

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

**Evaluation von biologischen, chemischen und physikalischen
Behandlungsverfahren zum Ziel der Sterilisation
von dezellularisiertem, bovinen Perikard**

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

vorgelegt von
Evelyn Christina Kienle

aus
Immenstadt i. Allgäu

Jahr
2025

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Christian Hagl
Mitberichterstatter: Prof. Dr. Christoph Schmitz
PD Dr. Jan-Michael Abicht

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. Nikolaus Thierfelder
Dipl.-Ing. Fabian König
Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 24.07.2025

Inhaltsverzeichnis

I KURZZUSAMMENFASSUNG	6
II ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	8
III ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	9
IV TABELLENVERZEICHNIS	9
1 EINLEITUNG	9
1.1 Transplantationsmaterialien.....	10
1.2 Einsatzfelder von Perikard in der Medizin	11
1.3 Dezellularisation von biologischem Gewebe	12
1.4 Sterilisation von biologischem Gewebe	14
1.4.1 Allgemeines	14
1.4.2 Chemische Methoden	14
1.4.3 Physikalische Methoden.....	17
1.4.4 Biologische Methoden.....	18
1.5 Ziel der Arbeit.....	19
2 MATERIAL UND METHODEN	20
2.1 Vorbereitung der Perikarde.....	20
2.1.1 Perikardgewinnung.....	20
2.1.2 Präparation.....	20
2.2 Dezellularisation	21
2.2.1 Versuchsaufbau.....	21
2.2.2 Dezellularisationsprotokoll	22
2.3 Sterilisation	23
2.3.1 Vorbereitung.....	23
2.3.2 Chemische Methoden	24
2.3.3 Biologische Methode.....	25
2.3.4 Physikalische Methoden.....	25
2.3.5 Kombinationsversuche.....	27
2.4 Waschprozess nach Sterilisation	28
2.5 Probenentnahme.....	28
3 ANALYSE.....	30
3.1 Sterilitätstestung.....	30

3.2 Dicken- und Umfangsvermessungen	31
3.3 Histologie	32
3.3.1 Vorbereitung	32
3.3.2 DAPI-Färbung	32
3.3.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	33
3.3.4 Pentachrom-Färbung	34
3.3.5 Pikro-Siriusrot-Färbung	34
3.3.6 Auswertung der histologischen Schnitte	35
3.4 Rasterelektronenmikroskopie	36
3.4.1 Allgemeines	36
3.4.2 Fixierung	37
3.4.3 Alkoholreihe	37
3.4.4 Kritisch-Punkt-Trocknen	37
3.4.5 Sputtern	38
3.4.6 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen	39
3.5 Zugversuche	39
3.5.1 Durchführung der Zugversuche	39
3.5.2 Auswertung der Zugversuche	40
3.6 Zytotoxizitätstestungen	40
3.6.1 Zellisolation	40
3.6.2 Zellkultivierung	41
3.6.3 Kryokonservierung	42
3.6.4 Versuchsdurchführung	42
3.6.5 Auswertung	43
3.7 Statistik	44
4 ERGEBNISSE	45
4.1 Sterilitätstestung	45
4.1.1 Chemische Methoden	45
4.1.2 Biologische Methode	45
4.1.3 Physikalische Methoden	45
4.1.4 Kombinationsversuche	46
4.2 Dicken- und Umfangsmessungen	47
4.2.1 Nativproben	47
4.2.2 Dezellularisierte Proben	48
4.2.3 Behandelte Proben	48
4.2.4 Kombinationsversuche	51

4.3 Histologie	52
4.3.1 DAPI-Färbung.....	52
4.3.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	53
4.3.3 Pentachrom-Färbung	55
4.3.4 Pikro-Siriusrot-Färbung.....	57
4.4 Rasterelektronenmikroskopie.....	59
4.4.1 Nativproben.....	59
4.4.2 Dezellularisierte Proben	60
4.4.3 Behandelte Proben	61
4.4.4 Kombinationsversuche	63
4.5 Zugfestigkeitstestung.....	64
4.5.1 Nativproben.....	64
4.5.2 Dezellularisierte Proben	64
4.5.3 Behandelte Proben	65
4.5.4 Kombinationsversuche	67
4.6 Zytotoxizitätstestung	68
5 DISKUSSION	71
6 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	81
7 LITERATURVERZEICHNIS.....	84
8 ANHANG.....	93
VORVERÖFFENTLICHUNGEN	105
DANKSAGUNG	106

I KURZZUSAMMENFASSUNG

Zielsetzung: Dezellularisierte Materialien bieten großes Potential im Bereich der regenerativen Medizin. Um jedoch optimale Ergebnisse in der späteren Implantation zu erzielen, ist neben dem vollständigen Entfernen aller Zellen das Sicherstellen eines sterilen Produktes essenziell. Ziel dieser Dissertation ist deshalb die Evaluation unterschiedlicher Methoden zum Ziel der Sterilisation von dezellularisiertem, bovinen Perikard (PK).

Material und Methoden: PK wurde mit Hilfe einer chemischen Lösung, bestehend aus je 0,5 % Natriumdesoxycholat und Natriumdodecylsulfat (SD/SDS) aufgelöst in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS), für 16 h dezellularisiert. Es folgte eine Evaluation von fünf verschiedenen chemischen (Ethanol 70 % [EtOH], 30 min; Peressigsäure 0,1 % [PAA], 3 h; Octenidindihydrochlorid 0,1 % [Octenidin], 1 h; Benzalkoniumchlorid 2 % [BAC], 15 min; Povidon-Iod 7,5 % [POV], 10 min), einer biologischen (10.000 U/ml Penicillin G + 10 mg/ml Streptomycin + 25 mg/ml Amphotericin B [Anti-Anti], 24 h) und zwei physikalischen (UV-Bestrahlung mit 15 W für 3 h/Seite; Gamma-Bestrahlung, 3.000 Gy) Behandlungsmethoden.

Rasterelektronenmikroskopie (REM), uniaxiale Zugversuche, Dicken- und Umfangsvermessungen, sowie histologische Färbungen (DAPI-, H&E-, Pentachrom-, Pikro-Siriusrot-Färbung) wurden zur Beurteilung der in den Versuchen verwendeten PK-Proben herangezogen. Die Sterilisationseffektivität der einzelnen Verfahren wurde durch die Inkubation der behandelten Proben für sieben Tage in zwei verschiedenen Kulturmedien (Thioglycollate- und Trypticase-Medium) validiert. Zur Ermittlung der Zytotoxizität der chemischen Behandlungsmedien wurden diese in drei verschiedenen Konzentrationen in Kontakt mit Endothelzellen (EC) gebracht.

Ergebnisse: DAPI- und H&E-Färbung validierten die erfolgreiche Dezellularisation (DZ). EtOH, PAA, BAC und Gamma-Bestrahlung erwiesen sich als effiziente Sterilisationsmethoden. POV, Octenidin und die UV-Bestrahlung gewährleisteten nur teilweise Sterilität, wohingegen Anti-Anti zu keinerlei Sterilität führte. Die Vermessungen der einzelnen PK zeigten eine leichte Zunahme der Dicken nach DZ ohne Umfangszunahme der Proben im Vergleich zu den nativen Proben. Die evaluierten Verfahren, bis auf PAA und BAC, führten bei der Dicke und dem Umfang der PK zu keiner wesentlichen Änderung. Mit Hilfe der REM-

Untersuchungen konnte der Erhalt der Oberflächenstruktur durch Octenidin, BAC, POV und Anti-Anti bewiesen werden. EtOH und PAA verursachten leichte, die physikalischen Bestrahlungsmethoden sogar deutliche Schäden an der Ultrastruktur. Der Erhalt von Kollagen- und elastischen Fasern nach der Sterilisation konnte mithilfe der histologischen Färbungen (Pentachrom- und Pikro-Siriusrot-Färbung) bestätigt werden. Nur die Gamma-Bestrahlung und die Behandlung mit PAA verursachten Schäden an der Extrazellulärmatrix (EZM). Die Zugfestigkeit der Proben nahm im Durchschnitt nach der DZ leicht ab. Die meisten Behandlungsmethoden bewirkten eine Änderung der Zugfestigkeit, bis auf Octenidin, welche die Zugfestigkeit nach dem DZ-Prozess erhalten konnte. Anti-Anti erwies sich bei der Zytotoxizitätstestung als nicht zytotoxisch. Octenidin erreichte zumindest eine reduzierte Zellviabilität. Im Anschluss erfolgte die Kombination von Octenidin mit PAA in zwei modifizierten Durchführungen. In diesen Kombinationsversuchen (KV) konnte die Sterilität gewährleistet und die Ultrastruktur und biomechanischen Eigenschaften der Proben weitestgehend erhalten werden.

Zusammenfassung: Einzeln führte keines der evaluierten Verfahren zu optimalen Ergebnissen. Deswegen wird eine Kombination von Octenidin (1 %, 60 min) und PAA (0,1 %, 30 min) empfohlen, um Sterilität zu erreichen und einen optimalen Erhalt der biomechanischen und strukturellen Eigenschaften des Probenmaterials zu gewährleisten.

II ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNG	BEDEUTUNG
ΔL	Längenänderung
Abb.	Abbildung
Anti-Anti	Antibiotisch-antimykotische Lösung
BAC	Benzalkoniumchlorid
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNasen	Desoxyribonukleasen
dsDNS	Doppelstrang-Desoxyribonukleinsäure
DZ	Dezellularisation
engl.	englisch
EZM	Extrazellulärmatrix
EtOH	Ethanol
F _{max}	Maximale Zugkraft
H&E	Hämatoxylin-Eosin
KV	Kombinationsversuch
LP	Zugproben entnommen in Längsrichtung zum PK- Faserverlauf
MRSA	Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus
MW	Mittelwert
n	Stückzahl
Octenidin	Octenidindihydrochlorid
PAA	Peressigsäure
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
POV	Povidon-Iod
PK	Perikard
QP	Zugproben entnommen in Querrichtung zum PK-Faserverlauf
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RNasen	Ribonukleasen
RT	Raumtemperatur
SAL	Sterilisierungsvertrauensgrad
SD	Natriumdesoxycholat (Sodium deoxycholate)
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodium dodecyl sulfate)
SE	Sekundärelektron
U/ml	Einheiten pro Milliliter
UV	Ultraviolett
ZL	Zelllinie

Sonstige Angaben wurden nach dem SI-System gemacht.

III ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Bovines PK nach Präparation.....	11
Abbildung 2: Natives und präpariertes PK mit Einzeichnung der Proben für die DZ.....	21
Abbildung 3: Schematische Darstellung des DZ-Aufbaus.....	22
Abbildung 4: Aufbau der UV-Bestrahlung.....	26
Abbildung 5: Aufbau der Gamma-Bestrahlung.....	27
Abbildung 6: Schematische Darstellung einer Zugprobe.....	28
Abbildung 7: Glasplatte zur Durchleuchtung der PK.....	29
Abbildung 8: Die zwei verwendeten mikrobiologischen Anzuchtmedien.....	31
Abbildung 9: Kritisch-Punkt-Trockner und Sputter-Coater.....	38
Abbildung 10: Die verwendete Zugprüfmaschine.....	40
Abbildung 11: Auswertung Dicken der PK.....	50
Abbildung 12: Auswertung der Umfänge der PK.....	50
Abbildung 13: Dicken der PK der KV-3- und KV-4-Gruppe.....	51
Abbildung 14: Umfänge der PK der KV-3- und KV-4-Gruppe.....	51
Abbildung 15: Auswertung der DAPI-Färbung.....	52
Abbildung 16: H&E-Färbung nativer und dezellularisierter PK-Schnitte.....	54
Abbildung 17: H&E-Färbung der behandelten PK-Proben.....	55
Abbildung 18: Pentachrom-Färbung nativer, dezellularisierter und behandelter PK.....	57
Abbildung 19: Pikro-Siriusrot-Färbung nativer, dezellularisierter und behandelter PK.....	59
Abbildung 20: REM-Aufnahmen nativer PK-Proben.....	60
Abbildung 21: REM-Aufnahmen dezellularisierter PK-Proben.....	60
Abbildung 22: REM-Aufnahmen behandelter PK-Proben.....	62
Abbildung 23: REM-Aufnahmen nach KV-3- und KV-4-Protokollbehandlung.....	63
Abbildung 24: Zugfestigkeit der nativen und dezellularisierten LP und QP.....	64
Abbildung 25: Zugfestigkeit der nativen, dezellularisierten und behandelten LP und QP.....	67
Abbildung 26: Zugfestigkeit der LP und QP der KV-3- und KV-4-Protokoll-Gruppe.....	68
Abbildung 27: Zytotoxizitätsmessungen.....	70

IV TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Ablauf des DZ-Prozesses	23
Tabelle 2: Nachweis verschiedener Bakterien und Pilzen mit den Anzuchtmedien.....	30
Tabelle 3: Konzentrationen der einzelnen Medien für die Zytotoxizitätsmessungen.....	43
Tabelle 4: Auswertung der Sterilität nach den einzelnen Behandlungsmethoden.....	46
Tabelle 5: Auswertung der Sterilität nach den Kombinationsversuchen	47
Tabelle 6: Schematische Zusammenfassung aller Ergebnisse.....	83

1 EINLEITUNG

1.1 Transplantationsmaterialien

Die Nachfrage nach biologischen Materialien für die Transplantationsmedizin wird immer größer. Zum einen bietet der Fortschritt der Medizin eine größere Vielfalt an operativen Ersatzverfahren und zum anderen bringt die demographische Entwicklung eine erhöhte Fallzahl an Patienten mit degenerativen Erkrankungen mit sich, die auf eine Transplantation angewiesen sind. Die Zahl der implantierten Herzklappen beispielsweise nahm in den letzten Jahren stetig zu. Dies ist, abgesehen von den angeborenen und entzündlichen Herzklappenfehlern, vor allem der stetig steigenden Lebenserwartung in den Industrienationen geschuldet. Herzklappenerkrankungen, wie beispielsweise die Aortenklappenstenose, entstehen vor allem durch degenerative Prozesse und sind eine der häufigsten, interventionspflichtigen Erkrankungen im höheren Lebensalter [1-6].

Insgesamt muss zwischen biologischen und künstlichen Transplantationsmaterialien unterschieden werden. Die artifiziellen Transplantate bergen den Nachteil, dass der Körper sie als körperfremd erkennt und es zu einer Abstoßungs- und Entzündungsreaktion, sowie durch die gerinnungsaktivierende Oberfläche der Implantate zur einer erhöhten Thrombogenität kommen kann [7, 8]. Da zudem mechanische Klappen die anatomischen und biomechanischen Gegebenheiten einer Herzklappe nicht originalgetreu wiedergeben können, wird durch sie die Flusseigenschaft des Blutstromes verändert. So treten unter anderem vermehrte Scherkräfte und Turbulenzen an den Implantaten auf, welche die Thrombogenität zusätzlich steigern [9]. Zudem kann es im Laufe der Zeit zu Materialversagen und pathologischen Umbauprozessen im Körper kommen. Aufgrund dessen werden häufig biologische Transplantate genutzt, um ähnliche biomechanische und physiologische Eigenschaften im menschlichen Körper nachzubilden.

Bei den biologischen Transplantationsmaterialien muss zwischen den Subtypen Auto-, Homo- und Xenograft unterschieden werden. Bei einem Autograft wird körpereigenes Material des Patienten verwendet, wohingegen bei einem Homograft Gewebe eines humanen Spenders verwendet wird [10]. Die tierischen Materialien werden als Xenografts bezeichnet. Sie sind oft porcinen oder bovinen Ursprungs. Zudem rückt xenogenes Perikard (PK) als Transplantationsmaterial zunehmend in den Fokus der Forschung.

1.2 Einsatzfelder von Perikard in der Medizin

Das Perikard (lat.: pericardium), auch als Herzbeutel bezeichnet, umhüllt das Herz anatomisch als Bindegewebssack. Es besteht aus zwei Schichten. Einer glatten, serösen Schicht ($\triangleq$ Pericardium serosum), welche dem Herzen zugewandt ist und eine, vom Herzen abgewandte fibröse Schicht ($\triangleq$ Pericardium fibrosum), an der sich Fettgewebe anlagert [11]. Histologisch betrachtet, besteht der fibröse Herzbeutel vor allem aus kaum dehnbarem Kollagen Typ I, Elastin sowie Proteo- und Glykosaminoglykanen [12, 13]. PK, sowohl humanen als auch xenogenen Ursprungs, eignet sich hierbei besonders als kardiovaskuläres Transplantat. Es erfüllt dabei mehrere Kriterien, die für den Einsatz als Transplantat erforderlich sind. Dazu gehören unter anderem seine mechanischen Eigenschaften, da es dank seiner Faserstruktur extrem dünn (siehe Abb. 1) sowie extrem reißfest und strapazierfähig ist. Zudem ist xenogenes PK durch gezielte Tierzucht in großer Stückzahl verfügbar.

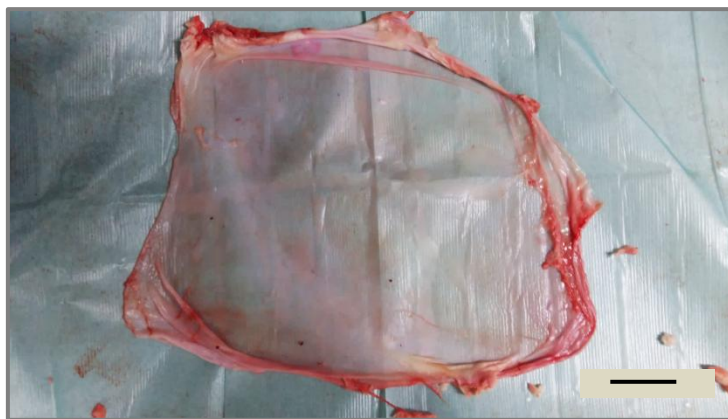


Abbildung 1: Bovines PK nach Präparation. Es wirkt aufgrund seiner dünnen Beschaffenheit durchsichtig; Maßstabsbalken: 5 cm.

Bovines PK kann unter anderem für die Herstellung von regenerativen Materialien in der Herzchirurgie verwendet werden [14, 15], da es geeignete biomechanische Merkmale aufweist [16-18]. Dies ist vor allem für die längere Haltbarkeit des Transplantates wichtig [19]. Seine Einsatzfelder in der Medizin sind dank dieser Eigenschaften mittlerweile vielzählig. Es wird unter anderem für die Rekonstruktion von Gefäßen verwendet [20, 21] und dient als Patch-Material in diversen gefäß- und herzchirurgischen Operationen [21-23]. Zudem können ganze Herzklappen aus PK rekonstruiert werden [24, 25], wie es unter anderem Ionescu et al. mit Herzklappenprothesen aus bovinem PK erfolgreich zeigen konnten [26].

PK ist ebenfalls Bestandteil des Aortenklappenersatzverfahrens nach Ozaki, bei dem die Herzklappensegel im Laufe der Operation durch eigenes PK des Patienten ersetzt werden [27, 28]. Dank dieser Methode kann auf eine orale Antikoagulation, wie sie nach Implantation einer mechanischen Herzklappe nötig wäre, verzichtet werden. Es zeigte sich ein gutes Outcome in Langzeitstudien, was das PK als geeignetes Transplantat für Klappenrekonstruktionen erscheinen lässt [28].

Die Anwendung von patienteneigenem PK ist jedoch aufgrund der anatomischen Gegebenheiten nur limitiert einsetzbar, weshalb häufiger auf Xenografts zurückgegriffen wird. Die Haltbarkeit von Xenografts im menschlichen Körper wird jedoch zum einen durch eine frühzeitige Abstoßungsreaktion und zum anderen durch die progrediente Degeneration, insbesondere der Kalzifikation des tierischen Transplantates, limitiert [29]. Als auslösender Mechanismus wird laut derzeitiger Forschung eine komplexe Inflammationsreaktion des Empfängers gegen die tierischen Antigene des implantierten Gewebes vermutet [30-32]. Ein Lösungsansatz hierfür bildet das im Tissue Engineering entwickelte Verfahren der Dezellularisation (DZ).

1.3 Dezellularisation von biologischem Gewebe

Die DZ von Gewebe ist mittlerweile ein gängiges Verfahren bei der Entwicklung von implantierbaren Biomaterialien in der regenerativen Medizin [33, 34]. Hierbei werden alle Zellen aus dem biologischen Material entfernt, wobei die Extrazellulärmatrix (EZM) erhalten bleibt. Diese dreidimensionale, azelluläre Ultrastruktur des Ausgangsmaterials kann im Folgenden beispielsweise mit Zellen rebesiedelt oder direkt als Transplantat verwendet werden [35]. Die DZ soll eine inflammatorische Reaktion des Transplantatempfängers verhindern, da sie zu einer Verringerung der Spenderantigene führt.

Es werden verschiedene Methoden zur DZ von biologischem Gewebe eingesetzt. So finden chemische [29, 30, 36-38], physikalische [39-42] oder enzymatische [29, 43-46] DZ-Verfahren Anwendung, oder aber auch eine Kombination aus unterschiedlichen Ansätzen [33, 42]. Die chemischen Verfahren nutzen häufig verschiedene Detergenzien, die dank des Ausbildens von Mizellen eine DZ des Transplantates ermöglichen [36]. Ihre molekulare, amphiphile Struktur, bestehend aus einer hydrophilen Kopfgruppe und einer hydrophoben Schwanzgruppe,

erlaubt es den Detergenzien, die Zellmembranen zu zerstören und Zellen, sowie Bestandteile des Zellkernes, aus dem Gewebe zu lösen [36]. Beispiele für gängig eingesetzte chemische DZ-Lösungen sind unter anderem Natriumdesoxycholat, engl. Sodium deoxycholate (SD), Natriumdodecylsulfat, engl. Sodium dodecyl sulfate (SDS) oder Triton-X 100 [29, 30, 36-38]. Die herausgelösten Zellen und die chemischen DZ-Lösungen selbst müssen im Anschluss möglichst vollständig von den dezellularisierten Materialien entfernt werden, da diese einen negativen Einfluss auf die EZM haben können und zudem zytotoxisch sind.

Physikalische DZ-Verfahren wiederum nutzen unter anderem hohen hydrostatischen Druck [39, 40] oder das Einfrieren und Wiederauftauen (sog. Freeze-Thawing) des Materiales [41]. Zumeist werden auch physikalische Methoden, wie Ultraschallverfahren oder unterschiedliche Schüttel- und Rührtechniken, zusätzlich zu chemischen oder enzymatischen Methoden eingesetzt [42, 44].

Enzymatische Verfahren werden häufig in Kombination mit anderen chemischen DZ-Verfahren eingesetzt [43, 45]. Bei den am häufigsten angewandten Enzymen handelt es sich zum einen um Nukleasen, wie beispielsweise die Desoxyribonukleasen, kurz DNasen, [43, 44], oder Ribonukleasen, kurz RNasen [29], oder Proteasen wie das Enzym Trypsin [45, 46].

Zudem gibt es erste Ansätze zur Entwicklung von automatischen DZ-Systemen mit Kombinationen von unterschiedlichen DZ-Verfahren, welche mögliche Fehlerquellen eliminieren und die Abläufe für den klinische Gebrauch optimieren sollen [47, 48].

Entscheidend für die spätere Anwendbarkeit im Rahmen der regenerativen Medizin ist jedoch bei jedem einzelnen Verfahren der bestmögliche Erhalt der dreidimensionalen Struktur der EZM beim DZ-Prozess [49, 50]. Nur so kann eine spätere Adhäsion, Proliferation und Differenzierung von Zellen an dem dezellularisierten Gewebe gelingen [51-54]. Zudem ist es von essentieller Bedeutung, das Gewebe vor der Transplantation suffizient zu sterilisieren.

1.4 Sterilisation von biologischem Gewebe

1.4.1 Allgemeines

Unter dem Begriff Sterilisation versteht man das Abtöten von lebenden Mikroorganismen, einschließlich ihrer Ruhestadien, mit dem Ziel, eine vollständige Keimfreiheit zu erreichen [55]. Dies schließt Bakterien, Pilze, Sporen, Viren und auch Prionen mit ein. Da dies zumeist nicht zu 100 Prozent möglich ist, gilt laut internationaler Standards eine Reduktion der lebensfähigen Keime auf einen „Sterilisierungsvertrauensgrad“ (engl.: Sterility Assurance Level, kurz SAL) von 10^{-6} als positiver Sterilisationsnachweis [56]. Unter SAL versteht man die Wahrscheinlichkeit, dass das behandelte Gewebe nach dem Sterilisationsprozess dennoch kontaminiert ist. Dies bedeutet im Umkehrschluss, je niedriger der SAL-Wert, desto sicherer ist der Sterilisationsprozess [57].

Der Begriff der Desinfektion hingegen wird verwendet, wenn lediglich eine Reduktion der Keimanzahl erreicht wird, jedoch nicht der SAL [58].

Generell gilt die Sterilisation von biologischem Gewebe in der Mikrobiologie als Herausforderung, da jedes Gewebe aus fragilen Materialien besteht und deswegen ein individuell abgestimmtes Verfahren benötigt. Gängige Verfahren der Oberflächensterilisation sind häufig nicht anwendbar, ohne das Gewebe irreversibel zu schädigen. Das Sterilisationsverfahren sollte jedoch schonend und zugleich effizient sein, um inflammatorische Prozesse im menschlichen Körper zu vermeiden und gleichzeitig die strukturellen und biomechanischen Eigenschaften der EZM so wenig wie möglich zu verändern.

Die Sterilisationsmethoden lassen sich im Allgemeinen in drei Überkategorien einteilen: chemische, physikalische und biologische Sterilisationsverfahren.

1.4.2 Chemische Methoden

Chemische Verfahren, wie das Anwenden von konzentrierten Säuren oder Laugen, können häufig für die Sterilisation von biologischen Materialien aufgrund ihrer schädigenden Wirkung auf biologisches Gewebe nicht herangezogen werden. Sie führen in hohen Konzentrationen zur Denaturierung von Zell-Proteinen und zerstören somit die Struktur des Biomaterials [59, 60]. Zudem dürfen keine Rückstände der chemischen Materialien am Transplantat entstehen, die für den

Transplantatempfänger toxisch sind oder zu gesundheitlichen Schäden führen können.

Das derzeit in der Herzchirurgie gängige Verfahren für die weitere Prozessierung biologischer Transplantationsmaterialien stellt die Fixation mittels Glutaraldehyd dar [46, 61, 62]. Glutaraldehyd selbst weist eine starke bakterizide, fungizide, mykobakterizide, sporizide und viruzide Wirkung auf [63]. Ein weiterer Effekt ist zudem das sogenannte Cross-linking, eine Quervernetzung von Aminosäuren des kollagenen Gewebes, sodass immunologische Reaktionen des Empfängers gegen das implantierte Material verringert werden [64, 65].

Diese Methode zeigt jedoch in vivo nach Transplantation vor allem bei hohen Konzentrationen eher enttäuschende Mittel- bis Langzeitergebnisse [30, 66]. Glutaraldehyd ist zytotoxisch, was eine Adhäsion und Proliferation von Zellen beeinträchtigen kann. Zudem führt es als einer von mehreren Faktoren zur verstärkten Kalzifikation des Transplantats, was im weiteren Verlauf beispielsweise zum Transplantatversagen und einer notwendigen Re-Operation führen kann [67-69]. Der Prozess der Kalzifikation wird laut einiger Studien vorrangig von Zellen verursacht, die unter anderem durch das Glutaraldehyd devitalisiert wurden [70-72].

Alkoholbasierte Antiseptika, mit Inhaltsstoffen wie beispielsweise Ethanol (EtOH) oder 2-Propanol, zählen im Labor- und Klinikalltag zu den gängigen, chemischen Sterilisationsmitteln. Sie dienen unter anderem der Oberflächensterilisation [73] und werden bevorzugt in der Hautdesinfektion eingesetzt [74, 75]. Aber auch im Bereich des Tissue Engineering gelten Alkohole als häufig angewandtes Sterilisationsmedium. Sie werden in verschiedenen Konzentrationen entweder singulär oder in Kombination mit anderen Sterilisationsmedien, wie beispielsweise Peressigsäure (PAA), eingesetzt [76-78]. Zumeist wird hier reiner Alkohol mit 20-35 Prozent Wasser versetzt. Die Alkohole durchdringen die Zellwand und bewirken im Zellinneren eine unspezifische Denaturierung der Proteine. Die Proteinausfällung führt zum Absterben des Bakteriums, da lebenswichtige Zellfunktionen nicht mehr ablaufen können. Auf diese Weise wirken sie unspezifisch gegen alle Bakterien und Hefen, zeigen sich allerdings nicht wirksam gegen Bakteriosporen [79]. Laut dem Robert-Koch-Institut beispielsweise liegt die optimale Konzentration von EtOH für die Wirksamkeit gegen Bakterien

zwischen 70-80 % [80]. Ab einer Einwirkzeit von 30 min wirkt es zudem teilweise viruzid [81].

Ein weiteres Beispiel für eine chemische Behandlungsmethode stellen iodoforme Lösungen wie Povidon-Iod (POV) dar. POV wird besonders im chirurgischen Bereich genutzt, um vor operativen Eingriffen eine keimfreie Oberfläche des Operationsgebietes zu gewährleisten. In der derzeitigen Forschung ist es noch kein Bestandteil der Sterilisationsprozesse von dezellularisiertem PK-Gewebe, doch wird es bereits im Tissue Engineering für Knochenmaterial eingesetzt [82-84]. POV besteht aus einem Komplex aus Iod und Polyvinylpyrrolidon. Sein sterilisierender Effekt beruht auf der oxydierenden und halogenierenden Wirkung des enthaltenen Iods. Hierbei werden die Oberflächen der einzelnen Mikroorganismen irreversibel geschädigt, so dass diese absterben. Insgesamt ist das Wirkspektrum des POV breit gefächert. So wirkt es nicht nur bakterizid, sondern auch fungizid und teilweise sogar viruzid, sporozid und protozid [85]. „Braunol®“, welches 7,5%iges POV enthält, steht auf der vom Robert Koch- Institut veröffentlichten Liste der geprüften und anerkannten Desinfektionsmittel und -verfahren [86]. Es gilt in der Chirurgie als ein gängiges Medium für die Haut- und Wunddesinfektion und kann, laut Fachinformation des Herstellers, auch an den Schleimhäuten angewandt werden, muss jedoch je nach Anwendungsgebiet bis zu 1:20 verdünnt werden [87].

Des Weiteren zählen quartäre Ammoniumverbindungen, wie beispielsweise das Benzalkoniumchlorid (BAC), zu den für Medizinprodukte angewandte Sterilisationsmedien. Sie werden im Allgemeinen vor allem für die Haut- und Oberflächensterilisation [73] und als Sterilisationsmedium von Mehrdosenbehältnissen bei Augentropfen verwendet [88, 89]. BAC wurde von González-Andrades et al. sogar zur DZ von kornealem Gewebe eingesetzt, da die Arbeitsgruppe dem Stoff, durch seinen lysierenden Effekt auf Zellmembranen, ein hohes Detergenzpotenzial zuschreibt [90]. Seine sterilisierende Wirkung beruht auf seiner Anreicherung in lebenden Organismen und einer Beeinträchtigung der Funktion der Zellmembranen. Es ist selbst in geringer Dosierung sowohl gegen grampositive als auch gramnegative Bakterien und Pilze wirkungsvoll einsetzbar [91].

Octenidindihydrochlorid (Octendidin) gehört zur Gruppe der Bipyridinen und ist in zahlreichen Desinfektionsmitteln enthalten. Es dient unter anderem zur

Oberflächenbehandlung, kann aber auch auf der Haut und an den Schleimhäuten angewandt werden, da es keine hautreizenden Eigenschaften besitzt und nicht resorbiert wird [92, 93]. Octenidin wirkt gegen eine Vielzahl an Mikroorganismen, sowohl im gram-positiven als auch gram-negativen Bereich, und deckt auch das Spektrum einiger multiresistenter Keime wie MRSA ab [92, 94-97]. Jedoch besitzt es keine sporizide Eigenschaften [92, 98]. Seine Wirkung beruht auf der Wechselwirkung mit der Zellwand und den Zellmembranbestandteilen der Mikroorganismen. So führt Octenidin durch unterschiedliche Ladungsverhältnisse im Verhältnis zur Zellwand zu einer Destabilisierung [99].

PAA ist eine Säure, die heutzutage beispielsweise unter anderem für die Sterilisation von Sehnen, Haut, Herzklappen, PK und xenogenetischer EZM verwendet wird [100-105]. Besonders für hitzelabile Materialien stellt sie eine gute und einfach anzuwendende Möglichkeit zur terminalen, effektiven Sterilisation im Tissue Engineering dar [106]. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass sie konzentrationsabhängige Schäden an den behandelten, biologischen Materialien verursacht und ebenfalls konzentrationsabhängig eine unterschiedliche Sterilisationseffektivität aufweist [101, 107]. Es wirkt durch seinen oxidierenden Effekt nicht nur bakterizid, sondern ebenso fungizid und je nach Konzentration viruzid und sporozid [16].

Wasserstoffperoxid hingegen ist lediglich eine schwache Säure, jedoch ein starkes Oxidationsmittel, weshalb es für biologische Materialien eher unbrauchbar ist, hingegen für Oberflächensterilisation von Materialien äußerst effektiv eingesetzt werden kann. In 0,3%iger Verdünnung kann es zudem als Mund- und Rachendesinfektionsmittel, sowie zur Desinfektion von Kontaktlinsen genutzt werden [108].

1.4.3 Physikalische Methoden

Vor allem thermische Verfahren, wie das Autoklavieren, die Heißluftsterilisation oder die Tyndallisierung (zyklisches Erhitzen auf 100 °C), die für das Abtöten der meisten Bakterien geeignet sind, scheiden aufgrund ihrer denaturierenden Wirkung als Sterilisationsmethoden für biologisches Gewebe aus. Jedes dieser Verfahren muss bei einer Temperatur von mindestens 100 °C durchgeführt werden, um eine vollständige Sterilisation zu erreichen [109].

Zudem zählen gewisse Bestrahlungsarten zu weiteren in der Medizintechnik regulär eingesetzten Methoden zur Desinfektion und Sterilisation, beispielsweise Ultraviolett- oder auch Beta- und Gamma-Strahlung.

Die UV-Bestrahlung wird im Laboralltag vor allem für die Sterilisation von Oberflächen, beispielsweise bei Reinraumwerkbänken, verwendet. Sie dient im Tissue Engineering jedoch auch der Quervernetzung von artifiziellen oder biologischen Fasern [110, 111].

Die Gamma-Bestrahlung ist eine Sterilisationsmöglichkeit für medizinische Produkte, da mit dieser etablierten Methode eine absolute Sterilität gewährleistet werden kann. Sie wird beispielsweise schon seit längerem erfolgreich zur Sterilisation von Knochenmaterial [112], Sehnen [113] oder Zähnen [114] eingesetzt. In den letzten Jahren entwickelte sich die Gamma-Bestrahlung zudem als mögliche Methode für die Sterilisation von Herzklappen, wie es James E. Jordan et al. bereits erfolgreich bei dezellularisierten, porcinen Pulmonalklappen zeigten [115]. Allerdings ist Gamma-Strahlung aufgrund seiner ionisierenden Wirkung als gesundheitsschädlich zu betrachten, da es somatische Schäden und auch Schäden am Erbgut verursachen kann. Deshalb ist eine Anwendung der Gamma-Strahlung nur an spezialisierten Zentren möglich, was die Art der Sterilisation nur begrenzt zugänglich macht.

1.4.4 Biologische Methoden

Unter die Kategorie der biologischen Substanzen zum Ziel der Sterilisation bzw. Desinfektion fallen vor allem antibiotische, antimykotische sowie antivirale Substanzen. Diese Lösungen dienen im klinischen Alltag vor allem der Therapie von Infektionen, aber auch der Aufbewahrung biologischer Materialien, da sie sehr schonend zu dem Gewebe sind und eine Keimvermehrung auf den Materialien vermindern sollen [36, 42, 116].

Antibiotisch-antimykotische Lösungen gibt es in verschiedensten Zusammensetzungen und mit angepassten Wirkstoffgruppen, je nachdem, welche native Keimbesiedelung abgedeckt werden soll. Häufig werden unterschiedliche Wirkstoffklassen miteinander kombiniert, um ein möglichst breites mikrobielles Spektrum mit einzubeziehen. Das häufig in Laboren eingesetzte „Anti-Anti“ beinhaltet Penicillin, Streptomycin, sowie Amphotericin B. Penicillin und Streptomycin sind Antibiotika, die zusammen ein breites grampositives sowie auch

gramnegatives Wirkspektrum abdecken können. Amphotericin B hingegen wirkt als Antimykotikum fungizid gegenüber einer Vielzahl an Pilzarten [117].

1.5 Ziel der Arbeit

Um die chemische Fixation des Gewebes mittels Glutaraldehyd aufgrund der oben angeführten negativen Wirkungen zu vermeiden, werden derzeit verschiedene, alternative Methoden zur Sterilisation von dezellularisiertem Gewebe untersucht [16, 118, 119]. Jedoch konnte sich, nach derzeitigem Stand der Forschung, kein geeignetes Sterilisationsverfahren durchsetzen. Aufgrund dessen besteht die Notwendigkeit der Evaluation eines effizienten und einfach anzuwendenden Sterilisationsverfahrens für dezellularisiertes, bovines PK. Die zu Grunde liegende Hypothese, dass ein oder mehrere Methoden zur Behandlung von dezellularisiertem Perikard eruiert werden können, die sowohl schonend zu dem untersuchten Gewebe sind, als auch Sterilität gewährleisten, gilt es zu beweisen. Im Rahmen dieser Dissertation sollten verschiedene chemische, physikalische und eine biologische Behandlungsmethoden miteinander verglichen werden, um den Effekt der jeweiligen Methode auf das PK zu untersuchen. Zunächst sollte mittels eines effektiven DZ-Verfahrens eine vollständige DZ des biologischen Materials gewährleistet werden, da dies als Grundlage für die weiteren Untersuchungen dient. Um festzustellen, ob die ausgewählten Behandlungsmethoden geeignet sind, musste vor allem die Sterilität der einzelnen Proben nachgewiesen werden. Zudem sollte mittels verschiedener Untersuchungstechniken mögliche Veränderungen der biomechanischen Gegebenheiten, der Oberflächenstruktur und der Ultrastruktur nachgewiesen werden. Dies sollte jeweils im Vergleich zu nativem und dezellularisiertem PK geschehen, um spezifische Unterschiede darstellen zu können. Um das Transplant später auch einsetzen zu können, ist zudem die Evaluation der Zytotoxizität der einzelnen chemischen und der biologischen Behandlungsmedien sinnvoll.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Vorbereitung der Perikarde

2.1.1 Perikardgewinnung

Als Ausgangsmaterial für die Versuche diente bovines PK, das von der „Attenberger Fleisch GmbH und Co.KG“ in München zur Verfügung gestellt wurde. Eine Ausnahmegenehmigung für die Verwendung von tierischen Nebenprodukten zu Lehr- und Forschungszwecken gemäß Art. 17 Abs. 1 VO (EG) Nr. 1069/2009 lag vor. Die Gewinnung des tierischen Materials erfolgte unter Aufsicht und nach Weisung des amtlichen Tierarztes des Schlachtbetriebes. Insgesamt drei PK wurden vom Fleischbeschauer direkt bei der Schlachtung von den Innereien dreier Rindern getrennt. Dabei wurde der vollständige Erhalt der PK angestrebt, um eine ausreichend große Fläche für die Probenentnahme zu bewahren. Die einzelnen PK wurden von dem Tierarzt auf etwaige Erkrankungen des Spendertieres untersucht. Das PK wurde bei Raumtemperatur (RT) transportiert. Auf die Kühlung des Materials konnte verzichtet werden, da es direkt im Anschluss weiter verarbeitet wurde. Eine Einsicht über das Alter oder Geschlecht des jeweiligen Rindes konnte nicht erfolgen.

2.1.2 Präparation

Das überschüssige Fett und Gewebe wurde mithilfe von Mullkompressen (Gazin-Mullkompressen, Lohmann und Rauscher GmbH und Co.KG, Neuwied, Deutschland) möglichst vollständig von der fibrösen Schicht der unbehandelten drei PK abpräpariert und verworfen. Die Innenseite der PK, die seröse Schicht, präsentierte sich glatt und frei von anhängendem Gewebe (siehe Abb. 2 A).

Insgesamt wurden drei PK-Stücke aus jeweils einem PK gewonnen. Diese teilten sich auf in eine natives Stück, das unbehandelt blieb, eines für die alleinige DZ und eines, das sowohl dezellularisiert als auch mit einer der ausgewählten chemischen, physikalischen oder biologischen Methoden weiter behandelt wurde. Mit einem Lineal wurden pro PK jeweils zwei 10 x 10 cm große Stücke ausgemessen. Diese wurden mit einem sterilen, medizinischen Hautmarkierungsstift (steriler Hautmarkierungsstift Standardspitze, VMP Vertrieb medizinischer Produkte GmbH, Hückelhoven, Deutschland) auf dem PK markiert (siehe Abb. 2 B). Dabei

handelte es sich um das PK-Stück für die DZ und ein weiteres für die Kombination aus DZ und weiterer Behandlung. Das native PK wurde aus dem restlichen, präparierten Gewebe entnommen. Nach dem Herausschneiden der beiden ausgemessenen PK-Stücke mit einer chirurgischen Schere wurden diese mit verschiedenfarbigen Fäden für die jeweilige Gruppe (Nahtmaterial Prolene monofil blau 5,0 mit Nadel, Ethicon Endo Surgery, Somerville, USA) gekennzeichnet.

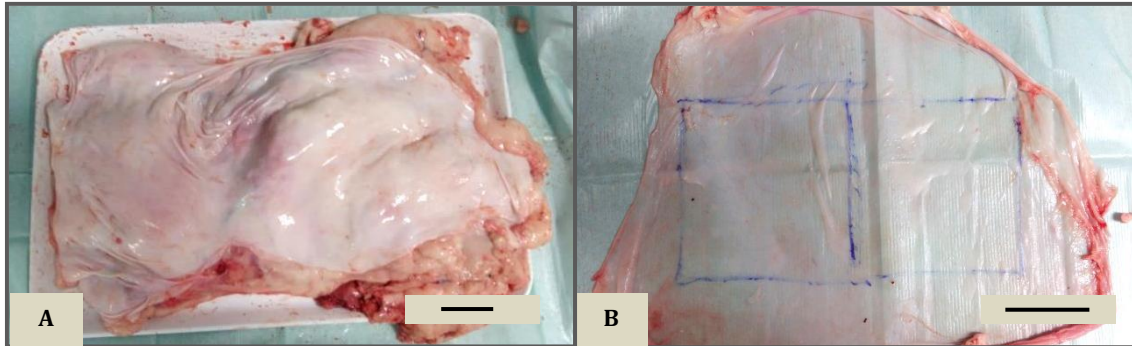


Abbildung 2: Natives PK direkt nach der Schlachthausabholung mit erkennbarem überschüssigen Fett und Gewebe an der Fibrosa (Pfeil) und eine glatte Serosa (A); Präpariertes PK mit Einzeichnung der PK-Stücke für die DZ und für die zusätzliche Behandlung mit der jeweiligen chemischen, biologischen oder physikalischen Methode; Größe 10 x 10 cm (B); Maßstabsbalken: 5 cm.

2.2 Dezellularisation

2.2.1 Versuchsaufbau

Sowohl die drei zuvor aus den drei PK gewonnen Stücke für die alleinige DZ, als auch die drei für die weitere Behandlung, wurden an einer Scheibe mit Löchern angenäht und mit einem daran befestigten Stab in ein 1 l-fassendes Schraubglas (Weithalslaborgewindeglas 1.000 ml, Schott AG, Mainz, Deutschland) gesenkt. Das Schraubglas, welches mit einer Detergenzienlösung befüllt war, war über einen im Deckel eingelassenen Schlauch mit einer Pumpe (Aquarien-Pumpe EDEN 155 80 W, Eden Water Paradise GmbH, Hörstel, Deutschland) verbunden. Diese lag in einem 2 l-Messbecher (Becher, VWR, Radnor, USA), welcher ebenfalls mit 1,5 l des gleichen Gemisches aus Detergens-PBS-Lösung gefüllt war. Hierüber konnte die Detergenzienlösung vom Messbecher in das Schraubglas gepumpt werden (siehe Abb. 3 A). Um einen Kreislauf zu gewährleisten führten zwei weitere Schläuche durch den Deckel des Schraubglases wieder in den Messbecher. Nach dem Anschalten der Pumpe entstand so ein vollständiger Kreislauf mit einem gleichmäßigen Durchfluss von ungefähr 16 l/min. Das Detergens wurde durch den

Druck der Pumpe in das Schraubglas, an den angehängten PK vorbei und durch die Schläuche zurück in den Messbecher gepumpt (siehe Abb. 3 B). Zeitweise wurde der gesamte Versuchsaufbau in ein Ultraschallbad (Ultrasonic Cleaner, USC-T, VWR) gestellt, um den DZ-Prozess mit Ultraschallwellen zu unterstützen.

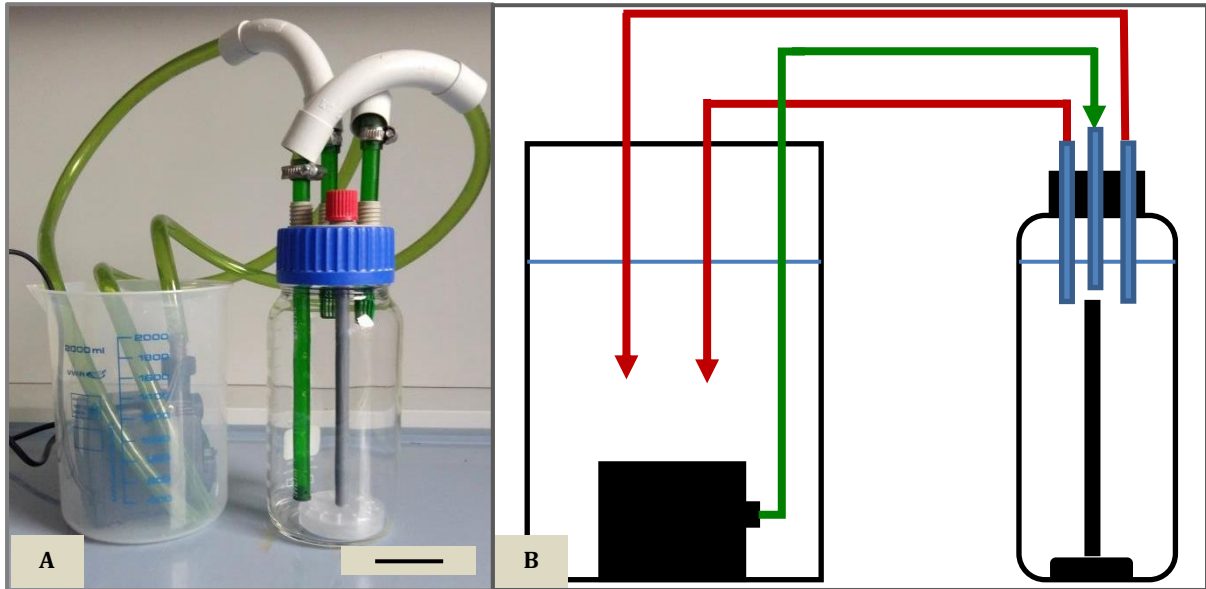


Abbildung 3: Die Hartplastikscheibe mit dem angebrachten Stab befindet sich im Schraubglas, das über ein Schlauchsystem mit der Pumpe im Messbecher verbunden ist (A); Schematische Darstellung des DZ-Aufbaus: links der Messbecher mit der Pumpe, rechts das Schraubglas mit der Scheibe, beide verbunden mit zu- und abführenden Schläuchen, um eine Zirkulation herzustellen (B); Maßstabsbalken: 5 cm.

2.2.2 Dezellularisationsprotokoll

Das DZ-Protokoll (siehe Tabelle 1) wurde in der herzchirurgischen Klinik und Poliklinik der Universität München entwickelt und für den Versuchsaufbau modifiziert [42]. Es sah eine Waschung mit der Detergenzienlösung bestehend aus 0,5%igem SD (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland) und 0,5%igem SDS (SDS Pellets, Rotiphorese-Grade, Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland) in PBS (PBS Dulbecco, Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland) für zunächst 4 h unter kontinuierlichem Durchfluss vor, wovon die ersten 30 min unter Ultraschallexposition stattfanden. Nach dem Wechsel DZ-Lösung begann der zweite 12-stündige Abschnitt der DZ mit kontinuierlichem Durchfluss, der ebenfalls in den ersten 30 min durch ein Ultraschallbad ergänzt wurde.

Auf die insgesamt 16-stündige DZ folgte der Waschungsprozess mit 10 x 15 min andauernden Zyklen (siehe Tabelle 1). Die Waschung selbst erfolgte mit dem gleichen Versuchsaufbau wie bei der DZ. Statt des Detergens wurde jedoch

ausschließlich PBS verwendet. Nach jedem 15-minütigen Waschschrift wurde die alte Waschlösung verworfen und der 2 l-Messbecher und das 1 l-Schraubgefäß mit neuer PBS-Lösung gefüllt.

Dauer	Medium	Ultraschallexposition
30 min	SD/SDS in PBS	+
3,5 h		-
Mediumwechsel		
30 min	SD/SDS in PBS	+
11,5 h		-
Mediumwechsel		
10 x 15 min	PBS	-

Tabelle 1: Ablauf des DZ-Prozesses: Einer 4-stündigen DZ mit 0,5%igem SD/SDS in PBS folgte nach einem Mediumwechsel der 12-stündige Waschprozess mit der gleichen Detergenzienlösung. In den ersten beiden 30 min der beiden DZ-Abschnitte wurde der Aufbau um ein Ultraschallbad ergänzt. Der DZ schloss sich ein 10 x 15-minütiger Waschvorgang mit PBS an.

Nach dem Waschvorgang konnten die zuvor angenähten PK-Proben mit Hilfe eines Skalpell (Feather Disposable Scalpel No. 23, Feather Safety Razor Co. Ltd., Osaka, Japan) von der Hartplastikscheibe gelöst werden. Die weitere Verwahrung der PK bis zur Behandlung mit den ausgewählten Methoden erfolgte in PBS bei 4 °C.

2.3 Sterilisation

2.3.1 Vorbereitung

Die acht ausgewählten Behandlungsmethoden können insgesamt in drei Untergruppen eingeteilt werden: chemische, physikalische und biologische. Die chemischen Verfahren beinhalteten die Behandlung mit Ethanol 70 % (EtOH), Povidon-Iod 7,5 % (POV), Benzalkoniumchlorid 2 % (BAC), Octenidindihydrochlorid 0,1 % (Octenidin) und Peressigsäure 0,1 % (PAA).

Die physikalischen Verfahren bildeten die UV- und die Gamma-Bestrahlung. Als biologisches Behandlungsverfahren wurde eine antibiotisch-antimykotische Lösung (Anti-Anti) evaluiert.

Zur Vorbereitung der Behandlung mit den chemischen und biologischen Medien wurden die entsprechenden PK-Proben in ein zuvor dampfsterilisiertes Becherglas überführt, welches das jeweilige Medium beinhaltet. Alle weiteren Schritte wurden im Folgenden bei RT und unter sterilen Bedingung mithilfe einer Reinraumwerkbank mit Laminar Flow (Reinraumwerkbank mit Laminar Flow, Hera safe, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) durchgeführt.

2.3.2 Chemische Methoden

Ethanol

Die Durchführung der chemischen Behandlung mittels EtOH erfolgte im Zuge dieser Arbeit angelehnt an das Behandlungsprotokoll, das von Kweon et al. [120] etabliert und von Yildirim et al. [121] bereits erfolgreich an bioabsorbierbaren Nanokomposits durchgeführt wurde. Die PK-Proben wurden für 30 min mit 70%igem EtOH, bestehend aus einem Gemisch aus 99,9%igem EtOH (Ethanol 99,9 %, vergällt mit MEK [v/v], Apotheke Klinikum Großhadern, Deutschland) und destilliertem Wasser (Aqua destillata AMPUWA, Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Deutschland), behandelt.

Povidon-Iod

Die PK wurden für 10 min mit 7,5%igem POV (Braunol, 7,5g Povidon-Iod mit 10 % verfügbarem Iod, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) behandelt. Diese Einwirkzeit wird vom Hersteller vor chirurgischen Eingriffen für die Gewährleistung der vollständigen Sterilität empfohlen [122].

Benzalkoniumchlorid

Die PK-Proben wurden für 15 min mit 2%igem BAC (Benzalkonium chlorid, BioXtra, Sigma-Aldrich) behandelt. Dafür wurden 2 g des BAC mit einer Präzisionswaage (Präzisionswaage Kern EW, Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland) abgewogen und in 100 ml sterilem PBS gelöst. Laut Herstellerinformation des Oberflächensterilisationsproduktes „Desotop®“ (Desotop, Desomed - Dr. Trippen GmbH, Malsfeld, Deutschland), dessen wirksamer Bestandteil BAC ist, reicht dieses Verfahren aus, um einen bakteriziden und viruziden Effekt zu erreichen [123].

Octenidindihydrochlorid

Die PK wurden für 60 min mit 0,1%igem Octenidin (Octendin[di]hydrochlorid, Dishman Pharmaceuticals, Gujarat, Indien) behandelt. In dieser Konzentration und nach dieser Einwirkungsdauer ist es laut Herstellerinformation von „Octenilin®“ auch wirksam gegen Biofilme [124]. Dafür wurden 0,1 g des Octenidines in 100 ml sterilem PBS aufgelöst. Da sich die Substanz nur schwer in PBS löst, wurde das Gemisch über 12 h mittels Magnetprüher (Magnetprüher RET basic, IKA Werke GmbH & Co.KG, Staufen, Deutschland) mit einer Rührfrequenz von 100/min suspendiert. In der angegebenen Zeit löste sich das Octenidin und bildete eine homogene, milchig trübe Lösung.

Peressigsäure

Die PK wurden für 3 h mit 0,1%iger PAA (Peressigsäure, Sigma-Aldrich) behandelt. Um die gewünschte Konzentration zu erlangen, wurden 1 ml der 39%igen PAA mit 389 ml sterilem PBS vermischt. Dieses Verfahren wurde von Selim et al. bereits erfolgreich für die Sterilisation von biologischem Gewebe bei Urethra-Transplantationen eingesetzt [125].

2.3.3 Biologische Methode

Antibiotisch-antimykotische Lösung

Als biologische Methode diente das Einlegen der PK in 5%iges Anti-Anti (Antibiotic-Antimycotic [100X], Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc.) mit PBS für 24 h. Orientierung, für die Dauer der Einwirkzeit, lieferte ein Protokoll von Yildirimer et al. [121], welche ihre Polymer-Proben ebenfalls mit Hilfe einer 5%igen antibiotisch-antimykotischen Lösung (10.000 Units/ml Penicillin, 10.000 µg/ml Streptomycin und 25 µg/ml Amphotericin B gelöst in PBS, Sigma Aldrich) behandelten.

2.3.4 Physikalische Methoden

UV-Bestrahlung

Die PK wurden für die UV-Sterilisation in sterile, eckige Petrischalen (Bakteriologische Petrischalen 120 mm x 120 mm, witeg Labortechnik GmbH,

Wertheim am Main, Deutschland) überführt, die mit jeweils 25 ml sterilem PBS befüllt waren, um eine Austrocknung der Proben während der Bestrahlung zu vermeiden. Die Petrischalen wurden in einem Abstand von 22 cm unter einer Ultraviolett-Lampe (HNS 15 W G13 UVC Lampe – PURITEC keimtötende UV-Lampe, OSRAM GmbH, München, Deutschland) platziert (siehe Abb. 4). Der gesamte Prozess fand auf einer Reinraumwerkbank mit Laminar Flow (Hera safe, Thermo Scientific Inc.) statt, um eine Kontamination der Proben zu vermeiden. Insgesamt wurden die Proben 3 h mit UV-Licht bestrahlt, wobei eine zuvor errechnete Gesamtstrahlendosis von mindestens 27,0 mJ/cm² erreicht wurde. Damit kann, laut dem Hersteller von vergleichbaren Ultraviolett-Lampen „Lennetech“, eine Keimreduktion von 99,999 % für Oberflächen gewährleistet werden [126]. Alle Proben wurden nach der Hälfte der Zeit mit einer sterilen Pinzette gewendet, um eine beidseitige Exposition zu ermöglichen.



Abbildung 4: Drei 10 x 10 cm große PK-Proben in, mit PBS befüllten, eckigen Petrischalen in einem Abstand von 22 cm unter einer UV-Lampe auf einer Reinraumwerkbank; Maßstabsbalken: 5 cm.

Gamma-Bestrahlung

Die PK wurden in einem sterilen Schraubgefäß, gefüllt mit sterilem PBS, in eine Gamma-Bestrahlungsanlage (Gammazell 220, Institut für Strahlenschutz, Helmholtz Zentrum München, Deutschland) überführt (siehe Abb. 5 A). Der Probenbehälter wurde so eingespannt, dass die Gamma-Strahlung auf die Mitte des Gefäßes traf (siehe Abb. 5 B). So konnte ein möglichst homogenes Bestrahlungsfeld geschaffen werden.



Abbildung 5: Die Bestrahlungsanlage Gammazell 220 (A); Aufhängung der PK-Proben in der Bestrahlungskammer des Gammazell 220 (B).

Es wurde eine Gesamtstrahlendosis von 3.000 Gy über einen Zeitraum von ca. 7,5 h erreicht. Zur Orientierung wurde ein Bestrahlungsprotokoll von Helder et al. herangezogen. Die Arbeitsgruppe erbrachte den Nachweis, dass mit dieser Strahlendosis die Sterilität von dezellularisiertem Herzklappengewebe gewährleistet werden kann [119].

2.3.5 Kombinationsversuche

Den oben genannten Versuchen schlossen sich, hervorgehend aus deren Ergebnissen, weiterführende Kombinationsversuche (KV) an. Im KV 1 erfolgte eine Behandlung der PK mittels 0,1%igem Octenidin für 60 min und darauffolgend eine Inkubation mittels Anti-Anti für 24 h. Im KV 2 wurden die Proben ebenfalls für 60 min in 0,1%igem Octenidin inkubiert und für 2 h mit UV-Licht bestrahlt.

Im KV 3 erfolgte die Behandlung der zuvor dezellularisierten PK-Proben mit 1%igem Octenidin für 60 min und darauffolgend mit 0,1%igem PAA für 30 min. Im KV 4 wurden die dezellularisierten PK mit 0,5%igem Octenidin für 60 min und 0,1%igem PAA für ebenfalls 60 min behandelt.

2.4 Waschprozess nach Sterilisation

Nach jeder der o.g. Behandlungsmethoden schloss sich ein Waschprozess an, um mögliche Rückstände der verwendeten Medien oder verbliebene Zellbestandteile zu entfernen. Dieser erfolgte unter einer sterilen Werkbank mit Laminar Flow, um mögliche Kontaminationen der Proben durch die Luft auszuschließen. Die zuvor behandelten Proben wurden mit einer sterilen Pinzette in ein weiteres dampfsterilisiertes Becherglas überführt. Die Waschung erfolgte 5 x 15 min lang bei RT mit jeweils 100 ml sterilem PBS auf einer Magnetrührplatte mit einer Rührfrequenz von 100/min. Das PBS wurde nach jeweils 15 min mithilfe einer sterilen Pipette (Serological Pipet, 50 ml, Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland) ausgetauscht.

2.5 Probenentnahme

Mithilfe einer chirurgischen Schere konnten die nativen Proben für die Histologie (Probengröße ca. 1 x 1 cm) und für die REM (Probengröße ca. 1 x 1 cm) gewonnen werden. Um einheitliche Proben für die Zugversuche zu erhalten, erfolgte der Einsatz einer Kniehebelstanze (Bent Lever Cutting, Zwick Roell GmbH & Co.KG, Ulm, Deutschland). So konnten standardisierte Proben mit einer Länge von 5 cm mit verbreiterten Endstücken, sowie einem schmalen Mittelstück generiert werden (siehe Abb. 6).

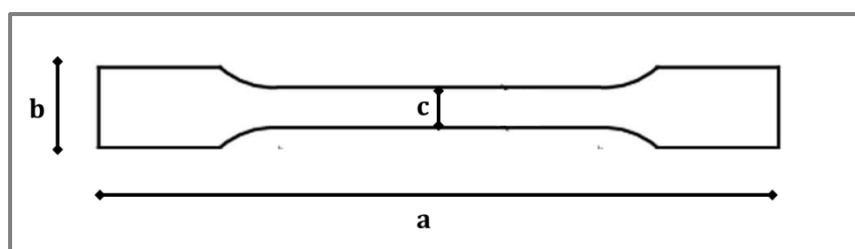


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Zugprobe, die mithilfe der Kniehebelstanze aus dem PK entnommen wurde. $a = 50 \text{ mm}$, $b = 8,5 \text{ mm}$, $c = 4 \pm 0,050 \text{ mm}$.

Die zuvor ausgestanzten Proben für die Zugversuche entsprachen alle der DIN-Norm 53504 in der Größe S3A.

Jedes PK wies einen individuellen Verlauf aus Kollagenfasern auf, welche eine komplexe Vernetzung bildeten. Bei den Zugversuchsproben wurde eben auf diese

Strukturindividualität geachtet, da schon aus vorhergehenden Studien ersichtlich geworden ist, dass die Zugfestigkeit je nach Faserverlauf deutlich variieren kann [127, 128]. Der Faserverlauf konnte mit einer Lichtplatte festgestellt werden. Dafür wurde das PK auf eine Glasplatte gelegt, unter deren Oberfläche LED-Lampen (LF06P short pitch 830, OSRAM GmbH) angebracht waren, die das PK durchleuchteten (siehe Abb. 7). Da PK unter Durchleuchtung aufgrund seiner geringen Dicke beinahe durchsichtig erscheint, konnte so gegen das Licht der Faserverlauf dargestellt und Zugproben sowohl längs als auch quer zur Faserausrichtung entnommen werden. Diese werden im Folgenden als Längsproben (LP) und Querproben (QP) bezeichnet. Für die dezellularisierten und die zusätzlich mit den evaluierten Methoden behandelten PK erfolgte die Probenentnahme nach dem gleichen Schema, wie bei den nativen PK. Jedoch wurden die Proben aus den 10 x 10 cm großen PK-Stücken nach DZ bzw. nach DZ und zusätzlicher Behandlung entnommen. Den mit der jeweiligen chemischen, physikalischen oder biologischen Methode behandelten PK-Proben wurden unter sterilen Bedingungen in der Reinraumwerkbank zwei 5 x 5 mm große Proben für den Sterilisationsnachweis entnommen.

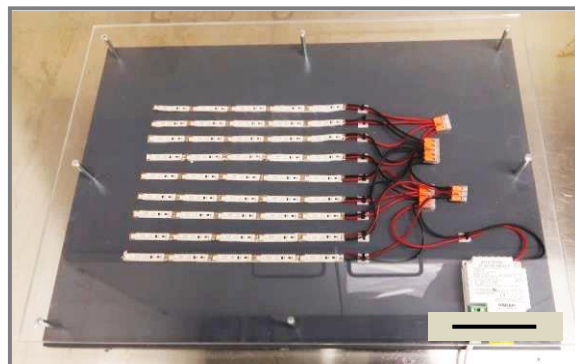


Abbildung 7: Speziell konstruierte Glasplatte mit LED-Lichtern unter der Oberfläche für die Durchleuchtung der PK; Maßstabsbalken: 10 cm.

3 ANALYSE

3.1 Sterilitätstestung

Um die Sterilität der Proben nachzuweisen, wurden zwei unterschiedliche Nährmedien für die Anzucht von Bakterien und Pilzen verwendet (siehe Abb. 8 A). Das Thioglycollate-Medium (Thioglycollate Medium USP, OXOID Deutschland GmbH, Wesel, Deutschland) zeigt laut Hersteller nach Inkubation bei $36 \pm 1^\circ\text{C}$ bei Bakterien ein klar sichtbares Wachstum in der Flüssigkeit nach drei und für Pilze nach fünf Tagen. Zudem wird eine Trübung der Flüssigkeit für *Clostridium sporogenes*, *Clostridium perfringens*, sowie *Pseudomonas aeruginosa* beschrieben, wohingegen bei *Staphylococcus aureus* eher mit einer Ausflockung der Lösung zu rechnen wäre [129].

Das Trypticase-Medium (Trypticase Soy Broth, BD GmbH, Heidelberg, Deutschland) weist laut Hersteller bei einer Inkubation bei $35 \pm 2^\circ\text{C}$ sowohl zahlreiche aerobe als auch fakultative und obligat anaerobe Bakterien oder Pilze nach. So wird bei *Streptococcus pneumoniae* nach einem Tag eine Ausflockung sichtbar, bei *Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus* nach zwei Tagen, bei *Bacillus subtilis* nach drei und bei *Candida albicans* und *Aspergillus brasiliensis* nach insgesamt fünf Tagen (siehe Tabelle 2) [130].

Inkubationsdauer	Wachstum von Bakterien und Pilze	
	Thioglycollate-Medium	Trypticase-Medium
1 d	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
2 d	-	<i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i>
3 d	<i>Clostridium sporogenes</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
5 d	Pilze	<i>Aspergillus brasiliensis</i> <i>Candida albicans</i>

Tabelle 2: Beginn des Wachstums von verschiedenen Bakterien und Pilzen in den beiden Inkubationsmedien nach einer Inkubationsdauer von 1 d, 2 d, 3 d und 5 d; - = kein Wachstum.

Nach dem sterilen Einführen einer Probe eines zuvor behandelten PK wurden beide bakteriologischen Anzuchtmedien in einem Wärmeschrank (Hera cell, Heraeus, Hanau, Deutschland) mit einer Temperatur von 37°C inkubiert. Um eine sichere Beurteilung gewährleisten und falsch negative Ergebnisse ausschließen zu

können, wurden die Medien jeweils für sieben Tage darin belassen. Es erfolgte eine Kontrolle der Medien am ersten, zweiten, dritten, fünften und siebten Tag der Inkubation. Blieben beide Anzuchtmedien auch am siebten Tag ungetrübt (siehe Abb. 8 B), wurde von der Sterilität der Probe ausgegangen. Zeigte auch nur eines der Sterilitätsmedien mikrobiologisches Wachstum, wurde die Probe als nicht steril eingestuft.

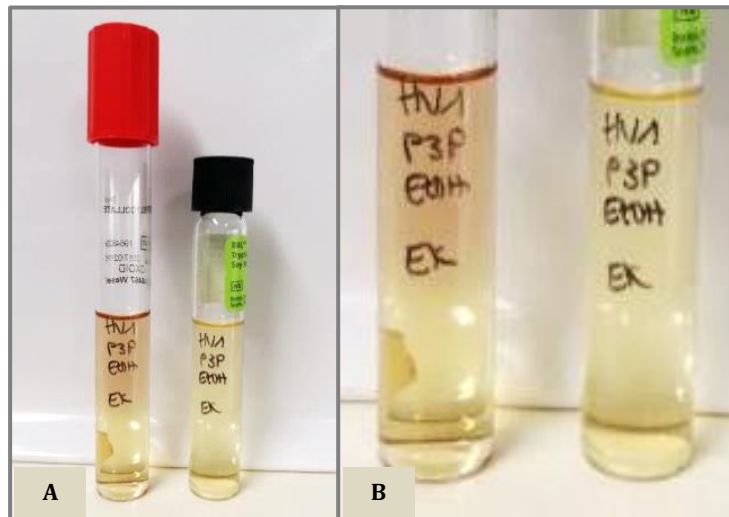


Abbildung 8: Das Thioglycollate- (roter Deckel) sowie das Trypticase-Anzuchtmedium (schwarzer Deckel) (A); Vergrößerung der ungetrübten Flüssigkeiten am Beispiel nach Behandlung mit EtOH (B).

3.2 Dicken- und Umfangsvermessungen

Die nativen, die dezellularisierten und die zusätzlich behandelten PK wurden hinsichtlich Dicke und Umfang vermessen. Hierzu wurden die vier Seiten des quadratischen PK mit einem Lineal abgemessen, um so eine Veränderung des Umfanges aufgrund der durchgeführten Verfahren feststellen zu können. Die Dicke der PK wurde mit einem Dickenmessgerät (Dial Gage Stand 913-101, Mitutoyo Deutschland GmbH, Neuss, Deutschland) an fünf vorher definierten Stellen ermittelt. Diese Stellen lagen jeweils in den vier Ecken sowie der Mitte der Probe. Durch den Vergleich der gemessenen Dicken zu den jeweiligen Zeitpunkten konnten so Rückschlüsse auf die Dickenzu- oder -abnahme gezogen werden.

3.3 Histologie

3.3.1 Vorbereitung

Die entnommenen Proben für die weiteren histologischen Untersuchungen wurden für mindestens 48 h in 4%iger Formalinlösung (Roti-Histofix 4%, Carl Roth GmbH) in einem Eppendorf-Gefäß mit Schraubverschluss gelagert. Zunächst erfolgte das Anfärben der PK-Stücke für 4 min in Hämalan (Mayers Hämalanlösung, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) und das Spülen für 3 x 2 min in destilliertem Wasser. Das Anfärben diente dem Zweck der besseren Sichtbarkeit beim späteren Anfertigen der Schnitte im Paraffinblock. Danach erfolgte die Entwässerung der Proben mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe, welche aus 30, 50, 70 und 96%igem Ethanol bestand. Darauf folgte das Eingießen der Proben in Paraffinblöcke. Nach dem Aushärten konnten mit Hilfe eines Mikrotoms (Mikrotom, MH 400 R, Microm International GmbH, Walldorf, Deutschland) 8 µm dicke Schnitte aus der Mitte der Probe angefertigt und auf einem Objektträger (Objektträger 25 x 75 x 1 mm, Superfrost, Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland) aufgebracht werden. Diese verblieben zur Trocknung über Nacht bei 40 °C im Wärmeschrank (WTC, Binder, Tuttlingen, Deutschland). Vor der jeweiligen Färbung wurden die Schnitte nochmals für 30 min im Wärmeschrank bei 50 °C erwärmt. Bevor die Schnitte angefärbt werden konnten, mussten diese zunächst vom Paraffin befreit werden. Hierfür wurden die Schnitte der H&E- sowie der DAPI-Färbung zunächst für zweimalig 15 min in Roti-Histol (Roti-Histol, Carl Roth GmbH + Co.KG) inkubiert. Daraufhin fanden für je 2 x 5 min Behandlungen mit Ethanol 100 %, 96 % und 70 % (Ethanol 100/96/70 Vol.-% vergällt, Apotheke Klinikum Großhadern) statt. Abschließend wurden die Schnitte für je 2 x 3 min mit destilliertem Wasser und PBS gespült (siehe Anhang). Bei den Pentachrom- und Pikro-Siriusrot-Färbungen wurden jeweils leicht abgewandelte, individuell vom Hersteller empfohlene, Prozeduren angewandt (siehe Anhang).

3.3.2 DAPI-Färbung

Bei 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) handelt es sich um einen fluoreszierenden Farbstoff. Dieser bindet stark an Regionen in der Doppelstrang-DNS (dsDNS), die reich an Basenpaaren mit Adenin und Thymin sind. Daher ist er für das Anfärben von Zellkernen im Gewebe geeignet [131, 132]. Wird der Farbstoff mit

ultraviolettem Licht von ca. 350 nm Wellenlänge angeregt, leuchtet dieser unter dem Fluoreszenzmikroskop bläulich auf. Das Emissionsmaximum liegt bei ca. 460 nm. Es werden allerdings nicht nur intakte Zellekerne sondern auch dsDNS-Rückstände mit DAPI angefärbt. Deshalb ist diese Färbung besonders für den DZ-Nachweis von Bedeutung.

Der Färbeprozess im Anschluss an die Entparaffinierung der Schnitte wurde unter möglichst lichtarmen Verhältnissen durchgeführt, da der Farbstoff DAPI durch UV-Strahlung seine fluoreszierende Wirkung verliert. Das DAPI-Reagenz wird gefroren aufbewahrt und musste deshalb 30 min vor der Färbung in einer verschlossenen Box bei RT aufgetaut werden. Im Folgenden konnte eine Mischung aus 200 µl des DAPI-Reagenzes und 200 ml PBS angesetzt und die Schnitte für 5 min darin inkubiert werden. Danach folgte eine Waschung der Schnitte mit PBS (10 min) und das Färben mit Sudan-Schwarz (2 min) zur besseren Kontrastierung der späteren Bildaufnahmen. Das Spülen erfolgte mit destilliertem Wasser (10 min) (siehe Anhang).

3.3.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H&E-Färbung) ist eine der Standardfärbungen in der Histologie und ermöglicht einen guten Überblick über feingewebliche Schnitte. Hämatoxylin ist ein basischer Farbstoff und dient vor allem dem Anfärben von basophilen Strukturen, wie den Zellkernen, die dann unter dem Lichtmikroskop blau erscheinen. Eosin färbt azidophile (eosinophile) Strukturen rötlich-lila an, was im Falle der PK-Schnitte besonders die Kollagenfasern und das Zytoplasma betrifft [133, 134].

Dem Entparaffinierungsprozess schloss sich das Anfärben der Schnitte mit Hämaun (Merck KGaA) für 5 min und dem nachfolgenden Bläuen mit lauwarmem Leitungswasser für die gleiche Zeit an. Nach dreimaligem Eintauchen in Ethanol 70 % folgte das Anfärben mit Eosin (Eosin Y solution alcoholic, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) für 2 min und kurzes Spülen mit Wasser. Am Ende des Färbeprozesses wurden die Schnitte nochmals mit Ethanol 70 % (viermaliges Eintauchen), Ethanol 96 % (zehnmaliges Eintauchen), Ethanol 100 % (10 min) und Xylol (dreimaliges Eintauchen) entwässert (siehe Anhang).

3.3.4 Pentachrom-Färbung

Die Pentachrom-Färbung wird vor allem als klassische Übersichtsfärbung und für das Anfärben sämtlicher Bindegewebsstrukturen in histologischen Schnitten verwendet [135]. So erlaubt es die Darstellung von elastischen Fasern (rot) und von Kollagenfasern (hellgelb). Weitere, nicht differenziert anfärbbare Bestandteile der EZM, stellen sich als Grundsubstanz blau-grün dar. Zudem färbt es die Zellkerne, die kein Bestandteil der EZM sind, blau-schwarz an. Mithilfe dieser histologischen Färbung war es möglich, die Bindegewebsstruktur der behandelten PK-Schnitte mit den Schnitten der Nativproben zu vergleichen und eine mögliche Schädigung der EZM durch die einzelnen Behandlungsmethoden festzustellen.

Nach dem Entparaffinierungsprozess wurden die Schnitte mithilfe des Herstellerprotokolls für die Pentachrom-Färbung (MORPHISTO GmbH) angefärbt (siehe Anhang). Dafür folgte eine Inkubation der Schnitte in Alcianblau (12 min) zum Anfärben, in alkalischem Alkohol (60 min) zur Differenzierung, in Weigerts Eisenhämatoxylin (10 min) zum Anfärben der Zellkerne, in Eisen(III)-Chlorid-Lösung (3 min), Natriumthiosulfat (1 min) und in Brillant-Crocein-Säurefuchsin (10 min) zum Anfärben des Zellplasmas. Dazwischen fand je ein Waschungsschritt mit destilliertem bzw. nicht-destilliertem Wasser statt, um überschüssige Farbpartikel und Rückstände der Chemikalien vor dem nächsten Färbeschritt zu entfernen. Zur Differenzierung des Gewebes diente das zweimalige Waschen mit 1%iger Essigsäure (30 s, 2 min) und dazwischen eine Inkubation mit 5%iger Phosphorwolframsäure (20 min). Anschließend folgte ein Entwässerungsschritt mit Ethanol 99 % (7 min) und einem weiteren Färbeschritt mit Safran du Gâtinais (6 min). Am Ende des Färbeprotokolls stand eine weitere Entwässerung der gefärbten Schnitte mit Ethanol 99 % (4 min), 2-Propanol (2 min) und mit Xylol (10 min) (siehe Anhang).

3.3.5 Pikro-Siriusrot-Färbung

Die Pikro-Siriusrot-Färbung wird vor allem für die Darstellung von Kollagenfasern und der Gesamtstruktur von Gewebe verwendet [136, 137]. Mit Hilfe der Polarisationsmikroskopie können Kollagen I (rot-gelb) und III (grün) dargestellt und voneinander abgegrenzt werden.

Im Anschluss an den Entparaffinierungsprozess der einzelnen Schnitte wurde ein Herstellerprotokoll (MORPHISTO GmbH) für Pikro-Siriusrot durchgeführt (siehe Anhang). Dieses beinhaltete die Färbung der Schnitte mit Weigerts Eisenhämatoxylin (8 min) und einen anschließenden Spülvorgang mit zweimaligem Eintauchen in destilliertes Wasser im Wechsel mit nicht-destilliertem Wasser zum Bläuen. Darauf folgte ein weiterer Färbeschritt mittels Pikro-Siriusrot (60 min) und anschließendem Spülen mit 30%iger Essigsäure (2 min). Abschließend wurden die Schnitte mit Ethanol 96 % (8 min), 2-Propanol (4 min) und Xylol (20 min) entwässert (siehe Anhang).

3.3.6 Auswertung der histologischen Schnitte

Am Ende der H&E-, Pentachrom- und Pikro-Siriusrot-Färbung konnten die Schnitte mit einem Eindeckmedium (Leica CV Mount, Leica Camera AG, Wetzlar, Germany) und einem Deckglas (Eindeckgläser 24 x 50 mm, Gerhard Menzel GmbH) versehen und unter dem Lichtmikroskop (Leica DMR, Programm LAS EZ Version 3.4.0, Kamera: digitale Leica DMR, Objektiv: PL FLUOTAR 10x/0.30-PH1, PL FLUOTAR 20x/0.50-PH2, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland) betrachtet werden. Hierbei wurden Aufnahmen in sowohl 100- als auch 200-facher Vergrößerung angefertigt. Für die mit Pikro-Siriusrot angefärbten Schnitte musste zudem ein linearer Polarisationsfilter für die Bildaufnahmen verwendet werden, um die Kollagenfaserstruktur optimal darstellen zu können.

Für die DAPI-Schnitte wurde ein Eindeckmedium für die Fluoreszenz verwendet (ibidi Mounting Medium, ibidi GmbH, Martinsried, Deutschland). Im Anschluss konnten die Schnitte unter dem Fluoreszenzmikroskop (AxioObserver, Kamera: AxioCam 705 Mono, Objektiv: Plan-Neofluar 40, Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland) in 50facher und 100facher Vergrößerung ausgewertet werden. Alle Bilder wurden mit der AxioVision-Rel. 4.8-Software aufgenommen. Um eine bessere Vergleichbarkeit zu erhalten, wurde eine Belichtungszeit von 400 ms für jedes Bild festgesetzt. Zudem werden in allen nachfolgenden Abbildungen die Innenseiten der PK-Schnitte (die seröse Schicht) auf der rechten und die Außenseiten (die fibröse Schicht) auf der linken Seite abgebildet.

3.4 Rasterelektronenmikroskopie

3.4.1 Allgemeines

Die REM bietet die Möglichkeit hochauflösende Bildaufnahmen von Oberflächenstrukturen anzufertigen. Indem Primärelektronen im Hochvakuum als gebündelter Elektronenstrahl über die eingeführte Probe geleitet werden, entstehen Sekundärelektronen (SE), Rückstreuelektronen sowie Röntgenstrahlen. Diese Interaktionen zwischen der Oberfläche der Probe und den Primärelektronen können mithilfe verschiedener Detektoren erfasst werden. Der im Versuchsaufbau verwendete SE-Detektor beispielsweise, ermöglicht die hochauflösenden Bilder aufgrund eines geringen Abstandes zum Objekt bei geringen Beschleunigungsspannungen des Primärstrahls. Es erfolgt im Anschluss eine rechnerische Rekonstruktion der Oberflächenstruktur in unterschiedlichen Graustufen. Entsprechende Topographie-, Material- oder Strukturkontraste können so abgebildet werden [138].

Um eine rasterelektronenmikroskopische Beurteilung überhaupt erst möglich zu machen, müssen die Proben Vorbehandlungsschritte unterlaufen. Im Rahmen des verwendeten Durchführungsprotokolls erfolgte zunächst eine Fixierung der Proben für mindestens 48 h. Die Fixierung soll das Gewebe in dem momentanen Zustand erhalten und es festigen [139]. Dadurch konnte eine Stabilität für die weitere Verarbeitung gewährleistet werden. Es schloss sich eine vollständige Entwässerung der Proben mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe an, sowie das Kritisch-Punkt-Trocknen. Beim Kritisch-Punkt-Trocknen handelt es sich um ein physikalisches Verfahren, das die Trocknung von Proben ohne Phasenübergang gewährleistet und damit die Probe in geringstem Ausmaß schädigt. Im Zuge dieses Verfahrens wurde die im Probenmaterial enthaltene Flüssigkeit in einer Druckkammer sukzessive durch Kohlenstoffdioxid (CO_2), das bei RT bereits unter einem Druck von ca. 55 bar flüssig ist, verdrängt. Die Temperatur wurde anschließend auf einen Wert jenseits des kritischen Punktes des CO_2 (31,0 °C) erhöht. Der kritische Punkt beschreibt in der Thermodynamik den Zustand eines Stoffes, der sich durch ein Angleichen seiner Dichten von Flüssigkeits- und Gasphase kennzeichnet. Die Differenzierung der beiden Aggregatzustände ist an diesem Punkt nicht mehr möglich. Dadurch liegt das CO_2 bei mehr als 31 °C und mindestens 73,8 bar als sogenanntes überkritisches Fluid vor [138, 140, 141].

Abschließend wurde der Kammerdruck bei konstanter Temperatur durch Ablassen des CO₂ wieder auf den Umgebungsdruck herabgesenkt. Dem Trocknungsprozess schließt sich als letzter Schritt die Beschichtung der Proben mit einem leitfähigen Material an. Hierfür wurden die Proben im Vakuum mit Goldatomen bedampft, was auch als „Sputtern“ bezeichnet wird. Nach Abschluss dieser Vorbereitungsschritte konnten die Proben rasterelektronen-mikroskopisch hinsichtlich ihrer Oberflächen- und Ultrastruktur untersucht werden.

3.4.2 Fixierung

Die für die REM-Analyse entnommene Proben aus dem PK wurden in FIX II (456 ml Ampuwa, Fresenius Kabi AG + 43,5 ml Glutaraldehyd; Sigma Aldrich + 0,75 ml HCL; ICN GmbH, Northeim, Deutschland + 5,65 g NaCaCO₃; Sigma Aldrich) überführt und in einem Eppendorf-Gefäß (Mikro-Schraubröhre 1,5 ml, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) luftdicht verschlossen. Die Proben wurden mindestens für 48 h bei RT in FIX II belassen, um eine vollständige Fixierung des Gewebes zu gewährleisten.

3.4.3 Alkoholreihe

Der Fixierung der Proben schloss sich eine Alkoholreihe an, die dem Auswaschen des FIX II und dem Entwässern der Proben dienen sollte. Dafür wurden die einzelnen Proben in einen Metallzylinder überführt. Für jeweils 10 min folgte die Inkubation der Proben in dem Zylinder in 30, 50, 70 und 96%igem Alkohol in aufsteigender Konzentration. Am Ende des Prozesses wurde der Metallzylinder mit den enthaltenden Proben in -20 °C kaltes, unvergälltes 99,9%iges Ethanol überführt.

3.4.4 Kritisch-Punkt-Trocknen

Der Alkoholreihe schloss sich das Kritisch-Punkt-Trocknen an. Die Druckkammer des Kritisch-Punkt-Trockners (siehe Abb. 9) (Critical Point Dryer CPD 030, BalTec Maschinenbau AG, Pfäffikon, Schweiz) wurde mit Aceton befüllt und der Metallzylinder darin eingesenkt. Die Kammer wurde verschlossen und im Folgenden bei einem konstanten Druck von ca. 60 bar auf 8 °C herabgekühlt. Das Aceton wurde sukzessive durch CO₂ ersetzt. Darauf folgend wurde die

Druckkammer auf eine Temperatur von 42 °C erwärmt. Durch diesen Schritt konnte das flüssige CO₂ in den überkritischen Zustand versetzt (die Kritisch-Punkt-Temperatur für CO₂ beträgt 31 °C) und ein konstanter Druck von ca. 80 bar aufgebaut werden. Dieser Druck wurde in einem Zeitraum von 30 min durch kontinuierliches Ablassen über ein Ventil auf den Umgebungsdruck reduziert. Als letzter Schritt konnten die getrockneten Proben aus der Druckkammer entnommen werden. Um bei der REM hochauflösende Bilder zu erzielen, mussten die Proben zudem mit einer feinen Goldschicht als elektrischen Leiter überzogen.



Abbildung 9: Der verwendete Kritisch-Punkt-Trockner CPD 030 links und Sputter-Coater SCD 050 rechts für die Vorbereitung der REM-Proben.

3.4.5 Sputtern

Die Proben wurden im Anschluss an das Kritisch-Punkt-Trocknen mit einem Skalpell in der Mitte halbiert und auf einen Stiftprobenträger mit haftender Oberfläche übertragen. Hierbei wurde darauf geachtet, dass jeweils eine Außen- und eine Innenseite der Probe auf einem Probenteller nach oben gerichtet waren. Die Stiftprobenteller wurden in die Vakuumkammer des Sputter-Coaters (siehe Abb. 9) (Sputter Coater SCD 050, BalTec Maschinenbau AG) eingefügt und die Kammer verschlossen. Wir erzeugten ein Vakuum von mindestens 5×10^{-2} mbar, welches in geringen Mengen Argongas enthielt. Dieses wurde benötigt, um nach Anlegen der Spannung von 570 Volt Atome aus einer Goldkathode (28 mA) auszulösen und so eine möglichst monoatomare, aber ausreichende Goldbeschichtung zu erzielen. Nach Abschalten des Gerätes belüftete dieses die Vakuumkammer und die Stiftprobenteller konnten entnommen werden.

3.4.6 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen

Nach der alkoholischen Entwässerung, der Kritisch-Punkt-Trocknung und dem Sputtern der Proben konnten diese mittels REM untersucht werden. Dafür wurden die Stiftprobenteller in die dafür vorgesehene Halterung in der Probenkammer des REM (Rasterelektronenmikroskop Zeiss EVO LS10, Carl Zeiss AG) eingeschraubt und unter Vakuum verschlossen. Es wurden Aufnahmen von der serösen und der fibrösen Seite der Proben in 100-, 500-, 2 k-, und 10 k- facher Vergrößerung angefertigt und auf dem Computer gespeichert.

3.5 Zugversuche

Der Zugversuch gilt als Standardverfahren, um Größen wie Zugfestigkeit, Bruchkraft und Streckdehnung eines Materials zu ermitteln [142]. Bei den Zugversuchen wurden die in Längs- und Querrichtung zum Faserverlauf ausgestanzten Proben bis zum Bruch der Probe gedehnt. Während des Dehnungsprozesses konnte die Kraft (F) und die Längenänderung (ΔL) kontinuierlich gemessen werden. Die Probenlagerung bis zur Ausführung der Zugversuche erfolgte bei 8 °C in PBS.

3.5.1 Durchführung der Zugversuche

Die Zugversuche konnten mit Hilfe einer Zugprüfmaschine (ZwickiLine bis 5 kN, Zwick Roell GmbH und Co. KG) am Lehrstuhl für Medizintechnische Materialien und Implantate an der Technischen Universität München durchgeführt werden (siehe Abb. 10 A). Die Auswertung der Versuche erfolgte mit dem Programm „Zwick TestXpert“ (testXpert V12.3, Zwick Roell GmbH und Co. KG). Die Dicke jeder Probe wurde vor den Zugversuchen mit Hilfe eines Dickenmessgerätes bestimmt. Danach wurde die Probe an den jeweiligen verarbeiteten Enden in der Zugmaschine eingespannt. Um eine optimale Haftung zu garantieren, konnten Schleifpapierstreifen zu Hilfe genommen und an den Enden befestigt werden (siehe Abb. 10 B). Die Dehnung des Materials erfolgte mit einer gleichbleibenden, vorher definierten Geschwindigkeit (30 mm/min). Die Messung wurde von der Zugprüfmaschine selbständig abgebrochen, nachdem die maximale Zugkraft ($F_{\max}$) erreicht wurde.

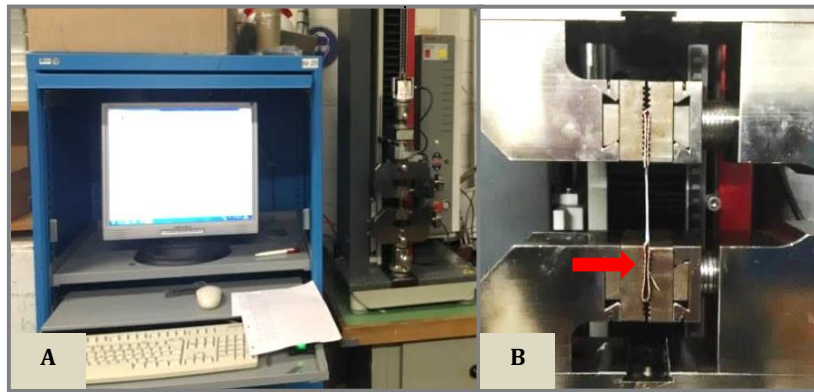


Abbildung 10: Die verwendete Zugprüfmaschine im Überblick (A); Der Probenhalter mit der eingespannten PK-Probe in vergrößerter Aufnahme, der Pfeil deutet auf das untere Ende der eingespannten Probe (B).

3.5.2 Auswertung der Zugversuche

Verglichen wurde die maximale Zugkraft auch Bruchkraft genannt der einzelnen behandelten Proben. Diese ließ sich aus der maximal aufgewendeten Zugkraft auf die vorher berechnete Querschnittsfläche der Probe berechnen. Dabei bildeten die gemessenen Werte der nativen PK einen Bezugswert für sowohl die alleinig dezellularisierten als auch für die zusätzlich mit den zu evaluierenden Methoden behandelten Proben. Dadurch, dass die maximale Zugkraft der einzelnen Proben je nach Faserrichtung differierte, ist eine getrennte Aufgliederung der LP und QP sinnvoll.

3.6 Zytotoxizitätstestungen

3.6.1 Zellisolation

Der gesamte Zellisolutionsprozess lief unter sterilen Bedingungen unter einer Sterilwerkbank mit Laminar Flow ab. Die im Rahmen der Zytotoxizitätstestung benötigten EC konnten durch enzymatische Lyse aus Fragmenten drei humaner Venae saphenae magnae isoliert werden. Die Venensegmente waren Reste von Bypass-Operationen und wurden anonymisiert. Zur Verwendung der Venen für Forschungszwecke lag eine Unbedenklichkeitsbescheinigung der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität vor. Eine Aufklärung der betreffenden Patienten über die weitere Verwendung war erfolgt.

Nach der Entnahme wurden die Venensegmente bis zur Weiterverarbeitung bei 4 °C in M199 (Biochrom GmbH) gelagert und transportiert. Es folgte die

Kanülierung und das Anbringen eines Dreiwegehahnes (Dreiwegehahn, B. Braun Medical AG, Escholz matt, Schweiz) an beiden Enden. Die Dichtigkeit konnte im nächsten Schritt durch das Spülen der Vene mit einer speziellen Spülflüssigkeit (Spülmedium: 494 ml M199 + 5 ml Gentamycin; Biochrom GmbH + 5000 i.E. Heparin; Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) überprüft werden. Intravasale Fremdkörper konnten so gleichzeitig aus dem Gefäß entfernt werden. Mit dem Einbringen einer Trypsin-EDTA-Mischung (Trypsin-EDTA 10x Solution, Sigma-Aldrich GmbH) erfolgte das Herauslösen der EC. Die Vene wurde währenddessen in PBS inkubiert und im Wärmeschrank bei 37 °C gelagert. Nach 15 min konnte die enzymatische Reaktion mit M199 und FCS (Stoppmedium: 444 ml M199 + 5 ml Gentamycin; Biochrom GmbH + 1 ml 50000 i.E. Heparin; Ratiopharm GmbH + 50 ml FCS; Thermo Fisher Scientific Inc.) beendet werden. Der Spül- und Inkubationsvorgang wurde nochmals wiederholt, um eine größere Menge an EC herauszulösen. Im Anschluss erfolgte die Zentrifugation der gewonnenen Suspension für 7 min bei 500 U/min. Es konnte der jeweilige Überstand mit einer sterilen Pipette entnommen und das verbliebene Zellpellet mit jeweils 5 ml EC-Medium (Endothelial Cell Growth Medium, PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland + 25 ml FCS + EC-Supplement) suspendiert werden. Diese Zellsuspensionen wurden in 12,5 cm² große Zellkulturflaschen (Cell culture flask, Corning B.V. Life Science, Amsterdam, Niederlande) zur weiteren Kultivierung überführt.

3.6.2 Zellkultivierung

Die Zellkulturflaschen wurden bei 37 °C im Wärmeschrank gelagert. Das Endothelzell-Medium wurde drei Mal pro Woche mithilfe von sterilen Pipetten ausgetauscht. Unter dem Phasenkontrastmikroskop wurde die Zelldichte am Boden der Zellkulturflaschen regelmäßig kontrolliert. Waren die Zellen nach ein bis zwei Wochen konfluent, also einem Zellrasen ähnlich, konnten diese auf weitere Zellkulturflaschen aufgeteilt werden.

Hierfür erfolgte ein Spülvorgang mit PBS und dem anschließenden Ablösen der Zellen mit Trypsin unter Inkubation der Zellkulturflasche bei 37 °C für 2 min. Der Erfolg der Zellablösung wurde ebenfalls unter dem Phasenkontrastmikroskop kontrolliert. Nach der darauffolgenden Zentrifugation der Zellsuspension bei 500 U/min konnte das entstandene Zellpellet mit frischem EC-Medium

resuspendiert und auf eine größere Zellkulturflasche umverteilt werden; zunächst auf eine 75 cm², dann auf eine 162 cm² und anschließend auf jeweils drei verschiedene 162 cm² große Zellkulturflaschen (Cell culture flask, Corning B.V. Life Science).

3.6.3 Kryokonservierung

Die Zellen wurden bis zur Versuchsdurchführung bei -80 °C im Gefrierschrank konserviert. Zunächst erfolgte das Ablösen der Zellen mit Trypsin (siehe 3.6.2) und die Zentrifugation und danach das Suspensieren der Zellpellets mit einem Gemisch aus 70%igem Zellmedium, 20%igem FCS und 10%igem Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma-Aldrich GmbH). Da DMSO bei RT auf längere Zeit zelltoxisch wirkt, wurde die Zellsuspension umgehend in Kryoröhrchen überführt und in speziellen Kryoboxen bei -80 °C eingefroren. Die Kryoboxen gewährleisteten ein möglichst langsames Abkühlen der Suspension (ca. 1 °C/min), was die zellschädigenden Einflüsse des DMSO auf die Zellen minimieren sollte. Beim Auftauvorgang wurden die gefrorenen Zellen mit einem Gemisch aus 8 ml M199 und 4 ml FCS resuspendiert. Dies wurde zügig durchgeführt, da wie auch schon beim Einfrieren hierbei auf die Zelltoxizität des DMSO geachtet werden musste. Das Gemisch wurde für 5 min zentrifugiert und mit EC-Medium in Suspension gebracht. Im Anschluss konnte die Zellsuspension auf 162 cm² große Zellkulturflaschen verteilt werden.

3.6.4 Versuchsdurchführung

Um die Zytotoxizität der angewandten chemischen und des biologischen Mediums zu prüfen, mussten diese in Kontakt mit den zuvor isolierten EC gebracht werden. Die Medien wurden in jeweils drei verschiedenen, absteigenden Konzentrationen verwendet. Als Ausgangswert diente die Konzentration der einzelnen verwendeten Behandlungsmedien (Ausgangskonzentration). Außerdem wurde ein Zehntel (Verdünnung 1) und ein Hundertstel (Verdünnung 2) dieser Konzentration für die Zytotoxizitätstestung verwendet (siehe Tabelle 3). So sollte eine Konzentrationsabnahme des Stoffes während des Waschvorganges simuliert werden. Die jeweilige zu evaluierende Substanz wurde mit EC-Medium auf die entsprechende Konzentration verdünnt.

Medien	Ausgangskonzentration	Verdünnung 1	Verdünnung 2
EtOH	70,0%	7,00%	0,700%
POV	7,5%	0,75%	0,075%
BAC	2,0%	0,20%	0,002%
Octenidin	0,1%	0,01%	0,001%
PAA	0,1%	0,01%	0,001%
Anti-Anti	5,0%	0,50%	0,005%

Tabelle 3: Aufschlüsselung der Konzentrationen der einzelnen chemischen und des biologischen Medien für die Zytotoxizitätsmessungen.

Jeweils 2 ml/Well der hergestellten Lösungen konnten nun auf die 24-Well-Platten (24 Wells, Multiple Well Plates, Beckton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) verteilt werden. Zur Zellzahlermittlung wurde 10 µl der Zellsuspension mit 40 µl Trypanblau (Trypan Blue Solution 0,4%, Sigma-Aldrich GmbH) gemischt. Die so angefärbten Zellen konnten unter dem Phasenkontrastmikroskop mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Zählkammer, C-Chip, Biochrom GmbH) ausgezählt werden und so eine Zellkonzentration pro Milliliter im Rückschluss berechnet werden. Am Boden jeden Wells wurde mit Hilfe einer sterilen Pipette 30.000 Zellen ausgesät. Es wurden pro untersuchtes Medium drei Wellplatten angelegt. Für jede einzelne Versuchsdurchführung von 24 h, 48 h und 72 h wurde zusätzlich eine sogenannte Leerwertkontrolle angelegt. Diese bestand lediglich aus dem Medium, jedoch ohne Zellbesiedelung. Zudem wurde jeweils eine Positivkontrolle angelegt, welche aus dem Zellmedium und Zellen jedoch ohne Behandlungsmedium bestand.

Die erste wurde für 24 h, die zweite für 48 h und die dritte für 72 h bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert und dann ausgewertet.

3.6.5 Auswertung

Für die Auswertung des Zytotoxizitätsversuches wurde pro Well 50 µl WST-1-Stocklösung (WST-1-Stocklösung, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) in 450 µl Kulturmedium aus einem Well verdünnt. Die verbliebenen 1550 µl Kulturmedium in den einzelnen Wells wurde vollständig abgenommen und die zuvor entstandenen 500 µl Arbeitslösung aus WST-1 und Kulturmedium auf die EC am Boden der Wells dazu gegeben. Es schloss sich eine Inkubation der Well-Platten für 30 min bei 37 °C im Wärmeschrank an. Hierbei erfolgte, bei

erhaltener mitochondrialer Aktivität der EC, die Umsetzung des hellroten Tetrazoliumsalzes des WST-1 in tiefgelbes Formazan durch mitochondriale Dehydrogenasen. Je Well wurden jeweils 3 x 100 µl umgesetzter WST-1-Lösung in drei Wells einer 96-Well-Platte (96 Well Microplates, Beckton Dickinson GmbH) überführt.

Die Auswertung des Farbumschlages erfolgte durch eine photometrische Messung mit Hilfe eines ELISA-Readers (Multiskan Ascent 96 Plate Reader, Thermo Fisher Scientific Inc.). Die Extinktionswerte der Flüssigkeiten in den einzelnen Wells konnte mit Hilfe der AxioVision Mikroskopsoftware (AxioVision REl. 4.8, Carl Zeiss AG) bei einer Messwellenlänge von 450 nm automatisch ausgewertet werden. Die gemessenen Extinktionswerte der Leerproben konnten im Folgenden von den Extinktionswerten der mit Sterilisationsmedien besiedelten Zellen abgezogen werden, um eine Verfälschung durch das Kulturmedium auszuschließen. Die Extinktionswerte der Kontrollproben dienten als Referenzwerte zu den Extinktionswerten der Zellen nach den Behandlungsmedien. Diese zeigen an, wie sich die Zellen ohne weitere Einflüsse, sondern lediglich mit Zellmedium verhalten.

3.7 Statistik

Die Auswertung der einzelnen erhobenen Werte erfolgte mit Hilfe des Programms „Microsoft Excel 2010“. Aufgrund der geringen Anzahl an behandelten Proben (n=3), wurde der Mittelwert der einzelnen Werte ermittelt und zumeist als absolute Größe dargestellt. Zudem wurde jeweils die Standardabweichung errechnet, um eine Streuung der Werte abschätzen zu können.

Eine Ableitung von Signifikanzen war lediglich bei der größeren Versuchsprobenmenge von nativen (n=24) und dezellularisierten PK (n=24) möglich bzw. statistisch sinnvoll. Alle angegebenen Signifikanzen wurden mittels t-Test ermittelt. Es wurde ein Signifikanzniveau von 5 % ($\alpha=0.05$) festgelegt.

4 ERGEBNISSE

4.1 Sterilitätstestung

4.1.1 Chemische Methoden

Die jeweils drei inkubierten PK-Proben, die mit den chemischen Medien EtOH, PAA und BAC behandelt wurden, zeigten auch nach sieben Tagen keinerlei Trübung des Thioglycollate- und des Trypticase-Mediums.

Eine der drei mit POV behandelten PK-Proben wies am siebten Tag der Inkubation eine Ausfällung des Trypticase-Mediums auf, wohingegen das Thioglycollate-Medium ungetrübt blieb. Die Nährmedien der beiden anderen inkubierten PK-Proben zeigten keinerlei Trübung.

Die Anzuchtmedien für Mikroorganismen mit inkubierten PK-Proben, die mit Octenidin behandelt wurden, wiesen nach sieben Tagen nur bei einer PK-Probe keine Trübung auf. Bei zwei Proben war nach zwei Tagen eine Ausfällung des Thioglycollate-Mediums zu beobachten. Das Trypticase-Medium zeigte dafür keinerlei Anzeichen von Mikroorganismen, was gegen Streptococcus pneumoniae, Escherichia coli und Staphylococcus aureus spricht, jedoch nicht näher spezifiziert werden kann (siehe Tabelle 4).

4.1.2 Biologische Methode

Die biologische Behandlungsmethode mit der Inkubation der Proben in Anti-Anti erwies sich als vollkommen unzureichend. Bereits nach einem Tag konnte eine Trübung beider Arten von Anzuchtmedien aller inkubierten PK-Proben verzeichnet werden (siehe Tabelle 4).

4.1.3 Physikalische Methoden

Von den physikalischen Verfahren gewährleistete die Gamma-Bestrahlung die Sterilität auch noch nach sieben Tagen. Es zeigte sich keinerlei Trübung der Nährmedien mit den inkubierten Gamma-bestrahlten Proben.

Die UV-Bestrahlung hingegen führte zu keiner effizienten Sterilisation. Hier waren von Beginn an zwei der drei behandelten PK-Proben laut Trypticase-Medium nicht mehr steril. Nach sieben Tagen wiesen alle mikrobiellen Nährmedien eine Trübung auf, ausgenommen von einem Thioglycollate-Medium (siehe Tabelle 4).

Chemische Behandlungsmethoden	Sterilität nach n d					
	Medium	1 d	2d	3 d	5 d	7 d
EtOH	Thio.	---	---	---	---	---
	Tryp.	---	---	---	---	---
PAA	Thio.	---	---	---	---	---
	Tryp.	---	---	---	---	---
BAC	Thio.	---	---	---	---	---
	Tryp.	---	---	---	---	---
POV	Thio.	---	---	---	---	---
	Tryp.	---	---	---	---	--+
Octenidin	Thio.	---	+++	+++	+++	+++
	Tryp.	---	---	---	---	---
Biologische Behandlungsmethode						
Anti-Anti	Thio.	+++	+++	+++	+++	+++
	Tryp.	+++	+++	+++	+++	+++
Physikalische Behandlungsmethoden						
UV-Bestrahlung	Thio.	--+	--+	--+	--+	--+
	Tryp.	+++	+++	+++	+++	+++
Gamma-Bestrahlung	Thio.	---	---	---	---	---
	Tryp.	---	---	---	---	---

Tabelle 4: Auflistung der Sterilitätsnachweise der drei PK-Proben mit dem Thioglycollate- (Thio.) und Trypticase-Medium (Tryp.) nach 1 d, 2 d, 3 d, 5 d und 7 d nach den chemischen Medien EtOH, PAA, BAC, POV und Octenidin, sowie nach der biologischen Methode mittels Anti-Anti, als auch nach physikalischer Behandlung mittels UV- und Gamma-Bestrahlung; + = Trübung, - = keine Trübung. Die nicht sterilen Nachweise sind dick markiert und blau hinterlegt.

4.1.4 Kombinationsversuche

Nach der Durchführung der KV 1 konnte, dank der beiden mikrobiologischen Inkubationsmedien, nach bereits einem Tag eine teilweise Trübung und bei dem KV 2 nach 2 Tagen die teilweise Trübung beider Medien nachgewiesen werden. Da sich die beiden Methoden bereits hinsichtlich ihrer Sterilisationspotenz als

ungeeignet erwiesen, wurden keine weiteren Auswertungsmethoden mehr durchgeführt.

Die KV 3 und KV 4 zeigten sich hinsichtlich ihrer Sterilisation effektiv. So ließ sich auch nach 7 Tagen keine Trübung der Medien nachweisen (siehe Tabelle 5).

Kombinationsversuche	Sterilität nach n d					
	Medium	1 d	2 d	3 d	5 d	7 d
KV 1	Thio.	--+	--+	+++	+++	+++
	Tryp.	--+	--+	+++	+++	+++
KV 2	Thio.	---	--+	--+	--+	--+
	Tryp.	---	+++	+++	+++	+++
KV 3	Thio.	---	---	---	---	---
	Tryp.	---	---	---	---	---
KV 4	Thio.	---	---	---	---	---
	Tryp.	---	---	---	---	---

Tabelle 5: Auflistung der Sterilitätsnachweise der drei PK-Proben mit dem Thioglycollate- (Thio.) und Trypticase-Medium (Tryp.) nach 1 d, 2 d, 3 d, 5 d und 7 d nach KV 1, KV 2, KV 3 und KV 4. KV 3 und KV 4 zeigten eine ausreichende Sterilisationseffizienz.

4.2 Dicken- und Umfangsmessungen

4.2.1 Nativproben

Die durchschnittliche Dicke aller vermessenen nativen PK betrug im Durchschnitt $514,6 \pm 91,7 \mu\text{m}$. Die PK zeigten sowohl lokale Dickenunterschiede als auch im Vergleich untereinander. So wies das dickste, native PK eine Dicke von $698,2 \mu\text{m}$ auf, wohingegen das dünnste PK nur $301,2 \mu\text{m}$ dick war. Innerhalb eines PK zeigen sich zudem ebenfalls je nach Region deutliche Dickenunterschiede. Den maximalen Dickenunterschied zeigte ein natives PK, das an einer ausgewählten Stelle eine maximale Dicke von $900,0 \mu\text{m}$ sowie eine minimale Dicke an einer anderen ausgewählten Stelle von $429,0 \mu\text{m}$ aufwies, was einer Differenz von $471,0 \mu\text{m}$ entspricht.

Die Umfänge der nativen Proben betrugen im Durchschnitt $35,14 \pm 1,06 \text{ cm}$. Dies bedeutet, dass es nicht immer möglich war, die Probengröße mit genau 10 cm

Kantenlänge auszumessen und sie durch die begrenzten, anatomischen Gegebenheiten häufig etwas kleiner ausfielen als der zuvor festgelegte Richtwert.

4.2.2 Dezellularisierte Proben

Die durchschnittliche Dicke der gesamten PK-Proben nahm nach der DZ im Vergleich zu den nativen Messwerten um 31,0 % zu und belief sich im Durchschnitt auf $688,8 \pm 97,1 \mu\text{m}$. Diese Zunahme zeigte sich jedoch nicht statistisch signifikant ($p=0,07$). Der Umfang der dezellularisierten Proben hingegen blieb mit $34,66 \pm 0,61 \text{ cm}$ annähernd konstant, was einer prozentualen Änderung von lediglich 1,4 % entspricht und sich statistisch signifikant zeigte ($p=0,02$).

4.2.3 Behandelte Proben

Nach der Behandlung der PK mit EtOH wurde eine durchschnittliche Dicke von $567,1 \pm 75,5 \mu\text{m}$ gemessen. Somit nahm sie im Vergleich zu den nativen Proben im Durchschnitt um $70,4 \pm 35,8 \mu\text{m}$ zu, zeigte jedoch im Vergleich zu den dezellularisierten Proben beinahe eine gleichbleibende Dicke mit nur einer geringen durchschnittlichen Abnahme von $9,9 \pm 32,9 \mu\text{m}$. Der Umfang lag nach EtOH-Behandlung bei $33,23 \pm 0,52 \text{ cm}$, was einen Rückgang sowohl zur nativen Probe um $4,02 \pm 1,04 \text{ cm}$, sowie zur dezellularisierten von $1,80 \pm 0,36 \text{ cm}$ bedeutet (siehe Abb. 11 und 12 EtOH).

Nach der Behandlung mit POV zeigte sich eine durchschnittliche Dicke von $663,9 \pm 33,0 \mu\text{m}$. Dies bedeutet $124,4 \pm 33,4 \mu\text{m}$ mehr im Verhältnis zu den Dicken der nativen PK. Im Vergleich zu den lediglich dezellularisierten PK zeigte sich eine durchschnittliche Abnahme von $10,2 \pm 84,0 \mu\text{m}$. Der Umfang fiel $32,90 \pm 0,54 \text{ cm}$ aus. Dieser war im Durchschnitt um $1,05 \pm 0,63 \text{ cm}$ geringer als im Vergleich zu den nativen Umfängen. Verglichen zu den dezellularisierten Werten zeigte sich hier ein Abnahme des Umfang von $0,43 \pm 0,92 \text{ cm}$ (siehe Abb. 11 und 12 POV).

Die Dicken der mit Octenidin behandelten PK zeigten sich bei $582,9 \pm 199,2 \mu\text{m}$. Im Vergleich zu den nativen PK war hier eine Zunahme um $122,5 \pm 113,7 \mu\text{m}$, jedoch nur eine leichte durchschnittliche Abnahme zu den dezellularisierten Proben von $16,1 \pm 227,4 \mu\text{m}$ zu sehen. Der durchschnittliche Umfang zeigte sich annähernd gleichbleibend mit $34,23 \pm 1,28 \text{ cm}$. Im Vergleich zu den nativen Proben war hier

eine geringe Zunahme von $0,08 \pm 0,67$ cm zu sehen, wohingegen sich der Umfang verglichen zu den dezellularisierten Proben abnehmend mit $0,70 \pm 0,50$ cm zeigte (siehe Abb. 11 und 12 Octenidin).

Die mit BAC behandelten PK hingegen wiesen eine Dicke von $582,3 \pm 88,3$ μm auf. So zeigte sich zu den nativen Proben lediglich eine Zunahme der durchschnittliche Dicke um $32,6 \pm 106,5$ μm , wohingegen eine deutliche Abnahme der Dicke von $205,1 \pm 166,9$ μm im Vergleich zu den dezellularisierten PK-Proben zu verzeichnen war. Der Umfang der PK nach der Behandlung mit BAC lag im Schnitt bei $34,23 \pm 1,39$ cm, was sich um $0,47 \pm 0,54$ cm im Vergleich zu den nativen Proben zunehmend zeigte. Verglichen mit den dezellularisierten Proben bedeutete dies in diesem Falle eine Zunahme des Umfangs um $2,10 \pm 1,18$ cm (siehe Abb. 11 und 12 BAC).

Nach der Behandlung mit Anti-Anti war eine deutliche Zunahme der Dicke der PK von $1041,3 \pm 287,8$ μm zu verzeichnen. Sowohl im Vergleich zu den nativen PK-Proben zeigte sich eine Steigerung der Dicke um $492,3 \pm 334,2$ μm , als auch im Vergleich zu den lediglich dezellularisierten um $224,3 \pm 93,3$ μm . Der Umfang blieb mit $32,60 \pm 0,89$ cm annähernd gleich zu den nativen und dezellularisierten Proben (siehe Abb. 11 und 12 Anti-Anti).

Nach der Behandlung mit dem chemischen Medium PAA war eine deutliche Zunahme der Dicke auf $1199,1 \pm 122,2$ μm zu sehen. Dies bedeutete eine Zunahme um $753,7 \pm 263,7$ μm im Vergleich zu den nativen PK. Auch im Vergleich zu den Proben nach DZ kam es nochmals zu einer Steigerung der Dicke um $531,6 \pm 153,5$ μm . Der Umfang nahm bei dieser Methode am drastischsten ab auf $30,63 \pm 0,95$ cm. Das bedeutete eine Abnahme von $6,60 \pm 0,74$ cm im Vergleich zum nativen Umfang, sowie von $5,97 \pm 0,99$ cm im Vergleich zu den dezellularisierten Proben (siehe Abb. 11 und 12 PAA).

Nach der UV-Bestrahlung war eine Dicke von $642,7 \pm 225,6$ μm zu verzeichnen. Im Vergleich zu den nativen Proben zeigte sich somit eine Steigerung um $102,6 \pm 154,9$ μm , jedoch im Verhältnis zu den Dicken der dezellularisierten Proben eine Abnahme um $64,7 \pm 285,3$ μm . Beim Umfang war im Gegensatz dazu eine Abnahme auf $32,97 \pm 1,41$ cm ersichtlich, was im Verhältnis zu den nativen Proben eine Abnahme von $2,32 \pm 0,74$ cm bedeutete und im Vergleich zu den dezellularisierten eine Abnahme von $2,0 \pm 1,42$ cm (siehe Abb. 11 und 12 UV).

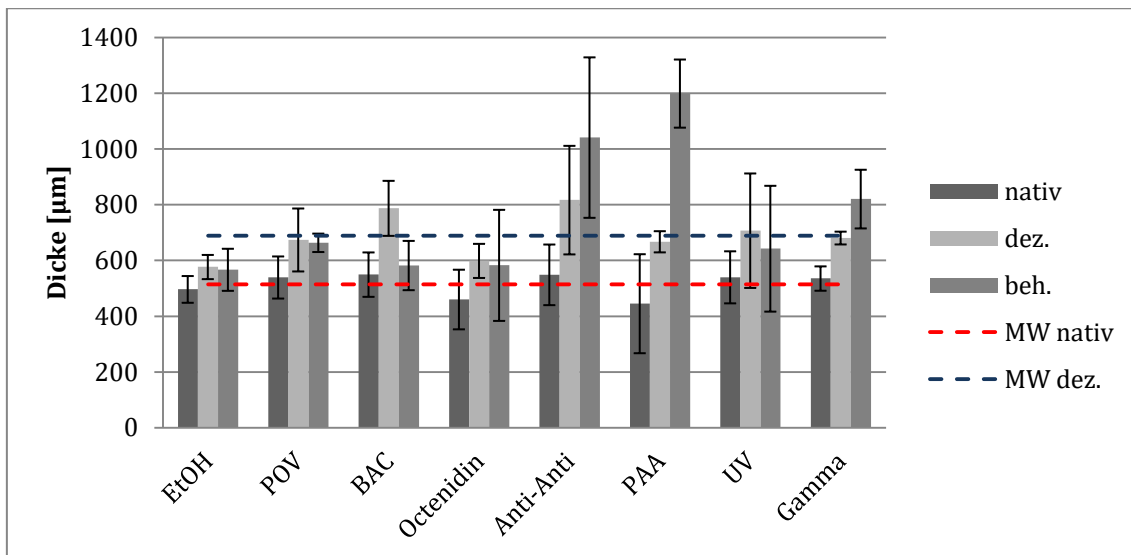


Abbildung 11: Dicken der PK in µm: nativ, nach der DZ, sowie nach DZ und Behandlung mit den jeweiligen chemischen (EtOH, POV, BAC, Octenidin, PAA), biologischen (Anti-Anti) und physikalischen (UV- und Gamma-Bestrahlung) Behandlungsverfahren; dez. = dezellularisiert, beh. = mit der jeweiligen Methode behandelt, rot gestrichelte Linie (MW nativ) = Mittelwert aller nativen PK (n= 24), blau gestrichelte Linie (MW dez.) = Mittelwert aller dezellularisierten PK (n=24). Das eingezeichnete Streumaß entspricht der Standardabweichung bei einer jeweiligen Gruppengröße von n=3.

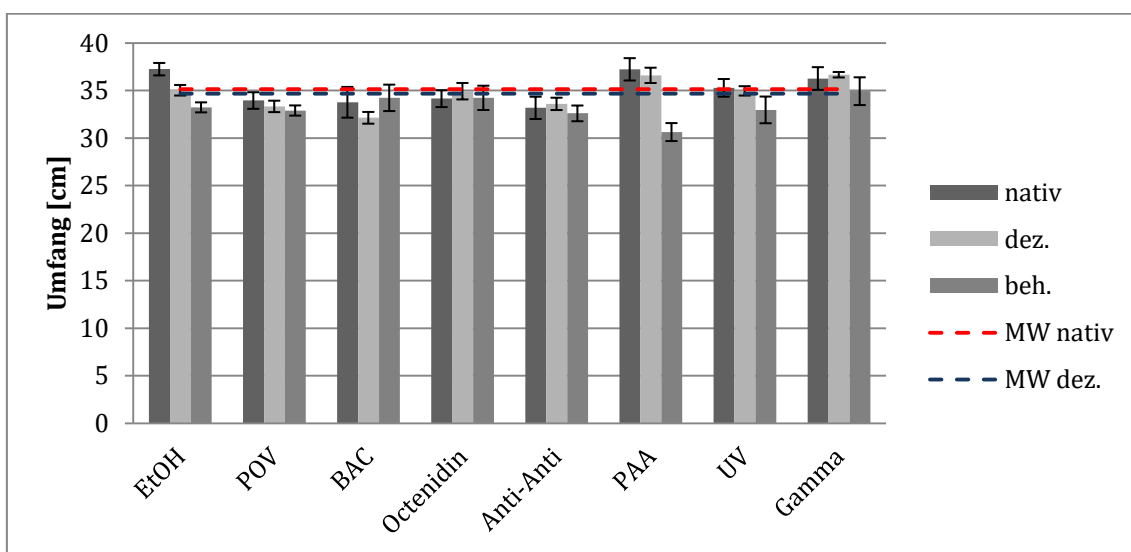


Abbildung 12: Umfänge der PK in cm: nativ, nach DZ, sowie nach DZ und Behandlung mit den jeweiligen chemischen (EtOH, POV, BAC, Octenidin, PAA), biologischen (Anti-Anti) und physikalischen (UV- und Gamma-Bestrahlung) Behandlungsverfahren; dez. = dezellularisiert, beh. = mit der jeweiligen Methode behandelt, rot gestrichelte Linie (MW nativ) = Mittelwert aller nativen PK (n=24), blau gestrichelte Linie (MW dez.) = Mittelwert aller dezellularisierten PK (n=24). Das eingezeichnete Streumaß entspricht der Standardabweichung bei einer jeweiligen Gruppengröße von n=3.

Nach der Gamma-Bestrahlung zeigte sich die Dicke mit einem durchschnittlichen Wert von $820,7 \pm 105,2 \mu\text{m}$, was im Vergleich zu den nativen Proben eine Zunahme von $285,1 \pm 68,5 \mu\text{m}$ war. Auch konnte hier im Vergleich zu den dezellularisierten Proben eine erneute Dickenzunahme von $139,7 \pm 95,5 \mu\text{m}$ beobachtet werden. Der

Umfang zeigte sich hingegen leicht regredient auf $34,93 \pm 1,46$ cm, was einer Abnahme von $1,33 \pm 0,05$ cm im Vergleich zum durchschnittlichen nativen Umfang gleichkommt, verglichen mit dem durchschnittlichen Umfang der Proben nach DZ um $1,73 \pm 1,47$ cm (siehe Abb. 11 und 12 Gamma).

4.2.4 Kombinationsversuche

Die durchschnittliche Dicke der nativen PK in der KV-3-Gruppe lag bei $581,5 \pm 106,0$ μm , die der KV-4-Gruppe bei $529,5 \pm 51,7$ μm . Wie auch bereits anhand der vorangegangenen Versuche zu sehen war, zeigte sich in beiden Kombinationsversuchen eine Zunahme der Dicke der PK nach der DZ. In der KV-3-Gruppe war eine Dickenzunahme von $88,0 \pm 8,2$ μm zu verzeichnen, in der KV-4-Gruppe von $192,2 \pm 39,7$ μm .

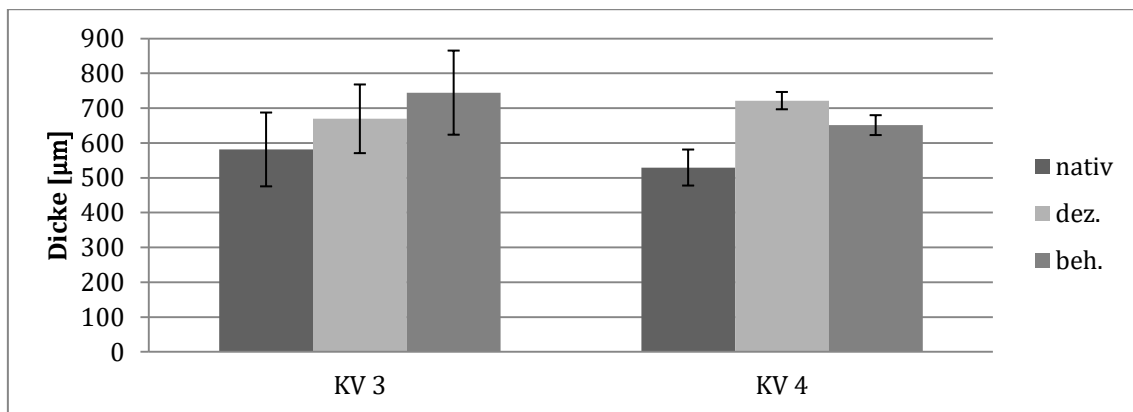


Abbildung 13: Dicken der PK in μm : nativ, nach DZ, sowie nach DZ und Behandlung mit dem jeweiligen Kombinationsversuchsprotokoll; dez. = dezellularisiert, beh. = mit Protokollen des KV 3 oder KV 4 behandelt. Das eingezeichnete Streumaß entspricht der Standardabweichung bei einer jeweiligen Gruppengröße von $n=3$.

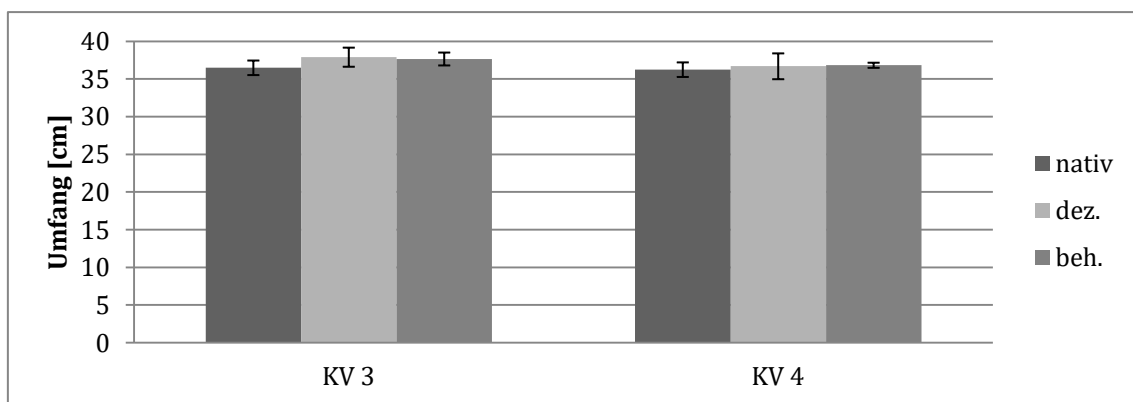


Abbildung 14: Umfänge der PK in cm: nativ, nach DZ, sowie nach DZ und Behandlung mit dem jeweiligen Kombinationsversuchsprotokoll; dez. = dezellularisiert, beh. = mit den Protokollen des KV 3 oder KV 4 behandelt. Das eingezeichnete Streumaß entspricht der Standardabweichung bei einer jeweiligen Gruppengröße von $n=3$.

Die Umfänge der Proben blieben dabei bei beiden Versuchsgruppen nach DZ annähernd gleich. In der KV-3-Versuchsgruppe zeigte sich eine Umfangszunahme von $1,41 \pm 0,19$ cm, in der KV-4-Versuchsgruppe von $0,45 \pm 0,49$ cm.

Nach Behandlung mit dem KV-3-Protokoll war eine weitere Zunahme der durchschnittliche Dicke auf $744,7 \pm 120,8$ μm zu verzeichnen. Im Gegensatz dazu zeigte sich die Dicke nach Behandlung der PK-Proben mittels KV-4-Protokolls im Verhältnis zu den dezellularisierten PK leicht abnehmend auf $651,4 \pm 28,6$ μm . Der Umfang blieb nach beiden Sterilisationsprotokollen annähernd erhalten. Nach dem KV-3-Protokoll zeigte sich ein Umfang von $37,67 \pm 0,86$ cm. Nach dem KV-4-Protokoll konnte ein Umfang von $36,83 \pm 0,34$ cm gemessen werden (siehe Abb. 13 und 14).

4.3 Histologie

4.3.1 DAPI-Färbung

Der DZ-Erfolg des angewandten Protokolls wurde vor allem anhand der DAPI-Färbung ermittelt. So konnten in den Histologieschnitten der nativen Proben zahlreiche DNA-Bestandteile dargestellt werden. Die Zellkerne lagen in den verschiedenen nativen Aufnahmen teilweise homogen und vereinzelt auch gruppiert über die histologischen Schnitte verteilt (siehe Abb. 15 A). Im Gegensatz dazu zeigten die histologischen Schnitte aller Versuchsgruppen nach DZ keine angefärbten Zellstrukturen (siehe Abb. 15 B). In vier von 24 PK-Schnitten waren allerdings auch nach der DZ noch vereinzelt DNA-Partikel auszumachen (siehe Abb. 15 C). So waren zwar keine deutlichen Zellkerne mehr erkennbar, jedoch kann von DNA-Rückständen ausgegangen werden.

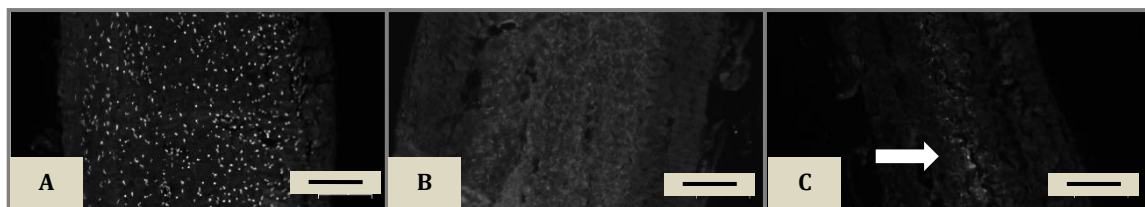


Abbildung 15: DAPI-Färbung eines nativen PK-Schnittes mit angefärbter DNA (A), nach erfolgreicher DZ ohne Nachweis von fluoreszierenden DNA-Rückständen (B) und nach unvollständiger DZ (C) mit angefärbten DNA-Rückständen (siehe weißer Pfeil); Maßstabsbalken: 200 μm .

4.3.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Mit der H&E-Färbung ließ sich ein zusätzlicher DZ-Nachweis erbringen. Die Färbung der nativen histologischen Schnitte mittels H&E ließ die Zellkerne als bläulich-schwarz angefärbte, rundliche Strukturen erscheinen (siehe Abb. 16 A, sowie B schwarzer Pfeil). Meist lagen diese diffus verstreut zwischen den rötlich-lila angefärbten Faserbündeln der PK-Proben. Zum Teil kam es, wie auch schon in der DAPI-Färbung zu sehen, je nach Schnittebene, zu kleineren Zellkernakkumulationen. Im Gegensatz zu den nativen Gewebeschnitten zeigte die H&E-Färbung in der Übersicht der PK-Schnitte nach DZ das Fehlen der bläulichen Zellkerne (siehe Abb. 16 C und D). Mitunter konnten ebenfalls je nach Schnittebene in allen Proben kleinere Gefäße in den Gewebeschnitten dargestellt werden. Diese zeigten sich als bläuliche Kreise mit einem mittigen Lumen (siehe Abb. 16 D, schwarzer Pfeil). Neben dem Aufzeigen des DZ-Erfolges zeigte die H&E-Färbung bei der Beurteilung der Übersicht der dezellularisierten PK-Schnitte eine Auflockerung der Faserstruktur nach DZ (siehe Abb. 16 C). Ansonsten ergab die Auswertung der dezellularisierten Proben keine prozessbedingten Schäden an der mikroskopischen Struktur der PK. Die dezellularisierten PK-Schnitte wiesen allesamt eine intakt erscheinende EZM-Struktur auf (siehe Abb. 16 C und D).

Mit der H&E-Färbung konnte zudem ein guter Überblick über die allgemeine Beschaffenheit der gesamten Proben gegeben werden. Jedes einzelne PK zeigte zwar eine individuelle Faserstruktur und Dicke, jedoch konnten einige strukturelle Gemeinsamkeiten eruiert werden. Auch in der histologischen Färbung war eine Unterscheidung der Außen- und Innenseite der PK-Schnitte möglich. Die Innenseite der nativen Proben war meist glatt und durchgängig (siehe Abb. 16 A Stern), wohingegen die Außenseite eine unregelmäßige, durchbrochene und aufgefaserter Struktur aufwies.

Die EZM stellte sich aufgrund der Azidophilie ihrer Komponenten rötlich bis lila dar. Sowohl an der Innen- als auch an der Außenseite der PK-Schnitte zeigten sich die Fasern eher aufgelockert. In der Mitte der Schnitte war das Bild von durchgehenden, fest zusammenstehenden Faserbündeln geprägt. Zumeist zeigte sich ein leicht welliger Verlauf der einzelnen Faserstränge.

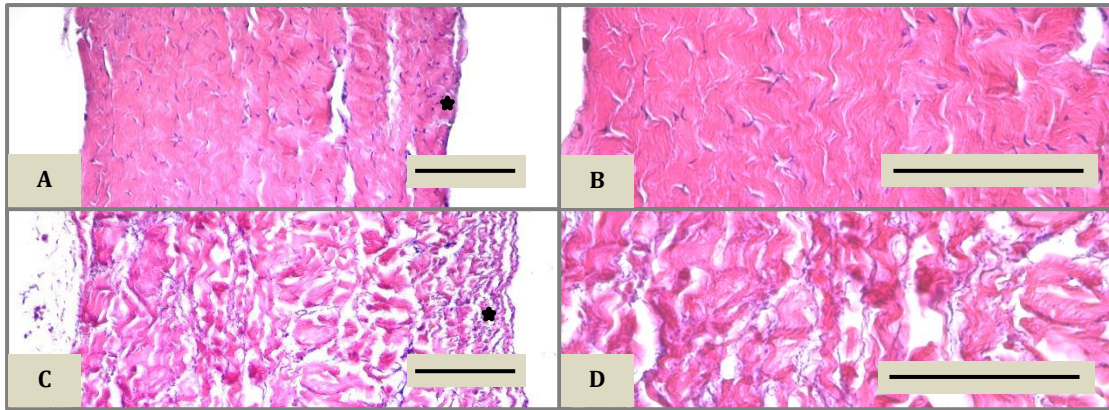


Abbildung 16: H&E-Färbung nativer PK-Schnitte mit den bläulich angefärbten Zellkernen (A und B); dezellularisierte PK-Schnitte ohne Zellkerne und aufgelockerter Faserstruktur (C und D), die jeweilige Innenseite ist mit einem Stern gekennzeichnet; Maßstabsbalken: 200 µm.

Die chemischen Behandlungsmethoden mittels EtOH, POV, BAC und Octenidin verursachten keine wesentlichen Veränderungen an der EZM-Struktur. Die Übersichtsfärbung mittels H&E zeigte zwar eine Auflockerung der einzelnen PK-Fasern (siehe Abb. 17 A-D), jedoch war diese nicht progredient im Vergleich zu den Kontroll-PK nach DZ. Die Behandlung der PK-Proben mit PAA hingegen zeigte in den histologischen Schnitten in H&E-Färbung eine leicht verwaschene Struktur der EZM. Insgesamt war der Faserverlauf jedoch noch erhalten (siehe Abb. 17 F).

Die Behandlung der Proben mit der biologischen Behandlungsmethode mittels Anti-Anti erzielte den Erhalt der EZM-Struktur sowohl im Vergleich zu den nativen, als auch zu den dezellularisierten Proben. Es waren, bis auf die leichte Auflockerung wie nach der DZ, keine Veränderungen in der Faserstruktur erkennbar (siehe Abb. 17 E).

Die physikalischen Bestrahlungsmethoden bewirkten beide eine deutliche, in der H&E-Färbung sichtbare, Veränderung der EZM-Struktur. Im Gegensatz zu den chemischen und biologischen Verfahren zeigte sich nach der UV-Bestrahlung der Proben keine Auflockerung der Faserstruktur, wie nach DZ, sondern eine Verdichtung bis hin zur Faserverschmelzung (siehe Abb. 17 G). Die deutlichste Zerstörung der EZM zeigten die Proben jedoch nach der Gamma-Bestrahlung. In der H&E-Färbung war keine durchgehende Faserstruktur in den einzelnen PK-Schnitten mehr erkennbar. Die Proben wiesen multiple Strangbrüche und Verschmelzungen auf und differierten damit deutlich von der nativen und dezellularisierten Struktur (siehe Abb. 17 H).

Nach dem KV-3-Protokoll zeigte sich eine erhaltene Faserstruktur in der Übersichtsfärbung (siehe Abb. 17 I). Auch nach KV-4-Protokoll zeigte sich die

Faserstruktur erhalten, jedoch waren angedeutete Faserverschmelzungen zu beobachten (siehe Abb. 17 J).

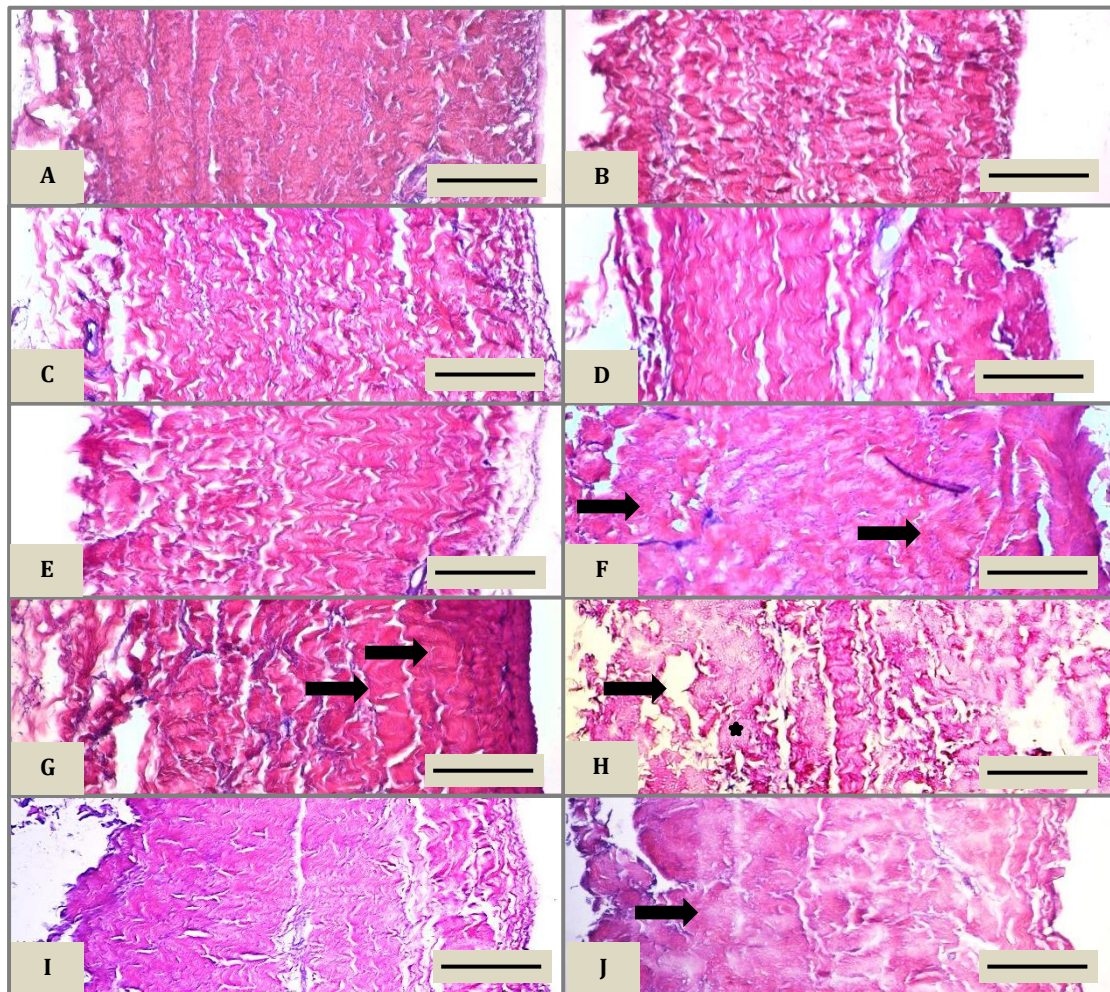


Abbildung 17: H&E-Färbung der histologischen Schnitte der behandelten PK-Proben in 100-facher Vergrößerung. Nach der Behandlung mittels EtOH (A), POV (B), BAC (C), Octenidin (D), Anti-Anti (E) sowie KV 3 (I) sind keine deutlichen Veränderungen sichtbar. Die Schnitte nach Behandlung mittels PAA (F), sowie nach dem KV-4-Protokoll (J), wiesen eine minimal verwaschene Struktur (Pfeile) auf. Die UV-Bestrahlung (G) verursachte ein Verschmelzen der einzelnen Fasern vor allem an der Innenseite der PK-Schnitte (Pfeile). Die Gamma-Bestrahlung (H) verursachte enorme Schäden mit Auflösung der Faserstruktur, Strangbrüche (Pfeil), sowie Faserverschmelzungen (Stern); Maßstabsbalken 200 μm .

4.3.3 Pentachrom-Färbung

Mithilfe der Pentachrom-Färbung war eine Darstellung der EZM möglich. Den dominierenden Anteil in den nativen Schnitten bildeten gelblich-angefärbte Kollagenfasern. Zudem zeigte sich bei den nativen Proben, je nach Schnittebene, ein unterschiedlich ausgeprägtes Bild an zusätzlichen, rot-gefärbten elastischen Fasern und seltener an blau-grün-angefärbter Grundsubstanz. Neben der EZM-

Darstellung konnten die Zellkerne der nativen PK als rötlich-schwarze, zwischen den Kollagenfasern der nativen PK-Proben liegende, Strukturen identifiziert werden (siehe Abb. 18 A). Es waren in allen Schichten der nativen PK-Schnitte diffus verteilte Zellkerne zu erkennen. Insgesamt zeigten die histologischen Schnitte ein sehr variables Bild an Faserausprägungen. So finden sich in einigen Schnitten beispielsweise sehr viele rot-angefärbte, elastische Fasern, die in anderen Schnitten des gleichen PK nicht zu finden waren.

Die Auswertung aller dezellularisierten Proben mittels Pentachrom-Färbung belegte, dass die kollagenen und elastischen Fasern im Vergleich zu den nativen Proben nach dem DZ-Prozess intakt geblieben waren. Der einzig wahrnehmbare Unterschied der EZM zu den Nativproben war eine visuell erkennbare Auflockerung des Gewebes und damit eine leichte Aufhellung der Schnitte. In Übereinstimmung mit der H&E- und DAPI-Färbung wurde mittels dieser histologischen Färbemethode zudem ein vollständiger DZ-Erfolg nachgewiesen, da nach der DZ keine Zellkerne oder Kernbestandteile mehr anzufärben waren (siehe Abb. 18 B).

Mithilfe der Untersuchung der behandelten Proben sollten prozessbedingte Schäden an der Struktur der PK erkannt, beziehungsweise ausgeschlossen werden. Soweit der optische Vergleich es zuließ, konnte keine wesentliche Änderung der Faseranteile der EZM, weder nach Behandlung mit den chemischen, biologischen oder physikalischen Methoden, sowie nach den Kombinationsversuchen, festgestellt werden. Wie schon nach dem DZ-Verfahren zeigten sich die einzelnen Fasern in ihrer Struktur zumeist weiter aufgelockert, jedoch war keine Abnahme der Grundsubstanz sowie der elastischen oder kollagenen Fasern zu beobachten (siehe Abb. 18 C-I, K und L). Lediglich nach der Gamma-Bestrahlung konnten in allen Schnitten bis auf eine deutlich blasse, hellgelbe bis bräunliche Faserstruktur, welche am ehesten als kollagene Fasern gewertet werden können, keinerlei EZM mehr angefärbt werden (siehe Abb. 18 J).

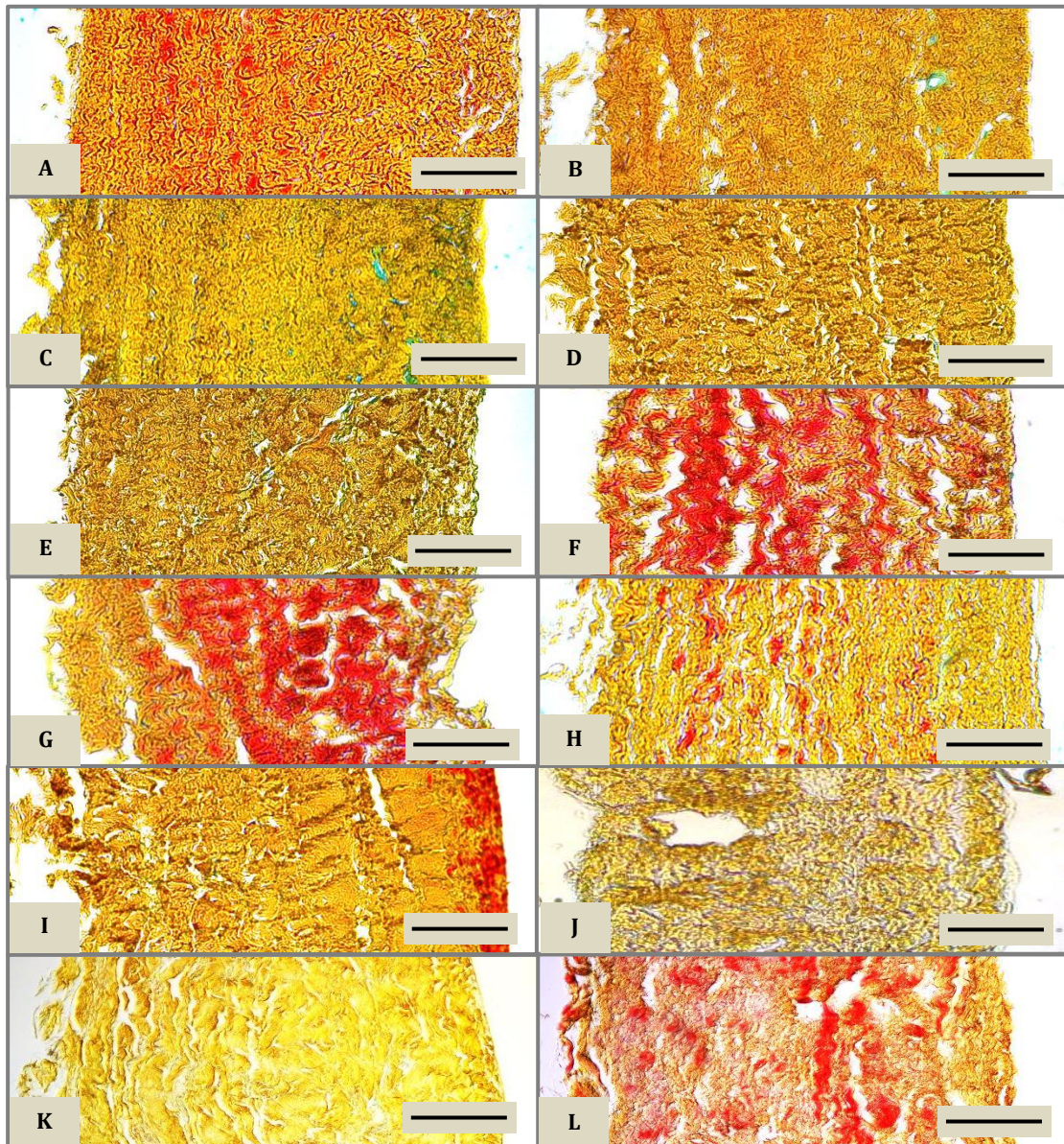


Abbildung 18: Pentachrom-Färbung nativer (A) und dezellularisiertes PK ohne Zellkerne und mit einem leichten Auseinanderweichen der angefärbten Kollagenfasern (B). Die PK nach Behandlung mit EtOH (C), POV (D), BAC (E), Octenidin (F), PAA (G), Anti-Anti (H), UV-Bestrahlung (I), KV 3 (K) und KV 4 (L) zeigten einen Erhalt der elastischen und kollagenen Fasern. Nach Gamma-Bestrahlung (J) war jedoch lediglich eine blasse Kollagenstruktur zu sehen. Maßstabsbalken: 200µm.

4.3.4 Pikro-Siriusrot-Färbung

Durch die Pikro-Siriusrot-Färbung ließen sich vor allem die Faserstruktur und der Faserverlauf gut nachvollziehen. Die Innen- und Außenseite der einzelnen PK-Schnitte konnten klar unterschieden werden. Die anatomisch nach innen gewandte Seite des PK zeigte sich glatt begrenzt mit intakten kollagenen Fasern. Die nach außen gewandte Seite wirkte hingegen deutlich aufgelockert mit teilweise nachweisbaren Faserbrüchen. Zumeist in der Mitte der einzelnen Schnitte

verliefen die Fasern in einer fischgrätenähnlichen Anordnung. Dieses Muster durchzog das gesamte PK in Längsrichtung. Diese einzelnen, charakteristischen Faserstrukturen reihten sich in Reihen aneinander und wurden gelegentlich durch bindegewebige Fasern unterbrochen (siehe Abb. 19 A).

Die Auswertung der dezellularisierten PK mittels der Pikro-Siriusrot-Färbung zeigte den Erhalt der kollagenen Fasern in allen angefertigten, histologischen Schnitten. Es konnten mikroskopisch keine sichtbaren Veränderungen des Kollagens im Vergleich zu den nativen Proben ausgemacht werden. Das bei den nativen Proben beschriebene, charakteristische fischgrätenartige Muster der Kollagenfasern fand sich auch bei den dezellularisierten PK-Schnitten wieder (siehe Abb. 19 B).

Mithilfe der Pikro-Siriusrot-Färbung sollten mögliche Schäden vor allem an den Kollagenfasern und Änderung der Faserstruktur nach den einzelnen Behandlungsverfahren ermittelt werden. Nach Behandlung der PK-Proben mit den chemischen Methoden EtOH, POV, BAC, Octenidin und PAA konnte der Erhalt des charakteristischen, fischgrätenartigen Faserverlaufs des Kollagens nachgewiesen werden (siehe Abb. 19 C-G).

Die biologische Methode mittels Anti-Anti verursachte ebenfalls keine Schäden an den PK. Die typische Faserstruktur konnte an allen mit Anti-Anti behandelten Proben-PK nachgewiesen werden (siehe Abb. 19 H).

Die physikalischen Methoden zeigten ein gespaltenes Bild. So konnten nach der UV-Bestrahlung keine Schäden an den Kollagenfasern festgestellt werden. Das Fischgrätenmuster war auch nach der UV-Bestrahlung der Proben durchgängig darstellbar (siehe Abb. 19 I). Die Gamma-Bestrahlung hingegen bewirkte eine nahezu komplette Zerstörung der nativen Struktur der PK. So waren nicht nur multiple Faserbrüche zu erkennen, sondern auch die beinahe komplette Aufhebung des ursprünglichen Kollagenverlaufs. Das Fischgrätenmuster war praktisch bis auf vereinzelt angeschnittene Stränge nicht mehr nachweisbar (siehe Abb. 19 J). Nach dem KV 3 und KV 4 zeigte sich ebenfalls ein Erhalt der fischgrätenartigen Struktur und der Fasern (siehe Abb. 19 K und L).

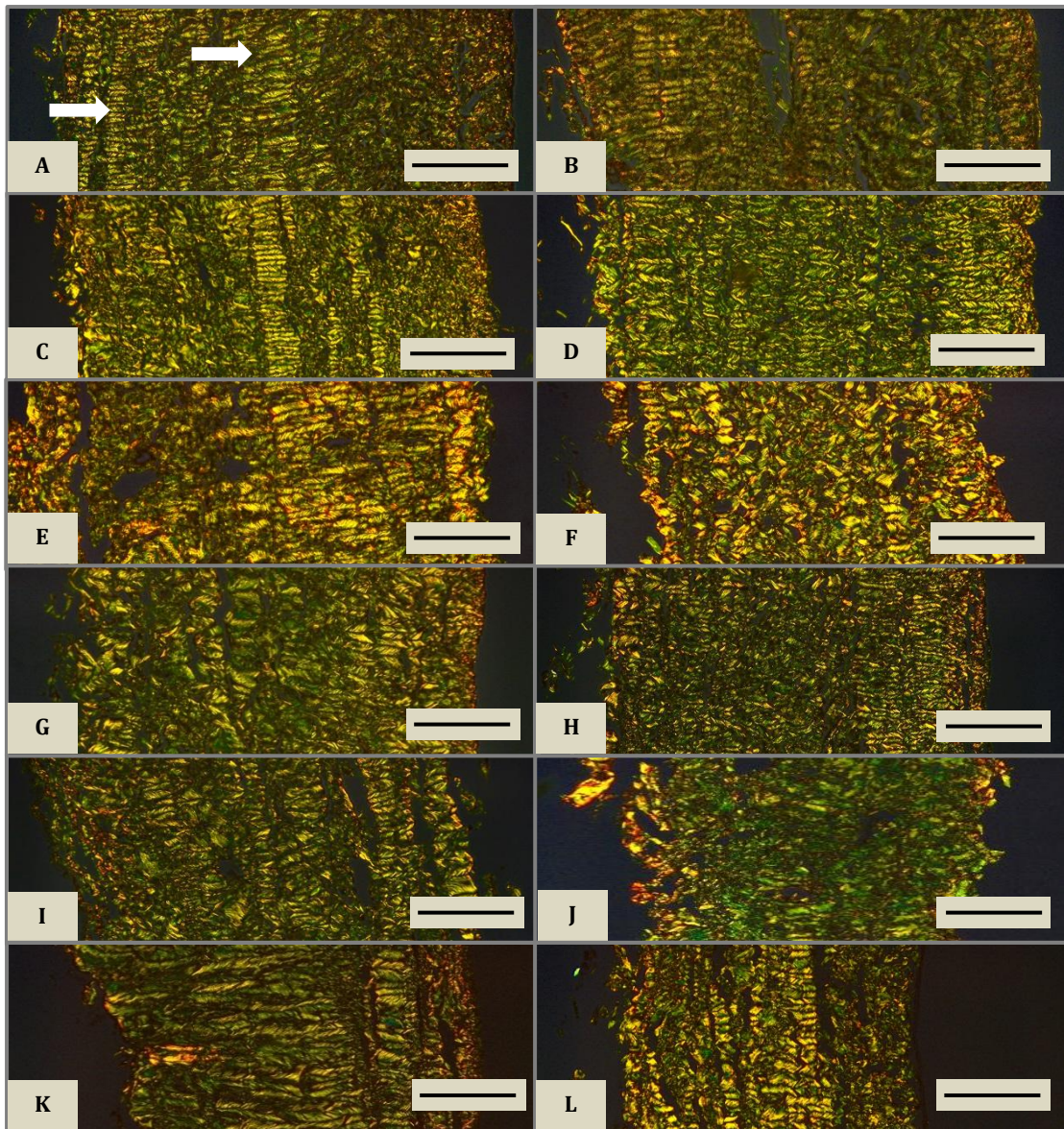


Abbildung 19: Picro-Siriusrot-Färbung nativer PK (A) mit charakteristischem Fischgrätenmuster (Pfeile), dezellulisiertes PK (B) mit einer leichten Auflockerung der angefärbten Kollagenfasern und Erhalt der Faserstruktur. PK nach Behandlung mit EtOH (C), POV (D), BAC (E), Octenidin (F), PAA (G), Anti-Anti (H), UV-Bestrahlung (I) und KV 3 (K) und KV4 (L) zeigten einen Erhalt des typischen Faserverlaufs. Nach Gamma-Bestrahlung (J) zeigten die histologischen Schnitte eine Destruktion der Kollagenfasern; Maßstabsbalken: 200 µm.

4.4 Rasterelektronenmikroskopie

4.4.1 Nativproben

Die Oberflächenstruktur der Innen- (dem Herzen anliegend) und der Außenseite (vom Herzen abgewandt) der PK konnte deutlich voneinander unterschieden werden. So war die Innenseite durch einen gleichmäßigen Faserverlauf mit einer geschlossenen, leicht welligen, jedoch im Gesamten eher glatten Oberfläche

gekennzeichnet (siehe Abb. 20 A). Die Außenseite hingegen war keiner einheitlichen Struktur zuzuordnen und zeigte einen unorganisierten Faserverlauf. Hierbei konnten dickere Faserbündel sowie dünnere Aufzweigungen der einzelnen Fasern unterschieden werden. Zudem war die Oberfläche leicht angeraut (siehe Abb. 20 B; Details siehe Anhang 1).

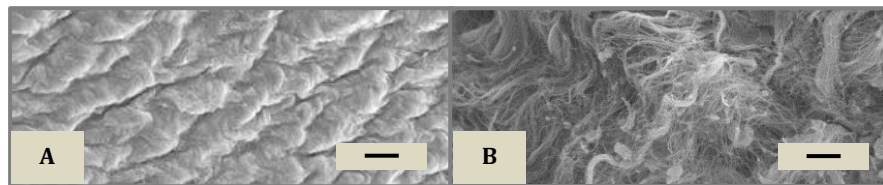


Abbildung 20: REM-Aufnahmen nativer PK-Proben von der Innenseite mit gleichmäßigem Faserverlauf und glatter, geschlossener Oberfläche (A) und Außenseite mit unregelmäßigem Faserverlauf und angerauter Oberfläche (B); in 2k-facher Vergrößerung; Maßstabsbalken: 10 μm .

4.4.2 Dezellularisierte Proben

Nach dem DZ-Prozess war eine Auflockerung des Faserverlaufs an der Innenseite der PK zu erkennen. So zeigte sich die in den nativen Proben geschlossene Oberfläche häufig unterbrochen und Fasern unterhalb der oberflächenbildenden Schicht waren erkennbar. An der Innenseite des PK konnte mitunter die Bildung kleiner Löcher an der Oberfläche beobachtet werden (siehe Abb. 21 A, schwarze Pfeile).

Der Faserverlauf und die Faserrichtung blieben jedoch annähernd erhalten. Bei der Außenseite der dezellularisierten Proben traten keine deutlichen Veränderungen auf. Lediglich eine vermehrte Auflockerung der dickeren Faserbündel und eine Zunahme kleinerer, netzartiger Fasern konnte beobachtet werden (siehe Abb. 21 B; Details siehe Anhang 2).

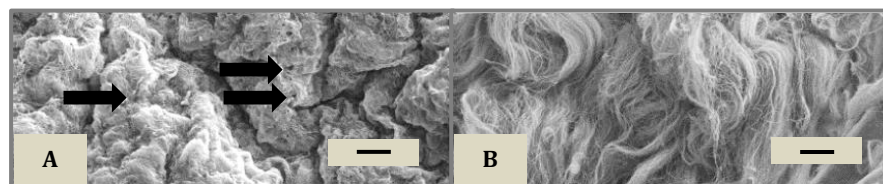


Abbildung 21: REM-Aufnahmen dezellularisierter PK-Proben von der Innenseite (A) mit leicht löchriger Oberfläche (Pfeile); Außenseite (B) mit dezenter Auflockerung der Faserbündel; in 2 k-facher Vergrößerung; Maßstabsbalken: 10 μm .

4.4.3 Behandelte Proben

Die Behandlungen mit den einzelnen chemischen Sterilisationsmedien zeigten unterschiedliche Effekte auf die Ultrastruktur der PK im Vergleich zu den nativen und dezellularisierten Proben.

Nach der Behandlung mit EtOH konnten bei zwei von drei PK-Proben ein Erhalt der Oberfläche nachgewiesen werden, bei einer PK-Probe zeigte sich teilweise eine abgeflachte Oberflächentopologie an der Innenseite der Probe (siehe Abb. 22 A1 Pfeil). Ab einer 2 k- bis 10 k-fachen Vergrößerung ließ sich das Verschmelzen der einzelnen PK-Fasern miteinander erkennen. Dieser Effekt war auch an der Außenseite der behandelten PK-Probe zu finden (siehe Abb. 22 A2 Pfeil, Details siehe Anhang 3).

Die Behandlung der PK-Proben mit POV zeigte einen Erhalt der Oberflächenstruktur. Das Oberflächenrelief stellte sich sowohl an der Innen- als auch Außenseite bis zu einer 10 k-fachen Vergrößerung intakt dar (siehe Abb. 22 B1 und B2; Details siehe Anhang 4).

Die Analyse der Oberflächenstruktur der mit BAC behandelten PK-Proben mittels REM zeigte ebenfalls einen weitest gehenden Erhalt der Oberflächenstruktur. (siehe Abb. 22 C1 und C2; Details siehe Anhang 5).

Octenidin erzielte ebenfalls einen Erhalt des Oberflächenreliefs der behandelten PK-Proben. Sowohl an der Innen- als auch Außenseite der Proben konnten keine sichtbaren Schäden der Ultrastruktur festgestellt werden (siehe Abb. 22 D1 und D2; Details siehe Anhang 6).

Die Behandlung der PK-Proben mit PAA verursachte leichte Veränderungen der Oberfläche. Sowohl an der Innen- als auch an der Außenseite der einzelnen Proben waren einzelne Faserschmelzungen sowie in 10 k-facher Vergrößerung vereinzelt Strangbrüche erkennbar (siehe Abb. 22 E1 und E2 Pfeile; Details siehe Anhang 7).

Die biologische Methode mittels Anti-Anti verursachte keine sichtbaren Schäden an der Ultrastruktur der behandelten PK-Proben. Im Vergleich zu den allein dezellularisierten PK blieb sowohl die Oberflächenstruktur der Innen- als auch der Außenseite optisch erhalten (siehe Abb. 22 F1 und F2; Details siehe Anhang 8).

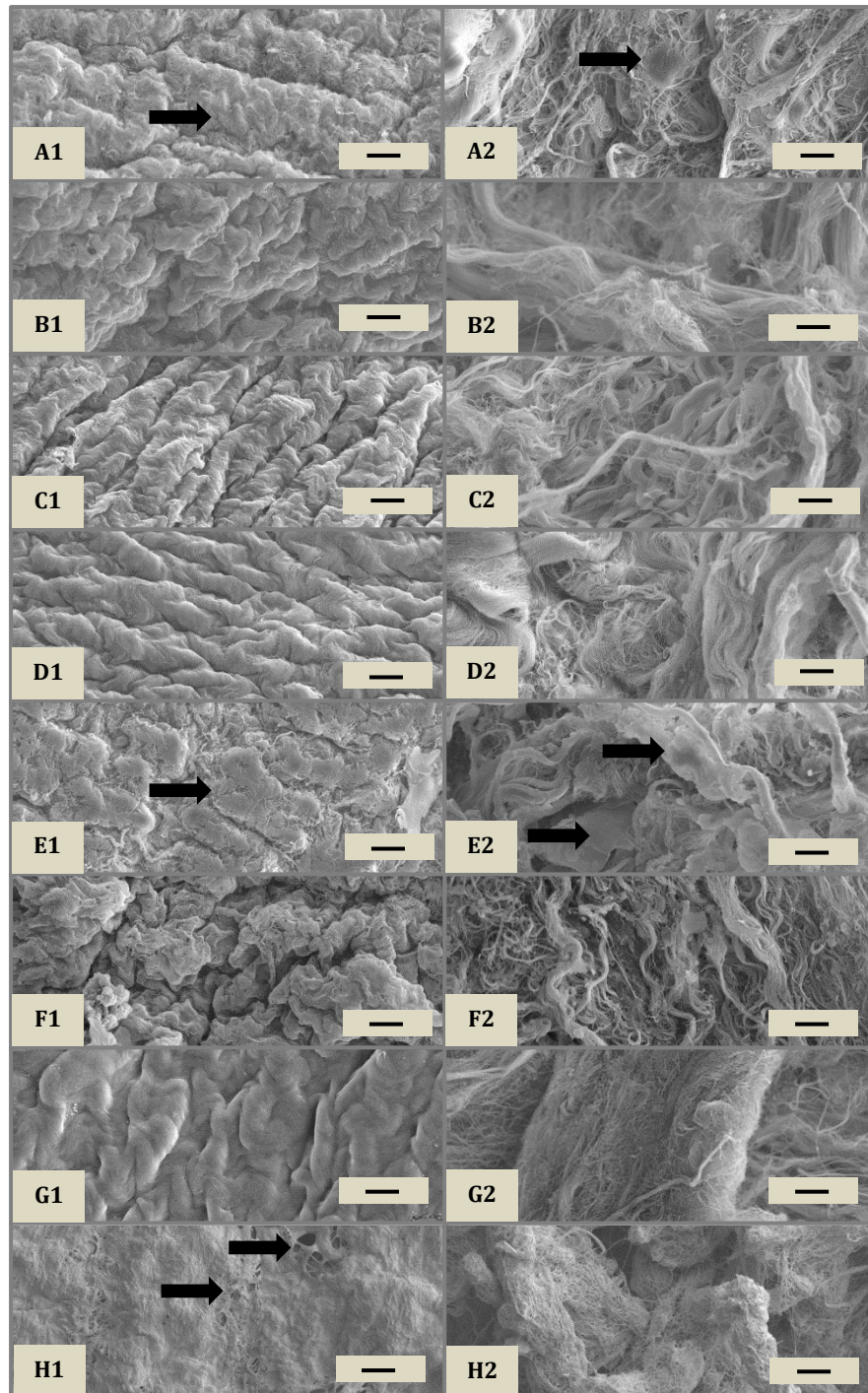


Abbildung 22: 1: Innenseite und 2: Außenseite, alle Bilder in 2 k-facher Vergrößerung. Sowohl nach Behandlung mit EtOH (A), POV (B), BAC (C), Octenidin (D) und Anti-Anti (F) zeigte sich ein intaktes Oberflächenrelief. Nach Behandlung mit PAA (E) waren leichte Faserverschmelzungen ersichtlich (siehe Pfeile). Nach UV-Bestrahlung zeigten sich an der Innenseite Faserverschmelzungen (G1) und an der Außenseite ein erhaltenes Oberflächenrelief (G2). Nach Gamma-Bestrahlung zeigten sich an der Innenseite Faserverschmelzungen mit abgeflachtem Relief mit teils löchrigen Unterbrechungen (H1 Pfeile) und eine poröse-wirkende, verdickte Faserstruktur an der Außenseite (H2). Maßstabsbalken: 10 μm .

Die physikalischen Verfahren verursachten beide eine deutliche Destruktion der Oberflächenstruktur. Bei den PK-Proben nach UV-Bestrahlung war in 500-facher Vergrößerung eine Abflachung des Oberflächenreliefs an der Innenseite zu erkennen. In der 2 k- und 10 k-fachen Vergrößerung zeigte sich dabei eine Verschmelzung der einzelnen PK-Fasern (siehe Abb. 22 G1). Die Außenseite jedoch wies keine deutlichen Veränderungen der Ultrastruktur auf und blieb im Vergleich nahezu intakt (siehe Abb. 22 G2; Details siehe Anhang 9).

Die PK-Proben nach der Gamma-Bestrahlung zeigten eine deutliche Veränderung in der Ultrastruktur, sowohl der Innen- als auch der Außenseite. An der Innenseite ließen sich vor allem ein abgeflachtes Relief und eine löchrige Oberflächenstruktur darstellen (siehe Abb. 22 H1). Zudem zeigten sich die einzelnen Fasern verschmolzen mit Unterbrechungen im Faserverlauf. An der Außenseite ließen sich schon ab einer 500-fachen Vergrößerung verdickte, porös wirkende Fasern erkennen, welche auch in den höheren Auflösung bestätigt werden konnten (siehe Abb. 22 H2; Details siehe Anhang 10).

4.4.4 Kombinationsversuche

In der REM konnte eine erhaltene Ultrastruktur der PK-Proben nach den KV-Protokollen evaluiert werden. So waren mit Hilfe der REM nach den beiden Behandlungsmethoden sowohl an der Innen- (siehe Abb. 23 A1 und B1) als auch Außenseite der PK-Proben (siehe Abb. 23 A2 und B2) weder Fasererschmelzungen noch Strangbrüche zu erkennen, wie es in den Hauptversuchen bei einer längeren Einwirkungsdauer von PAA der Fall gewesen war (Details siehe Anhang 11 und 12).

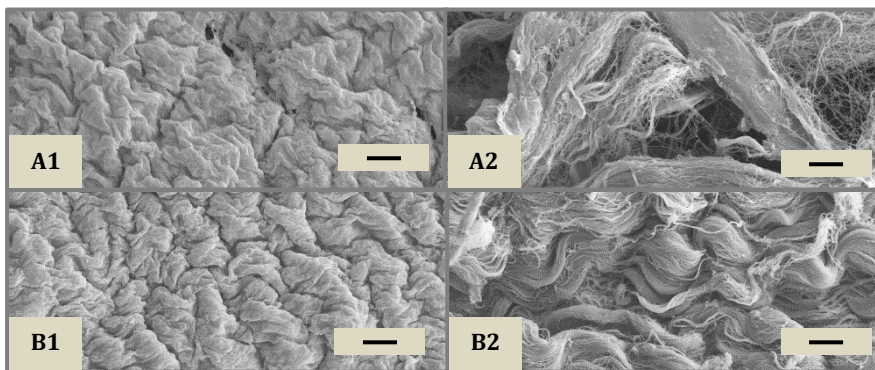


Abbildung 23: REM-Aufnahmen der mit dem KV-3- (A) und KV-4-Protokoll (B) behandelten PK-Proben. Sowohl an den Innenseiten (1) als auch an den Außenseiten (2) erkennt man eine intakte Faserstruktur; 2 k-fache Vergrößerung, Maßstab: 10 µm.

4.5 Zugfestigkeitstestung

4.5.1 Nativproben

Zunächst wurde die mittlere maximale Bruchkarft der nativen LP und der QP miteinander verglichen. Es zeigte sich, dass die Zugproben, die parallel zum Faserverlauf der PK entnommen wurden, im Durchschnitt höhere Werte aufwiesen als die der senkrecht zum Faserverlauf entnommenen QP, was sich jedoch als nicht signifikant erwies ($p = 0,59$; siehe Abb. 24). Die durchschnittliche Zugfestigkeit betrug bei den nativen LP $23,47 \pm 16,97$ N, die der QP $21,75 \pm 14,79$ N. Nimmt man den Mittelwert aus allen nativen Längs- und Querproben, so beträgt der Wert der maximalen Zugkraft $22,61 \pm 15,94$ N.

Zudem muss angemerkt werden, dass die Standartabweichungen aller Zugversuche von allen Gruppen im Allgemeinen hoch ausfielen (siehe Abb. 24).

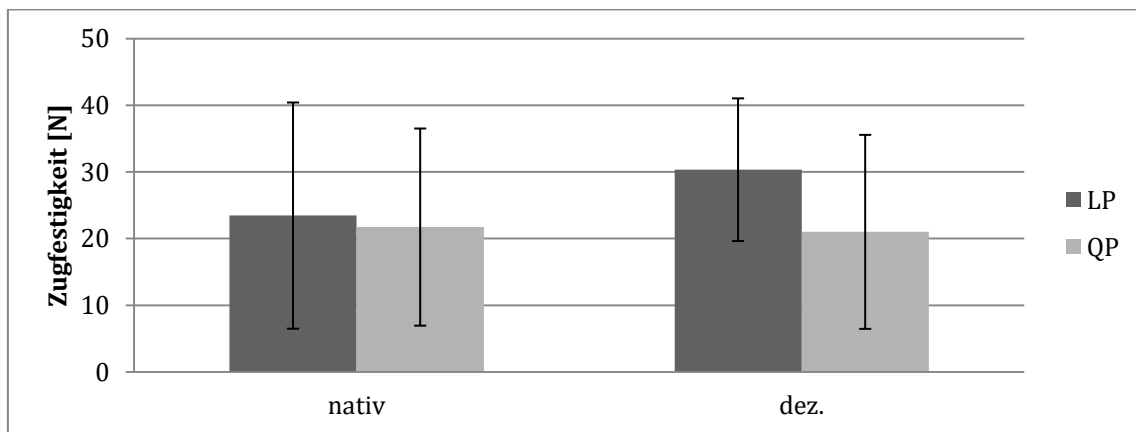


Abbildung 24: Die durchschnittliche Zugfestigkeit aller LP im Vergleich zu den jeweiligen QP in nativer und dezellularisierter (dez.) Form. Das eingezeichnete Streumaß entspricht der errechneten Standartabweichung bei einer jeweiligen Gruppengröße von $n=24$.

4.5.2 Dezellularisierte Proben

Durch das Messen der Zugfestigkeit nach dem DZ-Prozess sollten mögliche Veränderungen der Belastbarkeit des dezellularisierten Gewebes, im Vergleich zum nativen, getestet werden. Die Messwerte dienten als Vergleichswerte für die zusätzlich behandelten Proben.

Ebenso wie bei den nativen Proben konnte auch bei den dezellularisierten ein Unterschied der $F_{\max}$ je nach Faserverlauf festgestellt werden, jedoch zeigte sich hier der Unterschied ebenfalls als nicht signifikant ($p = 0,90$). Der Wert der QP fiel

mit $21,04 \pm 14,55$ N geringer aus als der Wert der LP mit $30,36 \pm 10,70$ N (siehe Abb. 24).

In Hinblick auf den Mittelwert der LP und QP kann festgehalten werden, dass es im Vergleich zu den nativen Proben nach dem DZ-Prozess zu einer leichten Zunahme der Zugfestigkeit der PK-Proben kam. So belief sich die durchschnittliche $F_{\max}$ aller dezellularisierten Proben auf $25,45 \pm 13,59$ N.

4.5.3 Behandelte Proben

Die Zugfestigkeitstestung nach den einzelnen Behandlungsprozessen diene zur Identifikation möglicher Schäden an den PK. Eine deutliche Zu- oder Abnahme der $F_{\max}$, im Vergleich zu den nativen und den dezellularisierten Proben spräche für eine Veränderung der biomechanischen Eigenschaften des behandelten Gewebes durch die jeweilige Behandlungsmethode.

Der native Zugfestigkeitswert der LP der EtOH-Versuchsgruppe belief sich auf $24,46 \pm 3,24$ N, der Wert nach DZ $27,30 \pm 10,34$ N und der nach Behandlung mit EtOH auf $29,52 \pm 9,23$ N. Die QP zeigten in der nativen EtOH-Gruppe eine mittlere Zugfestigkeit von $19,35 \pm 2,02$ N, nach DZ von $6,13 \pm 2,15$ N und nach der Behandlungsmethode EtOH von $21,84 \pm 15,82$ N (siehe Abb. 25 A und B, EtOH). Insgesamt kam es im Vergleich zu den nativen als auch dezellularisierten Proben zu einer Zugfestigkeitszunahme sowohl der LP als auch der QP.

Der native Zugfestigkeitswert der LP der POV-Gruppe zeigte einen mittleren Wert von $17,78 \pm 4,11$ N, nach DZ von $30,44 \pm 11,83$ N und nach Behandlung mit POV von $34,62 \pm 1,74$ N. Die nativen Werte der QP lagen im Mittel bei $13,17 \pm 8,44$ N, nach DZ bei $31,69 \pm 22,83$ N und nach POV bei $15,37 \pm 8,01$ N (siehe Abb. 25 A und B, POV). Die Zugfestigkeitsänderungen nach Behandlung mit POV im Vergleich zu den dezellularisierten Proben war bei den LP ansteigend, wohingegen sie bei den QP deutlich abnehmend war.

Die Zugfestigkeiten der nativen LP lag in der BAC-Gruppe bei $16,34 \pm 5,48$ N, der dezellularisierten bei $32,65 \pm 8,84$ N und der mit BAC-behandelten LP bei $15,73 \pm 3,30$ N. Die durchschnittliche Zugfestigkeit der QP belief sich hiergegenüber nativ auf $31,14 \pm 22,62$ N, nach DZ auf $24,41 \pm 7,54$ N und nach Behandlung mit BAC auf $18,30 \pm 8,45$ N (siehe Abb. 25 a und B, BAC). So zeigte sich im Vergleich zur DZ-Gruppe ein deutliche Abnahme der Zugfestigkeit.

Die nativen $F_{\max}$ -Werte der LP der Octenidin-Gruppe lagen im Mittel bei $17,26 \pm 13,10$ N, nach DZ bei $25,76 \pm 2,72$ N und nach Octenidin bei $23,49 \pm 13,11$ N. Die nativen Werte der QP beliefen sich auf $6,79 \pm 6,28$ N, nach DZ auf $14,78 \pm 8,27$ N und nach Octenidin auf $15,17 \pm 11,16$ N (siehe Abb. 25 A und B, Octenidin). Verglichen mit den Werten rein nach DZ zeigten sich somit vergleichbare Zugfestigkeitswerte.

Der native Zugfestigkeitswert der LP der PAA-Gruppe lag bei $12,86 \pm 7,03$ N, nach DZ bei $32,87 \pm 3,37$ N und nach Behandlung mit PAA bei $16,47 \pm 6,95$ N. Der durchschnittliche native Zugfestigkeitswert der QP lag bei $20,48 \pm 4,90$ N, nach DZ bei $24,32 \pm 16,15$ N und nach PAA bei $12,56 \pm 3,96$ N (siehe Abb. 25 A und B, PAA). Es zeigte sich im Vergleich zu den lediglich dezellularisierten PK eine Abnahme der Zugfestigkeiten, jedoch ähnlich hohe Werte verglichen mit den nativen PK.

Die biologische Methode mit Anti-Anti konnte die Zugfestigkeit der Proben nicht vollständig erhalten. Es zeigte sich in beiden Gruppen eine geringere Zugfestigkeit, verglichen mit der DZ-Gruppe. Die nativen Werte waren bei den LP bei $14,52 \pm 4,70$ N, bei den QP bei $20,76 \pm 8,92$ N, nach DZ bei den LP bei $28,50 \pm 8,90$ N, bei den QP bei $21,41 \pm 8,31$ N und nach Anti-Anti bei den LP bei $25,82 \pm 6,03$ N und bei den QP bei $14,54 \pm 4,45$ N (siehe Abb. 25 A und B, Anti-Anti).

Die mittlere Zugfestigkeit der LP in der UV-Gruppe belief sich nativ auf $37,37 \pm 4,77$ N, nach DZ auf $26,97 \pm 16,82$ N und nach UV-Bestrahlung auf $25,55 \pm 2,44$ N, die der nativen QP auf $26,83 \pm 8,63$ N, der dezellularisierten auf $27,33 \pm 13,21$ N und die der UV-bestrahlten auf $34,88 \pm 24,17$ N (siehe Abb. 25 A und B, UV). Somit zeigte sich eine leichte Abnahme der LP-Zugfestigkeiten nach UV-Bestrahlung, jedoch eine Zunahme der Zugfestigkeitswerte der QP.

Die Gamma-Bestrahlung führte zu Veränderungen der biomechanischen Eigenschaften der bestrahlten Proben. So kam es sowohl bei den behandelten LP als auch QP zu einer Zunahme der mittleren Zugfestigkeit verglichen mit der DZ-Gruppe, zeigten jedoch vergleichbare Werte wie die der nativen Proben. Die native Zugfestigkeit belief sich bei den LP im Mittel auf $47,22 \pm 30,11$ N, bei den QP auf $35,50 \pm 18,32$ N, nach DZ bei den LP auf $38,40 \pm 10,10$ N und bei den QP auf $18,23 \pm 9,67$ N, nach Gamma-Bestrahlung bei den LP auf $46,88 \pm 16,94$ N und bei den QP auf $33,42 \pm 10,07$ N (siehe Abb. 25 A und B, Gamma).

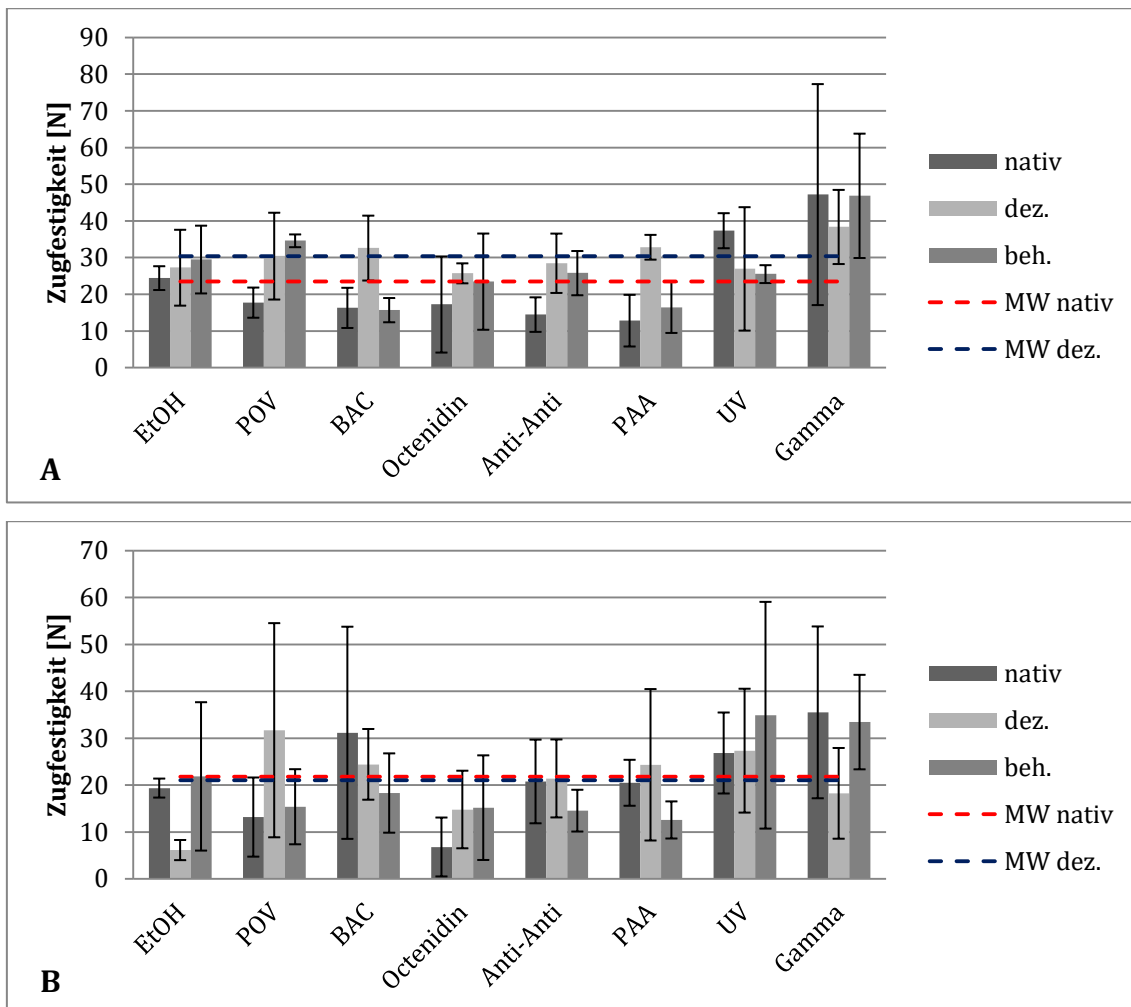


Abbildung 25: Zugfestigkeit der LP (A) und der QP (B); native Proben (nativ), nach DZ (dez.) und nach den chemischen (EtOH, POV, BAC, Octenidin, PAA), der biologischen (Anti-Anti) und den beiden physikalischen (UV- und Gamma-Bestrahlung) Behandlungsmethoden (beh.), rot gestrichelte Linie (MW nativ) = Mittelwert aller nativen PK (n=24), blau gestrichelte Linie (MW dez.) = Mittelwert aller dezellularisierten PK (n=24). Das eingezeichnete Streumaß entspricht der errechneten Standardabweichung bei einer jeweiligen Gruppengröße von n=3.

4.5.4 Kombinationsversuche

Die nativen Zugversuchswerte der KV-3-Gruppe beliefen sich bei den LP auf $22,86 \pm 3,14$ N und bei den QP auf $18,23 \pm 2,44$ N, nach DZ bei den LP auf $14,55 \pm 11,15$ N und bei den QP auf $30,52 \pm 11,82$ N, nach dem KV-3-Protokoll bei den LP auf $39,15 \pm 10,90$ N und bei den QP auf $22,35 \pm 5,36$ N (siehe Abb. 26 A und B, KV 3). Somit zeigte sich bei den LP eine Zunahme der Zugfestigkeit nach KV-3-Behandlung im Vergleich zu der Gruppe nach reiner DZ, sowie eine Abnahme bei den QP.

Die nativen Werte der KV-4-Gruppe zeigten sich bei den LP bei $27,35 \pm 0,50$ N, der QP bei $8,81 \pm 4,42$ N. Nach DZ wurde eine mittlere Zugfestigkeit der LP von

26,25 ± 6,66 N und der QP von 10,80 ± 1,05 N, sowie nach dem KV-4-Protokolle bei den LP von 22,67 ± 5,77 N und der QP von 21,70 ± 15,12 N gemessen (siehe Abb. 26 A und B, KV4). Es war also eine Abnahme der Zugfestigkeit der LP nach Behandlung mit dem KV-4-Protokoll zu verzeichnen sowie eine Zunahme bei den QP.

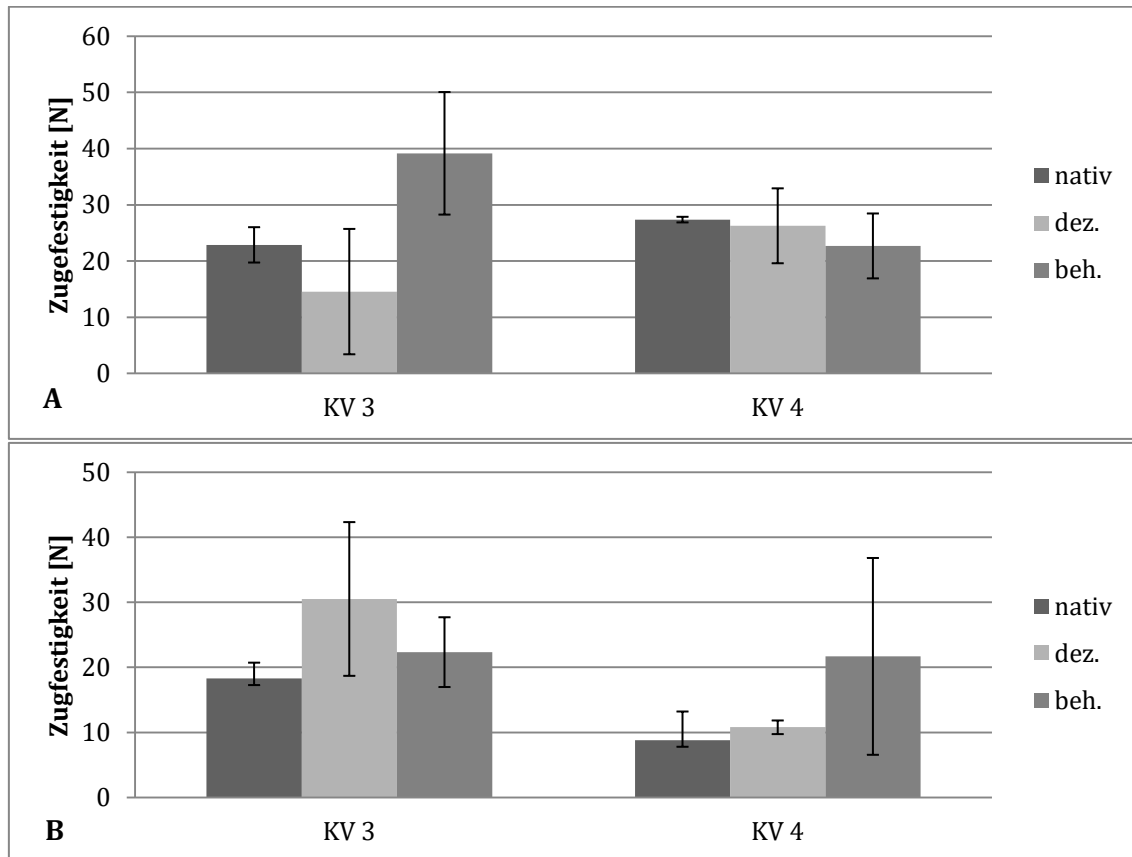


Abbildung 26: Zugfestigkeit der LP (A) und der QP (B); Native Proben (nativ), nach DZ (dez.) und nach dem KV-3- und KV-4-Protokoll (beh.). Das eingezeichnete Streumaß entspricht der errechneten Standardabweichung bei einer jeweiligen Gruppengröße von n=3.

4.6 Zytotoxizitätstestung

Mithilfe der Zytotoxizitätstestungen sollte überprüft werden, ob die chemischen Behandlungsmethoden und das biologische Medium zytotoxische Effekte auf die EC zeigen, da dies für die spätere Re-Besiedelung der dezellularisierten Proben mit Zellen entscheidend ist.

Die EC nach Behandlung mit 0,7%igem EtOH zeigten bereits nach 24 stündiger Inkubation einen deutliche geringeren Umsatz des Farbstoffes von $36,0 \pm 1,21\%$, sowie nach 48 h und 72 h keine Farbumsetzung mehr. Dies war auch bei den Zellen nach Kontakt mit dem 7%igem EtOH zu sehen. Nach 24 h war hier lediglich ein

Wert von $18,4 \pm 25,8 \%$, sowie nach 48 h und 72 h keine Zellviabilität mehr zu erheben. Dahingegen zeigten sich bei EtOH 70% deutlich höhere Werte mit ebenfalls deutlich höheren Standardabweichung mit $98,0 \pm 31,9 \%$ nach 24 h, $164,5 \pm 105,6 \%$ nach 48 h und $127,2 \pm 12,9 \%$ nach 72 h (siehe Abb. 27 A). Makroskopisch war hier bereits eine Trübung der Flüssigkeit zu beobachten, was zu den überhöhten Werten führte, jedoch kein Farbanschlag.

Ähnliche Ergebnisse lieferten Zytotoxizitätsmessungen nach POV. Auch hier zeigte sich bei den beiden geringeren Konzentrationen eine beinahe aufgehobene Zellviabilität bereits nach 48 h. Lediglich nach 24 h war bei POV 0,075 % eine geringe Zellaktivität mit $43,1 \pm 4,0 \%$ zu sehen. Auch hier waren in der Ausgangskonzentration deutlich höhere Werte mit deutlich höheren Standardabweichungen zu sehen. So zeigte sich nach 24stündiger Inkubation mit POV 7,5 % ein Wert von $85,9 \pm 41,8 \%$, nach 48 h $46,8 \pm 62,1 \%$ und nach 72 h $38,3 \pm 24,0 \%$ (siehe Abb. 27 B). Dies kann ebenfalls auf die Verfärbung der Messflüssigkeit durch Rückstände des 7,5%igen POV zurückgeführt werden.

Bei der Auswertung der Zytotoxizitätsmessung nach Inkubation der EC mit BAC 0,02 % zeigte sich eine gering niedrige Zellviabilität von $17,3 \pm 6,5 \%$ nach 24 h, $23,6 \pm 22,1 \%$ nach 48 h und $21,8 \pm 4,6 \%$ nach 72 h. Deutlich höhere Werte präsentierten sich bei BAC 2% mit einem Farbumsatz von $163,9 \pm 18,6 \%$ nach 24 h Inkubation, $230,7 \pm 52,5 \%$ nach 48 h und $121,5 \pm 17,7 \%$ nach 72 h. Die gemessenen Werte nach Inkubation mit BAC 0,2% zeigten sich mit $396,5 \pm 13,2 \%$ nach 24 h, $293,4 \pm 255,2 \%$ nach 48 h und $319,1 \pm 126,4 \%$ nochmals deutlich höher (siehe Abb. 27 C).

Auch nach Behandlung der EC mit Octenidin in der Ausgangskonzentration von 0,1 % zeigten sich durchgehend Werte über 100 %, nach 24 h $161,6 \pm 142,4 \%$, nach 48 h $119,8 \pm 7,8 \%$ und nach 72 h $179,5 \pm 72,1 \%$. Bei 0,01%igem Octenidin zeigten sich ähnliche Werte mit $130,1 \pm 84,1 \%$ nach 24 h, $154,9 \pm 85,8 \%$ nach 48 h und $164,6 \pm 57,3 \%$ nach 72 h. Lediglich bei der geringsten Octenidinkonzentration von 0,001% zeigte sich die Zellviabilität mit $24,7 \pm 3,0 \%$ nach 24 h, $70,8 \pm 73,1 \%$ nach 48 h und $46,5 \pm 20,9 \%$ nach 72 h deutlich geringer (siehe Abb. 27 D).

PAA zeigte in der Ausgangskonzentration von 0,1 % eine zunehmende Farbumsetzung nach Inkubationsdauer. So waren es nach 24h bereits nur noch bei $4,2 \pm 0,9 \%$ und nach 72 h bei $5,7 \pm 1,7 \%$. Bei PAA 0,001 % lag der Wert nach 24 h

bei $143,4 \pm 149,5$ %, nach 48 h bei $28,1 \pm 2,1$ % und nach 72 h lediglich bei $5,3 \pm 1,1$ % (siehe Abb. 27 E).

Bei Anti-Anti präsentierte sich in den beiden höheren Konzentrationen 5 % und 0,5 % eine leichte Zunahme der Zellviabilität nach 48 h, jedoch nach 72 h bereits eine leichte Abnahme. Lediglich bei Anti-Anti 0,05 % zeigte sich eine kontinuierliche Abnahme der gemessenen Werte, bis diese nach 72 h unter 100 % auf $96,3 \pm 16,7$ % fielen (siehe Abb. 27 F).

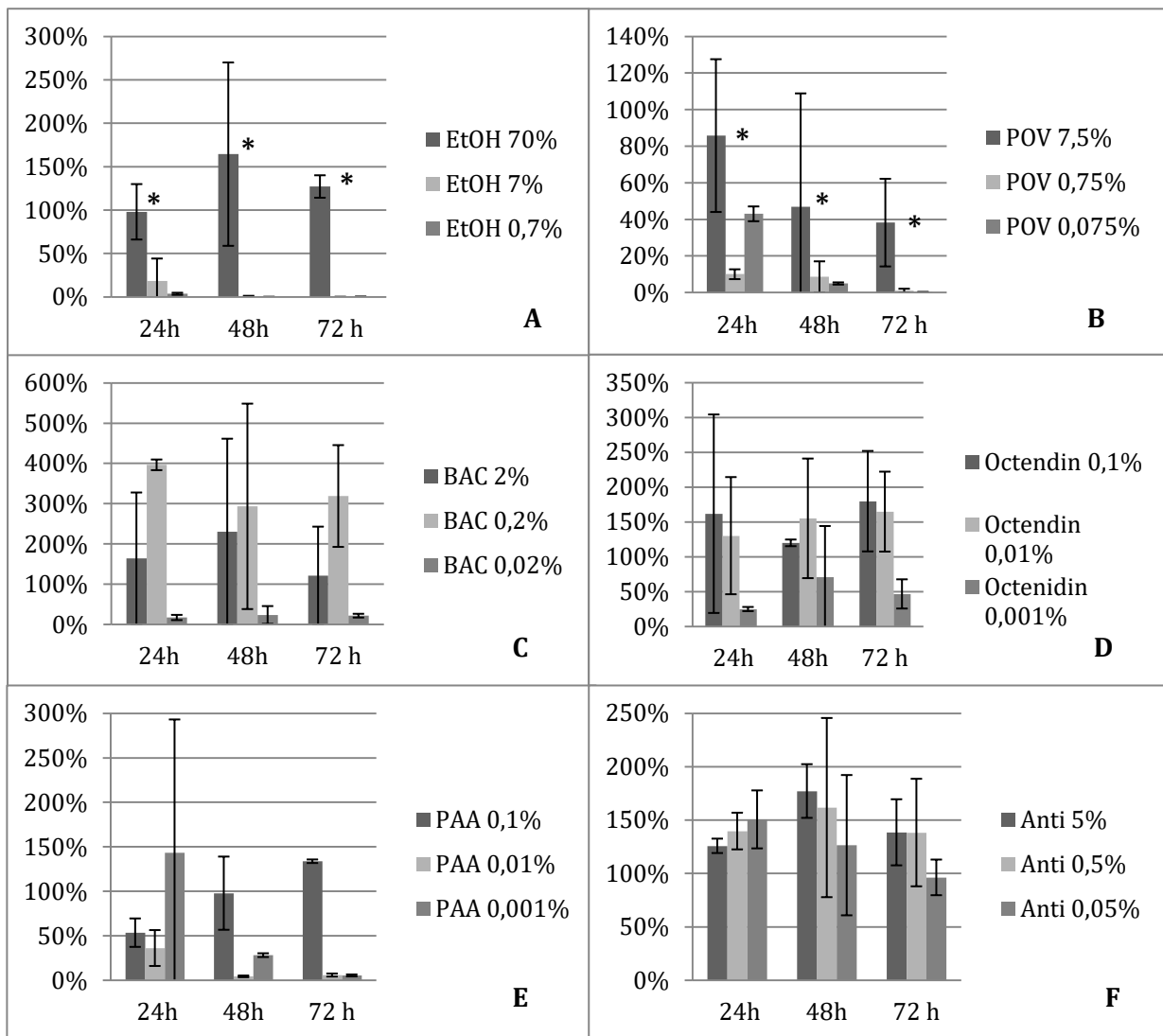


Abbildung 27: Graphische Darstellung der Zellviabilität im Verhältnis zur Zellkontrolle in % nach der Inkubation mit EtOH 70 %, 7 % und 0,7 % (A), mit POV 7,5 %, 0,75 % und 0,075 % (B), mit BAC 2 %, 0,2 % und 0,02 % (C), mit Octenidin 0,1 %, 0,01 % und 0,001 % (D), mit PAA 0,1 %, 0,01 % und 0,001 % (E), sowie Anti-Anti 5 %, 0,5 % und 0,05 % (F); Sternchen (*) = Verfälschung der Werte durch Ausflockung (A) oder Eigenfärbung der Substanz (B). Das eingezeichnete Streumaß entspricht der Standardabweichung bei einer jeweiligen Gruppengröße von n=3.

5 DISKUSSION

Zur Sterilisation biologischer Gewebe werden bereits unterschiedliche Behandlungsmethoden angewandt. Speziell für bovines, dezellularisiertes Perikard wurden nun verschiedene Methoden evaluiert und systematisch hinsichtlich ihrer Effizienz, ihrer biomechanischen und strukturellen Auswirkungen auf das Gewebe und ihrer Zytotoxizität auf EC verglichen. Hierfür wurden im Gesamten fünf chemische, ein biologisches und zwei physikalische Behandlungsmethoden analysiert.

Dezellularisation von bovinem Perikard

Bovines Perikard zeigte sich als sehr dünnes und dennoch strapazierfähiges Material. Vor allem im kardiovaskulären Bereich ist bovines Perikard als Transplantationsmaterial vielfältig einsetzbar. Auch für das verwendete Dezellularisationsprotokoll zeigte sich das Material gut geeignet. Der Dezellularisationsprozess zielt darauf ab, die Zellen aus dem entsprechenden Gewebe zu entfernen und die Extrazellulärmatrix des biologischen Gewebes bestmöglichst zu erhalten. Um eine vollständige Dezellularisation zu ermöglichen, wird oftmals eine Kombination unterschiedlicher Methoden angewendet. Mittels des in dieser Arbeit angewendeten Dezellularisationsprotokolls gelang eine suffiziente Dezellularisation. Dies konnte unter anderem mittels der DAPI-Färbung nachgewiesen werden. Auch Starnecker et al. konnten in ihrer Arbeit, in der ähnliche Protokolle untersucht wurden, einen vergleichbaren Dezellularisationserfolg erzielen [42]. Die gelungene Dezellularisation lieferte die Grundvoraussetzung für die weitere Evaluation der Sterilisation der dezellularisierten PK.

Sterilisationseffizienz der untersuchten Methoden

Die Behandlung der PK mit EtOH zeigte sich im Rahmen der Untersuchungen als effizient. Das Wirkungsspektrum von EtOH schließt jedoch, laut *Kontrollstelle für Chemie und Biosicherheit* (KCB) des Kantonalen Laboratoriums Basel-Stadt, keine bakteriellen Sporen mit ein und ist wenig wirksam gegen nicht-lipoide Viren [81]. Aufgrund dieser Limitationen muss deshalb eher von einer Desinfektion als von einer Sterilisation mittels EtOH gesprochen werden [143]. Vergleichend zu den aufgeführten Ergebnissen zeigte sich jedoch im Rahmen dieser Arbeit nach sieben

Tagen keinerlei Wachstum in den Anzuchtmedien. Dieser Nachweis deckt jedoch keine Sporen ab, da dafür die Proben länger als sieben Tage in den Anzuchtmedien inkubiert werden müssen. Hingegen ein PK nach Behandlung mit POV wies nach sieben Tagen keine ausreichende Sterilität auf. Obwohl POV als Hautantiseptikum langjährig im klinischen Alltag eingesetzt wird, konnten Zhao et al. beispielsweise ebenfalls bei der Behandlung von Knochenmaterial mit POV eine eingeschränkte Sterilisationseffizienz nachweisen. So eradizierte das Medium zum Teil keine gramnegativen Keime [82]. Auch Octenidin zeigte im Rahmen der Sterilitätstestungen keine ausreichende Sterilisationseffizienz. Mithilfe einer Kombination von Alkoholen wie EtOH oder Propanolol mit Octenidin könnte laut Dettenkofer et al. die Sterilisationseffizienz gesteigert werden kann [94]. Hingegen ist eine Kombination mit POV laut Hubner et al. nicht zu empfehlen, da es zu einer vermehrten Freisetzung von Iod aus dem Povidon-Iod-Komplex käme, wodurch das Gewebe gereizt werden kann [92]. PAA hingegen gilt als zuverlässiges Sterilisationsmedium. Huang et al., die 0,1%iges PAA für die Sterilisation von Sehnen einsetzten, konnten eine effektive Sterilisation nach drei Stunden Behandlungsdauer nachweisen [144]. Dies lässt sich auch auf dezellularisiertes PK übertragen, da im Zuge dieser Promotionsarbeit mit sowohl der gleichen Konzentration, als auch der gleichen Einwirkzeit, eine effiziente Sterilisation des Gewebes erreicht werden konnte. Huang et al. gehen außerdem davon aus, dass die Sterilisation mittels PAA vor allem für dünne, biologische Materialien, wie beispielsweise PK, geeignet ist [144]. Anti-Anti zeigte hingegen eine mangelnde Sterilisationseffizienz im Rahmen der vorliegenden Sterilitätstestungen. Die Behandlung der PK-Proben mit Anti-Anti für 24 h konnte keinerlei Sterilität erzielen und führte zu einer Trübung aller Inkubationsmedien. Die antibiotisch-antimykotischen Lösungen dienen zumeist der Desinfektion und nicht der Sterilisation, wie es beispielsweise Germain et al. und Fan et al. in ihren Studien anführen [145, 146]. Auch Gutierrez et al. desinfizierten lediglich die dezellularisierten, porcinen Aortenklappen mit einer antibiotisch-antimykotischen Lösung, bevor sie diese wiederum in Schweine implantierten [147]. Dafür setzten sie jedoch während der Studie ein orales Antibiotikum ein, um bakterielle Prozesse zu unterdrücken. Ziel dieser Dissertationsarbeit war jedoch das Erreichen eines vollständig sterilisierten Produktes, um eine zusätzliche Nutzung von antibiotischen- oder antimykotischen Stoffen im Folgenden zu vermeiden. Generell

sollte der Einsatz von Antibiotika und Antimykotika als Ausgleich zu nicht sterilen Implantaten kritisch hinterfragt werden. Der Gebrauch dieser Substanzen kann eine Resistenzbildung seitens der zu behandelnden Erreger nach sich ziehen, weshalb die breite Verwendung zu Sterilisationszwecken als nicht sinnvoll zu betrachten ist [148, 149]. Die UV-Bestrahlung erzielte hinsichtlich der Sterilisationseffizienz eher enttäuschende Ergebnisse. Trotz einer lang gewählten Bestrahlungsdauer von drei Stunden konnte keine terminale Sterilität erreicht werden. Übereinstimmend deklarierten Stoppel et al. bei der UV-Bestrahlung von Alginat-Hydrogelen ein unzureichendes Sterilisationsergebnis [150]. Simona Walker et al. nutzen UV-Bestrahlung primär zur Quervernetzung der Fasern und ergänzen das Verfahren um eine Bestrahlung mit niederenergetischen Elektronen, um Sterilität zu erreichen [151]. Insgesamt muss deshalb die UV-Bestrahlung als ungeeignet für dezellularisiertes PK erachtet werden. Bei zunehmender Strahlendosis traten bereits deutliche Schäden an der EZM der Proben auf, weshalb die Bestrahlungsdauer nicht weiter verlängert werden konnte. Die Gamma-Bestrahlung erzielte hingegen als zweite physikalische Behandlungsmethode im Gegensatz zur UV-Bestrahlung eine effiziente Sterilisation der PK. Salehpour et al. konnten beweisen, dass die Auswirkungen auf die biomechanischen Eigenschaften des biologischen Gewebes durch die Gamma-Bestrahlung deutlich von der Strahlendosis abhängig ist [152]. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Gesamtstrahlendosis von 3 kGy ausgewählt. Helder et al. konnten zudem nachweisen, dass mit einer Low-Dose-Bestrahlung (< 10 kGy) von dezellularisierten, porcinen Herzklappen ab 3 kGy bereits eine Sterilität des Gewebes erreicht werden kann, sich jedoch trotz dieser niedrigeren Dosis Schäden an der EZM zeigen [119]. Dies stimmt mit den vorliegenden Ergebnissen überein. Im klinischen Alltag wird häufig für die Sterilisation von Oberflächen oder medizinischen Materialien eine Bestrahlungsdosis von 25 kGy als Standard angesehen [118, 153, 154], was jedoch für die Bestrahlung von biologischen Materialien aufgrund der schädigenden Wirkung ungeeignet ist [118, 155].

Auswirkung der untersuchten Methoden auf Dicke und Umfang der Perikarde

Um weitere Veränderungen durch die einzelnen Behandlungsmethoden zu detektieren, wurden die Dicken und die Umfänge der einzelnen PK gemessen. Eine zunehmende Dicke spricht für eine Flüssigkeitsaufnahme bzw. ein Auftreiben der einzelnen PK-Fasern, was häufig mit einem abnehmenden Umfang („Schrumpfung“) einhergeht. Dieser Effekt konnte im Rahmen der Arbeit beispielsweise nach Behandlung der PK mit EtOH ausgemacht werden, wie es auch Siritientong et al. bei der Behandlung von Sericin und Grasman et al. es bei Fibrin-Microthread-Gerüsten feststellten [110, 156]. Obwohl Alkohole eher wasserentziehende Eigenschaften besitzen, lässt sich dies möglicherweise mit den angeschlossenen Waschvorgängen mit PBS nach der EtOH-Behandlung erklären. Hierbei wird das Gewebe wieder hydriert. Die Dicke wurde erst nach den Waschvorgängen gemessen und nicht direkt nach der Behandlung mit EtOH, weshalb ein direkter Vergleich nicht gezogen werden kann. Eine abnehmende Dicke, sowie konkordant hierzu ein zunehmender Umfang spräche hingegen a.e. für ein Auseinanderweichen von Fasern, wie es beispielsweise bei BAC ersichtlich war.

Histologische Veränderungen der Perikardstruktur

Mittels der durchgeführten histologischen Untersuchungen konnten weitere Schäden an der Faserstruktur und an der Faserqualität aufgezeigt werden. Dies lässt sich beispielhaft nach Behandlung der PK mit PAA zeigen. Hier war eine leichte Auflockerung der Kollagenfasern im Gewebe festzustellen, was bereits durch Huang et al. nachgewiesen wurde [144]. Die Ergebnisse der vorliegenden, histologischen Untersuchungen der PK nach Gamma-Bestrahlung ähneln zudem jenen von Edwards et al., bei denen azelluläre, porcine Superflexor-Sehnen mit unterschiedlichen Dosen Gamma-Strahlung sterilisiert wurden und eine deutliche Veränderung der Kollagenstruktur ersichtlich war [154].

Oberflächenveränderungen

Die REM-Aufnahmen zeigten am besten die Veränderungen der Oberflächenstruktur auf, welche am deutlichsten nach den beiden physikalischen Behandlungsmethoden zu sehen waren. Nach der Bestrahlung der PK-Proben mit

UV-Licht war eine Verschmelzung der einzelnen PK-Fasern mit einem insgesamt abgeflachten Oberflächenrelief zu erkennen. UV-Strahlung dient im Tissue Engineering unter anderem auch der Quervernetzung von artifiziellen oder biologischen Fasern. So verwendeten sowohl Grasman et al. als auch Cornwell et al. die UV-Strahlung zur Vernetzung von Fibrin-Mikrofasern, wobei sie die Proben für 40 min einer 5-8 W starken UV-Lampe aussetzten [110, 111]. Dieser quervernetzende Effekt zeigte sich auch bei unseren rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen der mit UV-Strahlung behandelten PK-Proben. In den REM-Aufnahmen der Gamma-bestrahlten PK konnte ebenfalls eine Verschmelzung bzw. Vernetzung der einzelnen PK-Fasern detektiert werden. Die Vernetzung von Fasern, Faserbrüche, sowie die Abnahme der Zugfestigkeit von Gewebe durch Gamma-Strahlen wurde unter anderem von R. L. Clough nach Bestrahlung von Polymeren beschrieben [157]. Insgesamt kann, genauso wie bei Helder et al., zu dem Ergebnis gelangt werden, dass mithilfe der Gamma-Bestrahlung im Gesamten keine Balance zwischen Sterilität und Schäden an der EZM gefunden werden kann [119]. Aus diesem Grund muss diese Methode als ungeeignet für dezellularisiertes, biologisches Material angesehen werden. Eine Schonung der Oberfläche der PK hingegen wurde unter anderem durch POV erreicht. Dies konnte auch durch das Forscherteam um Zhao et al. bestätigt werden [82]. Auch nach der Behandlung mit BAC waren im Rahmen der Untersuchungen keine deutlichen Schäden an der Oberflächenstruktur festzustellen, ganz im Gegenteil zu den strukturellen Veränderungen der kornealen Oberfläche von Kaninchen, die von Chen et al. beschrieben wurden [158]. Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit konnten lediglich in den hohen Vergrößerungen der REM-Aufnahmen in wenigen Aufnahmen leichte Veränderung der Faserstruktur festgestellt werden.

Einfluss der Methoden auf die Zugfestigkeit des Perikards

Ein guter Indikator für den Erhalt der biomechanischen Eigenschaften der PK stellt die Zugfestigkeit dar. Bei der Auswertung der nativen Zugfestigkeitstestungen konnte, wie auch schon Jones et al. es bei bovinem Leder beschrieben hatten, ein Unterschied zwischen der Zugfestigkeiten der längs und quer zur Faserrichtung entnommener Proben gemessen werden [127, 128]. Insgesamt waren allerdings hohe Standardabweichungen zu verzeichnen und der Unterschied zeigte sich als

nicht statistisch signifikant. Dies war vor allem durch nicht zu beeinflussende Faktoren bei biologischen Geweben begründet, wie beispielsweise die individuelle anatomische Beschaffenheit der einzelnen Proben, sowie bakteriologische Prozesse bei nicht erreichter Sterilität. Die Dicken und die Elastizität der einzelnen PK variieren nach dem Geschlecht und dem Alter des jeweiligen Rindes, wie auch schon Sizeland et al. anhand von Glutaraldehyd-fixiertem PK gezeigt haben [61]. Die genauen Angaben zu den Rindern waren jedoch im Rahmen dieser Studie nicht einsehbar. Im Allgemeinen kann als Ursache für eine Abnahme der Zugfestigkeit in Längsrichtung eine Beschädigung der Fasern angesehen werden. Eine Zunahme der Zugfestigkeit der Proben quer zum Faserverlauf spricht dagegen am ehesten für eine zugenommene Versteifung des Gewebes. Ein Beispiel hierfür ist unter anderem die Auswirkung der PAA auf die biologischen Proben. Sie erzielt zum einen durch die bereits in der REM nachgewiesenen Faserdestruktion sowohl eine Abnahme der Zugfestigkeitswerte der Längs- als auch der Querproben. Rosario et al. beispielsweise verwendeten ebenfalls 0,1%ige PAA zur Sterilisation von dezellularisiertem, porcinen Harnblasengewebe [159]. Sie konnten eine vollständige Sterilität und eine Abnahme der Zugfestigkeit nach der Behandlung mit PAA feststellen, was sich mit den vorliegenden Ergebnissen der Arbeit deckt. Insgesamt ist die Behandlung von PAA eine Methode mit einer hohen Sterilisationspotenz, wobei jedoch auf eine möglichst geringe Einwirkzeit geachtet werden sollte. So kann der Sterilisationserfolg garantiert und die Schäden an der EZM möglichst verringert werden, wie im Rahmen der Kombinationsversuche gezeigt werden konnte. Bei den unterschiedlichen antibiotisch-antimykotischen Lösungen hingegen sind generell keine negativen Auswirkungen auf die biomechanischen oder Oberflächen-Eigenschaften von biologischem Gewebe bekannt. Schuttler et al. konnten keine Unterschiede der biomechanischen Gegebenheiten bei porcinen, vorderen Kreuzbändern ohne und mit Behandlung mit einem Antibiotikum ausmachen [160]. Wir konnten im Zuge der Arbeit ebenfalls keine deutlichen Änderungen der biomechanischen Eigenschaften eruieren. Lediglich eine leichte Abnahme der Zugfestigkeit war zu vermerken. Tomoya Inoue et al. konnten keine Veränderungen der biomechanischen Eigenschaften nach Behandlung von porcinem Perikard mit EtOH feststellen, wohingegen im Rahmen dieser Arbeit eine leichte Zunahme der Zugfestigkeit zu verzeichnen war [161]. Nach Gamma-Bestrahlung zeigte sich neben einer Zunahme

der mittleren $F_{\max}$ bei den LP auch eine Versteifung des Gewebes und somit eine zunehmende Bruchkraft bei den QP. Diesen Effekt konnte sowohl von Hafeez et al., mit einer deutlich höheren Strahlendosis, als auch bei Helder et al., mit der gleichen Strahlendosis, bereits beobachtet werden [118, 119]. Die Zunahme der $F_{\max}$ der QP nach UV-Bestrahlung lässt sich ebenfalls durch die bereits beschriebene quervernetzende Wirkung sowie eine damit zusammenhängende Versteifung des Gewebes erklären, wie auch Kevin G. Cornwall et al. an Kollagen-Proben zeigten [162]. Auch Daniel V. Bax et al. setzten UV-Bestrahlung ein, um Kollagen-basierende Materialien zu erzeugen und deren biomechanischen Eigenschaften zu verändern [163].

Zytotoxizität der untersuchten chemischen Materialien

Um die behandelten PK später als Transplantate verwenden zu können, ist eine Zytokompatibilität von Vorteil, um inflammatorische Prozesse zu vermeiden bzw. zu verringern. Es zeigten sich im Rahmen dieser Arbeit die meisten chemischen Medien zytotoxisch. Octenidin jedoch wies nach EC-Kontakt nach 72 h noch eine eingeschränkte Zellviabilität auf. Anti-Anti zeigte sich als biologische Substanz nicht zytotoxisch gegenüber den EC. Zunächst muss jedoch einschränkend angeführt werden, dass im Zuge dieser Arbeit die Substanzen selbst an den Zellen getestet wurden und nicht das behandelte PK. Nicht alle Methoden zeigten eine vollständige Sterilisationseffizienz, weshalb eine mögliche bakterielle Besiedelung der PK eine direkte Testung der Substanzen an den EC erfordert. Zudem muss kritisch angemerkt werden, dass es durch den direkten Kontakt der chemischen Medien mit dem Zellmedium, sowie mit den EC selbst teilweise zu chemischen Reaktionen kam, die die Messergebnisse der Zytotoxizitätsmessungen nachhaltig beeinflusste. Bei EtOH beispielsweise konnte aufgrund seiner denaturierenden Wirkung eine Trübung des EC-Mediums vor allem in den höheren Konzentrationen (EtOH 7 % und 70 %) beobachtet werden, welche sich auch in den Messungen als vermutlich falsch hohe Werte widerspiegelt. Zudem zeigte sich EtOH in den durchgeführten Versuchen zytotoxisch, auch wenn es Youngstrom et al. gelang, Sehnenmaterial mittels 95%igem EtOH zu sterilisieren und damit ein nicht-zytotoxisches Produkt zu schaffen [164]. Es besteht die Möglichkeit einer vollständigen Entfernung von EtOH nach den Waschzyklen, so dass ebenfalls ein nicht-zytotoxisches Produkt möglich wäre. Bei POV kam es ebenfalls durch die

braun-gelbe Färbung und trotz Waschvorgang durch die residuellen färbenden Stoffe zu falsch hohen Extinktionswerten vor allem in den beiden höchsten Konzentrationen (POV 0,75 % und 7,5 %). Dies kann durch die hohen Standardabweichungen verdeutlicht werden. Auch bei BAC und Octenidin entstand durch die schwere Löslichkeit des Stoffes bei den beiden höheren Konzentrationen eine makroskopisch nachweisbare Trübung und Ausfällung der Stoffe, was zu den vermutlich fälschlich erhöhten Messwerten ebenfalls in den höheren Konzentrationen führte. Wir konnten zudem eine Zytotoxizität des BAC in unseren Testungen an den EC zeigen. Bereits bei der geringsten verwendeten Konzentration nach 24 h war keinerlei Zellaktivität mehr messbar. Rasmussen et al. beschrieben bereits bei einer Konzentration von 0,005 % starke zytotoxische Effekte des BAC an der Kornea, durch Anregen der Apoptose der Zellen und sowie einer inflammatorischen Reaktion von Kornea und Konjunktiva [88]. Datta et al. erklären sich diesen Effekt durch eine Dysfunktion der Mitochondrien in den Zellen, die durch das BAC hervorgerufen wird [165]. In der Packungsbeilage von BAC-haltigen Augentropfen, wie beispielsweise „Rifobacin“, wird explizit vor einer häufigen Überempfindlichkeitsreaktion mit zusätzlicher Reizung des Auges gewarnt [166]. Aufgrund dessen, dass bereits eine minimale Dosis an BAC noch deutlich nachgewiesene zytotoxische Effekte aufweist und somit eine Inflammation auslösen kann, sowie zu einer Veränderung der Oberflächenstruktur und der biomechanischen Eigenschaften führt, sollte trotz einer guten Sterilisationseffizienz von der Verwendung von BAC für die Sterilisation von dezellularisierten Materialien abgesehen werden. Die Zytotoxizität des Octenidins lag laut Hubner et al., sowie Kramer et al. über der des Povidon-Iods [92, 167]. In den Ergebnissen dieser Arbeit war dieser Umstand jedoch nicht erkennbar. Octenidin zeigte in der geringsten Konzentration nach 72 h noch eine leichte Zellviabilität, die EC nach POV jedoch nicht. Da POV aus einem Komplex aus Iod und Polyvinylpyrrolidon besteht, ist es für die Sterilisation von Implantaten eher ungeeignet. Das nach Sterilisation im Transplantat möglicherweise verbliebende Iod kann bei Patienten mit einer pathologischen Schilddrüsenfunktion zu gesundheitlichen Schäden führen [168, 169]. Da wir trotz des Waschungsprozesses nach dem Behandlungsprozess nicht eindeutig nachweisen können, wie viel POV noch an Proben haftet, wäre die Anwendung des POV bei Transplantaten nicht empfehlenswert. Octenidin hingegen kann aufgrund seiner oberflächen-

schonenden Wirkung, seinem breiten Wirkspektrum sowie seiner Anwendbarkeit an Schleimhäuten als ein geeignetes Behandlungsmedium für dezellularisiertes biologisches Gewebe erachtet werden. Da es jedoch keine terminale Sterilität gewährleisten kann, sollte es mit einer weiteren Methode kombiniert werden. Die Arbeitsgruppe von Huang et al. konnte, im Gegensatz zu den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Testungen, keine zytotoxischen Effekte von PAA feststellen [144]. Dies könnte daran liegen, dass die mit PAA behandelten Proben nach den Waschungen eine so geringe Konzentration der Säure aufwiesen, welche die getestete, niedrigste Konzentration in den Zytotoxizitätstestungen dieser Arbeit unterschritt. Fidalgo et al. hingegen fanden, kongruent zu den Ergebnissen dieser Arbeit, eine zunehmende Zytotoxizität innerhalb der ersten 72 h, in denen die Zellen dem mit PAA und Anti-Anti behandelten, dezellularisierten PK Proben ausgesetzt waren [16]. Diese zeigte sich jedoch nach längerer Beobachtungsdauer (7 d) wieder abnehmend. Im Zuge dieser Arbeit wurden nur die unmittelbaren Auswirkungen der einzelnen Stoffe auf die EC innerhalb von 72 h ermittelt. Es konnte deshalb eine abnehmende Zytotoxizität zu einem späteren Zeitpunkt nicht beleuchtet werden. Guler et al. belegen zudem, dass Anti-Anti kein Zytotoxizität aufweist, da sie es für das Waschen von biologischem Gewebe mit zytotoxischen Rückständen verwendeten und danach keinerlei zytotoxische Aktivität mehr nachweisbar war [170]. Dies deckt sich mit den erhobenen Zytotoxizitätsergebnissen, bei denen auch nach 72 h eine mitochondriale Zellaktivität der EC messbar war.

Wirtschaftlichkeit

Die in den Versuchen dieser Arbeit eingesetzten chemischen Medien und die biologische Methode sind alle insgesamt als kostengünstig anzusehen. Auch eine UV-Bestrahlung ist mit einer einfachen UV-Lampe mit der nötigen Leistung möglich. Lediglich die Gamma-Sterilisation benötigt teure Gerätschaften. Zudem sollte erwähnt werden, dass BAC als Gefahrenstoff gesehen werden muss und es ggf. Gesundheitsschäden hervorrufen kann, weshalb das Arbeiten mit diesem Stoff gewissenhaft und nach den geltenden Vorschriften geschehen sollte [171, 172].

Kombination verschiedener Behandlungsmethoden

Da die evaluierten Behandlungsverfahren einzeln keine optimalen Ergebnisse erzielten, wurde in einem weiteren Schritt die Kombination zweier Methoden untersucht. Die entwickelten KV-3- und KV-4-Protokolle konnten eine vollständige Sterilität, den Erhalt der EZM, sowie der Oberflächenstruktur der behandelten PK-Proben erzielen. Diese Kombinationsversuche boten eine geeignete Möglichkeit, dezellularisierte Materialien zu sterilisieren. Fidalgo et al. beispielsweise erzielten bei einer Zweistufen-Sterilisation mittels eines antibiotisch-antimykotischen Mediums und 0,05%iger PAA Sterilität und den Erhalt der nativen Charakteristika der behandelten dezellulierten, porcinen und bovinen PK [16]. Dies ist vergleichbar mit den Ergebnissen der im Zuge dieser Arbeit entwickelten Kombinationsversuche, in denen die Zweistufen-Sterilisation mittels 0,1%iger PAA und 0,5%igem Octenidin optimale Ergebnisse hinsichtlich aller beleuchteten Kriterien erzielte. Bei zunehmenden Resistenzen sollte ein Einsatz von Antibiotika restriktiv betrachtet werden. Kajbafzadeh et al. kamen bei der Sterilisation von Lebergewebe ebenfalls zu dem Ergebnis, dass eine Kombination von Methoden am besten für die Sterilisation von biologischen Geweben geeignet ist [173]. Auch wenn sie sich noch auf eine Gamma-Bestrahlung in Kombination mit PAA oder Ethylenoxid stützen, weisen sie darauf hin, dass jede Sterilisationsmethode auf das jeweilige Gewebe abgestimmt werden muss, was bekräftigt werden kann. Zudem konnte das erarbeitete KV-4-Protokoll bereits erfolgreich durch Grefen et al. im Rahmen einer weiteren Evaluation von PK als Gewebe für kardiovaskuläre Anwendung eingesetzt werden [174, 175]. Hierbei war die entwickelte Methode dem Glutaraldehyd hinsichtlich der Zytotoxizität und des Erhalts der EZM überlegen. Zudem konnte durch Grefen et al. gezeigt werden, dass die Methode auch im Laboralltag gut umsetzbar und praktikabel ist. Die entwickelte Sterilisationsmethode benötigt keine schwer verfügbaren Ressourcen, ist kostengünstig und kann leicht reproduziert werden. Eine Zweistufigkeit des Sterilisationsprotokolls bietet außerdem den Vorteil, die Vorzüge der einzelnen Komponenten zu kombinieren und gleichzeitig deren Schwächen ausgleichen zu können. So kann beispielsweise die Einwirkungsdauer reduziert und so die schädigende Wirkung auf die EZM verringert werden. Ferner kann das Sterilisationsprotokoll vielfältiger variiert werden, um es auf die individuellen Gegebenheiten der biologischen Proben anzupassen.

6 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Nach der Evaluation verschiedener biologischer, chemischer und physikalischer Methoden, mit dem Ziel der Sterilisation und gleichzeitigem Strukturerthalt von bovinem, dezellularisierten PK, zeigte keine der untersuchten Methoden einzeln optimale Ergebnisse.

EtOH erzielte eine ausreichende Sterilität, sowie gute histologische Ergebnisse (siehe Abb. 28 EtOH). Jedoch zeigte sich ein leichtes Aufquellen der Fasern mit Dickenzu- und Umfangsabnahme, erwies sich zytotoxisch und veränderte die Zugfestigkeit im Sinn einer Versteifung des Gewebes. Dies war auch mit Hilfe der REM bei einer der drei untersuchten Proben im Sinne einer Faserverschmelzung zu detektieren.

Octenidin zeigte ein eingeschränktes Sterilisationsvermögen und leichte zytotoxische Eigenschaften. Es konnte jedoch die Oberflächenstruktur sowie die biomeschanischen Gegebenheiten des PK weitestgehend erhalten.

POV kann zwar als schonende Methode angesehen werden, jedoch war zum einen die Sterilisationseffizienz nicht vollends gegeben und zum anderen wäre eine Anwendung aufgrund von einer späteren potentiellen Iod-Freisetzung nach Transplantation nicht wünschenswert.

BAC zeigte zytotoxische Effekte am behandelten Gewebe. Zudem führte es zur Veränderung der biomechanischen Eigenschaften im Sinne von abnehmender Zugfestigkeit und einem Auseinanderweichen der Faserstruktur. Deshalb raten wir trotz einer gelungenen Sterilisation von der Verwendung von BAC von dezellularisiertem PK ab.

Von den evaluierten chemischen Medien zeigte PAA mit eine der höchsten Sterilisationseffizienz. Es verursachte jedoch mit der ursprünglichen Einwirkdauer leichte Schäden an der EZM, wie in der REM und in den histologischen Schnitten gezeigt werden konnte.

Das biologische Verfahren mittels Anti-Anti erwies sich hinsichtlich seiner Sterilisationspotenz als unzureichend und erreichte das schlechteste Ergebnis hinsichtlich der Keimreduktion. Insgesamt muss deshalb geschlussfolgert werden, dass Anti-Anti nicht zur terminalen Sterilisation verwendet werden kann. Zudem nehmen Resistenzen gegenüber Antibiotika und Antimykotika weiter zu, weshalb ein regelhafter Einsatz dieser Substanzen mit Zurückhaltung erfolgen sollte.

Die beiden physikalischen Verfahren mittels UV- und Gamma-Bestrahlung erwiesen sich als Sterilisationsmethoden für dezellularisiertes PK als ungeeignet. Bei beiden Verfahren gelang keine Balance zwischen der notwendigen Strahlendosis für eine effektive Sterilisation und der Minimierung der Schäden am Gewebe. So konnte mit der UV-Bestrahlung auch nach 3 h Behandlungsdauer keine terminale Sterilität erreicht werden, wohingegen bereits deutliche Schäden an der Ultrastruktur entstanden. Ähnlich verhielt es sich mit der Gamma-Bestrahlung. Hier konnte zwar mit 3 kGy eine effiziente Sterilisation der Proben erzielt werden, jedoch zeigten sich deutliche Schäden an der EZM und der Oberflächenstruktur.

Dank der gewonnen Ergebnisse und der jeweiligen Vor- und Nachteile der einzelnen Methoden wurde eine weitere Kombination von Octenidin und PAA untersucht. Dabei verringerten wir die Einwirkzeit der PAA und steigerten die Konzentration des Octenidins, um Schädigungen durch PAA zu minimieren und die Sterilisationseffizienz des Octenidins zu steigern. Durch das erarbeitete Protokoll gelang eine Sterilisation mit gleichzeitiger Schonung der EZM der behandelten Proben. Die KV-3- und KV-4-Protokolle erzielten gute Ergebnisse. Die Kombination von 1%igem Octenidin für 60 min sowie 0,1%ige PAA mit einer Einwirkzeit von 30 min mit einem anschließenden Waschzyklus von fünf Mal 15 min mit PBS wird letztendlich aufgrund der geringeren Einwirkzeit der PAA bevorzugt. Möglicherweise könnte die Konzentration oder Einwirkzeit der PAA sowie des Octenidins noch weiter verringert werden, um Sterilität gewährleisten zu können, die schädlichen Einflussfaktoren jedoch auf ein Minimum zu reduzieren. Zudem könnte eine Kombination von EtOH und Octendin in Betracht gezogen werden, da sich diese aufgrund der erhobenen Ergebnisse gut ergänzen würden. Hierzu wäre eine weitere Forschung mit Variation des Kombinationsprotokolls von Nöten. Um festzustellen, ob die Waschzyklen ausreichend sind, um die verwendeten Medien vom Gewebe zu entfernen, wäre der Einsatz von Gas- oder Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie sinnvoll.

Abschließend lässt sich sagen, dass Dank des erarbeiteten Kombinationsprotokolls eine gute Alternative zu dem derzeit angewandten Glutaraldehyd für dezellularisierte PK-Implantate gefunden werden konnte. Die aufgestellte Hypothese, dass ein schonendes Verfahren zur Sterilisation von dezellularisiertem Perikard evaluiert werden kann, wurde somit bestätigt. In einigen Punkten zeigte sich das erarbeitete Protokoll sogar überlegen, wie beispielsweise beim Erhalt der

EZM und der biomechanischen Eigenschaften. Es verhielt sich im Gesamten schonend zum Gewebe und konnte die Oberflächenstruktur sowie die biomechanischen Gegebenheiten des Materials präservieren. Als nächster Schritt wäre die Erprobung an Tiermodellen zu empfehlen, um eine abschließende Eignung der Methode zu verifizieren. Das Protokoll ist im klinischen Alltag leicht einsetzbar, da die Materialien in gängig verwendeten Sterilisationsprodukten zu finden sind und deshalb im Allgemeinen leicht verfügbar und kostengünstig sind. Zudem werden keine weiteren aufwändigen technischen Hilfsmittel benötigt. Zudem wäre eine Anwendung an anderen biologischen Materialien denkbar, was das Einsatzspektrum deutlich erweitern würde und somit auch für andere biologische Transplantationsmaterialien Chancen bietet.

	Sterilität	Dicke/ Umfang	Histologie	Oberfläche	max. Bruchkraft	Zell- viabilität
EtOH	+	+/-	+	+/-	-	-
POV	+/-	+	+	+	-	-
BAC	+	-	+	+	-	-
Octenidin	+/-	+	+	+	+	+/-
PAA	+	-	+/-	-	-	+/-
Anti-Anti	-	-	+	+	+/-	+
UV	-	-	+/-	-	-	
Gamma	+	-	-	-	-	
KV3	+	+/-	+	+	+/-	
KV4	+	+/-	+	+	+/-	

Tabelle 6: Zusammenfassung der Ergebnisse der einzelnen chemischen, biologischen und physikalischen Methoden sowie der Kombinationsversuche-3 und -4; + = ja bzw. erhalten, - = nein bzw. nicht erhalten, +/- = teilweise erhalten.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Benjamin, E.J., et al., *Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update: A Report From the American Heart Association*. Circulation, 2017. **135**(10): p. e146-e603.
2. Liakopoulos, O.J., et al., *[Surgical treatment of aortic valve stenosis]*. Herz, 2017. **42**(6): p. 542-547.
3. Vogelgesang, A., G. Hasenfuß, and C. Jacobshagen, *[Diagnosis and treatment of aortic valve stenosis]*. Internist (Berl), 2018. **59**(12): p. 1279-1290.
4. Iung, B. and A. Vahanian, *Epidemiology of valvular heart disease in the adult*. Nat Rev Cardiol, 2011. **8**(3): p. 162-72.
5. Nkomo, V.T., et al., *Burden of valvular heart diseases: a population-based study*. Lancet, 2006. **368**(9540): p. 1005-11.
6. Herzstiftung, D., *Deutscher Herzbericht 2020*, in *Deutscher Herzbericht*. 2020, Deutsche Herzstiftung e.V. p. 194.
7. Holme, P.A., et al., *Shear-induced platelet activation and platelet microparticle formation at blood flow conditions as in arteries with a severe stenosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997. **17**(4): p. 646-53.
8. Stein, P.D. and H.N. Sabbah, *Measured turbulence and its effect on thrombus formation*. Circ Res, 1974. **35**(4): p. 608-14.
9. Borazjani, I. and F. Sotiropoulos, *The effect of implantation orientation of a bileaflet mechanical heart valve on kinematics and hemodynamics in an anatomic aorta*. J Biomech Eng, 2010. **132**(11): p. 111005.
10. Grischa Hoffmann, G.L., Jochen Cremer, *Verbesserte Haltbarkeit von biologischen Herzklappen*, in *Deutsches Ärzteblatt*. 2008. p. 143-148.
11. Gerhard Aumüller, G.A., Andreas Doll, Jürgen Engele, Joachim Kirsch, Siegfried Mense, Dieter Reißig, Jürgen Salvetter, Wolfgang Schmidt, Frank Schmitz, Erik Schulte, Katharina Spaniel-Borowski, Werner Wolff, Laurenz J. Wurzinger, Hans-Gerhard Zilch, *Anatomie*. Duale Reihe. Vol. 2. 2010: Thieme. 1218.
12. Hoit, B.D., *Anatomy and Physiology of the Pericardium*. Cardiol Clin, 2017. **35**(4): p. 481-490.
13. Aguiari, P., et al., *Mechanical testing of pericardium for manufacturing prosthetic heart valves*. Interact Cardiovasc Thorac Surg, 2016. **22**(1): p. 72-84.
14. Nwaejike, N. and R. Ascione, *Mitral valve repair for disruptive acute endocarditis: extensive replacement of posterior leaflet with bovine pericardium*. J Card Surg, 2011. **26**(1): p. 31-3.
15. Tiwari, N., et al., *Tissue engineered decellularized bovine pericardium as prosthetic material in paediatric cardiac surgery*. Indian J Thorac Cardiovasc Surg, 2025. **41**(1): p. 35-40.
16. Fidalgo, C., et al., *A sterilization method for decellularized xenogeneic cardiovascular scaffolds*. Acta Biomater, 2018. **67**: p. 282-294.
17. Polak, R. and R.N. Pitombo, *Care during freeze-drying of bovine pericardium tissue to be used as a biomaterial: a comparative study*. Cryobiology, 2011. **63**(2): p. 61-6.
18. Noble, C., et al., *Evaluation of Pericardial Tissues from Assorted Species as a Tissue-Engineered Heart Valve Material*. Med Biol Eng Comput, 2022. **60**(2): p. 393-406.
19. Mirnajafi, A., B. Zubiate, and M.S. Sacks, *Effects of cyclic flexural fatigue on porcine bioprosthetic heart valve heterograft biomaterials*. J Biomed Mater Res A, 2010. **94**(1): p. 205-13.
20. Lauterio, A., et al., *Bovine pericardium for multiple artery reconstruction in kidney transplantation*. Transpl Int, 2017. **30**(12): p. 1292-1293.
21. Olsen, S.B., W.C. McQuinn, and P. Feliciano, *Results of Carotid Endarterectomy Using Bovine Pericardium Patch Closure, with a Review of Pertinent Literature*. Am Surg, 2016. **82**(3): p. 221-6.

22. Yakirevich, V.S., et al., *Reconstruction of the pericardial sac with glutaraldehyde-preserved bovine pericardium*. Tex Heart Inst J, 1984. **11**(3): p. 238-42.
23. Tao, T., J. Zheng, and Y. Ni, *A new technique of managing paravalvular leak using a folding pericardium patch*. J Card Surg, 2019. **34**(3): p. 134-136.
24. Arya, A., et al., *Assessment of untreated fresh autologous pericardium as material for construction of heart valve: Result at 5 years*. Ann Card Anaesth, 2019. **22**(3): p. 273-277.
25. Amirghofran, A.A., et al., *Pulmonary Valve Replacement Using an Intraoperatively Created Trileaflet Autologous Pericardial Valve: A Case Series*. Iran J Med Sci, 2025. **50**(2): p. 87-97.
26. Ionescu, M.I., et al., *Durability of the pericardial valve*. Eur Heart J, 1984. **5 Suppl D**: p. 101-6.
27. Mourad, F., et al., *Aortic valve construction using pericardial tissue: short-term single-centre outcomes*. Interact Cardiovasc Thorac Surg, 2019. **28**(2): p. 183-190.
28. Reuthebuch, O., et al., *Aortic valve replacement using autologous pericardium: single centre experience with the Ozaki technique*. Swiss Med Wkly, 2018. **148**: p. w14591.
29. Vafaei, T., et al., *Decellularization of human donor aortic and pulmonary valved conduits using low concentration sodium dodecyl sulfate*. J Tissue Eng Regen Med, 2018. **12**(2): p. e841-e853.
30. da Costa, F.D.A., et al., *Decellularized Allografts for Right Ventricular Outflow Tract Reconstruction in Children*. World J Pediatr Congenit Heart Surg, 2017. **8**(5): p. 605-612.
31. Hogan, P.G. and M.F. O'Brien, *Improving the allograft valve: does the immune response matter?* J Thorac Cardiovasc Surg, 2003. **126**(5): p. 1251-3.
32. Carr-White, G.S., et al., *Incidence, location, pathology, and significance of pulmonary homograft stenosis after the Ross operation*. Circulation, 2001. **104**(12 Suppl 1): p. 116-20.
33. Somuncu, O.S., *Decellularization Concept in Regenerative Medicine*. Adv Exp Med Biol, 2019.
34. Gilbert, T.W., T.L. Sellaro, and S.F. Badylak, *Decellularization of tissues and organs*. Biomaterials, 2006. **27**(19): p. 3675-83.
35. 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.
36. Daus, A., et al., *Detergent-Based Decellularization of Bovine Carotid Arteries for Vascular Tissue Engineering*. Ann Biomed Eng, 2017. **45**(11): p. 2683-2692.
37. Brouki Milan, P., et al., *Decellularization and preservation of human skin: A platform for tissue engineering and reconstructive surgery*. Methods, 2019.
38. 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.
39. Funamoto, S., et al., *The use of high-hydrostatic pressure treatment to decellularize blood vessels*. Biomaterials, 2010. **31**(13): p. 3590-5.
40. Sasaki, S., et al., *In vivo evaluation of a novel scaffold for artificial corneas prepared by using ultrahigh hydrostatic pressure to decellularize porcine corneas*. Mol Vis, 2009. **15**: p. 2022-8.
41. Roth, S.P., et al., *Automated freeze-thaw cycles for decellularization of tendon tissue - a pilot study*. BMC Biotechnol, 2017. **17**(1): p. 13.
42. Starnecker, F., et al., *Tissue-engineering acellular scaffolds-The significant influence of physical and procedural decellularization factors*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2018. **106**(1): p. 153-162.
43. Zambaiti, E., et al., *Whole rat stomach decellularisation using a detergent-enzymatic protocol*. Pediatr Surg Int, 2019. **35**(1): p. 21-27.

44. Guimaraes, A.B., et al., *Evaluation of a Physical-Chemical Protocol for Porcine Tracheal Decellularization*. Transplant Proc, 2019. **51**(5): p. 1611-1613.
45. Khorramirouz, R., et al., *Effect of three decellularisation protocols on the mechanical behaviour and structural properties of sheep aortic valve conduits*. Adv Med Sci, 2014. **59**(2): p. 299-307.
46. Hulsmann, J., et al., *Transplantation material bovine pericardium: biomechanical and immunogenic characteristics after decellularization vs. glutaraldehyde-fixing*. Xenotransplantation, 2012. **19**(5): p. 286-97.
47. Mooney, R.O., et al., *Automatic decellularization of ovine aorta-derived extracellular matrix offers reduced processing and attendee times while being as effective as manual techniques*. Tissue Eng Part C Methods, 2015. **21**(5): p. 480-8.
48. Pellegata, A.F., et al., *Arterial Decellularized Scaffolds Produced Using an Innovative Automatic System*. Cells Tissues Organs, 2015. **200**(6): p. 363-73.
49. Badylak, S.F., *The extracellular matrix as a biologic scaffold material*. Biomaterials, 2007. **28**(25): p. 3587-93.
50. Badylak, S.F., *Xenogeneic extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction*. Transpl Immunol, 2004. **12**(3-4): p. 367-77.
51. Kheradvar, A., et al., *Emerging trends in heart valve engineering: Part I. Solutions for future*. Ann Biomed Eng, 2015. **43**(4): p. 833-43.
52. Thomas, L.V., V. Lekshmi, and P.D. Nair, *Tissue engineered vascular grafts--preclinical aspects*. Int J Cardiol, 2013. **167**(4): p. 1091-100.
53. Badylak, S.F., D.O. Freytes, and T.W. Gilbert, *Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function*. Acta Biomater, 2009. **5**(1): p. 1-13.
54. Sarikouch, S.T., Igor; Cebotari, Serghei; Horke, Alexander and A.H. Haverich, Andres, *Aortenklappenersatz: Therapieoption für junge Patienten*. Deutsches Ärztelabel International, 2015. **112**: p. 1426.
55. Zink, C., *Pschyrembel- klinisches Wörterbuch*. Pschyrembel, ed. W.d.G. GmbH. Vol. 255. 1986: Walter de Gruyter GmbH. 1873.
56. von Woedtke, T. and A. Kramer, *The limits of sterility assurance*. GMS Krankenhhyg Interdiszip, 2008. **3**(3): p. Doc19.
57. Agency, I.-I.A.E., *Radiation Sterilization of Tissue Allografts: Requirements for Validation and Routine Control A Code of Practice*. 2008.
58. Lecturio. *Desinfektion*. 2019; Available from: <https://www.lecturio.de/lexikon/desinfektion>.
59. López-Alonso, J.P., et al., *NMR spectroscopy reveals that RNase A is chiefly denatured in 40% acetic acid: implications for oligomer formation by 3D domain swapping*. J Am Chem Soc, 2010. **132**(5): p. 1621-30.
60. Wikipedia. *Denaturierung (Biochemie)*. 2021 12.01.2021; Available from: [https://de.wikipedia.org/wiki/Denaturierung_\(Biochemie\)](https://de.wikipedia.org/wiki/Denaturierung_(Biochemie)).
61. Sizeland, K.H., et al., *Age dependent differences in collagen alignment of glutaraldehyde fixed bovine pericardium*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 189197.
62. Dittfeld, C., et al., *Tissue requirements for the application of aortic valve neocuspidization - appropriate pericardium properties and homogeneity?* J Mater Sci Mater Med, 2024. **35**(1): p. 26.
63. Russell, A.D., *Glutaraldehyde: current status and uses*. Infect Control Hosp Epidemiol, 1994. **15**(11): p. 724-33.
64. Chang, J., et al., *A multifunctional bio-patch crosslinked with glutaraldehyde for enhanced mechanical performance, anti-coagulation properties, and anti-calcification properties*. J Mater Chem B, 2023. **11**(43): p. 10455-10463.
65. Filová, E., et al., *Modification of human pericardium by chemical crosslinking*. Physiol Res, 2020. **69**(1): p. 49-59.
66. Manji, R.A., et al., *Bioprosthetic heart valves of the future*. Xenotransplantation, 2014. **21**(1): p. 1-10.

67. Gendler, E., S. Gendler, and M.E. Nimni, *Toxic reactions evoked by glutaraldehyde-fixed pericardium and cardiac valve tissue bioprosthesis*. J Biomed Mater Res, 1984. **18**(7): p. 727-36.
68. Abolhoda, A., et al., *Calcification of bovine pericardium: glutaraldehyde versus No-React biomodification*. Ann Thorac Surg, 1996. **62**(1): p. 169-74.
69. Simionescu, D., A. Simionescu, and R. Deac, *Mapping of glutaraldehyde-treated bovine pericardium and tissue selection for bioprosthetic heart valves*. J Biomed Mater Res, 1993. **27**(6): p. 697-704.
70. Schoen, F.J. and R.J. Levy, *Calcification of tissue heart valve substitutes: progress toward understanding and prevention*. Ann Thorac Surg, 2005. **79**(3): p. 1072-80.
71. Simionescu, D.T., *Prevention of calcification in bioprosthetic heart valves: challenges and perspectives*. Expert Opin Biol Ther, 2004. **4**(12): p. 1971-85.
72. Manji, R.A., et al., *Glutaraldehyde-fixed bioprosthetic heart valve conduits calcify and fail from xenograft rejection*. Circulation, 2006. **114**(4): p. 318-27.
73. Steinhauer, K., et al., *Antimicrobial efficacy and compatibility of solid copper alloys with chemical disinfectants*. PLoS One, 2018. **13**(8): p. e0200748.
74. Boyce, J.M., *Best products for skin antisepsis*. Am J Infect Control, 2019. **47s**: p. A17-a22.
75. Reichel, M., et al., *Alcohols for skin antisepsis at clinically relevant skin sites*. Antimicrob Agents Chemother, 2009. **53**(11): p. 4778-82.
76. von Versen-Hoeynck, F., et al., *Sterilization and preservation influence the biophysical properties of human amnion grafts*. Biologicals, 2008. **36**(4): p. 248-55.
77. Phipps, A., et al., *Chemical sterilization of allograft dermal tissues*. Cell Tissue Bank, 2017. **18**(4): p. 573-584.
78. Kuttan, J.C., et al., *Decellularized tracheal extracellular matrix supports epithelial migration, differentiation, and function*. Tissue Eng Part A, 2015. **21**(1-2): p. 75-84.
79. Rotte, C. "Worauf beruht die desinfizierende Wirkung bei 70%igen alkoholischen Lösungen"? 2019; Available from: https://www.mpibpc.mpg.de/151749/Desinfizierende_Wirkung_von_Alkohol.
80. Institut, R.K. *Epidemiologisches Bulletin- aktuelle Daten und Informationen zu Infektionskrankheiten und public health*. 2016; 17:[Available from: https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2016/17/Art_01.html].
81. Umwelt, K.B. *Hintergrundinformation zu Desinfektionsmitteln*. [Faktenblatt] 2003; 6.2:[Available from: http://www.ims.uzh.ch/static/CMS_service/Bio_Sicherheit/doc/22-Hinterg-Des-mit-22-10-04.pdf].
82. Zhao, Y., et al., *Use of polyvinylpyrrolidone-iodine solution for sterilisation and preservation improves mechanical properties and osteogenesis of allografts*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 38669.
83. Afshar, A., *Reimplantation of a Large Extruded Segment of Bone in an Open Fracture*. J Hand Surg Am, 2017. **42**(2): p. 128-134.
84. Abdelfatah, M.A., *Management of Dropped Skull Flaps*. Turk Neurosurg, 2017. **27**(6): p. 912-916.
85. Wikipedia. *Povidon-Iod*. 2019 18.7.19; Available from: https://de.wikipedia.org/wiki/Povidon-Iod#cite_note-12.
86. Koch-Institut, R. *Liste der vom Robert Koch-Institut geprüften und anerkannten Desinfektionsmittel und -verfahren*. 2017; Available from: https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Krankenhaushygiene/Desinfektionsmittel/Downloads/BGBI_60_2017_Desinfektionsmittelliste.pdf?__blob=publicationFile.
87. AG, B.B.-M. *Braunol- Fachinformation*. 2017; Available from: <https://www.bbBraun.de/content/dam/catalog/bbraun/bbraunProductCatalog/S/AEM2015/de-de/b5/braunol.pdf.bb-.37624996/braunol.pdf>.

88. Rasmussen, C.A., P.L. Kaufman, and J.A. Kiland, *Benzalkonium chloride and glaucoma*. J Ocul Pharmacol Ther, 2014. **30**(2-3): p. 163-9.
89. Steven, D.W., P. Alagband, and K.S. Lim, *Preservatives in glaucoma medication*. Br J Ophthalmol, 2018. **102**(11): p. 1497-1503.
90. Gonzalez-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.
91. Baudouin, C., et al., *Preservatives in eyedrops: the good, the bad and the ugly*. Prog Retin Eye Res, 2010. **29**(4): p. 312-34.
92. Hubner, N.O., J. Siebert, and A. Kramer, *Octenidine dihydrochloride, a modern antiseptic for skin, mucous membranes and wounds*. Skin Pharmacol Physiol, 2010. **23**(5): p. 244-58.
93. Assadian, O., *Octenidine dihydrochloride: chemical characteristics and antimicrobial properties*. J Wound Care, 2016. **25**(3 Suppl): p. S3-6.
94. Dettenkofer, M., et al., *Effect of skin disinfection with octenidine dihydrochloride on insertion site colonization of intravascular catheters*. Infection, 2002. **30**(5): p. 282-5.
95. Harke, H.P., *[Octenidine dihydrochloride, properties of a new antimicrobial agent]*. Zentralbl Hyg Umweltmed, 1989. **188**(1-2): p. 188-93.
96. Rengelshausen, J., et al., *Decolonization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus by disinfection of the skin*. Am J Med, 2000. **108**(8): p. 685-6.
97. Rohr, U., et al., *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus whole-body decolonization among hospitalized patients with variable site colonization by using mupirocin in combination with octenidine dihydrochloride*. J Hosp Infect, 2003. **54**(4): p. 305-9.
98. Bartoszewicz, M., et al., *Penetration of a selected antibiotic and antiseptic into a biofilm formed on orthopedic steel implants*. Ortop Traumatol Rehabil, 2007. **9**(3): p. 310-8.
99. PharmaWiki. *Octenidin*. 2019 14.7.17; Available from: <https://www.pharmawiki.ch/wiki/index.php?wiki=octenidin>.
100. Lomas, R.J., et al., *Effects of a peracetic acid disinfection protocol on the biocompatibility and biomechanical properties of human patellar tendon allografts*. Cell Tissue Bank, 2004. **5**(3): p. 149-60.
101. Lomas, R.J., et al., *Assessment of the biological properties of human split skin allografts disinfected with peracetic acid and preserved in glycerol*. Burns, 2003. **29**(6): p. 515-25.
102. Farrington, M., et al., *Processing of cardiac valve allografts: 2. Effects of antimicrobial treatment on sterility, structure and mechanical properties*. Cell Tissue Bank, 2002. **3**(2): p. 91-103.
103. Freytes, D.O., et al., *Biaxial strength of multilaminated extracellular matrix scaffolds*. Biomaterials, 2004. **25**(12): p. 2353-61.
104. Nam, J., et al., *Changes of the Structural and Biomechanical Properties of the Bovine Pericardium after the Removal of alpha-Gal Epitopes by Decellularization and alpha-Galactosidase Treatment*. Korean J Thorac Cardiovasc Surg, 2012. **45**(6): p. 380-9.
105. Scheffler, S.U., et al., *Remodeling of ACL allografts is inhibited by peracetic acid sterilization*. Clin Orthop Relat Res, 2008. **466**(8): p. 1810-8.
106. Yoganarasimha, S., et al., *Peracetic acid: a practical agent for sterilizing heat-labile polymeric tissue-engineering scaffolds*. Tissue Eng Part C Methods, 2014. **20**(9): p. 714-23.
107. Woon, C.Y., et al., *Optimization of human tendon tissue engineering: peracetic acid oxidation for enhanced reseeding of acellularized intrasynovial tendon*. Plast Reconstr Surg, 2011. **127**(3): p. 1107-17.
108. Wikipedia. *Wasserstoffperoxid*. 2020 13.12.20; Available from: https://de.wikipedia.org/wiki/Wasserstoffperoxid#Desinfektion_und_Sterilisation.
109. Wikipedia. *Sterilisation*. 2021; Available from: <https://de.wikipedia.org/wiki/Sterilisation>.

110. Grasman, J.M., et al., *The Effect of Sterilization Methods on the Structural and Chemical Properties of Fibrin Microthread Scaffolds*. Macromol Biosci, 2016. **16**(6): p. 836-46.
111. Cornwell, K.G. and G.D. Pins, *Discrete crosslinked fibrin microthread scaffolds for tissue regeneration*. J Biomed Mater Res A, 2007. **82**(1): p. 104-12.
112. Rahman, N., R. Khan, and S. Badshah, *Effect of x-rays and gamma radiations on the bone mechanical properties: literature review*. Cell Tissue Bank, 2018. **19**(4): p. 457-472.
113. Yang, X., et al., *Irradiation sterilization used for allogeneic tendon: a literature review of current concept*. Cell Tissue Bank, 2019. **20**(2): p. 129-139.
114. Brauer, D.S., et al., *Effect of sterilization by gamma radiation on nano-mechanical properties of teeth*. Dent Mater, 2008. **24**(8): p. 1137-40.
115. Jordan, J.E., et al., *Bioengineered self-seeding heart valves*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2012. **143**(1): p. 201-8.
116. Aguiari, P., et al., *In vitro comparative assessment of decellularized bovine pericardial patches and commercial bioprosthetic heart valves*. Biomed Mater, 2017. **12**(1): p. 015021.
117. Ruß, A., *Arzneimittel pocket 2018*. Arzneimittel pocket, ed. B.B. Verlag. Vol. 23. 2018: Börm Bruckmeier Verlag. 537.
118. Hafeez, Y.M., et al., *Effect of freeze-drying and gamma irradiation on biomechanical properties of bovine pericardium*. Cell Tissue Bank, 2005. **6**(2): p. 85-9.
119. Helder, M.R., et al., *Low-Dose Gamma Irradiation of Decellularized Heart Valves Results in Tissue Injury In Vitro and In Vivo*. Ann Thorac Surg, 2016. **101**(2): p. 667-74.
120. Kweon, H., et al., *A novel degradable polycaprolactone networks for tissue engineering*. Biomaterials, 2003. **24**(5): p. 801-8.
121. Yildirim, L. and A.M. Seifalian, *Sterilization-Induced Changes in Surface Topography of Biodegradable POSS-PCLU and the Cellular Response of Human Dermal Fibroblasts*. Tissue Eng Part C Methods, 2015. **21**(6): p. 614-30.
122. AG, B.B.M. *Braunol® – universelle PVP-Iod-Lösung zur Haut-, Schleimhaut- und Wundantiseptik*. 2013; Available from: <https://www.bbraun.de/content/dam/catalog/bbraun/bbraunProductCatalog/S/AEM2015/de-de/b0/produktblatt-braunol.pdf.bb-.37631046/produktblatt-braunol.pdf>.
123. GmbH, D.D.T. *DESOTP- Kombinationspräparat zur Desinfektion und Reinigung von Flächen*. 2019; Available from: <https://desomed.de/produkte/desotop>.
124. AG, S.u.M. *Antiseptik mit Octenidin- Vorbeugen. Schützen. Behandeln*. 2010; Available from: <https://docplayer.org/10154797-Antiseptik-mit-octenidin-vorbeugen-schuetzen-behandeln.html>.
125. Selim, M., et al., *Developing biodegradable scaffolds for tissue engineering of the urethra*. BJU Int, 2011. **107**(2): p. 296-302.
126. Lennetech, *Desinfektion durch UV-Licht*. 2019.
127. Basil-Jones, M.M., et al., *Collagen fibril alignment and deformation during tensile strain of leather: a small-angle X-ray scattering study*. J Agric Food Chem, 2012. **60**(5): p. 1201-8.
128. Basil-Jones, M.M., et al., *Collagen fibril orientation in ovine and bovine leather affects strength: a small angle X-ray scattering (SAXS) study*. J Agric Food Chem, 2011. **59**(18): p. 9972-9.
129. GmbH, O.D., *Product Specification- Thioglycollate Medium USP*, O.D. GmbH, Editor. 2012, OXOID Deutschland GmbH.
130. Beckton, D.a.C., *BBL Trypticase Soy Broth*, D.a.C. Beckton, Editor. 2015, Beckton, Dickinson and Company. p. 1-4.
131. Kapuscinski, J., *DAPI: a DNA-specific fluorescent probe*. Biotech Histochem, 1995. **70**(5): p. 220-33.

132. Tanious, F.A., et al., *DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) binds differently to DNA and RNA: minor-groove binding at AT sites and intercalation at AU sites*. *Biochemistry*, 1992. **31**(12): p. 3103-12.
133. Lüllmann-Rauch, R., *Taschenlehrbuch Histologie*. Vol. 4. 2012: Georg Thieme Verlag KG.
134. Th. Kirchner, H.K.M.-H., A. Roessner, *Grundmann- Kurzlehrbuch Pathologie und Grundlagen der speziellen Pathologie*. Kurzlehrbuch, ed. A. Roessner. Vol. 12. 2014: ELSEVIER- Urban & Fischer. 561.
135. GmbH, M. *Färbekit: MOVAT Pentachrom nach VERHÖFF*. 2019 28.09.19 [cited 2019 19.10.19]; Available from: https://www.morphisto.de/shop/detail/d/F%C3%A4rbekit%3A_MOVAT_Pentachrom_nach_VERH%C3%96FF/12/.
136. Borges, L.F., S.R. Taboga, and P.S. Gutierrez, *Simultaneous observation of collagen and elastin in normal and pathological tissues: analysis of Sirius-red-stained sections by fluorescence microscopy*. *Cell Tissue Res*, 2005. **320**(3): p. 551-2.
137. Vogel, B., et al., *Determination of collagen content within picosirius red stained paraffin-embedded tissue sections using fluorescence microscopy*. *MethodsX*, 2015. **2**: p. 124-34.
138. Nguyen, J.N.T. and A.M. Harbison, *Scanning Electron Microscopy Sample Preparation and Imaging*. *Methods Mol Biol*, 2017. **1606**: p. 71-84.
139. Mulisch, M., *Fixierungen für Licht- und Elektronenmikroskopie*. 2015, Romeis-Mikroskopische Technik: Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg. 98.
140. Wikipedia. *Überkritische Trocknung*. 2019 27.03.2019; Available from: https://xtools.wmflabs.org/articleinfo-authorship/de.wikipedia.org/%C3%9Cberkritische_Trocknung?uselang=de.
141. Katsen-Globa, A., et al., *Study of SEM preparation artefacts with correlative microscopy: Cell shrinkage of adherent cells by HMDS-drying*. *Scanning*, 2016. **38**(6): p. 625-633.
142. Wikipedia. *Zugversuch*. 2021 23.10.21; Available from: <https://de.wikipedia.org/wiki/Zugversuch>.
143. Holy, C.E., et al., *Optimizing the sterilization of PLGA scaffolds for use in tissue engineering*. *Biomaterials*, 2001. **22**(1): p. 25-31.
144. Huang, Q., et al., *Production of a sterilised decellularised tendon allograft for clinical use*. *Cell Tissue Bank*, 2013. **14**(4): p. 645-54.
145. Germain, M., et al., *Disinfection of human cardiac valve allografts in tissue banking: systematic review report*. *Cell Tissue Bank*, 2016. **17**(4): p. 593-601.
146. Fan, Y.D., et al., *Evaluation of decontamination process of heart valve and artery tissues in European Homograft Bank (EHB): a retrospective study of 1,055 cases*. *Cell Tissue Bank*, 2012. **13**(2): p. 297-304.
147. Paniagua Gutierrez, J.R., et al., *Regenerative potential of low-concentration SDS-decellularized porcine aortic valved conduits in vivo*. *Tissue Eng Part A*, 2015. **21**(1-2): p. 332-42.
148. Davies, J. and D. Davies, *Origins and evolution of antibiotic resistance*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2010. **74**(3): p. 417-33.
149. Munita, J.M. and C.A. Arias, *Mechanisms of Antibiotic Resistance*. *Microbiol Spectr*, 2016. **4**(2).
150. Stoppel, W.L., et al., *Terminal sterilization of alginate hydrogels: efficacy and impact on mechanical properties*. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2014. **102**(4): p. 877-84.
151. Walker, S., et al., *Sterilization and Cross-Linking Combined with Ultraviolet Irradiation and Low-Energy Electron Irradiation Procedure: New Perspectives for Bovine Pericardial Implants in Cardiac Surgery*. *Thorac Cardiovasc Surg*, 2022. **70**(1): p. 33-42.
152. Salehpour, A., et al., *Dose-dependent response of gamma irradiation on mechanical properties and related biochemical composition of goat bone-patellar tendon-bone allografts*. *J Orthop Res*, 1995. **13**(6): p. 898-906.

153. Valente, T.A., et al., *Effect of Sterilization Methods on Electrospun Poly(lactic acid) (PLA) Fiber Alignment for Biomedical Applications*. ACS Appl Mater Interfaces, 2016. **8**(5): p. 3241-9.
154. Edwards, J.H., et al., *The effects of irradiation on the biological and biomechanical properties of an acellular porcine superflexor tendon graft for cruciate ligament repair*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2017. **105**(8): p. 2477-2486.
155. Johnson, C.M., et al., *The feasibility of gamma radiation sterilization for decellularized tracheal grafts*. Laryngoscope, 2017. **127**(8): p. E258-e264.
156. Siritientong, T., T. Srichana, and P. Aramwit, *The effect of sterilization methods on the physical properties of silk sericin scaffolds*. AAPS PharmSciTech, 2011. **12**(2): p. 771-81.
157. Clough, R.L., *High-energy radiation and polymers: A review of commercial processes and emerging applications.*, in *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research in Section B*. 2001. p. 8-33.
158. Chen, W., et al., *Corneal alternations induced by topical application of benzalkonium chloride in rabbit*. PLoS One, 2011. **6**(10): p. e26103.
159. Rosario, D.J., et al., *Decellularization and sterilization of porcine urinary bladder matrix for tissue engineering in the lower urinary tract*. Regen Med, 2008. **3**(2): p. 145-56.
160. Schuttler, K.F., et al., *Biomechanical and microbiological effects of local vancomycin in anterior cruciate ligament (ACL) reconstruction: a porcine tendon model*. Arch Orthop Trauma Surg, 2019. **139**(1): p. 73-78.
161. Inoue, T., et al., *Effects of Short-Duration Ethanol Dehydration on Mechanical Properties of Porcine Pericardium*. Ann Thorac Cardiovasc Surg, 2021. **27**(3): p. 169-175.
162. Cornwell, K.G., et al., *Crosslinking of discrete self-assembled collagen threads: Effects on mechanical strength and cell-matrix interactions*. J Biomed Mater Res A, 2007. **80**(2): p. 362-71.
163. Bax, D.V., et al., *Impact of UV- and carbodiimide-based crosslinking on the integrin-binding properties of collagen-based materials*. Acta Biomater, 2019. **100**: p. 280-291.
164. Youngstrom, D.W., et al., *Functional characterization of detergent-decellularized equine tendon extracellular matrix for tissue engineering applications*. PLoS One, 2013. **8**(5): p. e64151.
165. Datta, S., et al., *The Eye Drop Preservative Benzalkonium Chloride Potently Induces Mitochondrial Dysfunction and Preferentially Affects LHON Mutant Cells*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2017. **58**(4): p. 2406-2412.
166. MerckSerono. *Refobacin Augentropfen*. Gebrauchsinformation: Information für Anwender 2015 Juni 2015; Available from: https://www.merckgroup.com/content/dam/web/corporate/non-images/country-specifics/germany/expertise/use-information/r/REFOBACIN_Augentropfen_Juni_2015.pdf.
167. Kramer, A., et al., *[Explant test with skin and peritoneum of the neonatal rat as a predictive test of tolerance of local anti-infective agents in wounds and body cavities]*. Chirurg, 1998. **69**(8): p. 840-5.
168. Findik, G., et al., *Effect of intrapleural povidone-iodine lavage on thyroid hormones in thoracic surgery*. Thorac Cardiovasc Surg, 2010. **58**(4): p. 225-8.
169. Findik, R.B., et al., *Effect of povidone iodine on thyroid functions and urine iodine levels in caesarean operations*. J Matern Fetal Neonatal Med, 2014. **27**(10): p. 1020-2.
170. Guler, S., et al., *Improvement of Decellularization Efficiency of Porcine Aorta Using Dimethyl Sulfoxide as a Penetration Enhancer*. Artif Organs, 2018. **42**(2): p. 219-230.
171. Johnson, N.F., *Pulmonary Toxicity of Benzalkonium Chloride*. J Aerosol Med Pulm Drug Deliv, 2018. **31**(1): p. 1-17.
172. Kwon, D., et al., *Evaluation of pulmonary toxicity of benzalkonium chloride and triethylene glycol mixtures using in vitro and in vivo systems*. Environ Toxicol, 2019. **34**(5): p. 561-572.

173. Kajbafzadeh, A.M., et al., *Determining the optimal decellularization and sterilization protocol for preparing a tissue scaffold of a human-sized liver tissue*. Tissue Eng Part C Methods, 2013. **19**(8): p. 642-51.
174. Grefen, L., et al., *Pericardial tissue for cardiovascular application: an in-vitro evaluation of established and advanced production processes*. J Mater Sci Mater Med, 2018. **29**(11): p. 172.
175. Dr. med. Linda Grefen, N.T., Caroline Radner, Joscha Büch, Christian Hagl, Maximilian Grab, *Prozessierungsmethoden von Biomaterialien In-vitro-Analyse von Perikard-Patches und Biokompatibilität*. Zeitschrift für Herz-,Thorax- und Gefäßchirurgie 2023. **Ausgabe 3-4/2023** p. 172-178.

8 ANHANG

Medien und Reagenzien:

Artikel	Artikelnummer	Hersteller/Lieferant
Antibiotic-Antimycotic 5% (Gibco)	15240062	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Aqua destillata (AMPUWA)	1214482	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Deutschland
Benzalkoniumchlorid 2%	B6295	BioXtra, Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Desoxycholsäure 0,5%	D2510	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Eosin Y solution alcoholic	230251	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland
Ethanol 30%, vergällt		Apotheke Klinikum Großhadern
Ethanol 50%, vergällt		Apotheke Klinikum Großhadern
Ethanol 60%, vergällt		Apotheke Klinikum Großhadern
Ethanol 70%, vergällt		Apotheke Klinikum Großhadern
Ethanol 80%, vergällt		Apotheke Klinikum Großhadern
Ethanol 96%, vergällt		Apotheke Klinikum Großhadern
Ethanol 99,8%, DAB, reinst.	K928.5	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol absolut, vergällt		Apotheke Klinikum Großhadern15240062
Heparin 5000 i.E.	5394.00.00	Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
Mayers Hämalauflösung	1.09249.0500	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Medium (M) 199	F0665	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Natriumlaurylsulfat (SDS-Pellets)	CN30.3	Rotiphorese-Grade, Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Octenidindihydrochlorid	70775-75-6	Dishman Pharmaceuticals, Gujarat, Indien

PBS Dulbecco w/o Ca²⁺, Mg²⁺, Instamed 9,55 g/l, gemischt mit AMPUWA	L182-50	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Peressigsäure 0,1%	1.07222	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Povidon-Iod 7,5% (Braunol)	9322531	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Roti-Histofix 4%	P087.3	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Thioglycollate Medium USP	TV5001D	OXOID Deutschland GmbH, Wesel, Deutschland
Trypsin-EDTA 10x Solution	T4174	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Trypticase Soy Broth	L007517	BD GmbH, Heidelberg, Deutschland
Tryptan Blue Solution (0,4%)	T8154	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
WST-1	5015944001	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Xylol	9713.3	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Medienzusammensetzungen:

Medium	Reagenz	Menge
FIX II (500 ml) - Lagerung: 4 °C	Aqua bidest	456 ml
	Glutaraldehyd (25%)	43,5 ml
	HCL (1N)	0,75 ml
	Na-CaCO	5,65 g
Kulturmedium Endothelzellen (5% FCS) - Lagerung: 4 °C	Endothelial Cell Growth Medium	500 ml
	Endothelial Cell Growth Medium Suppl. Pack	10 ml
	FCS	25 ml
Mayer's Häkalaunlösung (1:4) - Lagerung: RT	Häkalaun	50 ml
	PBS	150 ml
Spülmedium (500 ml) aliquotiert: 15 ml - Lagerung: 20 °C	M199	494 ml
	Heparin	5000 i.E.
	Gentamycin	5 ml

Stoppmedium (500 ml) aliquotiert: 15 ml - Lagerung: 20 °C	M 199	444 ml
	Heparin (5000 i.E.)	1ml
	Gentamycin (10 mg/ml)	5 ml
	FCS	50 ml
Sudan-Schwarz - Lagerung: RT	Sudan-Schwarz B	4 mg
	Ethanol absolut	50 ml
	Destilliertes Wasser	100 ml
Trypsin (1:20) - aliquotiert: 50 ml - Lagerung: -20 °C	PBS	475 ml
	Trypsin (10x)	25 ml

Verbrauchsmaterialien:

Artikel	Artikelnummer	Hersteller/Lieferant
Becher, 2000 ml	213-0469	VWR, Radnor, USA
Bakteriologische Petrischalen 120 mm x 120 mm	5488041	Witeg Labortechnik GmbH, Wertheim am Main, Deutschland
Cell culture flask 12,5 cm²	353107	Corning B.V. Life Science, Amsterdam, Niederlande
Cell culture flask 75 cm²	3290	Corning B.V. Life Science, Amsterdam, Niederlande
Cell culture flask 162 cm²	3151	Corning B.V. Life Science, Amsterdam, Niederlande
Deckgläser 24 x 50 mm	10672-014	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
Dreiwegehahn	16494 C	B. Braun Medical AG, Escholzmat, Schweiz
Gazin-Mullkompresse	L2 18506	Lohmann und Rauscher GmbH und Co.KG, Neuwied, Deutschland
Leica CV Mount	14046430011	Leica Camera AG, Wetzlar, Deutschland
Mikro-Schraubröhre 1,5 ml	72.692.005	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Nahtmaterial Prolene monofil blau 5,0 mit Nadel	K2463	Ethicon Endo Surgery, Somerville, USA
Objektträger 25x75x1,0 mm, Superfrost	J1800AMNZ	Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland

Pipette serol., 50 ml	4487	Corning Inc., Corning, USA
Skalpell Feather Disposable Scalpel No. 23	200130023	Feather Safety Razor Co. Ltd., Osaka, Japan
Steriler Hautmarkierungsstift	PS3150	VMP Vertrieb medizinischer Produkte GmbH, Hückelhoven, Deutschland
Weithalslaborgewindeglas 1000 ml	21801545	Schott AG, Mainz, Deutschland
Zählkammer, C- Chip	PDHC-N01	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
24-Well-Platte	353043	Beckton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
96-Well-Platte	353047	Beckton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland

Geräteliste:

Gerät	Model/Typ	Hersteller
Aquarien-Pumpe	Aquarien-Pumpe EDEN 155 Eden Water Paradise 80 W	Eden Water Paradise GmbH, Hörstel, Deutschland
Autoklav	WEBECO Vertikalautoklav	WEBECO GmbH, Selmsdorf, Deutschland
Dickenmessgerät	Dial Gage Stand 913-101	Mitutoyo Deutschland GmbH, Neuss, Deutschland
ELISA-Reader	Multiskan Ascent 96 Plate Reader	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Fluoreszenzmikroskop	AxioObserver	Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland
Gamma-Bestrahlungsanlage	Gammazell 220	Institut für Strahlenschutz, Helmholtz Zentrum München, Deutschland
Kniehebelstanze	Bent Lever-Cutting DO725974 / 2016	Zwick Roell GmbH & Co.KG, Ulm, Deutschland
Kritisch-Punkt-Trockner	Critical Point Dryer, CPD 030	BalTec Maschinenbau AG, Pfäffikon, Schweiz
LED-Lampen	Stabilized LED Power supply 0,9-20 W	OSRAM GmbH, München, Deutschland
Lichtmikroskop	Leica DMR	Leica Mikrosysteme

		Vertrieb GmbH, Wetzlar, GER
Mikrotom	MH 400 R	Microm International GmbH, Walldorf, Deutschland
Präzisionswaage	Präzisionswaage Kern EW	Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
Rasterelektronenmikroskop	Zeiss EVO LS10	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Reinraumwerkbank	Reinraumwerkbank mit Laminar Flow, Hera safe	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Rührplatte	Magnetrührer RET basic	IKA Werke GmbH & Co.KG , Staufeu, Deutschland
Sputter Coater	Sputter Coater, SCD 050	BalTec Maschinenbau AG, Pfäffikon, Schweiz
Ultraschallbad	Ultrasonic Cleaner	USC-T, VWR, Radnor, USA
Ultraviolett-Lampe	HNS 15 W G13 UVC Lampe – PURITEC keimtötende UV-Lampe	OSRAM GmbH, München, Deutschland
Wärmeschrank	WTC	Binder,Tuttlingen, Deutschland
Zugprüfmaschine	ZwickiLine bis 5 kN	Zwick Roell GmbH und Co. KG, Ulm, Deutschland

Färbeprotokolle

H&E-Färbeprotokoll	
Lösung	Dauer und Vorgang
Roti-Histol	2 x 15 min
Ethanol 100 %	2 x 5 min
Ethanol 96 %	2 x 5 min
Ethanol 70 %	2x 5 min
Destilliertes Wasser	2x 3 min
PBS	2x 3 min
destilliertes Wasser	kurz spülen
Hämalaunlösung (1:3 in PBS)	5 min
Leitungswasser	kurz spülen
Lauwarmes Leitungswasser	5-10 min
EtOH 70%	3 x kurz tauchen
Eosin	2 min
Leitungswasser	2 x kurz tauchen
EtOH 70%	4 x kurz tauchen

EtOH 96%	10 x kurz tauchen
EtOH 100%	2x 5 min
Xylol	3 x tauchen

Pentachrom-Färbeprotokoll	
Lösung	Dauer und Vorgang
Xylol	2 x 5min
Ethanol 96 %	2 min
Ethanol 80 %	2 min
Ethanol 70 %	2 min
Ethanol 60 %	2 min
Destilliertes Wasser	2 min
Alcianblau 1%	12 min
Leitungswasser fließend	5 min
alkalischer Alkohol	60 min
Leitungswasser fließend	10 min
Weigerts Eisenhämatoxylin	10 min
destilliertes Wasser	1 min
Eisen-(III)-Chlorid-Lösung	3 min
destilliertes Wasser	1 min
Natriumthiosulfat	1 min
destilliertes Wasser	1 min
Leistungswasser fließend	15 min
Brilliant-Crocein-Säurefuchsin	10 min
Essigsäure 1%	30 s
Phosphorwolframsäure 5%	20 min
Essigsäure 1%	2 min
Ethanol 99%	1 min
Ethanol 99%	6 min
Safran du Gâtinais	6 min
Ethanol 99%	2 x 2 min
2-Propanol	2 min
Xylol	2 x 5 min

Pikro-Siriusrot-Färbeprotokoll	
Lösung	Dauer und Vorgang
Xylol	2 x 10 min
Ethanol 96 %	4 min
Ethanol 80 %	4 min
Ethanol 70 %	4 min
Ethanol 60 %	4 min
Leitungswasser	4 min
Weigerts Eisenhämatoxylin	8 min
destilliertes Wasser	kurz spülen
Leitungswasser fließend	10 min

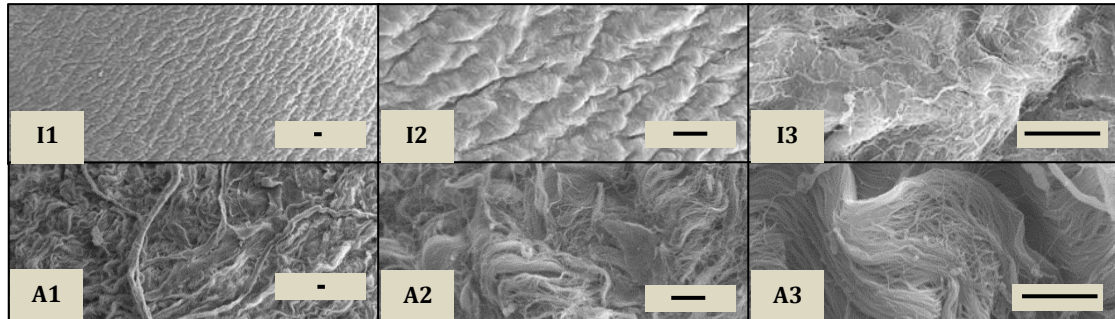
destilliertes Wasser	1 min
Pikro-Siriusrot	60 min
Essigsäure 30%	2 x 1 min
EtOH 96%	2 x 4 min
2-Propanol	4 min
Xylol	2 x 10 min

DAPI-Färbeprotokoll	
Lösung	Dauer und Vorgang
Roti-Histol	2 x 15 min
Ethanol 100 %	2 x 5 min
Ethanol 96 %	2 x 5 min
Ethanol 70 %	2x 5 min
Destilliertes Wasser	2x 3 min
PBS	2x 3 min
DAPI-Reagenz in PBS (1:1000)	5 min
PBS	2 x 5 min
Sudanschwarz , c = 0,3 %	2 min
destilliertes Wasser	2 x 5 min

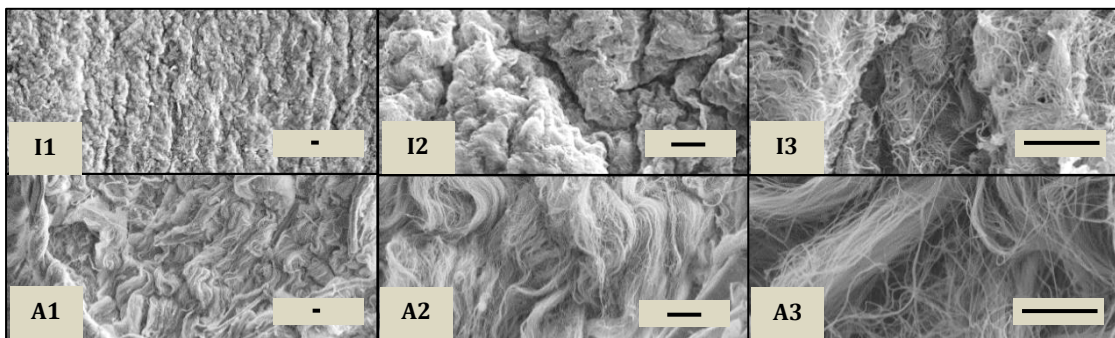
Rasterelektronenmikroskopie-Bilder

Beschriftung für alle nachfolgenden REM-Bilder:

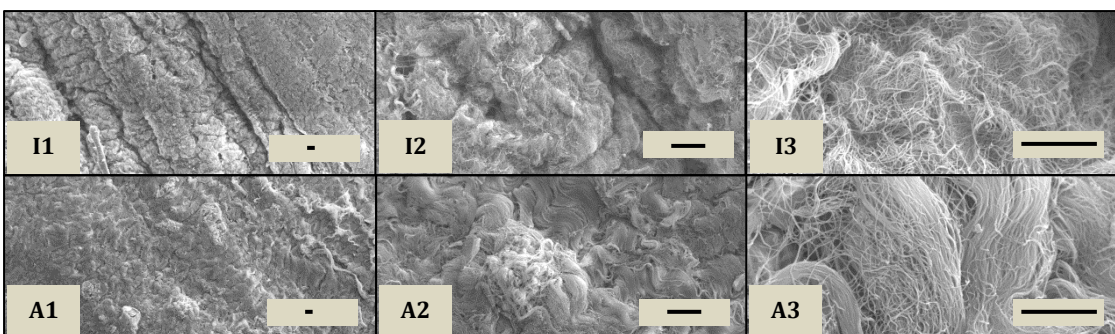
I: Innenseite, A: Außenseite, 1: 500-fache, 2: 2 k-fache und 3: 10 k-fache Vergrößerung;
Maßstabsbalken: 10 µm.



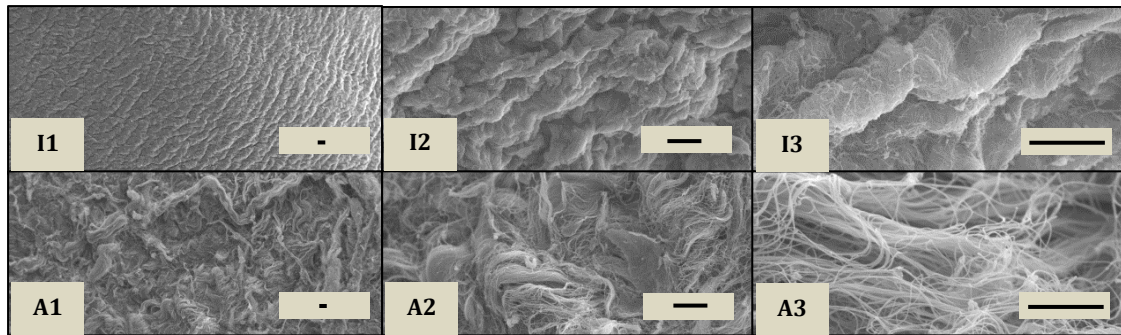
Anhang 1: Native PK-Proben; I1-3: gleichmäßiger Faserverlauf und glatte, geschlossene Oberfläche; A1-3: unregelmäßiger Faserverlauf und angeraute Oberfläche.



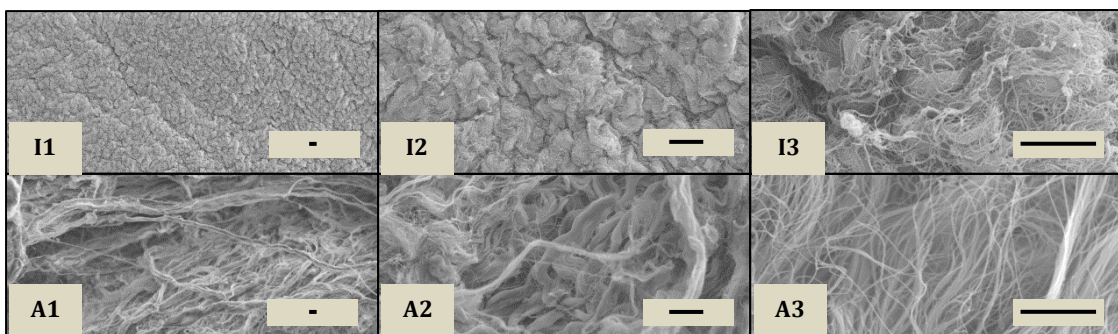
Anhang 2: Dezellularisierte PK-Proben; I1-3: teilweise leicht löchrige Oberfläche; A1-3: Auflockerung der Faserbündel.



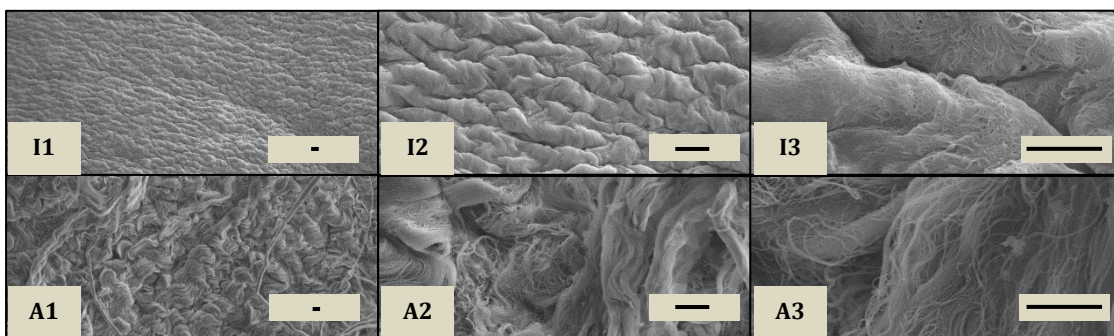
Anhang 3: Mit EtOH behandelte PK-Proben; I1 und A1: An der Innenseite sowie an der Außenseite einer von 3 Proben erkennt man in 500-facher Vergrößerung eine Abflachung des Oberflächenrelief, I2-3 und A2-3: in den beiden nächstgrößeren Aufnahmen ist ebenfalls auf beiden Seiten eine Faserverschmelzung zu erkennen.



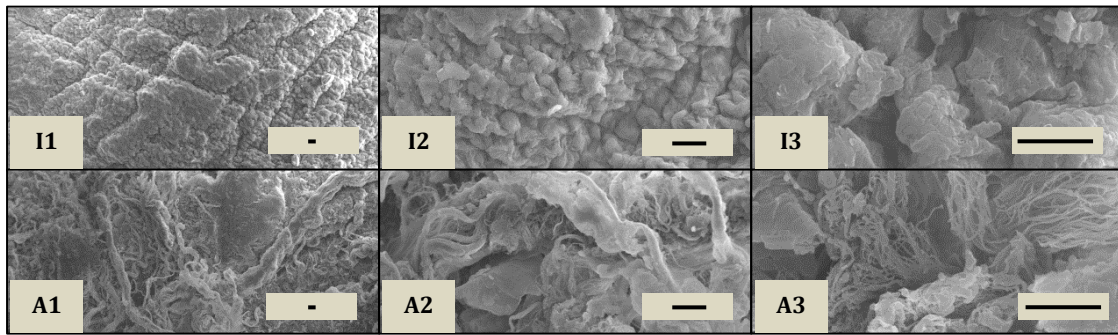
Anhang 4: Mit POV behandelte PK-Proben; I1-3 und A1-3: An der Innenseite sowie an der Außenseite erkennt man in allen Vergrößerungen ein intaktes Oberflächenrelief.



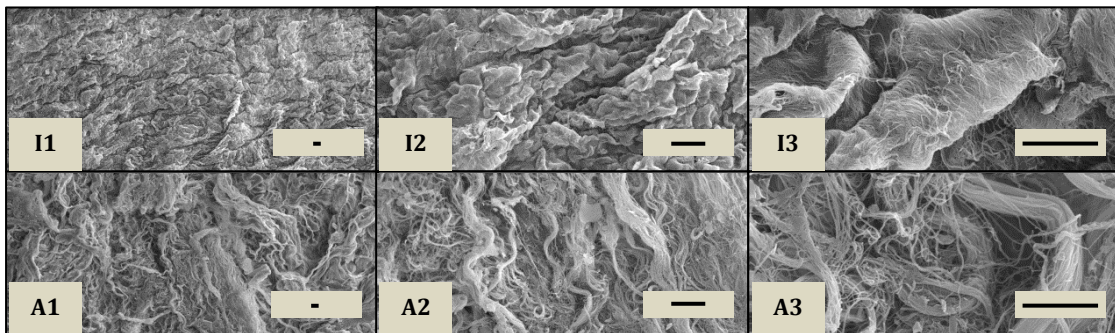
Anhang 5: Mit BAC behandelte PK-Proben; A1-3: Intakte Oberflächenstruktur an der Außenseite. I3: Lediglich an der Innenseite in der 10 k-fachen Vergrößerung vereinzelt Faserverschmelzungen und löchrige Struktur der Fasern.



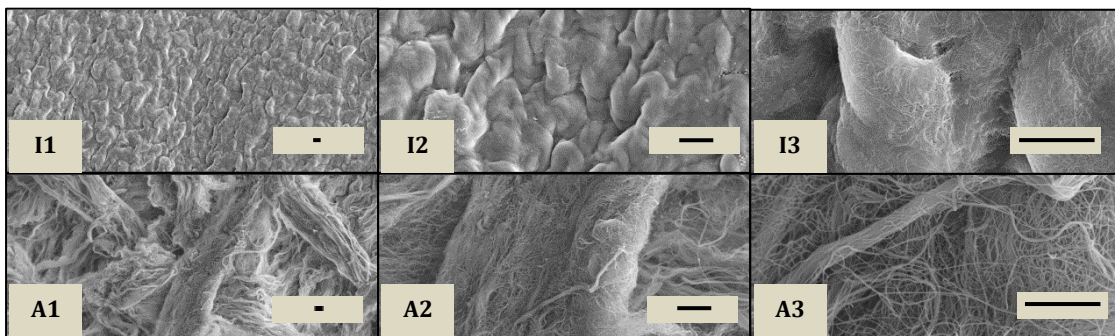
Anhang 6: Mit Octenidin behandelte PK-Proben; I1-3 und A1-3: Intakte Oberflächenstruktur sowohl der Innen- als auch der Außenseite in allen Vergrößerungen.



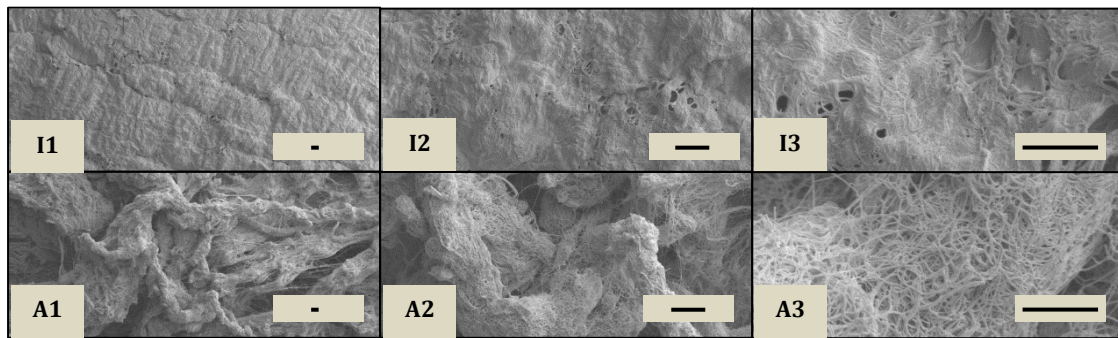
Anhang 7: Mit PAA behandelten PK-Proben; A2-3: Deutliche Faserverschmelzungen, I2-3: auch an der Innenseite sind Faserverschmelzungen sichtbar.



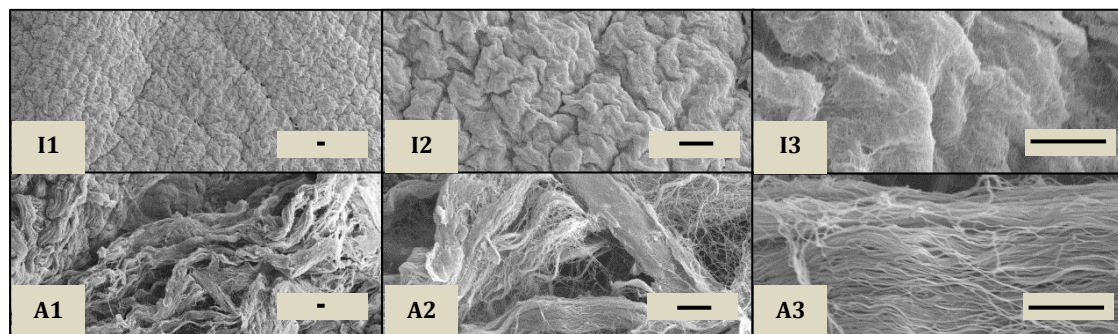
Anhang 8: Mit Anti-Anti behandelten PK-Proben; I1-3 und A1-3: Intakte Oberflächenstruktur sowohl der Innen- als auch der Außenseite in allen Vergrößerungen.



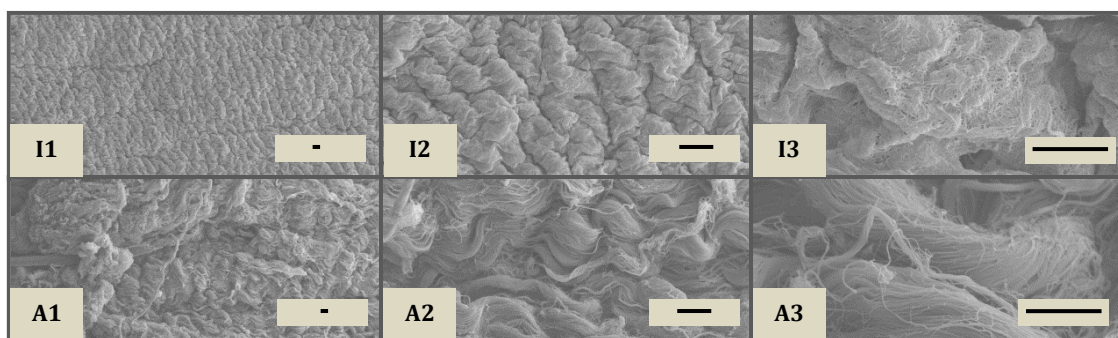
Anhang 9: UV-bestrahlte PK-Proben; I1-3: Deutliche Faserverschmelzungen an der Innenseite der PK-Oberfläche; A1-3: erhaltenes Oberflächenrelief an der Außenseite.



Anhang 10: Gamma-bestrahlte PK-Proben; I1: Faserverschmelzungen der PK-Oberfläche mit abgeflachtem Relief, I1-2: teils löchrige Unterbrechungen, A1-3: Porös wirkende, verdickte Faserstruktur.



Anhang 11: Mit dem KV-3-Protokoll behandelte PK-Proben; I1-3 und A1-3: An der Innenseite sowie an der Außenseite erkennt man in allen Vergrößerungen ein intaktes Oberflächenrelief.



Anhang 12: Mit dem KV-4-Protokoll behandelte PK-Proben; I1-3 und A1-3: An der Innenseite sowie an der Außenseite erkennt man in allen Vergrößerungen ein intaktes Oberflächenrelief.

Zytotoxizitätsmessungen

	Zelllinie 1			Zelllinie 2			Zelllinie 3		
	24h	48h	72 h	24h	48h	72 h	24h	48h	72 h
EtOH 70%	0,263	0,296	0,191	0,064	0,253	0,254	0,174	0,292	0,230
EtOH 7%	0,001	0,002	0	0,000	0	0	0,093	0	0
EtOH 0,7%	0,006	0,000	0,001	0,007	0	0	0,005	0	0
Zell-KO	0,210	0,085	0,131	0,131	0,253	0,222	0,170	0,174	0,177
POV 7,5%	0,134	0,133	0,098	0,160	0,034	0,037	0,145	0,073	0,068
POV 0,75%	0,025	0,020	0,003	0,008	0,006	0	0,019	0,018	0,002
POV 0,075%	0,097	0,003	0,001	0,048	0,014	0	0,075	0,008	0
Zell-KO	0,210	0,085	0,131	0,131	0,253	0,222	0,170	0,174	0,177
BAC 2%	0,303	0,273	0,192	0,249	0,498	0,229	0,286	0,410	0,223
BAC 0,2%	0,816	0,630	0,669	0,547	0,372	0,458	0,663	0,499	0,563
BAC 0,02%	0,023	0,053	0,037	0,035	0,036	0,038	0,030	0,031	0,040
Zell-KO	0,210	0,085	0,131	0,131	0,253	0,222	0,170	0,174	0,177
Octendin 0,1%	0,059	0,096	0,377	0,490	0,315	0,252	0,277	0,202	0,322
Octendin 0,01%	0,102	0,258	0,325	0,333	0,255	0,241	0,230	0,279	0,306
Octenidin 0,001%	0,056	0,169	0,100	0,026	0,074	0,057	0,045	0,119	0,089
Zell-KO	0,2101	0,085	0,131	0,131	0,253	0,222	0,170	0,174	0,177
PAA 0,1%	0,080	0,144	0,178	0,101	0,182	0,292	0,092	0,175	0,238
PAA 0,01%	0,038	0,004	0,011	0,087	0,011	0,011	0,059	0,005	0,008
PAA 0,001%	0,072	0,026	0,009	0,496	0,065	0,010	0,166	0,053	0,009
Zell-KO	0,210	0,085	0,131	0,131	0,252	0,222	0,170	0,174	0,177
Anti 5%	0,279	0,187	0,243	0,153	0,412	0,247	0,211	0,306	0,243
Anti 0,5%	0,329	0,262	0,281	0,150	0,290	0,208	0,234	0,274	0,243
Anti 0,05%	0,266	0,205	0,159	0,252	0,223	0,181	0,252	0,219	0,170
Zell-KO	0,210	0,085	0,131	0,131	0,253	0,222	0,170	0,174	0,177

Anhang 13: Extinktionswerte der Zytotoxizitätsmessung der chemischen Medien EtOH, POV Octenidin und PAA, des biologischen Mediums Anti-Anti sowie der Zell-Kontrollen anhand von 3 Zelllinien.

VORVERÖFFENTLICHUNGEN

Ein Teil der Dissertationsarbeit wurde 2017 sowohl im Rahmen der *DoktaMed* am LMU Klinikum in München als auch auf dem *12th Munich Heart Alliance Meeting* in Bernried auf einer Poster Session vorgestellt. Darüber hinaus wurden Teile der Arbeit im Jahr 2018 im Rahmen der *Cardiovascular Research Days* in Debrecen in Form eines Poster-Vortrages veröffentlicht.

Kienle, E, König, F, Grab, M, Hagl, C, Thierfelder, N. *Sterilization of Bovine Pericardium – A big Challenge for Clinical Application.*
DoktaMed, München, 2017.

Kienle, E, König, F, Grab, M, Hagl, C, Thierfelder, N. *Sterilization of Bovine Pericardium – A big Challenge for Clinical Application.*
12th Munich Heart Alliance Meeting, Bernried, 2017.

Kienle, E, König, F, Grab, M, Hagl, C, Thierfelder, N. *Sterilization of Bovine Pericardium – A big Challenge for Clinical Application.*
Cardiovascular Research Days, Debrecen, 2018.

DANKSAGUNG

Ich möchte mich zuallererst sehr herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Christian Hagl bedanken, der mir die Promotion in der, unter seiner Leitung stehenden, Herzchirurgischen Klinik und Poliklinik der Universität München ermöglicht hat. Es war mir eine Freude, für mehrere Jahre ein Teil der Arbeitsgruppe „Tissue Engineering und kardiovaskuläre Medizintechnik“ gewesen zu sein. Ohne deren tatkräftige Unterstützung wäre ein erfolgreicher Abschluss meiner Promotion nicht möglich gewesen.

Besonders hervorheben möchte ich die exzellente Unterstützung durch meine beiden Betreuer Herrn Dr. med. Nikolaus Thierfelder und Herrn Dipl.-Ing. Fabian König. Beide schafften es von Anfang an, in mir die Begeisterung für mein Promotionsthema zu wecken und ermutigten mich stets zum eigenständigen Handeln und Denken. Herr Dr. med. Nikolaus Thierfelder stand mir jederzeit bei all meinen labor-medizinischen Fragen zur Seite, inspirierte mich und half mir des Öfteren bei den Problemlösungen im Laboralltag. Er unterstützte mich auf meinem wissenschaftlichen Weg auf jede erdenkliche Weise und war für mich jederzeit ein konstruktiver Kritiker und Ratgeber. Herr Dipl.-Ing. Fabian König brachte mir vor allem bei, Probleme aus einem anderen Blickwinkel zu betrachten und schärfte, neben meinem medizinisch-wissenschaftlichen Verständnis, vor allem meine technischen Fertigkeiten. Ohne ihn wären die Zugversuche an der Technischen Universität München niemals möglich gewesen. Beide haben mein wissenschaftliches Denken und meine medizinische Laufbahn maßgeblich geprägt. Sie schafften es, im Labor in der gesamten Zeit meines Laboraufenthaltes eine lockere und doch professionelle Atmosphäre zu schaffen, wodurch die Zeit dort zu einer unvergesslichen Erfahrung wurde.

Zudem möchte ich mich bei Maximilian Grab bedanken, der als Betreuer der Arbeitsgruppe Cardiovascular Tissue Engineering zwar erst gegen Ende meiner Arbeit dazu stieß, jedoch war er schon von Beginn an eine große Bereicherung in unserem Laboralltag und ein großer Motivator bei all meinen Poster-Vorträgen.

Neben meinen Betreuern gilt mein Dank allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeiterinnen unserer Abteilung: Frau Eike Petersen, Frau Barbara Steinl und Frau Bettina Wimmer. Für das Einlernen in die verwendeten

Auswertungsmethoden wie die Vorbereitung der REM-Proben, Herstellung von Paraffinschnitten und die Arbeit und der Umgang mit Zellkulturen gilt vor allem Frau Eike Petersen mein herzlichster Dank. Frau Barbara Steinl stand mir mit ihrer langjährigen Erfahrung im Laboralltag allzeit mit ihrer Hilfe und ihrem Organisationstalent zur Seite. Zudem möchte ich Frau Bettina Wimmer meinen Dank für die positive Mitbegleitung meiner Versuche aussprechen. Ich danke allen drei Mitarbeiterinnen sehr für ihre Unterstützung und vor allem für ihre endlose Geduld.

Den Mitarbeiterinnen des Zentrums für Neuropathologie und Prionforschung der Universität München gilt ebenso großer Dank für ihre Unterstützung bei der histologischen Probenaufarbeitung.

Ein herzliches Dankeschön auch an das „Institute of Medical and Polymer Engineering“ der Technischen Universität München, die mir alle technischen Hilfsmittel für die Durchführung meiner Zugversuche zur Verfügung stellten.

Außerdem möchte ich mich bei dem Helmholtz-Zentrum München bedanken, besonders bei Herrn Florian Wagner, für die Ermöglichung der Gamma-Bestrahlung meiner PK-Proben.

Mein abschließender Dank gilt vor allem meiner Familie. Ohne sie wäre diese Promotionsarbeit niemals zu Stande gekommen. Ein großer Dank gilt meiner Mutter, die im Grunde für meine Promotion im Bereich der Humanmedizin verantwortlich ist. Danke an meinen Vater, der mir die Neugierde auf die Wissenschaft vererbt hat und danke an meine Schwester, die mir schon immer ein Vorbild war.



Eidesstattliche Versicherung

Kienle, Evelyn Christina

Name, Vorname

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

Evaluation von biologischen, chemischen und physikalischen Behandlungsverfahren zum Ziel der Sterilisation von dezellularisiertem, bovinen Perikard

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, 11.08.25

Ort, Datum

Evelyn Christina Kienle

Unterschrift Evelyn Christina Kienle