

Aus der
Herzchirurgischen Klinik und Poliklinik
Klinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Christian Hagl

**Systematische in-vitro Evaluation physikalischer
Dezellularisationsmethoden zur optimierten Entwicklung
xenogener Gewebesccaffolds im Tissue Engineering**

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

vorgelegt von
Nicola Clarissa Schepp
aus
München

Jahr
2025

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Christian Hagl
Mitberichterstatter: PD Dr. Andreas Bauer
PD Dr. Jan-Michael Abicht

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. Nikolaus Thierfelder

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 13.02.2025

Meiner Familie

I Inhaltsverzeichnis

II KURZZUSAMMENFASSUNG	4
III SUMMARY	6
IV ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	8
1 EINLEITUNG	11
1.1 Kernprobleme der modernen Transplantationsmedizin	11
1.2 Tissue Engineering	13
1.2.1 Hintergrund	13
1.2.2 Strategien des Tissue Engineerings	14
1.2.3 Zellträger: Anforderungen und Materialien	16
1.3 Dezellularisation	18
1.3.1 Hintergrund	18
1.3.2 Dezellularisationsmethoden	19
1.3.3 Überprüfung des Dezellularisationserfolgs	21
1.3.4 Aktueller Stand der Wissenschaft und klinischer Einsatz	23
1.3.5 Limitationen	24
1.3.6 Experimentelle Ansätze zur Bestimmung des spezifischen Beitrags von Einfrier-Auftau-Zyklen und osmotischem Schock zum Dezellularisationserfolg	26
1.4 Ziel der vorliegenden Arbeit	27
2 MATERIAL UND METHODEN	29
2.1 Materialien	29
2.1.1 Biologische Materialien	29
2.1.2 Dezellularisationslösungen	30
2.2 Versuchsaufbau	31
2.3 Physikalische Dezellularisationsmethoden	34
2.3.1 Schockfrieren bei -196 °C	34
2.3.2 Langsames Einfrieren bei -32 °C	34

2.3.3 Osmotischer Schock	34
2.4 Dezellularisationsprotokoll	35
2.5 Integration der aussichtsreichsten physikalischen Methode in ein etabliertes Dezellularisationsprotokoll	38
3 AUSWERTUNG	41
3.1 Probenentnahme und Weiterverarbeitung	41
3.2 DNA-Quantifizierung	42
3.2.1 DNA-Extraktion	42
3.2.2 DNA-Messung	43
3.3 Histologie	44
3.3.1 Probenvorbereitung	44
3.3.2 Paraffinschnitte und Entparaffinierung	45
3.3.3 DAPI Fluoreszenz	46
3.3.4 Hämatoxylin-Eosin Färbung	48
3.3.5 Movat Pentachrom Färbung	48
3.3.6 Pikro-Siriusrot Färbung	49
3.4 Rasterelektronenmikroskopie	50
3.4.1 Entwässerung	50
3.4.2 Kritisch-Punkt-Trocknen	50
3.4.3 Sputtern	51
3.4.4 Mikroskopie	51
3.5 Uniaxiale Zugversuche	52
3.6 Statistische Auswertung	53
4 ERGEBNISSE	54
4.1 Eliminierung zellulärer Komponenten	54
4.1.1 DAPI Fluoreszenz	54
4.1.2 Hämatoxylin – Eosin	58
4.1.3 DNA-Quantifizierung	61
4.2 Erhalt der Extrazellulärmatrix	63
4.2.1 Movat Pentachrom Färbung	63
4.2.2 Pikro-Siriusrot Färbung	66

4.3 Topographie	68
4.3.1 Makroskopische Topographie	68
4.3.2 Mikroskopische Topographie	68
4.4 Biomechanische Eigenschaften	72
5 DISKUSSION	78
6 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	88
7 LITERATURVERZEICHNIS	90
8 TABELLENVERZEICHNIS	102
9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS	103
ANHANG	104
DANKSAGUNG	118
AFFIDAVIT	119

II KURZZUSAMMENFASSUNG

Seit Ende des 20. Jahrhunderts erregt die Verwendung dezellularisierter Scaffolds im Tissue Engineering aufgrund ihrer vielversprechenden Materialeigenschaften immer mehr Aufmerksamkeit. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation erfolgte die systematische Evaluation ausgewählter physikalischer Methoden zur Dezellularisation (DZ) biologischer Gewebe.

Zu diesem Zweck wurden 80 porcine Aortenwände (AW) gemäß acht verschiedener Protokolle dezellularisiert (jeweils $n = 10$). Dabei wurden die Effekte der jeweiligen physikalischen Vorbehandlung auf der Grundlage eines detergenzien- und enzymbasierten Protokolls beurteilt. Die gruppenspezifischen physikalischen DZ Methoden umfassten den einmaligen Einfrier-Auftau-Vorgang bei -196 °C (Gruppe A₁) und -32 °C (Gruppe B₁), den fünfmaligen zyklischen Einfrier-Auftau-Vorgang bei -196 °C (Gruppe A₂) und -32 °C (Gruppe B₂) und den osmotischen Schock (Gruppe C). Dabei dienten ein Nativkollektiv und eine spezifische Kontrollgruppe (Gruppe K₁) zum Vergleich. Die Bewertung der Effektivität der DZ Vorgänge erfolgte anhand der in Gewebefärbungen mit 4',6-diamidin-2-phenylindol (DAPI) und Hämatoxylin-Eosin (H&E) ermittelten Eindringtiefen (EDT) der Zelleliminierung sowie einer photometrischen DNA-Quantifizierung. Die Movat Pentachrom (MPC) und Pikro-Siriusrot (PSR) Färbungen sowie die Rasterelektronenmikroskopie (REM) dienten der Beurteilung des Erhalts der Extrazellulärmatrix (EZM) und ihrer Strukturen. Zur Evaluation der biomechanischen Eigenschaften des dezellularisierten Gewebes wurden uniaxiale Zugversuche durchgeführt.

Durch das einmalige Schockfrieren bei -196 °C war ein signifikanter Zugewinn an EDT sowohl an den äußeren ($+23,17\%$, $p \leq 0,01$) als auch an den inneren ($+27,54\%$, $p \leq 0,001$) Oberflächen der AW zu verzeichnen. Weder auf den licht- noch auf den elektronenmikroskopischen Aufnahmen ließen sich durch das einmalige Schockfrieren bedingte EZM Schäden detektieren. Unter allen physikalischen Vorbehandlungen resultierte diese Methode außerdem in den ausgewogensten biomechanischen Eigenschaften. Die durch das einmalige Einfrieren bei -32 °C erzielte Zunahme der EDT war weder an den äußeren ($+19,34\%$) noch an den inneren ($+2,73\%$) Oberflächen statistisch signifikant. Im direkten Vergleich war die EDT an der inneren Oberfläche nach einmaligem Schockfrieren bei -196 °C signifikant größer als nach einmaligem Einfrieren

bei -32 °C (+24,15 %, $p\leq 0,01$). Auch durch die zyklische, fünffache Durchführung der Einfrier-Auftau-Vorgänge ließ sich ein Anstieg der EDT beobachten, dieser war allerdings nur an der äußeren Oberfläche bei -32 °C statistisch signifikant (+29,64 %, $p\leq 0,05$). Alle anderen Zugewinne an EDT erwiesen sich als statistisch nicht signifikant. Makroskopisch und mikroskopisch waren durch die zyklische Durchführung der Einfrier-Auftau-Vorgänge bedingte, substantielle Schäden an den EZM Strukturen erkennbar. Als einzige der untersuchten physikalischen Vorbehandlungen erbrachte der osmotische Schock weder an den inneren (-7,50 %) noch an den äußeren (-4,24 %) Oberflächen einen Zusatznutzen hinsichtlich der DZ Effektivität. Aufgrund relevanter Mengen an residualen Zellkernkomponenten im dezellularisierten Gewebe war es nicht adäquat möglich, mittels DNA-Quantifizierung eine signifikante Reduktion des DNA-Gehalts durch die DZ nachzuweisen, sodass der Fokus bei der Auswertung der Zelleliminierung auf den mittels DAPI Fluoreszenz bestimmten EDT lag.

Auf der Grundlage der oben genannten Erkenntnisse wurde ein weiteres DZ Protokoll D entwickelt, das auf der physikalischen DZ Methode mit den aussichtsreichsten Resultaten basiert. Durch die Integration eines einmaligen Einfrier-Auftau-Vorgangs bei -196 °C in ein vorbestehendes, detergenzien- und enzymbasiertes Protokoll sollte geprüft werden, ob so bei verkürzter Expositionsdauer gegenüber den chemischen Detergenzien ein gleichbleibendes DZ Ergebnis erzielt werden könnte. Wieder diente eine spezifische Kontrollgruppe (Gruppe K₂) zum Vergleich. Das Ziel einer vollständigen Zellfreiheit der AW, in der auch das ursprüngliche Protokoll resultiert, wurde in Versuchsgruppe D verfehlt. Allerdings konnte die Beobachtung, dass das Schockfrieren in flüssigem Stickstoff eine signifikante Zunahme der EDT sowohl an den äußeren (+18,51 %, $p\leq 0,05$) als auch an den inneren Oberflächen (+14,34 %, $p\leq 0,05$) bewirkt, bestätigt werden. Außerdem war in der DNA-Quantifikation erstmals eine höchst signifikante Reduktion des DNA-Gehalts zu verzeichnen (D: -70,90 %, $p\leq 0,001$, K₂: -63,07 %, $p\leq 0,001$). Auf den licht- und elektronenmikroskopischen Aufnahmen erschienen alle EZM Komponenten und Strukturen intakt.

Basierend auf diesen Ergebnissen bestätigt die vorliegende Dissertation den Mehrwert der Durchführung eines einmaligen Schockfrierzyklus in DZ Protokollen. Diese physikalische DZ Methode geht mit effektiver Zelleliminierung und gutem Erhalt der EZM einher, was bei der Optimierung zukünftiger DZ Protokolle berücksichtigt werden sollte.

III SUMMARY

Since the late 20th century, the use of decellularized scaffolds in tissue engineering has been attracting more and more interest due to their promising material properties. In this dissertation, selected physical methods for decellularization (DC) of biological tissues were systematically evaluated.

For this purpose, 80 porcine aortic walls (AW) were decellularized employing eight different protocols (10 AW per protocol). Subsequently, the effects of the respective physical pretreatments were assessed against the background of an otherwise unchanged detergent- and enzyme-based protocol. Group-specific physical DC methods comprised a singular freezing-thawing procedure at $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (group A₁) or $-32\text{ }^{\circ}\text{C}$ (group B₁), a cyclic fivefold freezing-thawing procedure at $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (group A₂) or $-32\text{ }^{\circ}\text{C}$ (group B₂) and an osmotic shock (group C). A native collective and a specific control group (group K₁) served for comparison. The efficacy of DC methods was evaluated by measuring the depth of cell elimination (DCE) (as determined after tissue staining by 4',6-diamidin-2-phenylindol (DAPI) and hematoxylin-eosin (H&E)) and by photometric DNA quantification. Movat Pentachrome- (MPC) and Picro-Sirius-red (PSR) stainings as well as scanning electron microscopy served for evaluating the preservation of the extracellular matrix (ECM) and its structures. Uniaxial tensile tests were performed to evaluate the biomechanical properties of decellularized tissues.

Singular shock freezing at $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ resulted in a significant gain in DCE at the external (+23,17 %, $p\leq 0,01$) as well as at the internal (+27,54 %, $p\leq 0,001$) AW surfaces. Neither light- nor scanning electron microscopy revealed any damage to the ECM by singular shock freezing at $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Beyond that, singular shock freezing resulted in the most balanced biomechanical properties among all methods of physical pretreatment. After singular freezing at $-32\text{ }^{\circ}\text{C}$, no statistically significant gains in DCE were achieved either at the external (+19,34 %) or at the internal (+2,73 %) AW surfaces. By direct comparison, DCE after singular shock freezing at $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ significantly exceeded DCE after singular freezing at $-32\text{ }^{\circ}\text{C}$ at the internal AW surface (+24,15 %, $p\leq 0,01$). Likewise, cyclic fivefold freezing-thawing resulted in a gain in DCE which, however, only reached statistical significance at the external surface at $-32\text{ }^{\circ}\text{C}$ (+29,64 %, $p\leq 0,05$). Any other gains in DCE proved statistically non-significant. A substantial damage of the ECM due to cyclic freezing-thawing was detectable macro- as well as microscopically. Among all physical

pretreatments tested here, osmotic shock was the only one failing to achieve any additional benefit with respect to DC efficacy at the internal (-7,50 %) or external AW surfaces (-4,24 %). Any significant reduction of DNA content by DC could not be detected via DNA-quantification due to relevant amounts of residual cell nucleus components in decellularized tissue. Thus, the focus of evaluating cell elimination was on DCE as determined by DAPI fluorescence.

Based on the above-mentioned results, an additional DC protocol (D) was developed employing the most promising physical DC method. Through the integration of a singular freezing-thawing procedure at -196 °C into a pre-existing, detergent- and enzyme-based protocol, it was tested whether this combination yields an equivalent DC result while allowing for a reduction of exposition time to chemical detergents. Again, a specific control group (group K₂) served for comparison. A completely cell-free AW – as created by the pre-existing protocol – was not achieved by the additional DC protocol (D). Yet, it was confirmed that shock freezing in liquid nitrogen results in a significant gain in DCE at the external (+18,51 %, $p \leq 0,05$) as well as at the internal AW surfaces (+14,34 %, $p \leq 0,05$). Beyond that, a highly significant reduction of DNA content was achieved for the first time (D: -70,90 %, $p \leq 0,001$, K₂: -63,07 %, $p \leq 0,001$). Light- and scanning electron microscopy imaging revealed intact ECM components and structures.

Based on these results, this dissertation proves the additional benefit of performing a singular shock freezing cycle in DC protocols. This physical DC method yields effective cell elimination and good preservation of ECM. This should be considered while optimizing future DC protocols.

IV ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Einheiten:

Abkürzung	Bedeutung
bar	Physikalische Druckeinheit bar
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
g	Gramm
<i>g</i>	Maßeinheit der Zentrifugalbeschleunigung
h	hour/ Stunde
l	Liter
mA	Milliampere
mbar	Millibar
mg	Milligramm
min	Minute
mm	Millimeter
µm	Mikrometer
mM	Millimolar
% m/m	Gewichtsprozent
ms	Millisekunde
n	Anzahl
N	Newton
nm	Nanometer
rpm	revolutions per minute/ Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
U	Unit/ Enzymeinheit zur Angabe der Enzymaktivität
V	Volt
% v/v	Volumenprozent

Allgemeine Begrifflichkeiten:

Abkürzung	Bedeutung
Abb.	Abbildung
AD	Aqua destillata
a.e.	am ehesten
AW	Aortenwand
CaCl ₂	Calciumchlorid
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAPI	4',6-diamidin-2-phenylindol
DNA dsDNA	deoxyribonucleid acid = Desoxyribonukleinsäure double-stranded DNA = doppelsträngige DNA
DNase	Deoxyribonuklease
DZ	Dezellularisation
EDT	Eindringtiefe
EDT _i	Eindringtiefe an der inneren Oberfläche (=luminal)
EDT _a	Eindringtiefe an der äußeren Oberfläche
EZM	Extrazellulärmatrix
FDA	US Food and Drug Administration
HCL	Salzsäure
H&E	Hämatoxylin-Eosin
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MPC	Movat Pentachrom
o.g.	oben genannt
PBS	phosphate buffered saline = Phosphat gepufferte Saline
PLA	polyactide = Polymilchsäure
PSR	Pikro-Siriusrot
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RT	Raumtemperatur
SD	sodium deoxycholate/ Natriumdeoxycholot
SDS	sodium dodecyl sulfate/ Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle

u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel

1 EINLEITUNG

1.1 Kernprobleme der modernen Transplantationsmedizin

Transplantation (von lateinisch *transplantatio* = Verpflanzung, Versetzung) bezeichnet die Übertragung von Organen und Geweben zu therapeutischen Zwecken [1]. Dabei wird zwischen autogener Transplantation (Spender und Empfänger sind identisch) und allogenen Transplantationen (Spender und Empfänger sind nicht identisch) unterschieden. Bei autogener Transplantation wird das Transplantat als Autograft, bei allogener Transplantation als Allograft definiert [2]. Stammt das Transplantat von einem Spender, der einer anderen Spezies angehört, spricht man von einem Xenograft.

Obwohl die Transplantation eine vergleichsweise neue Erweiterung der Therapie von Organversagen im Endstadium darstellt, geht das Konzept, Gewebe oder Organe aus einem Körper zu entfernen und für einen anderen zu verwenden, weit zurück [3]. Archäologische Erkenntnisse und historische Dokumente lassen vermuten, dass die Gewebetransplantation mehrere Jahrtausende alt ist [4, 5]. Beispielsweise finden sich in hinduistischen Texten von 3000-2500 v. Chr. Beschreibungen, wie patienteneigene Haut, die von Kinn oder Gesäß gewonnen worden war, genutzt wurde, um verstümmelte Nasen zu rekonstruieren [6].

Aus den verschiedensten Regionen der Welt folgten im Laufe der Jahre zahlreiche weitere Berichte von derartigen Bemühungen, die die Basis der heutigen Transplantationsmedizin bilden [3]. Im 16. Jahrhundert war der italienische Chirurg Gaspare Tagliacozzi einer der ersten, der beschrieb, was heute als immunologische Abstoßungsreaktion nach allogener Organtransplantation bekannt ist [7]. Allerdings sollte es noch bis weit ins 20. Jahrhundert hinein dauern, bis ein wissenschaftlicher Konsens darüber bestand, dass die Resultate allogener Transplantationen denen autogener Transplantationen unterlegen sind [8]. Ein erster Durchbruch gelang dem Österreicher Karl Landsteiner im Jahr 1900, als er das AB0-Blutgruppensystem entdeckte und so den Weg für kompatible Bluttransfusionen bahnte [9]. 1943 erkannten Peter Brian Medawar und Thomas Gibson, dass es sich bei der Destruktion eines Allografts nach Hauttransplantation um die Folge eines „Mechanismus der aktiven Immunisierung“ handeln musste [10]. 1958 identifizierte dann Jean Dausset das erste der humanen Leukozyten-Antigene (HLA) [11]. Diese zellständigen Antigene ermöglichen dem Immunsystem eine Unterscheidung zwischen körperfremden und körpereigenen Zellen.

Die Entdeckung dieses neuen Antigen-Systems sollte die Entwicklung der modernen Transplantationsmedizin maßgeblich beeinflussen. Heutzutage werden die HLA des Spenders und des Empfängers routinemäßig aufeinander abgestimmt, sowohl bei Stammzell- als auch soliden Organtransplantationen. Bei letzteren ist auch eine ABO-Kompatibilität grundsätzlich notwendig [12].

Daraus leitet sich gleichzeitig ein grundlegendes Problem der heutigen Transplantationsmedizin ab: Die Schwierigkeit, ein empfängerkompatibles Spenderorgan zu finden. Aufgrund der steigenden Inzidenz des terminalen Versagens vitaler Organe ist der Bedarf an Organtransplantationen in den letzten Jahrzehnten weltweit rapide gewachsen [13]. Das Angebot an geeigneten Spenderorganen stagniert hingegen weiterhin auf einem niedrigen Niveau, in deutschen Kliniken hat die Spendebereitschaft seit 2012 sogar abgenommen mit einem Tiefststand in 2017 [12]. Bei der Suche kommt die Grundvoraussetzung der ABO- und HLA-Kompatibilität noch erschwerend hinzu. Das Resultat dieser Spenderorganknappheit sind lange Wartezeiten, während derer sich die Organfunktionen weiter zu verschlechtern drohen. In Deutschland versterben durch den Organmangel ca. 900 Patientinnen und Patienten pro Jahr auf der Warteliste. Somit verwehrt der Mangel an Spenderorganen tausenden Menschen eine neue und bessere Lebensqualität und bedingt zudem einen erheblichen Kostenanstieg von alternativen Therapiemöglichkeiten wie der Dialyse [13].

Doch auch wenn die Organtransplantation den Goldstandard in der Behandlung terminalen Organversagens darstellt, bringt diese Therapieform unweigerlich auch negative Aspekte mit sich. Da eine vollständige Kompatibilität der HLA-Gene nur bei genetisch identischen Individuen wie monozygoten Zwillingen erreicht werden kann, folgt auf eine Transplantation stets eine immunsuppressive Therapie mit dem Ziel einer transplantat-spezifischen Immuntoleranz [12, 14]. Die schwerwiegenden Komplikationen einer solchen Therapie reichen dabei von Nephro-, Myelo- und Neurotoxizität über die Reaktivierung latenter Infektionen und erhöhte Inzidenzen maligner Tumore bis hin zur gesteigerten Infektanfälligkeit, die die Gefahr der Sepsis und des Todes durch Multiorganversagen birgt [15-17]. Doch auch unter immunsuppressiver Therapie gelingt es nicht immer, eine immunologische Abstoßungsreaktion zu verhindern. Gefürchtet sind dabei sowohl Host versus Graft-Reaktionen (Immunreaktion des Empfängers gegen das Transplantat) als auch Graft versus Host-Reaktionen

(Immunreaktion des Transplantats gegen den Empfänger, bei Knochenmarkstransplantationen) [12, 18, 19].

Auf der Suche nach einer Antwort auf diese Probleme begann sich gegen Ende der 1980er Jahre mit dem Tissue Engineering eine neue Fachdisziplin zu formieren: 1993 definierten Langer und Vacanti Tissue Engineering als interdisziplinäres Forschungsfeld, das Prinzipien der Ingenieur- und Lebenswissenschaften zur Entwicklung biologischer Ersatzimplantate nutzt, die der Erneuerung, Bewahrung oder Verbesserung der Gewebefunktion dienen. [20]

1.2 Tissue Engineering

1.2.1 Hintergrund

Der Terminus Tissue Engineering bezeichnet die Konstruktion oder Züchtung, also die künstliche Herstellung biologischer Gewebe [20]. Zum Tissue Engineering wird eine Kombination aus biokompatiblen Materialien, lebenden Zellen und geeigneten biochemischen (z.B. Wachstumsfaktoren) und physikalischen Faktoren (z.B. zyklische mechanische Belastung) genutzt, um gewebeähnliche Strukturen zu erzeugen [21]. Diese sollen in ihren gewebespezifischen morphologischen, biologischen, chemischen, mechanischen und funktionellen Eigenschaften eine möglichst große Ähnlichkeit mit dem Nativgewebe aufweisen [22]. In den allermeisten Fällen ist dabei das endgültige Ziel die Implantation dieser Gewebekonstrukte in den Körper, um eine Verletzung zu heilen oder die Funktion eines versagenden Organs zu ersetzen [21]. Ebenso wie native Gewebe reagieren auch tissue-engineerte Implantate auf biologische und physikalische Stimuli, gegenüber denen sie *in vivo* exponiert werden [23]. Diese Eigenschaft stellt einen der großen Vorteile tissue-engineerten Gewebes dar: Ein azelluläres Implantat oder Material ist mit der Zeit unweigerlich der Degradation durch Enzyme, Hydrolyse oder Alterserscheinungen ausgesetzt. Im Gegensatz dazu können in einem tissue-engineerten Gewebekonstrukt die besiedelnden Zellen die Extrazellulärmatrix (EZM) reparieren und umstrukturieren, sodass die Gewebeeigenschaften im Laufe der Zeit nicht durch einen Zersetzungsprozess beeinträchtigt werden.

Auch wenn der Begriff des Tissue Engineerings erst Anfang der 1990er Jahre geprägt wurde, reichen die Ursprünge dieses Wissenschaftsbereiches viel weiter zurück [24]. Bereits 1908 berichtete Lexer über die Nutzung frisch amputierter Allografts für Kniegelenkrekonstruktionen [25]. Diese Eingriffe könnten heute als erste Versuche im

Tissue Engineering strukturellen Gewebes bezeichnet werden [23]. In den späten 1980er Jahren wurde in Colorado eine historisch bedeutende Tagung mit dem Namen „Tissue engineering“ abgehalten [24]. Dieser kam eine zentrale Rolle darin zu, die Bedeutung der Manipulation lebender Gewebe und ihrer potenziellen Kombination mit prothetischen Materialien herauszuarbeiten. W. T. Green, ein pädiatrischer Orthopäde aus Boston, erkannte bereits in den 1970er Jahren, dass innovative biokompatible Materialien als adäquat konfigurierte Zellträgersysteme mit lebensfähigen Zellen besiedelt werden können, um neues Gewebe zu generieren.

Mittlerweile haben Forscher beinahe jedes Gewebe des menschlichen Körpers mit dem Ziel untersucht, es durch lebende, tissue-engineerte Strukturen zu ersetzen [26]. Hierbei weist die Herstellung kompletter Organe durch Tissue Engineering vier Stufen zunehmender Komplexität auf [27]. Am unkompliziertesten ist das Tissue Engineering flacher Gewebe und Organe wie der Haut; höhere Komplexität muss für die Herstellung tubulärer Organstrukturen wie Blutgefäße oder Trachea gemeistert werden. Noch schwieriger ist die Züchtung von hohlen, nicht-tubulären Organen wie der Blase, doch am komplexesten ist die Nachbildung solider Organe wie Herz, Niere und Leber.

Sowohl flache als auch tubuläre und hohle, nicht-tubuläre Organstrukturen wurden bereits erfolgreich im Labor entwickelt, ihre Implantation in Patientinnen und Patienten zeigen vielversprechende klinische Ergebnisse [28-31]. Die Züchtung funktionstüchtiger solider Organe ist allerdings nach aktuellem Kenntnisstand noch nicht möglich [27]. Von zentraler Bedeutung ist dabei die Suche nach geeigneten Quellen zur Gewinnung einer hinreichend großen Anzahl an Zellen. Um dickere Gewebe und letztendlich Organe herstellen zu können, ist zudem ihre Vaskularisation ein kritischer Punkt. Außerdem basiert die Funktion eines Organs auf der Leistung individueller Zelltypen mit verschiedenen Eigenschaften und Aufgaben. Eine der größten Herausforderungen des Tissue Engineerings bleibt daher die Entwicklung technisch ausgereifter Biomaterialien, die allen verschiedenen Zelltypen eines Organs die funktionelle Zusammenarbeit und die Produktion ihrer spezifischen EZM ermöglichen [32].

1.2.2 Strategien des Tissue Engineerings

Beim Tissue Engineering werden grundsätzlich zwei verschiedene Herangehensweisen genutzt. Das *in vivo*-Tissue Engineering basiert auf der natürlichen Regenerationsfähigkeit des Körpers und verwendet daher nicht-zellbesiedelte Biomaterialien [33]. Diese Strategie kann den zusätzlichen Einsatz von Proteinen wie

Wachstumsfaktoren, DNA oder mRNA erforderlich machen, um eine bessere Geweberegeneration zu garantieren. Das Ziel nach der Implantation in den Organismus ist die Rekrutierung körpereigener Zellen zur Besiedelung des Zellträgersystems (Scaffold), um eine Gewebestruktur auf dem Scaffold zu formen [34].

Im Gegensatz dazu beinhaltet das *in vitro*-Tissue Engineering eine *in vitro*-Kultivierung von Zellen, die zur *in vitro*-Besiedelung des Scaffolds genutzt werden [33]. Dabei werden die Zellen dazu angeregt, eine EZM zu produzieren und somit noch vor der Implantation in die *in vivo*-Umgebung ein initiales Gewebegerüst zu generieren [34]. Es können viele verschiedene Zellquellen für das *in vitro*-Tissue Engineering verwendet werden, darunter autologe, allogene und xenogene Zellen [35]. Idealerweise sollten diese Zellen nicht-immunogen, hoch proliferativ und leicht zu gewinnen sein und außerdem über die Fähigkeit verfügen, sich in zahlreiche verschiedene Zelltypen mit spezialisierten Funktionen differenzieren zu können [36]. Hierbei konnten die größten Erfolge unter Verwendung von autologen Primärzellen erzielt werden [34]. Diese Strategie ist allerdings durch den invasiven Charakter der Zellgewinnung und den potentiell erkrankten Zustand der Zellen limitiert. Außerdem weisen bestimmte Zelltypen wie Kardiomyozyten oder Hepatozyten eine geringe Proliferationsrate in Zellkulturen auf [35]. Deswegen sind schneller proliferierende Zellquellen wie fetale, neonatale, genmanipulierte Zellen und embryonale oder adulte Stammzellen ebenfalls Gegenstand aktueller Untersuchungen [37].

So fortgeschritten die *in vitro*-Gewebezüchtung inzwischen ist, so essenziell bleibt die *in vivo*-Umgebung für die definitive Entwicklung des Gewebes oder Organs [33]. Somit dient der menschliche Körper oft als „endgültiger Inkubator“. In seiner nativen Umgebung ist das Gewebe in ein komplexes Makro- und Mikromilieu eingebettet, das im Informationsaustausch mit dem gesamten Organismus steht und die gewebespezifischen Funktionen festlegt [38, 39]. Eine *in vitro*-Umgebung sollte diese *in vivo*-Bedingungen also möglichst genau imitieren [40]. Zu diesem Zwecke werden im Tissue Engineering analog zur Biotechnologie oder Lebensmittelindustrie technisch hochentwickelte Bioreaktorsysteme verwendet. Auf diese Weise können physikalische und chemische Prozessparameter (z.B. Scherspannung, Sauerstoff- und Kohlenstoffdioxidpartialdruck, pH-Wert) kontrolliert und somit optimale Kultivierungsbedingungen für eine adäquate funktionelle Gewebeentwicklung garantiert werden [33, 40, 41].

1.2.3 Zellträger: Anforderungen und Materialien

Für die Entwicklung tissue-engineerten Gewebes sind Auswahl und Design der Biomaterialien für Zellträgersysteme von essentieller Bedeutung [33]. Diese Biomaterialien erleichtern die Lokalisierung und Ansiedlung von Zellen und/oder bioaktiven Faktoren (z.B. Zelladhäsionspeptide oder Wachstumsfaktoren) an der gewünschten Position im Organismus, definieren einen dreidimensionalen Raum für die Ausbildung einer adäquaten Gewebestruktur und fördern und lenken die Entwicklung der gewebespezifischen Funktionen [42]. Auch direkte Injektionen von Zellsuspensionen ohne die Verwendung einer unterstützenden Biomatrix wurden bereits durchgeführt, allerdings ist hier die Kontrolle über die Lokalisation der transplantierten Zellen erschwert [33, 43, 44]. Außerdem sind manche Zelltypen von ihrer Verankerung in einer Matrix abhängig und können ohne Trägermaterial nicht überleben [33].

Um im Tissue Engineering als potentieller Baustoff für Zellträgersysteme berücksichtigt zu werden, muss ein Biomaterial zahlreiche Qualitätskriterien erfüllen. Zunächst ist hierbei die Biokompatibilität zwischen Implantat und Organismus zu nennen. Der Begriff der Biokompatibilität beinhaltet die Energetik und Kinetik aller physikalischen, chemischen und biochemischen Prozesse, die an der Grenzfläche zwischen Biomaterial und biologischem System ablaufen, und alle dadurch hervorgerufenen Veränderungen, sowohl im Bezug auf das Material als auch auf das biologische System [45]. Ein biokompatibles Material darf beispielsweise weder eine karzinogene Wirkung aufweisen noch die Funktion umliegender Gewebe stören oder thrombogene, toxische, allergische, inflammatorische oder immunologische Reaktionen hervorrufen. Falls das betreffende Biomaterial biologisch abbaubar ist, sollten auch seine Abbauprodukte biokompatibel sein und – gegebenenfalls nach weiterer Metabolisierung – z.B. renal oder biliär aus dem Körper eliminiert werden können [33].

Auch adäquate mechanische und physikalische Eigenschaften sind von fundamentaler Bedeutung: Ein Biomaterial sollte wenigstens temporär eine ausreichende mechanische Unterstützung garantieren, um den hohen einwirkenden Kräften *in vivo* standhalten zu können, bis das tissue engineerte Gewebe selber über genügend mechanische Festigkeit verfügt [33, 46]. Zelltyp und Zellträgermaterial sollten sehr sorgfältig kombiniert und auf den Einsatzzweck abgestimmt werden, denn es ist bekannt, dass Zusammensetzung, Oberflächentopographie und Architektur des Scaffolds mit dem Zellverhalten interagieren und dieses steuern können [34]. Meredith et. al. zeigten beispielsweise, dass

die Oberflächentopographie eines Zellträgers im Nano- bis Mikrometerbereich das Zellverhalten durch eine Veränderung der Zytoskelettanordnung beeinflusst [47]. Ripamonti et. al. konnten anhand der Abhängigkeit der Knochenbildung von bestimmten Scaffoldregionen demonstrieren, wie die Zellträgerarchitektur die Zellantwort und den daraus folgenden Gewebeaufbau modifiziert [48].

Daraus ergibt sich die Anforderung an ein Biomaterial, eine angemessene Regulation des Zellverhaltens wie Adhäsion, Proliferation, Migration und Differenzierung zu gewährleisten, um die Entwicklung funktionalen neuen Gewebes zu unterstützen. Das Biomaterial kann dabei auch als Depot für die lokale Freisetzung von Wachstumsfaktoren und anderen bioaktiven Substanzen dienen, die eine gewebespezifische Genexpression der Zellen induzieren. [33]

Bei der Herstellung von Zellträgersystemen können zwei Klassen von Biomaterialien unterschieden werden: Synthetische und natürliche Materialien [33]. Beispiele für synthetische Biomaterialien sind die Polyester der natürlich vorkommenden α -Hydroxysäuren: PLA (polylactide acid = Polymilchsäure), PGA (polyglycolic acid = Polyglycolsäure) und PLGA (polylactid-o-glycolid = Copolymer aus Lactid und Glycolid). Diese haben die Zulassung durch die US Food and Drug Administration (FDA) für ein breites Anwendungsspektrum erhalten und sind im Tissue Engineering weit verbreitet [49]. Da es sich bei diesen Materialien um thermoplastische Kunststoffe handelt, können aus ihnen durch verschiedene Verfahren leicht dreidimensionale Scaffolds mit der gewünschten Mikrostruktur, Form und Dimension angefertigt werden [33]. Ein Vorteil der synthetischen Polymere besteht in der Möglichkeit der Massenproduktion sowie einer genauen Kontrolle der mechanischen Eigenschaften und der Abbaugeschwindigkeit. Ein großer Nachteil synthetischer Polymere ist jedoch ihre fehlende biologische Wiedererkennung durch den Empfängerorganismus. Um Zellerkennungsdomänen in den Scaffold zu integrieren, wurden deshalb bereits Kopolymere mit darin enthaltenen Aminosäuren entwickelt [50-53].

Zu den natürlichen Biomaterialien zählen unter anderem Biopolymere wie Kollagen, Alginat und Chitosan [33]. Diese haben den Vorteil der potenziellen biologischen Wiedererkennung mit niedriger Toxizität und nur schwach ausgeprägter chronisch-inflammatorischer Reaktion [33, 54]. Als nachteilig erweisen sich hingegen die schlechten mechanischen Eigenschaften und die sehr komplexen Strukturen, die eine Manipulation durch Tissue Engineering erschweren [54]. Außerdem sind als natürliche Biomaterialien

azelluläre Gewebematrices zu nennen, die durch die Entfernung zellulärer Komponenten aus dem Gewebe entstehen [33]. Nach Implantation werden diese Gewebematrices langsam abgebaut und durch EZM Proteine ersetzt und umorganisiert. Diese Proteine werden von transplantierten oder einwachsenden Zellen synthetisiert und sezerniert. Diese azellulären Scaffolds ziehen aufgrund ihrer vergleichsweise hohen Bioaktivität, niedrigen Immunogenität, guten Biodegradabilität und nativen Strukturen immer mehr Aufmerksamkeit auf sich, denn sie zeigen großes Potential, die Nachteile der bisher verwendeten Materialien zu überwinden [55]. Der Prozess der Zellentfernung wird dabei als Dezellularisation (DZ) bezeichnet [56].

1.3 Dezellularisation

1.3.1 Hintergrund

Das Ziel der DZ ist die Entfernung aller zellulären Komponenten aus Geweben oder Organen unter Bewahrung der Makro- und Mikroarchitektur des ursprünglichen Gewebes zur Herstellung dreidimensionaler EZM-Konstrukte im Tissue Engineering [56]. Xenogene und allogene zelluläre Antigene werden vom Immunsystem des Empfängers als fremd erkannt und induzieren demzufolge eine Immunreaktion [57]. Im Gegensatz dazu bewahrten die EZM-Komponenten evolutionär eine große Übereinstimmung zwischen den verschiedenen Spezies, wodurch sich deren gute Verträglichkeit sogar bei xenogenen Empfängern erklärt [58-61]. Durch die Eliminierung der zellulären Bestandteile und damit der zellständigen Antigene aus der EZM wird das Risiko unerwünschter Reaktionen wie Inflammation, Kalzifizierung und immunologischer Transplantatabstoßung deutlich reduziert [62-64]. Somit kann durch die Schaffung immunogen inerter Scaffolds eine Toleranz des Empfängerimmunsystems auch gegenüber allogenen oder xenogenen Transplantaten erreicht werden.

Ein weiterer großer Vorteil dezellularisierter Scaffolds ist ihre natürliche Beschaffenheit aus EZM. Für die Entwicklung eines der EZM ähnlichen Biomaterials wurden bereits zahlreiche EZM Moleküle wie Kollagene und Proteoglykane als Rohmaterialien eingesetzt. Ein einzelnes Molekül kann dabei jedoch unmöglich die Rolle der gesamten EZM übernehmen. Obendrein erschwert die Komplexität der EZM in Zusammensetzung und Struktur eine Replikation erheblich. Deshalb weisen dezellularisierte Scaffolds mit ihrer EZM-ähnlichen Struktur im Vergleich zu vielen anderen Biomaterialien deutliche Vorzüge auf. [55]

Die EZM besteht grundsätzlich aus zwei verschiedenen Komponenten, nämlich Grundsubstanz und Fasern [65]. Zu den Fasern der EZM zählen vor allem Elastin- und Kollagenfasern. Kollagene sind die im menschlichen Körper am häufigsten vorkommenden Strukturproteine [66]. Im Extrazellulärraum lagern sich die Kollagenfibrillen parallel aneinander und werden durch kovalente Bindungen quervernetzt, worauf ihre große mechanische Zugfestigkeit beruht [65]. Auch Elastinfasern sind ein essenzieller Bestandteil der EZM zahlreicher Gewebe, für deren elastische Rückstellkräfte sie verantwortlich sind [67]. Die Räume zwischen den Fasern sind mit Grundsubstanz gefüllt, bestehend aus Glykosaminoglykanen und Proteoglykanen [65]. Deren wichtigste Aufgabe besteht in der Bindung von Wasser, das auf diese Weise gespeichert werden kann und aufgrund seiner nicht-komprimierbaren Eigenschaften der mechanischen Festigkeit dient. Außerdem haben die Bestandteile der Grundsubstanz spezifische zellbiologische Funktionen. So spielen sie beispielsweise eine Rolle bei der Bindung und Signaltransduktion von Wachstumsfaktoren [68]. Sowohl innerhalb der einzelnen Gewebe als auch zwischen diesen variiert die EZM in ihrer Zusammensetzung und Konzentration, was zu unterschiedlichen EZM Eigenschaften führt [69-71].

Einerseits resultiert die Bewahrung der makroskopischen und mikroskopischen EZM Strukturen in mechanischen Eigenschaften, die denen des Nativgewebes nahekommen [72]. Andererseits ist der Erhalt der EZM von entscheidender Bedeutung für die biologischen Eigenschaften eines Gewebes. Die EZM bettet alle Körperzellen in ein lokales Mikromilieu ein, mit dem die Zellen durch verschiedene Oberflächenrezeptoren in ständigem Kontakt stehen [73]. Durch das Zusammenwirken ihrer Ultrastruktur, Oberflächentopographie und Zusammensetzung beeinflusst die EZM das Zellverhalten durch Regulation von Zellmigration und gewebespezifischer Differenzierung sowie durch Induktion konstruktiver Umbauprozesse im Empfängergewebe [56, 74-76].

Jede Form der DZ führt unweigerlich zu einer Veränderung der EZM Zusammensetzung und zu einem gewissen Maß an ultrastrukturellen Schäden [56]. Das endgültige Ziel der DZ besteht also nicht nur in einer möglichst effektiven Eliminierung zellulärer Komponenten, sondern auch im weitestgehenden Erhalt der Zusammensetzung, strukturellen Integrität und Bioaktivität der EZM [57].

1.3.2 Dezellularisationsmethoden

Für die DZ stehen chemische, enzymatische und physikalische Methoden zur Verfügung, die in unterschiedlichen prozeduralen Schemata angewandt werden. Die Wirksamkeit

einer DZ Methode ist abhängig von zahlreichen, das zu dezellularisierende Material betreffenden Faktoren, wie etwa Gewebedichtigkeit und -dicke sowie Zell- und Lipidgehalt. [56]

Chemische DZ Methoden stellen die derzeit dominierende Verfahrensweise dar [55]. Zu den für die DZ genutzten chemischen Substanzen gehören unter anderem Säuren, Basen, Alkohole und andere Lösemittel [56]. Eine besonders wichtige Rolle spielen außerdem Detergenzien. Diese sind im Stande, Zellmembranen zu verflüssigen und DNA von Proteinen zu dissoziieren, wodurch sich ihre große Effektivität bei der Entfernung zellulären Materials aus dem Gewebe erklärt [77, 78]. Am häufigsten werden dabei das nicht-ionische Detergens Triton X-100 und die ionischen Detergenzien Natriumdeoxycholat (sodium deoxycholate = SD) und Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate = SDS) verwendet [57]. Mit diesen konnten bereits zahlreiche vielversprechende DZ Ergebnisse erzielt werden, die mit effektiver Zellentfernung und verhältnismäßig kleinen EZM Schäden einhergingen [79-83].

Zu den enzymatischen DZ Methoden zählt beispielsweise die Verwendung von Lipasen, Nukleasen wie DNase oder RNase sowie Proteasen wie Trypsin oder Kollagenase. Enzyme zeigen eine hohe Spezifität in der Entfernung von Zellrückständen oder unerwünschten EZM Komponenten, wobei sie vergleichsweise wenig Schäden an den anderen Gewebebestandteilen hinterlassen. Eine DZ, die nur auf enzymatischen Methoden basiert, ist allerdings wenig erfolgversprechend. Auch könnten Enzymrückstände möglicherweise die Rezellularisierung behindern oder eine schädliche Immunreaktion hervorrufen. [56]

Physikalische DZ Methoden nutzen physikalische Kräfte wie Temperatur, mechanischen Druck oder elektrischen Strom, um die physikalischen Eigenschaften eines Gewebes zu verändern und Zellmembranen zu lysieren [55]. Die am häufigsten angewandten Methoden beinhalten Einfrier-Auftau-Prozesse, Kraft- und Druckanwendung, Elektroporation, Ultraschallbehandlung, den Einsatz überkritischer Flüssigkeiten oder osmotisch wirksamer Lösungen sowie das mechanische Schütteln des Gewebes in DZ Lösung oder seine Perfusion damit. Auch wenn die physikalischen Methoden eine effektive Zellyse bewirken, müssen darauf in den meisten Fällen weitere Behandlungsschritte folgen, um das lysierte zelluläre Material aus dem Gewebe zu entfernen [57].

Der Großteil der DZ Protokolle basiert auf einer Kombination von chemischen, enzymatischen und physikalischen Methoden [57]. Meistens beginnen sie mit der Lysierung von Zellmembranen durch physikalische Prozesse oder mit dem Einsatz von ionischen Detergenzien, gefolgt von der Auftrennung der zellulären Komponenten und der EZM durch enzymatische Behandlung und der abschließenden Entfernung der Zell- und Chemikalienüberreste aus dem Gewebe. Die gründliche Säuberung des Gewebes von residualen chemischen Detergenzien ist dabei ausschlaggebend für eine Minimierung der Zytotoxizität des Scaffolds [84]. Die Effektivität der DZ Protokolle kann durch die Anpassung prozeduraler Rahmenbedingungen gesteigert werden. So ist es wichtig, DZ Dauer und Methode auf die jeweilige Gewebebeschaffenheit abzustimmen [56]. Außerdem beinhalten viele Protokolle eine zyklische Applikation von DZ Lösungen mit intermittierenden Waschschritten und anschließendem Lösungswechsel, um eine noch wirksamere Zellentfernung zu erzielen [85, 86].

1.3.3 Überprüfung des Dezellularisationserfolgs

Es ist kaum möglich, durch die verschiedenen DZ Techniken eine hundertprozentige Entfernung des zellulären Materials aus dem Gewebe zu gewährleisten [56]. Die Schwellenkonzentration zellulärer Residuen, die genügt, um eine unerwünschte Immunreaktion hervorzurufen, kann von verschiedenen Faktoren wie Ausgangs- und Empfängergewebe sowie Immunfunktion des Empfängers abhängen. Basierend auf den Ergebnissen von Untersuchungen, die ein konstruktives Remodelling *in vivo* und das Ausbleiben schädlicher Immunreaktionen ergaben, definierten Crapo et. al. drei Schwellenwerte für eine suffiziente DZ [56]. Gemäß diesen sollte der DNA-Gehalt dezellularisierter Scaffolds unter 50 ng dsDNA pro mg EZM (Trockengewicht) betragen und die Länge der DNA-Fragmente unter 200 bp liegen [56, 87, 88]. Schließlich dürfen in den Gewebefärbungen mit 4',6-diamidin-2-phenylindol (DAPI) und Hämatoxylin-Eosin (H&E) keine Zellkerne erkennbar sein [56]. Der Fokus auf der Entfernung von Zellkernbestandteilen resultiert daraus, dass DNA eine der Hauptursachen immunologischer Abstoßungsreaktionen darstellt [87, 88]. Außerdem kann DNA leicht quantifiziert werden, ist ubiquitär in allen Zell- und Gewebetypen vertreten und stellt somit einen repräsentativen Index auch für andere Zellresiduen in der EZM dar [56].

Die ersten beiden Kriterien lassen sich durch Gelelektrophorese beziehungsweise kommerziell erhältliche DNA-Quantifizierungskits überprüfen [56]. Nach der vollständigen Extraktion der DNA aus einer Gewebeprobe wird die photometrische

Quantifizierung der Nukleinsäuren genutzt, um sowohl ihre Konzentration in einer Probe als auch ihre Reinheit zu bestimmen [89].

Das dritte Kriterium lässt sich leicht mit histologischen Routinefärbungen und Immunfluoreszenzmethoden beurteilen und dient einer qualitativen Verifizierung der ersten beiden Kriterien [56]. Die Färbung mit DAPI wird zur Visualisierung von Zellkernen verwendet. Der Fluoreszenzfarbstoff bindet hier bevorzugt an Adenin-Thymin-Basenpaare in der kleinen Furche von doppelsträngiger DNA (dsDNA) [90]. Durch die Aktivierung mit ultraviolettem Licht fluoresziert der Farbstoff blau. Mithilfe des Fluoreszenzmikroskops können so dsDNA Rückstände im Gewebe nach DZ quantifiziert werden.

Bei der H&E Färbung hingegen werden die beiden Einzelfärbungen mit Hämalaun und Eosin miteinander kombiniert, um einen ersten Überblick über die Gewebestruktur zu erhalten. Das basische Hämalaun bindet dabei an alle basophilen Strukturen, insbesondere an Zellkernkomponenten wie DNA, und färbt diese blau an [91]. Ergänzend dazu färbt das saure Eosin alle azidophilen Bestandteile rot, beispielweise zytoplasmatische Strukturen und Kollagenfasern. Anhand der H&E Färbung lassen sich also nicht nur die Resultate der DAPI Färbung verifizieren, sondern auch erste Einblicke in den Erhalt der EZM gewinnen.

Auch dieser Aspekt ist neben der Entfernung zellulärer Komponenten bei der Überprüfung des DZ Erfolgs von großem Interesse. Seine Analyse erfolgt hauptsächlich durch qualitative Methoden. In Ergänzung und Erweiterung zur H&E Färbung bietet sich beispielsweise mit der Pentachrom Färbung (MPC) eine Möglichkeit zur Beurteilung der gesamten Gewebestruktur sowie eventueller, durch den DZ Prozess daran entstandener Schäden. Mit einer einzigen histologischen Färbung lassen sich hier die verschiedenen Bestandteile des Binde- und Stützgewebes voneinander unterscheiden [92]. Die Pikro-Siriusrot (PSR) Färbung erlaubt die spezifische Untersuchung der Kollagenstruktur des Gewebes unter polarisiertem Licht [93]. Eine bildliche Darstellung der Oberflächentopographie der dezellularisierten Proben ermöglicht hingegen die Rasterelektronenmikroskopie (REM), durch die hochauflösende Aufnahmen der Gewebeoberflächen angefertigt werden können [94].

Zusätzlich können bei der Beurteilung des Erhalts der EZM auch quantitative Methoden zum Einsatz kommen. So kann etwa der Restgehalt besonders erhaltungswürdiger EZM Komponenten wie Glykosaminoglykane oder Wachstumsfaktoren nach DZ gemessen

werden. Außerdem gewährt die mechanische Prüfung der EZM nach DZ einen Einblick in die Anwesenheit und Integrität von Strukturproteinen innerhalb des Scaffolds. [57]

1.3.4 Aktueller Stand der Wissenschaft und klinischer Einsatz

Aufgrund ihrer vielversprechenden Materialeigenschaften ziehen dezellularisierte Scaffolds immer mehr Aufmerksamkeit auf sich. Inzwischen wurden zahlreiche Gewebetypen erfolgreich dezellularisiert und auch zur Geweberekonstruktion verwendet [55]. Da sich während des DZ Prozess gewebespezifische Herausforderungen ergeben, befindet sich die Entwicklung dezellularisierter Scaffolds verschiedener Gewebetypen in unterschiedlichen Entwicklungsphasen. Diese reichen von Klein- [95] oder Großtiermodellen [96] über klinische Studien [97] bis hin zu fertigen Produkten [98].

Tatsächlich haben bereits zahlreiche dezellularisierte Produkte die Zulassung durch die FDA erhalten und sind auf dem medizinischen Markt erhältlich [55]. Zu den am genauesten untersuchten Geweben zählen dabei unter anderem Haut und Dünndarmsubmukosa. Der klinische Einsatz dezellularisierter Haut ist sowohl in der Behandlung von Verbrennungen [98, 99] als auch in oralen und maxillofazialen [100, 101] sowie HNO-chirurgischen Eingriffen [102, 103] weit verbreitet. Mit der Verwendung von Dünndarmsubmukosa als Gefäßersatz wurde in den 1960er Jahren begonnen [55]. Seitdem ist dieses Gewebe im Feld der Geweberekonstruktion zum Gegenstand intensiver Forschung geworden. Der Einsatz dezellularisierter Dünndarmsubmukosa ist bereits schrittweise in die klinischen Therapie von Defekten verschiedener Gewebe eingeführt worden, z.B. der Urethra und des kardiovaskulären Systems [104, 105]. Andere dezellularisierte Gewebe wie Knochenmatrix [106, 107], Nerven- [108] oder Hornhautgewebe [109] wurden erfolgreich in *in vivo* Tiermodellen getestet.

Darüber hinaus wurden inzwischen auch ganze Organe dezellularisiert. Ott et. al. gelang 2008 die vollständige Dezellularisation eines Herzens, dessen darauffolgende Rebesiedelung mit Kardiomyozyten und Endothelzellen und schließlich die Entwicklung eines künstlichen Herzens mit makroskopisch sichtbaren Kontraktionen und rudimentärer Pumpfunktion. Obwohl sich diese Studie auf murine Herzen beschränkte, stellte sie einen wichtigen Meilenstein in der DZ solider Organe dar. [110]

Ebenfalls 2008 wurde das erste tissue-engineerte Organ der Welt mit Erfolg einer 31-jährigen Patientin transplantiert [111]. Es handelte sich dabei um eine dezellularisierte humane Spendertrachea, die vor Implantation *in vitro* mit autologen respiratorischen Endothelzellen und stammzell-abgeleiteten Chondrozyten besiedelt worden war. 18

Monate später konnte die Patientin ein nahezu normales Leben ohne Immunsuppression führen [97].

2018 erregten Damodaran et. al. Aufmerksamkeit durch die Rebesiedlung dezellularisierter muriner Pankreata mit Inselzellen. Glukose-stimulierte Insulinsekretion bestätigte deren Funktionalität nach 48 Stunden. Bioartifizielle Pankreata für die Organtransplantation sind ein innovativer Ansatz in der Diabetestherapie und nähern sich ihrer *in vivo* Testung. [112]

Offensichtlich sind die Verfahren zur Herstellung dezellularisierter EZM-Matrizes noch nicht völlig ausgereift. Dennoch versprechen diese Materialien großes Potential in der Gewebe- und Organrekonstruktion durch Tissue Engineering. [55]

1.3.5 Limitationen

Trotz der bemerkenswerten Fortschritte, die in den letzten Jahren in der Erforschung dezellularisierter EZM-Matrizes erzielt werden konnten, liefern präklinische und klinische Studien nach wie vor sehr variable Ergebnisse. Da Costa et. al. berichten beispielsweise über die erfolgreiche Implantation von dezellularisierten humanen Aortenklappen in 41 Patientinnen und Patienten, die auch vier Jahre nach dem Eingriff keine nennenswerten strukturellen oder morphologischen Veränderungen zeigten [113]. Auch Lederman et. al. konnten durch den Einsatz dezellularisierter porciner dermaler Xenografts in der Therapie von Rotatorenmanschettenrupturen verbesserte Ergebnisse hinsichtlich Funktionalität, Muskelkraft und Bewegungsumfang verzeichnen [114]. Andere Studien verweisen hingegen auf potentielle Komplikationen, die im Zusammenhang mit dezellularisierten Scaffolds auftreten können. So setzten Sharp et. al. einem 68-jährigen Patienten einen dezellularisierten bovinen Ureter als vaskuläre femoro-tibiale Bypassprothese ein, der jedoch nur acht Wochen später aufgrund aneurysmatischer Degeneration entfernt werden musste [115]. Auch Corno et. al. berichten über eine erhöhte Inzidenz von Re-Interventionen nach Gefäßrekonstruktionen des Aortenbogens mit Patches aus dezellularisierter Dünndarmsubmukosa bei pädiatrischen Patientinnen und Patienten [104].

Anhand dieser Studien wird deutlich, dass inhomogene klinische Resultate ein zentrales Problem bei der Bewertung des Erfolgs dezellularisierter EZM-Matrizes darstellen. Hierfür werden ineffektive DZ Prozesse verantwortlich gemacht, die die Balance zwischen der präzisen Entfernung zellulären Materials sowie dem Erhalt nicht-antigener EZM Komponenten stören. Dies kann zur Persistenz zellständiger Antigene führen sowie

zu veränderten biomechanischen Eigenschaften und zu einer verringerter Bioaktivität. Daraus folgt die Notwendigkeit einer weiteren Verbesserung der Effektivität von DZ Protokollen. Diese Effektivität hängt von verschiedenen Faktoren ab, wie z.B. Gewebetyp, Matrixdicke, -dichte und -zusammensetzung sowie v.a. von der Dezellularisationsmethode. [55]

Bei der Entwicklung der unterschiedlichen DZ Protokolle wurde allerdings selten lediglich *eine einzelne* Methode in ansonsten identischen Protokollen modifiziert, um diese am selben Material vergleichend zu bewerten. Somit ist nur die Beurteilung des Gesamtergebnisses aller in einem Protokoll enthaltenen DZ Methoden möglich [116-118]. Um diesem Problem entgegenzuwirken, haben sich einige Arbeitsgruppen mit der direkten, gewebespezifischen Gegenüberstellung einzelner DZ Methoden beschäftigt. Diese Studien konzentrieren sich vorrangig auf chemische und enzymatische DZ Methoden [86, 119, 120]. Auch die vielversprechenden Ergebnisse fluss- und perfusionsbasierter DZ Protokolle erregen immer mehr Aufmerksamkeit und sind Gegenstand genauer Untersuchungen [110, 121, 122].

Andere physikalische DZ Methoden wie Einfrier-Auftau-Prozesse sind hingegen oft fester Bestandteil von DZ Protokollen, ohne dass ihre spezifischen Effekte vorher systematisch analysiert worden wären. Zahlreiche Studien haben bereits das große Potential von Einfrier-Auftau-Prozessen zur Steigerung der DZ Effektivität aufgezeigt. Dabei wurde jedoch lediglich die Verbesserung der DZ Protokolle durch Einfrier-Auftau-Vorgänge an sich beurteilt. Die Auswirkungen einer Modifizierung sowohl der jeweiligen Einfriertemperatur als auch der genauen Anzahl der Einfrier-Auftau-Zyklen wurden dagegen außer Acht gelassen, sodass das Vorgehen der einzelnen Arbeitsgruppen willkürlich erscheint und uneinheitlich war. [85, 123-128]

Ähnliches gilt für die Verwendung osmotisch wirksamer Lösungen: Auch diese sind häufig eine Teilkomponente in DZ Protokollen, ohne dass ihre spezifischen Auswirkungen gezielt analysiert worden sind [116, 117, 129, 130]. Genauere Untersuchungen zum Einsatz des osmotischen Schocks zeigen teilweise divergente Ergebnisse. Allerdings konzentrieren sich die meisten dieser Arbeiten auf den Einsatz salzhaltiger hypertonen Lösungen, während Lösungen, die auf anderen osmotisch wirksamen Molekülen wie etwa Zuckern basieren, bisher weitestgehend vernachlässigt wurden [85, 131-133].

1.3.6 Experimentelle Ansätze zur Bestimmung des spezifischen Beitrags von Einfrier-Auftau-Zyklen und osmotischem Schock zum Dezellularisationserfolg

Für die Planung der vorliegenden Arbeit waren physikalische Effekte von großer Bedeutung, die durch Modifikationen der Einfrier-Auftau-Prozesse sowie der osmotischen Zusammensetzung des Inkubationsmediums induziert werden.

Bereits 1972 stellten Mazur et. al. die „Two Factor Hypothesis of freezing injury“ auf [134]. Darin werden zwei Mechanismen der Zellschädigung in Abhängigkeit von der Einfriertemperatur und damit von der Einfriergeschwindigkeit definiert. Bei relativ langsamen Einfrieren beginnt zuerst das perizelluläre Wasser von darin gelösten Salzen zu dissoziieren und zu frieren. Durch die Bildung extrazellulärer Eiskristalle steigt die Salzkonzentration in der noch ungefrorenen Lösung, was zu einem osmotischen Wasserausstrom aus den Zellen und deren Dehydratation führt. Dieser Prozess bedingt eine Zellschädigung durch erhöhte Salzkonzentrationen, was als Lösungseffekt bezeichnet wird. Die Wanderung der Wassermoleküle durch die Zellmembran hängt dabei von der Einfriergeschwindigkeit ab. Bei sehr schnellem Einfrieren bleibt dagegen dem intrazellulären Wasser weniger Zeit, um dem osmotischen Gradienten folgend aus den Zellen zu strömen, was wiederum in der Entstehung intrazellulärer Eiskristalle resultiert. Die Bildung dieser Eiskristalle und deren Ausdehnung beim Prozess der Rekristallisation während der Wiedererwärmung beschädigen die Zellen durch Zerstörung zellulärer Strukturen und durch konsekutive Beeinträchtigung ihrer physiologischen Zellfunktion. Unterschiedliche Einfriertemperaturen und damit Einfriergeschwindigkeiten führen demnach auf unterschiedliche Art und Weise zu einer Destruktion der Zellen, womit ihre Effektivität in der Eliminierung von Zellen aus Geweben potentiell differieren könnte. Wie andere Arbeitsgruppen bereits früher gezeigt haben, muss die Temperatur unter -40 °C fallen, um die Bildung intrazellulärer Eiskristalle sicherzustellen [135]. Dies wurde in der Planung der vorliegenden Arbeit als maßgebend berücksichtigt.

Auch der Einsatz des osmotischen Schocks durch salzhaltige Lösungen ist bereits in einigen früheren Arbeiten genauer analysiert worden, jedoch mit teilweise divergenten Ergebnissen [85, 131-133]. Lösungen, die auf Zuckern als osmotisch wirksame Moleküle basieren, sind bisher nicht ausreichend untersucht worden, auch wenn Glukose als osmotischer Stressor bekannt ist [136]. Hypotone Lösungen führen durch osmotischen Wassereinstrom zum Anschwellen und schlussendlich zur Lyse der Zellen [137]. Um

diesen Effekt noch zu verstärken, ist es üblich, das Gewebe in mehreren Zyklen abwechselnd hyper- und hypotonen Lösungen auszusetzen [56]. Die universelle Zellantwort auf langanhaltenden hyperosmolaren Stress besteht in einer intrazellulären Akkumulation organischer Osmolyte [138]. Auf diese Weise soll eine Normalisierung des Zellvolumens ohne kritische Erhöhung der intrazellulären anorganischen Ionenkonzentrationen ermöglicht werden. Demzufolge könnte die Behandlung des dezellularisierenden Gewebes mit hypertoner Glukoselösung eine Aufsättigung des Intrazellulärtraums mit osmotisch wirksamen Glukosemolekülen bewirken. Die Glukoseaufnahme in glatte Muskelzellen erfolgt vor allem über den ubiquitär vorhandenen und insulinunabhängigen GLUT-1 Glukosetransporter [139]. Dieser Transporter sorgt beispielsweise in β -Zellen des humanen Pankreas dafür, dass die Glukosekonzentration stets proportional zu der des Blutes bleibt und ermöglicht dadurch eine blutzuckerabhängige Insulinsekretion [140]. Über eine erhöhte extrazelluläre Glukosekonzentration könnte also eine erhöhte Glukoseaufnahme in die glatten Muskelzellen der in der vorliegenden Arbeit verwendeten AW erreicht werden, sodass die damit einhergehende Vergrößerung des osmotischen Gradienten zwischen Intra- und Extrazellulärtraum den Effekt des osmotischen Schocks beim darauf folgenden Einsatz von hypotoner Lösung noch verstärken würde.

1.4 Ziel der vorliegenden Arbeit

Die unbefriedigenden klinischen Ergebnisse beim Einsatz dezellularisierter EZM Scaffolds verdeutlichen die Notwendigkeit einer gezielten Analyse und Optimierung der aktuell etablierten DZ Methoden. In diesem Zusammenhang war der Einsatz von Einfrier-Auftau-Zyklen und von osmotisch wirksamen Lösungen bisher weitgehend unbeachtet geblieben.

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit bestand daher in einer systematischen Evaluation der Auswirkungen dieser physikalischen DZ Methoden. Zu diesem Zweck wurden DZ Protokolle mit fünf verschiedenen physikalischen Vorbehandlungen entwickelt und hinsichtlich der Eliminierung zellulärer Bestandteile sowie des Erhalts der EZM Komponenten untersucht. Auf der Basis der Ergebnisse wurde die aussichtsreichste Methode ausgewählt und in ein bestehendes Protokoll integriert, um ihr Potential in der Optimierung zukünftiger DZ Protokolle zu evaluieren. Wichtig für die selektive Beurteilung der jeweiligen Resultate war dabei der stetige Vergleich mit einer

Nativgruppe und einer spezifischen Kontrollgruppe, deren DZ Protokoll bis auf die zu untersuchende physikalische DZ Methode identisch aufgebaut war.

Weil längere DZ Dauern mit größeren EZM Schäden assoziiert sind, ist eine Steigerung der Effektivität bestehender DZ Protokolle besonders im Hinblick auf dickere Geweben von großem Interesse [56]. Deshalb wurden für die vorliegende Arbeit als biologisches Ausgangsmaterial exemplarisch porcine Aorten gewählt, die sich in früheren Studien als besonders schwer dezellularisierbar erwiesen haben [141]. In diesem Gewebe standen folglich für die DZ durch die zu untersuchenden physikalischen Methoden hinreichend viele Zellen zur Verfügung, sodass eine uneingeschränkte Beurteilung der spezifischen Effekte der einzelnen DZ Methoden möglich war.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien

2.1.1 Biologische Materialien

Die Effekte der physikalischen DZ Methoden wurden am Gewebe von porcinen Aorten untersucht. Dafür wurden von einem lokalen Schlachthaus (Schweineschlachtung München GmbH) pro Versuch jeweils 13 Schweinherzen mitsamt anhängender Aorta ascendens und Aortenbogen bezogen. Nach der Schlachtung erfolgte innerhalb von 30 min der in der Regel ungekühlte Transport in das Labor der Herzchirurgischen Klinik und Poliklinik des LMU Klinikums. Dort wurden die Herzen untersucht und diejenigen aussortiert, deren Aortenwände (AW) beschädigt waren oder pathologische Veränderungen aufwiesen (z.B. aneurysmatische Erweiterungen oder sklerotische Verhärtungen). Pro Versuch wurden jeweils zehn unversehrte AW präpariert. Dabei wurden diese mittels anatomischer Skalpelle, Scheren und Pinzetten aus ihren bindegewebigen Verwachsungen mit den Umgebungsstrukturen gelöst und anschließend direkt oberhalb der Aortenklappe und des *bulbus aortae* vom Herzen abgetrennt. Distal wurden die AW einheitlich ca. 0,5 cm hinter dem Abgang der *Arteria subclavia sinistra* abgesetzt. Die zurechtgeschnittenen Aortenröhren wurden in Phosphat gepufferter Saline eingelegt (PBS; PBS Medium 10 x konzentriert 10 L, Apotheke Klinikum Großhadern, München, GER), um das Austrocknen der Proben während der Feinpräparation zu vermeiden. Hierbei konnten die restlichen erkennbaren Fett- und Bindegewebsüberreste benachbarter Strukturen vollständig entfernt werden. Danach wurde am distalen Rand jeder AW ein schmaler Gewebestreifen abgetrennt, aus dem die Nativproben für die DNA-Quantifizierung entnommen wurden.

Um den bakteriellen Befall der Proben zu verhindern, wurden die AW nach Abschluss der Präparation über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank in PBS mit 2 % v/v einer antibiotisch und antimykotisch wirksamen Lösung (Anti-Anti 100x, Gibco® by Life Technologies, GmbH, Darmstadt, GER) zwischengelagert. Am darauffolgenden Tag begann der DZ Vorgang. Insgesamt wurden 80 der 90 präparierten AW gemäß acht verschiedener Protokolle dezellularisiert (jeweils n = 10). Die übrigen zehn AW wurden im Nativzustand belassen, sodass sie ohne Zwischenlagerung weiterverarbeitet werden konnten.

2.1.2 Dezellularisationslösungen

Ergänzend zu den physikalischen Faktoren beinhalteten die verwendeten DZ Protokolle detergenzien- und enzymbasierte Schritte.

Chemische Dezellularisationslösung

Die chemische DZ Lösung enthielt jeweils 0,5 % m/v der ionischen Detergenzien SD (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, GER) und SDS (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, GER). Hierfür wurden mithilfe eines Magnetrührers (RCT Basic, Ika®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, GER) 5 g SD und 5 g SDS Pulver pro Liter PBS gelöst. Anschließend wurde das Gemisch in Kanistern bei Raumtemperatur bis zur Dezellulierung maximal eine Woche lang aufbewahrt.

Enzymatische Dezellularisationslösung

Für die enzymatische Behandlung wurde zunächst aus lyophilisiertem DNase Pulver (Deoxyribonuclease I, Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, New Jersey, USA) eine DNase-Stocklösung mit einem Glycerinanteil von 50 % v/v und Konzentrationen von 20 mM Tris-HCl (Tris Hydrochlorid Pufferan® ≥99 %, p.a., Carl Roth GmbH und Co.KG) und 1 mM MgCl₂ (Magnesium Chlorid ≥98,5 % wasserfrei, Carl Roth GmbH und Co.KG) angefertigt. Dabei wurden zur Aufnahme von 25 mg DNase-Pulver 25 ml Lösung (12,5 ml Glycerin; Carl Roth GmbH und Co.KG + 1,25 ml 400 mM Tris-HCl-Lösung pH = 7,5 + 0,25 ml 100 mM MgCl₂-Lösung + 11 ml aqua destillata (AD)/ Ampuwa, Fresenius Kabi Deutschland GmbH) benötigt. Die fertige Stocklösung wurde in 1 ml Reaktionsgefäßen (Eppendorf Tubes® 3810X, Eppendorf AG, Hamburg, GER) bis zur Verwendung bei -20 °C eingefroren. Da sich die angegebenen Enzymaktivitäten stets auf ca. 3.000 U/mg beliefen und die Endkonzentration in der Gebrauchslösung nur noch ca. 30 U/ml betragen sollte, musste die Stocklösung vor dem Versuch um den Faktor 1:100 verdünnt werden. Dafür wurde jeweils am Versuchstag eine frische Lösung angesetzt, bestehend aus PBS sowie 100 mM MgCl₂- und 100 mM CaCl₂-Lösung (Calcium Chlorid Dihydrat ≥99%, p.a., ACS, Carl Roth GmbH und Co.KG), sodass sich Konzentrationen von ca. 10 mM MgCl₂ und 5 mM CaCl₂ ergaben. Die zweiwertigen Metallionen Magnesium und Calcium dienten dabei der Enzymaktivierung und dem Schutz vor proteolytischem Verdau. Falls die angegebene Enzymaktivität von 3.000 U/mg abwich, musste die Verdünnung der DNase-Stocklösung entsprechend angeglichen werden. Zusätzlich

wurden auch dieser Lösung 2 % v/v Anti-Anti hinzugefügt. Um die Präzipitation der gelösten Salze zu verhindern, wurde das trübe Medium anschließend mit Salzsäure (HCL 1 mol/l, Merck KGaA, Darmstadt, GER) titriert, bis sie vollkommen klar war. Um eine einheitliche Enzymaktivität zu garantieren, wurde dabei mithilfe eines pH-Meters (inoLab pH Level 1, WTW, Weilheim, GER) stets der endgültige pH-Wert überprüft. Alle gemessenen Werte lagen übereinstimmend im Bereich pH = 6,3 – 6,5.

2.2 Versuchsaufbau

Um die Effektivität der detergenzienbasierten DZ zu erhöhen, wurden die AW während dieser Behandlung einem kontinuierlichen Flüssigkeitsstrom ausgesetzt. Zu diesem Zweck wurden die AW in einem Bioreaktor befestigt, der in unserem Labor mittels 3D-Drucker (Ultimaker 3 Extended, Ultimaker, Geldermalsen, NED) aus Polymilchsäure (polylactide = PLA) hergestellt worden war [142]. Die Bioreaktorbox (**s. Abb. 2-1 a Nr. 6**) wurde mit einem passenden Deckel (**s. Abb. 2-1 a Nr. 2**) dicht verschraubt. Eine bodennahe Zufluss (**s. Abb. 2-1 a Nr. 7**) war durch einen Schlauch (Durchmesser 9,5 mm) mit einer Pumpe (Eden 155 Aquarienpumpe, 80 W, Pfg GmbH, Hörstel, GER) verbunden, um eine Flussbewegung zu erzeugen. Diese Pumpe (**s. Abb. 2-1 c und d**) wurde in einem Reservoir platziert, das mit 5 l Wasch- bzw. DZ Lösung gefüllt war. Nach Inbetriebnahme förderte diese Pumpe über den Verbindungsschlauch 16 l/min in den Bioreaktor. Die Lösung verließ diesen dem hydrodynamischen Druck folgend wieder über einen Ausfluss (**s. Abb. 2-1 a Nr. 1**) zentral im Deckel. Dieser Ausfluss war mit einem weiteren Schlauch verbunden, der die Lösung ins Reservoir rückführte. Somit wurden ein geschlossener Kreislauf und ein konstantes Flüssigkeitsniveau gewährleistet (**s. Abb. 2-1 c und d**).

Im Folgenden wird in der vorliegenden Arbeit durchgängig die intraluminale Oberfläche des Aortenpräparats als innere, die extraluminale als äußere Oberfläche bezeichnet. Im Bioreaktor wurde sowohl die innere als auch die äußere Oberfläche aller AW vollständig mit Lösung umspült. Dies konnte mithilfe verschiedener Einbauten in den Bioreaktor erreicht werden: Die AW wurden mit Kabelbindern (Pan-ty cable ties, Panduit Singapore Ptd Ltd, Odeon Towers, SGP) auf einer jeweils eigenen zylinderförmigen und von innen hohlen Halterung (**s. Abb. 2-1 a Nr. 4**) befestigt. Diese Halterungen wurden auf einer Platte (**s. Abb. 2-1 a Nr. 5**) mit fünf dafür vorgesehenen Öffnungen durch Bajonettverschlüsse fixiert. Um diese Öffnungen herum befanden sich jeweils acht

abstandsgleiche, kleinere Öffnungen (**s. Abb. 2-1 b**) mit einem Durchmesser von 3 mm. Zehn kleine Stützen verhinderten, dass sich die Platte beim Einsetzen in den Bioreaktor bis auf dessen Boden absenkte, sie kam vielmehr auf einem Niveau oberhalb der Schlauchmündung zum liegen. Damit entstand unter der Platte ein flüssigkeitsgefüllter Raum, aus dem die Dezellularisationslösung nach oben strömen konnte. Durch die kleinen Öffnungen in der Platte wurden die AW (**s. Abb. 2-1 c, rosa dargestellt**) von außen umspült, durch die hohlen Halterungen von innen. Ein weiterer Inneneinsatz (**s. Abb. 2-1 a Nr. 3**) mit fünf für die AW vorgesehenen, kreisförmigen Öffnungen (Durchmesser: 5 cm), der über die Präparate gestülpt worden war, diente als mechanische Barriere zwischen den einzelnen AW. Das Ziel dabei war die Schaffung von vergleichbaren DZ Bedingungen für alle Aorten. Durch diesen Versuchsaufbau sollte eine hohe intraluminale und gemäßigte extraluminale Flussrate gewährleistet und somit eine Optimierung des DZ Erfolgs im Vergleich zur herkömmlichen Schüttelinkubation erreicht werden [122].

Ein Bioreaktor bot Platz für 5 AW, also nur für die Hälfte der Stichprobengröße $n = 10$. Deshalb wurde jeder Versuch mit zwei Bioreaktoren gleichzeitig durchgeführt, jeweils mit eigener Pumpe und eigenem Reservoir.

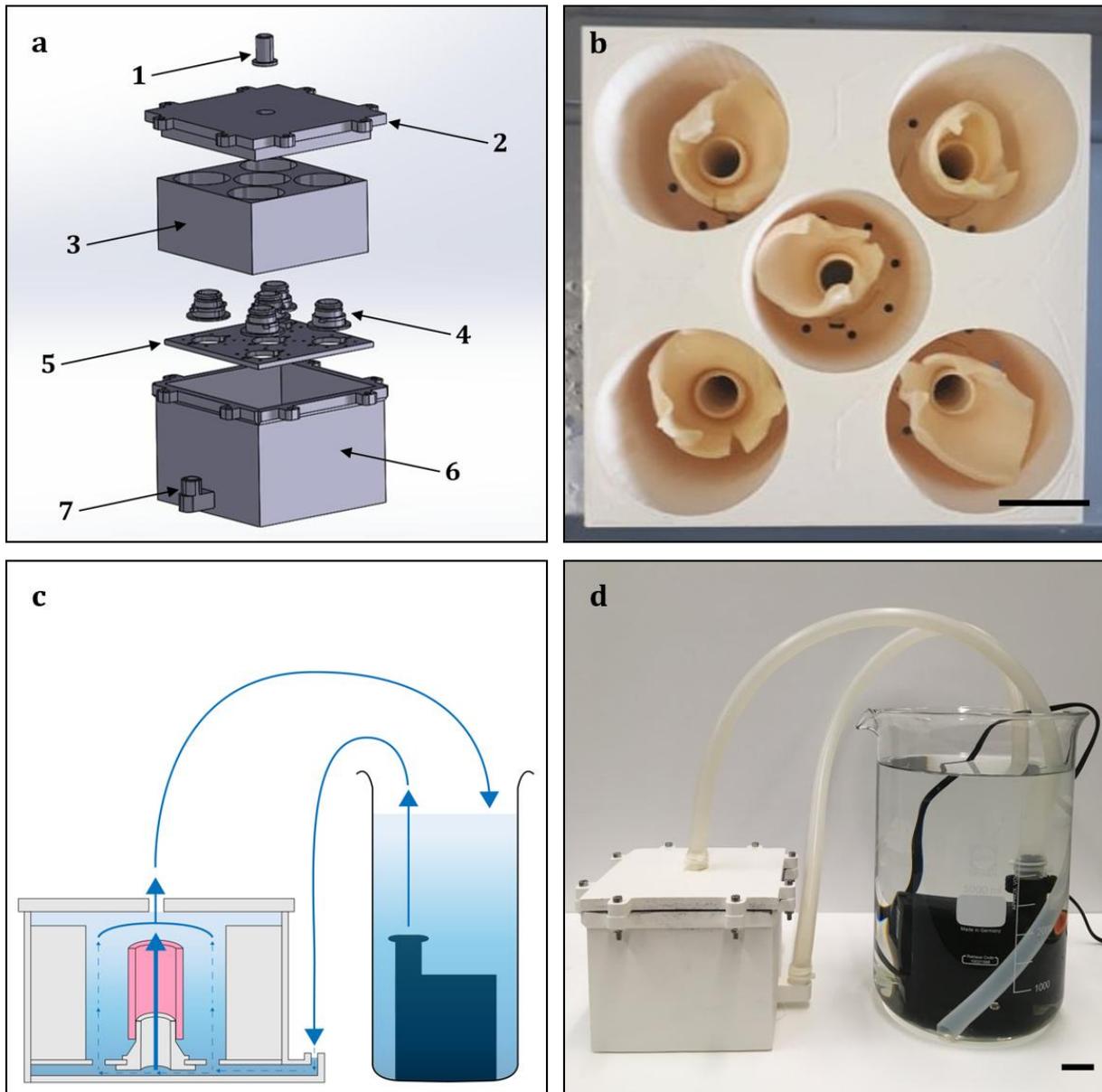


Abbildung 2-1: Design des 3D-gedruckten Bioreaktors und Versuchsaufbau

a. [142] Explosionsdarstellung aller Komponenten des Bioreaktors; 1: Ausfluss; 2: Deckel; 3: Bioreaktoreinsatz; 4: Probenhalterungen (5x); 5: Platte mit Öffnungen; 6: Bioreaktorbox; 7: Zufluss;

b. Ansicht von oben auf Bioreaktoreinsatz und Platte mit fünf auf den Probenhaltern befestigten AW;

c. und d. [142] Schematische Darstellung (c) und praktische Umsetzung (d) des Versuchsaufbaus mit Pumpe, Reservoir und Verbindungsschläuchen. Die im Reservoir befindliche Pumpe (rechts im Bild) beförderte die Lösung über einen mit dem Zufluss verbundenen Schlauch in den Bioreaktor (links im Bild). Dem hydrodynamischen Druck folgend strömte die Lösung sowohl durch die hohlen Probenhalterungen als auch durch die kleineren, diese Halterungen zirkulär umgebenden Öffnungen durch die Platte nach oben. Auf diese Weise wurde sowohl die innere als auch die äußere Oberfläche der AW (c, rosa dargestellt) vollständig mit Lösung umspült. Ein Bioreaktoreinsatz mit fünf kreisförmigen Öffnungen diente dabei als mechanische Barriere zwischen den einzelnen AW. Die Lösung verließ den Bioreaktor über den Ausfluss zentral im Deckel. Dieser Ausfluss war mit einem weiteren Schlauch verbunden, der die Lösung ins Reservoir rückführte. Somit wurden ein geschlossener Kreislauf und ein konstantes Flüssigkeitsniveau gewährleistet; Maßstabsbalken (b und d): 2 cm.

2.3 Physikalische Dezellularisationsmethoden

2.3.1 Schockfrieren bei -196 °C

Den ersten Schritt aller Protokolle bildeten die zu überprüfenden physikalischen DZ Methoden. Hierbei waren die Effekte eines schnellen Einfrierprozesses von Interesse. Hierfür wurden die AW jeweils 20 s lang vollständig in ein Behältnis mit flüssigem Stickstoff getaucht und so bei -196 °C schockgefroren (Gruppe A₁). An diesen Einfrierschritt schloss sich eine 15-minütige Auftauphase in PBS und 2 % v/v Anti-Anti an. Wie bei allen Inkubations- und Waschschrritten außerhalb des Bioreaktors befanden sich die AW dabei in einzelnen 100 ml-Glasfläschchen (Laborgewindeflasche Duran® 100 ml, Schott AG, Mainz, GER), um eine einheitliche Behandlung und vollständige Immersion aller AW zu garantieren. Während des Auftauens wurden die Fläschchen in einem Thermostat-kontrollierten Wasserbad (Julabo SW22, JULABO GmbH, Seelbach, GER) platziert, wodurch eine konstante Temperatur von 37 °C erreicht werden konnte. Die Auswirkungen mehrfachen Schockfrierens wurde anhand einer Gruppe analysiert, die den Einfrier-Auftau-Zyklus bei -196 °C fünf Mal direkt hintereinander durchlief (Gruppe A₂).

2.3.2 Langsames Einfrieren bei -32 °C

Vergleichend zum Schockfrieren wurde eine langsamere Einfriermethode untersucht. Dafür wurden die AW in separaten verschlossenen Plastikbehältnissen über 90 min bei -32 °C im Gefrierschrank deponiert (Gruppe B₁). Wie bei A₁ folgte darauf auch bei diesem Protokoll eine 15-minütige Auftauphase in PBS und 2 % v/v Anti-Anti bei 37 °C im Thermostat-kontrollierten Wasserbad. Außerdem diente, analog zu A₂, eine weitere Gruppe (B₂) der Analyse der Effekte einer Vervielfachung des Einfrierschritts. Auch bei dieser Gruppe wurde der Einfrier-Auftau-Prozess bei -32 °C fünf Mal unmittelbar hintereinander wiederholt.

2.3.3 Osmotischer Schock

Eine weitere physikalische Methode, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde, ist die des osmotischen Schocks. Hierfür wurden die AW zunächst über 2 h einer hyperosmolaren Lösung mit 50 % m/v Glukose (Glukoselösung 50%, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, GER) und 2 % v/v Anti-Anti ausgesetzt (Gruppe C). Bei diesem Schritt waren die Inkubationsgefäße in einem orbitalen Schüttel-Inkubator (Inkubationshaube TH 15, Edmund Bühler GmbH, Bodelshausen, GER) mit

Schüttelfrequenz- und Temperaturregler positioniert. Hier wurden sie durchgehend bei Raumtemperatur (RT) mit einer Frequenz von 90 rpm geschüttelt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit hypotoner Lösung, bestehend aus vollentsalztem (VE) Wasser mit 2 v/v % Anti-Anti, bei 4 °C im Kühlschrank über 24 h.

2.4 Dezellularisationsprotokoll

Die spezifischen Effekte der verschiedenen physikalischen DZ Methoden wurden in den Gruppen A₁, A₂, B₁, B₂ und C mit der zugehörige Kontrollgruppe K₁ untersucht. Deren Protokolle waren bis auf die zu untersuchenden physikalischen Faktoren identisch aufgebaut und erstreckten sich über insgesamt 4 Tage. Nach der Präparation begann am zweiten Tag der eigentliche DZ Vorgang mit der jeweiligen gruppenspezifischen, oben beschriebenen physikalischen DZ Methode. Eine Ausnahme bildete hierbei die Gruppe K₁, die als Kontrollgruppe ohne physikalischen Zwischenschritt diente. Auch bei Gruppe C wurde das Vorgehen leicht modifiziert: Aufgrund der Abhängigkeit der Glukoseaufnahme in die Zellen von einer noch bestehenden Stoffwechselaktivität sollte die Zeitspanne zwischen Schlachtung der Tiere und Beginn der DZ der präparierten Aorten so kurz wie möglich gehalten werden. Deshalb wurden die Schweineherzen bei diesem Versuch eisgekühlt ins Labor transportiert, um jegliche Stoffwechselprozesse drastisch zu verlangsamen. Außerdem wurden nur jeweils fünf AW pro Tag vom Schlachthof geholt und direkt im Anschluss an die Präparation der Glukoselösung zugeführt, anstatt über Nacht in PBS und Anti-Anti zu lagern.

Die nächste Phase bildete die 16-stündige Flussdezellularisation im Bioreaktor mittels chemischer DZ Lösung mit 0,5 % v/v SD-SDS. Dabei erfolgte nach jeweils 4 h ein Lösungswechsel, um die DZ-Effektivität zu steigern, sodass sich diese 16 Stunden aus einem 4 h- und einem 12 h-Intervall zusammensetzten. Um jegliche Residuen der chemischen Detergenzien aus den AW zu entfernen, wurden sie im Anschluss an die Behandlung mit SD-SDS in zehn jeweils 15-minütigen Waschschritten sorgfältig in PBS gespült. Hierfür verblieben sie im Bioreaktor. Am Ende jedes DZ- bzw. Waschschriffs wurden Reservoir, Pumpe, Box und Schlauchsysteme vollständig entleert und anschließend mit frischer Lösung befüllt. Die Erhöhung der Lösungstemperatur durch die Pumpenabwärme wurde stets überprüft. Die Messwerte lagen während der längeren DZ Schritte einheitlich bei ca. 33 °C, während der kürzeren Waschschriffe hingegen nur bei 25 °C.

Den letzten Abschnitt der DZ Protokolle bildete die Inkubation der AW mit enzymatischer DNase-Lösung. Vor dieser Behandlung waren die Inkubationsgefäße mithilfe eines Autoklavs (CertoClav-Hochdrucksterilisator Typ CV-EL, Certoclav Sterilizer GmbH, Leonding, AUT) sterilisiert worden. Sie wurden während dieser Phase im orbitalen Schüttelinkubator positioniert, wo sie 24 h lang bei Raumtemperatur mit einer Frequenz von 90 rpm geschüttelt wurden. Diese Bedingungen galten auch für die zwei weiteren 15-minütigen Waschschrte in PBS, die sich daran anschlossen (**s. Tab. 2-1**).

Tabelle 2-1: Inkubationsprotokolle der Gruppen A₁, A₂, B₁, B₂ und C sowie der zugehörigen Kontrollgruppe K₁

Gruppe	A ₁	A ₂	B ₁	B ₂	C	K ₁
Methode	Einmaliges Schockfrieren	Zyklisches Schockfrieren	Einmaliges langsames Einfrieren	Zyklisches langsames Einfrieren	Osmotischer Schock	Kontrollgruppe
Lagerung	PBS (2 % v/v Anti-Anti) über Nacht bei 4 °C	PBS (2 % v/v Anti-Anti) über Nacht bei 4 °C	PBS (2 % v/v Anti-Anti) über Nacht bei 4 °C	PBS (2 % v/v Anti-Anti) über Nacht bei 4 °C	-	PBS (2 % v/v Anti-Anti) über Nacht bei 4 °C
Physikalische DZ	1x (20 s bei -196 °C / 15 min bei 37 °C)	5x (20 s bei -196 °C / 15 min bei 37 °C)	1x (90 min bei -32 °C / 15 min bei 37 °C)	5x (90 min bei -32 °C / 15 min bei 37 °C)	1x (2 h 50 m/v % Glukose bei RT / 24 h VE Wasser bei -4 °C)	-
Chemische DZ	4 h 0,5 v/v % SD-SDS bei 33 °C					
	12 h 0,5 v/v % SD-SDS bei 33 °C					
Waschen	10x 15 min PBS bei 25 °C					
Enzymatische DZ	24 h 30 U/ml DNase (2 % v/v Anti-Anti) bei RT					
Waschen	2x 15 min PBS bei 25 °C					

2.5 Integration der aussichtsreichsten physikalischen Methode in ein etabliertes Dezellularisationsprotokoll

Basierend auf den Ergebnissen der Gruppen A₁, A₂, B₁, B₂ und C wurde eine weitere Versuchsgruppe D konzipiert. Als Ansatzpunkt diente dabei ein in unserer Arbeitsgruppe etabliertes und ausschließlich detergenzien- und enzymbasiertes DZ Protokoll [142]. Aufgrund sehr langer Inkubationsschritte mit chemischer DZ Lösung resultiert dieses Ausgangsprotokoll in vollständig zellfreien AW. Im Versuchsprotokoll D wurde es allerdings dahingehend modifiziert, dass die Inkubationszeit mit chemischer DZ Lösung um ein Drittel reduziert und stattdessen eine physikalische DZ Methode eingefügt wurde. Auf diese Weise sollte untersucht werden, ob durch die Kombination mit dem physikalischen Verfahren die Verkürzung der Expositionsdauer gegenüber den chemischen Detergenzien möglich ist und dennoch das Ziel vollkommen zellfreier AW erreicht werden kann.

Das Ausgangsprotokoll beinhaltete 48 h Flussdezellularisation in chemischer DZ Lösung mit 0,5 % v/v SD-SDS, unterteilt in zwei Zyklen mit jeweils einem 18-stündigen und zwei 3-stündigen DZ Schritten. Diese wurden durch je 30-minütiges intermittierendes Spülen in PBS ergänzt, um den DZ Erfolg zu optimieren. Nach zwei abschließenden Waschschritten in PBS (30 min) und PBS mit 2 % v/v Anti-Anti (16 h) folgte auch bei diesem Protokoll eine 24-stündige Behandlung mit DNase-Lösung mit 2 % v/v Anti-Anti im Schüttelinkubator und zwei anschließenden 15-minütigen Waschschritten in PBS.

Dieses Protokoll wurde so abgewandelt, dass sich die Inkubationszeit mit chemischer DZ Lösung mit 0,5 % v/v SD-SDS um 33,33 % von insgesamt 48 h auf 32 h verkürzte: Der initiale 18 h-Schritt wurde dabei auf 3 h reduziert, der folgende 18h-Schritt auf 17 h.

Basierend auf den Ergebnissen der vorherigen Gruppen wurde als physikalische Vorbehandlung die der Gruppe A₁ gewählt, sodass die AW nach Präparation und Lagerung in PBS mit 2 % v/v Anti-Anti über Nacht bei -196 °C schockgefroren wurden und dann 15 min lang bei 37 °C auftauen konnten. Daran schlossen sich chemische und enzymatische Behandlung sowie die entsprechenden Waschschriffe an. Auch bei diesem Versuch diente eine spezifische Kontrollgruppe ohne physikalische Vorbehandlung (K₂) der Verifizierung der Ergebnisse (**s. Tab. 2-2**).

Tabelle 2-2: Inkubationsprotokolle des Ausgangsprotokolls, der Versuchsgruppe D und der zugehörigen Kontrollgruppe K₂

Gruppe	Ausgangsprotokoll	D	K₂
Lagerung	-	PBS (2 % v/v Anti-Anti) über Nacht bei 4 °C	PBS (2 % v/v Anti-Anti) über Nacht bei 4 °C
Physikalische DZ	-	20 s bei -196 °C / 15 min bei 37 °C	-
Chemische DZ	18 h 0,5 v/v % SD-SDS	3 h 0,5 v/v % SD-SDS	3 h 0,5 v/v % SD-SDS
Waschen	30 min PBS		
Chemische DZ	3 h 0,5 v/v % SD-SDS		
Waschen	30 min PBS		
Chemische DZ	3 h 0,5 v/v % SD-SDS		
Waschen	30 min PBS		
Chemische DZ	18 h 0,5 v/v % SD-SDS	17 h 0,5 v/v % SD-SDS	17 h 0,5 v/v % SD-SDS
Waschen	30 min PBS		
Chemische DZ	3 h 0,5 v/v % SD-SDS		
Waschen	30 min PBS		
Chemische DZ	3 h 0,5 v/v % SD-SDS		
Waschen	2x 30 min PBS		
	16 h PBS (2 % v/v Anti-Anti)		
Enzymatische DZ	24 h 30 U/ml DNase (2 % v/v Anti-Anti)		
Waschen	2x 15 min PBS		

Tabelle 2-3: Abkürzungsverzeichnis der Versuchsgruppen

Abkürzung	Bedeutung
A ₁	Gruppe A ₁ = 1 x Schockfrieren (-196 °C) + 16 h SD-SDS + 24 h DNase
A ₂	Gruppe A ₂ = 5 x Schockfrieren (-196 °C) + 16 h SD-SDS + 24 h DNase
B ₁	Gruppe B ₁ = 1 x langsames Einfrieren (-32 °C) + 16 h SD-SDS + 24 h DNase
B ₂	Gruppe B ₂ = 5 x langsames Einfrieren (-32 °C) + 16 h SD-SDS + 24 h DNase
C	Gruppe C = Osmotischer Schock + 16 h SD-SDS + 24 h DNase
D	Gruppe D = 1 x Schockfrieren (-196 °C) + 32 h SD-SDS + 24 h DNase
K ₁	Kontrollgruppe 1 = 16 h SD-SDS + 24 h DNase
K ₂	Kontrollgruppe 2 = 32 h SD-SDS + 24 h DNase

3 Auswertung

3.1 Probenentnahme und Weiterverarbeitung

Nach Beendigung des DZ Vorgangs wurden die AW der Länge nach aufgeschnitten, um Gewebeproben für die verschiedenen Analyseverfahren zu gewinnen. Dies erfolgte bei allen AW auf die gleiche Weise, um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten (**s. Abb 3-1**).

Am weitesten distal, also herzfjern, mit einem Abstand von etwa 3 mm zum Rand des Aortenstumpfes, wurden die Proben für die DNA-Quantifizierung entnommen, denn diese sollten einer den Nativproben möglichst unmittelbar benachbarten Stelle entstammen. Native und dezellularisierte Proben wurden in Kryoröhrchen (CryoPure Gefäße 1,8 ml, Sarstedt AG&Co. KG, Nümbrecht, GER) zuerst in flüssigem Stickstoff bei -196 °C schockgefroren und dann bis zur weiteren Auswertung im Gefrierschrank bei -80 °C gelagert.

Proximal der DNA-Quantifizierungsproben wurden die Proben für die Histologie und die REM ausgeschnitten. Die Aortenstücke, aus denen histologische Gewebeschnitte angefertigt werden sollten, wurden bei Raumtemperatur für mindestens 48 h in Formalinlösung 4,5 % (Roti®-Histofix 4,5%, Carl Roth GmbH + Co.KG) fixiert, um eine postmortale enzymatische Autolyse zu verhindern. Für die REM war es erforderlich, die jeweiligen Gewebeproben mindestens 48 h lang bei 4 °C mit Fix-II-Lösung (912 ml Ampuwa + 86,5 ml Glutaraldehydlösung 25 % m/m; Sigma-Aldrich Chemie GmbH + 1,5 ml HCL; Merck KGaA + 11,3 g Na-CaCo; Sigma-Aldrich Chemie GmbH) zu inkubieren. Im Anschluss konnten die Aortenstücke weiterverarbeitet werden.

Am nächsten zum Herzen, proximal des Abgangs des *Truncus brachiocephalicus*, wurden die Zugversuchsproben gewonnen. Dabei wurde mit einer Stanze (ZCP020, ZwickRoell GmbH & Co.KG, Ulm, GER) aus jeder AW eine zirkuläre, 5 cm lange Gewebeprobe nach dem Modell des Schulterstabes S3A der Norm DIN 53504 herausgestanzt. Diese Proben wurden dann in 15 ml Röhrchen (Sarstedt Reagenz- und Zentrifugen Röhre 15 ml, Sarstedt AG & Co. KG) in PBS mit 2 % v/v Anti-Anti zwischengelagert und noch am Tag der Entnahme in der Zugprüfmaschine getestet.

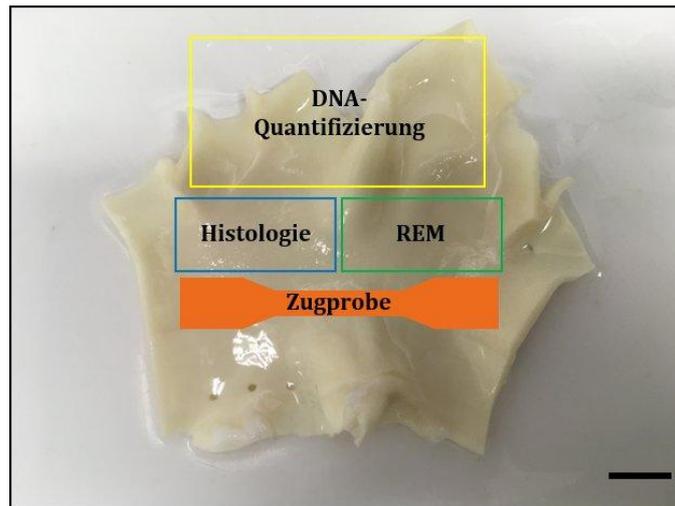


Abbildung 3-1: Exemplarische Darstellung der Entnahme von Gewebeproben aus einer dezellularisierten AW

Exemplarisch ist eine der Länge nach eröffnete AW dargestellt. Am weitesten distal, also herzfjern, wurden die Proben für die DNA-Quantifizierung ausgeschnitten. Proximal davon erfolgte die Probenentnahme für Histologie und REM. Am nächsten zum Herzen wurden die zirkulären Zugversuchsproben ausgestanzt. Maßstabsbalken: 1 cm.

3.2 DNA-Quantifizierung

3.2.1 DNA-Extraktion

Zunächst wurden die bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefrorenen Proben über mindestens 15 min bei Raumtemperatur aufgetaut und dann mit einer Feinwaage (Kern 770-13, Kern & Sohn GmbH, Balingen, GER) in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß auf 25 mg abgewogen. Dabei war essenziell, dass die Gewebstücke immer einen genauen Querschnitt durch die gesamte AW darstellten. Außerdem wurden die Proben zur Oberflächenvergrößerung und somit Beschleunigung der Zellyse mithilfe eines Skalpell in kleine Einzelstücke zerteilt und das genaue Probengewicht notiert, um im Falle von geringen Abweichungen von den angestrebten 25 mg die Ergebnisse später auf ein einheitliches Gewicht umrechnen zu können.

Für die Extraktion der DNA aus den Gewebeproben wurden das Protokoll und die Reagenzien eines Kits (Isolate II Genomic DNA Kit, Bioline Meridian Bioscience, Cincinnati, Ohio, USA) genutzt. Um zunächst alle Zellstrukturen zu lysieren, wurden in jedes Probengefäß 180 μl GL-Lysepuffer und 25 μl Proteinase K Lösung pipettiert (Eppendorf Research Pipette, Eppendorf AG). Die lyophilisierte Proteinase K war zuvor einem dafür vorgesehenen Puffer des Kits gelöst und für höchstens 6 Monate bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert worden. Nach kurzem Schütteln der Proben (Reax Top, Heidolph Instruments

GmbH & Co.KG, Schwabach, GER) erfolgte eine 15-stündige Inkubation über Nacht in einem Thermoschüttler (Thermomixer™ C, Eppendorf AG) bei 56 °C und 600 rpm. Danach wurde den Gefäßen jeweils 200 µl G3-Lysepuffer hinzugefügt, wobei sie vor und nach der Zugabe abermals kurz geschüttelt wurden. Es folgte eine 10-minütige Inkubation im Thermoschüttler bei 70 °C, bis sich das Gewebe schließlich komplett gelöst hatte. Zur Optimierung der Bedingungen der späteren DNA-Bindung an eine Spin Filter-Membran wurden dann jeweils 210 µl Ethanol 100 % v/v. ergänzt, ebenfalls mit einem Vortexschritt davor und danach. Daraufhin wurden die Probenmischungen mittels Pipette vollständig in „DNA Spin Columns“ geladen, die in 2 ml-Auffanggefäßen platziert worden waren. Den Säulenboden der „DNA Spin Columns“ bildete dabei jeweils eine Spin Filter-Membran. Um die Bindung der DNA an diese Silikamembranen zu ermöglichen, schloss sich die Zentrifugation der Spin Columns an (Rotina 46 R Zentrifuge, A. Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, GER). Dieser Schritt fand – wie auch alle darauffolgenden, in diesem Protokoll enthaltenen Zentrifugationen – für eine Minute bei 11.000 x *g* statt. Der Durchfluss im Auffanggefäß wurde danach – wie auch bei allen folgenden Zentrifugationen – verworfen und das Auffanggefäß wiederverwendet. Zur Reinigung der Silikamembran mit der nun daran gebundenen DNA schlossen sich zwei weitere Zentrifugationsschritte an, der erste mit 500 µl GW1-Waschpuffer, der zweite mit 600 µl GW2-Waschpuffer. Eine darauffolgende Zentrifugation ohne zusätzliches Reagenz diente der Trocknung der Silikamembran und dem Entfernen von Ethanolresten. Abschließend wurden die Spin Columns zur Eluierung der DNA in frische 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und jeweils 60 µl des auf 70 °C vorgeheizten Elutionspuffers G auf die Membranen pipettiert. Nach einminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Gefäße dann ein letztes Mal zentrifugiert. In den Reaktionsgefäßen befanden sich nun die jeweiligen DNA-Eluate.

3.2.2 DNA-Messung

Direkt im Anschluss an die Isolierung der DNA konnte ihre Konzentration in den Eluaten anhand eines Photometers (BioPhotometer, Eppendorf AG) mit einem werkseitig voreingestellten Programm für dsDNA ermittelt werden. Das Funktionsprinzip basiert dabei auf dem Lambert-Beer'schen Gesetz. Dieses beschreibt die Abnahme der Intensität einer Strahlung nach Durchquerung einer Lösung mit einer darin enthaltenen absorbierenden Substanz [89]. Diese Abnahme ist proportional zu der Substanzkonzentration, der Länge des Lichtwegs und dem substanzspezifischen

Extinktionskoeffizienten. Nukleinsäuren weisen die größte Lichtabsorption bei einer Wellenlänge von 260 nm auf [143]. Bei dieser Wellenlänge wurde die Lichttransmission einer Plastikkuvette (UVette® 220 nm-1.600 nm, Eppendorf AG) mit jeweils 100 µl Messlösung mittels Silizium-Photodiode detektiert und anschließend in die jeweilige DNA-Konzentration in der Einheit µg/ml umgerechnet. Zur Verdünnung der Eluate wurde 10 mM Tris-HCL Puffer mit pH = 8,0 verwendet.

Da auch Lösungsmittel und Kuvette Licht absorbieren und reflektieren können, wurde zuerst eine Referenzmessung durchgeführt, bei der sich ausschließlich 100 µl Tris-Puffer in der Kuvette befanden. Auf diese Weise konnten die Effekte des Puffers und der Kuvette in den folgenden Messungen herausgerechnet werden, um die spezifische Absorption der Probesubstanz festzustellen. Die selbe Kuvette wurde nach vollständigem Herauspipettieren der Lösung für alle darauffolgenden Messungen wiederverwendet.

Zum Ausschluss der Verunreinigung der DNA durch andere Makromoleküle wie Proteine oder RNA, die ebenfalls bei 260 nm absorbieren, wurde die Absorption der Probe zusätzlich bei anderen Wellenlängen gemessen. So ist eine hohe Absorption bei 320 nm ein Hinweis auf eine Probenkontamination. Der A320-Wert sollte demnach stets nahe 0 liegen, das A260/280-Verhältnis der Probe hingegen zwischen 1,7 und 2,0. Außerdem darf der A260-Wert nicht kleiner als 0,025 sein, da bei einer so geringen Absorption der Einfluss von Störfaktoren unverhältnismäßig groß wird. Die jeweilige Verdünnung der DNA-Eluate richtete sich also nach dem A260-, A320- und dem A260/280-Wert. Erst wenn diese allesamt im Normbereich lagen, konnte die Verdünnung verwendet werden. Für die nativen Proben betrug diese meist 1:20, für die dezellularisierten meist 1:10. Zur anschaulicheren Darstellung und zum Vergleich mit Literaturwerten wurden die Ergebnisse abschließen in die Einheit ng pro mg Gewebe (per wet tissue weight) umgerechnet.

3.3 Histologie

3.3.1 Probenvorbereitung

Die in Formalinlösung fixierten Aortenstücke wurden in etwa 10 mm lange und 4 mm breite Rechtecke zurechtgeschnitten, die einen kompletten Querschnitt durch die AW bildeten. Anschließend wurden sie in Einbettkassetten (Lab Logistics Group GmbH, Meckenhelm, GER) platziert. Um die Gewebeproben später in den Paraffinblöcken besser sichtbar zu machen, erfolgte danach eine 2 min lange Färbung mit Hämalaun (Mayer's

Hämalaunlösung 1:3 mit PBS verdünnt, Merck KGaA). Daraufhin wurden sie für 3 min in Leitungswasser gespült und abermals für 5 min in Formalin 4,5 % überführt. Daran schloss sich zur Entwässerung der Proben eine in der Konzentration aufsteigende Alkoholreihe an. Damit sollte das spätere Eindringen des Einbettmittels Paraffin, welches selbst nicht wasserlöslich ist, in die Proben erleichtert werden. Diese Alkoholreihe bestand aus jeweils 10-minütigen Inkubationsschritten: Drei mit Ethanol 70 % v/v, drei mit Ethanol 96 % v/v (Ethanol 70/96 % v/v vergällt, Apotheke Klinikum Großhadern) und drei mit Isopropanol (Carl Roth GmbH + Co.KG). Dann erfolgten zwei ebenfalls 10-minütige Inkubationen mit Roti-Histol (Roti®-Histol, Carl Roth GmbH + Co.KG), um den Alkohol wieder aus dem Gewebe zu verdrängen. Schließlich wurden die Kassetten in einem Glasbehältnis mit vorgewärmten und vollständig aufgelöstem Paraffin (Histosec® Pastillen ohne DMSO, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) über mindestens 12 h in einem Wasserbad (W22-2, Rheotest Medingen GmbH, Ottendorf-Okrilla, GER) bei 63 °C belassen. Nach Ablauf dieser Zeit konnten sie in das Paraffinbad einer Einbettstation (HistoCore Arcadia H, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, GER) überführt werden. Hier wurden die Proben aus ihren Kassetten entnommen und aufrecht mit der zu schneidenden Seite nach unten in Einbettformen (Parafree Metall Ausgießform, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH) platziert. Anschließend wurden die Fomen mit Paraffin befüllt und die beschriftete Einbettkassette daraufgesetzt, sodass diese später die Unterlage des Paraffinblockes bilden würde. Jeder so erstellte Block wurde zum Erkalten und Erhärten auf eine Eisplatte gestellt und konnte danach aus seiner Form gebrochen werden.

3.3.2 Paraffinschnitte und Entparaffinierung

Aus den Paraffinblöcken wurden mit einem Schlittenmikrotom (Schlittenmikrotom HM 400 R, Microm International GmbH, Walldorf, GER) 5 µm dicke Paraffinschnitte angefertigt. Davor waren die Blöcke zunächst soweit angeschnitten worden, dass sich ein vollständiger Querschnitt durch die AW in der Schneideebene befand. Die Schnitte wurden unverzüglich in ein auf 48 °C eingestelltes Streckbad (Paraffinstreckbad Typ 25900, MEDAX GmbH & Co.KG, Neumünster, GER) überführt. Nachdem sie sich dort vollständig geglättet hatten, konnten sie auf einem Objektträger (Thermo SCIENTIFIC Superfrost Ultra Plus®, Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, GER) aufgefangen werden. Nach der Trocknung über Nacht bei 40 °C in einem Wärmeschrank (Wärmeschrank WTC,

Binder GmbH, Tuttlingen, GER) erfolgte die Lagerung der Schnitte bis zur Färbung vor Licht geschützt und bei Raumtemperatur in Objektträgerbehältern.

Am Tag der Färbung wurden die Schnitte zunächst für 30 min bei 50 °C im Wärmeschrank erhitzt. Daraufhin erfolgte die Entparaffinierung in Roti-Histol, gefolgt von einer absteigenden Alkoholreihe zur Rehydrierung und anschließenden Spülschritten. Die für die DAPI und H&E Färbung genutzten Entparaffinierungsprotokolle waren bis auf die Spülschritte identisch aufgebaut. An ihrem Anfang standen 2 x 15 min Inkubationen mit Roti-Histol und danach je 2 x 5 min Schritte in Ethanol 100 (Ethanol 100 % v/v vergällt, Apotheke Klinikum Großhadern), 96 und 70 % v/v. Bei der H&E Färbung schloss sich direkt daran die eigentliche Färbung an, bei der DAPI Färbung wurden die Schnitte noch für jeweils 2 x 3 min in Ampuwa und PBS gespült. Für die PSR und MPC Färbungen hingegen waren vom Hersteller (MORPHISTO® Evolutionsforschung und Anwendung GmbH, Frankfurt am Main, GER) jeweils spezifisch modifizierte Vorgehensweisen empfohlen. Auch hier begannen die Protokolle mit zwei Inkubationen mit Roti-Histol, allerdings für eine Dauer von je 10 min bei PSR und je 5 min bei MPC. Die absteigende Alkoholreihe bestand bei PSR aus je zweiminütigen und bei MPC aus je vierminütigen Inkubationen mit vergälltem Ethanol 96, 80, 70 und 60 % v/v (Ethanol 60 % v/v vergällt, Apotheke Klinikum Großhadern). Zuletzt wurden die Schnitte bei PSR für 4 min in Leitungswasser und bei MPC für 2 min in AD gewaschen. Im Anschluss an die Entparaffinierungsprotokolle erfolgte direkt die jeweiligen Färbung.

3.3.3 DAPI Fluoreszenz

Zur Zellfixierung und -permeabilisierung schloss sich an die Entparaffinierung zunächst eine zweiminütige Inkubation mit einem 1:1 Gemisch aus Methanol (Methanol for analysis, Merck KGaA) und Aceton (Acetone for analysis, Merck KGaA) an. Nachdem die Objektträger 2 x 3 min in PBS gespült worden waren, folgte daraufhin eine fünfminütige Inkubation mit DAPI Arbeitslösung (Sigma Aldrich Chemie GmbH, c = 0,1 µg/ml in PBS). Beginnend mit diesem Schritt wurde die Färbung in einer Styroporbox fortgesetzt, um das DAPI vor Lichteinstrahlung zu schützen und damit ein Ausbleichen zu verhindern. Es erfolgten zwei weitere dreiminütige Waschschrte in PBS und zur Reduktion der Hintergrundfluoreszenz eine zweiminütige Behandlung mit Sudanschwarz 0,3 % v/v in Ethanol 70 % v/v (Sudanschwarz B für die Mikroskopie, Carl Roth GmbH + Co.KG). Schließlich wurden die Schnitte noch 2 x 3 min in AD gespült. Nach Abschluss der Färbung wurden sie mit einem speziell für Fluoreszenzfärbungen entwickelten Eindeckmedium

(Mounting Medium, ibidi GmbH, Gräfelfing, GER) sowie Eindeckgläsern (Gerhard Menzel GmbH) bedeckt und aufgrund der Lichtempfindlichkeit des Farbstoffes noch am selben Tag mikroskopiert.

Die Beurteilung des Resultats der DAPI Färbung erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskop (AxioObserver, Carl Zeiss AG, Oberkochen, GER). Hiermit wurden mit einer Anregungswellenlänge von 340 nm und einer Emissionswellenlänge von 461 nm Mosaikbilder erstellt, bestehend aus jeweils neun Einzelaufnahmen. Dafür wurde einheitlich eine 10-fache Vergrößerung und eine Belichtungszeit von 200 ms gewählt. Anhand einer Analysesoftware (AxioVision Rel. 4.8, Carl Zeiss AG) konnte dann die Effektivität des DZ Vorgangs bestimmt werden, die mit der Dicke der nichtfluorezierenden und damit kernfreien Schichten der AW korrelierte. Sowohl von der inneren als auch von der äußeren Oberfläche senkrecht ausgehend erfolgte für jede Gewebeprobe die Messung der Ausmaße dieser Schichten, was gleichermaßen der Eindringtiefe (EDT) der DZ entsprach (**s. Abb. 3-2**). Für jedes Präparat wurden innen und außen jeweils 3 repräsentative EDT bestimmt, aus denen ein Mittelwert für die innere (EDT_i) und äußere (EDT_a) Seite errechnet wurde. Anhand dieser konnte also die DZ Effektivität der verschiedenen physikalischen DZ Methoden ermittelt werden.

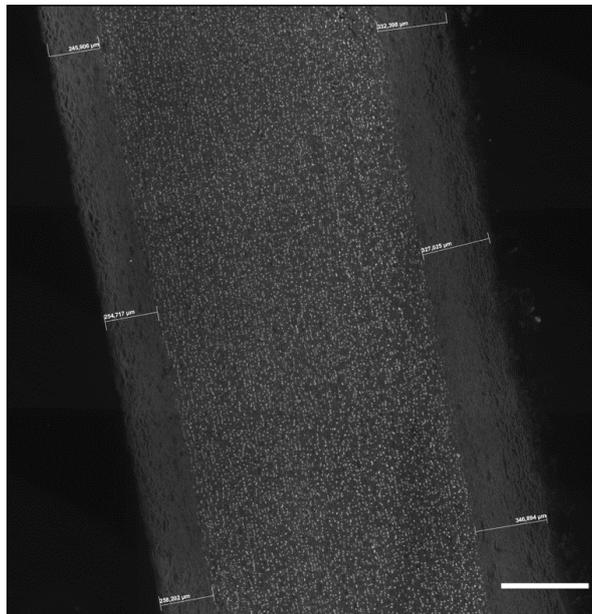


Abbildung 3-2: Repräsentative Darstellung der EDT Messungen in den DAPI Fluoreszenzaufnahmen
Für jede AW wurden innen und außen jeweils drei repräsentative EDT bestimmt, aus denen der Mittelwert für die innere (EDT_i) und äußere (EDT_a) Oberfläche ermittelt wurde. Die hier gezeigte Abbildung stellt die Vermessung der AW Nr. 7 aus Gruppe K_1 dar. Maßstabsbalken: 400 µm.

3.3.4 Hämatoxylin-Eosin Färbung

Nach der Entparaffinierung wurden die Schnitte kurz mit VE Wasser gespült, woran sich eine fünfminütige Inkubation mit Hämalaun anschloss. Daraufhin wurden die Präparate unter fließendem Leitungswasser abgewaschen und dann zum Bläuen für 5-10 min darin stehen gelassen. Hierbei schlug die Farbe durch Erhöhung des pH Wertes von Rotbraun ins typische Blauviolett um. Im Anschluss daran wurden die Objektträger 3 x kurz in Ethanol 70 % v/v getaucht, bevor die zweiminütige Gegenfärbung mit Eosin (Eosin Y solution, alcoholic, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) erfolgte. Danach wurden die Präparate 2 x kurz in Wasser gespült. Zur Entwässerung wurden sie dann 4 x in Ethanol 70 % v/v und 10 x in Ethanol 96 % v/v eingetaucht und 2 x 5 min mit Ethanol 100 % v/v inkubiert. Abschließend erfolgte eine dreimalige Klärung der Schnitte in Roti-Histol. Für die langfristige Konservierung wurden die Objektträger mit Eindeckmedium (Leica CV MOUNT, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH) und Eindeckgläsern bedeckt, sodass sie so bei Raumtemperatur dauerhaft gelagert werden konnten.

Die Aufnahmen der H&E-gefärbten Präparate erfolgten mithilfe eines Lichtmikroskops (Leica DMR, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH) und einer Bildersoftware (Ascent software version 3.4.0, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH) in 10-facher Vergrößerung, wobei von jedem Präparat jeweils drei Einzelbilder von innerer, mittlerer und äußerer Schicht der AW erstellt wurden. Daran schloss sich die Zusammenfügung der Einzelbilder zu einer Gesamtabbildung des AW Querschnitts mit dem Programm Adobe Photoshop (Adobe Inc., San José, Kalifornien, USA) an.

3.3.5 Movat Pentachrom Färbung

Für die MPC Färbung wurde ein kommerzielles Kit mit zugehörigen Farblösungen und Protokoll (Movat Pentachrom (Original), MORPHISTO® Evolutionsforschung und Anwendung GmbH) verwendet. Nach der Entparaffinierung wurden die Schnitte zunächst für 12 min mit Alcianblau 1 % v/v gefärbt und dann für 5 min unter fließendem Leitungswasser gespült. Daran schloss sich eine 60-minütige Differenzierung in alkalischem Alkohol an, gefolgt von weiteren 10 min unter fließendem Leitungswasser. Danach erfolgte die ebenfalls zehnminütige Kernfärbung mit Weigert's Eisenhämatoxylin. Vor der Fortsetzung der Färbung wurden einige zusätzliche, für Schnittdicken über 4 µm empfohlene Schritte eingefügt: Eine dreiminütige Inkubation mit Eisen(III)-Chlorid-Lösung sowie eine einminütige Inkubation mit Natriumthiosulfat, mit einem jeweils vorangehenden und auch mit einem abschließenden einminütigen Spülschritt in AD.

Daraufhin konnte mit der eigentlichen Färbung fortgefahren werden: Nach 15 min unter fließendem Leitungswasser erfolgten die Färbung des Zellplasmas in Brilliant-Crocein-Säurefuchsin (10 min), die Differenzierung in Essigsäure 1 % v/v (30 s), das Beizen in Phosphorwolframsäure 5 % v/v (20 min), eine weitere Differenzierung in Essigsäure 1 % v/v (2 min), die Entwässerung in vergälltem Ethanol 99 % v/v (1 + 6 min) und die Färbung in Safron du Gateis (6 min). Abschließend durchliefen die Schnitte eine Alkoholreihe zur Entwässerung, bestehend aus jeweils zweiminütigen Inkubationen mit vergälltem Ethanol 99 % v/v (2 x) und mit Isopropanol, gefolgt von zweimaliger Behandlung über jeweils 5 min mit Xylol.

Eindecken und Mikroskopie erfolgten analog zur H&E Färbung.

3.3.6 Pikro-Siriusrot Färbung

Auch für die PSR Färbung wurden das Protokoll und die Lösungen eines Färbekits (Pikro-Siriusrot Färbung für Kollagen I & III, MORPHISTO® Evolutionsforschung und Anwendung GmbH) genutzt. Auf die Entparaffinierung folgte zunächst die achtminütige Zellkernfärbung mit Weigert's Eisenhämatoxylin. Dann fand nach kurzem Waschen der Schnitte in AD (5 s) das Bläuen unter fließendem Leitungswasser (10 min) und ein weiterer Waschschrift in AD (1 min) statt. Daran schlossen sich die 60-minütige Färbung mit Pikro-Siriusrot und zwei Spüschritte in Essigsäure 30 % v/v für jeweils 1 min an. Daraufhin wurden die Präparate zur Entwässerung zweimal mit vergälltem Ethanol 96 % v/v und einmal mit Isopropanol inkubiert, jeweils für 4 min. Den Abschluss bildeten zwei zehnminütige Behandlungen mit Roti-Histol.

Das Eindecken und die Mikroskopie erfolgten analog zur H&E und MPC Färbung. Allerdings wurden für das Lichtmikroskop diesmal zwei zusätzliche Polarisationsfilter verwendet, denn Kollagenfasern zeigen bei der Polarisationsmikroskopie doppelbrechende Eigenschaften [93]. Sie sind also in der Lage, Lichtbündel in zwei Teilbündel aufzuspalten. Siriusrot lagert sich an Kollagen an und verstärkt dadurch dessen doppelbrechende Eigenschaften. Die Polarisationsfilter befanden sich unterhalb (Polarisator) und oberhalb (Analysator) des Objektträgers [144]. Der Polarisator war dabei genau im 90°-Winkel zum Analysator ausgerichtet, um den Lichtdurchlass zu minimieren. In dieser Position erreichte nur *das* Licht das Objektiv, dessen Schwingungsebene vorher infolge der Doppelbrechung durch die Kollagenfasern des Präparats gedreht und deshalb nicht vom Analysator ausgelöscht worden war.

3.4 Rasterelektronenmikroskopie

Bevor die Proben mit der REM untersucht werden konnten, mussten sie zunächst fixiert, entwässert, getrocknet und mit einem leitenden Material beschichtet werden. Nach der mindestens 48-stündigen Inkubation mit Fix-II-Lösung zur Haltbarmachung der Proben wurden diese mithilfe einer Alkoholreihe entwässert und anschließend Kritisch-Punkt-getrocknet. Dies war erforderlich, um die spätere Verdampfung der Gewebeflüssigkeit im Hochvakuum des REM und eine dadurch bedingte Beschädigung der Proben zu verhindern. Im Anschluss an die Trocknung wurden die Proben mit einer dünnen Goldschicht bedeckt, um sie für die REM-Abtastung durch einen Elektronenstrahl leitfähig zu machen. Dieser Prozess wird als „Sputtern“ bezeichnet.

3.4.1 Entwässerung

Nach der Inkubation mit Fix-II-Lösung wurden die Aortenstücke in einem gefensterten Metallzylinder platziert, der in neun nummerierte Kammern unterteilt war. So konnte die genaue Zuordnung der Proben zu den zugehörigen AW sichergestellt werden. In diesem Zylinder durchliefen die Proben sowohl die Alkoholreihe als auch die Kritisch-Punkt-Trocknung. Die aufsteigende Alkoholreihe diente der Entwässerung der Proben und dem Ausspülen der Überreste der Fix-II-Lösung. Sie setzte sich aus jeweils zehnminütigen Inkubationen mit Ethanol 30, 50, 70 und 2 x 96 % v/v zusammen. Der Probenbehälter befand sich währenddessen in einem Gefäß mit Auslassventil. Dieses ermöglichte ein kontrolliertes, unvollständiges Ablassen des Ethanols und gewährleistete dadurch eine permanente Bedeckung der Gewebestücke mit Lösung. Dadurch wurde eine Austrocknung der Proben durch verdunstenden Alkohol verhindert. Abschließend wurden die Proben in auf - 20 °C vorgekühltes, unvergälltes Ethanol 100 % v/v (Ethanol absolute for analysis, Merck KGaA) überführt.

3.4.2 Kritisch-Punkt-Trocknen

Zunächst wurde die Druckkammer des Kritisch-Punkt-Trockners (Critical Point Dryer CPD30, BalTec AG, Schalksmühle, GER) mit unvergälltem Ethanol 100 % v/v befüllt und der Metallprobenbehälter rasch darin herabgelassen. Daraufhin wurde die Kammer verschlossen und die Temperatur auf 8 °C gesenkt. Sobald dieser Wert erreicht war, konnte das gesamte Ethanol schrittweise gegen flüssiges CO₂ als Lösungsmedium für die Kritisch-Punkt-Trocknung ausgetauscht werden. Der kritische Punkt von CO₂ liegt bei etwa 31 °C und 74 bar [145]. Durch eine anschließende Erhöhung der Temperatur auf

42 °C und des Druckes auf ca. 80 bar wurde dieser kritische Punkt überschritten und das CO₂ in einen überkritischen Zustand versetzt. In diesem ist eine Unterscheidung zwischen den beiden Aggregatzustände fest und flüssig nicht mehr möglich [94]. Durch langsames Ablassen des CO₂ über einen Zeitraum von mindestens 30 min wurde dann bei konstanter Temperatur der Druck wieder auf den Umgebungsdruck gesenkt. So konnte die Überschreitung der Phasengrenze zwischen festem und flüssigen Aggregatzustand und eine damit einhergehende Beschädigung der Gewebestücke vermieden werden [94]. Nach abgeschlossener Trocknung wurden die Proben aus dem Kritisch-Punkt-Trockner entnommen und mittels Skalpell in jeweils zwei Hälften geteilt. Von jeder AW wurde dann je eine Hälfte mit der inneren und eine mit der äußeren Oberfläche nach oben auf einen Probenhalter geklebt, sodass von jeder Seite eine rasterelektronenmikroskopische Bilddokumentation erstellt werden konnte.

3.4.3 Sputtern

Beim Sputtern werden unter Hochspannung in einem Vakuum Edelgasatome ionisiert und beschleunigt. Mithilfe ihrer kinetischen Energie können aus einer Goldkathode einzelne Atome herausgelöst und verdampft werden. Diese schlagen sich anschließend als Goldnebel auf den Proben nieder. [146]

Die Probenhalter wurden also zur Goldbeschichtung in einem Sputter (Sputter Coater SCD 50, BalTec AG) platziert und die Probenkammer luftdicht verschlossen, sodass sich darin ein Vakuum von mind. 5×10^{-2} mbar aufbauen konnte. Währenddessen wurde außerdem ein geringes Volumen Argongas darin eingelassen. Durch das Anlegen einer Spannung von 570 V (28 mA) startete der Sputterprozess, wobei mithilfe der beschleunigten Argonionen Goldatome aus der Kathode herausgetrennt wurden. Nach 180 s waren die Proben vollständig von einer Goldschicht bedeckt und der Vorgang damit abgeschlossen. Das Gerät konnte belüftet und die mikroskopierfertigen Proben daraus entnommen werden.

3.4.4 Mikroskopie

Nach abgeschlossener Vorbereitung der Proben konnten mittels REM hochauflösende Aufnahmen der AW Oberflächen angefertigt werden. Im REM werden von einer Glühkathode emittierte Elektronen durch hintereinandergeschaltete elektromagnetische Linsen im Hochvakuum zu einem einzigen primären Strahl gebündelt. Dieser ist auf die Probe gerichtet und fährt sie systematisch ab. Wenn der Primärstrahl auf die

Probenoberfläche trifft, werden sogenannte Sekundärelektronen aus dieser herausgelöst. Abgelenkte Primär- und emittierte Sekundärelektronen können mithilfe von diversen Detektoren registriert werden. Durch Umrechnung in verschiedene Graustufen wird so eine bildliche Darstellung der Oberflächentopographie ermöglicht. [94]

Für die Aufnahmen wurden die Probenhalter also ins Mikroskop (Zeiss EVO LS10, Carl Zeiss AG) eingesetzt, gefolgt von der Erzeugung eines Hochvakuums in der luftdicht verschlossenen Probenkammer. Hierdurch konnten beide Oberflächen der AW genau untersucht und repräsentative Bereiche ermittelt werden. Von diesen wurden Bilder in je 100-, 500-, 1000-, 2000- und 5000-facher Vergrößerung angefertigt. Vor allem die Aufnahmen der inneren Oberflächen gaben dabei Aufschluss über die Auswirkungen der jeweiligen DZ Methoden auf die Oberflächentopographie, da diese Seiten nicht durch die anfängliche Präparation alteriert worden sein konnten.

3.5 Uniaxiale Zugversuche

Um eine Probendegeneration zu vermeiden, wurden die uniaxialen Zugversuche noch am Tag der Probenentnahme mit einer Zugprüfmaschine (Z2.5TN, ZwickRoell GmbH & Co. KG), einer Kraftmessdose von 200 N (KAF-TC, Angewandte System Technik GmbH, Dresden, GER) sowie einer Prüfsoftware (testXpert V12.3, ZwickRoell GmbH & Co. KG) durchgeführt. Zuvor war mit einem Dickenmessgerät (Mitutoyo ID-C112XB, Mitutoyo, Neuss, GER) die jeweilige Gewebedicke in der Probenmitte ermittelt worden. Damit die Proben während des Zugversuches nicht aus den Spannbacken herausrutschen konnten, mussten sie zunächst gründlich abgetrocknet und ihre beiden Enden in Schleifpapier darin eingespannt werden. Nach Eingabe der individuellen Probendicke und Normen der Anfangsspannung auf 0 N/mm^2 wurden alle Proben mit einer einheitlichen Prüfgeschwindigkeit von 40 mm/min bis zum Bruch auseinandergezogen. Währenddessen wurden permanent die Längenänderung der Probe und die an ihr wirkende Kraft registriert. Die Messung der maximalen Kraft, der jede Probe ohne zu zerreißen standhalten konnte, erfolgte dabei in der Einheit Newton (N). Da diese Werte in der Literatur oft als größte mechanische Zugspannung in der Einheit N/mm^2 angegeben werden, wurde zur besseren Vergleichbarkeit die Maximalkraft zusätzlich auch in dieser Einheit, also bezogen auf den anfänglichen Probenquerschnitt, aufgeführt. Außerdem erfolgte die Dokumentation der Bruchdehnung jeder Probe. Diese ist ein Maß

für die Längenzunahme der Probe unmittelbar vor ihrem Auseinanderreißen, bezogen auf ihre Ausgangslänge [147].

Es konnten nur die Ergebnisse derjenigen Proben verwendet werden, die regelrecht zwischen den beiden Probenradien gerissen waren. Für die Nativgruppe waren $n = 30$ Aortenstümpfe präpariert worden. Davon rissen jedoch sieben Proben in der Einspannung der Zugprüfmaschine und mussten verworfen werden, sodass $n = 23$ Nativproben ausgewertet werden konnten. Die Probenanzahl aller dezellularisierten Gruppen betrug jeweils $n = 10$. Diese Werte konnten ausnahmslos verwendet werden.

3.6 Statistische Auswertung

Für alle Methoden mit numerischen Ergebnissen, also DAPI-Vermessung, DNA-Quantifizierung und Zugversuche, erfolgte eine statistische Auswertung. Mithilfe des Anderson-Darling-Tests wurde zunächst überprüft, ob die erhobenen Daten innerhalb der einzelnen Gruppen normalverteilt waren [148]. Wenn dies der Fall war, wurde anschließend der Fisher-Test verwendet, um die Homoskedastizität zweier zu vergleichenden Gruppen zu verifizieren [149]. Anhand eines ungepaarten (DAPI-Vermessungen und Zugversuche) bzw. gepaarten (DNA-Quantifizierung) t-Tests konnten dann unter Berücksichtigung von Homo- bzw. Heteroskedastizität die Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen ermittelt werden [150]. Falls die Daten mindestens einer der zwei Gruppen nicht normalverteilt waren, wurde der nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Test genutzt [151]. Ein errechneter Wert von $p \leq 0,05$ bezeichnete einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen, $p \leq 0,01$ einen hoch signifikanten und $p \leq 0,001$ einen höchst signifikanten.

4 ERGEBNISSE

4.1 Eliminierung zellulärer Komponenten

4.1.1 DAPI Fluoreszenz

Als Grundlage für die spätere Beurteilung des DZ Erfolgs der verschiedenen Protokolle wurde zunächst ein Kollektiv nativer Aorten untersucht. Hierbei zeigte sich über alle Schichten der AW hinweg eine durchgängige und homogene Verteilung von zwischen den Bindegewebsfasern der EZM gelegenen, fluoreszierenden ovalen und runden Strukturen (**s. Abb. 4-2**). Diese entsprachen den Zellkernen mit der darin enthaltenen, mit DAPI angefärbten DNA.

Im Gegensatz zu den Nativproben waren bei sämtlichen dezellularisierten AW sowohl an den inneren als auch an den äußeren Oberflächen nicht-fluoreszierende und damit kernfreie Bereiche festzustellen. Allerdings waren bei allen Proben, auch bei denen mit der höchsten EDT, noch verbleibende Kerne in den mittleren Schichten der AW angefärbt. Eine vollständige Zellfreiheit war somit durch keines der Protokolle erreicht worden (**s. Abb. 4-2**).

Die EDT waren innerhalb aller Gruppen bis auf A₂ (EDT_a) und B₁ (EDT_i) normalverteilt. Dabei wurde deutlich, dass die EDT_a aller AW immer größer war als die entsprechende EDT_i, nur eine einzige Probe (A₂: AW Nr. 6) blieb davon ausgenommen (**s. Tab. 4-1, Abb. 4-1**). Durchschnittlich war die EDT_a um 54,96 % ($p \leq 0,01$) signifikant größer als die EDT_i (**s. Tab. 4-1**).

Die EDT_a der Kontrollgruppe K₁ betrug $444,05 \pm 59,94 \mu\text{m}$ (**s. Tab 4-1**). Durch beide einmaligen Einfrierprozesse, sowohl das Schockfrieren bei $-196 \text{ }^\circ\text{C}$ als auch das langsamere Einfrieren bei $-32 \text{ }^\circ\text{C}$, konnte ein Zugewinn der EDT_a im Vergleich zu dieser Kontrollgruppe beobachtet werden: Die EDT_a lag in A₁ um 23,17 % ($p \leq 0,01$) signifikant höher als in K₁. In B₁ konnte ein Zugewinn der EDT_a von 19,34 % verzeichnet werden, dieser Unterschied war statistisch allerdings nicht signifikant (**s. Tab. 4-2, Abb. 4-1**). Auch hinsichtlich der EDT_i ergab sich nur in A₁ ein signifikanter Zuwachs um 27,54 % im Vergleich zu K₁ ($p \leq 0,001$), in B₁ betrug dieser lediglich 2,73 % (**s. Tab. 4-2, Abb. 4-1**). Im direkten Vergleich war die EDT_i in A₁ um 24,15 % ($p \leq 0,01$) signifikant größer als in B₁, die EDT_a allerdings nur um 3,21 % (**s. Tab. 4-2, Abb. 4-1**).

Durch die zyklische, fünffache Durchführung dieser beiden Einfrierprozesse konnte ein weiterer Zuwachs der EDT_a erreicht werden. So wiesen A₂ bzw. B₂ eine um 40,88 %

($p \leq 0,001$) bzw. 54,71 % ($p \leq 0,001$) signifikant höhere EDT_a als K_1 auf (**s. Tab. 4-2, Abb. 4-1**). Dabei zeigte sich gegenüber den Protokollen mit einfachem Einfrierschritt allerdings nur beim langsamen Einfrieren eine signifikante Steigerung: Die EDT_a lag in B_2 um 29,64 % ($p \leq 0,05$) höher als in B_1 . In A_2 war sie um 14,38 % größer als in A_1 , womit die statistische Signifikanz verfehlt wurde (**s. Tab. 4-2, Abb. 4-1**). Hinsichtlich der EDT_i führte wiederum nur die Behandlung mit flüssigem Stickstoff zu einem signifikanten Anstieg: In A_2 war eine um 29,20 % ($p \leq 0,05$) höhere EDT_i festzustellen als in K_1 , in B_2 war sie nur um 5,80 % höher als in K_1 (**s. Tab. 4-2, Abb. 4-1**). Im unmittelbaren Vergleich mit den einfachen Einfrierschritten erwiesen sich die Zugewinne an EDT_i allerdings als minimal: Die EDT_i lag in A_2 nur um 1,30 % höher als in A_1 , in B_2 um 2,98 % höher als in B_1 (**s. Tab. 4-2, Abb. 4-1**).

Zusammenfassend zeigt die Auswertung der verschiedenen Einfriermethoden, dass das Schockfrieren in flüssigem Stickstoff an der inneren Oberfläche der AW einen deutlich größeren Anstieg der EDT bewirkt als das Einfrieren bei -32°C . Durch die zyklische Durchführung der jeweiligen Einfrierschritte lässt sich dagegen v.a. ein Zuwachs der EDT an der äußeren Oberfläche der AW erzielen. Im Gruppenvergleich fand sich die größte EDT_i in A_2 ($416,49 \pm 84,51 \mu\text{m}$), die größte EDT_a hingegen in B_2 ($687,01 \pm 149,80 \mu\text{m}$; **s. Tab. 4-1**).

Einzig bei Gruppe C war kein positiver Effekt der physikalischen Vorbehandlung, nämlich der durch osmotischen Schock, auf die EDT zu beobachten. Die Werte lagen hier sogar um 4,24 % (EDT_a) bzw. um 7,50 % (EDT_i) unter denen der Referenzgruppe K_1 (**s. Tab. 4-2, Abb. 4-1**).

Die größte EDT aller Protokolle wies die Versuchsgruppe D auf, die basierend auf den Ergebnissen der vorangehenden Versuchsreihen entwickelt worden war. Die EDT_i betrug hier $593,31 \pm 80,60 \mu\text{m}$ und die EDT_a $949,44 \pm 134,14 \mu\text{m}$ (**s. Tab. 4-1**). Das Ziel einer vollkommen zellfreien AW war somit bei keiner der Proben erreicht worden. Allerdings konnte die Beobachtung aus A_1 , dass das Schockfrieren in flüssigem Stickstoff eine signifikante Zunahme der EDT sowohl an der äußeren als auch an der inneren Oberfläche bewirkt, bestätigt werden: Die EDT_i lag in D um 14,34 % höher als in der zugehörigen Kontrollgruppe K_2 ($p \leq 0,05$), die EDT_a um 18,51 % ($p \leq 0,05$; **s. Tab. 4-2, Abb. 4-1**).

Tabelle 4-1: DAPI MW der EDT [μm] an den inneren (EDT_i) und äußeren (EDT_a) Oberflächen der AW sowie Differenz der MW der EDT_a und korrespondierenden EDT_i

Daten: Mittelwerte \pm Standardabweichung aus jeweils n = 10 AW pro Gruppe sowie Differenzen der Mittelwerte der EDT_a und korrespondierenden EDT_i. Signifikanzlevels: * = p \leq 0,05 (signifikant); ** = p \leq 0,01 (hoch signifikant); *** = p \leq 0,001 (höchst signifikant).

MW der EDT und Differenz EDT_a - EDT_i				
Physikalische DZ Methoden				
		EDT_i [μm]	EDT_a [μm]	Differenz MW EDT_a - EDT_i [%]
Kontrollgruppe	K₁	322,4 \pm 41,6	444,1 \pm 59,9	+37,8 %***
Schockfrieren bei -196°C	A₁	411,2 \pm 36,0	546,9 \pm 61,8	+33,0 %***
	A₂	416,5 \pm 84,5	625,6 \pm 142,6	+50,2 %***
Langsames Einfrieren bei -32°C	B₁	331,2 \pm 60,3	529,9 \pm 132,0	+60,0 %***
	B₂	341,1 \pm 68,8	687,0 \pm 149,8	+101,4 %***
Osmotischer Schock	C	298,2 \pm 38,4	425,2 \pm 67,6	+42,6 %***
Modifizierung eines vorbestehenden Protokolls				
		EDT_i [μm]	EDT_a [μm]	Differenz MW EDT_a - EDT_i [%]
Kontrollgruppe	K₂	518,9 \pm 53,7	801,1 \pm 66,8	+54,4 %***
Zusätzlicher einfacher Schockfrierzyklus	D	593,3 \pm 80,6	949,4 \pm 134,1	+60,0 %***

Tabelle 4-2: Zuwachsraten der MW der EDT [%] an den inneren (EDT_i) und äußeren (EDT_a) Oberflächen der AW

Daten: Differenzen der Mittelwerte der EDT aus Tab. 4-1. Signifikanzlevels: * = p≤0,05 (signifikant); ** = p≤0,01 (hoch signifikant); *** = p≤0,001 (höchst signifikant).

Zuwachsraten der EDT [%]			
Physikalische DZ Methoden			
Zuwachsraten der EDT durch physikalische Vorbehandlung			
		EDT_i	EDT_a
Schockfrieren bei -196°C	K₁ → A₁	+27,5 %***	+23,2 %**
	K₁ → A₂	+29,2 %*	+40,9 %***
Langsames Einfrieren bei -32°C	K₁ → B₁	+2,7 %	+19,3 %
	K₁ → B₂	+5,8 %	+54,7 %***
Osmotischer Schock	K₁ → C	-7,5 %	-4,2 %
Zuwachsraten der EDT durch zyklische Einfrier-Auftau-Prozesse			
		EDT_i	EDT_a
Schockfrieren bei -196 °C	A₁ → A₂	+1,3 %	+14,4 %
Langsames Einfrieren bei -32 °C	B₁ → B₂	+3,0 %	+29,6 %*
Zuwachsraten der EDT vom langsamen Einfrieren zum Schockfrieren			
		EDT_i	EDT_a
	B₁ → A₁	+24,2 %**	+3,2 %
Modifizierung eines bestehenden Protokolls			
Zuwachsraten der EDT von K₂ zu D			
		EDT_i	EDT_a
	K₂ → D	+14,3 %*	+18,5 %*

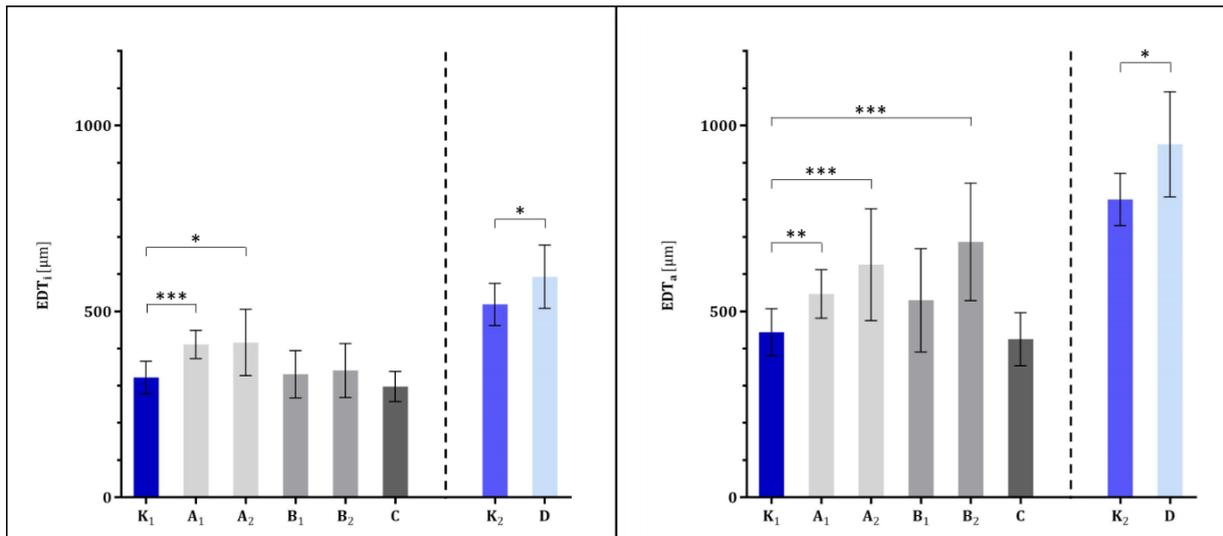


Abbildung 4-1: DAPI EDT [µm] an den inneren (EDT_i) und äußeren (EDT_a) Oberflächen der AW

Links: EDT_i. **Rechts:** EDT_a. Die verschiedenen dezellularisierten Gruppen sind auf der jeweiligen x-Achse aufgetragen, die EDT auf der jeweiligen y-Achse. ■ K₁ = Kontrollgruppe der Gruppen A₁, A₂, B₁, B₂ und C (ohne physikalische Vorbehandlung); ■ Schockfrieren bei -196 °C (A₁ = einfach, A₂ = zyklisch); ■ langsames Einfrieren bei -32 °C (B₁ = einfach, B₂ = zyklisch); ■ C = osmotischer Schock; ■ K₂ = Kontrollgruppe der Gruppe D (ohne physikalische Vorbehandlung); ■ D = Modifizierung eines bestehenden Protokolls (zusätzlicher einfacher Schockfrierzyklus). Signifikanzlevels: * = p≤0,05 (signifikant); ** = p≤0,01 (hoch signifikant); *** = p≤0,001 (höchst signifikant). Daten: Darstellung der Mittelwerte ± Standardabweichung aus jeweils n = 10 AW pro Gruppe. In allen Gruppen war die EDT_a größer als die korrespondierende EDT_i. Im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe K₁ ließ sich hinsichtlich der EDT_i in den Gruppen A₁ und A₂, hinsichtlich der EDT_a in den Gruppen A₁, A₂ und B₂ ein signifikanter Zuwachs feststellen. In der Versuchsgruppe D wurde im Vergleich zur zugehörigen Kontrollgruppe K₂ bezüglich sowohl der EDT_i als auch der EDT_a ein signifikanter Zugewinn beobachtet.

4.1.2 Hämatoxylin – Eosin

Die H&E gefärbten nativen Präparate zeigten eine dichte und regelmäßige Schichtung der eosinophilen Bindegewebsfasern. Diese wiesen einen wellenförmigen und parallelen Verlauf auf. Zwischen den Fasern waren, analog zur DAPI Fluoreszenz, homogen über alle Gewebeschichten verteilte, ovale basophile Strukturen zu beobachten, die den Zellkernen entsprachen. Der gesamte Hintergrund stellte sich aufgrund der Eosinophilie der nicht vollständig gegeneinander abgrenzbaren EZM Bestandteile ebenfalls rötlich bis rosa dar. Dank der gleichmäßigen Anordnung der Matrixkomponenten war eine deutliche Aufteilung der AW in ihre drei verschiedenen Schichten erkennbar: Die der Tunica intima, bestehend aus einer geschlossenen Endothelzelldecke und den Bindegewebsfasern der subendothelialen Schicht, der Tunica media, in der die Zellkerne der glatten Muskelzellen dominierten, und der bindegewebigen Tunica adventitia, die das Gefäß in seiner Umgebung verankert hatte. Diese äußerste Schicht war in den meisten Fällen fast

vollständig abpräpariert worden (**s. Abb. 4-2, Dreischichtung der AW in der H&E Färbung der Nativproben exemplarisch markiert**).

Auch die H&E Färbung der dezellularisierten Präparate konnte die Ergebnisse der DAPI Fluoreszenz bestätigen: Analog zu dieser waren bei allen Proben sowohl an der äußeren als auch an der inneren Oberfläche zellkernfreie Bereiche zu beobachten, während in der dazwischen liegenden Mittelschicht jeweils ein Zellkernstreifen verblieben war. Das Ausmaß der zellkernfreien Bereiche an der äußeren und inneren Oberfläche entsprach dabei den gemessenen EDT in der DAPI Fluoreszenz (**s. Abb. 4-2**). Demnach wiesen die durch einmaligen Einfrierschritt bei -32 °C (Gruppe B₁) und osmotischen Schock (Gruppe C) behandelten Proben vergleichbar große zellkernfreie Zonen auf wie die aus der Kontrollgruppe K₁ (**s. Abb. 4-2**). In den Gruppen, deren Protokoll einfache oder zyklische Schockfrierschritte beinhaltete (Gruppen A₁ und A₂), präsentierten sich diese Bereiche hingegen etwas ausgedehnter (**s. Abb. 4-2**). Durch die zyklische Durchführung der Einfrierschritte war vor allem an der äußeren Oberfläche bei -32 °C, also in Gruppe B₂ gegenüber Gruppe B₁, eine Zunahme der zellkernfreien Areale zu verzeichnen (**s. Abb. 4-2**). Unter den Gruppen A₁, A₂, B₁, B₂ und C zeigten diese Bereiche an der inneren Oberfläche in Gruppe A₂, an der äußeren Oberfläche in Gruppe B₂ das größte Ausmaß (**s. Abb. 4-2**). Insgesamt erstreckten sich die kernfreien Areale allerdings in Protokoll D, der Gruppe mit der längsten DZ Dauer, am tiefsten in die AW (**s. Abb 4-2**).

Hinsichtlich der EZM zeigte die H&E Färbung bei den dezellularisierten Präparaten im Vergleich zur Nativgruppe einen weitgehenden Erhalt des dreischichtigen Wandbaus und intakt wirkende EZM Bestandteile. In Anordnung und Verlauf der Bindegewebsfasern waren bei den meisten Gruppen kaum Veränderungen zu erkennen (**s. Abb. 4-2**). Den wohl prägnantesten Unterschied zur Nativgruppe stellte eine teilweise wabenförmige Auflockerung der EZM dar, die sich vor allem auf die äußeren, kernfreien Schichten beschränkte und bei längeren DZ Dauern (D und K₂) stärker ausgeprägt war (**s. Abb. 4-2**). In den zyklischen Einfriergruppen A₂ und B₂ waren allerdings alle Schichten der AW, nicht nur die äußeren, von Brüchen im Verlauf der Kollagenfasern und teilweise porenartigen Strukturzerstörungen betroffen (**s. Abb 4-2**).

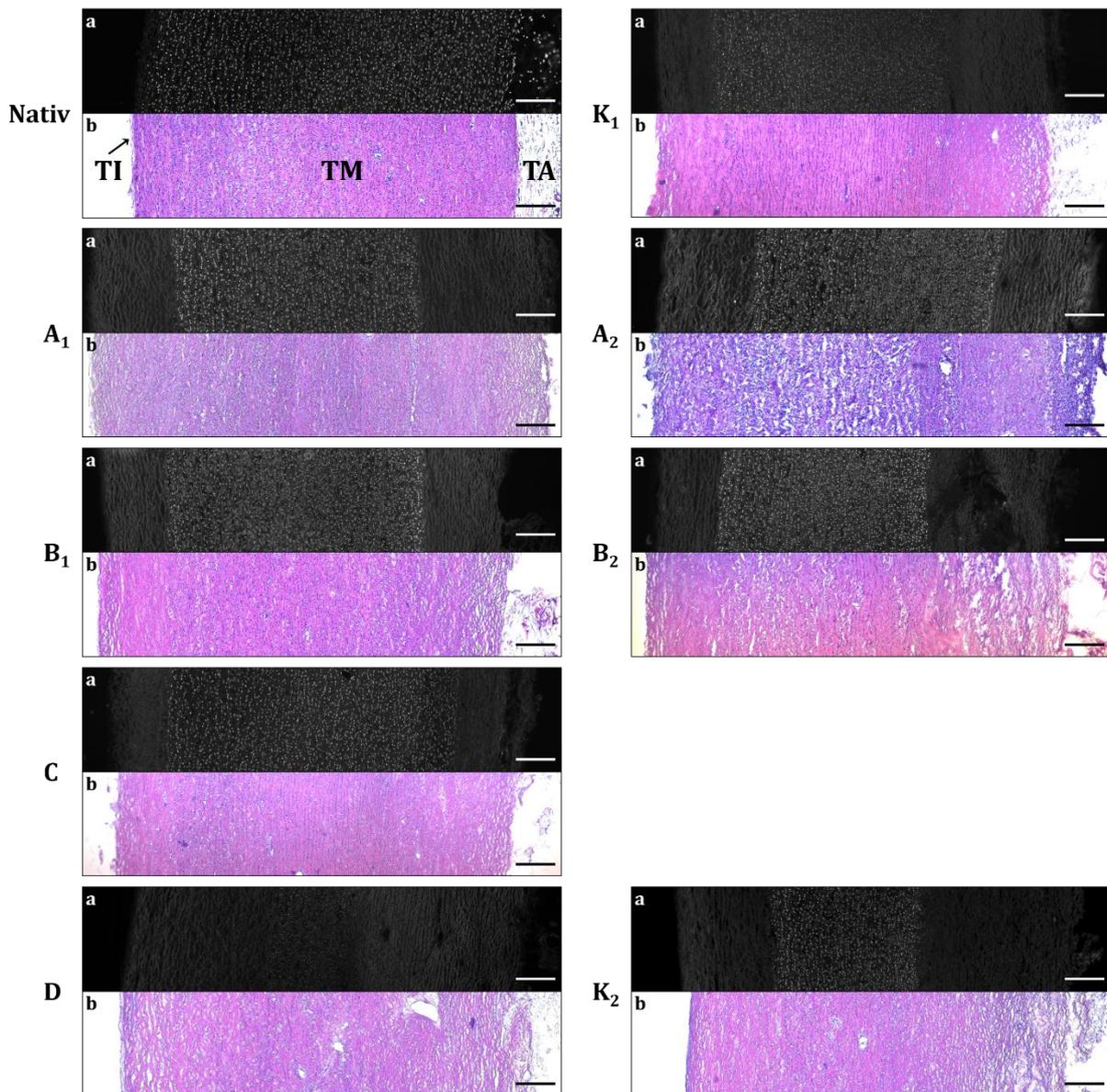


Abbildung 4-2: DAPI Fluoreszenz und H&E Färbung

a = DAPI Fluoreszenz, diese Abbildungen bestehen jeweils aus einem Einzelbild. **b** = H&E Färbung, diese Abbildungen wurden jeweils aus drei Einzelbildern zusammengesetzt. Sowohl **a** als auch **b** stellen den gesamten Querschnitt der AW von der inneren Oberfläche (links) über die Mittelschicht bis zur äußeren Oberfläche (rechts) dar. In beiden Färbungen war eine homogene Verteilung der Zellkerne über alle Gewebeschichten der Nativproben festzustellen. Die regelmäßige Schichtung der AW in Tunica intima (TI), Tunica media (TM) und Tunica adventitia (TA) ist in der H&E Färbung der Nativproben exemplarisch markiert. In den dezellularisierten Gruppen entsprach das Ausmaß der zellkernfreien Bereiche an den äußeren und inneren Oberflächen in der H&E Färbung den gemessenen EDT in der DAPI Fluoreszenz. Die Proben aus den Gruppen B₁ und C wiesen ähnlich große zellkernfreie Zonen auf wie die aus der Kontrollgruppe K₁. In den Gruppen A₁ und A₂ präsentierten sich die kernfreien Bereiche etwas ausgedehnter. Durch die zyklische Durchführung der Einfrierschritte war vor allem in Gruppe B₂ gegenüber Gruppe B₁ an der äußeren Oberfläche eine Zunahme der kernfreien Areale zu verzeichnen. In den Versuchsgruppen K₂ und D war von allen Gruppen die größten EDT zu beobachten. Dabei ließ sich in Gruppe D im Vergleich zur Kontrollgruppe K₂ sowohl an der inneren als auch an der äußeren Oberfläche eine Zunahme der kernfreien Areale feststellen. Die H&E Färbung der Gruppen K₁, A₁, B₁, C, K₂ und D zeigte bis auf eine wabenförmige Auflockerung in den äußeren Schichten der AW einen weitgehenden Erhalt der EZM Bestandteile. In der H&E Färbung der Gruppen A₂ und B₂ wurden in allen Schichten der AW Brüche im Verlauf der Kollagenfasern und porenartigen Strukturzerstörungen beobachtet. Maßstabsbalken: 200 µm.

4.1.3 DNA-Quantifizierung

Ergänzend zu den histologischen Methoden der DAPI Fluoreszenz und H&E Färbung bot sich mit der DNA-Quantifizierung die Möglichkeit einer quantitativen Beurteilung der nach DZ im Gewebe verbliebenen DNA-Reste. Aufgrund der starken natürlichen Schwankungen der DNA-Werte zwischen den einzelnen AW und auch innerhalb der jeweiligen Gefäße war von jeder AW jeweils eine Probe im nativen und im dezellularisierten Zustand entnommen worden, und zwar an nächstmöglich beieinander liegenden Positionen. Auf diese Weise sollten optimale Ausgangsbedingungen für die Untersuchung der Reduktion des DNA-Gehalts und ihre Beurteilung in jeder individuellen AW geschaffen werden.

Bei der Messung des DNA-Gehalts lag der Mittelwert aller Nativproben gesamtheitlich betrachtet bei $543,45 \pm 212,02$ ng/mg. Für die einzelnen Gruppen ergaben sich bei den Nativproben Mittelwerte zwischen $319,28 \pm 86,48$ ng/mg (Gruppe A₂) und $681,36 \pm 141,10$ ng/mg (Gruppe K₂, **s. Tab. 4-3**), entsprechend der natürlichen Streuung der DNA-Werte.

In Übereinstimmung zur DAPI Fluoreszenz und H&E Färbung bestätigte die DNA-Quantifizierung, dass in allen Proben auch nach DZ eine gewisse Menge an Rest-DNA verblieben war. Die Mittelwerte der dezellularisierten Gruppen lagen zwischen $192,18 \pm 148,90$ ng/mg (Gruppe D) und $586,66 \pm 75,98$ ng/mg (Gruppe C, **s. Tab. 4-3**), für alle dezellularisierten Proben zusammen ergab sich ein Mittelwert von $426,99 \pm 183,55$ ng/mg.

Unter den Versuchsgruppen A₁, A₂, B₁, B₂ und C sowie der zugehörigen Kontrollgruppe K₁ war nur in Gruppe B₁, die mit einem einmaligen Einfrierschritt bei -32 °C behandelt worden war, eine signifikante Reduktion des DNA-Gehalts nach DZ zu beobachten ($-27,98$ %, $p \leq 0,001$; **s. Tab. 4-3 Abb. 4-3**). Außerdem war dies die einzige dieser Gruppen, bei dem auch in jeder einzelnen AW der jeweiligen Gruppe eine Reduktion des DNA-Wertes erkennbar war, während bei allen anderen vereinzelt AW zu finden waren, deren DNA-Werte bei den dezellularisierten Proben höher lagen als bei den nativen. Dennoch zeigte sich auch in Gruppe K₁ eine Reduktion der DNA-Konzentration um $15,99$ %, dieser Unterschied war allerdings statistisch nicht signifikant (**s. Tab. 4-3, Abb. 4-3**). Bei den Gruppen A₁, A₂, B₂ und C war hingegen eine Zunahme des DNA-Gehalts festzustellen, diese Unterschiede waren aber ebenfalls nicht von statistischer Signifikanz (A₁: $+28,71$ %; A₂: $+20,86$ %; B₂: $+5,33$ %; C: $+4,42$ %; **s. Tab. 4-3, Abb. 4-3**). Insgesamt unterschieden sich

die Reduktionen des DNA-Gehalts bei keiner der Gruppen A₁, A₂, B₁, B₂ und C signifikant von der Reduktion des DNA-Gehalts der entsprechenden Kontrollgruppe K₁.

Analog zur H&E Färbung und DAPI Fluoreszenz bestätigte sich bei den Protokollen mit den längsten DZ Dauern (D und K₂), bei denen die größten EDT der DZ gemessen worden waren, auch in der DNA-Quantifizierung eine deutliche und höchst signifikante Reduktion des DNA-Gehalts, sowohl bei den Mittelwerten als auch bei jedem einzelnen Aortenpräparat (**s. Tab. 4-3, Abb. 4-3**). Diese Abnahme der DNA-Konzentration durch DZ war bei Gruppe D (-70,90 %, p≤0,001) noch etwas größer als bei der zugehörigen Kontrollgruppe K₂ (-63,07 %, p≤0,001; **s. Tab. 4-3**). Diese Reduktionen unterschieden sich allerdings statistisch nicht signifikant voneinander.

Tabelle 4-3: MW des DNA-Gehalts der nativen und dezellularisierten Proben [ng DNA / mg Gewebe] sowie Änderung des DNA-Gehalts durch Dezellularisierung [%]

Daten: Mittelwerte ± Standardabweichung aus jeweils n = 10 AW pro Gruppe sowie Differenzen der MW der nativen und korrespondierenden dezellularisierten Proben. Signifikanzlevels: * = p≤0,05 (signifikant); ** = p≤0,01 (hoch signifikant); *** = p≤0,001 (höchst signifikant).

MW des DNA-Gehalts und Änderung durch DZ				
Physikalische DZ Methoden				
		MW DNA-Gehalt Nativ [ng/mg]	MW DNA-Gehalt Dezellularisiert [ng/mg]	Änderung DNA-Gehalt [%]
Kontrollgruppe	K₁	647,8 ± 241,8	544,2 ± 150,1	-16,0 %
Schockfrieren bei -196°C	A₁	374,6 ± 176,0	482,2 ± 137,9	+28,7 %
	A₂	319,3 ± 86,5	385,9 ± 81,7	+20,9 %
Langsames Einfrieren bei -32°C	B₁	564,5 ± 95,2	406,6 ± 42,0	-28,0 %***
	B₂	538,0 ± 217,2	566,7 ± 141,2	+5,3 %
Osmotischer Schock	C	561,8 ± 204,2	586,7 ± 76,0	+4,4 %
Modifizierung eines vorbestehenden Protokolls				
		MW DNA-Gehalt Nativ [ng/mg]	MW DNA-Gehalt Dezellularisiert [ng/mg]	Änderung DNA-Gehalt [%]
Kontrollgruppe	K₂	681,4 ± 141,1	251,6 ± 147,9	-63,1 %***
Zusätzlicher einfacher Schockfrierzyklus	D	660,3 ± 147,3	192,2 ± 148,9	-70,9 %***

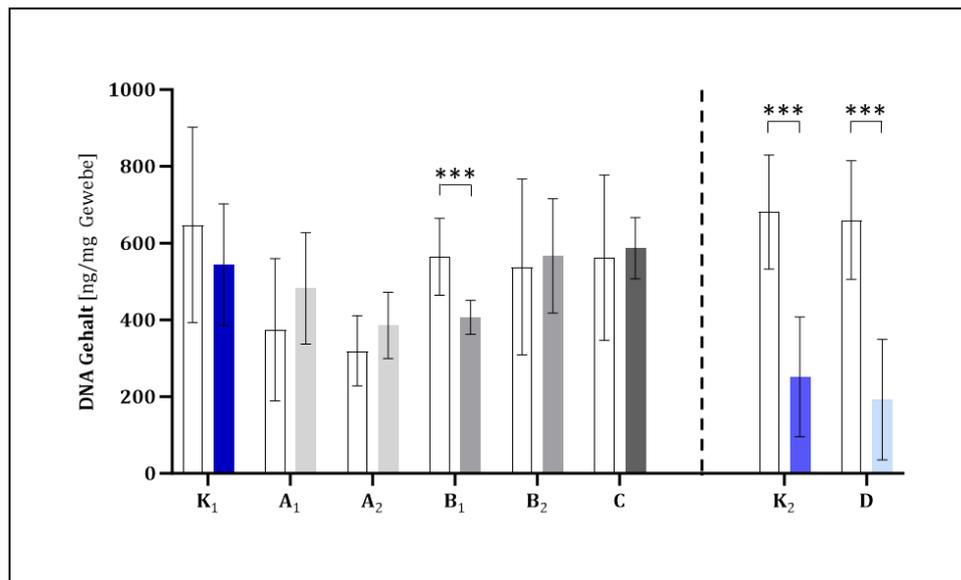


Abbildung 4-3: DNA-Gehalt der nativen und dezellularisierten Proben [ng DNA / mg Gewebe]

Die verschiedenen dezellularisierten Gruppen mit jeweils zugehörigem Nativkollektiv sind auf der x-Achse aufgetragen, die jeweiligen DNA-Konzentrationen auf der y-Achse. □ Nativproben; ■ K₁ = Kontrollgruppe der Gruppen A₁, A₂, B₁, B₂ und C (ohne physikalische Vorbehandlung); ■ Schockfrieren bei -196 °C (A₁ = einfach, A₂ = zyklisch); ■ langsames Einfrieren bei -32 °C (B₁ = einfach, B₂ = zyklisch); ■ C = osmotischer Schock; ■ K₂ = Kontrollgruppe der Gruppe D (ohne physikalische Vorbehandlung); ■ D = Modifizierung eines bestehenden Protokolls (zusätzlicher einfacher Schockfrierzyklus). Signifikanzlevels: * = p≤0,05 (signifikant); ** = p≤0,01 (hoch signifikant); *** = p≤0,001 (höchst signifikant). Daten: Darstellung der Mittelwerte ± Standardabweichung aus jeweils n = 10 AW pro Gruppe. In den Gruppen B₁, K₂ und D war eine signifikante Reduktion des DNA-Gehalts nach DZ zu beobachten.

4.2 Erhalt der Extrazellulärmatrix

4.2.1 Movat Pentachrom Färbung

Die MPC Färbung ermöglichte eine detaillierte Untersuchung der Gewebestruktur und eventueller, durch den DZ Prozess bedingter Schäden daran. Elastische Fasern sowie Muskulatur kamen rot zur Darstellung, Kollagenfasern gelb. Andere, nicht weiter differenzierbare EZM Bestandteile, stellten sich als blaue Grundsubstanz dar, Zellkerne färbten sich blauschwarz.

Die MPC gefärbten nativen Präparate offenbarten, analog zur H&E Färbung, eine regelrechte Dreischichtung der Gefäßwand: Die Tunica intima zeigte nach luminal eine bündige Begrenzung durch die geschlossene Endothelzellschicht mit den darunter liegenden, v.a. kollagenen Bindegewebsfasern der subendothelialen Schicht. Den größten Abschnitt der Gefäßwand stellte die Tunica media dar. Da die Aorta zu den Arterien vom elastischen Typ gehört, fanden sich hier zahlreiche konzentrische elastische Lamellen und dazwischen liegend die Kerne der glatten Muskelzellen, eingebettet in Grundsubstanz. Die

elastischen Fasern wiesen dabei eine starke Schlängelung auf. Auch bei diesen Schnitten war erkennbar, dass die Tunica adventitia meist soweit abpräpariert worden war, dass eine Auswertung dieser Gewebeschicht nicht mehr möglich war. Wenn vorhanden, dominierten in dieser Schicht v.a. gelbe Kollagenfasern. Dazwischen lagen Zellkerne der Fibroblasten, teilweise waren auch angeschnittene *Vasa vasorum* zu sehen. Die Zellkerne waren also gleichmäßig über alle Gefäßschichten verteilt, womit die Ergebnisse der DAPI und H&E Färbung bestätigt werden konnten. Die Bindegewebsfasern zeigten außer in der Tunica adventitia, die durch die Präparation alteriert worden war, eine intakte Struktur **(s. Abb. 4-4)**.

Analog zur DAPI und H&E Färbung waren bei den MPC gefärbten dezellularisierten Präparaten Zellkerne nur noch in der mittleren Schicht der AW zu beobachten. Die Schnitte belegten einen weitestgehenden Erhalt aller EZM Komponenten, also der Grundsubstanz, der elastischen und der kollagenen Bindegewebsfasern. Allerdings traten die elastische Fasern teilweise deutlicher hervor als bei der Nativgruppe. Das deutet auf einen leichten Verlust von Grundsubstanz hin, also z.B. von Glykosaminoglykanen und Proteoglykanen, da die blaue Grundsubstanz bei den Nativproben etwas dominanter erschien **(s. Abb. 4-4)**. Außerdem konnte, wie in der H&E Färbung, auch hier eine wabenförmige Auflockerung der Gewebestruktur beobachtet werden, die sich in den meisten Fällen nur auf die äußeren, kernfreien Areale erstreckte. Am deutlichsten waren hiervon, wie bei der H&E Färbung, die Protokolle mit der längsten DZ Dauer betroffen (D und K₂; **s. Abb. 4-4**), aber auch die Gruppe A₂, die einen fünffachen Schockfrierzyklus durchlaufen hatte. In Gruppe A₂ beschränkte sich die bullöse Veränderung der EZM Struktur nicht nur auf die kernfreien Bereiche, sondern reichte oft bis in die inneren Gewebeschichten **(s. Abb. 4-4)**. Desweiteren war bei einigen Proben eine regelrechte Fragmentierung der elastischen Fasern zu erkennen. Davon war in geringem Maße die Gruppe B₁, die mit einem einfachen Einfrierschritt bei -32 °C behandelt worden war, betroffen. Häufiger zeigte sich diese Fragmentierung allerdings in den zyklischen Einfriergruppen Gruppen, v.a. in B₂, aber auch in A₂ **(s. Abb. 4-4)**.

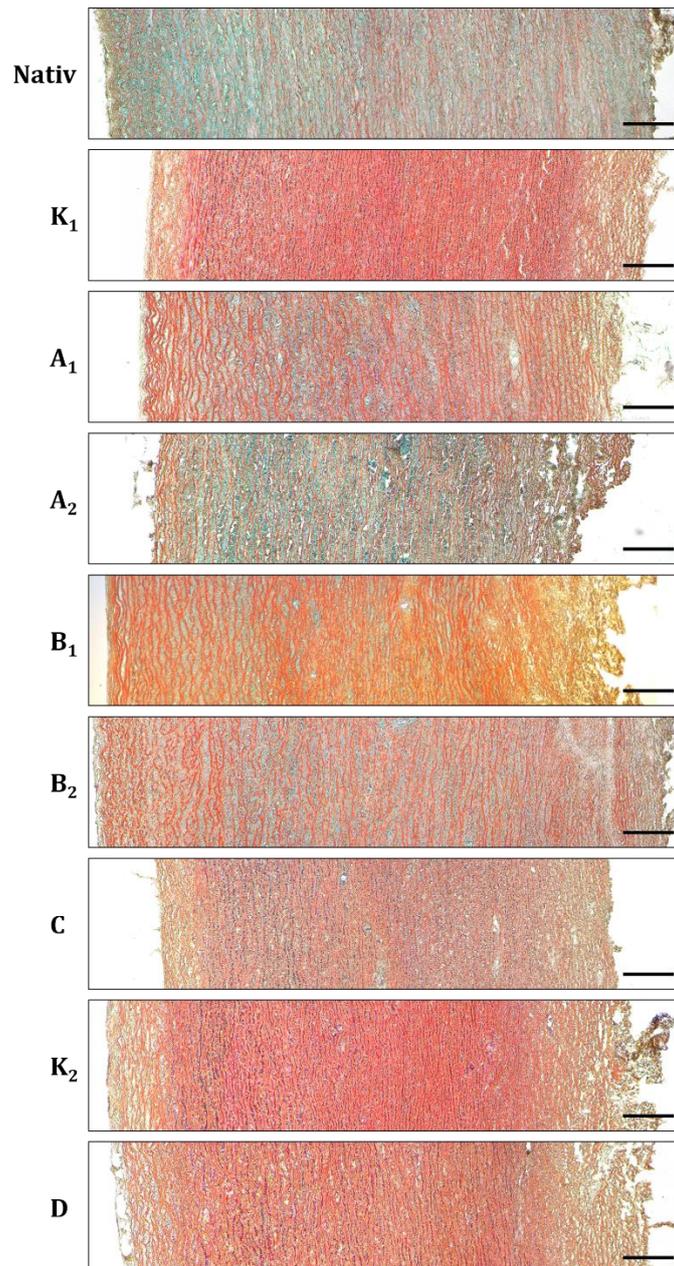


Abbildung 4-4: Movat Pentachrom Färbung

Die Abbildungen wurden jeweils aus drei Einzelbildern zusammengefügt. Sie stellen den gesamten Querschnitt der AW von der inneren Oberfläche (links) über die Mittelschicht bis zur äußeren Oberfläche (rechts) dar. Die nativen Präparate zeigten eine regelrechte Dreischichtung der Gefäßwand: In der Tunica intima dominierten die kollagenen Bindegewebsfasern der subendothelialen Schicht; in der Tunica media dominierten konzentrische elastische Lamellen, eingebettet in Grundsubstanz; in der Tunica adventitia, soweit vorhanden, dominierten wieder Kollagenfasern. Die Bindegewebsfasern zeigten außer in der durch die Präparation alterierten Tunica adventitia eine intakte Struktur. Die dezellularisierten Präparate zeigten einen weitgehenden Erhalt aller EZM Komponenten. Analog zur H&E Färbung erstreckte sich die wabenförmige Auflockerung der Gewebestruktur nur über die äußeren, kernfreien Areale. In Gruppe A₂ reichte diese bullöse Veränderung der EZM Struktur oft bis in die inneren Gewebeschichten. Außerdem waren in den Gruppen A₂ und B₂ und in geringem Maße auch in Gruppe B₁ Brüche und Fragmentierungen im Verlauf der elastischen Fasern zu erkennen. Maßstabsbalken: 200 µm.

4.2.2 Pikro-Siriusrot Färbung

Die PSR Färbung erlaubte eine genaue Beurteilung der Kollagenstruktur der AW unter polarisiertem Licht. Dabei präsentierten sich die relativ dicken Kollagen I Fibrillen rotgelb und die dünneren Kollagen III Fibrillen der retikulären Fasern grün [152, 153]. Diese stellen die Hauptkollagentypen in der Aorta dar [154]. Die PSR gefärbten nativen Präparate zeigten eine äquivalente Verteilung der Fasern beider Kollagentypen über alle Gewebeschichten. Eine extrem starke Anreicherung imponierte dabei, falls vorhanden, in der Tunica adventitia. Auch in der subendothelialen Schicht schienen die Kollagenfasern etwas dichter angeordnet als in der restlichen AW. Im Hintergrund waren die schwarzen wellenförmigen Strukturen der elastischen Fasern zu erkennen **(s. Abb. 4-5)**.

Die Aufnahmen der dezellularisierten Proben aller Gruppen bezeugten ausnahmslos einen Erhalt sowohl der Menge und Anordnung der Kollagenfasern als auch der Heterogenität der beiden Kollagentypen I und III. Auch bei den behandelten Präparaten zeigte sich eine gleichmäßige Verteilung der Kollagenfasern über die gesamte AW, mit besonders starker Anreicherung in den äußeren Bereichen. Dabei war im Vergleich zur Nativgruppe bei keiner der dezellularisierten Gruppen eine Abnahme des Kollagengehalts der AW zu detektieren. Die elastischen Fasern präsentierten sich bei den behandelten Proben ebenfalls wellenförmig und schwarz im Hintergrund **(s. Abb. 4-5)**. Den einzigen Unterschied zur Nativgruppe stellte, analog zur H&E und MPC Färbung, eine Auflockerung der gesamten EZM Struktur dar, die sich vor allem in den äußeren Schichten zeigte. Besonders stark waren davon auch hier die zyklischen Einfriergruppen (A₂ und B₂) und die Protokolle mit der längsten DZ Dauer (D und K₂) betroffen.

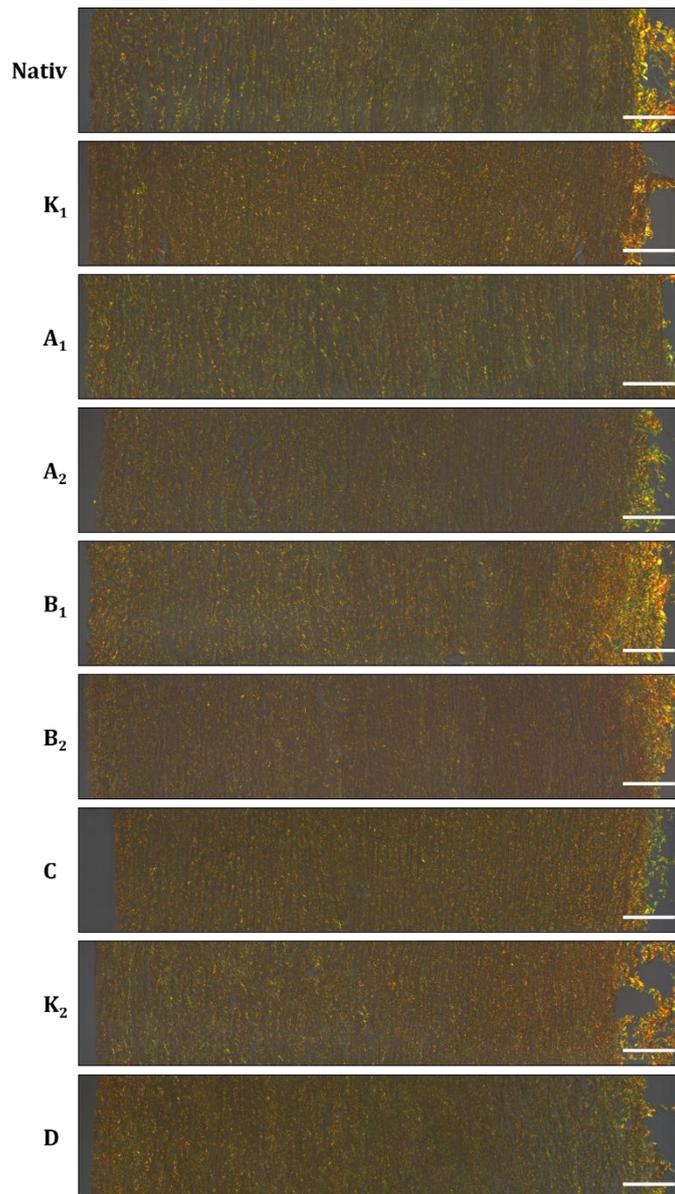


Abbildung 4-5: Picro-Siriusrot Färbung

Die Abbildungen wurden jeweils aus drei Einzelbildern zusammengefügt. Sie stellen den gesamten Querschnitt der AW von der inneren Oberfläche (links) über die Mittelschicht bis zur äußeren Oberfläche (rechts) dar. Die nativen Präparate zeigten eine äquivalente Verteilung der beiden Kollagentypen I (rotgelb) und III (grün) über alle Gewebeschichten mit stärkerer Anreicherung in den äußeren Bereichen. Die dezellularisierten Präparate zeigten in allen Gruppen einen Erhalt sowohl der Menge und Anordnung der Kollagenfasern als auch der Heterogenität der beiden Kollagentypen I und III. Im Vergleich zur Nativgruppe war bei keiner der Gruppen eine Abnahme des Kollagengehalts der AW zu detektieren. Maßstabsbalken: 200 µm.

4.3 Topographie

4.3.1 Makroskopische Topographie

Nach der physikalischen Behandlung präsentierten sich die Aortenstümpfe aller Gruppen unauffällig, ohne dass dabei ein makroskopischer Unterschied zu den Nativproben erkennbar war. Die einzige Ausnahme bildete die Gruppe A₂. Hier wirkten die Aorten nach dem fünffachen Schockfrierzyklus bei -196 °C in ihrer Struktur erheblich angegriffen, denn sie wiesen ausnahmslos deutliche Risse in den Gefäßwänden auf (**s. Abb. 4-6**). Deren Auftreten während des mehrmaligen Einfrier-Auftau-Prozesses war unvermeidlich, obwohl die Behandlung mit äußerster Vorsicht durchgeführt worden war. Nach nur einmaligem Schockfrieren (A₁ und D) hingegen waren diese Brüche bei keiner einzigen Aorta zu beobachten, ebenso wenig nach osmotischem Schock (C) und ein- oder mehrmaligem langsamen Einfrieren bei -32 °C (B₁ und B₂).

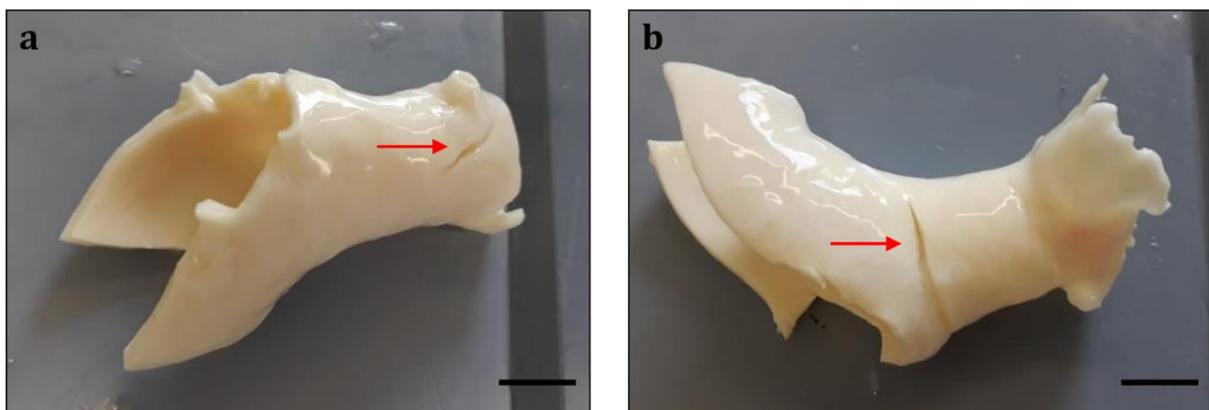


Abbildung 4-6: Makroskopische Topographie der AW aus Gruppe A₂

a. AW Nr. 5 aus Gruppe A₂; **b.** AW Nr. 8 aus Gruppe A₂. Die Abbildungen zeigen exemplarisch die makroskopisch sichtbaren Risse (rote Pfeile), die auch alle anderen AW aus Gruppe A₂ nach dem fünffachen Schockfrierzyklus aufwiesen. Maßstabsbalken (a und b): 1 cm.

4.3.2 Mikroskopische Topographie

Ergänzend zur makroskopischen Topographie ermöglichten die REM Aufnahmen eine Beurteilung der mikroskopischen Oberflächentopographie der AW. Von besonderem Interesse waren die Aufnahmen der inneren Oberflächen, da diese Seiten nicht durch die anfängliche Präparation alteriert worden waren. Die Nativproben dienten dabei wieder als Bewertungsmaßstab für die dezellularisierten Gruppen. Sie zeigten in den meisten Fällen eine homogen von einer geschlossenen Zellschicht bedeckte innere Oberfläche mit

einer gewellten Oberflächenstruktur. Allerdings schloss die Zelldecke auch in der Nativgruppe bei sehr wenigen Aorten nicht vollständig bündig ab, sodass bei diesen AW in einzelnen Bereichen das darunter liegende Netzwerk der EZM sichtbar wurde, ein filigranes Geflecht aus sich immer weiter verzweigenden Fasern (**s. Abb. 4-7**). Die Aufnahmen der äußeren Oberfläche boten hingegen ein deutlich inhomogeneres Bild: Es waren dicke Faserbündel mit wellenförmigem Verlauf erkennbar, aber auch wesentlich feinere, sich unregelmäßig dazwischen aufspannende Fasern. Diese Areale wechselten sich ab mit geschlossenen Zellschichten, sowie Detritus und Fettüberresten der Präparation (**s. Abb. 4-7**). Vereinzelt waren sowohl an der äußeren als auch an der inneren Oberfläche anheftende Stäbchenbakterien zu sehen.

Die Topographie der inneren Oberflächen der dezellularisierten Gruppen war in den meisten Fällen weitestgehend mit der der Nativgruppe vergleichbar. Auch bei diesen Proben war die innere Oberfläche größtenteils dicht mit Zellen überzogen, auch wenn dazwischen in einzelnen Bereichen in variablem Ausmaß das Fasernetzwerk der EZM freigelegt war. Die fein verzweigte Faserstruktur präsentierte sich dabei weiterhin homogen und schien durch den DZ Vorgang keinen offensichtlichen Schaden genommen zu haben. Genau wie bei der Nativgruppe beschränkte sich diese lückenhafte Zellbedeckung bei den meisten Gruppen auf kleine Areale, nur wenige AW waren davon betroffen (**s. Abb. 4-7**). Sogar die Gruppen mit den längsten DZ Dauern (D und K₂) zeigten eine mit der der Nativgruppe vergleichbare innere Oberflächentopographie (**s. Abb. 4-7**). Allerdings war bei diesen beiden Gruppen im Vergleich zur Nativgruppe und zu den anderen dezellularisierten Gruppen sowohl an der äußeren als auch an der inneren Oberfläche eine stärkere Bakterienkontamination zu beobachten.

Zwischen den dezellularisierten Gruppen ergab hinsichtlich der Topographie der inneren Oberflächen ebenfalls kein erkennbarer Unterschied. Die einzige Ausnahme hiervon bildete die Gruppe B₂, die einen fünfmaligen Einfrierzyklus bei -32 °C durchlaufen hatte. Bei diesen AW war die EZM in deutlich stärkerem Ausmaß freigelegt als bei allen anderen Protokollen. Im Vergleich zu diesen schienen die betroffenen Bereiche in Gruppe B₂ außerdem erheblich größer und waren bei fast allen AW der Gruppe zu finden. Desweiteren präsentierte sich die eigentliche Struktur des Fasergeflechts weniger dicht. Insbesondere feinste Fasern im Nanometerbereich waren seltener zu erkennen, dafür war das Netzwerk von zahlreicheren und größeren Poren durchzogen als bei den anderen Gruppen. Diese Poren stellten sich dabei als unregelmäßig, nicht verbunden und

uneinheitlich verteilt dar (**s. Abb. 4-7**). Demnach hatte der insgesamt zehnstündige Einfrier-Auftau-Prozess bei -32 °C die Topographie der inneren Aortenoberflächen am deutlichsten verändert.

Hinsichtlich der Topographie der äußeren Oberflächen war dagegen bei keiner einzigen der dezellularisierten Gruppen ein erkennbarer Unterschied zur Nativgruppe festzustellen: Auch bei allen dezellularisierten AW zeigte sich hier ein gemischtes Bild, bestehend aus dicken welligen Faserbündeln mit sich dazwischen inhomogen verzweigenden feinen Fasern sowie Zellrasen und Detritus (**s. Abb. 4-7**). Weder die verschiedenen physikalischen DZ Methoden noch die DZ Dauer schien also Einfluss auf die Topographie der äußeren Aortenoberflächen genommen zu haben.

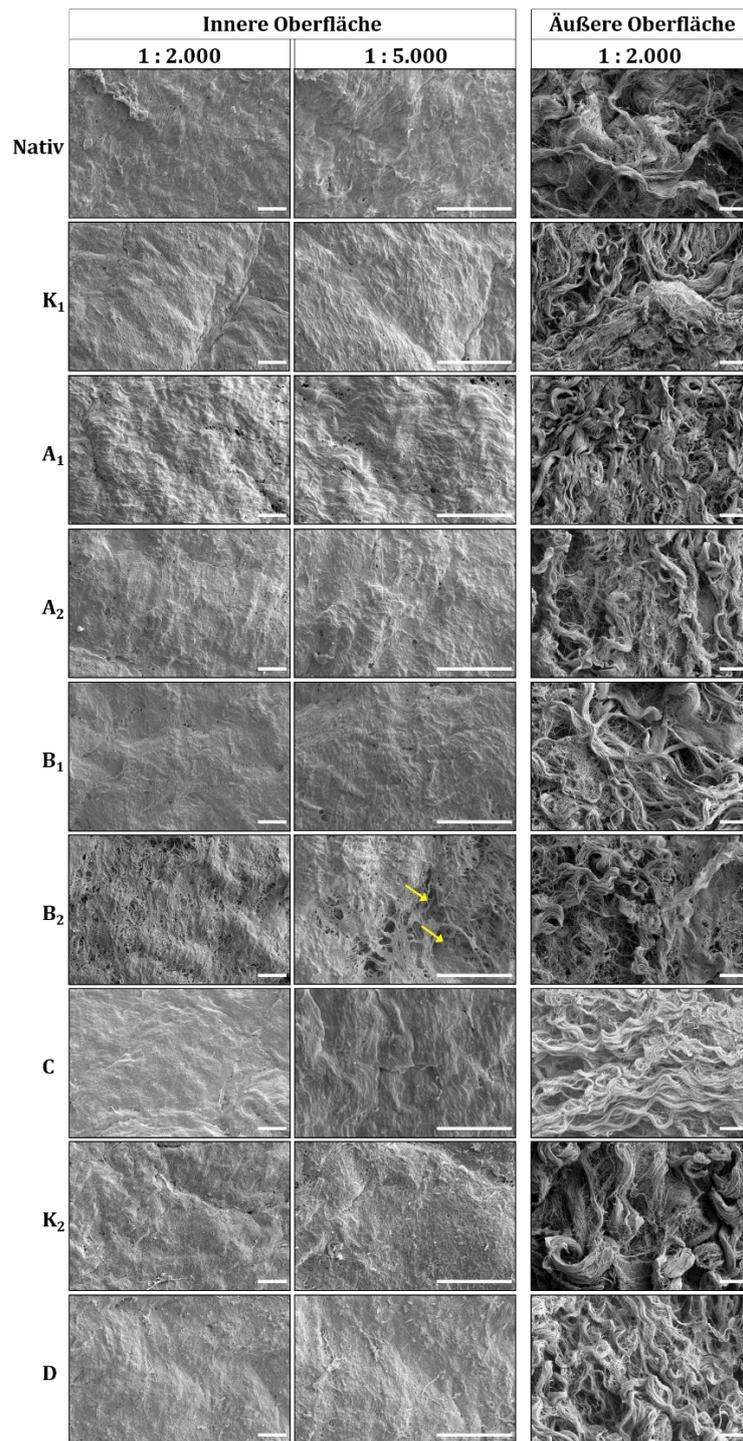


Abbildung 4-7: REM Analyse

Die Abbildung zeigt die inneren Oberflächen der AW in 2.000-facher und, zur detaillierteren Beurteilung, auch in 5.000-facher Vergrößerung, ferner ihre äußeren Oberflächen in 2.000-facher Vergrößerung. Die inneren Oberflächen der nativen Proben waren von einer geschlossenen Zellschicht bedeckt, in einzelnen Arealen wurde das darunterliegende Fasernetzwerk der EZM sichtbar. Die Aufnahmen der äußeren Oberflächen der Nativproben zeigten wellige Faserbündel unterschiedlichen Ausmaßes. Die Topographie der inneren Oberflächen war in den Gruppen K₁, A₁, A₂, B₁, C, K₂ und D mit der der Nativgruppe vergleichbar. Nur in Gruppe B₂ war das Fasernetzwerk der EZM in deutlich stärkerem Ausmaß freigelegt als in allen anderen Protokollen. Außerdem präsentierte sich die Struktur des Fasernetzwerkes in Gruppe B₂ weniger dicht und war von großen, unregelmäßigen Poren (gelbe Pfeile) durchzogen. Hinsichtlich der Topographie der äußeren Oberflächen war bei keiner der Gruppen ein Unterschied zur Nativgruppe zu detektieren. Maßstabsbalken: 20 µm.

4.4 Biomechanische Eigenschaften

Für die Untersuchung der biomechanischen Eigenschaften der Proben wurden direkt nach ihrer Entnahme uniaxiale Zugversuche durchgeführt. Die gemessenen Dicken der nativen Zugproben ($n = 23$) lagen dabei zwischen 1,78 mm und 2,83 mm, es ergab sich ein Mittelwert von $2,37 \pm 0,30$ mm. Die Mittelwerte der dezellularisierten Gruppen bewegten sich zwischen $2,22 \pm 0,17$ mm (A_1) und $2,29 \pm 0,17$ mm (K_2), für alle dezellularisierten Proben zusammen ergab sich ein Mittelwert von $2,25 \pm 0,18$ mm. Es war keine signifikante Veränderung der Probendicke durch DZ festzustellen.

Die Maximalkraft, der die Proben ohne zu zerreißen standhielten, betrug in der Nativgruppe $19,03 \pm 2,70$ N (**s. Tab. 4-4**). Bei fast allen dezellularisierten Gruppen war eine Zunahme dieser Maximalkraft zu beobachten. Die einzige Ausnahme davon stellte die Kontrollgruppe K_1 dar, bei der die Maximalkraft unter der der Nativgruppe lag ($-0,44$ %; **s. Tab. 4-4, Abb. 4-8**). Unter Betrachtung der Versuchsgruppen A_1 , A_2 , B_1 , B_2 und C wies die Gruppe B_1 , die mit einem einmaligen Einfrierschritt bei -32 °C behandelt worden war, den größten und dabei höchst signifikanten Unterschied zur Nativgruppe auf ($+24,62$ %, $p \leq 0,001$; **s. Tab. 4-4, Abb. 4-8**). Am nächsten zum Wert der Nativgruppe lag hingegen die Maximalkraft der Gruppe A_2 , die einen fünffachen Einfrierzyklus bei -196 °C durchlaufen hatte ($+4,11$ %; **s. Tab. 4-4, Abb. 4-8**). Die Ergebnisse der anderen Gruppen bewegten sich zwischen den Werten dieser beider Gruppen, die Unterschiede hierbei teilweise von statistischer Signifikanz (A_1 : $+14,98$ %, $p \leq 0,05$; B_2 : $+15,66$ %, $p \leq 0,05$; C: $+23,61$ %; **s. Tab. 4-4, Abb. 4-8**). Auch bei den Protokollen mit längeren DZ Dauern (D und K_2) zeigte sich eine Zunahme der Maximalkraft, allerdings ohne statistische Signifikanz (D : $+0,64$ %; K_2 : $+21,00$ %; **s. Tab. 4-4, Abb. 4-8**).

Setzte man die Maximalkraft in Bezug zum anfänglichen Probenquerschnitt, betrug die größte mechanische Zugspannung, der die Nativproben standhielten, im Durchschnitt $2,03 \pm 0,35$ N/mm² (**s. Tab. 4-4**). Im Vergleich dazu zeigte sich hier bei ausnahmslos allen dezellularisierten Gruppen eine Zunahme der Zugfestigkeit der AW, auch bei der Kontrollgruppe K_1 ($+3,26$ %; **s. Tab. 4-4, Abb. 4-8**). Analog zu den Absolutwerten der Maximalkraft war unter den Versuchsgruppen A_1 , A_2 , B_1 , B_2 und C abermals in Gruppe B_1 der größte und dabei signifikante Unterschied zur Nativgruppe zu verzeichnen ($+32,29$ %, $p \leq 0,01$), in Gruppe A_2 dagegen der kleinste ($+7,81$ %; **s. Tab. 4-4, Abb. 4-8**). Die Ergebnisse der anderen Gruppen lagen zwischen denen von B_1 und A_2 , die Unterschiede hierbei durchweg von statistischer Signifikanz (A_1 : $+21,92$ %, $p \leq 0,01$;

B₂: +18,20 %, $p \leq 0,01$; C: +27,18 %, $p \leq 0,05$; s. **Tab. 4-4, Abb. 4-8**). Auch bei den Protokollen mit den längsten DZ Dauern (D und K₂) war ein Anstieg der Zugfestigkeit zu beobachten, dieser war allerdings nur bei Gruppe K₂ signifikant (D: +5,29 %; K₂: +23,67 %, $p \leq 0,05$; s. **Tab. 4-4, Abb. 4-8**). Insgesamt stützten diese Ergebnisse also die Resultate der absoluten Maximalkraftwerte und zeigten bis auf kleine Abweichungen die selben Tendenzen auf.

Die Bruchdehnung, also die Längenzunahme der Probe bezogen auf ihre Ausganglänge, betrug in der Nativgruppe $103,46 \pm 8,24$ % (**s. Tab. 4-5**). Bei fast allen dezellularisierten Gruppen war eine signifikante Abnahme der Bruchdehnung zu konstatieren. Die einzige Ausnahme hiervon bildete Protokoll C, das mittels osmotischem Schock behandelt worden war, denn hier wurde eine minimale Zunahme der Bruchdehnung (+0,24 %) festgestellt (**s. Tab. 4-5, Abb. 4-9**). Unter den Versuchsgruppen A₁, A₂, B₁, B₂ und C wich die Bruchdehnung der Gruppe C am wenigsten vom Wert der Nativgruppe ab. Der größte und dabei höchst signifikante Unterschied zur Nativgruppe konnte hingegen in Gruppe A₂ beobachtet werden (-22,41 %, $p \leq 0,001$; **s. Tab. 4-5, Abb. 4-9**). Die Ergebnisse der anderen Gruppen und auch der zugehörigen Kontrollgruppe K₁ lagen zwischen diesen Werten, die Unterschiede hierbei ausnahmslos statistisch signifikant (A₁: -17,26 %, $p \leq 0,001$; B₁: -12,94 %, $p \leq 0,001$; B₂: -22,27 %, $p \leq 0,001$; K₁: -20,39 %, $p \leq 0,001$; **s. Tab. 4-5, Abb. 4-9**). Auch bei den Protokollen mit den längsten DZ Dauern (D und K₂) war eine signifikante Reduktion der Bruchdehnung im Vergleich zum Nativzustand erkennbar (D: -18,25 %, $p \leq 0,001$; K₂: -7,28 %, $p \leq 0,05$; **s. Tab. 4-5, Abb. 4-9**).

Tabelle 4-4: MW der Kraft F_{max} [N und N/mm²] und dessen Differenz zum MW der Nativgruppe
 Daten: Mittelwerte \pm Standardabweichung aus n = 23 AW (Nativgruppe) bzw. jeweils n = 10 AW (dezellularisierte Gruppen) sowie Differenzen dieser MW zum MW der Nativgruppe. Signifikanzlevels: * = $p \leq 0,05$ (signifikant); ** = $p \leq 0,01$ (hoch signifikant); *** = $p \leq 0,001$ (höchst signifikant).

MW der Kraft F_{max} und Differenz zur Nativgruppe			
		Kraft F_{max} [N]	
		Kraft F_{max} [N/mm²]	
Nativgruppe		19,03 \pm 2,70 2,03 \pm 0,35	
Physikalische DZ Methoden			
		Kraft F_{max} [N]	Differenz zur Nativgruppe [%]
		Kraft F_{max} [N/mm²]	
Kontrollgruppe	K₁	18,94 \pm 3,53 2,10 \pm 0,37	-0,44 % +3,26 %
Schockfrieren bei -196°C	A₁	21,88 \pm 3,91 2,48 \pm 0,50	+14,98 %* +21,92 %**
	A₂	19,81 \pm 4,22 2,19 \pm 0,53	+4,11 % +7,81 %
Langsames Einfrieren bei -32°C	B₁	23,71 \pm 3,91 2,69 \pm 0,49	+24,62 %*** +32,29 %**
	B₂	22,01 \pm 4,27 2,40 \pm 0,31	+15,66 %* +18,20 %**
Osmotischer Schock	C	23,52 \pm 6,24 2,58 \pm 0,59	+23,61 % +27,18 %*
Modifizierung eines vorbestehenden Protokolls			
		Kraft F_{max} [N]	Differenz zur Nativgruppe [%]
		Kraft F_{max} [N/mm²]	
Kontrollgruppe	K₂	23,02 \pm 5,37 2,51 \pm 0,57	+21,00 % +23,67 %*
Zusätzlicher einfacher Schockfrierzyklus	D	19,15 \pm 3,97 2,14 \pm 0,38	+0,64 % +5,29 %

Tabelle 4-5: MW der Bruchdehnung [%] und dessen Differenz zum MW der Nativgruppe

Daten: Mittelwerte \pm Standardabweichung aus n = 23 AW (Nativgruppe) bzw. jeweils n = 10 AW (dezellularisierte Gruppen) sowie Differenzen dieser MW zum MW der Nativgruppe. Signifikanzlevels: * = $p \leq 0,05$ (signifikant); ** = $p \leq 0,01$ (hoch signifikant); *** = $p \leq 0,001$ (höchst signifikant).

MW der Bruchdehnung und Differenz zur Nativgruppe			
		Bruchdehnung [%]	
Nativgruppe		103,46 \pm 8,24	
Physikalische DZ Methoden			
		Bruchdehnung [%]	Differenz zur Nativgruppe [%]
Kontrollgruppe	K₁	82,37 \pm 7,78	-20,39 %***
Schockfrieren bei -196°C	A₁	85,61 \pm 4,17	-17,26 %***
	A₂	80,28 \pm 8,39	-22,41 %***
Langsames Einfrieren bei -32°C	B₁	90,08 \pm 4,56	-12,94 %***
	B₂	80,42 \pm 8,99	-22,27 %***
Osmotischer Schock	C	103,71 \pm 12,32	+0,24 %
Modifizierung eines vorbestehenden Protokolls			
		Bruchdehnung [%]	Differenz zur Nativgruppe [%]
Kontrollgruppe	K₂	95,93 \pm 7,77	-7,28 %*
Zusätzlicher einfacher Schockfrierzyklus	D	84,58 \pm 6,68	-18,25 %***

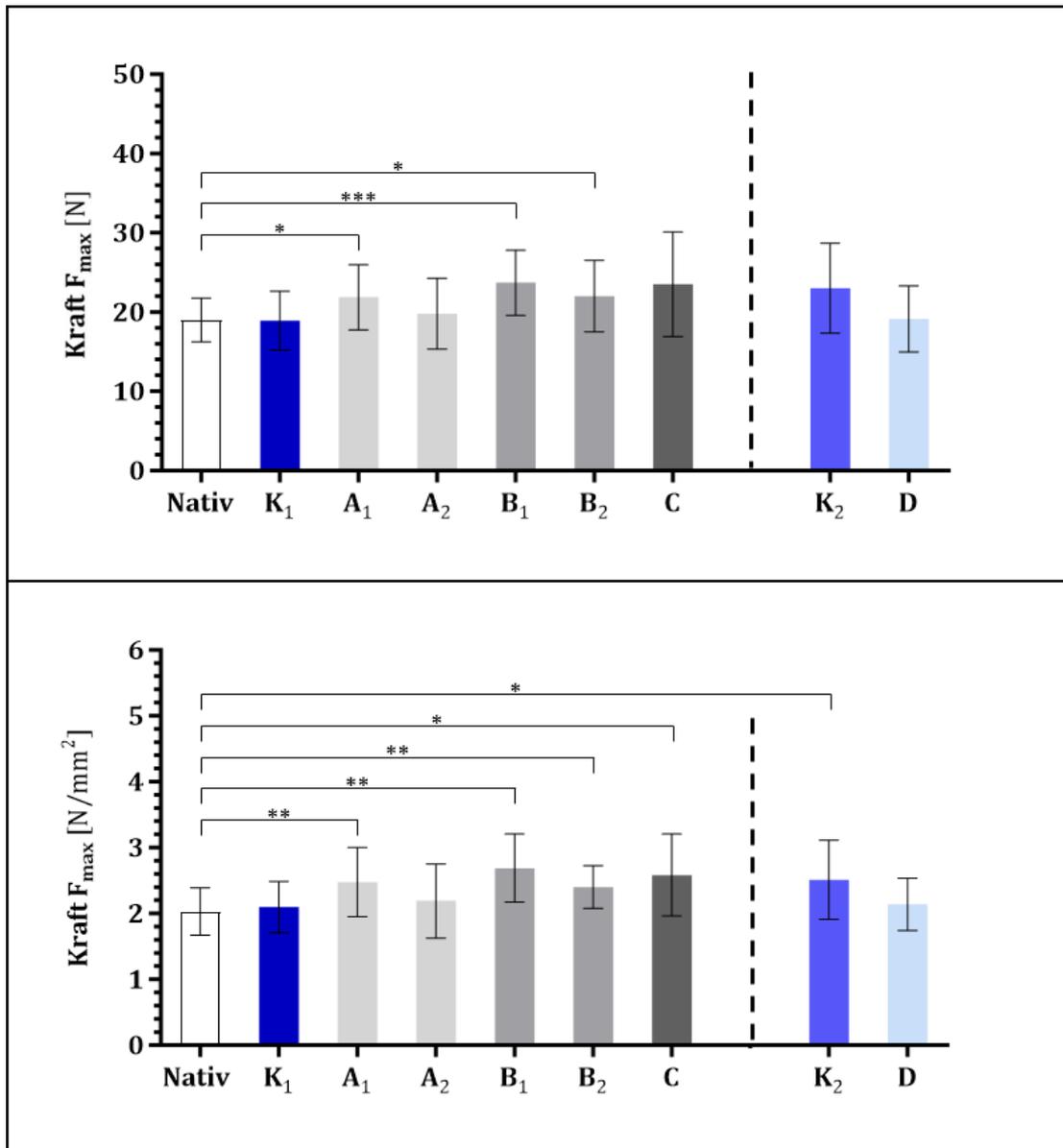


Abbildung 4-8: Kraft F_{max} [N und N/mm²]

Oben: Kraft F_{max} [N]. **Unten:** Kraft F_{max} [N/mm²]. Die native und die dezellulierten Gruppen sind auf der jeweiligen x-Achse aufgetragen, die F_{max} auf der jeweiligen y-Achse. □ Nativgruppe; ■ K₁ = Kontrollgruppe der Gruppen A₁, A₂, B₁, B₂ und C (ohne physikalische Vorbehandlung); ■ Schockfrieren bei -196 °C (A₁ = einfach, A₂ = zyklisch); ■ langsames Einfrieren bei -32 °C (B₁ = einfach, B₂ = zyklisch); ■ C = osmotischer Schock; ■ K₂ = Kontrollgruppe der Gruppe D (ohne physikalische Vorbehandlung); ■ D = Modifizierung eines bestehenden Protokolls (zusätzlicher einfacher Schockfrierzyklus). Signifikanzlevels: * = p ≤ 0,05 (signifikant); ** = p ≤ 0,01 (hoch signifikant); *** = p ≤ 0,001 (höchst signifikant). Daten: Darstellung der Mittelwerte ± Standardabweichung aus n = 23 AW (Nativgruppe) bzw. jeweils n = 10 AW (dezellulierte Gruppen). Im Vergleich zur Nativgruppe war hinsichtlich der Kraft F_{max} [N] in den Gruppen A₁, B₁ und B₂ eine signifikante Zunahme zu beobachten, hinsichtlich der Kraft F_{max} [N/mm²] in den Gruppen A₁, B₁, B₂, C und K₂.

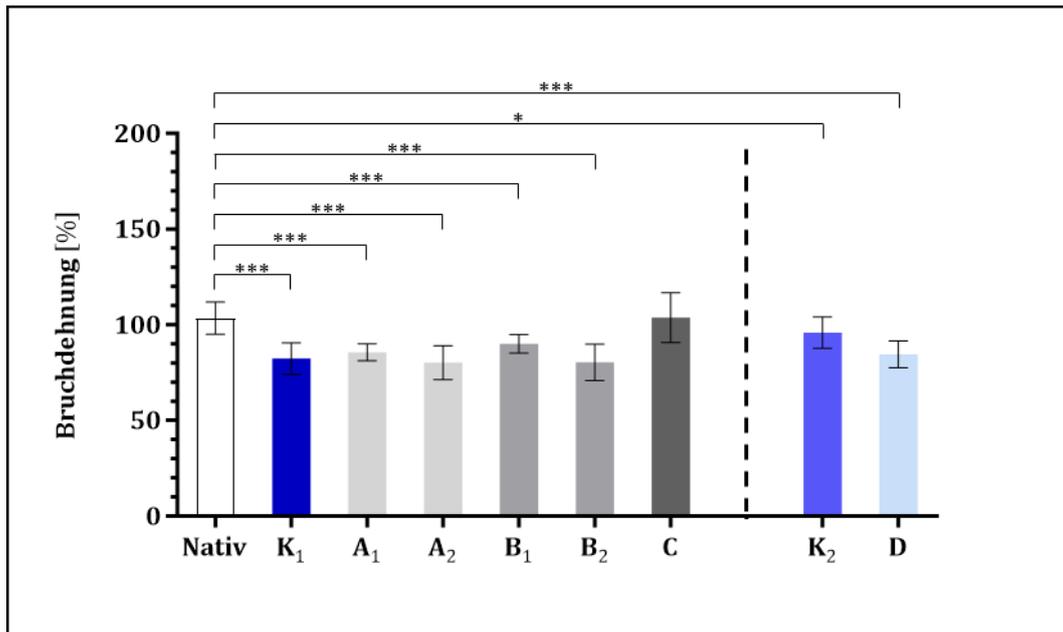


Abbildung 4-9: Bruchdehnung [%]

Die native und die dezellularisierten Gruppen sind auf der x-Achse aufgetragen, die Bruchdehnung auf der y-Achse. □ Nativgruppe; ■ K₁ = Kontrollgruppe der Gruppen A₁, A₂, B₁, B₂ und C (ohne physikalische Vorbehandlung); ■ Schockfrieren bei -196 °C (A₁ = einfach, A₂ = zyklisch); ■ langsames Einfrieren bei -32 °C (B₁ = einfach, B₂ = zyklisch); ■ C = osmotischer Schock; ■ K₂ = Kontrollgruppe der Gruppe D (ohne physikalische Vorbehandlung); ■ D = Modifizierung eines bestehenden Protokolls (zusätzlicher einfacher Schockfrierzyklus). Signifikanzlevels: * = p≤0,05 (signifikant); ** = p≤0,01 (hoch signifikant); *** = p≤0,001 (höchst signifikant). Daten: Darstellung als Mittelwerte aus n = 23 AW (Nativgruppe) bzw. n = 10 AW (dezellularisierte Gruppen) ± Standardabweichung. Im Vergleich zur Nativgruppe war in den Gruppen K₁, A₁, A₂, B₁, B₂, K₂ und D eine signifikante Abnahme der Bruchdehnung zu beobachten.

5 DISKUSSION

Dezellularisierte Scaffolds sind ein vielversprechender Ansatz in der Entwicklung biokompatibler Zellträgersysteme im Tissue Engineering. Ziel der vorliegenden Arbeit war die systematische Evaluation ausgewählter physikalischer DZ Methoden betreffend die Eliminierung zellulärer Bestandteile und den Erhalt der EZM am Beispiel porciner Aorten. Hierbei erwies sich das einmalige Schockfrieren bei -196 °C dem einmaligen langsameren Einfrieren bei -32 °C als überlegen. Dagegen wurde das DZ Ergebnis weder durch die zyklische fünffache Durchführung der Einfrier-Auftau-Vorgänge noch durch den osmotischen Schock verbessert. Die Integration der aussichtsreichsten physikalischen DZ Methode (einmaliges Schockfrieren bei -196 °C) in ein vorbestehendes Protokoll unserer Arbeitsgruppe zeigte das Potential zur Optimierung gängiger DZ Verfahren durch die Kombination mit einem einmaligen Schockfrierzyklus auf.

Betreffend die Zelleliminierung waren in der vorliegenden Arbeit die mittels DAPI Fluoreszenz bestimmten EDT den Ergebnissen der DNA-Quantifizierung überlegen. Anhand der DNA-Quantifizierung war bei den meisten Versuchsgruppen keine Reduktion des DNA-Gehalts durch DZ nachzuweisen. Dies ist vermutlich auf die relevante Menge residualer Zellkernkomponenten nach DZ zurückzuführen, sodass die DNA-Messwerte nativer und dezellularisierter AW Proben sehr dicht beieinander lagen und v.a. die natürlichen Schwankungen der DNA-Konzentration zwischen und innerhalb individueller Aorten abbildeten. Diese spiegeln sich in den inkonstanten Ergebnissen früherer Veröffentlichungen wider, die eine Spannbreite der DNA-Messwerte in nativen porcinen Aorten von $86 \pm 47\text{ ng/mg}$ [155] bis $453 \pm 84\text{ ng/mg}$ [156] angegeben haben. O'Connor Mooney et. al. haben in Proben unterschiedlicher Stellen derselben nativen porcinen Aorta DNA-Gehalte zwischen 223 und 522 ng/mg festgestellt [157]. In der vorliegenden Arbeit war daher ein Vergleich der Gruppen anhand der DNA-Quantifizierung nur schwer möglich. In künftigen Studien könnte zum Beispiel die gelelektrophoretische Bestimmung der DNA-Fragmentlänge ergänzt werden, um eine suffiziente DZ sicherzustellen [56].

In der vorliegenden Arbeit erwies sich der einmalige Einfrier-Auftau-Prozess bei -196 °C gegenüber dem bei -32 °C hinsichtlich des DZ Ergebnisses als überlegen.

Ein primäres Ziel der DZ ist die möglichst effektive Eliminierung zellulärer Komponenten, um das Risiko der immunologischen Transplantatabstoßung zu minimieren [57]. Die DAPI Fluoreszenz ergab in A₁ (1x -196 °C) eine signifikante Zunahme der EDT_i (+27,54 %, p≤0,001) und EDT_a (+23,17 %, p≤0,01) vs. Kontrollgruppe K₁. Da die EDT der DZ mit der Effektivität der jeweiligen DZ Methode korreliert, legen diese Ergebnisse nahe, dass zusätzliches einmaliges Schockfrieren eine effektivere Zelleliminierung aus den AW ermöglicht. Im direkten Vergleich mit dem einmaligen Einfrieren bei -32 °C war das einmalige Schockfrieren überlegen: In B₁ (1x -32 °C) konnte keine signifikante Zunahme der EDT_i (+2,73 %) und EDT_a (+19,34 %) beobachtet werden, außerdem war die EDT_i in A₁ signifikant größer als in B₁ (+24,15 %, p≤0,01).

Auffälliger Weise lag die EDT_a um durchschnittlich 54,96 % (p≤0,01) über der jeweiligen EDT_i. Als mögliche Erklärung haben Penn et. al. gezeigt, dass die Lamina elastica interna als Diffusionsbarriere den Transport von Makromolekülen durch die Arterienwand behindert [158]. Somit wäre das Eindringen der DZ Agenzien an der inneren Oberfläche der AW erschwert. Der Zugewinn der EDT_i durch Vorbehandlung in flüssigem Stickstoff suggeriert, dass diese Methode das anschließende Durchdringen der Lamina elastica interna durch Detergenzien erleichtert und eine effektivere DZ ermöglicht.

Der DNA-Gehalt der Nativproben lag in den einzelnen Gruppen durchschnittlich zwischen 319,28 ± 86,48 (A₂) und 681,36 ± 141,10 ng/mg (K₂). Hieran wird die starke natürliche Streuung der DNA-Werte deutlich. Insgesamt lagen diese in der Größenordnung vergleichbarer Literaturwerte: O'Conner Mooney et. al. haben z.B. einen DNA-Gehalt nativer porciner Aorten von 220 – 351 ng/mg wet weight (n = 3) beschrieben [157]. Zwar war in Gruppe B₁ der vorliegenden Arbeit im Gegensatz zu A₁ nach DZ eine signifikante Reduktion des DNA-Gehalts (A₁: +28,71 %; B₁: -27,98 %, p≤0,001) erkennbar, diese zeigte allerdings nur unterstützend zur DAPI Fluoreszenz eine Tendenz in die gleiche Richtung. Aus den o.g. Gründen lag der Fokus bei der Auswertung der Zelleliminierung auf den mittels DAPI Fluoreszenz bestimmten EDT und nicht auf der DNA-Quantifizierung. Somit erwies sich das einmalige Schockfrieren im Vergleich zum einmaligen Einfrieren bei -32 °C als effektiver, v.a. hinsichtlich der DZ an den inneren Oberflächen.

Die Ergebnisse stehen im Einklang mit zahlreichen Veröffentlichungen zum positiven Effekt von Einfrier-Auftau-Vorgängen auf das DZ Ergebnis. So ist z.B. die Zellentfernung bei der DZ langer Sehnen, aber auch porciner Gefäßprothesen signifikant verbessert worden [125]. Dies könnte eine *in vivo* Reduktion von inflammatorischer Immunreaktion

und Kalzifizierung sowie ein verstärktes Einwachsen von Zellen in den Graft bewirken, wodurch EZM Synthese und Vaskularisierung begünstigt werden [123].

Für eine erfolgreiche DZ ist allerdings nicht nur der Grad der Zelleliminierung entscheidend, sondern auch der bestmögliche Erhalt der Zusammensetzung, strukturellen Integrität und Bioaktivität der EZM [56]. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die EZM Beschaffenheit der AW umfassend untersucht. Weder auf licht- noch auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen ließen sich durch einmaliges Schockfrieren bedingte EZM Schäden detektieren, vielmehr waren diese Bilder mit denen der Kontrollgruppe K₁ vergleichbar. H&E und MPC Färbungen von A₁ bestätigten den weitestgehenden Erhalt des dreischichtigen Wandbaus und der einzelnen EZM Komponenten. In Anordnung und Verlauf der Bindegewebsfasern waren in A₁ vs. K₁ kaum Veränderungen zu erkennen. Auch hier zeichnete sich ein Vorteil des Schockfrierens im Vergleich zum Einfrieren bei -32 °C ab, da in B₁ im Gegensatz zu A₁ in geringem Maße Fragmentierungen der elastischen Fasern registriert wurden. In der PSR Färbung wurde ersichtlich, dass nach einmaligem Einfrierschritt Menge, Anordnung und Heterogenität der Kollagenfasern erhalten blieben, die entscheidend für Zugfestigkeit und Flexibilität der Aorta sind [159]. Diese hängen nicht nur von der Menge der Kollagenfasern, sondern auch von ihrer räumlichen Anordnung und mechanischen Interaktionen ab [154].

Prägnantester Unterschied im Vergleich zur Nativgruppe war in allen histologischen Färbungen eine wabenförmige Auflockerung der Gewebestrukturen, von der meist nur die äußeren, kernfreien Schichten betroffen waren. Diese bullöse Veränderung war allerdings auch in der Kontrollgruppe K₁ zu beobachten und ist somit nicht auf die physikalische Vorbehandlung zurückzuführen. Vielmehr scheint sie ein Phänomen nach Behandlung mit DZ Protokollen darzustellen, die chemische Detergenzien wie SDS enthalten. So haben Huang et al. Lücken zwischen Kollagenfasern nach SDS-basierter DZ humaner Patellarsehnen beschrieben [160]. Auch Cartmell et. al. haben ähnliche Veränderungen dezellularisierter muriner Sehnen festgestellt, die sie auf die verwendeten chemischen Detergenzien, a.e. SDS, zurückgeführt haben [161]. Diese Annahme deckt sich damit, dass sich die in den Gruppen A₁ und B₁ der vorliegenden Arbeit beobachteten Gewebeauflockerungen weitgehend auf die äußeren, kernfreien Bereiche beschränkten, also auf die Schichten, in die Detergenzien vordringen konnten. Einerseits legt eine solche Veränderung der Faserstrukturen eines Gewebes auch die Beeinträchtigung seiner mechanischen Stabilität nahe. In der vorliegenden Studie wurde

allerdings keine reduzierte mechanische Belastbarkeit der dezellularisierten Proben detektiert. Andererseits könnten die aufgelockerten Faserstrukturen den Zugang von Zellen und Nährstoffen erleichtern und somit das Remodelling des Grafts unterstützen [160]. Diese Fragestellung sollte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

Zusätzlich zu den histologischen Färbungen wurde die REM zur Beurteilung der EZM herangezogen. Auch die innere Oberflächentopographie hatte durch das einmalige Einfrieren keine erkennbaren Schäden genommen, die fein verzweigte Faserstruktur der EZM präsentierte sich in A₁ und B₁ homogen und mit der der Kontrollgruppe K₁ sowie der Nativgruppe vergleichbar. Diese Beobachtungen decken sich mit denen anderer Arbeitsgruppen: Z.B. haben Kobayashi et. al. die elektronenmikroskopisch sichtbare Bewahrung der luminalen Bindegewebsfaserstruktur dezellularisierter porciner Aorten beschrieben, deren DZ Protokoll ebenfalls auf Einfrier-Auftau-Vorgängen basiert ist [162]. Die Tatsache, dass auch bei der Nativgruppe der vorliegenden Arbeit an manchen Stellen das Fasernetzwerk der EZM freilag, impliziert, dass diese Veränderungen nicht zwingend dezellularisationsbedingt sind: Ursache könnten auch unvermeidbare Präparationsschäden sein oder der Gesundheits- und damit der Endothelzustand des individuellen Tiers, aus dem die untersuchte Aorta entnommen worden war.

Zur Evaluation der biomechanischen Eigenschaften wurden uniaxiale Zugversuche durchgeführt. Dabei wurden die Bruchdehnung der Proben und die Maximalkraft ermittelt, der sie ohne zu zerreißen standhielten. Andere Studien haben diese Werte als größte mechanische Zugspannung in der Einheit N/mm² bzw. MPa angegeben, bezogen auf den initialen Probenquerschnitt [142, 157, 163]. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde die Maximalkraft auch in der vorliegenden Arbeit in dieser Einheit angegeben. Ein mögliches Szenario besteht allerdings darin, dass ein Biomaterial einer hohen relativen Maximalkraft bzw. Zugspannung (N/mm²) standhält, aber nur einer niedrigen absoluten Maximalkraft (N) [164]. Im klinischen Einsatz kommt es zum Implantatversagen, wenn die *in vivo* wirkende Kraft die absolute Zugfestigkeit des Materials übersteigt. Deswegen ist die Berücksichtigung der absoluten Zugfestigkeit eines Biomaterials unerlässlich, um eine zuverlässige Prognose bezüglich des klinischen Verhaltens zu erstellen.

Die größte mechanische Zugspannung, der in der vorliegenden Arbeit die Nativproben standhielten, betrug im Durchschnitt $2,03 \pm 0,35$ N/mm², die entsprechende Bruchdehnung $103,46 \pm 8,24$ %. Dabei entsprachen diese Werte denen in der Literatur: Für zirkumferentielle Zugproben aus nativen porcinen Aorten haben z.B. O'Connor

Mooney et. al. eine durchschnittliche Zugfestigkeit von 4,7 MPa und Bruchdehnungswerte von 214 - 244 % gemessen, Liu et. al. im Mittel Zugfestigkeiten von ca. 1 MPa und Bruchdehnungen von ca. 150 % [123, 157].

Im Vergleich zur Nativgruppe ließ sich in der vorliegenden Arbeit bei fast allen dezellularisierten Gruppen eine Zunahme der Maximalkraft (Ausnahme: K₁) und eine Abnahme der Bruchdehnung (Ausnahme: C) nachweisen. Die Stabilität der EZM wurde also bei allen DZ Protokollen bewahrt. Diese Ergebnisse widersprechen denen anderer Arbeitsgruppen, die eine Abnahme der mechanischen Zugfestigkeit im Zusammenhang mit EZM Schäden nach DZ beschrieben haben [83, 119]. Andere Publikationen haben dagegen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigt [129, 165].

Für gute Biokompatibilität ist es wichtig, dass Biomaterialien die native EZM u.a. in ihren mechanischen Eigenschaften bestmöglich imitieren [86]. Diesbezüglich zeigte sich allerdings in fast allen Gruppen der vorliegenden Arbeit eine Diskrepanz zwischen Maximalkraft und Bruchdehnung: Wenn die Maximalkraft einer Gruppe nahe der des Nativkollektivs lag, unterschied sich die entsprechende Bruchdehnung umso deutlicher vom Nativwert und umgekehrt. So war unter den physikalischen Vorbehandlungen die Bruchdehnung in B₁ (1 x -32 °C) der der Nativgruppe relativ ähnlich (-12,94 %, p≤0,001), allerdings unterschied sich hier die Maximalkraft am deutlichsten von der nativen (+24,62 %, p≤0,001). Einzig die Gruppe A₁ (1 x -196 °C) wies relativ ausgewogene biomechanische Eigenschaften auf, denn keiner der beiden Werte wich in ein negatives Extrem ab: Im Vergleich zur Nativgruppe lag die Bruchdehnung in A₁ innerhalb der Werte der physikalischen Vorbehandlungen im Mittelfeld (-17,26 %, p≤0,001), die Maximalkraft war der der Nativgruppe am zweitähnlichsten (+14,98 %, p≤0,05). Daraus wird deutlich, dass einmaliges Schockfrieren unter den analysierten physikalischen Methoden in den homogensten mechanischen Ergebnissen resultiert und damit auch hinsichtlich der Biomechanik für die künftige *in vivo* Applikation am geeignetsten erscheint.

Eine mögliche Erklärung für die Zunahme der Gewebesteifigkeit nach DZ haben Williams et. al. aus der Methodes des sogenannten „Small-angle light scattering“ (SALS) abgeleitet, einer quantitativen Technik zur Überprüfung der Faserkinematik [129]. Im unbelasteten Zustand hat sich die Faserausrichtung nativer Kaninchen-Karotiden hier als einheitlich orientiert erwiesen, die dezellularisierter Proben dagegen als deutlich desorganisierter. Nachdem das Gewebe einer Zug- und Druckbelastung ausgesetzt worden war, haben die nativen Proben weiterhin eine gleichförmig angeordnete Faserstruktur gezeigt.

Allerdings haben sich nun auch die Fasern der dezellularisierten Proben einheitlich ausgerichtet, und zwar in Richtung der applizierten Belastung. Auf diese Beobachtungen haben Williams et. al. die Hypothese gestützt, dass in nativem, strukturell unversehrtem Gewebe zahlreiche Faser-Faser- bzw. Zell-Faser-Interaktionen eine Faserorientierung in Richtung der Belastung verhindern, woraus eine höhere Nachgiebigkeit des Gewebes resultiert. Im Gegensatz dazu könnte die kompromittierte strukturelle Integrität des Fasernetzwerks dezellularisierter Proben zu einer erhöhten Fasermobilität führen, die die Rekrutierung der Fasern durch ihre Rotation in Richtung der Belastung erlaubt. Daraus ergibt sich eine erhöhte Steifheit des dezellularisierten Gewebes. [129]

Aus diesen Beobachtungen wird deutlich, dass eine Beschädigung der EZM nicht nur die Abnahme sondern auch die Zunahme der Zugfestigkeit eines Gewebes bedingen kann. Abweichungen der Gewebecompliance eines vaskulären Grafts von der des Nativgefäßes ziehen möglicherweise hämodynamische Veränderungen nach sich, die zur aggressiven Entwicklung einer neointimalen Hyperplasie bis hin zum Transplantatversagen führen können [166]. Auch das Verhalten einwandernder Zellen einschließlich Adhäsion, Migration und Proliferation hängt von veränderten Matrixstrukturen, Faserorganisation und Gewebesteifigkeit ab [167-169]. Zukünftige Studien sollten daher untersuchen, ob veränderte Struktur-Funktionsbeziehungen das *in vivo* Verhalten dezellularisierter Gefäßprothesen tatsächlich negativ beeinflussen [129].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass das Schockfrieren mit intrazellulärer Eiskristallbildung dem Einfrieren bei -32 °C mit extrazellulärer Eiskristallbildung als physikalische DZ Methode vorzuziehen ist, da es nicht nur das zeitsparendere Verfahren darstellt sondern auch mit effektiverer Zelleliminierung und tendenziell besserem Erhalt der EZM einhergeht. Außerdem führte das einmalige Schockfrieren im Rahmen der untersuchten Methoden zu den ausgewogensten biomechanischen Eigenschaften. Einen Ansatzpunkt für auf der vorliegenden Arbeit aufbauende Untersuchungen könnte der Einfluss der Auftaugeschwindigkeit auf das DZ Ergebnis darstellen, denn Mazur et. al. implizieren eine Abhängigkeit der Zellschädigung auch von diesem Faktor [134].

Unabhängig von der Einfriertemperatur erwies sich in der vorliegenden Arbeit die einmalige als der fünfmaligen Durchführung der Einfrier-Auftau-Zyklen überlegen.

Die fünffachen Einfrier-Auftau-Zyklen hatten eine effektivere Zelleliminierung zu Folge als die einfachen Einfrierschritte: Durch die fünffache Durchführung der Einfrier-Auftau-

Vorgänge ließ sich sowohl bei -196 °C als auch bei -32 °C eine Zunahme der EDT beobachten. Diese war allerdings nur an der äußeren Oberfläche bei -32 °C signifikant (+29,64 %, $p \leq 0,05$). Zwar stieg die EDT_a auch durch zyklische Durchführung des Schockfrierens, dieser Unterschied war allerdings statistisch nicht signifikant (+14,38 %). Auch die Zugewinne an EDT_i waren im Vergleich mit den einfachen Einfrierschritten nicht signifikant (-196 °C: +1,30 %; -32 °C: +2,98 %). Die These, dass die Effektivität der Zelleliminierung durch die zyklische Durchführung von Einfrierschritten zu steigern ist, konnte also in der vorliegenden Arbeit nicht uneingeschränkt bestätigt werden.

Auch bezüglich des EZM Erhalts lieferte das zyklische Einfrieren keine überzeugenden Ergebnisse: Nach fünfmaligem Schockfrieren waren schon makroskopisch deutliche Risse in den Gefäßwänden erkennen, ein Befund, der sich bei keiner anderen Gruppe bestätigen ließ. Auch mikroskopisch wiesen A₂ und B₂ im Vergleich zu den anderweitig physikalisch vorbehandelten AW wesentlich größere EZM Schäden auf. Die bullöse Auflockerung der EZM in den histologischen Färbungen beschränkte sich bei diesen beiden Gruppen nicht auf die kernfreien Areale, sondern reichte oft bis in die inneren Gewebeschichten und ging zusätzlich mit porenartigen Strukturzerstörungen einher. Außerdem wurde in den H&E und MPC Färbungen in zahlreichen Proben eine Fragmentierung der Kollagen- und Elastinfasern beobachtet. Diese gilt in der Aneurysma-Pathogenese als entscheidender Faktor [170]. Da die o.g. Veränderungen der EZM Beschaffenheit in der Kontrollgruppe K₁ der vorliegenden Arbeit nicht zu sehen waren, sind diese nicht allein auf die Effekte einer Behandlung mit chemischen Detergenzien zurückzuführen, sondern dürften direkt durch die jeweilige physikalische Vorbehandlung bedingt sein.

Die REM Aufnahmen der Gruppe B₂ unterschieden sich im Gegensatz zu allen anderen Protokollen deutlich von den Bildern der Nativ- bzw. Kontrollgruppe. Die EZM Fasern schienen durch das fünffache Einfrieren bei -32 °C in ihrer Struktur besonders stark angegriffen, denn das Fasernetzwerk war weniger dicht und mit zahlreicheren und größeren Poren durchzogen als bei den anderen Gruppen. In Gewebestrukturen können offene Poren auch positive Aspekte mit sich bringen, denn sie sind essentiell für Zellbindung und Zellmigration und beeinflussen Ausmaß und Eindringtiefe zellulärer Rebesiedelung [171, 172]. Dabei ist allerdings eine einheitliche und verbundene Struktur des Porennetzwerkes wichtig, um neue Gewebebildung zu lenken und zu fördern [173, 174]. Die Poren in B₂ schienen jedoch eher unregelmäßig, unverbunden und uneinheitlich verteilt, was der zellulären Besiedlung wiederum weniger zuträglich ist [123].

Das Ziel eines EZM Erhalts durch die Behandlung mit mehrfachen Einfrierzyklen wurde demnach verfehlt: Die makroskopisch sichtbaren Risse der AW nach fünfmaligem Schockfrieren disqualifizieren diese bereits für den Einsatz als Gefäßprothesen. Doch auch die durch das zyklische Einfrieren bei -32 °C verursachten ultrastrukturellen Schäden könnten sich negativ auf eine zukünftige *in vivo* Applikation auswirken, da die Integrität der EZM nicht nur für biomechanische Eigenschaften, sondern auch für das lokale Mikromilieu und Zellverhalten entscheidend ist [55, 56, 175]. Demzufolge kann, auch in Anbetracht des statistisch meist nicht signifikanten Zugewinns an EDT, eine zyklische, fünffache Durchführung der Einfrierprozesse weder bei -196 °C noch bei -32 °C empfohlen werden. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den Resultaten anderer Arbeitsgruppen. So haben z.B. Li et. al. DZ Protokolle von bovinem Perikard durch fünf Einfrier-Auftau-Zyklen in flüssigem Stickstoff ergänzt [83]. Hierdurch ist die DZ Effektivität bei guter Biokompatibilität und ausgezeichnetem Erhalt der EZM gesteigert worden. Burk et. al. haben eine effizientere Zelleliminierung aus großen equinen Sehnen durch zusätzliches fünfmaliges Schockfrieren beschrieben, ohne DZ-bedingte morphologische EZM Veränderungen [126]. Diese Ergebnisse konnten in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Die Ursache dieser Diskrepanz ist unklar. Eine hypothetische Erklärung liegt in der im Vergleich zu Sehne und Perikard weitaus höheren Komplexität der Aorta: Diese könnte als tubuläres Organ mit nicht nur elastischen sondern auch kontraktile Elementen Wandeigenschaften aufweisen, die sowohl die DZ erschweren als auch die AW anfälliger machen für die Beschädigung durch zyklische Einfrier-Auftau-Vorgänge. Basierend auf den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit erscheint es jedenfalls sinnvoll, für zukünftige Studien die nur einmalige Durchführung der Einfrier-Auftau-Zyklen zu favorisieren.

Auch eine sequenzielle hyper- und hypoosmolare Vorbehandlung der AW erwies sich in der vorliegenden Arbeit als ungeeignet, das DZ Ergebnis zu verbessern.

Die Ergebnisse der DAPI Fluoreszenz belegen, dass die Inkubation mit einer hyperosmolaren Lösung mit 50 % m/v Glukose, gefolgt von einer Behandlung in hypotonem VE Wasser, als einzige der untersuchten physikalischen Vorbehandlungen keinen Zusatznutzen hinsichtlich der DZ Effektivität erbrachte. Die Werte der EDT lagen in Gruppe C sogar unter denen der Kontrollgruppe K₁, diese Unterschiede waren allerdings statistisch nicht signifikant (EDT_a: -4,24 %; EDT_i: -7,50 %).

Eine mögliche Erklärung für den ausgebliebenen DZ Effekt der hyperosmolaren Glukoselösung könnte darin bestehen, dass die Glukoseaufnahme in den Intrazellulärraum von einem aktiven Zellstoffwechsel abhängt. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit zahlreiche Vorkehrungen getroffen, um die Zeitspanne zwischen Schlachtung der Tiere und Beginn der DZ der präparierten Aorten so kurz wie möglich zu halten und jegliche Stoffwechselprozesse drastisch zu verlangsamen. Dennoch legen die Ergebnisse nahe, dass in den AW keine Glukoseaufnahme ins Zellinnere mehr stattfinden konnte und die Exposition gegenüber hyperosmolarer Glukoselösung deshalb keine Wirkung zeigte. Allerdings blieb abgesehen davon auch die anschließende Inkubation mit hypotoner Lösung ohne Konsequenz. Eine solche Behandlung mit hypotoner Lösung stellt häufig einen Bestandteil in DZ Protokollen dar, ohne dass dabei eine gezielte Analyse ihrer spezifischen Auswirkungen erfolgt ist [129, 130]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen jedoch die sequenzielle Verwendung von hyper- und hypotonen Lösungen in DZ Protokollen zumindest von schwer dezellularisierbaren Geweben wie porcinen Aorten als unzureichend wirksam und damit als ungeeignet erscheinen.

Der Einsatz des osmotischen Schocks ist bereits von anderen Arbeitsgruppen untersucht worden, die vergleichbare Versuche mit salinen Lösungen durchgeführt haben, teilweise mit divergenten Ergebnissen. Einerseits ist durch Gardin et. al. so eine vollständige DZ von bovinem Perikard mit sehr gutem Erhalt der EZM und hoher Biokompatibilität erzielt worden, und auch Ishida et. al. haben eine erfolgreiche DZ von murinen Ischiasnerven unter Verwendung einer hypertonen Lösung beschrieben [85, 131]. Andererseits haben Oberwallner et. al. nach hypo- und hypertonen Behandlung von humanem Myokard eine insuffiziente DZ und damit einhergehende Schäden der Gewebearchitektur beobachtet, während von Elder et. al. negative Auswirkungen dieser Behandlung auf die funktionellen Eigenschaften von Knorpelgewebe festgestellt worden sind [132, 133]. Die Resultate der vorliegenden Arbeit wie auch die inkonstanten Literaturergebnisse verdeutlichen die Notwendigkeit einer gezielten Analyse der Effekte osmotisch wirksamer Lösungen auf das entsprechende Gewebe vor ihrem unkritischen Einsatz in DZ Protokollen.

Basierend auf den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wurde die aussichtsreichste Methode in ein bestehendes Protokoll integriert; hierbei verfehlte die Verkürzung der Expositionsdauer gegenüber chemischen Detergenzien zugunsten eines zusätzlichen

Einfrier-Auftau-Vorgangs bei -196 °C die durch das Ausgangsprotokoll erreichte vollständige Zellfreiheit der AW.

Auf der Grundlage der Ergebnisse der Gruppen A₁, A₂, B₁, B₂ und C wurde in der vorliegenden Arbeit ein weiteres Versuchsprotokoll D entwickelt. Unter den untersuchten physikalischen DZ Methoden wurde die mit den meistversprechenden Resultaten, also die des einmaligen Schockfrierens, ausgewählt und in ein bestehendes, ausschließlich detergenzien- und enzymbasiertes DZ Protokoll integriert. So sollte untersucht werden, ob durch die Kombination mit dem thermischen Verfahren die Verkürzung der Expositionsdauer gegenüber chemischen Detergenzien möglich ist, bei dennoch gleichbleibendem DZ Ergebnis. Denn obwohl chemische Detergenzien eine effektive Zelleliminierung ermöglichen, bergen sie das Risiko negativer Auswirkungen auf die EZM. In diesem Zusammenhang sind die Eliminierung von Wachstumsfaktoren, die Dissoziation von EZM Molekülen und die Zerstörung der EZM Ultrastruktur beschrieben worden [80, 176-180]. Eine Reduktion der Inkubationszeit mit Detergenzien sollte also eine Reduktion dieser schädlichen Nebeneffekte der chemischen DZ bewirken.

Das Ziel einer vollständigen Zellfreiheit, in der auch das Ausgangsprotokoll resultiert, wurde in Gruppe D der vorliegenden Arbeit verfehlt. Allerdings wies dieses Protokoll die größte EDT von allen auf. Auch konnte die Beobachtung, dass Schockfrieren in flüssigem Stickstoff eine signifikante Zunahme der EDT sowohl an der inneren als auch an der äußeren Oberfläche bewirkt, bestätigt werden: Die EDT_i lag in D um 14,34 % höher als in der zugehörigen Kontrollgruppe K₂ ($p \leq 0,05$), die EDT_a um 18,51 % ($p \leq 0,05$). Außerdem zeigte sich in D und K₂ erstmals eine höchst signifikante Reduktion des DNA-Gehalts, sowohl bei den Mittelwerten als auch bei jedem einzelnen Aortenpräparat (D: -70,90 %, $p \leq 0,001$; K₂: -63,07 %, $p \leq 0,001$). Diese Ergebnisse stützen die Hypothese, dass eine Reduktion des DNA-Gehalts umso besser durch DNA-Quantifizierung nachzuweisen ist, je kleiner die Menge residualer Zellkernkomponenten. Auf den elektronen- und lichtmikroskopischen Bildern schienen alle EZM Komponenten und Strukturen intakt.

Wahrscheinlich wurde in Protokoll D der vorliegenden Arbeit die Zeit der Exposition gegenüber den Detergenzien zu stark gekürzt, um das Ziel völlig zellfreier AW zu erreichen. Dennoch konnte der Mehrwert der Durchführung eines einmaligen Schockfrierzyklus in einem zuvor bereits etablierten DZ Protokoll bestätigt und das Potential dieses schonenden und zeitsparenden Verfahrens zur Optimierung zukünftiger DZ Protokolle aufgezeigt werden.

6 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation erfolgte die systematische Evaluation ausgewählter physikalischer DZ Methoden am Beispiel von porcinen Aorten. Dabei wurden die Effekte der jeweiligen physikalischen Vorbehandlung auf der Grundlage eines konstanten detergenzien- und enzymbasierten Kontrollprotokolls beurteilt. Die Integration der physikalischen DZ Methode mit den aussichtsreichsten Ergebnissen in ein bestehendes Protokoll sollte ihr Potential zur Optimierung zukünftiger DZ Verfahren demonstrieren.

Eine zentrale Fragestellung bestand darin, inwiefern das DZ Ergebnis von Protokollen, die Einfrier-Auftau-Prozesse beinhalten, durch Modifizierung der Einfriertemperatur beeinflusst werden kann. Dabei zeigte sich das einmalige Schockfrieren bei -196 °C dem langsameren Einfrieren bei -32 °C überlegen, da es nicht nur das deutlich zeitsparendere Verfahren darstellt sondern auch in effektiverer Zelleliminierung und tendenziell besserem Erhalt der EZM resultiert. Außerdem führte das einmalige Schockfrieren im Rahmen der untersuchten Methoden zu den ausgewogensten biomechanischen Eigenschaften des dezellularisierten Gewebes.

Unabhängig von der Einfriertemperatur resultierte dagegen die zyklische, fünffache Durchführung der Einfrier-Auftau-Vorgänge im Vergleich zu der einmaligen meist in keiner statistisch signifikanten Zunahme der Effektivität der Zelleliminierung. Vielmehr führte es sogar zu makro- und mikroskopisch erkennbaren, substanziellen Schäden an den EZM Strukturen. Basierend auf diesen Ergebnissen ergibt sich für zukünftige Studien die Empfehlung einer nur einmaligen Durchführung der Einfrier-Auftau-Zyklen in DZ Protokollen.

Ein weiteres physikalisches Verfahren, das in der vorliegenden Arbeit hinsichtlich seines Einsatzes in DZ Protokollen untersucht wurde, ist das des osmotischen Schocks. Diese Methode erbrachte jedoch als einzige der untersuchten physikalischen Vorbehandlungen keinen Zusatznutzen hinsichtlich der DZ Effektivität.

Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse erfolgte die Integration der aussichtsreichsten physikalischen DZ Methode, also der des einmaligen Schockfrierens bei -196 °C , in ein bereits vorbestehend etabliertes Protokoll. Hierbei konnte die Optimierung gängiger DZ Verfahren durch die Kombination mit einem einmaligen Schockfrierzyklus bestätigt werden.

Die Resultate der vorliegenden Arbeit verdeutlichen die Notwendigkeit einer systematischen Evaluation einzelner Methoden zur Verbesserung von DZ Protokollen. Auf den hier vorgelegten Ergebnissen aufbauende Studien könnten den Einfluss einer Modifizierung der Auftaugeschwindigkeit auf das DZ Ergebnis untersuchen, da eine Abhängigkeit der Zellschädigung auch von diesem Faktor anzunehmen ist. Dabei sollten in zukünftigen Studien noch weitere *in vitro* Analysemethoden zur Qualitätskontrolle berücksichtigt werden. So könnte neben der DNA-Quantifizierung und histologischen Gewebefärbungen die gelelektrophoretische Untersuchung der DNA-Fragmentlängen erfolgen, um eine suffiziente DZ sicherzustellen. Außerdem erscheint die Quantifizierung weiterer residueller, potentiell immunogenen Strukturen wie der des α -Gal-Epitops sinnvoll, aber auch die erstrebenswerter EZM Komponenten wie Glykosaminoglykane oder Wachstumsfaktoren. Die Aussagekraft mechanischer Tests könnte durch eine bi- statt uniaxiale Durchführung der Zugversuche verbessert werden, da die *in vivo* wirkenden Belastungen dadurch realitätsgetreuer abgebildet werden. Grundsätzlich sind aber nach möglichst eingehender *in vitro* Analyse zur endgültigen Bestimmung der Eignung eines jeden DZ Verfahrens *in vivo* Studien erforderlich, um eine Untersuchung potentieller Immunreaktionen zu ermöglichen.

Gelingt durch die weitere Perfektionierung gängiger DZ Protokolle die optimale Balance zwischen präziser Entfernung zellulären Materials sowie Erhalt nicht-antigener EZM Komponenten, scheinen gute und reproduzierbare Ergebnisse in klinischen Studien erreichbar, und damit auch das langfristige Ziel eines klinischen Einsatzes dezellularisierter und immunogen inerter Scaffolds in der Transplantationsmedizin.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. *Organtransplantation*. 2021 [cited 2021 09-21]; Available from: <https://www.drze.de/im-blickpunkt/organtransplantation>.
2. Tilney, N.L., *Transplantation Immunology*, in *Encyclopedia of Gastroenterology*. 2004, Elsevier. p. 510-515.
3. Howard, R.J., D.L. Cornell, and L. Cochran, *History of deceased organ donation, transplantation, and organ procurement organizations*. *Prog Transplant*, 2012. **22**(1): p. 6-16; quiz 17.
4. Linden, P.K., *History of solid organ transplantation and organ donation*. *Crit Care Clin*, 2009. **25**(1): p. 165-84, ix.
5. Shayan, H., *Organ transplantation: from myth to reality*. *J Invest Surg*, 2001. **14**(3): p. 135-8.
6. Bergan, A., *Ancient myth, modern reality: a brief history of transplantation*. *J Biocommun*, 1997. **24**(4): p. 2-9.
7. Bezinover, D. and F. Saner, *Organ transplantation in the modern era*. *BMC Anesthesiol*, 2019. **19**(1): p. 32.
8. Barker, C.F. and J.F. Markmann, *Historical overview of transplantation*. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2013. **3**(4): p. a014977.
9. Landsteiner, K., *Zur Kenntnis der antifermentativen, lytischen und agglutinierenden Wirkungen des Blutserums und der Lymphe*, in *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten*. 1900.
10. Gibson, T. and P.B. Medawar, *The fate of skin homografts in man*. *J Anat*, 1943. **77**(Pt 4): p. 299-310.4.
11. Turner, D., *The human leucocyte antigen (HLA) system*. *Vox Sang*, 2004. **87 Suppl1**: p. 87-90.
12. Müller, M., *Chirurgie für Studium und Praxis*. 15 ed. 2020/21: Medizinische Verlags- und Informationsdienste.
13. Abouna, G.M., *Organ shortage crisis: problems and possible solutions*. *Transplant Proc*, 2008. **40**(1): p. 34-8.
14. *17.1 Transplantationsimmunologie*, in *Nephrologie*. 2008, Georg Thieme Verlag KG: Stuttgart.
15. Reske, A., A. Reske, and M. Metze, *Complications of immunosuppressive agents therapy in transplant patients*. *Minerva Anesthesiol*, 2015. **81**(11): p. 1244-61.
16. Prof. Dr. med. Bernd Salzberger, F.H., Frank Hanses, *Therapie von Infektionen bei kritisch Kranken unter Immunsuppression*. *Zeitschrift für Rheumatologie*, 10/2019.

17. Engels, E.A., et al., *Spectrum of cancer risk among US solid organ transplant recipients*. *Jama*, 2011. **306**(17): p. 1891-901.
18. Moreno, D.F. and J. Cid, *Graft-versus-host disease*. *Med Clin (Barc)*, 2019. **152**(1): p. 22-28.
19. Thurman, J.M., S.E. Panzer, and M. Le Quintrec, *The role of complement in antibody mediated transplant rejection*. *Mol Immunol*, 2019. **112**: p. 240-246.
20. Langer, R. and J.P. Vacanti, *Tissue engineering*. *Science*, 1993. **260**(5110): p. 920-6.
21. Berthiaume, F., T.J. Maguire, and M.L. Yarmush, *Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress, and challenges*. *Annu Rev Chem Biomol Eng*, 2011. **2**: p. 403-30.
22. Alsberg, E., et al., *Engineering growing tissues*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(19): p. 12025-30.
23. Vacanti, C.A. and J.P. Vacanti, *The science of tissue engineering*. *Orthop Clin North Am*, 2000. **31**(3): p. 351-6.
24. Vacanti, C.A., *The history of tissue engineering*. *J Cell Mol Med*, 2006. **10**(3): p. 569-76.
25. Lexer, E., *The use of free osteoplasty together with trials on arthrodesis and joint transplantation*. *Archiv für klin Chirurgie*. 1908;**86**(4):939-954. *Clin Orthop Relat Res*, 2008. **466**(8): p. 1771-6.
26. Langer, R. and J. Vacanti, *Advances in tissue engineering*. *J Pediatr Surg*, 2016. **51**(1): p. 8-12.
27. Shafiee, A. and A. Atala, *Tissue Engineering: Toward a New Era of Medicine*. *Annu Rev Med*, 2017. **68**: p. 29-40.
28. Hamilton, N.J., et al., *Tissue-Engineered Tracheal Replacement in a Child: A 4-Year Follow-Up Study*. *Am J Transplant*, 2015. **15**(10): p. 2750-7.
29. Atala, A., et al., *Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty*. *Lancet*, 2006. **367**(9518): p. 1241-6.
30. Raya-Rivera, A.M., et al., *Tissue-engineered autologous vaginal organs in patients: a pilot cohort study*. *Lancet*, 2014. **384**(9940): p. 329-36.
31. Centanni, J.M., et al., *StrataGraft skin substitute is well-tolerated and is not acutely immunogenic in patients with traumatic wounds: results from a prospective, randomized, controlled dose escalation trial*. *Ann Surg*, 2011. **253**(4): p. 672-83.
32. Atala, A., *Engineering organs*. *Curr Opin Biotechnol*, 2009. **20**(5): p. 575-92.
33. Godbey, W.T. and A. Atala, *In vitro systems for tissue engineering*. *Ann N Y Acad Sci*, 2002. **961**: p. 10-26.

34. Howard, D., et al., *Tissue engineering: strategies, stem cells and scaffolds*. J Anat, 2008. **213**(1): p. 66-72.
35. Fuchs, J.R., B.A. Nasser, and J.P. Vacanti, *Tissue engineering: a 21st century solution to surgical reconstruction*. Ann Thorac Surg, 2001. **72**(2): p. 577-91.
36. Marler, J.J., et al., *Transplantation of cells in matrices for tissue regeneration*. Adv Drug Deliv Rev, 1998. **33**(1-2): p. 165-182.
37. Vacanti, J.P. and R. Langer, *Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation*. Lancet, 1999. **354 Suppl 1**: p. S132-4.
38. Fuchs, E., T. Tumber, and G. Guasch, *Socializing with the neighbors: stem cells and their niche*. Cell, 2004. **116**(6): p. 769-78.
39. Mammoto, T. and D.E. Ingber, *Mechanical control of tissue and organ development*. Development, 2010. **137**(9): p. 1407-20.
40. Hansmann, J., et al., *Bioreactors in tissue engineering - principles, applications and commercial constraints*. Biotechnol J, 2013. **8**(3): p. 298-307.
41. Barron, V., et al., *Bioreactors for cardiovascular cell and tissue growth: a review*. Ann Biomed Eng, 2003. **31**(9): p. 1017-30.
42. Kim, B.S. and D.J. Mooney, *Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering*. Trends Biotechnol, 1998. **16**(5): p. 224-30.
43. Ponder, K.P., et al., *Mouse hepatocytes migrate to liver parenchyma and function indefinitely after intrasplenic transplantation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(4): p. 1217-21.
44. Brittberg, M., et al., *Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation*. N Engl J Med, 1994. **331**(14): p. 889-95.
45. Klinkmann, H., H. Wolf, and E. Schmitt, *Definition of biocompatibility*. Contrib Nephrol, 1984. **37**: p. 70-7.
46. Atala, A., *Autologous cell transplantation for urologic reconstruction*. J Urol, 1998. **159**(1): p. 2-3.
47. Meredith, D.O., et al., *Microtopography of metal surfaces influence fibroblast growth by modifying cell shape, cytoskeleton, and adhesion*. J Orthop Res, 2007. **25**(11): p. 1523-33.
48. Ripamonti, U., *Soluble, insoluble and geometric signals sculpt the architecture of mineralized tissues*. J Cell Mol Med, 2004. **8**(2): p. 169-80.
49. Gilding, D. and D. Williams, *Biocompatibility of clinical implant materials*. Biodegradable Polymers. CRC Press; Boca Raton, FL, 1981.

50. Cook, A.D., et al., *Characterization and development of RGD-peptide-modified poly(lactic acid-co-lysine) as an interactive, resorbable biomaterial*. J Biomed Mater Res, 1997. **35**(4): p. 513-23.
51. Barrera, D.A., et al., *Synthesis and RGD peptide modification of a new biodegradable copolymer: poly(lactic acid-co-lysine)*. Journal of the American Chemical Society, 1993. **115**(23): p. 11010-11011.
52. Barrera, D.A., et al., *Copolymerization and Degradation of Poly(lactic acid-co-lysine)*. Macromolecules, 1995. **28**(2): p. 425-432.
53. in 't Veld, P.J.A., Shen, Z-R., Takens, G. A. J., Dijkstra, P. J., & Feijen, J. , *Glycine/Glycolic acid based copolymers*. Journal of polymer science. Part A: Polymer chemistry, 1994.
54. Vats, A., et al., *Scaffolds and biomaterials for tissue engineering: a review of clinical applications*. Clin Otolaryngol Allied Sci, 2003. **28**(3): p. 165-72.
55. Liao, J., et al., *Applications of decellularized materials in tissue engineering: advantages, drawbacks and current improvements, and future perspectives*. J Mater Chem B, 2020. **8**(44): p. 10023-10049.
56. Crapo, P.M., T.W. Gilbert, and S.F. Badylak, *An overview of tissue and whole organ decellularization processes*. Biomaterials, 2011. **32**(12): p. 3233-43.
57. Gilbert, T.W., T.L. Sellaro, and S.F. Badylak, *Decellularization of tissues and organs*. Biomaterials, 2006. **27**(19): p. 3675-83.
58. Bernard, M.P., et al., *Nucleotide sequences of complementary deoxyribonucleic acids for the pro alpha 1 chain of human type I procollagen. Statistical evaluation of structures that are conserved during evolution*. Biochemistry, 1983. **22**(22): p. 5213-23.
59. Bernard, M.P., et al., *Structure of a cDNA for the pro alpha 2 chain of human type I procollagen. Comparison with chick cDNA for pro alpha 2(I) identifies structurally conserved features of the protein and the gene*. Biochemistry, 1983. **22**(5): p. 1139-45.
60. Constantinou, C.D. and S.A. Jimenez, *Structure of cDNAs encoding the triple-helical domain of murine alpha 2 (VI) collagen chain and comparison to human and chick homologues. Use of polymerase chain reaction and partially degenerate oligonucleotide for generation of novel cDNA clones*. Matrix, 1991. **11**(1): p. 1-9.
61. Exposito, J.Y., et al., *Sea urchin collagen evolutionarily homologous to vertebrate pro-alpha 2(I) collagen*. J Biol Chem, 1992. **267**(22): p. 15559-62.
62. Keane, T.J., et al., *Consequences of ineffective decellularization of biologic scaffolds on the host response*. Biomaterials, 2012. **33**(6): p. 1771-81.
63. Sandor, M., et al., *Host response to implanted porcine-derived biologic materials in a primate model of abdominal wall repair*. Tissue Eng Part A, 2008. **14**(12): p. 2021-31.

64. Manji, R.A., et al., *Glutaraldehyde-fixed bioprosthetic heart valve conduits calcify and fail from xenograft rejection*. *Circulation*, 2006. **114**(4): p. 318-27.
65. Renate Lüllmann-Rauch, u.M.v.F.P., *Taschenlehrbuch Histologie*,. 4 ed. 2012: Thieme.
66. Shoulders, M.D. and R.T. Raines, *Collagen structure and stability*. *Annu Rev Biochem*, 2009. **78**: p. 929-58.
67. Vindin, H., S.M. Mithieux, and A.S. Weiss, *Elastin architecture*. *Matrix Biol*, 2019. **84**: p. 4-16.
68. Shi, Y. and J. Massagué, *Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus*. *Cell*, 2003. **113**(6): p. 685-700.
69. Hynes, R.O., *The extracellular matrix: not just pretty fibrils*. *Science*, 2009. **326**(5957): p. 1216-9.
70. Hay, E.D., *Extracellular matrix*. *J Cell Biol*, 1981. **91**(3 Pt 2): p. 205s-223s.
71. Baker, B.M. and C.S. Chen, *Deconstructing the third dimension: how 3D culture microenvironments alter cellular cues*. *J Cell Sci*, 2012. **125**(Pt 13): p. 3015-24.
72. Takagi, K., et al., *In vivo recellularization of plain decellularized xenografts with specific cell characterization in the systemic circulation: histological and immunohistochemical study*. *Artif Organs*, 2006. **30**(4): p. 233-41.
73. Hynes, R.O., *Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines*. *Cell*, 2002. **110**(6): p. 673-87.
74. Vorotnikova, E., et al., *Extracellular matrix-derived products modulate endothelial and progenitor cell migration and proliferation in vitro and stimulate regenerative healing in vivo*. *Matrix Biol*, 2010. **29**(8): p. 690-700.
75. Allen, R.A., et al., *Adrenal extracellular matrix scaffolds support adrenocortical cell proliferation and function in vitro*. *Tissue Eng Part A*, 2010. **16**(11): p. 3363-74.
76. Xu, C.C., et al., *A bovine acellular scaffold for vocal fold reconstruction in a rat model*. *J Biomed Mater Res A*, 2010. **92**(1): p. 18-32.
77. Cox, B. and A. Emili, *Tissue subcellular fractionation and protein extraction for use in mass-spectrometry-based proteomics*. *Nat Protoc*, 2006. **1**(4): p. 1872-8.
78. Giusti, S., et al., *An improved method to obtain a soluble nuclear fraction from embryonic brain tissue*. *Neurochem Res*, 2009. **34**(11): p. 2022-9.
79. Meyer, S.R., et al., *Comparison of aortic valve allograft decellularization techniques in the rat*. *J Biomed Mater Res A*, 2006. **79**(2): p. 254-62.
80. Kasimir, M.T., et al., *Comparison of different decellularization procedures of porcine heart valves*. *Int J Artif Organs*, 2003. **26**(5): p. 421-7.

81. Mirsadraee, S., et al., *Development and characterization of an acellular human pericardial matrix for tissue engineering*. *Tissue Eng*, 2006. **12**(4): p. 763-73.
82. Sullivan, D.C., et al., *Decellularization methods of porcine kidneys for whole organ engineering using a high-throughput system*. *Biomaterials*, 2012. **33**(31): p. 7756-64.
83. Li, N., et al., *Efficient decellularization for bovine pericardium with extracellular matrix preservation and good biocompatibility*. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*, 2018. **26**(5): p. 768-776.
84. Cebotari, S., et al., *Detergent decellularization of heart valves for tissue engineering: toxicological effects of residual detergents on human endothelial cells*. *Artif Organs*, 2010. **34**(3): p. 206-10.
85. Gardin, C., et al., *Decellularization and Delipidation Protocols of Bovine Bone and Pericardium for Bone Grafting and Guided Bone Regeneration Procedures*. *PLoS One*, 2015. **10**(7): p. e0132344.
86. Simsa, R., et al., *Systematic in vitro comparison of decellularization protocols for blood vessels*. *PLoS One*, 2018. **13**(12): p. e0209269.
87. Nagata, S., R. Hanayama, and K. Kawane, *Autoimmunity and the clearance of dead cells*. *Cell*, 2010. **140**(5): p. 619-30.
88. Zheng, M.H., et al., *Porcine small intestine submucosa (SIS) is not an acellular collagenous matrix and contains porcine DNA: possible implications in human implantation*. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2005. **73**(1): p. 61-7.
89. Nilapwar, S.M., et al., *Chapter four - Absorption Spectroscopy*, in *Methods in Enzymology*, D. Jameson, M. Verma, and H.V. Westerhoff, Editors. 2011, Academic Press. p. 59-75.
90. Sbirikova-Dimitrova, H.I. and B. Shivachev, *Crystal structure of the DNA sequence d(CGTTGAATTCACG)₂ with DAPI*. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*, 2017. **73**(Pt 9): p. 500-504.
91. *H&E Staining Overview: A Guide to Best Practices*. 2019 [cited 2020 03-26]; Available from: <https://www.leicabiosystems.com/knowledge-pathway/he-staining-overview-a-guide-to-best-practices/>.
92. Movat, H.Z., *Demonstration of all connective tissue elements in a single section; pentachrome stains*. *AMA Arch Pathol*, 1955. **60**(3): p. 289-95.
93. Junqueira, L.C., G. Bignolas, and R.R. Brentani, *Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections*. *Histochem J*, 1979. **11**(4): p. 447-55.
94. Hollenberg, M.J. and A.M. Erickson, *The scanning electron microscope: potential usefulness to biologists. A review*. *J Histochem Cytochem*, 1973. **21**(2): p. 109-30.

95. Porzionato, A., et al., *Decellularized Human Skeletal Muscle as Biologic Scaffold for Reconstructive Surgery*. Int J Mol Sci, 2015. **16**(7): p. 14808-31.
96. Luc, G., et al., *Decellularized and matured esophageal scaffold for circumferential esophagus replacement: Proof of concept in a pig model*. Biomaterials, 2018. **175**: p. 1-18.
97. Bader, A. and P. Macchiarini, *Moving towards in situ tracheal regeneration: the bionic tissue engineered transplantation approach*. J Cell Mol Med, 2010. **14**(7): p. 1877-89.
98. Wainwright, D.J., *Use of an acellular allograft dermal matrix (AlloDerm) in the management of full-thickness burns*. Burns, 1995. **21**(4): p. 243-8.
99. Feng, X., et al., *The study of inhibiting systematic inflammatory response syndrome by applying xenogenic (porcine) acellular dermal matrix on second-degree burns*. Burns, 2007. **33**(4): p. 477-9.
100. Taylor, J.B., et al., *A modified tensionless gingival grafting technique using acellular dermal matrix*. Int J Periodontics Restorative Dent, 2010. **30**(5): p. 513-21.
101. Agarwal, C., B.T. Kumar, and D.S. Mehta, *An acellular dermal matrix allograft (Alloderm®) for increasing keratinized attached gingiva: A case series*. J Indian Soc Periodontol, 2015. **19**(2): p. 216-20.
102. Vos, J.D., et al., *Use of AlloDerm in type I tympanoplasty: a comparison with native tissue grafts*. Laryngoscope, 2005. **115**(9): p. 1599-602.
103. Hernandez, S.C., et al., *Injection Laryngoplasty Using Micronized Acellular Dermis for Vocal Fold Paralysis: Long-term Voice Outcomes*. Otolaryngol Head Neck Surg, 2016. **154**(5): p. 892-7.
104. Corno, A.F., et al., *Is Decellularized Porcine Small Intestine Sub-mucosa Patch Suitable for Aortic Arch Repair?* Front Pediatr, 2018. **6**: p. 149.
105. Fiala, R., et al., *Porcine small intestinal submucosa graft for repair of anterior urethral strictures*. Eur Urol, 2007. **51**(6): p. 1702-8; discussion 1708.
106. Ye, Y., et al., *Decellularized Periosteum-Covered Chitosan Globule Composite for Bone Regeneration in Rabbit Femur Condyle Bone Defects*. Macromol Biosci, 2018. **18**(9): p. e1700424.
107. You, L., et al., *In vivo immunogenicity of bovine bone removed by a novel decellularization protocol based on supercritical carbon dioxide*. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2018. **46**(sup2): p. 334-344.
108. Boriani, F., et al., *A novel technique for decellularization of allogenic nerves and in vivo study of their use for peripheral nerve reconstruction*. J Biomed Mater Res A, 2017. **105**(8): p. 2228-2240.
109. Hashimoto, Y., et al., *Corneal Regeneration by Deep Anterior Lamellar Keratoplasty (DALK) Using Decellularized Corneal Matrix*. PLoS One, 2015. **10**(7): p. e0131989.

110. Ott, H.C., et al., *Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart*. Nat Med, 2008. **14**(2): p. 213-21.
111. Macchiarini, P., et al., *Clinical transplantation of a tissue-engineered airway*. Lancet, 2008. **372**(9655): p. 2023-30.
112. Guruswamy Damodaran, R. and P. Vermette, *Decellularized pancreas as a native extracellular matrix scaffold for pancreatic islet seeding and culture*. J Tissue Eng Regen Med, 2018. **12**(5): p. 1230-1237.
113. da Costa, F.D., et al., *The early and midterm function of decellularized aortic valve allografts*. Ann Thorac Surg, 2010. **90**(6): p. 1854-60.
114. Lederman, E.S., et al., *A prospective, multicenter study to evaluate clinical and radiographic outcomes in primary rotator cuff repair reinforced with a xenograft dermal matrix*. J Shoulder Elbow Surg, 2016. **25**(12): p. 1961-1970.
115. Sharp, M.A., et al., *A cautionary case: the SynerGraft vascular prosthesis*. Eur J Vasc Endovasc Surg, 2004. **27**(1): p. 42-4.
116. Perea-Gil, I., 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): p. 558-73.
117. Chai, Y., et al., *Evaluation of decellularization protocols for production of porcine small intestine submucosa for use in abdominal wall reconstruction*. Hernia, 2020. **24**(6): p. 1221-1231.
118. Fitzpatrick, J.C., P.M. Clark, and F.M. Capaldi, *Effect of decellularization protocol on the mechanical behavior of porcine descending aorta*. Int J Biomater, 2010. **2010**.
119. Liu, X., et al., *Comparison of detergent-based decellularization protocols for the removal of antigenic cellular components in porcine aortic valve*. Xenotransplantation, 2018. **25**(2): p. e12380.
120. González-Andrades, M., et al., *Effects of Detergent-Based Protocols on Decellularization of Corneas With Sclerocorneal Limbus. Evaluation of Regional Differences*. Transl Vis Sci Technol, 2015. **4**(2): p. 13.
121. Park, S.M., et al., *Effect of pulsatile flow perfusion on decellularization*. Biomed Eng Online, 2018. **17**(1): p. 15.
122. Montoya, C.V. and P.S. McFetridge, *Preparation of ex vivo-based biomaterials using convective flow decellularization*. Tissue Eng Part C Methods, 2009. **15**(2): p. 191-200.
123. Liu, X., et al., *An innovative method to obtain porous porcine aorta scaffolds for tissue engineering*. Artif Organs, 2019. **43**(12): p. 1162-1169.
124. Lu, H., et al., *Comparison of decellularization techniques for preparation of extracellular matrix scaffolds derived from three-dimensional cell culture*. J Biomed Mater Res A, 2012. **100**(9): p. 2507-16.

125. Cheng, J., C. Wang, and Y. Gu, *Combination of freeze-thaw with detergents: A promising approach to the decellularization of porcine carotid arteries*. Biomed Mater Eng, 2019. **30**(2): p. 191-205.
126. Burk, J., et al., *Freeze-thaw cycles enhance decellularization of large tendons*. Tissue Eng Part C Methods, 2014. **20**(4): p. 276-84.
127. Fernández-Pérez, J. and M. Ahearne, *The impact of decellularization methods on extracellular matrix derived hydrogels*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 14933.
128. Dang, Y., et al., *Freeze-thaw decellularization of the trabecular meshwork in an ex vivo eye perfusion model*. PeerJ, 2017. **5**: p. e3629.
129. Williams, C., et al., *Altered structural and mechanical properties in decellularized rabbit carotid arteries*. Acta Biomater, 2009. **5**(4): p. 993-1005.
130. Dragúňová, J., et al., *Development of a new method for the preparation of an acellular allodermis, quality control and cytotoxicity testing*. Cell Tissue Bank, 2017. **18**(2): p. 153-166.
131. Ishida, Y., et al., *Development of a novel method for decellularizing a nerve graft using a hypertonic sodium chloride solution*. Int J Artif Organs, 2014. **37**(11): p. 854-60.
132. Oberwallner, B., et al., *Preparation of cardiac extracellular matrix scaffolds by decellularization of human myocardium*. J Biomed Mater Res A, 2014. **102**(9): p. 3263-72.
133. Elder, B.D., S.V. Eleswarapu, and K.A. Athanasiou, *Extraction techniques for the decellularization of tissue engineered articular cartilage constructs*. Biomaterials, 2009. **30**(22): p. 3749-56.
134. Mazur, P., S.P. Leibo, and E.H. Chu, *A two-factor hypothesis of freezing injury. Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells*. Exp Cell Res, 1972. **71**(2): p. 345-55.
135. Baust J, C.Z., *Underlying mechanisms of damage and new concepts in cryosurgical instrumentation*, in *Cryosurgery: Mechanism and Applications*. 1995: Paris, France: Institut international de froid. p. 21-36.
136. Star, R.A., *Hyperosmolar states*. Am J Med Sci, 1990. **300**(6): p. 402-12.
137. Fu, R.H., et al., *Decellularization and recellularization technologies in tissue engineering*. Cell Transplant, 2014. **23**(4-5): p. 621-30.
138. Burg, M.B., *Molecular basis of osmotic regulation*. Am J Physiol, 1995. **268**(6 Pt 2): p. F983-96.
139. Kaiser, N., et al., *Differential regulation of glucose transport and transporters by glucose in vascular endothelial and smooth muscle cells*. Diabetes, 1993. **42**(1): p. 80-9.

140. Löffler/Pertrides, *Biochemie und Pathobiochemie*. 2014: Springer.
141. Sierad, L.N., et al., *Functional Heart Valve Scaffolds Obtained by Complete Decellularization of Porcine Aortic Roots in a Novel Differential Pressure Gradient Perfusion System*. *Tissue Eng Part C Methods*, 2015. **21**(12): p. 1284-96.
142. Grab, M., et al., *Customized 3D printed bioreactors for decellularization-High efficiency and quality on a budget*. *Artif Organs*, 2021.
143. *Absorbance Measurements – the Quick Way to Determine Sample Concentration*. 2019 [cited 2020 04-15]; Available from: <https://handling-solutions.eppendorf.com/sample-handling/photometry/principles/detailview-principles/news/absorbance-measurements-the-quick-way-to-determine-sample-concentration/>.
144. *Polarized Light Microscopy*. 2020 [cited 2020 04-03]; Available from: <https://www.microscopyu.com/techniques/polarized-light/polarized-light-microscopy>.
145. Danan, H. and P. Esposito, *Critical gases for critical issues: CO2 technologies for oral drug delivery*. *Ther Deliv*, 2014. **5**(2): p. 205-32.
146. Depla, D., S. Mahieu, and J.E. Greene, *Chapter 5 - Sputter Deposition Processes*, in *Handbook of Deposition Technologies for Films and Coatings (Third Edition)*, P.M. Martin, Editor. 2010, William Andrew Publishing: Boston. p. 253-296.
147. Läßle, V., *Einführung in die Festigkeitslehre*. 2016: Springer Verlag.
148. *Anderson–Darling Test*, in *The Concise Encyclopedia of Statistics*. 2008, Springer New York: New York, NY. p. 12-14.
149. Sprent, P., *Fisher Exact Test*, in *International Encyclopedia of Statistical Science*, M. Lovric, Editor. 2011, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 524-525.
150. Kalpić, D., N. Hlupić, and M. Lovrić, *Student's t-Tests*, in *International Encyclopedia of Statistical Science*, M. Lovric, Editor. 2011, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 1559-1563.
151. Neuhäuser, M., *Wilcoxon–Mann–Whitney Test*, in *International Encyclopedia of Statistical Science*, M. Lovric, Editor. 2011, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 1656-1658.
152. Junqueira, L.C., W. Cossermelli, and R. Brentani, *Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy*. *Arch Histol Jpn*, 1978. **41**(3): p. 267-74.
153. Montes, G.S., et al., *Histochemical and morphological characterization of reticular fibers*. *Histochemistry*, 1980. **65**(2): p. 131-41.
154. Berillis, P., *The Role of Collagen in the Aorta's Structure*. *The Open Circulation and Vascular Journal*, 2013. **6**: p. 1-8.

155. Syazwani, N., et al., *Decellularization of Aorta Tissue Using Sonication Treatment as Potential Scaffold for Vascular Tissue Engineering*. Journal of Medical and Biological Engineering, 2015. **35**(2): p. 258-269.
156. Koenig, F., et al., *Successful decellularization of thick-walled tissue: Highlighting pitfalls and the need for a multifactorial approach*. Int J Artif Organs, 2019. **42**(1): p. 17-24.
157. O'Connor Mooney, R., et al., *On the Automatic Decellularisation of Porcine Aortae: A Repeatability Study Using a Non-Enzymatic Approach*. Cells Tissues Organs, 2016. **201**(4): p. 299-318.
158. Penn, M.S., et al., *Visualization and quantification of transmural concentration profiles of macromolecules across the arterial wall*. Circ Res, 1990. **67**(1): p. 11-22.
159. Brüel, A. and H. Oxlund, *Growth hormone influences the content and composition of collagen in the aorta from old rats*. Mech Ageing Dev, 2002. **123**(6): p. 627-35.
160. Huang, Q., et al., *Production of a sterilised decellularised tendon allograft for clinical use*. Cell Tissue Bank, 2013. **14**(4): p. 645-54.
161. Cartmell, J.S. and M.G. Dunn, *Effect of chemical treatments on tendon cellularity and mechanical properties*. J Biomed Mater Res, 2000. **49**(1): p. 134-40.
162. Kobayashi, M., et al., *In vitro evaluation of surface biological properties of decellularized aorta for cardiovascular use*. J Mater Chem B, 2020. **8**(48): p. 10977-10989.
163. Liu, G.F., et al., *Decellularized aorta of fetal pigs as a potential scaffold for small diameter tissue engineered vascular graft*. Chin Med J (Engl), 2008. **121**(15): p. 1398-406.
164. Stieglmeier, F., et al., *Mapping of bovine pericardium to enable a standardized acquirement of material for medical implants*. J Mech Behav Biomed Mater, 2021. **118**: p. 104432.
165. Garriboli, M., et al., *Development of a porcine acellular bladder matrix for tissue-engineered bladder reconstruction*. Pediatr Surg Int, 2022. **38**(5): p. 665-677.
166. Abbott, W.M., et al., *Effect of compliance mismatch on vascular graft patency*. J Vasc Surg, 1987. **5**(2): p. 376-82.
167. Gratzer, P.F., R.D. Harrison, and T. Woods, *Matrix alteration and not residual sodium dodecyl sulfate cytotoxicity affects the cellular repopulation of a decellularized matrix*. Tissue Eng, 2006. **12**(10): p. 2975-83.
168. Curtis, A. and C. Wilkinson, *Topographical control of cells*. Biomaterials, 1997. **18**(24): p. 1573-83.
169. Brown, X.Q., K. Ookawa, and J.Y. Wong, *Evaluation of polydimethylsiloxane scaffolds with physiologically-relevant elastic moduli: interplay of substrate mechanics and*

- surface chemistry effects on vascular smooth muscle cell response.* Biomaterials, 2005. **26**(16): p. 3123-9.
170. Boyum, J., et al., *Matrix metalloproteinase activity in thoracic aortic aneurysms associated with bicuspid and tricuspid aortic valves.* J Thorac Cardiovasc Surg, 2004. **127**(3): p. 686-91.
 171. van Tienen, T.G., et al., *Tissue ingrowth and degradation of two biodegradable porous polymers with different porosities and pore sizes.* Biomaterials, 2002. **23**(8): p. 1731-8.
 172. Wake, M.C., C.W. Patrick, Jr., and A.G. Mikos, *Pore morphology effects on the fibrovascular tissue growth in porous polymer substrates.* Cell Transplant, 1994. **3**(4): p. 339-43.
 173. Sung, H.J., et al., *The effect of scaffold degradation rate on three-dimensional cell growth and angiogenesis.* Biomaterials, 2004. **25**(26): p. 5735-42.
 174. Chevalier, E., et al., *Fabrication of porous substrates: a review of processes using pore forming agents in the biomaterial field.* J Pharm Sci, 2008. **97**(3): p. 1135-54.
 175. Watt, F.M. and W.T. Huck, *Role of the extracellular matrix in regulating stem cell fate.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2013. **14**(8): p. 467-73.
 176. Alhamdani, M.S., et al., *Single-step procedure for the isolation of proteins at near-native conditions from mammalian tissue for proteomic analysis on antibody microarrays.* J Proteome Res, 2010. **9**(2): p. 963-71.
 177. Patel, N., et al., *Strategies to recover proteins from ocular tissues for proteomics.* Proteomics, 2008. **8**(5): p. 1055-70.
 178. Ott, H.C., et al., *Regeneration and orthotopic transplantation of a bioartificial lung.* Nat Med, 2010. **16**(8): p. 927-33.
 179. Courtman, D.W., et al., *Development of a pericardial acellular matrix biomaterial: biochemical and mechanical effects of cell extraction.* J Biomed Mater Res, 1994. **28**(6): p. 655-66.
 180. Reing, J.E., et al., *The effects of processing methods upon mechanical and biologic properties of porcine dermal extracellular matrix scaffolds.* Biomaterials, 2010. **31**(33): p. 8626-33.

8 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 2-1: Inkubationsprotokolle der Gruppen A ₁ , A ₂ , B ₁ , B ₂ und C sowie der zugehörigen Kontrollgruppe K ₁	37
Tabelle 2-2: Inkubationsprotokolle des Ausgangsprotokolls, der Versuchsgruppe D und der zugehörigen Kontrollgruppe K ₂	39
Tabelle 2-3: Abkürzungsverzeichnis der Versuchsgruppen.....	40
Tabelle 4-1: DAPI MW der EDT [μm] an den inneren (EDT _i) und äußeren (EDT _a) Oberflächen der AW sowie Differenz der MW der EDT _a und korrespondierenden EDT _i	56
Tabelle 4-2: Zuwachsraten der MW der EDT [%] an den inneren (EDT _i) und äußeren (EDT _a) Oberflächen der AW	57
Tabelle 4-3: MW des DNA-Gehalts der nativen und dezellularisierten Proben [ng DNA / mg Gewebe] sowie Änderung des DNA-Gehalts durch Dezellularisierung [%]	62
Tabelle 4-4: MW der Kraft F _{max} [N und N/mm ²] und dessen Differenz zum MW der Nativgruppe	74
Tabelle 4-5: MW der Bruchdehnung [%] und dessen Differenz zum MW der Nativgruppe	75

9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 2-1: Design des 3D-gedruckten Bioreaktors und Versuchsaufbau	33
Abbildung 3-1: Exemplarische Darstellung der Entnahme von Gewebeproben aus einer dezellularisierten AW	42
Abbildung 3-2: Repräsentative Darstellung der EDT Messungen in den DAPI Fluoreszenzaufnahmen	47
Abbildung 4-1: DAPI EDT [μm] an den inneren (EDT_i) und äußeren (EDT_a) Oberflächen der AW	58
Abbildung 4-2: DAPI Fluoreszenz und H&E Färbung.....	60
Abbildung 4-3: DNA-Gehalt der nativen und dezellularisierten Proben [$\text{ng DNA} / \text{mg Gewebe}$].....	63
Abbildung 4-4: Movat Pentachrom Färbung	65
Abbildung 4-5: Pikro-Siriusrot Färbung.....	67
Abbildung 4-6: Makroskopische Topographie der AW aus Gruppe A ₂	68
Abbildung 4-7: REM Analyse.....	71
Abbildung 4-8: Kraft F_{max} [N und N/mm^2].....	76
Abbildung 4-9: Bruchdehnung [%]	77

Anhang

Messwerte DAPI Fluoreszenz:

DAPI EDT_a [µm] an den äußeren Oberflächen

EDT _a [µm]								
	K ₁	A ₁	A ₂	B ₁	B ₂	C	K ₂	D
AW 1	492,2	503,5	653,5	385,0	851,9	433,5	904,8	932,4
AW 2	437,5	642,9	682,0	599,6	477,7	380,2	795,8	979,3
AW 3	368,6	500,0	491,8	708,2	595,5	398,2	688,2	923,5
AW 4	441,2	575,8	543,1	692,2	718,7	361,9	822,7	1215,6
AW 5	520,4	460,2	668,7	616,5	480,4	345,1	819,3	986,6
AW 6	500,8	528,4	504,5	570,7	733,3	524,5	831,5	1033,0
AW 7	335,4	488,6	710,0	415,3	896,1	548,5	771,8	1015,0
AW 8	384,9	551,3	502,7	371,5	701,2	484,3	779,5	760,0
AW 9	457,7	559,7	520,6	603,8	542,8	363,7	893,8	707,3
AW 10	501,8	659,0	978,9	336,5	872,6	412,6	703,8	941,5
MW	444,1	546,9	625,6	529,9	687,0	425,2	801,1	949,4
±s	59,9	61,8	142,6	132,0	149,8	67,6	66,8	134,1

DAPI EDT_i [µm] an den inneren Oberflächen

EDT _i [µm]								
	K ₁	A ₁	A ₂	B ₁	B ₂	C	K ₂	D
AW 1	292,9	416,8	264,3	305,5	288,5	276,6	602,4	579,9
AW 2	341,6	433,0	425,6	305,8	457,8	338,0	533,3	632,3
AW 3	316,9	424,7	454,6	380,7	463,7	240,4	489,2	665,9
AW 4	358,4	410,6	360,7	324,4	343,5	318,8	615,9	665,8
AW 5	280,1	331,5	402,9	485,8	298,5	256,0	453,3	615,2
AW 6	382,1	421,2	584,3	315,3	299,6	341,1	496,9	479,2
AW 7	252,9	379,1	420,2	321,6	278,8	342,8	441,5	493,9
AW 8	310,0	476,1	317,7	266,3	257,3	332,0	500,6	567,0
AW 9	385,8	392,7	479,5	338,8	343,7	282,2	534,4	499,6
AW 10	303,1	425,7	455,3	267,7	379,2	254,1	521,3	734,3
MW	322,4	411,2	416,5	331,2	341,1	298,2	518,9	593,3
±s	41,6	36,0	84,5	60,3	68,8	38,4	53,7	80,6

Messwerte DNA-Quantifizierung:

DNA-Gehalt [ng DNA/mg Gewebe] der nativen und korrespondierenden dezellularisierten Proben

DNA-Gehalt [ng DNA/mg Gewebe]																
	K ₁		A ₁		A ₂		B ₁		B ₂		C		K ₂		D	
	Nativ	DZ	Nativ	DZ	Nativ	DZ	Nativ	DZ								
AW 1	991,2	394,3	565,7	412,8	444,3	395,4	538,1	435,9	512,6	452,2	1064,8	569,6	707,4	78,3	913,2	144,5
AW 2	814,9	445,1	531,4	404,6	271,5	340,8	560,0	371,7	761,6	712,4	482,3	629,3	991,5	257,4	569,9	140,3
AW 3	915,6	586,5	711,1	365,7	285,2	468,2	763,9	452,8	699,9	495,6	402,8	645,2	732,9	492,4	787,2	66,5
AW 4	404,7	635,1	318,4	419,0	456,7	358,2	547,2	391,0	932,9	722,9	294,5	520,4	792,8	508,4	800,1	235,1
AW 5	406,0	349,6	138,3	484,8	346,1	298,1	384,4	376,3	296,8	552,4	562,4	442,2	506,3	272,1	711,1	354,9
AW 6	393,8	362,8	255,6	445,5	417,8	353,3	484,3	316,9	307,1	589,4	559,2	518,1	609,9	57,3	525,7	32,7
AW 7	935,2	479,1	323,1	535,2	205,4	461,8	523,1	426,0	266,4	296,3	549,2	637,9	590,0	320,8	626,0	140,5
AW 8	739,8	679,8	289,5	865,2	261,0	408,1	631,2	467,3	441,6	568,7	366,5	542,5	736,9	195,5	733,9	551,0
AW 9	493,8	775,2	452,9	507,8	228,8	532,6	632,7	411,2	437,1	798,8	675,2	681,7	482,4	120,7	531,4	189,7
AW 10	382,7	734,6	159,9	380,8	276,1	242,3	580,0	416,6	723,6	478,0	661,2	679,6	663,5	213,2	404,9	66,6
MW	647,8	544,2	374,6	482,2	319,3	385,9	564,5	406,6	538,0	566,7	561,8	586,7	681,4	251,6	660,3	192,2
±s	241,8	150,1	176,0	137,9	86,5	81,7	95,2	42,0	217,2	141,2	204,2	76,0	141,1	147,9	147,3	148,9

Messwerte uniaxiale Zugversuche:

Zugprobendicke [mm]

Zugprobendicke [mm]									
	Nativ	K ₁	A ₁	A ₂	B ₁	B ₂	C	K ₂	D
AW 1	2,83	2,46	2,14	2,62	2,32	2,16	2,42	2,04	1,86
AW 2	2,19	2,24	2,11	2,32	2,52	2,12	2,34	2,28	2,09
AW 3	2,30	2,37	2,60	2,04	2,42	2,72	2,05	2,18	2,20
AW 4	2,70	2,21	2,16	2,00	1,86	2,25	2,20	2,00	2,38
AW 5	2,60	2,15	1,99	2,37	2,18	1,96	2,12	2,26	2,16
AW 6	1,78	2,06	2,38	2,21	2,23	2,44	2,14	2,37	2,30
AW 7	2,68	2,33	2,23	2,54	2,39	2,07	2,47	2,62	2,49
AW 8	2,54	2,08	2,41	2,32	1,96	2,30	2,47	2,38	2,29
AW 9	2,52	2,46	2,02	2,40	2,17	2,51	2,07	2,39	2,29
AW 10	2,42	2,22	2,19	2,00	2,18	2,23	2,38	2,41	2,15
AW 11	2,26								
AW 12	2,18								
AW 13	2,55								
AW 14	2,17								
AW 15	2,68								
AW 16	1,86								
AW 17	2,72								
AW 18	2,28								
AW 19	2,29								
AW 20	2,31								
AW 21	2,79								
AW 22	2,07								
AW 23	1,83								
MW	2,37	2,26	2,22	2,28	2,22	2,28	2,27	2,29	2,22
±s	0,30	0,14	0,18	0,21	0,19	0,21	0,16	0,17	0,17

F_{max} [N]

F_{max} [N]									
	Nativ	K₁	A₁	A₂	B₁	B₂	C	K₂	D
AW 1	15,68	15,76	31,14	24,06	29,21	24,32	15,93	13,69	8,94
AW 2	16,32	19,28	19,58	21,36	19,47	17,51	18,75	14,75	19,32
AW 3	16,05	20,27	25,00	21,45	29,73	28,40	18,99	23,17	18,97
AW 4	15,63	20,94	19,82	25,52	23,71	21,75	21,20	24,58	18,61
AW 5	17,72	14,56	23,97	18,04	28,60	14,99	19,29	26,40	23,02
AW 6	18,31	17,19	21,81	23,50	19,88	24,25	27,44	23,32	21,70
AW 7	20,70	21,99	16,58	16,86	20,99	20,64	37,43	19,16	23,50
AW 8	19,34	21,27	20,18	21,30	24,53	18,97	27,89	25,16	17,56
AW 9	19,83	25,07	22,25	13,74	19,82	28,90	19,88	29,02	21,99
AW 10	24,17	13,08	18,42	12,23	21,14	20,33	28,39	30,95	17,84
AW 11	19,31								
AW 12	21,18								
AW 13	20,13								
AW 14	16,64								
AW 15	22,39								
AW 16	15,16								
AW 17	18,49								
AW 18	23,25								
AW 19	22,97								
AW 20	16,73								
AW 21	19,82								
AW 22	21,97								
AW 23	15,77								
MW	19,03	18,94	21,88	19,81	23,71	22,01	23,52	23,02	19,15
±s	2,70	3,53	3,91	4,22	3,91	4,27	6,24	5,37	3,97

F_{\max} [N/mm²]

F_{\max} [N/mm ²]									
	Nativ	K₁	A₁	A₂	B₁	B₂	C	K₂	D
AW 1	1,39	1,60	3,64	2,30	3,15	2,82	1,64	1,68	1,20
AW 2	1,86	2,16	2,32	2,30	1,93	2,07	2,01	1,62	2,31
AW 3	1,74	2,14	2,41	2,63	3,07	2,61	2,32	2,66	2,16
AW 4	1,45	2,37	2,30	3,20	3,19	2,41	2,41	3,07	1,95
AW 5	1,71	1,70	3,01	1,91	3,28	1,91	2,27	2,93	2,66
AW 6	2,57	2,08	2,29	2,66	2,23	2,49	3,21	2,46	2,36
AW 7	1,93	2,36	1,86	1,66	2,20	2,49	3,78	1,83	2,36
AW 8	1,90	2,56	2,09	2,30	3,13	2,06	2,82	2,64	1,92
AW 9	1,97	2,55	2,75	1,43	2,28	2,88	2,40	3,04	2,40
AW 10	2,50	1,47	2,11	1,53	2,42	2,28	2,98	3,22	2,08
AW 11	2,14								
AW 12	2,42								
AW 13	1,97								
AW 14	1,92								
AW 15	2,09								
AW 16	2,04								
AW 17	1,70								
AW 18	2,55								
AW 19	2,51								
AW 20	1,81								
AW 21	1,77								
AW 22	2,65								
AW 23	2,16								
MW	2,03	2,10	2,48	2,19	2,69	2,40	2,58	2,51	2,14
±s	0,35	0,37	0,50	0,53	0,49	0,31	0,59	0,57	0,38

Bruchdehnung [%]

Bruchdehnung[%]									
	Nativ	K₁	A₁	A₂	B₁	B₂	C	K₂	D
AW 1	118,25	82,49	80,62	93,11	97,08	80,38	76,94	81,98	79,90
AW 2	104,41	86,17	92,59	76,08	92,17	66,78	127,93	99,58	80,12
AW 3	96,68	71,99	85,94	81,32	90,78	78,06	107,37	85,42	96,38
AW 4	111,27	85,16	85,51	83,58	86,84	72,97	107,84	96,92	77,05
AW 5	118,20	76,97	89,71	71,70	86,41	72,62	102,33	97,27	80,41
AW 6	98,62	88,04	78,97	91,14	95,02	80,73	100,33	100,43	80,90
AW 7	111,69	87,00	82,66	75,23	95,29	86,20	106,70	87,16	91,64
AW 8	114,78	81,69	85,07	63,82	88,83	78,06	93,53	104,15	84,28
AW 9	104,92	96,09	90,90	84,54	86,14	87,82	111,35	105,69	80,14
AW 10	92,49	68,09	84,09	82,30	82,25	100,60	102,76	100,70	94,97
AW 11	106,86								
AW 12	114,22								
AW 13	89,95								
AW 14	98,94								
AW 15	95,74								
AW 16	97,90								
AW 17	102,62								
AW 18	92,01								
AW 19	97,47								
AW 20	105,69								
AW 21	102,17								
AW 22	96,11								
AW 23	108,70								
MW	103,46	82,37	85,61	80,28	90,08	80,42	103,71	95,93	84,58
±s	8,24	7,78	4,17	8,39	4,56	8,99	12,32	7,77	6,68

Geräte:

Geräte	Modellbezeichnung	Herstellerfirma
Autoklav	CertoClav- Hochdrucksterilisator Typ CV- EL 18 Liter 1600W/220V 50/60Hz 3 Bar	Certoclav Sterilizer GmbH, Leonding, AUT
BioPhotometer	6131	Eppendorf AG, Hamburg, GER
Dickenmessgerät	Mitutoyo ID-C112XB	Mitutoyo Europe GmbH, Neuss, GER
3D - Drucker	Ultimaker 3 Extended	Ultimaker, Geldermalsen, NED
Einbettmaschine	HistoCore Arcadia H	Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, GER
Feinwaage	Kern 770-13	Kern & Sohn GmbH, Balingen, GER
Fluoreszenzmikroskop	AxioObserver 1021855009 SN: 3834001051	Carl Zeiss AG, Oberkochen, GER
Kamera Lichtmikroskop	Leica MC 170 HD	Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, GER
Kraftmessdose	KAF-TC	Angewandte System Technik GmbH, Mess- und Regeltechnik, Dresden, GER
Kritisch-Punkt-Trockner	CPD 30	BalTec AG, Schalksmühle, GER Hauptquartier: Pfäffikon, CHE
Lichtmikroskop	Leica DMR	Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, GER
Magnetrührer	RCT basic	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, GER
Paraffinstreckbad	Typ 25900 SN: 35308	MEDAX GmbH & Co. KG, Neumünster, GER
PC Software Fluoreszenzauswertung	AxioVision Rel. 4.8	Carl Zeiss AG, Oberkochen, GER
PC Software Histologieauswertung	Ascent software version 3.4.0 Leica Application Suite LAZEZ	Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, GER
PC Software Zugversuchsauswertung	testXpert V12.3	ZwickRoell GmbH & Co. KG, Ulm, GER
PC Software Zusammenfügung Histologieaufnahmen	Adobe Photoshop	Adobe Inc., San José, Kalifornien, USA

Geräte	Modellbezeichnung	Herstellerfirma
pH-Meter	ino Lab pH Level 1	WTW - Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG, Weilheim, GER
Polarisationsfilter	Art. Nr.: 108330 Polfilterfolie SI38 linear	Polfilter24 - Optische Produkte und Materialien, Elmshorn, GER
Pumpe	EDEN 155 Aquarienpumpe, 80W	PFG GmbH, Hörstel, GER
Rasterelektronenmikroskop	Zeiss EVO LS10	Carl Zeiss AG, Oberkochen, GER
REM Detektor	XFlash Detektor 510 129 eV	Bruker Nano GmbH, Berlin, GER
Schlittenmikrotom	HM 400 R	Microm International GmbH, Walldorf, GER
Schüttelinkubator	Inkubationshaube TH 15	Edmund Bühler GmbH, Bodelshausen, GER
Sputter Coater	SCD 050	Baltec AG, Schalksmühle, GER Hauptsitz: Pfäffikon, CHE
Stanze	ZCP020	ZwickRoell GmbH & Co. KG, Ulm, GER
Thermoschüttler	Thermomixer™ C	Eppendorf AG, Hamburg, GER
Vortexer	Reax top SN: 049801363	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, GER
Wärmeschrank	WTC Typ: 1511530000202	BINDER GmbH, Tuttlingen, GER
Wasserbad	Julabo SW22	JULABO GmbH, Seelbach, GER
Wasserbad 2	W22-2	Rheotest Medingen GmbH, Ottendorf-Okrilla, GER
Zentrifuge groß	Rotina 46 R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, GER
Zentrifuge klein	Micro 22 R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, GER
Zugprüfmaschine	Z2.5(TN) SN: 169898/2006/E	ZwickRoell GmbH & Co. KG, Ulm, GER

Hilfsmittel/ Verbrauchsmaterial:

Artikel	Modellbezeichnung	Herstellerfirma
Aquarellpinsel	Serie 1520L	Lab Logistics Group GmbH, Meckenhelm, GER
Borstenpinsel	Serie 7179L	Lab Logistics Group GmbH, Meckenhelm, GER
Einbettförmchen	Parafree Metall Ausgießform SN: 39 LC-700-2	Leica Microsysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, GER
Einbettkassetten	151391	Lab Logistics Group GmbH, Meckenheim, GER
Eindeckgläser 24 x 50 mm		Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, GER
Eindeckmedium	Leica CV Mount	Leica Microsysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, GER
Eindeckmedium DAPI	Ibidi Mounting Medium	ibidi GmbH, Gräfelfing, GER
Eppendorf Tubes® 1,5 ml	3810X	Eppendorf AG, Hamburg, GER
Falcon 15 ml	Sarstedt Reagenz- und Zentrifugen Röhre 15 ml	Sarstedt AG&Co. KG, Nümbrecht, GER
Glasfläschchen	Laborgewindeflasche Duran® 100ml	Schott AG, Mainz, GER
Kabelbinder	Pan-ty cable ties 5.6 in / 142mm 15263586N	Panduit Singapore Pte Ltd, Odeon Towers, SGP
Klingen Mikrotom	Microtome Blades Typ S35	FEATHER® Safety Razor Co. Ltd. Ōsaka, JPN
Kryoröhrchen	CryoPure Gefäße 1,8ml	Sarstedt AG&Co. KG, Nümbrecht, GER
Küvetten	UVette® 220 nm-1.600 nm	Eppendorf AG, Hamburg, GER
Objektträger 25 x 75 x 1,0 mm	Thermo SCIENTIFIC, Superfrost Ultra Plus®	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, GER
Paraffin	Histosec® Pastillen (ohne DMSO) 1.15161.2504	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Pipettenspitzen	Biosphere (R) Quality Tips 100-1000 µl: 70.762.200	Sarstedt AG&Co. KG, Nümbrecht, GER
	Biosphere (R) Filter Tips 2-200 µl: 70.760.211	

Artikel	Modellbezeichnung	Herstellerfirma
	Biosphere (R) Filter Tips 0,5-20 µl: 70.1116.210	
Pipetten	Eppendorf Research Pipette (10, 100, 200, 1000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg, GER
Schottglas 500 ml	GLS 80	Schott GmbH, Mainz, GER
Stickstoff	Apollo 100	Cryotherm GmbH & Co. KG Kirchen/Sieg, GER

Lösungen und Reagenzien:

Medium	Art.-Nr.	Herstellerfirma
Acetone for analysis	1.00014.5000	Merck KGaA, Darmstadt, GER
Anti-Anti (100x) Antibiotic Antimycotic	15240-062	GibcoR by Life Technologies, Darmstadt, GER Hauptsitz: Carlsbad, Kalifornien, USA
Aqua destillata (Ampuwa), 10L	1080181	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, GER
Calciumchlorid Dihydrat (CaCl ₂) ≥ 99% p.a., ACS M 147,02 g/mol	5239.2	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, GER
Deoxyribonuclease I	LS002138	Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, New Jersey, USA
4'6-Diamidino-phenylindole dihydrochloride (DAPI), c = 200 mg/ml	D9564-10MG	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, GER
Eosin Y solution, alcoholic	HT110116-500ML	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, GER
Ethanol 30 % v/v vergällt		Morphisto® Evolutionsforschung und Anwendung GmbH Frankfurt am Main, GER
Ethanol 50 % v/v vergällt	L13488	Apotheke Klinikum Großhadern, München, GER
Ethanol 70 % v/v vergällt		Apotheke Klinikum Großhadern, München, GER
Ethanol 80 % v/v vergällt		Apotheke Klinikum Großhadern, München, GER

Medium	Art.-Nr.	Herstellerfirma
Ethanol 96 % v/v vergällt		Apotheke Klinikum Großhadern, München, GER
Ethanol 100 % v/v vergällt		Apotheke Klinikum Großhadern, München, GER
Ethanol absolute for analysis 100% unvergällt	1.000983.2500	Merck KGaA, Darmstadt, GER
Glukoselösung 50 %	402301 10x100 ml	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v. d. H., GER
Glutaraldehydlösung 25 % m/m	G400-4	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, GER
Glycerin ≥ 98% Ph.Eur. wasserfrei	7530.1	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, GER
HCL, 1 mol/l	1.09970.0001	Merck KGaA, Darmstadt, GER
Isopropanol (2-Propanol)	6752.4	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, GER
Magnesiumchlorid (MgCl ₂) ≥ 98,5% wasserfrei M 95,22 g/mol	KK 36.1	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, GER
Mayer's Häkalaunlösung	1.09249.0500	Merck KGaA, Darmstadt, GER
Methanol for analysis	1.06009.2500	Merck KGaA, Darmstadt, GER
PBS - Medium 10 x konzentriert 10 l	P210	Apotheke Klinikum Großhadern, München, GER
Roti®-Histofix Formaldehydlösung 4,5%	P087.3	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, GER
Roti®-Histol	6640.4	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, GER
Sodium cacodylate trihydrate (Na-CaCO)	20838 C0250	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, GER
Sodium deoxycholate	30970-500G	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, GER
Sodium dodecyl sulfate ≥ 99,5%	80294	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, GER
Sodium hydroxide solution (1M NaOH)	35256-1L	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, GER
Sudanschwarz B (C.I. 26150) für die Mikroskopie	0292.1	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, GER

Medium	Art.-Nr.	Herstellerfirma
Tris Hydrochlorid Pufferan® ≥ 99% p.a. M 157,60 g/mol	9090.2	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, GER
Xylol (Isomere) >98%, rein, für die Histologie	9713.3	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, GER

Lösungszusammensetzungen:

Lösung	Bestandteile	Menge
100 mM CaCl ₂ - Lösung	CaCl ₂	1,4702 g
	VE - Wasser	100 ml
DAPI - Arbeitslösung, cDAPI = 0,1 µg/ml	DAPI - Stocklösung	1 µl
	PBS	1 ml
DAPI - Stocklösung, cDAPI = 0,1 mg/ml	DAPI	1 mg
	Ampuwa	10 ml
DNase - Arbeitslösung, U = 30/ml	Anti - Anti (100x)	2 ml
	100 mM CaCl ₂ - Lösung	5 ml
	DNase - Stocklösung	1 ml
	100 mM MgCl ₂ - Lösung	10 ml
	PBS	82 ml
DNase - Stocklösung, U = 3.000/ml	Aqua bidest.	440 µl
	Deoxyribonuclease I	1 mg
	Glycerin	500 µl
	100 mM MgCl ₂ - Lösung	10 µl
	400 mM Tris - HCL - Lösung, pH 7,5	50 µl
FIX 2	Aqua dest.	912 ml
	Glutaraldehydlösung 25 % m/m	86,5 ml
	HCl	1,5 ml
	Na-CaCO	11,3 g
Hämalaun für H&E Färbung	Mayer's Hämalaunlösung	50 ml
	PBS	150 ml
Methanol - Aceton	Aceton	100 ml

Lösung	Bestandteile	Menge
	Methanol	100 ml
100 mM MgCl ₂ – Lösung	MgCl ₂	952,2 mg
	VE – Wasser	100 ml
PBS	PBS – Medium	1 l
	VE – Wasser	9 l
SD/SDS	Sodiumdeoxycholat	5 g
	Sodium dodecyl sulfate	5 g
	PBS	1 l
10 mM Tris – HCl – Puffer	Tris – Hydrochlorid	157,6 mg
	VE – Wasser	100 ml
400 mM Tris – HCl – Puffer	Tris – Hydrochlorid	6,304 g
	VE – Wasser	100 ml

Kommerzielle Kits:

Kit	Bestandteile	Art.-Nr.	Herstellerfirma
Isolate II Genomic DNA Kit	Collection Tubes 2 ml	Bio – 52067	Bioline Meridian Bioscience, Cincinnati, Ohio, USA
	DNA Spin Columns		
	Elutionspuffer G		
	Lysepuffer GL		
	Proteinase K (lyophilisiert)		
	Proteinase K – Puffer		
	Puffer G3		
	Waschpuffer GW1		
	Waschpuffer GW2 (Konzentrat)		
Movat Pentachrom (Original) Art. Nr. 12057	Alcianblau 1 % v/v	10126.0100	Morphisto® Evolutionsforschung und Anwendung GmbH Frankfurt am Main, GER
	Alkalischer Alkohol mit Ammoniak	10132.0100	
	WEIGERT Stammlösung A/B	10225.0100 A/B	
	Eisen (III)-Chlorid 2%	12019.0100	
	Brilliant-Crocein- Säurefuchsin	10156.0100	
	Phosphorwolframsäure 5%	10324.0100	

Kit	Bestandteile	Art.-Nr.	Herstellerfirma
	Safron du Gatinais	10369.0100	
	Natriumthiosulfat 5%	10288.0100	
	Essigsäure 1 % v/v	10180.0100	
Pikro-Siriusrot für Kollagen I & III Nachweis Art. Nr. 13425	WEIGERT Stammlösung A/B	10225.0100 A/B	Morphisto® Evolutionsforschung und Anwendung GmbH, Frankfurt am Main, GER
	Pikro-Siriusrot-Lösung	13422.0100	
	Essigsäure 30 % v/v	13428.0100	

Danksagung

Zunächst möchte ich mich sehr herzlich bei meinem Doktorvater, Prof. Dr. med. Christian Hagl, für die Möglichkeit bedanken, an der Herzchirurgischen Klinik und Poliklinik der Universität München promoviert haben zu dürfen.

Weiterhin gilt mein besonderer Dank Herrn PD Dr. med. Nikolaus Thierfelder und Herrn Maximilian Grab für die intensive Betreuung meiner Dissertation. Während der gesamten Arbeit, angefangen von der Versuchsplanung und -durchführung über die Auswertung der Ergebnisse bis hin zum Verfassen der Dissertation, konnte ich auf ihre permanente Unterstützung und wertvollen Ratschläge bauen. In zahlreichen konstruktiven Diskussionen gelang es ihnen, mich bei der Überwindung von Schwierigkeiten zum eigenverantwortlichen Denken zu motivieren, sodass ich eine Menge über die Herangehensweisen an wissenschaftliche Probleme und über die Entwicklung geeigneter Lösungsstrategien lernen konnte.

Ebenso möchte ich mich bei den aktuellen und ehemaligen Mitarbeiterinnen unseres Labors, Frau Bettina Wimmer und Frau Barbara Steinl, bedanken. Sie haben mich nicht nur in sämtliche Labortätigkeiten eingewiesen, sondern standen mir auch während der gesamten Laborarbeit mit ihrer tatkräftigen Unterstützung und einem stets offenem Ohr zur Seite, was zum erfolgreichen Abschluss dieser Dissertation nachhaltig beigetragen hat.

Ein weiterer Dank gilt der gesamten Arbeitsgruppe für Tissue Engineering für die ständige Hilfsbereitschaft und die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen Eltern, meinen Geschwistern und meinem Freund bedanken, ohne deren liebevolle und bedingungslose Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Affidavit



Eidesstattliche Versicherung

Schepp, Nicola

Name, Vorname

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

Systematische in-vitro Evaluation physikalischer Dezellularisationsmethoden zur optimierten Entwicklung xenogener Gewebescaffolds im Tissue Engineering

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

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

München, den 19.02.2025

Ort, Datum

Nicola Clarissa Schepp

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand