156, 159, 160]. Generell weisen biologische Materialien eine individuelle Beschaffenheit des Materials auf, die insbesondere durch das Alter des Tieres beeinflusst werden kann [161, 162]. Studien suggerierten bereits, dass eine Normung der Materialdicke sowie eine standardisierte Kategorisierung der Perikardentnahmestelle maßgeblich zu einer homogenen Gewebeauswahl beitragen würden und somit inter-individuelle Auswirkungen applizierter Prozessierungsprotokolle vermindert werden könnten [163, 164]. In Anlehnung dessen, zeigten sich in dieser Arbeit bereits während der Präparation der Perikarde unterschiedliche Gegebenheiten und Materialdicken. Besonders auffällig waren hier die Ergebnisse der Materialdickenmessungen der RP<sub>i</sub>-Patche. Entsprechende Unterschiede sind demnach bei der Effizienz eines Prozessierungsprotokolls, z.B. der Dezellularisierung, zu erwarten.

Generell zeigte sich die Notwendigkeit einer qualitätskontrollierten Vorauswahl der Perikarde für die Herstellung von Biomaterialien für medizinische Zwecke. Ein standardisiertes Protokoll zur biologischen Materialauswahl sollte demnach bereits vor der Applikation von Prozessierungsmethoden zur Anwendung kommen.

Obwohl Pferdeperikard zunehmend chirurgisch und sogar zur Herstellung von biologischen Herzklappen genutzt wird [165-168], gibt es wenige Studien zur Charakterisierung der Gewebeeigenschaften. In dieser Arbeit konnten erstmalig vergleichende Schlüsse zu GA-fixiertem und dezellularisiertem sowie industriell dezellularisiertem Rinderperikard gezogen werden. Die in dieser Arbeit durchgeführte Evaluierung stellte die erste vergleichende und umfangreiche Analyse von Pferdeperikard für kardiovaskuläre Anwendungen dar.

Um Zulassungen von Biomaterialien für die klinische Anwendungen zu genehmigen, sind Sterilitätsnachweise unabdingbar. In der Literatur sind bereits viele verschiedene Ansätze zur Sterilisation von Perikard beschrieben worden [72, 85, 86, 169]. Hierbei liegt ein besonderer Fokus auf dem Gleichgewicht zwischen effizienten Sterilisationsmethoden und gleichzeitigem Erhalt der biologischen Gewebestruktur [170]. Während viele Protokolle zur Sterilisation von Perikarden die Nutzung antibiotischer/antimykotischer Lösungen beinhalten [83], entschieden wir uns im Hinblick auf global weiterhin steigende Antibiotikaresistenzen gezielt gegen den Einsatz antibiotischer Lösungen [171]. Das in dieser Arbeit angewandte Sterilisationsprotokoll, bestehend aus 0,5 %igem Octenidin und 0,1 %iger Peressigsäure, resultierte in nachweislich sterilen Rinderperikardpatches. Die Proben zeigten sich sowohl in der Sterilitätstestung nach 14 Tagen steril als auch in der Besiedelung der Patches mit humanen EC in der Zellkultur. Eine effiziente Sterilisation durch die Nutzung von Peressigsäure wurde bereits für synthetische und biologische Materialien in verschiedenen Studien beschrieben, ebenso die antiseptischen Eigenschaften von Octenidin [172-174]. Bisher wurde aber noch kein Kombinationsprotokoll der beiden Lösungen angewandt. Die in einigen Studien geäußerten Bedenken bezüglich der zytotoxischen Wirkung von Peressigsäure konnten in unseren Experimenten nicht bestätigt werden [85]. Im Gegenteil dazu zeigten die hier durchgeführten Biokompatibilitätstestungen nach 72 Stunden statischer Zellbesiedelung sowohl in der HE-Färbung die Formation einer Zellschicht der DEZ-Proben sowie die Zelladhäsion in der REM-Analyse. Das Vorliegen adhärenter Zellen nach Behandlung mit Peressigsäure

wurde ebenfalls von anderen Gruppen beschrieben [83, 175]. Auch die Proben der industriell dezellularisierten Perikardpatche (RP<sub>i</sub> und PP<sub>i</sub>) zeigten nach 72 Stunden statischer Besiedelung mit humanen EC die beginnende Formation einer Zellschicht mit adhärennten Zellen in der HE-Färbung und der REM-Analyse und erwiesen sich somit als biokompatible Perikardpatche.

Untersuchungen zur Biokompatibilität von Biomaterialien werden häufig mit Stammzellen durchgeführt [176]. In dieser Arbeit kamen humane venöse EC aus der Vena saphena magna zur Anwendung. Bereits in vorherigen Studien konnte gezeigt werden, dass die Zellgewinnung aus Venensegmenten nach Bypass-Operationen eine gut verfügbare und optimale Zellquelle für kardiovaskuläres *Tissue Engineering* darstellt [177]. Die physiologischen Gegebenheiten im menschlichen Kreislaufsystem stellen anspruchsvolle Anforderungen an implantierbare Biomaterialien. Für *in-vitro* Untersuchungen dieser speziellen Gegebenheiten stellen EC mit ihren vielfältigen essentiellen Eigenschaften im Gefäßsystem, z.B. im Hinblick auf inflammatorische und immunologische Prozesse sowie die Schaffung einer antithrombotischen Gefäßauskleidung, die optimale Wahl dar [178]. Durch die in dieser Arbeit durchgeführte Analyse der EC-Besiedelung, konnte sowohl die *in-vitro* Biokompatibilität der prozessierten Gewebe als auch das Potential der Endothelialisierung für zukünftige *in-vivo* Experimente evaluiert werden.

EC sind im Organismus der Schubspannung an den Gefäßwänden, die durch das vorbeiströmende Blut entsteht, ausgesetzt. Je nach Gefäßkaliber variieren die Werte der vorliegenden Schubspannungen zwischen ungefähr 1 bis 70 dyn/cm<sup>2</sup> [179, 180]. Diese mechanische Reizung spielt eine übergeordnete Rolle für die EC-Funktionen. So werden beispielsweise durch pulsatilen Fluss oder Änderungen des Blutdrucks Signalwege der Genexpression oder Membrankanäle aktiviert, die letztlich zu einem Umbau und einer Anpassung der EC an die Gegebenheiten der Umgebung führen [181]. Um diese Bedingungen für *in-vitro* Experimente zu simulieren, wurde in dieser Dissertation ein Flusskammermodell zur dynamischen Kultivierung und Konditionierung von EC etabliert. In Studien konnte gezeigt werden, dass die Flusskonditionierung von EC die Bildung der EZM stimulierte und die EC-Proliferation förderte [182]. In dieser Arbeit erfolgte die Konditionierung von EC unter dynamischen Bedingungen für 24, 48 und 72 Stunden; eine statische Kultivierung mit entsprechenden Kultivierungszeiten galt als Kontrollgruppe. Orientierend an den Ergebnissen anderer Studien, wurde die

Schubspannung während der dynamischen Konditionierung sukzessiv von 2 dyn/cm<sup>2</sup> auf bis zu 15 dyn/cm<sup>2</sup> gesteigert [183-186]. Hiermit konnte ein frühzeitiges Ablösen der Zellen vermieden werden und eine langsame Konditionierung der Zellen mit Adaption an Flussbedingungen erreicht werden. In gesunden, nicht-verzweigten Blutgefäßen liegt meist ein unidirektionaler Fluss mit einer mittleren Schubspannung von etwa 150 µN/cm<sup>2</sup> vor, was umgerechnet den in diesem Experiment applizierten 15 dyn/cm<sup>2</sup> entspricht [187].

Die Ergebnisse der statischen EC-Konditionierung wiesen bereits nach 24 Stunden eine subkonfluente Zellschicht mit allseits vorhandenen Adhärens-Kontakten im Sinne von VE-Cadherin-Expression in der Immunfluoreszenzfärbung und einem intakten Zellskelett (Aktiomyosinfasern) auf. Wie bereits durch die Arbeit von Abu Taha et al. beschrieben, zeigte sich auch hier eine teils unterbrochene Expression von VE-Cadherin bei subkonfluenter EC-Schicht nach 24 Stunden [93]. Nach 72 Stunden der statischen Kultivierung zeigten sich die EC weiterhin als homogene, weiter verdichtete und nun konfluente Zellschicht. Hierbei konnte eine gleichmäßige und kontinuierliche Verteilung der Expression von VE-Cadherin in der Immunfluoreszenzfärbung beobachtet werden. Die Stressfasern lagen locker und ungerichtet orientiert ubiquitär vor. Die Durchführung dieser Versuche galt einerseits als Kontrollgruppe für die Evaluierung der Biokompatibilität der statisch besiedelten prozessierten Gewebe und andererseits als Nachweis der wirksamen EC-Gewinnung. Es konnte gezeigt werden, dass voll funktionsfähige EC durch die hier verwendeten Methoden gewonnen und kultiviert werden konnten.

Im Vergleich dazu wiesen die Analysen der dynamischen Flusskonditionierung bereits nach 24 Stunden eine leichte Ausrichtung der Zellen in Flussrichtung auf, was sich mit Ergebnissen anderer Studien deckt [92, 188]. Trotz einer deutlichen Abnahme der vitalen Zellen in der LD-Färbung nach 48 Stunden, zeigte sich eine gut erkennbare Ausrichtung der adhärennten Zellen in Flussrichtung. Nach 72 Stunden lagen deutlich elongierte EC sowie eine Progredienz und merkliche Ausrichtung der Stressfasern in Flussrichtung vor. Zusätzlich zeigte sich auch in der Immunfluoreszenzfärbung eine stetige Expression von sowohl VE-Cadherin als auch Aktin. Hier konnte bereits nach 24 Stunden dynamischer Konditionierung ein kontinuierliches ununterbrochenes Muster der VE-Cadherin-Expression observiert werden. Diese Ergebnisse sind in Einklang mit veröffentlichten Studien [93, 186]. In der LD-Färbung zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen

statischer und dynamischer Konditionierung; die EC passten sich den dynamischen Bedingungen an. Die Ergebnisse der dynamischen Konditionierungsversuche erlauben einen weiteren Rückschluss auf den funktionellen Zustand der EC. Die Methode der EC-Isolation aus Venensegmenten lieferte schlussfolgernd funktions- und anpassungsfähige EC. Einhergehend mit bereits veröffentlichten Arbeiten erwies sich die EC-Besiedelung als effiziente und aussagekräftige Methode, um die Biokompatibilität der Gewebe zu evaluieren [189, 190].

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Flusskammer zur dynamischen Besiedelung verschiedener Gewebe zeigte trotz Komplikationen bei der Durchführung der Experimente bereits das Potential der EC-Besiedelung von Biomaterialien. Zur Optimierung sind weitere Fixierungsmöglichkeiten im Aufbau der Flusskammer denkbar die garantieren, dass das Perikard dem Flusskanal flach anliegt und sich nicht vom Boden löst oder in die Adapter gesogen wird. Denkbar wäre hier auch eine Fixierung des Perikards mittels chirurgischem Nahtmaterial. In zukünftigen Arbeiten gilt es, das Flusskammer-Konzept weiterzuentwickeln und Methoden zur reproduzierbaren dynamischen Besiedelung von Geweben zu etablieren, für die in der vorliegenden Dissertation bereits der Grundstein gelegt werden konnte.

## 6. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation erfolgte die Evaluierung bereits etablierter und neu entwickelter Prozessierungsmethoden für Biomaterialien für die kardiovaskuläre Anwendung.

Hierbei wurden die Fixierung des Gewebes mit Glutaraldehyd, die Dezellularisierung und ein neues Sterilisationsprotokoll nach erfolgter Dezellularisierung evaluiert. Als Kontrollgruppe galten industriell dezellularisierte und sterilisierte Rinder- und Pferdeperikardpatche, wobei die Pferdeperikardpatche bereits zur klinischen Anwendung zugelassen sind. Die Auswirkungen der verschiedenen Aufbereitungsprotokolle auf die Gewebestruktur und Zellbestandteile wurde mittels histologischer Färbemethoden sowie REM-Analysen und biomechanischen Testungen untersucht. Zudem ist die Effektivität der Dezellularisierung sowie die Sterilität der prozessierten Materialien evaluiert worden. Um Aussagen über mögliche zytotoxische Effekte der Behandlungsprotokolle treffen zu können, wurden des Weiteren Biokompatibilitätstestungen mit humanen EC durchgeführt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten Vorteile dezellularisierter Perikardpatche im Vergleich zu GA-fixierten Patches aufgrund von überlegener Biokompatibilität und wesentlicher Reduzierung von Zellbestandteilen im Patchgewebe, was letztlich zu einer längeren Haltbarkeit der Implantate führt. Zudem lassen die Ergebnisse einen direkten Vergleich zu industriell dezellularisierten und klinisch bereits angewandten Perikardpatches zu. Unter Letzteren erwiesen sich Patches aus Pferdeperikard als zu bevorzugendes Biomaterial zur Herstellung kardiovaskulärer Medizinprodukte. Während der Arbeit mit biologischem Material ist mit einer gewissen Diversität der einzelnen Proben zu rechnen. Dies sollte bei der seriellen Herstellung und industrieller Aufbereitung von xenogenen Materialien für die medizinische Anwendung Berücksichtigung finden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen die Notwendigkeit der Etablierung eines standardisierten multi-modalen Protokolls zur primären Auswahl biologischer Materialien auf.

Die Auswirkungen der verschiedenen Gewebeprozessierungsprotokolle können insbesondere im Hinblick auf ihre inflammatorischen und zytotoxischen Wirkungen weitergehend untersucht werden. Denkbar wären hier neben weiteren *in-vitro*

Evaluationen zur Zellviabilität mittels z.B. WST-1-Test auch *in-vivo* Versuche im Mausmodell mit subkutaner Implantation der zu untersuchenden Perikardgruppen. Hierdurch könnte nach einer Inkubationszeit die Veränderungen des Gewebes im Sinne von Entzündungsreaktionen oder Zellmigration untersucht werden, um weitere quantifizierte Aussagen zur medizinischen Applikation treffen zu können. Zusätzlich sind Untersuchungen zum Ausmaß der Kalzifizierung nach erfolgter Prozessierung der Gewebe denkbar. Die hier aufgeführten Ergebnisse zeigen vielversprechende Einsatzmöglichkeiten für dezellularisierte und sterilisierte Perikardpathe im kardiovaskulären Anwendungsbereich und werden Gegenstand weiterführender Forschungsvorhaben sein.

### III. Literaturverzeichnis

1. WHO. *Cardiovascular diseases (CVDs)*. Zitiert am: 05.05.2019, 16:20 Uhr; URL: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)).
2. Deutsche Gesellschaft für Kardiologie-Herz- und Kreislaufforschung e.V., *Presstext DGK 02/2019*. 2019.
3. Sobotta, J., F. Paulsen, and J. Waschke, *Atlas der Anatomie des Menschen*. 2010: Elsevier, Urban & Fischer.
4. Müller, M., *Chirurgie für Studium und Praxis*. 2016/2017, Medizinische Verlags- und Informationsdienste: Breisach a. Rh. p. 120-128.
5. Lindinger, A., G. Schwedler, and H.W. Hense, *Angeborene Herzfehler in Deutschland*. *Der Kardiologe*, 2011. **5**(5): p. 325.
6. Zeng, Y.I., R. Sun, X. Li, et al., *Pathophysiology of valvular heart disease*. *Experimental and therapeutic medicine*, 2016. **11**(4): p. 1184-1188.
7. Baumgartner, H., V. Falk, J.J. Bax, et al., *2017 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease*. *European Heart Journal*, 2017. **38**(36): p. 2739-2791.
8. Sassalos, P., M.-S. Si, R.G. Ohye, et al., *50 - Atrioventricular Septal Defects*, in *Critical Heart Disease in Infants and Children (Third Edition)*, R.M. Ungerleider, et al., Editors. 2019, Elsevier: Philadelphia. p. 606-614.e2.
9. Testini, M., A. Gurrado, P. Portincasa, et al., *Bovine pericardium patch wrapping intestinal anastomosis improves healing process and prevents leakage in a pig model*. *PloS one*, 2014. **9**(1): p. e86627-e86627.
10. Morgenstern, U. and M. Kraft, *Band 1 Faszination, Einführung, Überblick*. 2014. p. 131-157.
11. Lam, M.T. and J.C. Wu, *Biomaterial applications in cardiovascular tissue repair and regeneration*. *Expert review of cardiovascular therapy*, 2012. **10**(8): p. 1039-1049.
12. Stanisławska, A., *Biomaterials and Implants in Cardiac and Vascular Surgery - Review*. *Advances in Materials Science*, 2014. **14**(3): p. 5-17.
13. Thottappillil, N. and P.D. Nair, *Scaffolds in vascular regeneration: current status*. *Vascular health and risk management*, 2015. **11**: p. 79-91.
14. Calcaterra, D., M.-A. Jazayeri, J.W. Turek, et al., *Aortic Root Reconstruction with a New Dacron Graft Featuring Prefabricated Coronary Side Branches: Lessons Learned from the Cabrol Procedure*. *Aorta (Stamford, Conn.)*, 2017. **5**(1): p. 1-10.

15. Brewster, L., E.M. Brey, and H.P. Greisler, *Principles of Tissue Engineering (Fourth Edition)*, in *Principles of Tissue Engineering (Fourth Edition)*, R. Lanza, R. Langer, and J. Vacanti, Editors. 2014, Academic Press: Boston. p. 798.
16. Dimarakis, I., S.M. Rehman, and G. Asimakopoulos, *1 - Tissue responses to implanted materials*, in *Biomaterials and Devices for the Circulatory System*, T. Gourlay and R.A. Black, Editors. 2010, Woodhead Publishing. p. 3-23.
17. Treiser, M., S. Abramson, R. Langer, et al., *Chapter 1.2.6 - Degradable and Resorbable Biomaterials*, in *Biomaterials Science (Third Edition)*, B.D. Ratner, et al., Editors. 2013, Academic Press. p. 179-195.
18. Mosala Nezhad, Z., A. Poncelet, L. de Kerchove, et al., *Small intestinal submucosa extracellular matrix (CorMatrix®) in cardiovascular surgery: a systematic review*. *Interactive cardiovascular and thoracic surgery*, 2016. **22**(6): p. 839-850.
19. Schünke, M.e.a., *3 Organe des Kreislaufsystems und ihre Leitungsbahnen (I)*, in *PROMETHEUS Innere Organe*. 2018, Georg Thieme Verlag: Stuttgart. p. 98, Abb. 3.5 B.
20. Rodriguez, E.R. and C.D. Tan, *Structure and Anatomy of the Human Pericardium*. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 2017. **59**(4): p. 327-340.
21. Edwards Lifesciences Corporation. *Edwards bovine pericardial patch*. Zitiert am: 12.05.2019, 09:24 Uhr; URL: <https://www.edwards.com/devices/bovine-pericardial-patches/cardiac>.
22. GmbH, A.T.B. *Matrix Patch™*. Zitiert am: 12.05.2019, 09:28 Uhr; URL: <https://autotissue.de/products/>.
23. Deutsche Gesellschaft für Thorax-, H.-u.G.D., *Deutscher Herzbericht 2016: Herzchirurgie in Deutschland*. 2017, Deutsche Gesellschaft für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie (DGTHG), Pressereferentin, Regina Iglauer-Sander.
24. Gott, V.L., D.E. Alejo, and D.E. Cameron, *Mechanical heart valves: 50 years of evolution*. *The Annals of Thoracic Surgery*, 2003. **76**(6): p. S2230-S2239.
25. Alperi, A., D. Hernandez-Vaquero, I. Pascual, et al., *Aortic valve replacement in young patients: should the biological prosthesis be recommended over the mechanical?* *Annals of translational medicine*, 2018. **6**(10): p. 183-183.
26. Pape, H.C., A. Kurtz, and S. Silbernagl, *Physiologie*. 2014, G. Thieme. p. 296-298.
27. Tillquist, M.N. and T.M. Maddox, *Cardiac crossroads: deciding between mechanical or bioprosthetic heart valve replacement*. *Patient preference and adherence*, 2011. **5**: p. 91-99.
28. Teshima, H., M. Ikebuchi, Y. Miyamoto, et al., *10-year results of On-X bileaflet mechanical heart valve in the aortic position: low target INR regimen in Japanese*. *Gen Thorac Cardiovasc Surg*, 2017. **65**(8): p. 435-440.

29. Ziemer, G. and A. Haverich, *Herzchirurgie: Die Eingriffe am Herzen und an den herznahen Gefäßen*. 2009, Springer Berlin Heidelberg. p. 601-634.
30. Mazine, A., A. Ghoneim, and I. El-Hamamsy, *The Ross Procedure: How I Teach It*. *The Annals of Thoracic Surgery*, 2018. **105**(5): p. 1294-1298.
31. Sievers, H.-H., U. Stierle, T. Hanke, et al., *Die Ross-Operation ñ eine Therapieoption bei Aortenklappenerkrankungen: Ergebnisse des Deutschen Ross-Registers*. *Dtsch Arztebl International*, 2005. **102**(30): p. 2090-.
32. Bloomfield, P., *Choice of heart valve prosthesis*. *Heart (British Cardiac Society)*, 2002. **87**(6): p. 583-589.
33. Head, S.J., M. Çelik, and A.P. Kappetein, *Mechanical versus bioprosthetic aortic valve replacement*. *European Heart Journal*, 2017. **38**(28): p. 2183-2191.
34. Brennan, J.M., F.H. Edwards, Y. Zhao, et al., *Long-term safety and effectiveness of mechanical versus biologic aortic valve prostheses in older patients: results from the Society of Thoracic Surgeons Adult Cardiac Surgery National Database*. *Circulation*, 2013. **127**(16): p. 1647-55.
35. Goldstone, A.B., P. Chiu, M. Baiocchi, et al., *Mechanical or Biologic Prostheses for Aortic-Valve and Mitral-Valve Replacement*. *New England Journal of Medicine*, 2017. **377**(19): p. 1847-1857.
36. Baumgartner, H., V. Falk, J.J. Bax, et al., *2017 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease*. *Eur Heart J*, 2017. **38**(36): p. 2739-2791.
37. van Geldorp, M.W.A., W.R. Eric Jamieson, A.P. Kappetein, et al., *Patient outcome after aortic valve replacement with a mechanical or biological prosthesis: Weighing lifetime anticoagulant-related event risk against reoperation risk*. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 2009. **137**(4): p. 881-886.e5.
38. Schmid, C., *Leitfaden Erwachsenenherzchirurgie*. 2013, Springer Berlin Heidelberg. p. 39-40.
39. Clayton, B., G. Morgan-Hughes, and C. Roobottom, *Transcatheter aortic valve insertion (TAVI): a review*. *The British journal of radiology*, 2014. **87**(1033): p. 20130595-20130595.
40. IQTIG – Institut für Qualitätssicherung und Transparenz im Gesundheitswesen, B., *Qualitätsreport 2020*. 2020: p. 74-85.
41. Vahanian, A., F. Beyersdorf, F. Praz, et al., *2021 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease: Developed by the Task Force for the management of valvular heart disease of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS)*. *European Heart Journal*, 2021.
42. LivaNova PLC. *Carbomedics Top Hat, Totally Supra-Annular Aortic Valve*. Zitiert am: 11.05.2019, 17:33 Uhr; URL: <https://www.livanova.com/en-US/Home/Products->

- Therapies/Cardiovascular/Healthcare-Professionals/Heart-Valves/Aortic/Carbomedics-Aortic-Family.aspx.
43. Medtronic. *Avalus™ Bioprosthesis - Pericardial Aortic Surgical Valve*. Zitiert am: 11.05.2019, 17:37 Uhr; URL: <https://www.medtronic.com/us-en/healthcare-professionals/products/cardiovascular/heart-valves-surgical/avalus-bioprotheses.html>.
  44. Wöhrle, J., B. Gonska, C. Rodewald, et al., *Transfemoral Aortic Valve Implantation with the New Edwards Sapien 3 Valve for Treatment of Severe Aortic Stenosis—Impact of Valve Size in a Single Center Experience*. PLOS ONE, 2016. **11**(3): p. e0151247.
  45. Richardson, W.J., S.A. Clarke, T.A. Quinn, et al., *Physiological Implications of Myocardial Scar Structure*. Comprehensive Physiology, 2015. **5**(4): p. 1877-1909.
  46. Morgenstern, U. and M. Kraft, *Band 1 Faszination, Einführung, Überblick*. 2014. p. 160, Abb. 7.9.
  47. Mind the Graph. *Mind the Graph - online infographic maker*. Zitiert am: 17.05.2019, 18:25 Uhr; URL: <https://mindthegraph.com/>.
  48. Musunuru, K., I.J. Domian, and K.R. Chien, *Stem cell models of cardiac development and disease*. Annual review of cell and developmental biology, 2010. **26**: p. 667-687.
  49. Maxfield, M.W., M.A. Cleary, and C.K. Breuer, *Chapter 40 - Tissue-Engineering Heart Valves*, in *Principles of Tissue Engineering (Fourth Edition)*, R. Lanza, R. Langer, and J. Vacanti, Editors. 2014, Academic Press: Boston. p. 813-833.
  50. Eng, G., B.W. Lee, M. Radisic, et al., *Chapter 38 - Cardiac Tissue Engineering*, in *Principles of Tissue Engineering (Fourth Edition)*, R. Lanza, R. Langer, and J. Vacanti, Editors. 2014, Academic Press: Boston. p. 771-792.
  51. Radisic, M., A. Marsano, R. Maidhof, et al., *Cardiac tissue engineering using perfusion bioreactor systems*. Nature protocols, 2008. **3**(4): p. 719-738.
  52. Mäki, J.M., R. Sormunen, S. Lippo, et al., *Lysyl oxidase is essential for normal development and function of the respiratory system and for the integrity of elastic and collagen fibers in various tissues*. The American journal of pathology, 2005. **167**(4): p. 927-936.
  53. Lee, C., H.-G. Lim, C.-H. Lee, et al., *Effects of glutaraldehyde concentration and fixation time on material characteristics and calcification of bovine pericardium: implications for the optimal method of fixation of autologous pericardium used for cardiovascular surgery*. Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery, 2017. **24**(3): p. 402-406.
  54. Ziemer, G. and A. Haverich, *Herzchirurgie: Die Eingriffe am Herzen und an den herznahen Gefäßen*. 2009, Springer Berlin Heidelberg. p. 111-130.

55. Pires, A.C., W.F. Saporito, S.H. Cardoso, et al., *Bovine pericardium used as a cardiovascular patch*. Heart Surg Forum, 1999. **2**(1): p. 60-9.
56. Carpentier, A., G. Lemaigre, L. Robert, et al., *Biological factors affecting long-term results of valvular heterografts*. The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, 1969. **58**(4): p. 467-483.
57. Migneault, I., C. Dartiguenave, M.J. Bertrand, et al., *Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking*. BioTechniques, 2004. **37**(5): p. 790-802.
58. Jayakrishnan, A. and S.R. Jameela, *Glutaraldehyde as a fixative in bioprostheses and drug delivery matrices*. Biomaterials, 1996. **17**(5): p. 471-484.
59. Singhal, P., A. Luk, and J. Butany, *Bioprosthetic Heart Valves: Impact of Implantation on Biomaterials*. ISRN Biomaterials, 2013. **2013**: p. 728791.
60. Constable, M., H.E. Burton, B.M. Lawless, et al., *Effect of glutaraldehyde based cross-linking on the viscoelasticity of mitral valve basal chordae tendineae*. BioMedical Engineering OnLine, 2018. **17**(1): p. 93.
61. Manji, R.A., L.F. Zhu, N.K. Nijjar, et al., *Glutaraldehyde-fixed bioprosthetic heart valve conduits calcify and fail from xenograft rejection*. Circulation, 2006. **114**(4): p. 318-27.
62. Vincentelli, A., C. Latrémouille, R. Zegdi, et al., *Does glutaraldehyde induce calcification of bioprosthetic tissues?* The Annals of Thoracic Surgery, 1998. **66**(6): p. S255-S258.
63. Schoen, F.J. and R.J. Levy, *Calcification of tissue heart valve substitutes: progress toward understanding and prevention*. Ann Thorac Surg, 2005. **79**(3): p. 1072-80.
64. Korbmacher, C., *Die zentrale Rolle der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase*, in *Physiologie*, H.-C. Pape, et al., Editors. 2014, Georg Thieme Verlag.
65. Simionescu, D.T., *Prevention of calcification in bioprosthetic heart valves: challenges and perspectives*. Expert Opin Biol Ther, 2004. **4**(12): p. 1971-85.
66. Lei, Y., L. Deng, Y. Tang, et al., *Hybrid Pericardium with VEGF-Loaded Hyaluronic Acid Hydrogel Coating to Improve the Biological Properties of Bioprosthetic Heart Valves*. Macromol Biosci, 2019. **19**(6): p. e1800390.
67. Guldner, N.W., I. Jasmund, H. Zimmermann, et al., *Detoxification and endothelialization of glutaraldehyde-fixed bovine pericardium with titanium coating: a new technology for cardiovascular tissue engineering*. Circulation, 2009. **119**(12): p. 1653-60.
68. Lopez-Moya, M., P. Melgar-Lesmes, K. Kolandaivelu, et al., *Optimizing Glutaraldehyde-Fixed Tissue Heart Valves with Chondroitin Sulfate Hydrogel for Endothelialization and Shielding against Deterioration*. Biomacromolecules, 2018. **19**(4): p. 1234-1244.

69. Gough, J.E., C.A. Scotchford, and S. Downes, *Cytotoxicity of glutaraldehyde crosslinked collagen/poly(vinyl alcohol) films is by the mechanism of apoptosis*. J Biomed Mater Res, 2002. **61**(1): p. 121-30.
70. Salgaller, M.L. and P.K. Bajpai, *Immunogenicity of glutaraldehyde-treated bovine pericardial tissue xenografts in rabbits*. Journal of Biomedical Materials Research, 1985. **19**(1): p. 1-12.
71. Manji, R.A., W. Lee, and D.K.C. Cooper, *Xenograft bioprosthetic heart valves: Past, present and future*. International Journal of Surgery, 2015. **23**: p. 280-284.
72. Keane, T.J., I.T. Swinehart, and S.F. Badylak, *Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance*. Methods, 2015. **84**: p. 25-34.
73. Cebotari, S., I. Tudorache, T. Jaekel, 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.
74. Zhang, Q., M. Raoof, Y. Chen, et al., *Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury*. Nature, 2010. **464**(7285): p. 104-7.
75. Londono, R., J.L. Dziki, E. Haljasmaa, et al., *The effect of cell debris within biologic scaffolds upon the macrophage response*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2017. **105**(8): p. 2109-2118.
76. Crapo, P.M., T.W. Gilbert, and S.F. Badylak, *An overview of tissue and whole organ decellularization processes*. Biomaterials, 2011. **32**(12): p. 3233-3243.
77. Kolesar, A., T. Toporcer, M. Bajmoczy, et al., *Aortic Valve Repair of a Stenotic Unicuspid Aortic Valve in Young Patients*. The Annals of Thoracic Surgery, 2018. **105**(5): p. 1351-1356.
78. Sobieraj, M., E. Cudak, W. Mrówczyński, et al., *Application of the CardioCel bovine pericardial patch - a preliminary report*. Kardiochirurgia i torakochirurgia polska = Polish journal of cardio-thoracic surgery, 2016. **13**(3): p. 210-212.
79. Tudorache, I., A. Horke, S. Cebotari, et al., *Decellularized aortic homografts for aortic valve and aorta ascendens replacement †*. European Journal of Cardio-Thoracic Surgery, 2016. **50**(1): p. 89-97.
80. Sarikouch, S., A. Horke, I. Tudorache, et al., *Decellularized fresh homografts for pulmonary valve replacement: a decade of clinical experience*. European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery, 2016. **50**(2): p. 281-290.
81. Simon, P., M.T. Kasimir, G. Seebacher, et al., *Early failure of the tissue engineered porcine heart valve SYNERGRAFT in pediatric patients*. Eur J Cardiothorac Surg, 2003. **23**(6): p. 1002-6; discussion 1006.

82. Christ, T., A.C. Paun, H. Grubitzsch, et al., *Long-term results after the Ross procedure with the decellularized AutoTissue Matrix P® bioprosthesis used for pulmonary valve replacement*. Eur J Cardiothorac Surg, 2019. **55**(5): p. 885-892.
83. Fidalgo, C., L. Iop, M. Sciro, et al., *A sterilization method for decellularized xenogeneic cardiovascular scaffolds*. Acta Biomater, 2018. **67**: p. 282-294.
84. Fritsche, O., *Medizinische Mikrobiologie*, in *Mikrobiologie*, O. Fritsche, Editor. 2016, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 251-294.
85. Dai, Z., J. Ronholm, Y. Tian, et al., *Sterilization techniques for biodegradable scaffolds in tissue engineering applications*. Journal of Tissue Engineering, 2016. **7**.
86. Delgado, L.M., A. Pandit, and D.I. Zeugolis, *Influence of sterilisation methods on collagen-based devices stability and properties*. Expert Review of Medical Devices, 2014. **11**(3): p. 305-314.
87. European Pharmacopoeia Commission, *European Pharmacopoeia 5.0, 2.6. Biological Tests; 2.6.1. Sterility*. 2005.
88. Vara, D.S., H.J. Salacinski, R.Y. Kannan, et al., *Cardiovascular tissue engineering: state of the art*. Pathologie Biologie, 2005. **53**(10): p. 599-612.
89. Lüllmann-Rauch, R. and E. Asan, *Blutgefäße*, in *Taschenlehrbuch Histologie*, R. Lüllmann-Rauch and E. Asan, Editors. 2019, Georg Thieme Verlag.
90. Lüllmann-Rauch, R. and E. Asan, *Blutgefäße - Abb. 11.2*, in *Taschenlehrbuch Histologie*, R. Lüllmann-Rauch and E. Asan, Editors. 2019, Georg Thieme Verlag.
91. Ehmke, H., *Aufbau und Funktion der Gefäßwand*, in *Physiologie*, H.-C. Pape, et al., Editors. 2014, Georg Thieme Verlag.
92. Harris, E.S. and W.J. Nelson, *VE-cadherin: at the front, center, and sides of endothelial cell organization and function*. Current opinion in cell biology, 2010. **22**(5): p. 651-658.
93. Abu Taha, A. and H.-J. Schnittler, *Dynamics between actin and the VE-cadherin/catenin complex: novel aspects of the ARP2/3 complex in regulation of endothelial junctions*. Cell adhesion & migration, 2014. **8**(2): p. 125-135.
94. Rabodzey, A., Y. Yao, F.W. Lusinskas, et al., *Early Response of Endothelial Cells to Flow Is Mediated by VE-Cadherin*. Cell Communication & Adhesion, 2007. **14**(5): p. 195-209.
95. Katoh, K., Y. Kano, and S. Ookawara, *Role of stress fibers and focal adhesions as a mediator for mechano-signal transduction in endothelial cells in situ*. Vascular health and risk management, 2008. **4**(6): p. 1273-1282.
96. Dorland, Y.L. and S. Huvneers, *Cell-cell junctional mechanotransduction in endothelial remodeling*. Cellular and molecular life sciences : CMLS, 2017. **74**(2): p. 279-292.

97. Chistiakov, D.A., A.N. Orekhov, and Y.V. Bobryshev, *Effects of shear stress on endothelial cells: go with the flow*. Acta Physiologica, 2017. **219**(2): p. 382-408.
98. Ballermann, B.J., A. Dardik, E. Eng, et al., *Shear stress and the endothelium*. Kidney International, 1998. **54**: p. S100-S108.
99. Davies, P.F., *Hemodynamic shear stress and the endothelium in cardiovascular pathophysiology*. Nature clinical practice. Cardiovascular medicine, 2009. **6**(1): p. 16-26.
100. Ehmke, H., *Strömungswiderstand*, in *Physiologie*, H.-C. Pape, et al., Editors. 2014, Georg Thieme Verlag.
101. Auto Tissue Berlin GmbH. *Matric Patch Equine Pericardial Patch*. Zitiert am: 28.03.2020, 15:53 Uhr.
102. Starnecker, F., F. König, C. Hagl, et al., *Tissue-engineering acellular scaffolds-The significant influence of physical and procedural decellularization factors*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2018. **106**(1): p. 153-162.
103. ibidi GmbH. *Instruction Manual ibidi Pump System*. Zitiert am: 17.05.2019, 16:22 Uhr; URL: [https://ibidi.com/img/cms/products/instruments/I\\_1090X\\_PumpSystem/IN\\_1090X\\_pump\\_system.pdf](https://ibidi.com/img/cms/products/instruments/I_1090X_PumpSystem/IN_1090X_pump_system.pdf).
104. ibidi GmbH. *Instructions  $\mu$ -Slide Luer*. Zitiert am: 17.05.2018, 16:28 Uhr; URL: [https://ibidi.com/img/cms/products/labware/channel\\_slides/S\\_801XX\\_Slide\\_ILuer/IN\\_801XX\\_I\\_Luer.pdf](https://ibidi.com/img/cms/products/labware/channel_slides/S_801XX_Slide_ILuer/IN_801XX_I_Luer.pdf).
105. Lüllmann-Rauch, R. and E. Asan, *Standardpräparate für die Lichtmikroskopie*, in *Taschenlehrbuch Histologie*, R. Lüllmann-Rauch and E. Asan, Editors. 2019, Georg Thieme Verlag.
106. Morphisto GmbH. *Färbeprotokoll für: Pikrosirius-Rot-Färbung für Kollagen I&II*. Zitiert am: 17.05.2019, 16:44 Uhr; URL: [https://www.morphisto.de/fileadmin/pdf/Faerbeprotokolle/Pikrosiriusrot\\_fuer\\_Kollagen.pdf](https://www.morphisto.de/fileadmin/pdf/Faerbeprotokolle/Pikrosiriusrot_fuer_Kollagen.pdf).
107. Morphisto GmbH. *Färbeprotokoll für: MASSON-Färbung (Original)*. Zitiert am: 17.05.2019, 16:40 Uhr; URL: [https://www.morphisto.de/fileadmin/pdf/Faerbeprotokolle/MASSON\\_Original.pdf](https://www.morphisto.de/fileadmin/pdf/Faerbeprotokolle/MASSON_Original.pdf).
108. Morphisto GmbH. *Färbeprotokoll für: Hämatoxylin & Eosin (H&E)*. Zitiert am: 17.05.2019, 16:46 Uhr; URL: [https://www.morphisto.de/fileadmin/pdf/Faerbeprotokolle/H\\_E.pdf](https://www.morphisto.de/fileadmin/pdf/Faerbeprotokolle/H_E.pdf).
109. Lichtman, J.W. and J.-A. Conchello, *Fluorescence microscopy*. Nature Methods, 2005. **2**(12): p. 910-919.
110. Kapuscinski, J., *DAPI: a DNA-Specific Fluorescent Probe*. Biotechnic & Histochemistry, 1995. **70**(5): p. 220-233.

111. ThermoFisher Scientific. *DAPI Protocol for Fluorescence Imaging*. Zitiert am: 17.05.2019, 17:13 Uhr; URL: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/references/protocols/cell-and-tissue-analysis/protocols/dapi-imaging-protocol.html>.
112. Labno, C. *Basic Intensity Quantification with ImageJ*. Zitiert am: 25.01.2021, 14:24 Uhr; URL: <https://www.unige.ch/medecine/bioimaging/files/1914/1208/6000/Quantification.pdf>.
113. Handala, L., T. Fiore, Y. Rouillé, et al., *QuantIF: An ImageJ Macro to Automatically Determine the Percentage of Infected Cells after Immunofluorescence*. *Viruses*, 2019. **11**(2): p. 165.
114. ThermoFisher Scientific. *SYTO™ 9 Green Fluorescent Nucleic Acid Stain*. Zitiert am: 17.05.2019, 17:23 Uhr; URL: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/S34854>.
115. ThermoFisher Scientific. *Propidium Iodide*. Zitiert am: 17.05.2019, 17:27 Uhr; URL: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/cell-analysis/fluorophores/propidium-iodide.html>.
116. ibidi GmbH. *Live/dead staining with FDA and PI*. Zitiert am: 17.05.2019, 17:19 Uhr; URL: [https://ibidi.com/img/cms/support/AN/AN33\\_Live\\_Death\\_staining\\_with\\_FDA\\_and\\_PI.pdf](https://ibidi.com/img/cms/support/AN/AN33_Live_Death_staining_with_FDA_and_PI.pdf).
117. Beckman Coulter Life Sciences. *CD144 (VE-Cadherin) Antigen*. Zitiert am: 17.05.2019, 17:35 Uhr; URL: <https://www.beckman.de/reagents/coulter-flow-cytometry/antibodies-and-kits/single-color-antibodies/cd144>.
118. Spirochrome. *SiR-actin Kit*. Zitiert am: 17.05.2019, 17:37 Uhr; URL: <https://spirochrome.com/product/sir-actin-50-nmol/>.
119. Lukinavičius, G., L. Reymond, E. D'Este, et al., *Fluorogenic probes for live-cell imaging of the cytoskeleton*. *Nature Methods*, 2014. **11**(7): p. 731-733.
120. ibidi GmbH. *Cell cultivation and Immunofluorescence staining with  $\mu$ -Slide VI 0.4*. Zitiert am: 17.05.2019, 17:54 Uhr; URL: [https://ibidi.com/img/cms/support/AN/AN09\\_Immunofluorescence\\_SlideVI.pdf](https://ibidi.com/img/cms/support/AN/AN09_Immunofluorescence_SlideVI.pdf).
121. Macherauch, E. and H.-W. Zoch, *Rasterelektronenmikroskopie, in Praktikum in Werkstoffkunde: 91 ausführliche Versuche aus wichtigen Gebieten der Werkstofftechnik*. 2011, Vieweg+Teubner: Wiesbaden. p. 289-296.
122. Fazel Anvari-Yazdi, A., K. Tahermanesh, M.T. Joghataei, et al., *How to Prepare Biological Samples and Live Tissues for Scanning Electron Microscopy (SEM)*. *Galen Medical Journal*, 2014. **3**: p. 63-80.
123. Bioline GmbH. *Isolate II Genomic DNA Kit Product Manual*. Zitiert am: 26.03.2020, 10:12 Uhr; URL:

- [https://www.bioline.com/us/downloads/dl/file/id/873/isolate\\_ii\\_genomic\\_dna\\_kit\\_product\\_manual.pdf](https://www.bioline.com/us/downloads/dl/file/id/873/isolate_ii_genomic_dna_kit_product_manual.pdf).
124. Río Bártulos, C., H. Tappe, and S. Rothhämel, *Isolierung von DNA*, in *Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*, M. Jansohn and S. Rothhämel, Editors. 2012, Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg. p. 95-134.
  125. Weißbach, W., *Werkstoffprüfung*, in *Werkstoffkunde: Strukturen, Eigenschaften, Prüfung*. 2012, Vieweg+Teubner Verlag: Wiesbaden. p. 365-404.
  126. Tomsic, A., D.D. Bissessar, T.J. van Brakel, et al., *Initial Experience and Early Results of Mitral Valve Repair With CardioCel Pericardial Patch*. *Ann Thorac Surg*, 2018. **106**(4): p. 1241-1244.
  127. Mourad, F., S.-E. Shehada, J. Lubarski, et al., *Aortic valve construction using pericardial tissue: short-term single-centre outcomes*. *Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery*, 2018. **28**(2): p. 183-190.
  128. Helmus, M.N. and C.M. Cunanan, *5 - Mechanical and bioprosthetic heart valves*, in *Biomaterials for Artificial Organs*, M. Lysaght and T.J. Webster, Editors. 2011, Woodhead Publishing. p. 113-162.
  129. Olivencia-Yurvati, A.H., R.T. Mallet, and J. Fernandez, *4 - Developments in cardiovascular valve technology*, in *Biomaterials and Devices for the Circulatory System*, T. Gourlay and R.A. Black, Editors. 2010, Woodhead Publishing. p. 89-122.
  130. Liao, K., E. Seifter, D. Hoffman, et al., *Bovine Pericardium Versus Porcine Aortic Valve: Comparison of Tissue Biological Properties as Prosthetic Valves*. *Artificial Organs*, 1992. **16**(4): p. 361-365.
  131. European Medicines Agency (EMA). *Guideline on xenogeneic cell-based medicinal products*. Zitiert am: 28.03.2020, 10:38 Uhr; URL: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-xenogeneic-cell-based-medicinal-products\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-xenogeneic-cell-based-medicinal-products_en.pdf).
  132. D'Andrilli, A., M. Ibrahim, F. Venuta, et al., *Glutaraldehyde Preserved Autologous Pericardium for Patch Reconstruction of the Pulmonary Artery and Superior Vena Cava*. *The Annals of Thoracic Surgery*, 2005. **80**(1): p. 357-358.
  133. Saporito, W.F., A.C. Pires, S.H. Cardoso, et al., *Bovine pericardium retail preserved in glutaraldehyde and used as a vascular patch*. *BMC Surgery*, 2011. **11**(1): p. 37.
  134. Umashankar, P.R., P.V. Mohanan, and T.V. Kumari, *Glutaraldehyde treatment elicits toxic response compared to decellularization in bovine pericardium*. *Toxicol Int*, 2012. **19**(1): p. 51-8.
  135. McDade, J.K., E.P. Brennan-Pierce, M.B. Ariganello, et al., *Interactions of U937 macrophage-like cells with decellularized pericardial matrix materials: influence of crosslinking treatment*. *Acta Biomater*, 2013. **9**(7): p. 7191-9.

136. Tam, H., W. Zhang, D. Infante, et al., *Fixation of Bovine Pericardium-Based Tissue Biomaterial with Irreversible Chemistry Improves Biochemical and Biomechanical Properties*. Journal of cardiovascular translational research, 2017. **10**(2): p. 194-205.
137. Julien, M., D.R. Letouneau, Y. Marois, et al., *Shelf-life of bioprosthetic heart valves: a structural and mechanical study*. Biomaterials, 1997. **18**(8): p. 605-12.
138. Aguiari, P., M. Fiorese, L. Iop, et al., *Mechanical testing of pericardium for manufacturing prosthetic heart valves*. Interact Cardiovasc Thorac Surg, 2016. **22**(1): p. 72-84.
139. Lee, C., H.G. Lim, C.H. Lee, et al., *Effects of glutaraldehyde concentration and fixation time on material characteristics and calcification of bovine pericardium: implications for the optimal method of fixation of autologous pericardium used for cardiovascular surgery*. Interact Cardiovasc Thorac Surg, 2017. **24**(3): p. 402-406.
140. Ozolins, V., I. Ozolanta, L. Smits, et al. *Biomechanical Properties of Glutaraldehyde Treated Human Pericardium*. 2008. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
141. Sugimoto, H. and M.S. Sacks, *Effects of Leaflet Stiffness on In Vitro Dynamic Bioprosthetic Heart Valve Leaflet Shape*. Cardiovascular Engineering and Technology, 2013. **4**(1): p. 2-15.
142. Mendelson, K. and F.J. Schoen, *Heart valve tissue engineering: concepts, approaches, progress, and challenges*. Annals of biomedical engineering, 2006. **34**(12): p. 1799-1819.
143. Agathos, E.A., M. Shen, M. Katsiboulas, et al., *In Vivo Calcification of Glutaraldehyde-Fixed Cardiac Valve and Pericardium of Phoca groenlandica*. ASAIO Journal, 2011. **57**(4).
144. Edwards Lifesciences Corporation. *Carpentier-Edwards ThermaFix advanced tissue process - Frequently Asked Questions*. Zitiert am: 26.03.2020, 17:35 Uhr; URL: <https://www.edwards.com/filefolder/resourcegallery/products/heartvalves/pdfs/ar00728.pdf>.
145. LivaNova PLC. *CROWN PRT™ Inservice implantation guide*. Zitiert am: 11.03.18, 08:54; URL: <http://www.livanova.sorin.com/file/download-7364.action>.
146. Fisher, C.W., A. Fiorello, D. Shaffer, et al., *Aldehyde-Resistant Mycobacteria Associated with the Use of Endoscope Reprocessing Systems*. American journal of infection control, 2012. **40**(9): p. 880-882.
147. Griffiths, P.A., J.R. Babb, C.R. Bradley, et al., *Glutaraldehyde-resistant Mycobacterium chelonae from endoscope washer disinfectors*. J Appl Microbiol, 1997. **82**(4): p. 519-26.
148. Nomura, K., M. Ogawa, H. Miyamoto, et al., *Antibiotic susceptibility of glutaraldehyde-tolerant Mycobacterium chelonae from bronchoscope washing machines*. Am J Infect Control, 2004. **32**(4): p. 185-8.

149. Duarte, R.S., M.C.S. Lourenço, L.d.S. Fonseca, et al., *Epidemic of postsurgical infections caused by Mycobacterium massiliense*. Journal of clinical microbiology, 2009. **47**(7): p. 2149-2155.
150. Li, N., Y. Li, D. Gong, et al., *Efficient decellularization for bovine pericardium with extracellular matrix preservation and good biocompatibility*. Interact Cardiovasc Thorac Surg, 2018.
151. Rassoli, A., N. Fatourae, R. Guidoin, et al., *Comparison of tensile properties of xenopericardium from three animal species and finite element analysis for bioprosthetic heart valve tissue*. Artificial Organs, 2020. **44**(3): p. 278-287.
152. Cramer, M.C. and S.F. Badylak, *Extracellular Matrix-Based Biomaterials and Their Influence Upon Cell Behavior*. Annals of biomedical engineering, 2020. **48**(7): p. 2132-2153.
153. Keane, T.J., R. Londono, N.J. Turner, et al., *Consequences of ineffective decellularization of biologic scaffolds on the host response*. Biomaterials, 2012. **33**(6): p. 1771-1781.
154. International, A., *ASTM F3354-19, Standard Guide for Evaluating Extracellular Matrix Decellularization Processes*, P. ASTM International: West Conshohocken, USA, Editor. 2019.
155. Hsieh, D.J., P. Srinivasan, K.C. Yen, et al., *Protocols for the preparation and characterization of decellularized tissue and organ scaffolds for tissue engineering*. Biotechniques, 2021. **70**(2): p. 107-115.
156. Aguiari, P., L. Iop, F. Favaretto, et al., *In vitro comparative assessment of decellularized bovine pericardial patches and commercial bioprosthetic heart valves*. Biomed Mater, 2017. **12**(1): p. 015021.
157. Mora-Navarro, C., M.E. Garcia, P. Sarker, et al., *Monitoring decellularization via absorbance spectroscopy during the derivation of extracellular matrix scaffolds*. Biomed Mater, 2021. **17**(1).
158. Costa, A., J.D. Naranjo, R. Londono, et al., *Biologic Scaffolds*. Cold Spring Harbor perspectives in medicine, 2017. **7**(9): p. a025676.
159. Yang, M., C.Z. Chen, X.N. Wang, et al., *Favorable effects of the detergent and enzyme extraction method for preparing decellularized bovine pericardium scaffold for tissue engineered heart valves*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2009. **91**(1): p. 354-61.
160. Gardin, C., S. Ricci, L. Ferroni, et al., *Decellularization and Delipidation Protocols of Bovine Bone and Pericardium for Bone Grafting and Guided Bone Regeneration Procedures*. PLoS One, 2015. **10**(7): p. e0132344.
161. Sizeland, K.H., H.C. Wells, J. Higgins, et al., *Age dependent differences in collagen alignment of glutaraldehyde fixed bovine pericardium*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 189197.

162. Stephens, E.H., N. de Jonge, M.P. McNeill, et al., *Age-related changes in material behavior of porcine mitral and aortic valves and correlation to matrix composition*. Tissue engineering. Part A, 2010. **16**(3): p. 867-878.
163. Hiester, E.D. and M.S. Sacks, *Optimal bovine pericardial tissue selection sites. I. Fiber architecture and tissue thickness measurements*. Journal of Biomedical Materials Research, 1998. **39**(2): p. 207-214.
164. Reece, I.J., R. van Noort, T.R.P. Martin, et al., *The Physical Properties of Bovine Pericardium: A Study of the Effects of Stretching during Chemical Treatment in Glutaraldehyde*. The Annals of Thoracic Surgery, 1982. **33**(5): p. 480-485.
165. Centonze, R., E. Agostini, S. Massaccesi, et al., *A novel equine-derived pericardium membrane for dural repair: A preliminary, short-term investigation*. Asian J Neurosurg, 2016. **11**(3): p. 201-5.
166. Dohmen, P.M., F. da Costa, S.V. Lopes, et al., *Successful implantation of a decellularized equine pericardial patch into the systemic circulation*. Med Sci Monit Basic Res, 2014. **20**: p. 1-8.
167. Martens, S., *Sutureless equine aortic valve replacement*, in *Aortic Root Surgery: The Biological Solution*, C.A. Yankah, Y. Weng, and R. Hetzer, Editors. 2010, Steinkopff: Heidelberg. p. 57-63.
168. Wendt, D., M. Thielmann, T. Buck, et al., *First clinical experience and 1-year follow-up with the sutureless 3F-Enable aortic valve prosthesis*. Eur J Cardiothorac Surg, 2008. **33**(4): p. 542-7.
169. Hennessy, R.S., S. Jana, B.J. Tefft, et al., *Supercritical carbon dioxide-based sterilization of decellularized heart valves*. JACC. Basic to translational science, 2017. **2**(1): p. 71-84.
170. Matuska, A.M. and P.S. McFetridge, *The effect of terminal sterilization on structural and biophysical properties of a decellularized collagen-based scaffold; implications for stem cell adhesion*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2015. **103**(2): p. 397-406.
171. WHO. *Antibiotic resistance, Fact Sheet*. Zitiert am: 11.03.18, 15:56; URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/en/>.
172. Gilbert, T.W., T.L. Sellaro, and S.F. Badylak, *Decellularization of tissues and organs*. Biomaterials, 2006. **27**(19): p. 3675-3683.
173. Yoganarasimha, S., W.R. Trahan, A.M. Best, et al., *Peracetic acid: a practical agent for sterilizing heat-labile polymeric tissue-engineering scaffolds*. Tissue Eng Part C Methods, 2014. **20**(9): p. 714-23.
174. Daeschlein, G., *Antimicrobial and antiseptic strategies in wound management*. Int Wound J, 2013. **10** Suppl 1: p. 9-14.

175. Lomas, R.J., J.E. Cruse-Sawyer, C. Simpson, et al., *Assessment of the biological properties of human split skin allografts disinfected with peracetic acid and preserved in glycerol*. *Burns*, 2003. **29**(6): p. 515-25.
176. Zhang, J., *Engineered Tissue Patch for Cardiac Cell Therapy*. Current treatment options in cardiovascular medicine, 2015. **17**(8): p. 399-399.
177. Schmidt, D. and S.P. Hoerstrup, *Tissue engineered heart valves based on human cells*. *Swiss Med Wkly*, 2006. **136**(39-40): p. 618-23.
178. Rajendran, P., T. Rengarajan, J. Thangavel, et al., *The Vascular Endothelium and Human Diseases*. *International Journal of Biological Sciences*, 2013. **9**(10): p. 1057-1069.
179. Cheng, C.P., R.J. Herfkens, and C.A. Taylor, *Abdominal aortic hemodynamic conditions in healthy subjects aged 50-70 at rest and during lower limb exercise: in vivo quantification using MRI*. *Atherosclerosis*, 2003. **168**(2): p. 323-31.
180. Cheng, C.P., R.J. Herfkens, and C.A. Taylor, *Comparison of abdominal aortic hemodynamics between men and women at rest and during lower limb exercise*. *J Vasc Surg*, 2003. **37**(1): p. 118-23.
181. Dorland, Y.L. and S. Huveneers, *Cell-cell junctional mechanotransduction in endothelial remodeling*. *Cell Mol Life Sci*, 2016.
182. Lichtenberg, A., S. Cebotari, I. Tudorache, et al., *Flow-dependent re-endothelialization of tissue-engineered heart valves*. *J Heart Valve Dis*, 2006. **15**(2): p. 287-93; discussion 293-4.
183. Reiser, A., H. Wagner, A. Bieser, et al., *Changes in cell-cell contacts of endothelial cells (HUVEC) under long term shear stress conditions*. *Angiogenesis*, 2014. **17**: p. 962-962.
184. ibidi GmbH. *Application Note 13 - Endothelial Cell Culture under Perfusion with the ibidi Pump System and  $\mu$ -Slide I 0.6 Luer*. Zitiert am: 28.03.2020, 12:59 Uhr; Version 4.0:[URL: [https://ibidi.com/img/cms/support/AN/AN13\\_HUVECs\\_under\\_perfusion.pdf](https://ibidi.com/img/cms/support/AN/AN13_HUVECs_under_perfusion.pdf)].
185. Davies, P.F., *Flow-mediated endothelial mechanotransduction*. *Physiological reviews*, 1995. **75**(3): p. 519-560.
186. Seebach, J., G. Donnert, R. Kronstein, et al., *Regulation of endothelial barrier function during flow-induced conversion to an arterial phenotype*. *Cardiovascular research*, 2007. **75**(3): p. 596-607.
187. Warboys, C.M., N. Amini, A. de Luca, et al., *The role of blood flow in determining the sites of atherosclerotic plaques*. *F1000 medicine reports*, 2011. **3**: p. 5-5.
188. ibidi GmbH. *Cells Under Flow: Experimental Examples*. Zitiert am: 28.03.2020, 13:37 Uhr; URL: <https://ibidi.com/content/301-experimental-examples>.

189. Guldner, N.W., I. Jasmund, H. Zimmermann, et al., *Detoxification and endothelialization of glutaraldehyde-fixed bovine pericardium with titanium coating: a new technology for cardiovascular tissue engineering*. *Circulation*, 2009. **119**(12): p. 1653-60.
190. Jansson, K., L. Bengtsson, J. Swedenborg, et al., *In vitro endothelialization of bioprosthetic heart valves provides a cell monolayer with proliferative capacities and resistance to pulsatile flow*. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 2001. **121**(1): p. 108-115.

## IV. Anhang

### Geräte

Der Firmensitz befindet sich in Deutschland, sofern nicht anders angegeben.

#### Allgemeine Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Typ</b>	<b>Hersteller</b>
Autoklav	CV-EL	CertoClav Sterilizer GmbH, Traun, AUT
Dickenmessgerät	ID-C112XB	Mitutoyo, Neuss
Fluidic Unit	Fluidic Unit	Ibidi GmbH, Planegg
Magnetrührer	RET basic	IKA®-Werke GmbH & Co. KG
Mikrotom	MH 400 R	Microm International GmbH, Walldorf
Probenkörperstanze	ZCP020	Zwick GmbH & Co. KG, Ulm
Pumpe	Eden 230V~50Hz 80W	PfG GmbH, Hörstel
Pumpe	Ibidi Pump	Ibidi GmbH, Planegg
Kniehelebstanze	ZCP020	Zwick GmbH & Co. KG, Ulm
Ultraschall	Ultrasonic Cleaner USC-T	VWR International GmbH, Darmstadt
Waage	Kern 770	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Wärmeschrank	WTC	Binder GmbH, Tuttlingen
Wasserbad	Medax	Nagel GmbH & Co. KG, Kiel
Zugmaschine	zwickiLine, 2.5 kN	Zwick GmbH & Co. KG, Ulm

#### Zellkultur

<b>Gerät</b>	<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
Inkubatoren	Hera Cell	Heraeus Holding GmbH, Hanau
	Heraeus 6000	Heraeus Holding GmbH, Hanau
	APT.line TM CB	Binder GmbH, Tuttlingen
Pipetten	Easypet	Eppendorf AG, Hamburg
	accu-jet® pro	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim

<b>Gerät</b>	<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
Wasserbad	Julabo SW22	Julabo GmbH, Seelbach
Zentrifuge	Rotina 46 R	A. Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen

### Fluoreszenzmikroskopie

<b>Gerät</b>	<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
Fluoreszenzlampe	HXP 120	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Mikroskop	Axio Observer	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Power Supply	Power Supply 231	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Software	AxioVision Rel. 4.8	Carl Zeiss AG, Oberkochen

### Lichtmikroskopie

<b>Gerät</b>	<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
Mikroskop	Axiovert 35	Carl Zeiss AG, Oberkochen
	Evos XL Core	Life Technologies GmbH, Darmstadt
	Leica DM R	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Software	LAS EZ V.3.4	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar

### Rasterelektronenmikroskopie

<b>Gerät</b>	<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
Kritisch-Punkt- Trockner	CPD 030	Bal-Tec
Mikroskop	EVO LS10	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Sputter	SCD 050	Bal-Tec

## Molekularbiologie

Gerät	Name	Hersteller
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf AG, Hamburg
Thermoblock	ThermoMixer C	Eppendorf AG, Hamburg
Tischzentrifuge	Mikro 22 R	A. Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen
Vortex Rüttler	REAX top	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach

## Reagenzien und Zellkulturmedien

Bezeichnung	Hersteller
Aceton zur Analyse	Merck KGaA, Darmstadt
Anti/Anti Lösung (100x)	gibco® by Life Technologies GmbH, Darmstadt
Aqua destillata (Ampuwa®)	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v.d.H.
Bacillol AF	Bode Chemie GmbH, Hamburg
BBL™ Fluid Thioglycollate Medium	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Collagenase Type 2 CLS-2	Worthington Biochemical Corporation, NJ, USA
Desoxycholsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dimethyl Sulfoxid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Endothelial Cell Growth Medium	Promocell GmbH, Heidelberg
Ethanol (30 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 96 %, 100 %), vergällt	Apotheke Klinikum Großhadern
Ethanol <99,8 %, DAB, reinst	Apotheke Klinikum Großhadern
Fermacidal D2	DROL-Laborgeräte & Zubehör, Reichertshausen
Fötales Kälberserum (FKS)	Lot-Nr.: 0742C, Biochrom GmbH, Berlin
Glutaraldehyd Lsg., 25 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Heparin (5000 i.E)	Ratiopharm GmbH, Ulm

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Humanes Serumalbumin (HAS)	Baxter GmbH, Unterschleißheim
Hydrochloric Acid 37%	Merck KGaA, Darmstadt
Mayers Hämlaunlösung	Merck KGaA, Darmstadt
Medium 199 Earle	Lot-Nr.: 0264D, Biochrom GmbH, Berlin
NaCl 0,9%	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v.d.H.
Natriumlaurylsulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Octenidin (di)hydrochlorid	Caesar & Loretz GmbH, Hilden
PBS	Biochrom GmbH, Berlin
Penicillin-Streptomycin Solution Stabilized	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
PFA-Fixans 4 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Roti-Histofix 4%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trypanblau Sol. 0,4%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trypsin-EDTA 10x Solution	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tryptic Soy Broth Medium	Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA
Tween® 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Xylol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

## Zusammensetzungen von Medien, Puffer und Reagenzien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
0,1 % GA (500 ml)	498 ml PBS 2 ml GA
1 % Anti/Anti (1000 ml)	990 ml PBS 10 ml Anti/Anti
Dezellularisierungslösung	10 l PBS 5 g SD 5 g SDS
FIX-II-Lsg. (1000 ml)	912 ml Aqua bidest 86 ml 25 % GA

<b>Bezeichnung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
	11,3 g Na-CaCO 1,5 ml HCl (1N)
HSA (1000 ml)	950 ml PBS 80 ml HSA
Lagerungsmedium für Venen (500 ml)	495 ml M199 5 ml Pen/Strep
Spüllösung (500 ml)	498 ml M199 1 ml Heparin (5000 i.E.) 1 ml Gentamycin (50 mg/ml)
Stopplösung (500 ml)	380 ml M199 120 ml FKS
Trypsin 1:20 (500 ml)	475 ml PBS 25 ml Trypsin
Zellkulturmedium (5 % FKS)	500 ml Endothelial Cell Growth Medium Endothelial Cell Growth Medium Suppl. Pack 25 ml FKS 1 ml Pen/Strep

## Immunfluoreszenzfärbung

Puffer/Substanz	Zusammensetzung	Hersteller
Blockierungspuffer	1 % BSA 0,1 % Tween® 20 in PBS gelöst	
ibidi Mounting Medium		ibidi GmbH, Planegg
SiR-Actin	1:1000	Spirochrome, Stein am Rhein, CHE
Permeabilisierungspuffer	1 % BSA 0,1 % Triton X-100 in PBS gelöst	
Primärantikörper	Mouse Anti-Human CD144 (VE-Cadherin), 1:200	Beckman Coulter Life Sciences, CA, USA
Sekundärantikörper	Donkey Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor®555), 1:200 Verapamil 1:1000	Abcam plc., CBG, UK Spirochrome, Stein am Rhein, CHE

## Fluoreszenzfärbung

Puffer	Hersteller
DAPI 1:1000	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Propidiumjodid 1:500	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
SYTO™ 9 1:1000	Merck KGaA, Darmstadt

## Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
24 Wellplatten, Falcon®	Corning Incorporated, NY, USA
48 Wellplatten, Cellstar®	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
Biopsiestanzen, Picu Punch®, 10 mm	Acuderm Inc, FL, USA
Bottle Top Filter 0,2 µm	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Bottle Top Filter 0,45 µm	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
C-Chip, Neubauer Improved, DHC-N01	Biochrom GmbH, Berlin
Cell culture flask 12,5 cm <sup>2</sup> , Falcon®	Corning Incorporated, NY, USA
Cell culture flask 175 cm <sup>2</sup>	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Cell culture flask 75 cm <sup>2</sup>	Corning Incorporated, NY, USA
Cryo Tube vials, 1,8 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Deckgläser, 24 x 50 mm	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Dreiwegehahn, Discifix C 3SC	B. Braun AG, Melsungen
Einbettkassetten	Lab Logistics Group GmbH, Meckenheim
Eindeckmedium, CV Mount	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Faden (5/0), Prolene™, 90 cm	Ethicon, LLC, NJ, USA
Glasflasche, Duran® GLS 80®, 1000 ml	DWK Life Sciences GmbH, Wertheim
GLS 80® Anschluss-System mit 4 Ports	DWK Life Sciences GmbH, Wertheim
Kanüle, Neolus 20 G	Terumo Deutschland GmbH, Eschborn
Knopfkanüle DLP® 30000	Medtronic Inc., MN, USA
Mikrotommesser, S35	Feather Safety Razo CO., LTD., JPN
Mullkompressen, Gazin®, 7,5 x 7,5 cm	Lohmann & Rausche GmbH & Co. KG, Neuwied
Objektträger, Superfrost Ultra Plus®	Thermo Scientific Menzel GmbH, Braunschweig
Perfusion Set yellow/green	Ibidi GmbH, Planegg
Pipettenspitzen:	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
5, 10, 100, 200, 1000 µl	
Reagenzien für Färbungen	Morphisto GmbH, Frankfurt am Main
Reservoir Set 10 ml	Ibidi GmbH, Planegg
Röhre 50 ml, steril	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Röhre 15 ml, steril	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Secu Drape, steril, 45 x 75 cm	Sengewald, Rohrdorf-Thansau
Serologische Pipetten: 1,2,5,10,25 ml	Corning Incorporated, NY, USA
Skalpell No.10	Feather Safety Razo CO., LTD., JPN
Spritzen 2,10,20 ml, BD Discardit™ II	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Spritzenfilter, Minisart® 16596-HYK	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
Sterile Handschuhe, Vasco Nitril blue	B. Braun AG, Melsungen

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Transferpipette 3,5 ml μ-slide I <sup>0.6</sup> Luer, ibiTreat	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht Ibidi GmbH, Planegg

## Weitere Materialien

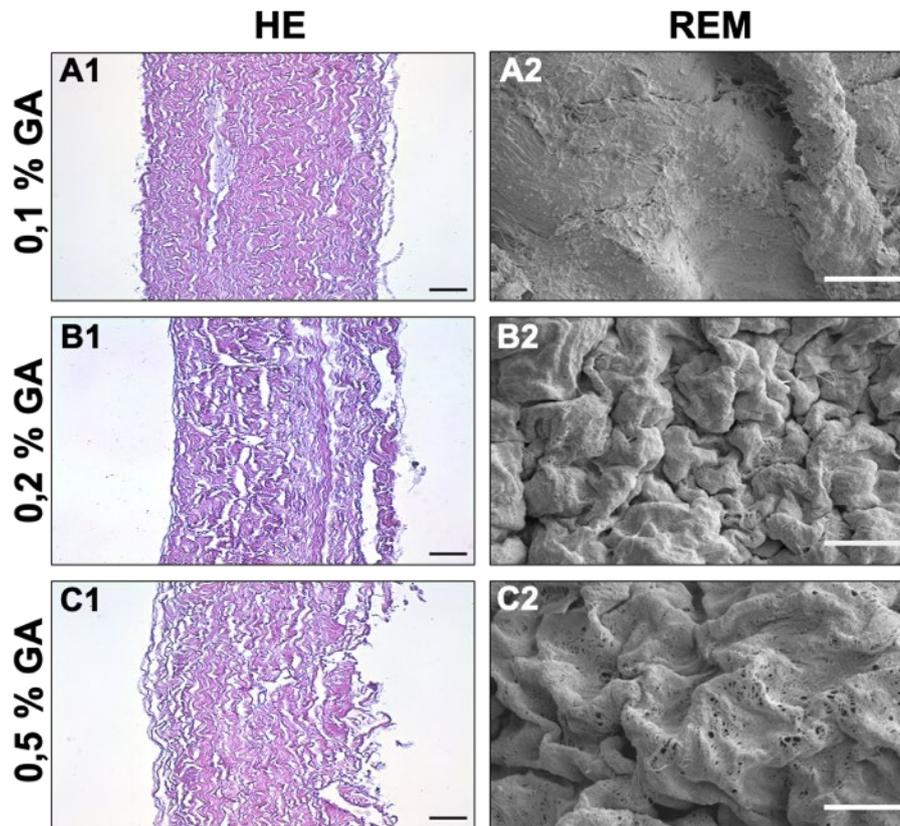
<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Stiftprobenteller, 3 mm (REM)	NeoLab Migge GmbH, Heidelberg
Becher mit Deckel, Steril, 500 ml	Klinikum Großhadern
Chirurgische Instrumente, steril	Klinikum Großhadern
Isolate II Genomic DNA Kit	Bioline GmbH, Luckenwalde
Industriell dezellularisierte Rinderperikardpatche	AutoTissue Berlin GmbH, Berlin Seriennummern: 1431, 1444, 1451, 1463, 1467
Industriell dezellularisierte Pferdeperikardpatche	AutoTissue Berlin GmbH, Berlin Seriennummern: EP211116-63, EP211116-67, EP 211116-70, EP211116-71, EP211116-90

## **Vorversuch: Bestimmung der GA-Konzentration**

Zur Bestimmung und Festlegung der zu verwendenden GA-Konzentration sowie zur Testung der Handhabung der Perikarde wurden in einem Vorversuch bereits Perikarde untersucht.

Jedem Perikard ( $n = 3$ ) sind insgesamt 90 runde Stanzen ( $\varnothing = 10$  mm) entnommen worden. Jeweils 30 dieser Stanzen wurden in 0,1 %iger, 0,2 %iger und 0,5 %iger GA-Lösung für 24 Stunden bei 4 °C fixiert. Es erfolgte die statische Besiedelung mit je 5 EC-Linien für 72 Stunden. Hierfür sind die Patche in einer 24-Wellplatte platziert und mit Teflonringen beschwert worden, um eine gleichmäßige Besiedelung zu ermöglichen. Die Auswertung erfolgte anhand von histologischen Färbemethoden und REM-Analysen. Hierbei zeigte sich eine bereits ausreichende Fixierung des Perikards bei Verwendung einer 0,1 %igen GA-Lösung. Dies äußerte sich zum einen durch sterile Zellkulturversuche und zum anderen in der Haptik und spürbaren Stabilisierung bzw. Festigung des Materials. Proben, die mit 0,2 %iger oder 0,5 %iger GA-Lösung behandelt wurden, zeigten sowohl in der REM-Analyse Oberflächendefekte als auch starke strukturelle Veränderungen der EZM in der HE-Färbung (Abbildung 39). Auch makroskopisch war eine starke Größenabnahme der Patche, die mit höheren GA-Konzentrationen behandelt wurden, zu vermerken.

Aufgrund der vorliegenden Sterilität in den Vorversuchen der Zellkultur und der vergleichsweise geringen Gewebeschädigung wurde für die nachfolgenden Experimente eine GA-Konzentration von 0,1 % zur Fixierung der Perikarde gewählt.

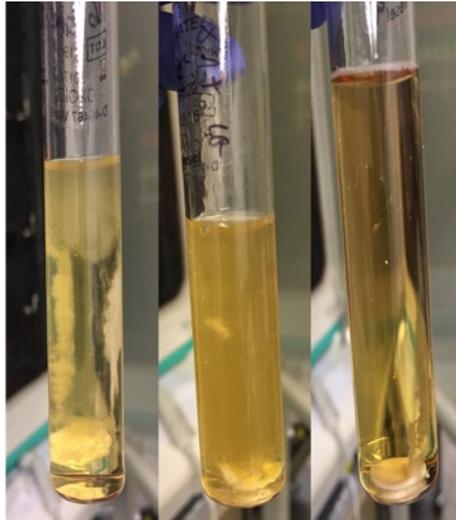


**Abbildung 39: HE-Färbung und REM-Analyse von Perikard mit verschiedener GA-Konzentration**

Ergebnisse eines Vorversuches zeigen Perikarde nach Fixierung mit verschiedenen GA-Konzentration in der HE-Färbung (A-C1) und der REM-Analyse (A-C2). Nach einer Fixierung mit 0,1 %iger GA-Lösung zeigten die Proben eine generell erhaltene EZM-Struktur (A1) sowie eine intakte Oberflächenstruktur in der REM-Untersuchung (A2). Nach einer Steigerung der GA-Konzentration auf 0,2 % oder 0,5 % konnte in beiden Fällen eine Auflockerung der EZM in der HE-Färbung beobachtet werden (B1, C1). Gleichermäßen zeigten sich nach Anwendung erhöhter GA-Konzentrationen Schäden der Oberflächentopographie (B2, C2). Maßstabsbalken HE = 100  $\mu$ m, REM = 2  $\mu$ m

## Ergebnisse der Sterilitätstestung der GA-Patche

Bereits nach weniger als 24 Stunden Inkubationszeit im Nährmedium zur Sterilitätsprobe zeigten sich drei der insgesamt fünf Patche, die mit GA behandelt wurden, unsteril (Abbildung 40). Dies äußerte sich durch ein trübes Nährmedium sowie bakterielle/fungale Wachstumsprozesse, die von den Patchen selbst ausgingen und im Nährmedium zu beobachten waren.



**Abbildung 40: Mikrobielles Wachstum in der Sterilitätstestung der GA-Patche**

Repräsentative Aufnahmen der drei GA-Proben, die bereits nach weniger als 24 Stunden Inkubationszeit ein trübes Nährmedium der Sterilitätsprobe sowie Wachstum im Medium aufwiesen

## Protokoll: Pumpen Set-Up

Protokoll entsprechend der Herstellerangaben adaptiert.

Pumpen Set-Up während der 2-stündigen Inkubationszeit der besiedelten  $\mu$ -Slides durchführen.

### Fluidic Units anschließen

- Sterile Filter, Gummidichtungen und Perfusions-Sets bereitlegen
- Spritzenreservoir mit jeweils 13 ml vorgewärmten EC-Medium befüllen
- Fluidic Units (FU) an Luftdruckpumpe (per USB mit PC verbunden) anschließen und im Inkubator positionieren

### Luftblasen entfernen

- Spritzenreservoir manuell auf 5 ml equilibrieren
- Einstellung für PumpControl Software zunächst 20 mbar und Manual Control (Klemme verwenden bei mehreren Units!)
- Einstellungen verändern auf 50 mbar, Automatic Cycle. Mind. 30 Minuten laufen lassen

### Klemm-Test (überprüft richtigen Aufbau)

- Jeweils eine Seite der Silikonschläuche eines Fluidic Units abklemmen. Pumpe sollte hierbei stoppen.

### Kalibrierung der Flussrate

- Perfusions-Set und  $\mu$ -Slide in PumpControl Software auswählen
- Viskosität Endothelzellmedium: 0,0072; Wandschubspannung: 10 dyn/cm<sup>2</sup>
- Spritzenreservoir auf 5 ml equilibrieren, Zyklus starten
- Zeit messen, in der 2 ml des Spritzenreservoirs gefüllt/geleert werden

Formel zur Berechnung der Flussrate (III):

$$\theta \left[ \frac{ml}{min} \right] = \frac{2 ml \cdot 60 \frac{s}{min}}{\text{Mittelwert } t [s]} \quad \text{(III)}$$

Tabelle 12: Formblatt zur Kalibrierung der Flussrate

FU	Zeit <sub>1</sub> [s]	Zeit <sub>2</sub> [s]	Zeit <sub>3</sub> [s]	Zeit <sub>4</sub> [s]	Mittelwert	Flussrate
1						
2						
3						

## Protokoll: Versuchsdurchführung Flusseexperiment

- Vorher
- ECs auftauen, Medienwechsel regelmäßig durchführen
  - Maßnahmen für weniger Gasblasen:  $\mu$ -Slides, Perfusions-Sets und abgefülltes EC-Medium einen Tag vorher in den Inkubator
  - Gummidichtungen für Filter 10 Minuten in Ethanol sterilisieren

### Tag 1

1. Trypsinieren der EC
2. Zellzählung und Bestimmung der Zell-/EC-Medium-Suspension (300.000 Zellen/ $\mu$ -Slide)
3. Slides besiedeln  
 $\mu$ -Slides mit 150  $\mu$ l befüllen, für 30 Minuten inkubieren, Reservoirs mit je 60  $\mu$ l befüllen und für weitere 2 Stunden inkubieren
4. Pumpen Set-Up durchführen
5. Nach 2 Stunden Inkubationszeit: Adhärenz und Konfluenz der Zellen unter dem Lichtmikroskop überprüfen
6. Experimente starten und Zeit notieren

### Tag 2 (bzw. 3 oder 4)

Immunfluoreszenz-Protokoll vorbereiten ca. 30 Minuten vor Ende des Flussversuches:

1. Paraformaldehyd, PBS, Puffer A + B bereitstellen
2. Feuchtkammer vorbereiten

Ende des Flussversuches:

1.  $\mu$ -Slide unter dem Lichtmikroskop betrachten
2.  $\mu$ -Slides für Immunfluoreszenz fixieren
3. Zunächst Live/Dead-Färbung der statischen und dynamischen Proben durchführen
4. Immunfluoreszenz fortführen

### Tag 3 (bzw. 4 oder 5)

1. Immunfluoreszenz fortführen

## V. Vorveröffentlichungen

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in folgenden Originalartikeln und Kongressbeiträgen publiziert:

### Artikel in Fachzeitschrift:

- **Grefen, L.,** König, F., Grab, M., Hagl, C., Thierfelder, N., *Pericardial tissue for cardiovascular application: an in-vitro evaluation of established and advanced production processes.* Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2018. **29**(11): p. 172.

### Kongressbeiträge:

- **Grefen, L.,** König, F., Grab, M., Hagl, C., Thierfelder, N., *Comparitive in-vitro assessment of treatment effects on pericardial tissue for cardiovascular application.* Poster – Cardiovascular Research Days 2020, Weissensee, Österreich / European Surgery, 2020. **52**(1): p. 1-23
- **Grefen, L.,** Thierfelder, N., Grab, M., Hagl, C., König, F., *Processing pericardial tissue for cardiovascular surgery – Highlighting the importance of a comprehensive quality management.* Vortrag – BMT 2018, Aachen / Biomedical Engineering / Biomedizinische Technik 2018; **63**(s1): S216
- Grab, M., König, F., Kienle, E., Kuster, E., Starnecker, F., Schepp, N., Emrich, J., **Grefen, L.,** Menold, P., Kilzer, M., Steinl, B., Wimmer, B., Hagl, C., Thierfelder, N., *A toolbox of single factors and their influence on successful decellularization processes.* Poster – Termis Jahrestagung 2018, Kyoto
- **Grefen, L.,** König, F., Grab, M., Hagl, C., Thierfelder, N., *Processing pericardial tissue for cardiovascular surgery – Highlighting the importance of a comprehensive quality management.* Vortrag – MMS ScienceCon 2018, München

- **Grefen, L.**, Thierfelder, N., Grab, M., Hagl, C., König, F., *Pericardial tissue for cardiovascular application – An in-vitro evaluation of established and advances production processes*. Poster – Munich Heart Alliance Winter Meeting 2018, München

**Auszeichnungen:**

- 5. Platz im Studentenwettbewerb der DGBMT 2018 in Aachen: Linda Grefen; (Ludwig-Maximilians-Universität München - Thierfelder): *Processing pericardial tissue for cardiovascular surgery*

## VI. Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Christian Hagl für die Unterstützung und die Möglichkeit in der Herzchirurgischen Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München promoviert haben zu dürfen. Hierbei möchte ich mich insbesondere für die Gelegenheit der Teilnahme an Fachkongressen und die Unterstützung bei diversen Kongressbeiträgen bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt den Betreuern meiner Doktorarbeit, Herrn Dr. med. Nikolaus Thierfelder und Herrn Dipl.-Ing. Fabian König. Während meiner Arbeit im Labor, konnte ich meine Faszination für wissenschaftliches Arbeiten entdecken und dabei maßgeblich von der stetigen Betreuung und der außerordentlichen fachlichen Erfahrung beider profitieren. Hierbei konnte ich nicht nur das selbstständige, problemorientierte Arbeiten im Labor erlernen, sondern auch das Präsentieren meiner Ergebnisse in Form von Posterbeiträgen oder Vorträgen auf Fachkongressen. Für die Möglichkeit des selbstständigen Verfassens meines ersten Fachartikels und die wertvollen Erfahrungen, die damit einhergehen, bin ich den beiden sehr dankbar. Die Zusammenarbeit mit Herrn Dr. med. Nikolaus Thierfelder und Herrn Dipl.-Ing. Fabian König hat den Verlauf meines Medizinstudiums entscheidend geprägt und ich bin äußerst dankbar für die außerordentlich gute Betreuung und Wegweisung während dieser Zeit, in der ich sehr viel von ihnen lernen durfte.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn M. Sc. Maximilian Grab für die Unterstützung während der Zeit im Labor und während des Verfassens dieser Promotion bedanken. Sein technisches Verständnis und seinen fachlichen Rat habe ich immer sehr geschätzt und die regen Diskussionen über neue Innovationen haben meinen wissenschaftlichen Horizont um einige Ideen erweitert.

Während der Zeit ihres Projekts hat mich Frau Assoc.-Prof. Priv. Doz. Mag. Ph.D. Barbara Messner tatkräftig unterstützt. Durch ihre langjährige wissenschaftliche Erfahrung konnte sie mir zu immer neuen Ansätzen der Problemlösung verhelfen und mich in den richtigen Momenten durch ihre Leidenschaft für das wissenschaftliche Arbeiten motivieren.

Ebenfalls möchte ich Frau Eike Petersen, Frau Barbara Steinl und Frau Bettina Wimmer danken. Zu Beginn meiner Laborarbeit führten mich Frau Eike Petersen und Frau Barbara

Steinl in die gängigsten Methoden des Labors ein. Die Grundzüge des fehlerfreien und reproduzierbaren Arbeitens sowohl in der Zellkultur als auch bei Färbemethoden und der REM-Analyse lernte ich unter ihrer Anleitung. Bei Fragen zu Durchführungen oder der Etablierung neuer Methoden hatten Frau Barbara Steinl und Frau Bettina Wimmer immer ein offenes Ohr, konstruktive Vorschläge und motivierende Worte. Dafür möchte ich mich an dieser Stelle ganz herzlich bedanken.

Weiterhin möchte ich meinen Kolleginnen und Kollegen im Labor danken. Neben unzähligen wissenschaftlichen Diskussionen und der konstruktiven Generierung neuer Ideen gab es auch immer genug Zeit für den ein oder anderen Kaffee und den freundschaftlichen Austausch im Labor. Danke für die tolle Stimmung während der Zeit im Labor.

Bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Zentralsterilisation des Klinikums sowie dem Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung möchte ich mich für die hilfreiche Unterstützung und die Mitnutzung der Gerätschaften zur Sterilisation bzw. zur Paraffineinbettung zahlreicher Proben bedanken.

Abschließend möchte ich mich besonders bei meiner Familie für den jahrelangen, bedingungslosen Rückhalt und die Möglichkeit des Medizinstudiums in München bedanken. Das Studium, geschweige denn diese Dissertation, wären ohne die tatkräftige Unterstützung jeglicher Art meiner Eltern nicht möglich gewesen. Ebenfalls danke ich meinen Freunden für das entgegengebrachte Verständnis, die vielen motivierenden Worte und die Ablenkung vom Alltag.



LUDWIG-  
MAXIMILIANS-  
UNIVERSITÄT  
MÜNCHEN

Promotionsbüro  
Medizinische Fakultät



## Eidesstattliche Versicherung

---

Name, Vorname

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

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

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

**Linda Grefen**

---

Ort, Datum

---

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand