

AUS DER HERZCHIRURGISCHEN KLINIK UND POLIKLINIK
KLINIK DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN
DIREKTOR: PROF. DR. MED. CHRISTIAN HAGL



**SYSTEMATISCHE OPTIMIERUNG BESTEHENDER DEZELLULARISIERUNGSMETHODEN
VON PULMONALARTERIEN MITHILFE VON PHYSIKALISCHEN, PROZEDURALEN UND
ENZYMATISCHEN MODIFIKATIONEN**

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

Vorgelegt von
SIMONE VERENA MÜLLER

aus
LÜBECK
2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Christian Hagl
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. Christoph Schmitz Priv. Doz. Dr. med. Barbara Rantner
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. Nikolaus Thierfelder Dipl.-Ing. Fabian König M. Sc. Maximilian Grab
Dekan:	Prof. Dr. med. Thomas Gudermann
Tag der mündlichen Prüfung:	24.11.2022

INHALTSVERZEICHNIS

Meiner Familie

1. INHALTSVERZEICHNIS

1.	INHALTSVERZEICHNIS	1
2.	KURZZUSAMMENFASSUNG	4
3.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	6
4.	EINLEITUNG	7
4.1	Anatomie und Physiologie des kardiovaskulären Systems	7
4.2	Pathologie von Herzklappenerkrankungen	10
4.3	Gewebeersatz in der Herzchirurgie	11
4.4	Tissue Engineering	13
4.4.1	Grundlagen des Tissue Engineerings	13
4.4.2	Dezellularisation	14
4.4.3	Dezellularisierungsmethoden	15
4.4.4	Qualitätssicherung in der Gewebedezellularisation	20
4.4.5	Anwendung der DZ in der Herzchirurgie	21
4.5	Ziel der Arbeit	22
5.	MATERIAL UND METHODEN	24
5.1	Materialvorbereitung	24
5.2	Auswahl der Dezellularisationsprotokolle	25
5.2.1	Protokoll 1: SDS/SD	26
5.2.2	Protokoll 2: SD	26
5.2.3	Protokoll 3: TX/SDS	26
5.2.4	Protokoll 4: TX/SD	27
5.3	Durchführung der publizierten Prozeduren	28
5.4	Erste Modifikation der Verfahren	29
5.5	Zweite Modifikation der Verfahren	31
5.6	Probenentnahme und Konservierung	33
5.7	Auswertung	35
5.7.1	Makroskopische Beurteilung der Arterien	35
5.7.2	Vorbereitungen für die Histologie	35
5.7.3	Entparaffinierung	36
5.7.4	DAPI Fluoreszenz-Färbung	37
5.7.5	Hämatoxylin & Eosin Färbung	39
5.7.6	Movat's Pentachrom Färbung	41

INHALTSVERZEICHNIS

5.7.7	Pikro-Siriusrot-Färbung	43
5.7.8	Rasterelektronenmikroskopie	45
5.7.9	DNA-Quantifikation	47
5.7.10	Glykosaminoglykan-Quantifikation	48
5.7.11	Zugversuche	49
5.7.12	Statistische Auswertung	51
6.	ERGEBNISSE	53
6.1	Makroskopische Beurteilung der Arterien	53
		54
6.2	DAPI Fluoreszenz Färbung	55
6.2.1	Nativproben	55
6.2.2	Originalprotokolle	55
6.2.3	Erste Modifikation	57
6.2.4	Zweite Modifikation	59
6.3	Hämatoxylin-Eosin Färbung	63
6.3.1	Nativproben	63
6.3.2	Originalprotokolle	63
6.3.3	Erste Modifikation	65
6.3.4	Zweite Modifikation	66
6.4	Movat's Pentachrom Färbung	69
6.4.1	Nativproben	69
6.4.2	Originalprotokolle	70
6.4.3	Erste Modifikation	71
6.4.4	Zweite Modifikation	73
6.5	Pikro-Siriusrot-Färbung	75
6.5.1	Nativproben	75
6.5.2	Originalprotokolle	76
6.5.3	Erste Modifikation	77
6.5.4	Zweite Modifikation	79
6.6	Rasterelektronenmikroskopie	81
6.6.1	Nativproben	81
6.6.2	Originalprotokolle	82
6.6.3	Erste Modifikation	84
6.6.4	Zweite Modifikation	86
6.7	DNA-Quantifikation	88
6.8	Quantifikationen der Glykosaminoglykane	90

INHALTSVERZEICHNIS

6.9	Zugversuche	92
7.	DISKUSSION	95
8.	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	110
9.	LITERATURVERZEICHNIS	112
10.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	126
11.	TABELLENVERZEICHNIS	128
12.	ANHANG	129
12.1	Vorausgehende Arbeiten	129
12.2	Finale modifizierte Protokolle	137
12.3	Materialien	139
13.	VORVERÖFFENTLICHUNGEN	145
14.	DANKSAGUNG	146
15.	AFFIDAVIT	148
16.	LEBENS LAUF	FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.

2. KURZZUSAMMENFASSUNG

Das Vorkommen von kardiovaskulären Erkrankungen und der damit einhergehende Bedarf an Prothesen für Arterien und Herzklappen ist in den vergangenen Jahrzehnten deutlich gestiegen. Zur Verbesserung der klassischen künstlichen und biologischen Prothesen in der Herzchirurgie wird zunehmend die Methode des „Tissue engineering“ angewendet. Dies ist die künstliche Erstellung oder Modifikation von biologischem Gewebe zur Herstellung einer langlebigen Prothese. Ein möglicher Schritt ist dabei eine Entfernung aller zellulären Komponenten und Antigene von biologischen Geweben mithilfe einer Dezellularisation (DZ). Die vollständige DZ von Herzklappen und Arterien mit gleichzeitiger Erhaltung des Gewebes stellt dabei noch eine Herausforderung dar. Im Rahmen dieser Studie wurden deshalb publizierte DZ-Verfahren reproduziert und auf ihre Wirksamkeit getestet. Daraufhin wurden ausgewählte physikalische und prozedurale Methoden zur Optimierung der DZ angewandt und die publizierten Protokolle systematisch verbessert, mit dem Ziel die DZ von vaskulärem Gewebe insgesamt zu verbessern.

Insgesamt fand eine DZ von 60 porzinen Pulmonalarterien mithilfe vier verschiedener in der Literatur publizierter, detergenzien-basierter Protokolle statt, welche nach Begutachtung modifiziert wurden. Zu den verbessernden Techniken gehörte die Verwendung von Ultraschall, Temperaturveränderungen und die zyklische DZ mittels intermittierenden Waschvorgängen. Zusätzlich dazu wurden zwei neue DZ-Methoden miteinander verglichen. Zum einen erfolgte die DZ der Arterien in einem kontinuierlichen Fluss der Detergenzienlösung, zum anderen wurden die Proben mit einer perfusions-basierten Technik intraluminal mit der Flüssigkeit durchströmt. Zum Abschluss der Modifikationen schloss sich zusätzlich eine Enzymbehandlung mit DNase und α -Galaktosidase an. Um die Zellfreiheit der Arterien nachzuweisen erfolgte eine Färbung des Gewebes mit 4',6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI) und Hämatoxylin-Eosin (H&E). Die Extrazellulärmatrix (EZM), die das Grundgerüst des Gewebes bildet, konnte in den Färbungen Movat's Pentachrom, Pikro-Siriusrot sowie der Rasterelektronenmikroskopie beurteilt werden. Außerdem stellte die quantitative Messung der verbleibenden DNA und Glykosaminoglykane den Erfolg der

Dezellularisation und den Erhalt der EZM dar. Abschließend wurden Zugversuche durchgeführt, um die Elastizität und Zugfestigkeit des Gewebes zu testen.

Die Anwendung der publizierten Protokolle zeigte, dass keines der Verfahren eine vollständige Zellfreiheit des Gewebes erzielen konnte. Dies bewies die schwierige Reproduzierbarkeit dieser Verfahren und die Notwendigkeit von Optimierungen. Die anschließend genutzten physikalischen und prozeduralen Methoden, wie zyklische und zirkulierende DZ, Ultraschallbehandlung und Temperaturveränderungen, führten in allen verwendeten Protokollen schließlich zu einer signifikant verbesserten Zellfreiheit mit gleichzeitiger Erhaltung des Gewebes. Der Erfolg der DZ war insbesondere nach der Enzymbehandlung sichtbar, bei der sich eine höchst signifikante Zunahme der Eindringtiefe der Detergenzien um durchschnittlich $76,10 \pm 20,21 \%$ ($p < 0,001$) im Vergleich zum Originalprotokoll zeigte. Dies bestätigte auch die deutliche Reduktion des DNA-Gehaltes um $63,91 \pm 16,11 \%$ ($p < 0,001$) im Vergleich zur Nativprobe. Im direkten Vergleich war die kontinuierliche zirkulierende Strömung der DZ-Lösung der perfusionsbasierten DZ überlegen. Trotz verbesserter Effektivität konnte die EZM in den meisten Proben mit den Modifikationen gut erhalten bleiben. In manchen Proben zeigte sich allerdings auch eine geringe Reduktion der Grundsubstanz, des Kollagen Typ III sowie des Glykosaminoglykan-Gehaltes, weshalb von einer gewissen Schädigung der EZM durch die DZ ausgegangen werden muss. Grundsätzlich verminderte sich allerdings die Aggressivität der Protokolle durch die Reduktion der Einwirkzeit und Konzentrationen der Detergenzien schrittweise, wodurch die EZM letztendlich besser erhalten blieb.

Zusammenfassend demonstriert diese Studie die universelle Anwendbarkeit der neu etablierten Methoden, besonders die kontinuierliche Strömung der Detergenzien, Ultraschallbehandlung und intermittierende Waschzyklen, auf unterschiedliche DZ-Verfahren. In allen Modifikationen konnten Verbesserungen der Originalprozedur bewiesen werden. Die Kombination aus Detergenzien und Enzymen im kontinuierlichen Fluss mit intermittierenden Ultraschall-Behandlungen und Waschzyklen kann besonders empfohlen werden. So könnte die Erstellung von Prothesen für Arterien und Herzklappen möglich sein, die die biologischen und mechanischen Eigenschaften des kardiovaskulären Systems beibehalten.

3. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

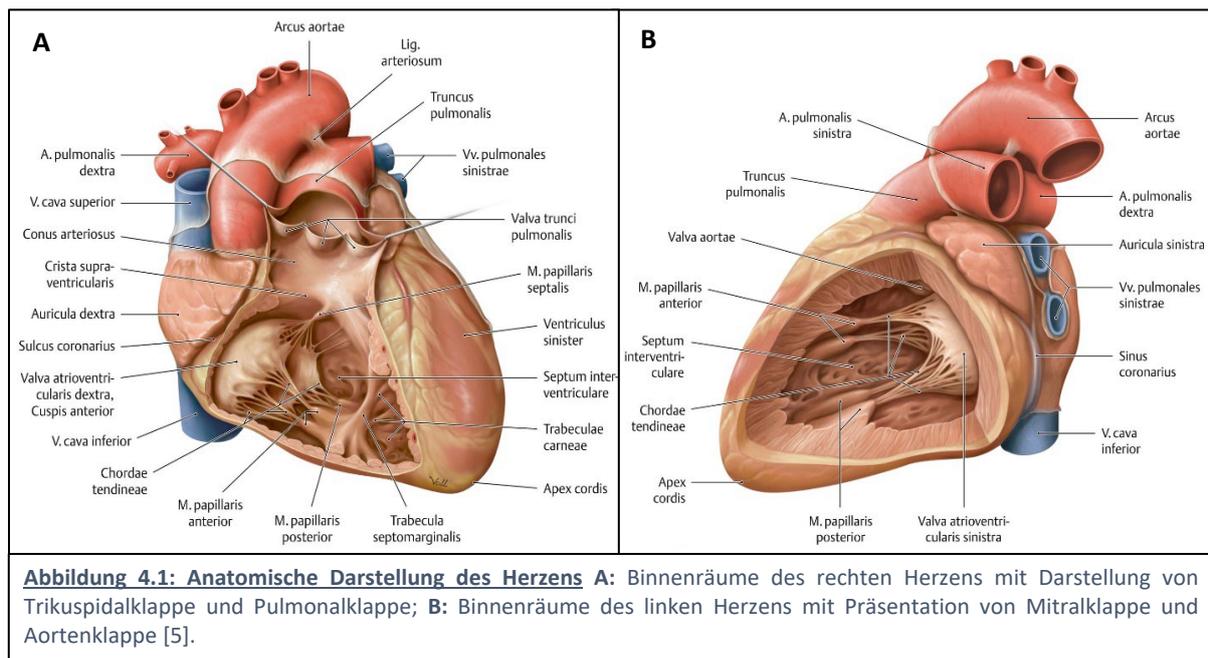
ABKÜRZUNG	BEDEUTUNG
Aqua dest.	Aqua destillata
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
DB	Detergenzienbehandlung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige DNA
DZ	Dezellularisation
EB	Enzymbehandlung
EZM	Extrazellulärmatrix
GAG	Glykosaminoglykane
H&E	Hämatoxylin-Eosin
HK	Herzklappen
MP	Modifiziertes Protokoll
MPC	Movat's-Pentachrom
NaCl	Natriumchlorid-Lösung
Nr.	Nummer
OP	Originalprotokoll
PA	Pulmonalarterie
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PS	Pikro-Siriusrot
REM	Rasterelektronenmikroskop
RT	Raumtemperatur
SD	Natriumdeoxycholat
SD	Protokoll 2
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS/SD	Protokoll 1
TE	Tissue Engineering
TX/SD	Protokoll 4
TX/SDS	Protokoll 3
v.a.	vor allem
α-Gal	α-Galaktosidase

Die Benennung der Einheiten erfolgte gemäß des SI- Systems.

4. EINLEITUNG

4.1 Anatomie und Physiologie des kardiovaskulären Systems

Das menschliche Herz lässt sich in vier Bereiche, den rechten und linken Vorhof (Atrium), sowie die rechte und linke Kammer (Ventrikel) aufteilen. Das Blut fließt nacheinander durch diese Abschnitte und passiert dabei vier Herzklappen. Davon sitzen zwei am Übergang zwischen Kammer und Vorhof und zwei zwischen Ventrikel und Körper- bzw. Lungenkreislauf und verbinden so die zwei großen Kreislaufsysteme des Körpers. Zwischen Atrium und Ventrikel befinden sich die Segelklappen: Auf der rechten Seite des Herzens befindet sich die Trikuspidalklappe, welche aus drei Segeln aufgebaut ist und auf der linken Seite die aus zwei Segeln bestehende Mitralklappe. Die Segel lagern sich mit der Kontraktion der Ventrikel aufgrund des Blutstroms aneinander an und verhindern so den Rückfluss von Blut in die Vorhöfe während der Systole. Die Taschenklappen bilden den Übergang zu den Blutkreisläufen. Dabei sitzt die Pulmonalklappe zwischen rechtem Ventrikel und der Pulmonalarterie und die Aortenklappe am Übergang vom linken Ventrikel zur Aorta. Die Taschenklappen bestehen aus drei halbmondförmigen Taschen und vermeiden einen Rückstrom des Blutes während der Diastole des Herzens. [1, 2, 3, 4]



EINLEITUNG

Alle Klappen sind von Bindegewebe und Faserringen (Herzskelett) umgeben und werden somit stabilisiert. Des Weiteren wird so eine Isolationsschicht gebildet, mit der sich die elektrischen Reize kontrolliert nur über das Leitungssystem des Herzens ausbreiten können. [3]

Histologisch besteht das Herz hauptsächlich aus Kardiomyozyten und Bindegewebe. Das Herzskelett wird aus dichtem Bindegewebe und elastischen Fasern gebildet [1, 6]. Alle anderen Abschnitte des Herzens und der Gefäße haben einen dreischichtigen Wandaufbau gemein. Die Tunica intima, welche am Herzen das Endokard darstellt, die Tunica media, welche dem Myokard entspricht und die Tunica adventitia/ externa, das Epikard [6, 7]. Die Tunica intima oder das Endokard ist eine Schicht aus Endothel und Bindegewebe und kleidet alle Herzinnenflächen und Arterien aus. Die Intima besteht aus einer Endothelschicht, bei der flache Endothelzellen auf der Basallamina eine Barriere bilden und somit die Immigration von Blutzellen regulieren und Thromben verhindern. Eine glatte einschichtige Lage aus Endothelzellen an der Innenseite soll für einen reibungsarmen Blutfluss sorgen. Das Stratum subendotheliale enthält kaum Zellen und besteht vor allem Extrazellulärmatrix. Die Membrana elastica interna ist die dritte Schicht der Intima und hauptsächlich von elastischen Fasern durchzogen. [2, 6] Das Endokard enthält keine Gefäße und wird nur vom umgebenden Blutfluss und den subendothelialen Gefäßen versorgt. Das Myokard bildet den dicken Herzmuskel und auch an den Arterien ist die Tunica media die breiteste Schicht der Wand. Sie wird aus den Herzmuskelzellen, den Myozyten gebildet, welche sich in zusammenhängenden Ketten durch Ventrikel und Vorhöfe ziehen [6]. Sie sind für die Umsetzung der elektrischen Erregungen und die koordinierte Muskelkontraktion zuständig [8]. Eine Besonderheit der herznahen Gefäße ist ein vermehrtes Vorkommen von elastischen Fasern in der Tunica media [9, 10]. Dadurch entsteht die „Windkesselfunktion“ dieser Arterien, welche die von Herzen erzeugte Energie während der Systole speichert und die Druckunterschiede im Kreislauf zwischen Systole und Diastole verringert [10]. Am Übergang zur Tunica adventitia oder dem Epikard befindet sich die Membrana elastica externa, welche auch aufgrund einer hohen Menge an elastischen Fasern zur besonderen Elastizität der großen Arterien und des Myokards führt. Das Epikard/Die Tunica adventitia bildet die äußerste Schicht und bereits einen Teil des Perikards. Das dort vorliegende einschichtige Plattenepithel sorgt für eine reibungsarme Oberfläche [6,

9]. Sonst besteht das Epikard/ die Adventitia aus dichten elastischen und kollagenen Fasern, durchzogen von Blutgefäßen und vegetativen Nervenfasern. Durch sie werden die Arterien in ihrer Umgebung fixiert [6].

Die Herzklappen werden durch Duplikaturen des Endokards ohne zusätzliches Gewebe oder Gefäße gebildet, wodurch sie sehr dünn und zart sind [3]. Ihr Aufbau kann weiter auf drei Schichten aufgeteilt werden: Die Spongiosa, die Fibrosa und die Ventrikularis. Die Spongiosa ist auf der Seite des Atriums oder der Arterie und ist charakterisiert durch einen hohen Anteil an Proteoglykanen (Glykosaminoglykanen). Die Fibrosa ist ein Teil des Herzskeletts und deshalb bestehend aus dichtem Kollagen. Die Ventrikularis ist jeweils auf der Seite des Ventrikels und enthält elastische Fasern und eine Endothelschicht [3, 11]. Sie werden direkt durch den vorbeifließenden Blutstrom mit Nährstoffen versorgt. Aufgrund ihrer sonst eingeschränkten Versorgung von Blut, können Erreger wie Bakterien jedoch nur langsam abtransportiert werden und Immunzellen schlecht einwandern [12]. Dies begünstigt die Entwicklung von Entzündungen der Herzinnenhaut, sogenannten Endokarditiden, die zu Klappenschädigungen führen können [13].

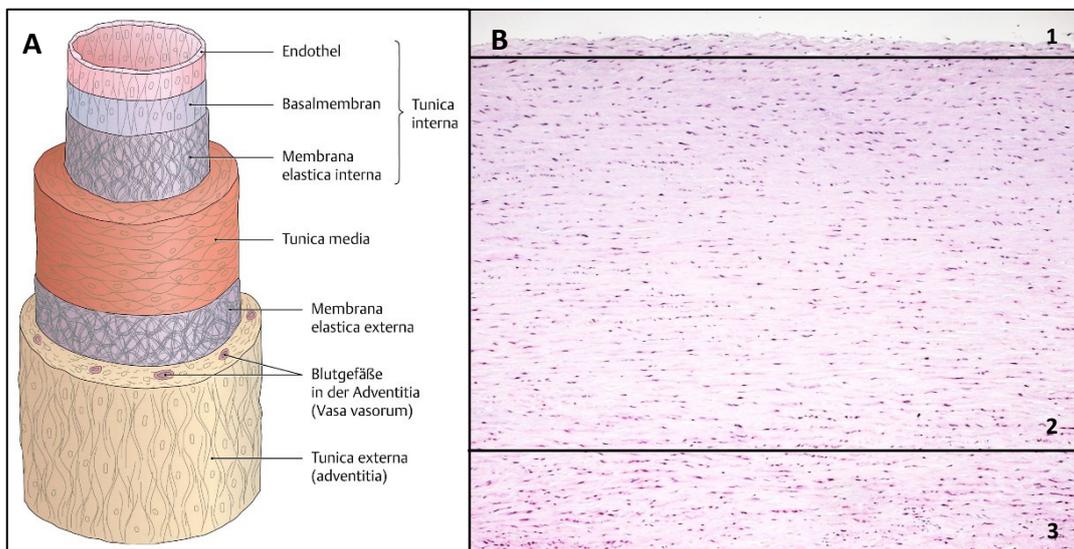


Abbildung 4.2: Aufbau und Histologie der Arterien A: Schematischer Aufbau einer Arterie: Hier zeigt sich die beschriebene Dreischichtung der Arterienwand am Beispiel einer Arterie vom muskulären Typ. Die Dreischichtung und unterschiedliche Dicke der einzelnen Schichten bewirkt die besonderen biomechanischen Eigenschaften der Arterien [14]. B: Darstellung einer Aortenwand in der H&E-Färbung (©PathoPic): In diesem Bereich dominiert besonders die breite Tunica Media das Bild. Zwischen den regelmäßig angeordneten elastischen Lamellen befinden sich eosinophile glatte Muskelzellen. Die Intima (1), mit einem Saum von flachen Endothelzellen an der luminalen Seite der Arterie, ist sehr schmal [15]. Die Adventitia (3), am unteren Rand des Bildes, zeigt eine Zunahme von Bindegewebe und weniger breite Muskelzellen, wodurch die dunklen Zellkerne dichter beieinander sind.

4.2 Pathologie von Herzklappenerkrankungen

Aufgrund der hohen Beanspruchung und dem komplexen Aufbau dieser Gewebe sind Defekte an den Herzklappen (HK) oder herznahen Gefäßen häufig [16]. Sie können angeboren oder erworben sein, wobei die erworbenen Herzklappenerkrankungen eine höhere Prävalenz haben [17]. Herzklappendefekte lassen sich weiter in Stenosen oder Insuffizienzen unterteilen. Stenosen bezeichnen eine unvollständige Öffnung der Klappen, welche durch einen verminderten Strom des Blutes zu einem erhöhten prävalvulären Druck führen [18]. Sie entstehen meist durch entzündliche Erkrankungen oder degenerative Veränderungen wie Kalzifizierungen [19]. Eine Besonderheit stellt dabei die Pulmonalklappenstenose dar, die meist angeboren ist, beispielsweise im Rahmen einer Fallot'schen Tetralogie. Sie macht etwa 6-7 % der kindlichen Herzfehler aus [20].

Insuffizienzen hingegen führen zu einem inkompletten Verschluss der Klappe, der einen ständigen Rückfluss und erhöhte Volumenbelastung prävalvulär zur Folge hat [18]. Ausgelöst werden diese meist durch Endokarditiden oder strukturelle Bindegewebserkrankungen [12]. Dadurch werden die HK-Segel steifer, kleiner oder instabiler und können somit nicht mehr vollständig schließen [19, 21]. Oft zeigen sich auch Kombinationen aus Stenose und Insuffizienz an einer HK [22].

Viele Herzklappendefekte sind asymptomatisch und bedürfen oft keiner Therapie [23]. Besteht allerdings, auch bei asymptomatischen Patienten, die Indikation zur Behandlung, ist die beste Methode meist die Reparatur der Klappe [24]. Beispielsweise ist im Falle einer Mitralklappeninsuffizienz eine Rekonstruktion mittels Anuloplastie oder auch minimal-invasiv mittels „MitraClip“ möglich [25, 26]. Wenn eine Reparatur jedoch nicht machbar ist, kann die effektivste Methode der Ersatz durch eine Prothese sein [19, 24]. Insgesamt steigt die Anzahl der HK-Eingriffe jährlich an [16]. 2019 wurden insgesamt 32.291 Herzklappen implantiert. 7.905 Klappen davon wurden konventionell und die restlichen Prothesen minimalinvasiv mittels Katheter eingesetzt [27].

Abgesehen von Prothesen von HK ist auch der Ersatz von Gefäßen in der Herzchirurgie häufig. Ein Austausch von Gefäßen kann aufgrund von Aneurysmata oder Dissektionen, die durch Degenerationen, Bindegewebsschwächen und Verkalkungen entstehen, nötig

werden. Bei Stenosen oder Thrombosen werden Gefäßprothesen oft als Bypass, also als Umgehungskreislauf, eingesetzt. [28, 29]

4.3 Gewebeersatz in der Herzchirurgie

Die Auswahl der Prothesen, insbesondere der optimalen Materialien, ist komplex [24]. Ersatzmöglichkeiten für Gefäße und Herzklappen lassen sich beispielsweise mit synthetischen Materialien erstellen. Seit der Implantation der ersten synthetischen HK in den frühen 1950er Jahren wurden viele Materialien untersucht. Dabei sind Dacron und Polyethylen die erfolgreichsten und werden seither weltweit am meisten eingesetzt [30]. Der mechanische Herzklappenersatz zeichnet sich durch eine lange Haltbarkeit aus und wird deshalb bei jüngeren Patienten bevorzugt [31]. Außerdem bringen große Variation in den Ausführungen der Prothesen, gute Verfügbarkeit und niedrige Kosten weitere Vorteile [32]. Allerdings zeigt sich synthetisches Material auch hoch thrombogen, so dass nach der Implantation eine lebenslange Antikoagulation notwendig ist [19, 33, 34]. Eine weitere Komplikation ist die Protheseninfektion in Form einer Endokarditis, welche bei circa 20,1 % der Patienten weltweit auftritt [35]. Mit einer insgesamten Mortalität von 22,8 %, insbesondere bei älteren und vorerkrankten Patienten, ist diese Komplikation besonders schwerwiegend und muss schnellstmöglich therapiert werden [35]. Aufgrund der erschwerten medikamentösen Behandlung von Bakterien auf Implantaten wird in circa der Hälfte der Patienten (48.7 %) einen Ersatz notwendig [36]. Des Weiteren haben mechanische Prothesen nicht die biomechanischen Eigenschaften der nativen biologischen Gewebe, sodass ihre Anpassungsfähigkeit an die komplexe mechanische Beanspruchung geringer als die der nativen Herzklappen ist [37–40].

Die Alternative zu den mechanischen Prothesen ist der biologische HK-Ersatz. Hier unterscheidet man zwischen Auto-, Homo- und Xenografts. Autografts sind vom selben Patienten stammende Prothesen, Homografts entstammen anderen humanen Spendern und Xenografts bestehen aus tierischem Material, welche in der Herzchirurgie meist vom Rind (bovin) oder vom Schwein (porcin) stammen [41]. Autografts sind, wenn möglich, die beste Option des Herzklappenersatzes [42]. Ein großer Vorteil ist die fehlende

Immunantwort und die vergleichbaren hämodynamischen Eigenschaften [43]. Allerdings muss das entsprechende Material beim Patienten vorhanden und gut zugänglich sein. Bei dem Ersatz von HK lassen sich Autografts nur in Ausnahmesituationen, wie beispielsweise bei der Ross Operation, nutzen. Hier wird eine defekte Aortenklappe durch die Pulmonalarterienwurzel des Patienten ersetzt und an deren Position eine Herzklappe eines menschlichen Spenders oder tierischen Ursprungs eingesetzt. Diese Operation ist aufgrund guter Langzeitergebnisse besonders bei Kindern und jungen Patienten sinnvoll (Reoperationsfreiheit des Autografts nach 20 Jahren 80 % und des Homografts 92 %) [42, 44, 45].

Homografts von humanen Spendern sind aufgrund einer geringen Spendebereitschaft limitiert und in ihrer Qualität divergent. Sie können trotz vorheriger Entfernung der Zellen und Antigene eine Immunreaktion auslösen und zusätzlich Infektionen übertragen. Ihre Anwendung in der Herzchirurgie ist deshalb nur sehr begrenzt. [46, 47, 48]

Xenografts von Rindern oder Schweinen werden hingegen häufig eingesetzt [49, 50]. Zur Verringerung der Immunantwort auf die HK werden diese vorher mit Glutaraldehyd fixiert, sterilisiert und antigene Strukturen denaturiert [51]. Allerdings lässt sich in Studien in kommerziell verfügbaren Klappen oft noch immunaktives Gewebe nachweisen [51]. Dies resultiert in einer erhöhten Einwanderung von Entzündungszellen, Neovaskularisation und vermehrte Kollagenbildung, wodurch eine verstärkte Kalzifizierung und verfrühte Degeneration entstehen [51]. Aus diesem Grund haben diese biologischen Materialien nur eine begrenzte Haltbarkeit und müssen meist nach 15-20 Jahren ausgetauscht werden [49, 52]. Die Vorteile der biologischen Klappen sind insbesondere ihre geringe Thrombogenität, weshalb Trikuspidal- und Mitralklappenersätze nur einer vorübergehenden Antikoagulation für drei Monate und Aortenklappen nur einer Thrombozytenaggregationshemmung mit Aspirin 100 mg/Tag bedürfen [53]. Biologische Prothesen behalten ihre dynamischen und biomechanischen Eigenschaften, welche im Fall von porzinem und bovinem Material besonders passend und vergleichbar mit humanem Gewebe sind [55].

Die Wahl des geeigneten Herzklappenersatzes hängt hauptsächlich von Alter und Vorerkrankungen der Patienten ab [54, 56]. Bei der Implantation von

Herzklappenprothesen in Kindern und Jugendlichen zeigen sich oft kürzere Haltbarkeiten als in Erwachsenen [47]. Dies ist meist durch die höhere Aktivität der Immunsystems in jungen Jahren begründet [57]. Junge Patienten profitieren deshalb beispielsweise von synthetischen Prothesen, da sie eine längere Lebensdauer haben, während Frauen mit noch bestehendem Kinderwunsch zur Vermeidung einer Antikoagulation während der Schwangerschaft eine biologische Klappe erhalten sollten [50, 58].

4.4 Tissue Engineering

4.4.1 Grundlagen des Tissue Engineerings

Das Tissue Engineering (TE) bezeichnet im Allgemeinen die künstliche Herstellung oder Modifikation von biologischem Gewebe [59, 60, 61]. Dafür wird zuerst ein strukturelles Gerüst erstellt, welches mit lebenden Zellen besiedelt oder direkt implantiert werden kann [62]. Den Beginn prägten Green et al. in den 1970er Jahren mit der Herstellung von neuem Knorpelgewebe in der Orthopädie durch Besiedelung von Knochengewebe mit Chondrozyten [59, 60, 63]. Erst zehn Jahre später wurden die ersten Versuche des Tissue Engineerings in der Herzchirurgie unternommen [64]. Eine der ersten Entwicklungen war die Besiedelung von Gefäßprothesen mit Endothelzellen [64, 65]. Heute werden weiterhin Gefäß- oder Herzklappenprothesen mittels TE erstellt und die Verfahren immer weiter optimiert [62]. Dabei unterscheidet man ebenso Prothesen aus synthetischem Material von modifiziertem biologischen von Schwein oder Rind [60]. Bei der Verwendung von biologischem Gewebe im Tissue Engineering ist ein möglicher Schritt die Dezellularisierung (DZ), bei der alle sowohl zelluläre Komponenten und Proteine entfernt werden, die eine Immunreaktion im Empfänger auslösen könnten. Des Weiteren gibt es zwei grundlegend unterschiedliche Verfahren zur Wiederbesiedelung der Prothesen mit Zellen. Diese kann zum einen „*in vitro*“ oder „*in situ*“ geschehen. Bei der Wiederbesiedelung „*in vitro*“, werden zuvor isolierte Endothelzellen oder Fibroblasten genutzt und vor der Implantation der Prothese auf das Gewebe aufgebracht. Die Besiedelung „*in situ*“ geschieht nach Implantation der dezellulierten oder synthetischen Prothese, indem zirkulierende Endothelzellen im Verlauf am Gewebe

anhaften und dort proliferieren [64- 67]. Bei diesem Verfahren entfällt eine vorherige aufwendige Zellkultur mit patienten-eigenen Zellen, wodurch die Prothese zügig verwendbar ist. Dies nennt man „*off-the-shelf*“ Prothese. Insbesondere bei den dünnen Segeln der Herzklappen ist dieses Verfahren effektiv und wird bereits kommerziell verwendet.

Tissue Engineering stellt insgesamt eine vielversprechende Alternative zur Erstellung von kardiovaskulären Prothesen dar, da diese besonders anpassungsfähig, langlebig und schnell verfügbar sein können [59, 68, 69].

4.4.2 Dezellularisation

Die Dezellularisation hat zum Ziel alle zellulären und extrazellulären Komponenten und immunrelevanten Elemente aus der Extrazellulärmatrix (EZM) zu entfernen [81- 84]. Durch die Beseitigung aller Zellen und Antigene kann das dezellularisierte Gewebe nicht als fremd erkannt werden und löst somit keine Abwehrreaktion des Patienten nach der Implantation aus [55, 61, 85, 86]. Somit wird das Gewebe vom Körper der Patienten toleriert und eigene Zellen können einwandern [55, 87]. Mit der DZ können also xenogene Herzklappen und Gefäßprothesen hergestellt werden, die eine längere Haltbarkeit durch verringerte Implantatabstoßung aufweisen [87-89]. Langfristig kann in einem Umbauprozess das fremde Material von patienteneigenem Gewebe substituiert werden, wodurch sogar ein anpassendes Wachstum der Prothese möglich sein könnte [68]. Dies kann besonders bei angeborenen Herzfehlern von Vorteil sein um mehrere Reoperationen zu verhindern [57, 61]. Zusätzlich sind die biomechanischen Eigenschaften der biologischen Gewebe besonders ähnlich zu denen der humanen Gefäße und Herzklappen [55].

Natürlich geht diese Art der Gewebeentwicklung auch mit speziellen Hindernissen einher. Wichtig für den Langzeiterfolg ist eine vollständige DZ des Materials [68, 90]. Dabei ist insbesondere die Entfernung aller Zellen und Antigene aus festem und dickem Gewebe aktuell noch schwierig [91]. Deshalb werden zur Entwicklung von TE-Herzklappen häufig nur die Segel dezellularisiert, während die Wand noch xenogene

Zellen enthält [90, 91, 92]. Eine weitere Schwierigkeit ist die Wiederbesiedelung, wofür je nach Zielgewebe Endothel- oder Muskelzellen benötigt werden [64]. Allogene humane Zellen, welche im Voraus zur Verfügung stehen könnten, rufen Immunreaktionen hervor und bringen somit keinen Vorteil [70, 91, 93]. Durch die Nutzung von patienteneigenen Zellen vermeidet eine Immunreaktion vollständig. Allerdings können die Prothesen dafür nicht im Voraus produziert werden [66]. Der Ansatz von azellulären „*off-the-shelf*“ Prothesen mit „*in situ*“-Rezellularisation kann hierfür Abhilfe leisten und wird deshalb immer mehr angewandt (s. Kapitel 4.4.1) [94].

Eine weitere Herausforderung ist der Erhalt der biomechanischen Eigenschaften, welche durch die DZ häufig verloren gehen. Künstlich erstellte Prothesen, insbesondere von HK, sind im Kreislaufsystem großem mechanischen Stress ausgesetzt [69, 95]. Deshalb ist es wichtig, die komplexe Biomechanik nachzuahmen und die Prothesen damit suffizient auf ihre Anwendbarkeit *in vivo* zu testen [66, 96, 97].

4.4.3 Dezellularisierungsmethoden

Die DZ stellt im Idealfall die komplette Entfernung von zellulären Komponenten und Oberflächenantigenen dar. Die Schwierigkeit ist dabei, trotz radikaler Behandlung des Gewebes zur Entfernung der Zellen, die Struktur der EZM und damit die biologischen und mechanischen Eigenschaften zu erhalten [82, 98]. Sie bilden die Grundlage für die Stabilität und Mechanik *in vivo*. Das biologische Milieu sorgt außerdem für Anreizsignale zur Migration von Zellen bei der Re-Besiedelung [67, 81, 95].

Zur Erstellung eines solchen zellfreien Gerüsts werden verschiedene Methoden angewendet. Dabei werden drei grundlegende Verfahren, chemische, physikalische und biologische DZ, miteinander kombiniert. Abhängig vom behandelten Gewebe werden dabei unterschiedliche Substanzen genutzt. [84, 99, 100]

Chemische Dezellularisation

Zur Erstellung kardiochirurgischer Prothesen mittels Tissue Engineering werden oft chemische Mittel genutzt, um die zellulären Verbindungen zu spalten und die

Komponenten zu entfernen [82, 84]. Dabei sind ionische und anionische Detergenzien besonders wirkungsvoll in der Entfernung der zellulären Bestandteile. Sie führen zu Löslichkeit und Dissoziation der DNA von den Proteinen, verursachen allerdings auch Defekte der EZM [82, 95, 101]. Das anionische Detergens Triton-X-100 trennt Verbindungen zwischen Lipiden und Proteinen oder DNA und schont die Proteinverbindungen untereinander. Dadurch kann die EZM zwar teilweise gut erhalten bleiben, aber diese „sanfte“ Art der DZ führt auch zu einem vermehrten Verbleib von Zellen im Gewebe [101]. Ionische Detergenzien wie Natriumdodecylsulfat (Sodium dodecylsulfate; SDS) zeigen sich wirksamer in der Entfernung von Zellkernen aus festen Strukturen indem sie das Zytoplasma und die Zell- und Kernmembran auflösen [85]. Auch Natriumdesoxycholat (Sodiumdesoxycholate; SD) ist sehr effektiv, führt allerdings auch häufiger zu einer Schädigung des Gewebes [83, 102]. Eine angemessene Konzentration der Detergenzien spielt eine große Rolle um sowohl viel DNA zu entfernen, aber auch den Schaden an der EZM möglichst gering zu halten [84]. Anschließende Waschvorgänge sind wichtig, um die zytotoxischen Chemikalien wieder zu entfernen [89].

In vielen Beispielprotokollen wird eine Kombination von Detergenzien mit Säuren oder Basen genutzt [82]. Säuren und Basen führen zu Hydrolyse der Moleküle [55, 103, 104]. Peroxyessigsäure beispielsweise unterbricht die Zellmembran und entfernt wirkungsvoll die Nukleinsäuren. Jedoch werden so auch Proteine denaturiert und Glykosaminoglykane (GAG) beschädigt [105, 106]. Basen führen zu einer noch stärkeren Zerstörung der EZM mit Verlust der GAG und Kollagenfasern und werden deshalb weniger genutzt [85]. Eine weitere Möglichkeit der chemischen DZ ist die Zuhilfenahme von hypotonen und hypertonen Lösungen. Hypertone Kochsalzlösung führt durch osmotischen Schock zu einem Defekt der Zellmembran und somit zur Lyse, während hypotone Lösungen durch Osmose die Zellen lysieren und die DNA von den Proteinen lösen. Die abwechselnde Verwendung dieser Lösungen in Zyklen schont die EZM, ist allerdings alleine nur wenig suffizient [84, 85].

Biologische Dezellularisation

Daneben ist die Verwendung von Enzymen für die DZ möglich. Nukleasen, Trypsin, Lipase und α -Galaktosidase (α -Gal) zersetzen und entfernen immunaktive Substanzen, die eine

Abwehrreaktion auf das Gewebe induzieren würden [98, 107]. Enzymbehandlungen wirken spezifisch auf einzelne Komponenten, ohne große Defekte des Restgewebes hervorzurufen. Nukleasen (DNase und RNase) spalten und entfernen effektiv die DNA und RNA, welche einen Hauptteil der Immunreaktion ausmachen. Trotz der spezifischen Wirkung auf die DNA oder RNA kann eine ausgiebige Anwendung auch eine Veränderung der EZM hervorrufen und wichtige Bestandteile die GAG, Kollagen und Laminin entfernen [108]. Trypsin wirkt hauptsächlich auf das Elastin und Kollagen der EZM und unterbricht so EZM-Struktur, weshalb es bevorzugt zu Beginn der DZ genutzt wird um Zugang zu den Zellen zu erschaffen [108]. α -Gal entfernt das Oberflächenantigen Galactose- α -(1,3)-Galactose, welches auf den Zellen der meisten Säugetiere zu finden ist, jedoch bei Primaten und Menschen fehlt [109]. Deshalb ist es nachweislich für hyperakute und chronische Immunreaktionen auf Prothesen in Patienten verantwortlich und sollte vollständig entfernt werden [56, 110, 111]. Wie bei der detergentenbasierten DZ ist auch nach der Verwendung von Enzymen ein ausgiebiges Waschen wichtig, da diese körperfremden Proteine zusätzlich Immunantworten triggern können [98, 112].

Die Verwendung von Enzymen wird häufig mit Detergenzien kombiniert. Beispielsweise beweisen Khorramirouz et al., dass eine alleinige Nutzung von Enzymen nicht zu einer optimalen DZ ohne Immunantwort auf das Gewebe führt [108]. Bei Wilson et al. führte eine vorherige Anwendung von Detergenzien zu einer besseren Diffusion der DNase in das Gewebe [113]. Zusätzliche Verwendung von hypotonen Waschlösungen sorgen in einigen Publikationen schließlich für eine erfolgreiche DZ [86, 114].

Physikalische Dezellularisation

Zusätzlich zu den genannten Methoden lassen sich Gewebe mithilfe von diversen mechanischen und physikalischen Prozessen dezellularisieren. Einerseits können Temperaturveränderungen genutzt werden [115]. Viele Protokolle in der Literatur werden bei Raumtemperatur oder 37°C durchgeführt [98, 101]. Häufig wird jedoch eine Verbesserung der DZ bei erhöhter Temperatur beschrieben [116]. Dausgs et al. präsentieren 37-50°C als optimale Temperatur zur Entfernung der zellulären Strukturen ohne Veränderung der EZM von bovinen Arterien [117]. Sie stellen fest, dass eine Entfernung von DNA bei einer Temperatur von 50°C am effektivsten ist, jedoch kann so

hohe Temperatur auch zu einer Denaturierung von Proteinen führen und so die EZM beeinflussen. In dem Zusammenhang zeigen Daus et al. auch, dass Rinderkollagen bei Temperaturen über 50°C dehydriert wird und mit einer Beeinträchtigung der Stabilität einhergeht [117]. Zusätzlich dazu belegen Negishi et al. eine besonders schonende DZ bei 4°C im Vergleich zu 37°C [115]. In ihrer Studie resultierte eine erhöhte Waschttemperatur in einem verringerten Kollagengehalt im Gewebe, weshalb eine zu hohe Temperatur über lange Zeit vermieden werden sollte.

Eine weitere Anwendung von Temperaturunterschieden ist das Einfrieren von Zellen, was durch die Bildung von intrazellulären Eiskristallen zu einer Lyse der Zellen und damit vereinfachten Entfernung aus der EZM führt [84, 118]. Dies lässt zelluläre Bestandteile zurück, welche mittels Waschphasen abtransportiert werden müssen, um eine Abstoßungsreaktion zu verhindern [119]. Somit können auch Einfrierzyklen in Kombination mit Detergenzien in einer Verbesserung der DZ resultieren [119].

Zum anderen wurden Ultraschallbehandlungen im Rahmen von DZ-Protokollen bereits an verschiedenen Geweben getestet und beschrieben [120, 121]. So konnten beispielsweise Hazwani et al. eine verbesserte DZ von Aortengewebe durch die Verwendung von Ultraschall auch in kurzer DZ-Zeit nachweisen [122]. Auch an anderen Geweben, wie Menisken oder Dünndarmproben, wurde der Vorteil von Ultraschallbehandlungen nachgewiesen [123, 124]. Ausgelöst wird die Zell-Lyse durch den Ultraschall aufgrund des Kavitationsphänomens [125]. Hierbei werden im Gewebe, mit durch die Ultraschallwellen ausgelösten Niederdruckphasen, Vakuumbblasen erzeugt. Diese implodieren anschließend in einer Hochdruckphase und zerstören mit ihren Scherkräften die Zellen [126]. Die zusätzlichen Vibrationen führen außerdem zu mechanischer Ablösung von Zellen. Azhim et al. beweisen, dass die Penetration der Detergenzien nach einer Ultraschallbehandlung des Gewebes deutlich intensiver ist, jedoch auch auf eine Destruktion der EZM geachtet werden muss [127]. Somit werden Ultraschallbehandlungen gerne in Kombination von Detergenzien oder Enzymen für die DZ verwendet [128].

Schließlich können auch einfache mechanische Kräfte wie Druck und Reibung oberflächliche Zellen gut entfernen und somit als zusätzliche Maßnahmen hilfreich sein

[81]. Physikalische Prozeduren alleine sind allerdings nicht in der Lage Gewebe vollständig zu dezellarisieren [84, 86].

Um das Gewebe mit einer chemischen oder biologischen Lösung von Zellen zu befreien, kann man entweder eine ante- oder retrograde Perfusion des Materials, Bewegung in freier Lösung oder die Verwendung von Druckgradienten über dem Gewebe wählen [82]. Bei ganzen Organen, wie beispielsweise dem Herzen zeigt sich insbesondere die Perfusion des vaskulären Systems als wirkungsvoll [129–131]. Durch das Kapillarnetz gelangt die DZ-Lösung auch in tieferes Gewebe [131]. Um jedoch einzelne Gewebe und dichteres Material wie Knorpel oder großlumige Arterienwände zu dezellarisieren, ist die freie Bewegung von Flüssigkeit besonders effektiv [98]. Während die meisten Protokolle eine einfache Schüttelbewegung für die DZ nutzen, gibt es auch einige Studien, die eine Effektivitätssteigerung durch eine vermehrte Bewegung der Flüssigkeit belegen [81, 119, 132]. Insbesondere kontinuierlicher Fluss und Perfusion sorgen für eine gute DZ mit besserem Erhalt der EZM, wie beispielsweise bei Simsa et al. [133]. Die Dicke und Densität des Gewebes bestimmen dabei die Länge des Protokolls und die Stärke der DZ-Lösung. Der zusätzliche Aufbau eines Druckgradienten kann zuträglich sein und die Struktur der EZM durch kürzere und schonendere Behandlung schützen [84, 86, 91].

Insgesamt werden die physikalischen und prozeduralen DZ-Methoden oft als unveränderliche Konstante in allen Protokollen verwendet und nicht vollständig für die Optimierung genutzt. In einer von Starnecker et al. durchgeführten systematischen Untersuchung wurden die physikalischen und verfahrenstechnischen DZ-Methoden unabhängig voneinander geprüft [134]. Hier konnte bereits belegt werden, dass ein kontinuierlicher Fluss der DZ-Lösung durch eine bessere Verteilung der Detergenzien im Vergleich zum Schütteln der Detergenzien einer Effektivitätssteigerung der DZ erzielte. Zusätzlich entfernten intermittierende Waschzyklen Zellresiduen und Detritus schon von Beginn an und ermöglichten so ein tieferes Eindringen der Detergenzien. Die Anwendung von Ultraschall und erhöhter Temperatur zeigte, dass dieser zwar zu einer größeren Eindringtiefe führt, jedoch auch, je nach Länge des Behandlungsintervalls, Defekte hervorruft.

4.4.4 Qualitätssicherung in der Gewebedezellularisation

Trotz dieser verschiedenen Methoden ist die vollständige DZ von Gewebe wie den Gefäßen und Herzklappen weiterhin eine Herausforderung [66]. Es ist nur selten möglich alle zellulären Komponenten und Antigene zu entfernen, ohne die EZM-Struktur zu beeinträchtigen [82, 83]. Dabei ist es jedoch wichtig zu erwähnen, dass zum aktuellen Zeitpunkt keine allgemein gültige Definition für eine erfolgreiche DZ existiert. So ist beispielsweise die Relevanz der Menge an Residualzellen oder Antigenen für eine Immunantwort umstritten [81]. Badylak et al. weisen beispielsweise geringe Mengen von DNA in bereits regelmäßig klinisch genutzten Prothesen nach [93]. Hieraus lässt sich ableiten, dass nur die Entfernung eines Hauptanteils der DNA nötig wäre, um die Immunreaktion ausreichend zu reduzieren [135]. Des Weiteren wird thematisiert, ob zurückgebliebene Zellen sogar eine Remodellierung unterstützen und somit von Vorteil sein könnten [136]. Dennoch wurde bereits mehrfach bewiesen, dass zunehmender Erfolg in der Entfernung von Zellen mit einer verminderten Immunreaktion korreliert und deshalb zu bevorzugen ist [135-137].

Die Qualität der DZ lässt sich an verschiedenen Parametern messen. Crapo et al. präsentieren in ihrer Arbeit Richtlinien für den DZ-Erfolg, basierend auf Studien in denen eine geringe Immunantwort festgestellt werden konnte [81]. Das erste Kriterium ist die Entfernung von DNA bis zu einem DNA-Gehalt von <50 ng dsDNA pro mg EZM. Zusätzlich sollte eine maximale DNA-Fragmentlänge von 200 bp nicht überschritten werden, da DNA Fragmentation ein wichtiges Kennzeichen für Apoptose darstellt [138]. Das dritte Kriterium ist der Nachweis der doppelsträngigen DNA in DAPI- oder H&E-Färbung. Ebenso wichtig wie die Darstellung der zellulären Komponenten ist die Überprüfung der EZM-Integrität [98, 131]. Die Intaktheit der Matrix wird in histologischen Färbungen wie die Movat`s Pentachrom Färbungen untersucht und die zurückbleibenden Glykosaminoglykane, als Maßstab für die Bewahrung des Bindegewebes, gemessen [68, 131]. Für den Erhalt der EZM wurden bisher jedoch noch keine qualitativen Vorgaben publiziert. Deshalb gibt es noch es viele verschiedene DZ-Methoden in der Literatur, die in ihrem Outcome variieren [83]. Auch kommerziell produzierte Produkte unterscheiden sich in der Güte der DZ [139].

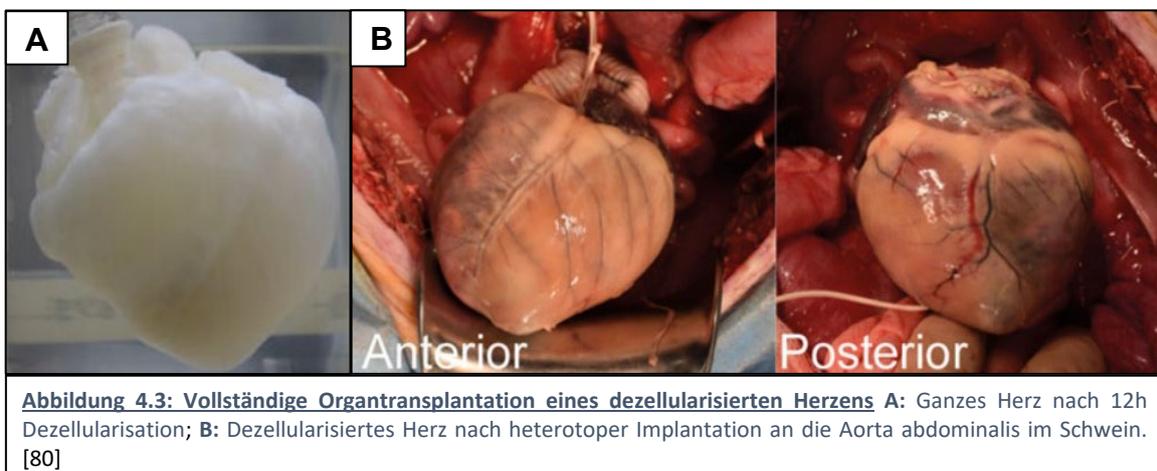
4.4.5 Anwendung der DZ in der Herzchirurgie

In der Herzchirurgie zeigt sich ein großes Potential für dezellularisierte Prothesen [70]. Mit Materialien ohne Zellen und Antigenen könnten Nachteile wie schlechte Langzeitergebnisse aufgrund degenerativer und entzündlicher Veränderungen ausgeräumt werden [51, 55]. Herzklappenprothesen können so langfristiger ohne Auslösung einer Immunreaktion eingesetzt werden. Aktuell gibt es bereits kommerziell verfügbare dezellularisierte Herzklappen und Patches zur Rekonstruktion. Bei Murin et al. zeigten diese Prothesen sehr gute Ergebnisse mit geringen Reoperationsraten (Reoperationsfreiheit nach einem Jahr z.B. 85,5% bei Patchimplantation) [71]. Jedoch konnte auch bei diesen zellfreien Prothesen bereits eine Infiltration mit Immunzellen nach kurzer Zeit (20 Monaten) nachgewiesen werden. Auch wenn sich nach dieser Zeit noch keine Degeneration in Form von Kalzifizierungen darstellte, könnten die Langzeiterfolge dieser Herzklappen limitiert sein [71, 72].

Auch im Bereich der Gefäßprothesen zeigt sich ein Potential für die DZ [55]. Synthetische Gefäßprothesen präsentieren sich besonders im kleinelumigen Bereich aufgrund ihres erhöhten Risikos für Thrombosen als ungünstig. Biologische Prothesen werden meist autolog verwendet (beispielsweise durch die Vena saphena magna bei koronaren Bypassen) [73]. Diese sind jedoch begrenzt und führen zu einem erweiterten Operationsrisiko für den Patienten. Um dies zu vermeiden werden bereits dezellularisierte Venen implantiert, welche vielversprechende Ergebnisse zeigen [73, 74].

Ein weiteres Anwendungsgebiet für das Tissue Engineering in der Herzchirurgie sind Herztransplantationen [75]. Diese sind aktuell durch die Anzahl an Organspendern limitiert, welche in den letzten Jahren in Deutschland zudem kontinuierlich sinkt (Stand 2019) [76- 78]. Auf der anderen Seite steigt die Zahl an transplantationspflichtigen Patienten aufgrund der verlängerten Lebenserwartung immer weiter an [77]. Ein durch TE entwickeltes Organ könnte hier Abhilfe leisten. DZ-Herzen konnten bereits hergestellt werden und bringen große Hoffnung für die Transplantation in der Herzchirurgie [79]. Dabei zeigen sich allerdings noch Schwierigkeiten in der DZ der dicken Ventrikelwände und auch die Re-Besiedelung muss durch Optimierung der in vitro Organkultur und Auswahl an Zellen verbessert werden [75]. 2016 konnten Kitahara

et al. eine erfolgreiche heterotope Transplantation eines dezellularisierten und rezellularisierten Herzens in Schweinen durchführen [80]. Die Ergebnisse demonstrierten die besonderen Herausforderungen der DZ ganzer Organe. Zum einen zeigten sich bereits nach drei Tagen eine große Anzahl an Entzündungszellen, welche auf eine akute Abstoßungsreaktion hinwiesen. Zum anderen wurden die Herzen heterotop an den abdominalen Gefäßen implantiert, weshalb die biomechanischen Anforderungen verändert sind. Trotzdem demonstriert diese Arbeit große Fortschritte in der Geschichte des Tissue Engineerings und zeigt bedeutende Möglichkeiten für die Zukunft auf.



4.5 Ziel der Arbeit

Aufgrund der starken Variation in den DZ-Verfahren ist es aktuell schwierig eine optimale Methode zur DZ von kardiovaskulärem Gewebe zu benennen. Durch die fehlenden Richtlinien und unterschiedliche Gewichtung für eine erfolgreiche DZ in den Studien ist ein Vergleich der publizierten Methoden erschwert. Um jedoch effektivere Verfahren für die klinische Anwendung zu entwickeln, ist eine genaue Analyse und Weiterentwicklung der etablierten Protokolle nötig. Das Ziel dieser Studie ist es deshalb, eine systematische und unabhängige Prüfung verschiedener etablierter, detergenzien-basierter Verfahren aus der Literatur durchzuführen. Mit der Reproduktion der Protokolle lassen sich Vorteile und Nachteile, sowie zu verbessernde Faktoren darstellen. Auf der Basis dieser Erkenntnisse, sollen schließlich Modifikationen zur Effektsteigerung der Methoden entwickelt werden.

EINLEITUNG

Hierzu wurde bereits die selektive Beurteilung von physikalischen und prozeduralen Faktoren durchgeführt und eine Verbesserung der DZ durch einen kontinuierlichen Detergenzienfluss, intermittierende Waschschritte, Ultraschallbehandlungen und Temperatursteigerungen belegt. Nun soll in der hier vorliegenden Studie eine Optimierung durch eine Kombination dieser Verfahren realisiert werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist deshalb die Ultraschallbehandlung, die zyklische Dezellularisation und den kontinuierlichen Volumenstrom der Detergenzienlösung gemeinsam anzuwenden und auf ihre Effektivität zu prüfen. Als weitere prozedurale Technik, wird eine perfusions-basierte DZ untersucht. Diese allgemeinen Methoden werden an verschiedenen, zuvor reproduzierten, DZ-Prozeduren aus der Literatur angewandt. Dabei besteht die These, dass diese physikalischen und prozeduralen Methoden unabhängig vom Ursprungsprotokoll eine Verbesserung des Verfahrens ermöglichen und protokoll- und gewebeübergreifend anwendbar sind. Im Anschluss wird eine Kombination mit einer Enzymbehandlung getestet, welche die DZ möglicherweise weiter intensivieren kann.

Letztendlich sollen so anwendbare standardisierte DZ-Abläufe erstellt werden, die der Herstellung von dezellulisiertem Gewebe für den klinischen Gebrauch dienen. Die Zusammenführung verschiedener Methoden und die systematische Überprüfung variierender DZ-Prozeduren soll die Optimierung aller Verfahren ermöglichen und gegebenenfalls ein überlegenes Protokoll hervorbringen. Diese prozeduralen und physikalischen Verfahren können schließlich einen vielversprechenden Fortschritt auf der Suche nach dem optimalen Gewebeersatz in der Herzchirurgie darstellen.

5. MATERIAL UND METHODEN

5.1 Materialvorbereitung

Die Durchführung der Versuche erfolgte an Pulmonalarterien (PA) von Schweinen. PA sind im Vergleich zur Aorta etwas dünner, wodurch die vollständige DZ mit den geplanten Verfahren herausfordernd, jedoch gut möglich erscheint. Dies soll die Varianz der Verfahren und Optimierungsmöglichkeiten geeignet abbilden. Um das Projekt durchzuführen wurden Schweineherzen von einem lokalen Schlachthof abgeholt und schnellstmöglich (maximal 45 Minuten Transportzeit) in das Labor für Tissue Engineering der Herzchirurgie der Ludwig-Maximilians-Universität in München transportiert. Für die Verwendung von tierischen Nebenprodukten zu Forschungszwecken lag eine Ausnahmegenehmigung mit der Registriernummer DE 09 162 0039-21 vor. Zum Transport waren die Herzen stets luftdicht verpackt, um eine Keimbesiedelung zu vermeiden. Nun folgte die Überprüfung der Qualität der Herzen, indem auf Defekte und Veränderungen, wie beispielsweise Degenerationen oder Aneurysmen an den Klappen oder Arterien und eine ausreichende Länge der PA (mindestens 6 cm) geachtet wurde.

Schließlich konnten so 60 Herzen für die DZ ausgewählt werden. Bei der anschließenden Präparation wurde die PA oberhalb der Pulmonalklappe mittels Pinzetten und Skalpell vom Herzen abgesetzt und das gesamte Fettgewebe und anhängende Bindegewebe der Außenseite entfernt. Hierbei war es wichtig, die Schichten der Arterienwand selbst zu schonen. Regelmäßige Waschschriffe in phosphatgepufferten Salzlösung (PBS; PBS Dulbecco w/o CA2+ Instamed 9,55 g/L, Biochrom GmbH) führten zu einer vereinfachten Ablösung des umgebenden Bindegewebes und verhinderten außerdem das Austrocknen der PA während der Präparation. Bis zur DZ oder endgültigen Lagerung fand eine Überführung der Proben in PBS mit 1 % Antibiotikum und Antimykotikum (Anti-Anti 100x; Gibco® by Life Technologies GmbH) statt, um eine mikrobielle Besiedelung der Arterien zu verhindern. An jeder Probe erfolgte schließlich eine Markierung über verschiedene Einzelknopfnähte mit chirurgischem Nahtmaterial (Suprolene, Resorba Medical GmbH) um jeweils native und behandelte Proben zuzuordnen und direkt miteinander vergleichen zu können (s. Abb. 5.1 C), bevor die DZ

je nach Protokoll begonnen wurde. Die Stückzahl an Pulmonalarterien pro Versuch betrug $n=5$. Zusätzlich erfolgte einmalig die Präparation von zehn Arterien als Nativproben für die Zugversuche, da bei den Versuchsproben nicht ausreichend Material vorgelegen hätte (s. Kapitel 5.7.11).

5.2 Auswahl der Dezellularisationsprotokolle

Im Vorfeld der Studie wurde eine Literaturrecherche durchgeführt, indem aus den Datenbanken MEDLINE und Embase verschiedene, hauptsächlich detergenzien-basierte, Protokolle zur DZ von Gefäßen zusammengetragen wurden. Aus diesen wurden schließlich zehn Methoden ausgewählt, welche sich durch die verwendeten Lösungen, Dauer der DZ und physikalischen Bedingungen unterschieden. Anschließend erfolgte die Evaluation und der Vergleich der Protokolle bezüglich ihrer Wirksamkeit. Dabei wurde besonders die Zellfreiheit und der Erhalt der Extrazellulärmatrix beachtet. Von diesen Verfahren wurden schließlich vier verschiedene Methoden zur DZ von Arterien bestimmt, welche als besonders effektiv galten [102, 140–142].

Die ausgewählten Protokolle waren alle detergenzien-basiert und variierten in den Lösungen, Konzentrationen und Behandlungszeiten, um das universale Einsatzspektrum der Modifikationen an möglichst unterschiedlichen Protokollen zu testen (s. Tabelle 5.1). Zuerst wurden die PA als Kontrollgruppe, exakt wie in den jeweiligen Publikationen mit den ausgewählten Dezellularisationsprotokollen behandelt. Erst danach begannen die Modifikationen mit den neu entwickelten Methoden.



Abbildung 5.1: Präparation der Schweineherzen A: Ganzes Schweineherz; B: porcine Aorta (links) und Pulmonalarterie (rechts) im Vergleich. Das Gewebe der Aorta ist etwas fester, während die PA elastischer erscheinen; C: Pulmonalarterien vor der Dezellularisation (präpariert und fadenmarkiert); Maßstab: 5cm

5.2.1 Protokoll 1: SDS/SD

Das erste Dezellularisierungsprotokoll, welches von Cebotari et al. veröffentlicht wurde, basierte auf einer Behandlung mit zwei Detergenzien in niedrigen Konzentrationen der einzelnen Stoffe, wodurch eine geringere Toxizität erreicht werden sollte [102]. Dieses Protokoll sollte eine gute Balance zwischen Erhaltung des Gewebes und ausreichender Dezellularisation darstellen. Zunächst erfolgte eine DZ der Pulmonalarterien für 24 h mit 0,5 % Natriumdesoxycholat (SD, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) und 0,5 % Natriumdodecylsulfat (SDS, Carl Roth GmbH & Co. KG) in PBS bei Raumtemperatur (22°C). Anschließend wurden zehn intermittierende Waschschriffe mit PBS bis zu einer insgesamten Waschdauer von 12 h ebenfalls bei Raumtemperatur durchgeführt. Die gesamte DZ fand unter kontinuierlichem Schütteln der Lösung auf einem Horizontalschüttler statt. Im Folgenden wird dieses Protokoll mit "SDS/SD" abgekürzt.

5.2.2 Protokoll 2: SD

Das zweite Protokoll, entwickelt von J. Zhou et al., besteht ebenso aus einer DZ mit einem ionischem Detergens [140]. Dazu wird 1 % SD in PBS gelöst und die PA für 24 h bei 37°C behandelt. Daran angeschlossen erfolgt ein 24-stündiger Waschvorgang mit PBS bei Raumtemperatur. Auch diese DZ wurde unter kontinuierlichem Schütteln durchgeführt. Mit der höheren Konzentration und einem solitären Detergens sollte dieses Protokoll ein Beispiel für eine intensivere DZ-Methode darstellen, welche in der Literatur häufig eine höhere Toxizität hervorruft [102]. Dieses Protokoll wird hier "SD" genannt.

5.2.3 Protokoll 3: TX/SDS

Dieses Protokoll stammt von Z. H. Syedain et al. und demonstriert ein höher konzentriertes Vorgehen, das außer Detergenzien auch eine Enzymbehandlung beinhaltet [141]. Mutmaßlich bedingt durch die hohen Konzentrationen zweier starker Detergenzien konnte die Behandlungsdauer in diesem Protokoll mit 6 h sehr kurz ausfallen. Die Wahl fiel auf dieses Protokoll, um ein zügiges und gegebenenfalls aggressiveres DZ-Verfahren zu präsentieren. Hier wurde 1 % SDS in Aqua destillata (Ampuwa, Aqua dest., Fresenius Kabi AG) für 5,5 h genutzt und die Proben anschließend noch 30 min mit 1 % Octyl-Phenol Ethoxylat (Triton-X-100; Triton-X-100, Bio-Rad) in Aqua dest. behandelt. Daraufhin wurden die PA für 72 h mit PBS gespült. Die beschriebenen

Schritte erfolgten bei Raumtemperatur und unter kontinuierlichem Schütteln. Abschließend sollte eine Behandlung der Arterien mit DNase (DNase 150 U/ml, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) für 4 h bei 37°C im Schüttelschrank für komplette Entfernung der DNA sorgen. Die Abkürzung für dieses Protokoll ist "TX/SDS".

5.2.4 Protokoll 4: TX/SD

Dieses Dezellarisierungsprotokoll von E. Rieder et al. ist ein langes Protokoll, das eine Kombination aus verschiedenen Detergenzien enthält [142]. Für die DZ wurden 0,05 % Triton-X-100, 0,05 % SD und 0,05 % Octylphenyl-polyethyleneglycol (IGEPAL-CA630, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) mit Aqua dest. vermischt und die Arterien für 48 h bei 4°C behandelt. Anschließend erfolgte eine enzymatische Behandlung mit Ribonuclease (RNase; 100 µg/ml, Roche Diagnostics Deutschland GmbH) und DNase (Desoxyribonuklease I (30 U/ml), Worthington, Lakewood, US) für 24 h bei 37°C. Zum Abschluss folgten 6 jeweils zweitägige Waschvorgänge mit M-199-Medium bei 4°C. Hier fanden alle Schritte bei konstanter Rotation der fünf Arterien in einem Becherglas mit einem Magnetrührer statt. Diese Methode stellt mit den geringen Konzentrationen einen starken Gegensatz zu Protokoll TX/SDS dar. Die Inkubation der Proben für 48 h mit Detergenzien und 24 h mit Enzym mit einem zusätzlichen 12-tägigen Waschvorgang ist außerdem außergewöhnlich lang und repräsentiert somit einen weiteren Kontrast. Vermutlich wurde das Verfahren deutlich länger durchgeführt, um trotz der niedrigen Detergenzienkonzentrationen effektiv dezellarisieren zu können. Im Folgenden wird dieses Protokoll "TX/SD" genannt.

Tabelle 5.1: Darstellung und Vergleich der ausgewählten Dezellarisierungsprotokolle aus der Literatur

	Dezellularisation			Waschphase			Enzymbehandlung		
	Medium	Zeit	Temp	Medium	Zeit	Temp	Medium	Zeit	Temp
1. Protokoll: SDS/SD	0,5 % SD + 0,5 % SDS	24 h	22°C	PBS	12 h	22 °C	_____	___	___
2. Protokoll: SD	1 % SD	24 h	37°C	PBS	24 h	22 °C	_____	___	___
3. Protokoll: TX/SDS	1 % SDS +1 % Triton-X-100	6 h	22°C	PBS	72 h	22 °C	DNase	4 h	37 °C
4. Protokoll: TX/SD	0,05 % Triton-X-100 + 0,05 % SD + 0,05 % IGEPAL	48 h	4°C	M-199 Medium	12 d	4 °C	RNase+ DNase	24 h	37 °C

5.3 Durchführung der publizierten Prozeduren

Zuerst erfolgte die Durchführung der Protokolle gemäß der Beschreibung in der Literatur. Anschließend wurde der DZ-Erfolg mithilfe diverser Auswertungsmethoden beurteilt und auf Optimierungsmöglichkeiten überprüft. Im zweiten und dritten Durchlauf wurden dann physikalische, prozedurale und enzymatische Modifikationen für die Verfahren ausgewählt und die Resultate mit den Ursursungsprotokollen verglichen.

Der erste Versuchsdurchlauf fand entsprechend der Literatur bei den Protokollen SDS/SD, SD und TX/SD unter kontinuierlichem Schütteln statt. Hierzu wurden 500 ml der DZ-Lösung zu den PA in einen verschließbaren Behälter gegeben und in einen Schüttelinkubator platziert (Inkubationshaube TH 15, Edmund Bühler GmbH). Die Frequenz des Rüttelns wurde auf circa 150 bpm eingestellt, damit alle PA in konstanter Bewegung sein konnten (s. Abb. 5.2). Die Wärmeregulation im Schüttelinkubator war je nach Protokoll unterschiedlich (s. Tabelle 5.1). Die DZ mit TX/SD fand, wie in der Quelle angegeben, gekühlt und unter kontinuierlicher Rotation mittels Magnetrührer (Heiz- und Magnetrührer RH-Serie Modelle RH basic, IKA) statt. Der Magnet wurde in ein fest verschließbares Behältnis aus Plastik gelegt und die Proben mit den Detergenzien hinzugegeben. Dann wurde der Behälter in einen Kühlschrank bei 4°C platziert und die DZ unter leichter Rotation bis zur Bewegung der gesamten Flüssigkeit durchgeführt.

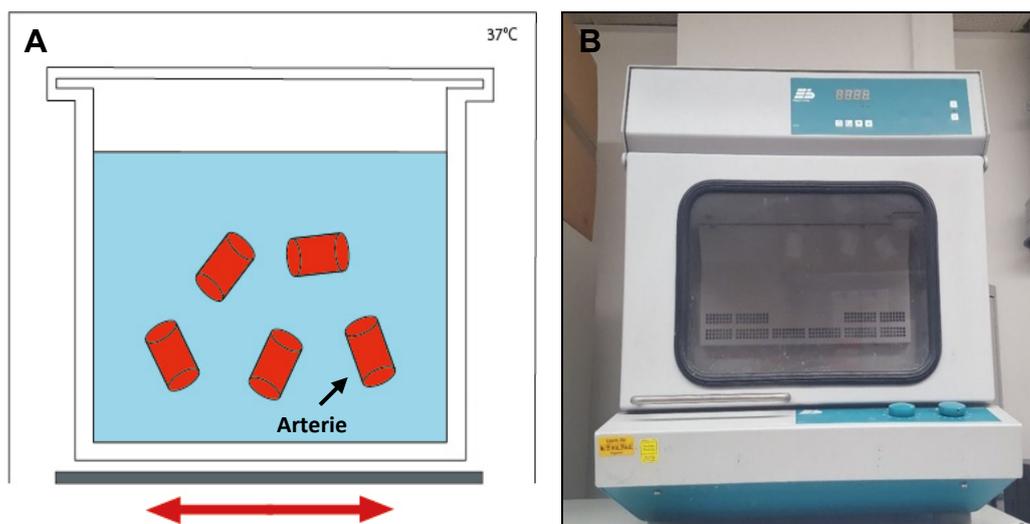


Abbildung 5.2: Erster Versuchsaufbau bei Protokoll SDS/SD, SD und TX/SD A: schematische Darstellung des DZ-Aufbaus, Die Platzierung der fünf Arterien in einem Becherglas auf einem Schüttelinkubator führt zu einer freien Bewegung der PA; B: Schüttelinkubator zur DZ: Dieser wurde auf 150 bpm eingestellt. Protokoll SDS/SD und TX/SD fanden bei RT statt. Bei Protokoll SD wurde die Temperatur des Inkubators auf 37°C eingestellt. Protokoll TX/SD wurde unter kontinuierlicher Rotation mithilfe eines Magnetrührers bei 4 °C durchgeführt. Der Versuchsaufbau ist hier nicht abgebildet.

5.4 Erste Modifikation der Verfahren

Bei der ersten Modifikation wurden verschiedene verfahrenstechnische Veränderung eingeführt. Vorrangig veränderte sich die Art der Flüssigkeitsbewegung. Anstatt einem kontinuierlichen Schütteln der DZ-Flüssigkeit wurde nun mithilfe einer Pumpe ein konstanter Fluss in die Lösung gebracht. Dadurch bewegte sich die gesamte Flüssigkeit durch zwei Behälter. Der Erste, ein Becherglas mit Deckel, enthielt die Proben. Er wurde über zwei Schläuche mit 12 mm Innendurchmesser und circa 1 m Länge mit dem zweiten Behälter, ein 3 Liter fassendes Becherglas, verbunden, der als Reservoir diente. Im Reservoir befand sich auch die Pumpe (Eden 155 Aquarienpumpe, 80 W, PfG GmbH), die die Flüssigkeit mit 20 L pro Minute durch einen weiteren Schlauch mit 12 mm Durchmesser zurück in den Probenbehälter brachte. Somit wurden die PA gleichmäßig von den jeweiligen Lösungen umspült und in dem rotierenden Strom bewegt. Am zuführenden Schlauch befand sich außerdem ein 25 cm langer Stab mit mehreren kleinen Öffnungen, welche eine Strudelbewegung der Flüssigkeit erzeugten. Insgesamt bewegten sich 2,5 L Flüssigkeit in dem Kreislaufsystem. Der Probenbehälter enthielt 1 L davon, der Rest befand sich im Reservoir (s. Abbildung 5.3.). Bei einem Lösungswechsel wurde die gesamte Flüssigkeit ausgetauscht. Die Temperatur wurde in dieser Modifikation über ein Wasserbad geregelt (Julabo SW 23, Julabo GmbH), in dem die Behälter platziert wurden. Zusätzlich wärmte ein Inkubator (HeraSafe, Heraeus Holding GmbH) die Flüssigkeiten circa eine Stunde vorher auf die gewünschten Temperaturen vor.

Eine weitere prozedurale Modifikation war die Einführung der zyklischen DZ. Hierzu wurden die Flüssigkeiten regelmäßig gewechselt und intermittierende Waschzyklen von einer Stunde eingefügt. Das sollte zu einer verbesserten Entfernung der Zellbestandteile und Detergenzien aus den PA führen und damit sowohl die Effektivität der DZ steigern als auch die Toxizität vermindern.

Zusätzlich wurde eine Ultraschallbehandlung der PA in die DZ integriert. Dazu wurde der Behälter mit den enthaltenen Proben intermittierend in ein Ultraschallbad (Ultrasonic Cleaner USC600T, 12 Watt, 45 kHz, VWR International GmbH) mit vorgewärmtem Wasser platziert. Die Ultraschallbehandlung erfolgte jeweils für 30 min am Anfang aller

Dezellularisations- und Waschzyklen. Während den Ultraschallbehandlungen wurden die Detergenzien in allen Protokollen jeweils auf 37°C erwärmt.

In Erwartung einer effizienteren Zellentfernung wurde die Behandlungsdauer im Vergleich zum Originalprotokoll bei der ersten Modifikation in Protokollen SDS/SD und SD um 50% gekürzt. Somit erfolgte die DZ nun für 12 h anstatt wie vormals für 24 h. Der Waschvorgang wurde unverändert im ersten Protokoll 12 h und im zweiten Protokoll 24 h durchgeführt. Die Behandlungstemperaturen wurden in SDS/SD mit 22°C und Protokoll SD mit 37°C beibehalten und nur während der intermittierenden Ultraschallbehandlungen bei beiden Verfahren auf 37°C erhöht. Das Protokoll TX/SDS wurde abgesehen von der Einführung der genannten prozeduralen Veränderungen nicht modifiziert, da es bereits von Anfang an das kürzeste Protokoll war. Die Temperatur der Flüssigkeiten betrug weiterhin 22°C und wurde nur bei den Ultraschallbehandlungen auf 37°C erhöht.

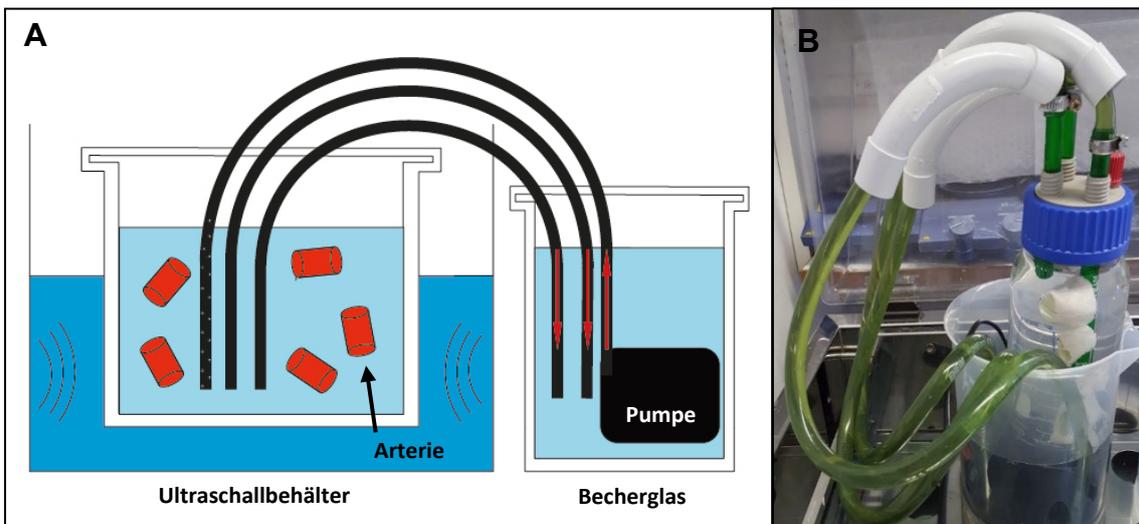


Abbildung 5.3: Versuchsaufbau der ersten Modifikation A: schematische Darstellung des Versuchsaufbaus mit kontinuierlichem Fluss der DZ-Lösung durch die Pumpe und Behandlung im Ultraschallbad. Zusätzlich wurden intermittierende Waschzyklen integriert. Mit diesem Aufbau wurden die Arterien gleichmäßig von der Flüssigkeit umspült und rotierten im Becherglas. Die Pumpe führte zu einem kontinuierlichen Fluss B: Darstellung der modifizierten DZ im Wasserbad. Nach jeweils einer 30-minütigen Anwendung im Ultraschallbad wurde die DZ bis zum nächsten Zyklus im Wasserbad weitergeführt.

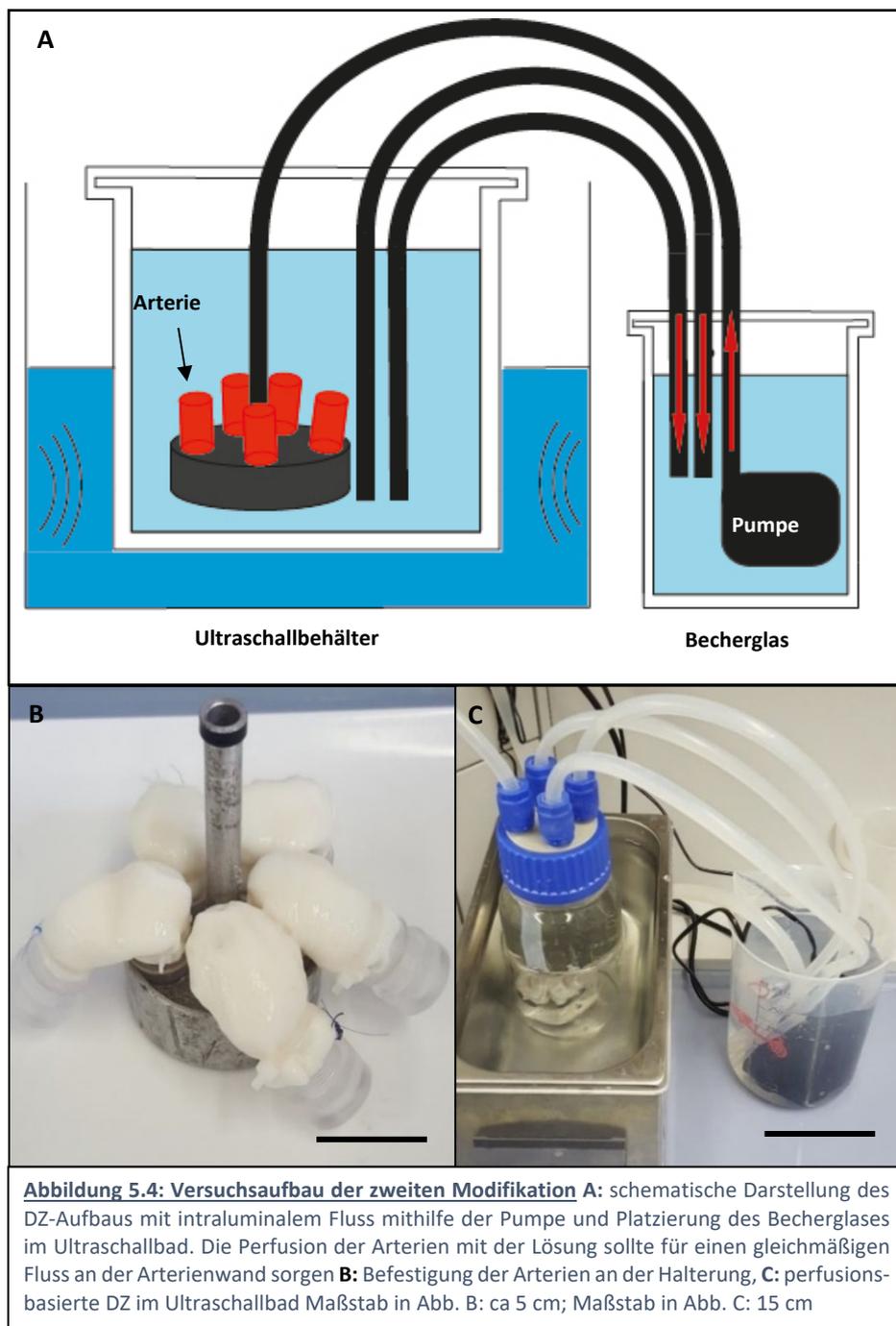
5.5 Zweite Modifikation der Verfahren

Im dritten Versuchsdurchlauf wurde ein neuer Versuchsaufbau zur DZ verwendet. Dabei sollte die Dezellularisierungslösung nicht um die PA rotieren, sondern durch das Lumen der Arterien geführt werden. Eine Pumpe sorgte wie im vorherigen Versuchsaufbau für einen konstanten Fluss. Durch einen Schlauch floss die Lösung nun durch eine Halterung mit fünf Öffnungen, welche in einem Becherglas platziert wurde. An den Öffnungen wurde jeweils eine PA befestigt, sodass die Flüssigkeit ausschließlich durch das Lumen der Arterien hindurchfließen konnte. Am distalen Ende der PA wurde ein Ring befestigt, welcher die fließende Lösung nur durch ein kleines zentrales Loch herausließ. Mit dem dadurch erhöhten Druck in der PA wurde ihr Lumen durchgehend offengehalten. Die austretende Flüssigkeit konnte schließlich im verschlossenen Probenbehälter rotieren und die PA somit auch von außen umspülen. Anschließend strömte die Detergenzienlösung über Schläuche im Deckel des Behälters zurück zum Reservoir, welches die Pumpe enthielt. Diese Methode sollte durch Perfusion einen gleichmäßigen Fluss der DZ-Lösung an den PA generieren und so die DZ optimieren (s. Abbildung 5.4). Auch bei diesem Durchlauf erfolgte das zyklische Vorgehen mit intermittierenden Waschschritten. Außerdem wurden weiterhin die Ultraschallbehandlungen jeweils am Anfang aller Zyklen für 30 min durchgeführt.

Eine zweite entscheidende Modifikation im dritten Durchlauf, stellte die Addition einer Enzymbehandlung (EB) in allen Verfahren dar. Dazu schloss sich am Ende jeden Protokolls eine vier-stündige Behandlung mit Desoxyribonuklease (DNase) an. Dafür wurde DNase I (Desoxyribonuklease I, Worthington, Lakewood, US) in einer Konzentration von 30 U/ml in 100ml PBS verwendet und mit 5 ml 100 mM CaCl_2 und 10 ml 100 mM MgCl_2 aktiviert. Die DNase-Behandlung fand bei 37°C und circa 100 bpm im Schüttelinkubator statt. Anschließend erfolgte eine Behandlung mit alpha-galaktosidase (α -galactosidase from green coffee beans, Sigma Aldrich Chemie GmbH; Darmstadt, D). Die α -Galactosidase (α -Gal) wurde in einer Konzentration von 0,1 U/ml in 100 ml PBS für 24 Stunden genutzt.

Die Konzentration und Dauer der DZ in Protokoll SDS/SD und Protokoll SD entsprach bei diesem Versuchsdurchlauf denen der ersten Modifikation. In Protokoll TX/SDS erfolgte

eine Reduktion der Konzentration der Detergenzien um 50 %, wodurch nun anstatt mit 1 % Lösung mit 0,5 % SDS und 0,5 % Triton-X-100 dezellularisiert wurde. Dies sollte dem zusätzlichen Schutz des Gewebes dienen und die Toxizität verringern. Auf eine Verminderung der DZ-Zeit wurde verzichtet, da das Protokoll mit 6 h bereits ausreichend kurz erschien.



5.6 Probenentnahme und Konservierung

Die Weiterverarbeitung der Proben erfolgte entsprechend der in Kapitel 5.7 beschriebenen Auswertungsmethoden. Zur Konservierung der Nativproben wurde von jeder PA direkt nach der Präparation ein Ring in einer Breite von 2 cm entfernt. Die Entnahme des behandelten Gewebes fand sofort nach der DZ bzw. nach der EB statt. Zur Vermeidung von verfälschten Ergebnissen durch seitliches Eindringen der Substanzen an den Rändern wurde jeweils am oberen und unteren Ende des Probenstückes 0,5 cm Gewebe abgetrennt und verworfen.

Zur Fixierung vor der Auswertung wurde für die histologischen Gewebeschnitte (DAPI-Färbung, Hämatoxylin&Eosin-Färbung, Movat's Pentachrom-Färbung und Pikro Siriusrot-Färbung) ein Gewebestück der Größe 0,5 x 1 cm entnommen und für mindestens 24 h in Formalinlösung 4 % (Roti[®]-Histofix 4 %, Carl Roth GmbH + Co.KG) bei Raumtemperatur gelagert. Die Weiterverarbeitung für die Rasterelektronenmikroskopie (REM) erfolgte durch Zuschnitt einer 0,5 x 0,5 cm großen Probe und Lagerung in FIX-II-Lösung, bestehend aus 912 ml AD (Ampuwa; Fresenius Kabi AG), 86,5 ml Glutaraldehydlösung 25 Gew.-% (Glutaraldehyd, Sigma-Aldrich Chemie GmbH), 1,5 ml Salzsäure (HCl; HCl, Merck KGaA) und 11,3 g Na-CaCO (Na-CaCO, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) bei 4°C für mindestens 48 h. Es wurde jeweils 25 µg Gewebe für die DNA-Quantifikation und 10 µg Gewebe für die Messung des Glykosaminoglykangehaltes (GAG-Gehaltes) mit der Feinwaage (Analysenwaage ABS 770, Kern & Sohn) abgewogen und bei -80°C mit Stickstoff eingefroren. Zur Vorbereitung der Zugversuchsproben wurde mit einer Stanze (manuelle Schneidpresse ZCP 020, ZwickRoell) eine hantelförmige Form gemäß ISO Norm DIN 53504 S3A aus den PA gestanzt (siehe Abb. 5.6). Dabei war es besonders relevant, die Arterienrohre längs aufzuschneiden und die Stücke in zirkulärer Richtung auszustechen, um bei jeder Probe die gleiche Messung entlang der zirkumferentialen Faserverlauf zu gewährleisten.

MATERIAL UND METHODEN

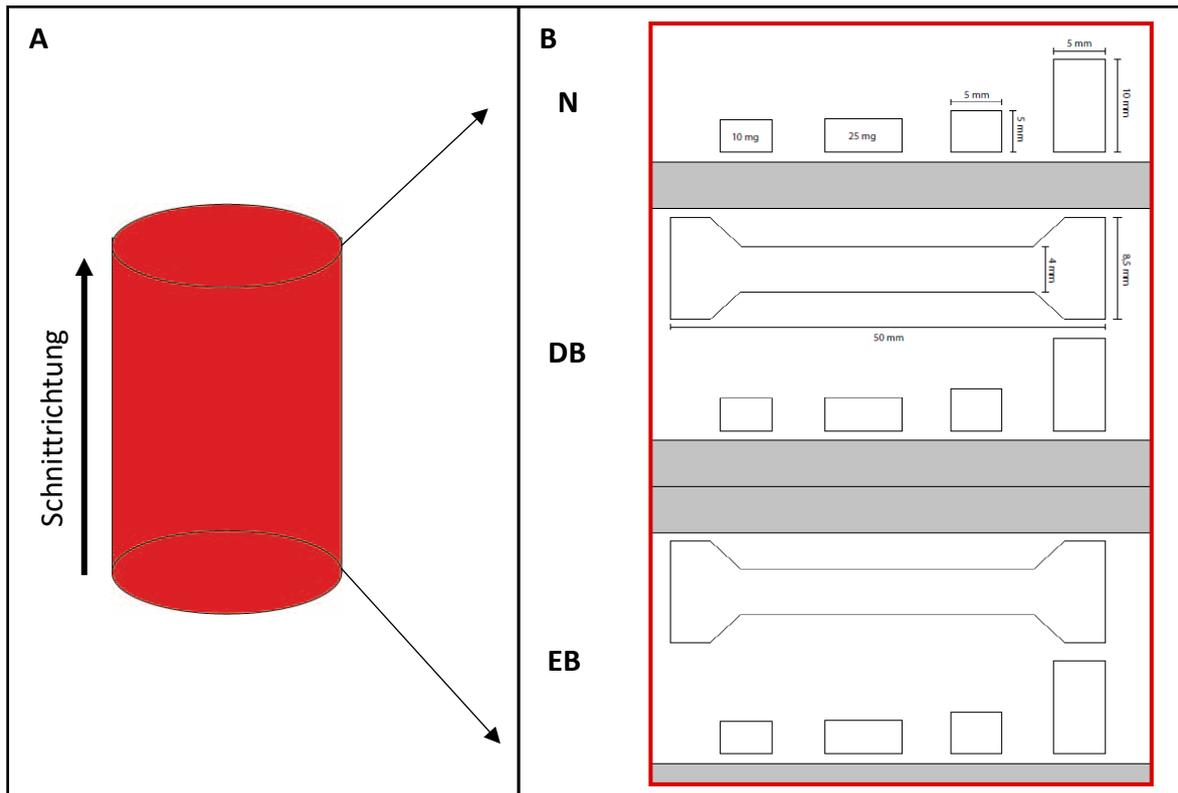


Abbildung 5.5: Darstellung der Probenentnahme aus den Pulmonalarterien A: Darstellung der PA. Diese wurden jeweils längs aufgeschnitten. B: Die PA wird hier längs aufgeschnitten dargestellt. Die Proben wurden zu verschiedenen Zeitpunkten: Nativ (N), nach Detergenzienbehandlung (DB) und nach Enzymbehandlung (EB) entnommen. Nach DB und EB wurde jeweils am oberen und unteren Ende Gewebe verworfen (grau dargestellt) um Verzerrungen der Ergebnisse durch das seitliche Eindringen der Detergenzien zu vermeiden.

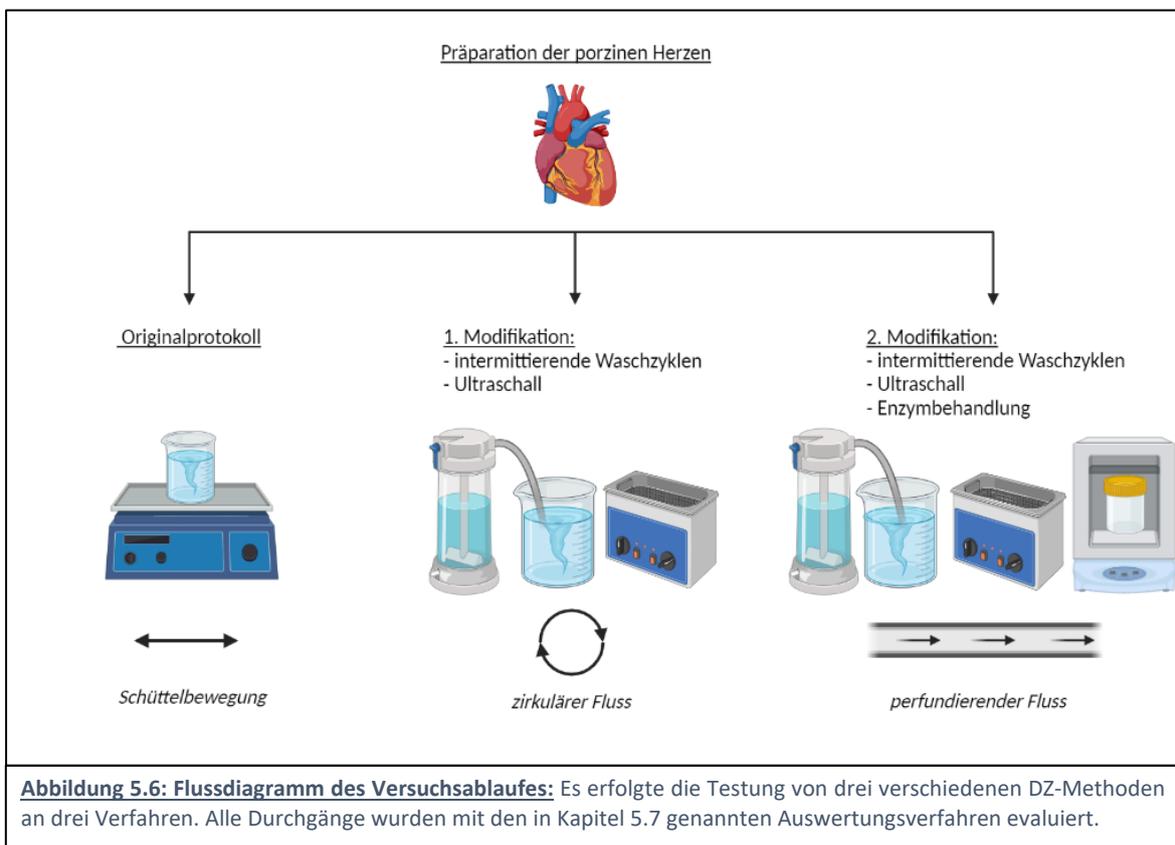


Abbildung 5.6: Flussdiagramm des Versuchsablaufes: Es erfolgte die Testung von drei verschiedenen DZ-Methoden an drei Verfahren. Alle Durchgänge wurden mit den in Kapitel 5.7 genannten Auswertungsverfahren evaluiert.

5.7 Auswertung

5.7.1 Makroskopische Beurteilung der Arterien

Zur makroskopischen Beurteilung der Arterien erfolgte eine Messung von Länge, Umfang und Dicke der Arterien. Dies wurde jeweils an nativen Proben als auch vor Anwendung der finalen modifizierten DZ-Protokolle durchgeführt. Dazu wurde die Dicke und der Umfang der jeweiligen PA jeweils in unbehandelter Form, nach DB und nach EB gemessen. Die Bestimmung der Länge der PA fand nur bei den unbehandelten Proben statt, da anschließend sofort Proben für die Auswertung entnommen wurden (siehe Abb. 5.6). Die makroskopische Untersuchung zu Beginn wurde durchgeführt, um das Ausmaß der Homogenität der porzinen Herzen und Arterien zu untersuchen und eine minimale Länge für eine ausreichende Probenentnahme zu gewährleisten. Die Feststellung der Länge und des Umfangs der PA erfolgte mit einem Längenmaß nach Durchtrennung der Längsseite der Arterien. Die Dicke der Arterien konnte mit einem digitalen Dickenmessgerät (Dickenmessgerät Marameter XLI-57B-15; Mahr GmbH) bestimmt werden. Dies geschah jeweils an drei unterschiedlichen Regionen zur Berechnung eines Mittelwertes.

5.7.2 Vorbereitungen für die Histologie

Nach der Fixierung der Proben für mindestens 24 h in einer Formalinlösung, erfolgte die weitere Vorbereitung zur Auswertung mittels histologischer Färbungen. Zuerst wurden die Gewebestücke in zuvor beschriftete gefensterte Einbettkassetten (Lab Logistics Group GmbH) platziert. Um die Außenseiten des Gewebes farbig zu kennzeichnen, wurden die Einbettkassetten für 4 min in Hämalaun (Mayer's Hämalaunlösung 1:3 mit PBS verdünnt, Merck KGaA) gelegt und anschließend 5 min unter fließendem Leitungswasser gebläut. Diese Farbmarkierung erleichterte die Kontrolle auf Intaktheit der Schnitte. Daraufhin fand die aufsteigende Alkoholreihe zur Paraffineinbettung statt. Dafür wurden die Pulmonalarterien 3 x 15 min mit Ethanol 70 Vol.-%, dann 3 x 15 min mit Ethanol 96 Vol.-%, 2 x 15 min mit Ethanol 100 Vol.-% und schließlich 15 min mit Xylol 100 % behandelt. Bis zur Paraffineinbettung am nächsten Tag lagerten die Proben in

einem Paraffinbad bei 50°C. Zur Einbettung wurden die Proben in Metallformen für Paraffinblöcke positioniert. Hier war es essentiell die PA aufrecht hinzustellen, um bei den Gewebeschnitten einen kompletten Querschnitt der Wand zu garantieren. Nun wurden die Formen mit Paraffin aufgefüllt und zur Aushärtung auf einer Kälteplatte platziert bis sich ein fester Paraffinblock gebildet hatte. Nach der Aushärtung folgte die Herstellung von Gewebeschnitten mit einer Dicke von 6 µm. Diese entstanden mithilfe eines Schlittenmikrotoms (Schlittenmikrotom HM 400 R, Microm International GmbH). Danach wurden die Gewebeschnitte in ein, auf 50°C vorgeheiztes, Paraffinstreckbad (Paraffinstreckbad Typ 25900, MEDAX GmbH & Co.KG) gelegt und schließlich auf Objektträger gezogen (Thermo SCIENTIFIC Superfrost Ultra Plus®, Gerhard Menzel GmbH). Nach der Trocknung der Schnitte bei 40°C über Nacht in einem Wärmeschrank (Wärmeschrank WTC, Binder) waren die Proben bereit für die Färbung oder Lagerung.

5.7.3 Entparaffinierung

Vor der Färbung erfolgte zuerst die Inkubation der Objektträger für 30 min bei 50°C im Wärmeschrank und anschließend die Entparaffinierung (s. Tab. 5.2). Diese unterschied sich in den einzelnen Färbungen minimal durch die Konzentrationen des Ethanol und der Dauer der Inkubationszeiten.

Bei der DAPI- und der H&E-Färbung begann sie mit einer Behandlung der Schnitte für 2x 15 min mit Xylol. Es folgten jeweils 2 x 5 min mit Ethanol 100 Vol.-%, 96 Vol.-% und 70 Vol.-%. Daraufhin wurden die Schnitte zweimalig für 3 min mit AD und dann für 2 x 3 min mit PBS inkubiert.

Tabelle 5.2: Ablauf der Entparaffinierung für die DAPI Färbung und der H&E Färbung

	BEHANDLUNG	ZEIT
Entparaffinierung	Roti-Histol	2 x 15 min
	Ethanol 100 Vol.-%	2 x 5 min
	Ethanol 96 Vol.-%	2 x 5 min
	Ethanol 70 Vol.-%	2 x 5 min
	Aqua dest.	2 x 3 min
	PBS	2 x 3 min

Bei der Movat's Pentachrom (MPC) und der Piko-Siriusrot- Färbung (PSR) erfolgte die Entparaffinierung in anderer Weise. Die Schnitte wurden zuerst mit Xylol behandelt, woraufhin sich jeweils Einwirkung von Ethanol 96 Vol.-%, 80 Vol.-%, 70 Vol.-%, 60 Vol.-% und AD anschloss. Die Dauer der Inkubationszeiten war hierbei in den einzelnen Färbungen unterschiedlich (s. Tab. 5.3).

Tabelle 5.3: Ablauf der Entparaffinierung für die Movat's Pentachrom Färbung und Piko-Siriusrot-Färbung

BEHANDLUNG		ZEIT (MPC)	ZEIT (PSR)
Entparaffinierung	Xylol	2 x 5 min	2 x 10 min
	Ethanol 96 Vol.-%	1 x 2 min	1 x 4 min
	Ethanol 80 Vol.-%	1 x 2 min	1 x 4 min
	Ethanol 70 Vol.-%	1 x 2 min	1 x 4 min
	Ethanol 60 Vol.-%	1 x 2 min	1 x 4 min
	Aqua dest.	1 x 2 min	1 x 4 min

5.7.4 DAPI Fluoreszenz-Färbung

Die DAPI Färbung ist eine Kernfärbung mit einem Fluoreszenzfarbstoff, der DNA markiert. Fluoreszenzfarbstoffe können an verschiedene Zellstrukturen binden und sorgen dort für eine Lichtemission bei Beleuchtung. 4',6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI) bindet an die kleine Furche doppelsträngiger DNA (dsDNA) und führt somit zu Detektion von DNA-Bestandteilen im Gewebeschnitt. Dabei werden besonders Adenin-Thymin Verbindungen bevorzugt. Der DAPI-Fluoreszenzfarbstoff wird durch ultraviolettes Licht mit einer Wellenlänge von circa 347 nm, welches das Absorptionsmaximum von dsDNA darstellt, bestrahlt. Dadurch fluoresziert er blau und produziert Lichtemissionen von einer Wellenlänge von circa 448 nm, welche dann mittels Fluoreszenzmikroskop detektiert werden können. Je stärker das empfangene Licht ist, als desto höher kann die Menge an DNA erachtet werden. [144, 145, 146]

Färbeprotokoll

Die anschließende Färbung startete mit einer zwei-minütigen Behandlung mit einer 1:1 Lösung aus Methanol (Methanol for analysis, Merck KGaA) und Aceton (Acetone for analysis, Merck KGaA). Dadurch fand die Permeabilisierung der Zellmembran statt, da DAPI, welches an den Zellkern gelangen muss, nur langsam intakte Zellmembranen

durchdringen kann. Daraufhin wurden die Schnitte für 2 x 3 min in PBS gewaschen. Nun konnte die Färbung mit der DAPI Lösung (Sigma Aldrich Chemie GmbH, c = 0,1 µg/ml in PBS) für 5 min folgen. Ab diesem Schritt fand die Färbung in einer Dunkelkammer statt. Es erfolgte eine Behandlung der Schnitte für 5 min mit PBS und 2 min mit Sudanschwarz 0,3 Vol.-% in Ethanol 70 Vol.-% (Sudanschwarz B für die Mikroskopie, Carl Roth GmbH + Co.KG). Als Gegenfärbung verminderte diese eine Fluoreszenz des Hintergrundes. Den Abschluss bildete ein erneuter Waschvorgang für 2 x 3 min in destilliertem Wasser. Da sich direkt an die Färbung die Mikroskopie anschloss, wurden die Objektträger nicht für eine langfristige Lagerung eingedeckt, sondern mit Eindeckmedium (Mounting Medium; Ibidi GmbH) für die Fluoreszenzmikroskopie vorbereitet.

Tabelle 5.4: Ablauf der DAPI-Fluoreszenzfärbung

BEHANDLUNG	ZEIT
MetOH-Aceton (1:1)	1 x 2 min
PBS	2 x 3 min
DAPI, c= 0,1 µg/ml	1 x 5 min
PBS	1 x 5 min
Sudanschwarz, c= 0,3 Vol.-%	1 x 2 min
Aqua dest.	2 x 3 min
Mikroskopieren	

Auswertung

Die Auswertung der DAPI Färbung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (AxioObserver Carl Zeiss AG). Die Aufnahmen wurden mit einer konstanten Belichtungszeit von 200 ms und einer Anregungswellenlänge von 340 nm und einer Emissionswellenlänge von 461 nm erstellt. Auf diese Weise entstanden von jedem Gewebeschnitt neun (3x3) Aufnahmen in 100x Vergrößerung, welche miteinander verbunden einen Überblick über die gesamte Arterienwand zeigten. Die Analysesoftware AxioVision (AxioVision Rel. 4.8, Carl Zeiss AG) wurde genutzt um das Bild zu analysieren, die Gesamtdicke des Schnittes zu messen und Abstände zu bestimmen. Durch Quantifikation der nichtfluoreszierenden Schicht der Arterienwand konnte die Effektivität der Dezellularisierungsmethode bestimmt werden. Qualitativ zeigte sich hier ein Unterschied in dem Vorhandensein von klar abgrenzbaren

Zellkernen und hellerer Hintergrundfluoreszenz oder diffus leuchtenden Regionen, welche auf ein Zurückbleiben der DNA hinwies. Die Eindringtiefe des Detergens (EDT) wurde bei inkomplett dezellularisierten Proben bestimmt, indem eine Messung des Abstandes ausgehend von der Oberfläche senkrecht bis zur fluoreszierenden Schicht stattfand (siehe Abb. 5.8). Sowohl bei der Dickenmessung der Arterienwand, als auch bei Messung der Dicke des Mittelstreifens mit intakten Zellkernen und der Eindringtiefe erfolgte die Berechnung der Mittelwerte aus drei repräsentativen Werten für den Querschnitt, um Messfehler und Variationen zu minimieren.

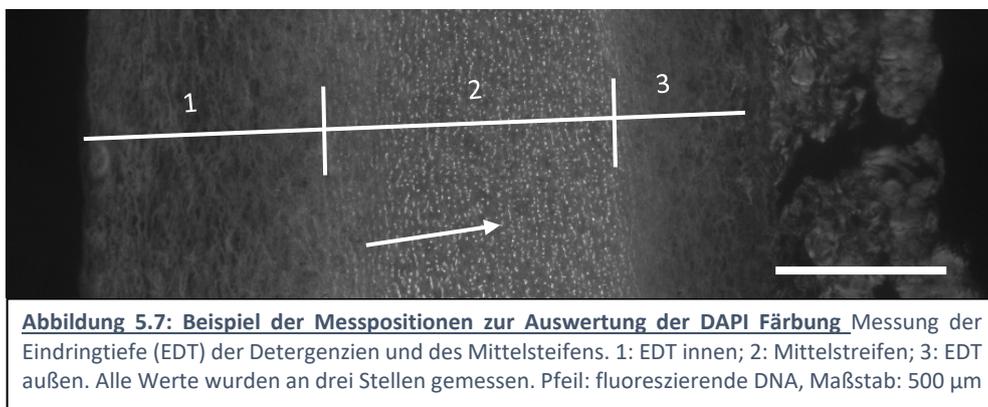


Abbildung 5.7: Beispiel der Messpositionen zur Auswertung der DAPI Färbung Messung der Eindringtiefe (EDT) der Detergenzien und des Mittelstreifens. 1: EDT innen; 2: Mittelstreifen; 3: EDT außen. Alle Werte wurden an drei Stellen gemessen. Pfeil: fluoreszierende DNA, Maßstab: 500 μm

5.7.5 Hämatoxylin & Eosin Färbung

Die Hämatoxylin&Eosin-Färbung (H&E-Färbung) ist eine histologische Übersichtsfärbung und gelingt durch zwei unterschiedliche Einzelfärbungen, die sich an verschiedene Gewebekomponenten anlagern. Hämalaun ist ein natürlicher Farbstoff aus Blauholz. Bei Belichtung färbt er sich rot. Danach wird Hämalaun an der Luft zu Hämatein oxidiert und bildet unter Spülung mit Wasser blauviolett erscheinende Chelate. Diese Chelate sind stark basisch und werden demnach von sauren Zellbestandteilen, wie beispielsweise DNA und RNA gebunden. Eosin dagegen, ist ein saurer Xanthinfarbstoff und wird von basischem Gewebe aufgenommen. So färbt es die azidophilen Zellplasmaproteine, Kollagen und Mitochondrien rot. Aufgrund dieses Färbeverhaltens lassen sich mit der H&E-Färbung Zellkerne besonders gut darstellen und somit der Grad der DZ einschätzen. Außerdem können erste Aussagen über den Erhalt der EZM getroffen werden

Kollagenfasern stellen sich beispielsweise als blass-rote Bänder und elastische Fasern als dunkle wellenförmige Strukturen im gesamten Querschnitt der Wand dar. [147- 149]

Färbeprotokoll

Nach der Vorbereitung mit Entparaffinierung (s. Kapitel 5.7.3), schloss sich zunächst eine Spülung mit Aqua dest. für 2 x 3 min an. Anschließend erfolgte die Kernfärbung mit 1:2 in PBS verdünntem Hämalaun (Mayer´s Hämalaunlösung, Merck KGaA) für 5 min. Für die darauffolgende Spülung wurde 0,1 Vol.-% Salzsäure Lösung (HCL Lösung, Merck KGaA) genutzt und die Schnitte anschließend unter fließendem Leitungswasser 10 min gebläut. Daraufhin folgte die Färbung mit Eosin für 5 sek (Eosin Y solution alcoholic, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) und anschließend eine erneute Waschphase für 5 min mit Leitungswasser.

Dann erfolgte ein mehrmaliges Eintauchen der Proben in Ethanol 80 Vol.- %, um die Farbintensität zu vermindern und so die einzelnen Bestandteile besser differenzieren zu können. Zur Entwässerung der Schnitte schloss sich eine Alkoholreihe mit 96 Vol.-% Ethanol und 100 Vol.-% Ethanol für jeweils 2 x 2 min an. Eine 5-minütige Behandlung zur Klärung mit Xylol (Xylol, Carl Roth GmbH + Co.KG) beendete den Färbevorgang. Daraufhin wurden die Objektträger mit Eindeckmedium (Leica CV MOUNT, Leica Biosystems Nussloch GmbH) und Eindeckgläsern (Thermo SCIENTIFIC, Gerhard Menzel GmbH) eingedeckt.

Tabelle 5.5: Ablauf der H&E Färbung

BEHANDLUNG	ZEIT
Aqua dest.	2 x 3 min
Hämalaun	1 x 5 min
HCL 0,1%	1 x 1 min
Leitungswasser fließend	10 min
Eosin	1 x 5 sek
Leitungswasser	1 x 3 min
Differenzierung 80% Ethanol	Mehrmals eintauchen
96% Ethanol	2 x 2 min
100% Ethanol	2 x 2 min
Xylol	1 x 5 min
Eindecken & Mikroskopieren	

Auswertung

Zur Begutachtung der Proben wurde ein Lichtmikroskop (Leica DMR, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH) genutzt und die Bilder mit der PC-Software (Ascent Software version 2.6, Thermo Fischer Scientific) in 100x und 200x Vergrößerung festgehalten.

5.7.6 Movat's Pentachrom Färbung

Bei dieser polychromatischen Färbung steht die Beurteilung der Extrazellulärmatrix (EZM) im Vordergrund. Es werden Alcianblau, Hämatoxylin, Brilliant-Crocein-Säurefuchsin und Safron du Gateis verwendet. Sie färbt verschiedene zelluläre und extrazelluläre Gewebekomponenten an und erzeugt damit einen guten Überblick über die Qualität der DZ und den Erhalt der EZM. Die EZM versteht man als Netzwerk, gebildet aus Bindegewebsfasern (kollagene, retikuläre und elastische Fasern), Glykosaminoglykanen, Proteoglykanen und Glykoproteinen. Die verschiedenen Fasertypen bestehen aus Strukturproteinen wie beispielsweise Kollagen oder Elastin [150, 151]. Kollagen, welches den größten Anteil darstellt, befindet sich ubiquitär in der EZM und weist eine hohe Zugfestigkeit auf. Kollagenfasern können hier mithilfe der Färbung mit Safron du Gateis deutlicher als in der H&E-Färbung als hellgelbe Fasern hervorgehoben werden. Elastin bildet durch Faserbildung und Vernetzung die elastischen Fasern, welche besonders in Gewebe mit hoher Elastizität, beispielsweise der Aorta, vorkommen. Diese Fasern werden durch die MPC-Färbung als braun-rote Strukturen sichtbar. Saure Glykoproteine wie Glykosaminoglykane und Mucine werden durch Alcianblau angefärbt. Nach Behandlung mit Ethanol stellen sich diese Komponenten dann blau-grün dar. Die Grundsubstanz der EZM ist somit grünlich gefärbt. Muskelfasern erscheinen in dieser Färbung rot, was vor allem durch den Farbstoff Brilliant-Crocein-Säurefuchsin hervorgerufen wird. Zusätzlich färbt Eisenhämatoxylin die Zellkerne in schwarz-roter Farbe. [6, 152, 153]

Färbeprotokoll

Nach der Entparaffinierung startete die Färbung mit einem kommerziellen Färbekit (Färbeprotokoll für Movat's Pentachrom, Morphisto Evolutionsforschung und

MATERIAL UND METHODEN

Anwendung GmbH). Den Beginn stellte eine Inkubation mit Alcianblau 1 Vol.-% für 12 min dar. Danach wurden die Proben 5 min unter fließendem Leitungswasser gespült. Anschließend folgte eine 60-minütige Behandlung mit alkalischem Alkohol, woraufhin wieder eine Spülung mit fließendem Leitungswasser für 10 min folgte. Nach 10 min Einwirkzeit von Eisenhämatoxylin wurden die Schnitte 1 min in AD und anschließend 2 min in Eisen (III)-Chlorid-Lösung getaucht. Danach folgte erneut eine Spülung mit AD für 1 min. Nach 1 min Inkubation mit Natriumthiosulfat wurde erneut eine Spülung mit AD (1 min) und fließendem Leitungswasser (15 min) durchgeführt, bis die Verwendung von Brilliant-Crocein-Säurefuchsin für 10 min begann. Daraufhin erfolgte die Behandlung mit Essigsäure 1 Vol.-% für 2 x 2 min, unterbrochen von Phosphorwolframsäure 20 Vol.-% (20 min). Nach zweimaliger Inkubation mit Ethanol 99 Vol.-% (1 und 6 min), wurden die Proben zuerst 6 min mit Safron du Gateis und erneut mit Ethanol 99 Vol.-% für 2 min behandelt. Den Abschluss bildete ein Eintauchen der Schnitte in Isopropanol für 2 min und 2 x 5 min in Xylol. Die Konservierung erfolgte durch das Eindecken der Objektträger.

Tabelle 5.6: Ablauf der Movat's Pentrachrom Färbung

BEHANDLUNG	ZEIT
Alcianblau 1 Vol. %	1 x 12 min
Leitungswasser fließend	1 x 5 min
Alkalischer Alkohol	1 x 60 min
Leitungswasser fließend	1 x 10 min
Eisenhämatoxylin	1 x 10 min
Aqua dest.	1 x 1 min
Eisen (III)-Chlorid-Lösung	1 x 3 min
Aqua dest.	1 x 1 min
Natriumthiosulfat	1 x 1 min
Aqua dest.	1 x 1 min
Leitungswasser fließend	1 x 15 min
Brilliant-Crocein-Säurefuchsin	1 x 10 min
Essigsäure 1 Vol.-%	1 x 2 min
Phosphorwolframsäure 5 Vol.-%	1 x 20 min
Essigsäure 1 Vol.-%	1 x 2 min
Ethanol 99 Vol.-%	1 x 1 min
Ethanol 99 Vol.-%	1 x 6 min
Safron du Gateis	1 x 6 min
Ethanol 99 Vol.-%	2 x 2 min
Isopropanol	1 x 2 min
Xylol	2 x 5 min
Eindecken & Mikroskopieren	

Auswertung

Für die Bewertung der Pentachrom-Färbung wurde jeweils in 100- und 200-facher Vergrößerung Aufnahmen mit dem Lichtmikroskop angefertigt.

5.7.7 Pikro-Siriusrot-Färbung

Mit der Pikro-Siriusrot-Färbung (PSR-Färbung) lassen sich insbesondere Kollagene verschiedener Gewebe anfärben. Damit ist sie, wie die MPC-Färbung, geeignet die EZM der PA zu beurteilen. Kollagen, Elastin, Glykoproteine, Muskelfasern und Zytoplasma werden hier unterschiedlich dargestellt. Außergewöhnlich ist hierbei, dass die Betrachtung der Schnitte im Lichtmikroskop mit regulärem Licht und mittels Polarisationsfilter möglich ist. Im Lichtmikroskop erscheinen alle Kollagene rötlich und zelluläre Bestandteile, sowie Hintergrundgewebe gelblich. Unter Verwendung eines Polarisationsfilters ist der Hintergrund schwarz. Durch Eigendoppelbrechung der Färbungen der Kollagenfasern wird das Kollagen der EZM gut betont und die verschiedenen Unterarten werden differenziert. Dabei präsentieren die dicken Fasern von Kollagen Typ I eine gelbe und Kollagen Typ III eine grüne Doppelbrechung. Durch die deutliche Abhebung vom dunklen Hintergrund ist eine quantitative Messung der Fluoreszenz des Kollagengehalts möglich. Kollagen I ist der häufigste Kollagentyp und ubiquitär vorhanden. Es kommt insbesondere in Haut, Sehnen, Faszien, Knochen und Gefäßen vor und ist wichtig für die Strukturbildung und Festigkeit sowie für die Interaktion mit anderen Bestandteilen der EZM. Kollagen Typ III ist vor allem Bestandteil von Gefäßwänden und inneren Organen sowie der Haut. Hier bilden die Fasern Kollagenfibrillen und sorgen für Stabilität. Im Vergleich zu den stabilen Kollagenfasern von Typ I sind die Fasern des Kollagen Typ III dünner und feiner. [154- 158]

Färbeprotokoll

Auch die PSR-Färbung erfolgte mittels eines Herstellerprotokolls (Färbeprotokoll für PSR für Kollagen I und III, Morphisto Evolutionsforschung und Anwendung GmbH). Nach Inkubation mit Eisenhämatoxylin für 8 min folgten 5 sek in AD, 10 min Spülung mit fließendem Leitungswasser und erneut 1 min in AD. Daraufhin wurden die Schnitte 1 h in Siriusrot gefärbt. Nach einer Behandlung mit Essigsäure 30 Vol.-% (2 x 4 min) und

Ethanol 96 Vol.-% (2 x 4 min) schloss sich eine Inkubation mit Isopropanol an (4 min). Zum Schluss wurden die Proben 2 x 10 min mit Xylol behandelt und anschließend mit Eindeckmedium für die Mikroskopie und Lagerung vorbereitet.

Tabelle 5.7: Ablauf der Pikro-Siriusrot-Färbung

BEHANDLUNG	ZEIT
Eisenhämatoxylin	1 x 8 min
Aqua dest.	1 x 5 sek
Leitungswasser fließend	1 x 10 min
Aqua dest.	1 x 1 min
Siriusrot	1 x 1 h
Essigsäure 30 Vol.-%	2 x 1 min
Ethanol 96 Vol.-%	2 x 4 min
Isopropanol	1 x 4 min
Xylol	2 x 10 min
Eindecken und Mikroskopieren	

Auswertung

Die Auswertung der Pikro-Siriusrot Färbung erfolgte am Lichtmikroskop sowohl unter regulärem Licht als auch bei polarisiertem Licht durch zwei gekreuzte Polarisatoren in 100- und 200-facher Vergrößerung [159]. Mit diesen Aufnahmen konnte sowohl eine qualitative als auch eine quantitative Beurteilung der Schnitte vorgenommen werden. Die quantitative Messung erfolgte mit der Bildbearbeitungssoftware ImageJ [160]. Dabei wurde die Intensität der Doppelbrechung in drei unterschiedlichen Abschnitten mit einer Größe von 500 x 800 Pixeln gemessen. Die Summe der Intensitäten wurde als „Raw integrated density“ (RawIntDen) bezeichnet. Zum Vergleich der Proben wurde der Durchschnitt (Mean) der Lichtintensitäten berechnet als $Mean\ Intensity = \frac{RawIntDen}{in\ Pixel}$ (*Pixelanzahl des berechneten Abschnittes*). Schließlich wurde ein Mittelwert und eine Standardabweichung der drei gemessenen Werte berechnet [161].

5.7.8 Rasterelektronenmikroskopie

Mit dem Rasterelektronenmikroskop (REM) lassen sich Proben hochaufgelöst (bis ca. 1 nm) begutachten. Im Vergleich zum Transmissions-Elektronenmikroskop können hier auch dicke, nicht elektronentransparente, Proben untersucht werden. Dies geschieht durch eine Abrasterung der Oberfläche durch einen Elektronenstrahl. Wechselwirkungen der Elektronen mit dem Objekt werden schließlich zu der Erzeugung des Bildes genutzt. Um Wechselwirkungen mit unterschiedlichen Molekülen der umgebenden Atmosphäre zu vermeiden, muss der Vorgang im Vakuum stattfinden. Die Primärelektronen werden aus der Kathode entlassen und zeilenweise über die Oberfläche des Objektes geführt. Durch die Wechselwirkung mit den Proben werden Sekundärelektronen (SE) oder Rückstreuelektronen erzeugt, welche dann von Detektoren erfasst werden. SE entstehen im gesamten Objekt. Allerdings erreichen die SE aus den tieferen Schichten nicht die Oberfläche und werden somit nicht detektiert. Deshalb bilden die erfassten SE nur die Probenoberfläche (Tiefe 1-10 nm) ab und sind somit wichtig für die hochauflösende Oberflächendarstellung der Probe. Die unterschiedlichen Signale werden dann in Grauwertinformationen umgewandelt und zu einem Bild zusammengesetzt. [162- 164, 167- 169]

Probenvorbereitung

Für die Rasterelektronenmikroskopie erfolgte nach der Präparation eine Fixierung der Proben in „Fix II“ Medium (s. Anhang), bestehend aus Aqua dest, Gultaraldehydlösung, Salzsäure sowie Natrium-Calciumcarbonat, für 48 h bei 4°C. Danach wurden die 0,5 x 0,5 cm großen Gewebestücke in einer Metallhalterung platziert und mithilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und das „Fix II“ entfernt. Dazu wurden die Proben für jeweils 10 min Ethanol 30 Vol.-%, 50 Vol.-%, 70 Vol.-% und 2 x 96 Vol.-% inkubiert. Dazu wurde jeweils so viel Flüssigkeit aufgefüllt und abgelassen, dass die Proben während der gesamten Zeit vollständig von Flüssigkeit bedeckt waren. Abschließend erfolgte ein Überführen der Proben in Ethanol 99 Vol.-% (vorgekühlt bei -20°C) bis zur weiteren Verarbeitung.

Kritisch-Punkt-Trocknen

Das Kritisch-Punkt-Trocknen wurde direkt im Anschluss durchgeführt. Um im REM keine Artefakte entstehen zu lassen und ein ausreichendes Vakuum aufbauen zu können, mussten die Proben vollständig trocken sein. Der Zeitpunkt, an dem es keine Unterschiede zwischen den Aggregatzuständen Gas und Flüssigkeit mehr gibt, wird kritischer Punkt genannt und wird durch die kritische Temperatur, den Druck und die Dichte gekennzeichnet. Bei CO₂ liegt dieser Punkt bei 31°C und 74 bar. Der kritische Punkt wird bei dieser Vorbereitungsmethode genutzt, um die Flüssigkeit vom Festkörper zu trennen.

Dazu wurden die Proben in der Druckkammer des Kritisch-Punkt-Trockners (Critical point dryer CPD30, BalTec GmbH) platziert und diese dann Ethanol 99,0 Vol.-% gefüllt. Danach erfolgte die Kühlung der Druckkammer auf 8°C. Nun wurde das Ethanol, welches bei 8°C flüssig ist, durch CO₂ ersetzt. Anschließend fand eine Erhöhung der Temperatur auf 42°C und eine Steigerung des Druckes in der Kammer auf 80 bar statt. An diesem Punkt konnte das jetzt gasförmige CO₂ über einen Zeitraum von 30 min abgelassen werden. Eine langsame, sukzessive Beseitigung des Gases führte zu einer Vermeidung von Oberflächenkräften, welche feine Strukturen beschädigen und war deshalb bedeutend für den optimalen Erhalt der Proben. Danach wurden die Gewebestücke aus der Metallhalterung entnommen und halbiert. Abschließend erfolgte ein Befestigen der PA auf einem Probenteller für Rasterelektronenmikroskopie in zwei Teilen, sodass sich jeweils einmal die Innen- und die Außenseite oben sichtbar zeigte.

Sputtern

Um die Proben weiter für die Mikroskopie vorzubereiten fand eine Goldbeschichtung des Gewebes statt. Dieses leitfähige Material sorgte dafür, dass die sonst strahlenempfindlichen Proben geschützt wurden [165]. Ohne die Goldbeschichtung würde das Rasterelektronenmikroskop im Anschluss zu einer starken Erhitzung und Beschädigung der Probe führen [166]. Dazu wurden die Probenteller in das Sputtergerät (Sputter Coater SCD 50, BalTec GmbH) eingelegt und ein Vakuum von mind. 5×10^{-2} mbar aufgebaut. Dieses Vakuum enthielt Argongas. Anschließend wurden die Atome aus einer Goldkathode bei einer Spannung von 570 Volt herausgelöst, wodurch eine Bedampfung der Proben erfolgte. Nach einer Dauer von 180 sek legte sich so eine ausreichende

Goldschicht über die Proben. Die Oberfläche war nun leitfähig für die Rasterelektronenmikroskopie.

Mikroskopie

Für die Rasterelektronenmikroskopie wurden die Probenteller auf einer Halterung befestigt und in das REM (Zeiss EVO LS10, Carl Zeiss AG) eingebracht. Nach luftdichtem Verschluss der Probenkammer konnte ein Vakuum von unter 1×10^{-5} mbar aufgebaut werden. Somit war die Begutachtung der Oberflächen im Mikroskop möglich. Aufnahmen der Proben entstanden bei 100x, 500x, 1000x, 2000x und 5000x Vergrößerung jeweils von der Oberfläche der luminalen Seite und der Außenseite der Arterien.

5.7.9 DNA-Quantifikation

Allgemeines

Die DNA-Quantifikation ist ein unerlässliches Mittel zur Beurteilung des DZ-Erfolges. Ein Hauptkriterium zur Erfassung der Qualität einer DZ ist der Verbleib von DNA und zellulären Bestandteilen im Gewebe. Gemäß der von Crapo et al. entwickelten Empfehlung sollten die Stücke nur <50 ng dsDNA pro mg EZM [81]. Eine erfolgreiche Entfernung der Zellen und DNA ist essentiell, um einer Immunreaktion vorzubeugen [138]. Allerdings konnte auch festgestellt werden, dass kürzere DNA-Fragmente vernachlässigbar sind und keine relevante Immunantwort hervorrufen [136]. Somit stand in dieser Studie die relative Reduktion der DNA im Mittelpunkt.

Durchführung des Protokolls

Die DNA-Quantifikation erfolgte mithilfe eines kommerziell erhältlichen Analysekits (ISOLATE II Genomic DNA-Kit, Bioline Meridiam Life Science). 25 mg des Gewebes wurde zur Auswertung zerkleinert und mit 25 μ l Proteinase K und 180 μ l Lyse Puffer bei 56°C über Nacht (maximal 16 h) inkubiert, um das gesamte Gewebe aufzulösen. Am nächsten Tag fand eine Behandlung der Lösung mit 200 μ l eines zweiten Lyse Puffers für 10 Minuten bei 70°C statt. Anschließend wurde 210 μ l Ethanol 96 Vol.-% hinzugefügt und in einem speziellen Behältnis mit integriertem Filter zentrifugiert, bis die gesamte

Flüssigkeit durch die Matrix gefiltert wurde. Dadurch befand sich nun in diesem Filter der gesamte DNA-Anteil der Probe. Mithilfe zweier verschiedener Waschpuffer (insgesamt 1100 µl) und mehrmaliger Zentrifugation erfolgte eine Reinigung der DNA von zurückgebliebenem Ethanol. Die DNA löste sich schließlich nach Verwendung von 100 µl Wasser von der Matrix. Nach Hinzufügen von Tris-HCL Puffer in einer Verdünnung von 1:10 konnte die DNA-Extinktion im Photometer bei 260 nm und 280 nm Wellenlänge gemessen werden. Das Absorptionsmaximum von DNA liegt bei 260 nm. Der Quotient von 260 nm/280 nm gibt dabei die Reinheit der DNA-Präparation an und sollte bei 1,8 liegen. Es wurden jeweils drei Messungen der DNA-Menge durchgeführt. [170, 171]

5.7.10 Glykosaminoglykan-Quantifikation

Allgemeines

Glykosaminoglykane (GAG) sind Polysaccharide und bilden eine wichtige Komponente der EZM, indem sie das Gerüst vieler Stoffe und Fasern darstellen. Sie können an Proteine binden und durch Zusammenschluss Proteoglykane bilden. Sie sind in allen Binde- und Stützgeweben im Körper zu finden und haben die Aufgabe die Struktur des Gewebes aufrecht zu erhalten. Sie halten Wasser im Bindegewebe und führen so zu einer Schutz- und Polsterfunktion. Als eine Grundsubstanz der EZM verbinden sie verschiedene extrazelluläre Moleküle und erstellen Wechselwirkungen zwischen intra- und extrazellulären Bestandteilen, Zelloberflächen und Plasmaproteinen. Des Weiteren wird durch sie der Raum zwischen den Zellen offengehalten und somit eine Transportstrecke im Gewebe, beispielsweise zwischen Blut und Zielzelle, erschaffen [6, 153]. Obwohl sie im Vergleich zu elastischen und kollagenen Fasern nur einen geringen Teil der EZM ausmachen, spielen sie eine große Rolle bei der Verbindung dieser Fasern. Es konnte auch festgestellt werden, dass eine Entfernung von GAG mit einer Reduktion der Spannungsrelaxation einhergeht [172]. Dies bestätigt die These, dass GAGs die viskoelastischen Eigenschaften von Arterien beeinflussen [172, 173]. Der Gehalt an GAG gibt somit indirekt Auskunft über die Integrität der EZM und der Biomechanik der Arterienwand. GAGs werden oftmals durch eine Behandlung mit Detergenzien und

Enzyme entfernt und sind somit ein wichtiger Kennwert für die Aggressivität eines DZ-Verfahrens [98].

Durchführung des Protokolls

Für die GAG-Messung wurde ein kommerziell erhältliches Kit (Glycosaminoglycan Assay Blyscan, Biocolor Ltd.) entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Dazu erfolgte zuerst eine Zerkleinerung von 10 mg PA und Inkubation dieser in 1 ml einer Papain-Reagenz für 4 h bei 65°C und 1500 U/min auf dem Schüttelinkubator bis zur vollständigen Auflösung. Die Papain-Reagenz bestand dabei aus 100 µl Papain und 25 ml einer Extraktions-Reagenz (25 ml Natrium Phosphat Puffer + 100 mg EDTA + 20 mg L-Cystein-HCl + 200 mg Natrium-Acetat). Nach 10 min Zentrifugation bei 10.000 g ($g \triangleq$ Schwerebeschleunigung) wurden die Proben erneut mit Papain-Reagenz (95 µl Papainreagenz + 5 µl Probe) versetzt. Zusätzlich wurde eine Standardreihe zum Vergleich durchgeführt. Anschließend wurden allen Proben 1 ml Blyscan Dye Reagent beigemischt und diese dann für 30 min im Thermoheizblock bei 24°C inkubiert. Nach weiteren 10 min Zentrifugation bei 12000 U/min zeigte sich nun ein deutlich gefärbter Bodensatz im Eppendorfer Gefäß. Nach vorsichtigem Verwerfen des Überstandes erfolgte ein Trocknen der Proben bei 37°C mit offenem Deckel im Thermoheizblock. Daraufhin fand eine Auflösung der verbliebenen Farbkomplexe in Kombination einer weiteren Reagenz im Vortexmischer statt. Nun konnte die Messung der Flüssigkeit im Photometer bei 656 nm Wellenlänge durchgeführt und somit der GAG-Gehalt mithilfe des Vergleiches mit der Standardreihe bestimmt werden.

5.7.11 Zugversuche

Allgemeines

Der Erhalt der mechanischen Eigenschaften von Arterien und Herzklappen ist wichtig für einen langfristigen Einsatz von Prothesen. Nach der DZ kommt es bekannterweise zu starken Veränderungen der EZM und damit auch der Elastizität und maximalen Belastbarkeit der Arterien [69, 174]. Deshalb ist es essentiell für die Beurteilung des DZ-Erfolges auch die mechanischen Eigenschaften nach DZ zu erfassen.

Bei der Verwendung von Universalprüfmaschinen für Zugversuche wird eine uniaxiale Kraft angebracht und somit eine konstante Dehnung des Materials erreicht. Indem der Zug bis zum Zerreißen des Gewebes einwirkt, kann die maximale Widerstandskraft des Materials berechnet werden. Die zusätzliche Angabe der ursprünglichen Dicke und Länge der Probe ermöglicht zusätzlich noch eine Einschätzung der Elastizität. Als Wert für die maximale Elastizität kann die endgültige Länge vor dem Zerreißen genutzt werden. In dieser Studie wurde mit der Durchführung der uniaxialen Zugversuche hauptsächlich Wert auf die maximale Belastbarkeit und die Elastizität des Gewebes gelegt. Es ist allerdings wichtig zu erwähnen, dass diese Kriterien alleine keine umfassende Beschreibung der mechanischen Eigenschaften von Geweben darstellen. Während hier nur die uniaxiale Belastung beschrieben wird, ist besonders bei herznahen Gefäßen auch die Dehnung in Länge und Breite, wie bei Yu Zou et al. und der Radius des Gefäßes sowie die Relevanz der Windkesselfunktion zu beachten [69, 96, 174].

Durchführung des Versuchs

Die Vorbereitung der Proben erfolgte direkt nach der Präparation bzw. der DZ oder EZ. Dazu wurde mittels einer Stanze (Manuell verstellbare Presse ZCP 020, ZwickRoell GmbH & Co. KG), jeweils ein großes Gewebestück aus den PA gestanzt. Dieses Stück entsprach der Norm ISO DIN 53504 S3A mit einer Größe von 2 x 8.5 x 50 mm. Auch die Dicke jedes Gewebestücks wurde bestimmt. Bis zur Ausführung der Zugversuche lagerten die Proben in 0,9 % NaCl. Zur Durchführung der Versuche stand eine Universalprüfmaschine (Zwickiline, ZwickRoell GmbH & Co. KG) zur Verfügung. Hier wurden die vorgefertigten Formen zuerst in die Zugapparatur mithilfe von verzahnten Klemmbacken eingespannt. Ausgehend von der Startposition führte eine axiale Kraft an den oberen Klemmbacken dazu, dass diese nach oben gezogen wurden. Infolgedessen kam es zur Dehnung der Arterie, die bis zum Reißen des Gewebes fortgesetzt wurde. Die dazugehörige Software ermittelte so nach Angabe der Dicke und Länge des Gewebes die maximale Zugfestigkeit der Arterien (F_{max}) und die maximale Länge vor dem Zerreißen als Kennwert für die Elastizität (L_{max}). Die Durchführung der Zugversuche erfolgte sowohl an Nativen Proben, als auch an dezellularisierten und enzymbehandelten Proben nach Durchführung der perfusions-basierten DZ. Da die Pulmonalarterien keine ausreichende Länge für drei Probenstanzen (Nativ, DB und EB) aufwiesen, wurde zuvor die Zugfestigkeit einer

Kohorte von 10 Nativproben gemessen, welche mit den dezellularisierten und enzymbehandelten Proben verglichen werden konnte.

5.7.12 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit den Programmen Microsoft Excel (Microsoft Excel 2019; Microsoft Corporation) und Graph Pad Prism 6 (GraphPad PRISM; GraphPad Software Inc.) durchgeführt. Zur statistischen Beurteilung der Normalverteilung wurde der D'Agostino-Pearson Test angewendet. So konnte festgestellt werden, ob die gemessenen Werte einer Normalverteilung folgten [176]. Es erfolgte die Berechnung von Mittelwerten und Standardabweichungen bei wiederholten Messungen eines Durchlaufs. Diese werden hier nun mit Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Die Identifizierung von Varianzen zwischen einzelnen Gruppen geschah mithilfe des ungepaarten t-Tests und einer One-way Anova mit Greenhouse-Geisser Korrektur sowie dem Test nach Tukey mit Berechnung des Signifikanzniveaus mittels p-Wert [177]. So konnte jeweils von allen Gruppen multiple Vergleiche gezogen werden. Dabei wurden Ergebnisse als signifikant bewertet, wenn sie das Signifikanzniveau von 5 % unterschritten. Demnach galten Werte als signifikant, wenn $p < 0,05$ betrug, als hoch signifikant bei $p < 0,01$ und höchst signifikant bei $p < 0,001$.

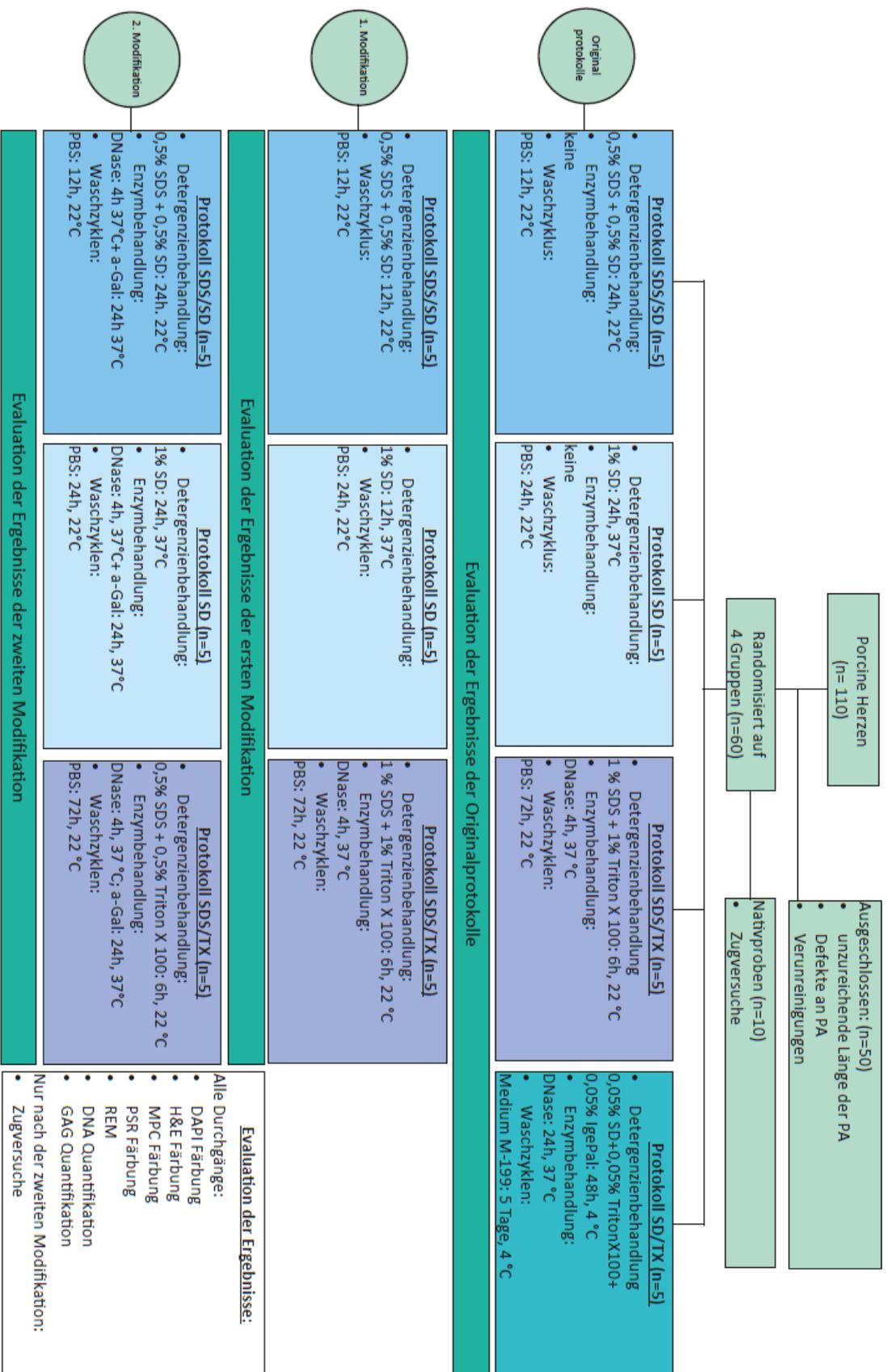


Abbildung 5.8: Algorithmus des Experimentes: Es wurden vier verschiedene DZ-Methoden ausgewählt, wovon 3 im weiteren Verlauf zweimal modifiziert wurden

6. ERGEBNISSE

6.1 Makroskopische Beurteilung der Arterien

Alle Pulmonalarterien die für die Versuche genutzt wurden waren zu Beginn intakt. Keine der Arterien wies Plaques oder makroskopische Pathologien der Wand auf. An der Außenseite der Wand waren teilweise Reste von Bindegewebe zu sehen, welches bei der Präparation nicht vollständig entfernt werden konnte. Auch nach der DZ präsentierten sich die PA ohne Defekte. Die Überreste des anhängenden Bindegewebes wurden durch die DZ vollständig entfernt, sodass sich sowohl das Lumen, als auch die Außenseite der Wand makroskopisch glatt darstellten. Da auch Verfärbungen und Auflagerungen herausgewaschen wurden, war das Gewebe nach der DZ gleichmäßig hell.

Vor der DZ wurde jeweils die Länge und der Umfang der Arterien gemessen. Die Länge der genutzten Pulmonalarterien betrug nativ circa $5,88 \pm 0,41$ cm. Im Verlauf des Versuchs zeigte sich keine Veränderung des Umfangs der PA. Diese betrug im Mittel $5,97 \pm 0,29$ cm.

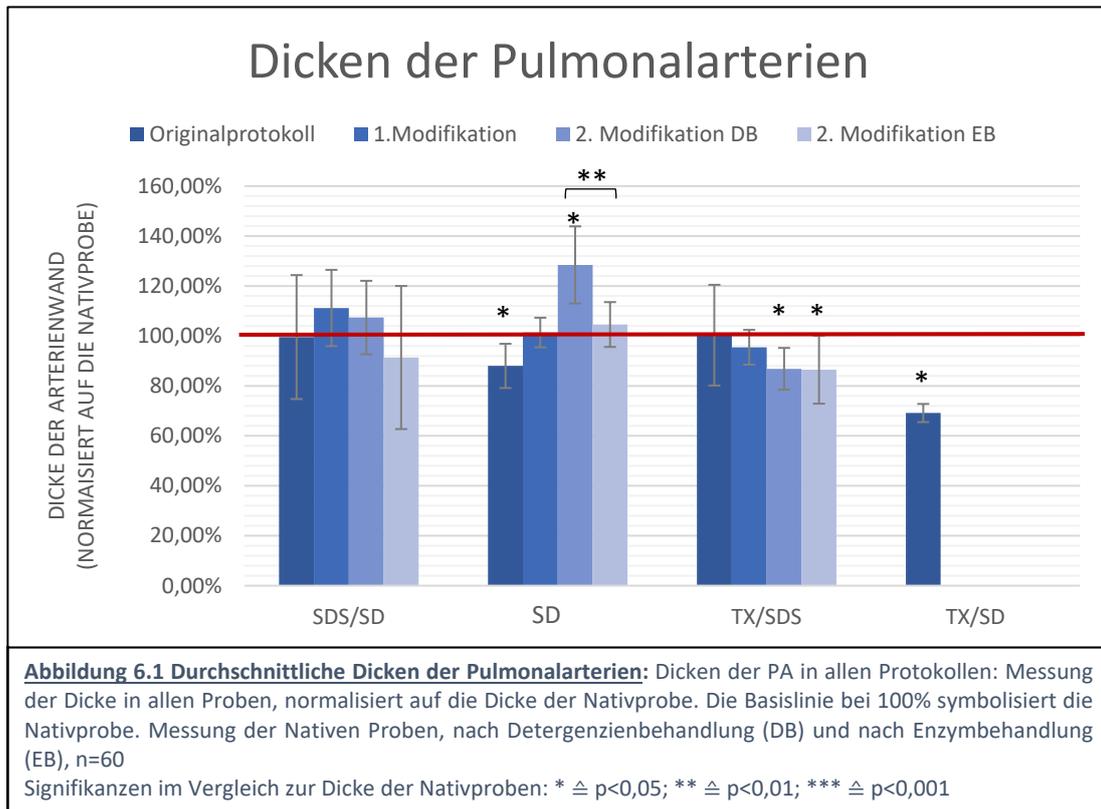
Zur Beurteilung des Gewebes der Arterien wurde eine Dickenmessung im Verlauf der Versuche durchgeführt. Die Wanddicke der nativen Arterien von allen Durchgängen von allen Protokollen betrug im Durchschnitt $2,13 \pm 0,23$ mm. Sie nahm nach allen DZ-Protokollen, insbesondere jedoch nach Verwendung von SDS/SD und TX/SDS, ab. Eindrücklich war die Veränderung der Wanddicke mit Anwendung der zweiten Modifikationen. Hier reduzierte sich die Dicke nach Verwendung von SDS/SD in den detergenzien-behandelten Proben nur minimal um 2 %. Anschließend erfolgte jedoch eine signifikante Reduktion der Dicke durch die Enzymbehandlung um 13 % auf $1,98 \pm 0,30$ mm ($p > 0,05$). Die Proben des Protokolls TX/SD wurden bereits durch die DB deutlich dünner und hatten eine Dicke von $1,83 \pm 0,16$ mm was einer Reduktion um 13 % entspricht. Die EB Proben wiesen eine weitere Verminderung der Dicke auf $1,77 \pm 0,12$ mm auf. Diese Reduktion war ebenso im Vergleich zu den Nativproben signifikant ($p < 0,05$). Bei Protokoll SD stellte sich ein diskontinuierlicher Verlauf in der Wanddicke dar. Hier kam es zu einer mittleren Zunahme der Wanddicke um 19 % nach der DB. Erst die EB führte zu einer deutlichen und signifikanten Reduktion der

ERGEBNISSE

Gewebedicke um 23 % auf $1,84 \pm 0,20$ mm ($p < 0,01$). Insgesamt führte also die Enzymbehandlung zu einer deutlichen Reduktion der Wanddicke in allen Proben.

Tabelle 6.1: Dicken der Pulmonalarterien bei Verwendung der zweiten Modifikationen und Enzymen;
 Signifikanzen im Vergleich zur Nativprobe: * $\triangleq p < 0,05$; ** $\triangleq p < 0,01$
 Angaben in mm; n=5; DB= Detergenzienbehandlung, EB: Enzymbehandlung

Dicken der Pulmonalarterien nach der zweiten Modifikation [in mm]			
	Nativ	DB	EB
SDS/SD	$2,28 \pm 0,16$	$2,26 \pm 0,33$	$1,98 \pm 0,30$
SD	$2,01 \pm 0,24$	$2,40 \pm 0,26^*$	$1,84 \pm 0,20^{**}$
TX/SDS	$2,10 \pm 0,21$	$1,83 \pm 0,16^*$	$1,78 \pm 0,12^*$



6.2 DAPI Fluoreszenz Färbung

6.2.1 Nativproben

Zur ausführlichen Beurteilung des Dezellularisationserfolges wurden die Proben zunächst nativ untersucht. Dabei zeigten die Pulmonalarterien in der DAPI-Färbung eine homogene Verteilung der DNA in der Arterienwand in allen Wandschichten, die durch die Bindung von DAPI fluoreszierte (s. Abb. 6.2). In dieser Färbung lässt sich annehmen, dass jeder fluoreszierende, helle Punkt einen Zellkern mit der enthaltenen DNA darstellt. Die luminale Seite konnte stets von der Außenseite abgegrenzt werden. Die Oberfläche der Intima war meist glatt begrenzt, während die Adventitia durch Bindegewebsreste nach der Präparation Unebenheiten aufwies. Der Hintergrund und damit die EZM war in dieser Färbung nur wenig beurteilbar. Die DAPI Färbung der nativen PA wurde als Vergleichswert für die Evaluierung der behandelten Proben genutzt. Im Durchschnitt waren die unbehandelten PA circa $1450,50 \pm 211,14 \mu\text{m}$ dick.

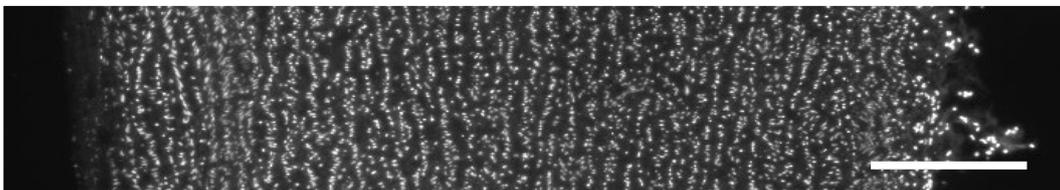


Abbildung 6.2: Unbehandelte Pulmonalarterie in der DAPI Färbung: Die hellen Punkte entsprechen der DNA der Zellkerne, welche sich im gesamten Querschnitt darstellen. Sie zeigen sich homogen in allen Wandschichten verteilt. Die Zellkerne erscheinen geordnet, vermutlich im Richtungsverlauf der Bindegewebsfasern, weshalb sich die dargestellte Längsstruktur zeigt. Die EZM ist in dieser Färbung nur begrenzt zu beurteilen. Maßstab: 500 μm

6.2.2 Originalprotokolle

Im ersten Versuchsdurchgang erfolgte die Reproduktion der Originalprotokolle zur Prüfung der in der Literatur dargestellten Ergebnisse. Dabei zeigten die Prozeduren sehr variierende Effekte.

Nach Verwendung des Kombinationsprotokolls SDS/SD konnte in drei der PA eine vollständige Entfernung der DNA nachgewiesen werden (s. Abb 6.3 A). Zwei der fünf Proben präsentierten fluoreszierende Anteile, die auf einen Verbleib von wenigen DNA-

ERGEBNISSE

Rückständen hinwies. In allen Proben war in der Tunica intima ein Bereich ohne jegliche Anzeichen von Fluoreszenz von durchschnittlich 55,54 % der Breite der Arterienwand sichtbar. In diesem Abschnitt konnte die DNA in allen Proben vollständig von der EZM gelöst werden, was eine höchst signifikante DZ darstellte ($p < 0,001$).

Protokoll SD zeigte in allen Arterien DNA-Rückstände. In drei der fünf Proben konnten im gesamten Querschnitt viele fluoreszierende DNA-Reste nachgewiesen werden, während sich bei den restlichen Proben nur vereinzelt DNA darstellte. Bei allen Proben war die DNA noch, wie in den Nativproben, gleichmäßig im Verlauf der Bindegewebsfasern angeordnet (s. Abb 6.3 B). An der Innenseite des Querschnitts präsentierte sich in allen Proben ein Bereich ohne fluoreszierende Anteile. Die Messung der prozentualen EDT ergab hier einen durchschnittlichen Wert von $12,68 \pm 2,99$ %, was signifikant in Bezug auf die gesamte Wanddicke war ($p < 0,001$).

Die DZ mittels TX/SDS führte in allen Proben zu einer Entfernung der DNA in den Randbereichen. Es stellte sich allerdings in den fünf PA ein fluoreszierender Mittelstreifen mit einer hohen Dichte an DNA dar (s. Abb 6.3 C). Die EDT betrug durchschnittlich insgesamt $47,19 \pm 12,26$ % der Gesamtdicke der PA ($p < 0,01$). Im Mittelstreifen war die fluoreszierende DNA geordnet und in regelmäßiger Struktur, wie in den Nativproben, zu finden.

Mit der vierten DZ-Methode wurde in allen Pulmonalarterien eine große Menge an DNA hinterlassen (s. Abb 6.3 D). Diese befand sich im gesamten Querschnitt, bis auf einen minimalen Bereich in der Tunica intima mit einer EDT von durchschnittlich $27 \pm 3,56$ % der gesamten Wanddicke, was im Vergleich zur gesamten Arterienwand keine signifikante Reduktion darstellte ($p > 0,05$). Im Rest der Probe zeigten sich die DNA-Rückstände jedoch unregelmäßiger als in den Nativproben, was vermutlich auf eine Ablösung aus der EZM und Destruktion der Zellkerne hinwies.

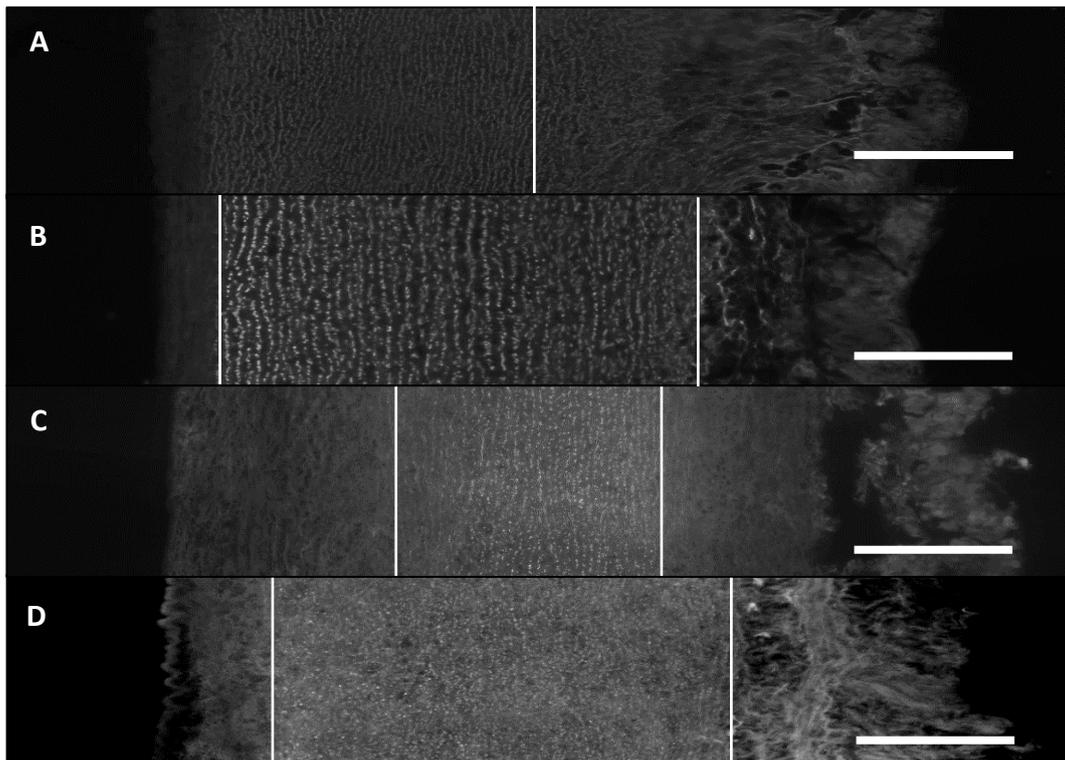


Abbildung 6.3: Pulmonalarterien in der DAPI Färbung nach Verwendung der Originalprotokolle: **A: SDS/SD:** Nach Verwendung des ersten Protokolls konnte in dieser PA keine DNA mehr nachgewiesen werden. In zwei der Proben waren noch disseminiert DNA-Reste sichtbar. Doch auch in diesen Proben betrug die EDT circa 50 %. **B SD:** Protokoll SD erreichte nur eine inkonsistente Entfernung der DNA in den verschiedenen Proben. Hier ist eine Probe mit viel DNA-Rückständen in ursprünglichem Verteilungsmuster abgebildet. Die EDT an der luminalen Seite war in allen Proben sichtbar. **C: TX/SDS:** Mit TX/SDS wurden in der Mitte des Querschnitts DNA-Reste hinterlassen, während die oberflächlichen Schichten gut dezellularisiert werden konnten. Insgesamt betrug so die EDT circa 50% und war damit signifikant **D: TX/SD:** Die DAPI Färbung der Proben von Protokoll TX/SD präsentierten DNA-Rückstände in allen Proben, welche jedoch irregulär und aufgelockert erschienen. Die Intima präsentierte sich in einem Teil der Proben frei von DNA. Die senkrechten Markierungen stellen die EDT dar. Eine Markierung in der Mitte des Bildes zeigt eine vollständige DZ bis zur Mitte der PA (s. Abb 6.3 A). Maßstab: 500 µm

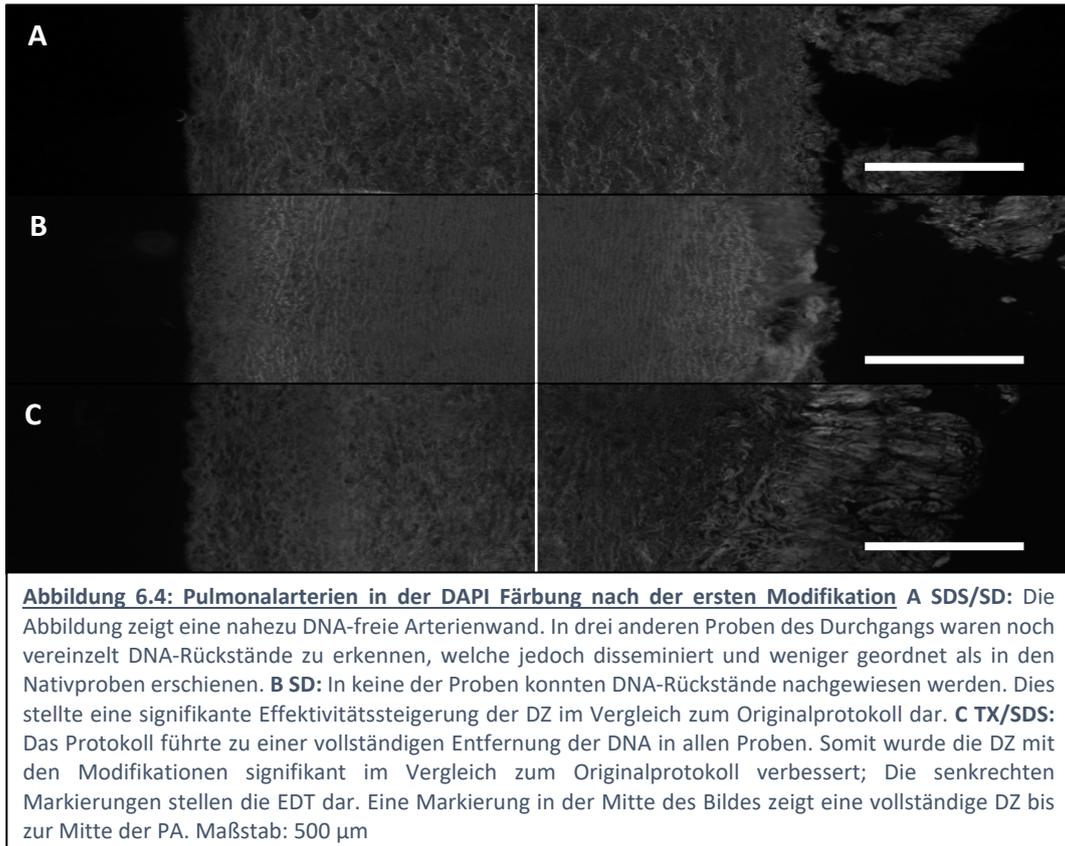
6.2.3 Erste Modifikation

Die neu konzipierten prozeduralen und physikalischen Verbesserungen präsentierten bereits in den Vorarbeiten (siehe Anhang) signifikante Steigerungen der Effektivität der DZ. Da nun auch mit den Modifikationen von einer Effektivitätssteigerung ausgegangen werden konnte, wurden die Detergenzien in Protokoll SDS/SD und Protokoll SD nur für die Hälfte der Zeit genutzt (12 h), mit dem Ziel die Aggressivität der DZ zu verringern. Da Protokoll TX/SDS bereits im Original sehr kurz war, wurde hier keine Verringerung der Inkubationszeit eingeführt.

Mit dem verkürzten Protokoll SDS/SD und den zusätzlichen Modifikationen konnte in der DAPI Färbung in drei der fünf Proben nur minimal verbliebene DNA detektiert werden. Es präsentierte sich eine mittlere EDT von $45,72 \pm 4,65$ % der Wanddicke, was insgesamt eine hoch signifikante Reduktion der DNA in Bezug auf die Nativprobe ($p < 0,01$) darstellte. Die Überreste waren vereinzelt und disseminiert in den Querschnitten der Arterienwand lokalisiert. Es konnte keine strukturierte Anordnung festgestellt werden, was eine Trennung der Zellkerne und der DNA vom Bindegewebe vermuten lässt. In den zwei restlichen Proben waren keine DNA-Reste mehr sichtbar (s. Abb. 6.4 A). Die Auswertung mittels DAPI-Färbung zeigte bei Protokoll SDS/SD insgesamt eine weniger effektive Entfernung der Zellkerne im Vergleich zum Originalprotokoll.

Auch Protokoll SD wurde bei Einführung der zusätzlichen Methoden um die Hälfte der Zeit verkürzt. Danach zeigten sich in keiner der Proben fluoreszierende Punkte (s. Abb. 6.4 B). Somit konnte eine vollständige Entfernung der DNA in der gesamten PA vermutet werden. Im Vergleich zur Nativprobe und auch zum Ergebnis des Originalprotokolls war hier eine signifikante Steigerung der EDT auf 100% sichtbar ($p < 0,001$).

Bei Verwendung von TX/SDS wurden ausschließlich die genannten prozeduralen und physikalischen Veränderungen hinzugefügt. Danach waren in keine der Proben dichte DNA-Reste in den Wandschichten zu finden (s. Abb. 6.4 C). Lediglich vereinzelt disseminierte helle Punkte deuteten auf einen Verbleib von DNA-Bestandteilen hin, welche jedoch losgelöst von der EZM erschienen. Dieses Ergebnis präsentierte eine signifikante Effektivitätssteigerung im Vergleich zum Originalprotokoll ($p < 0,001$) bei dem noch ein breiter Mittelstreifen von DNA nachzuweisen war.



6.2.4 Zweite Modifikation

Die zweite Modifikation beinhaltete die Einführung des Flusses durch das Arterienlumen und den Anschluss der Enzymbehandlung in allen Protokollen. In diesem Durchlauf wurden die Proben zu zwei Zeitpunkten, jeweils nach der DB und nach der EB entnommen, um das neue DZ-Verfahren isoliert zu beurteilen.

Die DZ mit Detergenzien alleine resultierte in Protokoll SDS/SD in keiner der Proben in einer vollständigen Entfernung der DNA in der DAPI Färbung. Mit der Methode konnte nur ein geringer Teil der DNA in den oberflächlichen Schichten (Tunica intima und adventitia) entfernt werden (s. Abb. 6.5 A1). So betrug die mittlere EDT außen und innen insgesamt nur $14,10 \pm 13,89$ % des Querschnitts, was im Vergleich zur Nativprobe keiner signifikanten Abnahme entsprach ($p > 0,05$). Das Ergebnis dieser DZ war im Vergleich zu Originalprotokoll außerdem signifikant schlechter. Nach der EB waren die Proben mikroskopisch schließlich vollständig frei von DNA-Rückständen (s. Abb. 6.5 A2). Die DAPI Färbung konnte in keiner der fünf Proben DNA detektieren und demonstriert damit

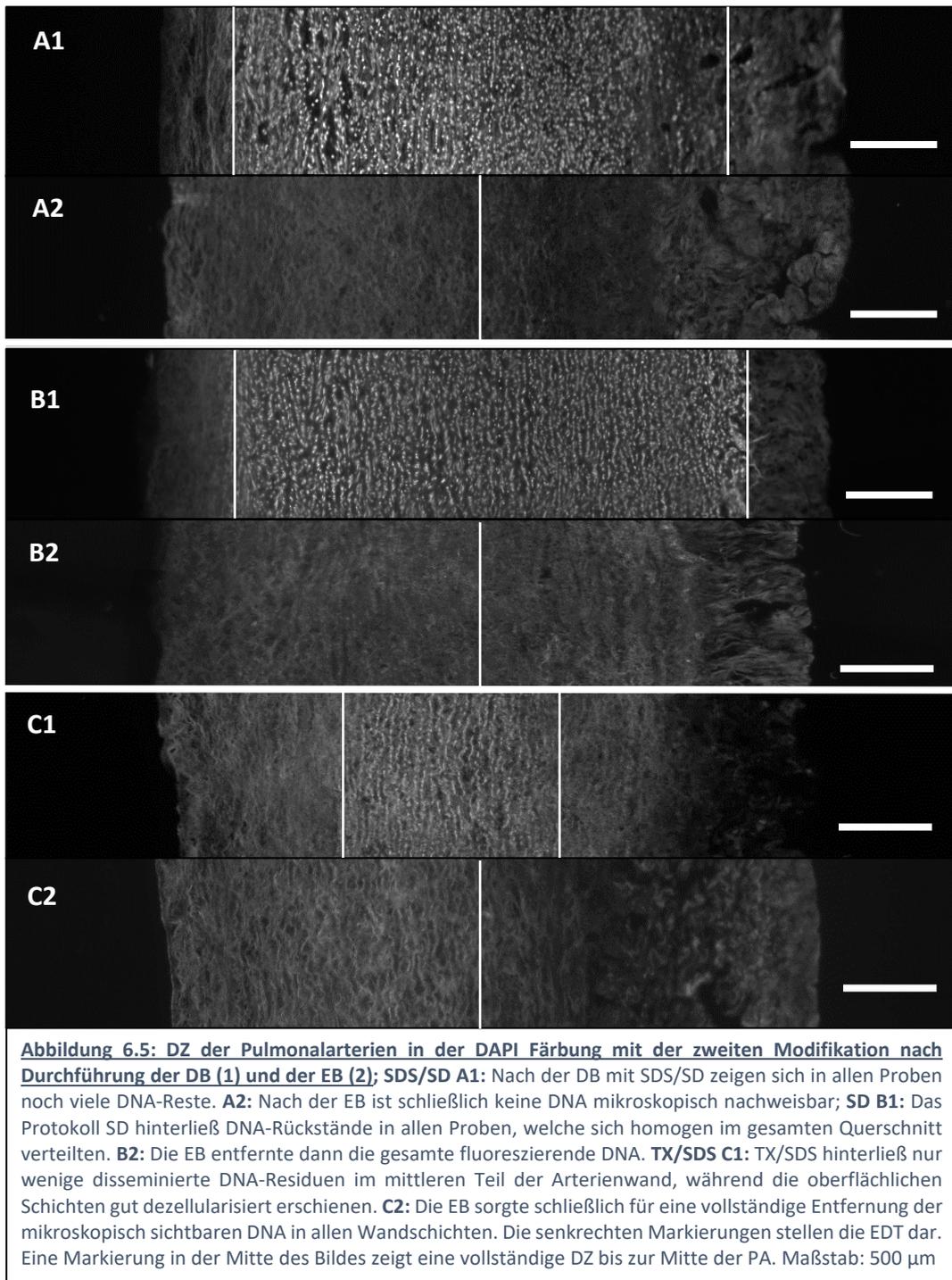
ERGEBNISSE

eine höchst signifikante Reduktion der DNA mit einer EDT von 100 % im Bezug zur Nativprobe ($p < 0,001$). Auch im Vergleich zum Originalprotokoll war die DNA-Reduktion signifikant verbessert ($p < 0,01$).

Bei Verwendung von SD ähnelte der Effekt dem vorherigen Verfahren. Bis auf einen kleinen Bereich an der Tunica intima zeigten sich nach der Behandlung mit Detergenzien alleine in der gesamten Arterienwand DNA-Reste, wodurch nur eine geringe EDT von $35,3 \pm 37,49$ % des Gesamtquerschnittes erreicht wurde (s. Abb. 6.5 B1). Die DNA-Residuen folgten einem homogenen Verteilungsmuster im Verlauf der Bindegewebsfasern, was auf eine unzureichende Ablösung der Anteile von der EZM hinwies. Die EB konnte dann auch hier eine deutliche Reduktion der Fluoreszenz erzielen und die DNA vollständig in allen Proben entfernen (s. Abb. 6.5 B2).

Nachdem mit TX/SDS bereits in der ersten Modifikation eine erfolgreiche DZ erreicht werden konnte, wurden im letzten Durchlauf die Konzentrationen der Detergenzien vermindert. Somit sollte die Aggressivität der Detergenzien reduziert werden. Die Reduktion der Konzentration von TX/SDS resultierte in einer geringeren Entfernung der DNA. In vier der fünf Proben war ein Mittelstreifen mit dicht geordneten DNA-Residuen sichtbar (s. Abb. 6.5 C1). Die letzte PA enthielt nur diffuse DNA-Residuen in allen Wandschichten. Die EDT war hier im Durchschnitt mit $30,21 \pm 17,19$ % des gesamten Querschnitts nicht signifikant ($p < 0,05$). In allen Proben bewirkte der Einsatz von Enzymen, wie bei den vorherigen Protokollen, eine vollständige DNA-Entfernung (s. Abb. 6.5 C2), was wieder eine signifikante Verbesserung der DZ im Vergleich zum Originalprotokoll darstellte ($p < 0,01$).

ERGEBNISSE



ERGEBNISSE

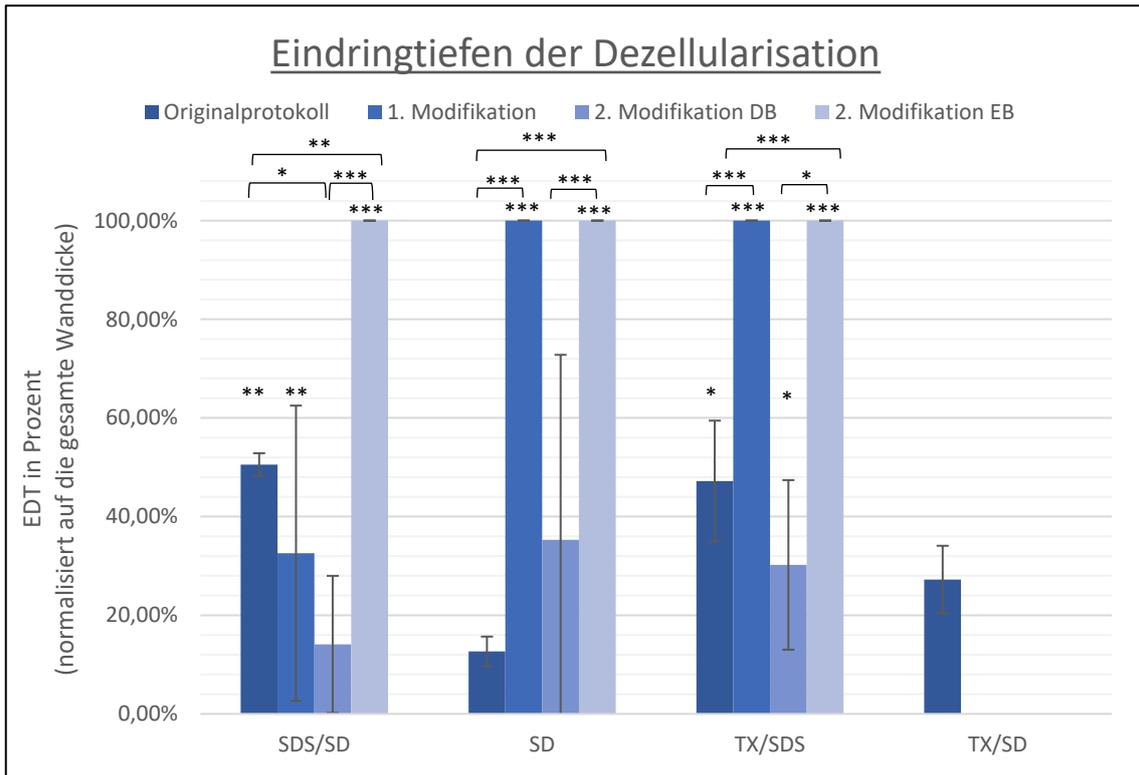


Abbildung 6.6: Prozentuale Eindringtiefen der Dezellularisation in allen Protokollen: Messung der Bereiche ohne fluoreszierende DNA in der DAPI Färbung. Eindringtiefe gesamt entspricht der Bereiche an Innen- und Außenseite; Prozentuale EDT abhängig von der Gesamtdicke der Arterienwand. DB= Detergenzienbehandlung, EB: Enzymbehandlung; n=60; Die Signifikanzen ohne Verbindungsbalken beziehen sich auf den Vergleich mit der Nativprobe * \triangleq p<0,05; ** \triangleq p<0,01; *** \triangleq p<0,001

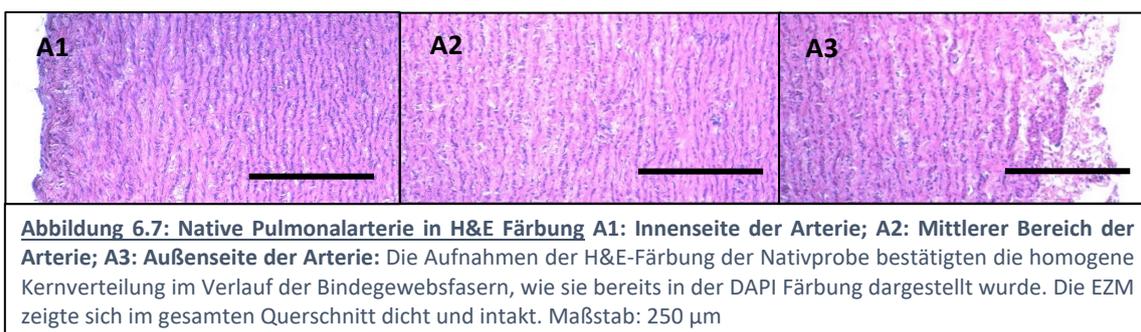
Tabelle 6.2: Prozentuale Eindringtiefe der Detergenzien in der DAPI Färbung: Die Eindringtiefe ist der Bereich der Arterie der ohne Nachweis von fluoreszierender DNA dargestellt wird. Die gesamte EDT entspricht dem Bereich an der Innen- und der Außenseite. Angaben der EDT in % der Gesamtbreite der Arterienwand; DB= Detergenzienbehandlung, EB: Enzymbehandlung; n=60
Signifikanzen im Vergleich zur Nativprobe: * \triangleq p<0,05; ** \triangleq p<0,01; *** \triangleq p<0,001

	Originalprotokoll [in %]	1. Modifikation [in %]	2. Modifikation [in %]	
			DZ	EZ
Protokoll SDS/SD	50,54 ± 2,31 **	32,57 ± 29,93 **	14,10 ± 13,89	100 ± 0 ***
Protokoll SD	12,68 ± 2,99 **	100 ± 0 ***	35,30 ± 37,49 *	100 ± 0 ***
Protokoll TX/SDS	47,19 ± 12,26 *	100 ± 0 ***	30,21 ± 17,19 *	100 ± 0 ***
Protokoll TX/SD	27,23 ± 3,56 *			

6.3 Hämatoxylin-Eosin Färbung

6.3.1 Nativproben

Die H&E-Färbung ist eine Übersichtsfärbung zur Beurteilung des allgemeinen Zustandes des Gewebes. Die unbehandelten Proben wiesen in allen Wandschichten dunkelblaue punktförmige Strukturen auf (s. Abb. 6.7). Diese stellten mutmaßlich die Zellkerne dar. Ihr Verteilungsmuster war, wie in der DAPI Färbung, homogen und dicht im Verlauf der Bindegewebsfasern. Oberflächennah ließen sich vermehrt rundliche Punkte erkennen, welche vermutlich die rundlichen Kerne des Endothels darstellten, während zentral längliche Punkte, am ehesten Zellkerne der Muskelzellen, überwogen. Der Hintergrund der Schnitte war homogen rötlich und stellte die azidophile EZM dar. Wellenförmige Strukturen waren hauptsächlich in den äußeren Wandschichten zu sehen und konnten als Bindegewebsfasern interpretiert werden. In der Tunica media hingegen zeigten sich mehr violette Bereiche mit gleichmäßig verteilten Kernen, die am ehesten die Muskelfasern repräsentierten. Kongruent zu den DAPI Aufnahmen waren die Innenseiten der Arterienwände glatt und unbeschädigt, während die äußere Oberfläche eine lockere Faserstruktur präsentierte.



6.3.2 Originalprotokolle

Nach Verwendung von Protokoll SDS/SD stellten sich die Proben in der H&E-Färbung hochgradig destruiert und aufgelockert dar (s. Abb. 6.8 A 1-3). In drei der fünf behandelten Proben konnten keine dunklen Punkte nachgewiesen werden, was für eine

ERGEBNISSE

vollständige Entfernung der Zellkerne spricht. Die anderen beiden Proben enthielten nur vereinzelte Kerne im Mittelstreifen, die im Gegensatz zu den Nativproben kein homogenes Verteilungsmuster hatten. Das Gewebe zeigte sich in allen Proben aufgelockert und mit großen Löchern. Außerdem war das Gewebe besonders in den kernfreien Bereichen und den Randschichten heller, was eine besondere Destruktion in diesen Schichten vermuten lässt. Ein paralleler Strukturverlauf der Bindegewebsfasern wie in den Nativproben war in keinem Schnitt erkennbar (z.B. s. Abb. 6.8 A 2).

Die DZ mithilfe von 1 % SD führte zu einer deutlich anderen Darstellung der Arterien in der H&E Färbung als das erste Protokoll. Alle Proben wiesen in der gesamten Wand dunkelblaue Punkte, als vermutlicher Nachweis von Zellkernen, auf (s. Abb. 6.8 B 1-3). In Teilen der Wand waren diese Punkte etwas vermindert und auch die EZM stellte sich intermittierend aufgelockert und weniger dicht dar (s. Abb. 6.8 B 1-3). In der Tunica intima und adventitia schien die Dichte der blauen Punkte im Vergleich zur Nativprobe leicht reduziert (s. Abb. 6.8 B 1 und 3). Im Großteil der Proben war die Verteilung der Zellkerne jedoch ähnlich zur Nativprobe.

TX/SDS hinterließ in allen fünf Pulmonalarterien einen breiten Mittelstreifen mit dunkelblauen Punkten, die am ehesten den Zellkernen entsprachen (s. Abb. 6.8 C 2). Diese Punkte waren homogen im Verlauf der Fasern der EZM angeordnet. Die Außenseiten präsentierten sich ohne Zellen. Dabei war in zwei der PA ein breiterer Bereich ohne Rückstände auf der Innenseite sichtbar, während drei Arterien eher an der Außenseite zellfrei wirkten. Auf der jeweiligen Seite präsentierte sich das Gewebe zusätzlich heller und weniger dicht (s. Abb. 6.8 C 1 und 3).

Nach Durchführung von Protokoll TX/SD konnten im Gegensatz zur DAPI-Färbung keine dunklen Punkte mit der H&E-Färbung nachgewiesen werden. Das Gewebe zeigte sich allerdings stellenweise aufgelockert im Vergleich zu den Nativproben (s. Abb. 6.8 D 1-3).

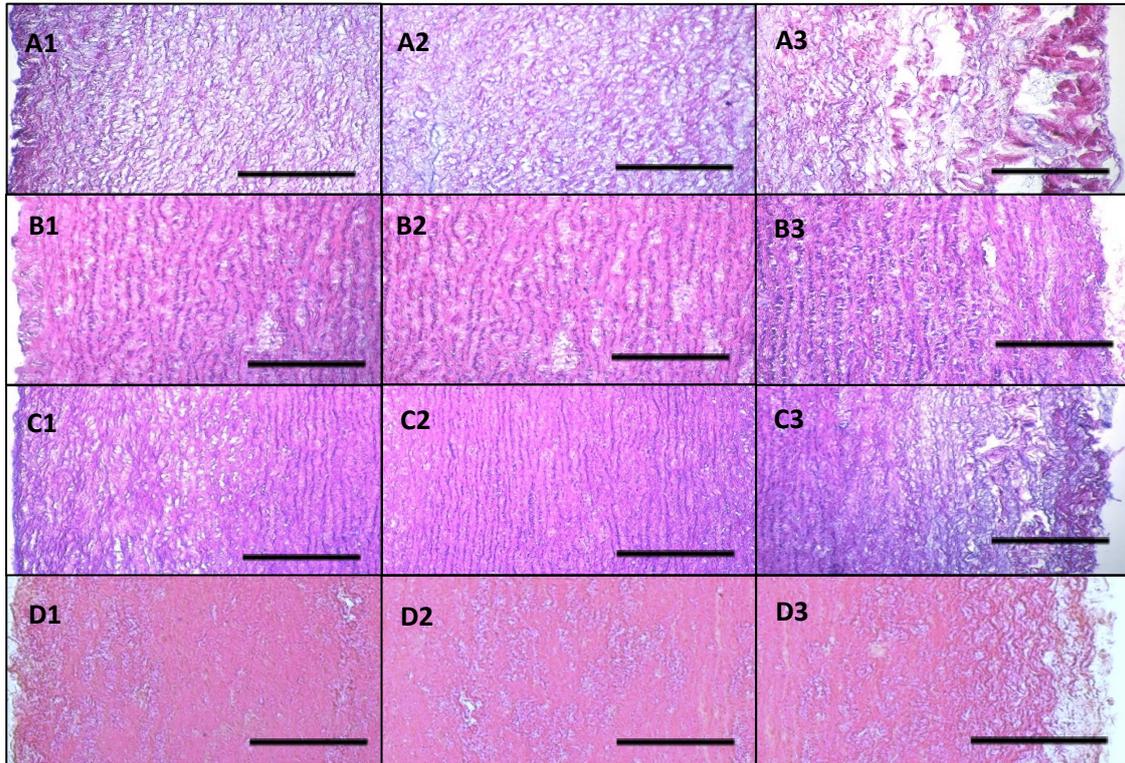


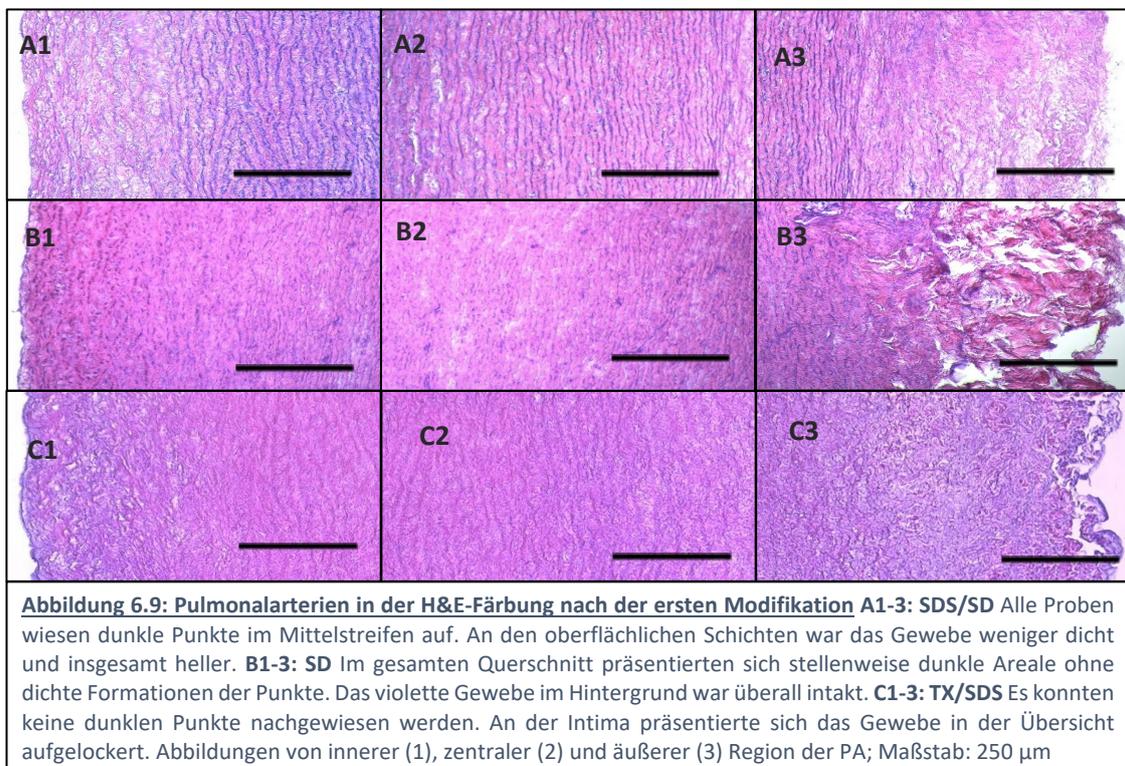
Abbildung 6.8: Pulmonalarterien in der H&E-Färbung nach Durchführung der Originalprotokolle A1-3: SDS/SD
 Nach Verwendung von SDS/SD stellten sich die meisten PA in der Übersichtsfärbung mit stark gelockerter EZM und irregulärem Faserverlauf dar. Dunkle Punkte, die die Zellkerne darstellten, konnten in keine der Proben nachgewiesen werden. **B1-3: SD** Dieses Protokoll hinterließ viele dunkle Rückstände in der Wand zurück. Das Gewebe zeigte sich stellenweise aufgelockert. **C1-3: TX/SDS** Hier präsentierten sich dunkle Punkte in einem Mittelstreifen in der Tunica media. In den oberflächlichen Schichten waren keine Punkte als Zellkerne sichtbar und das violette Gewebe, welches der EZM entsprach war deutlich mehr aufgelockert als in der Mitte. **D1-3: TX/SD** Die H&E Färbung wies keine dunklen Punkte in der Arterienwand nach. Die EZM zeigte sich stellenweise aufgelockert und mit Löchern in allen Wandschichten. Abbildungen von innerer, zentraler und äußerer Region der PA; Maßstab: 250 µm

6.3.3 Erste Modifikation

Nach den prozeduralen Veränderungen in Protokoll SDS/SD präsentierten sich vor allem im Mittelstreifen der Arterienwände dunkle Punkte, während die äußeren Wandbereiche nur violettes Gewebe zeigten (s. Abb. 6.9 A 1-3). In drei von fünf PA konnten voneinander abgrenzbare rundliche Punkte, was mutmaßlich einzelnen Zellkernen entsprach, nachgewiesen werden, während die andere beiden Proben nur vereinzelt dunkle Areale zeigten, welche DNA-Rückstände darstellen könnten. An der Außenseite des Querschnitts war ein breiterer Streifen ohne Punkte sichtbar als an der Innenseite, was zeigt, dass die EDT der Detergenzien hier tiefer war.

In Folge der ersten Modifikation von SD zeigten die Proben in der H&E-Färbung disseminiert dunkle Färbungen ohne jedoch dichte Ansammlungen von Punkten, welche Zellkernen entsprechen konnten (s. Abb. 6.9 B 1-3). Das Gewebe präsentierte sich in einer homogenen violetten Farbe ohne Löcher.

TX/SDS hinterließ mit den zusätzlichen prozeduralen Methoden keine dunklen Punkte in der Arterienwand (s Abb. 6.9 C 1-3). Drei der fünf PA zeigten im gesamten Querschnitt eine alleinige violette Färbung des Gewebes und in den zwei übrigen Proben stellten sich kleine Rückstände von dunkler Färbung dar. Das Gewebe präsentierte sich in den oberflächlichen Schichten aufgelockert und heller als im Mittelstreifen.



6.3.4 Zweite Modifikation

Nach der perfusions-basierten DZ mit SDS/SD konnte in allen Proben dunkle Punkte nachgewiesen werden (s. Abb. 6.10 A1.1-1.3). In drei der PA waren dichte Ansammlungen von Punkten im Mittelstreifen, während die restlichen Arterien nur wenige dunkle Rückstände zeigten. Bei der Mehrheit der Proben erschien die EDT der Detergenzien auf der Innenseite größer als auf der Außenseite, was sich durch einen breiteren Bereich ohne Punkte zeigte (s. Abb. 6.10 A1.1). Insgesamt waren die Ergebnisse der einzelnen PA jedoch stark inhomogen, sodass eine klare Aussage zur Seite der

ERGEBNISSE

tieferen EDT nicht möglich ist. In allen Wandschichten konnte ein wellenförmiger Faserverlauf der EZM durch die violette Färbung des Gewebes nachgewiesen werden. Nach der Enzymbehandlung wies keine der Proben dunkle Punkte auf. Die EZM der Arterienwand zeigte außerdem eine unveränderte Homogenität (s. Abb. 6.10 A2.1-2.3).

Nach Verwendung von SD mit der zweiten Modifikation präsentierten sich ausgeprägte Unterschiede vor und nach der Enzymbehandlung. Nach der DB enthielten die Proben viele Punkte und präsentierten sich insgesamt sehr heterogen im Ausmaß des DZ-Erfolges (s. Abb. 6.10 B1.1-1.3). Bei zwei der Proben konnten insbesondere in der Intima noch Rückstände von DNA in Form von dunklen Punkten nachgewiesen werden (s. Abb. 6.10 B1.1), während die Tunica Media hingegen teils nur violettes Hintergrundgewebe zeigte. Das Gewebe erschien in allen Schichten gut erhalten. Nach der EB waren alle Arterien schließlich einheitlicher dezellularisiert. Alle PA zeigten ausschließlich violettes Gewebe ohne dunkle Punkte. Die EZM war ubiquitär dicht und ohne Löcher (s. Abb 6.10 B2.1-2.3).

Die Konzentrationen in Protokoll TX/SDS wurden in der finalen Modifikation vermindert. Danach enthielten alle PA dunkle Rückstände im Verlauf der Bindegewebsfasern ohne Ansammlungen von dunklen runden Punkten (s. Abb 6.10 C1.1-1.3). Das Gewebe präsentierte sich in allen Schnitten homogen violett. Als Folge der Enzymbehandlung konnten schließlich keine dunklen Rückstände in den Arterien mehr nachgewiesen werden. Die EZM blieb wie vorher homogen in allen Schichten (s. Abb 6.10 C2.1-2.3).

ERGEBNISSE

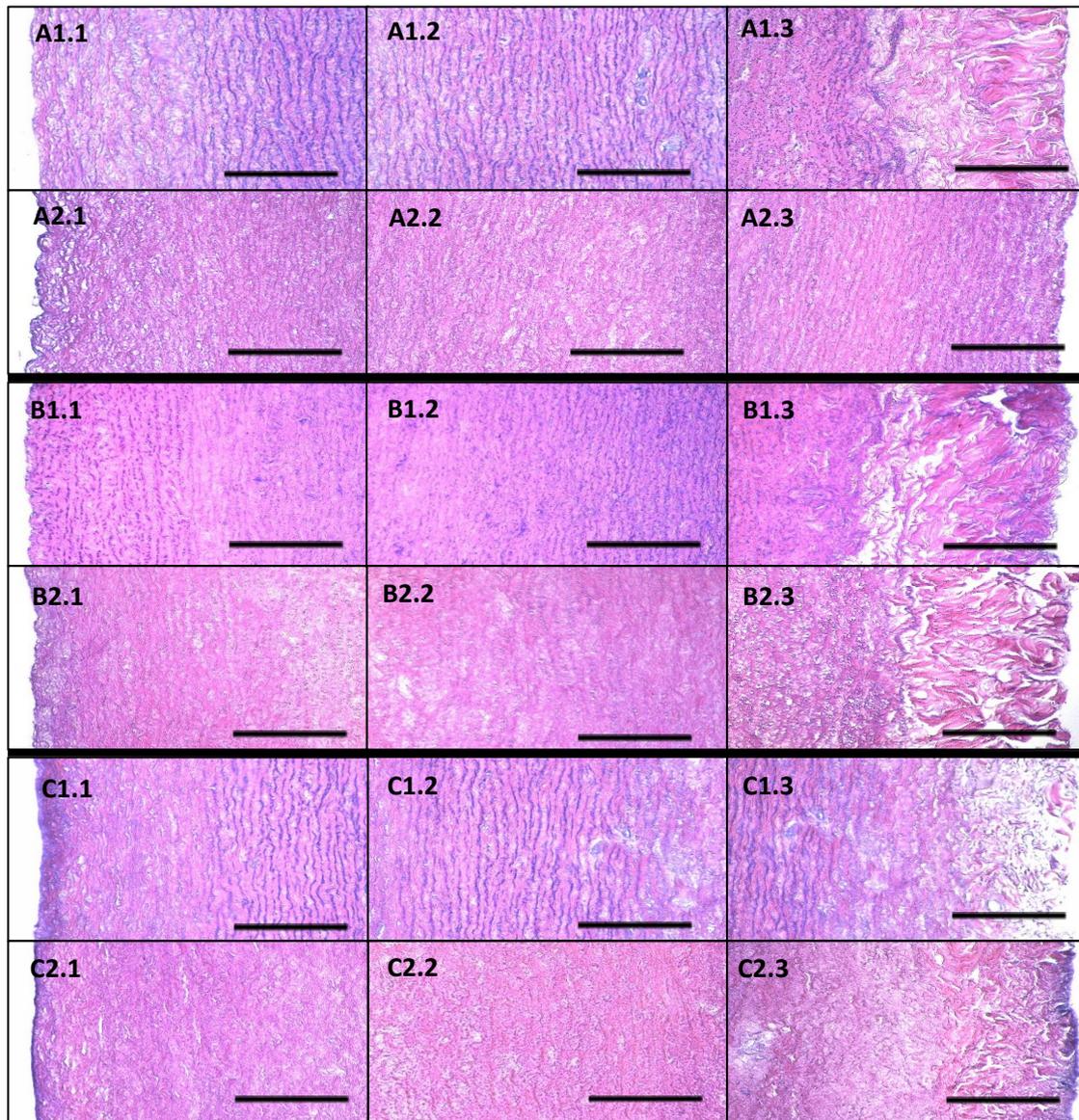


Abbildung 6.10: Pulmonalarterien in der H&E-Färbung nach Durchführung der DZ mit der zweiten Modifikation nach der Detergenzienbehandlung (DB) und nach Enzymbehandlung (EB) A1.1-1.3: SDS/SD nach DB: In der Mehrzahl der Proben zeigten sich im Mittelstreifen dunkle Punkte. Insbesondere an der Innenseite erscheint das Hintergrundgewebe aufgelockert. **A2.1-2.3: SDS/SD nach EB:** Alle Proben präsentierten sich frei von Punkten. Das Hintergrundgewebe stellte sich luminal weiterhin etwas aufgelockert dar **B1.1-1.3: SD nach DB:** Nach Verwendung von 1 % SD zeigten sich die Proben insgesamt sehr heterogen. In allen Proben waren jedoch dunkle Punkte zu finden. **B2.1-2.3: SD nach EB:** Auch hier befanden sich nach EZ keine dunklen Färbungen mehr im Gewebe. Das violette Gewebe zeigte sich im gesamten Querschnitt intakt und ohne Auflockerungen. **C1.1-1.3 TX/SD nach DB:** Insbesondere im Mittelstreifen zeigten sich dunkle Punkte. Das violette Gewebe war stellenweise aufgelockert, insgesamt jedoch gut erhalten. **C2.1-2.3 TX/SD nach EB:** Alle PA waren homogen violett ohne dunklere Färbungen oder helleren Löchern. Abbildungen von innerer, zentraler und äußerer Region der PA; Maßstab: 250 µm

6.4 Movat`s Pentachrom Färbung

6.4.1 Nativproben

Bei dieser Färbung steht die Begutachtung der EZM im Vordergrund. Sie gibt einen optimalen Überblick über den Aufbau der Arterienwand mit den drei Schichten und den verschiedenen Anteilen des Stützgewebes.

Die Nativproben zeigten dabei den Wandaufbau mit den unterschiedlichen Schichten im Detail (s. Abb. 6.11 A1-3). Die Tunica intima ist dabei, wie bereits in den vorherigen Färbungen, glatt begrenzt. Der Hauptteil dieser Schicht besteht aus Kollagenfasern, die in der Movat`s Pentachrom Färbung (MPC) gelb erscheinen, sowie die Hintergrunds substanz der EZM, die sich blau-grün präsentiert. Die Oberfläche aus Endothelzellen, deren Kerne sich als schwarze, rundliche Strukturen präsentierten und Kollagen, welches gelb leuchtete, war in allen Schnitten intakt. Die grünliche Grundsubstanz präsentiert das Zytoplasma sowie die Glykosaminoglykane, welche hier den intakten Zustand der EZM bewiesen. In der Tunica media dominierten elastische Fasern, welche in dieser Darstellung rot angefärbt sind. Auch Kollagenfasern, die in der Tunica media vermutlich dem Kollagen Typ I entsprechen, waren hier deutlich sichtbar. Die Außenseite stellte sich ähnlich der Intima mit grüner Grundsubstanz und gelbem Kollagen, allerdings mit kleineren dunklen Punkten dar. An der Außenseite waren, übereinstimmend mit DAPI und H&E-Färbung, Bindegewebsfragmente zu sehen.

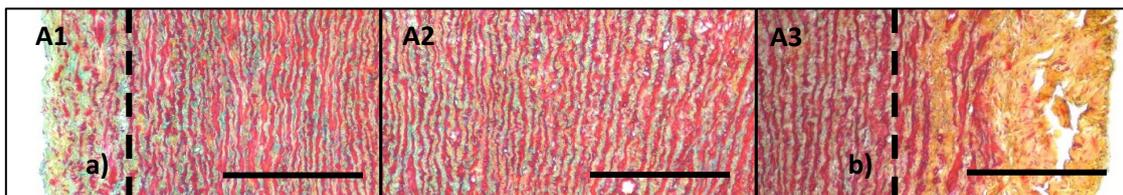


Abbildung 6.11: Unbehandelte Pulmonalarterien in der Movat`s Pentachrom Färbung A1: Innenseite der Arterie; A2: Mittlerer Bereich der Arterie; A3: Außenseite der Arterie: Grün: Grundsubstanz der EZM mit Glykosaminoglykanen; Gelb: Kollagene Fasern; Rot: Elastische Fasern. Die MPC-Aufnahmen der Nativproben zeigten einen intakten Aufbau der Arterienwand. Die EZM präsentierte sich im gesamten Querschnitt dicht und intakt. Kollagen und elastische Fasern konnten in allen Proben nachgewiesen werden. Die senkrechten Linien kennzeichnen jeweils den Übergang zwischen den verschiedenen Schichten (a) Intima zu Media und b) Media zu Adventitia. Maßstab: 250 µm

6.4.2 Originalprotokolle

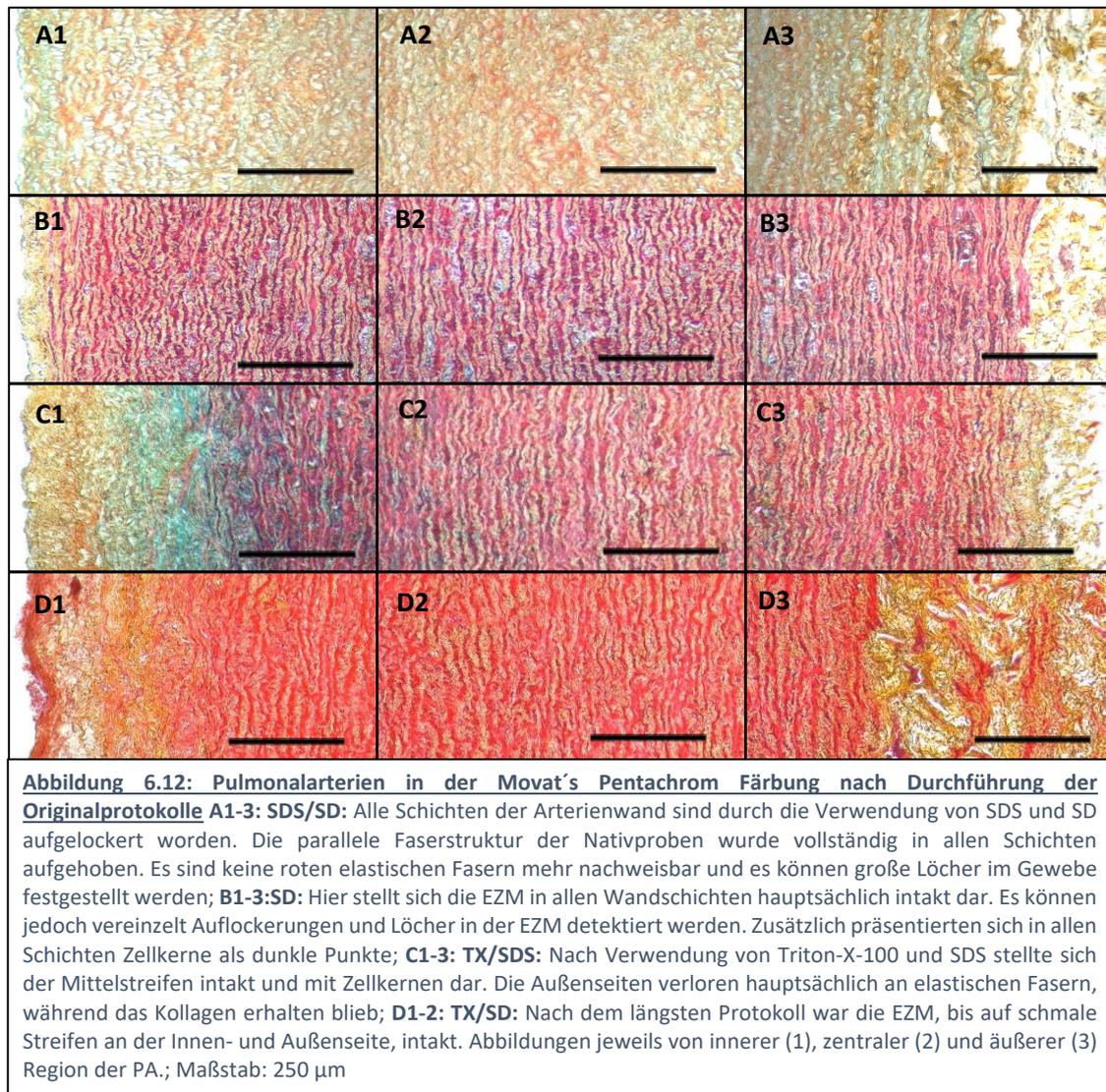
Die Reproduktion der unterschiedlichen Protokolle zeigte in der MPC-Färbung deutliche Variationen in der Effektivität der Verfahren. Protokoll SDS/SD sorgte für einen starken Defekt in der EZM, welcher in der MPC-Färbung deutlich sichtbar wurde (s. Abb. 6.12 A1-3). Im gesamten Querschnitt war ein Strukturverlust mit großen Löchern sowie ein Verlust der parallelen Faserstruktur zu sehen. Des Weiteren zeigte sich in drei der fünf Proben ein vollständiges Fehlen der roten elastischen Fasern, sodass in allen Schichten nur noch Kollagenfasern und GAG sichtbar waren. In keine der Proben konnten schwarze Punkte, welche Zellkerne entsprechen würden, dargestellt werden.

Nach Verwendung von Protokoll SD war die EZM und ihre Dreischichtung gut erhalten. An wenigen Stellen waren Löcher im Gewebe und die Faserstruktur aufgelockert. Es zeigten sich in allen Schichten von allen Proben disseminiert Zellkerne als dunkle Punkte (s. Abb. 6.12 B1-3).

Mit TX/SDS zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen dem Mittelstreifen und den oberflächlicheren Schichten. In der Tunica media stellte sich die EZM intakt dar und es konnten vereinzelt dunkle Punkte gefärbt werden (s. Abb. 6.12 C2). Die Innen- und Außenseite präsentierten Auflockerungen und Defekte der Faserstrukturen. Es konnte ein Verlust von elastischen Fasern beidseits detektiert werden, während das Kollagen erhalten blieb. An der Innenseite der Arterie war außerdem vermehrt grünliche Grundsubstanz zu sehen (s. Abb. 6.12 C1 und 3). In den oberflächlichen Wandbereichen waren keine Zellkerne nachweisbar.

Protokoll TX/SD führte in der MPC-Färbung zu einem Substanzverlust in den oberflächlichen Schichten. Insbesondere die Tunica intima erschien aufgelockert und ohne grünliche GAG und einem verminderten Kollagengehalt (s. Abb. 6.12 D1). Insgesamt war das Gewebe jedoch weitgehend intakt, mit einem parallelen Faserverlauf und ohne Auflockerungen zentral. Es präsentierten sich vereinzelt Zellkerne als dunkle Punkte im gesamten Schnitt.

ERGEBNISSE



6.4.3 Erste Modifikation

Die erste Modifikation von Protokoll SDS/SD führte nur zu einem leichten Verlust von Grundsubstanz an der Außenseite, während die Tunica intima viel Kollagen und hauptsächlich elastische Fasern verlor (s. Abb. 6.13 A1 und 3). Hier war kein paralleler Faserverlauf mehr sichtbar. Zentral war die EZM in der MPC-Färbung weitgehend intakt und ohne große Löcher (s. Abb. 6.13 A2). Die Tunica media wies vereinzelt dunkle Punkte als Zellkerne auf.

SD führte zum Verbleib von schwarzen Punkten in der MPC-Färbung, was für eine geringe Entfernung von Zellkernen sprach (s. Abb. 6.13 B1-3). Grüne Hintergrundsubstanz, welche die Glykosaminoglykane repräsentierte, ging in zwei der

ERGEBNISSE

Proben verloren. Kollagen und elastische Fasern waren in der Mehrheit der Arterien im gesamten Querschnitt erhalten (s. Abb. 6.13 B1-3).

Nach Verwendung von Protokoll TX/SDS wurden mit den Verfahren der ersten Modifikation alle elastischen Fasern aus den oberflächlichen Schichten entfernt (s. Abb. 6.13 C1 und 2). Die MPC-Färbung zeigte außerdem einen Verlust der Grundsubstanz mit GAG und eine Auflockerung der Tunica adventitia und intima. Dieser defekte Bereich der EZM war an der Innenseite der Arterie breiter als an der Außenseite. In der Mitte präsentierte sich ein intaktes Gewebe mit parallelen elastischen Fasern und Kollagen. Stellenweise konnten durch die Abbildung von schwarzen Punkten zentral Zellkerne nachgewiesen werden (s. Abb. 6.13 C2).

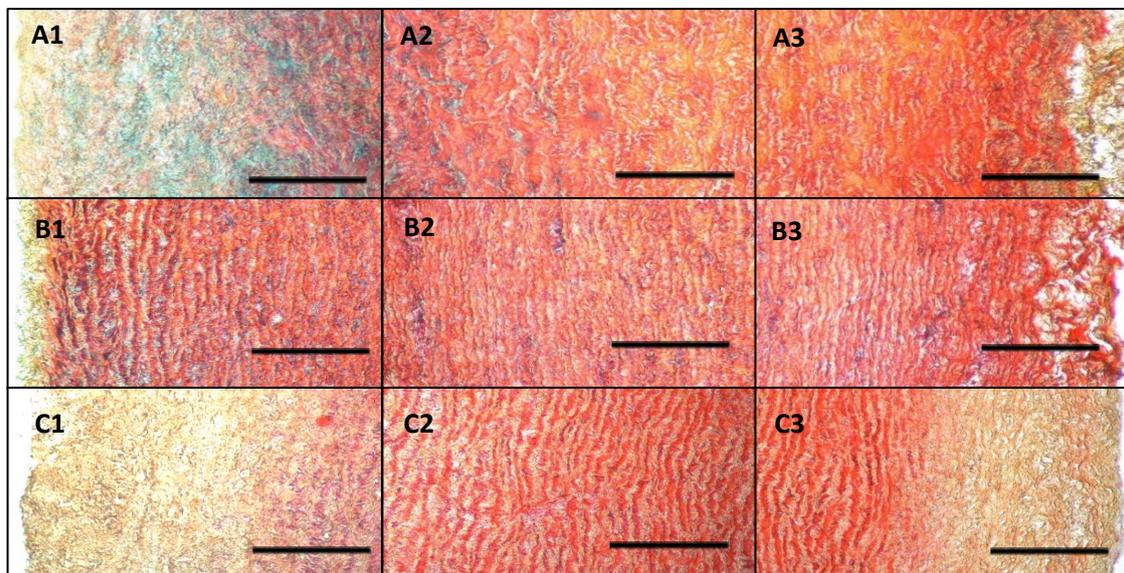


Abbildung 6.13: Pulmonalarterien in der Movat's Pentachrom Färbung nach Durchführung der Protokolle mit der ersten Modifikation A1-3: SDS/SD: Die EZM war in der Mitte der Arterienwand intakt, während die Außenseiten jeweils aufgelockert erschienen. Insbesondere an der Intima stellte sich ein breiter Streifen mit Auflockerungen und einem Verlust von elastischen Fasern dar; B1-3: SD: Die EZM konnte nach der Verwendung von 1 % SD intakt dargestellt werden und präsentierte sich in allen Schichten dicht und ohne Löcher. Es konnten hinterlassene Zellkerne als schwarze Punkte detektiert werden; C1-3: TX/SDS: Diese Prozedur führte zu einem Verlust von Grundsubstanz und elastischen Fasern in den oberflächlichen Schichten. Nur die Tunica media war vollständig erhalten, hier präsentierten sich jedoch auch vereinzelt Zellkerne. Abbildungen jeweils von innerer (1), zentraler (2) und äußerer (3) Region der PA.; Maßstab: 250 µm

6.4.4 Zweite Modifikation

Die perfusions-basierte DZ führte nach der Verwendung von SDS/SD zu inhomogenen Ergebnissen in den einzelnen Arterien. In drei von fünf Proben konnten noch Zellkerne im Mittelstreifen nachgewiesen werden (s. Abb. 6.14 A 1.2). Die MPC-Färbung zeigte außerdem einen Verlust von rötlichen elastischen Fasern und grünlichem GAG-Gehalt, insbesondere in den oberflächlichen Schichten (s. Abb. 6.14 A 1.1-1.3). Im Anschluss an die EB konnten in keiner der PA dunkle Punkte dargestellt werden. Die Grundsubstanz ging weiter zurück und die EZM erschien nun auch zentral leicht aufgelockert sowie mit einer weiteren Verminderung von elastischen Fasern. Insgesamt war das Gewebe jedoch intakt und dicht (s. Abb. 6.14 A 2.1-2.3).

Mit Protokoll SD unter Verwendung der Detergenzien alleine konnte die EZM-Integrität gut erhalten bleiben (s. Abb. 6.14 B 1.1-1.3). Es konnten vereinzelt Zellkerne als dunkle Punkte angefärbt werden, welche sich hauptsächlich in der Mitte der Wand befanden. An der Tunica intima war ein Verlust von elastischen Fasern und GAG zu sehen (s. Abb. 6.14 B 1.1). In den enzymbehandelten Proben hingegen waren keine dunklen Punkte detektierbar. Die Proben bestanden hauptsächlich aus Kollagen und elastischen Fasern. Die Grundsubstanz der EZM erschien vermindert (s. Abb. 6.14 B 2.1-2.3).

Die MPC-Färbung zeigte nach Verwendung von TX/SDS mit der perfusions-basierten zweiten Modifikation einen vollständigen Erhalt von kollagenen und elastischen Fasern mit ihrem parallelen Faserverlauf (s. Abb. 6.14 C 1.1-1.3). Die grün angefärbte Hintergrundsubstanz war im Vergleich zu den Nativproben vermindert. Es waren keine dunklen Punkte, welche die Zellkerne repräsentieren, nachzuweisen. Nach der EB konnten kollagene und elastische Fasern weiterhin ubiquitär detektiert werden, jedoch war ihre Dichte in den oberflächlichen Schichten verringert. Es zeigten sich keine Defekte oder Faserabbrüche. Die grünliche Grundsubstanz war, wie in den dezellularisierten Proben, reduziert. Es konnten in keiner der Proben schwarze Punkte angefärbt werden (s. Abb. 6.14 C 2.1-2.3).

ERGEBNISSE

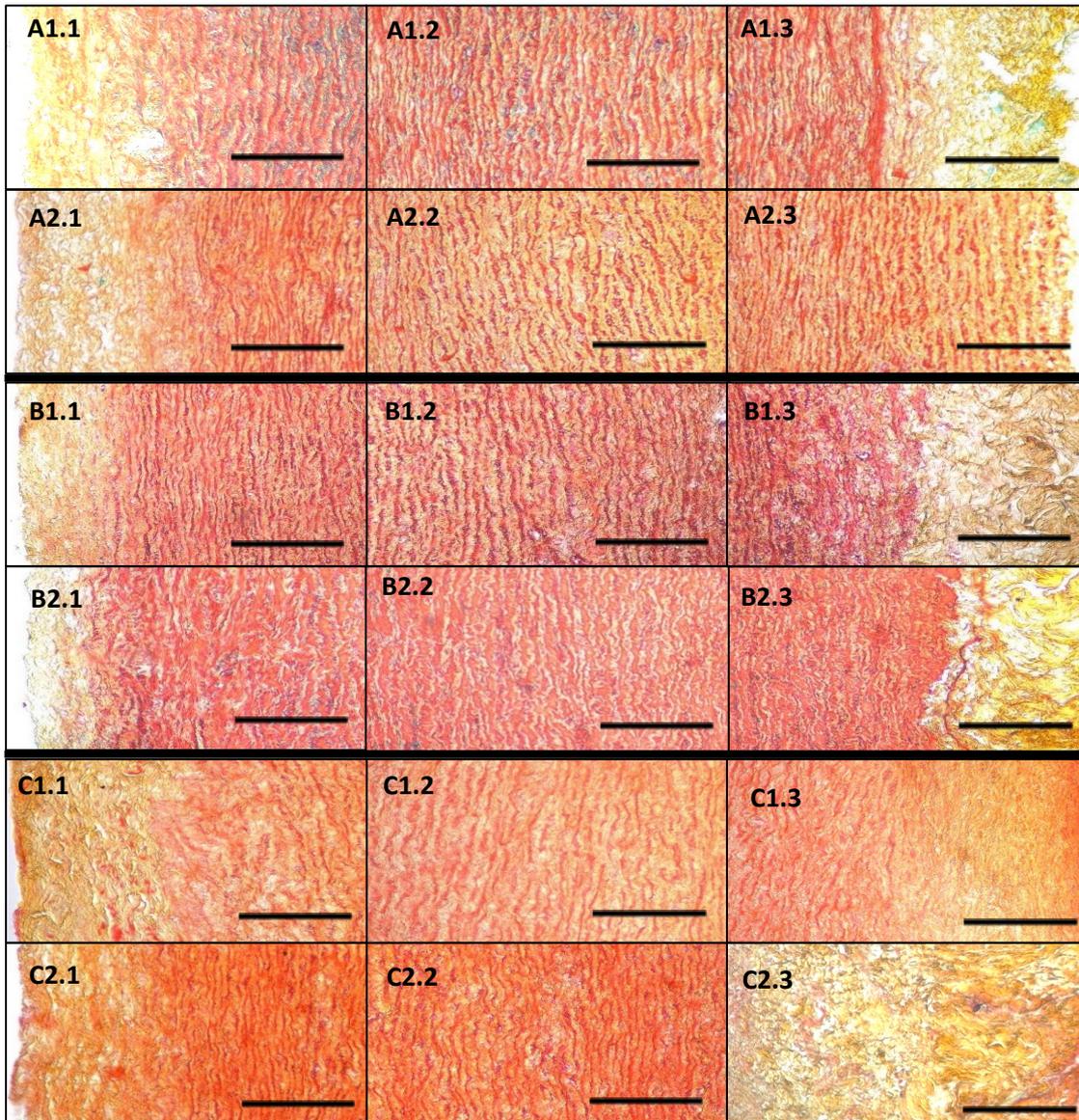


Abbildung 6.14: Pulmonalarterien in der Movat's Pentachrom Färbung nach Durchführung der DZ mit zweiten Modifikation nach der Detergenzienbehandlung (DB) und nach der Enzymbehandlung (EB) A1.1-1.3 SDS/SD nach DB: Es präsentierten sich inhomogene Ergebnisse in den 5 Proben, diese Abbildung zeigt eine zellfreie PA mit kollagenen und elastischen Fasern in der EZM. In den oberflächlichen Schichten erscheint die Grundsubstanz und die elastischen Fasern vermindert; **A2.1-2.3 SDS/SD nach EB:** Die EZM präsentiert sich in der MPC-Färbung mit einer Verminderung der Grundsubstanz und einem Verlust von elastischen Fasern an der Intima Es konnten in keiner der Proben schwarze Zellkerne nachgewiesen werden. **B1.1-1.3 SD nach DB:** Die EZM war in einem Großteil der Proben vollständig erhalten. Die Innenseite wies einen Verlust von elastischen Fasern und GAG auf, während der Rest des Querschnitts intakt erschien. Es präsentierten sich vereinzelt dunkle Punkte, welche Zellkerne darstellten; **B2.1-2.3 SD nach EB:** Die EZM war nach der EB weitestgehend ebenso erhalten. Die elastischen Fasern und die Grundsubstanz waren weiterhin vermindert. Nun waren jedoch alle Schichten frei von dunklen Punkten, was für eine gute Zellfreiheit sprach; **C1.1-1.3 TX/SDS nach DB:** In keine der Proben waren nach der DZ noch dunkle Punkte enthalten. Die elastischen Fasern und Kollagen waren vollständig vorhanden, während die Glykosaminoglykane vermindert nachgewiesen wurden. **C2.1-2.3 TX/SDS nach EB:** Nach der zusätzlichen EB gab es einen leichten Verlust an elastischen Fasern und Kollagen in den oberflächlichen Schichten. Es war weiterhin keine grünliche Grundsubstanz und dunkle Zellkerne nachweisbar. Abbildungen jeweils von innerer (X.X.1), zentraler (X.X.2) und äußerer (X.X.3) Region der PA.; Maßstab: 250 µm

6.5 Pikro-Siriusrot-Färbung

6.5.1 Nativproben

Die unbehandelten Proben wurden nach der Pikro-Siriusrot-Färbung (PSR) im Lichtmikroskop unter normalem Licht und unter polarisiertem Licht unter 100x und 200x Vergrößerung untersucht. Dabei konnte die Struktur der EZM dargestellt und die Faserstruktur der Kollagenfasern sowohl qualitativ als auch quantitativ beurteilt werden. Durch die unterschiedliche Doppelbrechung der Kollagentypen I und III konnten diese unterschieden werden. Die Kollagenfasern der PA zeigen sich in beiden Aufnahmen vermehrt in den oberflächlichen Bereichen der Wand. Außerdem konnten Faserdefekte in der Tunica adventitia bestätigt werden. Muskelfasern, Zytoplasma und Bindegewebe präsentierten sich im Lichtmikroskop gelb (s. Abb. 6.15 A 1-3). Im Polarisationsmikroskop stellten sich die Kollagenfasern Typ I als dicke, gelb-orange Fasern und Kollagen Typ III als dünnere, grüne Fasern dar. Kollagen Typ I dominierten in der Mitte der Arterie, während Kollagen Typ III besonders in den oberflächennahen Schichten sichtbar war (s. Abb. 6.15 B 1-3). Die elastischen Fasern der EZM konnten in der PSR unter dem Polarisationsmikroskop nicht beurteilt werden. Im Vergleich zur MPC-Färbung, die einen guten Überblick vermittelte, stellte die PSR die Komponenten der EZM im Polarisationsmikroskop detaillierter dar, sodass der Faserverlauf von Kollagenfasern isoliert beurteilt werden konnte. Die Proben können außerdem durch eine Messung der Intensität der Eigendoppelbrechung quantitativ verglichen werden.

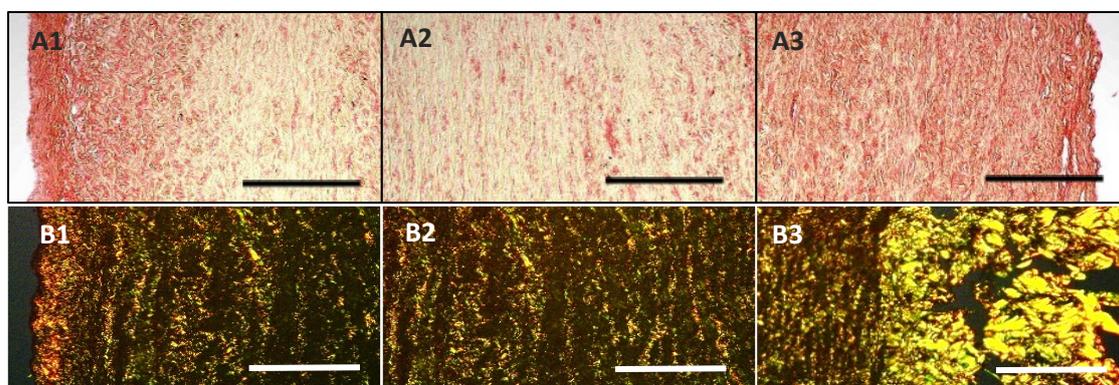


Abbildung 6.15: Unbehandelte Pulmonalarterien in der Pikro-Siriusrot-Färbung A1-2: Aufnahme der Nativprobe unter dem Lichtmikroskop. Kollagenfasern präsentierten sich rot, während das Zytoplasma, Muskelfasern und das Hintergrundgewebe gelb erschienen. Zwei Einzelbilder von innerer und äußerer Region, B1-3: Aufnahme unter dem Lichtmikroskop mit Polarisationsfilter. Die Kollagenfasern konnten differenziert werden. Die dicken Fasern von Kollagen Typ I wies eine gelb-orange und Typ III mit den dünnen Fasern eine grüne Doppelbrechung auf. Abbildungen jeweils von innerer (1), zentraler (2) und äußerer (3) Region der PA. Maßstab: 250 µm

6.5.2 Originalprotokolle

In der PSR-Färbung stellte sich die EZM nach Verwendung von SDS/SD deutlich verändert dar. Kollagen Typ III wurde in allen Proben leicht reduziert. An der Außenseite waren noch vereinzelt grüne Fasern sichtbar, während die Innenseite hauptsächlich Kollagen I zeigte. Die Fasern verloren im gesamten Querschnitt ihren parallelen Verlauf (s. Abb. 6.16 A 1-3). Das Gewebe erschien insgesamt wenig dicht und beinhaltete ubiquitär Löcher. Die quantitative Messung der Eigendoppelbrechung hatte signifikant abgenommen ($p < 0,05$) mit einer Durchschnittsintensität von $10,23 \pm 4,22 \times 10^7$ in den Nativproben und $29,51 \pm 0,69 \times 10^5$ in den dezellularisierten Proben.

Nach Protokoll SD wiesen die Proben in der Pikro-Siriusrot-Färbung einen intakten Faserverlauf und unveränderte Strukturen der Kollagenfasern in der EZM auf (s. Abb. 6.16 B 1-3). Es konnte keine Verminderung der Intensität in der quantitativen Messung festgestellt werden (ca $20,91 \pm 4,60 \times 10^7$ in der DZ Probe).

Die DZ mit TX/SDS führte zu einem verminderten Anteil von Kollagen III in allen Proben. Die restlichen PA zeigten eine vollständig erhaltene EZM. Die Faserverläufe des Kollagen I waren in den Proben gut nachzuverfolgen (s. Abb. 6.16 C 1-3). Die Intensität der Eigendoppelbrechung wurde auf nur 37 % der Nativprobe reduziert ($21,62 \pm 13,11 \times 10^4$ in der DZ Probe).

TX/SD führte zu Verminderungen des Kollagen III in der PSR. Die Faserverläufe waren in allen Schichten stark verändert ohne Parallelität. Es konnten vereinzelt auch Auflockerungen und Löcher detektiert werden (s. Abb. 6.16 D 1-3). Insbesondere die Tunica intima war aufgebrochen und ohne Kollagen Typ III nachgewiesen werden (s. Abb. 6.16 D 1). Die Intensität der Eigendoppelbrechung in der DZ Probe war mit $10,01 \pm 0,54 \times 10^7$ im Vergleich zur Nativprobe reduziert.

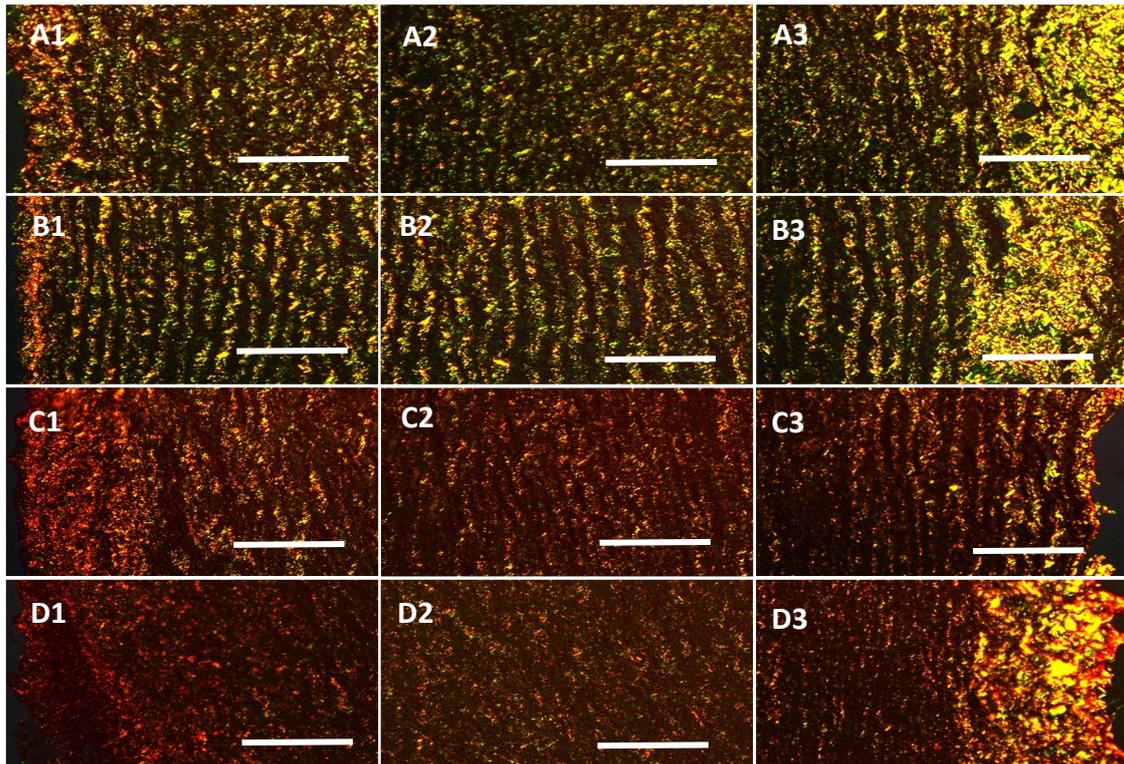


Abbildung 6.16: Pulmonalarterien in der Piko-Siriusrot-Färbung nach Durchführung der Originalprotokolle
A1-3 SDS/SD: In der EZM wird ein Verlust von Kollagen III an der Innenseite der PA detektiert. Außerdem stellt sich ubiquitär der Faserverlauf unregelmäßig und aufgebrochen dar; **B1-3 SD:** Der Faserverlauf und die Dreischichtung der EZM konnte mit Protokoll SD erhalten bleiben. In allen Schichten war das Kollagen I und III wie in den Nativproben vorhanden; **C1-3 TX/SDS:** Die Integrität der EZM zeigte sich in allen Proben vermindert, in zwei davon besonders stark. Kollagen Typ III wurde durch die DZ in allen Schichten reduziert. Der parallele Faserverlauf der Kollagen I Fasern konnte jedoch weitestgehend erhalten bleiben; **D1-3 TX/SD:** Die EZM zeigte sich weniger dicht und der Faserverlauf war unterbrochen und irregulär. Insgesamt zeigte sich ein Verlust von Kollagen III, insbesondere an der Innenseite. Abbildungen jeweils von innerer (1), zentraler (2) und äußerer (3) Region der PA. Maßstab: 250 μm

6.5.3 Erste Modifikation

Die PSR-Färbung zeigte nach Verwendung von SDS/SD und zusätzlichen Modifikationen einen guten Erhalt von Kollagen I und III an der Tunica intima und media. Allerdings stellte sich ein Verlust von Kollagenfasern an der Außenseite dar. Der Faserverlauf war insgesamt parallel, jedoch mit teilweisen Auflockerungen (s. Abb. 6.17 A 1-3). Die Intensität der Eigendoppelbrechung der Komponenten war im Vergleich zur Nativprobe nicht reduziert. Es zeigte sich eine Erhöhung der Intensität auf $15,21 \pm 9,91 \times 10^7$ in der DZ Probe.

SD führte nach der ersten Modifikation mit einem rotierenden Fluss der Detergenzien zu einem besseren Erhalt der EZM als im Originalprotokoll (s. Abb. 6.17 B 1-3). Es zeigten sich weniger Kollagenfasern Typ I in den inneren Bereichen. Kollagen Typ III war in allen

ERGEBNISSE

Schichten sichtbar. Der Faserverlauf war überwiegend parallel, wie in den Nativproben, aber an der Innenseite konnten auch Defekte in der Gewebestruktur nachgewiesen werden (s. Abb. 6.17 B 1). Wie bereits beim Originalprotokoll, war keine Verminderung der Intensität im Vergleich zur Nativprobe feststellbar.

Die Anwendung der physikalischen und prozeduralen Veränderungen nach Protokoll TX/SDS führten zu wenig Veränderung der EZM in der Tunica media. Hier stellten sich sowohl Kollagenfasern I als auch III regelrecht dar (s. Abb. 6.16 C 2). Die oberflächlichen Schichten präsentierten jedoch einen Verlust von Fasern, insbesondere von Kollagen Typ III. Zusätzlich zeigten die Fasern einen unregelmäßigen Verlauf und Defekte an der Innenseite (s. Abb. 6.16 C 1 und 3). Die Intensität der Eigendoppelbrechung war im Vergleich zur Nativprobe nicht reduziert.

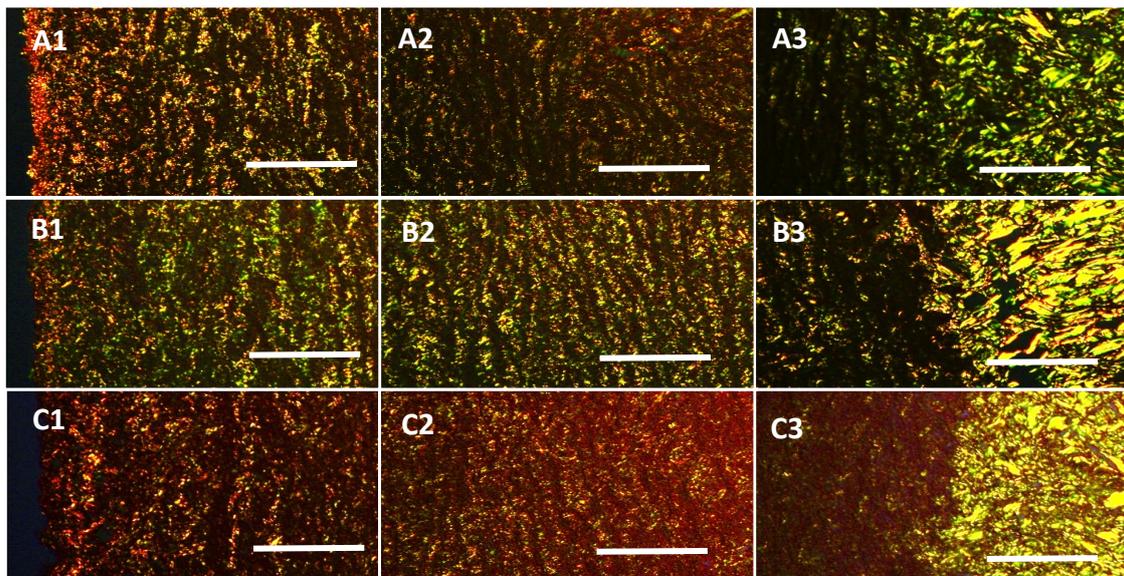


Abbildung 6.17: Pulmonalarterien in der Picro-Siriusrot-Färbung, nach Durchführung der ersten Modifikation

A1-3: SDS/SD: Hier zeigt sich ein Verlust von Fasern insbesondere Kollagen I an der Außenseite. Der Faserverlauf präsentierte teilweise Unregelmäßigkeiten und Auflockerungen; **B1-3 SD:** Die Dreischichtung und Faserverläufe der EZM konnten nach Verwendung von 1 % SD und der ersten Modifikation überwiegend gut dargestellt werden. Es zeigte sich nur ein geringer Verlust von Kollagen I an der Innenseite. Hier waren auch leichte Defekte im Gewebe sichtbar; **C1-3 TX/SDS:** An den Außenseiten sieht man einen Verlust von Kollagen, insbesondere Kollagen Typ III. In der Mitte ist kein Defekt des Gewebes zu sehen. Lediglich leicht unregelmäßige Faserverläufe weisen auf Veränderungen der EZM Struktur hin. Abbildungen jeweils von innerer (1), zentraler (2) und äußerer (3) Region der PA. Maßstab: 250 µm

6.5.4 Zweite Modifikation

Die zweite Modifikation mit der Verwendung einer perfusions-basierten DZ führte bei Protokoll SDS/SD zu einem deutlichen Rückgang der Kollagenfasern Typ III an der Innenseite von vier der fünf Proben (s. Abb. 6.18 A 1.1). Die Faserverläufe stellten sich in allen Schichten intakt und ohne Löcher dar (s. Abb. 6.18 A 1.1-1.3). Die anschließende EB führte in keiner der PA zu einem weiteren Verlust von Kollagen. Allerdings konnten in zwei der PA deutliche Unterbrechungen im Faserverlauf festgestellt werden. In den anderen drei waren jedoch regelmäßige parallele Kollagenfasern und ein dichtes Gewebe in allen Schichten zu sehen (s. Abb. 6.18 A 2.1.-2.3). In der quantitativen Messung der leuchtenden Bestandteile zeigte sich eine signifikante Abnahme von Intensität im Vergleich zur Probe nach DB (Intensität der DB-Probe = $45,25 \pm 29,51 \times 10^7$ und der EZB-Probe = $26,54 \pm 24,60 \times 10^7$ ($p < 0,05$)).

Die EZM der PA präsentierte sich nach Protokoll SD nur minimal verändert im Vergleich zu den Nativproben (s. Abb. 6.18 B 1.1-1.3). Das Kollagen III war in allen Bereichen reduziert, während das Kollagen I erhalten bleiben konnte. Die Faserverläufe waren aber in allen Schichten dicht und regelmäßig. Auch die quantitative Messung bestätigte den guten Erhalt der EZM mit einer signifikanten Abnahme von Intensitäten auf $41,18 \pm 35,97 \times 10^4$ in der DB-Probe ($p < 0,01$). Die EB führte zu einem zusätzlichen Verlust von Kollagenfasern Typ III, während die Kollagenfasern Typ I jedoch weiterhin vorhanden waren. Hier zeigte sich allerdings eine leichte Veränderung der parallelen Faserstruktur mit teils durchbrochenen Faserverläufen (s. Abb. 6.18 B 2.1-2.3). Die Reduktion der Kollagenfasern Typ III wurde auch in der Intensitätsmessung deutlich indem die Intensität mit $15,87 \pm 26,6 \times 10^4$ in den enzymbehandelten Proben im Vergleich zur Nativprobe signifikant verringert war ($p < 0,001$).

Die Verwendung von TX/SDS führte zu ebenso zu einem leichten Verlust von EZM Bestandteilen. Auch hier ging insbesondere Kollagen III verloren, während Kollagen I in allen Schichten zu sehen war (s. Abb. 6.18 C 1.1-1.3). In drei der Proben zeigten sich die Fasern im Bereich der Tunica adventitia aufgebrochen. Nach Verwendung von Enzymen stellten sich die Fasern in zwei der PA in der Mitte unregelmäßig und defekt dar. Einen weiteren Verlust von Fasern konnte nicht nachgewiesen werden. Auch die Intensität der

ERGEBNISSE

Lichtdoppelbrechung war nicht signifikant reduziert (Intensität der DB-Probe = $2,48 \pm 5,5 \times 10^7$ und Intensität der EB-Probe = $20,9 \pm 6,73 \times 10^4$).

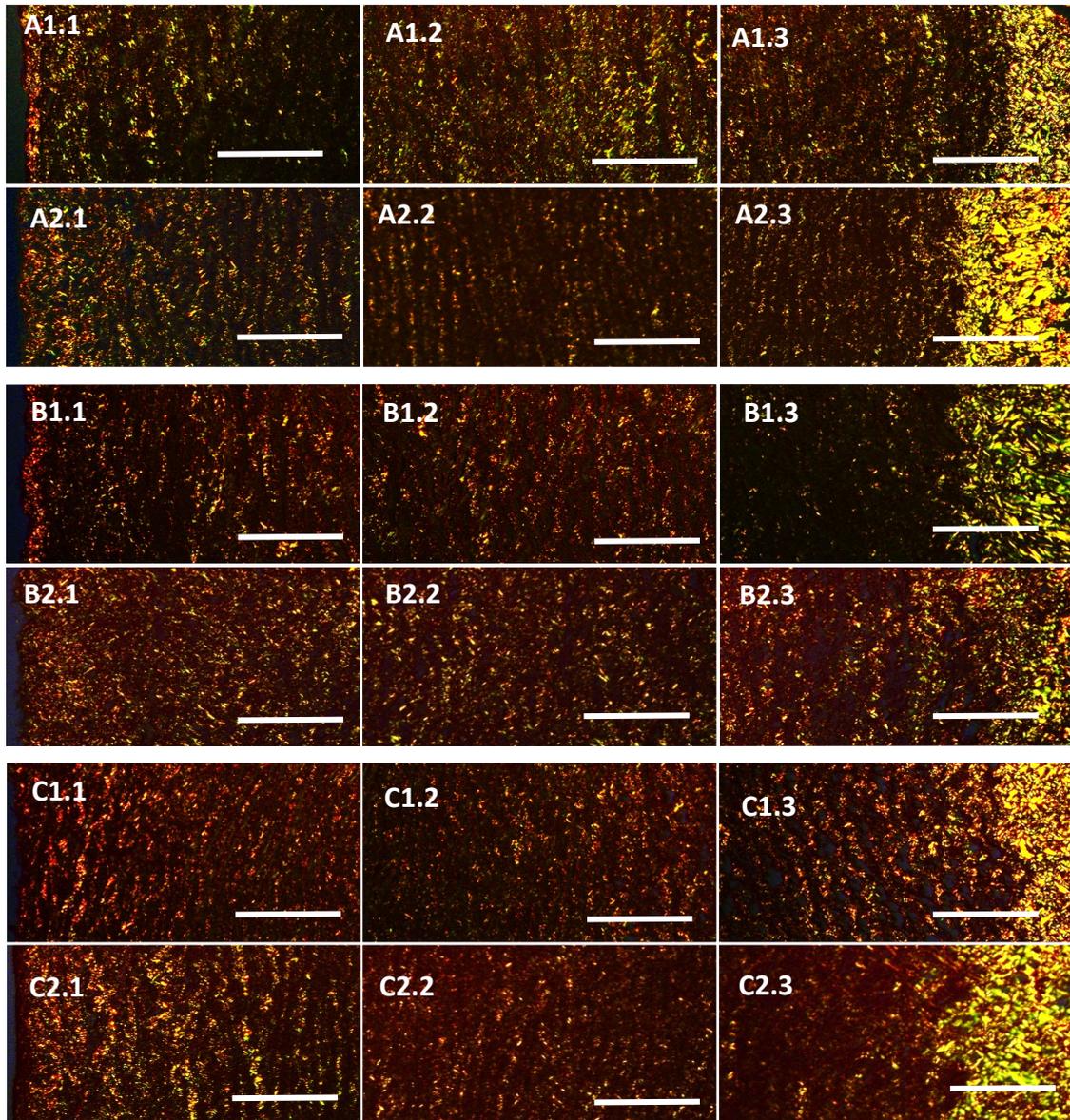


Abbildung 6.18: Pulmonalarterien in der Pikro-Siriusrot-Färbung nach Durchführung der DZ mit der zweiten Modifikation nach der Detergenzienbehandlung (DB) und nach Enzymbehandlung (EB) A1.1-1.3 SDS/SD nach DB: Es zeigte sich hier an der Innenseite ein Rückgang von Kollagen III während Kollagen I ubiquitär unverändert vorhanden ist. Die verbleibenden Fasern stellen sich regelmäßig angeordnet ohne größere Defekt im Gewebe. **A2.1-2.3 SDS/SD nach EB:** Die Kollagenfasern wurden durch die EZ nicht weiter reduziert. In den meisten PA war der Faserverlauf wie in diesen Abbildungen parallel und intakt; **B1.1-1.3 SD nach DB:** Auch mit diesem Protokoll wurde insbesondere das Kollagen Typ III reduziert. Die Kollagenfasern Typ I waren gut erhalten und ihr Verlauf gleichmäßig; **B2.1-2.3 SD nach EB:** Kollagen III wurde durch die EZ weiter reduziert, während Kollagen I weiter in allen Schichten detektiert werden konnte. Es zeigten sich jetzt jedoch Unregelmäßigkeiten und Faserabbrüche am Kollagen; **C1.1-1.3 TX/SDS nach DB:** Ähnlich zum vorherigen Protokoll stellt sich ein Verlust der Kollagenfasern Typ III dar. Kollagen I ist vollständig erhalten, es präsentieren sich jedoch stellenweise Brüche und Löcher in der EZM; **C2.1-2.3 TX/SDS nach EB:** Die PA enthielten in allen Abschnitten Kollagen III und I wie nach der DZ. Auch die Faserstruktur konnte wie in den vorherigen Proben dargestellt werden. Abbildungen jeweils von innerer (1), zentraler (2) und äußerer (3) Region der PA. Maßstab: 250 μm

ERGEBNISSE

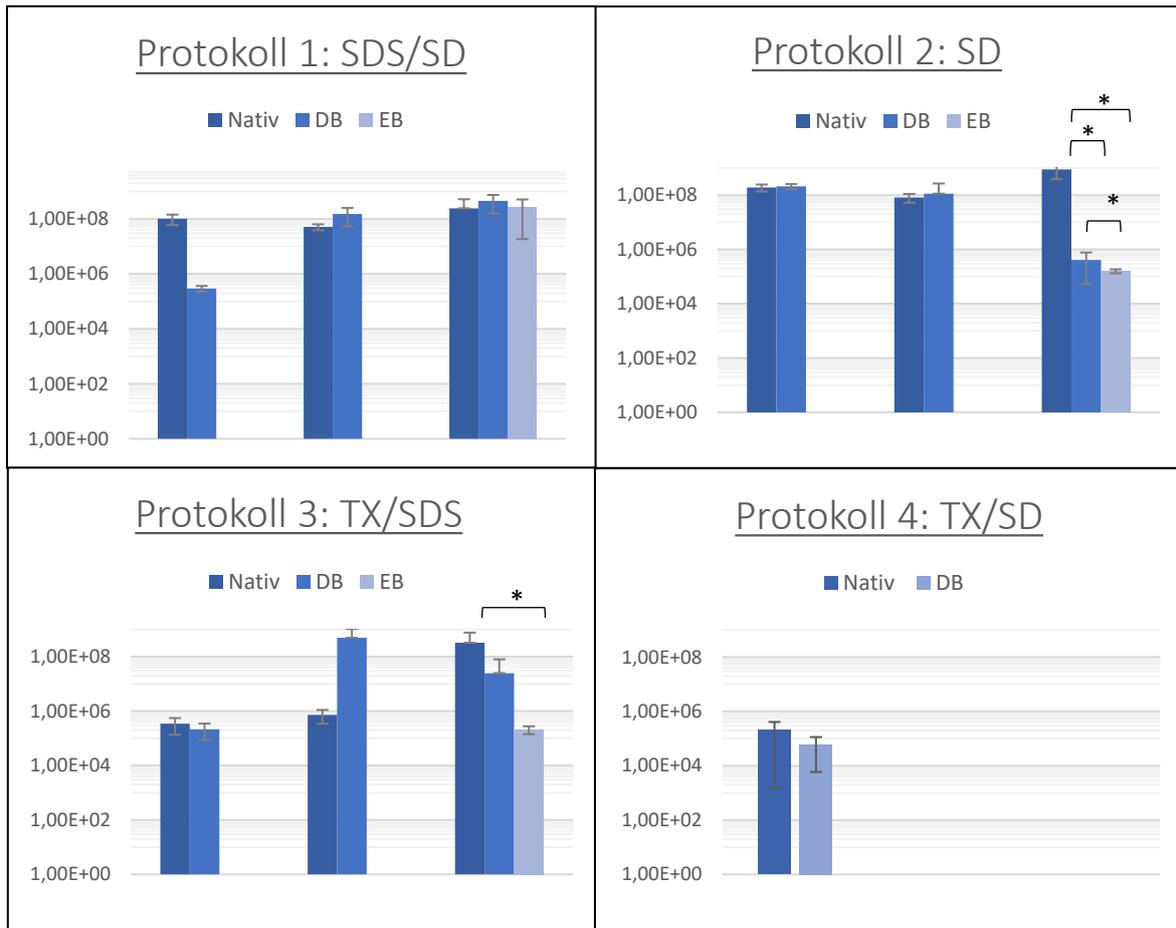


Abbildung 6.19: Diagramm zur Fluoreszenzintensität in der Piko-Siriusrot-Färbung in den einzelnen Protokollen: Die Werte an der Y-Achse geben die Fluoreszenzintensität in Pixel an. Hier wird eine logarithmische Skalierung genutzt. Die Intensität und damit der EZM-Erhalt nimmt im Verlauf der Dezellularisation ab. Insbesondere in Protokoll SD und TX/SDS zeigt sich nach der Enzymbehandlung eine signifikante Abnahme der Fluoreszenz und damit der EZM Bestandteile. Das erste Protokoll konnte am meisten Elastische Fasern und Kollagen erhalten; DB= Detergenzienbehandlung, EB: Enzymbehandlung; n=60; * \triangleq p<0,05; ** \triangleq p<0,01; *** \triangleq p<0,001

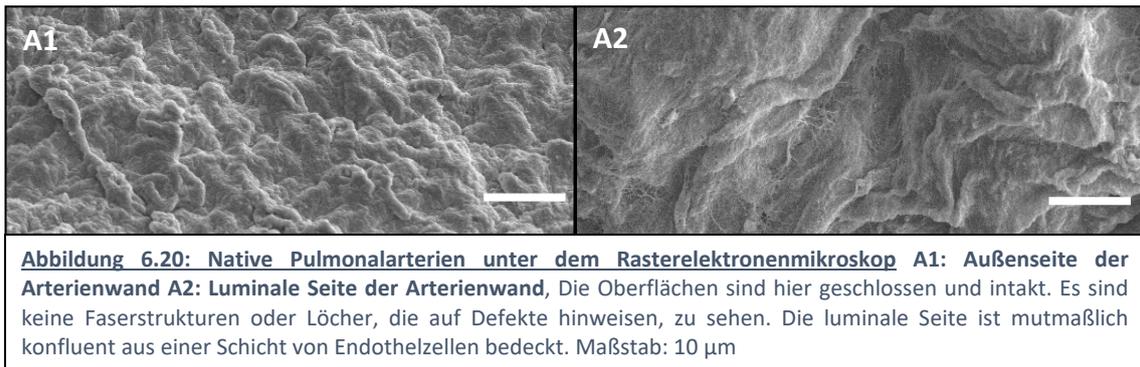
6.6 Rasterelektronenmikroskopie

6.6.1 Nativproben

Die Rasterelektronenmikroskopie ist durch ihre hohe Auflösung ein geeignetes Verfahren zur Darstellung der Probenoberfläche. Mithilfe des Vergleichs der behandelten Proben mit den nativen REM Aufnahmen konnten Defekte der Oberflächenintegrität und Mikrostruktur überprüft und so die Aggressivität des DZ-Verfahrens beurteilt werden. Bei guter DZ kann eine vollständige Entfernung der Endothelzellen an der luminalen Seite gezeigt werden mit einer Darstellung der glatten Basalmembran. Dicke Faserbündel und tiefe Löcher sprechen für einen schlechten Erhalt der EZM an der Außenseite. Eine Präsentation des oberflächlichen feinen Fasernetzes

des Gewebes ohne aufliegende Zellen zeigt hier eine gute DZ ohne starke Beeinträchtigung der EZM Integrität.

Bei den Nativproben ließen sich die Oberfläche der luminalen Seite stets gut von der Außenwand der Arterie unterscheiden. Die Oberfläche der Intima präsentierte sich als geschlossene Oberfläche mit regelmäßiger Struktur und einer dichten Schicht aus Endothelzellen (s. Abb. 6.20 A2). Nach der DZ sollte die Endothelschicht der Intima entfernt sein, sodass sich eine glatte Schicht darstellt, welche dann der Basalmembran der Tunica intima entspricht. Im Gegensatz dazu waren in den Aufnahmen der Außenseite teilweise einzelne Fasern erkennbar, die eng miteinander verbunden waren. Dabei konnte zwischen langstreckigen Zusammenschlüssen von Fasern und schmaleren Vernetzungen differenziert werden. An Teilen der Außenwand konnten schon an den Nativproben Defekte mit kleinen Löchern in der Adventitia nachgewiesen werden (s. Abb. 6.20 A1).



6.6.2 Originalprotokolle

Die Wiederholung der Originalprotokolle ergab variierende Ergebnisse im Erhalt der Oberflächenstruktur der einzelnen PA. Nach Durchführung des ersten Protokolls SDS/SD zeigten sich die Oberflächen der Außenseiten der PA weniger glatt als in den Nativproben. Es waren einzelne feine Fasern mit netzartigen Strukturen sichtbar (s. Abb. 6.21 A1). Der Großteil der luminalen Seiten präsentierten eine geschlossene glatte Oberfläche welche möglicherweise eine vollständige Entfernung der Endothelzellen darstellte (s. Abb. 6.21 A2).

ERGEBNISSE

Protokoll SD führte zu Darstellung von einzelnen feinen Fasern an der äußeren Oberfläche der Arterie (s. Abb. 6.21 B1). Der Rest der Wand war in den DZ-Proben glatt, jedoch mit weniger regulärer Oberflächenstruktur als die der Nativproben. Die luminale Oberfläche präsentierte sich in vier der fünf Proben vollständig geschlossen und ohne Freilegung der tieferen feinen Faserstrukturen. Die Oberfläche war dicht bedeckt von Zellen (s. Abb. 6.21 B2).

Nach Anwendung von TX/SDS wurden durch das REM starke Veränderungen auf der äußeren Oberfläche der PA sichtbar. Es zeigten sich ubiquitär netzartige Faserstrukturen und tiefe Löcher in der Oberfläche. Mehrere Faserbündel durchzogen die Arterienwand (s. Abb. 6.21 C1). Die luminale Oberfläche war jedoch in den meisten Proben dicht geschlossen und mit Endothelzellen überzogen (s. Abb. 6.21 C2). Nur an wenigen Stellen wurden tiefer liegende Anteile der Intima mit Fasern der EZM durch Entfernung der Zellen sichtbar.

Beidseits zeigte sich eine starke Veränderung der Struktur nach Verwendung von TX/SD. Auf der luminalen Seite konnte viele feine Fasern und dicke Faserbündel nachgewiesen werden, welche auf eine Destruktion der Tunica intima hinwiesen. Es gab keine geschlossene und gleichmäßige Oberfläche mit Zellen mehr (s. Abb. 6.21 D2). Auch auf der Außenseite waren zahlreiche Fasern aus der Tiefe der Schichten sichtbar (s. Abb. 6.21 D1). Zusätzlich konnten auf mehreren Proben stäbchenförmige Bakterien nachgewiesen werden.

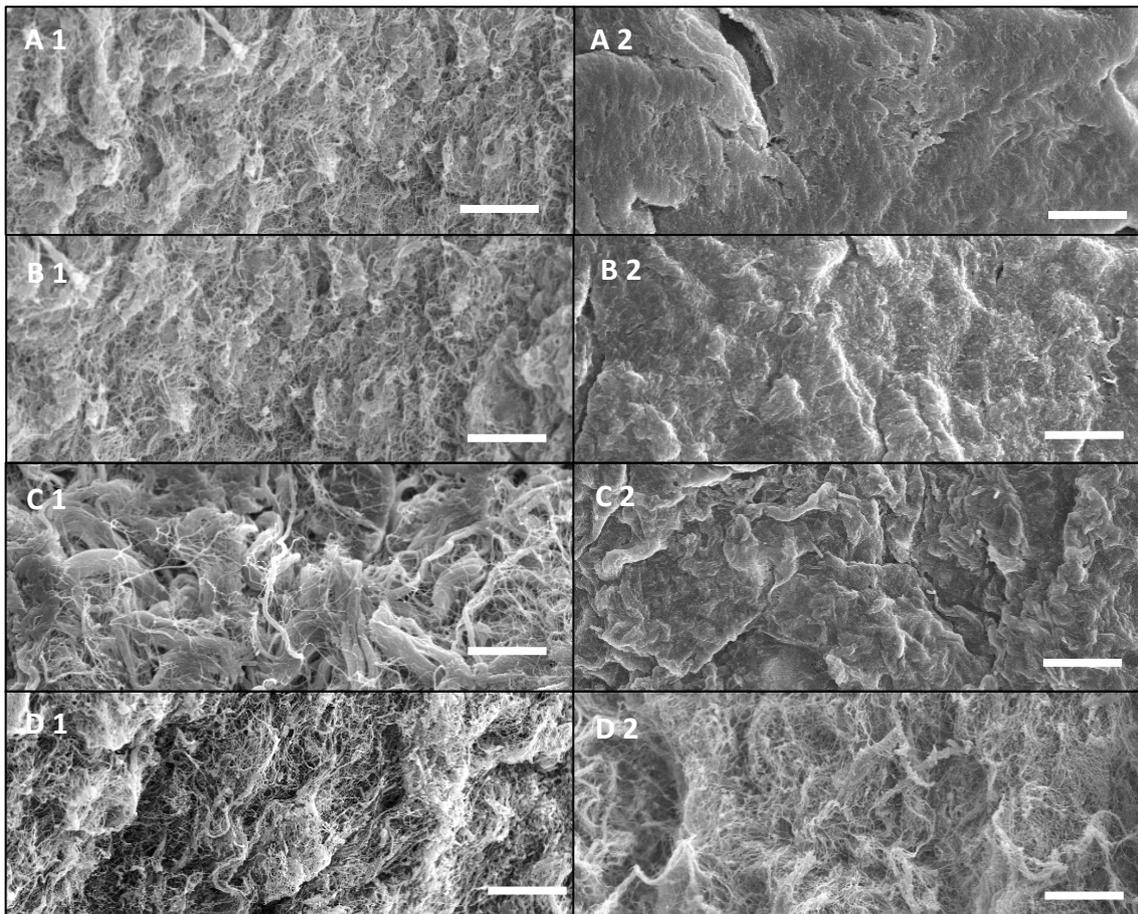


Abbildung 6.21: REM Analyse nach DZ mit den Originalprotokollen SDS/SD **A1:** äußere Oberfläche der PA nach SDS/SD mit feinen Faserstrukturen und mutmaßlich vollständiger Entfernung von oberflächlichen Zellen **A2:** luminale Oberfläche der PA, welche sich mit einer intakten Oberfläche ohne aufliegende Zellen, am ehesten Endothelzellen, darstellt. Nur vereinzelt werden tiefere Anteile der Wand sichtbar **SD B1:** Die Außenseite der PA zeigte feine Faserstrukturen nach Protokoll SD. **B2:** Luminale Seite nach Verwendung von Protokoll SD. Es zeigt sich eine dichte Decke von Zellen, wie in den Nativproben. **TX/SDS C1:** Äußere Oberfläche der PA nach Protokoll TX/SDS. Es stellen sich dicke und dünne Fasernetze dar. Die Oberfläche ist uneben und mit unregelmäßigem Verlauf der Fasern. **C2:** Innenseite nach TX/SDS, welche noch viele Zellen, am ehesten Endothelzellen, präsentiert. Teilweise stellen sich Lücken in der Oberfläche dar. **TX/SD D1:** Die äußere Oberfläche ist nach TX/SD aufgelockert mit feinen und auch dickeren Faserbündeln aus der Tiefe der Arterienwand und ohne Zellauflagerungen zu sehen **D2:** Die luminale Oberfläche präsentiert sich nach TX/SD mit dünnen Fasern ohne Nachweis von oberflächlichem Endothel, jedoch auch starker Destruktion der Basalmembran der Tunica intima. Maßstab: 10 µm.

6.6.3 Erste Modifikation

Mit den ersten Modifikationen veränderten sich auch die Ergebnisse der REM-Aufnahmen. Nach Verwendung von SDS/SD bestand die äußere Oberfläche der PA aus dicken gewellten Faserbündeln und dünnen netzartigen Strukturen (s. Abb. 6.22 A1). Die luminale Oberfläche war teilweise konfluent mit am ehesten Endothelzellen bedeckt. An einzelnen Bereichen konnten Löcher festgestellt werden, welche auf eine tiefere Destruktion der Schicht hinwiesen (s. Abb. 6.22 A2).

ERGEBNISSE

Durch die Modifikation von Protokoll SD stellte sich die äußere Oberfläche mit gewellten dicken Fasern dar (s. Abb. 6.22 B1). Die luminal Seite war zum Großteil noch geschlossen, jedoch konnten intermittierend tiefere Anteile der Wand mit feinen Faserstrukturen sichtbar gemacht werden. Aufgrund der glatten Struktur kann von einer vollständigen Entfernung der Endothelzellen an der Seite ausgegangen werden (s. Abb. 6.22 B2).

TX/SDS verursachte durch die Modifikationen aufgelockerte Oberflächen auf beiden Seiten. Die Außenseite präsentierte dicke und feine Faserbündel die eng miteinander vernetzt waren (s. Abb. 6.22 C1). Die luminal Oberfläche war aufgrund ihrer glatten Darstellung mutmaßlich vollständig frei von Endothelzellen. Stellenweise zeigte sie sich destruiert, sodass feinere Gewebefasern sichtbar wurden (s. Abb. 6.22 C2).

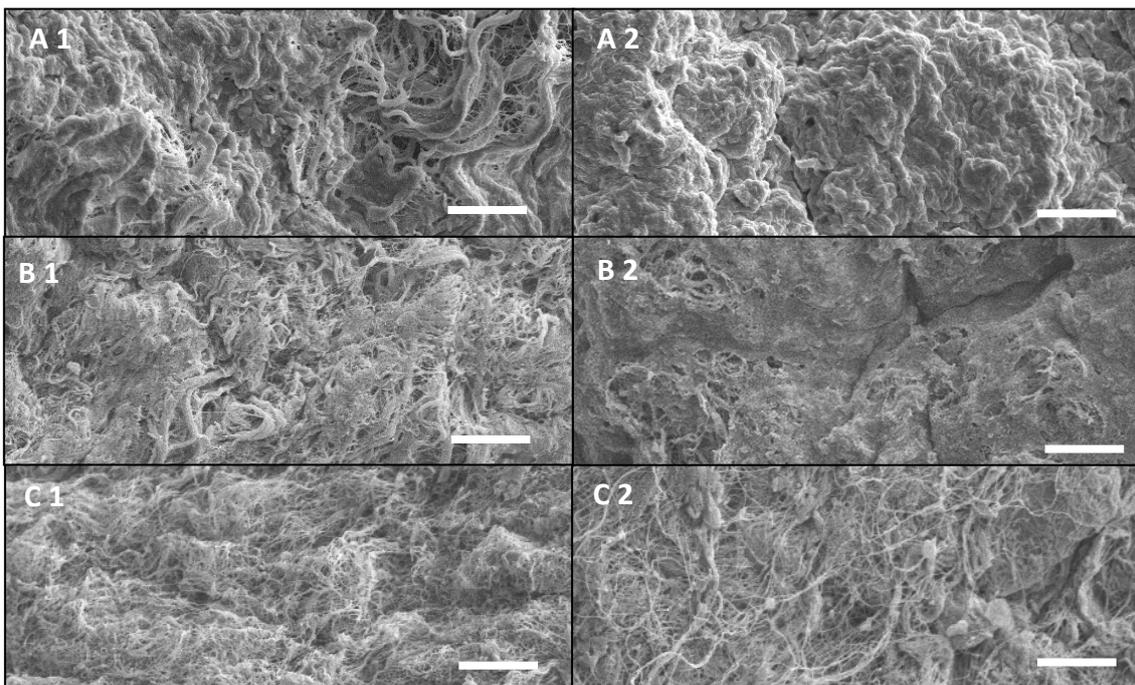


Abbildung 6.22: REM Analyse nach DZ mit den ersten Modifikationen SDS/SD **A1:** äußere Oberfläche der PA nach SDS/SD mit Darstellung von einem dichten Fasernetz und tiefen Defekten der EZM. **A2:** Die Innenseite der PA nach dem modifizierten Protokoll stellt sich mit einem geschlossenen Belag von Zellen dar. Nur vereinzelt waren kleine Löcher sichtbar. **SD** **B1:** Die Oberfläche der Außenseite nach Verwendung von SD präsentiert sich mit dicken und dünnen Faserbündeln. Teilweise sind aufliegende Zellen sichtbar. **B2:** Nach Protokoll SD zeigt sich luminal eine zellfreie Schicht mit leichten Defekten in der Basalmembran **TX/SDS** **C1:** Die äußere Oberfläche der Arterien stellt sich nach Protokoll TX/SDS mit aufgelockerten Faserstrukturen dar und es sind keine Zellen zu sehen **C2:** Die luminal Oberfläche präsentiert sich vollständig ohne aufliegende Zellen und einem starken Defekt der Basalmembran, sodass das darunterliegende Fasernetz der EZM sichtbar wird. Maßstab 10 µm.

6.6.4 Zweite Modifikation

Nach Verwendung von SDS/SD mit Anwendung der perfusions-basierten DZ war die Oberflächenstruktur der Außenseite mit dicken und teilweise auch tieferliegenden dünnen Faserbündeln sichtbar (s. Abb. 6.23 A 1.1). Die Oberfläche der Intima zeigte sich dicht geschlossen mit rauher Oberfläche, was auf ein Vorliegen von Endothelzellen an der Intima hindeutete (s. Abb. 6.23 A 1.2). Diese Zellen konnten nach der EB nicht mehr nachgewiesen werden. An der Innenseite präsentierte sich ein dichtes Netz aus Fasern mit teilweise noch dichten Anteilen der Basalmembran (s. Abb. 6.23 A 2.2). An der äußeren Seite wurde nun ein aufgelockertes Fasernetz sichtbar ohne aufliegende Zellen. Teilweise zeigten sich tiefe Löcher zwischen den Fasern (s. Abb. 6.23 A 2.1).

Nach Protokoll SD war die Oberfläche der luminalen Seite in allen PA durchweg geschlossen und mit Zellen versehen (s. Abb. 6.23 B 1.2). In zwei der Proben konnten an der Außenseite aufgelockerte Faserstrukturen wie in Abbildung 6.23 B 1.2 entdeckt werden, die anderen präsentierten teilweise bedeckte glatte Bereiche. Das Ergebnis war nach der EZ an der Außenseite ähnlich. Hier waren weiterhin dünne Fasern zu sehen (s. Abb. 6.23 B 2.1). An der Innenseite war eine dichte glatte Oberfläche zu sehen, die vermutlich die Basalmembran der Tunica Intima ohne aufliegende Zellen darstellte (s. Abb. 6.23 B 2.2).

Die dritte Prozedur führte schon nach der DZ zu einer glatten Oberfläche an der luminalen Seite. Es präsentierten sich vereinzelt Fasern und Löcher in der glatten Oberfläche (s. Abb. 6.23 C 1.2). Die Darstellung der äußeren Oberfläche variierte stark in den einzelnen Proben. Die meisten PA stellten eine aufgelockerte Oberfläche mit noch teils dichten Bereichen dar (s. Abb. 6.23 C 1.1). Andere waren noch vollständig von einer dichten Fläche bedeckt. Nach der EB hatten alle äußeren Oberflächen feine netzartige Strukturen mit jedoch auch vereinzelt tiefen Löchern (s. Abb. 6.23 C 2.1). Die luminalen Oberflächen wiesen ein homogenes Bild aus feinen Fasernetzen auf (s. Abb. 6.23 C 2.2).

ERGEBNISSE

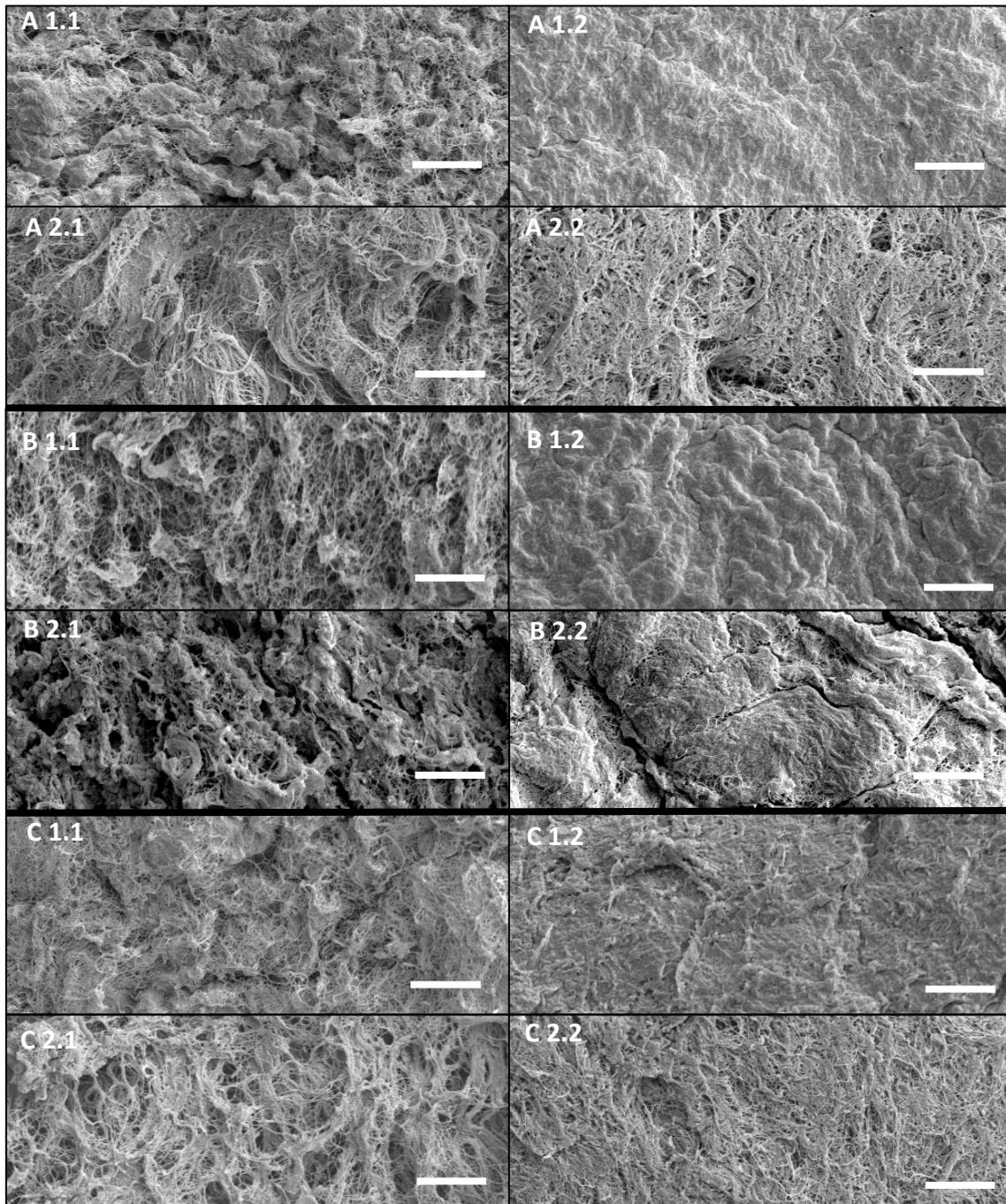


Abbildung 6.23: Pulmonalarterien in der Rasterelektronenmikroskopie nach Durchführung der DZ mit der zweiten Modifikation nach der DB (1.1+1.2) und nach EB (2.1+2.2) SDS/SD: A 1.1: Außenseite der PA nach der DZ mit präsentiert das dichte Fasernetz der EZM. **A 1.2:** Innenseite der PA mit einem dichten Belag ohne Darstellung der Fasern; **A 2.1:** Die äußere Oberfläche ist nach der EB mit vielen Faserbündeln zu sehen. Es sind keine tiefen Defekte sichtbar. **A 2.2:** Die luminal Seite ist nicht mehr dicht verschlossen. Es sind Löcher in der Tunica intima mit Darstellung der einzelnen Fasern zu sehen. **SD:** **B 1.1:** Die Außenseite der Arterien zeigt sich nach SD aufgelockert mit einem feinen Netz aus Fasern. **B 1.2:** Die luminal Seite präsentiert vollständig verschlossen mit regelmäßiger Struktur, die auch das Vorliegen von Zellen hinweist **B 2.1:** Nach der EB stellt sich die Außenseite weiterhin überall mit der Faserstruktur der EZM dar. Es zeigen sich teilweise tiefere Löcher. **B 2.2:** Die Innenseite erscheint glatt ohne Defekte. Es sind keine Zeichen von Zellen sichtbar. **TX/SDS:** **C 1.1** Die äußere Oberfläche der PA ist nach TX/SDS mit feinen Fasernetzen versehen, es sind keine tiefen Löcher sichtbar. **C 2.1:** Die Innenseite zeigt sich verschlossen mit einzelnen Fasersträngen. **C 2.1:** Durch die EB wurden das dichte Fasernetz der Arterienwand aufgelockert, sodass sich nun Defekte und Löcher an der äußeren Oberfläche präsentieren **C 2.2:** Die luminal Seite präsentiert sich fast durchgehend verschlossen. Teilweise sind Faserauflagerungen sichtbar. Maßstab 10 µm.

6.7 DNA-Quantifikation

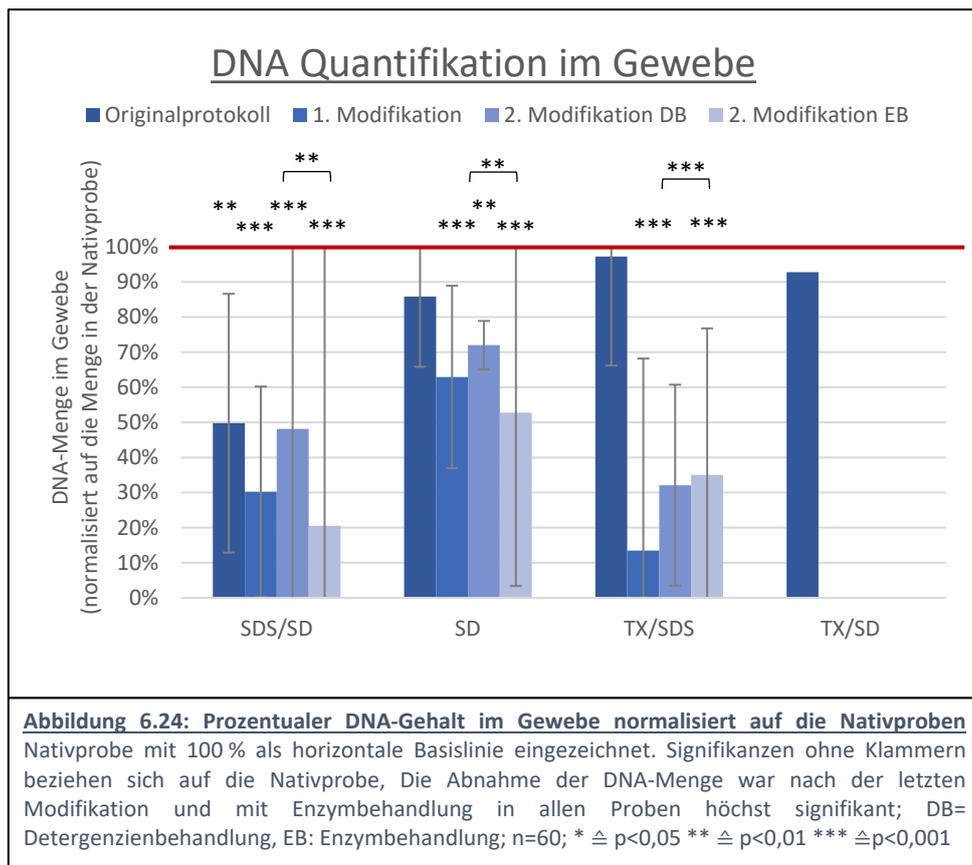
Die DNA-Quantifikation demonstrierte in dieser Studie eine quantitative, gut vergleichbare Erhebung des DNA-Gehaltes und damit eine objektive Beurteilung der DZ. Obwohl es keine einheitlichen Vorgaben für den DNA-Gehalt von DZ- Gewebe gibt, liegt laut Crapo et al. ein optimaler Anteil bei <50 ng dsDNA pro mg [43]. Die DNA-Quantifikation aller Nativproben zeigte einen durchschnittlichen DNA-Gehalt von $315,67 \pm 128,28$ ng/mg, wobei der Gehalt in den einzelnen Proben stark variierte. Nach der Verwendung der Originalprotokolle konnte in allen Protokollen eine Abnahme des DNA-Gehaltes festgestellt werden. In Prozedur SDS/SD wurde die DNA im Vergleich zur Nativprobe signifikant um 50,25 % ($p < 0,01$) reduziert. Das Verfahren SD zeigte sich in der Entfernung der DNA weniger erfolgreich. Hier verblieb $218,03 \pm 43,61$ ng dsDNA/mg EZM im Gewebe, was eine nicht signifikante Abnahme darstellt ($p > 0,05$). Das Originalprotokoll TX/SDS entfernte ebenso nur einen Bruchteil der DNA und hinterließ 97,2 % des DNA-Gehaltes der Nativprobe ($p > 0,05$). Das vierte Protokoll TX/SD erreichte keine signifikante Abnahme der DNA, sodass noch 92,78 % der DNA verblieben.

Die erste Modifikation der Verfahren konnte die DNA in allen Protokollen höchst signifikant reduzieren. Durch Protokoll SDS/SD verblieb nur 30,21 % ($p < 0,001$) der DNA im Gewebe, was einer höchst signifikanten Abnahme im Vergleich zur Nativprobe entsprach. Die Veränderung von Protokoll SD führte zu 62,92 % verbliebener DNA im Gewebe was ebenso eine signifikante Reduktion der DNA darstellte ($p < 0,001$). Eine deutliche Verbesserung der DNA-Entfernung konnte auch durch das letzte Protokoll TX/SDS erreicht werden. Hier konnte 86,53 % der DNA herausgewaschen werden und es verblieb nur $75,63 \pm 41,37$ ng dsDNA/mg im Gewebe ($p < 0,001$).

Nach der perfusions-basierten DZ in der zweiten Modifikation wurden starke Unterschiede in den Ergebnissen der verschiedenen Protokolle sichtbar. Protokoll SDS/SD konnte hier im ersten Schritt vor der EB 51,88 % Prozent ($p < 0,001$) der DNA entfernen. Dies entsprach einer signifikanten Reduktion der DNA im Vergleich zur Nativprobe aber weniger Entfernung als durch die Flussdezellularisation darstellte. Auch nach Verwendung SD im zweiten Verfahren blieb durch die alleinige Behandlung mit Detergenzien mehr DNA zurück als in dem vorherigen Durchlauf ($270,69 \pm 18,66$ ng dsDNA/mg Gewebe ($p < 0,01$)). Bei der DNA-Messung des Gewebes nach Behandlung mit

TX/SDS zeigte sich im Durchschnitt ein sehr hoher DNA-Gehalt ($656,72 \pm 188,12$ ng/mg), welcher auch die Werte des nativen Gewebes überschritt.

Die EB schließlich hatte eine deutlich stärkere DNA-Entfernung in allen drei Protokollen zur Folge. Hier wurde bei Verwendung SDS/SD im Vergleich zur DB nur $74,61 \pm 61,10$ ng DNA/mg zurückgelassen. Dies stellt einen Anteil von 20,5 % des DNA-Gehaltes der Nativprobe dar, wodurch die Abnahme höchst signifikant ist ($p < 0,001$). Auch im Vergleich zur ersten Modifikation war diese Reduktion signifikant ($p < 0,01$). Protokoll SD bestätigte die Wirkung der EB mit einem Verbleib von nur 52,78 % der DNA ($p < 0,001$), was einer deutlichen Verbesserung im Vergleich zum Originalprotokoll entsprach. Verfahren TX/SDS erzielte auch eine signifikante Optimierung der DZ unter Verwendung von DNase und α -Galaktosidase. Hier wurde mit $73,76 \pm 30,81$ ng dsDNA/mg der niedrigste DNA-Gehalt gemessen und eine Reduktion um 65 % ($p < 0,001$) erreicht.



ERGEBNISSE

Tabelle 6.3: DNA- Menge in gelöster Gewebeprobe bei Verwendung der einzelnen Protokolle:

Angaben der DNA-Menge in ng/mg Gewebe; n=60;

DB= Detergenzienbehandlung, EB: Enzymbehandlung

Signifikanzen in Bezug auf den DNA-Gehalt der jeweiligen Nativprobe: * \triangleq $p < 0,05$; ** \triangleq $p < 0,01$; ***

\triangleq $p < 0,001$

	Originalprotokoll [in ng/mg Gewebe]	1. Modifikation [in ng/mg Gewebe]	2. Modifikation [in ng/mg Gewebe]	
			DZ	EZ
Protokoll SDS/SD	105,12 \pm 38,76 **	114,37 \pm 34,29 ***	175,07 \pm 110,25 ***	74,61 \pm 61,10 ***
Protokoll SD	218,03 \pm 43,60	201,95 \pm 52,50 ***	270,69 \pm 18,66 **	198,45 \pm 98,04 ***
Protokoll TX/SDS	371,73 \pm 115,48	75,63 \pm 41,37 ***	210,72 \pm 56,68	73,76 \pm 30,81 ***
Protokoll TX/SD	362 \pm 72,92			

6.8 Quantifikationen der Glykosaminoglykane

Mit der Messung der Glykosaminoglykane als Teil der EZM von Arterien konnte das zurückbleibende Gewebe der Arterien beurteilt werden. Je mehr GAG in Gewebe verblieb, desto besser konnte der Erhalt des Bindegewebes eingeschätzt werden.

In der GAG-Quantifikation der Nativproben waren die Proben insgesamt homogen. Der Mittelwert des Gehaltes an GAGs aller nativen PA insgesamt war $130,78 \pm 13,73$ ng GAG/mg Gewebe. Die Verwendung der Originalprotokolle führte in allen Arterien nur zu einer minimalen Reduktion der GAG im Gewebe. Protokoll SDS/SD entfernte nur einen geringen Anteil und konnte 89,67 % ($p < 0,05$) der GAG-Menge erhalten. Durch Verwendung von SD verblieben allerdings nur 57,49 % GAG, was einer signifikanten Abnahme trotz geringer DZ entsprach ($p < 0,05$). Währenddessen erwies sich Protokoll TX/SDS am schonendsten gegenüber den Glykosaminoglykanen. Hier verblieb $130,00 \pm 22,71$ ng/mg GAG im Gewebe, welches im Durchschnitt dem Gehalt der Nativprobe entspricht und damit keine signifikante Reduktion darstellt.

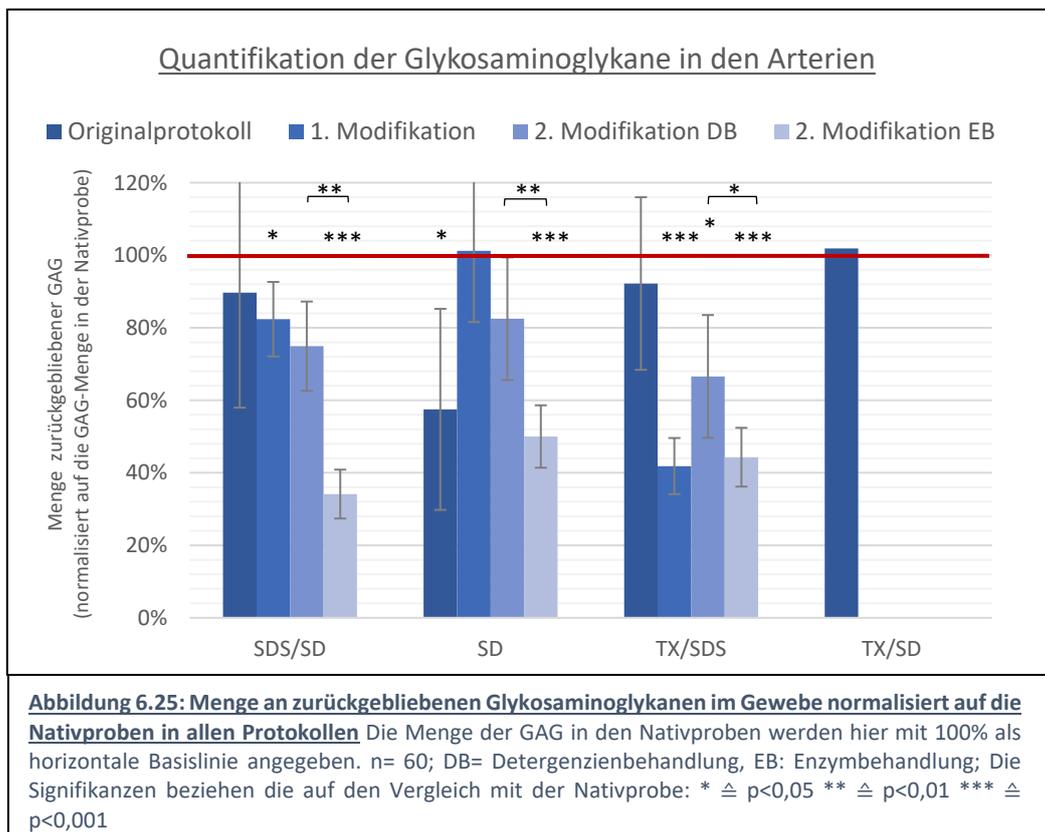
Die ersten Modifikationen verminderten die Menge der GAGs im Vergleich zu den Nativproben ebenso nur minimal. Die Reduktion nach SDS/SD auf 82,36 % der GAGs war nicht signifikant. Mit Protokoll SD konnte nun trotz vollständiger Entfernung der Zellkerne ein GAG Gehalt von $148,30 \pm 23,11$ ng/mg erhalten werden, was dem Durchschnittsgehalt in den Nativproben dieses Durchlaufs entsprach. TX/SDS

ERGEBNISSE

verzeichnete ein deutlich schwächeres Ergebnis als zuvor, da nur 41,84 % des GAG-Gehaltes erhalten blieb, was einer höchst signifikanten Abnahme entsprach ($p < 0,001$).

Mit der nächsten Modifikation erfolgte durch Einführung der perfusions-basierten DZ und EB eine deutliche Veränderung, welche sich auch im GAG-Gehalt der Arterien zeigte. Insbesondere die enzymbehandelten Proben wiesen eine Veränderung der GAGs auf. Die Anwendung von SDS/SD für 12 h ließ nach der DB 74,93 % GAG ($p < 0,05$) zurück, was im Vergleich zu den vorherigen Versuchen einem nur minimalen Abfall des GAG-Gehaltes entsprach. Nach der EB konnte eine starke Dezimierung der Glykosaminoglykane beobachtet werden. Hier verblieben nur 34,12 % der ursprünglichen GAG-Menge im Gewebe. Diese Abnahme der GAGs war somit sowohl im Vergleich zu den Nativ- als auch zu den DB-Proben höchst signifikant ($p < 0,001$). Protokoll SD zeigte übereinstimmend dazu einen kontinuierlichen Abfall des GAG-Gehaltes. Die DB führte zu einer Reduktion auf 82,49 % mit einer anschließenden höchst signifikanten Abnahme während der EB auf 50,01 % ($p < 0,001$).

Die Behandlung mit Protokoll TX/SDS zeigte hingegen einen alternativen Verlauf. Hier blieben nach Durchführung der DB 66,58 % ($79,0 \pm 16,69$ ng GAG/mg Gewebe) der GAG erhalten, was im Vergleich zur ersten Modifikation einer deutlichen Verbesserung



entsprach (GAG-Rückstand hier: 41,84 %). Allerdings konnte auch hier gezeigt werden, dass die Enzyme eine signifikante Reduktion des GAG-Gehaltes induzieren, da hier mit $54,81 \pm 14,73$ ng GAG/mg Gewebe ($p < 0,01$) nur 44,29 % der GAG zurückblieben.

Tabelle 6.4: Menge an Glykosaminoglykanen in gelöster Gewebeprobe bei Verwendung der einzelnen Protokolle: Angaben der GAG-Menge in ng/mg Gewebe; n=60; DB= Detergenzienbehandlung, EB: Enzymbehandlung;
Signifikanzen in Vergleich zum GAG-Gehalt der jeweiligen Nativprobe: * $\triangleq p < 0,05$ ** $\triangleq p < 0,01$ *** $\triangleq p < 0,001$;

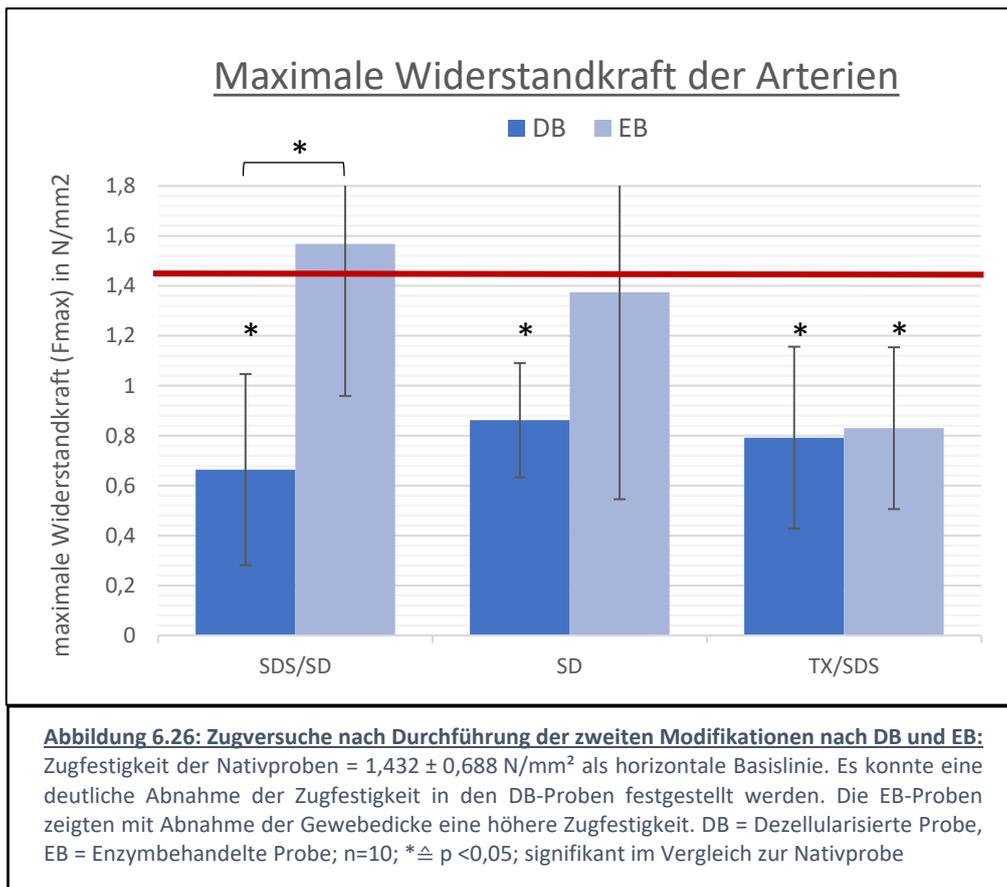
	Originalprotokoll [in ng/mg Gewebe]	1. Modifikation [in ng/mg Gewebe]	2. Modifikation [in ng/mg Gewebe]	
			DZ	EZ
Protokoll SDS/SD	95,21 \pm 19,11	97,65 \pm 12,03	113,01 \pm 27,05 *	50,40 \pm 6,50 ***
Protokoll SD	67,82 \pm 35,95 *	147,84 \pm 23,19	108,40 \pm 19,98 **	53,21 \pm 6,91 ***
Protokoll TX/SDS	130,41 \pm 22,68	49,41 \pm 7,16 ***	79,00 \pm 16,69 *	53,64 \pm 13,72 **
Protokoll TX/SD	87,21 \pm 61,47			

6.9 Zugversuche

Die Durchführung der Zugversuche an zehn Nativproben demonstrierten eine Zugfestigkeit pro Fläche der Arterien von durchschnittlich $1,43 \pm 0,69$ N/mm². Die Ergebnisse zeigen in Hinblick auf die Zugfestigkeit der Nativproben zueinander eine große Varianz.

Die Messung am Gewebe nach DB und DB stellte sich in den verschiedenen Protokollen homogener dar. In Protokoll SDS/SD führte die perfusions-basierte DZ im Durchschnitt zu einer Zugfestigkeit von $0,66 \pm 0,38$ N/mm², was 46,37 % der Kraft der Nativproben darstellte. Die Arterien von SD erzielten eine Zugfestigkeit von $0,86 \pm 0,23$ N/mm² (60,2 %) und das dritte Protokoll demonstrierte einen Mittelwert von $0,79 \pm 0,36$ N/mm² nach DB. Die Abnahme der Zugfestigkeit war in allen Kohorten signifikant mit $p < 0,05$. Nach der EB hingegen stellte sich in allen Prozeduren eine zunehmende Zugfestigkeit dar. Mit SDS/SD konnte nach EB eine Zugfestigkeit von $1,57 \pm 0,61$ N/mm² gemessen werden. Auch mit SD resultierte die Enzymbehandlung in einer erhöhten Zugfestigkeit mit $1,37 \pm 0,83$ N/mm² (Zunahme von $0,512$ N/mm²), was nahezu der Kraft der Nativproben entsprach. Protokoll TX/SDS konnte nach der Verwendung der Enzyme im Anschluss an die DB nur eine durchschnittliche Zunahme um $0,38$ N/mm² der Zugfestigkeit gemessen

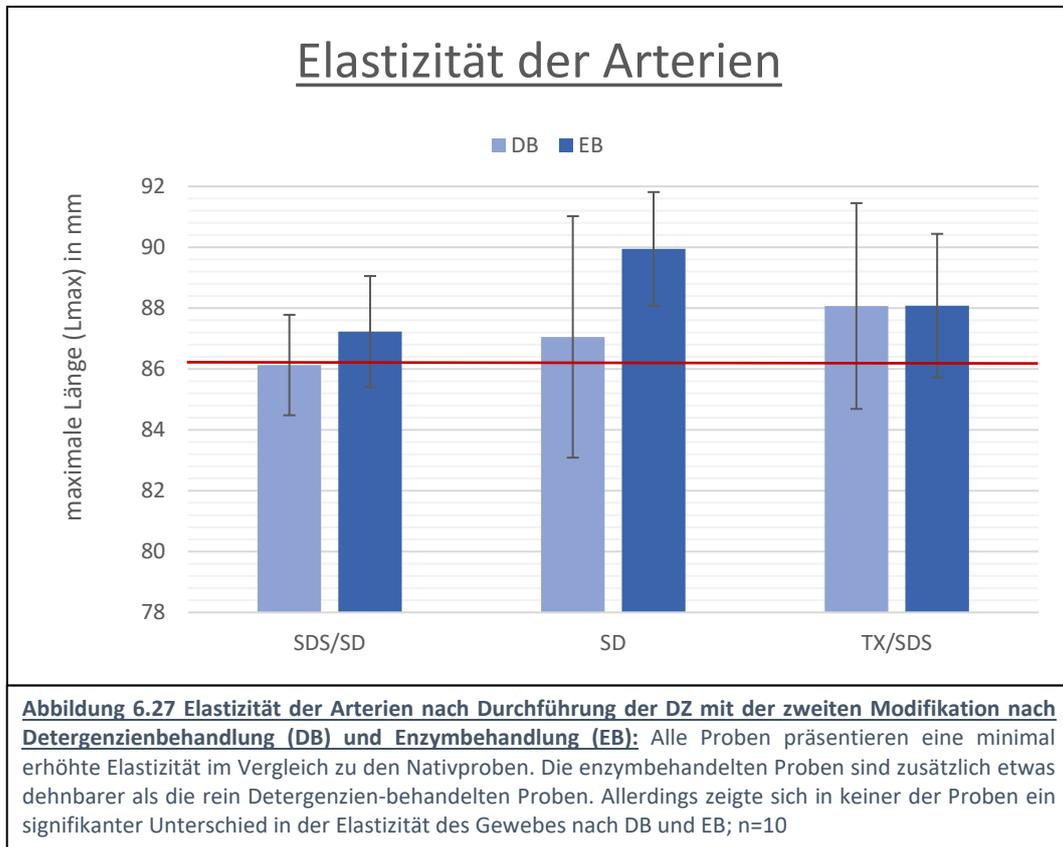
werden. Somit wurde in Protokoll SD und TX/SDS keine signifikante Zunahme im Vergleich zu der Kraft der DB-Proben erreicht.



Als zweiter Kennwert für die biomechanischen Eigenschaften des Gewebes wurde die Elastizität analysiert. Hierfür wurde die maximale Dehnbarkeit mithilfe der maximalen Länge (Lmax) vor dem Zerreißen des Gewebes gemessen. Bei den Nativproben war die maximale Länge im Durchschnitt $86,50 \pm 2,56$ mm. Nach der DB mit Protokoll SDS/SD ähnelte die Dehnbarkeit der Proben denen der Nativproben mit einer Länge von $86,13 \pm 1,65$ mm. Nach der EB war die Elastizität mit Lmax von $87,23 \pm 1,83$ mm leicht erhöht. Nach Protokoll SD war sowohl die Dehnbarkeit der Detergenzien-behandelten als auf der enzym-behandelten Proben erhöht. Nach der Einwirkung der Detergenzien betrug die maximale Länge durchschnittlich $87,05 \pm 3,97$ mm und nach den Enzymen circa $87,23 \pm 1,83$ mm. Diese Zunahme der Elastizität war jedoch nicht signifikant im Vergleich zur Nativprobe und zwischen den beiden Proben. Das dritte Protokoll resultierte nach der zweiten Modifikation ebenso in einer gesteigerten Elastizität der Arterienwände. Nach der DB alleine war die maximale Länge der Proben vor dem

ERGEBNISSE

Zerreißen $88,07 \pm 3,38$ mm und nach der EB durchschnittlich $88,08 \pm 2,36$ mm. Hier konnte also keine Zunahme der Dehnbarkeit durch die Wirkung der Enzyme festgestellt werden. Insgesamt war auch hier keiner der Unterschiede signifikant.



7. DISKUSSION

Das Tissue Engineering von Herzklappen und Gefäßen stellt eine vielversprechende Möglichkeit zur Erstellung von Prothesen in der Herzchirurgie dar. Die Entwicklung eines vollständig zellfreien und nicht immunogenen Präparates ist dabei essentiell um eine gute Funktion und Haltbarkeit zu gewährleisten [87, 93]. Die DZ ist ein möglicher Schritt zur Herstellung eines azellulären kardiovaskulären Gewebe in der Methode des Tissue Engineering [68, 70]. Zur Entfernung der Zellen und Eliminierung aller immunreaktiven Komponenten können viele verschiedenen Verfahren verwendet werden [84]. Alle klassischen Methoden, ob Detergenzien-basiert, mechanisch oder enzymatisch, haben sowohl Vorteile als auch Nachteile [66]. Beispielsweise können ionische Detergenzien wie SDS effektiv die Zellkerne entfernen, jedoch auch in zu hoher Konzentration die EZM schädigen. Auch Enzyme sind zwar durch höhere Spezifität schonender gegenüber den zu schützenden Strukturen, können aber auch bei langer Anwendung wichtige Bestandteile der EZM, z.B. Glykosaminoglykane, aus dem Gewebe lösen. Um dezellularisierte Prothesen in der Klinik anwenden zu können, benötigt die DZ deshalb weitere Optimierung [84]. Diverse Studien zeigen, dass verfahrenstechnische und physikalische Faktoren wichtig für die Effektivität einer DZ sind [129, 131]. In vorausgehenden Arbeiten wurden deshalb verschiedene Techniken unabhängig voneinander getestet und ihr Potential in der Effektsteigerung belegt [134].

In dieser Studie sollten nun verschiedene prozeduralen und physikalischen Methoden miteinander kombiniert und ihre Effektivität und Anwendbarkeit evaluiert werden. Dazu wurden grundlegende Veränderungen eingeführt. Zum einen erfolgte die DZ mittels Einsatzes einer Pumpe unter kontinuierlichem Fluss der DZ Lösung, sodass sich das Gewebe durchgehend in Bewegung befand und ausreichend umspült wurde. Zum anderen wurde eine perfusions-basierte Methode getestet, bei der die Arterien von der DZ-Lösung durchströmt und so ein kontinuierlicher Fluss durch das Lumen der PA gewährleistet wurde. Zusätzlich wurde ein intermittierender Wechsel der Lösung mit Durchführung von mehreren Waschphasen, sowie eine Ultraschallbehandlung mit zeitweiser Erhöhung der Temperatur eingeführt und getestet. Die Überprüfung dieser Einflussfaktoren auf die DZ erfolgte an unterschiedlichen Protokollen aus der Literatur. Als erstes wurden diese Verfahren reproduziert und auf ihre Wirksamkeit getestet. Damit

sollten Unterschiede in der Qualität der Verfahren untersucht und Möglichkeiten zur Verbesserung der Methoden festgelegt werden. Zusätzlich war es wichtig, die neu entwickelten prozeduralen Verfahren protokollübergreifend zu testen, um ihre Effektivität unabhängig vom DZ-Verfahren zu belegen.

Nach einer systematischen Literaturrecherche wurden vier Detergenzien-basierte Protokolle zur DZ von kardiovaskulärem Gewebe aus der Literatur ausgewählt, die in den Studien als erfolgreich beschrieben wurden [102, 140-142]. Um darzulegen, dass die prozeduralen Faktoren universal und mit verschiedenen Methoden wirksam sind, wurden hier besonders unterschiedliche Protokolle gewählt. Zwei Prozeduren hatte eine gleiche Anwendungszeit von 24 h, aber unterschieden sich in den Konzentrationen der Detergenzien. Dabei bestand das eine Protokoll aus einer Kombination aus zwei Detergenzien [102] und das andere nur aus Detergens mit doppelter Konzentration [140]. Das dritte Protokoll hatte eine sehr kurze DZ-Zeit mit hohen Konzentrationen der Detergenzien [141] und das letzte Protokoll war besonders lang mit eher niedrigen Konzentrationen [142]. Zuerst erfolgte eine präzise Reproduktion der Originalprozeduren gemäß ihrer Beschreibung in der Literatur. Die Ergebnisse der Originalprotokolle legten dann jeweils den Grundstein für weitere Modifikationen.

Reproduzierbarkeit der publizierten Protokolle

Das erste Protokoll von Ceborati et al. [102] konnte der Studie zufolge unter Verwendung von 0,5 % SD und 0,5 % SDS für 24 h eine erfolgreiche DZ mit kompletter Entfernung der Zellen erzielen. Durch die kombinierte Verwendung konnten die Detergenzien in geringerer Konzentration genutzt werden und dennoch gut wirken, was in unterschiedlichen histologischen Färbungen und DNA- Messungen nachgewiesen wurde. In Zusammenhang mit mehreren ausgiebigen Waschzyklen ermöglichten die Autoren so eine verringerte Toxizität des Verfahrens im Vergleich zu anderen, höher konzentrierten Protokollen. Dies belegten Cebotari et al. mit einer verbesserten Rebesiedelung der porzinen Herzklappen mit humanen Endothelzellen als in den verglichenen Protokollen [102].

Die Reproduktion des Protokolls SDS/SD in dieser Studie zeigte mikroskopisch eine gute Entfernung der dsDNA in einem Großteil der PA. Als quantitative Bestätigung belegte

auch die Quantifikation der DNA im Gewebe einen signifikanten Rückgang um 50% der Menge. Dennoch verblieben mit $105,12 \pm 38,76$ ng dsDNA /mg Gewebe Crapo et al. zufolge noch zu viel DNA in den PA [81]. Zusätzlich wurde durch das Verfahren von Cebotari et al. eine deutliche Veränderung der EZM ausgelöst. Es konnte ein vollständiger Verlust von elastischen Fasern und Grundsubstanz festgestellt werden, durch den das Gewebe in der MPC-Färbung große Löcher aufweist. Auch eine Verminderung der Kollagenfasern, insbesondere Typ III, und ein unregelmäßiger Verlauf der Bindegewebsfasern war sichtbar. Entgegen der Aussage von Grauss et al., dass die GAG bei einem starken Verlust von Elastin und Kollagen ebenso deutlich verringert sind, konnte die Messung hier noch circa 86 % der GAG nachweisen [98]. Im REM präsentierten die luminalen Seiten eine glatte Oberfläche, die vermutlich der Basalmembran der Tunica intima ohne aufliegende Endothelzellen entsprach. Hier waren jedoch auch leichte Defekte zu sehen, welche Kim et al. zufolge auch thrombogene Ereignisse fördern können [168]. Das Originalprotokoll von Cebotari et al. führte also zu einer erfolgreichen Entfernung der Zellkerne unter deutlichem Verlust der EZM Integrität. Dieser nachgewiesene Defekt der EZM lässt eine erschwerte Rebesiedelung und verringerte Haltbarkeit der Arterie vermuten [55, 64].

Zhou et al. verwendeten in ihrer Methode nur ein Detergens (1 % SD) und beschrieben damit eine vollständige DZ von Herzklappen [102]. Dabei wurden jedoch nur die Segel der Klappen beurteilt, welche deutlich dünner sind als die dazugehörige Arterienwand [102]. Dementsprechend konnte bei der Durchführung des Originalprotokolls keine vollständige Entfernung der Zellen aus den dicken Wänden der PA nachgewiesen werden. Es zeigten sich viele Zellkerne mit einem homogenen Verteilungsmuster wie in den Nativproben und auch die DNA-Messung konnte keine signifikante Reduktion der DNA belegen [148]. Nur ein geringer Bereich an der luminalen Seite war dezellularisiert mit einer EDT von $12,68 \pm 2,99$ %, was ein hohes Potenzial für Verbesserungen bot. Die Darstellung der EZM in den histologischen Färbungen präsentierte eine intakte Dreischichtung der Wand mit unveränderter Struktur und gutem Erhalt der Bindegewebsfasern. Auch der GAG-Gehalt war nicht signifikant reduziert, was die Integrität der EZM bestätigte. Das Originalprotokoll von Zhou et al. war den Ergebnissen zufolge also insgesamt nur wenig effektiv. Die erhebliche Differenz zu den Ergebnissen der Arbeitsgruppe von Zhou et al. lässt sich am ehesten auf die ausschließliche

Verwendung der Herzklappen-Segel bei Zhou et al. zurückführen, während in dieser Studie die deutlich dickere und dichtere Arterienwand untersucht wurde.

Das dritte Protokoll von Syedain et. al. zeichnete sich durch eine kurze Einwirkzeit (6 h) mit jedoch hohen Konzentrationen der Detergenzien aus [141]. Zusätzlich dazu wurde hier bereits im Originalprotokoll eine Enzymbehandlung mit DNase durchgeführt. Die Arbeitsgruppe von Syedain et al. präsentierte in ihrer Arbeit eine vollständige DZ sowie einen guten Erhalt der organisierten Faserstruktur von eigens in vitro erstellten Gefäßersätzen („Tubes“). Die Ergebnisse der Reproduktion von Protokoll TX/SDS belegten jedoch eine geringe Eindringtiefe der Detergenzien, sodass im Mittelstreifen der Arterienwände noch intakte Zellkerne sichtbar waren. Die inkonsistente Entfernung von Zellkernen wurde auch in der Quantifikation der DNA-Menge im Gewebe belegt. Hier war nach der Verwendung von TX/SDS noch 97,2 % der DNA übrig. In zwei der PA war die EDT innen größer, in den drei anderen Arterien an der Außenseite. Dies sprach für eine unzureichende Diffusion der Flüssigkeit in die Tiefe in der kurzen Inkubationszeit [81], bei der die aggressiven Detergenzien aber starken Einfluss auf die oberflächlichen Schichten hatten. Der Seitenunterschied könnte zusätzlich für eine ungleichmäßige Verteilung der Detergenzien durch den Schüttelinkubator sprechen, was allerdings an mehr Proben belegt werden müsste. In den dezellularisierten Bereichen und auf den Oberflächen zeigten sich Defekte der Faserstrukturen und Lücken im Gewebe der EZM, mit einem besonders starken Verlust der Grundsubstanz und Kollagen III an der Außenseite. Der GAG-Gehalt war allerdings nur gering reduziert, was darauf hinweist, dass die Tunica media noch ausreichend GAG enthielt. Protokoll TX/SDS konnte zusammenfassend keine ausreichende DZ erzielen. Die Detergenzien konnten in der kurzen Zeit nicht bis zur Mitte der Wand vordringen, während die äußeren oberflächlichen Schichten durch die hohen Konzentrationen der Detergenzien stark angegriffen wurden. In der veröffentlichten Arbeit werden keine Wandstärken genannt, doch aufgrund der hier erzielten Ergebnisse ist von einer geringeren Gewebe-Dichte und -Dicke der Gefäßersätze von Syedain et al. auszugehen [141].

Das letzte Verfahren stellte das Längste der vier Protokolle dar und sollte ein schonendes Verfahren mit sehr niedrigen Konzentrationen repräsentieren. Die Arbeitsgruppe von Rieder et al. nutzt hierzu 0,05 % Triton-X-100, 0,05 % SD und 0,05 % IGEPAL [142]. Sie

beschreiben, dass in den genutzten PA keine Zellreste detektiert werden konnten. Entgegen ihrer Behauptungen konnte in der hier vorliegenden Reproduktion allerdings keine zufriedenstellende DZ erzielt werden. Es zeigten sich mikroskopisch Zellkerne im gesamten Querschnitt der Wand ohne signifikante EDT und auch die Quantifikation der DNA zeigte keine signifikante Reduktion. Bei genauerer Betrachtung der EZM war dennoch ein Verlust der Grundsubstanz und Kollagen III sowie Defekte in der Faserstruktur der oberflächlichen Schichten sichtbar. Zusätzlich dazu konnten auf mehreren Proben stäbchenförmige Bakterien nachgewiesen werden. Diese mikrobielle Verunreinigung trotz Zugabe von Antimykotikum und Antibiotikum ist am ehesten auf die lange Behandlungsdauer von insgesamt 14 Tagen zurückzuführen. Im Vergleich der einzelnen Ergebnisse stellte sich das Protokoll TX/SD am ineffektivsten dar. Auch mit der zusätzlichen Verwendung von Ultraschall, intermittierenden Waschschritten und kontinuierlichem Lösungsfluss erschien eine vollständige DZ nicht möglich, sodass der Versuch mit dieser Methode beendet wurde. Dieses Protokoll unterschied sich von den restlichen besonders durch die DZ-Temperatur und die Länge. Die Proben wurden über zwei Wochen bei 4°C behandelt. Aus der daraus resultierenden geringen DZ lässt sich ableiten, dass eine DZ bei Raumtemperatur oder höher deutlich effektiver ist. So kann auch in kürzerer Zeit eine bessere DZ erzielt werden (s. Protokoll TX/SDS). Auch die niedrigen Konzentrationen dieses Protokolls scheinen im Vergleich zu den anderen Protokollen nicht ausreichend für eine effektive DZ von Arterienewebe. Die besonders lange DZ-Zeit hat zusätzlich noch andere Nachteile. Wie hier bereits nachgewiesen, ist die Gefahr der mikrobiellen Kontamination, mit dadurch erschwerter nachfolgender Sterilisation größer, je länger die Behandlung andauert. Außerdem ist eine lange Behandlung aufwendiger und kostenintensiver, weshalb dieses Protokoll für den klinischen Gebrauch weniger nützlich erscheint, als die anderen hier untersuchten Verfahren.

Es lässt sich also sagen, dass die Reproduktion deutliche Abweichungen von den Ergebnissen der publizierten Ergebnisse ergab. Während alle Protokolle von den Autoren als effektiv dargestellt wurden, konnte die präzise Reproduktion in keinem Fall die gleichen Ergebnisse erzielen. Es ergaben sich große Unterschiede in der Effizienz der einzelnen Methoden und keines konnte einen optimalen Gewebeersatz erstellen. Dies belegt, dass die Verfahren noch verbessert werden müssen, um für den klinischen

Gebrauch nutzbar zu sein [70, 93, 135]. Mit der Reproduktion konnten die unterschiedlichen Limitationen der Methoden demonstriert und so physikalische und prozedurale Verbesserungsmöglichkeiten für drei der vier Protokolle entwickelt werden.

Verschiedene Verfahren der Dezellularisation

1. Kontinuierliches Schütteln der Dezellularisierungslösung

Die ersten drei Originalverfahren wurden durch Bewegung der Proben in der DZ-Flüssigkeit im Schüttelinkubator durchgeführt. Bei der Literaturrecherche ist diese Methode am häufigsten zu finden, da sie unkompliziert und ohne aufwendige Techniken durchzuführen ist [81, 98, 108]. Allerdings stellt sich die Frage, ob dadurch eine gleichmäßige Verteilung der Flüssigkeit gewährleistet ist. Zhang et al. beispielsweise beschreiben in ihrer Arbeit eine bessere Diffusion und Verteilung der Detergenzien durch Perfusion als durch reine Schüttelbewegung [143]. Sie beschreiben, dass durch kontinuierliches Schütteln kein ausreichendes Eindringen der Detergenzien in das Gewebe erreicht und so nur stärkere Schäden in den oberflächlichen Schichten verursacht werden. Bei der Umsetzung der DZ im Schüttelschrank in dieser Studie konnte beobachtet werden, dass sich die PA am Boden des Gefäßes sammelten und manche Probenanteile nicht vollständig umspült wurden. Dies spiegelte sich auch in den Ergebnissen der Auswertung wider, bei denen die DZ-Effektivität zwischen den Proben stark variierte (am meisten in Protokoll SD). Dies belegte die These, dass eine reine Schüttelbewegung nicht zur ausreichenden Verteilung der DZ-Lösung und somit zur gleichmäßigen Diffusion der Detergenzien ins Gewebe führt. In den darauffolgenden Modifikationen wurden deshalb andere Verfahren zur Bewegung der DZ-Lösung untersucht.

2.: Kontinuierlicher Fluss der Dezellularisierungslösung

Die erste Methode bestand aus der Induktion eines kontinuierlichen Flusses der DZ-Lösung um die frei beweglichen PA. Die Detergenzien wurden mithilfe einer Pumpe in eine konstante Rotation versetzt. Da bei Verwendung der flussabhängigen DZ von einer Effektivitätssteigerung ausgegangen wurde, wurde die DZ-Zeit in Protokoll SDS/SD und SD um die Hälfte gekürzt. Eine kürzere Exposition der Proben zu den Detergenzien wurde

bereits häufig als deutlich schonender beschrieben [101, 178]. Diese Maßnahme hatte deshalb den Zweck die Aggressivität des Verfahrens zu verringern.

Mithilfe dieser Modifikation wurde mikroskopisch eine geringere Entfernung der Zellbestandteile mit Protokoll SDS/SD festgestellt als im Originalprotokoll. Es zeigten sich zurückgebliebene Zellkerne und dsDNA-Residuen im Mittelstreifen der PA-Wand mit einer jedoch signifikanten EDT von durchschnittlich $45,72 \pm 4,65$ %. Die DNA Quantifikation zeigte zusätzlich eine höchst signifikante Reduktion um circa 70 % des Ursprungsgehaltes. Allerdings betrug auch hier die Menge an verbliebener DNA noch mehr als die empfohlenen 50 ng pro mg EZM von Crapo et al. [81]. Im Vergleich zum Originalprotokoll konnte mit den Modifikationen jedoch eine deutliche Verbesserung des Erhalts der EZM nachgewiesen werden. Alle EZM-Bestandteile waren kongruent zu den dezellularisierten Bereichen an den Außenseiten vermindert, in der Mitte jedoch vollständig intakt. Die GAG-Quantifikation sprach mit einer nur leichten Reduktion für eine gute Integrität der EZM. Während das Originalprotokoll große Löcher und Unregelmäßigkeiten in der EZM verursachte, konnte mit den Modifikationen und der Verminderung der DZ-Zeit demnach mehr Gewebe geschont werden.

Auch die Protokolle SD und TX/SDS konnten mithilfe der Modifikationen eine gute Reduktion von Zellbestandteilen erreichen. Insbesondere die Proben von Protokoll TX/SDS waren mikroskopisch vollständig zellfrei, während bei SD wenige DNA-Residuen disseminiert in der Wand erschienen. Passend dazu war die DNA in beiden Verfahren im Vergleich zu den Originalprotokollen signifikant vermindert. Die EZM zeigte sich nach Protokoll SD größtenteils intakt, mit nur einem geringen Verlust der Grundsubstanz und GAG. Nach Verwendung von Protokoll TX/SDS wurden die äußeren Schichten aufgelockert. Der GAG-Gehalt war hier signifikant verringert. Im Vergleich zu den anderen Protokollen weist dieses Ergebnis darauf hin, dass die Kombination aus TX und SDS am aggressivsten gegenüber den oberflächlichen Schichten der EZM ist.

Insgesamt führte der kontinuierliche Fluss der DZ-Flüssigkeit zu einer Verbesserung des DZ-Erfolges in zwei der Protokolle. Wie bereits beschrieben, führte die stärkere Bewegung der Flüssigkeit zu einer effektiveren DZ [86, 119, 131 133]. Zusätzlich wurde eine Schonung der EZM in allen Protokollen, insbesondere durch Verkürzung der DZ-Zeit bewiesen.

3.: Kontinuierliche perfusions-basierte Dezellularisation

Ott et al. belegen in ihrer Arbeit, dass die intraluminale, perfusions-basierte DZ von ganzen Herzen aufgrund der zusätzlichen Druckerhöhung und Diffusion von Innen nach Außen besonders effektiv ist [79]. Auch weitere Publikationen beschreiben die DZ vollständiger Organe durch perfusions-basierte Methoden und zeigen, dass dadurch die DZ-Lösung besser ins Gewebe eindringen kann, als durch reine Agitationsbewegungen [129, 179]. Vergleichend zum kontinuierlichen Fluss, wurde hier nun eine alternative Umsetzung einer perfusions-basierten DZ untersucht. Dieses Verfahren wurde mit den vorher genutzten prozeduralen Methoden (Ultraschall, Temperaturveränderung und zyklische DZ) kombiniert. Während die ersten beiden Protokolle weiterhin in 50 % der Zeit durchgeführt wurden, wurden in Protokoll TX/SDS die Konzentrationen der Detergenzien halbiert, um eine schonendere DZ zu gewährleisten.

Mit dieser perfusions-basierten Methode konnte durch keines der Protokolle eine vollständige Entfernung der DNA erreicht werden. Alle Proben präsentierten viele Zellkerne und keine signifikante EDT. In der DNA Quantifikation konnte in den Proben von Protokoll SDS/SD und SD eine signifikante Reduktion der DNA im Vergleich zum Ursprungsgehalt berechnet werden (SDS/SD: Reduktion um 51,88 %, SD: 37,08 %), welche jedoch geringer war als nach Anwendung der Originalprotokolle. Die EZM präsentierte sich in den Proben von Protokoll SDS/SD und SD grundsätzlich erhalten mit nur einem minimalen Verlust der einzelnen Bestandteile. Am meisten waren Kollagenfasern Typ III vermindert, welche vermutlich aufgrund ihrer feinen Struktur am empfindlichsten sind. Der GAG-Gehalt wurde jeweils um circa 20 % reduziert, was einer moderaten Schädigung der EZM entspricht. Insgesamt variierte der Erfolg der DZ in den einzelnen Proben von Protokoll SDS/SD und SD stark, was auf eine unregelmäßige Verteilung der DZ-Lösung hinwies. Protokoll TX/SDS präsentierte konsistentere Ergebnisse. Hier waren in allen Proben dichte DNA-Residuen im Mittelstreifen zu sehen, während die Außenseiten vollständig dezellularisiert waren. Die Messung des DNA-Gehaltes zeigte hier keine signifikante Abnahme der DNA. Es lässt sich sagen, dass das hier verwendete Detergens Triton-X-100, trotz Verringerung der Konzentration hoch effizient und aggressiv wirkt. Da es jedoch vermutlich in der Kürze der Zeit nicht bis zur Mitte der Arterienwand vordringen kann, resultiert das Protokoll in einer

unvollständigen DZ. Die histologischen Färbungen demonstrierten einen guten Erhalt der EZM, mit nur einem geringen Verlust von Kollagen III in den oberflächlichen Bereichen. Der GAG-Gehalt wurde auf 66,58% reduziert, was jedoch deutlich besser war als bei Anwendung des kontinuierlichen Flusses. Dies war insbesondere auf die Reduktion der Detergenzien-Konzentration zurückzuführen. Auch die Oberflächen der Arterien präsentierten sowohl auf der luminalen als auch der äußeren Seite die Fasern der EZM ohne aufliegende Zellen.

Insgesamt konnte mit keinem der Protokolle mithilfe der Perfusion eine vollständige DZ erreicht werden. Eine Erklärung für diese großen Unterschiede im Vergleich zu den Erfolgen der Organdezellularisation könnte die Dichte der PA-Wand sein [79]. Wie Ott et al. beschreiben führt eine Perfusion durch die Kapillaren und kleineren Gefäße der Organe aufgrund der hohen Durchlässigkeit dieser Gefäße zu einer guten Verteilung der Detergenzien, ohne die Struktur des umliegenden Gewebes zu zerstören [75, 180]. Da die PA und die Aorta jedoch ausschließlich dem Transport des Blutes dienen sind sie mit starken Muskelfasern und dichtem Endothel ohne Kapillaren versehen, was ein Durchtreten der Flüssigkeit in tiefe Schichten erschwert [6]. Somit können die Detergenzien nicht ausreichend in das Gewebe gelangen [181, 182]. Dieses Verfahren führte zu einer großen Varianz der Ergebnisse in den einzelnen Proben, welche teilweise stärker war, als zwischen den diversen Modifikationen und Protokollen. Dies erklärt sich auch dadurch, dass die PA an der Halterung befestigt waren und sich nicht wie vorher frei in der Lösung bewegen konnten. Möglicherweise war die Strömung der Flüssigkeit um die Arterien damit insgesamt vermindert, sodass die Detergenzien weniger in das Gewebe eintreten konnten.

Die Studie zeigte eine effektivere DZ durch die kontinuierliche Strömung der Flüssigkeit als mithilfe der perfusions-basierten DZ. Perfusions-basierte DZ können eher bei kleinen Arterien und durchlässigeren Organgeweben verwendet werden, während die kontinuierliche Bewegung und Zirkulation der Detergenzien im gesamten Umfeld bei dichterem Gewebe wie Wänden der großen Arterien, Knorpel und Knochen genutzt werden sollte [176, 180, 182].

Enzymbehandlung mit DNase und α -Galaktosidase

Die Verwendung von Enzymen in Kombination mit Detergenzien ist ein häufiger Ansatz zur Entfernung von Zellbestandteilen aus Blutgefäßen und dichteren Geweben, wie Sehnen oder Knorpel [133, 183]. DNase wird in vielen Protokollen zum Abschluss für kurze Zeit hinzugefügt um die DZ zu intensivieren [58]. α -Galaktosidase hingegen wird, trotz vermehrter Evidenz für eine verstärkte Immunantwort bei zurückgelassenem α -Gal Epitop, nur selten integriert [110]. Die Daten von Naso et al. zeigen, dass die EB mit DNase und α -Galaktosidase die Effektivität der DZ in hohem Maße beeinflusst. Aufgrund dieser Ergebnisse, wurde in der vorliegenden Studie eine Enzymbehandlung an die detergenzien-basierte DZ angeschlossen.

In keiner der enzymbehandelten PA wurde mikroskopisch zurückgebliebene Zellen oder DNA-Rückstände detektiert, was einer signifikanten Verbesserung der DZ im Vergleich zu den Originalprotokolle entsprach. Die DNA Quantifikation unterstütze dieses Ergebnis mit einer signifikanten Reduktion des DNA-Gehaltes in allen Protokollen im Vergleich zum Originalprotokoll und den Nativproben. Alle Proben enthielten allerdings mehr als 50 ng/mg Gewebe (Niedrigster Mittelwert Protokoll TX/SDS= $73,76 \pm 30,81$ ng dsDNA/mg). Somit konnte kein Protokoll die von Crapo et al festgelegten Kriterien erreichen [81].

Gleichzeitig stellte sich die EZM homogen und dicht dar, mit nur einem leichten Verlust der Grundsubstanz und Auflockerung des Gewebes. Alle Proben wiesen eine Verminderung von Kollagen Typ III auf, wie bereits nach der DB. In allen Protokollen konnte festgestellt werden, dass die EB vorher bestehende EZM-Defekte, wie Grundsubstanzverlust oder Verminderung der Bindegewebsfasern aggravierte, aber keine neuen Defekte hervorrief. Dennoch war ein signifikanter Verlust der GAG-Gehalts in allen PA auf circa 30-50 % des Nativgehaltes zu sehen. Dies bestätigte sich auch in der Reduktion der Intensität der Doppelbrechung der PSR-Färbung. Die Oberflächendarstellung der Arterienwand zeigte die vollständige DZ mit einer vollständigen Entfernung der Zellen auf der luminalen Seite.

Nach der EB fiel außerdem eine Reduktion der Wanddicke in alle PA auf. Diese wurde sowohl in der makroskopischen Messung mittels Dickenmessgerät als auch der

mikroskopischen Messung in der DAPI Färbung festgestellt. Dausgs et al. zeigen in ihrer Studie, dass eine höhere DZ-Temperatur mit einem verringerten Wassergehalt des Gewebes einhergeht [117]. Der verminderte Wassergehalt könnte in Kombination mit der Reduktion der GAGs die verminderte Wanddicke der PA bewirken. Die Reduktion der Dicke könnte ebenso ein Einflussfaktor bei den Zugversuchen gewesen sein. Diese zeigten, dass keines der Verfahren die Zugfestigkeit der Nativprobe erhalten konnte. Besonders in Protokoll SDS/SD stellte sich nach der DB eine Abnahme der Zugfestigkeit um $53,6 \pm 26,7$ % der Nativprobe dar. Nach der EB wurde die Zugfestigkeit in allen Proben wieder erhöht. Speziell war auch hier Protokoll SDS/SD, bei dem die Widerstandskraft nun mit $1,568 \text{ N/mm}^2$ die der durchschnittlichen Nativprobe überschritt. Diese starke Steigerung kann auch an der Reduktion der Dicke der PA auf $1,98 \pm 0,30 \text{ mm}$ liegen. Die Zugversuche zeigen aber dennoch, dass die Widerstandskraft nach der DZ vergleichbar mit der Kraft der Nativproben war. Gegenätzlich zu den Aussagen von Simsa et al. muss also nicht von einer signifikanten Reduktion der Belastbarkeit ausgegangen werden [133].

Alle Arterien konnten wurden durch die Enzyme vollständig von Zellen und DNA-Resten befreit. Die erfolgreiche DZ konnte unabhängig von den vorherigen Ergebnissen erreicht werden, was die übergreifende Anwendungsmöglichkeit der Enzyme hervorhebt. Die Studie belegt auch, dass eine erfolgreiche DZ durch DNase möglich ist, ohne starke Destruktionen der EZM hervorzurufen. Hauptsächlich wurden durch die Enzyme nur bereits vorliegende Schäden durch Detergenzien verstärkt. Bei gutem Erhalt der EZM-Integrität nach DB hinterließen DNase und α -Galaktosidase nur oberflächliche Schäden und einen Verlust der Grundsubstanz ohne eine Veränderung der Kollagenstruktur und Faserverläufe zu bewirken. Trotzdem ist bewiesen, dass eine zu exzessive Nutzung von Nukleasen in einer starken Veränderung der EZM resultieren [113, 133]. Deshalb ist es zwar empfehlenswert eine EB durchzuführen, aber eine lange Nutzung zu vermeiden.

Zur Beurteilung des Effektes der α -Gal wurden in diesem Versuchsaufbau keine weitere Auswertungsmethoden durchgeführt. Eine Evaluation der α -Gal Entfernung erfolgte in vorausgehenden Versuchen (s. Anhang). Der Nachweis der α -Galaktose im Gewebe konnte an den PA nicht ausreichend reproduzierbar etabliert werden, sodass auf eine weitere Auswertung mit der Methode der Immunhistochemie verzichtet wurde. Der

Effekt von α -Gal in porzinen Klappenprothesen ist bereits in klinischen Studien bewiesen worden. Konakci et al. weisen in ihrer Arbeit bei Patienten mit einem porzinen Herzklappenersatz eine erhöhte Anzahl an Antikörpern gegen das α -Gal-Epitop nach [111]. Naso et al. zufolge sind Residuen von α -Galaktosidase verantwortlich für hyperakute Abwehrreaktionen [82]. Die Entfernung von α -Gal ist deshalb wichtig und sollte, wie bereits von Kasimir et al. gezeigt, standardmäßig quantifiziert werden [56, 110, 111].

Intermittierende Waschschritte bei der Dezellularisation

Die meisten Protokolle führen zuerst die Behandlung mit Detergenzien vollständig durch und schließen erst terminal mehrere Waschzyklen mit Kochsalzlösung an [111, 185]. Eine andere Möglichkeit ist jedoch die Verwendung von NaCl oder PBS intermittierend, um bereits gelöste DNA und Zellbestandteile zu entfernen [148]. Gerade festere Gewebe benötigt aufgrund der geringeren Durchlässigkeit eine längere DZ-Zeit die jedoch auch zu Defekten der EZM führen kann [89, 152]. Durch die intermittierenden Waschphasen kann eine schnellere Entfernung der Zellbestandteile ermöglicht werden was auch eine vollständige DZ von dickeren Arterienwänden ermöglicht, wie Pellegata et al. beweisen [185]. Perea-Gil et al. beschreiben in ihrer Arbeit auch eine Steigerung der Eindringtiefe durch zyklische Anwendung der DZ-Lösung mit intermittierenden Waschzyklen bei der DZ von Myokard [92]. Bei Anwendung dieser Methode in der hier vorliegenden Studie zeigten sich ebenso bessere Ergebnisse. Trotz verkürzter Inkubationszeit oder verringerten Konzentrationen der Detergenzien konnten signifikante Steigerungen der Wirkung in allen Protokollen erzielt werden (Größter Steigerung der EDT in Protokoll SD mit $87,23 \pm 2,99$ %). Allerdings zeigten DAPI und H&E-Färbung in einigen PA ein Verbleib von DNA-Resten ohne Nachweis von intakten Zellen zu Ende der DZ. Das spricht dafür, dass ein elongierter Waschzyklus zum Abschluss des Verfahrens nützlich sein könnte, um terminal alle gelösten DNA-Bestandteile zu entfernen. Eine verstärkte Spülung kann auch von Vorteil sein, um residuelle DZ Agentien zu entfernen, welche eine Rezellularisierung erschweren könnten [142]. In diesem Zusammenhang beschreiben Mathapati et al. eine quantitative und qualitative Messung zurückgebliebenen SDs, um eine detergenzien-assoziierte Toxizität zu verhindern [186].

Intermittierende Ultraschallbehandlung

Ultraschallbehandlungen wurden bereits in einigen Studien zur Verbesserung der DZ verschiedener Gewebe verwendet [120, 123, 187]. Jedoch ist auch hier auf eine Balance zwischen Zellentfernung und Erhalt der EZM zu achten. Eine Behandlung mit Ultraschall führt nachgewiesenermaßen zu einer Destruktion der EZM aufgrund hoher mechanischer Beanspruchung und großer Scherkräfte [121, 124]. Ein langer Gebrauch von Ultraschallbehandlungen ist deshalb zu vermeiden, um einen Erhalt der EZM Struktur zu gewährleisten [123, 124]. In dieser Studie wurde deshalb nur eine 30-minütige Behandlung jeweils zu Beginn eines DZ-Zyklus gewählt. Dies hatte zum Zweck, die Ultraschallzeit möglichst kurz zu halten und trotzdem eine verbesserte Penetration der Detergenzien in das Gewebe zu gewährleisten. Die Ergebnisse belegen, dass die Addition des Ultraschalls in Zusammenhang mit den übrigen Methoden in allen Protokollen zu einer Verbesserung des DZ-Erfolges führt. Bei allen Protokollen konnte eine signifikante Reduktion der DNA im Vergleich zum Originalprotokoll detektiert werden. Das Ultraschallbad begünstigte die Diffusion der Detergenzien und führte so zu einer erhöhten EDT (z.B. bei TX/SDS mit einer Vergrößerung der EDT von $52,81 \pm 12,26$ % im Vergleich zum Originalprotokoll) [121]. Dennoch muss beachtet werden, dass der Ultraschall bei exzessivem Einsatz auch zu Schäden an der EZM führen kann [121, 123]. Dabei sind besonders feinere EZM Strukturen wie elastische Fasern betroffen, während Kollagenfasern und Glykoprotein besser erhalten bleiben [124]. In dieser Studie zeigt sich, wie bei Oliveira et al., zuerst ein Rückgang von elastischen Fasern [124]. Insgesamt ist eine Verwendung von Ultraschall im DZ-Verfahren zu empfehlen und er lässt sich aufgrund der problemlosen Anwendbarkeit während des Verfahrens ohne Verlängerung der DZ-Zeit gut in etablierte Methoden integrieren.

Höhere Temperaturen

In der Literatur lassen sich mehrere Studien finden, die eine Verbesserung der DZ bei erhöhter Temperatur belegen [116, 117]. Bei Dausgs et al. resultierte beispielweise eine DZ bei 37-50°C in der besten Entfernung der zellulären Strukturen aus bovinen Arterien ohne Destruktion der EZM [117]. Allerdings führt eine zu hohe Temperatur über längere auch zu weitere Denaturierung von Proteinen, was die Stabilität der EZM beeinträchtigen könnte [115]. Deshalb kann die These aufgestellt werden, dass eine

intermittierend erhöhte Temperatur zwar die Effektivität der DZ erhöht, jedoch bei limitierter Zeit noch nicht zu tiefen Defekten im Gewebe führt. In dieser Arbeit wurde deshalb in Protokoll SDS/SD und TX/SD intermittierend mit Verwendung des Ultraschalls auch die Temperatur für eine halbe Stunde von RT auf 37°C erhöht. Diese Veränderungen resultierten in Zusammenhang mit den anderen Faktoren in einer verbesserten Entfernung von Zellbestandteilen. Mit der DZ bei RT konnte keine starke Zunahme der EZM-Defekte nachgewiesen werden. Protokoll SD, welches durchgehend bei 37°C durchgeführt wurde, hatte eine stärkere Destruktion der Arterienwand zur Folge. Die Temperatur wurde in dieser Studie zwar nicht einzeln untersucht, aber mit den vorliegenden Daten erscheint eine Temperatur von 22°C mit intermittierenden Temperaturerhöhungen auf 37°C als besonders effektiv.

Limitationen der Studie

Der Versuchsaufbau dieser Arbeit weist sowohl Stärken als auch Limitationen auf. Es ist zu erwähnen, dass durch die gleichzeitige Untersuchung mehrerer prozeduraler Parameter die einzelnen Effekte nicht isoliert voneinander beurteilt werden konnten. Die Verkürzung der DZ-Zeit und Verminderung der Detergenzien-Konzentrationen stellen zusätzliche Variationen in den Modifikationen dar, die die Vergleichbarkeit der einzelnen Faktoren vermindern. Da jedoch die systematische Betrachtung der einzelnen Faktoren bereits im Vorfeld stattfand [134], ist diese Untersuchung nicht Mittelpunkt der Arbeit. Hier sollten insbesondere die Kombinationen der Parameter untersucht und so eine optimierte Methode entwickelt werden.

In dieser Arbeit können außerdem die Langzeitwirkungen der Defekte nicht beurteilt werden. Beispielsweise stellt sich die Frage, ob ein Verlust der EZM der Arterien Einfluss auf die Haltbarkeit des Xenografts haben könnte. Tudorache et al. demonstrieren in einer longitudinalen klinischen Studie einen Erhalt der hämodynamischen Eigenschaften von dezellularisiertem Gewebe für bis zu 7,6 Jahren in jungen Patienten [188]. Dies gibt Hinweise auf eine gute Haltbarkeit der Arterien trotz minimaler Defekte der EZM, welche nicht vollständig vermieden werden können [86, 114, 184]. Auch weitergehende Testungen der biomechanischen Eigenschaften der EZM sind nötig um die Haltbarkeit zu beweisen [69, 96]. Beispielsweise sollte zusätzlich zum axialen Zugstress auch eine radiale Beanspruchung der Arterien getestet werden [189]. Auch dauerhafte

Beanspruchung in einem Bioreaktor kann die Haltbarkeit der Arterie und Veränderung der mechanischen Eigenschaften gut darstellen [190, 191]. Im weiteren Verlauf sollte auch die Zytotoxizität von zurückgebliebenen Detergenzien, thrombogene Faktoren [3, 168, 140] und auch die Immunreaktionen beurteilt werden [93, 111, 137]. Besonders die Testung in vivo, beispielsweise durch Implantation der Arterien in die Subkutis von Ratten, gibt ausgiebige Informationen über direkte Reaktionen und Langzeitwirkungen des Immunsystems auf das DZ-Gewebe [92, 192].

Selbstverständlich müssen für die klinische Anwendung der Verfahren weitere Maßnahmen getroffen werden [80, 84]. Ein wichtiger Faktor für die Verwendung am Patienten ist die universale Anwendbarkeit mit geringem Vorbereitungsaufwand, einfacher Reproduktion, Sterilisation und Lagerung [79, 81, 84].

Schlussfolgerung

Diese Dissertationsarbeit präsentiert die Anwendung von verschiedenen physikalischen und prozeduralen Veränderungen, um eine Optimierung von bestehenden DZ-Protokollen zu erreichen. Dabei kann belegt werden, dass die publizierten Verfahren noch einige Verbesserungen benötigen, um schließlich zu einem vollständig zellfreien Gewebe zu führen. Eine Optimierung durch die Kombination verschiedener Methoden wird hier nun, wie bereits auch in anderen Studien, als besonders effektiv dargestellt [84, 91, 99, 100]. Die Verbesserung durch die Einführung prozeduraler und physikalischer Veränderungen ist in den hier getesteten Protokollen signifikant und reproduzierbar. Zyklische DZ und der Einsatz von Ultraschall verstärken den Effekt der Detergenzien und insbesondere der kontinuierliche zirkulierende Fluss der DZ-Lösung kann für eine Effektsteigerung sorgen. Nach Evaluation aller Daten kann das modifizierte Protokoll von Z. H. Syedain et al. (Protokoll TX/SDS) als effektivste der hier untersuchten Methoden erachtet werden. Seine kurze Behandlungszeit mit Detergenzien in verringerter Konzentration gefolgt von einer effizienten EZ führt zu einer schonenden und erfolgreichen Dezellularisation.

8. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

In dieser Studie wurden diverse Verbesserungsmöglichkeiten in der DZ von Pulmonalarterien getestet. Es sollten verschiedene physikalische und prozedurale Methoden angewendet werden, um bestehende Verfahren zu optimieren. Dabei wurden vier publizierte Detergenzien-basierte DZ-Protokolle zuerst auf ihre Reproduzierbarkeit untersucht und anschließend verschiedenen Modifikationen unterzogen. Im ersten Verbesserungsversuch wurde ein kontinuierlicher Fluss der Flüssigkeit induziert, um im Vergleich zum reinen Schütteln der Lösung eine verbesserte Verteilung und Einwirkung der Detergenzien zu gewährleisten. Die zweite Modifikation erfolgte durch Nutzung einer intraluminalen Perfusion der PA durch die DZ-Lösung. Zusätzlich zu diesen beiden Methoden wurden intermittierende Ultraschallbehandlungen sowie Temperaturerhöhungen integriert. Des Weiteren erfolgte ein Wechsel der Lösungen mit intermittierenden Waschzyklen, mit dem Ziel die bereits gelösten Zellbestandteile zu beseitigen. Zuletzt wurde der DZ mit Detergenzien noch eine Enzymbehandlung mit DNase und α -Galaktosidase angeschlossen.

Bei der Reproduktion der publizierten Protokolle konnte belegt werden, dass keines der Verfahren eine vollständige Zellfreiheit erreichen konnten. Die Ineffektivität der DZ-Verfahren bewies die Notwendigkeit von Optimierungen durch universell anwendbare Methoden. Mit Verwendung der genannten Modifikationen zeigten alle Methoden eine Verbesserung der DZ-Effektivität. Mikroskopisch waren keine Zellkerne und DNA-Residuen in der DAPI- und H&E-Färbung sichtbar. Auch eine Quantifizierung des DNA-Gehaltes präsentierte eine signifikante DNA-Reduktion im Gewebe. Die Auswirkungen auf die EZM wurden mit histologischen Färbungen (Movat's Pentachrom und Picro-Siriusrot) sowie quantitativen Messungen der Glykosaminoglykane sowie der Rasterelektronenmikroskopie untersucht. Die ausgelösten Defekte der EZM bei erfolgreicher Entfernung der Zellbestandteile konnte mit den Modifikationen signifikant reduziert werden. Im Vergleich stellte sich der kontinuierliche rotierende Fluss der Detergenzien der perfusionsbasierten DZ in allen Protokollen überlegen dar. Besonders nach Einsatz der Enzyme konnte in allen Proben mikroskopisch eine vollständige Zellfreiheit erreicht werden.

Diese Arbeit bestätigt die Steigerung der Effektivität von Detergenzien durch eine Kombination aus Ultraschall und erhöhter Temperatur. Zusätzlich wurde gezeigt, dass durch intermittierende Waschphasen eine tiefere Eindringtiefe von DZ-Lösungen garantiert werden kann. Ein kontinuierlicher Fluss von Detergenzien ermöglicht ein besseres Umspülen des Gewebes und führt somit konstant zu optimierten Ergebnissen. Des Weiteren wird durch diese Studie die Wichtigkeit der Verwendung von Enzymen zur vollständigen DZ mit gutem Erhalt der EZM hervorgehoben. Mithilfe der hier geprüften Methoden konnte die Dauer der DZ oder die Konzentration der Detergenzien um 50 % verringert werden, was zu einem besseren Erhalt der EZM führte.

Zusammenfassend konnten mit den evaluierten Methoden alle verschiedenen Protokolle signifikant verbessert werden. So kann schließlich eine Kombination aus enzymatischer und Detergenzien-basierter DZ mit intermittierenden Waschzyklen und Ultraschallbehandlungen bei kontinuierlichem Fluss der Flüssigkeit besonders empfohlen werden. Basierend auf den Erkenntnissen dieser Studie sind Verbesserungen von weiteren DZ-Verfahren, sowie Behandlung anderer Gewebearten möglich. Durch diese nachgewiesenen effektiveren und optimierten Methoden könnten auch schwieriger behandelbare Gewebe und Organe für den klinischen Einsatz nutzbar gemacht werden.

9. LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Paulsen F, Waschke J, Sobotta, *Atlas der Anatomie*. 23. Auflage, München: Elsevier, Urban & Fischer; 2010
- [2] Aumüller G, Aust G, Conrad A, Engele J, Kirsch J, et al., *Duale Reihe Anatomie* 4. Auflage. Stuttgart: Thieme; 2017
- [3] Misfeld M, Sievers HH. Heart valve macro- and microstructure. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2007;362(1484):1421-1436. doi:10.1098/rstb.2007.2125
- [4] Sacks MS, David Merryman W, Schmidt DE. *On the biomechanics of heart valve function*. *J Biomech*. 2009;42(12):1804-1824. doi:10.1016/j.jbiomech.2009.05.015
- [5] Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M, Wesker K. *3.5 Herzbinnenräume*. In: *Innere Organe* Prometheus LernAtlas. 5. Auflage, Stuttgart, Thieme; 2018
- [6] Lüllmann-Rauch R, *Histologie*, 2. Auflage. Stuttgart: Thieme, 2006.
- [7] Crick SJ, Sheppard MN, Ho SY, Gebstein L, Anderson RH. *Anatomy of the pig heart: comparisons with normal human cardiac structure*. *J Anat*. 1998;193 (Pt 1)(Pt 1):105-119. doi:10.1046/j.1469-7580.1998.19310105.x
- [8] Sommer JR, Waugh RA. *Ultrastructure of heart muscle*. *Environ Health Perspect*. 1978;26:159-167. doi:10.1289/ehp.7826159
- [9] Schmidt R, *Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie*, 31. Auflag. Berlin Heidelberg: Springer, 2011.
- [10] L. Heinrich, Peter C., Mueller, Matthias, Graeve, *Biochemie und Pathobiochemie*, 9. Auflage. Berlin Heidelberg: Springer, 2014.
- [11] Tao G, Kotick JD, Lincoln J. *Heart valve development, maintenance, and disease: the role of endothelial cells*. *Curr Top Dev Biol*. 2012;100:203-232. doi:10.1016/B978-0-12-387786-4.00006-3
- [12] Hort W, *Pathologie des Endokard, der Kranzarterien und des Myokard*. 1.Auflage, Berlin-Heidelberg: Springer; 2000
- [13] Chambers HF, Bayer AS. *Native-Valve Infective Endocarditis*. *N Engl J Med*. 2020;383(6):567-576. doi:10.1056/NEJMcp2000400
- [14] Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M et al. *6.2 Aufbau von Arterien und Venen*. In: Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M et al. *Prometheus LernAtlas - Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem*, 5. Auflage, Stuttgart: Thieme; 2018. doi:10.1055/b-006-149643
- [15] Glatz-Krieger, Katharina; Institut für Pathologie Basel. „*PathoPic ID 10671- Normale Aorta ascendens (elastische Arterie)*.“ *Pathorama* 10. Aug 2010, <https://pathorama.ch/pathopic/10671/show>

LITERATURVERZEICHNIS

- [16] lung B, Vahanian A. *Epidemiology of valvular heart disease in the adult*. Nat Rev Cardiol. 2011;8(3):162-172. doi:10.1038/nrcardio.2010.202
- [17] Schoen FJ. *Morphology, Clinicopathologic Correlations, and Mechanisms in Heart Valve Health and Disease*. Cardiovasc Eng Technol. 2018;9(2):126-140. doi:10.1007/s13239-016-0277-7
- [18] Mrsic Z, Hopkins SP, Antevil JL, Mullenix PS. *Valvular Heart Disease*. Prim Care. 2018;45(1):81-94. doi:10.1016/j.pop.2017.10.002
- [19] Baumgartner H, Falk V, Bax JJ, et al. *2017 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease*. Eur Heart J. 2017;38(36):2739-2791. doi:10.1093/eurheartj/ehx391
- [20] Mouws EMJP, de Groot NMS, van de Woestijne PC, et al. *Tetralogy of Fallot in the Current Era*. Semin Thorac Cardiovasc Surg. 2019;31(3):496-504. doi:10.1053/j.semtcvs.2018.10.015
- [21] Herold G. *Kardiologie, In: Innere Medizin 2021*. Berlin, Boston: De Gruyter; 2021. <https://doi.org/10.1515/9783110738896>
- [22] Hollenberg SM. *Valvular Heart Disease in Adults: Etiologies, Classification, and Diagnosis*. FP Essent. 2017;457:11-16.
- [23] Haude M. Management von Herzklappenerkrankungen : *ESC/EACTS-Leitlinie 2017 [Management of valvular heart disease : ESC/EACTS guidelines 2017]*. Herz. 2017;42(8):715-720. doi:10.1007/s00059-017-4643-5
- [24] Thamilarasan M, Griffin B. *Choosing the most appropriate valve operation and prosthesis*. Cleve Clin J Med. 2002;69(9):. doi:10.3949/ccjm.69.9.688
- [25] Zoghbi WA, Asch FM, Bruce C, et al. *Guidelines for the Evaluation of Valvular Regurgitation After Percutaneous Valve Repair or Replacement: A Report from the American Society of Echocardiography Developed in Collaboration with the Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Japanese Society of Echocardiography, and Society for Cardiovascular Magnetic Resonance* [published correction appears in J Am Soc Echocardiogr. 2019 Jul;32(7):914-917]. J Am Soc Echocardiogr. 2019;32(4):431-475. doi:10.1016/j.echo.2019.01.003
- [26] Ren JF, Aksut S, Lighty GW Jr, et al. *Mitral valve repair is superior to valve replacement for the early preservation of cardiac function: relation of ventricular geometry to function*. Am Heart J. 1996;131(5):974-981. doi:10.1016/s0002-8703(96)90182-9
- [27] Deutsche Herzstiftung e.V., *Deutscher Herzbericht*, Deutsche Herzstiftung, 2020.
- [28] Rommens KL, Estrera AL. *Contemporary Management of Aortic Arch Aneurysm*. Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery. 2019 Winter;31(4):697-702. DOI: 10.1053/j.semtcvs.2019.03.011.
- [29] Baikoussis NG, Antonopoulos CN, Papakonstantinou NA, Argiriou M, Geroulakos G. *Endovascular stent grafting for ascending aorta diseases*. J Vasc Surg. 2017;66(5):1587-1601. doi:10.1016/j.jvs.2017.07.064

LITERATURVERZEICHNIS

- [30] Takagi H, Goto SN, Matsui M, Manabe H, Umemoto T. *A contemporary meta-analysis of Dacron versus polytetrafluoroethylene grafts for femoropopliteal bypass grafting*. J Vasc Surg. 2010;52(1):232-236. doi:10.1016/j.jvs.2010.02.010
- [31] Kvidal P, Bergström R, Malm T, Ståhle E. *Long-term follow-up of morbidity and mortality after aortic valve replacement with a mechanical valve prosthesis*. Eur Heart J. 2000;21(13):1099-1111. doi:10.1053 /euhj. 2000. 1862
- [32] Wernly JA, Crawford MH. *Choosing a prosthetic heart valve*. Cardiol Clin. 1998;16(3):491-504. doi:10.1016/s0733-8651(05)70028-x
- [33] Nkomo VT, Gardin JM, Skelton TN, Gottdiener JS, Scott CG, Enriquez-Sarano M. *Burden of valvular heart diseases: a population-based study*. Lancet. 2006;368(9540):1005-1011. doi:10.1016/S0140-6736(06)69208-8
- [34] Cannegieter SC, Rosendaal FR, Briët E. *Thromboembolic and bleeding complications in patients with mechanical heart valve prostheses*. Circulation. 1994;89(2):635-641. doi:10.1161/01.cir.89.2.635
- [35] Wang A, Athan E, Pappas PA, et al. *Contemporary clinical profile and outcome of prosthetic valve endocarditis*. JAMA, 2007; 297(12):1354-1361. doi:10.1001/jama.297.12.1354
- [36] Lalani T, Chu VH, Park LP, et al. *In-hospital and 1-year mortality in patients undergoing early surgery for prosthetic valve endocarditis* [published correction appears in JAMA Intern Med. 2013 Oct 28;173(19):1846]. JAMA Intern Med. 2013;173(16):1495-1504. doi:10.1001/jamainternmed.2013.8203
- [37] Gott VL, Alejo DE, Cameron DE. *Mechanical heart valves: 50 years of evolution*. Ann Thorac Surg. 2003;76(6):S2230-S2239. doi:10.1016/j.athoracsur.2003.09.002
- [38] Myers PO, Mokashi SA, Horgan E, et al. *Outcomes after mechanical aortic valve replacement in children and young adults with congenital heart disease*. J Thorac Cardiovasc Surg. 2019;157(1):329-340. doi:10.1016/j.jtcvs.2018.08.077
- [39] Vennemann B, Rösger T, Heinisch P, Obrist D, *Leaflet kinematics of mechanical and bioprosthetic aortic valve prostheses*. ASAIO Journal, 2018; 64(5), 651–661. <https://doi.org/10.1097/MAT.0000000000000687>
- [40] Dasi LP, Simon HA, Sucusky P, Yoganathan AP. *Fluid mechanics of artificial heart valves*. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2009;36(2):225-237. doi:10.1111/j.1440-1681.2008.05099.x
- [41] Dalrymple-Hay MJ, Leung Y, Ohri SK, et al. *Tricuspid valve replacement: bioprostheses are preferable*. J Heart Valve Dis. 1999;8(6):644-648.
- [42] Nappi F, Singh SSA, Bellomo F, Nappi P, Iervolino A, Acar C. *The Choice of Pulmonary Autograft in Aortic Valve Surgery: A State-of-the-Art Primer*. Biomed Res Int. 2021;2021:5547342. Published 2021 Apr 13. doi:10.1155/2021/5547342
- [43] Stoney RJ, Olofsson PA. *Aortorenal arterial autografts: the last two decades*. Ann Vasc Surg. 1988;2(2):169-173. doi:10.1016/S0890-5096(06)60801-7
- [44] Sievers H, Schmidtke C, Kaps M, and Graf B, *Aortenklappenersatz mit pulmonalem Autograft – Ross-Operation*, Dt Ärztebl 1998; 95: A-2922-2930

LITERATURVERZEICHNIS

- [45] Chambers JC, Somerville J, Stone S, Ross DN. *Pulmonary autograft procedure for aortic valve disease: long-term results of the pioneer series*. *Circulation*. 1997;96(7):2206-2214. doi:10.1161/01.cir.96.7.2206
- [46] Sodha NR. *Complex homograft aortic reconstruction: New recipes from old ingredients*. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2017;153(5):e77-e79. doi:10.1016/j.jtcvs.2017.01.027
- [47] Huygens SA, Mostaka M, Hanif M, Bekkers JA et al., *Contemporary outcomes after surgical aortic valve replacement with bioprostheses and allografts: a systematic review and meta-analysis*, *European Journal of Cardio-thoracic Surgery*, 2016; 50: 605–616, 2016, doi: 10.1093/ejcts/ezw101.
- [48] Carpenter JP, Tomaszewski JE. *Human saphenous vein allograft bypass grafts: immune response*. *J Vasc Surg*. 1998;27(3):492-499. doi:10.1016/s0741-5214(98)70323-4
- [49] Manji RA, Lee W, Cooper DKC. *Xenograft bioprosthetic heart valves: Past, present and future*. *Int J Surg*. 2015;23(Pt B):280-284. doi:10.1016/j.ijisu.2015.07.009
- [50] Yerebakan C, Sinha L, Desai M. *The never-ending story of the ideal valve*. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2019;157(2):726-727. doi:10.1016/j.jtcvs.2018.07.076
- [51] Manji RA, Zhu LF, Nijjar NK, et al. *Glutaraldehyde-fixed bioprosthetic heart valve conduits calcify and fail from xenograft rejection*. *Circulation*. 2006;114(4):318-327. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.549311
- [52] Schoen FJ, Levy RJ. *Calcification of tissue heart valve substitutes: progress toward understanding and prevention*. *Ann Thorac Surg*. 2005;79(3):1072-1080. doi:10.1016/j.athoracsur.2004.06.033
- [53] Voss F, Sucker C, Litmathe J. *Antikoagulation nach Herzklappenersatz*. *Wien Med Wochenschr* 2021. doi.org/10.1007/s10354-021-00845-7
- [54] Milewski RK, Habertauer A, Bavaria JE, et al. *Selection of prosthetic aortic valve and root replacement in patients younger than age 30 years*. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2019;157(2):714-725. doi:10.1016/j.jtcvs.2018.06.102
- [55] Schmidt CE, Baier JM. *Acellular vascular tissues: natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering*. *Biomaterials*. 2000;21(22):2215-2231. doi:10.1016/s0142-9612(00)00148-4
- [56] Kasimir MT, Rieder E, Seebacher G, Wolner E, Weigel G, Simon P. *Presence and elimination of the xenoantigen gal (alpha1, 3) gal in tissue-engineered heart valves*. *Tissue Eng*. 2005;11(7-8):1274-1280. doi:10.1089/ten.2005.11.1274
- [57] Etnel JR, Elmont LC, Ertekin E, et al. *Outcome after aortic valve replacement in children: A systematic review and meta-analysis*. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2016;151(1):143-52.e523. doi:10.1016/j.jtcvs.2015.09.083
- [58] Suri RM, Schaff HV. *Selection of aortic valve prostheses: contemporary reappraisal of mechanical versus biologic valve substitutes*. *Circulation*. 2013;128(12):1372-1380. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.001681
- [59] Vacanti CA. *The history of tissue engineering*. *J Cell Mol Med*. 2006;10(3):569-576. doi:10.1111/j.1582-4934.2006.tb00421.x

LITERATURVERZEICHNIS

- [60] O'Brien, Fergal J. *Biomaterials & Scaffolds for Tissue Engineering*. Materials Today 2011: 88–95. Materials Today. Web
- [61] Perić Kačarević Ž, Rider P, Alkildani S, et al. *An introduction to bone tissue engineering*. Int J Artif Organs. 2020;43(2):69-86. doi:10.1177/0391398819876286
- [62] Langer R, Vacanti J. *Advances in tissue engineering*. J Pediatr Surg. 2016;51(1):8-12. doi:10.1016/j.jpedsurg.2015.10.022
- [63] Brittberg, M and Anders L. *Tissue engineering of cartilage*. Tissue Engineering 2008: 533-557.
- [64] Combe J, Buniet JM, Hervé P, Camelot G. *Endothelial seeding of vascular prostheses: a technique of in situ enzymatic retrieval of endothelial cells without vein sacrifice*. Ann Vasc Surg. 1993;7(5):488-490. doi:10.1007/BF02002136
- [65] Herring M, Gardner A, Glover J. *A single-staged technique for seeding vascular grafts with autogenous endothelium*. Surgery. 1978;84(4):498-504.
- [66] Cheung DY, Duan B, Butcher JT. *Current progress in tissue engineering of heart valves: multiscale problems, multiscale solutions*. Expert Opin Biol Ther. 2015;15(8):1155-1172. doi:10.1517/14712598.2015.1051527
- [67] Sabetkish S, Kajbafzadeh AM, Sabetkish N, et al. *Whole-organ tissue engineering: decellularization and immunolarization of three-dimensional matrix liver scaffolds*. J Biomed Mater Res A. 2015;103(4):1498-1508. doi:10.1002/jbm.a.35291
- [68] Nerem RM, Braddon LG, Seliktar D. *Chapter IV.1-Tissue Engineering and the Cardiovascular System in Frontiers in Tissue Engineering* 1998:561-579. doi.org/10.1016/B978-008042689-1/50032-7.
- [69] Dahl SL, Rhim C, Song YC, Niklason LE. *Mechanical properties and compositions of tissue engineered and native arteries*. Ann Biomed Eng. 2007;35(3):348-355. doi:10.1007/s10439-006-9226-1
- [70] Pashneh-Tala S, MacNeil S, Claeysens F. *The Tissue-Engineered Vascular Graft-Past, Present, and Future*. Tissue Eng Part B Rev. 2016;22(1):68-100. doi:10.1089/ten.teb.2015.0100
- [71] Murin P, Weixler VHM, Kuschnerus K, et al. *Pulmonary artery augmentation using decellularized equine pericardium (Matrix Patch™): initial single-centre experience*. Eur J Cardiothorac Surg. 2021;60(5):1094-1101. doi:10.1093/ejcts/ezab183
- [72] Ellassal AA, Al-Radi OO, Zaher ZF, et al. *Equine pericardium: a versatile alternative reconstructive material in congenital cardiac surgery*. J Cardiothorac Surg. 2021;16(1):110. Published 2021 Apr 23. doi:10.1186/s13019-021-01494-y
- [73] Schaner PJ, Martin ND, Tulenko TN, et al. *Decellularized vein as a potential scaffold for vascular tissue engineering*. J Vasc Surg. 2004;40(1):146-153. doi:10.1016/j.jvs.2004.03.033.
- [74] Martin ND, Schaner PJ, Tulenko TN, et al. *In vivo behavior of decellularized vein allograft*. J Surg Res. 2005;129(1):17-23. doi:10.1016/j.jss.2005.06.037

LITERATURVERZEICHNIS

- [75] Welman T, Michel S, Segaren N, Shanmugarajah K. *Bioengineering for Organ Transplantation: Progress and Challenges*. Bioengineered. 2015;6(5):257-261. doi:10.1080/21655979.2015.1081320
- [76] Hummel M, Hetzer R. *Herztransplantation in Deutschland 2002*, Zentralbl Chir. 2003;128(10):788-795. doi:10.1055/s-2003-44333
- [77] Wilhelm MJ, Ruschitzka F, Flammer AJ, Bettex D, Turina MI, Maisano F. *Fiftieth anniversary of the first heart transplantation in Switzerland in the context of the worldwide history of heart transplantation*. Swiss Med Wkly. 2020;150:w20192. Published 2020 Feb 7. doi:10.4414/smw.2020.20192
- [78] Fuchs M, Schibilsky D, Zeh W, Berchtold-Herz M, Beyersdorf F, Siepe M. *Does the heart transplant have a future?* Eur J Cardiothorac Surg. 2019 Jun 1;55(Suppl 1):i38-i48. doi: 10.1093/ejcts/ezz107. PMID: 31106338; PMCID: PMC6537946.
- [79] Ott HC, Matthiesen TS, Goh SK, et al. *Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart*. Nat Med. 2008;14(2):213-221. doi:10.1038/nm1684
- [80] Kitahara H, Yagi H, Tajima K, et al. *Heterotopic transplantation of a decellularized and recellularized whole porcine heart*. Interact Cardiovasc Thorac Surg. 2016;22(5):571-579. doi:10.1093/icvts/ivw022
- [81] Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. *An overview of tissue and whole organ decellularization processes*. Biomaterials. 2011;32(12):3233-3243. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.01.057
- [82] Naso F, Gandaglia A. *Different approaches to heart valve decellularization: A comprehensive overview of the past 30 years*. Xenotransplantation. 2018;25(1):10.1111/xen.12354. doi:10.1111/xen.12354
- [83] Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. *Decellularization of tissues and organs*. Biomaterials. 2006;27(19):3675-3683. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.02.014
- [84] Zhang X, Chen X, Hong H, Hu R, Liu J, Liu C. *Decellularized extracellular matrix scaffolds: Recent trends and emerging strategies in tissue engineering*. Bioact Mater. 2021;10:15-31. Published 2021 Sep 23. doi:10.1016/j.bioactmat.2021.09.014
- [85] Keane TJ, Swinehart IT, Badylak SF. *Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance*. Methods. 2015;84:25-34. doi:10.1016/j.ymeth.2015.03.005
- [86] Böer U, Lohrenz A, Klingenberg M, Pich A, Haverich A, Wilhelmi M. *The effect of detergent-based decellularization procedures on cellular proteins and immunogenicity in equine carotid artery grafts*. Biomaterials. 2011;32(36):9730-9737. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.09.015
- [87] Hoshiba T, Lu H, Kawazoe N, Chen G. *Decellularized matrices for tissue engineering*. Expert Opin Biol Ther. 2010;10(12):1717-1728. doi:10.1517/14712598.2010.534079
- [88] Mohammadi S, Belli E, Martinovic I, et al. *Surgery for right ventricle to pulmonary artery conduit obstruction: risk factors for further reoperation*. Eur J Cardiothorac Surg. 2005;28(2):217-222. doi:10.1016/j.ejcts.2005.04.014

LITERATURVERZEICHNIS

- [89] Cebotari S, Tudorache I, Ciubotaru A, 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):S115-S123. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.012161
- [90] Tock CL, Burden TS. *Chapter IV.2-Tissue Engineering Applied to the Heart in Frontiers in Tissue Engineering*, 1998:580-597, doi.org/10.1016/B978-008042689-1/50033-9.
- [91] Greco Song HH, Rumma RT, Ozaki CK, Edelman ER, Chen CS. *Vascular Tissue Engineering: Progress, Challenges, and Clinical Promise*. *Cell Stem Cell*. 2018;22(4):608. doi:10.1016/j.stem.2018.03.014
- [92] Perea-Gil I, Uriarte JJ, Prat-Vidal C, et al. *In vitro comparative study of two decellularization protocols in search of an optimal myocardial scaffold for recellularization*. *Am J Transl Res*. 2015;7(3):558-573.
- [93] Badylak SF, Gilbert TW. *Immune response to biologic scaffold materials*. *Semin Immunol*. 2008;20(2):109-116. doi:10.1016/j.smim.2007.11.003
- [94] O'Rourke C, Day AGE, Murray-Dunning C, et al. *An allogeneic 'off the shelf' therapeutic strategy for peripheral nerve tissue engineering using clinical grade human neural stem cells*. *Sci Rep*. 2018;8(1):2951. doi:10.1038/s41598-018-20927-8
- [95] Badylak SF, Freytes DO, Gilbert TW. *Reprint of: Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function*. *Acta Biomater*. 2015;23 Suppl:S17-S26. doi:10.1016/j.actbio.2015.07.016
- [96] Zou Y, Zhang Y. *Mechanical evaluation of decellularized porcine thoracic aorta*. *J Surg Res*. 2012;175(2):359-368. doi:10.1016/j.jss.2011.03.070
- [97] Tefft BJ, Choe JA, Young MD, et al. *Cardiac Valve Bioreactor for Physiological Conditioning and Hydrodynamic Performance Assessment*. *Cardiovasc Eng Technol*. 2019;10(1):80-94. doi:10.1007/s13239-018-00382-2
- [98] Grauss RW, Hazekamp MG, Oppenhuizen F, van Munsteren CJ, Gittenberger-de Groot AC, DeRuiter MC. *Histological evaluation of decellularised porcine aortic valves: matrix changes due to different decellularisation methods*. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2005;27(4):566-571. doi:10.1016/j.ejcts.2004.12.052
- [99] Rahman S, Griffin M, Naik A, Szarko M, Butler PEM. *Optimising the decellularization of human elastic cartilage with trypsin for future use in ear reconstruction*. *Sci Rep*. 2018;8(1):3097. Published 2018 Feb 15. doi:10.1038/s41598-018-20592-x
- [100] Burk J, Erbe I, Berner D, et al. *Freeze-thaw cycles enhance decellularization of large tendons*. *Tissue Eng Part C Methods*. 2014;20(4):276-284. doi:10.1089/ten.TEC.2012.0760
- [101] Haupt J, Lutter G, Gorb SN, et al. *Detergent-based decellularization strategy preserves macro- and microstructure of heart valves*. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2018;26(2):230-236. doi:10.1093/icvts/ivx316
- [102] Cebotari S, Tudorache I, Jaekel T, et al. *Detergent decellularization of heart valves for tissue engineering: toxicological effects of residual detergents on human endothelial cells*. *Artif Organs*. 2010;34(3):206-210. doi:10.1111/j.1525-1594.2009.00796.x

LITERATURVERZEICHNIS

- [103] García-Gareta E, Abduldaiem Y, Sawadkar P, Kyriakidis C, Lali F, Greco KV. *Decellularised scaffolds: just a framework? Current knowledge and future directions*. J Tissue Eng. 2020;11:2041731420942903. doi:10.1177/2041731420942903
- [104] Buddrus Joachim: *Grundlagen der Organischen Chemie*, 3. Auflage, Walter de Gruyter, Berlin – New York, 2003.
- [105] Viola KS, Rodrigues EM, Tanomaru-Filho M, et al. *Cytotoxicity of peracetic acid: evaluation of effects on metabolism, structure and cell death*. Int Endod J. 2018;51 Suppl 4:e264-e277. doi:10.1111/iej.12750
- [106] Schneider C, Lehmann J, van Osch GJ, et al. *Systematic Comparison of Protocols for the Preparation of Human Articular Cartilage for Use as Scaffold Material in Cartilage Tissue Engineering*. Tissue Eng Part C Methods. 2016;22(12):1095-1107. doi:10.1089/ten.TEC.2016.0380
- [107] Zambaiti E, Scottoni F, Rizzi E, et al. *Whole rat stomach decellularisation using a detergent-enzymatic protocol*. Pediatr Surg Int. 2019;35(1):21-27. doi:10.1007/s00383-018-4372-8
- [108] Khorramirouz R, Sabetkish S, Akbarzadeh A, Muhammadnejad A, Heidari R, Kajbafzadeh AM. *Effect of three decellularisation protocols on the mechanical behaviour and structural properties of sheep aortic valve conduits*. Adv Med Sci. 2014;59(2):299-307. doi:10.1016/j.advms.2014.08.004
- [109] Macher BA, Galili U. *The Galalpha1,3Galbeta1,4GlcNAc-R (alpha-Gal) epitope: a carbohydrate of unique evolution and clinical relevance*. Biochim Biophys Acta. 2008 Feb;1780(2):75-88. doi: 10.1016/j.bbagen.2007.11.003. Epub 2007 Nov 22. PMID: 18047841; PMCID: PMC2271034.
- [110] Naso F, Gandaglia A, Iop L, Spina M, Gerosa G. *Alpha-Gal detectors in xenotransplantation research: a word of caution*. Xenotransplantation. 2012;19(4):215-220. doi:10.1111/j.1399-3089.2012.00714.x
- [111] Konakci KZ, Bohle B, Blumer R, et al. *Alpha-Gal on bioprostheses: xenograft immune response in cardiac surgery*. Eur J Clin Invest. 2005;35(1):17-23. doi:10.1111/j.1365-2362.2005.01441.x
- [112] Yam GH, Yusoff NZ, Goh TW, et al. *Decellularization of human stromal refractive lenticles for corneal tissue engineering*. Sci Rep. 2016;6:26339. Published 2016 May 23. doi:10.1038/srep26339
- [113] Wilson SL, Sidney LE, Dunphy SE, Dua HS, Hopkinson A. *Corneal Decellularization: A Method of Recycling Unsuitable Donor Tissue for Clinical Translation?*. Curr Eye Res. 2016;41(6):769-782. doi:10.3109/02713683.2015.1062114
- [114] Roosens A, Somers P, De Somer F, Carriel V, Van Nooten G, Cornelissen R. *Impact of Detergent-Based Decellularization Methods on Porcine Tissues for Heart Valve Engineering*. Ann Biomed Eng. 2016;44(9):2827-2839. doi:10.1007/s10439-016-1555-0
- [115] Negishi J, Funamoto S, Kimura T, Nam K, Higami T, Kishida A. *Effect of treatment temperature on collagen structures of the decellularized carotid artery using high hydrostatic pressure*. J Artif Organs. 2011;14(3):223-231. doi:10.1007/s10047-011-0570-z

LITERATURVERZEICHNIS

- [116] Aldridge A, Desai A, Owston H, et al. *Development and characterisation of a large diameter decellularised vascular allograft*. Cell Tissue Bank. 2018;19(3):287-300. doi:10.1007/s10561-017-9673-y
- [117] Dausgs A, Hutzler B, Meinke M, et al. *Detergent-Based Decellularization of Bovine Carotid Arteries for Vascular Tissue Engineering*. Ann Biomed Eng. 2017;45(11):2683-2692. doi:10.1007/s10439-017-1892-7
- [118] Han B, Teo KY, Ghosh S, Dutton JC, Grinnell F. *Thermomechanical analysis of freezing-induced cell-fluid-matrix interactions in engineered tissues*. J Mech Behav Biomed Mater. 2013;18:67-80. doi:10.1016/j.jmbbm.2012.10.014
- [119] Theodoridis K, Müller J, Ramm R, et al. *Effects of combined cryopreservation and decellularization on the biomechanical, structural and biochemical properties of porcine pulmonary heart valves*. Acta Biomater. 2016;43:71-77. doi:10.1016/j.actbio.2016.07.013
- [120] Azhim A, Takahashi T, Muramatsu K, Morimoto Y, Tanaka M, *Decellularization of meniscal tissue using ultrasound chemical process for tissue- engineered scaffold applications, IFMBE Proceedings*, 2010:31, 915–918, doi: 10.1007/978-3-642-14515-5_233.
- [121] Lin CH, Hsia K, Su CK, et al. *Sonication-Assisted Method for Decellularization of Human Umbilical Artery for Small-Caliber Vascular Tissue Engineering*. Polymers (Basel). 2021;13(11):1699. doi:10.3390/polym13111699
- [122] Hazwani A, Sha'Ban M, Azhim A. *Characterization and in vivo study of decellularized aortic scaffolds using closed sonication system*. Organogenesis. 2019;15(4):120-136. doi:10.1080/15476278.2019.1656997
- [123] Azhim A, Ono T, Fukui Y, Morimoto Y, Furukawa K, Ushida T. *Preparation of decellularized meniscal scaffolds using sonication treatment for tissue engineering*. Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc. 2013;2013:6953-6956. doi:10.1109/EMBC.2013.6611157
- [124] Oliveira AC, Garzón I, Ionescu AM, et al. *Evaluation of small intestine grafts decellularization methods for corneal tissue engineering*. PLoS One. 2013;8(6):e66538. Published 2013 Jun 14. doi:10.1371/journal.pone.0066538
- [125] Gevari MT, Abbasiasl T, Niazi S, Ghorbani M, Koşar A. *Direct and indirect thermal applications of hydrodynamic and acoustic cavitation: A review*. Applied Thermal Engineering, 2020: 171. doi.org/10.1016/j.applthermaleng.2020.115065.
- [126] Wu J, Nyborg WL. *Ultrasound, cavitation bubbles and their interaction with cells*. Adv Drug Deliv Rev. 2008;60(10):1103-1116. doi:10.1016/j.addr.2008.03.009
- [127] Azhim A, Syazwani N, Morimoto Y, Furukawa KS, Ushida T. *The use of sonication treatment to decellularize aortic tissues for preparation of bioscaffolds*. J Biomater Appl. 2014;29(1):130-141. doi:10.1177/0885328213517579
- [128] Azhim A, Yamagami K, Muramatsu K, Morimoto Y, Tanaka M. *The use of sonication treatment to completely decellularize blood arteries: a pilot study*. Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc. 2011;2011:2468-2471. doi:10.1109/IEMBS.2011.6090685

LITERATURVERZEICHNIS

- [129] Sullivan DC, Mirmalek-Sani SH, Deegan DB, et al. *Decellularization methods of porcine kidneys for whole organ engineering using a high-throughput system*. *Biomaterials*. 2012;33(31):7756-7764. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.07.023
- [130] Wainwright JM, Czajka CA, Patel UB, et al. *Preparation of cardiac extracellular matrix from an intact porcine heart*. *Tissue Eng Part C Methods*. 2010;16(3):525-532. doi:10.1089/ten.TEC.2009.0392
- [131] Akhyari P, Aubin H, Gwanmesia P, et al. *The quest for an optimized protocol for whole-heart decellularization: a comparison of three popular and a novel decellularization technique and their diverse effects on crucial extracellular matrix qualities*. *Tissue Eng Part C Methods*. 2011;17(9):915-926. doi:10.1089/ten.TEC.2011.0210
- [132] Wainwright JM, Czajka CA, Patel UB, et al. *Preparation of cardiac extracellular matrix from an intact porcine heart*. *Tissue Eng Part C Methods*. 2010;16(3):525-532. doi:10.1089/ten.TEC.2009.0392
- [133] Simsa R, Padma AM, Heher P, et al. *Systematic in vitro comparison of decellularization protocols for blood vessels*. *PLoS One*. 2018;13(12):e0209269. Published 2018 Dec 17. doi:10.1371/journal.pone.0209269
- [134] Starnecker F, König F, Hagl C, Thierfelder N. *Tissue-engineering acellular scaffolds-The significant influence of physical and procedural decellularization factors*. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2018;106(1):153-162. doi:10.1002/jbm.b.33816
- [135] Keane TJ, Londono R, Turner NJ, Badylak SF. *Consequences of ineffective decellularization of biologic scaffolds on the host response*. *Biomaterials*. 2012;33(6):1771-1781. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.10.054
- [136] Gilbert TW, Freund JM, Badylak SF. *Quantification of DNA in biologic scaffold materials*. *J Surg Res*. 2009;152(1):135-139. doi:10.1016/j.jss.2008.02.013
- [137] Brown BN, Valentin JE, Stewart-Akers AM, McCabe GP, Badylak SF. *Macrophage phenotype and remodeling outcomes in response to biologic scaffolds with and without a cellular component*. *Biomaterials*. 2009;30(8):1482-1491. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.11.040
- [138] Nagata S, Hanayama R, Kawane K. *Autoimmunity and the clearance of dead cells*. *Cell*. 2010;140(5):619-630. doi:10.1016/j.cell.2010.02.014
- [139] Aguiari P, Iop L, Favaretto F, et al. *In vitro comparative assessment of decellularized bovine pericardial patches and commercial bioprosthetic heart valves*. *Biomed Mater*. 2017;12(1):015021. Published 2017 Feb 3. doi:10.1088/1748-605X/aa5644
- [140] Zhou J, Fritze O, Schleicher M, et al. *Impact of heart valve decellularization on 3-D ultrastructure, immunogenicity and thrombogenicity*. *Biomaterials*. 2010;31(9):2549-2554. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.11.088
- [141] Syedain ZH, Meier LA, Reimer JM, Tranquillo RT. *Tubular heart valves from decellularized engineered tissue*. *Ann Biomed Eng*. 2013;41(12):2645-2654. doi:10.1007/s10439-013-0872-9
- [142] Rieder E, Seebacher G, Kasimir MT, et al. *Tissue engineering of heart valves: decellularized porcine and human valve scaffolds differ importantly in residual potential to attract*

LITERATURVERZEICHNIS

- monocytic cells*. *Circulation*. 2005;111(21):2792-2797. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.104.473629
- [143] Zhang J, Hu ZQ, Turner NJ, Teng SF, Cheng WY, Zhou HY, Zhang L, Hu HW, Wang Q, Badylak SF. *Perfusion-decellularized skeletal muscle as a three-dimensional scaffold with a vascular network template*. *Biomaterials*. 2016 May;89:114-26. doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.02.040. Epub 2016 Feb 26. PMID: 26963901.
- [144] Chazotte B. *Labeling nuclear DNA using DAPI*. *Cold Spring Harb Protoc*. 2011; 5556. doi:10.1101/pdb.prot5556
- [145] Kapuscinski J. *DAPI: a DNA-specific fluorescent probe*. *Biotech Histochem*. 1995;70(5):220-233. doi:10.3109/10520299509108199
- [146] M. B. M. Sanderson, Ian Smith, *Fluorescence Microscopy*, *Physiology & behavior*, 2016; 176(1):100–106. doi: 10.1016/j.gde.2016.03.011.
- [147] Feldman AT, Wolfe D. *Tissue processing and hematoxylin and eosin staining*. *Methods Mol Biol*. 2014;1180:31-43. doi:10.1007/978-1-4939-1050-2_3
- [148] Cardiff RD, Miller CH, Munn RJ. *Manual hematoxylin and eosin staining of mouse tissue sections*. *Cold Spring Harb Protoc*. 2014;2014(6):655-658. Published 2014 Jun 2. doi:10.1101/pdb.prot073411
- [149] Chan JK. *The wonderful colors of the hematoxylin-eosin stain in diagnostic surgical pathology*. *Int J Surg Pathol*. 2014;22(1):12-32. doi:10.1177/1066896913517939
- [150] Halper J, Kjaer M. *Basic components of connective tissues and extracellular matrix: elastin, fibrillin, fibulins, fibrinogen, fibronectin, laminin, tenascins and thrombospondins*. *Adv Exp Med Biol*. 2014;802:31-47. doi:10.1007/978-94-007-7893-1_3
- [151] Theocharis AD, Skandalis SS, Gialeli C, Karamanos NK. *Extracellular matrix structure*. *Adv Drug Deliv Rev*. 2016;97:4-27. doi:10.1016/j.addr.2015.11.001
- [152] Torzewski M: *Die Movat-Pentachromfärbung – eine farbenprächtige Darstellung verschiedener zellulärer und extrazellulärer Gewebekomponenten*, *Mikroskopie*, 2015;10 (2):204–208. doi: 10.5414/mkx0060.
- [153] Heinzeller T, Büsing CM, *Histologie, Histopathologie und Zytologie für den Einstieg*. 1.Auflage, Stuttgart, Thieme, 2001.
- [154] Lattouf R, Younes R, Lutomski D, et al. *Picrosirius red staining: a useful tool to appraise collagen networks in normal and pathological tissues*. *J Histochem Cytochem*. 2014;62(10):751-758. doi:10.1369/0022155414545787
- [155] Chowdhury SR, Mh Busra MF, Lokanathan Y, et al. *Collagen Type I: A Versatile Biomaterial*. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1077:389-414. doi:10.1007/978-981-13-0947-2_21
- [156] Kuivaniemi H, Tromp G. *Type III collagen (COL3A1): Gene and protein structure, tissue distribution, and associated diseases*. *Gene*. 2019;707:151-171. doi:10.1016/j.gene.2019.05.003
- [157] Parenteau-Bareil, R, Gauvin, R, & Berthod, F (2010). *Collagen-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications*. *Materials*, 3, 1863 - 1887.

LITERATURVERZEICHNIS

- [158] Schmitz N, Laverty S, Kraus VB, Aigner T. *Basic methods in histopathology of joint tissues. Osteoarthritis Cartilage*. 2010;18 Suppl 3:S113-S116. doi:10.1016/j.joca.2010.05.026
- [159] Inoué S. *Polarization microscopy*. Curr Protoc Cell Biol. 2002 Feb;Chapter 4:Unit 4.9. doi:10.1002/0471143030.cb0409s13. PMID: 18228405.
- [160] Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH *Image to ImageJ: 25 years of image analysis*. Nat Methods. 2012;9(7):671-675. doi:10.1038/nmeth.2089
- [161] Rueden CT, Schindelin J, Hiner MC, et al. *ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data*. BMC Bioinformatics. 2017;18(1):529. Published 2017 Nov 29. doi:10.1186/s12859-017-1934-z
- [162] Reimer L, Scanning Electron Microscopy, 1. Auflage, Berlin- Heidelberg, Springer-Verlag; 1985
- [163] Goodhew PJ, Humphreys J and Beanland R, *Electron Microscopy and Analysis*, 3. Auflage, Abingdon, Taylor and Francis, 2000
- [164] Bertazzo S, Gentleman E, Cloyd KL, Chester AH, Yacoub MH, Stevens MM. *Nano-analytical electron microscopy reveals fundamental insights into human cardiovascular tissue calcification*. Nat Mater. 2013;12(6):576-583. doi:10.1038/nmat3627
- [165] Gawlitza P, Braun S, Leson A et al. *Herstellung von Präzisionsschichten mittels Ionenstrahlputtern*. Vakuum in Forschung und Praxis. 2007;19(2). doi.org/10.1002/vipr.200700310
- [166] Egerton RF, Li P, Malac M. *Radiation damage in the TEM and SEM*. Micron. 2004;35(6):399-409. doi:10.1016/j.micron.2004.02.003
- [167] Cai Z, Gu Y, Xiao Y, Wang C, Wang Z. *Porcine carotid arteries decellularized with a suitable concentration combination of Triton X-100 and sodium dodecyl sulfate for tissue engineering vascular grafts*. Cell Tissue Bank. 2021;22(2):277-286. doi:10.1007/s10561-020-09876-7
- [168] Kim Y, Nakase H, Nagata K, Sakaki T, Maeda M, Yamamoto K. *Observation of arterial and venous thrombus formation by scanning and transmission electron microscopy*. Acta Neurochir (Wien). 2004;146(1):45-51. doi:10.1007/s00701-003-0156-5
- [169] Garbarsch C, Trantum-Jensen J, van Deurs B. *Scanning and transmission electron microscopy of the normal rabbit aortic endothelium after controlled perfusion fixation*. Acta Anat (Basel). 1982;112(1):79-91. doi:10.1159/000145499
- [170] Huss VA, Festl H, Schleifer KH. *Studies on the spectrophotometric determination of DNA hybridization from renaturation rates*. Syst Appl Microbiol. 1983;4(2):184-192. doi:10.1016/S0723-2020(83)80048-4
- [171] Tataurov AV, You Y, Owczarzy R. *Predicting ultraviolet spectrum of single stranded and double stranded deoxyribonucleic acids*. Biophys Chem. 2008;133(1-3):66-70. doi:10.1016/j.bpc.2007.12.004

LITERATURVERZEICHNIS

- [172] Mattson JM, Turcotte R, Zhang Y. *Glycosaminoglycans contribute to extracellular matrix fiber recruitment and arterial wall mechanics*. Biomech Model Mechanobiol. 2017;16(1):213-225. doi:10.1007/s10237-016-0811-4
- [173] Roccabianca S, Bellini C, Humphrey JD. *Computational modelling suggests good, bad and ugly roles of glycosaminoglycans in arterial wall mechanics and mechanobiology*. J R Soc Interface. 2014;11(97):20140397. doi:10.1098/rsif.2014.0397
- [174] Wagenseil JE, Mecham RP. *Vascular extracellular matrix and arterial mechanics*. Physiol Rev. 2009;89(3):957-989. doi:10.1152/physrev.00041.2008
- [175] Wyłomańska A, Iskander DR, Burnecki K. *Omnibus test for normality based on the Edgeworth expansion*. PLoS One. 2020;15(6):e0233901. Published 2020 Jun 11. doi:10.1371/journal.pone.0233901
- [176] Bottagisio M, Pellegata AF, Boschetti F, Ferroni M, Moretti M, Lovati AB. *A new strategy for the decellularisation of large equine tendons as biocompatible tendon substitutes*. Eur Cell Mater. 2016;32:58-73. Published 2016 Jul 8. doi:10.22203/ecm.v032a04
- [177] Mishra P, Singh U, Pandey CM, Mishra P, Pandey G. *Application of student's t-test, analysis of variance, and covariance*. Ann Card Anaesth. 2019;22(4):407-411. doi:10.4103/aca.ACA_94_19
- [178] Matuska AM, McFetridge PS. *Laser micro-ablation of fibrocartilage tissue: Effects of tissue processing on porosity modification and mechanics*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2018 Jul;106(5):1858-1868. doi: 10.1002/jbm.b.33997. Epub 2017 Sep 18. PMID: 28922555; PMCID: PMC5857432.
- [179] Gilpin A, Yang Y. *Decellularization Strategies for Regenerative Medicine: From Processing Techniques to Applications*. Biomed Res Int. 2017;2017:9831534. doi:10.1155/2017/9831534
- [180] Tapias LF, Ott HC. *Decellularized scaffolds as a platform for bioengineered organs*. Curr Opin Organ Transplant. 2014;19(2):145-152. doi:10.1097/MOT.0000000000000051
- [181] Gupta SK, Mishra NC, Dhasmana A. *Decellularization Methods for Scaffold Fabrication [published correction appears in Methods Mol Biol. 2018 Jan 14;:]. Methods Mol Biol. 2018;1577:1-10. doi:10.1007/7651_2017_34*
- [182] Cheng Y, Wang Y, Kang YZ, Hu PY, Gao Y, Pan MX. *In vitro culture of tumour-derived hepatocytes in decellularised whole-liver biological scaffolds*. Digestion. 2013;87(3):189-195. doi:10.1159/000349949
- [183] Farag A, Hashimi SM, Vaquette C, Volpato FZ, Hutmacher DW, Ivanovski S. *Assessment of static and perfusion methods for decellularization of PCL membrane-supported periodontal ligament cell sheet constructs*. Arch Oral Biol. 2018;88:67-76. doi:10.1016/j.archoralbio.2018.01.014
- [184] Liu X, Li N, Gong D, Xia C, Xu Z. *Comparison of detergent-based decellularization protocols for the removal of antigenic cellular components in porcine aortic valve*. Xenotransplantation. 2018;25(2):e12380. doi:10.1111/xen.12380
- [185] Pellegata AF, Asnaghi MA, Stefani I, et al. *Detergent-enzymatic decellularization of swine blood vessels: insight on mechanical properties for vascular tissue engineering* [published

- correction appears in Biomed Res Int. 2014;2014:412838]. Biomed Res Int. 2013;2013:918753. doi:10.1155/2013/918753
- [186] Mathapati, S., Galla, S., Sankaranarayanan, K. et al. *Qualitative and quantitative detection of sodium deoxycholic acid in decellularized tissue*. Indian J Thorac Cardiovasc Surg 26, 129–131 (2010). <https://doi.org/10.1007/s12055-010-0016-x>
- [187] Moradi L, Mohammadi Jobania B, Jafarnezhad-Ansariha F, et al. *Evaluation of different sterilization methods for decellularized kidney tissue*. Tissue Cell. 2020;66:101396. doi:10.1016/j.tice.2020.101396
- [188] Tudorache I, Horke A, Cebotari S, et al. *Decellularized aortic homografts for aortic valve and aorta ascendens replacement*. Eur J Cardiothorac Surg. 2016;50(1):89-97. doi:10.1093/ejcts/ezw013
- [189] Sulaiman NS, Bond AR, Bruno VD, et al. *Effective decellularisation of human saphenous veins for biocompatible arterial tissue engineering applications: Bench optimisation and feasibility in vivo testing*. J Tissue Eng. 2021;12:2041731420987529. doi:10.1177/2041731420987529
- [190] Mol A, Driessen NJ, Rutten MC, Hoerstrup SP, Bouten CV, Baaijens FP. *Tissue engineering of human heart valve leaflets: a novel bioreactor for a strain-based conditioning approach*. Ann Biomed Eng. 2005;33(12):1778-1788. doi:10.1007/s10439-005-8025-4
- [191] König F, Hollweck T, Pfeifer S, et al. *A Pulsatile Bioreactor for Conditioning of Tissue-Engineered Cardiovascular Constructs under Endoscopic Visualization*. J Funct Biomater. 2012;3(3):480-496. doi:10.3390/jfb3030480
- [192] Quinn RW, Hilbert SL, Bert AA, et al. *Performance and morphology of decellularized pulmonary valves implanted in juvenile sheep*. Ann Thorac Surg. 2011;92(1):131-137. doi:10.1016/j.athoracsur.2011.03.039

10. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 4.1: Anatomische Darstellung des Herzens

Abbildung 4.2: Aufbau und Histologie der Arterien

Abbildung 4.3: Vollständige Organtransplantation eines dezellularisierten Herzens

Abbildung 5.1: Präparation der Schweineherzen

Abbildung 5.2: Erster Versuchsaufbau bei Protokoll 1, 2 und 3

Abbildung 5.3: Versuchsaufbau der ersten Modifikation

Abbildung 5.4: Versuchsaufbau der zweiten Modifikation

Abbildung 5.5: Darstellung der Probenentnahme aus den Pulmonalarterien

Abbildung 5.6: Flussdiagramm des Versuchsablaufes

Abbildung 5.7: Beispiel der Messpositionen und Auswertung der DAPI Färbung

Abbildung 5.8: Algorithmus des Experimentes

Abbildung 6.1: Durchschnittliche Dicken der Pulmonalarterien

Abbildung 6.2: Unbehandelte Pulmonalarterie in der DAPI Färbung

Abbildung 6.3: Pulmonalarterien in der DAPI Färbung nach Verwendung der
Originalprotokolle

Abbildung 6.4: Pulmonalarterien in der DAPI Färbung nach der ersten Modifikation

Abbildung 6.5: DZ der Pulmonalarterien in der DAPI Färbung mit der zweiten
Modifikation nach Durchführung der DB und der EB

Abbildung 6.6: Prozentuale Eindringtiefen der Dezellularisation in allen Protokollen

Abbildung 6.7: Native Pulmonalarterie in H&E Färbung

Abbildung 6.8: Pulmonalarterien in der H&E-Färbung nach Durchführung der
Originalprotokolle

Abbildung 6.9: Pulmonalarterien in der H&E-Färbung nach der ersten Modifikation

Abbildung 6.10: Pulmonalarterien in der H&E-Färbung nach Durchführung der DZ mit
der zweiten Modifikation nach der Detergenzienbehandlung (DB) und
nach Enzymbehandlung (EB)

Abbildung 6.11: Unbehandelte Pulmonalarterien in der Movat's Pentachrom Färbung

Abbildung 6.12: Pulmonalarterien in der Movat's Pentachrom Färbung nach
Durchführung der Originalprotokolle

Abbildung 6.13: Pulmonalarterien in der Movat's Pentachrom Färbung nach
Durchführung der Protokolle mit der ersten Modifikation

Abbildung 6.14: Pulmonalarterien in der Movat's Pentachrom Färbung nach Durchführung der DZ mit zweiten Modifikation nach der Detergenzienbehandlung (DB) und nach der Enzymbehandlung (EB)

Abbildung 6.15: Unbehandelte Pulmonalarterien in der Pikro-Siriusrot-Färbung

Abbildung 6.16: Pulmonalarterien in der Pikro-Siriusrot-Färbung, nach Durchführung der Originalprotokolle

Abbildung 6.17: Pulmonalarterien in der Pikro-Siriusrot-Färbung, nach Durchführung der ersten Modifikation

Abbildung 6.18: Pulmonalarterien in der Pikro-Siriusrot-Färbung nach Durchführung der DZ mit der zweiten Modifikation nach der Detergenzienbehandlung (DB) und nach Enzymbehandlung (EB)

Abbildung 6.19: Diagramm zur Fluoreszenzintensität in der Pikro-Siriusrot-Färbung in den einzelnen Protokollen

Abbildung 6.20: Native Pulmonalarterien unter dem Rasterelektronenmikroskop

Abbildung 6.21: REM Analyse nach DZ mit den Originalprotokollen

Abbildung 6.22: REM Analyse nach DZ mit den ersten Modifikationen

Abbildung 6.23: Pulmonalarterien in der Rasterelektronenmikroskopie nach Durchführung der DZ mit der zweiten Modifikation nach der DB (1.1+1.2) und nach EB (2.1+2.2)

Abbildung 6.24: Prozentualer DNA-Gehalt im Gewebe normalisiert auf die Nativproben

Abbildung 6.25: Menge an zurückgebliebenen Glykosaminoglykanen im Gewebe normalisiert auf die Nativproben in allen Protokollen

Abbildung 6.26: Zugversuche nach Durchführung der zweiten Modifikationen nach DB und EB:

Abbildung 6.27: Elastizität der Arterien nach Durchführung der DZ mit der zweiten Modifikation nach Detergenzienbehandlung (DB) und Enzymbehandlung (EB)

11. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 5.1: Darstellung und Vergleich der ausgewählten Dezellularisierungsprotokolle aus der Literatur

Tabelle 5.1: Ablauf der Entparaffinierung für die DAPI Färbung und der H&E Färbung

Tabelle 5.3: Ablauf der Entparaffinierung für die Movat's Pentachrom Färbung und Piko-Siriusrot-Färbung

Tabelle 5.4: Ablauf der DAPI-Fluoreszenzfärbung

Tabelle 5.5: Ablauf der H&E Färbung

Tabelle 5.6: Ablauf der Movat's Pentachrom Färbung

Tabelle 5.7: Ablauf der Piko-Siriusrot-Färbung

Tabelle 6.1: Dicken der Pulmonalarterien bei Verwendung der zweiten Modifikationen und Enzyme

Tabelle 6.2: Prozentuale Eindringtiefe der Detergenzien in der DAPI Färbung

Tabelle 6.3: DNA- Menge in gelöster Gewebeprobe bei Verwendung der einzelnen Protokolle

Tabelle 6.4: Menge an Glykosaminoglykanen in gelöster Gewebeprobe bei Verwendung der einzelnen Protokolle

12. ANHANG

12.1 Vorausgehende Arbeiten

Im Vorfeld der oben genannten Arbeit wurde neben der systematischen Testung der einzelnen prozeduralen und physikalischen Methoden auch eine Evaluation der Enzymwirkungen von DNase und α -Galaktosidase unabhängig voneinander durchgeführt. In diesem vorausgehenden Versuch sollten die DZ-Methoden getestet und die individuelle Wirkung der Enzyme genauer betrachtet werden. Auswertende Verfahren, wie die DNA- und die GAG-Quantifikation wurden auf diesem Wege etabliert. Die α -Gal-Immunhistochemie konnte hier durchgeführt, jedoch im Hauptversuch nicht in gute Qualität reproduziert werden, weshalb sie dort nicht aufgeführt ist (s. Kapitel 6).

Material und Methoden

Für diesen Versuch wurden insgesamt 20 Aorten von Schweinen (4 Versuchswiederholungen mit jeweils 5 Proben) ausgewählt und wie die oben genannten Pulmonalarterien präpariert und gereinigt. Anschließend erfolgte eine Dezellularisation der Arterien mit 0,5 % SD und 0,5 % SDS in PBS. Die Detergenzien umflossen die Proben während der DZ in einem kontinuierlichen Fluss, der mittels einer Pumpe aufrechterhalten wurde. Zusätzlich wurden Ultraschallbehandlungen (US) und intermittierende Waschzyklen (WZ) integriert, um die DZ der Aorta zu intensivieren.

Tabelle 12.1: Dezellularisationsablauf im Vorversuch

Beschreibung	Dauer	Lösung	Ultraschall	Temperatur
Präparation der Herzen				
DZ+US	0,5h	SD+SDS	+	37°C
DZ	14,5h	SD+SDS	-	RT
WZ+US	0,5h	NaCl	+	37°C
WZ	0,5h	NaCl	-	RT
DZ+US	0,5h	SD+SDS	+	37°C
DZ	2,5h	SD+SDS	-	RT
WZ+US	0,5h	NaCl	+	37°C
WZ	0,5h	NaCl	-	RT
DZ+US	0,5h	SD+SDS	+	37°C
DZ	2,5h	SD+SDS	-	RT
WZ+US	0,5h	NaCl	+	37°C
WZ	0,5h	NaCl	-	RT
DZ+US	0,5h	SD+SDS	+	37°C

ANHANG

DZ	2,5h	SD+SDS	-	RT
WZ+US	15 min	NaCl	+	37°C
WZ+US	15 min	NaCl	+	37°C
WZ	12h	NaCl	-	RT
WZ+US	15 min	NaCl	+	37°C
WZ+US	15 min	NaCl	+	37°C
Ende Detergenzienbehandlung				
1. Gruppe DNase				
DNase	24h	Dnase	-	37°C
WZ+US	15 min	NaCl	-	RT
WZ+US	15 min	NaCl	-	RT
2. Gruppe				
α-Gal	24h	α-Gal	-	37°C
WZ+US	15 min	NaCl	-	
WZ+US	15 min	NaCl	-	

Am Ende der Behandlung mit den Detergenzien wurden die Proben halbiert und jeweils auf zwei Gruppen aufgeteilt. Die eine Hälfte erhielt eine Behandlung mit 30 U/ml DNase (1. Gruppe), die andere mit 0,1 U/ml α-Galaktosidase (2. Gruppe) für jeweils 24 h bei 37°C. Danach wurden alle Proben erneut mit NaCl gespült.

Anschließend erfolgte eine Auswertung aller Proben mittels histologischer Färbungen (H&E-, MPC-, PS-Färbung), DAPI-Fluoreszenzfärbung und REM. Die DNA- und GAG-Quantifikation wurde in diesem Versuch auch angewendet und etabliert. Alle Auswertungen verliefen wie bereits in Kapitel 5.7 beschrieben.

Bei diesem Versuch wurde außerdem eine Immunhistochemie zur Darstellung des Gehaltes von α-Galaktose in den Arterien durchgeführt. Da diese jedoch im Verlauf der anderen Versuche nicht konstant reproduzierbar war, wurde sie in Kapitel 6 nicht gezeigt. Für die Färbung wurden die Proben zuerst in Paraffin eingebettet und Schnitte angefertigt. Nach der gewohnten Entparaffinierung erfolgte eine Inkubation mit 0,3 % H₂O₂ in PBS bei RT für 15 min. Nach zweimaligem Waschen in PBS für 5 min wurden die Proben für 30 min bei RT in 5 % BSA eingelegt. Schließlich markierte ein primärer Antikörper α-Gal mit einer 1:5 Verdünnung in Antibody Diluent Lösung (Antibody Diluent, Agilent DAKO) über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag, nach ausführlichem Waschen in PBS, wurde der sekundäre Antikörper auf die Schnitte aufgetragen. Dies erfolgte durch Inkubation mit dem Cytoscan Biotinylated Link Antibody (Cytoscan Biotinylated Link Antibody, VantageBio Scientific) für 10 min bei RT in einer feuchten

Kammer. Nachfolgend schlossen sich erneut drei Waschzyklen mit PBS an. Schließlich wurde die Färbung der Schnitte mittels AEC-Kit (AEC Substrate Kit, abcam GmbH) begonnen und nach 10 min Einwirkzeit mittels Leitungswassers gestoppt. Eine Gegenfärbung erfolgte durch Hämalaun für 15 min. Danach konnten die Objektträger wie gewohnt eingedeckt werden. Die statistische Auswertung und Aufnahmen der mikroskopischen Bilder erfolgten wie in den anderen histologischen Färbungen.

Ergebnisse

Die Proben zeigten nach der DZ eine gleichmäßige Eindringtiefe der Detergenzien. Die Detergenzien konnten sowohl auf der Innen- als auch der Außenseite in das Gewebe eindringen. Die Eindringtiefe (EDT) betrug mit circa 34,43 % nur einen minimalen Teil der Wand, sodass ein breiter Mittelstreifen mit DNA zurückblieb (s. Abb 12.1 A). Eine vergrößerte EDT an der Tunica adventitia im Vergleich zur Intima weist darauf hin, dass die Detergenzien in diesem Bereich deutlich besser in die Wand der Aorta eindringen konnten. Der Bereich ohne DNA-Reste präsentierte sich in den histologischen Übersichtsfärbungen intakt mit jedoch aufgelockertem Gewebe und Verlust der einzelnen Bestandteile. Dies zeigte sich in allen Proben kongruent mit der EDT und Entfernung der DNA.

Die Enzymbehandlung mit DNase verbesserte die Entfernung der DNA deutlich. Die EDT konnte in den Arterien verdoppelt werden auf circa 54,57 %, sodass nur ein schmaler Mittelstreifen an DNA-Resten verblieb. Die Außenseiten enthielten keine DNA-Rückstände. Bei Betrachtung der EZM-Integrität ließen sich ähnliche Ergebnisse zu den dezellulierten Proben nachweisen. Die EZM zeigte keine verstärkte Reduktion der Kollagenfasern, Faserabbrüche oder Löcher an den Außenseiten. Die Messung des DNA-Gehaltes der enzymbehandelten Proben mit DNase ergab eine Menge von $120,24 \pm 69,16$ ng dsDNA/mg Gewebe. Damit wurde eine signifikante Abnahme der DNA in den im Vergleich zu den nativen ($385,00 \pm 101,44$ ng dsDNA/mg Gewebe) und den rein Detergenzien-behandelten Proben ($362,60 \pm 111,41$ ng dsDNA/mg Gewebe) demonstriert. Nach der Verwendung von α -Gal präsentierte sich kein Unterschied in der Entfernung von DNA im Vergleich zu den DZ-Proben. Auch die EZM zeigte sich kaum verändert zur vorherigen Darstellung. Einzig das REM demonstrierte eine Freilegung von feinen Fasernetzen an der Innen- und Außenseite mit Entfernung der oberflächlichen

Endothelzellen. Nach der Verwendung des von α -Galaktose konnte in der Immunhistochemie ein Unterschied festgestellt werden. Während in der Nativ- und DZ-Probe ubiquitär braune Färbungen das Vorliegen von α -Galaktose nachwiesen, konnten diese in den enzymbehandelten Schnitten nicht dargestellt werden. Bereits durch die Behandlung mit DNase reduzierte sich der Gehalt an α -Galaktose. Ein vollständiges Fehlen dieses Proteins war jedoch erst nach Verwendung von α -Galaktosidase nachweisbar. Diese Auswertmethode führte allerdings im Verlauf nicht zu konstant reproduzierbaren Ergebnissen und kann deshalb nur eingeschränkt bewertet werden.

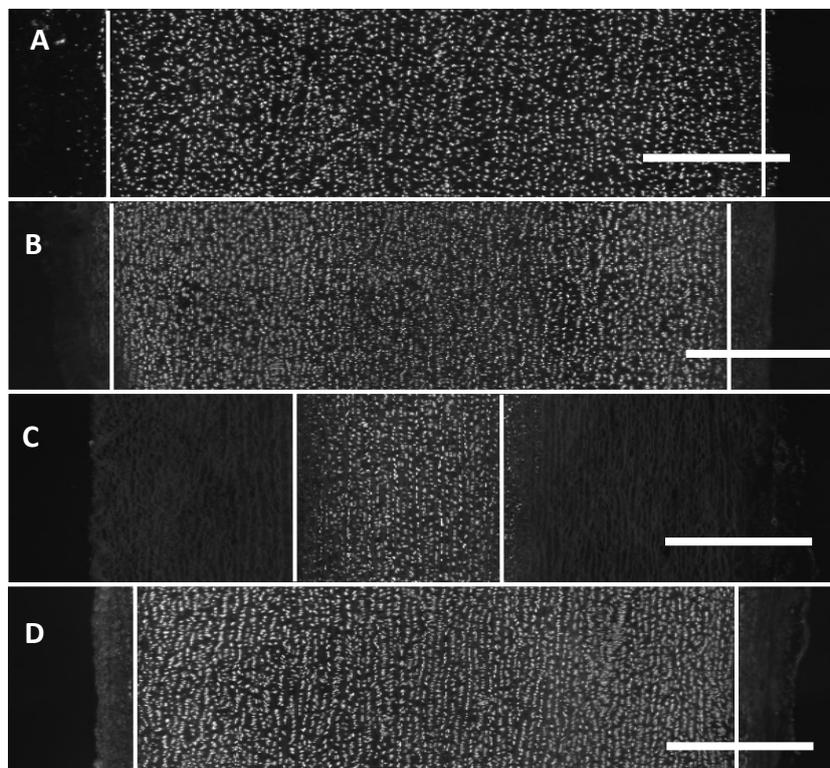


Abbildung 12.1 DAPI Färbung der Proben des Vorversuches: **A: Nativprobe:** Im gesamten Querschnitt ist die DNA der Zellkerne sichtbar. **B: DZ Probe:** Hier zeigt sich ein schmaler DNA-freier Randstreifen beidseits. Die EDT war an der Außenseite in allen Proben größer als innen **C: DNase-behandelte Probe:** Nach der EZ präsentiert sich nur ein schmaler Mittelstreifen mit DNA, der Rest der Wand ist vollständig frei von DNA-Resten. Dies stellt eine signifikant verbesserte DZ mit vergrößerter EDT dar. **D: α -Gal-behandelte Probe:** Nach Behandlung mit diesem Enzym ist nur eine minimal verstärkte Reduktion der fluoreszierenden DNA in der DAPI Färbung nachweisbar. Im Großteil der Wand befindet sich noch DNA; Maßstab: 500 μ m

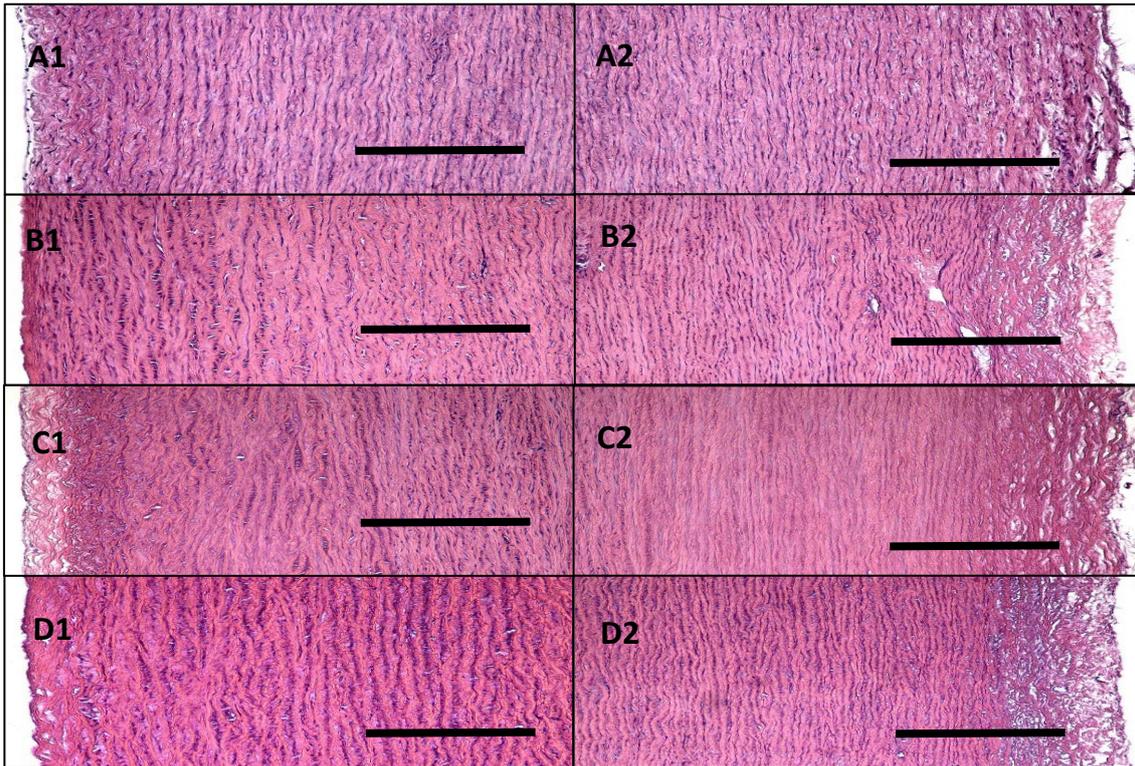
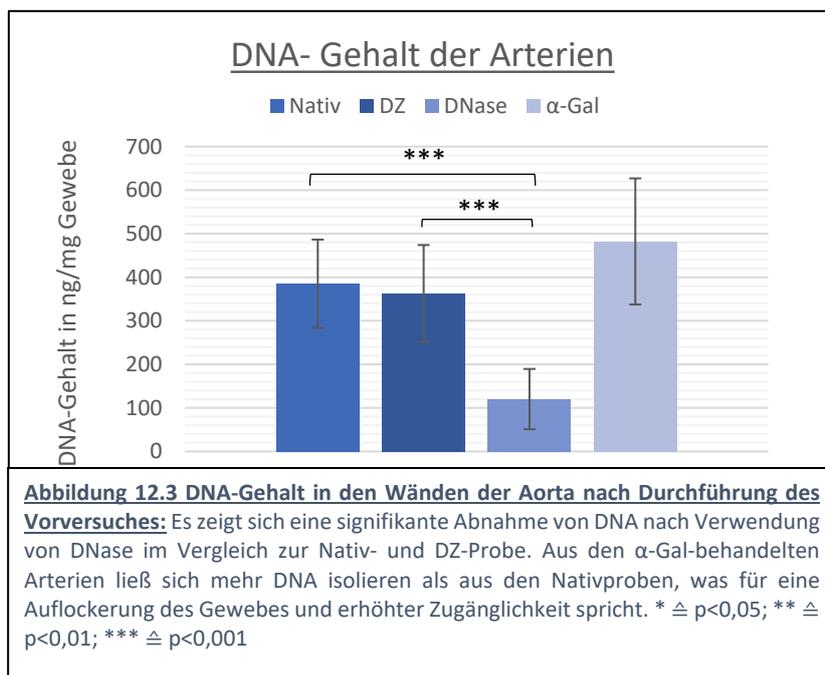


Abbildung 12.2 H&E Färbung der Proben des Vorversuches: A1-2. Nativprobe mit dunklen Punkten in allen Schichten der Aorta und insgesamt intaktem Gewebe; B1-2. DZ-Probe: Hier zeigt sich nur eine minimale Veränderung der Proben. Nur an der äußeren Schicht der Wand kann eine Abnahme von dunklen Punkten detektiert werden. Hier sieht auch das Gewebe aufgelockert und löchrig aus; C1-2: DNase-behandelte Proben: In den oberflächlichen Schichten kommt es zur vollständigen Entfernung der DNA Das Gewebe sieht allgemein intakt aus, nur die oberflächlichsten Schichten präsentieren sich defekt; D1-2. α-Gal-behandelte Probe: Es präsentierten sich dunkle Punkte in allen Schichten, die EDT ist minimal verstärkt im Vergleich zur DZ-Probe. Maßstab: 250 µm; A-D1= Innenseite der Arterie; A-D2= Außenseite der Arterie



ANHANG

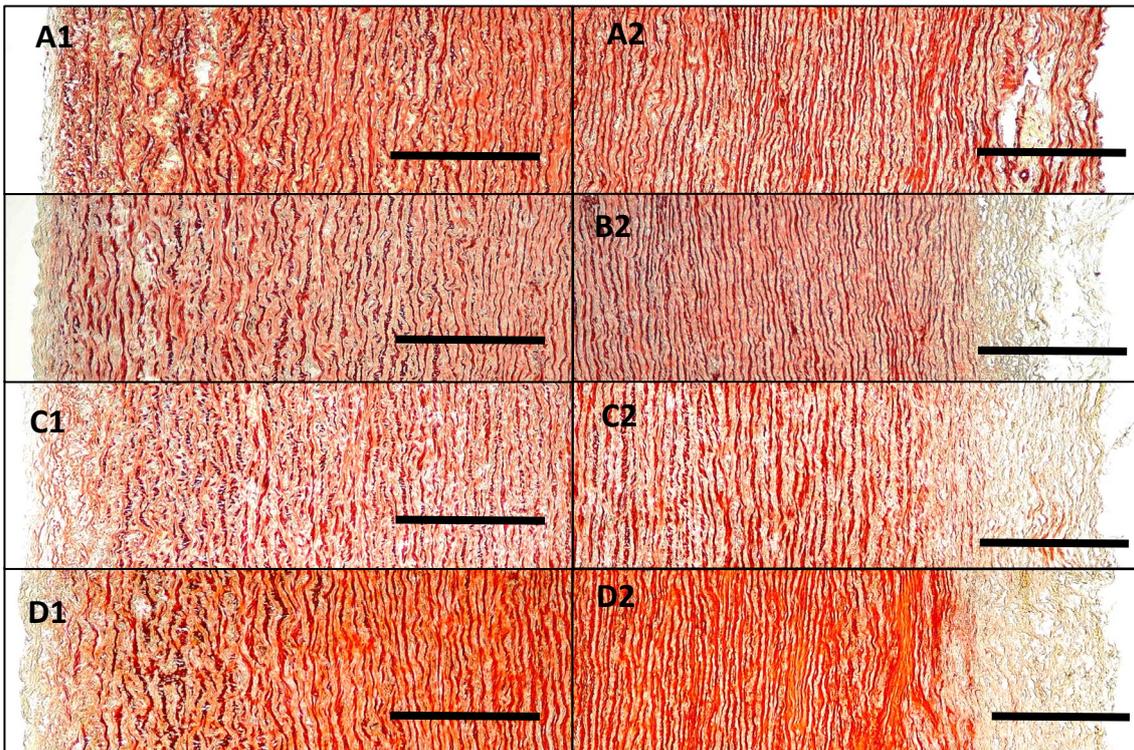


Abbildung 12.4 Movat's Pentachrom Färbung nach Durchführung des Vorversuchs: A1-2: Nativprobe: Die Dreischichtung der Aortenwand ist deutlich dargestellt und elastische und Kollagenfasern gut sichtbar. B1-2: DZ-Probe: Im schmalen zellfreien Rand an der Außenseite fehlen Kollagen und elastische Fasern. C1-2: DNase-behandelte Probe: Hier präsentiert sich ein größerer dezellularisierter Bereich. Jedoch kann keine Aggravierung der EZM Destruktion im Vergleich zur DZ nachgewiesen werden. D1-2: α -Gal-behandelte Probe: Die Defekte der EZM sind kongruent zu denen der DZ Proben. Maßstab: 250 μ m; A-D1= Innenseite der Arterie; A-D2= Außenseite der Arterie

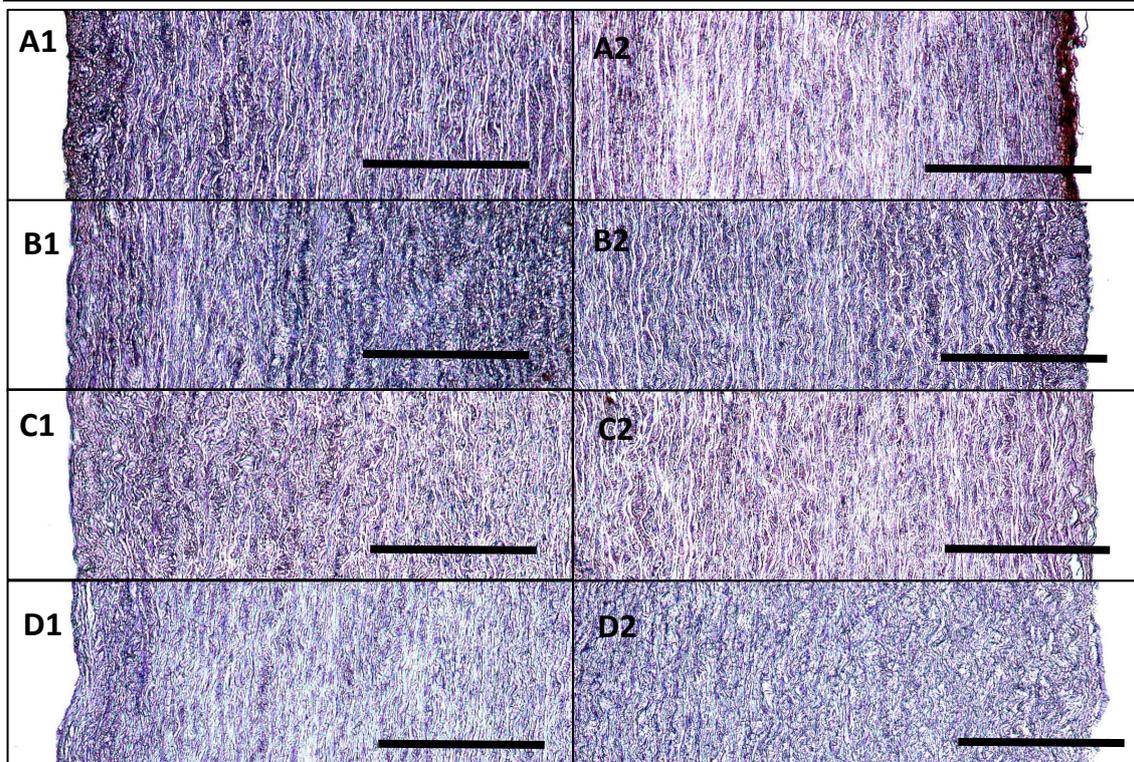
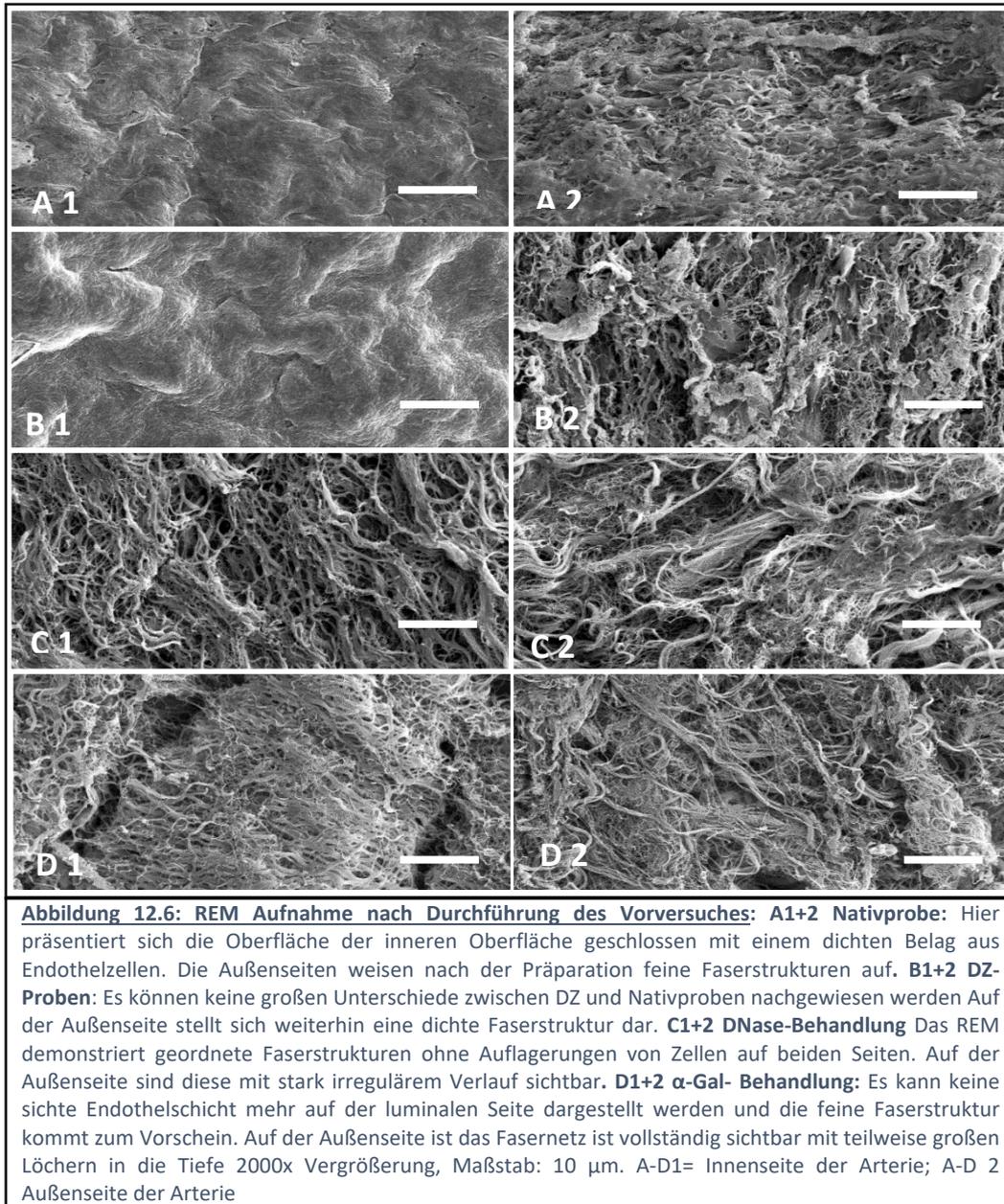
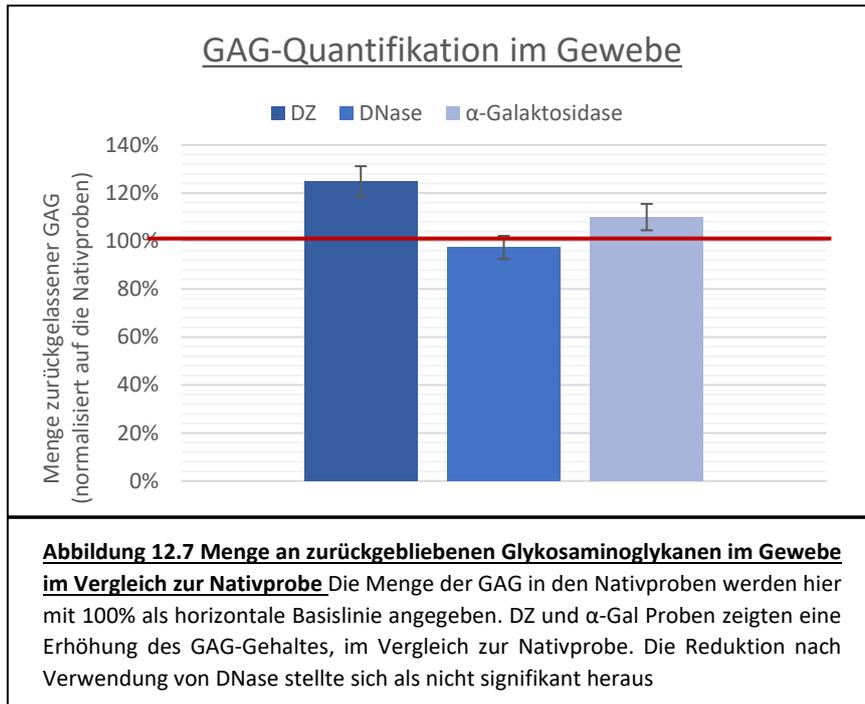


Abbildung 12.5 Immunhistochemie von α -Galaktose nach Durchführung des Vorversuchs: A1-2: Nativprobe: Hier markieren braune Färbungen insbesondere an den Oberflächen das Protein α -Galaktose; B1-2: DZ-Probe: Auch hier kann das Protein noch ubiquitär detektiert als braune Färbung werden. C1-2: DNase-behandelte Proben: Nach Verwendung des Enzyms reduziert sich die Menge an α -Gal gemeinsam mit der Entfernung von Zellen. D1-2: α -Gal-behandelte Proben: Im gesamten Querschnitt ist kein α -Galaktose mehr nachweisbar. Maßstab: 250 μ m; A-D1= Innenseite der Arterie; A-D2= Außenseite der Arterie



Die Evaluation des GAG-Gehaltes stellte variierende Ergebnisse dar. Nach der DZ konnten im Mittel mehr GAG aus dem Gewebe isoliert werden als aus den Nativproben. Auch nach der α -Gal-Behandlung präsentierte sich dieses Phänomen. Nur nach Verwendung von DNase konnte eine Verminderung des GAG-Anteils im Gewebe nachgewiesen werden. Diese war jedoch im Vergleich zu den Nativproben mit einer Reduktion auf 97,30 % minimal und nicht signifikant. Somit konnte die GAG-Messung bestätigen, dass die EZ trotz guter Wirkung in der Entfernung der DNA die EZM nicht vermehrt zerstört.



Beurteilung

Mit der Durchführung dieses Vorversuchs bestätigte sich die Hypothese von einer verbesserten Entfernung immunaktiver Komponenten durch Enzymbehandlungen. Die Verwendung von DNase führte in allen Proben zu einer signifikant verbesserten Entfernung von DNA. Somit konnten fast alle Zellbestandteile aus den Arterien ausgewaschen werden. Auch der Gebrauch von α -Galaktosidase führte zu einer Reduktion von α -Galaktose in den Aorten, wie die Immunhistochemie darstellen konnte. Die EZM stellte sich nach der EZ noch gut erhalten dar. Die vorherigen Defekte des Gewebes durch die Detergenzien wurden durch die Enzyme nur wenig verstärkt. Dadurch bestätigt sich der deutliche Vorteil der Enzymbehandlungen. Es folgte die Entscheidung zur Integration der Enzyme in den Hauptversuch der Studie.

12.2 Finale modifizierte Protokolle

DZ= Dezellularisation mit Detergenzien

US= Ultraschallbehandlung

RT= Raumtemperatur

Protokoll 1:

Tag	Uhrzeit	Vorgang	Dauer	Lösung	Ultraschall	Temperatur
1	7:00	Herzen abholen und präparieren				
	9:00	Lagern	Über Nacht	PBS+ AntiAnti	-	4°C
2	8:00	DZ+ US	0,5h	SD+ SDS	+	RT
	8:30	DZ	3,5h	SD+ SDS	-	RT
	12:00	WZ+ US	0,5h	PBS	+	RT
	12:30	WZ	0,5h	PBS	-	RT
	13:00	DZ+ US	0,5h	SD+ SDS	+	RT
	13:30	DZ	3,5h	SD+ SDS	-	RT
	17:00	WZ+ US	0,5h	PBS	+	RT
	17:30	WZ	0,5h	PBS	-	RT
	18:00	DZ+ US	0,5h	SD+ SDS	+	RT
	18:30	DZ	3,5h	SD+ SDS	-	RT
	22:00	WZ+ US	0,25h	PBS	+	RT
	22:15	WZ+ US	0,25h	PBS	+	RT
	22:30	WZ	8,5h	PBS	-	RT
3	7:00	Enzym	4h	DNase	-	37°C
	11:00	WZ	0,25h	PBS	-	RT
	11:15	WZ	0,25h	PBS	-	RT
	11:30	Enzym	24h	α -Galaktosidase	-	37°C
4	11:30	WZ	0,25h	PBS	-	RT
	11:45	WZ	0,25h	PBS	-	RT
	12:00	Ende Dezellularisation				

Protokoll 2

Tag	Uhrzeit	Vorgang	Dauer	Lösung	Ultraschall	Temperatur
1	7:00	Herzen abholen und präparieren				
	9:00	Lagern	Über Nacht	PBS+ AntiAnti	-	4°C
2	6:00	DZ+ US	0,5h	SD+ SDS	+	37°C
	6:30	DZ	3,5h	SD+ SDS	-	37°C
	10:00	WZ+ US	0,5h	PBS	+	RT
	10:30	WZ	0,5h	PBS	-	RT
	11:00	DZ+ US	0,5h	SD+ SDS	+	37°C
	11:30	DZ	3,5h	SD+ SDS	-	37°C
	15:00	WZ+ US	0,5h	PBS	+	RT
	15:30	WZ	0,5h	PBS	-	RT

ANHANG

	16:00	DZ+ US	0,5h	SD+ SDS	+	37°C
	16:30	DZ	3,5h	SD+ SDS	-	37°C
	20:00	WZ+ US	0,25h	PBS	+	RT
	20:15	WZ+ US	0,25h	PBS	+	RT
	20:30	WZ	13,5h	PBS	-	RT
3	10:00	Enzym	4h	DNase	-	37°C
	14:00	WZ	0,5h	PBS	-	RT
	14:30	WZ	3,5h	PBS	-	RT
	18:00	Enzym	24h	α-Galaktosidase	-	37°C
4	18:00	WZ	0,5h	PBS	-	RT
	18:30	WZ	3,5h	PBS	-	RT
	22:00	Ende Dezellularisation				

Protokoll 3

Tag	Uhrzeit	Vorgang	Dauer	Lösung	Ultraschall	Temperatur
1	7:00	Herzen abholen und präparieren				
	9:00	Lagern	Kurz	PBS+ AntiAnti	-	4°C
	10:00	DZ+ US	0,5h	SDS	+	RT
	10:30	DZ	1h	SDS	-	RT
	11:30	WZ+ US	0,5h	PBS	+	RT
	12:00	WZ	0,5h	PBS	-	RT
	12:30	DZ+ US	0,5h	SDS	+	RT
	13:00	DZ	1h	SDS	-	RT
	14:00	WZ+ US	0,5h	PBS	+	RT
	14:30	WZ	0,5h	PBS	-	RT
	15:00	DZ+ US	0,5h	SDS	+	RT
	15:30	DZ	2h	SDS	-	RT
	17:30	WZ+ US	0,5h	PBS	+	RT
	18:00	WZ	0,5h	PBS	-	RT
	18:30	DZ+US	0,25h	Triton X 100	+	RT
	18:45	DZ	0,25h	Triton X 100	-	RT
	19:00	WZ+ US	0,5h	PBS	+	RT
	19:30	WZ	11,5	PBS	-	RT
2	7:00	WZ + US	0,5h	PBS	+	RT
	7:30	WZ	11,5h	PBS	-	RT
	19:00	WZ+US	0,5h	PBS	+	RT
	19:30	WZ	19,5h	PBS	-	RT
3	15:00	WZ+ US	0,5h	PBS	+	RT
	15:30	WZ	16,5	PBS	-	RT
4	8:00	Enzym	4h	DNase	-	37°C
	12:00	WZ+ US	0,5h	PBS	+	RT
	12:30	WZ	3,5	PBS	-	RT
	16:00	Enzym	24h	α-Galaktosidase	-	37°C
5	16:00	WZ+ US	0,5h	PBS	+	RT
	16:30	WZ	3,5h	PBS	-	RT
	20:00	Ende Dezellularisation				

12.3 Materialien

Allgemeine Materialien

Material	Artikelnummer	Hersteller
Aquarellpinsel	Serie 1520L	Lab Logistics Group GmbH; Meckenhelm, D
Borstenpinsel	Serie 7179L	Lab Logistics Group GmbH; Meckenhelm, D
Cryomatrix	Shandon Cryomatrix	Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, USA
Desinfektionsmittel für Flächen und Gegenstände	Fermacidal D2, N24040	LHG –Laborgeräte Handelsgesellschaft mbH; Karlsruhe, D
Einbettkassetten		Lab Logistics Group GmbH; Meckenhelm, D
Eindeckgläser 24 x 50 mm		Gerhard Menzel GmbH; Braunschweig, D
Eindeckmedium Leica CV Mount	14046430011	Leica Biosystems Nussloch GmbH; Nussloch, D
Faltenfilter Ø 185 mm	10 311 647	Whatman Schleicher & Schuell GmbH; Dassel, D
GraphPad PRISM	GraphPAD Prism 6	GraphPad Software Inc.; San Diego, USA
Handschuhe Peha-soft	942727	Hartmann AG; Heidenheim, D
Microsoft Excel 2019	Excel 2019 16.41	Microsoft Corporation; Redmond, USA
Objektträger 25 x 75 x 1,0 mm;	71800 AMNZ	Gerhard Menzel GmbH; Braunschweig, D
Pipetboy	155018	INTEGRA Biosciences AG; Fernwald, D
Pipette serol. 10 ml, steril	4488	Costar, Corning Incorporated; Corning, NY, USA
Pipette serol. 1ml steril	4485	Costar, Corning Incorporated; Corning, NY, USA
Pipette serol. 25ml, steril	4489	Costar, Corning Incorporated; Corning, NY, USA
Pipette serol. 2ml, steril	4486	Costar, Corning Incorporated; Corning, NY, USA
Pipette serol. 50ml, steril	768180	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Pipette serol. 5ml, steril	4487	Costar, Corning Incorporated; Corning, NY, USA
Pipettenspitzen 10 µl	70.762.200	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D
Pipettenspitzen: 100 µl	70.760.212	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D

ANHANG

Pipettenspitzen: 1000 µl	70.1130.200	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D
Reaktionsgefäß 1,5 ml	0030 120.086	Eppendorf AG, Hamburg, D
Skalpell Fig. 10, steril	02.001.30.002	Feather Safety Razor Co., LTD, Osaka, Japan
Skalpell Fig. 11, steril	02.001.30.001	Feather Safety Razor Co., LTD, Osaka, Japan
Sterillium	975512	Bode Chemie GmbH; Hamburg, D
Suprolene, 3/0,75 cm, grün	91513	Resorba Medical GmbH; Nürnberg, D

Geräteliste

Gerät	Modellbezeichnung	Hersteller
Abzugshaube Laminaflow	Laminaflow HeraSafe	Heraeus Holding GmbH; Hanau, D
Argon Gasflasche	0586.1	—
Biophotometer	BioPhotometer® D30	Eppendorf AG; Hamburg, D
Brutschrank 1	Binder CB 150	Binder GmbH & Co; Tuttlingen, D
Brutschrank 2	HeraCell	Heraeus Holding GmbH; Hanau, D
Dezellularisations-Pumpe Pumpe 20L/min;	EDEN 155 Aquariumpumpe 80 Watt	PfG GmbH; Hoerstel, D
Dickenmessgerät	Marameter XLI-57B-15	Mahr GmbH; Göttingen; D
Fluoreszenz-Mikroskop	AxioObserver	Carl Zeiss AG; Oberkochen, D
Gefrierschrank, -20°C	Gefrierschrank, -20°C Comfort Plus“	Siemens AG, München, D
Kritisch Punkt Trockner	Critical Point Dryer CPD 30	BalTec; Schalksmühle, D
Kühleinheit: Paraffin	Micron KS 34	Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, USA
Lichtmikroskop	Leica DMR	Leica Camera AG; Solms, D
Magnetrührer	Heiz- und Magnetrührer RH- Serie Modelle RH basic	IKA- Werke GmbH & Co.; Staufen, D
Paraffinstreckbad	Typ 25900	Medax GmbH & Co.KG; Neumünster, D
PC: Mikroskop und Bildaufnahme	PC Celsius	Fujitsu Technology Solutions GmbH, Augsburg, GER
PC-Software Fluoreszenz Auswertung	AxioVision Rel. 4.8	Carl Zeiss AG; Oberkochen, D
pH-Meter	inoLab pH Lever 1	Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG; Weilheim, D

ANHANG

Rasterelektronen-Mikroskop	Zeiss Evo LS10	Carl Zeiss AG; Oberkochen, D
Schlittenmikrotom	HM 400 R	Microm International GmbH; Walldorf, D
Schüttelinkubator	Incubator Hood TH15	Edmund Bühler GmbH; Hechingen, D
Sputter coater	Gold coater SCD 50	BalTec AG; Schlakmühle, D
Stanze	manuelle Schneidpresse ZCP 020	ZwickRoell Gruppe; Ulm, D
Ultraschall Gerät	Ultrasonic-Cleaner USC600T 120 W, 45kHz	VWR International GmbH; Darmstadt, D
Waage	Analysenwaage „ABS 770“	Kern&Sohn GmbH, Balingen, D
Wasserbad DZ	Julabo SW 23	Julabo GmbH; Seelbach, D
Wasserbad Paraffinschnitte	Medax	Nagel-Group SE & Co. KG; Versmold, D
Zugversuchmaschine	zwickiLine Universalzugmaschine	ZwickRoell Gruppe; Ulm, D

Reagenzien und Medien

Artikel	Artikelnummer	Hersteller
10% FBS Fetal Bovine Serum (Fetal Bovine Serum)	A 7906	Sigma Aldrich Chemie GmbH; Darmstadt, D
Ampuwa (Aqua destillata)	1080181	Fresenius Kabi AG; Bad Homburg, D
Acetone for analysis (Aceton)	1.00014.5000	Merck KGaA, Darmstadt, D
Alpha-Galactosidase (α -galactosidase from green coffee beans)	9025-35-8	Sigma Aldrich Chemie GmbH; Taufkirchen, D
AntiAnti 100x Antibiotic Antimycotic (1% Streptomycin/Amphotericin B/ Penicillin)	15240-062	Gibco Life Technologies GmbH; Darmstadt, D
DAPI (c=20mg/ml) (4',6-Diamidino-2- phenylindole dihydrochloride)	6495 D9542-5mg	Sigma Aldrich Chemie GmbH; Taufkirchen, D
DNase 2U/ml ($\geq 2,000$ units per mg dry weight)	LS006331	Worthington Biochemical Corp; Lakewood, USA
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	E-4884	Sigma Aldrich Chemie GmbH; Taufkirchen, D
Eosin (Eosin Y-Lösung, alkoholisch)	HT 1101126-500ML	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Taufkirchen, D

ANHANG

Ethanol <99,8& DAB, reinst	K928,5	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe, D	
Ethanol 30%, 50%, 70%, 80%, 96%, 99% vergällt	E05 L0146 L148	Apotheke Klinikum Großhadern; München, D	
Ethanol absolut	5054	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe, D	
Roti-Histofix 4,5% (Formaldehydlösung)	2213.5	Carl Roth GmbH + Co.KG; Karlsruhe,D	
Glutaraldehyd-lösung 25 Gew. %	G400-4	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Taufkirchen, D	
Glycerin	7530	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe, D	
Wasserstoff-chlorid (HCl 1N)	1.09970	Merck KGaA; Darmstadt, D	
IGEPAL-CA630 (Octylphenyl-polyethylene glycol)	I8896	Sigma Aldrich Chemie GmbH; Taufkirchen, D	
Mayer`s Hämalaunlösung	1.09249.0500	Merck KGaA; Darmstadt, D	
Methanol for analysis (MetOH)	1-06009.2500	Merck KGaA; Darmstadt, D	
Movat`s Pentachrom Original	<u>Art.-Nr. 12057</u> 1. Alcianblau 1 Vol.-% 2. Alkalischer Alkohol 3. WEIGERT Stammlösun g A/B 4. Eisen (III)- Chlorid 5. Brilliant- Crocein- Säurefuchsin 6. Phosphorwol framsäure 7. Safron du Gatinais 8. Natriumthios ulfat 9. Essigsäure 1 Vol.-%	<u>Art.-Nr. 12057</u> 1. 10126 2. 10132 3. 10225 4. A/B 5. 12019 6. 10156 7. 10324 8. 10369 9. 10288	Morphisto Evolutionsforschung und Anwendung GmbH, Frankfurt am Main, D
Natriumchlorid-Lösung (NaCl)	809121	Fresenius Kabi AG; Bad Homburg, D	
Natriumcitrat	S4641	Sigma Aldrich Chemie GmbH; Taufkirchen, D	
Natrium-Carbonat (Na-CaCO)	20838	Sigma Aldrich Chemie GmbH; Taufkirchen, D	
PBS Dulbecoo Instamed 9,55g/l (Phosphate buffered saline)	L-1825	Biochrom GmbH; Berlin, D	
Pikro- Siriusrot für Kollagen I & III Nachweis	<u>Art.-Nr. 13425</u> 1. WEIGERT Stammlösun g A/B 2. Pikro- Siriusrot	<u>Art.-Nr. 13425</u> 1. 10255 A/B 2. 13422	Morphisto Evolutionsforschung und Anwendung GmbH, Frankfurt am Main, D

ANHANG

	3. Essigsäure 30 Vol.-%	3. 13428	
Proteinase bakteriell		P8038	Sigma Aldrich Chemie GmbH; Taufkirchen, D
RNase 100ul/ml (RNase A, from bovine pancreas, lyophilizate, powder)		10154105103	Roche Diagnostics Deutschland GmbH; Mannheim, D
Roti-Histol		6640.4	Carl Roth GmbH & Co KG; Karlsruhe, D
Sodium Desoxycholat/Natriumdesoxycholat (SD)		30970-500G	Sigma Aldrich Chemie GmbH; Darmstadt, D
Sodium Dodecyl Sulfat/Natriumdodecylsulfat (SDS)		0183.3	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe, D
Sudan Schwarz B (C.I.26150) für Mikroskopie		0292.1	Carl Roth GmbH & Co.KG; Karlsruhe, D
Tris-Bolrate-EDTA Puffer (10x Concentrate)		T4415-4L	Sigma-Aldrich GmbH; Steinheim, D
Triton X 100 2-[4-(2,4,4-trimethylpentan-2-yl)phenoxy]ethanol		1610407	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, US
Wasserstoff-peroxid 30% (H ₂ O ₂)		21676-3	Merck KGaA; Darmstadt, D
Xylol (Isomere) >98%, rein		9713.3	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe, D

Lösungen

Medium	Reagenzbestandteile	Menge
Mayer's Häkalaun (1:4) Lagerung bei RT	<ul style="list-style-type: none"> • Häkalaun • PBS 	50ml 150ml
FIX II 500ml Lagerung bei 4°C	<ul style="list-style-type: none"> • Aqua destillata • Glutaraldehydlösung 25 GEW.% (25%) • HCL (1N) • Na-CaCO 	456ml/ 912ml 43,5ml/86,5ml 0,75ml/1,5ml 5,65g/11,3g
EDTA-Lösung pH 8 Lagerung: RT	<ul style="list-style-type: none"> • EDTA • 0,1 N NaOH • Aqua dest. 	0,744g Bis pH =8 2L
Trypsin 1:20 500ml Lagerung: -20°C	<ul style="list-style-type: none"> • PBS • Trypsin (10x) 	475ml 25ml
DAPI Lösung, c= 0,1 ug/ml	<ul style="list-style-type: none"> • DAPI • PBS 	1 µg 10ml
Methanol-Aceton	<ul style="list-style-type: none"> • Methanol • Aceton 	100ml 100ml
PBS	<ul style="list-style-type: none"> • PBS Pulver 	9,55g 1l

ANHANG

	<ul style="list-style-type: none"> • Aqua destillata 	
DNase 50mg DNase Dnase Konzentration 1mg/ml -20°C eingefroren	<ul style="list-style-type: none"> • 50% Glycerin • 400mM 20mM TrisCl 7,5 • 100mM: 1mM MgCl₂ • H₂O • DNase 	25ml 2,5ml 0,5ml 22ml 50mg
DNase Lösung 1:100 verdünnt: 30U/ml	<ul style="list-style-type: none"> • PBS • MgCl 100 mM • CaCl 100 mM • Stocklösung Dnase 	84ml 100 mM 10ml 100 mM 5ml 1ml

13. VORVERÖFFENTLICHUNGEN

Müller S., Grab M., König F., Hagl C., Thierfelder N.; *Pulmonary artery root decellularization-Significant improvement of established protocols by modification of physical and procedural factors*; Poster-TERMIS World Congress Kyoto, Japan 2019.

Müller S., Grab M., König F., Hagl C., Thierfelder N.; *Pulmonary artery root decellularization-Significant improvement of established protocols by modification of physical and procedural factors*; Poster-Cardiovascular Research Days, Debrecen, Ungarn 2018

Müller S., Grab M., König F., Hagl C., Thierfelder N.; *Pulmonary artery root decellularization-Significant improvement of established protocols by modification of physical and procedural factors*; Poster-Munich Heart Alliance Winter Meeting, München 2018

14. DANKSAGUNG

Zuerst möchte ich mich herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Christian Hagl bedanken. Als Direktor der Herzchirurgischen Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München unterstützt er die Arbeitsgruppe Tissue Engineering und ich bin sehr dankbar, dass ich dieser Arbeitsgruppe während der Zeit meiner Promotionsarbeit angehören durfte.

Mein größter Dank gilt meinen Betreuern, Herrn Dr. med. Nikolaus Thierfelder, Herrn Dipl.-Ing. Fabian König und Herrn M. Sc. Maximilian Grab. Gemeinsam waren sie für den Erfolg der Arbeitsgruppe zuständig und stellten sich immer neuen Herausforderungen und Fragen. Unter ihrer Anleitung konnte ich mein wissenschaftliches Verständnis erweitern und ein für mich neues Feld der Medizin kennenlernen. Ihr Zuspruch und auch ihre Kritik halfen mir dabei neues wissenschaftliches Denken zu erlernen und mich immer wieder zu fordern. Insbesondere Herr Dr. med. Thierfelder unterstützte mich sowohl im Labor als auch aus der Ferne. Sogar in einem Auslandsaufenthalt seinerseits und nach meinem Umzug nach Hamburg konnte ich auf seinen Rat und Hilfe zählen. Besonders in Erinnerung bleiben mir die Veröffentlichungen meiner Arbeit auf den Kongressen, die ich mit meinen Betreuern besuchen durfte. Die Reise nach Debrecen in Ungarn war eine großartige Möglichkeit als Studentin in die internationale Welt der Wissenschaft hineinzuschnuppern. Ich bin zutiefst dankbar für die gemeinsame Zeit in der Arbeitsgruppe, welche ich sehr genossen habe. Ich bin überzeugt, dass sie den Grundstein für mein wissenschaftliches Interesse an Forschung gelegt hat, dem ich auch heute weiter nachgehe.

Zusätzlich danke ich den Mitarbeiterinnen der Arbeitsgruppe Frau Barbara Steinl, Frau Eike Petersen und Frau Bettina Wimmer. In der Einarbeitungsphase aber auch darüber hinaus zeigten sie mir Methodik und Grundlagen der wissenschaftlichen Laborarbeit. Bei der Etablierung neuer Methoden stand mir besonders Frau Petersen zur Seite, indem sie mit mir gemeinsam Protokolle erprobte und Probleme löste. Dafür möchte ich ihr besonders danken.

DANKSAGUNG

Schließlich möchte ich einen ganz besonderen Dank an meine Eltern und Geschwister aussprechen. Mit ihrer Hilfe und ihren ermutigenden Worten war es möglich mein Studium und die Promotion so durchführen zu können. Ihre kontinuierliche Unterstützung im gesamten Studium und auch zu Beginn meiner Assistenzarztzeit hat mir stets Motivation gegeben. Für ihre liebevolle Begleitung und Förderung danke ich Ihnen von ganzem Herzen.

15. AFFIDAVIT



LUDWIG-
MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

Promotionsbüro
Medizinische Fakultät



Eidesstattliche Versicherung

Müller, Simone Verena

Name, Vorname

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

Systematische Optimierung bestehender Dezellularisierungsmethoden von Pulmonalarterien mithilfe Von physikalischen, prozeduralen und enzymatischen Modifikationen

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.

Hamburg, 28.11.2022

Ort, Datum

Simone Müller

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand