

Aus der Herzchirurgischen Klinik und Poliklinik

Klinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Christian Hagl

**Optimierung bestehender Dezellularisationsprotokolle:
Effizienzerhöhung durch Feinabstimmung von Detergenzien,
Strömungsrichtung und Ultraschall**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Paula Luisa Menold

aus

Leonberg

2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Christian Hagl

Mitberichterstatter: PD Dr. med. Jan Abicht

Mitbetreuung durch: Dipl. -Ing. Fabian König

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 04.05.2022

Inhaltsverzeichnis

1	Kurzzusammenfassung	5
2	Abkürzungsverzeichnis	6
3	Einleitung.....	7
4	Material und Methoden	24
4.1	Materialgewinnung und -vorbereitung	24
4.1.1	Materialgewinnung	24
4.1.2	Materialvorbereitung	24
4.2	Herstellung der Dezellularisationslösungen.....	27
4.3	Aufbau der Dezellularisationsvorrichtung.....	27
4.4	Ablauf des Dezellularisationsprozesses.....	29
4.5	Nachbehandlung der Perikarde mit DNase	32
4.6	Nomenklatur der Proben.....	33
4.7	Auswertungsmethoden	34
4.7.1	Bestückung der Objektträger	34
4.7.2	DAPI-Färbung.....	35
4.7.3	Hämatoxillin-Eosin-Färbung	36
4.7.4	Pikro-Siriusrot-Färbung	36
4.7.5	Rasterelektronenmikroskopie	37
4.7.6	Pentachrom-Färbung.....	39
4.7.7	Untersuchung der Zugfestigkeit	40
4.7.8	Erläuterung des Scoring-Systems	40
4.7.9	Statistische Auswertung	42
5	Ergebnisse.....	43
5.1	DAPI-Färbung.....	45
5.2	Hämatoxillin-Eosin-Färbung	52
5.3	Pikro-Siriusrot-Färbung	56
5.4	Rasterelektronenmikroskopie	61
5.5	Pentachrom-Färbung.....	64
5.6	Untersuchung der Zugfestigkeit	65
6	Diskussion	68
7	Zusammenfassung.....	79
8	Literaturverzeichnis	81
9	Anhang.....	90

Inhaltsverzeichnis

9.1	Materialverzeichnis	90
9.2	Färbeprotokolle in Einzelschritten	93
9.3	Medienzusammensetzung	95
9.4	Referenzbilder	96
9.5	Abbildungsverzeichnis	100
10	Danksagung	101

1 Kurzzusammenfassung

Zielsetzung

Im Rahmen dieser Dissertation wurden Rinderherzbeutel dezellularisiert und anschließend hinsichtlich ihrer biologischen und mechanischen Eigenschaften untersucht. Ziel war es zu eruieren, welche Konstellation aus Dezellularisationsdauer, Konzentration der Dezellularisationslösungen sowie mechanischen und enzymatischen Einflussfaktoren sich am besten für die Herstellung einer biologischen Herzklappe eignet.

Material und Methoden

Mithilfe verschiedener Dezellularisationslösungen wurden Rinderherzbeutel unter temporärem Ultraschalleinfluss innerhalb zweier verschiedener Vorrichtungen dezellularisiert. Im Anschluss an die Dezellularisation erfolgten stets zehn Spülgänge, um restliche Detergenzien aus dem Gewebe zu entfernen. Im Rahmen der zweiten Versuchsreihe wurden die Proben im Anschluss an die Spülgänge zusätzlich mit einer DNase-Lösung behandelt. Anschließend wurden die Nativproben, die dezellularisierten sowie die mit DNase nachbehandelten Proben untersucht. Dabei erfolgte die Analyse mittels immunhistochemischer Färbungen, der Rasterelektronenmikroskopie sowie Zugversuchen zur Ermittlung der mechanischen Stabilität.

Ergebnisse

Die vollständige Dezellularisation gelang mithilfe einer Kombination von Natrium-Dodecyl-Sulfat und Natrium-Desoxycholat in einem 4-stündigen Dezellularisationszyklus sowie einer Kombination aus Natrium-Dodecyl-Sulfat und Triton X. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass zu hohe Konzentrationen an Natrium-Dodecyl-Sulfat sowie zu lange Dezellularisationszyklen die Extrazellulärmatrix stark schädigen.

Zusammenfassung

Mithilfe der dargestellten Dezellularisationsprotokolle war es möglich, bovines Perikard vollständig zu dezellularisieren. Unsere Ergebnisse weisen ferner darauf hin, dass im Rahmen zukünftiger Forschungsansätze ein besonderer Fokus auf die Beschaffenheit und die Eigenschaften der Perikarde als Grundmaterial zu legen ist und die Dezellularisationsprotokolle an diese Materialgegebenheiten anzupassen sind. Überdies sollte die enzymatische Nachbehandlung angewendet werden, um eine möglichst effektive und schonende Dezellularisation zu ermöglichen.

2 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
Abb.	Abbildung
ca.	circa
DAPI	Diamidino-Phenylindol
Dez.	Dezellularisation
DNase	Desoxyribonuklease
ECM	Extrazellulärmatrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
Engl.	englisch
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
i.d.R.	In der Regel
IGV	insulin-like growth factor
Kap.	Kapitel
M	molar
OP	Operation
PBS	phosphate-buffered saline
REM	Rasterelektronenmikroskopie
SD	Sodium-Desoxycholat
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
TAVI	transcatheter aortic valve implantation
TE	Tissue Engineering
Triton X	tert-octylphenyl-polyoxyethylene
VEGF	vascular endothelial growth factor

3 Einleitung

Herz-Kreislauf-Erkrankungen stellen heute nicht nur in den Industrienationen, sondern auch weltweit die häufigste Todesursache dar [1]. Dabei spielen neben der koronaren Herzkrankheit besonders Herzklappenerkrankungen eine wesentliche Rolle. Während in den westlichen Industrienationen vor allem altersbedingte Degenerationsprozesse für die Klappenerkrankungen verantwortlich sind, ist die Ursache in Entwicklungsländern in den meisten Fällen das rheumatische Fieber [2, 3]. Hinzu kommen angeborene Klappenfehlbildungen, die entweder Teil einer genetischen Erkrankung sind oder einen Fehler in der embryonalen Entwicklung der jungen Patienten darstellen [4].

Das Feld der Klappenerkrankungen kann in Klappenstenosen und Klappeninsuffizienzen aufgeteilt werden. Im Rahmen von Klappenstenosen ist am häufigsten die Aortenklappe betroffen, da diese durch ihre Lokalisation im arteriellen System höheren Drücken ausgesetzt ist. Bei einer Klappenstenose ist die Öffnungsfläche der Herzklappe reduziert, Grund hierfür ist in der Regel eine altersbedingte Kalzifizierung der Klappe, die zu einer verminderten Flexibilität und damit zu einer verringerten Klappenöffnungsfläche führt [5]. Diese kann im Rahmen der häufigen Aortenklappenstenose von $3,5 \text{ cm}^2$ auf unter $0,6 \text{ cm}^2$ fallen [6]. In der Folge muss das Herz einen höheren Druck aufbauen und mehr Kraft aufwenden, um das Blut durch die verengte Ausstrombahn zu pumpen. Daraus resultiert eine konzentrische Hypertrophie des linken Ventrikels, die schließlich zu einer Schwächung der Pumpfunktion und letztlich zum Herzversagen führt. Bis zu einer Klappenöffnungsfläche von ca. $1,0 \text{ cm}^2$ kann das Herz die verminderte Klappenfunktion durch eine Steigerung von Kontraktionskraft und Herzfrequenz kompensieren. Sind diese Kompensationsmechanismen allerdings ausgeschöpft, entwickelt der Patient Symptome einer Herzinsuffizienz (Schwäche, Synkope, Angina-Pectoris-Beschwerden) und seine Prognose verschlechtert sich erheblich. Die Lebenserwartung zu diesem Zeitpunkt beträgt dann noch etwa 2-3 Jahre [5].

Im Rahmen von Klappeninsuffizienzen schließt die Klappe nicht vollständig, was zu einer Regurgitation von Blut in die vorgeschaltete Herzhöhle führt. Bei der häufigsten Form, der Mitralklappeninsuffizienz, schwenkt die Klappe während der Systole in den linken Vorhof zurück. In der Folge wird nur ein Teil des eigentlichen Schlagvolumens in die Blutbahn ausgeworfen, der andere gelangt durch die insuffiziente Klappe zurück in den Vorhof. Dadurch muss der linke Ventrikel neben dem normalen Schlagvolumen zusätzlich das regurgitierende Blut mobilisieren und es kommt folglich zu einer dauerhaften Volumenbelastung des linken Ventrikels. Durch die resultierende Dilatation des linken Ventrikels sinkt dessen Kontraktionskraft. Ein Vorwärtsversagen, welches sich durch Schwäche

Einleitung

und Belastungsdyspnoe äußert, ist die Folge [7]. Darüber hinaus kommt es zum Rückwärtsversagen, da das aufgestaute Blut aus dem linken Vorhof zu einem pulmonalen Hypertonus führt, der neben einem Lungenödem auch eine Rechtsherzbelastung hervorrufen kann. Kann der Körper die pathologischen Vorgänge durch die Mitralklappeninsuffizienz nicht mehr kompensieren, kommt es sowohl zu einem Links- als auch zu einem Rechtsherzversagen [5].

Laut Deutschem Herzbericht liegt die derzeitige Morbiditätsziffer der degenerativen Klappenerkrankungen bei 119 stationären Patienten pro 100.000 Einwohner (Stand 2017). Im Zuge des demographischen Wandels nahm die Anzahl der degenerativen Klappenerkrankungen innerhalb der vergangenen Jahrzehnte deutlich zu. Zwischen 1995 und 2017 stieg die Zahl der Patienten, die unter einer Klappenerkrankung leiden, im Schnitt um 72,6% an. Betrachtet man jedoch die unterschiedlichen Altersgruppen so wird deutlich: Während bei den unter 75-jährigen ein Rückgang an Klappenerkrankungen zu verzeichnen war, stieg diese Zahl in der Gruppe der über 75-jährigen um 183,6% an. [8]

Bisher lassen sich degenerative Klappenerkrankungen weder verhindern noch ursächlich behandeln. Meist entwickelt der Patient erst bei fortgeschrittener Erkrankung Symptome. Sobald diese jedoch auftreten, ist ein rasches operatives Vorgehen nötig, um die Entstehung oder das Fortschreiten einer Herzinsuffizienz zu verhindern. Insbesondere bei Erkrankungen der Aortenklappe ist der Ersatz der funktionsuntüchtigen Klappe dann zumeist unumgänglich [7].

Historisch betrachtet ist der routinemäßige Ersatz einer funktionsuntüchtigen Herzklappe eine Neuheit. Noch vor 70 Jahren bedeutete ein spätes Erkrankungsstadium für die Patienten den bald bevorstehenden Tod. Zu dieser Zeit stellte das rheumatische Fieber den häufigsten Grund für das Versagen von Herzklappen dar [9]. Eine daraus resultierende Mitralklappenstenose war nicht therapierbar und führte neben der auf ein Minimum reduzierten Belastbarkeit zum baldigen Versterben der Patienten. Damalige Therapieansätze beinhalteten die Valvotomie nach Elliot Cuttler und Samuel Levine (erstmalig 1923), bei der über die Herzspitze ein hakenförmiges Instrument in den Ventrikel eingeführt wurde, um damit die stenosierte Mitralklappe zu zerstören [10]. Zwangsläufig wurde so aus der stenosierten eine insuffiziente Mitralklappe, diese wurde zu jener Zeit allerdings noch als weniger pathologisch betrachtet [11]. Der zweite Ansatz zur Behandlung der Mitralstenose war die sog. Fingerdilatation nach Henry Souttar (erstmalig 1925), bei welcher der Zeigefinger des Chirurgen von intraatrial die stenosierte Mitralklappe „aufbrach“ [12]. Obwohl sich Souttars Patientin komplikationslos von dem Eingriff erholte, blieb die erhoffte Anerkennung für Souttar aus und der Ansatz setzte sich zunächst nicht durch. Erst zwei Jahrzehnte später, im Jahr 1948, erprobten Dwight Harken und Laurence Ellis – ohne Wissen über Souttars frühere Ansätze – die Fingerdilatation erneut an Patienten. Die Methode entwickelte sich daraufhin zur Standardprozedur bei leichten bis

mittelschweren Mitralklappenstenosen. Problematisch blieb, dass in den weit häufigeren Fällen die vom rheumatischen Fieber stenosierte Mitralklappe so verengt war, dass ein Klappenersatz die einzige theoretische Option darstellte [13].

Im September 1952 implantierte Charles A. Hufnagel die erste künstliche Herzklappe in einen Menschen [14]. Die Prozedur fand noch ohne Einsatz der Herz-Lungen-Maschine statt, diese wurde erst im darauffolgenden Jahr von John Gibbon erfunden und machte damit erstmals die Operation am offenen, stillstehenden Herzen möglich [15]. Da zuvor noch kein offenes Verfahren am Herzen zur Verfügung stand, wurde Hufnagels Prothese in die Aorta descendens implantiert. Sie entsprach einem Kugelrückschlagventil, bestehend aus einem in der Aorta fixierten Plexiglaszylinder und einer innerhalb des Zylinders mobilen Nylonkugel [14]. Zwar legte Hufnagel damit den Grundstein für die Implantation von Klappenprothesen, darauffolgende Versuche seitens verschiedener Forschungsgruppen, eine Klappe auf Höhe der ursprünglichen Klappenebene zu implantieren, scheiterten jedoch stets an der Thrombogenität der Klappen, die binnen weniger Wochen durch zerebrale Infarkte zum Versterben der Versuchstiere führte [16]. Eine antikoagulatorische Therapie nach der Operation führte jedoch stets zu tödlich verlaufenden hämorrhagischen Zwischenfällen. In den darauffolgenden Jahren erfolgten mehrere Versuche, eine Klappenprothese zu implantieren, doch keiner der Patienten überlebte länger als drei Monate [16, 17]. Schließlich entwickelte der Ingenieur Lowell Edwards, der selbst während seiner Kindheit an rheumatischem Fieber erkrankt war, zusammen mit dem Herzchirurgen Albert Starr eine Kugelprothese, mit welcher die antikoagulatorische Therapie soweit hinausgezögert werden konnte, dass eine Hämostase vorher stattfinden konnte [11, 16]. Die Starr-Edwards-Klappe, bestehend aus einem Methyl-Methacrylat-Käfig und einem Silikonball, wurde erstmals im August 1960 in einen Menschen implantiert. Die 33-jährige Patientin starb zehn Tage nach der Implantation an einer Luftembolie, die zwar durch die Operation, nicht jedoch durch die Klappenprothese selbst hervorgerufen wurde. Die zweite Implantation fand nur kurz danach, im September 1960, statt. Philip Amundson, der trotz zwei vorangegangener Kommissurotomien unter einer massiven Mitralkalkung und einer daraus resultierenden Herzinsuffizienz der Stufe NYHA 4 litt, erhielt das Implantat und galt nach 3-monatigem Überleben als erster Patient, bei dem die erfolgreiche Implantation einer künstlichen Herzklappe gelungen war [16]. Amundson lebte weitere 15 Jahre mit dem künstlichen Klappenersatz [18]. Nachdem Edward und Starr die ersten sechs erfolgreichen Implantationen ihrer Klappe im Jahr 1961 publiziert hatten, begann der Siegeszug ihres Modells und die Klappenersatzoperation etablierte sich als probate Therapieoption bei Klappenstenosen und -insuffizienzen. In den darauffolgenden 20 Jahren stellte das Starr-Edwards-Modell 6120 die Standard-Prothese bei Klappenersatzoperationen dar [19].

Parallel zur Erfindung der mechanischen Herzklappe wurden auch biologische Materialien für den Einsatz als Herzklappenprothese untersucht. Anfangs wurden hierfür zunächst post mortem entnommene Spenderklappen verwendet [20]. Gordon Murray gilt als einer der Pioniere bei der Implantation biologischer Klappen. 1956 implantierte er erstmals erfolgreich eine Spenderklappe in einen Patienten mit schwerer Aorteninsuffizienz, weitere Operationen folgten [21, 22]. Gleichzeitig untersuchten verschiedene Forschungsgruppen die Kompatibilität von tierischem mit menschlichem Gewebe und die Übertragbarkeit von Gewebe von einer Säugetierart auf eine andere [23]. Carpentier fand dabei heraus, dass Gewebe vom Schwein dem menschlichen am stärksten ähnelte [24]. Anfang der 60er Jahre wurde erstmals ein Konservierungsverfahren vorgestellt, bei dem mithilfe von Aldehydverbindungen eine Sterilisierung und Konservierung biologischen Gewebes erzielt werden konnte. Zunächst fand dieses Verfahren nur in der Gerberei Anwendung [25, 26]. Es dauerte einige Jahre bis man den möglichen medizinischen Nutzen bei der Bearbeitung tierischer Produkte entdeckte und damit begann, tierische Gewebe mit Aldehydverbindungen zu bearbeiten und diese in Menschen zu implantieren. Marian Ionescu war hierbei einer der Ersten, 1971 implantierte er erstmals ein glutaraldehydfixiertes Xenograft in einen Menschen [27].

Auf diese Weise entstanden in den 50er- und 60er-Jahren die beiden großen Säulen der Herzklappenchirurgie: Die biologische und die mechanische Klappe. Sie stellten in den folgenden Jahrzehnten den Standard bei der Behandlung schwerer Klappendysfunktionen dar. Nichtsdestotrotz bot keine der beiden Säulen eine Klappe, die dem Patienten für den Rest seines Lebens als adäquater Klappenersatz dienen würde. Die Eigenschaften der „idealen Klappe“ wurden erstmals in den 50ern von Dwight Harken formuliert. Seine „ten commandments“ gelten noch heute als Richtschnur bei der Entwicklung von Herzklappenprothesen [28]. Neben einer einfachen Handhabung muss nach Harken die ideale Klappe die hämodynamischen Eigenschaften einer nativen Klappe aufweisen und sollte gleichzeitig keinen Bildungsort für Thromben darstellen. Sie muss darüber hinaus ein Leben lang halten und darf den Patienten nicht stören [29].

Natürlich sind diese Anforderungen vereinfacht dargestellt, nichtsdestotrotz zeigen sie auf, welche Kernproblematik hinter der Entwicklung von Klappenprothesen steckt. Rund 70 Jahre nach Postulierung dieser Eigenschaften ist die Problematik trotz erheblicher Fortschritte noch immer eine ähnliche. Und auch heute muss bei der Operationsindikation für einen Klappenersatz zwischen einer mechanischen und einer biologischen Klappe entschieden werden. Dabei müssen das Für und Wider der beiden Klappen gegeneinander abgewogen werden. [30]

Mechanische Klappen

Heutzutage werden mechanische Klappen aus künstlichen Materialien wie Polyesterverbindungen, Titan oder Carbon hergestellt, in der Regel werden Zwei-Flügel-Klappen implantiert [31]. Ihr größter Vorteil ist die durch das stabile Grundmaterial hervorgerufene fast unbegrenzte Lebensdauer, aus der die seltene Notwendigkeit einer Reoperation resultiert [32]. Gleichzeitig bringt die Implantation einige nicht unerhebliche Nachteile mit sich. Zunächst können mechanische Herzklappen nur im offenen Verfahren implantiert werden. Dabei wird der Brustkorb eröffnet und nach Freilegung des Herzens dieses über eine kardioplege Lösung stillgelegt. Entsprechend erfordert dieses offene Verfahren stets die Verwendung einer Herz-Lungen-Maschine, um den Körperkreislauf auch bei stillstehendem Herz aufrechtzuerhalten. Nach Stilllegung des Herzens erfolgt die Implantation der künstlichen Klappe über einen der Vorhöfe oder die Aorta [33]. Neben dem invasiven Implantationsverfahren besteht ein weiterer Nachteil in der lebenslangen antikoagulatorischen Therapie, die der Einsatz einer mechanischen Klappe nötig macht. Eine Antikoagulation erhöht die Gefahr von Blutungsereignissen, ein Risiko, das besonders bei alten, sturzgefährdeten Patienten ins Gewicht fällt [34, 35]. Diesem Faktor gilt es besondere Beachtung zu schenken, da insbesondere ältere Patienten mit vielen Vorerkrankungen und einer entsprechenden Vielzahl an Dauermedikamenten den Großteil der Klappenerkrankten ausmachen. Für diese Patienten kommt daher häufig die Implantation einer mechanischen Klappenprothese nicht infrage. Überdies steigt bei Nichteinnahme der antikoagulatorischen Medikamente das Risiko eines thrombembolischen Ereignisses rapide an [35]. Bei jungen Patientinnen macht diese Gratwanderung zwischen dem Risiko eines thrombembolischen Ereignisses und dem einer Blutung darüber hinaus eine Schwangerschaft äußerst riskant und gefährdet das Überleben des ungeborenen Kindes sowie das der Mutter [36]. Nicht zuletzt gilt es zu erwähnen, dass mechanische Klappen ein hörbares Geräusch erzeugen („Prothesenklick“), welches je nach Bauart der Klappe und psychischer Verfassung des Patienten einen mehr oder weniger großen Einfluss auf die Lebensqualität haben kann. Jüngste Studien zeigen sogar, dass dieses Geräusch bei fast 25% der Patienten mit mechanischem Klappenersatz zu einer Beeinträchtigung des Schlafverhaltens führt [37].

Biologische Klappen

Biologische Klappen benötigen aufgrund ihrer Ähnlichkeit zur menschlichen Klappe und ihrer hervorragenden hämodynamischen Eigenschaften keine dauerhafte Antikoagulation. Sie werden meist aus Schweine- oder Rindergewebe gefertigt (sog. Xenografts). Dabei kann zum einen die Klappe selbst verwendet werden, was häufig bei den porcinen (vom Schwein stammenden)

Implantaten der Fall ist, da die anatomischen Maße eines Schweineherzens denen eines menschlichen Herzens ähneln [24, 38]. Zum anderen kann auch aus dem Herzbeutel (Perikard) Gewebe zur Herstellung eines Klappenimplantats gewonnen werden, wobei die einzelnen Klappensegel aus der Gewebefläche ausgeschnitten werden. Dabei kann die Größe der einzelnen Klappensegel den genauen anatomischen Eigenschaften des Empfängers angepasst werden [39]. Schließlich kann auch die menschliche Herzklappe eines Spenders als Transplantat (sog. Homograft) verwendet werden, wie bei allen Organen muss hierbei jedoch zunächst die Kompatibilität mit dem Empfänger sichergestellt werden [40, 41].

Einer der wichtigsten Vorteile von biologischen Klappen gegenüber den mechanischen ist die Tatsache, dass die Implantation einer biologischen Klappe heute überwiegend kein offenes Operationsverfahren mehr benötigt, sondern der Einsatz der neuen Klappe minimalinvasiv über ein peripheres Gefäß oder die Herzspitze möglich ist. Die „transcatheter aortic valve implantation“ (TAVI) wurde erstmals 2002 vom Herzchirurgen Alain Cribrier angewendet - damals bei einem 57-jährigen Patienten, der für ein offenes Vorgehen aufgrund seiner schwerwiegenden Vorerkrankungen nicht infrage kam [42]. Beim TAVI-Verfahren wird die biologische Klappenprothese in einem Stent eingespannt. Dieser wird dann entweder über die Herzspitze oder über eine periphere Arterie (i.d.R. Arteria femoralis) bis auf Klappenhöhe vorgeschoben. Hat der Katheter die ideale Position erreicht, wird der Stent aufgespannt. Dies geschieht entweder über ein selbstentfaltendes System (self-expandable TAVI) oder mithilfe eines Ballons, der auf Klappenebene aufgepumpt wird und so den Stent entfaltet. Im Zuge dieses Entfaltungsprozesses wird die alte, funktionsuntüchtige Klappe durch den Stent an den Rand der Aorta gedrückt, während sich die neue Klappenprothese innerhalb des Stents entfaltet und in dieser Position fixiert wird [43, 44]. So kann ohne die Notwendigkeit einer Vollnarkose, einer Sternotomie und der anschließenden Kardioplegie eine neue Aortenklappe eingesetzt werden – ein wichtiger Schritt bei der Behandlung alter bzw. vorerkrankter Patienten. Das TAVI-Verfahren ermöglicht es heute, multimorbide Patienten risikoarm mit einer biologischen Aortenklappe zu versorgen. Dies spiegelt sich auch in der Statistik wider. Von allen Patienten, die im Jahr 2017 einen Aortenklappeneingriff erhielten, litt rund ein Drittel an Diabetes mellitus und über die Hälfte an einer mittelschweren Herzinsuffizienz [8].

Doch obwohl die Implantation eines Xenografts mithilfe des TAVI-Verfahrens eine Revolution in der Herzklappenchirurgie darstellt, ist es noch nicht als das ideale Verfahren anzusehen, da auch diese Herangehensweise mit einigen nicht unerheblichen Nachteilen behaftet ist. Da das menschliche Immunsystem über HLA-Antigene akribisch zwischen eigenem und fremdem Gewebe unterscheidet, muss bei der Implantation von biologischen Klappenprothesen gewährleistet werden, dass es nicht zu einer immunologischen Abstoßungsreaktion kommt [45]. Zu diesem Zweck werden bisherige

Klappenprothesen vor der Implantation fixiert. Bei diesem Vorgang wird das Gewebe einer glutaraldehydhaltigen Lösung ausgesetzt [46]. Durch diesen Fixierungsprozess kommt es im Gewebe zu einer Quervernetzung, dem cross-linking der Kollagenfibrillen. Dabei werden das Gewebe und die darin enthaltenen Antigene gewissermaßen nach außen versiegelt [47-49]. Die Glutaraldehydfixierung senkt so die Immunogenität des Gewebes und macht damit die Implantation eines solchen Xenografts möglich. Jedoch gehen mit der Glutaraldehydfixierung auch einige Nachteile einher. Zum einen wird die Immunogenität des Klappengewebes durch die Glutaraldehydfixierung lediglich gesenkt, es verbleiben jedoch Proteine wie z.B. α -Gal Epitope auf der Klappenoberfläche, die zu einer Immunreaktion im Körper des Empfängers führen. Die Einwanderung von Entzündungszellen in das implantierte Klappengewebe ist die Folge [50]. Darüber hinaus stellen die Aldehydgruppen in den cross-links *in-vivo* eine Bindungsstelle für Kalzium-Ionen dar. Die ins Gewebe einwandernden Kalzium-Ionen kristallisieren zu Kalziumphosphat-Kristallen aus [51]. Dieser entzündliche Kalzifikationsprozess bringt mehrere negative Effekte mit sich. Zunächst versteift die Klappe, wodurch häufig auch die Klappenöffnungsfläche verringert wird, es kommt entsprechend zu einer Restenosierung der Klappe. Darüber hinaus können Risse in den einzelnen Klappensegeln entstehen, die in der Folge zur Insuffizienz der Klappe führen [39, 51]. Lösen sich die kalzifizierten Auflagerungen und geraten so ins arterielle Gefäßsystem, können sie im schlimmsten Fall weiter stromabwärts einen akuten Gefäßverschluss hervorrufen. Da die ersten großen Abgänge der Aorta vor allem der Versorgung des Gehirns dienen, kommt es dabei häufig zu einem zerebralen Infarkt [39].

Ferner unterbindet die Fixierung eine mögliche Besiedelung mit Empfängerzellen. Diese Besiedelung stellt jedoch einen Schlüsselfaktor für das *in vivo*-Verhalten der Klappe dar. Die Besiedelung mit Empfängerzellen würde bedeuten, dass der Körper das Implantat als inhärent betrachtet, und es auch entsprechend behandelt. Dies würde nicht nur Anpassungs- und Reparaturprozesse innerhalb der Klappe ermöglichen, es würde auch bedeuten, dass die Klappe mit dem Körper mitwächst, ein Faktor, der besonders in der Pädiatrie von Bedeutung ist. Denn durch das Wachstum der jungen Patienten sind derzeit noch zahlreiche Re-Operationen nötig, sobald das Kind aus der Klappe „herausgewachsen“ ist [52]. So werden die momentan verwendeten, glutaraldehydfixierten Klappen zwar vom Körper toleriert, jedoch nicht als körpereigen wahrgenommen [49]. Das bedeutet, dass die Klappenimplantate im Körper des Empfängers weder repariert werden, noch wachsen sie gemeinsam mit dem Patienten und seinem Herz [49]. Durch die nicht stattfindenden Reparaturprozesse in Kombination mit der strukturellen Schädigung durch den Fixierungsvorgang weisen biologische Klappenimplantate selten eine Lebensdauer von über 15 Jahren auf. Danach wird der Einsatz einer neuen Klappe im Rahmen einer erneuten operativen Intervention nötig [52, 53].

Aufgrund dieser Lebensdauer mussten in den vergangenen Jahrzehnten die Leitlinien in Bezug auf das Patientenalter bei Implantation einer künstlichen Herzklappe mehrfach angepasst werden. Derzeit wird Patienten unter 60 Jahren der Einsatz einer mechanischen Herzklappe empfohlen [54]. Grund hierfür ist zum einen die Tatsache, dass jüngere Patienten über ein aktiveres Immunsystem verfügen, wodurch es deutlich schneller zur Kalzifizierung und zum Funktionsverlust der Klappe kommt [39, 55]. So variiert die mittlere Überlebensdauer einer biologischen Herzklappe zwischen durchschnittlich 11 Jahren bei 25-jährigen Patienten bis zu 25 Jahren bei 65-jährigen Patienten [54]. Zum anderen steigt aufgrund des demographischen Wandels und der steigenden durchschnittlichen Lebenserwartung auch das Risiko, dass der Patient sein eigenes Klappenimplantat „überlebt“ und dadurch eine Reoperation und der Einsatz einer neuen Klappenprothese nötig wird [30, 53]. Ab einem Alter von 65 Jahren wird generell eher zur Implantation einer biologischen Herzklappe geraten, da sich die Haltbarkeit der Klappenimplantate in der Regel mit der Lebenserwartung des Patienten deckt [56]. Insbesondere jedoch bei der Patientengruppe zwischen 60 und 65 gibt es keine eindeutige Empfehlung, weswegen Faktoren wie die Patientencompliance und die persönlichen Präferenzen des Patienten hier besonders zur Entscheidungsfindung beitragen [54].

In Deutschland fanden im Jahr 2018 rund 98.000 Herzoperationen statt [57]. Obwohl die Gesamtzahl der Herzoperationen insgesamt einen abnehmenden Trend zeigt, nahmen die Herzklappenoperationen im Vergleich zum Vorjahr um 1,5% auf 35.000 zu [8, 57]. In den vergangenen Jahren zeigte sich dabei eine klare Tendenz hin zur biologischen Klappe [24]. Während im Jahr 2001 noch 50% mechanische und 50% biologische Klappen eingesetzt wurden, macht die Anzahl der mechanischen Klappen im Jahr 2017 nur noch ca. 10 % aus [8]. Auch die Anzahl der TAVI Operationen stieg rasant an. Laut der Bundesauswertung des Instituts für Qualitätssicherung und Transparenz im Gesundheitswesen (IQTIG) fanden im Jahr 2018 knapp zweieinhalbmal so viele TAVI-Verfahren wie konventionelle Aortenklappenersatzoperationen statt [58, 59]. Insgesamt wurden laut Bundesauswertung im Jahr 2018 ca. 21.000 TAVI-Verfahren an der Aortenklappe durchgeführt [59]. Im Rahmen eines TAVI-Verfahrens wird stets ein glutaraldehydfixiertes Xenograft implantiert. Doch auch bei konventionellen, nicht-kathetergestützten Aortenklappenoperationen wird derzeit in 88% der Fälle ein Xenograft eingesetzt. Die übrigen 12% setzen sich aus reparierenden Operationsverfahren wie der Valvuloplastie, sowie dem Einsatz von Homografts und mechanischen Prothesen zusammen [57]. Die Gründe für den vermehrten Einsatz biologischer Klappen sind neben dem individuellen Patientenwunsch vor allem die einfacheren Implantationsmöglichkeiten, die besseren hämodynamischen Eigenschaften und die geringere Thrombogenität, durch die ein Einsatz von Antikoagulantien vermieden werden kann [39].

Weltweit finden jährlich ca. 290.000 Herzklappenersatzoperationen statt. Schätzungen zufolge soll diese Zahl bis zum Jahr 2050 auf 850.000 ansteigen [60, 61]. Dies macht deutlich, dass der Bedarf an verlässlichen und langlebigen Xenografts stetig zunimmt und auch mit Blick auf den demographischen Wandel keine Abnahme dieser Tendenz zu erwarten ist.

Glutaraldehydfixierte, biologische Herzklappen stellen die derzeit einzige Alternative zum mechanischen Klappenersatz dar, die dargelegten Nachteile zeigen jedoch, dass eine solche Klappe noch nicht dem Ideal entspricht. Das Ideal wäre eine Klappe, die vom Körper angenommen wird, mitwächst und sowohl auf immunologischer, als auch auf mechanischer bzw. hämodynamischer Ebene die Eigenschaften einer gesunden, nativen Klappe aufweist [29, 52].

Dieses Ziel – die Herstellung eines makellosen Transplantats – verfolgt das Forschungsfeld des Tissue Engineerings.

Tissue Engineering

Beim Tissue Engineering (TE) handelt es sich um einen interdisziplinären Forschungsansatz, der ähnlich wie 1960 Edward und Starr, die Kompetenzen von Biowissenschaften bzw. Medizin mit denen der Ingenieurskunst verknüpft, um Gewebeeigenschaften an unterschiedliche Anforderungen und Voraussetzungen anzupassen [62]. Das Konzept kam erstmals Mitte der 80er Jahre auf, damals vor dem Hintergrund einer zu geringen Organspenderzahl [63]. Wenige Jahre später stellten Langer und Vacanti diesen Ansatz – die Fusion von Medizin und Ingenieurwesen – im Science Magazine vor [62]. Heute gelten sie als Pioniere des Tissue Engineerings.

Langer und Vacanti definierten Tissue Engineering damals als *„interdisziplinäres Feld, welches die Prinzipien von Ingenieurskunst und Biowissenschaften verknüpft, um biologisches Ersatzmaterial zur Wiederherstellung, Instandhaltung oder Verbesserung von Gewebefunktionen oder ganzen Organen zu entwickeln.“* [62, 64]. Im Lauf der Zeit wurde diese Definition vielfach erweitert und angepasst [62, 64-67]. Heute basiert Tissue Engineering vorwiegend auf den folgenden Elementen [62, 68-70]:

Tabelle 3.1: Die Kernelemente des Tissue Engineerings sowie deren Funktion

Element	Funktion
Matrix (engl. Scaffold)	Dient als Formvorlage für das spätere Gewebe
Zellen	Bilden entlang der Matrix ein Gewebe
Kulturmedium	Ermöglicht das Wachstum der Zellen
Wachstumsfaktoren	Ermöglichen Wachstum und Ausdifferenzierung der Zellen
Konditionierungsfaktoren	Ermöglichen Zelldifferenzierung unter <i>in-vivo</i> -ähnlichen Bedingungen (z.B. Flussbedingungen)

Ziel des TE ist es, Zellen anhand einer Matrix eine Wachstumsrichtung vorzugeben, um so ein Gewebe nach individuellen Bedürfnissen formen zu können. Hierfür können z.B. Stamm- oder Progenitorzellen des späteren Empfängers verwendet werden. Das Wachstum entlang der Matrix geschieht meist innerhalb eines Nähr- bzw. Kulturmediums, welches die Zellen mit allen notwendigen Nährstoffen versorgt. Um die korrekte Ausdifferenzierung der Zellen zu ermöglichen, sind schließlich Wachstumsfaktoren nötig. Es handelt sich dabei meist um biologische Faktoren wie z.B. VEGF (vascular endothelial growth factor) oder IGF (insulin like growth factor), die die gewebliche Signaltransduktion modifizieren. Insbesondere aber bei Geweben, die später mechanischer Beanspruchung standhalten sollen, muss das Gewebe bereits unter mechanischer Belastung wachsen. Die Schaffung solcher *in-vivo*-ähnlicher Bedingungen zur korrekten Ausdifferenzierung der Zellen gehört zum Element der Konditionierung. Das auf diese Weise entstehende Gewebe enthält die genetische Information des späteren Empfängers. Dadurch wird es nach der Implantation von dessen Immunsystem nicht als Fremdmaterial erkannt, wodurch das Risiko einer Abstoßungsreaktion minimiert werden kann. [49, 68-70]

Die Matrix bzw. deren Zusammensetzung stellt einen Schlüsselfaktor bei der Herstellung von TE-Gewebe dar. Sie kann aus biologischem oder synthetischem Material bestehen. Bei synthetischen Materialien muss zunächst gewährleistet werden, dass diese biokompatibel sind. Die Matrix, meist aus Polymerverbindungen bestehend, wird *in-vitro* mit zuvor kultivierten Zellen des Empfängers besiedelt [62]. Ziel dieses Ansatzes ist es, dass sich die besiedelte Matrix nach der Implantation sukzessive auflöst, und deren Bestandteile anschließend über den Urin ausgeschieden, oder über den Zitratzyklus abgebaut werden. Idealerweise verbleibt dann ein Gewebestück aus Empfängerzellen, welches den geometrischen Eigenschaften der Matrix entspricht [49, 71]. Bisher ist es jedoch nicht möglich, das Einwachsen der Empfängerzellen in einem ausreichenden Maß zu regulieren. Die Folge ist, dass es häufig zu einer überschießenden Einwanderung von Fibroblasten und Endothelzellen

kommt, es entsteht eine Übermenge an Extrazellulärmatrix (ECM), das Gewebe fibrosiert, versteift und verliert seine Funktion insbesondere im Hinblick auf eine notwendige Klappenfunktion [71].

Verwendet man eine Matrix aus biologischem Gewebe, stammt diese entweder vom Menschen oder vom Tier. Wichtig ist es hierbei, das biologische Gewebe so zu bearbeiten, dass keinerlei immunogenes Potenzial mehr von ihm ausgeht. Dies gelingt entweder mittels einer Fixierung, oder durch Entfernung sämtlicher zellulärer Bestandteile. Der dadurch hervorgebrachte Zustand wird als Azellularität bezeichnet. Das Ziel eines azellulären Xenografts ist die Vermeidung einer immunologischen Reaktion im Empfänger – ohne die Notwendigkeit einer Glutaraldehydfixierung. Um diesen Zustand im Gewebe zu erreichen, wurde das Verfahren der Dezellularisation entwickelt.

Dezellularisation

Der Überbegriff der Dezellularisation vereint Verfahren, deren Ziel es ist, einen Zustand der Azellularität im Gewebe hervorzurufen. Mehrere Studien konnten bisher zeigen, dass dezellularisierte Gewebe eine deutlich höhere Biokompatibilität aufweisen als glutaraldehydfixierte Gewebe [46, 72]. Der Zustand der Azellularität kann auf verschiedene Weisen erreicht werden, wobei in der Regel eine Kombination verschiedener Methodiken zum Einsatz kommt [73].

Mechanische Dezellularisation

Hierbei wird das Gewebe mechanischen Einflussfaktoren ausgesetzt. Zu diesen zählen beispielsweise Gefriertrocknung [74, 75] und Ultraschalleinwirkung [76], aber auch eine Erhöhung des Umgebungsdruckes [77] und Agitation des Gewebes [78]. Insbesondere aber bei sehr dicken Geweben wie z.B. Sehnen oder Knochen reichen mechanische Verfahren allein nicht aus, um das Gewebe bis in die Tiefe vollständig zu dezellularisieren, sodass diese üblicherweise mit biologischen oder chemischen Dezellularisationsverfahren kombiniert werden [79, 80].

Biologische Dezellularisation

Bei dieser Methode erfolgt der Einsatz biologisch wirksamer Substanzen zur Entfernung von Zellmaterial. Biologische Detergenzien können wiederum in enzymatische und nicht-enzymatische Substanzen unterteilt werden. Zu den potentesten und am häufigsten verwendeten enzymatisch wirksamen Substanzen gehören Trypsin [81], DNase [79] und RNase [80, 82]. Aber auch andere

Enzyme wie z.B. Kollagenase [83], Thermolysin [84] oder α -Galactosidase [85] wirken unterstützend bei der Elimination zellulärer Bestandteile aus dem Gewebe. Zu den nicht-enzymatisch wirksamen Substanzen gehören z.B. die Chelatbildner EDTA (Ethyldiamintetraacetat) und EGTA (Ethylenglycoltetraessigsäure) [86, 87]. Sie wirken jedoch lediglich unterstützend bei der Auslösung von zellulärem Material aus dem ECM-Verband [88].

Insgesamt führt – ähnlich wie bei der mechanischen Dezellularisation – eine rein biologische Behandlung in der Regel nicht zu einer vollständigen Gewebedezellularisation [73, 89]. Es erfolgt deshalb häufig die Kombination mit einem mechanischen bzw. chemischen Verfahren [90].

Chemische Dezellularisation

Bei der chemischen Dezellularisation wird das Gewebe zelltoxischen Substanzen ausgesetzt, mit deren Hilfe die zellulären, respektive die immunogenen Bestandteile aus dem Gewebe entfernt werden. Zurück bleiben kollagene und elastische Fasern, eine bindegewebige Matrix, mit dem Potenzial für das Einwachsen neuer Zellen. Neben Perikarden und Herzklappen wurden so in den vergangenen Jahren viele weitere Gewebe dezellularisiert, darunter Urothel [91], Haut [92], Nervengewebe [93], Dünndarmsubmukosa [94, 95], Sehnen und Bänder [96] sowie Muskulatur [97] und Lebergewebe [98] – stets mit dem Ziel, ein azelluläres, universell einsetzbares Gewebe für die Implantation zu erhalten. Für die chemische Dezellularisation kommt eine Vielzahl von Detergenzien in Betracht, häufig erfolgt die Kombination mehrerer Substanzen.

Dezellularisationsdetergenzien

Allen Detergenzien ist gemein, dass es sich um wasserlösliche Moleküle handelt, welche in der Lage sind Mizellen zu bilden und so die Lipid-Protein- bzw. die Lipid-Lipid-Verbindungen innerhalb der Zellmembran aufzulösen [60]. Heutzutage sind die am häufigsten verwendeten Dezellularisationsdetergenzien Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS), Tert-Octylphenyl-Polyoxyethylen (Triton X) und Natrium-Desoxycholat (SD) [78].

SDS ist eines der am häufigsten verwendeten Dezellularisationsdetergenzien. Schon bei den ersten Dezellularisationsexperimenten 1984 durch *Malone et al.* mit dem Ziel, aus Karotisarterien vom Windhund azelluläre, vaskuläre Gefäßinterponate zu gewinnen, wurde SDS in einer Kombination mit Triton X verwendet [60, 99]. SDS ist ein anionisches Detergenz, welches in der Lage ist, nicht-kovalente Aminosäurenverbindungen (Protein-Protein-Verbindungen) zu lösen und so die

Tertiär- bzw. Quartärstruktur von Proteinen zu zerstören [60, 100]. Dies geschieht in einem Verhältnis von ca. 1,4 Gramm SDS pro Gramm Protein [101]. Auf diese Weise können nicht nur Zell-, sondern auch Kernmembran- und zytoplasmatische Bestandteile gelöst werden. Die hervorragenden dezellularisierenden Eigenschaften von SDS gehen allerdings mit einer nicht zu vernachlässigenden Gewebeschädigung einher [102]. So zeigte eine Studie von *Kasimir et al.*, dass die vollständige Dezellularisation porciner Klappen mithilfe von SDS zwar möglich ist, dabei jedoch ein erheblicher Gewebeschaden innerhalb der ECM entsteht [103]. *Gilbert et al.* weisen darauf hin, dass SDS zwar die Kollagenfaserstruktur angreift, jedoch den Gesamtkollagengehalt des Gewebes nicht verringert [78]. *Jordan et al.* zeigten darüber hinaus, dass durch die proteolytische Wirkung von SDS die Eigenschaften der elastischen Fasern in einem derartigen Maß beeinflusst werden, dass die Zugfestigkeit der Gewebeproben sinkt [104].

SD ist eine anionische Gallensäure, welche dazu dient, zelluläre Überreste aus dem Gewebe zu transportieren. Im menschlichen Körper fungiert SD vor allem als Emulgator für die Verdauung von Fetten. In Form von Ursodesoxycholsäure kommt SD darüber hinaus bei der Vorbeugung und Behandlung von Gallensteinen zum Einsatz. Als Mizellenbildner ist SD in der Lage, Membranproteine zu binden und abzutragen [105]. Die Studienlage bezüglich SD zeigt deutlich, dass SD allein kein wirksames Dezellularisationsdetergenz darstellt. So gibt es keine Studie, die einen dezellularisierenden Effekt von ausschließlich SD enthaltenden Lösungen belegt [78].

Triton X ist ein nicht-ionisches Detergenz [106]. Es gilt als mildes Dezellularisationsdetergenz, denn im Gegensatz zu SDS denaturiert Triton X die Proteinbestandteile nicht, sondern löst sie im Ganzen aus der Zell- bzw. Kernmembran heraus [60, 107]. Zwar ist Triton X so in der Lage, zelluläre Komponenten abzutragen, jedoch konnten Studien auch zeigen, dass durch die Behandlung mit Triton X Glykosaminoglykane, welche für den Wassergehalt und die Elastizität des Gewebes verantwortlich sind, aus dem Gewebe eliminiert werden [75, 108].

Aufgrund dieser vorliegenden Informationen liegt es nahe, nicht denaturierende Detergenzien wie Triton X mit denaturierenden Detergenzien wie SDS zu kombinieren, um eine vollständige Dezellularisation unter möglichst geringer Gewebeschädigung zu erreichen [99]. Dadurch steigt allerdings auch die Variabilität bezüglich der Kombinationsmöglichkeiten, was sich in der aktuellen, widersprüchlichen Studienlage widerspiegelt.

Aktuelle Studienlage

Zunächst wird bei Betrachtung der Studienlage deutlich, dass bezüglich der Dezellularisation von bovinem Perikard bisher weniger Studien vorliegen als bei porcinem Klappengewebe. Beide Ansätze zeigen jedoch vielversprechende Ergebnisse. Beim Vergleich von porcinem Klappengewebe und bovinem Perikard zeigen verschiedene Studien, dass bovines Perikard einen höheren Kollagengehalt aufweist und in einem geringeren Maß zur Degeneration neigt [109, 110]. Dies lässt vermuten, dass sich bovines Perikard besser für die Herstellung von Xenografts eignet als porcines Klappengewebe. Darüber hinaus stellt bovines Perikard neben der Verwendung als Klappenersatz auch ein Material dar, dessen Einsatzmöglichkeiten über den kardiovaskulären Rahmen hinausgehen [111-113].

Die Detergenzien SDS, SD und Triton X wurden bisher in einer Vielzahl von Studien bezüglich ihrer Wirksamkeit untersucht. Bereits 2003 verglichen *Kasimir et al.* die Wirksamkeit von SDS im Vergleich zu einer Kombination aus Triton X mit SD und konnten zeigen, dass die Kombinationslösung mit einer Konzentration von jeweils 0,25% zu einer vollständigen Dezellularisation von porcinen Klappen führte [103]. Es sei jedoch erwähnt, dass diese Erkenntnis lediglich mithilfe von optischen Verfahren gewonnen wurde, ohne die Durchführung einer DNA-Quantifikation. Als *Yu et al.* 10 Jahre später dasselbe Protokoll anwendeten und eine anschließende Nuklease-Behandlung hinzufügten, konnten sie durch DNA-Quantifizierung zeigen, dass das Gewebe zwar fast vollständig dezellularisiert wurde, eine Eliminierung sämtlicher DNA-Bestandteile jedoch nicht gelungen war [114].

Ohne die Kombination zweier Detergenzien gelang es dagegen *Vafae et al.* im Jahr 2016 humane Aorten- und Pulmonalklappen mithilfe einer 0,1%igen SDS-Lösung und einer anschließenden Nuklease-Behandlung zu 97% zu dezellularisieren [115]. Auch *Erdbrügger et al.* verwendeten 2006 reines SDS, als sie porcine Pulmonalklappen mithilfe einer 1,0%igen SDS-Lösung zu 75% dezellularisierten. Sie berichteten darüber hinaus von einer Zunahme des Berstungsdruckes bzw. der mechanischen Stabilität des Materials. Ob durch die relativ hohe SDS-Konzentration und die Dezellularisationsdauer von 14h eine strukturelle Schädigung im Gewebe hervorgerufen wurde, wird nicht beschrieben. Damals wurde diese Klappe 103 Patienten implantiert. Nach der Explantation der Klappen zeigten diese trotz der unvollständigen Dezellularisation eine Besiedelung mit Empfängerzellen. Zum Zeitpunkt der Veröffentlichung der Studie, ca. zwei Jahre später, trugen jedoch lediglich noch 9 Patienten diese Klappe in sich [116]. Dies lässt vermuten, dass es durch die unvollständige Dezellularisation *in-vivo* zu einer Abstoßungsreaktion und somit zu einem Versagen der Klappe gekommen sein könnte, und impliziert, dass eine restlose Dezellularisation eine elementare Voraussetzung für die Implantation darstellt.

Auch in der Studie von *Heuschkel et al.* aus dem Jahr 2018 zeigte sich eine unvollständige Dezellularisation bei der Verwendung von reinem SDS. Sie dezellularisierten bovine Perikarde mithilfe einer 0,1%igen SDS-Lösung in einem 24 Stunden langen Dezellularisationsprozess. Sie konnten zeigen, dass mit diesem Protokoll die Gewebeproben im Schnitt zu 77% dezellularisiert worden waren. Auffallend ist hierbei jedoch, dass sich trotz der 24-stündigen Dezellularisation eine weitgehend unversehrte ECM-Struktur bei den dezellularisierten Proben zeigte [117].

2012 kombinierten *Hülsmann et al.* SDS und SD in einer 0,5%igen Lösung zur Dezellularisation boviner Perikarde und verglichen diese anschließend mit glutaraldehydfixierten Perikarden. Sie konnten zeigen, dass die biochemischen und mechanischen Eigenschaften der SD/SDS-dezellularisierten Perikarde denen der glutaraldehydfixierten Perikarde ähnelten, dabei jedoch ein geringeres Abstoßungsrisiko bargen [118].

Auch *Granados et al.* untersuchten 2017 die Wirkung einer 0,5%igen SD/SDS-Lösung. Sie dezellularisierten in einem 36-stündigen Dezellularisationsprozess mit anschließender 3-stündiger DNase- und RNase-Nachbehandlung porcine Mitralklappen zu 92%. Die Dezellularisation fand dabei unter kontinuierlichem Rühren und elliptischem Schütteln statt. Trotz der unvollständigen Dezellularisation war im Anschluss die Repopulation der Klappe unter statischen Bedingungen möglich. Eine *in-vivo* Untersuchung der dezellularisierten Klappen erfolgte jedoch nicht [119].

Auch die Studie von *Goncalves et al.* aus dem Jahr 2005 gibt Hinweise darauf, dass erst die Kombination von SD und SDS zu einer vollständigen Abwesenheit von immunogenen Bausteinen in dezellularisierten Perikarden führt [120]. Sie zeigt außerdem, dass auch bei vollständiger Dezellularisation noch immunogenes Material im Gewebe vorhanden sein kann und dass dieses erst durch eine anschließende, enzymatische Nachbehandlung eliminiert wird.

Li et al. untersuchten 2018 den Effekt verschiedener Detergenzienkombinationen auf die Dezellularisation boviner Perikarde. Sie zeigten, dass mit reinem, SDS (1%) und SD/SDS (0,5%/1,0%) der Kollagengehalt stärker abfällt als bei Verwendung von Triton X (1%) oder einer Kombination aus Triton X und SD (1,0%/0,5%). Ebenso hatten letztere Kombinationen einen geringeren Einfluss auf die Zugfestigkeit der Perikarde. Keines der genannten Protokolle konnte eine vollständige Dezellularisation im Gewebe hervorrufen, jedoch hatte SDS den stärksten dezellularisierenden Effekt auf das Gewebe. Erst die Kombination der Protokolle mit Gefriertrocknungszyklen konnte alle zellulären Überreste aus dem Gewebe entfernen [75].

Gallo et al. untersuchten 2012 das *in-vivo*-Verhalten dezellularisierter Klappen im Schafmodell. Sie dezellularisierten die Klappen dabei mit einer Kombination aus Triton X und SD, die genaueren Eigenschaften der Dezellularisation wurden dabei nicht veröffentlicht. Während zwei Schafe nach ca.

einem Monat an einer Endokarditis und einer begleitenden Klappenthrombose verstarben, wiesen die übrigen elf Klappen 15 Monate nach Implantation physiologische Eigenschaften auf [121].

Zuletzt wurden Herzklappen aus dezellularisierten, bovinen Perikarden unter dem Namen CardioCel® im Rahmen einer Studie von *Nordmeyer et al.* 40 Patienten als Ersatz für eine Aortenklappe eingesetzt (2018). Im Follow-up zeigten lediglich 28 ± 9 % der Patienten in dieser Zeit einen einwandfreien Verlauf, bei 43 ± 12 % der Patienten wurde eine Reoperation nötig [122]. Dies steht im Widerspruch zu Veröffentlichungen von *Mazzitelli et al.* und *Bell et al.*, die bei 8- bzw. 24-monatigem Follow-up nach CardioCel®-Implantation einen komplikationslosen Verlauf feststellten [123, 124]. Langfristige Ergebnisse stehen jedoch in beiden Fällen noch aus. Darüber hinaus gilt es zu erwähnen, dass CardioCel®, zusätzlich zur Dezellularisation einen glutaraldehydfixierenden Vorgang enthält. Inwieweit das Ergebnis dieser Studien auf die Dezellularisation oder auf die Fixierung zurückzuführen ist, bleibt daher fraglich.

Bei Betrachtung der Studienlage wird deutlich: Es wurden bereits diverse Dezellularisationsprotokolle in einzelnen Studien untersucht. Dabei wurde häufig porcines Klappengewebe untersucht, bovines Perikard stellt jedoch aufgrund seiner mechanischen Eigenschaften eine vielversprechende Alternative dar [109, 110]. Im Hinblick auf Dezellularisationsprotokolle für bovines Perikard besteht derzeit eher ein Mangel. Hinsichtlich der Detergenzien wurden bereits mehrfach versucht, mithilfe eines einzelnen Detergenz eine vollständige Dezellularisation herbeizuführen [115-117, 120, 125-127]. Dies gelang dabei jedoch nur selten. Wurde das dezellularisierte Material dennoch eingesetzt, hielt das Xenograft den Bedingungen *in-vivo* i.d.R. nicht lange stand, oder benötigte einen zusätzlichen Fixierungsschritt, um eine Abstoßungsreaktion zu verhindern [123, 124, 128, 129]. Daher zeigte sich in den vergangenen Jahren ein vermehrter Trend hin zu einer Kombination mehrerer Detergenzien [103, 114, 118, 119, 130, 131]. Viele Studien wurden zu diesem Ansatz durchgeführt, jedoch nur wenige verglichen mehrere Detergenzienkombinationen und -konzentrationen miteinander. Die zusätzliche Anwendung von Nuklease im Anschluss an die Dezellularisation ist zwar ein eher neuer Ansatz, er zeigt jedoch bisher vielversprechende Ergebnisse [119, 120]. Bei Betrachtung der Studienlage wird außerdem deutlich, dass jede Dezellularisation eine Gratwanderung zwischen Gewebeschädigung und Zellentfernung darstellt. Bei zu kurzen Dezellularisationsgängen oder zu niedrig konzentrierten Dezellularisationslösungen verbleiben zelluläre Bestandteile im Gewebe. Die Implantation einer solchen unvollständig dezellularisierten Klappenprothese zeigte in der Vergangenheit bereits fatale Ausgänge [129]. Dezellularisiert man das Gewebe dagegen zu lang oder mit einer zu aggressiven Lösung, wird es so stark beschädigt, dass es anschließend nicht mehr als Klappenprothese geeignet ist. Zudem ist der Einfluss verschiedener Faktoren, wie der enzymatischen Nachbehandlung und der Dezellularisationsmechanik, noch nicht

eindeutig geklärt. Da jeder dieser Einflussfaktoren sich unterschiedlich auf das Ergebnis auswirkt, handelt es sich in der Gesamtheit um ein Zusammenspiel aus synergistisch agierenden Faktoren.

Diese Problematik veranlasste uns, alle genannten Einflussfaktoren in einer Studie zu bündeln, und den Effekt von Mechanik, Detergenzienkombinationen und –konzentrationen sowie einer Nuklease-Behandlung anhand von bovinen Perikarden zu untersuchen. Die Kernfrage dabei lautete: Wie kombiniert man all diese Einflussfaktoren zu einem Dezellularisationsprotokoll, welches alle immunogenen Bestandteile aus dem Gewebe entfernt und gleichzeitig die Gewebestruktur intakt hält?

Um diese Frage beantworten zu können, erforscht das Labor für Tissue Engineering der Herzchirurgischen Klinik der LMU München seit mehreren Jahren das Thema Dezellularisation von einem multimodalen Standpunkt aus [76, 132-137].

Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, vier verschiedene Dezellularisationsprotokolle an einer Gewebesorte zu untersuchen und dabei zu ermitteln, welche Detergenzienkombination zu einer möglichst effizienten Dezellularisation führt. Hierbei wurde außerdem eruiert, ob eine längere Dezellularisationsdauer zu einer vollständigeren Dezellularisation führt oder nicht, und ob es dabei zu einer Verschlechterung der geweblichen Eigenschaften kommen würde. Darüber hinaus wurde untersucht, ob sich die enzymatische Nachbehandlung des bereits dezellularisierten Gewebes positiv auf das Dezellularisationsergebnis auswirken würde. Anhand zweier verschiedener Versuchsaufbauten wurde außerdem untersucht, ob sich die Mechanik, unter der die Dezellularisation stattfindet, positiv auf das Dezellularisationsergebnis auswirken würde. Das Dezellularisationsergebnis würde dann als gut gelten, wenn möglichst wenige Zellen im Gewebe verblieben und gleichzeitig das dezellularisierte Gewebe nur gering mechanisch beeinträchtigt worden wäre.

4 Material und Methoden

4.1 Materialgewinnung und -vorbereitung

4.1.1 Materialgewinnung

Um geeignetes Material für die Durchführung des Dezellularisationsprozesses zu gewinnen, erfolgte die Beschaffung der bovinen Perikarde ausschließlich bei einem lokalen Schlachthof (Attenberger Fleisch Verwaltung GmbH, Zenettistraße 10, 80337 München, GER), mit dem das Labor für kardiovaskuläres TE der LMU München eine Kooperation unterhält. Bei den Rindern handelte es sich entweder um Milchkühe, Bullen oder Zuchtrinder für die Fleischproduktion.

Zunächst musste sichergestellt werden, dass das zu untersuchende Material stets eine möglichst gleichbleibende Qualität aufweist. Die Entfernung der Perikarde fand stets innerhalb der ersten 30 Minuten nach Eintritt des Todes statt. Hierfür wurde das Perikard von kranial nach kaudal aufgeschnitten und an der Befestigung auf Höhe der Klappenebene abgeschnitten. Die Entfernung des Perikardes vom bovinen Herz fand stets unter Sicht statt. So konnte gewährleistet werden, dass die Perikarde zum einen eine ausreichende Größe aufwies, zum anderen wurden auf diese Weise optisch auffällige (z.B. entzündete oder vernarbte) Perikarde von vornherein aussortiert. Damit bei späterer Auslese von inadäquaten Perikarden immer noch ausreichend Material für die Versuche verfügbar wäre, wurden zusätzlich stets mindestens zwei weitere Perikarde mitgenommen. Anschließend wurden die Perikarde doppelt in Plastikbeutel verpackt und unverzüglich ins Labor transportiert. Abhängig davon, wie lange die Perikardselektion gedauert hatte, fand der Transport zwischen einer und zwei Stunden nach Schlachtung statt. Nach Ankunft im Labor erfolgte die Weiterverarbeitung der Perikarde innerhalb von maximal zwei Stunden. Durch den stets identischen Ablauf dieser Prozesse konnte eine hohe Vergleichbarkeit der einzelnen Versuchsreihen miteinander gewährleistet werden. Darüber hinaus wurde durch die kurzen Lagerungszeiten die Beeinflussung des Gewebes bspw. durch Kontamination auf einem minimalen Level gehalten.

4.1.2 Materialvorbereitung

Die Materialvorbereitung bestand aus vier Schritten: Der optischen Begutachtung, der Entfettung, dem Ausschneiden des Untersuchungspatches und der Entnahme von Nativproben. Hierfür wurde die Arbeitsfläche zunächst mit einem sterilen OP-Tuch (SecuDrape Abdecktuch, Sengewald GmbH, Rohrdorf-Thansau, GER) abgedeckt und das Perikard aus dem Plastikbeutel auf das OP-Tuch

überführt (siehe Abb. 4.1, A). Nach vorsichtigem Abtupfen der Blutreste mit Wundgaze (Gazin® Mullkompressen, Lohmann & Rauscher GmbH & Co. KG, Neuwied, GER) erfolgte zum zweiten Mal eine optische Begutachtung. Um später möglichst homogenes Versuchsmaterial zu erhalten, wurden Ausschlusskriterien formuliert. Zu diesen Ausschlusskriterien gehörte neben einer zu kleinen homogenen Fläche vor allem das Vorhandensein von narbigen oder entzündlichen Veränderungen auf der Perikardoberfläche. Auch bei entsprechenden Veränderungen des umliegenden Fettgewebes wurde das Perikard verworfen.

Anschließend wurde das Perikard mithilfe von Kompressen manuell von der umgebenden Fettschicht abgezogen. War dies erfolgt, blieb das Perikard als dünnes, rosafarbenes Gewebe zurück (siehe Abb. 4.1 A und B). Die Oberfläche erschien hierbei auf der Innenseite glatt und glänzend, die Außenseite des Perikards wies dagegen eine eher raue und matte Oberfläche auf. Diese Oberflächenbeschaffenheit war auch in der mikroskopischen Bildgebung deutlich erkennbar.

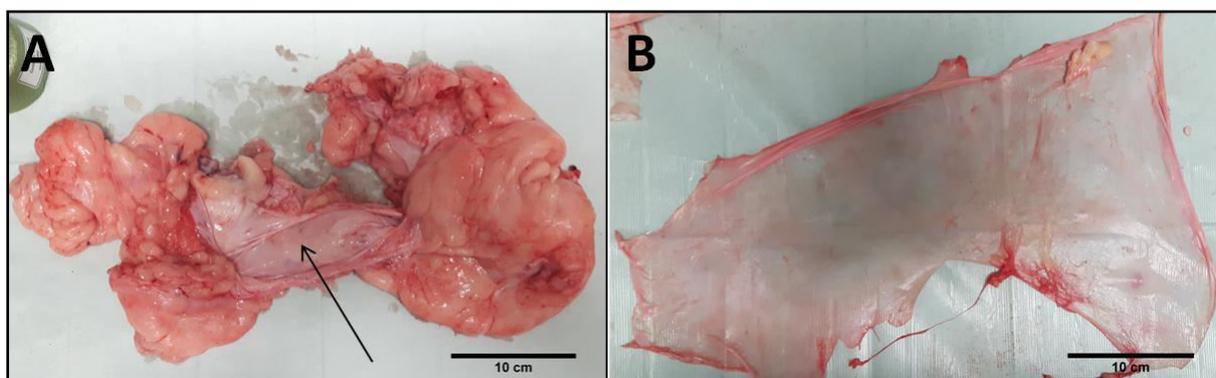


Abb. 4.1: Gesundes Perikard mit einer Größe von ca. 45x20 cm. A: Perikard vor Bearbeitung. Zu erkennen sind die Innenseite des Perikards (Pfeil) sowie die umgebende Fettschicht. B: Perikard nach Entfernung der Fettschicht, die Innenseite zeigt nach oben. Das Perikard bleibt als glatte, rosafarbene Fläche zurück, an den Rändern sind noch einzelne Fettreste zu erkennen.

Im Rahmen der ersten Versuchsreihe wurden Patche mit einer Größe von 10x10 cm zunächst aufgemalt (Hautmarkerstift Standardspitze, Purple Surgical International Ltd., Shenley, ENG), und anschließend ausgeschnitten. Der modifizierte Versuchsaufbau der zweiten Versuchsreihe machte eine Patchgröße von 9x14 cm nötig (siehe Abb. 4.2). Um später die Zugversuchsproben entsprechend dem Faserverlauf ausstanzen zu können, wurde im Rahmen der zweiten Versuchsreihe das Perikard hinsichtlich seines Faserverlaufs untersucht und dieser anschließend dokumentiert. Zusätzlich wurden dabei die Patche in 9 Felder unterteilt und die Perikarddicke in jedem Feld mit einem Dickenmessgerät (Absolute Digimatic Messuhr, Mitutoyo Deutschland GmbH, Neuss, GER) ermittelt und dokumentiert. Zuletzt wurden die Perikarde zu Identifikationszwecken mithilfe von Stanzlöchern (3,5 mm Acu-Punch, steril, Acuderm Inc., Ft. Lauderdale, USA) nummeriert.

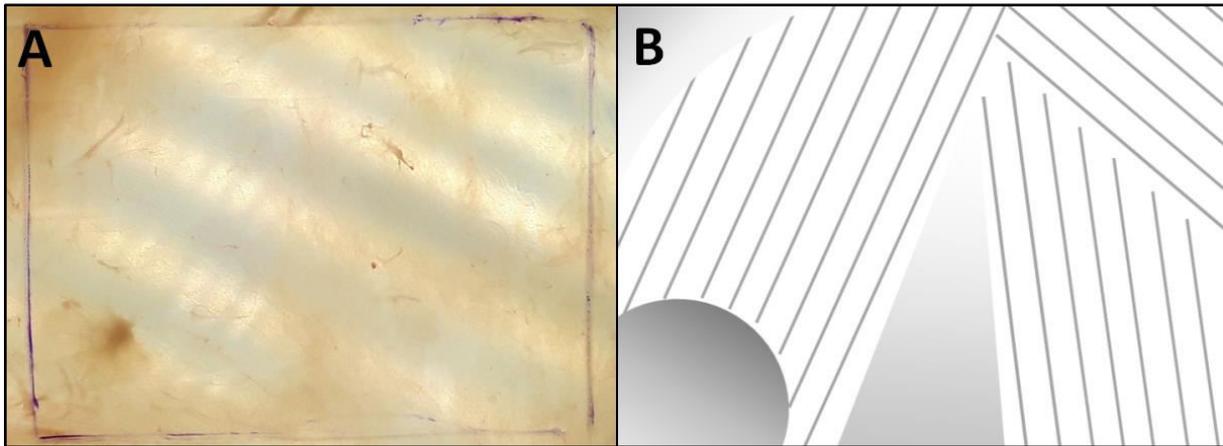


Abb. 4.2: Gesundes Perikard auf der Lichtplatte sowie ein Schema des Faserverlaufs. A: Zu erkennen ist das entfettete Perikard, man erkennt randständig die vorgezeichnete Markierung des 9x14cm großen Ausschnitts. Aus dem umliegenden Bereich wurden nach dem Ausschneiden des Patches Nativproben entnommen. B: Skizzierter Faserverlauf des Perikardpatches in Bild A: Die Linien entsprechen dem perikardialen Faserverlauf. Entlang des Faserverlaufs bzw. quer dazu wurden im Anschluss an die Dezellularisation Zugversuchsproben entnommen. Die flächigen Areale entsprechen Faserknoten bzw. Faserinhomogenitäten. Aus diesen Bereichen wurden keine Proben entnommen.

Damit bis zur Einbringung in die Dezellularisationsvorrichtung möglichst wenig osmotische Kräfte auf das Gewebe einwirkten, wurden die zugeschnittenen Perikardpatches nach dem Ausschneiden in einer phosphatgepufferten Salzlösung (PBS, phosphate-buffered saline, PBS Dulbecco w/o CA^{2+} Instamed 9,55g/L, L 182-50, Biochrom GmbH, Berlin, GER) gelagert. Anschließend erfolgte die Entnahme von Nativproben aus der übriggebliebenen Perikardfläche. Um maximale Vergleichbarkeit zwischen den Nativproben und den dezellularisierten Proben zu erreichen, wurden die Nativproben möglichst nah am Patchausschnitt entnommen. Pro Perikard wurden 4 Nativproben ausgeschnitten, 2 davon wurden anschließend in einer Formalinlösung (Roti®-Histofix 4,5%, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, GER), die anderen beiden in einer 0,86 mM Glutaraldehydlösung (im Folgenden als „Fix-II-Lösung“ bezeichnet Zusammensetzung siehe Kap. 9.3) fixiert. Jeweils eine der beiden Proben diente als Reserve. Im Rahmen der zweiten Versuchsreihe wurden darüber hinaus Zugversuchsproben nach DIN-Norm 53504 der Größe S3a (siehe Kap. 4.7.7) jeweils längs und quer zum perikardialen Faserverlauf ausgestanzt (Bent-Lever Cutting, Zwick GmbH & Co. KG, Ulm, GER) und bis zur Durchführung der Zugversuche in PBS gelagert.

4.2 Herstellung der Dezellularisationslösungen

Ziel der Forschungsarbeit war es unter anderem zu untersuchen, wie sich der Einsatz unterschiedlicher Detergenzien auf das Dezellularisationsergebnis auswirkt. Wir untersuchten die Wirkung von SD (Sodium-Desoxycholat, 30970-500G, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, GER), SDS (Sodium-Dodecyl-Sulfat $\geq 99,5\%$, Blotting-Grade, 0183.3, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, GER) und Triton X (tert-octylphenyl-polyoxyethylen, 510400, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, GER) und verwendeten dabei folgende Kombinationen bzw. Konzentrationen:

Tabelle 4.1: Zusammensetzung der verschiedenen Dezellularisationslösungen sowie deren Codierung

Zusammensetzung	Codierung
0,5% SD/SDS - Lösung	α
0,5% SD/Triton X - Lösung	β
0,5% SDS/Triton X - Lösung	γ
1,0% SDS - Lösung	δ

In der ersten Versuchsreihe (im Folgenden codiert als „V“) wurden die Lösungen α , β und γ angewendet. Da die Ergebnisse dieser Reihe darauf hinwiesen, dass SDS-haltige Dezellularisationslösungen effektiver dezellularisierten als SDS-freie Lösungen, wurde in der zweiten Versuchsreihe (im Folgenden codiert als „H“) überdies auch die Wirkung einer 1%igen SDS-Lösung untersucht (δ). Pro Dezellularisationszyklus wurden zwischen 3 und 3,5 Liter Dezellularisationslösung benötigt. Da jede Dezellularisation aus 2 Zyklen bestand, wurden pro Dezellularisation 7 Liter Dezellularisationslösung angesetzt.

4.3 Aufbau der Dezellularisationsvorrichtung

Der Aufbau der Dezellularisationsvorrichtung orientierte sich im Rahmen der ersten Versuchsreihe an vorangegangenen Forschungsarbeiten [76, 138].

Der Versuchsaufbau der ersten Versuchsreihe lies eine gleichzeitige Dezellularisation von 5 Perikardpatches zu. Dazu wurden die zuvor in PBS gelagerten Perikarde an jeweils einem Eck an einer zylindrischen Vorrichtung fixiert (siehe Abb. 4.3). Nachdem die Vorrichtung mit den 5 Perikarden versehen worden war, wurde sie im Anschluss am Boden eines Schraubdeckelglases (Schott Duran 1000 ml, DWK Life Sciences GmbH, Wertheim/Main, GER) angebracht. Anschließend wurde sowohl

das Schraubdeckelglas als auch ein weiteres Becherglas (VITLAB 3000 ml, VITLAB GmbH, Grossostheim, GER) mit der Dezellularisationslösung gefüllt. Im Becherglas wurde eine Pumpe (EDEN 155 Typ 3 Aquarienpumpe, PfG GmbH, Hörstel, GER) angebracht. Diese pumpt mit 16 l/min die Dezellularisationslösung über einen Schlauch in das Schraubdeckelglas. Um darin einen gerichteten Fluss zu erzeugen, wurde der Schlauch im Schraubdeckelglas mit einem Hohlstab verbunden. Dieser war zu einer Seite mit Löchern versehen, sodass beim Ausströmen der Dezellularisationslösung durch den Hohlstab ein gerichteter, zirkulärer Fluss entstand, der die Perikarde umspülte (siehe Abb. 4.3). Um einem Überdruck im Glas vorzubeugen, wurden drei abführende Schläuche in den Deckel des Schraubdeckelglases eingebaut, über die die Dezellularisationslösung passiv zurück ins Becherglas fließen konnte.

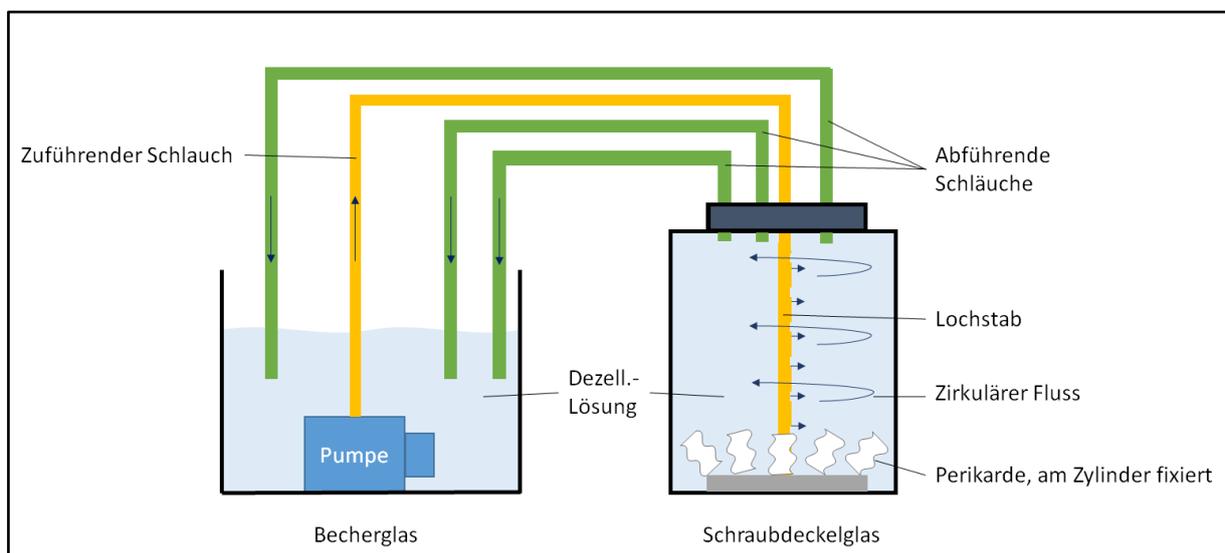


Abb. 4.3: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus der ersten Versuchsreihe (V). Zu erkennen ist der Pumpkreislauf, der vom Becherglas über den zuführenden Schlauch (gelb) ins Schraubdeckelglas führt. Dort führt der Schlauch in den Lochstab, über den im Glas ein zirkulärer Fluss entsteht, der die am Boden fixierten Perikarde umspült. Über drei abführende Schläuche (grün) wird die Dezellularisationslösung zurück in das Becherglas geleitet. Das Schraubdeckelglas besitzt einen Durchmesser von 10,1 cm und eine Höhe von 21,8 cm. Um den Lochstab und den zirkulären Fluss darstellen zu können, sind die 10x10 cm großen Perikardpatche in dieser Abbildung verkleinert dargestellt.

Im Rahmen der ersten Versuchsreihe kam es während der Dezellularisation gelegentlich zur Fältelung der Perikardpatche im zirkulären Fluss. Da dann nicht mehr gewährleistet werden konnte, dass die Patche an allen Stellen gleichmäßig mit der Dezellularisationslösung in Kontakt kommen, entschieden wir uns bei der zweiten Versuchsreihe für einen modifizierten Versuchsaufbau (siehe Abb. 4.4). Dieser ließ die Dezellularisation von 4 Perikarden zu. Hierzu wurden die Perikarde mithilfe von jeweils 5 Einzelknopfnähten aus monofilem Nahtmaterial (Ethicon Prolene 5-0, Johnson & Johnson Medical Medical GmbH Ethicon Germany, Norderstedt, GER) oder 5 chirurgischen Klammern (Covidien Appose ULC 35 W Surgical Skin Stapler, Covidien llc, Mansfield, MA, USA) zu einem Schlauch geformt,

wobei stets die Innenseite des Perikards auf der Innenseite des Schlauches lag. Entsprechend der Größe der ausgeschnittenen Patche besaß jeder Perikardschlauch somit eine Länge von 14 cm und einen Umfang von 9 cm. Anschließend wurde dieser Perikardschlauch über einen Zylinder mit 9 cm Umfang gespannt. Vier dieser Zylinder wurden an einem weiteren, nach unten geschlossenen Zylinder angebracht. Dieser wurde anschließend am Boden des Glases fixiert (siehe Abb. 4.4). Bei diesem gegenüber der ersten Versuchsreihe geänderten Versuchsaufbau strömte die Dezellularisationsflüssigkeit durch einen Schlauch in den großen Zylinder am Boden des Glases und von dort aus in die 4 Perikardschläuche. Als Folge des durch die Pumpe aufgebauten Druckes stellten sich die Perikardschläuche im Fluss auf. So konnte gewährleistet werden, dass die Perikarde kontinuierlich beidseitig von der Dezellularisationslösung umströmt wurden.

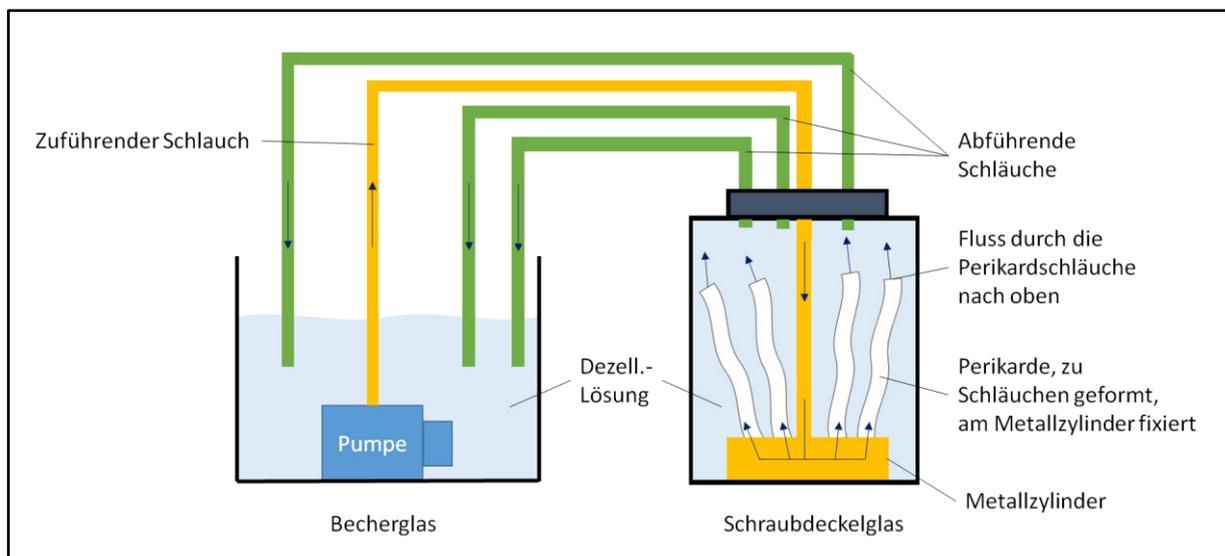


Abb. 4.4: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus der zweiten Versuchsreihe (H): Zu erkennen ist der Pumpkreislauf, der vom Becherglas über den zuführenden Schlauch (gelb) ins Schraubdeckelglas führt. Im Inneren des Glases führt der Schlauch in einen hohlen, nach unten geschlossenen Metallzylinder. Dieser verfügt über vier Öffnungen, an denen jeweils ein Perikardschlauch angebracht ist. Die Dezellularisationslösung fließt durch die Perikardschläuche nach oben, über drei abführende Schläuche wird die Dezellularisationslösung zurück ins Becherglas geführt. Das Schraubdeckelglas besitzt einen Durchmesser von 10,1 cm und eine Höhe von 21,8 cm.

4.4 Ablauf des Dezellularisationsprozesses

Ein weiteres Ziel dieser Forschungsarbeit war es zu untersuchen, inwieweit sich die Dezellularisationsdauer auf das Dezellularisationsergebnis auswirkt. Zu diesem Zweck untersuchten wir zwei Protokolle mit einer jeweiligen Dauer von 4 bzw. 16 Stunden, angelehnt an vorangegangenen Forschungsarbeiten [76, 138]. Im Rahmen des Dezellularisationsprozesses wird ein Teil der Detergenzien verbraucht – insbesondere innerhalb der ersten Stunden der Dezellularisation.

Material und Methoden

In dieser Zeit kommt es verstärkt zum Auslösen zellulärer Bestandteile aus dem Gewebe. Um den abgesunkenen Konzentrationsgradienten wiederherzustellen und überdies ausgelöste zelluläre Bestandteile aus der Dezellularisationslösung zu entfernen, fand bei beiden Dezellularisationsprotokollen ein Medienwechsel nach 2 bzw. 4 Stunden statt (siehe Abb. 4.5).

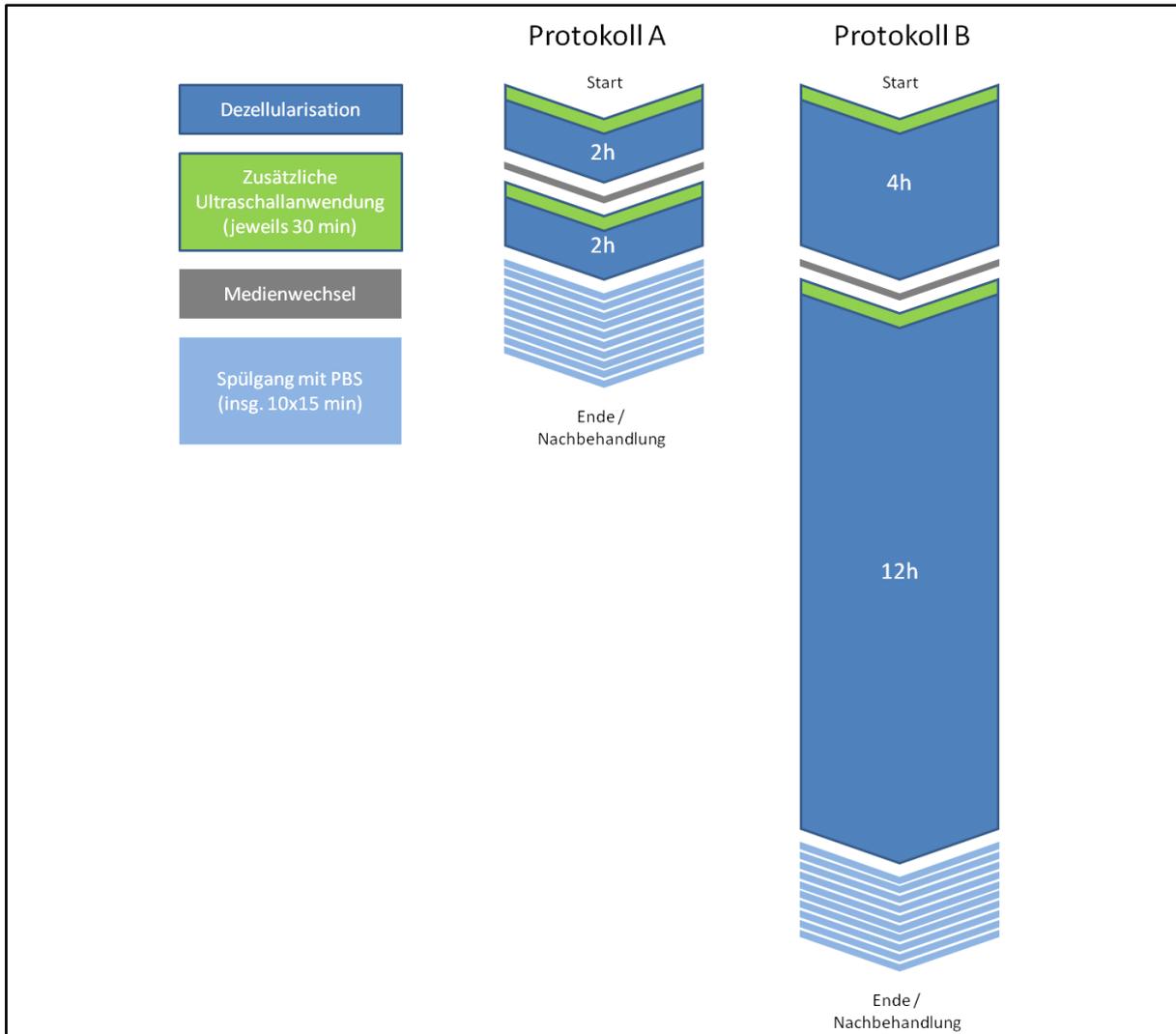


Abb. 4.5: Schematische Darstellung des Dezellularisationsablaufs: Beim Protokoll A erfolgten 2 Dezellularisationszyklen (dunkelblau) mit einer Dauer von jeweils 2 Stunden, dazwischen fand ein Medienwechsel (grau) statt. Beim Protokoll B folgte auf einen 4-stündigen ein 12-stündiger Dezellularisationszyklus, auch hier fand dazwischen ein Medienwechsel statt. Jeder Zyklus wurde während der initialen 30 Minuten durch Ultraschalleinfluss (grün) unterstützt. Im Anschluss an die Dezellularisation erfolgten stets zehn Spülgänge mit einer Dauer von jeweils 15 Minuten (hellblau).

Um die Eindringtiefe der Detergenzien zusätzlich zu steigern, fand die Dezellularisation während der initialen 30 Minuten jedes Zyklus in einem Ultraschallbad (Ultrasonic Cleaner USC600T, VWR International GmbH, Darmstadt, GER) bei 120 W und 45 kHz statt.

Nach der Dezellularisation war es wichtig die Reste der Detergenzien aus dem Gewebe zu entfernen, um die Biokompatibilität des Gewebes zu erhöhen und gleichzeitig zu verhindern, dass das Gewebe über die Dezellularisation hinaus geschädigt wird. Zu diesem Zweck wurden die Perikardpatche im Anschluss an die Dezellularisation mit PBS gespült. Die Spülgänge fanden unter denselben physikalischen Bedingungen statt wie zuvor die Dezellularisation. Es erfolgten stets 10 Spülgänge mit einer Dauer von jeweils 15 Minuten. Im Anschluss an die Dezellularisation und die nachfolgenden Spülgänge erfolgte unverzüglich die Entnahme der zu analysierenden Proben. Pro Patch wurden je zwei Proben in Formalin, zwei weitere in Fix-II-Lösung eingelegt. Je eine der beiden Proben diente als Reserve.

Im Zuge der zweiten Versuchsreihe wurde nach den Spülgängen mit PBS der Perikardschlauch von der Zylindervorrichtung entfernt und die Nähte aufgeschnitten. Um untersuchen zu können, wie groß der Effekt der anschließenden DNase-Behandlung ist, wurde das Perikard im Anschluss an die Dezellularisation in zwei Hälften geteilt. Von der einen Hälfte wurden unmittelbar Proben für die spätere Analyse entnommen sowie Zugproben ausgestanzt. Die andere Hälfte wurde direkt im Anschluss mit DNase nachbehandelt (siehe Kap. 4.5). Um sicherzustellen, dass bei beiden Hälften Zugversuchsproben in längs- und querverlaufender Faserrichtung entnommen werden konnten, wurden die Perikardpatche L-förmig auseinandergeschnitten (siehe Abb. 4.6).

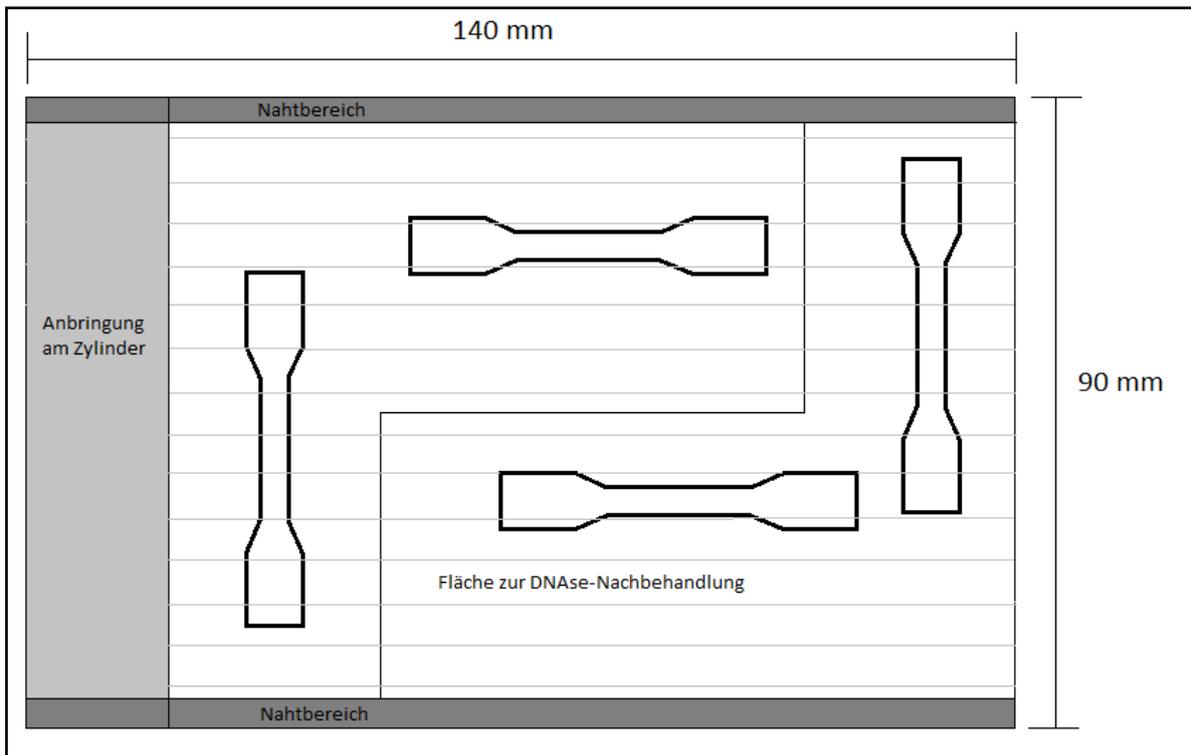


Abb. 4.6: Aufteilung der Perikardfläche im Rahmen der zweiten Versuchsreihe: Zu erkennen ist eine Zeichnung der Perikardfläche. Zusätzlich wird mit den grauen Linien der Faserverlauf des Perikards angedeutet. Zu erkennen ist außerdem die L-förmige Teilung der Perikardfläche, die es ermöglicht, sowohl vor als auch nach der DNase-Behandlung Zugproben in längs- sowie in querverlaufender Faserrichtung zu entnehmen. Beispielhaft wurden hierfür Zugversuchsproben eingezeichnet, die übrigen Proben für die Analyse wurden aus der restlichen Fläche entnommen.

4.5 Nachbehandlung der Perikarde mit DNase

Im Rahmen der zweiten Versuchsreihe erfolgte bei je einer Hälfte der dezellulierten Perikardpatche im Anschluss an die Dezellularisation eine Behandlung mit DNase. Hierzu wurden die L-förmigen Perikardausschnitte in quadratische Petrischalen (Petrischale quadratisch, 120 x 120 x 17 mm, Greiner bio-one, Kremsmünster, GER) überführt (siehe Abb. 4.7). Anschließend wurden die Petrischalen mit 62,5 ml DNase-Lösung (Desoxyribonuklease, LS002138, Worthington Biochemical Corporation, Fisher Scientific Company L.L.C, Hampton, New Hampshire, U.S.A.) befüllt. Dies entsprach bei einer Konzentration von 30 Units/ml einer Gesamtmenge von 1875 Units DNase pro Petrischale (genaue Zusammensetzung der DNase-Stocklösung siehe Kap. 9.3). Es wurde sichergestellt, dass die Perikarde lose in den Petrischalen schwammen und damit von allen Seiten Kontakt zur DNase-Lösung hatten. Um eine Umwälzung der DNase-Lösung im Glas zu erzeugen, fand die DNase-Nachbehandlung im Schüttelschrank (Inkubationshaube TH15, 6161000, Edmund Bühler

GmbH, Bodelshausen, GER) bei 30 Umdrehungen pro Minute statt. Im Schüttelschrank wurden die Perikardausschnitte 9 Stunden bei Raumtemperatur der DNase-Lösung ausgesetzt.



Abb. 4.7: Nachbehandlung mit DNase: Zu erkennen sind die 4 rechteckigen Petrischalen, deren Boden und Deckel beschriftet wurden. In den Petrischalen erkennt man die darin liegenden, L-förmig ausgeschnittenen Perikardpatche. Die Nummerierung der Perikarde erfolgte mithilfe einer Lochstanze (jeweils links oben). Zu erkennen ist das Dezellularisationsprotokoll HAY, die Proben tragen noch nicht die Zusatzbezeichnung „D“, da die Behandlung im Bild noch nicht abgeschlossen war. Die Beschriftungen „post.Dez“ und „DNase“ zeigen an, dass die Dezellularisation abgeschlossen ist und die ausgeschnittenen Proben der DNase-Nachbehandlung unterzogen werden.

Im Anschluss musste sichergestellt werden, dass Reste der DNase-Lösung aus dem Gewebe entfernt wurden. Hierfür erfolgte im Anschluss an die DNase-Behandlung zunächst eine erste Reinigung der Oberflächen beider Patchseiten unter fließendem, entsalztem Wasser für ca. 15 Sekunden. Danach wurde die DNase-Lösung in den Petrischalen durch PBS ersetzt und es erfolgte ein 15-minütiger Spülgang – auch hier erfolgte der Spülgang unter denselben prozeduralen Bedingungen wie die DNase-Behandlung zuvor. Nach einer weiteren beidseitigen Oberflächenreinigung und einem weiteren Spülgang mit PBS erfolgte sofort die Entnahme der Proben für die Formalin- und Fix-II-Konservierung sowie das Ausstanzen der Zugversuchsproben.

4.6 Nomenklatur der Proben

Um Verwechslungen vorzubeugen und sicherzustellen, dass es für jede Perikardprobe nur ein korrektes Kürzel gibt, etablierten wir ein Nomenklatursystem, das die verschiedenen Eigenschaften einer Probe codiert. Dieses System gibt für jede Probe an, um welche Versuchsreihe es sich handelt und mit welchem Detergenz wie lange dezellularisiert wurde. Darüber hinaus zeigt die Nummer im Codierungssystem an, um welches der vier bzw. fünf Perikarde es sich handelt. Zusatzbuchstaben geben Auskunft darüber, ob eine Nachbehandlung stattfand oder ob es sich bei der Probe um eine Nativprobe handelte. Die folgende Abbildung (Abb. 4.8) dient dem besseren Verständnis des Lesers und soll sämtliche Codierungsmöglichkeiten darstellen. Beispielhaft zeigt die Probe HBy3D, dass es sich dabei um eine Probe aus der zweiten Versuchsreihe handelt, die 16 Stunden lang mit einer

Kombination aus SDS und Triton X dezellularisiert wurde. Es handelt sich um das Perikard Nummer 3 (von 4). Das „D“ als Zusatzbuchstabe sagt aus, dass diese Probe anschließend mit DNase nachbehandelt wurde. Musste eine Versuchsreihe verworfen werden, so wurde dem Probenamen der Buchstabe „X-“ vorausgesetzt.

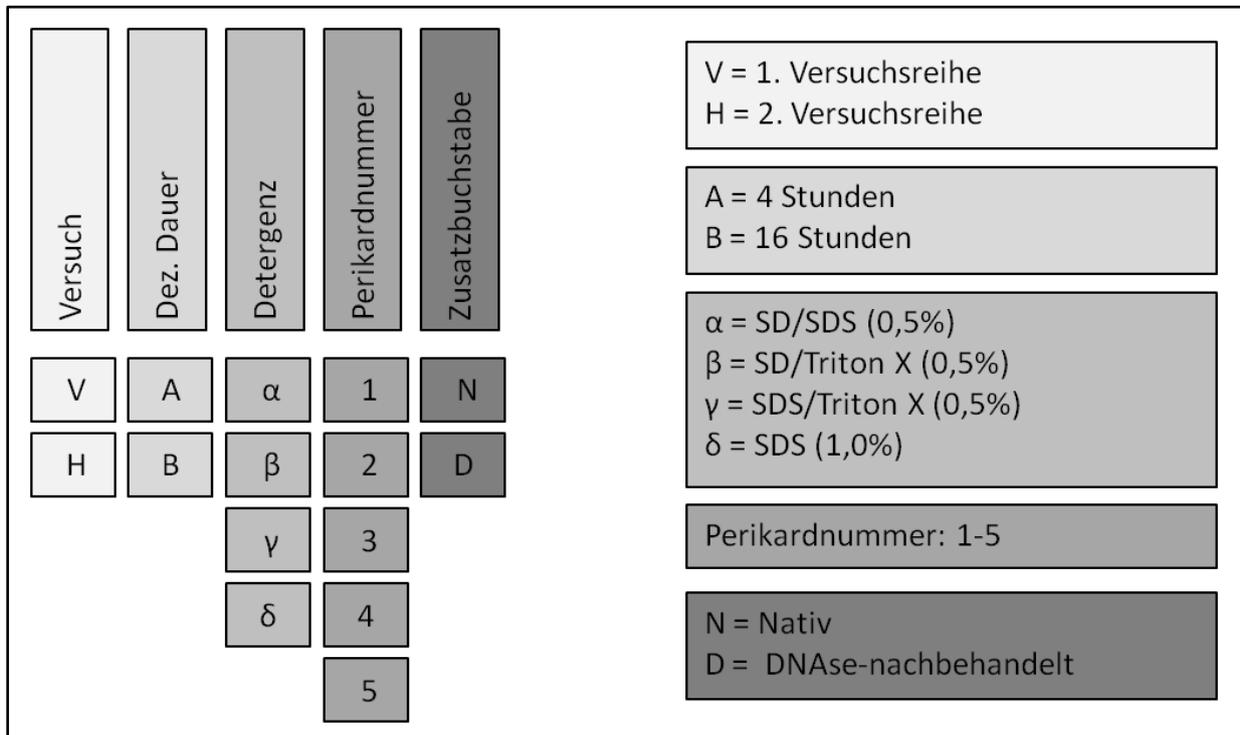


Abb. 4.8: Codierung der Perikardproben: Zu erkennen ist die Codierung bzw. die Nomenklatur der Proben. Sie soll dem Leser zum besseren Verständnis dienen.

4.7 Auswertungsmethoden

4.7.1 Bestückung der Objektträger

Um das Gewebe auf mikroskopischer Ebene untersuchen zu können, mussten zunächst Objektträger mit Gewebeproben bestückt werden. Die in Formalin fixierten Proben wurden hierzu zunächst mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und anschließend in Paraffinblöcke gegossen. Aus diesen Blöcken wurden anschließend 7 μ m dicke Schnitte angefertigt (Schlittenmikrotom HM 400 R, Microm International GmbH, Walldorf, GER, Klingen: Feather Microtome Blade, Feather Safety Razor Co. Ltd., Osaka, JPN). Über ein Wasserbad mit destilliertem Wasser (MEDAX WB24 Paraffinstreckbad für Mikrotom, MEDAX GmbH & Co. KG) wurden die Schnitte anschließend auf die Objektträger (Thermo SCIENTIFIC, Superfrost Ultra Plus®, Gerhard Menzel GmbH) überführt und im Wärmeschrank (Wärmeschrank WTC, Binder, Tuttlingen, GER) bei 40°C für 10 Stunden getrocknet.

Anschließend konnten die Objektträger bis zur Durchführung der gewünschten Färbung gelagert werden. Vor jeder Färbung erfolgte initial ein Entparaffinierungsschritt mit Xylol, anschließend wurden die Proben mittels einer absteigenden Alkoholreihe gewässert, und so für die Färbung vorbereitet (siehe Kap. 9.2).

4.7.2 DAPI-Färbung

Die DAPI-Färbung (Diamidino-Phenylindol-Färbung) diente der graphischen Darstellung der Zellkerne innerhalb des Schnittes. Diamidino-Phenylindol lagert sich in doppelsträngige DNA ein, und fluoresziert bei anschließender Stimulation durch ultraviolettes Licht in bläulicher Farbe. Auf diese Weise werden so Zellkerne bzw. das darin enthaltene DNA-Material sichtbar. Die DAPI-Färbung ist deshalb von besonderer Bedeutung, da sie aufzeigt, in welchem Maß das Perikard durch die Behandlung dezellularisiert wurde, bzw. wie viele Zellkerne trotz Behandlung im Perikard verblieben sind. Durch sie konnten so Rückschlüsse über die Eindringtiefe, und damit über den Erfolg des jeweiligen Dezellularisationsprotokolls, gezogen werden. Nach der Entparaffinierung wurden die Schnitte einer absteigenden Alkoholreihe unterzogen. Anschließend wurden die Schnitte fünf Minuten lang in einer PBS-basierten DAPI-Lösung (0,1µg/ml, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, GER) gefärbt. Um einen stärkeren Kontrast zu erhalten, wurden sie schließlich mit Sudanschwarz (Sudanschwarz B (C.I. 26150) für die Mikroskopie, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, GER) gefärbt und direkt im Anschluss unter dem Fluoreszenzmikroskop (AxioObserver, Carl Zeiss AG, Oberkochen, GER) begutachtet. Hierbei erschienen die mit DAPI gefärbten Zellkerne leuchtend auf dunklem Hintergrund. Die Belichtungszeit wurde automatisch in Abhängigkeit von der Leuchtkraft der Probe angepasst, um auch bei Azellularität eine Begutachtung des zellfreien Gewebestreifens vornehmen zu können. Anschließend wurde auch hier ein repräsentativer Ausschnitt gesucht, der dem durchschnittlichen Bild der jeweiligen Schnitte entsprach. Mithilfe des für das Fluoreszenzmikroskop vorgesehenen Computerprogramms (AxioVision Rel. 4.8, Carl Zeiss AG, Oberkochen, GER) wurde der Ausschnitt anschließend an 3 Stellen vermessen (siehe Abb. 4.9, A). Gemessen wurde die Breite des Schnittes (entspricht der Dicke des Perikards) und, sofern nach der Dezellularisation im Perikard noch Zellen vorhanden waren, auch die Breite des Zellstreifens in der Mitte des Schnittes. Zusätzlich wurde unterschieden, ob im Perikard noch ganze Zellkerne vorhanden waren, die als rundliche Körper im Perikard erschienen, oder ob es sich bei dem leuchtenden Material lediglich um Detritus (Zellschutt) handelte. Im Gegensatz zu den Zellkernen erschien Detritus in der DAPI-Färbung als unscharf abgegrenzte, leuchtende Areale (siehe Abb. 4.9 B). Da es sich bei Detritus allerdings auch um immunogenes Material handelt, galt das Gewebe lediglich dann als zellfrei, wenn weder Zellkerne noch Detritus erkennbar waren. Da außerdem gut zu sehen war,

welcher Schnitttrand der Innen- bzw. der Außenseite des Perikards entsprach, wurde zusätzlich die Breite des inneren zellfreien Streifens gemessen (siehe Abb. 4.9, A). Diese Breite entspricht der Eindringtiefe der Detergenzien von innen. Indem man von der Gesamtbreite des Streifens die innere zellfreie Strecke sowie die Breite des Zellstreifens subtrahierte, erhielt man näherungsweise die Breite des äußeren zellfreien Streifens, welcher der Eindringtiefe von außen entsprach.

4.7.3 Hämatoxyllin-Eosin-Färbung

Bei der Hämatoxyllin-Eosin-Färbung handelt es sich um eine Übersichtsfärbung. Nach der Entparaffinierung mit Xylol (Roti®-Histol für die Histologie, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, GER) wurden die Schnitte zunächst einer absteigenden Alkoholreihe unterzogen, um ihnen Wasser zuzuführen. Anschließend erfolgte die Färbung erst mit Hämatoxyllin (Mayer's Hämalaunlösung 1:3 mit PBS verdünnt, Merck KGaA, Darmstadt, GER), dann mit Eosin (Eosin Y solution, alcoholic, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, GER) (ausführliches Schema siehe Kap. 9.2). Schließlich wurden die Objektträger mit Eindeckmedium (Leica CV MOUNT, Leica Biosystems GmbH, Nussloch, GER) fixiert und mit einem Deckgläschen (Deckgläser rechteckig, 1871.2, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) versehen. Nach abgeschlossener Trocknung konnten die Objektträger dann unter dem Lichtmikroskop (Leica DMR, Programm LAS EZ Version 3.4.0, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, GER) begutachtet werden. Dabei wurden zunächst die Schnitte auf dem Objektträger betrachtet und hierunter eine repräsentative Stelle gesucht. Anschließend wurden von dieser Stelle Aufnahmen mit 100- und 200-facher Vergrößerung angefertigt. Im Rahmen der späteren Analyse wurden diese Aufnahmen mit einem Scoring-System beurteilt (siehe Kap. 4.7.8).

4.7.4 Pikro-Siriusrot-Färbung

Die Pikro-Siriusrot-Färbung diente der Darstellung von Kollagenfasern in den Gewebeschnitten und sollte aufzeigen, ob und inwieweit sich die kollagene Gewebestruktur durch die Dezellularisation verändert hatte. Nach erfolgter Entparaffinierung wurden die Schnitte mithilfe des Färbekits (Pikro-Siriusrot für Kollagen I & III Nachweis, MORPHISTO® Evolutionsforschung und Anwendung GmbH, Frankfurt am Main, GER) entsprechend dem vom Hersteller vorgegebenen Protokoll gefärbt (siehe Kap. 9.2). In der anschließenden Polarisationsmikroskopie konnten sowohl Kollagenfasern vom Typ I als auch vom Typ III sichtbar gemacht werden. Unser besonderes Interesse galt dabei den Kollagenfasern vom Typ I (gelb), da diese wesentlich für die perikardiale Zugfestigkeit verantwortlich sind. Vor der Prämisse, dass sämtliche Kollagenfasern vom Typ I gelb angefärbt wurden, ist davon

auszugehen, dass die Gelbfärbung der Probe mit deren Kollagengehalt korreliert. Um diesen Kollagengehalt zu quantifizieren, wurden die angefertigten Aufnahmen mit dem Computerprogramm ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) bezüglich ihrer gelben Farbdichte (integrated density) analysiert. Hierfür wurde der gelbe Farbanteil der Aufnahmen isoliert und anschließend die mittlere Helligkeit des Gelbanteils gemessen. Um eine Vergleichbarkeit der Gewebeproben unabhängig von deren Dicke zu ermöglichen, wurde die Helligkeit der Gewebeprobe mit ihrer Fläche ins Verhältnis gesetzt (integrated density/mm²). Eine geringere integrated density/mm² nach Dezellularisation entsprach hierbei also einer Abnahme der Kollagenfasern und deutete demzufolge auf eine Gewebeschädigung hin.

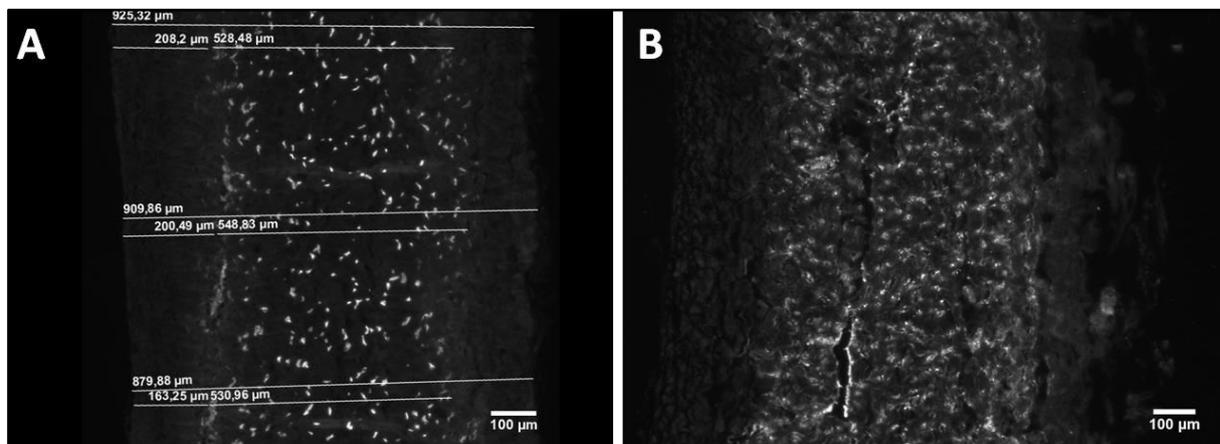


Abb. 4.9: Unvollständige Dezellularisation. A: Perikard HA β 3D im Querschnitt unter dem Fluoreszenzmikroskop nach DAPI-Färbung: Zu erkennen ist die glatte Innenseite des Perikards links sowie die etwas unebenere Außenseite rechts. In der Mitte sind Zellkerne zu erkennen, die unter der DAPI-Färbung leuchten. Es ist außerdem zu sehen, dass an 3 Stellen Messbalken für die Gesamtbreite, die Eindringtiefe von innen und die Breite des Zellstreifens eingefügt wurden. B: Beispiel für Detritus ohne Zellkerne: Zu erkennen ist das Perikard HBy4 nach einer DAPI-Färbung unter dem Fluoreszenzmikroskop. In der Mitte des Schnittes sind keine runden, abgrenzbaren Zellkerne erkennbar, jedoch erscheinen diffus leuchtende Areale, sog. Detritus (Zellschutt). In den Randbereichen des Gewebeschnittes ist kein Detritus erkennbar.

4.7.5 Rasterelektronenmikroskopie

Um die perikardiale Oberflächenstruktur im Detail bewerten zu können, empfiehlt sich die Rasterelektronenmikroskopie. Hierfür mussten die in der Fix-II-Lösung eingelegten Proben entsprechend vorbereitet werden. Um eine vollständige Gewebekonservierung zu gewährleisten, wurden die entnommenen Proben für mindestens 24h bei Raumtemperatur in dieser Lösung gelagert, die Weiterverarbeitung fand stets innerhalb der ersten 5 Tage nach Einlegen statt. Da die Rasterelektronenmikroskopie in einem Vakuum stattfand, mussten die Proben vakuumstabil gemacht werden. Dies beinhaltete zunächst die vollständige Trocknung, um zu verhindern, dass durch das Vakuum Wassermoleküle aus dem Gewebe ausströmten, da dieser Vorgang zur Bildung

sichtbarer Artefakte und damit zu einer Verfälschung des späteren Bildes führen könnte. Für die Trocknung der Proben wurden diese zunächst einer aufsteigenden Alkoholreihe unterzogen (Schema siehe Kap. 9.2) und anschließend in -30°C kaltem, reinem Ethanol (EMSURE Ethanol absolute for analysis, Merck KGaA, Darmstadt, GER) maximal eine Stunde gelagert. Im nächsten Schritt wurde mithilfe eines Kritisch-Punkt-Trockners (Critical Point Dryer CDP 030, L701431, BAL-TEC GmbH, Schalksmühle, GER) das Ethanol bei einer Temperatur von 8°C schrittweise durch flüssiges CO_2 ersetzt. Anschließend wurde das CO_2 mit den darin befindlichen Perikardproben auf 42°C erhitzt. Um zu verhindern, dass durch das Absinken des Druckes in der Kammer Trocknungsartefakte im Gewebe entstehen, wurde das CO_2 über ein Ventil langsam und dosiert abgelassen, bis der Umgebungsdruck erreicht war. Des Weiteren musste die Oberfläche der Proben für die spätere Rasterelektronenmikroskopie leitend gemacht werden. Dies gelang mithilfe eines Sputters (Sputter Coater SCD 050, L106975, BAL-TEC GmbH, Schalksmühle, GER), der die Perikardproben mit einer dünnen Goldschicht überzog. Hierfür wurden die Proben direkt im Anschluss an die Trocknung vorsichtig und ohne die Oberfläche zu beschädigen mit einem Skalpell mittig durchtrennt und auf einem Probenhalter mit einer klebrigen Oberfläche fixiert. Jeweils eine Hälfte der Gewebeprobe wurde gewendet aufgebracht, um später während der Rasterelektronenmikroskopie sowohl die Innen- als auch die Außenseite des Perikards begutachten zu können. Nach Einbringen der Proben in den Sputter (siehe Abb. 4.10, A) wurde die Sputterkammer mit Argon gefüllt und danach in ihr ein Unterdruck erzeugt. Anschließend wurden die Proben für 180 Sekunden bei 570 Volt besputtert. Hierdurch entstand auf den Proben eine dünne Goldschicht, die die Probenoberfläche leitend machte (siehe Abb. 4.10, B).

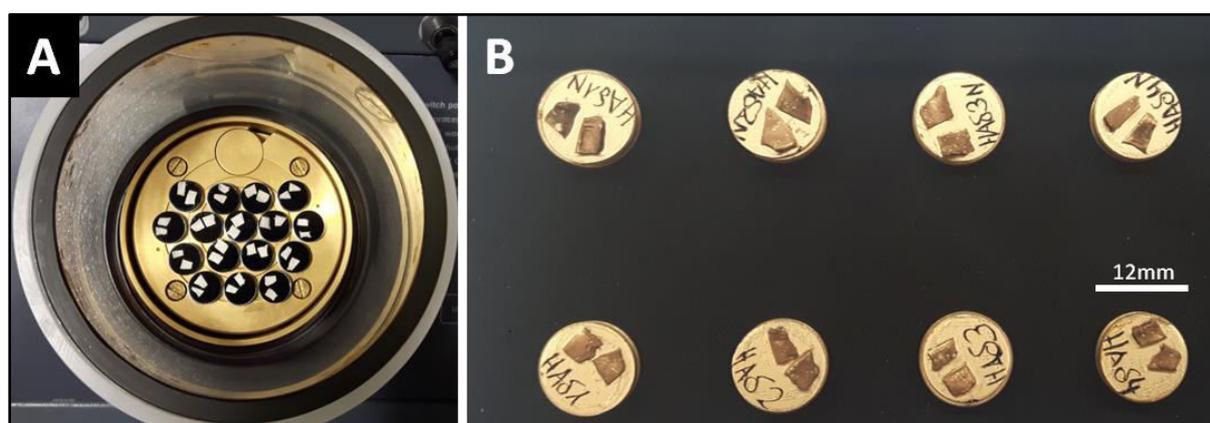


Abb. 4.10: REM-Vorbereitung: A: Blick von oben in die Sputterkammer vor dem Sputterprozess: Zu erkennen sind 16 Probenhalter mit jeweils 2 Proben (Innen- und Außenseite eines Perikards). Jeder Probenhalter hat einen Durchmesser von 12 mm. B: Blick auf die Probenhalter nach dem Sputterprozess: Man erkennt die goldene Oberfläche, welche die Proben durch das Sputtern angenommen haben. Sie wurden anschließend beschriftet, es handelt sich um die Serie HA δ 1-4 sowie HA δ 1-4N

Anschließend konnten die getrockneten und besputterten Proben im Rasterelektronenmikroskop (Zeiss EVO LS10, Programm SmartSEM User Interface, Carl Zeiss AG, Oberkochen, GER) angesehen werden. Dafür wurde jede Probe zunächst in der Übersicht betrachtet. Als Nächstes wurde eine Stelle aufgesucht, die der durchschnittlichen strukturellen Beschaffenheit der gesamten Probe entsprach. Von dieser Stelle wurden dann Aufnahmen mit 100-, 500-, 2.000-, 5.000- und 10.000-facher Vergrößerung angefertigt. Bei der Rasterelektronenmikroskopie handelt es sich um ein deskriptives Verfahren, entsprechend konnten die aus den Bildern gewonnenen Informationen nicht quantifiziert werden.

4.7.6 Pentachrom-Färbung

Die Pentachrom-Färbung erlaubt eine Darstellung verschiedener zellulärer und azellulärer Bestandteile. Ein besonderer Fokus lag dabei auf der Darstellung von elastischen Fasern, um analysieren zu können, in welchem Maß sich die Menge an elastischen Fasern innerhalb des Perikards durch die Dezellularisationen verändert hatte. Die Färbung erfolgte entsprechend des vom Hersteller vorgegebenen Protokolls (siehe Kap. 9.2) mit dem dafür vorgesehenen Färbekit (Movat Pentachrom Original, MORPHISTO® Evolutionsforschung und Anwendung GmbH, Frankfurt am Main, GER) (siehe Abb. 4.11). Anschließend wurden an einer repräsentativen Stelle innerhalb des Schnittes lichtmikroskopische Bilder mit 100- und 200-facher Vergrößerung angefertigt. Dabei erschienen die elastischen Fasern in einem kräftigen rot, das übrige Gewebe erschien gelblich. Die Aufnahmen wurden bei der späteren Analyse mithilfe des Scoring-Systems bewertet (siehe Kap. 4.7.8).



Abb. 4.11: Vorbereitung der Färbeküvetten: Zu erkennen sind die Glasküvetten, in denen die Färbung stattfindet. Hinter den Glasküvetten stehen die Flaschen mit den jeweiligen Färbedetergenzien, im Rahmen der Pentachrom-Färbung handelt es sich hierbei um die Schritte 19.-25. (vollständiges Färbeprotokoll im Anhang, Kap. 9.2)

4.7.7 Untersuchung der Zugfestigkeit

Im Rahmen der zweiten Versuchsreihe wurde die mechanische Stabilität der Perikarde untersucht. Ziel war es zu eruieren, ob und inwieweit sich die Zugfestigkeit der Perikarde durch den Dezellularisationsvorgang verändert hatte. Hierfür wurden aus den nativen, den dezellularisierten, und den mit DNase nachbehandelten Perikardflächen Zugversuchsproben nach DIN-Norm 53504 in der Größe S3a ausgestanzt (Bent-Lever Cutting, DO725974, Zwick GmbH & Co. KG, Ulm, GER) (siehe Abb. 4.12). Diese wurden anschließend bei 7°C in PBS gelagert.

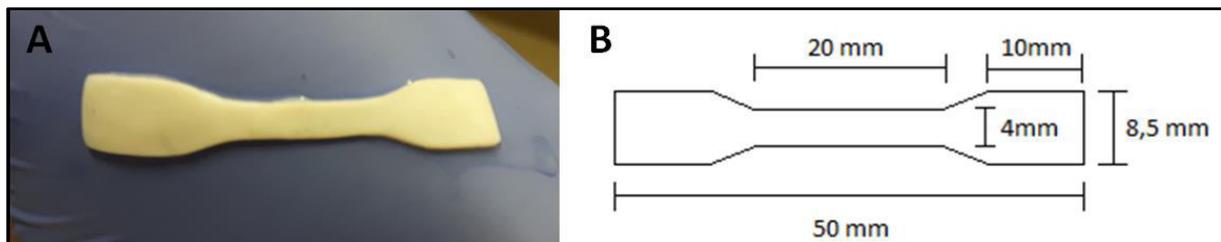


Abb. 4.12: Zugversuchsproben. A: Aus einem Perikard nach DIN-Norm 53504 ausgestanzte Zugversuchsprobe der Größe S3a auf einem blauen Handschuh. Jeweils das linke und rechte Ende wurde in die Zugmaschine eingespannt. B: Maße einer DIN-53504 Zugversuchsprobe der Größe S3a.

Die ausgestanzten Proben wurden so schnell wie möglich, jedoch immer innerhalb von 14 Tagen nach Entnahme, untersucht. Hierzu wurden die Proben in die Zugmaschine (Zwick Roell Z2.5, 659745, Zwick GmbH & Co. KG, Ulm, GER) eingespannt und anschließend mit einer Geschwindigkeit von 30 mm/min uniaxial auseinandergezogen. Die Untersuchung endete dann, wenn der Zugwiderstand durch die Probe unter 80% des maximalen Widerstands fiel. Die Zugfestigkeit der Perikarde wurde sowohl längs als auch quer zum Faserverlauf ermittelt.

4.7.8 Erläuterung des Scoring-Systems

Da es sich sowohl bei der HE- als auch bei der Pentachrom-Färbung um ein zunächst rein deskriptives Verfahren handelt, konzipierten wir ein Scoring-System, um die Ergebnisse der einzelnen Färbungen zumindest bis zu einem gewissen Grad quantifizierbar zu machen. Im Rahmen beider Färbungen wurden mithilfe von Referenzbildern zwischen 0 und 4 Punkten vergeben.

HE-Färbung

Die HE-Färbung sollte einen Überblick über die strukturellen Eigenschaften einer Gewebeprobe geben. Bei der Bewertung der Bilder wurden die Gesamtstruktur des Gewebequerschnitts sowie der Innenrand unabhängig voneinander bewertet. Da die Außenseite der Perikarde bei der manuellen

Entfettung der umgebenden Fettschicht (siehe Kap. 4.1.2) starken Zugkräften ausgesetzt war, konnte bei späterer Betrachtung eines Gewebeschnittes im Fall eines beschädigten Außenrandes nicht differenziert werden, ob es sich um eine Schädigung durch die Entfettung oder durch die Dezellularisation selbst handelte. Aufgrund dieser Manipulation ging der Außenrand nicht in die Bewertung ein.

Um eine möglichst objektive Bewertung der Gesamtstruktur vornehmen zu können, wurden zunächst Referenzbilder für jede Punktzahl zusammengestellt (siehe Kap. 9.4). Diese reichten in 1er-Schritten von 0 Punkten bei keinerlei erkennbarer gleichmäßiger Struktur bis 4 Punkten bei gleichmäßiger Gewebestruktur und regelmäßigem Faserverlauf. Anschließend erfolgte anhand dieser Referenzbilder eine Einordnung der Aufnahmen und eine entsprechende Punktevergabe.

Der Innenrand wies eine deutlich geringere Variabilität als die Gesamtstruktur der Schnitte auf. Aus diesem Grund wurden bei der Beurteilung des Innenrandes anstatt 5 nur 3 Abstufungen vorgenommen. Auch hierfür wurden Referenzbilder ausgewählt (siehe Kap. 9.4). War der Rand nicht durchgängig bzw. aufgrund der Gewebeerstörung nicht als solcher identifizierbar wurden 0 Punkte vergeben. War er zwar identifizierbar, jedoch nicht durchgängig wurden 2 Punkte vergeben. Ein glatter, durchgängiger Rand erhielt 4 Punkte.

So erhielt jede Gewebeprobe am Ende einen Score, der dem Durchschnittswert aus Innenrand-Score und Gesamtstruktur-Score entsprach. Eine hohe Punktzahl entsprach also intaktem, eine niedrige Punktzahl zerstörtem Gewebe.

Pentachrom-Färbung

Mithilfe der Pentachrom-Färbung sollte eruiert werden, in welchem Maß sich die Menge an elastischen Fasern im Gewebe durch die Dezellularisation verändert hatte. Im Rahmen der Färbung wurden elastische Fasern durch die Behandlung mit Brilliant-Crocein-Säurefuchsin rot gefärbt. Ziel des Scorings war es diese Rotfärbung zu kategorisieren. Auch hierbei wurden aufgrund der geringen Variabilität lediglich 3 Abstufungen vorgenommen und Referenzbilder ausgewählt. War im Gewebeschnitt keine bzw. kaum Rotfärbung erkennbar, wurden 0 Punkte vergeben. War eine Rotfärbung zwar erkennbar, jedoch nicht überwiegend, wurden 2 Punkte vergeben. Überwog die Rotfärbung im Gewebeschnitt, wurden 4 Punkte vergeben. Eine hohe Punktzahl entsprach also einem hohen Maß an elastischen Fasern, eine niedrige Punktzahl entsprach einem geringen Maß an elastischen Fasern.

4.7.9 Statistische Auswertung

Aufgrund der geringen Probenanzahl von $n=5$ bzw. $n=4$ brachte die Hinzuziehung statistischer Methoden keinen zusätzlichen Erkenntnisgewinn für diese Forschungsarbeit. Aufgrund dessen erfolgte die Auswertung der Ergebnisse in einem rein deskriptiven Rahmen.

5 Ergebnisse

Im Rahmen der Forschungsarbeit konnten neben den Erkenntnissen aus den Analysemethoden auch generelle, makroskopische Beobachtungen gemacht werden.

Zunächst wurde deutlich, dass die ursprünglich rosafarbenen Perikarde durch die Dezellularisation eine weiße Farbe annahmen (siehe Abb. 5.1). Außerdem erschien bei Entfernung der Perikarde aus der Dezellularisationsvorrichtung das Perikard etwas fester und dicker als im Nativzustand. Diese Beobachtung konnte später im Rahmen der Dickenmessung und der Zugversuche genauer untersucht werden.

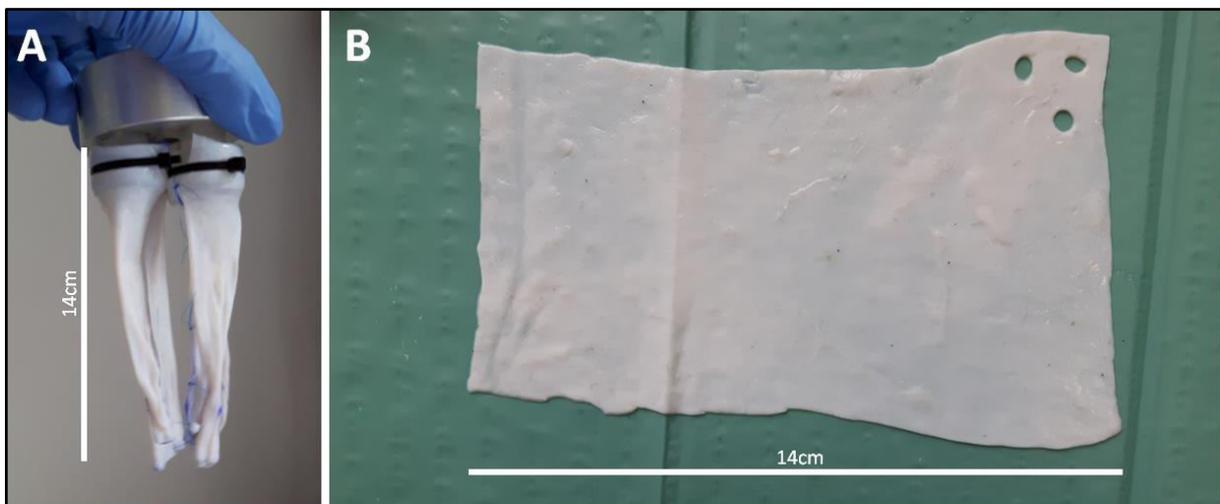


Abb. 5.1: Beispielhaftes Perikard nach Dezellularisation. A: Dezellularisationsvorrichtung mit Perikardpatches bestückt. Zu erkennen sind im Vordergrund des Bildes 2 der 4 Perikarde auf der Vorrichtung, die anderen beiden Perikarde befinden sich im Bildhintergrund. Die Perikarde wurden jeweils an einem kleinen Zylinder mit einem Kabelbinder fixiert, dieser wurde dann am großen, silbernen Zylinder angebracht. Die leichte Blaufärbung entsteht durch die vorherige Markierung mit einem chirurgischen Hautstift. Überdies erkennt man die 5 Einzelknopfnähte, die aus dem Patch einen Perikardschlauch formen. Zur besseren Übersicht wurde der Kolben um 180 Grad gedreht, damit die Perikardschläuche herunterhängen; im Versuchsaufbau zeigen die Schläuche nach oben. B: Darstellung eines Perikardpatches nach der Dezellularisation: Zu erkennen ist das weiße Perikardpatch auf einer OP-Unterlage, das Patch entspricht dem auf Nahtebene eröffneten Perikardschlauch aus A. Am linken Patchrand erkennt man Abdrücke von der Zylinderbefestigung, am rechten Oberrand erkennt man die Lochstanzen-Markierung (Perikard Nr. 3). Der unregelmäßige Rand am unteren Ende des Patches entsteht durch das Entfernen der Klammern bzw. Nähte. Beim Ausschneiden der Proben wurde daher ein Sicherheitsabstand von mindestens 5 mm zum Nahtareal eingehalten. Auffallend ist in beiden Bildern, dass das Perikard eine weiße Farbe angenommen hat.

Eine weitere Beobachtung war der Temperaturanstieg der Dezellularisationsflüssigkeit während der Dezellularisation. Insbesondere im Rahmen der 16-stündigen Dezellularisation stieg die Temperatur der Dezellularisationslösung von Raumtemperatur (ca. 20°C) zu Beginn der Dezellularisation auf 36°C zum Ende der Dezellularisation an. Da diese Temperatur am Ende der Dezellularisation gemessen wurde und nach 4 Stunden im Rahmen des Medienwechsels neue Dezellularisationsflüssigkeit mit

Ergebnisse

Raumtemperatur ins Glas gefüllt wurde, stieg dementsprechend die Temperatur innerhalb von 12 Stunden um 16°C an.

Das Dezellularisationsprotokoll δ (1,0%ige SDS Lösung) ist bezüglich der makroskopischen Auffälligkeiten besonders erwähnenswert. Insbesondere bei der 16-Stündigen Dezellularisation (HB δ) veränderte sich das optische Erscheinungsbild der Perikardpatche erheblich. Die zuvor auf eine Größe von 9x14 cm ausgeschnittenen Patche waren nach der Dezellularisation nur noch etwa 7x9 cm groß (siehe Abb. 5.2). Nach der Dezellularisation waren die Perikarde deutlich kleiner und wirkten verschrumpelt. Außerdem fiel auf, dass die Patche deutlich elastischer waren als vor der Dezellularisation. Aufgrund der Biegung und der Steifigkeit des HB δ -Gewebes nach der Dezellularisation war es nicht möglich, die DNase-Nachbehandlung wie üblich in einer Petrischale vorzunehmen. Als Ersatz verwendeten wir in diesem Fall ein Becherglas mit 250 ml DNase-Lösung. Der übrige Ablauf der DNase-Nachbehandlung blieb identisch. Eine weitere Schrumpfung der Patche fand durch die DNase-Behandlung nicht statt.



Abb. 5.2: Schrumpfung der HB δ -Perikarde im Vergleich zu den übrigen Dezellularisationsprotokollen. A: Die HA α -Perikarde nach der Dezellularisation (siehe auch Abb. 5.1). Eine ähnliche Optik wiesen auch die Perikarde nach einer Dezellularisation mit β oder γ auf. B: Die HB δ -Perikarde nach der Dezellularisation: Zu erkennen sind die am Kolben fixierten Perikarde, in der Mitte erkennt man überdies den zuführenden Schlauch aus dem Versuchsaufbau. Die Aufnahmen wurden direkt im Anschluss an die 16-stündige Dezellularisation angefertigt. Die Perikarde wirken verkürzt und geschrumpft. C: Das ausgebreitete Perikard auf einer 10x10cm großen Holzplatte, eine L-förmige Hälfte wurde zuvor für die DNase-Nachbehandlung ausgeschnitten. Neben der Schrumpfung wird in dieser Aufnahme auch das Hervortreten des Faserverlaufs deutlich.

5.1 DAPI-Färbung

Mithilfe der DAPI-Färbung konnte untersucht werden, in welchem Maß das perikardiale Gewebe sowohl von Zellkernen als auch Zellschutt befreit worden war. Dabei konnte sowohl die Dicke der Perikarde als auch die Eindringtiefe der Detergenzien ermittelt werden. Weiterhin konnte zwischen dem Eindringen von innen und von außen differenziert werden.

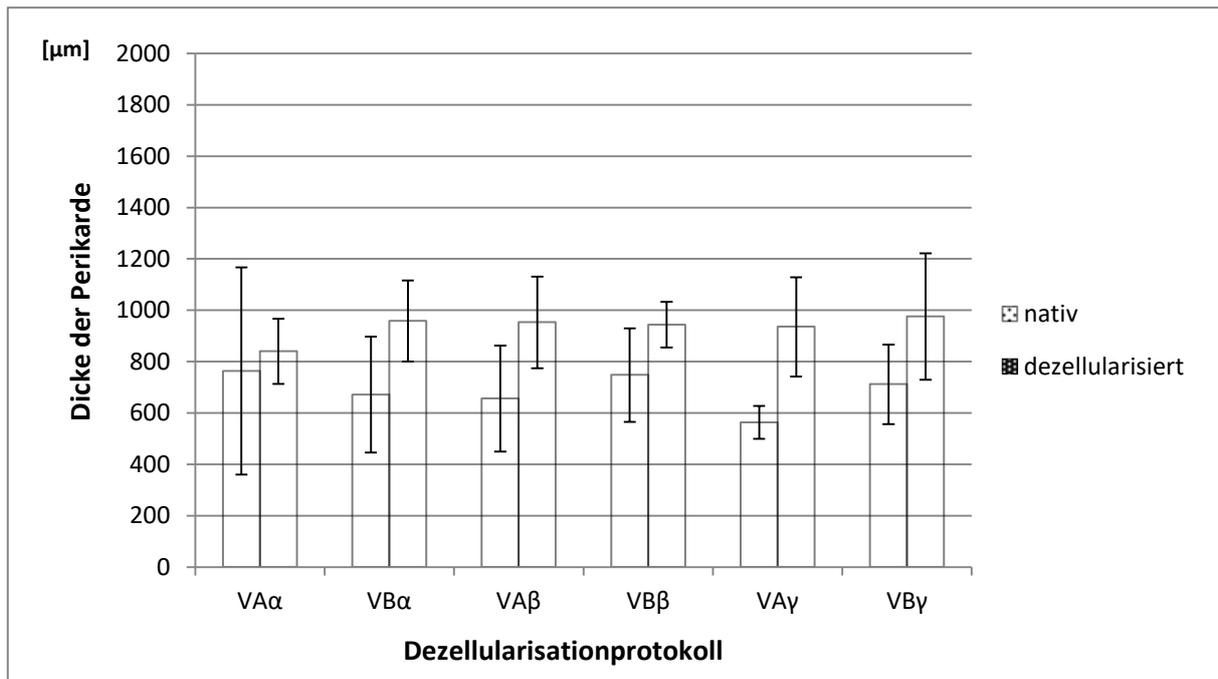


Abb. 5.3: Erste Versuchsreihe (V): Dicke der Perikarde vor und nach Dezellularisation, gemessen in μm .

Zunächst stach hervor, dass die Dicke der Perikarde im Rahmen der Dezellularisation stets zunahm. Dies konnte in beiden Versuchsreihen in einem ähnlichen Maß beobachtet werden (siehe Abb. 5.3, Abb. 5.4). Überdies fiel bei der zweiten Versuchsreihe auf, dass in den meisten Fällen die Nachbehandlung mit DNase zu einer zusätzlichen Dickenzunahme führte (siehe Abb. 5.4). Im Rahmen der Protokolle HB γ und HA δ nahm die durchschnittliche Dicke der Proben durch die DNase-Nachbehandlung ab.

Ergebnisse

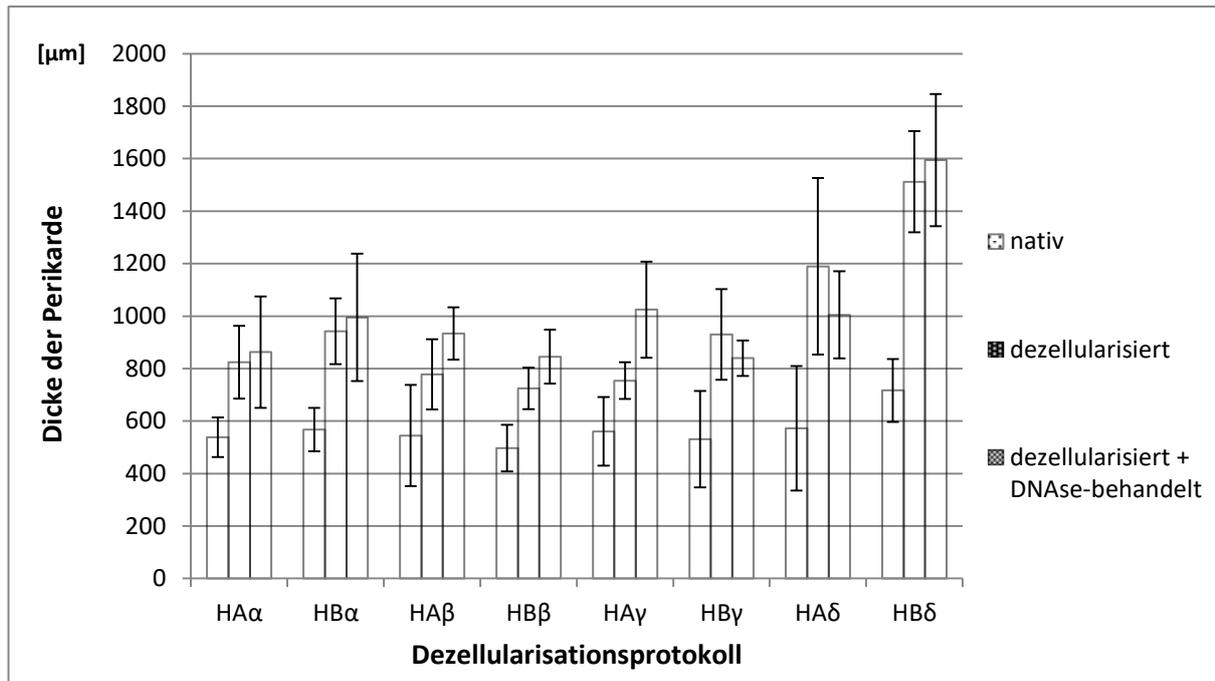


Abb. 5.4: Zweite Versuchsreihe (H): Dicke der Perikarde vor und nach der Dezellularisation sowie nach anschließender DNase-Behandlung.

Bei der 1%igen SDS-Lösung war dieser Effekt besonders stark ausgeprägt. Während die Nativproben eine durchschnittliche Dicke von $716 \pm 120 \mu\text{m}$ aufwiesen, betrug die durchschnittliche Dicke nach der Dezellularisation $1512 \pm 193 \mu\text{m}$. Nach der DNase-Behandlung stieg dieser Wert weiter auf eine durchschnittliche Dicke von $1595 \pm 253 \mu\text{m}$ (siehe Abb. 5.5). Dies entspricht einer Zunahme von 223% in Bezug auf den Ausgangswert.

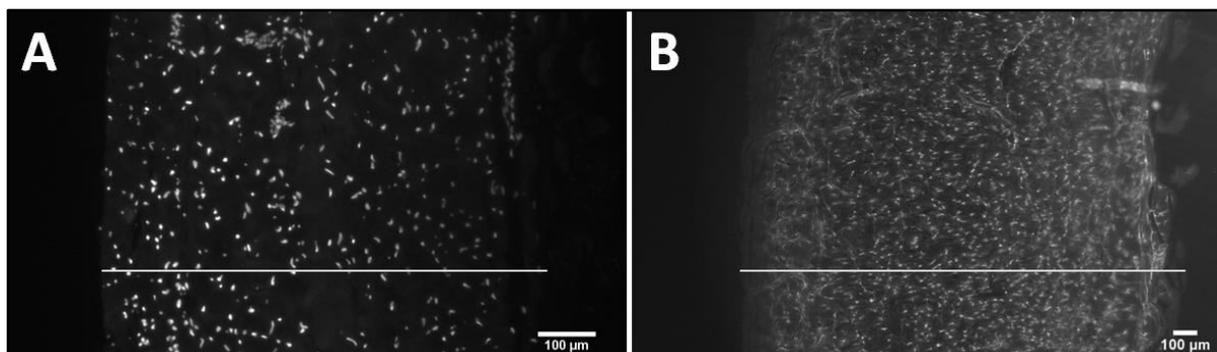


Abb. 5.5: Dickenzunahme im Rahmen des Protokolls HBδ. Zum besseren Verständnis wurde bei beiden Aufnahmen ein Balken eingefügt, welcher der Breite der Perikardprobe entspricht. A: Die Nativprobe HBδ1N bei 100-facher Vergrößerung, ihre durchschnittliche Dicke beträgt $743 \mu\text{m} \pm 8 \mu\text{m}$. B: Die dezellularisierte und mit DNase nachbehandelte Probe HBδ1D bei 40-facher Vergrößerung, ihre durchschnittliche Dicke beträgt $1821 \pm 54 \mu\text{m}$.

Ergebnisse

Im Rahmen der ersten Versuchsreihe gelang die vollständige Dezellularisation des Gewebes beim Protokoll VA α (0,5%ige SD/SDS-Lösung für 4 Stunden) bei 3 der 5 Perikarde. Diese konnte durch das Fehlen von Zellkernen sowie die Abwesenheit von leuchtendem Detritus in der Immunfluoreszenzmikroskopie gezeigt werden (siehe Abb. 5.6).

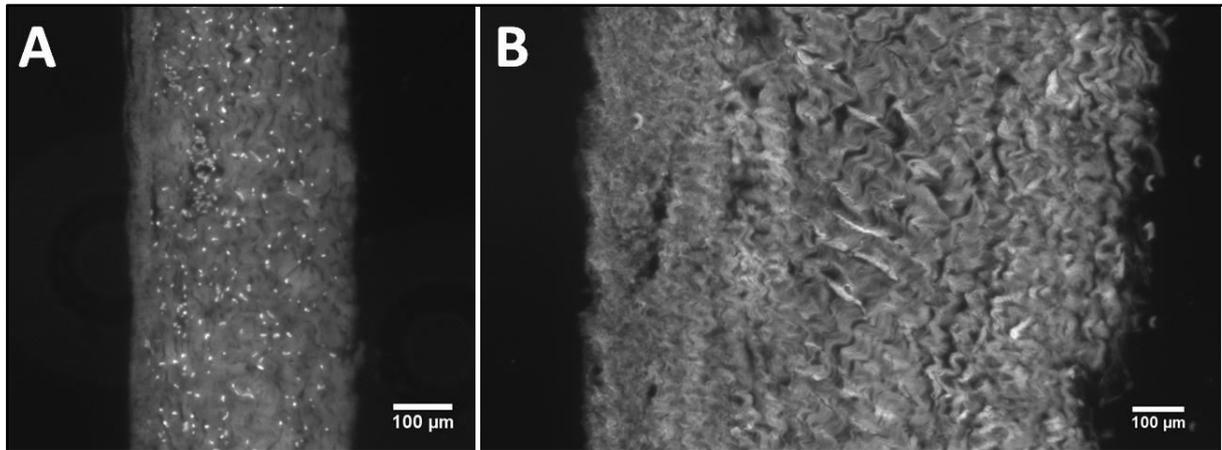


Abb. 5.6: Das Perikard VA α 5 vor und nach Dezellularisation bei 100-facher Vergrößerung: A: Nativprobe VA α 5N: Zu erkennen ist das perikardiale Gewebe mit enthaltenen, leuchtenden Zellkernen. B: Dezellularisierte Probe VA α 5: Es sind weder Kerne noch Detritus erkennbar. Die Kollagenfasern sind erkennbar; die Probe ist dicker als das Nativ.

VA α wies mit 86% sowohl die höchste prozentuale Eindringtiefe als auch mit $735 \pm 252 \mu\text{m}$ die höchste Gesamteindringtiefe in μm auf. Auffallend war hierbei, dass bei der 16-stündigen Dezellularisation mit dem identischen Medium (VB α) keine vollständige Dezellularisation erreicht wurde. Dieses Phänomen war auch beim Dezellularisationsmedium γ erkennbar: Während bei VA γ eine durchschnittliche Eindringtiefe von $567 \pm 169 \mu\text{m}$ sowie die vollständige Dezellularisation bei einem der fünf Perikarde beobachtet werden konnte, erreichte VB γ eine durchschnittliche Eindringtiefe von $458 \pm 107 \mu\text{m}$. Keines der fünf Perikarde konnte im Rahmen von VB γ vollständig dezellularisiert werden (siehe Abb. 5.7).

Ergebnisse

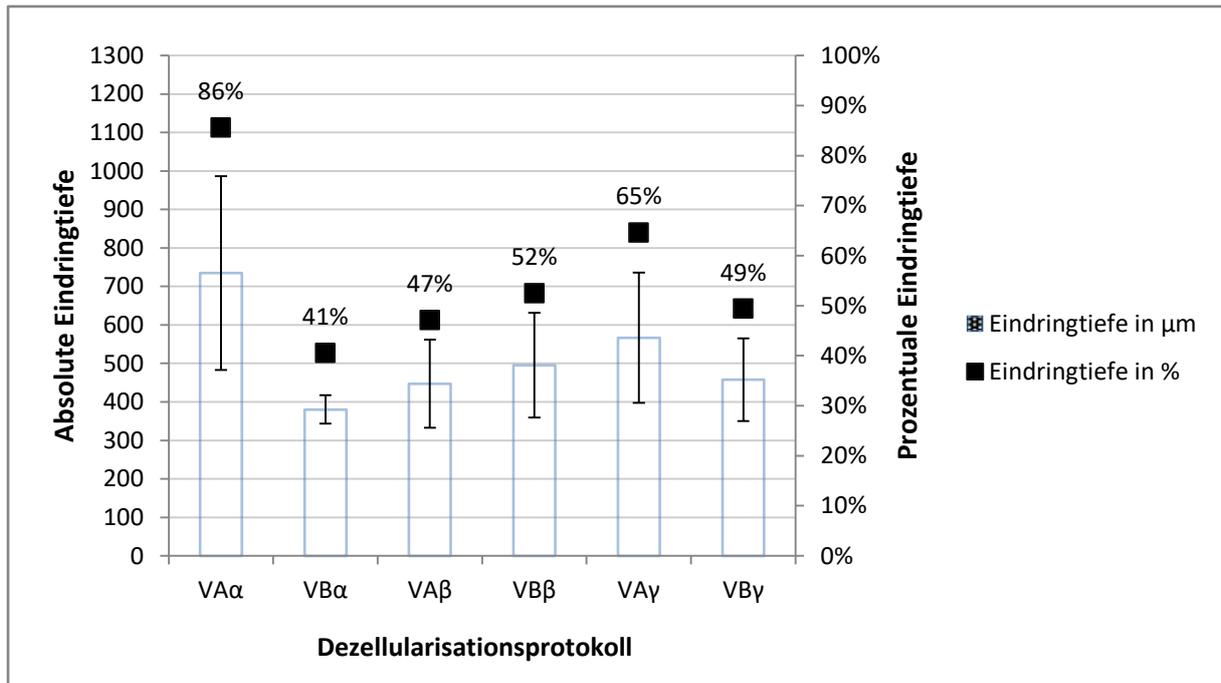


Abb. 5.7: Erste Versuchsreihe (V): Darstellung der Eindringtiefe sowohl absolut als auch prozentual. Es wird deutlich, dass aufgrund der ähnlichen Dicke der Perikarde nach der Dezellularisation (siehe Abb. 5.3) der prozentuale und der numerische Wert miteinander korrelieren.

War ein Perikard zu 100% dezellularisiert worden, konnte nicht mehr beurteilt werden, in welchem Maß die Dezellularisation von innen oder außen stattfand. Entsprechend konnten bei der Beurteilung der Eindringtiefe von innen bzw. außen bei VAα nur 2 der 5 Perikarde in die Berechnung miteingehen bzw. bei VAγ 4 der 5 Perikarde. Das Dezellularisationsmedium drang von beiden Seiten in das perikardiale Gewebe ein. Beim Vergleich der inneren und der äußeren Eindringtiefe waren jedoch keine Tendenzen erkennbar (siehe Abb. 5.8).

Ergebnisse

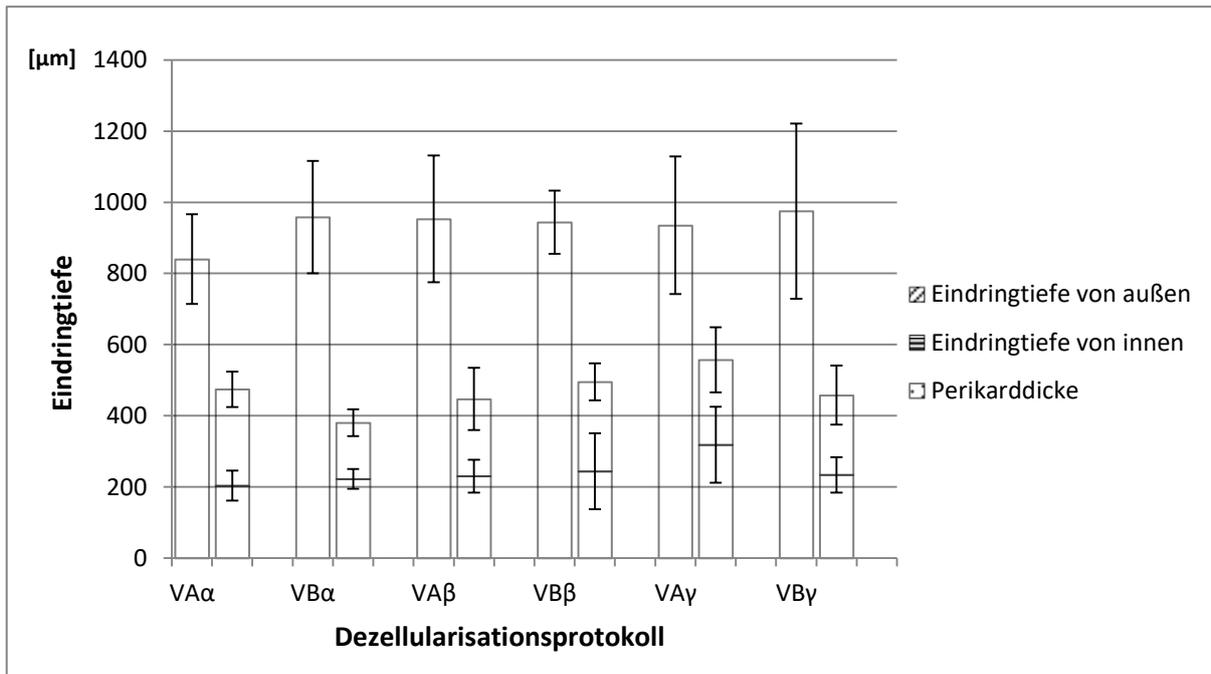


Abb. 5.8: Erste Versuchsreihe (V): Eindringtiefe der Dezellularisationslösung. Das Diagramm zeigt die Dicke der dezellularisierten Perikarde sowie den dezellularisierten Anteil, der der Gesamteindringtiefe entspricht. Die Gesamteindringtiefe setzt sich zusammen aus der Eindringtiefe von innen und der Eindringtiefe von außen. Vollständig dezellularisierte Perikarde konnten nicht in dieses Diagramm miteinfließen.

Im Rahmen der zweiten Versuchsreihe gelang die vollständige Dezellularisation im Rahmen des Dezellularisationsprotokolls HAYD (0,5%ige SDS/Triton X-Lösung für 4 Stunden mit zusätzlicher DNase-Behandlung) bei allen vier Perikarden (siehe Abb. 5.9).

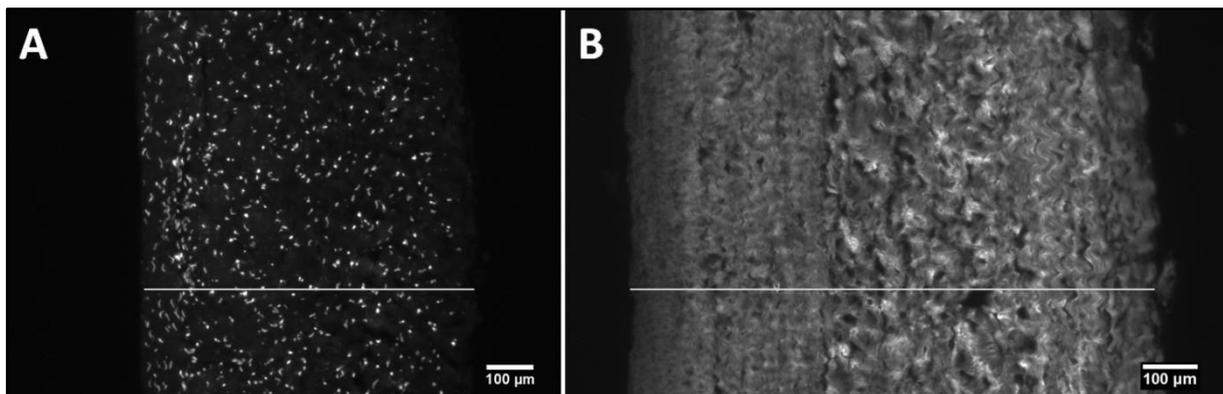


Abb. 5.9: Zweite Versuchsreihe (H): Perikard HAY1 vor und nach Dezellularisation bei 100-facher Vergrößerung. Zum besseren Verständnis wurde bei allen Aufnahmen ein Balken eingefügt, welcher der Breite der Perikardprobe entspricht. Die Belichtungszeit der Schnitte wurde automatisch angepasst, um so möglichen Detritus besser identifizieren zu können. Aufgrund dessen leuchtet in B das kollagene Gewebe heller. A: Nativprobe HAY1N, zu erkennen ist der Gewebestreifen mit enthaltenen, leuchtenden Zellkernen. B: Dezellularisiertes und mit DNase nachbehandeltes Perikard HAY1D: Zu erkennen ist der Gewebestreifen, es sind keine Zellkerne erkennbar. Darüber hinaus ist kein Detritus erkennbar. Es ist die kollagene Schichtung der Gewebeprobe erkennbar.

Ergebnisse

Bei den Protokollen HB β D, HB γ D und HA δ D gelang die vollständige Dezellularisation bei je einem der vier Perikarde. Bei HA α , HB α , HA γ und HB γ waren nach der Dezellularisation die Zellkerne soweit aufgelöst, dass in den Schnitten nur noch Detritus zu sehen war (siehe Abb. 5.10).

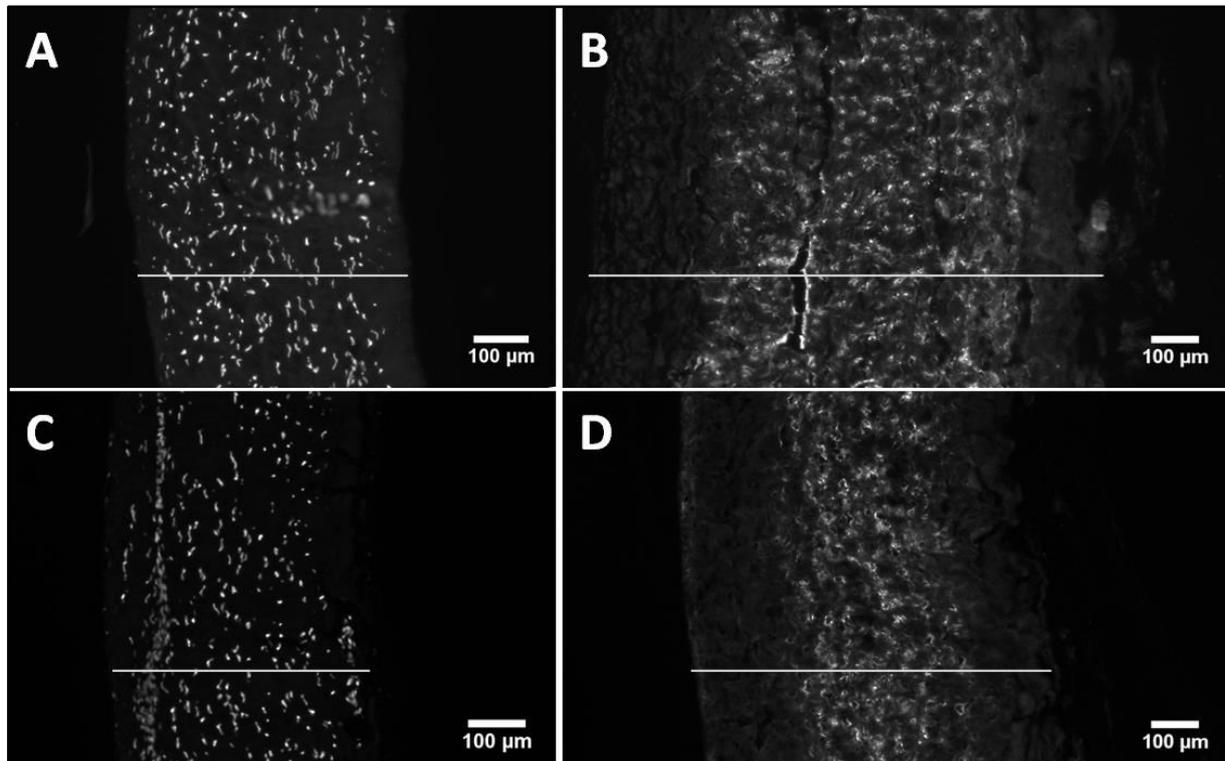


Abb. 5.10: Verbleib von Detritus (Zellschutt) im Gewebe nach Dezellularisation, alle Aufnahmen bei 100-facher Vergrößerung. Zum besseren Verständnis wurde bei allen Aufnahmen ein Balken eingefügt, welcher der Breite der Perikardprobe entspricht. A: Nativprobe HB γ 4N, es sind beidseits glatte Ränder erkennbar, die Zellkerne erscheinen rundlich bis länglich und sind gut abgrenzbar. B: Das Perikard HB γ 4 nach der Dezellularisation: Es sind keine abgrenzbaren Zellkerne mehr erkennbar, im Zentrum des Schnittes befindet sich ein Streifen aus diffus leuchtendem Material (Detritus), die ursprüngliche Lokalisation der Kerne lässt sich noch erahnen. Darüber hinaus hat das Gewebe an Dicke zugenommen und verfügt nicht mehr über glatte Ränder. C: Nativprobe HA α 4N: Es sind rundliche, leuchtende Zellkerne abgrenzbar, die Ansammlung von Zellkernen am linken Schnitttrand weist auf das Vorhandensein eines Gefäßes in diesem Bereich hin. D: Das Perikard HA α 4 nach Dezellularisation. Der Innenrand des Gewebes ist glatt, mittig ist ein diffus leuchtender Streifen aus Detritus erkennbar.

Im modifizierten Versuchsaufbau der zweiten Versuchsreihe wurden die Perikarde mit der ursprünglichen Innenseite nach innen zu einem Schlauch geformt, der dann von der Dezellularisationslösung durchströmt wurde. Aufgrund des höheren Druckes innerhalb des Schlauches war eine Fragestellung, ob dadurch die Eindringtiefe von innen beeinflusst würde. Die Ergebnisse in Bezug auf diese Fragestellung zeigen keine wesentliche Zunahme der inneren Eindringtiefe im Vergleich zur ersten Versuchsreihe. Nach der Dezellularisation wurden auf der Innenseite der Perikarde Eindringtiefen zwischen $42 \pm 78 \mu\text{m}$ beim Protokoll HB β und $204 \pm 38 \mu\text{m}$ beim Protokoll HA α erfasst. Die Eindringtiefen von außen variierten zwischen $71 \pm 18 \mu\text{m}$ bei HB δ und $185 \pm 13 \mu\text{m}$ bei HB α (siehe Abb. 5.11).

Ergebnisse

Das Detergenz α wies mit $359 \pm 58 \mu\text{m}$ beim 4-stündigen Protokoll und $404 \pm 19 \mu\text{m}$ beim 16-stündigen Protokoll die höchsten Eindringtiefen auf.

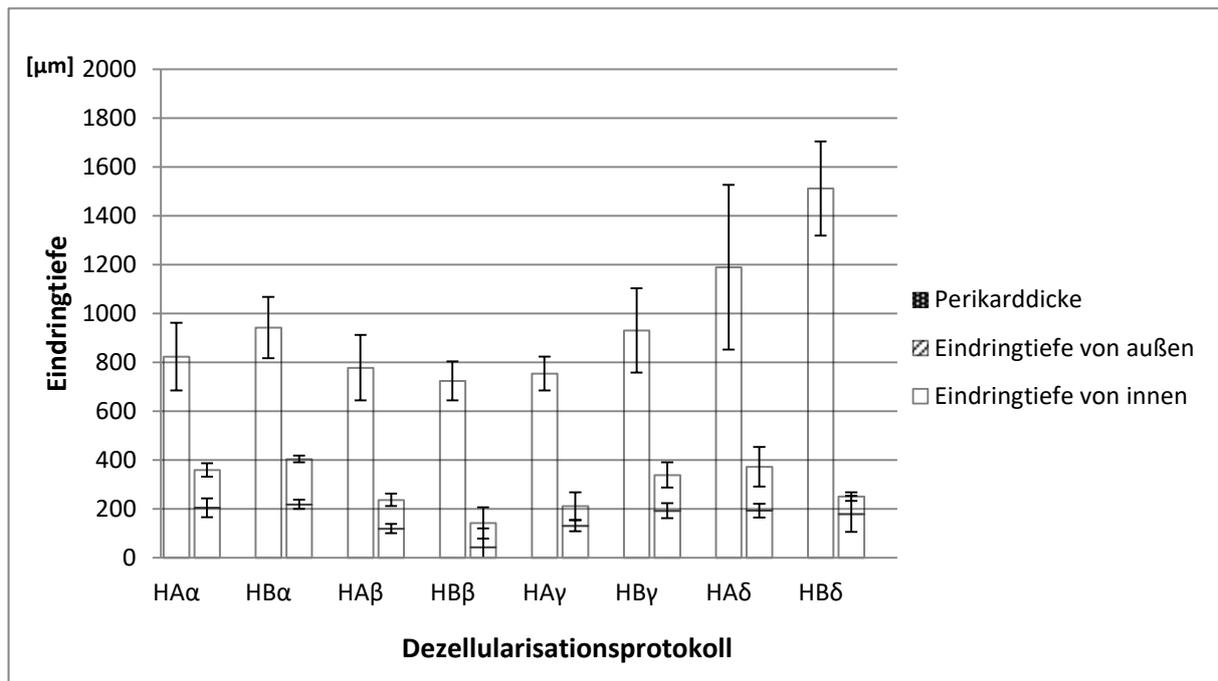


Abb. 5.11: Zweite Versuchsreihe (H): Eindringtiefe nach Dezellularisation. Das Diagramm zeigt die Dicke der dezellularisierten Perikarde sowie den dezellularisierten Anteil, der der Gesamteindringtiefe entspricht. Die Gesamteindringtiefe setzt sich zusammen aus der Eindringtiefe von innen und der Eindringtiefe von außen.

Durch die anschließende DNase-Behandlung stiegen sowohl die Perikarddicken, als auch die Eindringtiefen bei allen Dezellularisationsprotokollen an (siehe Abb. 5.12). Da bei HA γ D bei allen 4 Perikarden eine vollständige Dezellularisation stattfand, konnte hier nicht zwischen der Eindringtiefe von innen und der Eindringtiefe von außen differenziert werden. Entsprechend befindet sich an dieser Stelle im Diagramm ein abgewandelter Balken (siehe Abb. 5.12).

Ergebnisse

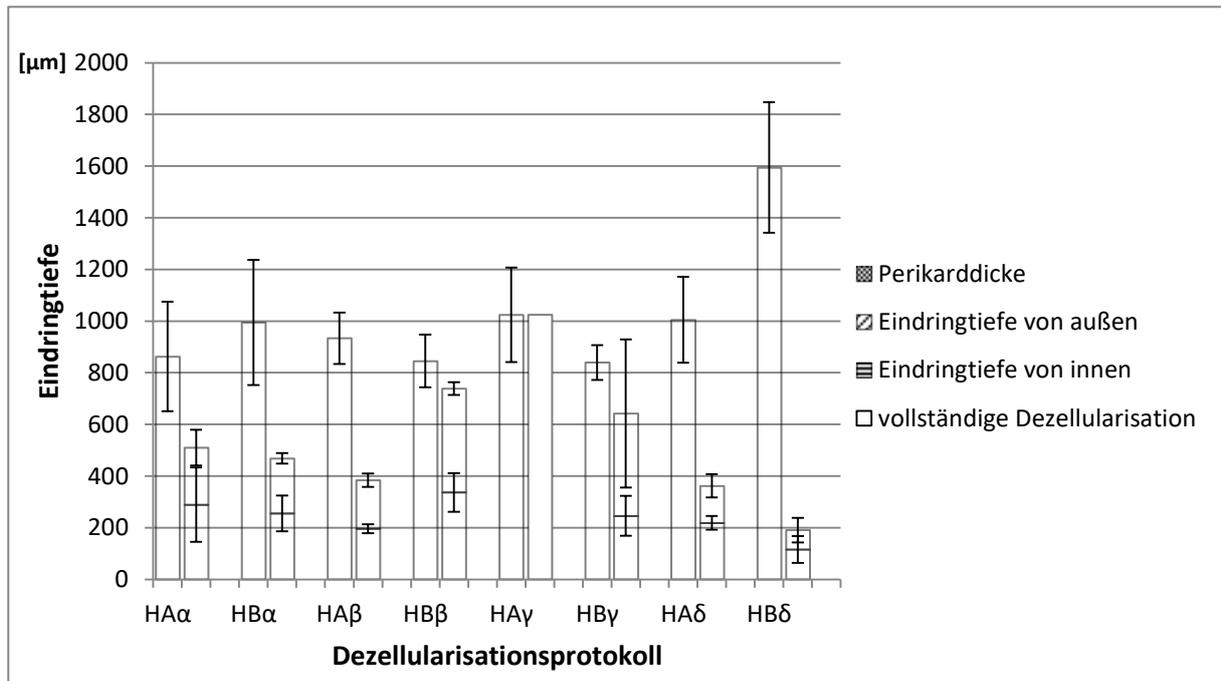


Abb. 5.12: Zweite Versuchsreihe (H): Eindringtiefe nach DNase-Behandlung. Das Diagramm zeigt die Dicke der dezellularisierten und mit DNase nachbehandelten Perikarde sowie den dezellularisierten Anteil, der der Gesamteindringtiefe entspricht. Die Gesamteindringtiefe setzt sich zusammen aus der Eindringtiefe von innen und der Eindringtiefe von außen. Im Rahmen von HAγD wurden alle Perikarde vollständig dezellularisiert, entsprechend konnte hier keine Unterscheidung zwischen innen und außen gemacht werden.

Auf der Innenseite der Perikarde reichte die Eindringtiefe von $115 \pm 52 \mu\text{m}$ bei HBδ bis $336 \pm 75 \mu\text{m}$ bei HBβ. Auf der Außenseite konnten Eindringtiefen zwischen $74 \pm 48 \mu\text{m}$ bei HBδ und $402 \pm 199 \mu\text{m}$ bei HBβ gemessen werden. Im Rahmen der DNase-Nachbehandlung stieg bei HBβ die Gesamteindringtiefe von $142 \pm 65 \mu\text{m}$ auf $655 \pm 86 \mu\text{m}$ an. Dies entspricht einer durchschnittlichen Zunahme der Eindringtiefe um 461 %. In Bezug auf die Eindringtiefe gilt es zu erwähnen, dass die vollständig dezellularisierten Perikarde bei HAγD eine Dicke und damit eine Gesamteindringtiefe von $1025 \pm 183 \mu\text{m}$ aufwiesen. Ginge man davon aus, dass das Perikard zu gleichen Teilen von innen und außen dezellularisiert wurde, so entspräche dies einer Eindringtiefe von $512,5 \mu\text{m}$ von beiden Seiten.

5.2 Hämatoxillin-Eosin-Färbung

Mithilfe der HE-Färbung konnte zunächst die Gesamtstruktur der Schnitte begutachtet und mithilfe des Scoring-Systems bewertet werden (Tabelle mit allen Scores und Referenzbildern siehe Kap. 9.4).

Ergebnisse

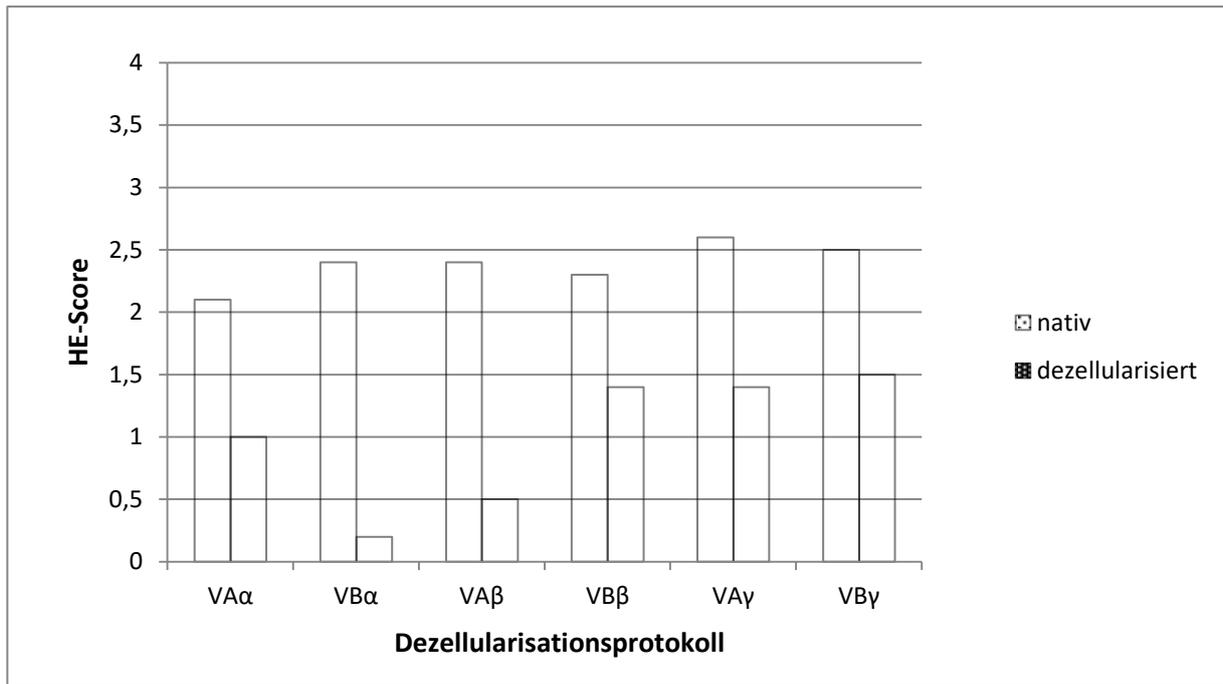


Abb. 5.13: Erste Versuchsreihe (V): HE-Score der Perikarde vor und nach der Dezellularisation.

Bei der ersten Versuchsreihe wiesen die Nativproben bei allen Dezellularisationsprotokollen im Durchschnitt einen Score zwischen 2,1 (VA α) und 2,6 (VA γ) auf. Dabei hatte das Dezellularisationsmedium γ mit einer Abnahme von 2,6 auf 1,4 (VA γ) bzw. 2,5 auf 1,5 (VB γ) den geringsten Effekt auf den Gewebescore in der HE-Färbung. Die Protokolle VB α und VA β bewirkten die deutlichste Abnahme des Gewebescores. Dabei fiel der Score bei VB α von 2,4 auf 0,2 und bei VA β von 2,4 auf 0,5. Auffallend ist, dass der Gewebescore beim Dezellularisationsprotokoll VA β (4h) stärker abnahm als bei VB β (16h) (siehe Abb. 5.13)

Im Rahmen der zweiten Versuchsreihe wiesen die Nativproben im HE-Scoring-System durchschnittlich Werte zwischen 3,4 und 3,9 auf (siehe Abb. 5.14).

Ergebnisse

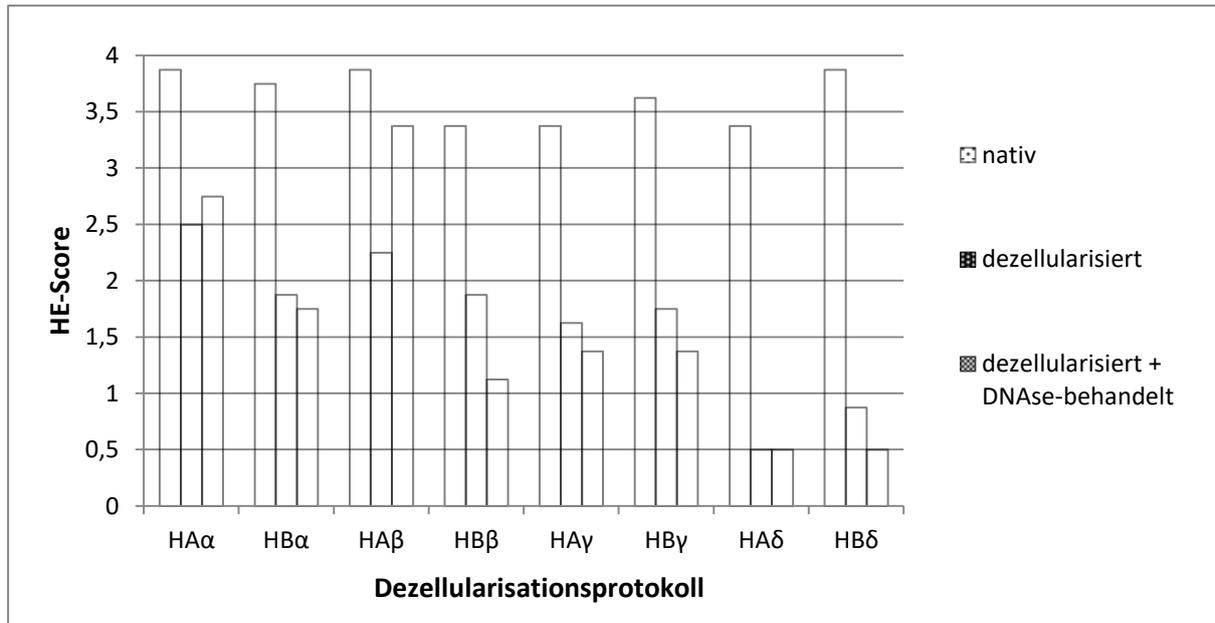


Abb. 5.14: Zweite Versuchsreihe (H): HE-Score der Perikarde vor und nach Dezellularisation sowie nach anschließender DNase-Behandlung.

Mit einer Scoreabnahme von 1,375 im Vergleich zu den Nativproben und einem durchschnittlichen Score von 2,5 nach der Dezellularisation hatte das Protokoll HAα (0,5%ige SD/SDS-Lösung für 4 Stunden) den geringsten Effekt auf den Gewebescore. Bei Betrachtung der Aufnahmen wurde deutlich, dass das Gewebe nach der Dezellularisation an Dicke zugenommen hatte, die Kollagenfasern lagen intakt vor, insgesamt wirkte die Gewebeprobe aufgelockert. Der Innenrand erschien glatt und gut abgrenzbar, wenige dunkel gefärbte Zellkerne waren in der Gewebeprobe erkennbar (siehe Abb. 5.15).

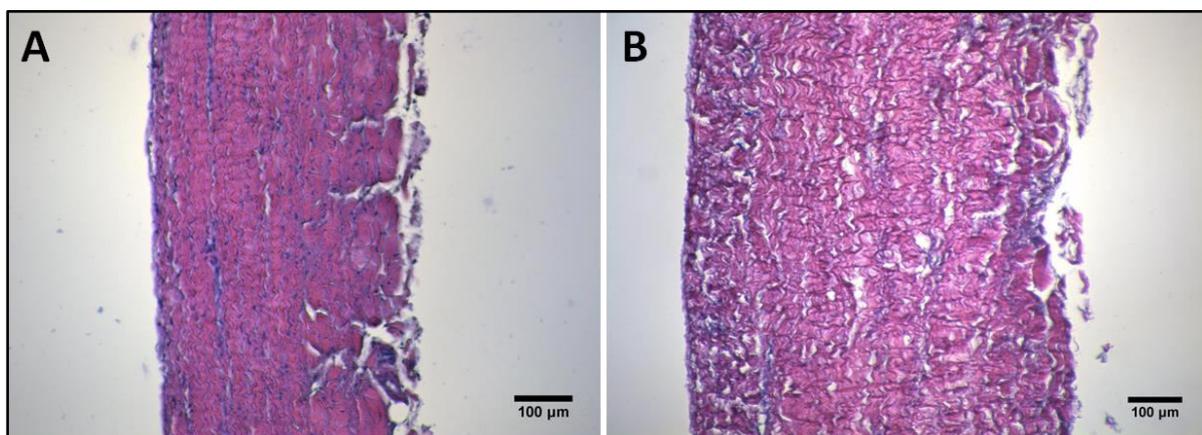


Abb. 5.15: Perikard HAα4 vor und nach Dezellularisation bei 100-facher Vergrößerung. A: Zu erkennen ist die Nativprobe HAα4N mit Innenrand links und Außenrand rechts, die Kollagenfasern liegen regelmäßig angeordnet und dicht gepackt, es sind dunkel gefärbte Zellkerne erkennbar. B: HAα4 nach der Dezellularisation: Der Innenrand erscheint glatt, die Kollagenbündel liegen regelmäßig angeordnet vor, das Gewebe hat an Dicke zugenommen und wirkt aufgelockert.

Ergebnisse

Die Detergenzien α , β und γ bewirkten bezüglich des HE-Scores ähnliche Effekte. Sowohl bei den 4- als auch bei den 16-stündigen Dezellularisationsprotokollen wiesen die Gewebeproben nach der Dezellularisation Werte zwischen 1,625 (HA γ) und 2,5 (HA α) auf. Zusätzlich fiel auf, dass der Score bei HA β nach der zusätzlichen DNase-Behandlung höher war als nach der zunächst stattgefundenen Dezellularisation. Bei den übrigen Dezellularisationsprotokollen nahm der HE-Score durch die DNase-Nachbehandlung in einem geringeren Maß ab als durch die Dezellularisation.

Im Rahmen der zweiten Versuchsreihe hatte das Dezellularisationsmedium δ (1,0%ige SDS-Lösung) einen auffallenden Negativeffekt auf die strukturelle Beschaffenheit der Perikarde. Sowohl beim 4- als auch beim 16-stündigen Protokoll fiel der Score durch die Dezellularisation um 2,9 (HA δ) bzw. 3,0 (HB δ). Dies entspricht einer starken Zerstörung des Gewebes. Auch bei Betrachtung der angefertigten Aufnahmen wurde deutlich, dass das Gewebe insbesondere nach der 16-stündigen Dezellularisation nur noch zu einem geringen Grad den Nativproben ähnelte. Vor allem die Ränder des mit δ dezellulierten Gewebes wiesen keine gerichtete Struktur mehr auf. Es waren keine kollagenen Faserzüge mehr erkennbar, das Gewebe wirkte insgesamt denaturiert (siehe Abb. 5.16). Sowohl die lichtmikroskopischen Aufnahmen als auch die Daten im Scoring-System legen nahe, dass diese Veränderungen in der Gewebestruktur durch die nachträgliche Behandlung mit DNase nicht beeinflusst wurden.

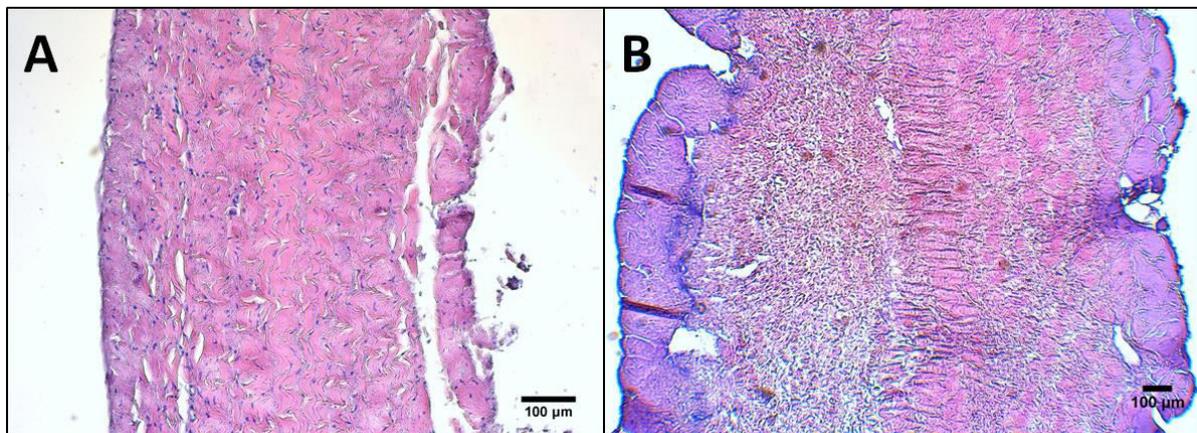


Abb. 5.16: Perikard HB δ 1 vor und nach Dezellularisation. A: Nativprobe HB δ 1N bei 100-facher Vergrößerung: Zu erkennen sind der glatte Innenrand und der unregelmäßigere Außenrand des Perikards, in der Mitte erscheinen regelmäßig angeordnete Kollagenfasern (rosa) sowie dunkel gefärbte Zellkerne. B: HB δ 1 nach Dezellularisation bei 40-facher Vergrößerung: Neben der Zunahme der Perikarddicke fällt eine starke Veränderung der Gewebestruktur auf. Innen- und Außenrand erscheinen denaturiert, eine Unterscheidung ist nicht möglich. In der Mitte sind noch einzelne Bereiche mit einer gerichteten Struktur erkennbar, der Rest des Gewebes wirkt unzusammenhängend, unregelmäßig und destruiert.

5.3 Pikro-Siriusrot-Färbung

Ziel der Pikro-Siriusrot-Färbung war es zu evaluieren, in welchem Maß die Dezellularisation bzw. die DNase-Behandlung die Kollagenstruktur und den Gesamtkollagengehalt des Gewebes beeinflusst. Anschließend konnte durch Messung der Helligkeit des Gelbanteils (integrated density), gerechnet auf die Fläche des Perikardausschnittes näherungsweise der Kollagengehalt der Perikardprobe (integrated density/mm²) ermittelt werden.

Zunächst war bei Betrachtung der angefertigten Aufnahmen erkennbar, dass die Kollagenbündel im Perikard generell in verschiedenen Schichten angeordnet sind. Im Zentrum des Gewebeschnittes weist die Kollagenstruktur in der Regel ein grobes, fischgrätenartiges Muster auf, welches unter der Pikro-Siriusrot-Färbung im polarisierten Licht gelb leuchtet. Zwischen Zentrum und Innenrand weist das Gewebe feinere Fischgrätenmuster, sowie Areale ganz ohne Muster auf (siehe Abb. 5.17).

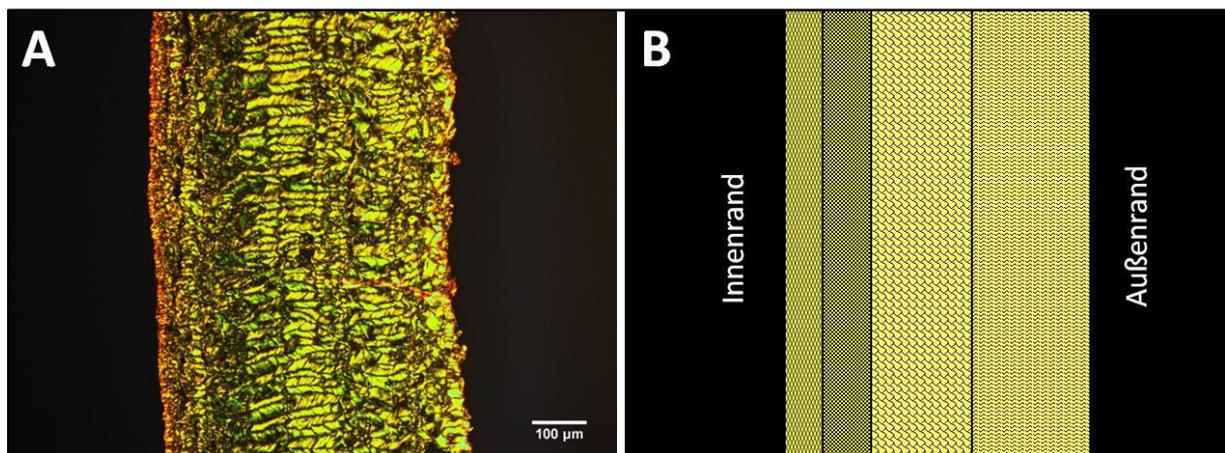


Abb. 5.17: Typische Kollagenverteilung in einer Nativprobe bei 100-facher Vergrößerung. A: Perikard HB62N in der Polarisationsmikroskopie nach Pikro-Siriusrot-Färbung. Zentral liegen grobe, fischgrätenartig angeordnete Kollagenbündel vor. In den Randregionen weichen die Fischgrätenmuster Arealen mit unregelmäßigerer Anordnung, sowie zum Innenrand hin geringerem Kollagengehalt. B: Skizzierte Darstellung der typischen Kollagenverteilung.

Im Rahmen der ersten Versuchsreihe variierten die Werte der Nativproben zwischen $1,66 \times 10^{10} \pm 0,88 \times 10^{10}$ (VBy) und $3,90 \times 10^{10} \pm 1,70 \times 10^{10}$ (VB α). Bei den Protokollen mit 0,5%iger SD/Triton X-Lösung (VA β und VB β) nahm der Kollagengehalt der Proben nur gering ab. Hierbei fiel jedoch auf, dass schon die Nativproben mit Werten von $2,02 \times 10^{10} \pm 1,21 \times 10^{10}$ (VA β) bzw. $1,75 \times 10^{10} \pm 0,49 \times 10^{10}$ (VB β) einen niedrigeren Ausgangswert als die restlichen Nativproben aufwiesen. Bei den Protokollen VBy und VA α stach außerdem hervor, dass der Kollagengehalt der Proben nach der Dezellularisation höher war als der Kollagengehalt der Nativproben. Beim Protokoll

Ergebnisse

VB α fiel überdies auf, dass die Farbdichte nach der Dezellularisation auf einen Wert von $1,73 \times 10^{10} \pm 0,73 \times 10^{10}$ und damit auf 44% des Ausgangswertes abgefallen war (siehe Abb. 5.18).

Bei der Analyse der zweiten Versuchsreihe fiel insbesondere die starke Abnahme der Farbdichte bei HB δ auf (siehe Abb. 5.19). Hier fiel durch die Dezellularisation der Wert der Farbdichte von $7,59 \times 10^{10} \pm 0,91 \times 10^{10}$ auf $0,75 \times 10^{10} \pm 1,01 \times 10^{10}$ nach der Dezellularisation ab. Nach der anschließenden DNase-Behandlung lag der Wert bei $0,46 \times 10^{10} \pm 0,33 \times 10^{10}$. Dies entspricht einer Reduktion auf 10% bzw. 6% des Ausgangswertes nach Dezellularisation bzw. Nachbehandlung (siehe Abb. 5.19). Die zugehörigen Aufnahmen zeigten, dass insbesondere in den Randbereichen kaum Kollagenfasern mehr vorhanden waren. Zentral wiesen besonders die Proben von HB δ eine aufgeworfene, destruierte Kollagenstruktur auf; der geringe Farbgehalt wies überdies auf einen stark verminderten Gesamtkollagengehalt hin.

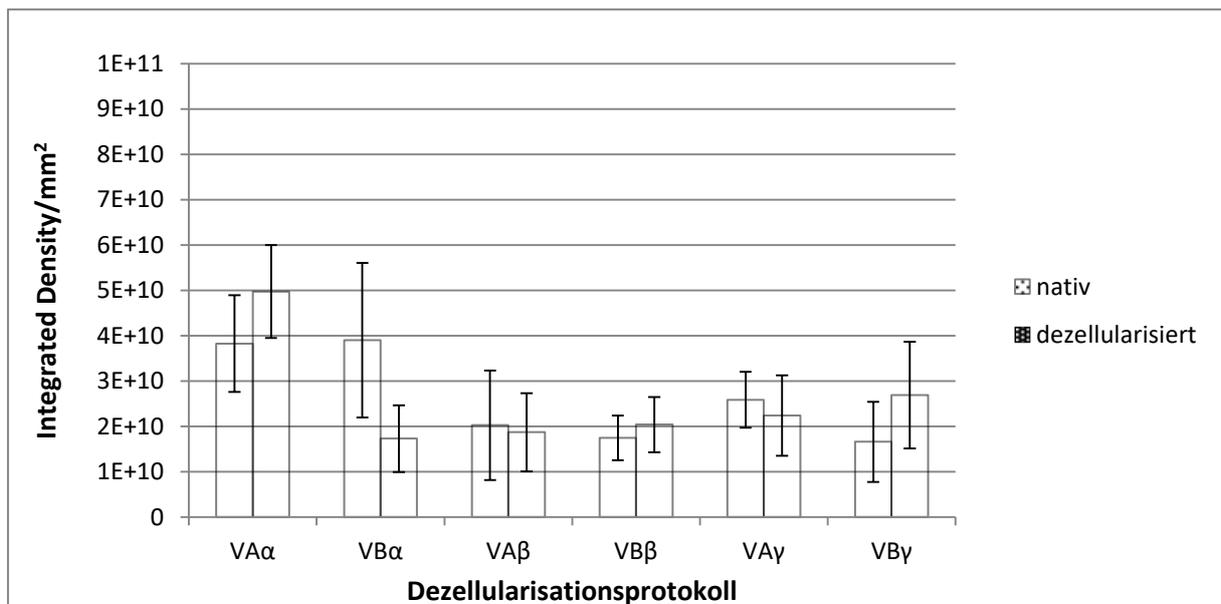


Abb. 5.18: Erste Versuchsreihe (V): Flächenbezogene Helligkeit des Gelbanteils (integrated density/mm²) der Perikarde vor und nach Dezellularisation. Eine Veränderung der integrated density/mm² entspricht näherungsweise einer Veränderung des perikardialen Kollagengehalts. Eine Zunahme des Kollagengehalts zeigt sich bei VA α , VB β und VB γ . Eine Abnahme zeigt sich bei VB α , VA β und VA γ . Bei Vergleich der Dezellularisationsprotokolle wird keine Tendenz deutlich.

Ergebnisse

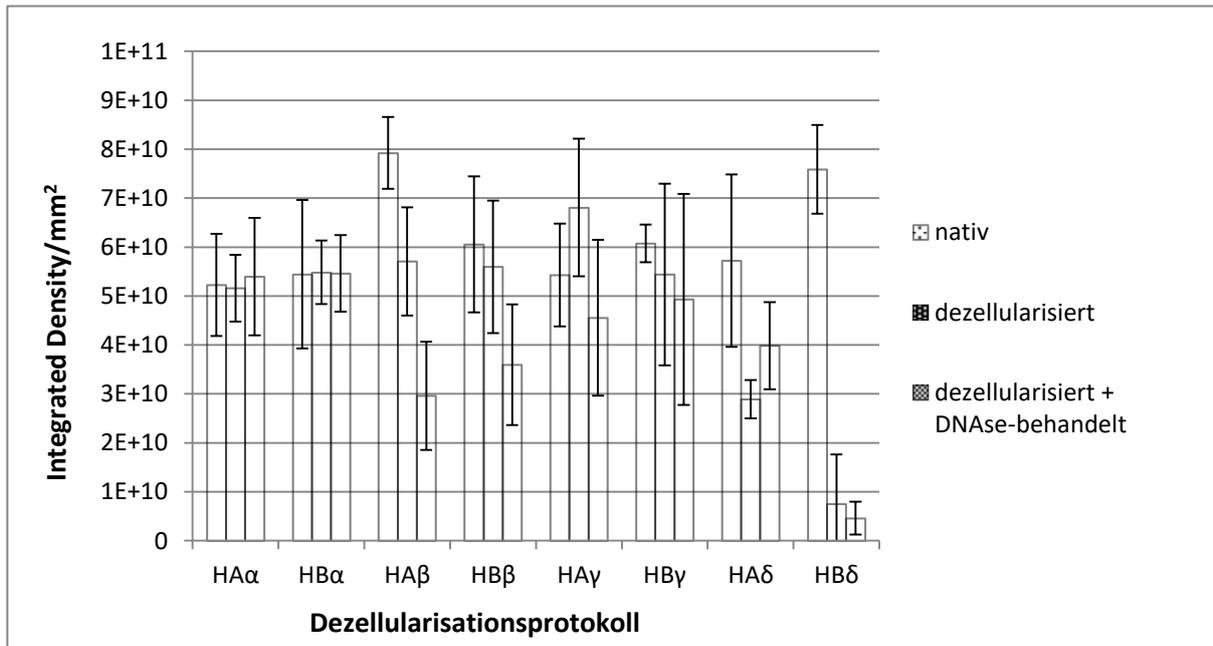


Abb. 5.19: Zweite Versuchsreihe (H): Flächenbezogene Helligkeit des Gelbanteils (integrated density/mm²) vor und nach Dezellularisation, sowie nach anschließender DNase-Behandlung. Eine Veränderung der integrated density/mm² entspricht näherungsweise einer Veränderung des perikardialen Kollagengehalts. Bei den α-Protokollen zeigt sich ein konstanter Kollagengehalt auch nach Dezellularisation und DNase-Behandlung, bei den β-Protokollen wird eine stete Kollagenabnahme mit jeder Behandlung deutlich. Bei HAγ, HBγ und HAδ zeigt sich keine Tendenz. HBδ weist eine massive Abnahme des Kollagengehalts auf.

Den geringsten Effekt auf den Kollagengehalt hatte das Dezellularisationsmedium α. Dies galt sowohl für die 4- als auch für die 16-stündige Dezellularisation. Überdies fiel auf, dass der Kollagengehalt durch die DNase-Behandlung nicht abnahm. So lag bei HBα der Farbdichtewert der Native bei $5,45 \times 10^{10} \pm 1,04 \times 10^{10}$. Nach der Dezellularisation lag der Wert bei $5,48 \times 10^{10} \pm 0,68 \times 10^{10}$ und nach der DNase-Behandlung bei $5,46 \times 10^{10} \pm 1,20 \times 10^{10}$. Bei Betrachtung der entsprechenden Bildaufnahmen ist erkennbar, dass sowohl die Nativproben als auch die dezellularisierten und mit DNase nachbehandelten Proben in einem ähnlichen Maß gelb-grünlich leuchteten (siehe Abb. 5.20). Es wurde auch ersichtlich, dass sich zwar der insgesamt Kollagengehalt nicht änderte, dennoch waren strukturelle Veränderungen erkennbar, im Besonderen die Dickenzunahme der Gewebeproben.

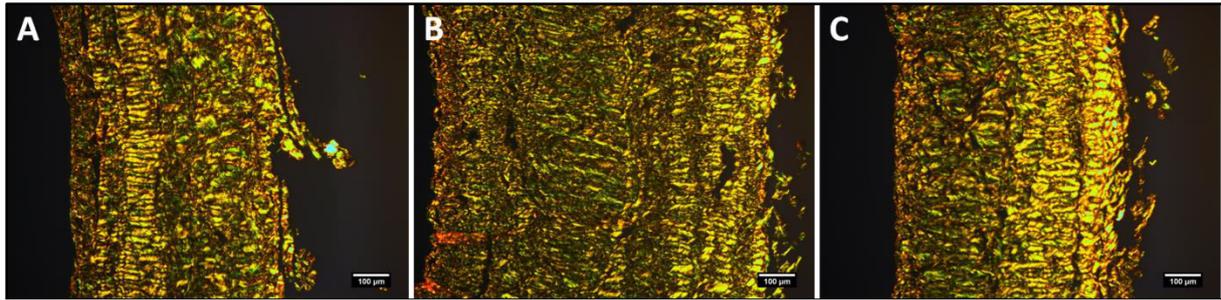


Abb. 5.20: Perikard HA α 2 im nativen, dezellularisierten und nachbehandelten Zustand bei 100-facher Vergrößerung. **A:** Natives Perikard (HA α 2N): Zu erkennen ist ein glatter Innenrand links sowie fischgrätenartige Kollagenmuster im Zentrum des Schnittes. **B:** Dezellularisiertes Perikard (HA α 2): Regelmäßig angeordnete Kollagenbündel finden sich am Außenrand der Probe rechts, darüber hinaus fällt eine Dickenzunahme im Vergleich zum Nativ auf. **C:** Das Perikard nach zusätzlicher DNase-Behandlung (HA α 4D): Zentral und zum Außenrand der Probe hin sind regelmäßig angeordnete Kollagenbündel erkennbar. Es wird deutlich, dass insbesondere die regelmäßig angeordneten Areale in der Polarisationsmikroskopie hell aufleuchten. Der Gesamtkollagengehalt der Probe hat durch die DNase-Behandlung nicht abgenommen.

Im Gegensatz zu α nahm besonders beim Dezellularisationsmedium β der Kollagengehalt durch die DNase-Behandlung ab. So wies das Protokoll HA β nach der DNase-Behandlung eine durchschnittliche Farbdichte von $2,96 \times 10^{10} \pm 1,11 \times 10^{10}$ auf (siehe Abb. 5.19). Das entspricht in Bezug auf die Nativprobe einer Abnahme von $4,96 \times 10^{10}$ bzw. einem Abfall auf 37,3% des Ausgangswertes. Bei Betrachtung der Aufnahmen wird deutlich, dass das Perikard mit jedem Dezellularisationsschritt schwächer leuchtet (siehe Abb. 5.21).

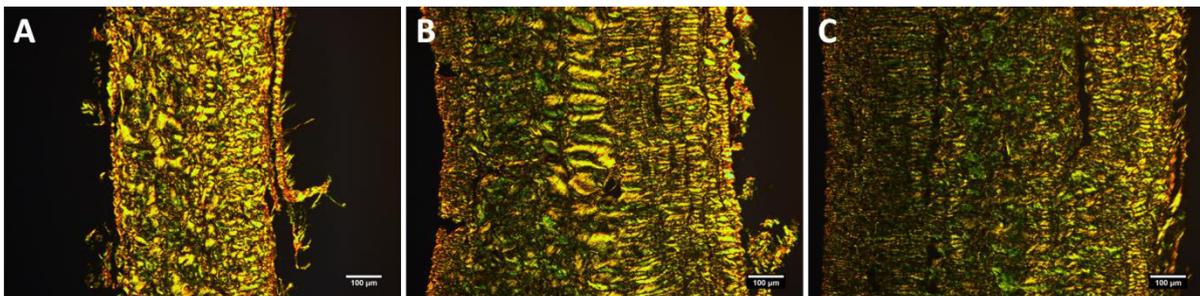


Abb. 5.21: Perikard HA β 2 im nativen, dezellularisierten und nachbehandelten Zustand bei 100-facher Vergrößerung. **A:** Natives Perikard HA β 2N: Zu erkennen sind dichte, gelb leuchtende Kollagenbündel, insbesondere im rechten Drittel des Schnittes ist eine regelmäßige Anordnung erkennbar. **B:** Dezellularisiertes Perikard HA β 2: Zu erkennen sind regelmäßig angeordnete Kollagenbündel, die jedoch im Vergleich zum Nativ in geringerem Maß gelb leuchten. **C:** Mit DNase nachbehandeltes Perikard HA β 2D: Die Kollagenbündel liegen nur noch unregelmäßig vor, es ist keine gerichtete Struktur erkennbar, das Gewebe leuchtet nur noch schwach in der Polarisationsmikroskopie. Sowohl bei B als auch bei C ist eine Dickenzunahme im Vergleich zum Nativ erkennbar.

Um festzustellen, ob durch Modifizierung des Versuchsaufbaus im Zuge der zweiten Versuchsreihe ein geringerer dezellularisationsassoziierter Kollagenverlust erzielt wurde, wurde die flächenbezogene Helligkeit des Gelbanteils der Nativproben mit denen der dezellularisierten Proben in Abb. 5.22 ins Verhältnis gesetzt.

Ergebnisse

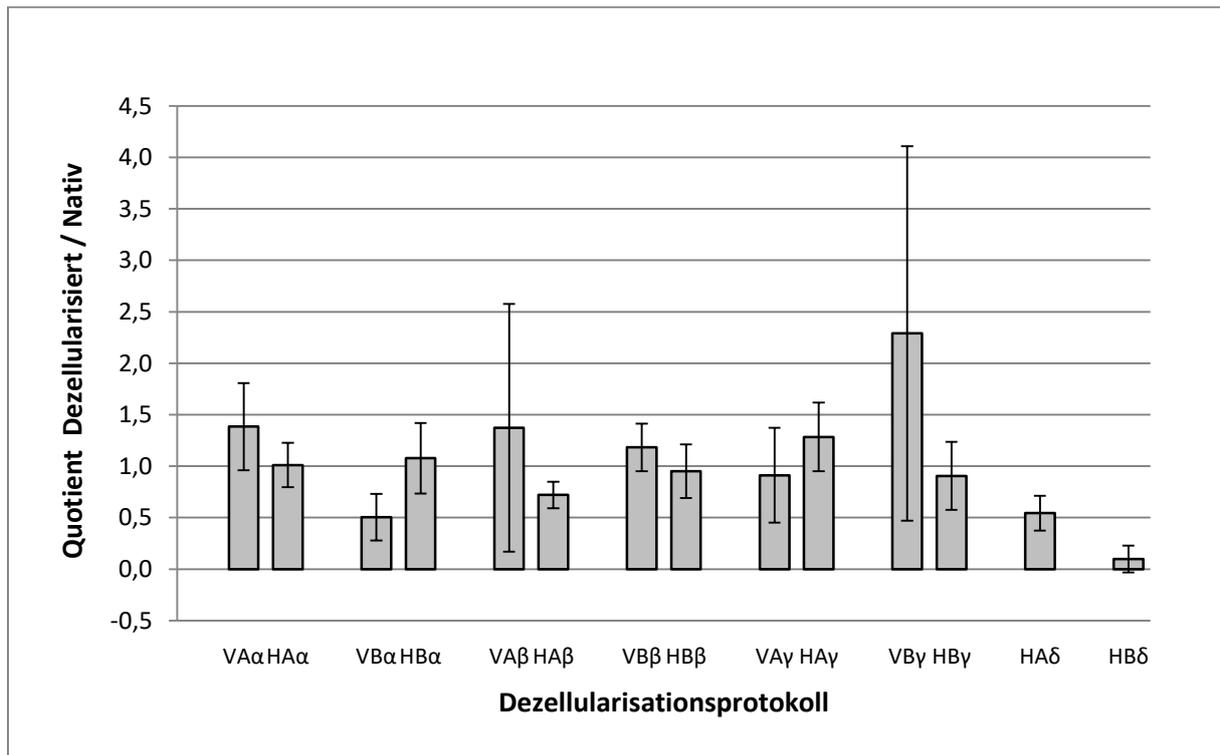


Abb. 5.22: Erste (V) und zweite (H) Versuchsreihe: Mithilfe dieser Darstellung wird das Verhältnis aus dem Kollagengehalt der dezellularisierten Proben mit dem der Nativproben dargestellt. Der Kollagengehalt entspricht dabei näherungsweise der flächenbezogenen Helligkeit des Gelbanteils (integrated density/mm²) der mit Pikro-Siriusrot gefärbten Perikardproben. Hierdurch wurde eruiert, ob die Veränderung des Versuchsaufbaus bei der zweiten Versuchsreihe zu einer geringeren Abnahme des Kollagengehalts nach der Dezellularisation führte. Das δ -Protokoll kam erst in der zweiten Versuchsreihe zum Einsatz. Dementsprechend können HA δ und HB δ nicht mit dem Vorversuch ins Verhältnis gesetzt werden.

Durch die Betrachtung der nativen und der dezellularisierten Proben im Verhältnis zueinander wird deutlich, dass die Modifikation des Versuchsaufbaus im Zuge der zweiten Versuchsreihe nicht zu einem geringeren dezellularisationsassoziierten Kollagenverlust geführt hat. Es zeigt sich keine klare Tendenz bei Vergleich von erster und zweiter Versuchsreihe (jeweils V und H). Auch hier zeigt sich bei den δ -Protokollen (1,0% SDS) der massive Kollagenverlust durch die Dezellularisation. Besonders deutlich wird dieser Effekt bei der 16-stündigen Dezellularisation (HB δ).

5.4 Rasterelektronenmikroskopie

Die Rasterelektronenmikroskopie ermöglichte die Beurteilung der perikardialen Oberfläche vor und nach der Dezellularisation. Da es sich bei diesem Verfahren um ein rein deskriptives Mittel handelt, konnten die gewonnen Erkenntnisse nicht quantifiziert werden. Dennoch konnten bei Begutachtung der Aufnahmen einige Beobachtungen gemacht werden.

Prinzipiell konnte bei Betrachtung der Bilder zwischen der glatten Innenseite und der raueren Außenseite unterschieden werden. Dies war sowohl im nativen als auch im dezellularisierten Zustand möglich. Die Außenseite des Perikards zeigte eine ungleichmäßigere Struktur als die Innenseite. Die Kollagenbündel erschienen gröber und weniger regelmäßig angeordnet. Überdies war ein Nebeneinander von Kollagenbündeln unterschiedlicher Größenordnung erkennbar (siehe Abb. 5.23, A). Im Gegensatz dazu erschienen auf der Innenseite des Perikards die Kollagenbündel einheitlich, die Bündel lagen gleichmäßig angeordnet in einer Ebene und bildeten damit eine glatt wirkende Oberfläche. Hier war außerdem der Faserverlauf deutlich erkennbar (siehe Abb. 5.23, B). Da die Außenseite des Perikards manuell vom umliegenden Fettgewebe befreit wurde, fand hier eine Manipulation des Gewebes statt. Daher war es nur bis zu einem gewissen Grad möglich, einzuschätzen, ob eine Veränderung der Oberflächenstruktur durch die manuelle Bearbeitung oder durch die Dezellularisation selbst hervorgerufen worden war. Aus diesem Grund lag bei der Beurteilung der Oberflächenbeschaffenheit ein besonderes Augenmerk auf der Innenseite des Perikards, da diese Seite in ihrer strukturellen Beschaffenheit ausschließlich von der Dezellularisation beeinflusst worden war.

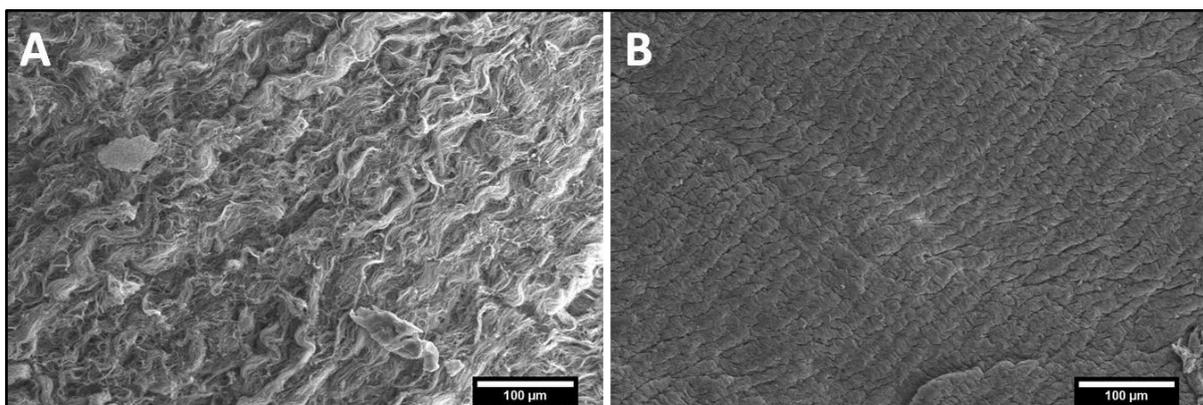


Abb. 5.23: Vergleich von Innen- und Außenseite des Perikards unter dem Rasterelektronenmikroskop anhand der Nativprobe HA γ 4N. Es handelt sich um eine Übersichtsaufnahme bei 500-facher Vergrößerung. A: Raue Außenseite des Perikards, gekräuselte Kollagenbündel unterschiedlicher Größenordnung sind erkennbar. B: Glatte Innenseite des Perikards, die Kollagenbündel sind regelmäßig angeordnet, es erscheint eine pflastersteinartige Oberfläche.

Ergebnisse

Bei Betrachtung der Bilder wurde deutlich, dass die dezellularisierten Perikarde der ersten Versuchsreihe deutlich stärker geschädigt erschienen, als die der zweiten. Dieses Phänomen war sowohl beim Dezellularisationsmedium α als auch bei β zu beobachten. Die stärkere Schädigung der Perikarde im Rahmen der ersten Versuchsreihe wurde schon bei den 4-stündigen Dezellularisationsprotokollen deutlich. Hierbei erschienen die Kollagenbündel auf der Innenseite des Perikards nach der Dezellularisation aufgelockert und aufgeraut. Dieser Effekt trat bei der zweiten Versuchsreihe in einem deutlich geringeren Maß auf. Insgesamt lassen die Bilder vermuten, dass das Dezellularisationsmedium α den geringsten Effekt auf die Oberflächenbeschaffenheit der Perikarde hatte. Diese Beobachtung konnte sowohl in der ersten als auch in der zweiten Versuchsreihe gemacht werden (siehe Abb. 5.24 und Abb. 5.25).

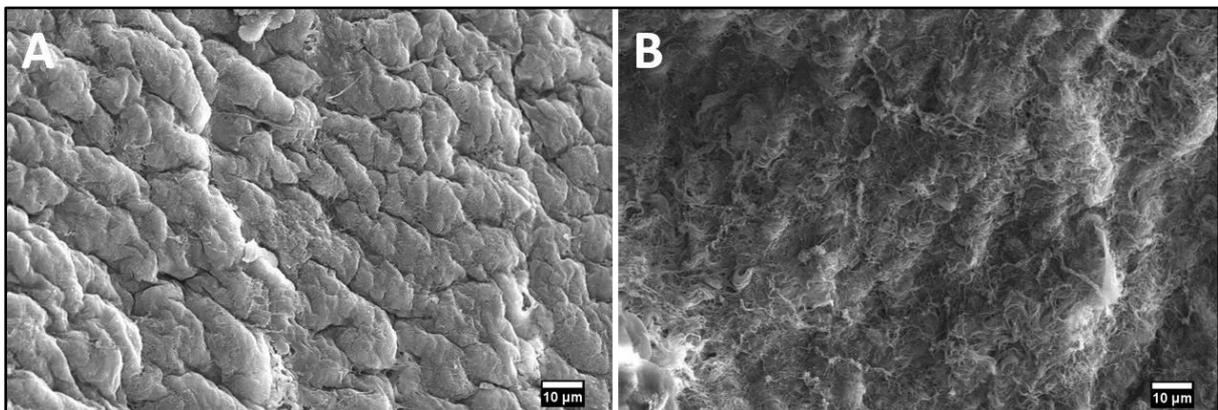


Abb. 5.24: Innenseite des Perikards VA α 5. Es handelt sich um eine Aufnahme bei 2000-facher Vergrößerung, was eine Beurteilung der Kollagenfaserbündel und ihrer Anordnung erlaubt. A: Innenseite des nativen Perikards VA α 5N: Die Kollagenbündel liegen in einer regelmäßigen Anordnung vor. B: Innenseite des dezellularisierten Perikards VA α 5: Die Oberfläche erscheint rau, Kollagenbündel sind nur noch sehr vereinzelt erkennbar.

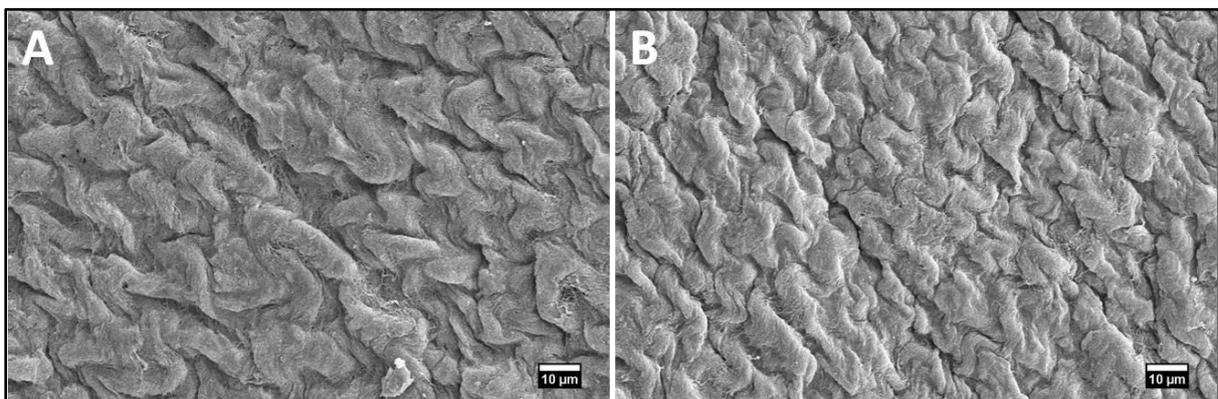


Abb. 5.25: Innenseite des Perikards HA α 4. Es handelt sich um eine Aufnahme bei 2000-facher Vergrößerung, was eine Beurteilung der Kollagenfaserbündel und ihrer Anordnung erlaubt. A: Innenseite des nativen Perikards HA α 4N: Die Kollagenbündel liegen in einer regelmäßigen Anordnung vor. B: Innenseite des dezellularisierten Perikards HA α 4: Das oberflächliche Erscheinungsbild des Gewebes unterscheidet sich kaum von dem der Nativprobe, auch hier liegen die Kollagenbündel regelmäßig angeordnet vor.

Ergebnisse

Beim Dezellularisationsmedium δ (1,0%ige SDS Lösung) fielen schon makroskopisch deutliche Unterschiede zur Nativprobe auf. Die Rasterelektronenmikroskopie zeigte beim Protokoll HB δ starke Veränderungen in der Gewebestruktur, die sowohl auf der Innen- als auch auf der Außenseite deutlich wurden. Die raue Oberflächenstruktur, die normalerweise auf der Außenseite der Perikarde üblich ist, erschien „geschmolzen“, es war weder auf der Innen- noch auf der Außenseite des Perikards eine gerichtete Struktur erkennbar (siehe Abb. 5.26, B).

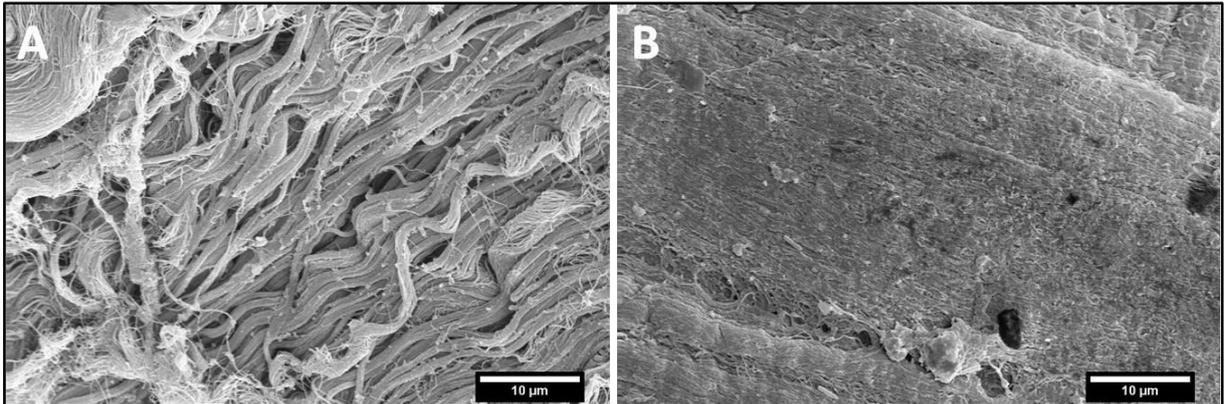


Abb. 5.26: Außenseite des Perikards HB δ 4 vor und nach Dezellularisation. Es handelt sich um eine Aufnahme bei 5000-facher Vergrößerung, was eine Beurteilung auf Faserebene erlaubt. A: Außenseite des nativen Perikards: Typisches Bild mit locker angeordneten Kollagenfasern. B: Außenseite des dezellulierten Perikards: Es ist keine Struktur erkennbar, die Oberfläche wirkt „geschmolzen“.

Auffallend war außerdem, dass die Oberfläche auf der Innenseite sich unter δ ähnlich verhielt wie die Außenseite, sodass sich im Anschluss an die Dezellularisation die Oberflächenstrukturen von Innen- und Außenseite ähnelten (siehe Abb. 5.26 und Abb. 5.27). Es erschien, als würde das Dezellularisationsmedium δ die strukturelle Beschaffenheit des Gewebes sowohl von innen als auch von außen stark beeinflussen. Dieser Effekt konnte auch bei der 4-stündigen Dezellularisation (HA δ) in einem geringeren Maß beobachtet werden.

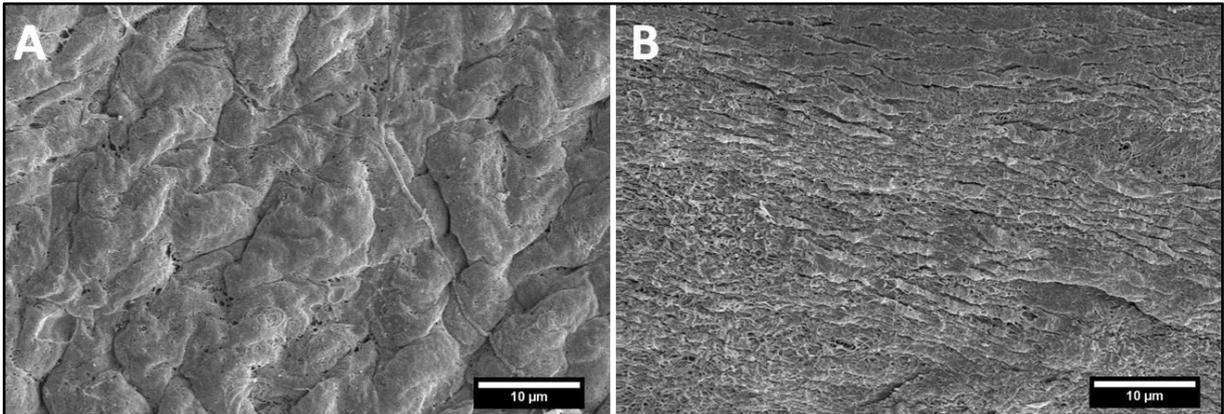


Abb. 5.27: Innenseite des Perikards HB δ 3 vor und nach Dezellularisation. Es handelt sich um eine Aufnahme bei 5000-facher Vergrößerung, was eine Beurteilung auf Faserebene erlaubt. A: Innenseite des nativen Perikards HB δ 3N: Typisches Bild mit regelmäßig, in einer Ebene angeordneten Kollagenfaserbündeln und glatt wirkender Oberfläche. B: Innenseite des dezellularisierten Perikards HB δ 3: Die Oberflächenstruktur wirkt angegriffen, löchrig und „geschmolzen“. Man erkennt außerdem eine starke Ähnlichkeit zur Außenseite des dezellularisierten Perikards (Abb. 5.26, B).

Im rasterelektronenmikroskopischen Bild wiesen einige Perikarde Löcher im Gewebe auf (siehe Abb. 5.28). Diese konnten sowohl bei nativen als auch bei dezellularisierten Proben beobachtet werden. Eine Ursache hierfür konnte nicht identifiziert werden und kann Fokus zukünftiger Forschungsansätze sein.

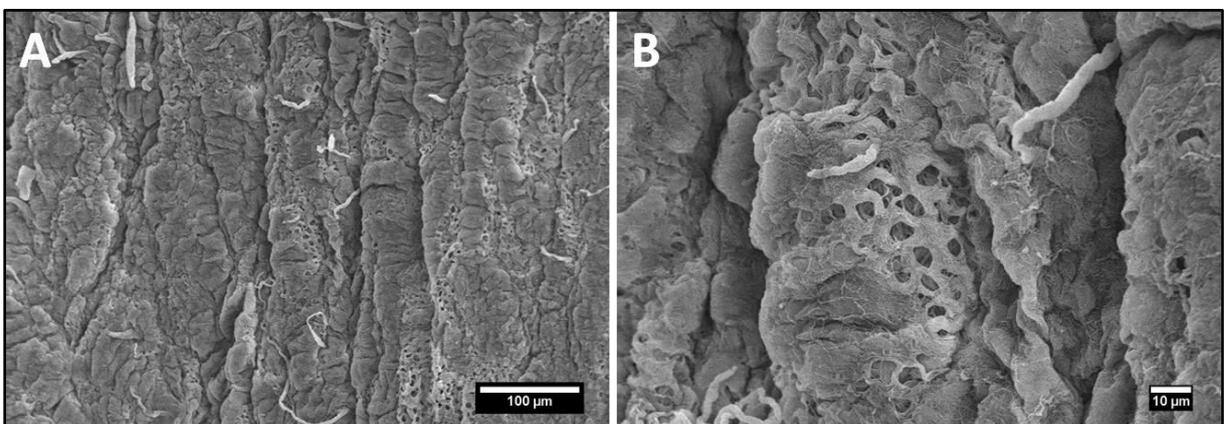


Abb. 5.28: Aufnahme der Innenseite der Gewebeprobe VBy2 mit löchriger Oberfläche. A: VBy2 bei 500-facher Vergrößerung: Es ist eine Vielzahl an Löchern auf der Oberfläche erkennbar. B: VBy2 bei 2000-facher Vergrößerung: Nahaufnahme der löchrigen Oberfläche. Diese Löcher konnten bei den Aufnahmen der Nativprobe nicht beobachtet werden.

5.5 Pentachrom-Färbung

Mithilfe der Pentachrom-Färbung konnten die elastischen Fasern innerhalb der Schnitte sichtbar gemacht werden. Bei der Auswertung der angefertigten Aufnahmen konnten sowohl bei den nativen

als auch bei den dezellularisierten Perikarden große Diskrepanzen zwischen den Schnitten bezüglich ihrer Rotfärbung festgestellt werden. Teilweise waren diese Unterschiede auch innerhalb einer Probe erkennbar (siehe Abb. 5.29).

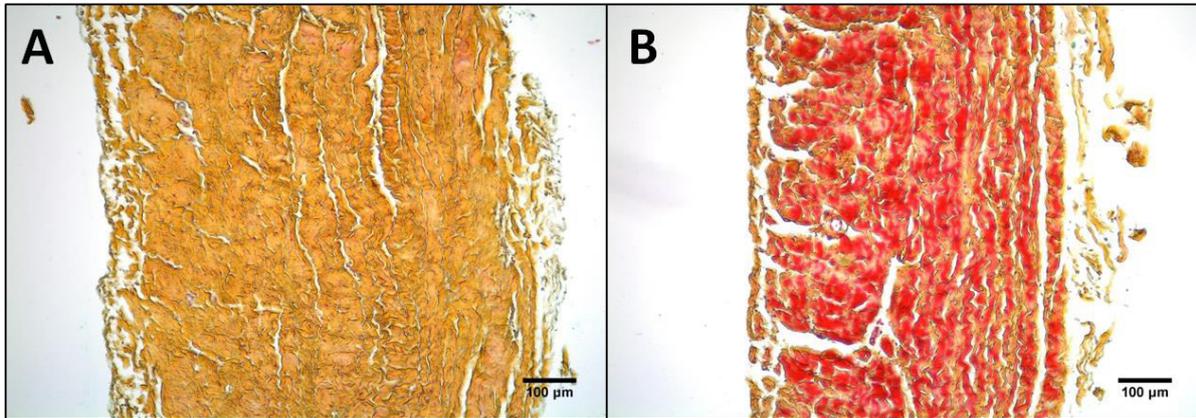


Abb. 5.29: Das Perikard VA α 4N nach Pentachrom-Färbung, 100-fache Vergrößerung. Es handelt sich um zwei Gewebeschnitte von derselben Perikardprobe. Da sich beide Schnitte auf einem Objektträger befanden, wurden sie entsprechend auch gemeinsam in derselben Pentachrom-Färbung gefärbt. A: VA α 4N, gelber Gewebeschnitt. Zu erkennen ist, dass der überwiegende Teil der Gewebeprobe gelb erscheint, nur vereinzelt sind rötliche Areale zu erkennen. Dieser Gewebeschnitt entspricht im Scoring-System 0 Punkten. B: VA α 4N, roter Gewebeschnitt, zu erkennen ist, dass der überwiegende Teil des Gewebeschnittes durch die Pentachrom-Färbung eine rote Farbe angenommen hat. Dieser Gewebeschnitt entspricht im Scoring-System 4 Punkten.

Entsprechend dieser Beobachtungen war es nicht möglich, aus den korrespondierenden Scorewerten Zusammenhänge abzuleiten.

5.6 Untersuchung der Zugfestigkeit

Im Rahmen der zweiten Versuchsreihe konnte mithilfe der Zugversuche untersucht werden, ob und inwieweit sich die mechanische Stabilität der Perikarde durch die Dezellularisation und die anschließende Nachbehandlung verändert hatte.

Zunächst fielen bei der Auswertung der Zugversuche große Unterschiede in Abhängigkeit vom Faserverlauf auf. Die Gesamtheit aller längsverlaufenden Nativproben zeigte eine durchschnittliche Zugfestigkeit von $16,4 \pm 9,2$ N/mm². Bei den querverlaufenden Nativproben lag dieser Wert bei $7,3 \pm 4,3$ N/mm². Bereits hier wird eine hohe Standardabweichung der Proben deutlich. Besonders auffallend ist dies bei den längsverlaufenden Nativproben des Dezellularisationsprotokolls HA δ N: Sie wiesen mit einer Zugfestigkeit von $27,1 \pm 17,86$ N/mm² sowohl die höchste durchschnittliche Zugfestigkeit als auch die höchste Standardabweichung auf (siehe Abb. 5.30). Gleichzeitig ist hier mit

Ergebnisse

einem Abfall auf $13,5 \pm 3,9 \text{ N/mm}^2$ nach Dezellularisation die stärkste Abnahme der mechanischen Stabilität zu beobachten. Sowohl bei den Nativproben als auch bei den dezellularisierten und den mit DNase nachbehandelten Proben war die durchschnittliche Zugfestigkeit der Proben längs zum Faserverlauf stets höher als die der Proben quer zum Faserverlauf.

In Bezug auf die Veränderung der Zugfestigkeit durch die Dezellularisation bzw. die DNase-Nachbehandlung zeigt sich kein eindeutiger Trend. Während bei den Protokollen HA β und HA γ eine Zunahme der mechanischen Stabilität im Zuge der Dezellularisation und der DNase-Behandlung erfasst werden konnte, war bei HB γ bezüglich der Zugfestigkeit nur eine geringe Differenz zwischen den nativen und den behandelten Proben zu verzeichnen. Eine besonders ausgeprägte Abnahme der Zugfestigkeit zeigte sich bei den Proben der Gruppe HB δ : Durch die 16-stündige Dezellularisation mit 1,0%iger SDS-Lösung sank die Zugfestigkeit der Längsproben von $13,5 \pm 7,3 \text{ N/mm}^2$ auf $3,0 \pm 1,1 \text{ N/mm}^2$ ab (siehe Abb. 5.30). Auch bei den Querproben konnte ein Abfall von $11,1 \pm 2,0 \text{ N/mm}^2$ auf $3,2 \pm 2,1 \text{ N/mm}^2$ beobachtet werden (siehe Abb. 5.31).

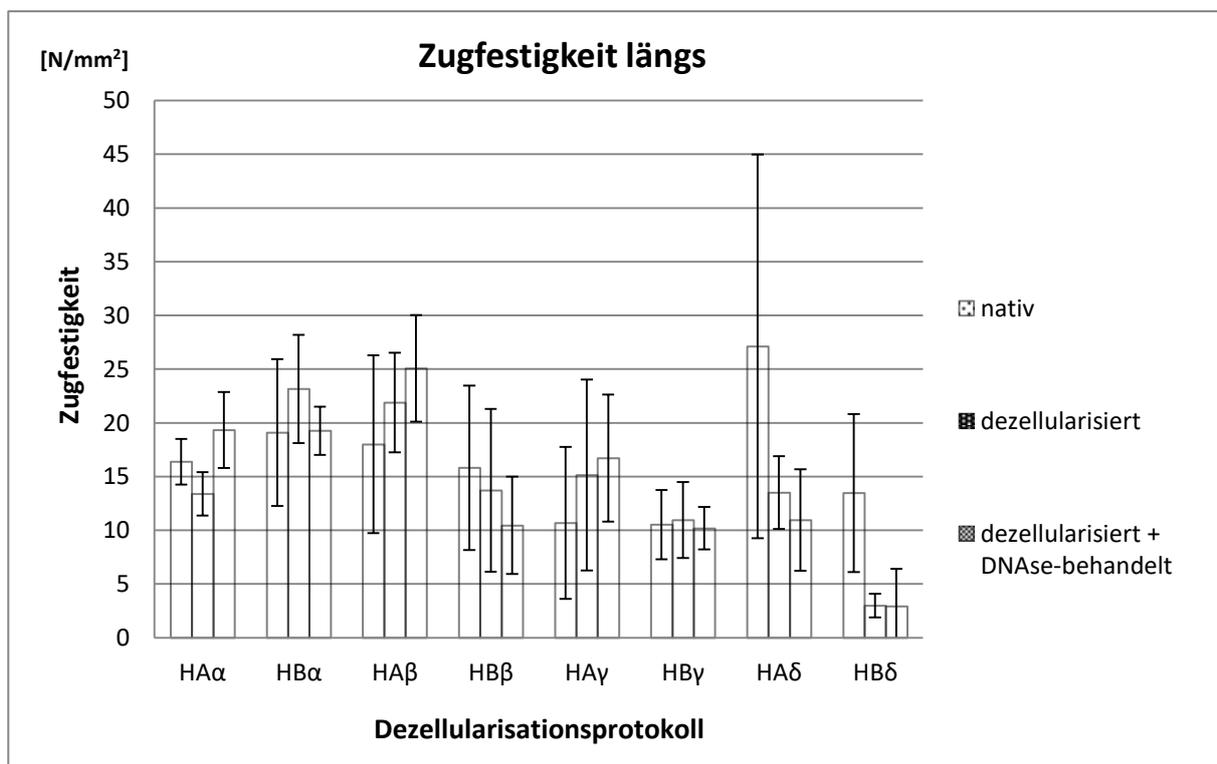


Abb. 5.30: Zweite Versuchsreihe (H): Zugfestigkeit (F_{\max}) der nativen, dezellularisierten sowie der zusätzlich mit DNase nachbehandelten Perikarde längs zum Faserverlauf, gemessen in N/mm^2 .

Bei der Untersuchung der Querproben fiel neben einer geringeren durchschnittlichen Zugfestigkeit auch ein geringeres Maß an Stringenz auf. So fiel beispielsweise bei der Querprobe von HB α die

Ergebnisse

Zugfestigkeit durch die Dezellularisation von $5,2 \pm 4,0 \text{ N/mm}^2$ auf einen Wert von $1,7 \pm 0,3 \text{ N/mm}^2$ ab und stieg im Zuge der DNase-Behandlung wieder auf einen Wert von $5,2 \pm 2,6 \text{ N/mm}^2$ an. Im Kontrast hierzu stieg der Wert beim Protokoll H Δ y durch die Dezellularisation von $5,8 \pm 2,4 \text{ N/mm}^2$ auf $7,9 \pm 4,7 \text{ N/mm}^2$ an und fiel anschließend im Zuge der DNase-Behandlung wieder auf einen Wert von $6,0 \pm 2,2 \text{ N/mm}^2$ ab (siehe Abb. 5.31).

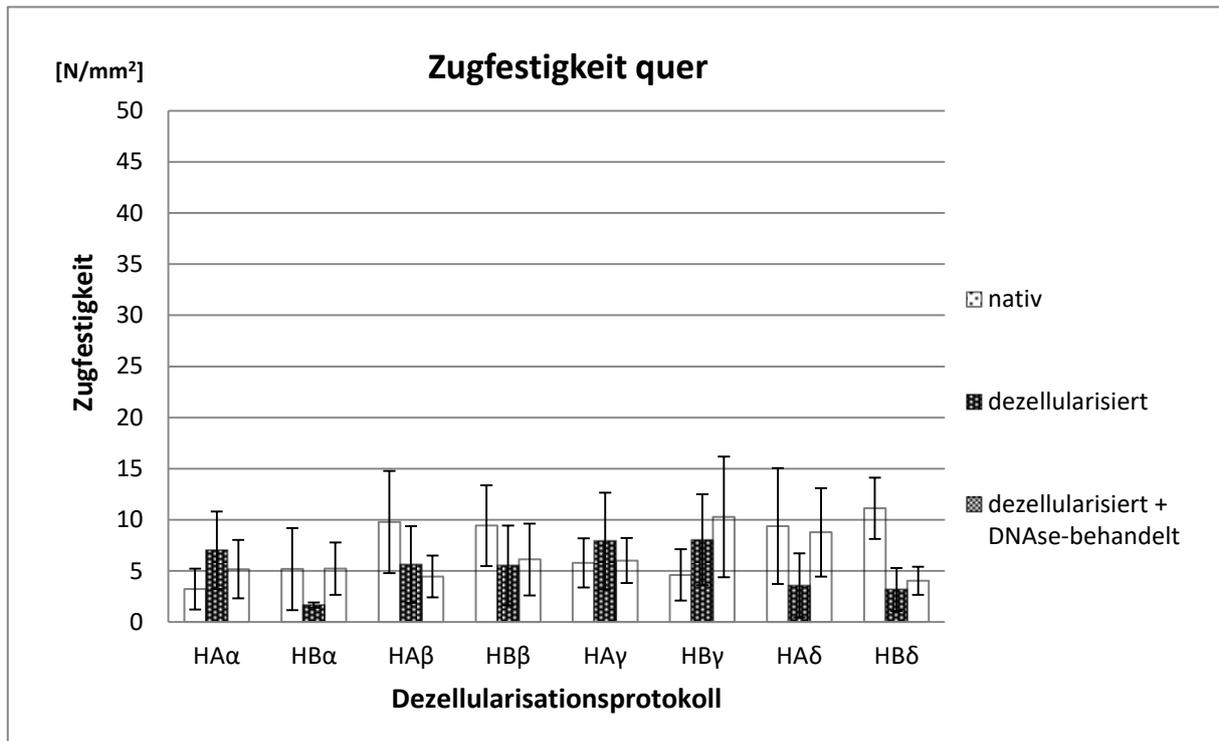


Abb. 5.31: Zweite Versuchsreihe (H): Zugfestigkeit (F_{\max}) der nativen, dezellularisierten sowie der zusätzlich mit DNase nachbehandelten Perikarde quer zum Faserverlauf, gemessen in N/mm^2 .

6 Diskussion

In Anbetracht des demographischen Wandels ist eine Zunahme altersbedingter, chronischer Krankheiten zu erwarten. Herzklappenerkrankungen wie die Aortenklappenstenose sind dabei keine Seltenheit und machen in der Regel den Ersatz der Klappe nötig. Durch den stetigen medizinischen Fortschritt ist außerdem damit zu rechnen, dass Menschen in Zukunft trotz chronischer Krankheiten länger leben als bisher. Angesichts dieser Entwicklungen muss eine Anpassung der Klappeneigenschaften insbesondere im Hinblick auf deren Langlebigkeit erfolgen [54, 139]. Derzeit verwendete, glutaraldehydfixierte Klappen weisen dabei zwei eklatante Mängel auf: Zum einen verhindert die Fixierung eine Annahme des fremden Gewebes im Körper des Empfängers, aufgrund der Zytotoxizität von Glutaraldehyd verbleibt die Klappe deshalb zeitlebens als „toter Fremdkörper“ im Patienten [140]. Zum anderen nutzt sich die Fixierung im Laufe der Zeit ab, wodurch es zu einer Freilegung immunogener Zellbestandteile und folglich zu einer immunologischen Entzündungs- bzw. Abstoßungsreaktion kommen kann [141]. Beides führt häufig zum Versagen der Klappe nach ca. 15 Jahren [142-144]. Um die derzeit vorhandenen Nachteile zu eliminieren und dem steigenden Bedarf an Klappenimplantaten gerecht zu werden ist es nötig, in neuen Forschungsfeldern nach Lösungsansätzen für diese wachsende Problematik zu suchen. Tissue-engineerte, dezellularisierte Xenografts stellen dabei eine vielversprechende Möglichkeit dar, diesen Anforderungen gerecht zu werden [145-147]. In dieser Studie wurden vier Dezellularisationsprotokolle miteinander verglichen und zusätzlich der Einfluss der Dezellularisationsmechanik sowie der beiden unterstützenden Faktoren Ultraschalleinfluss und DNase-Nachbehandlung untersucht. Die von uns angewandten Untersuchungsmethoden basierten primär auf der optischen Beurteilung erstellter Aufnahmen mithilfe verschiedener histologischer Färbungen, sowie deren anschließender Quantifizierung. Mithilfe der Zugfestigkeitsuntersuchungen konnte darüber hinaus die mechanische Stabilität der Perikarde vor und nach der Dezellularisation ermittelt werden. Um eine Vergleichbarkeit mit anderen Studien zu ermöglichen, orientierten wir uns methodisch an den geläufigsten und zugleich aussagekräftigsten Untersuchungsmethoden [78, 148-151]. Aufgrund seines geringeren Zellgehaltes und seiner homogenen Struktur im Vergleich zu porcinem Klappengewebe entschieden wir uns für die Dezellularisation von bovinen Perikarden [120]. Unser Ziel war es zu eruieren, auf welche Protokolle und Herangehensweisen in zukünftigen Forschungsansätzen ein besonderer Fokus gelegt werden sollte.

Die Ergebnisse dieser Forschungsarbeit zeigen, dass anders als vermutet eine längere Dezellularisationsdauer nicht per se eine vollständigere Dezellularisation bedeutet. So lieferten die 4-stündigen Dezellularisationsprotokolle teilweise bessere Ergebnisse als die 16-stündigen Protokolle

derselben Detergenzienkombination. Im Rahmen der ersten Versuchsreihe wurde die vollständige Dezellularisation der Perikarde beim Protokoll VA α (0,5% SD/SDS für 4 Stunden) erreicht. Bei Anwendung derselben Dezellularisationslösung im Rahmen des 16-stündigen Protokolls (VB α) verblieben jedoch zelluläre Reste im Gewebe. Gleichzeitig wird bei Analyse des β -Protokolls deutlich, dass das Gewebe im Rahmen der 4-stündigen Dezellularisation (HA β) paradoxerweise stärker geschädigt wurde als durch das analoge 16-stündige Protokoll (HB β).

Ein möglicher Erklärungsansatz hierfür ist die mit der Dezellularisation einhergehende Erwärmung der Dezellularisationsflüssigkeit, die zu einem schlechteren Eindringen der Dezellularisationslösungen führen könnte. Wäre dies der Fall, könnte eine Regulation der Dezellularisationstemperatur diesen Störfaktor bei zukünftigen Forschungsansätzen beseitigen. Ein Unterschied zwischen den Protokollen bestand im Zeitpunkt des Medienwechsels: Während bei den 4-stündigen Protokollen der Medienwechsel nach 2 Stunden erfolgte, fand dieser bei den 16-stündigen Protokollen nach 4 Stunden statt. Ob dieser zeitliche Unterschied tatsächlich einen Einfluss auf das Dezellularisationsergebnis hat, ist fraglich. Dennoch könnte bei kommenden Forschungsansätzen der Medienwechsel unabhängig von der Dauer des Protokolls zum selben Zeitpunkt stattfinden (z.B. immer nach 2 Stunden), um so eine bessere Vergleichbarkeit zwischen den Protokollen zu erreichen.

Einen weitaus schlüssigeren Erklärungsansatz in Bezug auf dieses Paradoxon liefert jedoch die Variabilität des verwendeten Versuchsmaterials: Einerseits wiesen die verwendeten Perikarde dünnere und dickere Stellen auf. Es ist selbsterklärend, dass dünnere Perikardteile schneller von Dezellularisationslösung durchdrungen werden als dickere. Beim Ausschneiden des zu dezellularisierenden Areals wurde daher stets auf eine möglichst homogene Schichtdicke geachtet [152]. Weitaus größere Unterschiede ergaben sich jedoch auch aus dem Geschlecht, dem Alter und dem Gesundheitszustand des geschlachteten Tieres. All dies sind Faktoren, die die Beschaffenheit des Perikards erheblich beeinflussen und so Auswirkungen auf den Dezellularisationserfolg haben können [153-155].

Einen weiteren Einflussfaktor konnten wir bei Beobachtung des Ablaufs der ersten Versuchsreihe identifizieren. Dabei wickelten sich die Perikarde im zirkulären Fluss um den Hohlstab im Dezellularisationsglas. Folglich konnte nicht mehr gewährleistet werden, dass an allen Stellen die gleiche Menge Dezellularisationslösung vorbeifloss. Es ist also möglich, dass die VB α -Proben an einer wenig und die VA α -Proben an einer stark umspülten Stelle entnommen wurden. Dies könnte eine Erklärung für die paradoxen Ergebnisse der ersten Versuchsreihe mit der α -Lösung liefern. Um diesen Störfaktor zu nivellieren, modifizierten wir den Versuchsaufbau für die zweite Versuchsreihe und ermöglichten so einen konstanten Fluss entlang der eingespannten Perikardflächen.

Diskussion

Die Modifikation des Versuchsaufbaus wirkte sich außerdem besonders auf die Gewebebeschaffenheit im Anschluss an die Dezellularisation aus. Nicht nur sank im Rahmen der zweiten Versuchsreihe der Gewebescore durch die Dezellularisation deutlich weniger ab, auch der Kollagengehalt nach der Dezellularisation war bei der zweiten Versuchsreihe durchweg höher als bei der ersten. Einziger Ausreißer ist das Protokoll δ , welches aufgrund seiner Aggressivität, insbesondere beim 16-stündigen Protokoll, zu einer drastischen Abnahme des Kollagengehaltes im Gewebe führte – eine Beobachtung, die sich durch die anschließenden Zugversuche bestätigen ließ. Diese, durch höherdosierte SDS-Lösungen hervorgerufene Gewebedestruktion wurde bereits mehrfach in der Literatur beschrieben [102, 117, 156].

Die ansonsten hervorragenden Ergebnisse in Bezug auf die Gewebebeschaffenheit und den Kollagengehalt nach der Dezellularisation lassen vermuten, dass der modifizierte Versuchsaufbau der zweiten Versuchsreihe eine schonendere Dezellularisation ermöglichte. Der gerichtete Fluss entlang der Perikarde, der außerdem eine Verwicklung dieser verhinderte, führte vermutlich zu einer verminderten mechanischen Belastung und damit zu einem nur gering ausgeprägten Verlust von Kollagen und Gewebestabilität. Interessant ist außerdem, dass der modifizierte Versuchsaufbau keine Auswirkungen auf die Eindringtiefen von innen und außen hatte. Da im Rahmen der zweiten Versuchsreihe das Perikard zu einem Schlauch geformt wurde, bei dem die Innenseite des Perikards nach innen zeigte, war zu vermuten, dass durch den Fluss bzw. den entstehenden Druck im Inneren des Schlauches eine stärkere Dezellularisation von innen hervorgerufen würde. Die Analyse der Eindringtiefen zeigt jedoch, dass hier keine Tendenz erkennbar ist.

Eine weitere Veränderung bei der zweiten Versuchsreihe war die Nachbehandlung der Perikarde mit DNase, die zu einer bemerkenswerten Verbesserung der Dezellularisationseffizienz führte. So stieg bei allen Protokollen die durchschnittliche Eindringtiefe im Rahmen der DNase-Nachbehandlung an. Bei Betrachtung der HE-Scores wird außerdem deutlich, dass durch die Dezellularisation eine stärkere Abnahme des Scores erfolgte als durch die DNase-Nachbehandlung. In Zusammenschau ist dies ein Indiz dafür, dass die DNase bei nur geringer Gewebeschädigung zelluläre Überreste in großen Umfang aus dem Gewebe eliminiert. Diese Beobachtungen spiegeln sich auch in der Literatur wider [114, 120, 150]. Die Ergebnisse in Bezug auf den Kollagengehalt der Proben zeigen nach der DNase-Nachbehandlung keine einheitliche Tendenz. Während mit SD/SDS (α) der Kollagengehalt durchweg gleich blieb, nahm er im Rahmen der SD/Triton X bzw. β -Protokolle sowohl durch die Dezellularisation als auch durch die DNase-Nachbehandlung stark ab. Dieses Ergebnis lässt die Hypothese zu, dass unterschiedliche Detergenzien den geweblichen Kollagengehalt nicht nur unterschiedlich stark beeinflussen, sondern das Gewebe auch unterschiedlich vulnerabel hinterlassen. Ein durch SD/Triton X zum Teil denaturiertes Gewebe wäre in einem solchen Szenario

auch labiler in Bezug auf die DNase-Behandlung. Bei kritischer Analyse der von uns durchgeführten DNase-Behandlung könnte dahingehend argumentiert werden, dass durch eine Behandlung bei Körpertemperatur (36°C) anstatt Raumtemperatur (21°C) das enzymatische Potenzial zusätzlich hätte gesteigert werden können. Inwiefern jedoch die schonende Dezellularisation durch die DNase-Nachbehandlung mit deren Durchführung bei Raumtemperatur korreliert, könnten zukünftige Forschungsansätze zeigen. Des Weiteren muss darauf hingewiesen werden, dass zur DNase-Behandlung durchgehend die „obere Perikardhälfte“ verwendet wurde, also jene, die von der Dezellularisationsvorrichtung weg zeigt, um eine bessere Vergleichbarkeit zwischen den Protokollen zu erzielen.

Im Zuge der Pentachrom-Färbung zeigten sich mehrere paradoxe Ergebnisse. Hierzu gehört neben der Tatsache, dass in manchen Fällen (HB α , HA β , HB β) keinerlei elastische Fasern sichtbar gemacht werden konnten, auch die scheinbare Zunahme an elastischen Fasern durch die Dezellularisation (VA α , VB β). Dies ist zurückzuführen auf die Tatsache, dass der Großteil des Proteinanteils innerhalb des Perikards aus Kollagen besteht und die elastischen Fasern zwischen diesen Kollagenbündeln in Schichten angeordnet sind [157, 158]. Nur wenn diese Schicht innerhalb des von uns angefertigten 7 μ m dicken Gewebeschnittes vorlag, konnte sie anschließend mithilfe der Pentachrom-Färbung sichtbar gemacht werden. Einen Anhaltspunkt hierfür liefert uns auch Abb. 5.29, die zeigt, dass zwei Schnitte derselben Perikardprobe (VA α 4N) innerhalb einer Pentachrom-Färbung einmal rot (elastische Fasern vorhanden, Score-Wert 4) und einmal gelb (keine elastischen Fasern, Score-Wert 0) gefärbt wurden. Die Rotfärbung zeigt zwar, dass die Färbung korrekt durchgeführt wurde, die Divergenz zwischen den benachbarten Schnitten signalisiert jedoch, dass die Pentachrom-Färbung für die von uns verwendete Schnittdicke von 7 μ m nicht geeignet ist. Für zukünftige Forschungsansätze bedeutet das, dass die Analyse der elastischen Fasern entweder durch eine andere Methode erfolgen sollte oder dass möglicherweise eine größere Schnittdicke gewählt werden muss, um eine Darstellung vorhandener elastischer Fasern zu garantieren.

Bei kritischer Betrachtung unserer Forschungsergebnisse fallen teils hohe Standardabweichungen auf. Diese lassen sich zum einen durch die niedrige n-Zahl von n=5 in der ersten und n=4 in der zweiten Versuchsreihe erklären. Folge der niedrigen n-Zahl war unter anderem, dass die Hinzuziehung statistischer Methoden nicht zu einem Erkenntnisgewinn führte, weswegen rein deskriptive Auswertungsmethoden verwendet wurden. Die hohen Standardabweichungen sind jedoch auch als Hinweis für eine deutlich gravierendere Problematik zu werten. Diese liegt in der Variabilität des Ausgangsmaterials, die sowohl zwischen den einzelnen Rindern als auch innerhalb des Perikards selbst erkennbar war [159, 160]. Um möglichst vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, müssen Störfaktoren beim Faktor Tier weitgehend eliminiert werden [152]. Dies würde im Idealfall

bedeuten, dass die Perikarde stets von Rindern stammen, die nicht nur das gleiche Geschlecht und ein ähnliches Alter aufweisen, es sollten außerdem vergleichbare Haltungsbedingungen gegeben sein, idealerweise würden in diesem Fall alle Tiere vom selben Hof stammen. So könnte ermöglicht werden, dass Faktoren wie Ernährung, Bewegung oder medikamentöse Behandlung keinen Einfluss auf die Beschaffenheit des Gewebes haben.

Ferner muss auch die Variabilität innerhalb des Perikards beachtet werden. Da jedes Perikard über dünnere und dickere Bereiche verfügt, sollte – um eine Vergleichbarkeit der Perikarde untereinander zu ermöglichen – die Untersuchung auf Gewebe innerhalb eines gewissen Dickenrahmens begrenzt werden. Diese Begrenzung ist in der Forschung bisher wenig untersucht [161, 162]. Erst nach Beginn unseres explorativen Forschungsvorhabens 2017, bei dem wir nur mit einer geringen Anzahl an Proben arbeiten konnten, veröffentlichten Bielli et al. im Jahr 2018 diesbezügliche Forschungsergebnisse, die das Spektrum der zu wählenden Perikarde eingrenzten. Sie dezellularisierten hierfür Perikarde gleichaltriger Kühe mit Dicken zwischen 400 und 700 μm und zeigten, dass diese Vereinheitlichung des Grundmaterials zu einer gleichmäßigeren Dezellularisation führt und somit geeignet für das Erreichen vergleichbarer Ergebnisse ist [163].

Eine generelle Problematik ergibt sich aus der Tatsache, dass ein Gewebeteil entweder analysiert oder zur Klappe weiterverarbeitet werden kann. Gegaart mit der beschriebenen Materialvariabilität innerhalb des Perikards kann so nie vollständig gewährleistet werden, dass das zu einer Klappe verarbeitete Gewebe vollständig von immunogenen Bestandteilen befreit wurde [159, 164]. Als Ansatz zur Lösung dieser Problematik könnte die Analyse stets an einer dickeren Stelle des Perikards stattfinden. Ist es in den dickeren Bereichen zellfrei, so ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass eine dünnere Stelle ebenfalls zellfrei ist – vorausgesetzt das Gewebe wurde gleichmäßig umspült. So könnte nach der Implantation das Abstoßungsrisiko des dezellularisierten Xenografts auf ein Minimum reduziert und so die Sicherheit des Implantats erhöht werden.

Im Hinblick auf die Auswahl der Detergenzien legen unsere Ergebnisse nahe, dass eine Kombination aus SDS mit einem nicht-denaturierenden Partnerdetergenz wie SD oder Triton X zu einer besonders effizienten Dezellularisation führt, und dass eine anschließende Nachbehandlung mit DNase bei nur geringer Gewebeschädigung den Dezellularisationserfolg erhöht. Sie deuten außerdem an, dass eine Dezellularisation mit reinem SDS zu einer massiven Gewebeschädigung führt – bei gleichzeitig ausbleibendem Dezellularisationserfolg. SDS mit seiner proteolytischen und damit denaturierenden Wirkung gilt in der Literatur als sehr potentes Dezellularisationsdetergenz und wird häufig mit weniger potenten, nicht proteolytischen Detergenzien kombiniert [79, 81, 130]. Auch unsere Forschungsergebnisse zeigen, dass es mithilfe einer Kombination aus SD und SDS sowie einer anschließenden DNase Behandlung möglich ist, bovine Perikarde vollständig zu dezellularisieren.

Diese Ergebnisse sind kongruent mit früheren Forschungsergebnissen, darunter auch denen von *Granados et al.* Ihnen gelang mit einer 0,5%igen SD/SDS-Lösung die 92%ige Dezellularisation von porcinen Mitralklappen [119]. Unsere Ergebnisse sind ein Indiz dafür, dass dieses Protokoll auf die Dezellularisation von bovinen Perikarden übertragbar ist. Auch *Hülsmann et al.* konnten mithilfe dieser 0,5%igen SD/SDS-Lösung bovine Perikarde fast vollständig dezellularisieren [118]. Während *Hülsmann et al.* jedoch ein Protokoll mit einer Dauer von 48 Stunden anwendeten, reichten im Rahmen unserer Forschungsarbeit bereits 4 Stunden (VA α) für die vollständige Dezellularisation der Perikarde aus. Ein möglicher Grund hierfür könnte sein, dass unsere Dezellularisation unter konstantem Fluss sowie temporärer Einwirkung von Ultraschallwellen stattfand. *Goncalves et al.* konnten zeigen, dass im Rahmen ihres Protokolls SD (0,5%) und SDS (0,1%) jeweils in der Lage waren bovine Perikarde optisch vollständig zu dezellularisieren, während dies mit Triton X (0,5%) nicht möglich war [120]. Es gilt jedoch zu erwähnen, dass hierbei stets eine Vorbehandlung mit hypotoner Lösung und Nuklease stattfand. Mithilfe der SDS-Lösung gelang es ihnen jedoch auch, zelluläre Überreste aus den perikardialen Gefäßen zu entfernen. Dies untermauert unsere Beobachtungen, dass SDS vermutlich das potenteste der drei Detergenzien ist. Die Studie zeigt, dass auch bei vollständiger Dezellularisation noch immunogenes Material im Gewebe vorhanden sein kann und dass dieses erst durch eine anschließende, enzymatische Nachbehandlung eliminiert wird. Auch unsere Ergebnisse deuten an, dass eine Nachbehandlung mit DNase zu einer ausgeprägten Steigerung der Dezellularisationseffizienz führt.

SD und Triton X sind nicht in der Lage Proteinbindungen zu spalten. Als nicht denaturierende Detergenzien wird ihnen jedoch eine wichtige Rolle beim Abtragen zellulärer Überreste zuteil [60, 105, 107]. Im Rahmen unserer Untersuchungen erwies sich die Kombination aus Triton X und SD (Protokoll β) im Vergleich zu den anderen Protokollen als nur schwach dezellularisierend. Dies steht in einem starken Kontrast zu den Forschungsergebnissen von *Kasimir et al.*, *Rieder et al.* und *Yu et al.*, denen mit einer Kombination dieser beiden Detergenzien eine weitgehend vollständige Dezellularisation porciner Herzklappen gelang [103, 114, 130]. *Kasimir et al.* verglichen bereits 2003 die Wirksamkeit von SDS im Vergleich zu einer Kombination aus Triton X mit SD und konnten zeigen, dass die Kombinationslösung mit einer Konzentration von jeweils 0,25% zu einer vollständigen Dezellularisation von porcinen Klappen führte [103]. Es sei jedoch erwähnt, dass diese Erkenntnis lediglich mithilfe von optischen Verfahren gewonnen wurde, ohne die Durchführung einer DNA-Quantifikation. *Rieder et al.* konnten jedoch im Folgejahr zeigen, dass mit *Kasimirs* Protokoll eine Neubesiedelung des dezellularisierten Gewebes möglich war [130]. Auch *Yu et al.* dezellularisierten im Jahr 2013 porcine Aortenklappen mithilfe einer jeweils 0,25%igen Lösung aus Triton X und SD, sowie einer anschließenden Nuklease-Behandlung. Dabei konnten sie durch DNA-Quantifizierung zeigen, dass die Klappen fast vollständig dezellularisiert worden waren. Eine

Eliminierung sämtlicher DNA-Bestandteile gelang jedoch nicht [114]. Eine mögliche Erklärung für diese Divergenz zu unseren Ergebnissen könnte sein, dass diese Forschungsgruppen nicht mit bovinen Perikarden, sondern mit porcinen Klappen arbeiteten.

Im Rahmen dieser Studie erschien SD im Vergleich zu SDS weniger potent in Bezug auf den Dezellularisationserfolg. Dies steht in Kontrast zu den Ergebnissen von *Konertz et al.* und *Erdbrügger et al.* *Konertz et al.* untersuchten 2005 die Wirkung von reinem SD (1,0%) und beschrieben die vollständige Dezellularisation porciner Klappen [125]. Während bei der klinischen Anwendung desselben Protokolls (Matrix P) durch *Erdbrügger et al.* und *Konertz et al.* zufriedenstellende Ergebnisse beschrieben wurden, zeigte die retrospektive Analyse von *Perri et al.* eine hohe Versagensrate beim Einsatz des Matrix P-Xenografts [116, 128, 165]. Unsere Ergebnisse, die auf eine niedrige Effizienz von SD bei der Dezellularisation boviner Perikarde hinweisen, könnten einen Erklärungsansatz für dieses Versagen liefern.

Auch Triton X zeigte in Bezug auf den Dezellularisationserfolg keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Der mangelnde Dezellularisationserfolg war bei Kombination von Triton X mit SDS (Protokoll γ) in einem geringeren Maß zu beobachten als bei Kombination mit SD (Protokoll β). Eine ähnliche Beobachtung machten auch *Kim et al.*, bei der Untersuchung einer reinen Triton X-Lösung (1,0%). Sie konnten dabei feststellen, dass damit keine zufriedenstellende Dezellularisation möglich war [126]. Dies ist kongruent zu unseren Forschungsergebnissen, die darauf hinweisen, dass Triton X möglicherweise nur dann nukleäres Material abtragen kann, wenn dieses zuvor durch ein denaturierendes Detergenz (wie z.B. SDS) aufgespalten wurde. Auch *Grauss et al.* untersuchten die Wirkung von reinem Triton X, dabei konnten sie porcine Aortenklappen mithilfe einer 1,0%igen Triton X-Lösung vollständig dezellularisieren. Es gilt jedoch zu erwähnen, dass zusätzlich RNase- und DNase-Lösungen verwendet wurden, und dass anschließend in der Aortenwand zelluläre Überreste detektierbar waren [108].

Betrachtet man die Tatsache, dass es im Rahmen dieser Forschungsarbeit sowohl mit einer Kombination aus SDS und Triton X (HA γ) als auch mit einer Kombination aus SDS und SD (VA α) möglich war, bovinen Perikard vollständig zu dezellularisieren, lässt dies die Vermutung zu, dass SDS das potenteste der drei Detergenzien ist. Bei Analyse des δ -Protokolls wird allerdings deutlich: SDS in Reinform vermag das Perikard nur zu einem geringen Grad zu dezellularisieren, es verbleiben große Mengen zellulären Materials im Gewebe. Darüber hinaus führt eine Dezellularisation mit reinem SDS zu einer starken Denaturierung der ECM. Die Kombination aus schwacher Dezellularisation und gleichzeitig ausgeprägter ECM-Schädigung lässt vermuten, dass SDS allein kein wirksames Detergenz darstellt. Möglicherweise wird ein abtragendes „Partnerdetergenz“ benötigt, um die zellulären Überreste vollständig aus dem Gewebe zu entfernen. Die ausgeprägte Schädigung der ECM durch

reines SDS wurde zuvor bereits von mehreren Forschungsgruppen beschrieben [102-104]. Neu ist jedoch, dass SDS in höheren Konzentrationen nicht zu einer vollständigeren Dezellularisation führt. Während in der Literatur SDS häufig als potentes, aber aggressives Dezellularisationsdetergenz gilt, deuten unsere Ergebnisse im Hinblick auf das Protokoll δ darauf hin, dass die durch reines, höherdosiertes SDS erzeugte Denaturierung eine weitere Dezellularisation des Gewebes sogar verhindert. Hinweise für diese Hypothese liefern uns sowohl die HE- als auch die DAPI-Färbung, in denen die mit reinem SDS behandelten Perikarde an den Rändern eine massive Gewebedestruktion aufweisen, während in der Mitte noch vollständige Kerne erkennbar sind. Auch die Abwesenheit von Detritus weist darauf hin, dass kein oder nur wenig Dezellularisationslösung in diese Schichten vorgedrungen war. Es ist bekannt, dass, um ein Eindringen der Detergenzien sowie das Abtragen von zellulären Überresten zu ermöglichen, die ECM zumindest in einem gewissen Maß „aufgebrochen“ werden muss [78]. Eine Dezellularisation des Gewebes ohne eine Manipulation der ECM ist folglich nicht möglich. Unsere Ergebnisse weisen jedoch darauf hin, dass bei einer zu starken Manipulation des Gewebes der Erfolg der Dezellularisation abnimmt. Dies steht in starkem Gegensatz zu den Ergebnissen von *Laio et al.* aus dem Jahr 2008, laut denen sich SDS nur in einem geringen Maß auf die ECM auswirkt [106]. In deren Abhandlung wird explizit darauf hingewiesen, dass rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der dezellularisierten Klappen denen von nativen Klappen ähnelten – eine Beobachtung, die in starkem Kontrast zu unseren Versuchsergebnissen steht. *Kim et al.* dezellularisierten ebenfalls porcine Klappen mit einer gering dosierten SDS-Lösung (0,5%) fast vollständig [126]. Dies lässt die Vermutung zu, dass SDS-Lösungen nur in niedriger Dosis eine sinnvolle Option darstellen, da bei zu hohen Dosen die ECM-Schädigung überwiegt. Ein weiteres Indiz für diese Hypothese liefert die Forschungsarbeit von *Mallis et al.* aus dem Jahr 2017: Sie dezellularisierten porcines Perikard mit einer noch niedriger dosierten SDS-Lösung (0,05%) und erreichten in einem 22-stündigen Dezellularisationsprotokoll eine vollständige Entfernung der Zellen aus dem Gewebe [127]. Dabei muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass lediglich lichtmikroskopische Aufnahmen zur Beurteilung des Dezellularisationserfolges angewendet wurden, im Gewebe verbliebener Detritus kann dabei nur schwer beurteilt werden. Auch *Heuschkel et al.* verwendeten 2018 sehr niedrig dosiertes SDS (0,1%) bei der Dezellularisation bovine Perikarde. Sie zeigten, dass im Rahmen einer 24-stündigen Dezellularisation bovine Perikarde zu 77% dezellularisiert werden konnten, jedoch unter Erhaltung einer weitgehend ursprünglichen ECM-Struktur [117]. Dies konfliktiert einerseits mit unserem Resultat, dass SDS in Reinform zu einer ausgeprägten Schädigung der ECM führt. Gleichzeitig stimmen die Ergebnisse von Heuschkel insofern mit unseren Ergebnissen überein, als dass eine reine SDS-Lösung nicht imstande ist, Perikard vollständig zu dezellularisieren. Die Tatsache, dass dies im Vergleich zu *Heuschkel et al.* im Rahmen unserer Untersuchungen auch mit der zehnfachen SDS-Konzentration (1,0%) nicht gelang, legt nahe,

dass SDS unabhängig von der Höhe der Konzentration keine vollständige Gewebedezellularisation bewirken kann, dass jedoch das Ausmaß der ECM-Schädigung mit der Höhe der SDS-Konzentration korreliert. Inwieweit die Schädigung der ECM mit der SDS-Konzentration zusammenhängt und ob SDS in Reinform eine weitere Dezellularisation verhindert, könnte Kernfrage eines zukünftigen Forschungsansatzes sein.

Bei Untersuchung der Eindringtiefen mithilfe der DAPI-Aufnahmen konnten wir feststellen, dass es bei unvollständig dezellularisierten Perikarden kein Nebeneinander von Detritus und Zellkernen gab. Entweder es waren noch vollständige, gut abgrenzbare Zellkerne erkennbar, oder es lag ausschließlich Zellschutt vor. Basierend auf dieser Beobachtung muss möglicherweise die Betrachtungsweise in Bezug auf die Eindringtiefen angepasst werden. Das alleinige Vorhandensein von Detritus weist darauf hin, dass das Dezellularisationsdetergenz das Perikard vollständig durchdrungen hat und dabei sämtliches nukleäres Material aufgespalten hat. Die Tatsache, dass diese Fragmente nach der Dezellularisation noch im Gewebe verblieben, könnte als Hinweis gedeutet werden, dass ein Mangel an abtragenden Detergenzien vorlag. Daraus könnte die Schlussfolgerung abgeleitet werden, dass nicht zu wenig denaturierende Detergenzien vorhanden waren, jedoch ein Mangel an abtragenden Detergenzien vorlag. Ein weiteres Indiz für diese Hypothese ist, dass, neben den oben beschriebenen δ -Protokollen, lediglich bei β -Protokollen, also bei einer Kombination von Triton X und SD vollständige Zellkerne im Gewebe verblieben waren. Dies zeigt erneut, dass SDS offenbar in der Lage ist, die Zellkerne aufzuspalten, während den Detergenzien SD und Triton X eher eine „abtragende“ Rolle bei der Dezellularisation zukommt. Angesichts der Tatsache, dass im Rahmen dieser Forschungsarbeit 4 Stunden unter konstantem Fluss und temporärer Ultraschallwirkung ausreichten, um bei sämtlichen SDS-haltigen Protokollen eine Aufspaltung der Zellkerne zu erreichen, lässt dies den möglichen Schluss zu, dass die SDS-Konzentration ausreichend war, jedoch die Konzentration des abtragenden Detergenz zu gering war. Für zukünftige Forschungsansätze bedeutet diese Erkenntnis, dass eine Konzentration von 0,5% SDS ausreicht, während bei Triton X und SD höhere Konzentrationen gewählt werden sollten.

Im Rahmen dieser Forschungsarbeit kam es bei der hochkonzentrierten SDS-Lösung (1,0%) außerdem zu einer deutlichen Abnahme der Zugfestigkeit. *Mallis et al.* untersuchten ebenfalls den Einfluss von (deutlich niedriger dosiertem) SDS auf die Zugfestigkeit von perikardialem Gewebe. Sie konnten dabei zeigen, dass durch die Behandlung mit 0,05%iger SDS-Lösung die Zugfestigkeit porciner Perikarde nur gering abnahm [127]. Daraus könnte die Schlussfolgerung abgeleitet werden, dass niedrigdosierte SDS-Lösungen die Zugfestigkeit von perikardialem Gewebe nur gering beeinträchtigen. Fraglich ist dabei, inwiefern Unterschiede in der geweblichen Zusammensetzung der Perikarde beim Schwein bzw. beim Rind einen Einfluss auf dieses Ergebnis haben [166]. *Gauvin et al.*

konnten bezüglich dieser Fragestellung zeigen, dass bovine Perikarde per se eine höhere Zugfestigkeit aufweisen, sich jedoch beide Materialien für die Produktion von Xenografts eignen [167].

Im Rahmen unserer Studie zeigte sich insbesondere bei Berücksichtigung der δ -Protokolle, dass die strukturelle Schädigung des Gewebes mit einer starken Abnahme der Zugfestigkeit einhergeht. Die enge Korrelation zwischen der strukturellen Beschaffenheit und den mechanischen Eigenschaften eines Perikards wurde bereits mehrfach beschrieben [154, 168, 169]. Bei Analyse der von uns durchgeführten Zugversuche fällt jedoch auch erneut die hohe Standardabweichung – wie beispielsweise bei den HA δ N-Längsproben – auf. Diese lässt sich zum einen durch die niedrige Probenzahl von n=4 erklären, zum anderen ist sie ein Indikator für eine mögliche Materialvariabilität. Ähnlich hohe Standardabweichungen finden sich auch bei anderen Studien, die sich mit den mechanischen Eigenschaften von Perikarden befasst haben [164, 170-172]. Auffallend ist überdies die äußerst niedrige Standardabweichung bei den mit dem δ -Protokoll dezellularisierten und DNase-nachbehandelten Proben. Dies weist darauf hin, dass die 1,0%ige SDS-Lösung alle Proben in einem ähnlichen Maß geschädigt und so auf ein ähnlich niedriges mechanisches Niveau gebracht hat. Eine gleichartige Beobachtung in Bezug auf die Zugfestigkeit nach SDS-Behandlung wurde 2018 von *Choe et al.* beschrieben. Ebenso beobachteten sie im Rahmen ihrer Studie die auch von uns erfasste Dickenzunahme durch die SDS-Dezellularisation [171]. Die Zugversuche zeigen ferner, dass die längsverlaufenden Zugversuchsproben im Schnitt eine deutlich höhere Zugfestigkeit aufweisen als die querverlaufenden Proben. Dies deckt sich mit einer Vielzahl an Forschungsergebnissen [164, 166, 170, 171, 173, 174]. Neueste Forschungen weisen diesbezüglich darauf hin, dass die Kollagenfaserorientierung eine entscheidende Rolle in Bezug auf die Lebensdauer der Klappe spielt und dass insbesondere dann, wenn der physiologische Fluss senkrecht zur Faserorientierung verläuft, die Klappe zu einem schnelleren Versagen neigt [173].

Neben der Anpassung von Kombination und Konzentration der Dezellularisationsdetergenzien müssen sich zukünftige Forschungsansätze auch jenen Problematiken widmen, die im Anschluss an die vollständige Dezellularisation erfolgen. Hierzu gehört neben der Sterilisation und Konservierung des Gewebes auch die Entfernung von Detergenzienüberresten, die – insbesondere bei SDS – durch ihre Zytotoxizität dem Empfänger schaden und die Rezellularisation verhindern können [175-178]. Es obliegt der weiteren Forschung festzustellen, ob die *in-vitro* Repopulation der dezellularisierten Gewebe eine Notwendigkeit sein wird, oder ob der Mensch den idealen Bioreaktor für diesen Prozess darstellt [179, 180]. In jedem Fall muss zuvor gewährleistet werden, dass das Gewebe die nötigen Eigenschaften für diese Repopulation aufweist. Bezüglich der Rezellularisation von Xenografts besteht derzeit noch eine widersprüchliche Studienlage. Während es *Kim et al.* [126]

gelang, SDS-dezellularisierte Schweineklappen mit Endothelzellen der Ziege zu rezellularisieren, wiesen *Rieder et al.* darauf hin, dass das Potenzial zur Rezellularisation in einem starken Maß vom Dezellularisationsdetergenz abhängt, wobei SDS eine schlechte Voraussetzung für die Rezellularisation darstellt [130]. Im Folgejahr konnten jedoch sowohl *Wilcox et al.* als auch *Knight et al.* zeigen, dass es möglich war mit SDS dezellularisierte Schweineklappen sowohl mit Schweinefibroblasten als auch mit humanen Progenitorzellen zu rezellularisieren [181, 182]. Es verbleibt die Frage, ob die Hindernisse bei der Repopulation auf ein Verbleiben von toxischem SDS im Gewebe zurückzuführen sind. *Caamaño et al.* untersuchten mit SDS dezellularisierte Rinderperikarde und den Verbleib von SDS im Gewebe über die Waschgänge hinaus. Zwar konnte die SDS-Konzentration im bovinen Gewebe auf ein Minimum reduziert werden, eine vollständige Eliminierung war jedoch nicht möglich [183]. Analog hierzu zeigt auch die Arbeit von *Cebotari et al.*, dass nach den Waschgängen stets eine geringe Menge SDS im Gewebe verbleibt [177]. Dennoch gelang im Anschluss an die Dezellularisation die Rezellularisation der porcinen Pulmonalklappen. Darüber hinaus konnten sie zeigen, dass eine Kombination aus SD und SDS schneller aus dem Gewebe eliminiert wird als SDS allein, ein weiterer Hinweis auf das synergistische Agieren dieser beiden Detergenzien.

Zusammenfassend lassen sich aus unseren Resultaten mehrere Empfehlungen für zukünftige Forschungsansätze ableiten. Unsere Ergebnisse weisen darauf hin, dass insbesondere mit Kombinationen aus SDS und Triton X sowie SDS und SD eine besonders effiziente und zugleich schonende Dezellularisation ermöglicht werden kann. SDS als alleiniges Detergenz erscheint zum einen zu aggressiv, zum anderen wird die Effektivität durch ein Partnerdetergenz in besonderem Maße gesteigert und das Gewebe gleichzeitig geschont. Wie die zweite Versuchsreihe außerdem zeigte, muss eine gleichmäßige Umspülung der Perikarde gewährleistet werden, um eine vollständige Dezellularisation in sämtlichen perikardialen Arealen zu erzeugen. Zukünftige Dezellularisationsprotokolle sollten überdies stets eine Nuklease-Behandlung beinhalten, da diese ohne ausgeprägte Schädigung der ECM den Dezellularisationserfolg außerordentlich zu steigern vermag. Die kritische Betrachtung dieser Studie zeigt, dass bei der Auswahl der Perikarde genauer auf Art, Geschlecht, Alter und Haltungsbedingungen geachtet werden muss, um möglichst homogenes Material für die Herstellung von Xenografts zu gewinnen. Außerdem muss bei zukünftigen Forschungsansätzen der Einfluss der Temperatur sowohl bei der Dezellularisation als auch im Rahmen einer Nuklease-Nachbehandlung genauer untersucht bzw. reguliert werden. Sind all diese Faktoren reguliert, kann bovines Perikard in kurzer Zeit von sämtlichem immunogenem Material befreit werden und so ein ideales Material zur Herstellung einer langlebigen und integrationsfähigen Klappe liefern.

7 Zusammenfassung

In einer alternden Gesellschaft mit einer steigenden Zahl an Herzklappenerkrankungen und -operationen stellt die Entwicklung langlebiger Klappenprothesen eine essenzielle Aufgabe für zukünftige Forschungsvorhaben dar. Tissue-engineerte, dezellularisierte Xenografts stellen hierfür eine vielversprechende Option dar.

Im Rahmen dieser Studie wurde untersucht, welche Konstellation aus Dezellularisationsdauer, Konzentration der Dezellularisationslösungen sowie mechanischen und enzymatischen Einflussfaktoren zu einer besonders effektiven und gleichzeitig schonenden Dezellularisation boviner Perikarde führt. Wir verwendeten hierfür jeweils 0,5%ige Kombinationslösungen aus SD/SDS, SD/Triton X oder SDS/Triton X. Im Rahmen der zweiten Versuchsreihe wurde zusätzlich die Anwendung einer 1,0%igen SDS-Lösung untersucht. Es wurde außerdem eruiert, ob eine längere Dezellularisationsdauer zu einer vollständigeren Dezellularisation führt oder nicht und ob es dabei zu einer Verschlechterung der geweblichen Eigenschaften kommen würde. Darüber hinaus wurde der Effekt einer anschließenden DNase-Behandlung untersucht. Durch Verwendung zweier verschiedener Versuchsaufbauten im Rahmen der ersten und zweiten Versuchsreihe konnte außerdem der Einfluss der Dezellularisationsmechanik auf das Dezellularisationsergebnis eruiert werden. Der Erfolg der Dezellularisation wurde anhand der Menge an verbliebenen Zellen in der DAPI-Färbung beurteilt. Die Evaluation der Gewebebeschaffenheit erfolgte durch die HE- und Pikro-Siriusrot-Färbung sowie durch die Zugversuche und die Rasterelektronenmikroskopie. Die Dezellularisation galt dann als erfolgreich, wenn bei nur geringer Schädigung der ECM eine vollständige Eliminierung zellulärer Bestandteile aus dem Gewebe stattgefunden hatte.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass es sowohl mit einer Kombination von SDS und SD sowie einer Kombination aus SDS und Triton X möglich ist bovine Perikarde vollständig von zellulärem Material zu befreien. Hierbei hatte entgegen unserer Vermutungen eine längere Dezellularisationsdauer keinen positiven Einfluss auf das Dezellularisationsergebnis. Eine Behandlung mit einer 1,0%igen, reinen SDS-Lösung führte zu einer unvollständigen Dezellularisation und einer massiven Gewebedestruktion und -denaturierung. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass SDS nur mit einem Partnerdetergenz in der Lage ist, Perikarde effektiv zu dezellularisieren. Dabei sollte bei zukünftigen Dezellularisationsprotokollen eine vergleichsweise geringe SDS-Konzentration und eine höhere SD- bzw. Triton X-Konzentration gewählt werden, da SDS das aggressivste der untersuchten Detergenzien darstellt.

Zusammenfassung

Unsere Resultate legen außerdem nahe, dass eine anschließende DNase-Behandlung den Erfolg der Dezellularisation bei nur geringfügiger Schädigung der perikardialen Kollagenstruktur erheblich steigert. Die modifizierten mechanischen Bedingungen im Rahmen der zweiten Versuchsreihe ermöglichten einen konstanten Fluss um die Perikarde herum, und ließen ein gleichmäßiges Umspülen aller perikardialen Areale zu.

Die Ergebnisse der Studie sind ein Fortschritt auf dem Weg zum langlebigen Klappenersatz. Nichtsdestotrotz bestehen bis zur Herstellung des idealen Xenografts und dessen komplikationsfreier Implantation noch offene Problemstellungen. Im Rahmen zukünftiger Forschungsansätze ist es von fundamentaler Wichtigkeit, den Fokus auf die Präzisierung der Dezellularisationsprotokolle in Abhängigkeit vom Grundmaterial und eine strenge Auswahl desselbigen zu legen. Ferner sollte während der Dezellularisation und der anschließenden DNase-Behandlung eine Temperaturregulation erfolgen, um diesen potenziellen Einflussfaktor noch besser kontrollieren zu können.

Nur so besteht durch die präzise Feinabstimmung aller Dezellularisationsmodalitäten die Möglichkeit einer schonenden und gleichwohl restlosen Dezellularisation.

8 Literaturverzeichnis

1. Benjamin, E.J., et al., *Heart Disease and Stroke Statistics—2018 Update: A Report From the American Heart Association*. Circulation, 2018. **137**(12): p. e67-e492.
2. lung, B. and A. Vahanian, *Epidemiology of Acquired Valvular Heart Disease*. Canadian Journal of Cardiology, 2014. **30**(9): p. 962-970.
3. Supino, P.G., et al., *The Epidemiology of Valvular Heart Disease: a Growing Public Health Problem*. Heart Failure Clinics, 2006. **2**(4): p. 379-393.
4. Kececioglu, D., *Erkrankungen des Herzens und der Gefäße, Herzrhythmusstörungen, kardiologische Intensivmedizin*, in *Pädiatrie*. 2009, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 513-561.
5. Flesch, M., *Erworbene Herzklappenfehler*, in *Klinische Kardiologie: Krankheiten des Herzens, des Kreislaufs und der herznahen Gefäße*, E. Erdmann, Editor. 2009, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 397-423.
6. Baumgartner, H., et al., *Echocardiographic assessment of valve stenosis: EAE/ASE recommendations for clinical practice*. J Am Soc Echocardiogr, 2009. **22**(1): p. 1-23; quiz 101-2.
7. Baumgartner, H., et al., *2017 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease*. Eur Heart J, 2017. **38**(36): p. 2739-2791.
8. Andresen, D., *Deutscher Herzbericht 2018*, in: 2018, Deutsche Herzstiftung.
9. Acheson, R.M., *The Epidemiology of Acute Rheumatic Fever 1950-1964*. Journal of Chronic Diseases, 1965. **18**(8): p. 723-34.
10. Cutler, E.C.L., S.A. , *Cardiotomy and Valvulotomy for Mitral Stenosis; Experimental Observations and Clinical Notes Concerning an Operated Case with Recovery*. The Boston Medical and Surgical Journal, 1923. **188**(26): p. 1023-1027.
11. Matthews, A.M., *The development of the Starr-Edwards heart valve*. Texas Heart Institute Journal, 1998. **25**(4): p. 282-293.
12. Souttar, H.S., *The surgical treatment of mitral stenosis*. British Medical Journal, 1925. **2**(3379): p. 603-606.
13. Kay, E.B., *Early years in artificial valve development*. The Annals of Thoracic Surgery, 1989. **48**(3, Supplement): p. S24-S25.
14. Hufnagel, C.A., P.D. Vilkgas, and H. Nahas, *Experiences with New Types of Aortic Valvular Prostheses*. Annals of Surgery, 1958. **147**(5): p. 636-644.
15. Gibbon, J.H., *The development of the heart-lung apparatus*. The American Journal of Surgery, 1978. **135**(5): p. 608-619.
16. Starr, A. and M.L. Edwards, *Mitral Replacement: Clinical Experience with a Ball-Valve Prosthesis*. Annals of Surgery, 1961. **154**(4): p. 726-740.
17. Khan, M.N., *The relief of mitral stenosis. An historic step in cardiac surgery*. Texas Heart Institute Journal, 1996. **23**(4): p. 258-266.
18. J., H., *County heart valve inventor honored: design for historic life-saving invention came following 'retirement'*. Orange County Illustrated, 1974 Feb(42): p. 5.
19. Swanson, J.S. and A. Starr, *The ball valve experience over three decades*. The Annals of Thoracic Surgery, 1989. **48**(3, Supplement): p. S51-S52.
20. Duran, C. and A.J. Gunning, *Aortic homograft valve transplantation*. Ann R Coll Surg Engl, 1966. **39**(3): p. 190-2.
21. Murray, G., W. Roschlau, and W. Loughheed, *Homologous Aortic-Valve-Segment Transplants as Surgical Treatment for Aortic and Mitral Insufficiency*. Angiology, 1956. **7**(5): p. 466-471.
22. Murray, G., *Aortic Valve Transplants*. Angiology, 1960. **11**(2): p. 99-102.
23. Duran, C.G. and A.J. Gunning, *Heterologous aortic-valve transplantation in the dog*. Lancet, 1965. **2**(7403): p. 114-5.

24. Ciubotaru, A., et al., *Biological heart valves*. Biomed Tech (Berl), 2013. **58**(5): p. 389-97.
25. Fein, M. and E. Filachione, *Tanning studies with aldehydes*. J. Am. Leather Chem. Assoc., 1957. **52**: p. 17.
26. Fein, M.L. and E.M. Filachione, *Tanning with glutaraldehyde*. 1960, Google Patents.
27. Ionescu, M., et al., *Heart valve replacement with the Ionescu-Shiley pericardial xenograft*. The Journal of thoracic and cardiovascular surgery, 1977. **73**(1): p. 31-42.
28. Harken, D.E. and L.E. Curtis, *Heart surgery—Legend and a long look*. The American Journal of Cardiology, 1967. **19**(3): p. 393-400.
29. Harken, D.E., *Heart valves: Ten commandments and still counting*. The Annals of Thoracic Surgery, 1989. **48**(3, Supplement): p. S18-S19.
30. Head, S.J., M. Çelik, and A.P. Kappetein, *Mechanical versus bioprosthetic aortic valve replacement*. European Heart Journal, 2017. **38**(28): p. 2183-2191.
31. Cheema, F.H., et al., *Patents and Heart Valve Surgery - I: Mechanical Valves*. Recent Patents on Cardiovascular Drug Discovery, 2013. **8**(1): p. 17-34.
32. Akins, C.W., et al., *Guidelines for reporting mortality and morbidity after cardiac valve interventions*. The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, 2008. **135**(4): p. 732-738.
33. Sievers, H.-H. and M. Misfeld, *Erworbene Vitien der Aortenklappe*, in *Herzchirurgie: Die Eingriffe am Herzen und den herznahen Gefäßen*. 2010, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 601-634.
34. Head, S.J., R.L. Osnabrugge, and A. Kappetein, *Age cutoffs for bioprosthetic vs mechanical aortic valve replacement*. JAMA, 2015. **313**(5): p. 522-523.
35. Butchart, E.G., et al., *Better anticoagulation control improves survival after valve replacement*. The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, 2002. **123**(4): p. 715-723.
36. van Hagen, I.M., et al., *Pregnancy in women with a mechanical heart valve: data of the European Society of Cardiology Registry of Pregnancy and Cardiac Disease (ROPAC)*. Circulation, 2015: p. CIRCULATIONAHA.115.015242.
37. Dis, E., *Nearly one-quarter of patients say mechanical heart valve disturbs sleep*. Cardiovascular journal of Africa, 2017. **28**(5): p. 330.
38. H. Cheema, F., et al., *Patents and Heart Valve Surgery - II: Tissue Valves*. Recent Patents on Cardiovascular Drug Discovery, 2013. **8**(2): p. 127-142.
39. Siddiqui, R.F., J.R. Abraham, and J. Butany, *Bioprosthetic heart valves: modes of failure*. Histopathology, 2009. **55**(2): p. 135-144.
40. O'Brien, M.F., et al., *A comparison of aortic valve replacement with viable cryopreserved and fresh allograft valves, with a note on chromosomal studies*. J Thorac Cardiovasc Surg, 1987. **94**(6): p. 812-23.
41. Fukushima, S., et al., *Long-term clinical outcomes after aortic valve replacement using cryopreserved aortic allograft*. The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, 2014. **148**(1): p. 65-72.e2.
42. Cribier, A., et al., *Percutaneous transcatheter implantation of an aortic valve prosthesis for calcific aortic stenosis: first human case description*. Circulation, 2002. **106**(24): p. 3006-3008.
43. Ruparel, N. and B.D. Prendergast, *TAVI in 2015: who, where and how?* Heart, 2015. **101**(17): p. 1422-1431.
44. Abdel-Wahab, M., et al., *Comparison of balloon-expandable vs self-expandable valves in patients undergoing transcatheter aortic valve replacement: the CHOICE randomized clinical trial*. Jama, 2014. **311**(15): p. 1503-1514.
45. Badylak, S.F. and T.W. Gilbert, *Immune response to biologic scaffold materials*. Semin Immunol, 2008. **20**(2): p. 109-16.
46. Umashankar, P.R., P.V. Mohanan, and T.V. Kumari, *Glutaraldehyde Treatment Elicits Toxic Response Compared to Decellularization in Bovine Pericardium*. Toxicology International, 2012. **19**(1): p. 51-58.
47. Tam, H., et al., *Fixation of Bovine Pericardium-Based Tissue Biomaterial with Irreversible Chemistry Improves Biochemical and Biomechanical Properties*. J Cardiovasc Transl Res, 2017. **10**(2): p. 194-205.

48. Jayakrishnan, A. and S.R. Jameela, *Glutaraldehyde as a fixative in bioprostheses and drug delivery matrices*. *Biomaterials*, 1996. **17**(5): p. 471-484.
49. Dohmen, P. and W. Konertz, *Tissue-engineered heart valve scaffolds*. Vol. 15. 2009. 362-7.
50. Z. Konakci, K., et al., *Alpha-Gal on bioprostheses: xenograft immune response in cardiac surgery*. *European Journal of Clinical Investigation*, 2005. **35**(1): p. 17-23.
51. Schoen, F.J. and R.J. Levy, *Calcification of Tissue Heart Valve Substitutes: Progress Toward Understanding and Prevention*. *The Annals of Thoracic Surgery*, 2005. **79**(3): p. 1072-1080.
52. Fioretta, E.S., et al., *Cardiovascular tissue engineering: From basic science to clinical application*. *Experimental Gerontology*, 2018.
53. Emmert, M.Y., E.S. Fioretta, and S.P. Hoerstrup, *Translational Challenges in Cardiovascular Tissue Engineering*. *Journal of Cardiovascular Translational Research*, 2017. **10**(2): p. 139-149.
54. Vahanian, A., et al., *Guidelines on the management of valvular heart disease (version 2012)* *The Joint Task Force on 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*, 2012. **33**(19): p. 2451-2496.
55. Jamieson, W.R.E., et al., *Carpentier-Edwards supraannular porcine bioprosthesis evaluation over 15 years*. *The Annals of Thoracic Surgery*, 1998. **66**(6, Supplement 1): p. S49-S52.
56. Cholesterol Treatment Trialists, C., *Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: a meta-analysis of data from 170 000 participants in 26 randomised trials*. *The Lancet*, 2010. **376**(9753): p. 1670-1681.
57. Beckmann, A., et al., *German Heart Surgery Report 2018: The Annual Updated Registry of the German Society for Thoracic and Cardiovascular Surgery*. *Thorac cardiovasc Surg*, 2019. **67**(05): p. 331-344.
58. Gesundheitswesen, I.I.f.Q.u.T.i., *Bundesauswertung zum Erfassungsjahr 2018 Aortenklappenchirurgie, isoliert (Konventionell chirurgisch)*. 2019, IQTIG – Institut für Qualitätssicherung und Transparenz im Gesundheitswesen Katharina-Heinroth-Ufer 1, 10787 Berlin. p. 21-32.
59. Gesundheitswesen, I.I.f.Q.u.T.i., *Bundesauswertung zum Erfassungsjahr 2018, Aortenklappenchirurgie, isoliert (Kathetergestützt), Qualitätsindikatoren und Kennzahlen*. 2019, IQTIG – Institut für Qualitätssicherung und Transparenz im Gesundheitswesen Katharina-Heinroth-Ufer 1, 10787 Berlin. p. 5-34.
60. Naso, F. and A. Gandaglia, *Different approaches to heart valve decellularization: A comprehensive overview of the past 30 years*. *Xenotransplantation*, 2018. **25**(1): p. e12354.
61. Yacoub, M.H. and J.J.M. Takkenberg, *Will heart valve tissue engineering change the world?* *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine*, 2005. **2**(2): p. 60-61.
62. Langer, R. and J. Vacanti, *Tissue engineering*. *Science*, 1993. **260**(5110): p. 920-926.
63. Shinoka, T. and H. Miyachi, *Current Status of Tissue Engineering Heart Valve*. *World Journal for Pediatric and Congenital Heart Surgery*, 2016. **7**(6): p. 677-684.
64. Skalak R, F.C., *Tissue engineering*, in *Proceedings of the workshop "Tissue Engineering"* ; New York: Liss. 1988: Granlibakken, Lake Tahoe, California.
65. Nerem, R.M., *Cellular engineering*. *Ann Biomed Eng*, 1991. **19**(5): p. 529-45.
66. MacArthur, B.D. and R.O.C. Oreffo, *Bridging the gap*. *Nature*, 2005. **433**(7021): p. 19-19.
67. Skalak, R. *Tissue engineering*. in *Proceedings of the 15th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Societ*. 1993.
68. Vacanti, J.P. and C.A. Vacanti, *Chapter 1 - The History and Scope of Tissue Engineering*, in *Principles of Tissue Engineering (Fourth Edition)*, R. Lanza, R. Langer, and J. Vacanti, Editors. 2014, Academic Press: Boston. p. 3-8.
69. Moffat, K.L., et al., *Chapter 13 - Engineering Functional Tissues: In Vitro Culture Parameters*, in *Principles of Tissue Engineering (Fourth Edition)*, R. Lanza, R. Langer, and J. Vacanti, Editors. 2014, Academic Press: Boston. p. 237-259.
70. Chapekar, M.S., *Tissue engineering: challenges and opportunities*. *J Biomed Mater Res*, 2000. **53**(6): p. 617-20.

71. Agrawal, C.M. and R.B. Ray, *Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering*. Journal of Biomedical Materials Research, 2001. **55**(2): p. 141-150.
72. Parvathy, T., et al., *Pathological Effects of Processed Bovine Pericardial Scaffolds—A Comparative In Vivo Evaluation*. Artificial Organs, 2013. **37**(7): p. 600-605.
73. Blaudez, F., et al., *An overview of decellularisation techniques of native tissues and tissue engineered products for bone, ligament and tendon regeneration*. Methods, 2020. **171**: p. 28-40.
74. Roth, S.P., et al., *Automated freeze-thaw cycles for decellularization of tendon tissue—a pilot study*. BMC biotechnology, 2017. **17**(1): p. 13.
75. Li, N., et al., *Efficient decellularization for bovine pericardium with extracellular matrix preservation and good biocompatibility*. Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery, 2018. **26**(5): p. 768-776.
76. Starnecker, F., et al., *Tissue-engineering acellular scaffolds—The significant influence of physical and procedural decellularization factors*. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 2016.
77. Hashimoto, Y., et al., *The effect of decellularized bone/bone marrow produced by high-hydrostatic pressurization on the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells*. Biomaterials, 2011. **32**(29): p. 7060-7.
78. Gilbert, T.W., T.L. Sellaro, and S.F. Badylak, *Decellularization of tissues and organs*. Biomaterials, 2006. **27**(19): p. 3675-3683.
79. Xu, K., et al., *Efficient decellularization for tissue engineering of the tendon-bone interface with preservation of biomechanics*. PloS one, 2017. **12**(2): p. e0171577.
80. Ning, L.J., et al., *Preparation and characterization of decellularized tendon slices for tendon tissue engineering*. Journal of biomedical materials research Part A, 2012. **100**(6): p. 1448-1456.
81. Lohan, A., et al., *Tenogenesis of decellularized porcine achilles tendon matrix reseeded with human tenocytes in the nude mice xenograft model*. International journal of molecular sciences, 2018. **19**(7): p. 2059.
82. Ning, L.-J., et al., *The utilization of decellularized tendon slices to provide an inductive microenvironment for the proliferation and tenogenic differentiation of stem cells*. Biomaterials, 2015. **52**: p. 539-550.
83. Brown, B.N., et al., *Comparison of three methods for the derivation of a biologic scaffold composed of adipose tissue extracellular matrix*. Tissue Engineering Part C: Methods, 2011. **17**(4): p. 411-421.
84. Hopkinson, A., et al., *Optimization of amniotic membrane (AM) denuding for tissue engineering*. Tissue Engineering Part C: Methods, 2008. **14**(4): p. 371-381.
85. Xu, C.C., et al., *A bovine acellular scaffold for vocal fold reconstruction in a rat model*. Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials, 2010. **92**(1): p. 18-32.
86. 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.
87. Klebe, R.J., *Isolation of a collagen-dependent cell attachment factor*. Nature, 1974. **250**(5463): p. 248-251.
88. Maurer, P. and E. Hohenester, *Structural and functional aspects of calcium binding in extracellular matrix proteins*. Matrix biology, 1997. **15**(8-9): p. 569-580.
89. Khorramirouz, R., et al., *Effect of three decellularisation protocols on the mechanical behaviour and structural properties of sheep aortic valve conduits*. Adv Med Sci, 2014. **59**(2): p. 299-307.
90. Cartmell, J.S. and M.G. Dunn, *Development of cell-seeded patellar tendon allografts for anterior cruciate ligament reconstruction*. Tissue engineering, 2004. **10**(7-8): p. 1065-1075.
91. Chen, F., J.J. Yoo, and A. Atala, *Acellular collagen matrix as a possible “off the shelf” biomaterial for urethral repair*. Urology, 1999. **54**(3): p. 407-410.

92. Chen, R.-N., et al., *Process development of an acellular dermal matrix (ADM) for biomedical applications*. *Biomaterials*, 2004. **25**(13): p. 2679-2686.
93. Hudson, T.W., S.Y. Liu, and C.E. Schmidt, *Engineering an improved acellular nerve graft via optimized chemical processing*. *Tissue engineering*, 2004. **10**(9-10): p. 1346-1358.
94. Badylak, S.F., et al., *Small intestinal submucosa as a large diameter vascular graft in the dog*. *Journal of Surgical Research*, 1989. **47**(1): p. 74-80.
95. Lantz, G.C., et al., *Small intestinal submucosa as a superior vena cava graft in the dog*. *Journal of Surgical Research*, 1992. **53**(2): p. 175-181.
96. Cartmell, J.S. and M.G. Dunn, *Effect of chemical treatments on tendon cellularity and mechanical properties*. *J Biomed Mater Res*, 2000. **49**(1): p. 134-40.
97. Borschel, G.H., R.G. Dennis, and W.M. Kuzon, Jr., *Contractile skeletal muscle tissue-engineered on an acellular scaffold*. *Plast Reconstr Surg*, 2004. **113**(2): p. 595-602; discussion 603-4.
98. Lin, P., et al., *Assessing porcine liver-derived biomatrix for hepatic tissue engineering*. *Tissue Eng*, 2004. **10**(7-8): p. 1046-53.
99. Malone, J.M., et al., *Detergent-extracted small-diameter vascular prostheses*. *Journal of Vascular Surgery*, 1984. **1**(1): p. 181-191.
100. Seddon, A.M., P. Curnow, and P.J. Booth, *Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 2004. **1666**(1): p. 105-117.
101. Reynolds, J.A. and C. Tanford, *Binding of Dodecyl Sulfate to Proteins at High Binding Ratios. Possible Implications for the State of Proteins in Biological Membranes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1970. **66**(3): p. 1002-1007.
102. Bodnar, E., et al., *Damage of Porcine Aortic Valve Tissue Caused by the Surfactant Sodiumdodecylsulphate*. *Thorac cardiovasc Surg*, 1986. **34**(02): p. 82-85.
103. Kasimir, M.-T., et al., *Comparison of different decellularization procedures of porcine heart valves*. *The International journal of artificial organs*, 2003. **26**(5): p. 421-427.
104. Jordan, R.E., et al., *Regulation of elastase-catalyzed hydrolysis of insoluble elastin by synthetic and naturally occurring hydrophobic ligands*. *Biochemistry*, 1974. **13**(17): p. 3497-3503.
105. Neugebauer, J.M., [18] *Detergents: An overview*, in *Methods in Enzymology*, M.P. Deutscher, Editor. 1990, Academic Press. p. 239-253.
106. Liao, J., E.M. Joyce, and M.S. Sacks, *Effects of decellularization on the mechanical and structural properties of the porcine aortic valve leaflet*. *Biomaterials*, 2008. **29**(8): p. 1065-1074.
107. Helenius, A. and K. Simons, *Solubilization of membranes by detergents*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*, 1975. **415**(1): p. 29-79.
108. Grauss, R.W., et al., *Histological evaluation of decellularised porcine aortic valves: matrix changes due to different decellularisation methods*☆. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 2005. **27**(4): p. 566-571.
109. Liao, K., et al., *Bovine Pericardium Versus Porcine Aortic Valve: Comparison of Tissue Biological Properties as Prosthetic Valves*. *Artificial Organs*, 1992. **16**(4): p. 361-365.
110. Shen, M., et al., *Protein adsorption in glutaraldehyde-preserved bovine pericardium and porcine valve tissues*. *The Annals of Thoracic Surgery*, 2001. **71**(5, Supplement 1): p. S408-S409.
111. Huang, W., et al., *Several clinical interests regarding lung volume reduction surgery for severe emphysema: meta-analysis and systematic review of randomized controlled trials*. *J Cardiothorac Surg*, 2011. **6**: p. 148.
112. Kadioglu, A., F. Kucukdurmaz, and O. Sanli, *Current status of the surgical management of Peyronie's disease*. *Nat Rev Urol*, 2011. **8**(2): p. 95-106.
113. Zapater, E., et al., *Use of bovine pericardium for the treatment of anterior iatrogenic glottic web*. *The Laryngoscope*, 2019. **129**(9): p. 2121-2124.

114. Yu, B.T., et al., *Comparative study of the Triton X-100-sodium deoxycholate method and detergent-enzymatic digestion method for decellularization of porcine aortic valves*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2013. **17**(16): p. 2179-84.
115. Vafaei, T., et al., *Decellularization of human donor aortic and pulmonary valved conduits using low concentration sodium dodecyl sulfate*. J Tissue Eng Regen Med, 2016.
116. Erdbrügger, W., et al., *Decellularized Xenogenic Heart Valves Reveal Remodeling and Growth Potential in Vivo*. Tissue Engineering, 2006. **12**(8): p. 2059-2068.
117. Heuschkel, M.A., et al., *In vitro evaluation of bovine pericardium after a soft decellularization approach for use in tissue engineering*. Xenotransplantation, 2018. **0**(0): p. e12464.
118. Hülsmann, J., et al., *Transplantation material bovine pericardium: biomechanical and immunogenic characteristics after decellularization vs. glutaraldehyde-fixing*. Xenotransplantation, 2012. **19**(5): p. 286-297.
119. Granados, M., et al., *Development and Characterization of a Porcine Mitral Valve Scaffold for Tissue Engineering*. Journal of Cardiovascular Translational Research, 2017. **10**(4): p. 374-390.
120. Gonçalves, A.C., et al., *Decellularization of bovine pericardium for tissue-engineering by targeted removal of xenoantigens*. J Heart Valve Dis, 2005. **14**(2): p. 212-7.
121. Gallo, M., et al., *Physiological Performance of a Detergent Decellularized Heart Valve Implanted for 15 Months in Vietnamese Pigs: Surgical Procedure, Follow-up, and Explant Inspection*. Artificial Organs, 2012. **36**(6): p. E138-E150.
122. Nordmeyer, S., et al., *Results of aortic valve repair using decellularized bovine pericardium in congenital surgery*. European Journal of Cardio-Thoracic Surgery, 2018: p. ezy181-ezy181.
123. Mazzitelli, D., et al., *Complete Aortic Valve Cusp Replacement in the Pediatric Population Using Tissue-Engineered Bovine Pericardium*. The Annals of Thoracic Surgery, 2015. **100**(5): p. 1923-1925.
124. Bell, D., et al., *Durability of tissue-engineered bovine pericardium (CardioCel®) for a minimum of 24 months when used for the repair of congenital heart defects*. Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery, 2018: p. ivy246-ivy246.
125. Konertz, W., et al., *Hemodynamic characteristics of the Matrix P decellularized xenograft for pulmonary valve replacement during the Ross operation*. J Heart Valve Dis, 2005. **14**(1): p. 78-81.
126. Kim, W., J. Park, and W. Lee, *Tissue-engineered heart valve leaflets: an effective method of obtaining acellularized valve xenografts*. The International journal of artificial organs, 2002. **25**(8): p. 791-797.
127. Mallis, P., et al., *Histological and biomechanical characterization of decellularized porcine pericardium as a potential scaffold for tissue engineering applications*. Bio-medical materials and engineering, 2017. **28**(5): p. 477-488.
128. Perri, G., et al., *Early and late failure of tissue-engineered pulmonary valve conduits used for right ventricular outflow tract reconstruction in patients with congenital heart disease*. European Journal of Cardio-Thoracic Surgery, 2012. **41**(6): p. 1320-1325.
129. Simon, P., et al., *Early failure of the tissue engineered porcine heart valve SYNERGRAFT® in pediatric patients*. European Journal of Cardio-Thoracic Surgery, 2003. **23**(6): p. 1002-1006.
130. Rieder, E., et al., *Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells*. The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, 2004. **127**(2): p. 399-405.
131. Cebotari, S., et al., *Use of fresh decellularized allografts for pulmonary valve replacement may reduce the reoperation rate in children and young adults: early report*. Circulation, 2011. **124**(11 Suppl): p. S115-23.
132. Koenig, F., et al., *Is Transcatheter Aortic Valve Implantation of Living Tissue-Engineered Valves Feasible? An In Vitro Evaluation Utilizing a Decellularized and Reseeded Biohybrid Valve*. Artificial organs, 2016. **40**(8): p. 727-737.
133. Thierfelder, N., et al., *In vitro comparison of novel polyurethane aortic valves and homografts after seeding and conditioning*. ASAIO journal, 2013. **59**(3): p. 309-316.

134. König, F., et al., *A Pulsatile Bioreactor for Conditioning of Tissue-Engineered Cardiovascular Constructs under Endoscopic Visualization*. J Funct Biomater, 2012. **3**(3): p. 480-96.
135. von Nathusius, S., et al., *The cardiotomy reservoir – a preliminary evaluation of a new cell source for cardiovascular tissue engineering*. The International Journal of Artificial Organs, 2017. **41**(2): p. 115-123.
136. Grefen, L., et al., *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.
137. Koenig, F., et al., *Successful decellularization of thick-walled tissue: Highlighting pitfalls and the need for a multifactorial approach*. The International Journal of Artificial Organs, 2018. **42**(1): p. 17-24.
138. Starnecker, F., *Systematische Evaluation und Optimierung physikalischer und prozeduraler Dezellularisationsmethoden zur Herstellung xenogener Gewebeprothesen*. 2019, lmu.
139. Vahanian, A., et al., *Changing demographics of valvular heart disease and impact on surgical and transcatheter valve therapies*. The International Journal of Cardiovascular Imaging, 2011. **27**(8): p. 1115-1122.
140. Gendler, E., S. Gendler, and M.E. Nimni, *Toxic reactions evoked by glutaraldehyde-fixed pericardium and cardiac valve tissue bioprosthesis*. J Biomed Mater Res, 1984. **18**(7): p. 727-36.
141. Manji, R.A., et al., *Glutaraldehyde-fixed bioprosthetic heart valve conduits calcify and fail from xenograft rejection*. Circulation, 2006. **114**(4): p. 318-27.
142. Ruel, M., et al., *Long-term outcomes of valve replacement with modern prostheses in young adults*. Eur J Cardiothorac Surg, 2005. **27**(3): p. 425-33; discussion 433.
143. Bonow, R.O., et al., *ACC/AHA 2006 Guidelines for the Management of Patients With Valvular Heart Disease*. Circulation, 2006. **114**(5): p. e84-e231.
144. Borger, M.A., et al., *Twenty-year results of the Hancock II bioprosthesis*. J Heart Valve Dis, 2006. **15**(1): p. 49-55; discussion 55-6.
145. Le Huu, A. and D. Shum-Tim, *Tissue engineering of autologous heart valves: a focused update*. Future Cardiol, 2014. **10**(1): p. 93-104.
146. Rippel, R.A., H. Ghanbari, and A.M. Seifalian, *Tissue-Engineered Heart Valve: Future of Cardiac Surgery*. World Journal of Surgery, 2012. **36**(7): p. 1581-1591.
147. Vesely, I., *Heart Valve Tissue Engineering*. Circulation Research, 2005. **97**(8): p. 743-755.
148. Philips, C., M. Cornelissen, and V. Carriel, *Evaluation methods as quality control in the generation of decellularized peripheral nerve allografts*. Journal of Neural Engineering, 2018. **15**(2): p. 021003.
149. Carriel, V., et al., *Histological assessment in peripheral nerve tissue engineering*. Neural Regen Res, 2014. **9**(18): p. 1657-60.
150. Roosens, A., et al., *Impact of Detergent-Based Decellularization Methods on Porcine Tissues for Heart Valve Engineering*. Annals of Biomedical Engineering, 2016. **44**(9): p. 2827-2839.
151. Mimler, T., et al., *Extracellular matrix in ascending aortic aneurysms and dissections - What we learn from decellularization and scanning electron microscopy*. PLoS One, 2019. **14**(3): p. e0213794.
152. 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: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and the Australian Society for Biomaterials, 1998. **39**(2): p. 207-214.
153. Bailey, A.J., *Molecular mechanisms of ageing in connective tissues*. Mechanisms of ageing and development, 2001. **122**(7): p. 735-755.
154. Sizeland, K.H., et al., *Age Dependent Differences in Collagen Alignment of Glutaraldehyde Fixed Bovine Pericardium*. BioMed Research International, 2014. **2014**: p. 189197.
155. Willett, T.L., et al., *Changes in collagen with aging maintain molecular stability after overload: evidence from an in vitro tendon model*. Journal of biomechanical engineering, 2010. **132**(3).

156. Harrison, R.D. and P.F. Gratzner, *Effect of extraction protocols and epidermal growth factor on the cellular repopulation of decellularized anterior cruciate ligament allografts*. Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials, 2005. **75**(4): p. 841-854.
157. Ishihara, T., et al., *Histologic and ultrastructural features of normal human parietal pericardium*. The American Journal of Cardiology, 1980. **46**(5): p. 744-753.
158. Schoen, F.J., J.W. Tsao, and R.J. Levy, *Calcification of bovine pericardium used in cardiac valve bioprosthesis. Implications for the mechanisms of bioprosthetic tissue mineralization*. Am J Pathol, 1986. **123**(1): p. 134-45.
159. Sacks, M.S., C.J.C. Chuong, and R. More, *Collagen Fiber Architecture of Bovine Pericardium*. ASAIO Journal, 1994. **40**(3): p. M632-M637.
160. Gabbay, S. and H. Welch, *Reducing the variability in durability of heart valve bioprosthesis. Key factor for future improvement*. ASAIO Trans, 1988. **34**(4): p. 1022-6.
161. Zioupos, P., J. Barbenel, and J. Fisher, *Mechanical and optical anisotropy of bovine pericardium*. Medical and Biological Engineering and Computing, 1992. **30**(1): p. 76-82.
162. Sacks, M.S., et al., *Bioprosthetic heart valve heterograft biomaterials: structure, mechanical behavior and computational simulation*. Expert Review of Medical Devices, 2006. **3**(6): p. 817-834.
163. Bielli, A., et al., *Characterization of a new decellularized bovine pericardial biological mesh: Structural and mechanical properties*. Journal of the mechanical behavior of biomedical materials, 2018. **78**: p. 420-426.
164. García Páez, J.M., et al., *Comparison of the mechanical behaviors of biological tissues subjected to uniaxial tensile testing: pig, calf and ostrich pericardium sutured with Gore-Tex*. Biomaterials, 2003. **24**(9): p. 1671-1679.
165. Konertz, W., et al., *Right ventricular outflow tract reconstruction with decellularized porcine xenografts in patients with congenital heart disease*. Journal of Heart Valve Disease, 2011. **20**(3): p. 341.
166. Caballero, A., et al., *Evaluation of transcatheter heart valve biomaterials: Biomechanical characterization of bovine and porcine pericardium*. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, 2017. **75**: p. 486-494.
167. Gauvin, R., et al., *A comparative study of bovine and porcine pericardium to highlight their potential advantages to manufacture percutaneous cardiovascular implants*. Journal of Biomaterials Applications, 2013. **28**(4): p. 552-565.
168. Hinton, R.B. and K.E. Yutzey, *Heart Valve Structure and Function in Development and Disease*. Annual Review of Physiology, 2011. **73**(1): p. 29-46.
169. Schoen, F.J., *Evolving Concepts of Cardiac Valve Dynamics*. Circulation, 2008. **118**(18): p. 1864-1880.
170. Pagoulatou, E., et al., *Biomechanical and structural changes following the decellularization of bovine pericardial tissues for use as a tissue engineering scaffold*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2012. **23**(6): p. 1387-1396.
171. Choe, J.A., et al., *Biomaterial characterization of off-the-shelf decellularized porcine pericardial tissue for use in prosthetic valvular applications*. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 2018. **12**(7): p. 1608-1620.
172. Chen, S., et al., *Donkey Pericardium as an Alternative Bioprosthetic Heart Valve Material*. Artificial Organs, 2013. **37**(3): p. 248-255.
173. Whelan, A., et al., *Collagen fibre orientation and dispersion govern ultimate tensile strength, stiffness and the fatigue performance of bovine pericardium*. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, 2019. **90**: p. 54-60.
174. Aguiari, P., et al., *Mechanical testing of pericardium for manufacturing prosthetic heart valves*. Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery, 2016. **22**(1): p. 72-84.
175. Nishi, C., N. Nakajima, and Y. Ikada, *In vitro evaluation of cytotoxicity of diepoxy compounds used for biomaterial modification*. J Biomed Mater Res, 1995. **29**(7): p. 829-34.

176. Augustin, C. and O. Damour, *Pharmacotoxicological applications of an equivalent dermis: three measurements of cytotoxicity*. Cell Biol Toxicol, 1995. **11**(3-4): p. 167-71.
177. Cebotari, S., et al., *Detergent Decellularization of Heart Valves for Tissue Engineering: Toxicological Effects of Residual Detergents on Human Endothelial Cells*. Artificial Organs, 2010. **34**(3): p. 206-210.
178. Martin, U., et al., *Expression of pig endogenous retrovirus by primary porcine endothelial cells and infection of human cells*. The Lancet, 1998. **352**(9129): p. 692-694.
179. Sparks, C.H., *Autogenous grafts made to order*. The Annals of thoracic surgery, 1969. **8**(2): p. 104-113.
180. Dohmen, P.M., et al., *Histological evaluation of tissue-engineered heart valves implanted in the juvenile sheep model: is there a need for in-vitro seeding?* The Journal of heart valve disease, 2006. **15**(6): p. 823-829.
181. Wilcox, H.E., et al., *Biocompatibility and recellularization potential of an acellular porcine heart valve matrix*. J Heart Valve Dis, 2005. **14**(2): p. 228-236.
182. Knight, R., et al., *Tissue engineering of cardiac valves: re-seeding of acellular porcine aortic valve matrices with human mesenchymal progenitor cells*. The journal of heart valve disease, 2005. **14**(6): p. 806-813.
183. Caamaño, S., et al., *Does sodium dodecyl sulfate wash out of detergent-treated bovine pericardium at cytotoxic concentrations?* The Journal of heart valve disease, 2009. **18**(1): p. 101-105.

9 Anhang

9.1 Materialverzeichnis

Material	Artikel	Artikelnummer	Firma mit Adresse
Perikardaufbereitung und -weiterverarbeitung			
OP-Tuch	SecuDrape 45 x 75 cm Abdecktuch	504572	Sengewald GmbH, Rohrdorf- Thansau, GER
Gaze	Gazin Mullkompressen 10 x 10 cm	18507	Lohmann & Rauscher GmbH & Co. KG, Neuwied, GER
Hautstift	Hautmarkerstift Standardspitze	PS 3150	Purple surgical International, Shenley, ENG
Eppendorf-Schraubdeckelglas mini (Formalinproben)	Mikro-Schraubröhre 1,5 ml	72.692.005	Sarstedt AG&Co., Nümbrecht, GER
Eppendorf-Schraubdeckelglas klein (Zugproben)	Röhre 15 ml, 120 x 17mm	62.554.502	Sarstedt AG&Co., Nümbrecht, GER
Eppendorf-Schraubdeckelglas groß (Aufbewahrung)	Röhre 50 ml, 115 x 28mm	62.559.001	Sarstedt AG&Co., Nümbrecht, GER
1x-Stanze (Nummerierung)	3,5 mm Acu-Punch, steril	P450	Acuderm inc., Ft. Lauderdale, USA
Hautklammergerät	Covidien Appose ULC 35 W Surgical Skin Stapler	8886803712	Covidien llc, Mansfield, MA, USA
Nahtmaterial	Ethicon Prolene 5-0	8523H	Ethicon Prolene 5-0, Johnson & Johnson Medical Medical GmbH Ethicon Germany, Norderstedt, GER
Einbettkassetten	Embedding Cassettes	9.160 844	Lab Logistics Group GmbH, Meckenheim, GER
Skalpell	Feather Disposable Scalpel No. 23	02.001.30.023	Feather Safety Razor Co., Ltd. ,Osaka, JPN
Objektträger	Thermo SCIENTIFIC, Superfrost Ultra Plus®	J3800AMNZ	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, GER
Deckgläschen	Deckgläschen 24 x 50 mm	1871	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, GER
Petrischalen quadratisch	Petrischale, quadratisch, 120 x 120 x 17 mm	688102	Greiner bio-one, Kremsmünster, AUS
Transferringpipette	Transferringpipette 3,5 ml, steril, einzeln verp.	861171001	Sarstedt GmbH, Nümbrecht, GER
El. Pipette (Pipetboy)	Pipetboy Sterilfilter	153015	Integra Bioscience GmbH, Fernwald, GER
Pipette	CELLSTAR	760180	Greiner bio-one, Kremsmünster, AUS
Mikrotomklingen	Feather Microtome Blade	02.075.00.000	Feather Safety Razor Co., Ltd., Osaka, JPN
Probenhalter REM-Probe	Stiftprobenteller für Zeiss mit 8 mm Stift	G301Z	neolab Migge GmbH, Heidelberg, GER
Klebefläche REM-Probe	PLANO-Leit-Tabs je 12 mm	G3347	neolab Migge GmbH, Heidelberg, GER
Handschuhe (blau)	Vasco® Nitril blue	9209825	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, GER
Dezellularisation			
Schraubdeckelglas	Schott Duran 1000 ml	10081920	DWK Life Sciences GmbH, Wertheim/Main, GER
Becherglas	VITLAB 3000 ml	484941	VITLAB GmbH, Grossostheim, GER
Parafilm zum Abdichten	Parafilm M Laboratory Film	WI 54956	Bemis Flexible Packaging, Neenah, WI, USA

Anhang

Geräte			
Stanze für Zugversuchsproben	Bent-Lever Cutting	DO725974	Zwick GmbH & Co. KG, Ulm, GER
Dickenmessgerät	Mitutoyo Absolute Digimatic Messuhr	ID-C112CXB	Mitutoyo Deutschland GmbH, Neuss, GER
Aquariumpumpe	EDEN 155 Typ T3 Aquarienpumpe, 4200 l/h, 230V, 80W	57231	PfG GmbH, Hörstel, GER
Mikrotom	Schlittenmikrotom HM 400 R	21031	Microm International GmbH, Walldorf, GER
Wasserbad	MEDAX WB 24, Paraffinstreckbad für Mikrotom	24900	MEDAX GmbH & Co. KG, Neumünster, GER
Ultraschallbad	Ultrasonic Cleaner USC600T	142-0090	VWR International GmbH, Darmstadt, GER
Wärmeschrank	Wärmeschrank WTC	1511530000202	Binder, Tuttlingen, GER
Zugmaschine	Zwick/Roell Z2.5	659745	Zwick GmbH & Co. KG, Ulm, GER
Sputter	Sputter Coater SCD 050	L106975	BAL-TEC GmbH, Schalksmühle, GER
Kritisch-Punkt-Trockner	Critical Point Dryer CDP 030	L701431	BAL-TEC GmbH, Schalksmühle, GER
Lichtmikroskop	Leica DMR	020-525.024	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, GER
Rasterelektronenmikroskop	Zeiss EVO LS10	10-11-80	Carl Zeiss AG, Oberkochen, GER
Immunfluoreszenzmikroskop	AxioObserver,	176045	Carl Zeiss AG, Oberkochen, GER
Schüttelschrank	Inkubationshaube TH15	6161000	Edmund Bühler GmbH, Bodelshausen, GER
Waage	KERN EW 6000-1M	027580515	Kern & Sohn GmbH, Balingen, GER
Feinwaage	KERN 770 – 13	90608875	Kern & Sohn GmbH, Balingen, GER
Detergenzien			
PBS	PBS Dulbecco w/o CA ²⁺ Instamed 9,55g/L (mit Ampuwa)	L 182-50	Biochrom GmbH, Berlin, GER
Aqua dest.	Ampuwa Spüllösung Aqua ad iniectionabilia	1080181	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, GER
Formalinlösung	Roti-Histofix 4%	P 087.3	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, GER
DAPI-Lösung	4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride C=0,1µg/ml in PBS	D9542-5MG	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, GER
SD	Sodium-Desoxycholat	30970	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, GER
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat ≥99,5%, Blotting-Grade	0183.3	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, GER
Triton X	tert-octylphenyl-polyoxyethylen	510400	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, GER
DNase	Worthington Biochemical Corporation DEOXYRIBONUCLEASE I 25MG	LS002138	Worthington Biochemical Corporation, Fisher Scientific Company L.L.C. Hampton, New Hampshire, USA
Tris-Cl	TRIS-Hydrochlorid >99%	9090.2	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, GER
Mg-Cl	Magnesiumchlorid, 98,5%, wasserfrei	KK36.1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, GER
Glycerin	Glycerin ROTIPURAN 99,5%	37832	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, GER
Glutaraldehyd für Fix-II	Glutaraldehyd, 25 Gew. %	G400-4	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, GER
Flächendesinfektion	Fermacidal D2, Desinfektionsmittel für Flächen und Gegenstände	N24040	DRÖL, Laborgeräte Reichertshausen, GER
Färbungen und Alkoholreihen			
Xylol	Roti®-Histol für die Histologie,	6640.4	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, GER
Aceton	Aceton 99,5% zur Synthese	5025.1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, GER
Ethanol 30%			Apotheke Klinikum Großhadern
Ethanol 50%			Apotheke Klinikum Großhadern
Ethanol 70%			Apotheke Klinikum Großhadern
Ethanol 96%			Apotheke Klinikum Großhadern
Ethanol 99 %			Apotheke Klinikum Großhadern
Ethanol 100%	EMSURE Ethanol absolute for analysis	200-578-6	Merck KGaA, Darmstadt, GER

Anhang

Hämalaun	Mayer's Hämalaunlösung	HX86014349	Merck KGaA, Darmstadt, GER
Eosin	Eosin Y Lösung alkoholisch	HT110116	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, GER
Weigerts Eisenhämatoxylin (je A und B zu 50%)	Weigert Stammlösung A	10225A.01000	MORPHISTO® GmbH, Frankfurt am Main, GER
	Weigert Stammlösung B	10225B.01000	MORPHISTO® GmbH, Frankfurt am Main, GER
Essigsäure 30%	Essigsäure 30%	13428.01000	MORPHISTO® GmbH, Frankfurt am Main, GER
Essigsäure 1 %	Essigsäure 30%, mit Aqua dest. verdünnt	13428.01000	MORPHISTO® GmbH, Frankfurt am Main, GER
Isopropanol (2-Propanol)	2-Propanol ROTIPURAN	6752.4	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, GER
Safron du Gateis	Safron du Gatinais	10369.01000	MORPHISTO® GmbH, Frankfurt am Main, GER
Phosphorwolframsäure 5%	Phosphorwolframsäure 5%	10324.02500	MORPHISTO® GmbH, Frankfurt am Main, GER
Brilliant-Crocein-Säurefuchsin	Brilliant-Crocein-Säurefuchsin	10156.01000	MORPHISTO® GmbH, Frankfurt am Main, GER
Natriumthiosulfat	Natriumthiosulfat 5%	10288.010	MORPHISTO® GmbH, Frankfurt am Main, GER
Eisen (III)-Chlorid-Lösung	Eisen (III)-Chlorid 2%	12019.01000	MORPHISTO® GmbH, Frankfurt am Main, GER
Alkalischer Alkohol	Alkalischer Alkohol mit Ammoniak (90/10)	10132.01000	MORPHISTO® GmbH, Frankfurt am Main, GER
Alcianblau 1%	Alcianblau 1% (pH 2,0 mit Essigsäure)	10126.01000	MORPHISTO® GmbH, Frankfurt am Main, GER
Pikrosiriusrot	Pikro-Siriusrot-Lösung	13422.01000	MORPHISTO® GmbH, Frankfurt am Main, GER
Pentachrom	Movat Pentachrom (Original)	12057	MORPHISTO® GmbH, Frankfurt am Main, GER
Sudanschwarz (für DAPI-Färbung)	Sudanschwarz B (C.I. 26150) für die Mikroskopie	0292.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, GER
Eindeckmedium LiMi	Leica CV MOUNT	14046430011	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, GER
Eindeckmedium DAPI	Ibidi Mounting Medium for fluorescence mikroskopy	50001	Ibidi GmbH, Martinsried, GER
Computerprogramme			
Axio Vision	AxioVision Rel. 4.8		Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, GER
ImageJ	Image J 1.51 f		(Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, https://imagej.nih.gov/ij/ , 1997-2016
Leica-Programm	LAS EZ Version 3.4.0		Leica Camera AG, Wetzlar, GER
REM-Programm	SmartSEM V05.04.03.00		Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, GER
Zugversuchsprogramm	TestXpert V11.02		Zwick GmbH & Co. KG, Ulm, GER

9.2 Färbeprotokolle in Einzelschritten

HE-Färbung			
Schritt	Lösung	Dauer	Vorgang
1.	Xylol	15 min	Entparaffinieren
2.	Xylol	15 min	Entparaffinieren
3.	Ethanol 100%	5 min	Wässern
4.	Ethanol 100%	5 min	Wässern
5.	Ethanol 96%	5 min	Wässern
6.	Ethanol 96%	5 min	Wässern
7.	Ethanol 70%	5 min	Wässern
8.	Ethanol 70%	5 min	Wässern
9.	Aqua dest.	10 sek fließend	Spülen
10.	Hämalaun	5 min	Färben
11.	Aqua nondest	10 sek fließend	Spülen
12.	Aqua nondest	10 min	Bläuen
13.	Ethanol 70%	3x tauchen	Klären
14.	Eosin	2 min	Färben
15.	Aqua nondest.	2x tauchen	Klären
16.	Ethanol 70%	4x tauchen	Entwässern
17.	Ethanol 96%	10x tauchen	Entwässern
18.	Ethanol 100%	5 min	Entwässern
19.	Ethanol 100%	5 min	Entwässern
20.	Xylol	3x tauchen	Entwässern
21.	Eindeckmedium		Konservieren
		87 min Gesamtdauer	

Pentachrom-Färbung			
Schritt	Lösung	Dauer	Vorgang
1.	Xylol	5 min	Entparaffinieren
2.	Xylol	5 min	Entparaffinieren
3.	Ethanol 96%	2 min	Wässern
4.	Ethanol 80%	2 min	Wässern
5.	Ethanol 70%	2 min	Wässern
6.	Ethanol 60%	2 min	Wässern
7.	Aqua dest.	2 min	Wässern
8.	Alcianblau 1%	12 min	Färben
9.	Aqua nondest.	5 min fließend	Spülen
10.	Alkalischer Alkohol	60 min	Differenzieren
11.	Aqua nondest.	10 min fließend	Färben
12.	Weigerts Eisenhämatoxylin	10 min	Kerne färben
13.	Aqua dest.	1 min	Spülen
14.	Eisen (III)-Chlorid-Lösung	3 min	Färben?
15.	Aqua dest.	1 min	Spülen
16.	Natriumthiosulfat	1 min	Färben
17.	Aqua dest.	1 min	Spülen
18.	Aqua nondest	15 min fließend	Färben
19.	Brilliant-Crocein-Säurefuchsin	10 min	Zellplasma färben
20.	Essigsäure 1%	30 sek	Differenzieren
21.	Phosphorwolframsäure 5%	20 min	Beizen
22.	Essigsäure 1%	2 min	Differenzieren
23.	Ethanol 99%	1 min	Entwässern
24.	Ethanol 99%	6 min	Gewebe färben
25.	Safron du Gateis	6 min	Gewebe färben
26.	Ethanol 99%	2 min	Entwässern
27.	Ethanol 99%	2 min	Entwässern
28.	Isopropanol (2-Propanol)	2 min	Entwässern
29.	Xylol	5 min	Entwässern
30.	Xylol	5 min	Entwässern
31.	Eindeckmedium		Konservieren
		205,5 min Gesamtdauer	

Anhang

Pikro-Siriusrot-Färbung			
Schritt	Lösung	Dauer	Vorgang
1.	Xylol	10 min	Entparaffinieren
2.	Xylol	10 min	Entparaffinieren
3.	Ethanol 96%	4 min	Wässern
4.	Ethanol 80%	4 min	Wässern
5.	Ethanol 70%	4 min	Wässern
6.	Ethanol 60%	4 min	Wässern
7.	Aqua nondest.	4 min	Wässern
8.	Weigerts Eisenhämatoxylin	8 min	Färben
9.	Aqua dest.	5 sek.	Spülen
10.	Aqua nondest	10 min	Bläuen
11.	Aqua dest.	1 min	Spülen
12.	Pikro-Siriusrot	60 min	Färben
13.	Essigsäure 30%	1 min	Spülen
14.	Essigsäure 30%	1 min	Spülen
15.	Ethanol 80%	4 min	Entwässern
16.	Ethanol 80%	4 min	Entwässern
17.	Isopropanol (2-Propanol)	4 min	Entwässern
18.	Xylol	10 min	Entwässern
19.	Xylol	10 min	Entwässern
20.	Eindeckmedium		Konservieren
153 min Gesamtdauer			

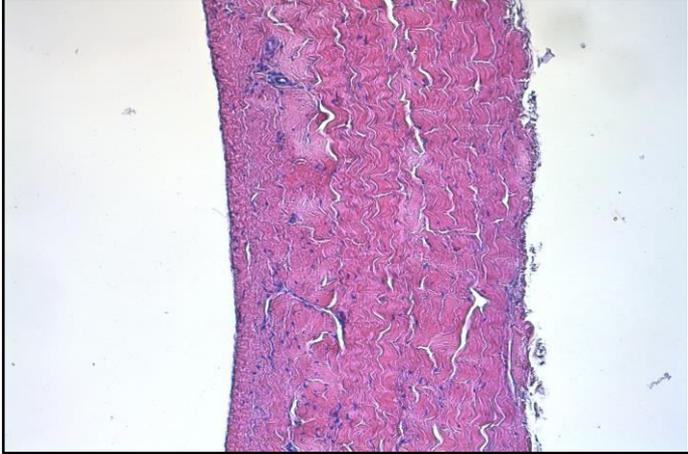
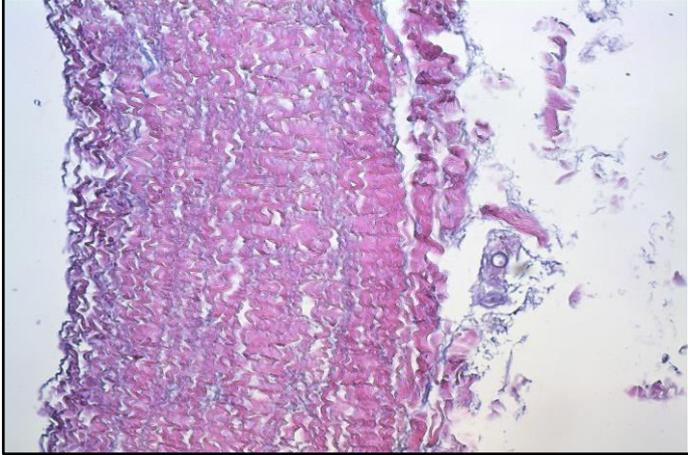
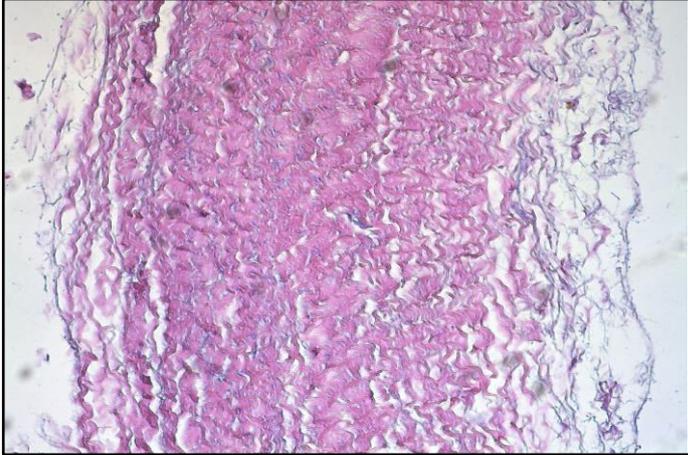
DAPI-Färbung			
Schritt	Lösung	Dauer	Vorgang
1.	Xylol	15 min	Entparaffinieren
2.	Xylol	15 min	Entparaffinieren
3.	Ethanol 100%	5 min	Wässern
4.	Ethanol 100%	5 min	Wässern
5.	Ethanol 96%	5 min	Wässern
6.	Ethanol 96%	5 min	Wässern
7.	Ethanol 70%	5 min	Wässern
8.	Ethanol 70%	5 min	Wässern
9.	Aqua dest.	3 min	Wässern
10.	Aqua dest.	3 min	Wässern
11.	PBS	3 min	Wässern
12.	PBS	3 min	Wässern
13.	DAPI-Lösung	5 min im Dunkeln	Färben
14.	PBS	5 min	Spülen
15.	PBS	5 min	Spülen
16.	Sudanschwarz	2 min	Hintergrund schwärzen
17.	Aqua dest.	5 min	Spülen
18.	Aqua dest.	5 min	Spülen
19.	Eindeckmedium		Konservieren
99 min Gesamtdauer			

Probenvorbereitung Rasterelektronenmikroskopie			
Schritt	Lösung	Dauer	Vorgang
1.	100 ml Ethanol 30%	10 min	Entwässern
2.	+ 100 ml Ethanol 50% = 200 ml	10 min	Entwässern
3.	100 ml der Lösung ablassen = 100 ml		
4.	+ 100 ml Ethanol 70% = 200 ml	10 min	Entwässern
5.	100 ml der Lösung ablassen = 100 ml		
6.	+ 100 ml Ethanol 96% = 200 ml	10 min	Entwässern
7.	100 ml der Lösung ablassen = 100 ml		
8.	+ 100 ml Ethanol 96% = 200 ml	10 min	Entwässern
9.	Transport in gekühltem (-20°C) Ethanol 100%		
50 min Gesamtdauer			

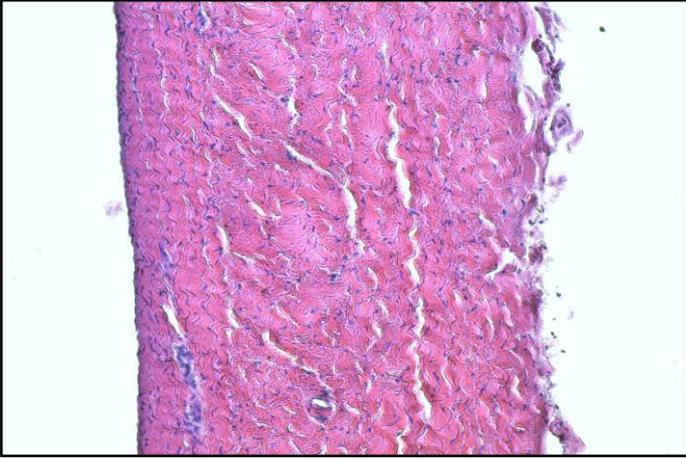
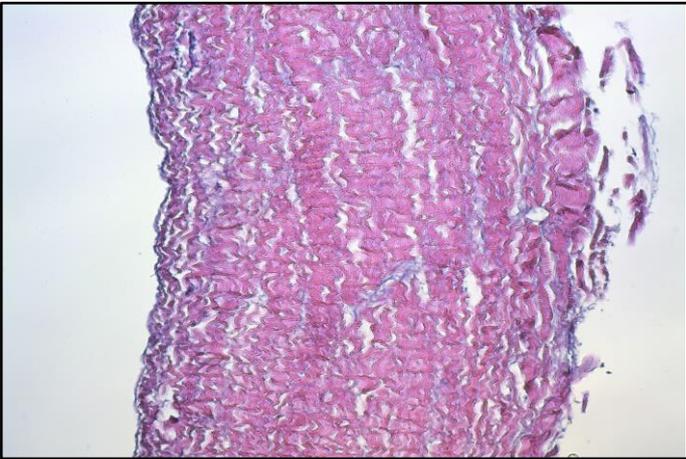
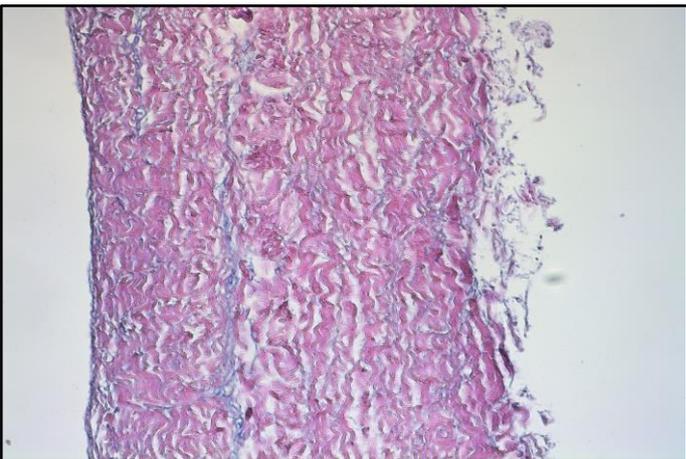
9.3 Medienzusammensetzung

Medienzusammensetzung		
Medium	Reagenzien	Dosierung
Fix-II-Lösung 500 ml	Ampuwa (Aqua dest.)	456 ml
	Glutaraldehyd (25%ig)	43,5 ml
	HCL (1N)	0,75 ml
	Na-CaCO	5,65 g
Mayer's Hämalaunlösung (1:4) 200 ml	Hämalaun	50 ml
	PBS	150 ml
DNAse-Stocklösung 50 ml (wird bei Verwendung 100-fach verdünnt)	Glycerin 50%	25 ml
	Tris-Cl (400 mM)	2,5 ml
	Mg-Cl (100 mM)	0,5 ml
	Aqua dest.	22 ml
	DNAse	Insg. 150.000 U (3000 U/ml)

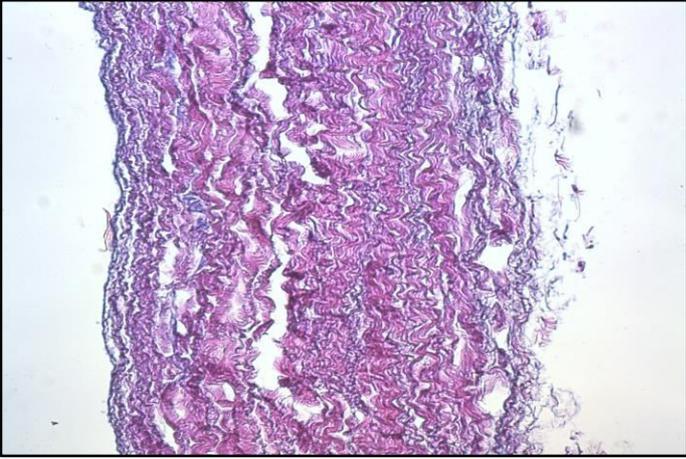
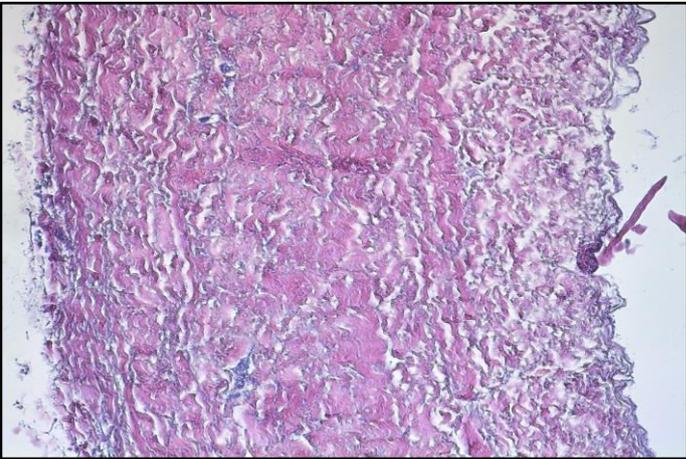
9.4 Referenzbilder

Referenzbild HE-Färbung Innenrand	Punktzahl	Erläuterung
	4 Punkte	<p>Rand durchgängig und glatt</p> <p><i>Probe: HAβ1N</i></p>
	2 Punkte	<p>Rand erkennbar aber nicht durchgängig</p> <p><i>Probe: HAγ2</i></p>
	0 Punkte	<p>Rand nicht durchgängig, Innenrand nicht identifizierbar</p> <p><i>Probe: HBβ1D</i></p>

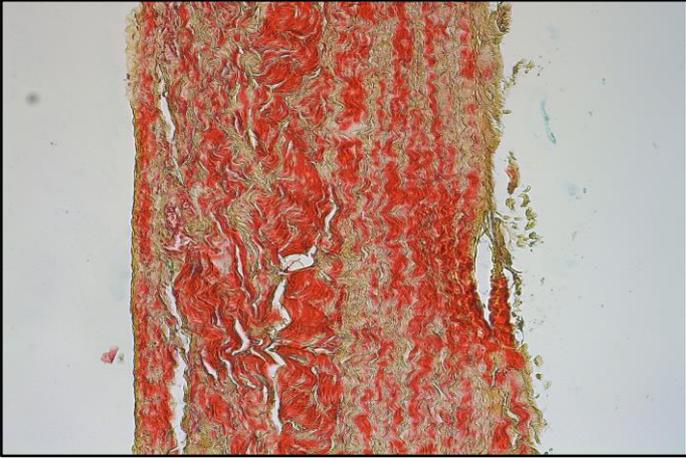
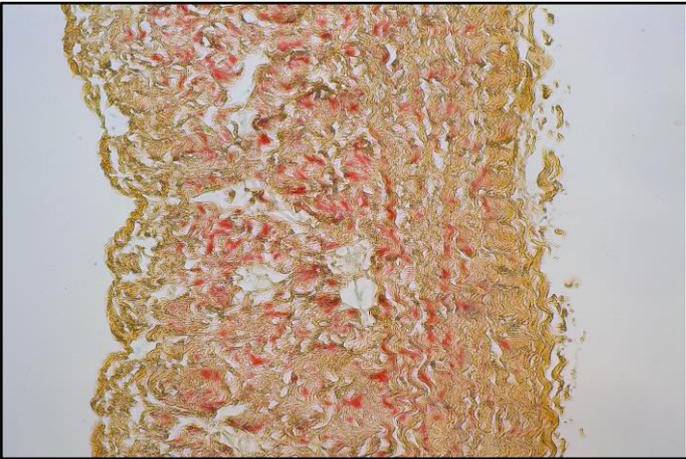
Anhang

Referenzbild HE- Färbung Gesamtstruktur	Punktzahl	Erläuterung
	<p>4 Punkte</p>	<p>Gewebestruktur gleichmäßig, Faserverlauf regelmäßig</p> <p><i>Probe: HAg1N</i></p>
	<p>3 Punkte</p>	<p>Gleichmäßige und ungleichmäßige Bereiche erkennbar, gleichmäßige Struktur überwiegend</p> <p><i>Probe: HAg1</i></p>
	<p>2 Punkte</p>	<p>gleichmäßige und ungleichmäßige Bereiche in ähnlichen Mengen erkennbar</p> <p><i>Probe:HBy3</i></p>

Anhang

Referenzbild HE-Färbung Gesamtstruktur	Punktzahl	Erläuterung
	1 Punkt	<p>Gleichmäßige und ungleichmäßige Bereiche erkennbar, ungleichmäßige Struktur überwiegend</p> <p><i>Probe: HB63D</i></p>
	0 Punkte	<p>Keinerlei bzw. kaum gleichmäßige Struktur erkennbar</p> <p><i>Probe: HB64D</i></p>

Anhang

Referenzbild Pentachrom-Färbung	Punktzahl	Erläuterung
	<p>4 Punkte</p>	<p>Rotfärbung überwiegend <i>Probe: X-HAα3N</i></p>
	<p>2 Punkte</p>	<p>Rotfärbung erkennbar, aber nicht überwiegend <i>Probe: HAγ3</i></p>
	<p>0 Punkte</p>	<p>Keinerlei bzw. kaum Rotfärbung erkennbar <i>Probe: HBδ2N</i></p>

9.5 Abbildungsverzeichnis

Abb. 4.1: Gesundes Perikard mit einer Größe von ca. 45x20 cm.....	25
Abb. 4.2: Gesundes Perikard auf der Lichtplatte	26
Abb. 4.3: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus der ersten Versuchsreihe (V).....	28
Abb. 4.4: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus der zweiten Versuchsreihe (H).....	29
Abb. 4.5: Schematische Darstellung des Dezellularisationsablaufs	30
Abb. 4.6: Aufteilung der Perikardfläche im Rahmen der zweiten Versuchsreihe.....	32
Abb. 4.7: Nachbehandlung mit DNase.....	33
Abb. 4.8: Codierung der Perikardproben	34
Abb. 4.9: Unvollständige Dezellularisation	37
Abb. 4.10: REM-Vorbereitung	38
Abb. 4.11: Vorbereitung der Färbeküvetten	39
Abb. 4.12: Zugversuchsproben.....	40
Abb. 5.1: Beispielhaftes Perikard nach Dezellularisation	42
Abb. 5.2: Schrumpfung der HB δ -Perikarde	43
Abb. 5.3: Erste Versuchsreihe (V): Dicke der Perikarde vor und nach Dezellularisation	44
Abb. 5.4: Zweite Versuchsreihe (H): Dicke der Perikarde vor und nach der Dezellularisation	45
Abb. 5.5: Dickenzunahme im Rahmen des Protokolls HB δ	45
Abb. 5.6: Das Perikard VA α 5 vor und nach Dezellularisation	46
Abb. 5.7: Erste Versuchsreihe (V): Darstellung der Eindringtiefe	47
Abb. 5.8: Erste Versuchsreihe (V): Eindringtiefe der Dezellularisationslösung.....	48
Abb. 5.9: Zweite Versuchsreihe (H): Perikard HA γ 1 vor und nach Dezellularisation.....	48
Abb. 5.10: Verbleib von Detritus (Zellschutt) im Gewebe nach Dezellularisation	49
Abb. 5.11: Zweite Versuchsreihe (H): Eindringtiefe nach Dezellularisation.....	50
Abb. 5.12: Zweite Versuchsreihe (H): Eindringtiefe nach DNase-Behandlung	51
Abb. 5.13: Erste Versuchsreihe (V): HE-Score der Perikarde vor und nach der Dezellularisation	52
Abb. 5.14: Zweite Versuchsreihe (H): HE-Score der Perikarde vor und nach Dezellularisation	53
Abb. 5.15: Perikard HA α 4 vor und nach Dezellularisation	53
Abb. 5.16: Perikard HB δ 1 vor und nach Dezellularisation	54
Abb. 5.17: Typische Kollagenverteilung in einer Nativprobe bei 100-facher Vergrößerung	55
Abb. 5.18: Erste Versuchsreihe (V): Flächenbezogene Helligkeit des Gelbanteils	56
Abb. 5.19: Zweite Versuchsreihe (H): Flächenbezogene Helligkeit des Gelbanteils	57
Abb. 5.20: Perikard HA α 2 im nativen, dezellularisierten und nachbehandelten Zustand.....	58
Abb. 5.21: Perikard HA β 2 im nativen, dezellularisierten und nachbehandelten Zustand	58
Abb. 5.22: Erste (V) und zweite (H) Versuchsreihe	59
Abb. 5.23: Vergleich von Innen- und Außenseite des Perikards	60
Abb. 5.24: Innenseite des Perikards VA α 5	61
Abb. 5.25: Innenseite des Perikards HA α 4	61
Abb. 5.26: Außenseite des Perikards HB δ 4	62
Abb. 5.27: Innenseite des Perikards HB δ 3	63
Abb. 5.28: Aufnahme der Innenseite der Gewebeprobe VBy2 mit löchriger Oberfläche	63
Abb. 5.29: Das Perikard VA α 4N nach Pentachrom-Färbung.....	64
Abb. 5.30: Zweite Versuchsreihe (H): Zugfestigkeit (F_{\max}).....	65
Abb. 5.31: Zweite Versuchsreihe (H): Zugfestigkeit (F_{\max}).....	66

10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die die Durchführung und Vollendung meiner Promotion ermöglicht haben:

Prof. Dr. Christian Hagl, meinem Doktorvater, für die Möglichkeit, im Labor für Tissue Engineering der LMU München promovieren zu dürfen.

Dipl. -ing Fabian König, meinem Betreuer, für die anspruchsvolle und interessante Promotionsthematik, für fortwährende Unterstützung und konstruktive Kritik, für ein stets offenes Ohr und eine beispiellose Hilfsbereitschaft.

Barbara Steinl und Bettina Wimmer, für ihren besonderen Sachverstand, viele Hilfestellungen in schwierigen Situationen und vor allem ihre Geduld.

Meiner Arbeitsgruppe, für die angenehme und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre.

Der Attenberger Fleisch Verwaltungs GmbH für die Kooperation und die Bereitstellung des Materials.

Dem Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung der LMU München für ihre Hilfe bei der Verarbeitung der Gewebeproben.

Meinen Freunden, und ganz besonders deren Ohren und Schultern in Zeiten, in denen es mal nicht lief, wie es sollte.

Meiner Familie und ganz besonders meinen Eltern, für ihr kritisches Urteil und ihren messerscharfen Verstand sowie für lange, fruchtbare Gespräche und ihre unermessliche Geduld. Danke, dass ich sowohl während des Studiums als auch während der Doktorarbeit jederzeit auf eure volle Unterstützung bauen konnte.



LUDWIG-
MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

Promotionsbüro
Medizinische Fakultät



Eidesstattliche Versicherung

Menold, Paula

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

**Optimierung bestehender Dezellularisationsprotokolle: Effizienzerhöhung durch
Feinabstimmung von Detergenzien, Strömungsrichtung und Ultraschall**

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.

München, den 04.07.2022

Ort, Datum

Paula Menold

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand