

Aus der Klinik für Kardiovaskuläre Chirurgie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Evaluation der Biokompatibilität von mit autologen Zellen  
beschichtetem xenogenen Gewebe im Tiermodell

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)  
vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Torsten Christ

aus Lichtenstein

Gutachter: 1.: Prof. Dr. med. P. Dohmen

2.: Prof. Dr.med. T. Volk

3.: Priv.-Doz. Dr. Dr. H. Siniawski

**Datum der Promotion: 03.09.2010**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>5</b>
1.1	Herzklappenprothesen	5
1.2	Degeneration von xenogenen Herzklappenprothesen	9
1.3	Verbesserung biologischer Herzklappenersätze	11
<b>2</b>	<b>Aufgabenstellung</b>	<b>16</b>
<b>3</b>	<b>Materialien und Methoden</b>	<b>17</b>
3.1	Materialien	17
3.1.1	Chemikalien	17
3.1.2	Geräte und Materialien	18
3.1.3	Chirurgische Instrumente	19
3.1.4	Medien, Puffer und Lösungen	20
3.1.5	Versuchstiere	21
3.2	Methoden	22
3.2.1	Allgemeiner Versuchsaufbau	22
3.2.2	Chirurgische Methoden	25
3.2.3	Zellkultur	29
3.2.4	Matrizen	31
3.2.5	Zellfärbungen für die Lichtmikroskopie	32
3.2.6	Immunhistochemische Zellfärbungen	34
3.2.7	Statistische Auswertung	38
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>39</b>
4.1	Entzündungszeichen bei Explantation der Matrizen	39
4.2	Zellfärbungen für die Lichtmikroskopie	42
4.2.1	Giemsa-Färbung	42
4.2.2	Hämatoxylin-Eosin Färbung	42
4.2.3	Von Kossa Färbung	50
4.3	Immunhistochemische Zellfärbungen	52
4.3.1	CD 68 positive Zellen	52

4.3.2	Fibroblasten	55
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>59</b>
5.1	Allgemeines	59
5.2	Dezellularisation	60
5.3	Endothelzellbesiedlung	64
5.4	Pulmonalarteriell und aortales Gewebe	65
5.5	Subkutanes Rattenmodell	67
5.6	Einschränkungen	68
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>69</b>
<b>7</b>	<b>Abstract</b>	<b>72</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>74</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung</b>	<b>82</b>
<b>10</b>	<b>Curriculum vitae</b>	<b>83</b>
<b>11</b>	<b>Publikationsliste</b>	<b>84</b>
<b>12</b>	<b>Erklärung an Eides Statt</b>	<b>85</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Herzklappenprothesen

In Deutschland wurden im Jahre 2007 in 79 Kliniken 21151 kardiochirurgische Eingriffe an Herzklappen durchgeführt [Gummert et al, 08]. Erworbene oder angeborene Herzklappenerkrankungen können zu Stenosen, Insuffizienzen oder Fehlbildungen führen. Die Funktion der Herzklappen wird infolge dieser Erkrankungen derart eingeschränkt, dass zwangsläufig eine Rekonstruktion oder ein Herzklappenersatz notwendig wird.

Bei Herzklappenprothesen unterscheidet man die mechanischen von den biologischen Klappenersätzen. Beide Prothesenarten haben ihre Vorteile und Nachteile. Abhängig vom Patienten, der Herzklappenerkrankung und vom Alter muss die Art der Prothese gewählt werden. 2007 wurden in Deutschland in Aortenklappenposition zu circa 24% mechanische und zu circa 76% biologische Herzklappenersätze implantiert [Gummert et al, 08].

1953 wurde der erste Mensch mit Hilfe einer Herz-Lungen-Maschine im kardioplegischen Herzstillstand operiert [Gibbon GH Jr., 54]. Ab diesem Zeitpunkt war es möglich, am offenen Herzen zu operieren und Herzklappen zu ersetzen. 1961 berichteten Starr und Edwards über die ersten vier erfolgreichen Operationen, bei denen eine Mitralklappe durch eine orthotope mechanische Ball-Klappe ersetzt wurde [Starr A et al, 61]. Damit beginnt die Ära der Herzklappenprothesen.

Nach dem Einsatz von prothetischen Herzklappen kommt es zu Komplikationen, welche sich hauptsächlich in vier Kategorien unterteilen lassen [Schoen et al, 99], erstens Thromboembolie, Thrombose und antikoagulationsbedingte Hämorrhagie, zweitens Prothesenendokarditis (Infektion), drittens strukturelle Fehlfunktionen, wie Fehlfunktionen von Bestandteilen mechanischer Klappen oder Degeneration des Prothesengewebes und viertens nicht-strukturelle Fehlfunktionen, wie Überwachsung durch Gewebe, Entstehung von paravalvulären Öffnungen, Hämolyse oder andere Interaktionen des Patientengewebes mit der implantierten Klappe.

Beeinflusst durch die nach dem Einsatz von künstlichen Herzklappen auftretenden Komplikationen stellt Harken 1962 „ Die 10 Anforderungen an die

befriedigende prothetische Aortenklappe“ auf [Harken DF, 62], welche auch heute noch ihre Gültigkeit haben und in Tabelle 1 wiedergegeben werden.

1. nicht obstruktiv
2. prompter und kompletter Verschluss
3. nicht thrombogen wirkend
4. resistent gegen Infektionen
5. chemisch inert
6. nicht hämolytisch wirkend
7. lange Haltbarkeit
8. einfach und permanent zu implantieren
9. gute Heilung des Gewebes in das die Prothese eingesetzt wurde
10. nicht den Patienten störend

Tabelle 1, Anforderungen an Herzklappenprothesen

Beim Einsatz von mechanischen Herzklappen bemerkt man sehr schnell Probleme mit Embolien durch Thromben, die sich an der Oberfläche der Prothese bilden. Durch dauerhafte Antikoagulation kann dieses Problem minimiert werden, jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Seit 1961 gibt es viele Weiterentwicklungen bei den mechanischen Herzklappenprothesen. 1966 wird eine Ball-Klappe Prothese mit Silikonball entwickelt welche bis heute benutzt wird [He et al, 95]. 1969 wird das erste mal von der „Björk-Shiley tilting disk“ Prothese berichtet [Björk VO, 69], bei der statt einem Ball eine Scheibe verwendet wird. 1977 wird das erste Mal die St. Jude Medical Herzklappenprothese verwendet, welche aus Karbon gefertigt und bis heute eine der haltbarsten Prothesen ist [Emery et al, 79].

Die mechanischen Herzklappen haben als größten Vorteil ihre Haltbarkeit, welche theoretisch einen lebenslangen Einsatz zulassen würde. Ihre Nachteile sind die thromboembolischen Komplikationen, aus deren Grund eine dauerhafte Antikoagulation durchgeführt werden muss. Hinzukommen daraus resultierende hämorrhagische Komplikationen [Cannegieter et al, 94; Edmunds, Jr. et al, 96]. Außerdem sind sie anfälliger gegen Infektionen, welche meist nur durch einen Austausch der Prothese zu beheben sind [Hammermeister et al, 93].

Das Risiko der Thromboembolien bei der Verwendung von mechanischen Herzklappenprothesen führt zur Suche nach Alternativen. Es stellt sich heraus, dass bei der Implantation von biologischen Prothesen dieses Risiko, dem von mechanischen Prothesen unter vollständiger Antikoagulationstherapie entspricht [Grunkemeier et al, 90]. Heute verwendete biologische Herzklappenersätze benötigen aus diesem Grunde keine antikoagulative Therapie [Bloomfield et al, 91; Hammermeister et al, 93; Schoen, 89].

Die Verwendung von biologischen Klappenersätzen erfordert chemische oder physikalische Vorbehandlung mit folgenden Zielen [Schmidt et al, 00]:

1. Präservierung des Gewebes durch Verbesserung der Resistenz gegen enzymatischen oder chemischen Abbau
2. Reduzierung der Immunogenität des Gewebes
3. Sterilisierung des Gewebes

Biologische Prothesen können verschiedener Herkunft sein. Es werden xenogene, beziehungsweise heterologe Klappen, wie Klappen vom Schwein oder Klappen, welche aus dem Perikard verschiedener Spendertiere hergestellt werden, verwendet. Auch Klappen allogener Herkunft, das heißt von menschlichen Spenderherzen, werden eingesetzt. Außerdem besteht die Möglichkeit des homogenen, beziehungsweise autologen Ersatzes.

Die Einpflanzung von allogenen Aortenklappen aus menschlichen Spenderherzen wird 1962 erstmals von Donald Ross in England [Ross DN, 62] und Barratt-Boyes in Neuseeland [Barratt-Boyes et al, 65] durchgeführt. Diese Klappen werden heutzutage durch die Methode der Cryopräservation aufbereitet. Auf diese Weise wird eine relativ lange Haltbarkeit der Klappen erreicht [O'Brien et al, 87]. Nachteilig wirken sich die schlechte Verfügbarkeit der Klappen und mögliche immunologische Reaktionen aus. Zudem ist die Cryopräservation kein validiertes Sterilisationsverfahren.

Beim autogenen Herzklappenersatz wird die Pulmonalklappe des Patienten in die Position der Aortenklappe verpflanzt und die Pulmonalklappe anschließend durch eine biologische Prothese ersetzt. Diese so genannte Ross-Operation wird erstmals 1967 von Donald Ross durchgeführt [Ross, 67]. Dabei ist zu erwarten, dass die Prothese im Lungenstromkreis, bedingt durch den dort

herrschenden niedrigeren Druck, weniger belastet wird. Die verpflanzte Pulmonalklappe ist dem höheren Druck im linksventrikulären Ausflusstrakt des Herzens eher gewachsen als ein biologischer Klappenersatz [Konertz et al, 96]. Des Weiteren liegt der Vorteil dieser Methode in der Viabilität der Pulmonalklappe, welche Wachstum, Regeneration und Anpassung ermöglicht.

Durch die Komplexität des Eingriffes findet diese Methode zwischenzeitlich nur wenig Unterstützung. 1988 werden aber Langzeitstudien veröffentlicht, welche zeigen, dass das Auftreten von Aortenklappenprothesendysfunktionen signifikant niedriger ist als beim homologen Aortenklappenersatz [Matsuki et al, 88]. Daraus ist eine längere Haltbarkeit der Klappen abzuleiten [Elkins et al, 94]. Mit besserer Präservationstechnik und Operationstechnik, das heißt Implantation der Pulmonalklappe in subkoronarer Technik anstelle eines Wurzelersatzes, erfreut sich diese Methode heutzutage wieder größerer Beliebtheit [Dohmen et al, 02a].

Als die geringere Thromboembolierate bei biologischen Prothesen bekannt wird, kommen durch das begrenzte Angebot von allogenen Prothesen auch heterologe Klappenersätze zum Einsatz. Xenogene Herzklappen vom Schwein haben sich hinter den Perikardklappen zu der am häufigsten verwendeten Art von biologischen Herzklappenersätzen entwickelt [Fann et al, 96].

Die Standardmethode für die Herstellung von xenogenen Herzklappen ist die Fixierung mit Glutaraldehyd. Diese Methode wird 1968 eingeführt und führt zu Verbesserungen in der klinischen Langzeitanwendung von xenogenen Prothesen [Carpentier et al, 74]. Glutaraldehyd bewirkt eine irreversible Proteinverknüpfung, eine Gewebstabilisierung und eine Reduzierung der Immunogenität des eingesetzten Ersatzes [Carpentier et al, 69].

Das Hauptproblem von biologischen Klappenersätzen sind strukturelle Fehlfunktionen, die aufgrund von Gewebsdegeneration auftreten und zu einer herabgesetzten Haltbarkeit führen [Bloomfield et al, 91; Schoen, 89]. 50% der biologischen Klappen degenerieren innerhalb von 15 Jahren [Schoen et al, 99]. Die Fehlerrate bei Patienten unter 35 Jahren liegt bei nahezu 100% in 5 Jahren, die bei über 65-jährigen bei 10% in 10 Jahren [Schoen et al, 99]. Daraus resultiert, dass innerhalb von 10 Jahren 50% bis 60% der Patienten erneut operiert werden müssen oder versterben [Bloomfield et al, 91].



Ein weiteres Problem besteht darin, dass biologische Herzklappenersätze genau wie mechanische Prothesen nicht lebensfähige Strukturen sind. Deshalb haben sie nicht die Möglichkeit zu wachsen oder sich anzupassen. Dies ist im Allgemeinen und speziell in der pädiatrischen Patientengruppe ein Problem, was dort wiederholte Operationen nach sich zieht [Mayer, Jr. et al, 97; Mayer, Jr., 95].

## **1.2 Degeneration von xenogenen Herzklappenprothesen**

Bei den degenerativen Veränderungen an xenogenen Herzklappenprothesen, spielen viele Faktoren eine Rolle. Ein Grund ist die Kalzifikation. Diese zeigt sich primär im die Segel umgebendem Gewebe. Im Klappensegel beginnt sie typischerweise als intrinsische Mineralisation. In einem Modell von Fishbein et al. zeigt sich Kalzifikation elektronenmikroskopisch diffus verteilt zunächst an der Oberfläche von Kollagenfibrillen und in den Interfibrillarräumen [Fishbein et al, 82]. In diesem Modell wurde allerdings ohne mechanischen Stress gearbeitet. Später erkennt man, dass die ersten Kalzifikationen assoziiert mit Zellrückständen der interstitiellen Zellen sind [Maxwell et al, 89; Schoen et al, 85]. Besonders Phospholipide, als Rückstände der Zellmembranen, sind oft Orte der Kalzifikation [Cunanan et al, 01]. Erst danach entstehen Ablagerungen an den Kollagenfibrillen [Schoen et al, 85]. Kalzifikation kann außerdem auch als extrinsische Kalzifikation, durch adhärenente Thromben oder Infektionen entstehen [Ferrans et al, 78]. Bei biologischen Prothesen, welche unter mechanischem Stress stehen, kommt es des Weiteren an Stellen erhöhter mechanischer Beanspruchung, wie den Umschlagstellen der Segel und den Punkten der maximalen Segelflexion zu verstärkter Ablagerung von Kalziumphosphaten [Grabenwoger et al, 92].

Es wird angenommen, dass weitere Gründe für die Degeneration, genau wie die Kalzifikation, zu einem großen Teil durch die Veränderungen der Herzklappe bei ihrer Herstellung und den daraus resultierenden Konsequenzen in vivo hervorgerufen werden [Schoen et al, 99]. Durch die Fixierung mit Glutaraldehyd als Standardmethode kommt es zu vielfältigen Veränderungen des Gewebes. Glutaraldehyd wirkt zelltoxisch, es verbleibt teilweise in den fixierten Herzklappen und wird nach der Implantation im Körper freigesetzt.

Damit verschlechtert sich die Rebesiedlung der Prothese mit körpereigenen Zellen in vivo [Eybl et al, 89]. Die Fixierung führt auch zum Verlust der Endothelzellschicht, auf deren Wichtigkeit weiter unten eingegangen wird. Nachweislich wirkt sich das Fehlen von Endothelzellen als physiologische Barriere nachteilig aus [Deutsch et al, 99]. Durch Glutaraldehyd kommt es auch direkt zur Schädigung der Extrazellulärmatrix, einschließlich der Denaturierung von Kollagenfasern [Vyavahare et al, 99; Ferrans et al, 78].

Weiterhin wird die Herzklappe durch die Proteinquervernetzung in einer Stellung fixiert [Talman et al, 95]. Dies kann unter mechanischer Beanspruchung eine Zerstörung des Kollagengerüsts und eine Delaminierung, durch die nicht mehr mögliche Verschiebung der verschiedenen Kollagenschichten untereinander, zur Folge haben [Broom, 80; Sacks et al, 98]. Des Weiteren kommt es durch die Abtötung der interstitiellen Zellen zum Unvermögen der Neubildung oder der Veränderung der extrazellulären Matrix. Somit erhöht sich der mechanische Stress auf die biologische Prothese, was zur Schädigungen der Kollagenfasern und dem Verlust mechanischer Stabilität führen kann [Broom, 78]. Außerdem zeigt sich ein Defizit an Glycosaminoglykanen [Vyavahare et al, 99], dass eine Verringerung der Gewebsplastizität und eine damit verbundene mechanisch vermittelte Klappendegeneration nach sich ziehen kann.

Jeder dieser verschiedenen Prozesse kann einzeln zur Fehlfunktion der Bindegewebsmatrix führen. Sie können aber auch potentiell synergistische Prozesse sein. Durch die Schaffung neuer Interfibrillärräume und Plasma-insudation verursacht die Kollagenzerstörung neue Kalzifikationen. Andererseits verursachen kalzifikationsbedingte Strukturschäden durchaus auch mechanische Funktionsschäden [Schoen et al, 99].

Der Zusammenhang zwischen den immunologischen Prozessen und der Klappendegeneration ist nicht vollständig geklärt. Zellrückstände und Extrazellulärmatrix stehen in Verdacht, immunologische Reaktionen hervorzurufen [Coito et al, 96]. Es wird beschrieben, dass Glutaraldehyd die Prothesen derart verändert, dass diese nicht mehr immunogen sind [O'Brien et al, 84]. Dies wird aber durch Dahm et al. widerlegt. Immunologische Reaktionen treten in abgeschwächerter Form auch bei mit Glutaraldehyd fixierten Herzklappen auf [Dahm

et al, 95]. Dahm et al. finden des Weiteren einen Zusammenhang zwischen mechanischen Oberflächenbeschädigungen und der Immunreaktionen [Dahm et al, 95]. Simon et al. können zeigen, dass Endothelzellen auf allogenen Herzklappenprothesen Moleküle exprimieren, die dann in der Lage sind immunologische Reaktionen zu initiieren [Simon et al, 98]. Wilhelmi et al. weisen eine höhere Expression von verschiedenen Molekülen nach, die eine wichtige Rolle bei immunoinflammatorischen Reaktionen spielen. Das unterstreicht den Einfluss immunologischer Faktoren bei der Degeneration biologischer Herzklappenprothesen [Wilhelmi et al, 02].

### **1.3 Verbesserung biologischer Herzklappenersätze**

Mit Beginn des Implantierens biologischer Herzklappen wurden viele Möglichkeiten erforscht, um ihre Degeneration zu vermindern:

1. Systemische oder lokale Applikation eines Medikaments
2. Modifikation der Biomaterialien:
  - Entfernung einer Komponente des Gewebes
  - Hinzufügen einer Komponente zum Gewebe
  - Chemische Veränderung des Gewebes

Die systemische Applikation mit Biphosphonaten wurde in Tierversuchen mit systemisch applizierten Ethanedihydroxydiphosphonat überprüft. Dabei verhindert man die Kalzifikation der Prothesen, es kommt aber zu Wachstumsretardierung und Unterbrechung der Hypophysenentwicklung [Levy et al, 85].

Die Modifikation der verwendeten Biomaterialien erscheint erfolgversprechender. Da die Fixierung mit Glutaraldehyd nachweisbar ein Hauptfaktor für die Degeneration ist, sucht man zunächst einen Weg, die Toxizität von Glutaraldehyd zu neutralisieren. Ein Beispiel dafür ist der No-React® Detoxifizierungsprozess. Mit dieser Methode ist es möglich die zelltoxische Wirkung von Glutaraldehyd zu minimieren [Abolhoda et al, 96]. Dennoch bleiben die anderen oben aufgeführten Nachteile der Fixierung mit Glutaraldehyd bestehen.

Eine weitere Methode zur Inhibierung der Kalzifikation von mit Glutaraldehyd fixierten biologischen Prothesen ist die Präinkubation mit Aluminiumchlorid [Webb et al, 88]. Bei diesem Versuchsansatz wird angenommen, dass die Metallionen Komplexe mit Phosphat bilden und diese damit die Bildung von Kalziumphosphat verhindern.

Auch Aminoölsäuren können verwendet werden. Sie binden kovalent an das bioprothetische Gewebe und verhindern einen Kalziumaustausch im Gewebe [Chen et al, 94a; Chen et al, 94b].

Wie oben erwähnt sind Phospholipide Gründe für die initiale Kalzifikation von biologischen Herzklappenprothesen. Durch die Behandlung von biologischem Gewebe mit Natriumdodecylphosphat, einem so genannten Surfactant, wird ein großer Teil von Phospholipiden aus dem Gewebe extrahiert [Hirsch et al, 93].

Die Kalzifikation von mit Glutaraldehyd fixierten biologischen Prothesen wurde ebenso durch Präinkubation mit Ethanol verhindert [Vyavahare et al, 97]. Dabei wird eine nahezu komplette Extraktion von Cholesterin und Phospholipiden erreicht. Weiterhin kommt es dabei zu einer Erhöhung der Resistenz gegenüber Kollagenase und zu einer Senkung des Wassergehaltes der behandelten Klappe [Lee et al, 98; Vyavahare et al, 98].

Die mit der Glutaraldehydfixierung verbundenen Nachteile haben außerdem zu einer Suche nach neuen Fixierungsmethoden geführt. Eine Methode ist die farbstoffvermittelte Photooxidation. Hierbei zeigt sich, dass bei gleicher Biostabilität eine erheblich geringere Tendenz zur Kalzifikation als bei der Fixierung mit Glutaraldehyd vorliegt [Moore et al, 98].

Nachweislich beginnt die Mineralisation an den Resten der abgetöteten Bindegewebszellen. Viele Studien beschäftigen sich mit Methoden, diese Zellen und ihre Rückstände aus dem Gewebe zu extrahieren. O'Brien et al. implantieren partiell dezellularisierte Xenografts im Schafsmodell. Dabei zeigt sich eine hämodynamische Funktionalität der Klappen, aber kein Nachweis von Kalzifikation. Doch auch in dieser Studie bedeckten keine Endothelzellen die innere Oberfläche der Klappen [O'Brien et al, 99]. Auch Leyh et al. stellen eine Methode zur effektiven Beseitigung von Endothelzellen und interstitiellen Zellen vor. Dabei kommt es allerdings zur strukturellen Degeneration des Gewebes [Leyh et al, 03].

Eine weitere Dezellularisierungsmethode wird von unserer Gruppe angewendet. Das Verfahren beruht auf einer chemischen Behandlung, welche keinen Einfluss auf die Integrität des Kollagengerüsts nimmt [Dohmen et al, 01b; Dohmen et al, 02a]. Es kann gezeigt werden, dass so dezellularisierte xenogene Pulmonalklappen in vitro bessere hämodynamische Eigenschaften als mit Glutaraldehyd fixierte Klappen haben [Dohmen et al, 02c]. Beim Vergleich so dezellularisierter Heterografts mit cryopräservierten Homografts zeigt sich keine Kalzifikation in den dezellularisierten Klappen und es kann eine Re-Population mit Fibroblasten sowie eine teilweise Re-Endothelialisierung gezeigt werden [da Costa F.D.A. et al, 04].

Eine weitere Möglichkeit zur Verringerung von degenerativen Veränderungen bei der Herstellung von biologischen Herzklappen basiert auf der Anwendung des Prinzips des Tissue Engineering. Darunter versteht man die Rekonstruktion lebensfähigen Gewebes mit Hilfe autologer Zellen.

Dieses Konzept, angewandt auf biologische Herzklappenprothesen, wird erstmals 1995 von Shinoka et al. vorgestellt [Shinoka et al, 95]. Die Gruppe benutzt einen biodegradierbaren Kunststoff, welcher mit Endothelzellen besiedelt wird, als Matrix für die Herzklappe. Tissue Engineering mit Matrizen aus Kunststoffen ist aber mit Problemen im Gewebsaufbau verbunden, welche durch eine schwache zelluläre Anhaftung und schlechte Gewebsregeneration hervorgerufen werden [Stock et al, 00].

Jockenhoevel et al. verwenden Matrizen, welche auf einem Fibringerüst basieren [Jockenhoevel et al, 01]. In diesen Matrizen kann ein gutes Wachstum von Fibroblasten und eine Endothelialisierung nachgewiesen werden. Problematisch erscheint aber eine Schrumpfung des Gewebes, welche im Tiermodell zu einer relevanten Regurgitation führt.

Alternativ können, wie in unserer Gruppe, auch xenogene biologische Herzklappen als Matrize für das Tissue Engineering verwendet werden [Walluscheck et al, 96; Dohmen et al, 01a]. Man versucht dabei die vielfältigen Funktionen der extrazellulären Matrix zu nutzen. Die extrazelluläre Matrix kann das Wachstum und die Proliferation verschiedener Zelltypen beeinflussen [Gospodarowicz et al, 81], unter anderem das von Fibroblasten und Endothelzellen [Madri et al, 83]. Dies geschieht durch die Möglichkeit der

Präsentation von Wachstumsfaktoren durch Matrixkomponenten [Bashkin et al, 89]. Die extrazelluläre Matrix bildet deshalb ein geeignetes Gerüst für Zellanhaftung, Angiogenese, Zellproliferation und Zellmigration [Badylak, 02].

Beim Tissue Engineering möchte man eine komplette Beschichtung der Klappe mit Endothelzellen erreichen, um deren vielfältige Funktionen zu nutzen. Zu den wichtigsten Funktionen der Endothelzellen gehören [Delvos et al, 85]:

- die Ausübung einer Schrankenfunktion für Makromoleküle und Blutkomponenten
- die Bewerkstelligung eines selektiven Transportes von Substanzen aus dem zirkulierenden Blut in das Gewebe und umgekehrt
- die Beteiligung an der Regulation des Gefäßwiderstandes
- die Aufrechterhaltung der Homöostase des Blutgerinnungssystems

Bei einer Verletzung beziehungsweise einer Absenz der Endothelzellschicht kommt es durch die Insudation von Plasma zu einem Verlust der Kollagenkohäsion [Ferrans et al, 78]. Außerdem lagern sich Thrombozyten und Fibrin an der Klappenoberfläche ab. Diese Faktoren werden als ursächlich für die Kalzifikation und die Degeneration von Herzklappen angesehen [Ishihara et al, 81; Liao et al, 93]. Ein weiterer Degenerationsgrund entsteht durch den komplizierten Reparaturmechanismus bei lokaler Schädigung der Endothelzellschicht, worin Endothelzellen und andere Zellen eingreifen [Bell et al, 89; Lindner et al, 90]. Kommt es dabei zu fehlerhafter Steuerung der Reparatur, wird durch proliferierende glatte Muskelzellen, zusammen mit Makrophagen und Endothelzellen, eine arteriosklerotische Plaque gebildet (Benditt, 1988).

Die autologen Zellen, welche für die Besiedlung der Matrizen gebraucht werden, müssen gewonnen, kultiviert und auf die Matrize aufgebracht werden. Die wahrscheinlich einfachste Methode für die Gewinnung von Endothelzellen ist die Entnahme einer Beinvene mit anschließender Isolierung und Kultivierung der Endothelzellen [Bader et al, 98]. Auch weitere Methoden, wie die Entnahme einer Arterie, sind möglich [Dohmen et al, 02a]. Die Kultivierung der Endothelzellen wird beschrieben und es wird gezeigt, dass der Transport und die Cryopräservierung keinen negativen Einfluss auf das Wachstum der Zellen haben [Dohmen et al, 01a].

Die Besiedlung mit Endothelzellen erfordert eine Prothese, welche die Migration beziehungsweise das Wachstum von Zellen zulässt. Die Prothese darf keine zelltoxischen Wirkungen, wie sie nach der Fixierung mit Glutaraldehyd auftreten, aufweisen [Eybl et al, 89]. Dohmen et al. beschichten dezellularisierte xenogene Klappen und erreichen eine komplette Endothelzellbesiedlung [Dohmen et al, 01b]. Die Endothelzellen sind in vivo den Scherkräften im Blutstrom ausgesetzt, wodurch ein starker interzellulärer Zusammenhalt sowie eine starke Verbindung zur Matrix benötigt wird. Im Tiermodell bei Schafen kann nachgewiesen werden, dass mit Endothelzellen beschichtete dezellularisierte Matrizen im pulmonalen Blutkreislauf den dortigen Kräften gewachsen sind [Dohmen et al, 01b].

Ein weiteres Ziel ist es Fibroblasten in der Matrice anzusiedeln, welche die extrazelluläre Matrix erneuern beziehungsweise reparieren können. Dies führt dazu, dass in vivo eine Herzklappe entsteht, die nur aus körpereigenem Gewebe besteht. Die so entstandene Klappe ist wachstumsfähig und sie löst das große Problem im pädiatrischen Patientenkreis, bei dem ein Wachstum der Prothesen erforderlich ist, um häufige Re-Operationen zu vermeiden. Die Migration dieser Zellen kann in vitro oder in vivo erfolgen. Bei in vitro Migration von Fibroblasten zeigt sich, dass aus Venen isolierte Myofibroblasten eine stärkere Proliferation sowie eine vermehrte Bildung von Extrazellulärmatrix aufweisen als aus Arterien isolierte Fibroblasten [Schnell et al, 01]. Dohmen et al. können auch Wachstum von Fibroblasten in dezellularisierten xenogenen Klappengewebe nach in vivo Migration nachweisen. Dabei wurden die Fibroblasten elektronenmikroskopisch durch ihre typische Morphologie mit gut entwickeltem rauem endoplasmatischen Retikulum, welches typisch für die Kollagenproduktion ist, identifiziert [Dohmen et al, 03].

## 2 Aufgabenstellung

In der vorliegenden Arbeit soll die Biokompatibilität von dezellularisierten, mit Endothelzellen beschichteten xenogenen Matrizen im subkutanen Rattenmodell evaluiert werden.

Folgende Fragestellungen werden dazu bearbeitet:

- Kann eine zelluläre Infiltration von dezellularisierten Matrizen stattfinden?
- Wie unterscheidet sich das Ausmaß der Entzündungsreaktion von dezellularisierten und unbehandelten Matrizen?
- Wie beeinflusst die Verwendung von aortalen und pulmonalarteriellen xenogenen Matrizen das Ausmaß der Entzündungsreaktion?
- Wie beeinflussen Endothelzellen das Ausmaß der Entzündungsreaktion von dezellularisierten und unbehandelten Matrizen?
- Gibt es präferierte Lokalisationen für Entzündungsprozesse?
- Wie unterscheidet sich das Ausmaß der Infiltration mit Fibroblasten von dezellularisierten und unbehandelten Matrizen?
- Wie beeinflusst die Verwendung von aortalen und pulmonalarteriellen xenogenen Matrizen das Ausmaß der Infiltration mit Fibroblasten?
- Wie unterscheidet sich das Ausmaß der Kalzifikation von dezellularisierten und unbehandelten xenogenen Matrizen?
- Wie beeinflusst die Verwendung von aortalen und pulmonalarteriellen xenogenen Matrizen das Ausmaß der Kalzifikation?
- Kann durch in vitro Endothelialisierung eine stabile Endothelzellschicht um xenogene Matrizen etabliert werden?
- Inwieweit ist das verwendete Tiermodell geeignet zur in vitro Endothelzellbesiedlung?



### 3 Materialien und Methoden

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Chemikalien

<b>Chemikalie</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Accutase	PAA Laboratories
Amphotericin B	Grünenthal
Aquatex	Merck
Eosin	Chromat
Ethanol	Dr. Hollborn & Söhne
FCS Gold (fetales Kälberserum)	PAA Laboratories
FGF (Fibroblasten Wachstumsfaktor)	Seromed
Fibronectin	Roche
Formalin	Merck
Giemsa Lösung	Merck
Hämalaun	Sigma
Kernechtrot-Aluminium-Sulfat	Chromat
Kollagenase Typ CLS II	Biochrom AG
L-Glutamin	Sigma
Medium 199	Sigma
Natriumchlorid	Merck
Natriumthiosulfat	Dr. Hollborn & Söhne
Parafin	Merck
PBS-Lösung	PAA Laboratories
Penicillin	Grünenthal
Phloxin 1%	Merck
Pyrogallussäure	Dr. Hollborn & Söhne
Silbernitrat	Dr. Hollborn & Söhne
Streptomycin	Grünenthal
Tris-Base	Merck

Tris-HCl	Merck
Vitroclud	R. Langenbrück
Xylol	Merck

Tabelle 2, verwendete Chemikalien

### 3.1.2 Geräte und Materialien

Gerät/ Material	Bezugsquelle
6 Well	Falcon
24 Well	Falcon
96 Well	Falcon
12.5 cm <sup>2</sup> Kulturflasche	Falcon
25 cm <sup>2</sup> Kulturflasche	Falcon
75 cm <sup>2</sup> Kulturflasche	Falcon
3-Wegehahn	PVB Medizintechnik
Automatische Pipetierhilfe Pippetus	Hirschmann Laborgeräte
Brutschrank/ CO2-Incubator	Sanyo
Entwässerungsautomat	Sanyo
Rotationsmikrotom RM 2125 RT	Leica
Microtomklingen A35	Feather
Objektträger Superfrost plus	R. Langenbrinck
Objektträger selianisiert	R. Langenbrinck
Eppendorfgefäße 1 ml	Sarstaedt
Flexüle 24g	BD Neoflon
Konisches Röhrchen Blue Max. 50ml	Falcon
Konisches Röhrchen Blue Max. 15ml	Falcon
Laborkühlschrank	Liebherr
Latex OP-Handschuhe	Ausell
Minisart Einmalfilter 45 Mikrometer	Sartorius
Rasierer	Wilkinson
Schüttler MTS 4	IKA

Sicherheitswerkbank BSK6 MP	Anthos Mikrosysteme
Zellzählgerät Casy	Schärfe System
Zentrifuge Biofuge 28RS	Haraeus Sepatech
Omnikon 40	Sterican
Ethicon Vicryl 5-0	Johnson & Johnson
Eticon Monocryl 4-0	Johnson & Johnson
Mullkompressen RK	Lohmann Rauscher
Betaisodona	Braun
Sterile Lochtücher	3M
Sterile Tücher	3M

Tabelle 3, verwendete Geräte und Chemikalien

### 3.1.3 Chirurgische Instrumente

Alle verwendeten chirurgischen Instrumente stammen von der Firma Aesculap.

Folgende Instrumente werden eingesetzt:

- Anatomische Pinzette 130mm
- Anatomische Pinzette mittelbreit 115mm
- Anlegepinzette nach Biemer, ohne Schloss, 145mm
- Chirurgische Schere, gerade Spitz/stumpf 115mm
- Einweg Sterilskalpell
- Gefäßclip nach Biemer, 6mm
- Mikrofederschere, Rundgriff, gerade, 145mm
- Nadelhalter Durogrip nach Ryder, 135mm
- Nadelhalter nach Castroviejo, 145mm
- Nadelhalter nach Jacobson, ohne Sperre, 185mm
- Präparierschere nach Littler 115mm
- Präparierschere nach Toennis 175mm

Die chirurgischen Instrumente werden nach jeder Operation gereinigt und im WEBECO Autoclaven sterilisiert.

### 3.1.4 Medien, Puffer und Lösungen

- Endothelzellnährmedium

Das für die Zellkultivierung benutzte Nährmedium wird in Anlehnung an Dohmen hergestellt [Dohmen et al, 02a]. Es wird aus sterilem Medium 199 der Firma Sigma, anstelle des bei Dohmen aufgeführten Dulbecco's Modified Eagle's Medium, hergestellt. Zu diesem wird 20% frisches Kälberserum, 200 mmol L-Glutamin, 5 ng/ l basic Fibroblasten Wachstumsfaktor, 100 U/ ml Penicillin, sowie 100 µg/ ml Streptomycin zugesetzt.

- Antibiotische phosphatgepufferte Salzlösung

PBS-Lösung (phosphatgepufferte Salzlösung) wird mit 100 U/ ml Penicillin und 100 µg/ ml Streptomycin versetzt.

- Isotone Kochsalzlösung

Isotone Kochsalzlösung wird aus destilliertem Wasser und Natriumchlorid hergestellt und steril filtriert mit einem 0,2 µm Filter.

- Eosin Ansatz für Hämatoxylin/Eosin-Färbungen

Dafür wird Eosin 3%ig in destilliertem Wasser gelöst. 75 ml dieser Lösung werden dann mit 150 ml 100%igen Ethanol und 1,5 ml 1%igen Phloxin gemischt.

- Tris-gepufferte Salzlösung (TBS, Tris Buffered Saline)

Für die Herstellung dieses Puffers werden 9,0 g Tris-Base (Aminomethan), 68,5 g Tris-HCl, 87,8 g Natriumchlorid mit destilliertem Wasser zu 10 L Lösung vermischt.

### **3.1.5 Versuchstiere**

Für den Versuch werden Ratten vom Stamm Lewis verwendet. Die Versuchstiere werden von Charles River Deutschland erworben. Lewis Ratten sind Inzuchtratten mit nahezu vollständiger genetischer Identität. Sie werden 1950 aus einer Zucht von Wistarratten entwickelt.

Die Ratten werden im Tierstall der Charité- Universitätsmedizin Berlin untergebracht und versorgt. Die Rattenhaltung wird nach den Richtlinien für die Versorgung und Pflege von Versuchstieren vorgenommen.

Die Studie ist von der Ethikkommission der Charité- Universitätsmedizin Berlin genehmigt (Versuchsgenehmigungsnummer G0184/01, genehmigt am 05.11.2001).

Diverse Gründe sprechen für die Auswahl der Ratten für diesen Versuch. Die Versuchstiere zeichnet eine relative genetische Gleichheit aus, was die Auswertung vereinfacht. Auch die niedrigen Kosten für die Tiere, die Haltung und die Anästhesie sind zu berücksichtigen [Rashid et al, 04]. Des Weiteren zeigt sich eine verstärkte beziehungsweise beschleunigte Kalzifikation im Rattenmodell [Mako et al, 97]. Als Nachteil ist die durch die Größe der Tiere erschwerte Operation anzusehen.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Allgemeiner Versuchsaufbau

Anfangs werden Endothelzellen der Versuchstiere isoliert und kultiviert. Dann erfolgt die Besiedelung der aus Stücken der Aorta beziehungsweise des Truncus pulmonalis eines Schweins hergestellten Matrizen mit den gewonnenen Zellen. Schließlich werden diese besiedelten Matrizen der Ratte wieder eingepflanzt. (siehe Abbildung 1)

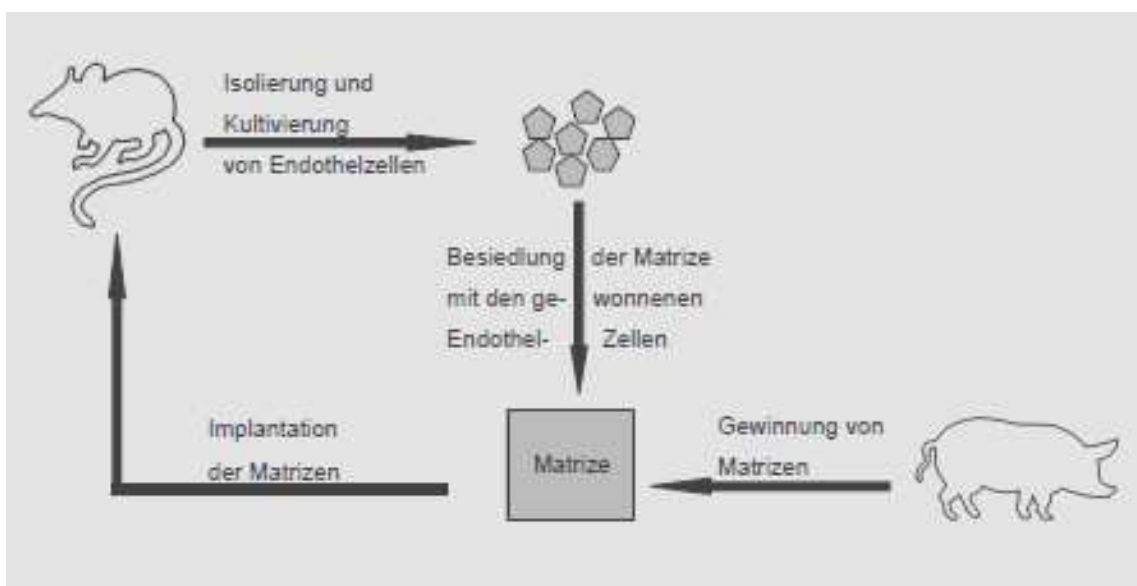


Abbildung 1, Allgemeiner Versuchsaufbau

Wie aus Tabelle 4 und Abbildung 2 auf der folgenden Seite hervorgeht umfasst die Versuchsreihe pro Ratte 8 Matrizen. Die dezellularisierten Matrizen wurden von der Firma AutoTissue GmbH bereitgestellt.

<b>MATRIZEN AUS DER AORTA</b>	<b>MATRIZEN AUS DEM TRUNCUS PULMONALIS</b>
Dezellularisiert, Endothelialisiert (1)	Dezellularisiert, Endothelialisiert (5)
Dezellularisiert, Nicht-endothelialisiert (2)	Dezellularisiert, Nicht-endothelialisiert (6)
Nicht-dezellularisiert, Endothelialisiert (3)	Nicht-dezellularisiert, Endothelialisiert (7)
Nicht-dezellularisiert, Nicht-endothelialisiert (4)	Nicht-dezellularisiert, Nicht-endothelialisiert (8)

Tabelle 4, implantierte Matrizen

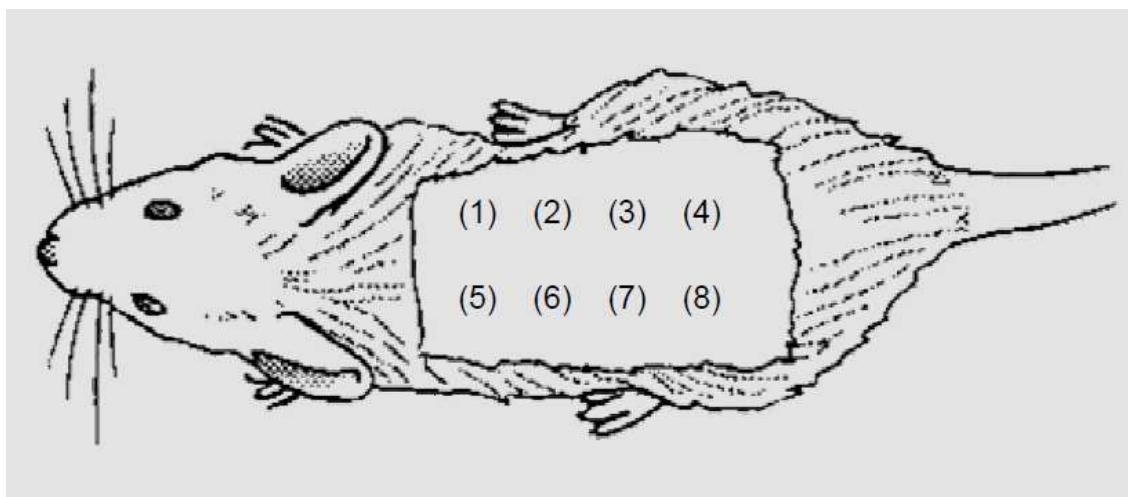


Abbildung 2, Anordnung der implantierten Matrizen in der Ratte

Tabelle 5 auf der folgenden Seite gibt die unterschiedliche Verweildauer der Matrizen bis zur Explantation in den 3 Versuchstiergruppen, welche jeweils 10 Versuchstiere beinhalten, wieder.

<b>GRUPPE</b>	<b>IMPLANTATIONSDAUER</b>
I (n=10)	2 Wochen
II (n=10)	4 Wochen
III (n=10)	6 Wochen

Tabelle 5, Gruppeneinteilung

### **3.2.1.1 Subkutanes Rattenmodell**

Dieses Versuchsmodell ist gewöhnlich der erste Schritt, um die Effektivität einer neuen Gewebspräparationsmethode zu überprüfen [Bernacca et al, 92]. Vorteilhaft sind die niedrigen anfallenden Kosten und die beschleunigte Kalzifikation [Mako et al, 99]. Dadurch benötigen die Experimente nur einen Implantationszeitraum von bis zu 42 Tagen [Levy et al, 86].

Beim Vergleich der Kalzifikation von Aortenwandgewebe zeigt sich im subkutanen Rattenmodell eine deutlichere Verkalkung als im Schafsmodell, unabhängig von Blutkontakt oder arteriellem Druck [Meuris et al, 03].

Es zeigt sich, dass verschieden starke Kalzifikationsgrade je nach dem Ort der Implantation der Matrizen entstehen, so mineralisieren dorsale Implantate schneller als ventrale Implantate [Mako et al, 99]. Deshalb werden bei diesem Versuch alle subkutanen Taschen auf dem Rücken der Versuchstiere angelegt. Die präparierten Matrizen werden in subkutan angelegte Taschen implantiert und für verschiedene Zeiträume (Tabelle 5) darin belassen, da sich eine Zunahme der Kalzifikation über die Zeit zeigt [Meuris et al, 03].

Die subkutanen Taschen sind einfach anzulegen und leicht zugänglich. Dadurch können bei diesem Modell unter relativ kleinem Aufwand viele Versuchsobjekte untersucht werden.

Nachteilig wirkt sich natürlich, die durch die Größe der Tiere, relativ schwierige Operation. Des Weiteren beeinflussen die nicht vorhandenen Auswirkungen des Blutkontaktes und des arteriellen Druckes die ablaufenden Prozesse in den implantierten Matrizen [Ozaki et al, 03].



### **3.2.2 Chirurgische Methoden**

Alle chirurgischen Eingriffe werden im Kleintierlabor der Charité-Universitätsmedizin Berlin unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

#### **3.2.2.1 Anästhesie der Versuchstiere**

Die Versuchstiere werden mit Thiopental narkotisiert. Dazu wird den Versuchstieren 1 mg Thiopental pro Gramm Körpergewicht intraperitoneal appliziert.

#### **3.2.2.2 Entnahme der Vena jugularis der Versuchstiere**

Um die benötigten Endothelzellen für den Versuch zu gewinnen, wird den Versuchstieren die Vena jugularis entnommen. Dazu werden die Ratten wie erläutert narkotisiert. Dann wird der Hals der Tiere rasiert und mit Braunol® und Mullkompressen desinfiziert. Ein drei Zentimeter langer Hautschnitt wird dann mit einem sterilen Einmalskalpell vom Sternum in Richtung des Mastoids gesetzt. Von diesem Schnitt aus wird in die Tiefe präpariert und die Vena jugularis dargestellt (Abbildung 3).



Abbildung 3, präparierte Vena jugularis externa

Alle Seitenäste werden freipräpariert und mit Ethibond® 4-0 abgebunden und durchtrennt. In der Folge wird die Vene mit einer Venenverweilkanüle Braun Vasofix® 24g kanüliert (Abbildung 4).

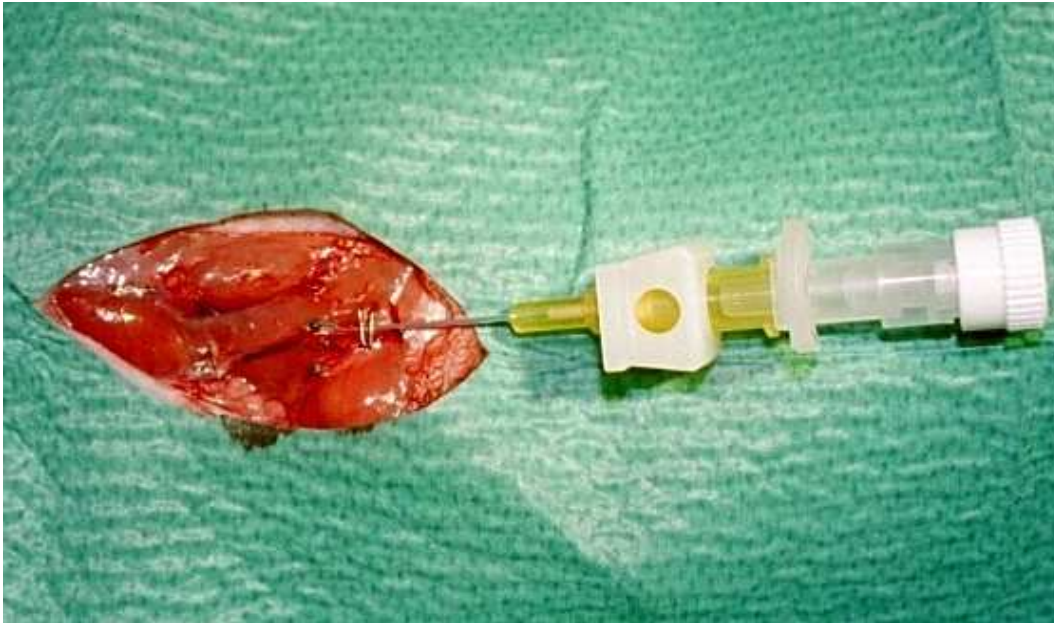


Abbildung 4, kanülierte Vena jugularis

Die Flexüle wird mit einem SLS-Clip® an der Vene fixiert. Nach dem Abbinden des cranialen sowie des proximalen Endes der Vene wird sie entnommen. Die Wunde wird dann subkutan mit Ethicon® Vicryl 5-0 Faden und kutan mit Ethicon® Monocryl 4-0 Faden verschlossen. Die Versuchstiere werden bis zum Ende der Narkose überwacht und dann wieder im Tierstall der Charité-Universitätsmedizin Berlin untergebracht.

Der entnommene Teil der Vena jugularis (Abbildung 5) wird dann zur Isolierung und Kultivierung von Endothelzellen (siehe 3.2.3.2) ins Labor für Tissue Engineering der Klinik für kardiovaskuläre Chirurgie der Charité-Universitätsmedizin Berlin überführt.



Abbildung 5, entnommene Vena jugularis

### 3.2.2.3 Implantation der Matrizen

Die Versuchstiere werden wie aufgeführt narkotisiert, ihr Rücken rasiert und mit Braunol® und sterilen Mullkompressen desinfiziert. Dann werden unter sterilen Bedingungen mit einem Einmalskalpell acht, jeweils ein cm lange Schnitte, davon vier einen cm rechts der Wirbelsäule und vier einen cm links der Wirbelsäule gesetzt. Zwischen den Schnitten werden jeweils fünf mm Abstand gelassen. Durch die Schnitte werden dann mittels einer Präparierschere isolierte subkutane Taschen auf dem Rücken der Tiere angelegt.

In den angelegten subkutanen Taschen werden den Versuchstieren dann die acht verschiedenen Matrizen implantiert. Die Matrizen werden nur an den für diesen Zweck vorgesehenen Ecken mit der Pinzette gehalten, um die Endothelzellschicht nicht zu beschädigen. Diese Ecken werden bei der Implantation abgeschnitten.

Nach Implantation aller Matrizen werden die Hautschnitte mit Monocryl® 5-0 Faden verschlossen. Die Ratten werden bis zum Ende der Narkose überwacht und dann wieder im Tierstall der Charité- Universitätsmedizin Berlin untergebracht.

### 3.2.2.4 Explantation der Matrizen

Die Versuchstiere werden wie aufgeführt narkotisiert. Ihr Rücken wird rasiert und mit Braunol und sterilen Mullkompressen desinfiziert.

Für diese Operation wird mit einem Einmalskalpell ein 8 cm langer, medianer Hautschnitt auf dem Rücken der Tiere gesetzt. Von dem Hautschnitt aus werden die implantierten Matrizen mit Präparierscheren frei präpariert und entnommen (Abbildung 6). Die Matrizen werden mit umliegendem Gewebe der Versuchstiere entnommen, um eine Beschädigung der Matrizen bei der Explantation zu verhindern.

Dabei wird auf Zeichen der Entzündung im Gewebe um die implantierte Matrize geachtet. Dazu gehören die Ansammlung von Wundsekret, verstärkte Durchblutung sowie die Bildung einer Kapsel. Dabei wird eine grobe 3er-Skala verwendet: 0 (keine Entzündungszeichen), 1 (wenige Entzündungszeichen), 2 (mäßige Entzündungszeichen), 3 (starke Entzündungszeichen).

Für die weiteren Untersuchungen werden die Matrizen in isotoner Kochsalzlösung gespült und daraufhin in Formalin fixiert.

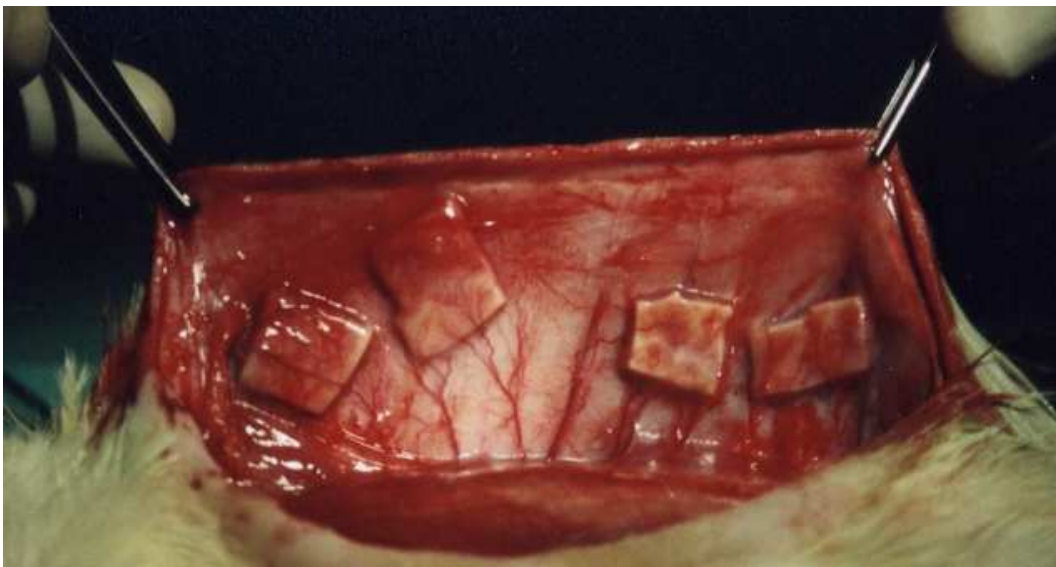


Abbildung 6, Explantation der Matrizen

### **3.2.3 Zellkultur**

#### **3.2.3.1 Kulturbedingungen**

Alle Zellkulturen werden im Brutschrank bei 37 Grad Celsius, 5% Kohlenstoffdioxid Konzentration und einer durch Verdunstung erzeugten 98%igen Luftfeuchtigkeit kultiviert. Dabei wird das Zellwachstum täglich mikroskopisch kontrolliert und jeden zweiten Tag das Endothelzellnährmedium gewechselt.

#### **3.2.3.2 Isolierung der Endothelzellen**

Zur Isolierung der Endothelzellen wird eine modifizierte Methode in Anlehnung an Dohmen et al. verwendet [Dohmen et al, 01a].

Das entnommene Venenstück wird durch die angebrachte Flexüle mit isotoner Kochsalzlösung gespült und dadurch von Blutrückständen befreit. Anschließend wird die offene Seite des Gefäßes mit einer Klemme verschlossen. Dann wird das Gefäß mit 1,5%iger Kollagenaselösung gefüllt und im Brutschrank für 25 Minuten inkubiert.

Die Wahl der Kollagenase, ihrer Konzentration und der Inkubationszeit sind laborspezifische Erfahrungswerte, um eine maximale Ausbeute an Endothelzellen zu erreichen.

Nach 25 Minuten wird der Inhalt der Vene und 5 ml Endothelzellnährmedium, mit welcher die Vene durchgespült wird, in ein 10ml Reagenzglas überführt. Die erhaltene Zellsuspension wird bei 500g für 8 Minuten zentrifugiert.

Nach dem Zentrifugieren wird der Überstand im Reagenzglas abgesaugt und verworfen.

Das gewonnene Zellpellet wird weiter zur Zellkultivierung verwendet.

#### **3.2.3.3 Kultivierung der Endothelzellen**

Die Kultivierung der Endothelzellen erfolgt ebenso in Anlehnung an Dohmen et al. [Dohmen et al, 01a].

Das bei der Isolierung der Endothelzellen gewonnene Zellpellet wird in 200 µl Endothelzellnährmedium resuspendiert und auf ein 96-Well aufgebracht.

Danach wird die Zellkultur 2 Tage, bis zum ersten Wechsel des Endothelzellnährmediums, in einer Ruhephase belassen. Daraufhin wird das Medium bis zum Erreichen der vollständigen Konfluenz der Endothelzellen auf dem Well alle 2 Tage gewechselt. Das Wachstum der Zellkultur wird dabei täglich mikroskopisch kontrolliert.

Dann wird die Endothelzellkultur auf ein 24-Well passagiert. Dazu wird das Endothelzellnährmedium abgesaugt und verworfen. Danach wird das 96-Well mit antibiotischer PBS Lösung gespült, 100 µl Accutase hinzu gegeben und 15 Minuten im Brutschrank bei Kulturbedingungen bis zur vollkommenen Ablösung und Vereinzelung der Zellen, für circa 5 bis 10 Minuten inkubiert. Die erhaltene Zellsuspension wird in ein 1ml Eppendorfgefäß überführt und bei 500g und 20 Grad Celsius für 8 Minuten zentrifugiert. Der Überstand über dem entstandenem Zellpellet wird abgesaugt. Das erhaltene Zellpellet wird jetzt in 500 µl Endothelzellnährmedium resuspendiert und auf ein 24-Well aufgebracht.

Die Zellen werden weiter kultiviert bis zum Erreichen der vollständigen Konfluenz der Endothelzellen auf dem 24-Well und auf ein 6-Well passagiert. Dazu wird das Endothelzellnährmedium abgesaugt und verworfen. Dann wird das 24-Well mit antibiotischer PBS Lösung gespült, 500 µl Accutase hinzu gegeben und 15 Minuten im Brutschrank bei Kulturbedingungen bis zur vollkommenen Ablösung und Vereinzelung der Zellen inkubiert. Die erhaltene Zellsuspension wird danach in ein 1ml Eppendorfgefäß überführt und bei 500g und 20 Grad Celsius, 8 Minuten zentrifugiert. Der Überstand über dem entstandenem Zellpellet wird abgesaugt. Das erhaltene Zellpellet wird jetzt in 1 ml Endothelzellnährmedium resuspendiert und auf ein 6-Well aufgebracht.

Die Zellen werden bis zum Erreichen der vollständigen Konfluenz der Endothelzellen auf dem 6-Well weiter kultiviert und dann in eine 25 cm<sup>2</sup> passagiert. Dazu wird das Endothelzellnährmedium abgesaugt und verworfen. Dann wird das 6-Well mit antibiotischer PBS Lösung gespült, 1ml Accutase hinzu gegeben und 15 Minuten im Brutschrank bei Kulturbedingungen bis zur vollkommenen Ablösung und Vereinzelung der Zellen inkubiert. Die erhaltene Zellsuspension wird danach in ein 15ml Reagenzglas überführt und bei 500g und 20 Grad Celsius, 8 Minuten zentrifugiert. Der Überstand über dem entstandenem Zellpellet wird abgesaugt. Das erhaltene Zellpellet wird jetzt in 5 ml

Endothelzellnährmedium resuspendiert und in eine 25 cm<sup>2</sup> Kulturflasche passagiert.

Die Zellen werden bis zum Erreichen der vollständigen Konfluenz der Endothelzellen in der 25 cm<sup>2</sup> Kulturflasche weiter kultiviert und dann in eine 75 cm<sup>2</sup> Kulturtasche passagiert. Dazu wird das Endothelzellnährmedium abgesaugt und verworfen. Dann wird die 25 cm<sup>2</sup> Kulturtasche mit antibiotischer PBS Lösung gespült, 4ml Accutase hinzu gegeben und 15 Minuten im Brutschrank bei Kulturbedingungen bis zur vollkommenen Ablösung und Vereinzelung der Zellen inkubiert. Die erhaltene Zellsuspension wird danach in ein 15ml Reagenzglas überführt und bei 500g und 20 Grad Celsius, 8 Minuten zentrifugiert. Der Überstand über dem entstandenem Zellpellet wird abgesaugt. Das erhaltene Zellpellet wird jetzt in 12ml Endothelzellnährmedium resuspendiert und in eine 75 cm<sup>2</sup> Kulturflasche passagiert.

Bis zum Erreichen der vollständigen Konfluenz der Endothelzellen werden die Zellen unter Kulturbedingungen weiter kultiviert. Dann wird das Endothelzellnährmedium abgesaugt und verworfen. Dann wird die 75 cm<sup>2</sup> Kulturtasche mit antibiotischer PBS Lösung gespült, 8ml Accutase hinzu gegeben und 15 Minuten im Brutschrank bei Kulturbedingungen bis zur vollkommenen Ablösung und Vereinzelung der Zellen inkubiert. Die erhaltene Zellsuspension wird danach in ein 15ml Reagenzglas überführt und bei 500g und 20 Grad Celsius, 8 Minuten zentrifugiert. Der Überstand über dem entstandenem Zellpellet wird abgesaugt. Das erhaltene Zellpellet wird jetzt in 10ml Endothelzellnährmedium resuspendiert und für die Endothelialisierung der Matrizen verwendet.

### **3.2.4 Matrizen**

#### **3.2.4.1 Gewinnung der Matrizen**

Die Matrizen werden aus Stücken von Aorta und Truncus pulmonalis hergestellt. Diese stammen von Herzen von Schweinen, welche von einem Schlachthof erworben werden. Die Gefäße werden von umliegendem Gewebe getrennt und in ein Quadratzentimeter große Stücke zurechtgeschnitten. Die hergestellten Matrizen werden in PBS-Lösung mit 100 U/ ml Penicillin und 100 µg/ ml Streptomycin gekühlt bei 4° Celsius aufbewahrt. Ein Teil dieser

Matrizen wird zur Dezellularisierung an die Firma AutoTissue GmbH weitergeleitet. Der Rest wird bis zur Implantation beziehungsweise zur Endothelialisierung weiterhin in antibiotischer PBS Lösung, welcher zusätzlich 30 µg/ ml Amphotericin zugesetzt wird, gelagert.

#### **3.2.4.2 Dezellularisierung der Matrizen**

Matrizen werden von der Firma AutoTissue GmbH dezellularisiert und für den Versuch zur Verfügung gestellt. Dabei wird ein Verfahren verwendet, das auf der Anwendung einer Gallsäurelösung und der Nachbehandlung mit Ethanol beruht [Erdbruegger et al, 06].

#### **3.2.4.3 Endothelialisierung der Matrizen**

Die zu beschichtenden Matrizen werden 3 Stunden in 6-Wells in Fibronectin inkubiert, um die Bindungskapazität der Matrizen für Endothelzellen zu erhöhen [Dohmen et al, 01a]. Dabei werden die Matrizen auf einem IKA-Schüttler MTS 4 bei 200 Umdrehungen je Minute, gestellt. Danach werden die Stücke wiederum in 6-Wells gelegt und mit der Zellsuspension bedeckt. Die Matrizen werden dann für 30 Minuten im Brutschrank unter Kulturbedingungen inkubiert. Nach 30 Minuten werden die Matrizen gedreht und der 6-Well wiederum für 30 Minuten auf den IKA-Schüttler MTS 4 inkubiert.

Im Anschluss daran werden die Matrizen für eine Woche im Brutschrank unter Kulturbedingungen inkubiert. Dabei wird das Zellwachstum täglich mikroskopisch kontrolliert und jeden zweiten Tag das Endothelzellnährmedium gewechselt, bevor die Matrizen den Versuchstieren implantiert werden.

### **3.2.5 Zellfärbungen für die Lichtmikroskopie**

#### **3.2.5.1 Vorbereitung der Präparate**

Die Zellfärbungen mit Hämatoxylin-Eosin, nach von Kossa sowie die immunhistochemischen Nachweise werden auf in Parafin fixierten Präparaten durchgeführt.

Die aus den Versuchstieren entnommenen Matrizen werden in 5mm dicke



Streifen geschnitten und in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Danach werden die Präparate in Parafin eingebettet. Von den entstandenen Parafinblöcken werden dann mit dem Mikrotom 2 µm dicke Schnitte hergestellt. Die Schnitte für die Hämatoxylin-Eosin Färbung werden auf normalen Objektträgern aufgebracht, die Schnitte für die immunhistochemischen Nachweise dagegen auf selianisierten Objektträgern. Abschließend werden die Schnitte getrocknet. Dabei werden die Hämatoxylin-Eosin und von Kossa zu färbenden Schnitte bei 70°C, die immunhistochemisch zu färbenden bei 54°C getrocknet.

### **3.2.5.2 Giemsa Färbung**

Die Giemsa Färbung wird zur Überprüfung der Endothelialisierung der Matrizen durchgeführt. Dazu wird für fünf Ratten die doppelte Anzahl an Matrizen besiedelt. Die überschüssigen Matrizen werden nach Ablauf der einwöchigen Inkubation nicht zur Implantation, sondern für die Färbung nach Giemsa verwendet.

Dazu werden die Präparate 5 Minuten in Giemsa Lösung getaucht. Dann werden die Präparate in isotoner Natriumchloridlösung gespült. Abschließend werden sie auf einen Objektträger aufgebracht und fixiert. Die Präparate werden dann bei starker Helligkeit mikroskopiert und Fotos werden angefertigt.

### **3.2.5.3 Zellfärbung mit Hämatoxylin-Eosin**

Für die Zellfärbung mit Hämatoxylin und Eosin werden die angefertigten Präparate gewässert. Dazu wird der Objektträger drei mal 5 Minuten in Xylol getaucht, dann dreimal 2 Minuten in 96%igen Alkohol, dann zweimal 2 Minuten in 80%igen Alkohol, dann zweimal 2 Minuten in 70%igen Alkohol und abschließend zweimal 2 Minuten in destilliertes Wasser.

Danach werden die Präparate 5 Minuten in Hämalaun nach Mayer gestellt, dann 10 Minuten fließend mit Leitungswasser (alkalisch) gewässert, dann 2 mal 2 Minuten in destilliertes Wasser, 2 Minuten in 80%igen Alkohol und 5 Minuten in Eosin gestellt, bevor noch einmal fließend gewässert wird.

Im Anschluss wird das Präparat durch zweimal 2 Minuten destilliertes Wasser,

zweimal 2 Minuten 96%igen Alkohol, dreimal 2 Minuten 100%igen Alkohol und dreimal 5 Minuten Xylol entwässert. Abschließend werden die Präparate mit Vitroclud eingedeckt.

Von den gefärbten Präparaten wird eine Beurteilung der Tiefe der zellulären Infiltration unter der ehemaligen Intimseite der Matrizen vorgenommen. Dazu wird eine Skala verwendet, die in Tabelle 6 dargestellt ist.

<b>WERT</b>	<b>Bedeutung</b>
0	<10% des Präparates
1	>10% des Präparates
2	>20% des Präparates
3	>30% des Präparates
4	>40% des Präparates
5	>50% des Präparates

Tabelle 6, Bewertungsskala zelluläre Infiltration

#### **3.2.5.4 Von Kossa Färbung**

Für die von Kossa Färbung werden die Präparate, wie unter 3.2.5.3 aufgeführt, gewässert. Danach wird das Präparat 40 Minuten in Silbernitrat getaucht, mit destilliertem Wasser gespült, 5 Minuten in Pyrogallussäure getaucht und wiederum mit destilliertem Wasser gespült. Dann wird das Präparat 5 Minuten in Natriumsulfat getaucht und 10 Minuten fließend gewässert, bevor das Präparat 10 Minuten zur Gegenfärbung in Kernechtrot getaucht wird.

Anschließend wird, wie unter 3.2.5.3 aufgeführt, entwässert und eingedeckt.

#### **3.2.6 Immunhistochemische Zellfärbungen**

Zur Vorbereitung auf die Färbungen werden die Präparate, wie unter 3.2.5.3 aufgeführt, gewässert. Darauf folgend werden die Präparate zur Epitopdemaskierung behandelt. Dazu werden die Schnitte 30 Minuten in einem Wasserbad mit TBS-Puffer (PH 6,0) bei 95°C bis 99°C inkubiert. Danach werden die Präparate 20 Minuten bei Zimmertemperatur abgekühlt und anschließend mit PBS und destilliertem Wasser gespült.

Zur Blockierung der endogenen Peroxidase werden die Präparate 30 Minuten bei Raumtemperatur in 3%igem Wasserstoffperoxyd in Methanol inkubiert. Dann werden die Präparate mit destilliertem Wasser gespült und in PBS-Lösung umgesetzt.

Daraufhin werden die Präparate aus dem Puffer genommen und für 10 Minuten mit dem Primärantikörper beziehungsweise dem negativen Kontrollreagenz inkubiert. Dann wird mit Waschpuffer gespült und in frischen Puffer umgesetzt.

Anschließend werden die Präparate 10 Minuten in LINK inkubiert und wiederum mit Waschpuffer gespült und in frischen Puffer umgesetzt.

Als nächstes werden die Präparate 10 Minuten mit Streptavidin inkubiert, gespült und gewaschen. Daraufhin werden die Präparate mit DAB-Gebrauchslösung für 5-30 Minuten inkubiert. Danach wird eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin durchgeführt. Dazu werden die Präparate 2-5 Minuten im Hämatoxylinbad inkubiert, zehnmal in Ammoniumwasser getaucht und 2 Minuten in destilliertem Wasser belassen. Abschließend werden die Präparate mit Aquatex, einem wasserlöslichen Eindeckmedium, eingedeckt.

### **3.2.6.1 CD 68**

Monoklonale Maus-Anti-Human Makrophagen, CD68, Klon KP1 Antikörper werden von Dako, Deutschland bezogen.

CD 68 ist ein transmembranes Glykoprotein von 110kD, dass sehr stark von Monozyten und Gewebsmakrophagen exprimiert wird [Pulford et al, 89]. Seine Zugehörigkeit zum CD68-Cluster wird bestätigt [Cordell JL et al, 95].

Der Antikörper bindet an alle Gewebsmakrophagen und andere mononukleäre Phagozyten. Weitere Elemente, die gefärbt werden sind myeloide Progenitorzellen, manche Megakaryozyten, Mastzellen und Kupffer´sche Zellen [Pulford et al, 89]. In nicht-hämatopoetischen Geweben färbt der Antikörper unter anderem auch Endothelzellen, Hautepithel, Schweißdrüsen und gelegentlich Bindegewebe [Cordell JL et al, 95].

Die Parafinschnitte werden durch hitzeinduzierte Epitopdemaskierung, wie unter 3.2.6 aufgeführt, vorbehandelt. Die Färbung wird mit 1:200 verdünnten Antikörper durchgeführt und mit dem EnVision Detektionssystem (siehe 3.2.6) gefärbt. Das zelluläre Färbemuster ist granulär-zytoplasmatisch.

Von den gefärbten Präparaten wird eine Beurteilung der Infiltrationstiefe unter der ehemaligen Intimaseite der Präparate durchgeführt. Die Skala dafür wird in Tabelle 8 dargestellt.

Wert	Bedeutung pro 1: 400 Sichtfeld
0	Bis 1/3 des Sichtfeldes
1	1/3 bis 2/3 des Sichtfeldes
2	2/3 bis 1 Sichtfeld
3	Über 1 Sichtfeld

Tabelle 8, Skala CD 68 Infiltration

### 3.2.6.2 Fibroblasten

Monoklonale Maus-Anti-Rat Prolyl-4-Hydroxylase, Klon 6-9H6 Antikörper werden von Akris, Deutschland bezogen.

Der Antikörper bindet spezifisch an die Beta-Subeinheit der Prolyl-4-Hydroxylase. Prolyl-4-Hydroxylase ist ein intrazelluläres Enzym, welches für die Produktion aller 20 bekannten Kollagenarten benötigt wird [Bai et al, 86]. Markierte Zellen zeigen deshalb eine auf das Zytoplasma begrenzte Anfärbung. Der Antikörper wird erfolgreich für immunhistochemische Färbung von Fibroblasten eingesetzt [Bai et al, 86].

Die Parafinschnitte werden durch hitzeinduzierte Epitopdemaskierung, wie unter 3.2.6 aufgeführt, vorbehandelt. Die Färbung wird mit 1:200 verdünnten Antikörper durchgeführt und mit dem EnVision Detektionssystem, wie unter 3.2.6 aufgeführt, gefärbt.

Auch für die Fibroblasten- Färbung wird eine quantitative Auswertung der Infiltrationstiefe an der ehemaligen Intima-Seite der Matrize vorgenommen. In Tabelle 9 wird das Bewertungsmodell dargestellt.

Wert	Bedeutung pro 1: 400 Sichtfeld
0	Unter 1/3 des Sichtfeldes
1	1/3 bis 2/3 des Sichtfeldes
2	2/3 bis 1 Sichtfeld
3	Über 1 Sichtfeld

Tabelle 9, Skala Fibroblasten Infiltration

### 3.2.6.3 Von Willebrand Faktor

Monoklonale Maus-Anti-Human vWf, Klon F8/86 Antikörper wurden von DakoCytomation, Dänemark bezogen. Der Von Willebrand Faktor ist ein großes Glykoprotein mit einer relativen Molekülmasse von 500kD bis hin zu mehr als 10000kD [Denis, 02].

Der Antikörper markiert spezifisch Endothelzellen [Padro et al, 00], Megakaryozyten und Megakaryoblasten [Werner et al, 92]. Die Expression des Von Willebrand Faktors ist gewebspezifisch und auf Endothelzellen und Megakaryozyten beschränkt [Denis, 02; Werner et al, 92]. Der von Willebrand Faktor liegt im Plasma vor, in Endothelzellen, in Megakaryozyten und den daraus hervorgehenden Thrombozyten und in der subendothelialen Matrix der Gefäßwand. Der Von Willebrand Faktor vermittelt in der Thrombozytenadhäsion und in der Entstehung von Thromben am Ort der vaskulären Schädigung und dient als Faktor VIII-Transporter im Plasma [Denis, 02].

Die Paraffinschnitte wurden durch hitzeinduzierte Epitopdemaskierung, wie oben aufgeführt vorbehandelt.

Die Färbung wurde mit 1:50 verdünnten Antikörper durchgeführt und mit dem EnVision Detektionssystem wie oben aufgeführt gefärbt.

Markierte Zellen zeigen eine granuläre und auf das Zytoplasma begrenzte Anfärbung.

Die Von Willebrand Faktor Färbung wurde zur Darstellung von Endothelzellen und zur klaren Identifikation von Blutgefäßen durchgeführt. Zur quantitativen Evaluierung der Blutgefäßdichte um die Matrizen wurde die in Tabelle 7 dargestellte Skala verwendet.

WERT	Bedeutung pro 1:400 Sichtfeld
0	Keine Blutgefäße
1	1-4 Blutgefäße
2	4-8 Blutgefäße
3	Über 8 Blutgefäße

Tabelle 7, Bewertungsskala Blutgefäße

### 3.2.7 Statistische Auswertung

Zur Auswertung der ermittelten Daten werden Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben. Da die erfassten Daten nicht metrisch und die Mittelwerte nicht normal verteilt sind, werden zur Ermittlung von signifikanten Unterschieden nicht-parametrische Tests angewendet werden. Ein p-Wert von 0,05 wurde als Grenze gesetzt. Mittels des Friedman-Tests, eines nicht-parametrischen statistischen Test zum Vergleich von drei oder mehr gepaarten Stichproben, wird die statistische Signifikanz des Tests in der Gesamtheit überprüft. Die verschiedenen implantierten Präparate werden mit Hilfe des Wilcoxon-Tests, eines nicht-parametrischen statistischen Tests zum Vergleich von zwei gepaarten Stichproben, miteinander verglichen. Durch jeweils verschiedenartige Zusammenfassung der implantierten Präparate aufgrund eines gemeinsamen Merkmales in jeweils 2 statistische Gruppen kann auf Korrekturverfahren für multiples Testen verzichtet werden. Des Weiteren kann dadurch die jeweilige Stichprobengröße erhöht werden. Statistische Auswertungen zwischen den Gruppen mit verschiedenen Implantationszeiträumen werden mit dem Kruskal-Wallis-Test, einem nicht-parametrischen statistischen Tests zum Vergleich von mehreren ungepaarten Stichproben und dem Mann-Whitney-U-Test, einem nicht-parametrischen statistischen Tests zum Vergleich von zwei ungepaarten Stichproben, durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von SPSS® Version 14.0 von LEAD Technologies, Inc.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Entzündungszeichen bei Explantation der Matrizen

Bei der Explantation der Matrizen wird die lokale Entzündungsreaktion mit der unter 3.2.2.4 aufgeführten Skala evaluiert.

Dabei kommt es in der Gruppe I (n=10, 2 Wochen Implantationsdauer) zu einer starken Zunahme der Durchblutung in der Umgebung der implantierten Matrizen. Außerdem bildet sich meist eine Kapsel mit Wundsekret im Umfeld der nativen Matrizen. Im Allgemeinen zeigt sich eine stärkere Entzündungsreaktion im Umfeld der nicht dezellulierten Matrizen (in Abbildung 7 erstes und drittes Präparat von links) im Gegensatz zu den dezellulierten Matrizen (in Abbildung 7 zweites und viertes Präparat von links).

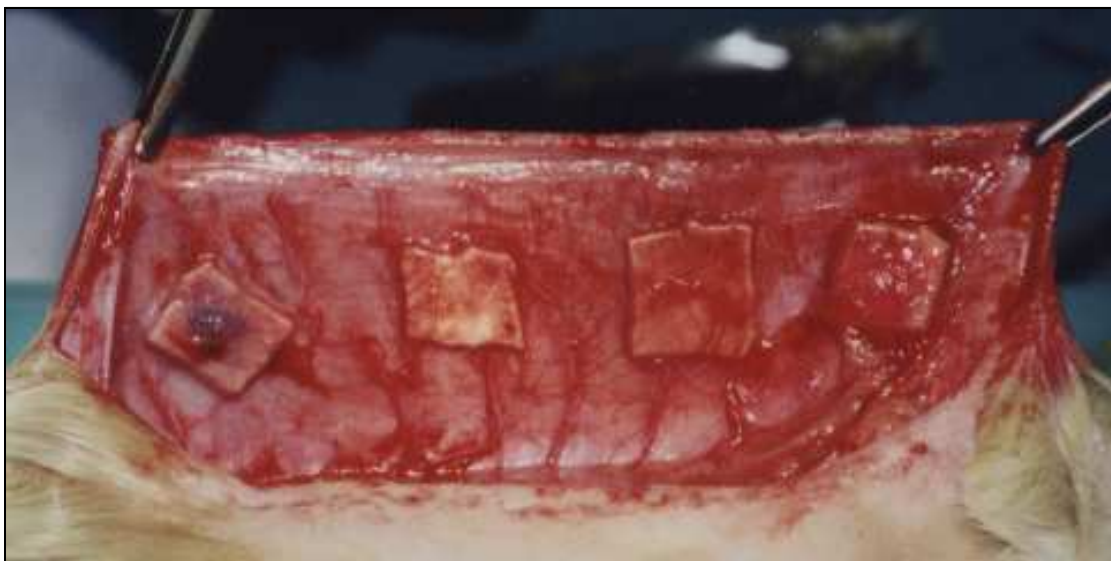


Abbildung 7, Explantation nach 2 Wochen

In der Gruppe II (n=10, 4 Wochen Implantationsdauer) fallen keine Unterschiede mehr zwischen den verschiedenen implantierten Matrizen auf. Entzündungszeichen gingen im Allgemeinen zurück, wie in Abbildung 8 dargestellt.

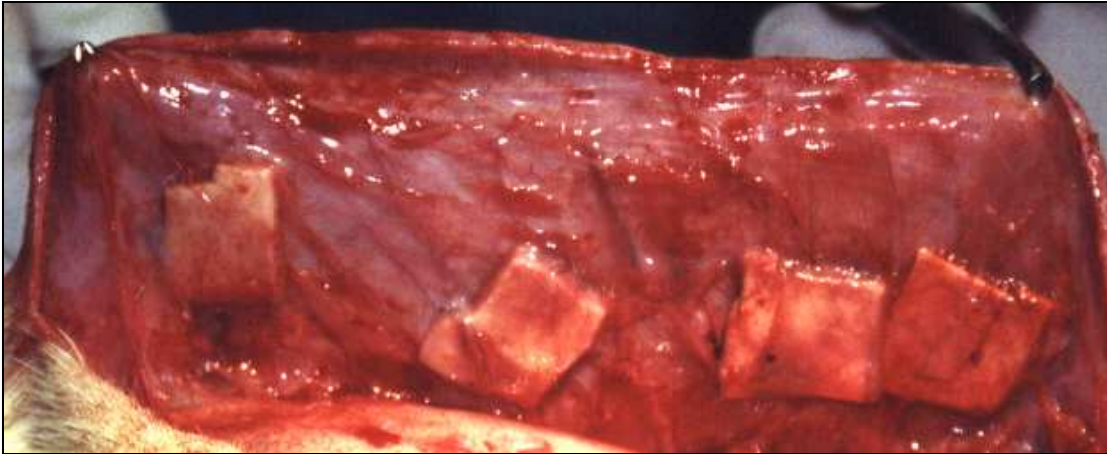


Abbildung 8, Explantation nach 4 Wochen

In der Gruppe III (n=10, 6 Wochen Implantationsdauer) sind keine Unterschiede zu sehen. Die Matrizen zeigen sich im Allgemeinen gut in die Umgebung integriert, wie in Abbildung 9 zu sehen ist.

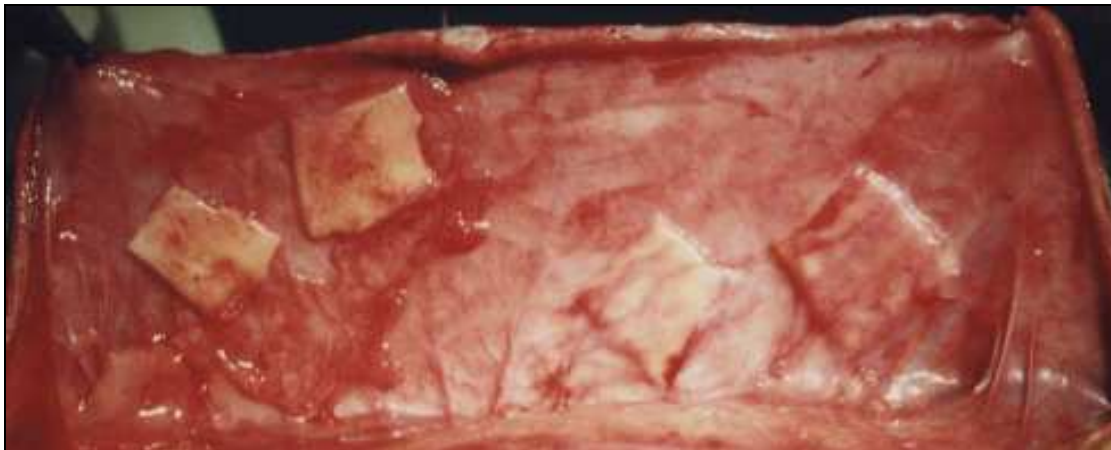


Abbildung 9, Explantation nach 6 Wochen

In Abbildung 10 sind die makroskopischen Entzündungszeichen graphisch aufgearbeitet. Dabei werden die acht verschiedenen Matrizen und die jeweilige durchschnittliche Entzündungsreaktion unabhängig von der Implantationsdauer dargestellt. Betrachtet man nach Gruppierung der dezellularisierten und der nicht dezellularisierten Matrizen unabhängig von den anderen Einflussfaktoren separat deren Unterschied, zeigen sich signifikant weniger Entzündungszeichen in den dezellularisierten Matrizen (Abbildung 11).



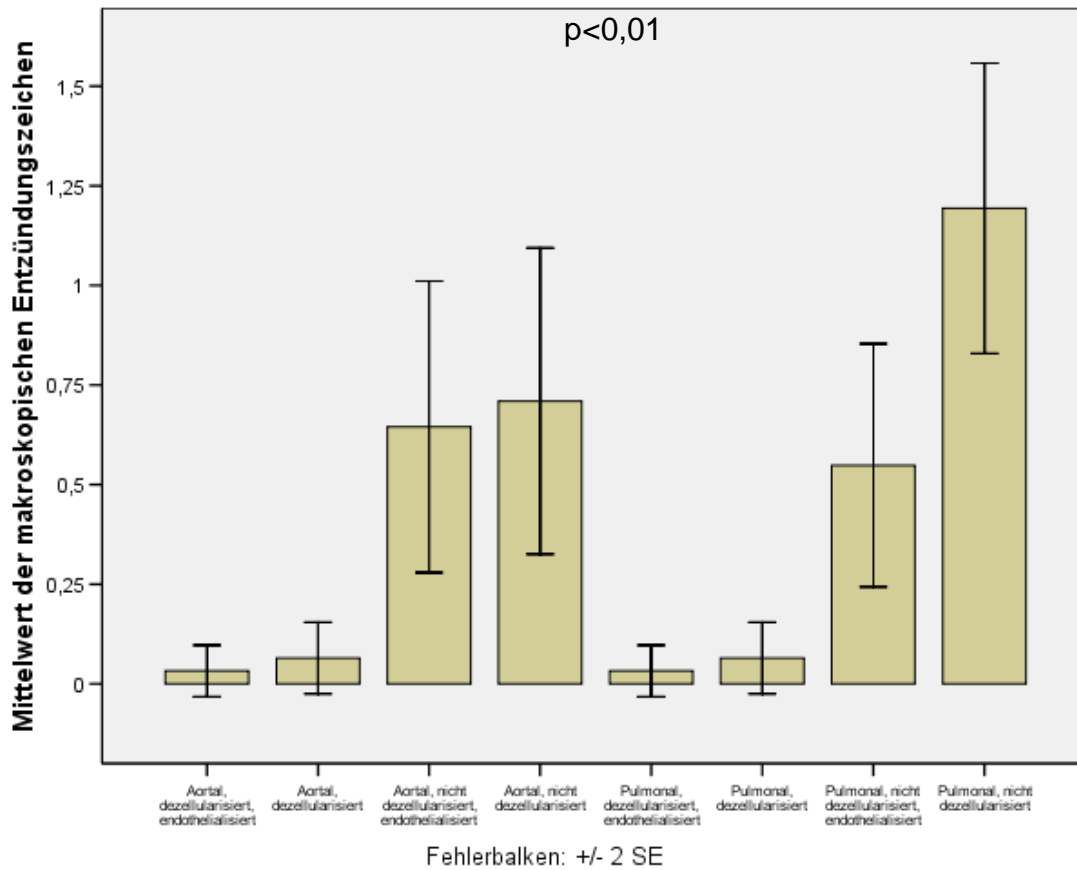


Abbildung 10, Darstellung der makroskopischen Entzündungszeichen der acht verschiedenen Matrizen (jeweils n=30)

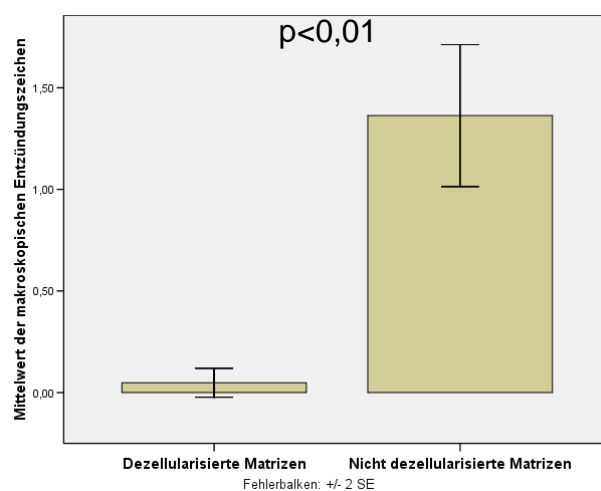


Abbildung 11, Gegenüberstellung der makroskopischen Entzündungszeichen von dezellularisierten und nicht dezellularisierten Matrizen (jeweils n=120)

## **4.2 Zellfärbungen für die Lichtmikroskopie**

### **4.2.1 Giemsa-Färbung**

Diese Färbung wird von 20 Matrizen angefertigt. Auf den angefertigten Präparaten von endothelialisierten Matrizen ist klar eine konfluente Zellschicht auf deren Oberfläche zu erkennen, welche morphologisch als Endothelzellschicht identifiziert werden kann. Dagegen sind bei den nicht besiedelten Matrizen keine Zellen erkennbar.

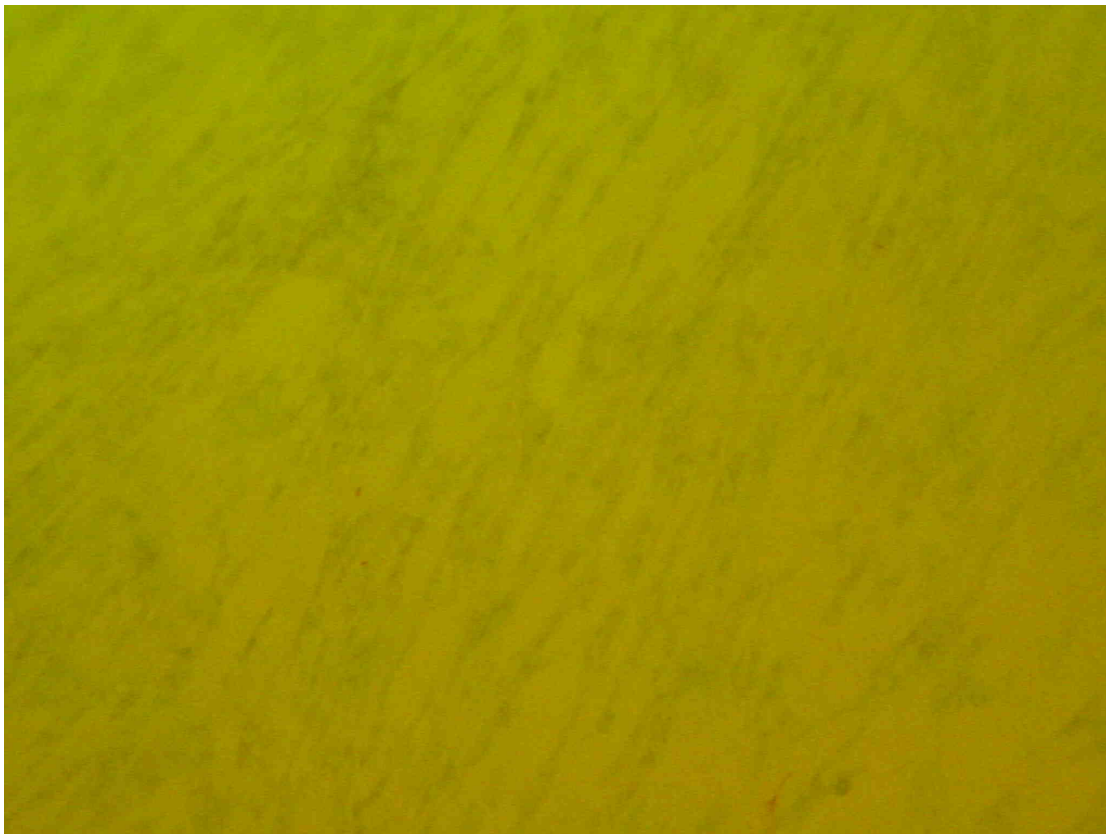


Abbildung 12, Giemsa Färbung einer besiedelten Matrize

### **4.2.2 Hämatoxylin-Eosin Färbung**

Die angefertigten Hämatoxylin-Eosin Färbungen liefern einen guten Überblick über die verschiedenen Präparate und es werden verschiedene quantitative Auswertungen an ihnen vorgenommen. Betrachtet werden über der ehemaligen Intima-Seite der Matrize die Tiefe der zellulären Infiltration, die Ausbildung einer Endothelzellschicht und die Bildung von Blutgefäßen. Des Weiteren wird der

Unterschied zellulärer Infiltration zwischen Schnittkante und ehemaliger Intima-Seite der Matrize betrachtet.

#### 4.2.2.1 Zelluläre Infiltration

In den Präparaten kommen verschiedene Ausprägungen der zellulären Infiltration zur Darstellung. An der ehemaligen Intima-Seite der Präparate zeigt sich die geringste Infiltration (In Abbildung 13 rechts) verglichen mit den Schnittkanten (In Abbildung 13 unten) und der ehemaligen Adventitia-Seite (In Abbildung 13 links) der Präparate. Bei allen Präparaten tritt, unabhängig davon welcher Behandlung sie unterzogen werden, die stärkste Infiltration an der Schnittkante der Matrizen auf. Dies kommt ebenfalls in den Abbildungen 13, 16, 17 und 18 zum Ausdruck.

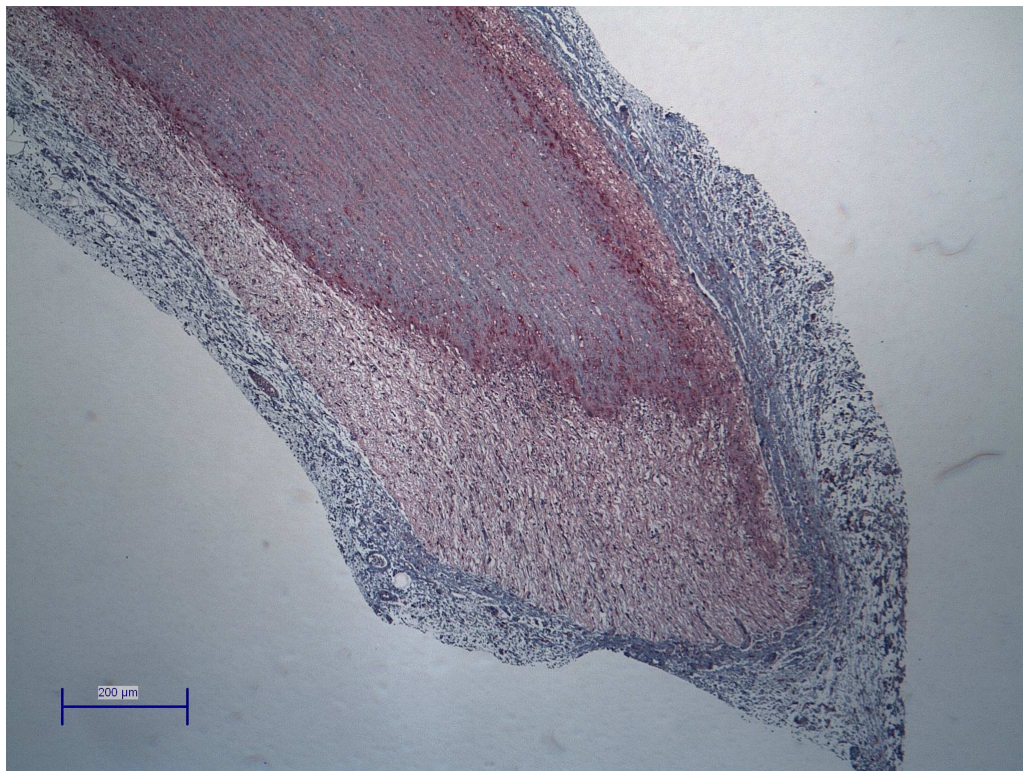


Abbildung 13, nicht dezellularisierte pulmonalarterielle Matrize

Bei genauerer histologischer Betrachtung der Präparate ist der Großteil der zellulären Infiltration als leukozytären Ursprungs zu erkennen. Zur Auswertung der Infiltrationstiefe wird eine Skala von 0 bis 5 verwendet (siehe 3.2.5.3).

Es zeigt sich ein klarer Unterschied zwischen den verschiedenen behandelten Präparaten. Dies wird in Abbildung 14 graphisch veranschaulicht. Dabei werden die drei verschiedenen Implantationszeiträume zusammengefasst dargestellt, wodurch eine Gruppengröße von jeweils n=30 entsteht.

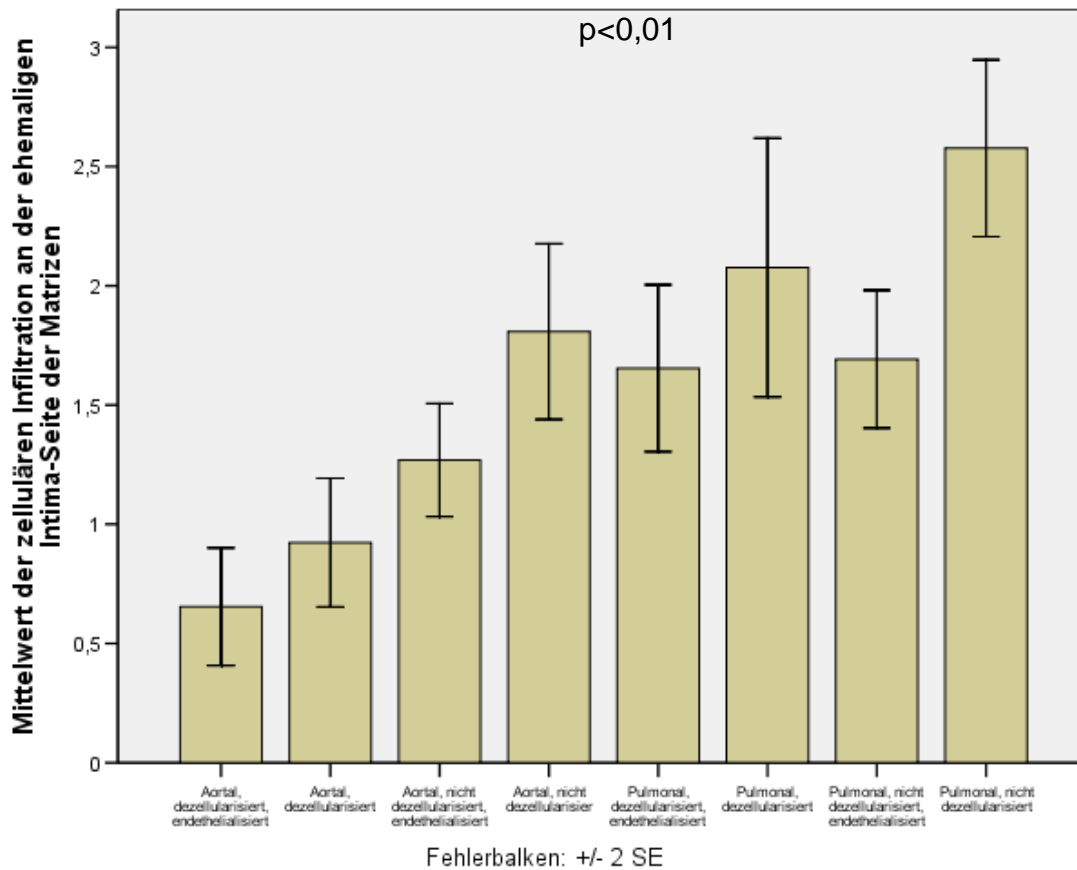


Abbildung 14, Darstellung der zellulären Infiltration unter der ehemaligen Intima-Seite der acht verschiedenen Matrizen (jeweils n=30)

Zum Vergleich aller dezellularisierten und aller nicht dezellularisierten Matrizen werden die Präparate unabhängig davon ob sie mit Endothelzellen besiedelt sind, aus pulmonalarteriellen oder aortalen Gewebe bestehen in zwei Gruppen unterteilt, wodurch eine Gruppengröße von jeweils n=120 entsteht. Bei der Gegenüberstellung wird eine signifikant geringere Infiltrationstiefe bei den dezellularisierten Matrizen deutlicher (Abbildung 15).

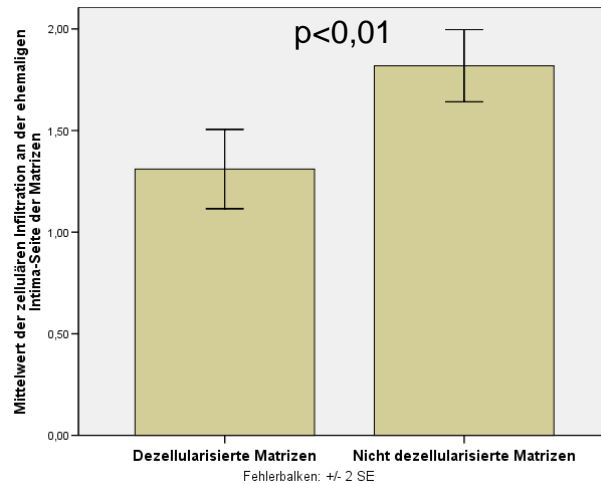


Abbildung 15, Darstellung der zellulären Infiltration unter der Intima-Seite von dezellularisierten und nicht dezellularisierten Matrizen (jeweils n=120)

Auch zum Vergleich aller pulmonalarteriellen und aller aortalen Matrizen werden die Präparate unabhängig davon ob sie mit Endothelzellen besiedelt sind, aus dezellularisierten oder nicht Gewebe bestehen in zwei Gruppen unterteilt, wodurch eine Gruppengröße von jeweils n=120 entsteht. Bei der Gegenüberstellung kann man eine signifikant geringere Infiltrationstiefe in den aortalen als in den pulmonalarteriellen Matrizen erkennen (Abbildung 16).

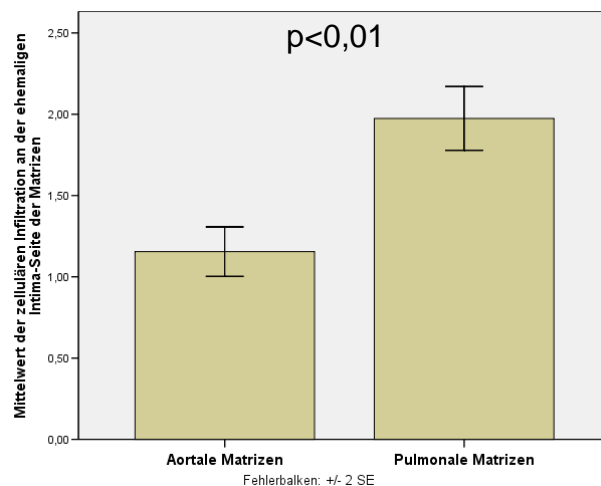


Abbildung 16, Darstellung der zellulären Infiltration unter der ehemaligen Intima-Seite von aortalen und pulmonalarterielle Matrizen (jeweils n=120)

Im zeitlichen Verlauf zeigt sich bei allen Präparaten eine Abnahme der zellulären Infiltration, wie sie im Laufe von Entzündungsreaktionen zu erwarten ist. In den Abbildungen 17,18 und 19 wird zur Veranschaulichung dessen beispielhaft die Verminderung der zellulären Infiltration einer aortalen dezellularisierten Matrize in den 3 verschiedenen Gruppen (2, 4 und 6 Wochen Implantationsdauer) dargestellt. In den Abbildungen 17 und 19 ist jeweils am oberen Bildrand die ehemalige Intima-Seite zu erkennen, in Abbildung 18 dagegen am rechten Bildrand.

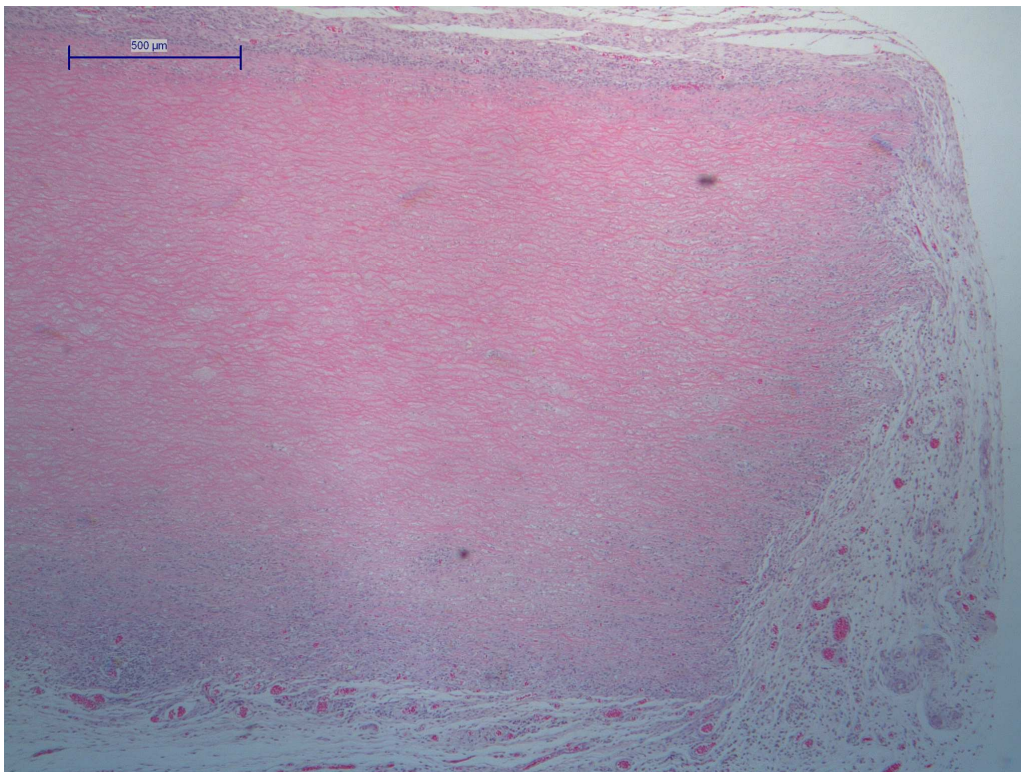


Abbildung 17, dezellularisierte aortale Matrize nach 2 Wochen Implantationsdauer

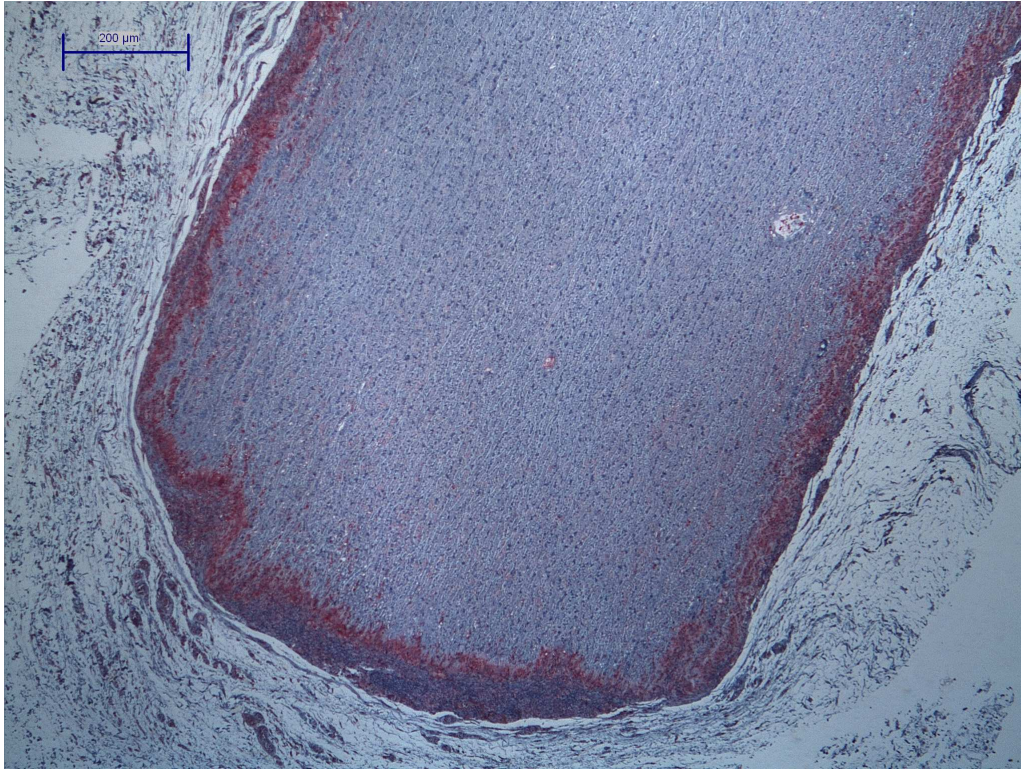


Abbildung 18, dezellularisierte aortale Matrize nach 4 Wochen

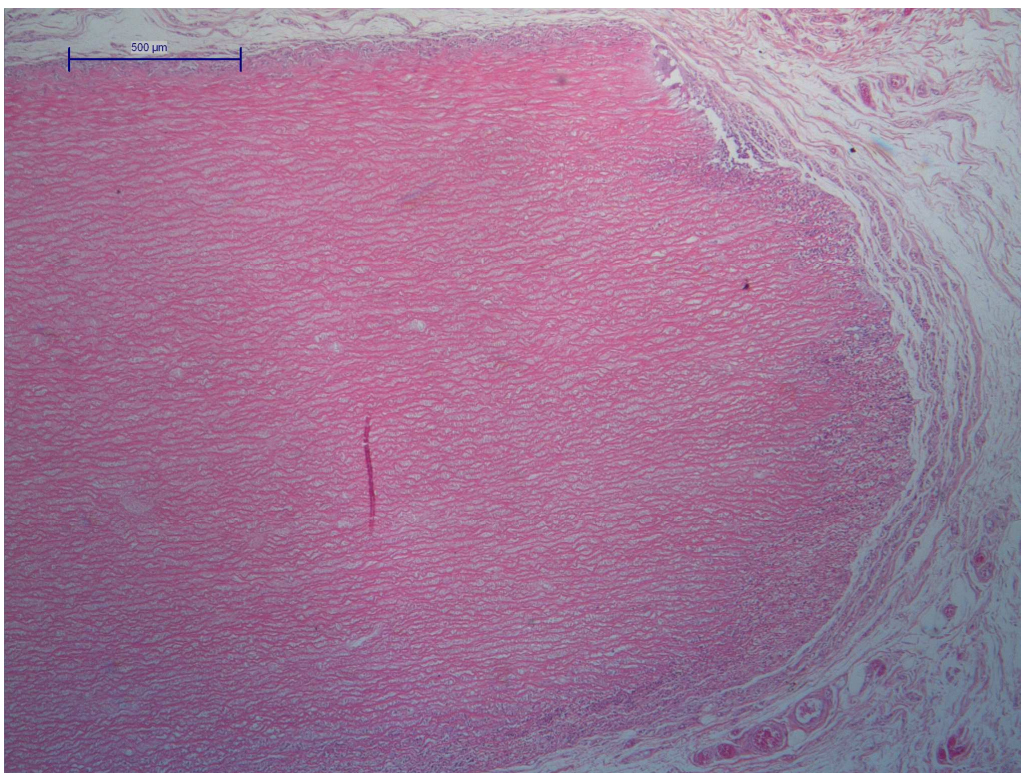


Abbildung 19, dezellularisierte aortale Matrize nach 6 Wochen

#### 4.2.2.2 Endothelzellschicht/ Bildung von Blutgefäßen

In keiner der Hämatoxylin-Eosin Färbungen oder der Von Willebrand Faktor Färbungen konnte eine Endothelzellschicht, welche das Präparat umgibt, um die mit Endothelzellen besiedelten Matrizen gefunden werden.

Auffällig war jedoch, dass es in den beschichteten Präparaten unabhängig von der Implantationsdauer zu einer vermehrten Bildung von Blutgefäßen am Rande der Matrizen kam (Abbildung 20). Zur Auswertung wird eine Skala von 0 bis 3, wie unter 3.2.6.3 beschrieben, verwendet.

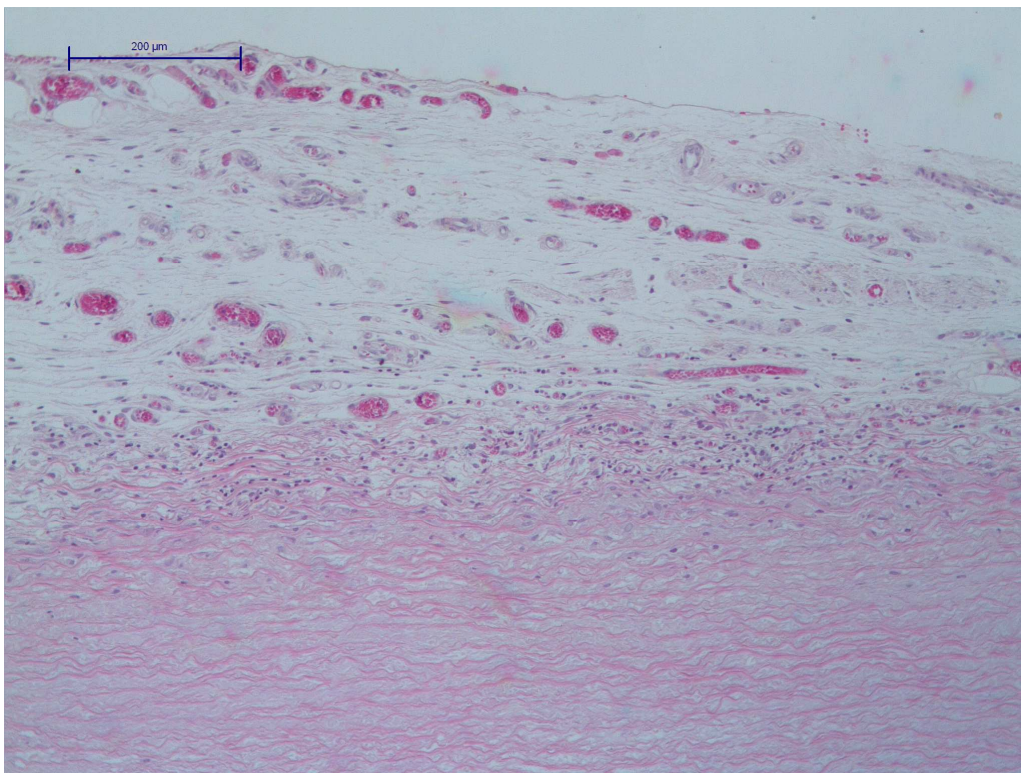


Abbildung 20, Blutgefäße an endothelialisierter Matriz

Es zeigt sich, wie in folgendem Diagramm (Abbildung 21) dargestellt, eine signifikant erhöhte Anzahl von Blutgefäßen am Rande der mit Endothelzellen beschichteten Matrizen im Gegensatz zu den unbeschichteten Matrizen.



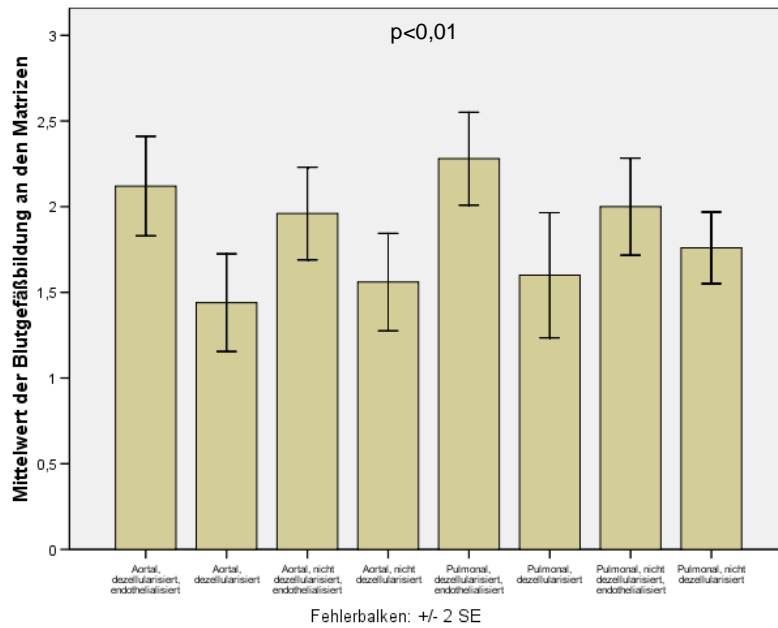


Abbildung 21, Menge der Blutgefäße an den acht verschiedenen Matrizen unabhängig vom Implantationsdauer (jeweils n=30)

Zur Verdeutlichung der Blutgefäßbildung werden unabhängig von der Implantationsdauer die vier endothelialisierten Matrizen zusammenfasst und den vier nicht endothelialisierten Matrizen gegenüberstellt, wodurch eine Gruppengröße von jeweils n=120 entsteht. Dabei ergibt sich wie in Abbildung 22 dargestellt ein signifikanter Unterschied.

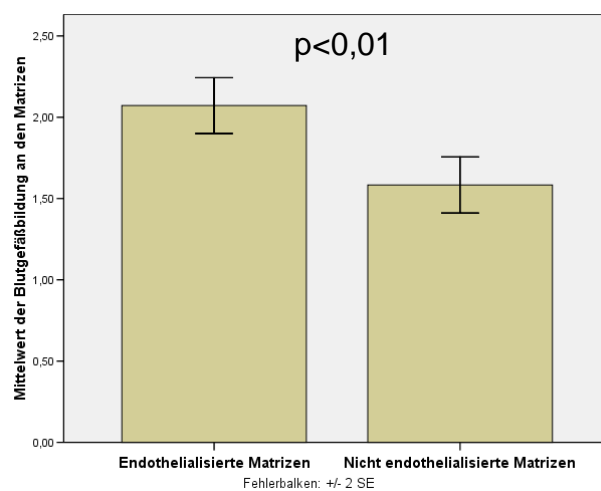


Abbildung 22, Blutgefäßbildung bei endothelialisierten und nicht endothelialisierten Matrizen (jeweils n=120)

Wenn man dagegen die Dezellularisation durch Zusammenfassung der jeweils vier verschiedenen dezellularisierten und nicht dezellularisierten Matrizen unabhängig von der Implantationsdauer in ihrer Auswirkung auf die Bildung von Blutgefäßen darstellt, so ergibt sich kein relevanter Unterschied (Abbildung 23).

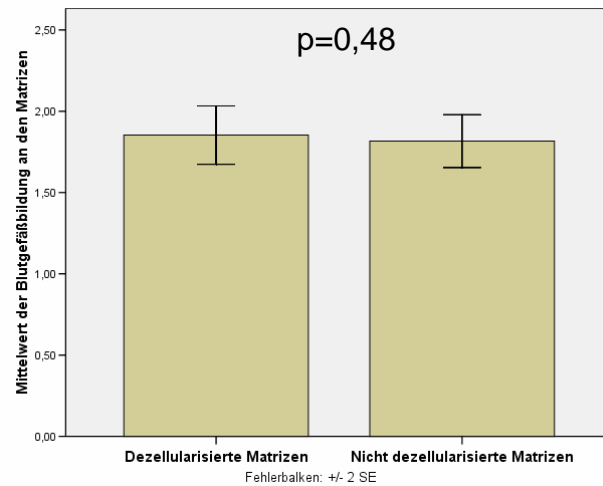


Abbildung 23, Blutgefäßbildung bei dezellularisierten und nicht dezellularisierten Matrizen (jeweils n=120)

#### 4.2.3 Von Kossa Färbung

Bei den Präparaten, welche eine Von Kossa Färbung erhielten, wurde in positive Reaktion (Kalzifikation vorhanden) und negative Reaktion (keine Kalzifikation vorhanden) unterteilt. Von den angefertigten Präparaten zeigen lediglich drei eine positive Reaktion, das heißt Kalziumablagerungen (in Abbildung 24 als dunkle Ablagerungen erkennbar). Die drei Präparate sind aus nicht dezellularisierten Matrizen hergestellt. Kein dezellularisiertes Präparat zeigte eine positive Reaktion. Nach Zusammenfassung der jeweils vier verschiedenen dezellularisierten und nicht dezellularisierten Matrizen unabhängig von der Implantationsdauer ergibt sich statistisch gesehen daraus keine Signifikanz ( $p=0,08$  bei jeweils  $n=120$ ), ein Trend ist jedoch absehbar. In Abbildung 25 ist dies graphisch dargestellt.

Auch beim Vergleich von aortalen und pulmonalarteriellen sowie endothelialisierten und nicht endothelialisierten Matrizen zeigt sich kein signifikanter Unterschied.

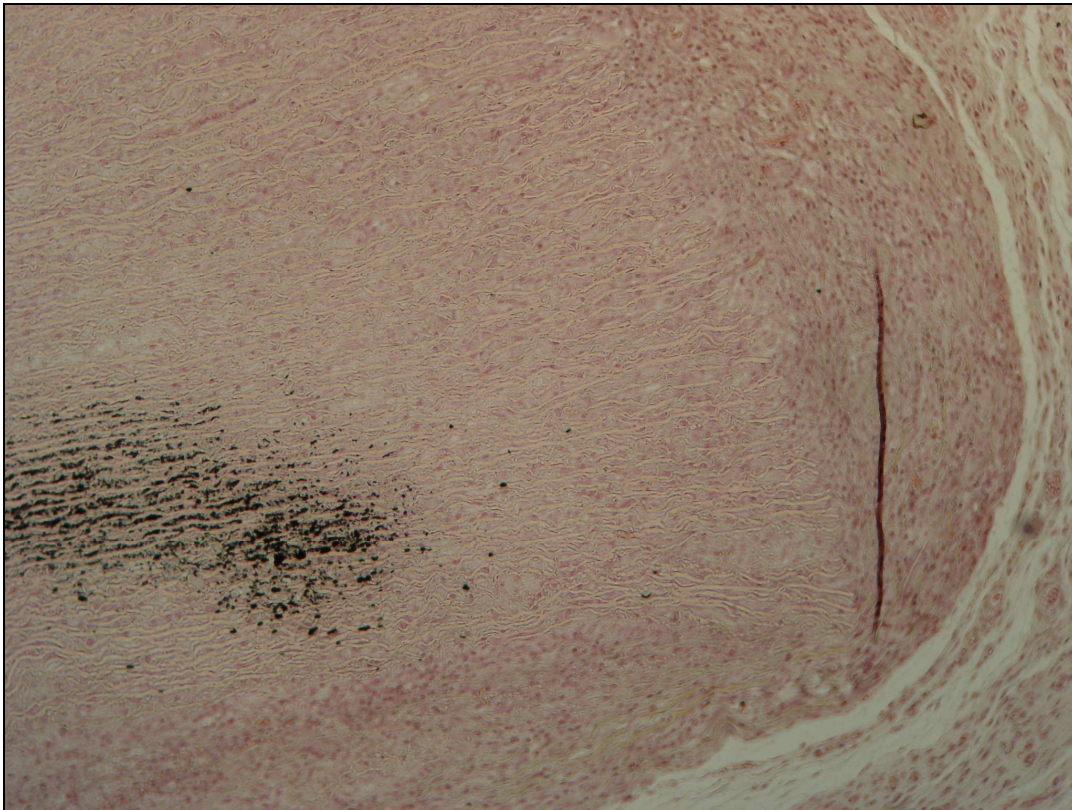


Abbildung 24, Von Kossa positives Präparat

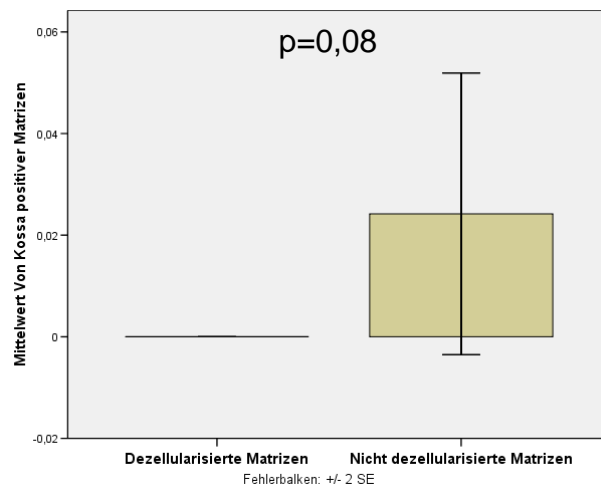


Abbildung 25, Gegenüberstellung von Kalzifikationen in der Von Kossa Färbung von dezellularisierten und nicht dezellularisierten Matrizen (jeweils n=120)

## 4.3 Immunhistochemische Zellfärbungen

### 4.3.1 CD 68 positive Zellen

Für die Färbung der CD 68 positiven Zellen wird eine quantitative Auswertung der Infiltrationstiefe mit der unter 3.2.6.1 aufgeführten Skala vorgenommen.

Dabei zeigt sich, betrachtet an der ehemaligen Intima-Seite der Matrizen, eine geringere Infiltration in den aortalen (Abbildung 26 und 27 Intima jeweils am oberen Bildrand) als in den pulmonalen Matrizen. In der Abbildungen 28 ist dieser signifikante Unterschied graphisch dargestellt. Dabei werden die vier aortalen Matrizen den vier pulmonalen Matrizen unabhängig von ihrer Implantationsdauer gegenübergestellt.

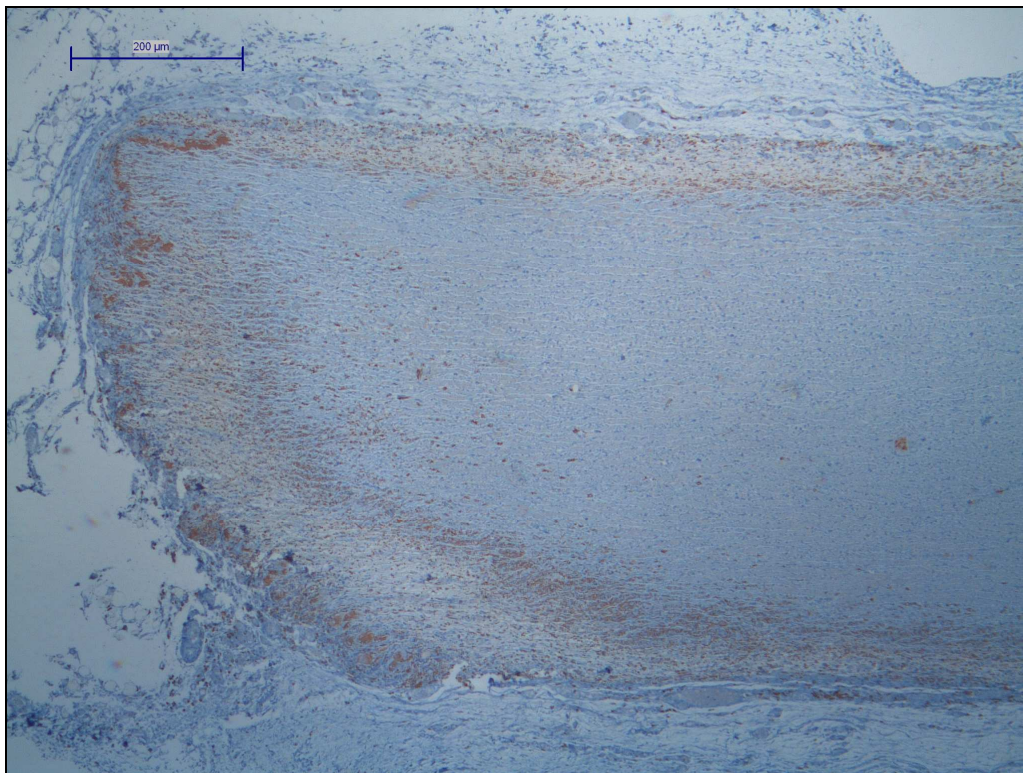


Abbildung 26, CD 68 Färbung einer dezellularisierten aortalen Matrize

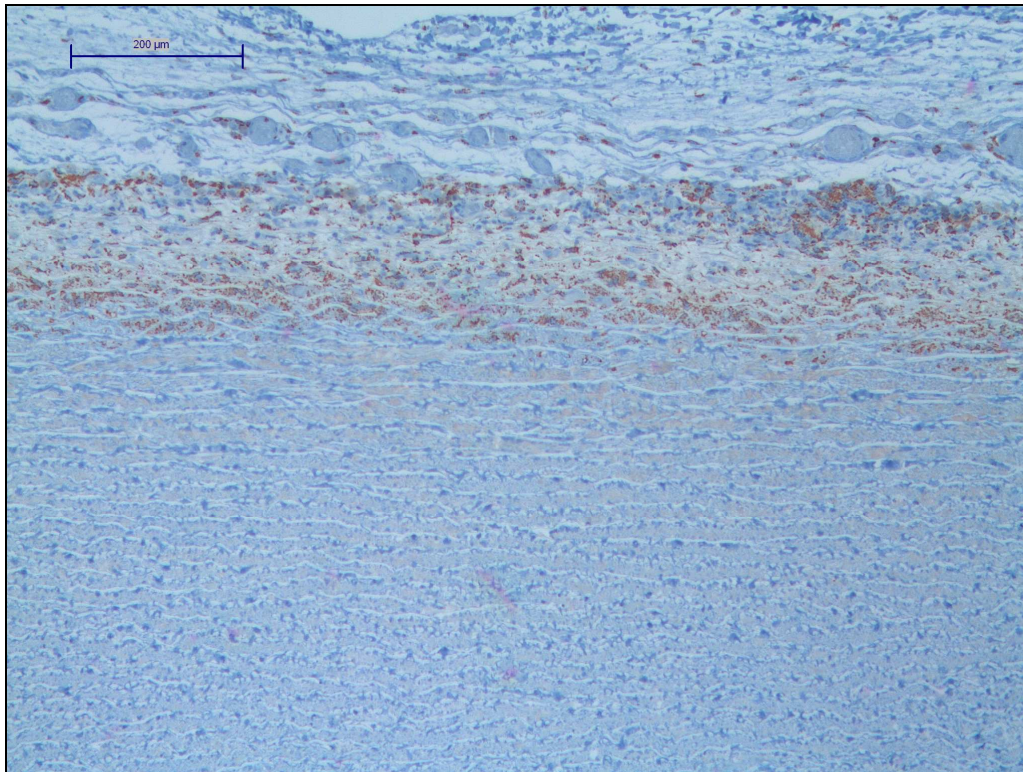


Abbildung 27, CD 68 Färbung einer dezellularisierten aortalen Matrizze

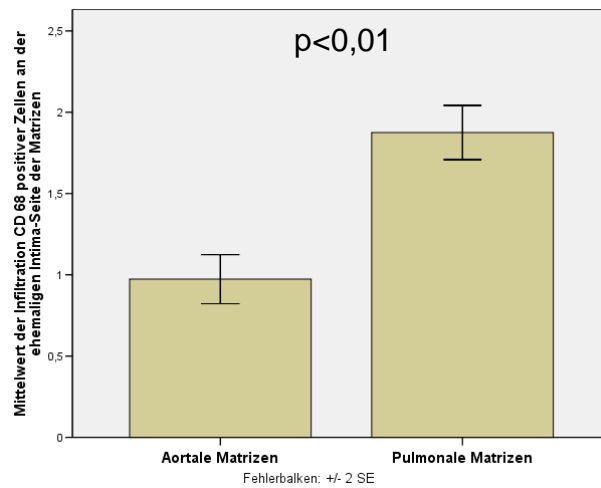


Abbildung 28, Infiltration CD 68 positiver Zellen bei aortalen und pulmonalarteriellen Matrizen (jeweils n=120)

In den vier unabhängig von ihrer Implantationsdauer zusammengefassten dezellularisierten Matrizen ergibt sich ebenfalls eine signifikant geringere Infiltration als in den vier nicht dezellularisierten Matrizen (Abbildung 29).

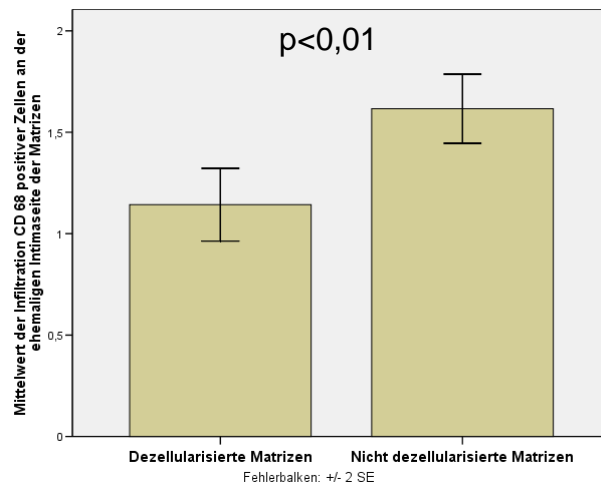


Abbildung 29, Infiltration CD 68 positiver Zellen bei dezellularisierten und nicht dezellularisierten Matrizen (jeweils n=120)

Auch bei den endothelialisierten Matrizen stellt sich eine signifikant geringere Infiltration als bei den nicht endothelialisierten Matrizen dar (Abbildung 30).

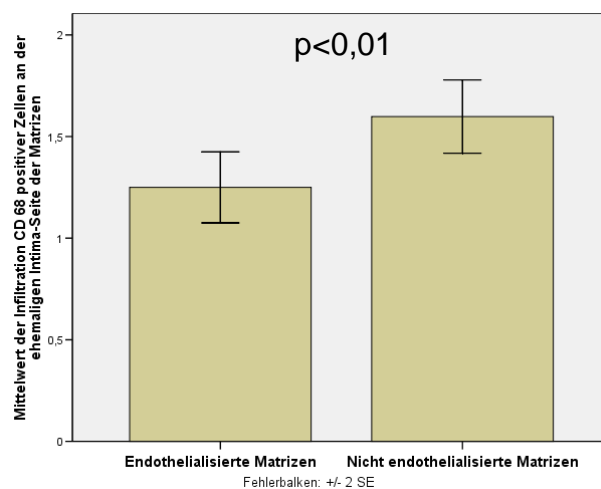


Abbildung 30, Infiltration CD 68 positiver Zellen bei endothelialisierten und nicht endothelialisierten Matrizen (jeweils n=120)

Bei allen Matrizen zeigt sich eine stärkere Infiltration an der Schnittkante der Matrizen. Im zeitlichen Verlauf stellt sich, genau wie bei der zellulären Infiltration, eine Regredienz der Infiltration von CD 68 positiven Zellen dar.

### 4.3.2 Fibroblasten

In den Abbildungen 31 und 32 ist eine Färbung der Fibroblasten mit einer verstärkten Anreicherung des roten Prolyl-4-Hydroxylase anfärbenden Farbstoffes unter der ehemaligen Intima-Seite der Matrice dargestellt (Ehemalige Intima am oberen Bildrand dargestellt). Man erkennt die Bildung einer Schicht von Fibroblasten um die Matrice herum sowie eine Infiltration der Matrice von außen nach innen.

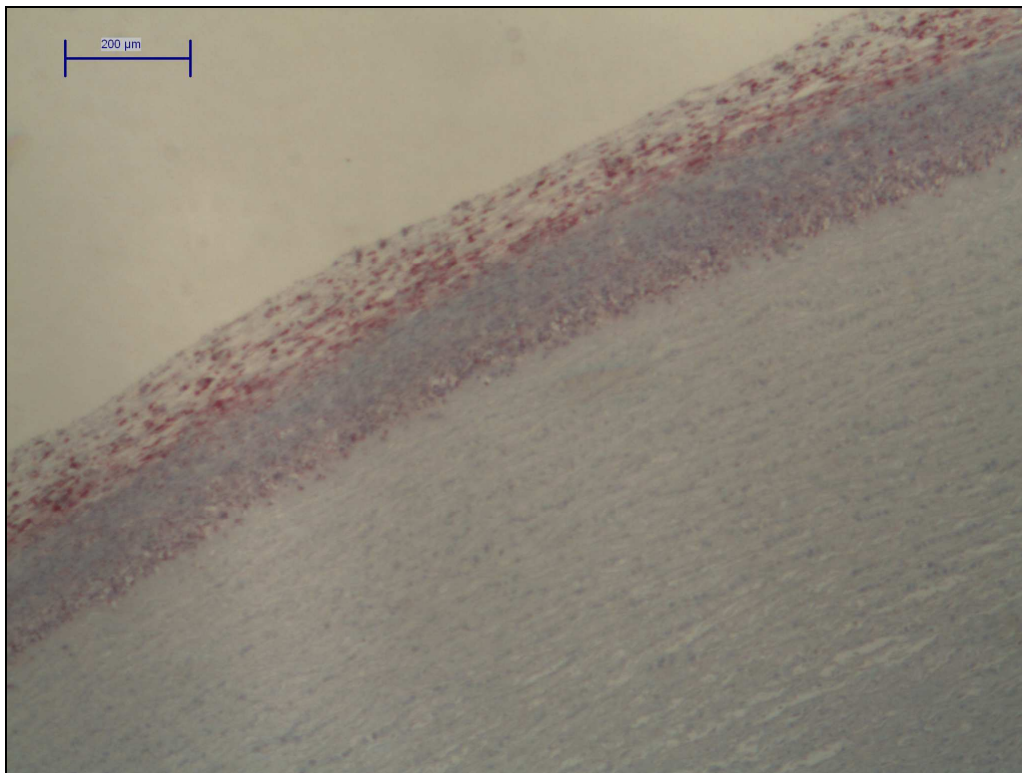


Abbildung 31, Fibroblasten an einer aortalen dezellularisierten Matrice

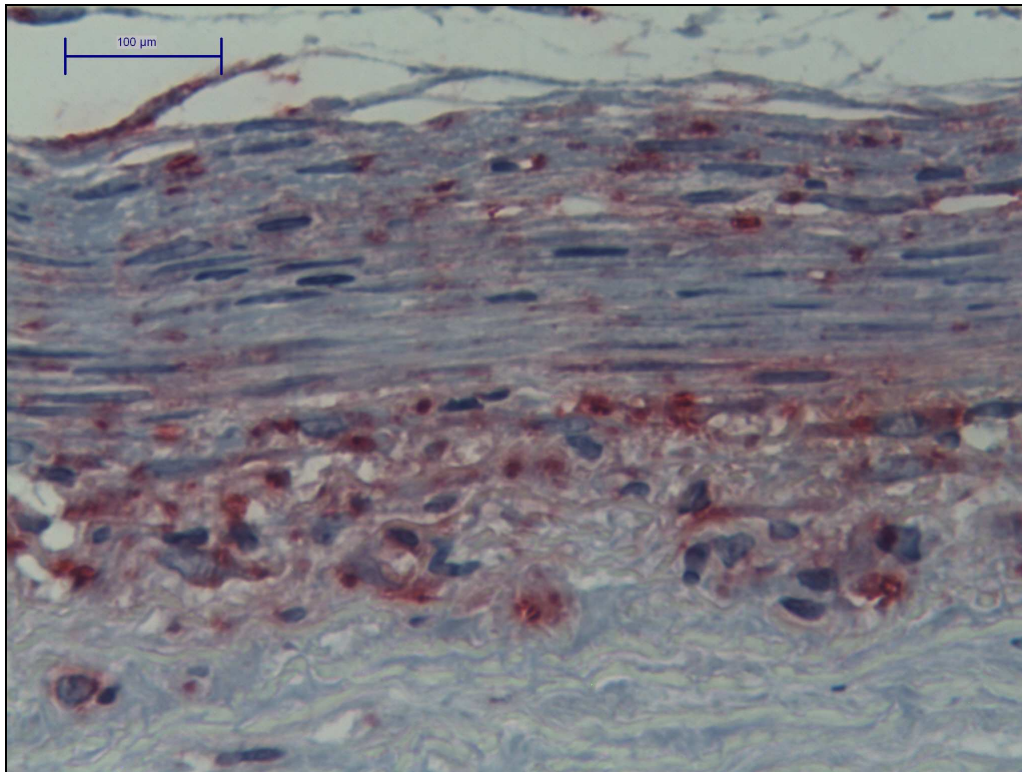


Abbildung 32, Fibroblasten an einer aortalen dezellularisierten Matriz

Nach statistischer Auswertung aller Präparate mit der unter 3.2.6.2 dargestellten Skala ergibt sich das in Abbildung 33 dargestellte Bild.

Bei Gegenüberstellung der verschiedenen Einflussfaktoren zeigt sich durch Zusammenfassung der jeweils vier, in Bezug auf einen Einflussfaktor, gleichartigen Matrizen eine signifikant geringere Infiltration der aortalen (Abbildung 34) und der dezellularisierten Matrizen (Abbildung 35). Dagegen hat die Endothelialisierung der Matrizen keinen Einfluss auf die Infiltration von Fibroblasten (Abbildung 36).

Wie bei den Färbungen für CD 68 positive Zellen und der zellulären Infiltration in der Hämatoxylin-Eosin Färbung ist auch in der Fibroblasten Färbung eine verstärkte zelluläre Ansammlung an den Schnittkanten der Matrizen zu sehen.

Im zeitlichen Verlauf stellt sich eine Regredienz der Infiltration in den drei verschiedenen Gruppen dar (2, 4, 6 Wochen Implantationsdauer), wie es schon bei der zellulären Infiltration in der Hämatoxylin-Eosin Färbung und in der Färbung CD 68 positiver Zellen zu beobachten ist.



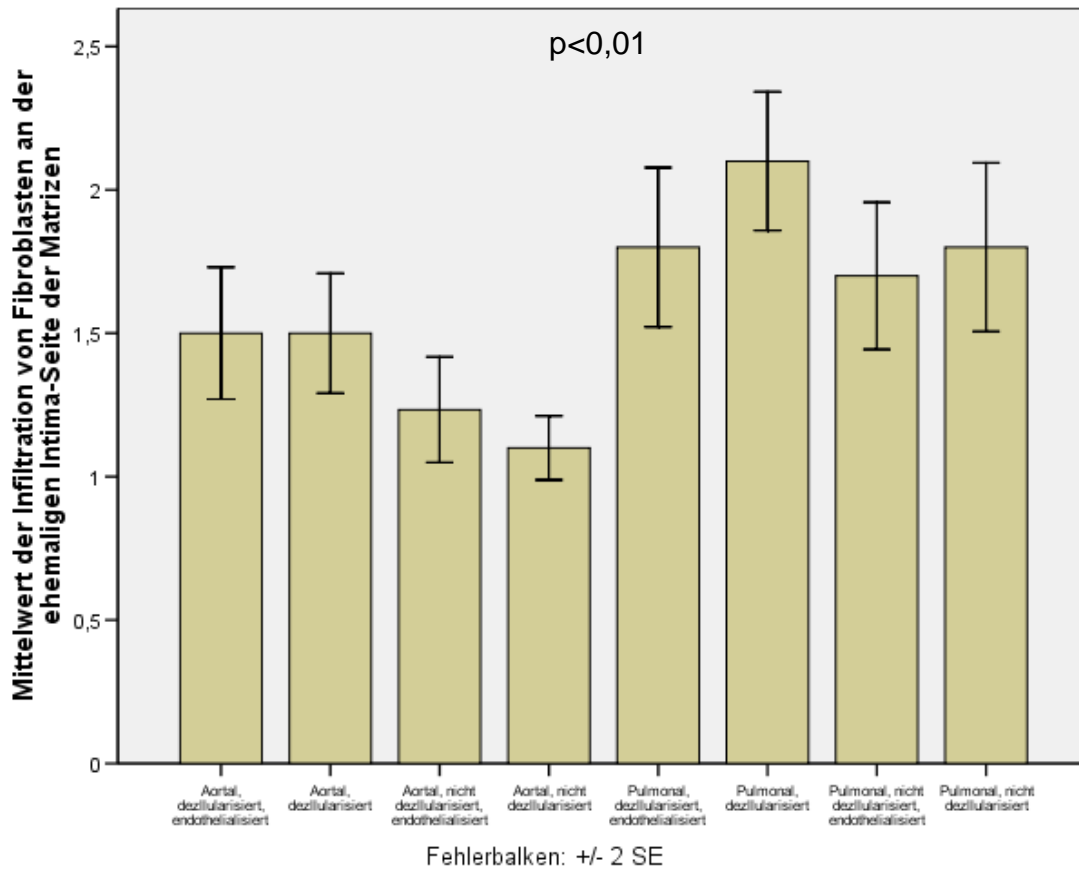


Abbildung 33, Fibroblasten- Infiltration unter der ehemaligen Intima-Seite bei den acht verschiedenen Matrizen (jeweils n=30)

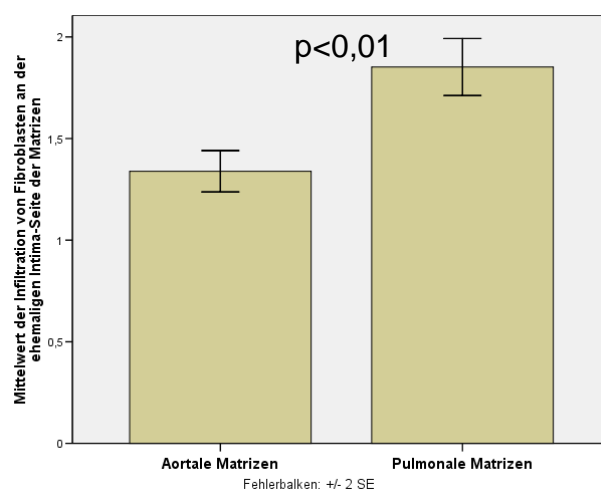


Abbildung 34, Fibroblasten- Infiltration unter der ehemaligen Intimaseite bei aortalen und pulmonalen Matrizen (jeweils n=120)

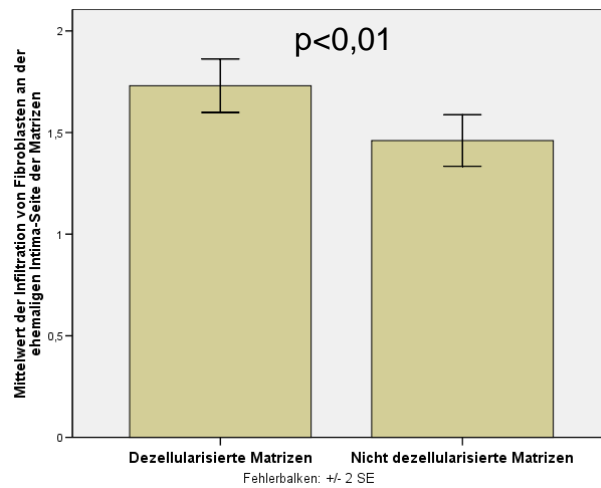


Abbildung 35, Fibroblasten- Infiltration unter der ehemaligen Intimaseite bei dezellularisierten und nicht dezellularisierten Matrizen (jeweils n=120)

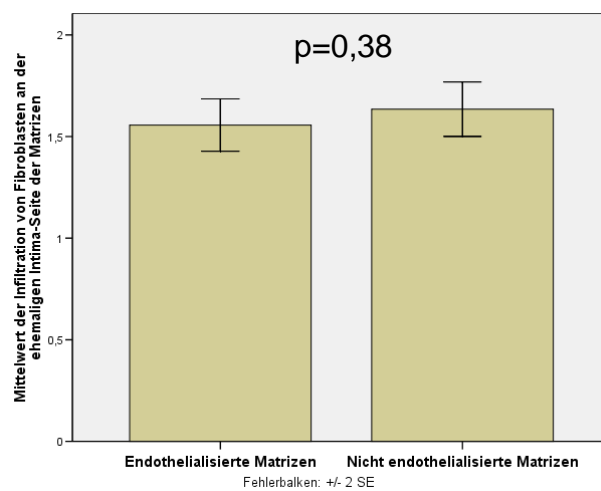


Abbildung 36, Fibroblasten- Infiltration unter der ehemaligen Intimaseite bei endothelialisierten und nicht endothelialisierten Matrizen (jeweils n=120)

## 5 Diskussion

### 5.1 Allgemeines

Tissue Engineering beruht auf dem Prinzip mit Hilfe körpereigener Zellen lebensfähiges Gewebe zu produzieren. Dieses Gewebe soll die Eigenschaften des zu ersetzenden Gewebes haben, um so dessen Aufgaben komplett erfüllen zu können. Es ist eine Methode, welche in vielen Gebieten der Medizin mit großem Interesse erforscht wird [Langer et al, 93; Sawa et al, 08]. Besonders auf dem Gebiet von ossären und chondralen Gewebe zeigen sich schon seit langem sehr gute Resultate [Vacanti et al, 94; Sawa et al, 08]. Ebenso wird an der Entwicklung von Blutgefäßen, welche nach den Prinzipien des Tissue Engineering hergestellt werden, geforscht [Sawa et al, 08].

Auch im Bereich von Herzklappen werden intensive Nachforschungen angestellt [Schoen et al, 99]. Dabei versucht man eine der natürlichen Klappe möglichst ähnliche vitale Prothese entstehen zu lassen. Sie soll so die Möglichkeit zur Regeneration haben und somit auch Anpassungsmöglichkeiten an Veränderungen im Blutkreislauf aufweisen. Damit kann eine langfristige Haltbarkeit der Klappen erreicht werden. Weiterhin soll ein Wachstumspotential vorhanden sein, welches vor allem im pädiatrischen Patientenkreis wichtig ist, um häufige Re-Operationen während des Wachstumsprozesses der Kinder zu vermeiden [Mayer, Jr. et al, 97].

Zwei Faktoren spielen bei der Herstellung einer solchen Klappe eine hervorgehobene Rolle. Dies ist zum einen die Matrize, welche als Grundgerüst für die Entstehung des später komplett autologen Gewebes im Verlauf des Tissue Engineering verwendet wird. Dabei ist besonders wichtig, dass keine immunologischen Reaktionen hervorgerufen werden und eine problemlose Migration autologer Zellen stattfinden kann. Diese infiltrierenden Zellen, welche für den Abbau und die Neubildung der extrazellulären Matrix und damit der Umgestaltung der Matrix zum autologen Gewebe zuständig sind, sind der zweite bedeutsame Punkt. Beide Faktoren stehen natürlich im engen Zusammenhang und beeinflussen sich gegenseitig.

## 5.2 Dezellularisation

Als Matrix für die Entstehung autologen Gewebes wird in dieser Arbeit aufgrund weiter oben aufgeführter Vorteile xenogenes Gewebe verwendet, wie es schon dezellularisiert in vivo mit exzellenten Ergebnissen angewendet wird [Dohmen et al, 02a]. Den Einfluss der Dezellularisation auf das xenogene Gewebe im subkutanen Rattenmodell zu verdeutlichen, ist eines der Ziele dieser Arbeit.

Eine der grundlegenden Voraussetzungen für ein Dezellularisationsverfahren welches beim Tissue Engineering verwendet wird, ist die Möglichkeit die Migration verschiedener Zellen zu erlauben. In diesem Versuch zeigt sich, dass die dezellularisierten Matrizen mit autologen Zellen, insbesondere der für die Bildung der extrazellulären Matrix besonders wichtigen Fibroblasten, infiltriert werden. Somit entsteht durch die Dezellularisierungsmethode keine zelltoxische Wirkung, wie sie für andere Fixierungsmethoden, wie zum Beispiel Glutaraldehyd, welches eine zelluläre Infiltration inhibiert, beschrieben wird [Eybl et al, 89].

In den dezellularisierten Matrizen beobachtet man schon bei der makroskopischen Begutachtung weniger Entzündungszeichen. Auch mikroskopisch spiegelt sich dies in einer in geringerem Maße ausgeprägten Infiltration mit Leukozyten, insbesondere mit CD 68 positiven Zellen wieder. CD 68 positive Zellen, das heißt Monozyten und Makrophagen, sind als phagozytierende und Antigen-präsentierende Zellen, primäre Bestandteile bei Entzündungsreaktionen beziehungsweise Fremdkörperreaktionen. Man kann sie damit als Korrelat der Stärke der Entzündungsreaktion ansehen [Pulford et al, 89]. Makrophagen sind auch in der Lage die Apoptose anderer Zellen einzuleiten. Die entstandenen Zellrückstände können dann eine weitere inflammatorische Reaktion hervorrufen [Coito et al, 96; Cunanan et al, 01] und auch als Substrat für eine Kalzifikation dienen [Aikawa et al, 07]. Die signifikante Verminderung der Entzündungsreaktion bei den dezellularisierten Matrizen kann also auf die Reduktion der immunogenen Strukturen zurückgeführt werden. Diese Herabsetzung der Antigenität wird durch die von Erdbrügger et al. beschriebene Entfernung aller zellulären Komponenten bei dieser Dezellularisierungsmethode möglich [Erdbruegger et al, 06]. Natürlich ist

aber auch zu beachten, dass sich im peripheren Blut in geringem Maße monozytäre Zellen befinden, welche endotheliale Charakteristika aufweisen [Asahara et al, 97]. Diese Progenitorzellen können im Tiermodell isoliert werden und zeigen nach Kultivierung Oberflächenmoleküle von Endothelzellen sowie ein größeres Wachstumspotential als isolierte Endothelzellen [Wu et al, 05]. Somit könnten mononukleäre Zellen zum Teil auch wichtige Bestandteile der Rezellularisation von dezellularisiertem Gewebe sein. Aufgrund dieser Tatsache werden mit solchen Progenitorzellen besiedelte pulmonale Allografts auch schon klinisch mit guten Ergebnissen eingesetzt [Cebotari et al, 06].

In den dezellularisierten Matrizen können keine Kalziumablagerung nachgewiesen werden, das heißt kein positives Von Kossa Präparat zeigt sich in dieser Gruppe. Bei mit Glutaraldehyd fixiertem Gewebe kann im Gegensatz dazu eine starke Kalzifikation im subkutanen Rattenmodell nachgewiesen werden [Mako et al, 99]. Cunanan et al. berichten, dass Phospholipide als zelluläre Rückstände in direktem Zusammenhang mit dem Ausmaß der Kalzifikation stehen [Cunanan et al, 01]. Aikawa et al. demonstrieren einen Zusammenhang zwischen inflammatorischer Reaktion und Kalzifikation, das heißt ein voranschreitender Prozess von Osteogenese kann in von einer Entzündungsreaktion betroffenen Aortenklappe gefunden werden [Aikawa et al, 07]. Die verminderte Entzündungsreaktion kann also das Fehlen einer Kalzifikation in diesem Versuch bedingen. Genauso spricht in diesem Zusammenhang also eine verringerte Kalzifikation auch für eine gute Beseitigung zellulärer Rückstände in den dezellularisierten Matrizen.

Auffällig ist die verstärkte Entzündungsreaktion und Auflösung der extrazellulären Matrix an der Schnittkante der Matrize. Bei Implantation von mit der hier verwendeten Dezellularisationsmethode behandelten Herzklappen in den rechtsventrikulären Ausflusstrakt von Schafen und Menschen zeigt sich diese Reaktion nicht [Dohmen et al, 02b]. Die Positionierung der Klappe im Blutkreislauf beziehungsweise die bessere Blutversorgung scheint also diese Reaktion zu verhindern und die subkutane Lage der Matrizen ausschlaggebend für diesen Unterschied zu sein.

Bei nativen bovinen im Gegensatz zu porcinen Kollagen werden inflammatorische Reaktionen schon beschrieben [Kawalec-Carroll et al, 06].

Allaire et al. erkennen, dass auch die porcine extrazelluläre Matrix selbst, welche jedoch mit einem anderen Dezellularisierungsverfahren behandelt wird, ein immunogenes Potential hat [Allaire et al, 97]. Abraham et al. sehen jedoch nach Anwendung wiederum eines anderen Dezellularisierungsverfahrens keine immunologische Reaktion auf porcines dezellularisiertes Kollagen [Abraham et al, 00]. Es scheinen also relevante Unterschiede zwischen den verschiedenen Verfahren zu bestehen. Bei nativen, das heißt unbehandelten xenogenen Kollagen beschreiben Lynn et al. keine Antigenität, jedoch bestehen immunologische Reaktionen an denaturierten und zerstörten Kollagenanteilen als auch an den Enden der Kollagenhelix [Lynn et al, 04]. An Kollagenschnittstellen beziehungsweise Bruchstellen wird in diesem Versuch damit vermehrt antigenes Material freigelegt, was die verstärkte Infiltration monozytärer Zellen hervorrufen könnte. Diese intensivere zelluläre Infiltration konnten Courtman et al. durch Quervernetzung und somit Maskierung der Antigene von dezellularisiertem xenogenem Gewebe signifikant vermindern [Courtman et al, 01]. Die Dezellularisierungsmethode dieser Gruppe unterscheidet sich jedoch von der hier durchgeführten.

Eine weitere Erklärung für die verstärkte Infiltration an den Schnittkanten der Matrizen könnte die fehlende Quervernetzung der Kollagenstruktur sein. Durch die Dezellularisierung des Gewebes kommt es dadurch zu keiner Versteifung der Matrix und zu keiner Zunahme der Brüchigkeit des Kollagengerüsts. Folgerichtig kommt es zu einer Verbesserung der Hämodynamik derartig hergestellter Herzklappen im Vergleich zu Polyurethan-Prothesen und mit Glutaraldehyd fixierten Prothesen [Dohmen et al, 02c]. Des Weiteren ist durch die fehlende Quervernetzung und die nicht vorhandene Toxizität von Glutaraldehyd eine leichtere Migration von autologen Zellen durch die normale extrazelluläre Struktur gewährleistet. Allerdings ist an den Schnittkanten als negative Folge der fehlenden Quervernetzung dadurch der extrazelluläre Zusammenhalt aufgehoben und es kann, neben der schon oben aufgeführten weiteren Freilegung antigener Strukturen, zu einer sich fortsetzenden Auflösung des Kollagengerüsts kommen. Da diese Reaktion bei Implantation derartig dezellularisierter Matrizen im rechtsventrikulären Ausflusstrakt von Schafen nicht auftritt [Dohmen et al, 02b], könnte aber auch hier die subkutane Lage der

Matrizen den Grund für die verstärkte zelluläre Infiltration darstellen.

Natürlich sind die verschiedenen Dezellularisationsprozesse, bedingt durch andere Methoden der zellulären Extraktion, dabei unterschiedlich zu betrachten. Zum Beispiel scheint die SynerGraft® Technologie strukturelle Veränderungen an der Extrazellulärmatrix hervorzurufen, wohingegen die Dezellularisierungsmethode unserer Gruppe dies nicht induziert [Dohmen et al, 08].

In der Färbung der infiltrierenden Fibroblasten werden die Zellen dargestellt, welche für das Ziel ein regenerationsfähiges autologes Gewebe entstehen zu lassen, essentiell sind. Fibroblasten sind niedrig differenzierte Zellen mit der Fähigkeit sich in verschiedene andere Zelltypen umzuwandeln. Ihre Migration ins Gewebe kann aus mehreren Gründen und auf verschiedene Arten erfolgen.

Optimal wäre die Migration und Ansiedlung der Zellen an den Orten, wo vor der Dezellularisierung die ursprünglichen Fibroblasten ansässig waren und die Übernahme derer Aufgaben zur Aufrechterhaltung und Erneuerung des Gewebes. Natürlich ist aber in diesem Modell selbst bei Migration der Fibroblasten an diese Orte nicht sichergestellt, dass durch die eingewanderten Zellen die komplizierte Anatomie einer Herzklappe aufrechterhalten werden kann. Dazu werden von unserer Gruppe Versuchsaufbauten gewählt, welche die Hämodynamik berücksichtigen. In vitro kann im Bioreaktor eine hervorragende Hämodynamik dezellularisierter Prothesen nachgewiesen werden [Dohmen et al, 02c] und auch im Schafsmodell lässt sich eine exzellente Funktion von dezellularisierten Prothesen im rechtsventrikulären Ausflusstrakt beobachten [Dohmen et al, 03].

Ein weiterer Grund für die Infiltration von Fibroblasten ist eine Entzündungsreaktion. Dabei kommt es aus verschiedenen Gründen zur Migration von Fibroblasten, zum Beispiel zur Abkapselung eines Entzündungsgeschehens oder auch zur Bindegewebsbildung in phagozytierten Arealen.

Die genaue Beurteilung der Art und Weise der Migration von Fibroblasten kann in dieser Färbung nicht durchgeführt werden. Durch Mitbeurteilung der anderen Färbungen können aber verschiedene Zusammenhänge dargestellt werden.

Beim Vergleich der Ergebnisse der CD 68 Färbung und der Fibroblasten Färbung fällt auf, dass Fibroblasten verstärkt in den stark mit CD 68 positiven Zellen besiedelten Matrizen vorkommen (siehe Abbildungen 28, 29 und 33).

Besonders bei den nicht dezellularisierten und unbehandelten Matrizen ist dieser Zusammenhang deutlich. Hier scheint die Infiltration mit Fibroblasten also eher im Zusammenhang mit einer Entzündungsreaktion zu stehen.

Im Gegensatz dazu liegt die Vermutung nahe, dass die Infiltration mit Fibroblasten in den dezellularisierten Matrizen eher gerichtet dem Wiederaufbau des Gewebes dient. Hier tritt nämlich ein verstärktes Einwachsen von Fibroblasten trotz geringer monozytärer Aktivität auf (siehe Abbildungen 29 und 35).

Genaue Aussagen über diese verschiedenartigen Infiltrationswege können sich aus diesem Versuchsaufbau jedoch nicht ableiten lassen.

### **5.3 Endothelzellbesiedlung**

Um die besonderen Aufgaben der Endothelzellen, die schon weiter oben aufgeführt worden [Ishihara et al, 81; Liao et al, 93], zu untersuchen, wird in diesem Versuch vor der Implantation eine Besiedlung der Matrizen mit autologen Endothelzellen in vitro vorgenommen. Damit soll erreicht werden, dass vor der Implantation der Matrizen eine autologe Zellschicht auf den Matrizen etabliert wird, welche das Fremdgewebe als Schutzschicht umgibt. Die Bildung dieser Endothelzellschicht haben wir vor der Implantation durch eine Giemsa-Färbung gesichert (siehe 4.2.1). Dohmen et al. zeigen im Schaffsmodell, dass in vivo eine durchgängige Endothelzellschicht entstehen kann, welche einer autologen Barriere entspricht [Dohmen et al, 03]. Auch beim Menschen kann die Bildung einer konfluenten Endothelzellschicht gezeigt und des Weiteren die Rezellularisation der Extrazellulärmatrix nachgewiesen werden [Dohmen et al, 07].

Das Wachstum von Endothelzellen wird durch das umliegende Gewebe gesteuert. Verschiedene zelluläre und extrazelluläre Faktoren, unter denen sich der „vascular endothelial growth factor“ hervorhebt, nehmen dabei eine wichtige Rolle ein [Ferrara, 01]. Durch die von Butcher et al. beschriebene Abhängigkeit von Struktur und Funktion spielt auch die mechanische Belastung beim Wachstum und der Anordnung der Endothelzellen eine bedeutende Rolle [Butcher et al, 07]. Somit wird eine optimale Anpassung der Endothelzellen an das umliegende Gewebe erreicht.

In diesem Versuch im subkutanen Rattenmodell kann man nach Explantation



der Matrizen keine komplette Endothelzellschicht nachweisen. Anstelle dessen zeigt sich aber, dass um die mit Endothelzellen beschichteten Matrizen eine erhöhte Dichte an Blutgefäßen besteht. Dies kann am ehesten als Anpassungsreaktion an die Verhältnisse im Gewebe gesehen werden. Die Matrizen liegen in diesem Versuch im Gegensatz zur Publikation von Dohmen [Dohmen et al, 03] nicht im direkten Blutfluss. Somit werden vom umliegenden Gewebe andere Wachstumsimpulse gegeben, wodurch es nicht zur Bildung einer abgrenzenden Endothelzellschicht kommt. Es bildet sich vielmehr, durch die Lage im subkutanen Gewebe ohne direkte Verbindung zum Blutfluss, eine höhere Anzahl von Blutgefäßen. Dies kann man mit den für die Funktion und Regeneration von Gefäßen wichtigen Vasa vasorum [Ritman et al, 07] vergleichen. Diese Gefäße, welche die Blutversorgung von stärkeren Gefäßwänden übernehmen sind natürlich auch essentielle Bestandteile im dezellularisierten Gewebe von Gefäßwänden. Es wird so die Blutversorgung gesteigert und eine bessere zelluläre Migration ist möglich. Dadurch kann eine bessere Integration der Matrize ins Gewebe erfolgen.

Aus diesen Resultaten lässt sich schlussfolgern, dass die im subkutanen Rattenmodell aufgebrauchten Endothelzellen nicht zu einer autologen Zellschicht um die implantierten Matrizen führen, sondern eine verstärkte Blutgefäßbildung bedingen. Das heißt um die Bildung einer Endothelzellschicht auf den Matrizen zu erreichen muss direkter Blutkontakt vorhanden sein. Aussagen über die Funktion einer solchen Endothelzellschicht auf dezellularisierte xenogene Matrizen müssen dementsprechend in einem derartigen Versuchsaufbau untersucht werden.

#### **5.4 Pulmonalarteriell und aortales Gewebe**

Verschiedene Arten von xenogenen Gewebe werden aktuell als Matrizen für das Tissue Engineering verwendet, wobei aktuell keine optimale Lösung vorhanden ist. Die Unterschiede zwischen pulmonalarteriellen und aortalen Gewebe sind bis jetzt noch nicht ausreichend evaluiert und sollen in diesem Versuch dargestellt werden.

Schon makroskopisch zeigt sich eine verstärkte inflammatorische Reaktion um die pulmonalarteriellen Matrizen. Des Weiteren fällt eine verstärkte zelluläre,

hauptsächlich leukozytäre Infiltration in diesem Gewebe auf. Wobei dies in einer relativen Skala angegeben ist, welche durch die geringere Dicke der pulmonalarteriellen Matrizen verfälscht wird. Die Infiltration mit CD 68 positiven Zellen ist jedoch in einer absoluten Skala angegeben und auch dort zeigt sich eine erhöhte Infiltration. Dies kann, wie weiter oben beschrieben, als Korrelat einer verstärkten Entzündungsreaktion, aber auch als Teil des Heilungsprozesses angesehen werden. Ebenso ist die Infiltration mit Fibroblasten in den pulmonalarteriellen Matrizen erhöht. Auch dies kann, wie weiter oben beschrieben, als Korrelat einer verstärkten Entzündungsreaktion, aber auch als Teil des Heilungsprozesses angesehen werden. In Zusammenhang mit der verstärkten Infiltration von CD 68 positiven Zellen spricht dies aber am ehesten für einen Vorgang im Sinne einer Entzündungsreaktion. Auch der zeitliche Ablauf mit einem Maximum der Infiltration in der ersten Phase nach Implantation der Matrizen und einer Regredienz im Verlauf (siehe 4.3.1) sprechen für eine ablaufende inflammatorische Reaktion. Bei den endothelialisierten Matrizen zeigt sich eine verminderte zelluläre und makrozytäre Infiltration. Bedingt durch die verbesserte Blutversorgung aufgrund der schon beschriebenen erhöhten Blutgefäßbildung ist ein schnellerer Abbau antigenen Materials möglich. Somit könnte nach einer Implantationsdauer von 2 Wochen eine schwächere monozytäre Infiltration vorliegen, da ein großer Anteil antigenen Strukturen schon abgebaut ist und somit die Infiltration mit Monozyten bereits wieder rückläufig ist.

Rieder et al. konnten zeigen, dass auf eine unterschiedliche Art dezellularisiertes porcines pulmonalarteriell Gewebe andere Proteine als humanes dezellularisiertes Gewebe aufweist und somit eine stärkere Migration von U 937 monozytären Zellen hervorruft [Rieder et al, 05]. Dies zeigt sich trotz einer nachgewiesenen kompletten Entfernung aller zellulären Bestandteile. Nicht zelluläre Bestandteile, wie die schon aufgeführten antigenen Strukturen an xenogenem Kollagen, müssen also für die verstärkte monozytäre Infiltration verantwortlich sein. Natürlich ist dies immer abhängig von Ursprung des xenogenen Gewebes und der Dezellularisierungsmethode zu sehen. Der Aufbau pulmonalarteriellen und aortalen Gewebes unterscheidet sich aber in jedem Falle aufgrund der unterschiedlichen Hämodynamik im jeweiligen

Kreislauf. So bestehen zum Beispiel unterschiedliche Anteile von Kollagen und Elastin [Plank et al, 80]. Naso et al. beschreiben nach Anwendung einer wiederum anderen Dezellularisierungsmethode eine unterschiedliche Proteinzusammensetzung aortaler und pulmonalarterieller dezellularisierter Matrizen sowie eine instabile Kollagenfraktion im pulmonalarteriellen Gewebe [Naso et al, 08]. Dieses veränderte antigene Potential könnte auch in diesem Versuch für die verstärkte Entzündungsreaktion in den pulmonalarteriellen Matrizen verantwortlich sein. Weitere Untersuchungen sollten unternommen werden, um dieses Ergebnis zu verifizieren und mögliche Ursachen aufzuzeigen.

## **5.5 Subkutanes Rattenmodell**

Das subkutane Rattenmodell ist ein etabliertes Modell zur Bearbeitung verschiedener Fragestellungen, zum Beispiel um Kalzifikationen im Gewebe zu beurteilen [Mako et al, 97], um zelluläre Rückstände im Gewebe zu bestimmen [Cunanan et al, 01] oder um zelluläre Infiltration zu beurteilen [Abolhoda et al, 96]. Die Gewinnung von Endothelzellen und die Implantation beschichteter Matrizen werden in dieser Weise in diesem Modell noch nicht durchgeführt und sollen hier evaluiert werden.

Die Narkose der Versuchstiere mit intraperitoneal appliziertem Thiopental ist sehr einfach durchzuführen und es zeigen sich bei keiner der Ratten schwerwiegende Nebenwirkungen.

Die operative Gewinnung von Endothelzellen wird hier erstmals beschrieben und ist gemeinsam mit der späteren Kultivierung in der hier angegebenen Weise als unproblematisch anzusehen. Die Besiedlung der Matrizen ist unkompliziert und durch eine Giemsa-Färbung kann eine konfluente Endothelzellschicht vor der Implantation nachgewiesen werden. Auch die Implantation und Explantation der Matrizen sind nach Erlangen der operativen Fertigkeiten in diesem Kleintiermodell in Kürze durchführbar.

Das Aufarbeiten der Präparate und Herstellen histologischer Präparate gestaltet sich ebenfalls unproblematisch. Allerdings ist die Auswertung der Präparate mit einigen Herausforderungen verbunden. Diese sind bedingt durch die Integration der Matrizen in die Subkutis und eine in einigen Fällen nur schwierige Differenzierung zwischen Matrizen und subkutanen Gewebe.

Zelluläre Infiltrationen sind einfach durch die oben aufgeführten Skalen erfassbar und somit sehr gut zu beurteilen. Eine in vitro Besiedlung der Matrizen mit Endothelzellen resultiert in diesem Modell jedoch nicht im Nachweis einer Endothelzellschicht bei Explantation. Dies ist ursächlich auf die Lage der Matrizen im subkutanen Gewebe, anstatt im Blutfluss, zurückzuführen. Es zeigt sich stattdessen eine verstärkte Bildung von Blutgefäßen. Zur Beurteilung einer eventuellen Wirkung der Endothelzellschicht als physiologische Schutzbarriere sollten demnach andere Versuchsaufbauten gewählt werden.

## **5.6 Einschränkungen**

Jedes Modell kann nur, je nach Versuchsaufbau, näherungsweise die Realität widerspiegeln und somit nur teilweise valide Daten liefern. Somit ist es nur für bestimmte Fragestellungen geeignet und dadurch auch mit Limitierungen verbunden.

In diesem Modell werden die Versuche zur Vereinfachung der Auswertung bei Lewis-Ratten, welche nahezu genetisch identisch sind, durchgeführt. Allerdings bestehen natürlich trotz dessen geringe Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchstieren. Auch vergleichend zu anderen Spezies bestehen natürlich Unterschiede, welche Einfluss auf den Versuch nehmen [Meuris et al, 03]. Außerdem fehlt die Wirkung direkten Blutkontaktes und des arteriellen Druckes, welche die Reaktion auf die Matrizen verändert [Ozaki et al, 03]. Somit ist natürlich keine akkurate Simulation der Prozesse im menschlichen Körper möglich.

Des Weiteren ist im subkutanen Modell keine eindeutige Grenze zwischen der implantierten Matrize und dem umliegenden Gewebe zu erkennen, was die Auswertung erschwert und auch verfälschen kann. Die Auswertungen der Infiltrationstiefe der verschiedenen Zelltypen und auch der Blutgefäßdichte bei den verschiedenen Präparaten wurde durch eine für diesen Versuch festgelegte Skala durchgeführt. Die Wahl der Abstufung der Skala hat natürlich genauso Einfluss auf das Ergebnis wie eine mögliche Verzerrung durch den jeweiligen Untersucher und muss bei der Bewertung der Ergebnisse in Betracht gezogen werden.

## 6 Zusammenfassung

### ***Einleitung:***

Der Ersatz von Herzklappen mittels biologischer Prothesen ist der in Deutschland häufigste Eingriff an Klappenapparat des Herzens. Die verwendeten Prothesen sind mit mehreren Problemen, wie Degeneration, Kalzifikation, fehlender Wachstums- und Regenerationsmöglichkeit und damit einer hohen Re-Operationsrate verbunden. Das Tissue Engineering, welches in den letzten Jahren im Mittelpunkt vieler Forschungsvorhaben steht, stellt eine viel versprechende Methode dar, um diese Probleme zu lösen. Dabei versucht man mit Hilfe körpereigener Zellen autologes Gewebe nachzubilden. Dadurch soll eine der natürlichen Herzklappe möglichst ähnliche, regenerationsfähige Prothese entstehen. Bis jetzt steht noch keine ideale Matrize zur Verfügung, welche als Grundgerüst für die Entstehung der Klappe dient. Des Weiteren ist auch noch nicht klar, durch welche autologen Zellen die Re-Population der Matrizen und auf welchem Wege diese erfolgen soll. Aktuell zeigt sich dezellularisiertes xenogenes Gewebe, aufgrund einer intakten extrazellulären Matrix, als beste Alternative.

### ***Methoden:***

In der Arbeit wird der Einfluss von Dezellularisation und autologer Endothelzellbesiedlung auf porcine Matrizen im subkutanen Rattenmodell beschrieben. Dazu werden aortale und pulmonalarterielle porcine Gewebestücke verwendet. Diese werden zum Teil dezellularisiert und mit Endothelzellen, welche aus der Vena jugularis der jeweiligen Versuchstiere isoliert sind, besiedelt. Nach Explantation und makroskopischer Begutachtung der Matrizen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Implantation (2, 4 und 6 Wochen) wird eine Hämatoxylin-Eosin Färbung zur Beurteilung der zellulären Infiltration durchgeführt. Eine Färbung CD 68 positiver Zellen (Makrophagen und Monozyten) wird durchgeführt um inflammatorische Prozesse darzustellen. Des Weiteren werden Fibroblasten, als wesentliche an der Neubildung der extrazellulären Matrix beteiligte Zellen, angefärbt und eine Von Kossa Färbung wird durchgeführt, um Kalzifikationsherde aufzuzeigen.

### ***Ergebnisse:***

Makroskopisch zeigt sich um die nicht dezellularisierten, als auch um die pulmonalarteriellen Matrizen eine stärkere Entzündungsreaktion. Auch in der Hämatoxylin-Eosin Färbung sieht man eine signifikant stärkere zelluläre Infiltration dieser Matrizen. Dabei stellen sich die Zellen als hauptsächlich leukozytären Ursprungs dar. Dies wird auch in der verstärkten Infiltration der nicht dezellularisierten und der pulmonalarteriellen Matrizen mit CD 68 positiven Zellen verdeutlicht. Bei Begutachtung der histologischen Präparate fällt auch eine verstärkte zelluläre Infiltration an den Schnittkanten der Gewebestücke auf. In der Färbung der Fibroblasten sieht man eine signifikant stärkere Infiltration der dezellularisierten Matrizen, als auch der Matrizen in denen eine verstärkte leukozytäre Infiltration vorliegt. Um die endothelialisierten Matrizen kann keine Endothelzellschicht nachgewiesen werden. Anstelle dessen zeigt sich aber eine verstärkte Bildung von Blutgefäßen. Die Von Kossa Färbung zeigt keine Kalzifikation in den dezellularisierten Matrizen, dagegen aber in den nicht dezellularisierten Matrizen.

### ***Schlussfolgerung:***

Um dem Ziel eines langfristig kompetenten Herzklappenersatzes möglichst nahe zu kommen, sollte beim Tissue Engineering schlussendlich rein autologes Gewebe entstehen. Fibroblasten sind für die Neubildung der extrazellulären Matrix verantwortlich und damit essentiell für den Aufbau regenerationsfähigen Gewebes. In der Arbeit zeigt sich eine gute Infiltration der dezellularisierten Matrizen mit diesen Zellen. Eine für die Anforderungen im Blutkreislauf suffiziente Gewebsregeneration und Neubildung kann in diesem subkutanen Modell allerdings nicht beurteilt werden. In den dezellularisierten Matrizen kann aufgrund der reduzierten zellulären und monozytären Infiltration von einer verminderten inflammatorischen Reaktion ausgegangen werden. Somit ist durch die Dezellularisierung eine Verminderung der Antigenität des Gewebes erreicht worden. Trotz dessen findet sich auch in diesen Matrizen eine verstärkte Infiltration an den Schnittkanten, was für eine Freilegung antigener Strukturen spricht, aber auch durch die subkutane Lage der Gewebestücke bedingt sein könnte. Die verstärkte Infiltration der pulmonalarteriellen Matrizen

spricht für eine höhere Antigenität pulmonalarteriellen porcinen Gewebes im Gegensatz zu aortalen porcinen Gewebe und sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Kalzifikation ist eines der Hauptprobleme biologischer Herzklappenersatzes und als Ausdruck verschiedener Probleme, wie zum Beispiel zellulärer Rückstände und inflammatorischer Vorgänge, anzusehen. Die komplette Entfernung von Zellbestandteilen wurde für diese Dezellularisierungsmethode schon beschrieben und eine Reduktion der Antigenität konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden. Dies spiegelt sich in der hier fehlenden Kalzifikation dezellularisierter Matrizen wieder. Die verstärkte Bildung von Blutgefäßen nach in vitro Endothelzellbesiedlung in diesem Versuch scheint durch die subkutane Lage der Matrizen und die Beeinflussung der Zellen durch das umliegende Gewebe bedingt zu sein. Das Tiermodell ist aus diesem Grund nicht geeignet, um die Auswirkung einer konfluenten Endothelzellschicht darzustellen.

## 7 Abstract

### ***Background:***

Biological heart valve replacements are the mainly and increasingly used prostheses in Germany. They are associated with certain problems like degeneration, calcification and lack of regenerative or growing potential. Tissue engineering is a promising approach to overcome these problems by creating viable tissue using autologous cells. Key for creating tissue engineered heart valves are optimal scaffolds, showing good bio-compatibility and allowing in vivo assembling of heart valves, which have regenerative potential. Decellularized tissue seems, due to intact extra-cellular matrix, the best alternative. Repopulation of the decellularized tissue is possible in vitro and in vivo, but until now without knowing which way is beneficial.

### ***Methods:***

In this study we want to evaluate the impact of decellularization and endothelial-cell-coating to porcine tissue. Therefore aortic and pulmonic porcine tissue specimens are used, which are in parts decellularized and coated with endothelial cells. 30 Lewis rats are investigated using the subdermal model. After explantation and gross examination of the tissue specimens Haematoxylin/Eosin-staining, Von-Kossa-staining, CD-68-positive-cell-staining, von-Willebrand-Factor-staining and Fibroblast-staining is performed and quantitative evaluations conducted.

### ***Results:***

In gross examination we see stronger inflammatory reaction surrounding decellularized and pulmonic tissue. Histological evaluation in Haematoxylin/Eosin staining shows significant decrease of inflammatory reaction (confirmed by staining for monocytes/ macrophages) in aortic and pulmonic scaffolds after decellularization. Significantly less inflammatory response ( $p < 0.05$ ) can also be seen in aortic as compared to pulmonic tissue. Besides this, stronger inflammatory reaction imposes at the cutting edge of all specimens. Fibroblasts could be detected in all specimens with strongest infiltration in decellularized



scaffolds and in specimens with increased inflammatory reaction. Surrounding the tissue specimens, which were coated with endothelial cells, no monolayer of endothelial cells can be found, but a significant increase of blood vessels imposes. Von Kossa staining shows no calcification in decellularized in contrast to non-decellularized tissue.

***Conclusion:***

To create viable heart valves, fibroblasts are essential, as producers of the extracellular matrix. Infiltration of decellularized tissue with these cells is shown, but of course the functionality of the tissue can not be displayed in this subdermal model. Results indicate that decellularization reduces inflammatory response of both, pulmonic and aortic tissue, what could be cause for the absence of calcification in decellularized tissue. But pulmonic tissue shows even if decellularized a higher inflammatory potential than aortic tissue. The reason could be a different configuration in the extra-cellular assembling and therefore more antigenic structures. Increased inflammatory reaction is seen at cutting edges of the specimens. Destroyed collagen or a disintegration of the extra-cellular matrix possibly induces this. But also the subdermal location of the specimens could account for this as we do not see this reaction in study setups where decellularized heart valves are implanted directly in blood circulation. The lack of an endothelial monolayer and increased blood vessel density of in vitro endothelialized specimens is most probably due to the subdermal position of the tissue specimens. Therefore effects of an endothelial layer need to be investigated in different study setups.

## 8 Literaturverzeichnis

- [1] Abolhoda, A.; Yu, S.; Oyarzun, J. R. et al (1996): No-react detoxification process: a superior anticalcification method for bioprostheses, *Ann.Thorac.Surg.* 62 [6], Seite 1724-1730. URL: PM:8957377
- [2] Abraham, G. A.; Murray, J.; Billiar, K. et al (2000): Evaluation of the porcine intestinal collagen layer as a biomaterial, *J.Biomed.Mater.Res.* 51 [3], Seite 442-452. URL: PM:10880087
- [3] Aikawa, E.; Nahrendorf, M.; Sosnovik, D. et al (2007): Multimodality molecular imaging identifies proteolytic and osteogenic activities in early aortic valve disease, *Circulation* 115 [3], Seite 377-386. URL: PM:17224478
- [4] Allaire, E.; Bruneval, P.; Mandet, C. et al (1997): The immunogenicity of the extracellular matrix in arterial xenografts, *Surgery* 122 [1], Seite 73-81. URL: PM:9225918
- [5] Asahara, T.; Murohara, T.; Sullivan, A. et al (1997): Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis, *Science* 275 [5302], Seite 964-967. URL: PM:9020076
- [6] Bader, A.; Schilling, T.; Teebken, O. E. et al (1998): Tissue engineering of heart valves--human endothelial cell seeding of detergent acellularized porcine valves, *Eur.J.Cardiothorac.Surg* 14 [3], Seite 279-284. URL: PM:9761438
- [7] Badylak, S. F. (2002): The extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction, *Semin.Cell Dev.Biol.* 13 [5], Seite 377-383. URL: PM:12324220
- [8] Bai, Y.; Muragaki, Y.; Obata, K. et al (1986): Immunological properties of monoclonal antibodies to human and rat prolyl 4-hydroxylase, *J.Biochem.* 99 [6], Seite 1563-1570. URL: PM:3017922
- [9] Barratt-Boyes, B. G.; Lowe, J. B.; Cole, D. S. et al (1965): Homograft valve replacement for aortic valve disease, *Thorax* 20 [6], Seite 495-504. URL: PM:5862747
- [10] Bashkin, P.; Doctrow, S.; Klagsbrun, M. et al (1989): Basic fibroblast growth factor binds to subendothelial extracellular matrix and is released by heparitinase and heparin-like molecules, *Biochemistry* 28 [4], Seite 1737-1743. URL: PM:2541764
- [11] Bell, L. und Madri, J. A. (1989): Effect of platelet factors on migration of cultured bovine aortic endothelial and smooth muscle cells, *Circ.Res.* 65 [4], Seite 1057-1065. URL: PM:2791219
- [12] Bernacca, G. M.; Dimitri, W. R.; Fisher, A. C. et al (1992): Chemical modification of bovine pericardium and its effect on calcification in the rat subdermal model, *Biomaterials* 13 [6], Seite 345-352. URL: PM:1610957
- [13] Björk VO (1969): A new tilting disc valve prosthesis, *Scand.J.Thorac.Cardiovasc.Surg.* [3], Seite 1-10.
- [14] Bloomfield, P.; Wheatley, D. J.; Prescott, R. J. et al (1991): Twelve-year comparison of a Bjork-Shiley mechanical heart valve with porcine bioprostheses, *N.Engl.J.Med.* 324 [9], Seite 573-579. URL: PM:1992318
- [15] Broom, N. D. (1978): Fatigue-induced damage in glutaraldehyde-preserved heart valve tissue, *J.Thorac.Cardiovasc.Surg.* 76 [2], Seite 202-211. URL: PM:98672
- [16] Broom, N. D. (1980): An 'in vitro' study of mechanical fatigue in glutaraldehyde-treated porcine aortic valve tissue, *Biomaterials* 1 [1], Seite 3-8.

URL: PM:6781550

[17] Butcher, J. T.; McQuinn, T. C.; Sedmera, D. et al (2007): Transitions in early embryonic atrioventricular valvular function correspond with changes in cushion biomechanics that are predictable by tissue composition, *Circ.Res.* 100 [10], Seite 1503-1511. URL: PM:17478728

[18] Cannegieter, S. C.; Rosendaal, F. R. und Briet, E. (1994): Thromboembolic and bleeding complications in patients with mechanical heart valve prostheses, *Circulation* 89 [2], Seite 635-641. URL: PM:8313552

[19] Carpentier, A.; Deloche, A.; Relland, J. et al (1974): Six-year follow-up of glutaraldehyde-preserved heterografts. With particular reference to the treatment of congenital valve malformations, *J.Thorac.Cardiovasc.Surg.* 68 [5], Seite 771-782. URL: PM:4214526

[20] Carpentier, A.; Lemaigre, G.; Robert, L. et al (1969): Biological factors affecting long-term results of valvular heterografts, *J.Thorac.Cardiovasc.Surg* 58 [4], Seite 467-483. URL: PM:5344189

[21] Cebotari, S.; Lichtenberg, A.; Tudorache, I. et al (2006): Clinical application of tissue engineered human heart valves using autologous progenitor cells, *Circulation* 114 [1 Suppl], Seite I132-I137. URL: PM:16820562

[22] Chen, W.; Kim, J. D.; Schoen, F. J. et al (1994a): Effect of 2-amino oleic acid exposure conditions on the inhibition of calcification of glutaraldehyde cross-linked porcine aortic valves, *J.Biomed.Mater.Res.* 28 [12], Seite 1485-1495. URL: PM:7876288

[23] Chen, W.; Schoen, F. J. und Levy, R. J. (1994b): Mechanism of efficacy of 2-amino oleic acid for inhibition of calcification of glutaraldehyde-pretreated porcine bioprosthetic heart valves, *Circulation* 90 [1], Seite 323-329. URL: PM:8026014

[24] Coito, A. J. und Kupiec-Weglinski, J. W. (1996): Extracellular matrix proteins: bystanders or active participants in the allograft rejection cascade?, *Ann.Transplant.* 1 [3], Seite 14-18. URL: PM:9869914

[25] Cordell JL; Falini B; Flenghi L et al (1995): Leucocyte typing V. White cell differentiation antigens, Oxford University Press, Seite 925-927.

[26] Courtman, D. W.; Errett, B. F. und Wilson, G. J. (2001): The role of crosslinking in modification of the immune response elicited against xenogenic vascular acellular matrices, *J.Biomed.Mater.Res.* 55 [4], Seite 576-586. URL: PM:11288086

[27] Cunanan, C. M.; Cabling, C. M.; Dinh, T. T. et al (2001): Tissue characterization and calcification potential of commercial bioprosthetic heart valves, *Ann.Thorac.Surg.* 71 [5 Suppl], Seite S417-S421. URL: PM:11388239

[28] da Costa F.D.A. und Dohmen P.M. (2004): Comparison of Cryopreserved Homografts and Decellularized Porcine Heterografts Implanted in Sheep, *Artificial Organs* 28 [4], Seite 366-370.

[29] Dahm, M.; Husmann, M.; Eckhard, Mayer et al (1995): Relevance of immunologic reactions for tissue failure of bioprosthetic heart valves, *Ann.Thorac.Surg.* 60 [2 Suppl], Seite S348-S352. URL: PM:7646186

[30] Delvos, U. und Muller-Berghaus, G. (1985): [Significance of the endothelium of the vascular wall for maintaining hemostasis], *Klin.Wochenschr.* 63 [24], Seite 1237-1246. URL: PM:3003450

[31] Denis, C. V. (2002): Molecular and cellular biology of von Willebrand factor, *Int.J.Hematol.* 75 [1], Seite 3-8. URL: PM:11843287

[32] Deutsch, M.; Meinhart, J.; Fischlein, T. et al (1999): Clinical autologous in

vitro endothelialization of infrainguinal ePTFE grafts in 100 patients: a 9-year experience, *Surgery* 126 [5], Seite 847-855. URL: PM:10568184

[33] Dohmen, P. M.; Hauptmann, S.; Terytze, A. et al (2007): In-vivo repopularization of a tissue-engineered heart valve in a human subject, *J.Heart Valve Dis.* 16 [4], Seite 447-449. URL: PM:17702372

[34] Dohmen, P. M. und Konertz, W. (2008): Decellularization of xenogenic biologic tissue, *Ann.Thorac.Surg.* 85 [6], Seite 2163-2164. URL: PM:18498860

[35] Dohmen, P. M.; Lembcke, A.; Hotz, H. et al (2002a): Ross operation with a tissue-engineered heart valve, *Ann.Thorac.Surg.* 74 [5], Seite 1438-1442. URL: PM:12440590

[36] Dohmen, P. M.; Meuris, B.; Flameng, W. et al (2001a): Influence of ischemic time and temperature on endothelial cell growth after transport, *Int.J.Artif.Organs* 24 [5], Seite 281-285. URL: PM:11420877

[37] Dohmen, P. M.; Ozaki, S.; Nitsch, R. et al (2003): A tissue engineered heart valve implanted in a juvenile sheep model, *Med.Sci.Monit.* 9 [4], Seite BR97-BR104. URL: PM:12709659

[38] Dohmen, P. M.; Ozaki, S.; Verbeken, E. et al (2002b): Tissue engineering of an auto-xenograft pulmonary heart valve, *Asian Cardiovasc.Thorac.Ann.* 10 [1], Seite 25-30. URL: PM:12079966

[39] Dohmen, P. M.; Ozaki, S.; Yperman, J. et al (2001b): Lack of calcification of tissue engineered heart valves in juvenile sheep, *Semin.Thorac.Cardiovasc.Surg.* 13 [4 Suppl 1], Seite 93-98. URL: PM:11805956

[40] Dohmen, P. M.; Scheckel, M.; Stein-Konertz, M. et al (2002c): In vitro hydrodynamics of a decellularized pulmonary porcine valve, compared with a glutaraldehyde and polyurethane heart valve, *Int.J.Artif.Organs* 25 [11], Seite 1089-1094. URL: PM:12487397

[41] Edmunds, L. H., Jr.; Clark, R. E.; Cohn, L. H. et al (1996): Guidelines for reporting morbidity and mortality after cardiac valvular operations. The American Association for Thoracic Surgery, Ad Hoc Liason Committee for Standardizing Definitions of Prosthetic Heart Valve Morbidity, *Ann Thorac.Surg* 62 [3], Seite 932-935. URL: PM:8784045

[42] Elkins, R. C.; Knott-Craig, C. J.; Randolph, J. D. et al (1994): Medium-term follow-up of pulmonary autograft replacement of aortic valves in children, *Eur.J.Cardiothorac.Surg* 8 [7], Seite 379-383. URL: PM:7946416

[43] Emery, R. W.; Mettler, E. und Nicoloff, D. M. (1979): A new cardiac prosthesis: the St. Jude Medical cardiac valve: in vivo results, *Circulation* 60 [2 Pt 2], Seite 48-54. URL: PM:445774

[44] Erdbruegger, W.; Konertz, W. und Dohmen, P. M. (2006): Decellularized Xenogenic Heart Valves Reveal Remodeling and Growth Potential *in Vivo*, *Tissue Engineering* 12 [8], Seite 2059-2068.

[45] Eybl, E.; Griesmacher, A.; Grimm, M. et al (1989): Toxic effects of aldehydes released from fixed pericardium on bovine aortic endothelial cells, *J.Biomed.Mater.Res.* 23 [11], Seite 1355-1365. URL: PM:2558116

[46] Fann, J. I.; Miller, D. C.; Moore, K. A. et al (1996): Twenty-year clinical experience with porcine bioprostheses, *Ann Thorac.Surg* 62 [5], Seite 1301-1311. URL: PM:8893561

[47] Ferrans, V. J.; Spray, T. L.; Billingham, M. E. et al (1978): Structural changes in glutaraldehyde-treated porcine heterografts used as substitute cardiac valves. Transmission and scanning electron microscopic observations

- in 12 patients, *Am.J.Cardiol.* 41 [7], Seite 1159-1184. URL: PM:96684
- [48] Ferrara, N. (2001): Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis, *Am.J.Physiol Cell Physiol* 280 [6], Seite C1358-C1366. URL: PM:11350730
- [49] Fishbein, M. C.; Levy, R. J.; Ferrans, V. J. et al (1982): Calcifications of cardiac valve bioprostheses. Biochemical, histologic, and ultrastructural observations in a subcutaneous implantation model system, *J.Thorac.Cardiovasc.Surg.* 83 [4], Seite 602-609. URL: PM:7062771
- [50] Gibbon GH Jr. (1954): Application of a mechanical heart and lung apparatus to cardiac surgery, *Minn Med* [27], Seite 171-9.
- [51] Gospodarowicz, D.; Hirabayashi, K.; Giguere, L. et al (1981): Factors controlling the proliferative rate, final cell density, and life span of bovine vascular smooth muscle cells in culture, *J.Cell Biol.* 89 [3], Seite 568-578. URL: PM:6454694
- [52] Grabenwoger, M.; Grimm, M.; Eybl, E. et al (1992): New aspects of the degeneration of bioprosthetic heart valves after long-term implantation, *J.Thorac.Cardiovasc.Surg* 104 [1], Seite 14-21. URL: PM:1614200
- [53] Grunkemeier, G. L. und Rahimtoola, S. H. (1990): Artificial heart valves, *Annu.Rev.Med* 41, Seite 251-263. URL: PM:2184728
- [54] Gummert, J. F.; Funkat, A.; Beckmann, A. et al (2008): Cardiac surgery in Germany during 2007: a report on behalf of the German Society for Thoracic and Cardiovascular Surgery, *Thorac.Cardiovasc.Surg.* 56 [6], Seite 328-336. URL: PM:18704854
- [55] Hammermeister, K. E.; Sethi, G. K.; Henderson, W. G. et al (1993): A comparison of outcomes in men 11 years after heart-valve replacement with a mechanical valve or bioprosthesis. Veterans Affairs Cooperative Study on Valvular Heart Disease, *N.Engl.J.Med* 328 [18], Seite 1289-1296. URL: PM:8469251
- [56] Harken DF (1962): Aortic valve replacement with a caged ball valve, *Am.J.Cardiol* [9], Seite 292-299.
- [57] He, G. W.; Grunkemeier, G. L.; Gately, H. L. et al (1995): Up to thirty-year survival after aortic valve replacement in the small aortic root, *Ann Thorac.Surg* 59 [5], Seite 1056-1062. URL: PM:7733698
- [58] Hirsch, D.; Drader, J.; Thomas, T. J. et al (1993): Inhibition of calcification of glutaraldehyde pretreated porcine aortic valve cusps with sodium dodecyl sulfate: preincubation and controlled release studies, *J.Biomed.Mater.Res.* 27 [12], Seite 1477-1484. URL: PM:8113234
- [59] Ishihara, T.; Ferrans, V. J.; Jones, M. et al (1981): Occurrence and significance of endothelial cells in implanted porcine bioprosthetic valves, *Am.J.Cardiol.* 48 [3], Seite 443-454. URL: PM:7270450
- [60] Jockenhoevel, S.; Zund, G.; Hoerstrup, S. P. et al (2001): Fibrin gel -- advantages of a new scaffold in cardiovascular tissue engineering, *Eur.J.Cardiothorac.Surg.* 19 [4], Seite 424-430. URL: PM:11306307
- [61] Kawalec-Carroll, J. S.; Hetherington, V. J.; Dockery, D. S. et al (2006): Immunogenicity of unprocessed and photooxidized bovine and human osteochondral grafts in collagen-sensitive mice, *BMC.Musculoskelet.Disord.* 7, Seite 32. URL: PM:16545115
- [62] Konertz, W.; Sidiropoulos, A.; Hotz, H. et al (1996): Ross operation and right ventricular outflow tract reconstruction with stentless xenografts, *J.Heart Valve Dis.* 5 [4], Seite 418-420. URL: PM:8858507

- [63] Langer, R. und Vacanti, J. P. (1993): Tissue engineering, *Science* 260 [5110], Seite 920-926. URL: PM:8493529
- [64] Lee, C. H.; Vyavahare, N.; Zand, R. et al (1998): Inhibition of aortic wall calcification in bioprosthetic heart valves by ethanol pretreatment: biochemical and biophysical mechanisms, *J.Biomed.Mater.Res.* 42 [1], Seite 30-37. URL: PM:9740004
- [65] Levy, R. J.; Hawley, M. A.; Schoen, F. J. et al (1985): Inhibition by diphosphonate compounds of calcification of porcine bioprosthetic heart valve cusps implanted subcutaneously in rats, *Circulation* 71 [2], Seite 349-356. URL: PM:3917378
- [66] Levy, R. J.; Schoen, F. J. und Golomb, G. (1986): Bioprosthetic heart valve calcification: Clinical features, pathobiology, and prospects for prevention., *CRC Crit Rev Biocompat* 2 [2], Seite 147-187.
- [67] Leyh, R. G.; Wilhelmi, M.; Rebe, P. et al (2003): In vivo repopulation of xenogeneic and allogeneic acellular valve matrix conduits in the pulmonary circulation, *Ann.Thorac.Surg.* 75 [5], Seite 1457-1463. URL: PM:12735562
- [68] Liao, K.; Gong, G.; Hoffman, D. et al (1993): Spontaneous host endothelial growth on bioprosthetic valves and its relation to calcification, *Eur.J.Cardiothorac.Surg.* 7 [11], Seite 591-596. URL: PM:8297612
- [69] Lindner, V.; Majack, R. A. und Reidy, M. A. (1990): Basic fibroblast growth factor stimulates endothelial regrowth and proliferation in denuded arteries, *J.Clin.Invest* 85 [6], Seite 2004-2008. URL: PM:2347923
- [70] Lynn, A. K.; Yannas, I. V. und Bonfield, W. (2004): Antigenicity and immunogenicity of collagen, *J.Biomed.Mater.Res.B Appl.Biomater.* 71 [2], Seite 343-354. URL: PM:15386396
- [71] Madri, J. A. und Williams, S. K. (1983): Capillary endothelial cell cultures: phenotypic modulation by matrix components, *J.Cell Biol.* 97 [1], Seite 153-165. URL: PM:6190818
- [72] Mako, W. J.; Shah, A. und Vesely, I. (1999): Mineralization of glutaraldehyde-fixed porcine aortic valve cusps in the subcutaneous rat model: analysis of variations in implant site and cuspal quadrants, *J.Biomed.Mater.Res.* 45 [3], Seite 209-213. URL: PM:10397978
- [73] Mako, W. J. und Vesely, I. (1997): In vivo and in vitro models of calcification in porcine aortic valve cusps, *J.Heart Valve Dis.* 6 [3], Seite 316-323. URL: PM:9183732
- [74] Matsuki, O.; Okita, Y.; Almeida, R. S. et al (1988): Two decades' experience with aortic valve replacement with pulmonary autograft, *J.Thorac.Cardiovasc.Surg* 95 [4], Seite 705-711. URL: PM:3352306
- [75] Maxwell, L.; Gavin, J. B. und Barratt-Boyes, B. G. (1989): Differences between heart valve allografts and xenografts in the incidence and initiation of dystrophic calcification, *Pathology* 21 [1], Seite 5-10. URL: PM:2762045
- [76] Mayer, J. E., Jr. (1995): Uses of homograft conduits for right ventricle to pulmonary artery connections in the neonatal period, *Semin.Thorac.Cardiovasc.Surg* 7 [3], Seite 130-132. URL: PM:7548318
- [77] Mayer, J. E., Jr.; Shin'oka, T. und Shum-Tim, D. (1997): Tissue engineering of cardiovascular structures, *Curr.Opin.Cardiol.* 12 [6], Seite 528-532. URL: PM:9429823
- [78] Meuris, B.; Ozaki, S.; Herijgers, P. et al (2003): Bioprosthetic tissue calcification: influence of blood contact and arterial pressure. an experimental study in rats and sheep, *J.Heart Valve Dis.* 12 [3], Seite 392-399. URL:

PM:12803341

- [79] Moore, M. A.; Phillips, R. E., Jr.; McIlroy, B. K. et al (1998): Evaluation of porcine valves prepared by dye-mediated photooxidation, *Ann.Thorac.Surg.* 66 [6 Suppl], Seite S245-S248. URL: PM:9930457
- [80] Naso, F; Gandaglia, A und Spina, M (2008): Differential quantitativ distribution of collagen, elastin, total lipid and other components between leaflets and sectors of aortic and pulmonary artery root before and after cell removal., Presentation at the 3rd Biennial Heart Valve Biology and Tissue Engineering Meeting of the Society for Heart Valve Disease.
- [81] O'Brien, M. F.; Goldstein, S.; Walsh, S. et al (1999): The SynerGraft valve: a new acellular (nonglutaraldehyde-fixed) tissue heart valve for autologous recellularization first experimental studies before clinical implantation, *Semin.Thorac.Cardiovasc.Surg.* 11 [4 Suppl 1], Seite 194-200. URL: PM:10660192
- [82] O'Brien, M. F.; Stafford, G.; Gardner, M. et al (1987): The viable cryopreserved allograft aortic valve, *J.Card Surg* 2 [1 Suppl], Seite 153-167. URL: PM:2979968
- [83] O'Brien, T. K.; Gabbay, S.; Parkes, A. C. et al (1984): Immunological reactivity to a new glutaraldehyde tanned bovine pericardial heart valve, *Trans.Am.Soc.Artif.Intern.Organs* 30, Seite 440-444. URL: PM:6398550
- [84] Ozaki, S.; Herijgers, P. und Flameng, W. (2003): Influence of blood contact on the calcification of glutaraldehyde-pretreated porcine aortic valves, *Ann.Thorac.Cardiovasc.Surg.* 9 [4], Seite 245-252. URL: PM:13129423
- [85] Padro, T.; Ruiz, S.; Bieker, R. et al (2000): Increased angiogenesis in the bone marrow of patients with acute myeloid leukemia, *Blood* 95 [8], Seite 2637-2644. URL: PM:10753845
- [86] Plank, L.; James, J. und Wagenvoort, C. A. (1980): Caliber and elastin content of the pulmonary trunk, *Arch.Pathol.Lab Med.* 104 [5], Seite 238-241. URL: PM:6892757
- [87] Pulford, K. A.; Rigney, E. M.; Micklem, K. J. et al (1989): KP1: a new monoclonal antibody that detects a monocyte/macrophage associated antigen in routinely processed tissue sections, *J.Clin.Pathol.* 42 [4], Seite 414-421. URL: PM:2654191
- [88] Rashid, S. T.; Salacinski, H. J.; Hamilton, G. et al (2004): The use of animal models in developing the discipline of cardiovascular tissue engineering: a review, *Biomaterials* 25 [9], Seite 1627-1637. URL: PM:14697864
- [89] Rieder, E.; Seebacher, G.; Kasimir, M. T. et al (2005): Tissue engineering of heart valves: decellularized porcine and human valve scaffolds differ importantly in residual potential to attract monocytic cells, *Circulation* 111 [21], Seite 2792-2797. URL: PM:15911701
- [90] Ritman, E. L. und Lerman, A. (2007): The dynamic vasa vasorum, *Cardiovasc.Res.* 75 [4], Seite 649-658. URL: PM:17631284
- [91] Ross DN (1962): Homograft replacement of the aortic valve, *Lancet* [2], Seite 487.
- [92] Ross, D. N. (1967): Replacement of aortic and mitral valves with a pulmonary autograft, *Lancet* 2 [7523], Seite 956-958. URL: PM:4167516
- [93] Sacks, M. S. und Smith, D. B. (1998): Effects of accelerated testing on porcine bioprosthetic heart valve fiber architecture, *Biomaterials* 19 [11-12], Seite 1027-1036. URL: PM:9692801
- [94] Sawa, Y.; Tatsumi, E.; Funakubo, A. et al (2008): *Journal of Artificial*

- Organs 2007: the year in review, *J.Artif.Organs* 11 [1], Seite 4-11. URL: PM:18414986
- [95] Schmidt, C. E. und Baier, J. M. (2000): Acellular vascular tissues: natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering, *Biomaterials* 21 [22], Seite 2215-2231. URL: PM:11026628
- [96] Schnell, A. M.; Hoerstrup, S. P.; Zund, G. et al (2001): Optimal cell source for cardiovascular tissue engineering: venous vs. aortic human myofibroblasts, *Thorac.Cardiovasc.Surg.* 49 [4], Seite 221-225. URL: PM:11505318
- [97] Schoen, F. J. (1989): *Intervental and surgical cardiovascular pathology: clinical correlations and basic principles*, WB Saunders, Philadelphia.
- [98] Schoen, F. J. und Levy, R. J. (1999): Founder's Award, 25th Annual Meeting of the Society for Biomaterials, perspectives. Providence, RI, April 28-May 2, 1999. Tissue heart valves: current challenges and future research perspectives, *J.Biomed.Mater.Res.* 47 [4], Seite 439-465. URL: PM:10497280
- [99] Schoen, F. J.; Levy, R. J.; Nelson, A. C. et al (1985): Onset and progression of experimental bioprosthetic heart valve calcification, *Lab Invest* 52 [5], Seite 523-532. URL: PM:3990244
- [100] Shinoka, T.; Breuer, C. K.; Tanel, R. E. et al (1995): Tissue engineering heart valves: valve leaflet replacement study in a lamb model, *Ann Thorac.Surg* 60 [6 Suppl], Seite S513-S516. URL: PM:8604922
- [101] Simon, A.; Wilhelmi, M.; Steinhoff, G. et al (1998): Cardiac valve endothelial cells: relevance in the long-term function of biologic valve prostheses, *J.Thorac.Cardiovasc.Surg.* 116 [4], Seite 609-616. URL: PM:9766589
- [102] Starr A und Edwards ML (1961): Mitral replacement: clinical experience with a ball valve prosthesis, *Ann Surg* [154], Seite 726-40.
- [103] Stock, U. A.; Nagashima, M.; Khalil, P. N. et al (2000): Tissue-engineered valved conduits in the pulmonary circulation, *J.Thorac.Cardiovasc.Surg* 119 [4 Pt 1], Seite 732-740. URL: PM:10733761
- [104] Talman, E. A. und Boughner, D. R. (1995): Glutaraldehyde fixation alters the internal shear properties of porcine aortic heart valve tissue, *Ann.Thorac.Surg.* 60 [2 Suppl], Seite S369-S373. URL: PM:7646190
- [105] Vacanti, C. A. und Vacanti, J. P. (1994): Bone and cartilage reconstruction with tissue engineering approaches, *Otolaryngol.Clin.North Am.* 27 [1], Seite 263-276. URL: PM:8159426
- [106] Vyavahare, N.; Hirsch, D.; Lerner, E. et al (1997): Prevention of bioprosthetic heart valve calcification by ethanol preincubation. Efficacy and mechanisms, *Circulation* 95 [2], Seite 479-488. URL: PM:9008467
- [107] Vyavahare, N.; Ogle, M.; Schoen, F. J. et al (1999): Mechanisms of bioprosthetic heart valve failure: fatigue causes collagen denaturation and glycosaminoglycan loss, *J.Biomed.Mater.Res.* 46 [1], Seite 44-50. URL: PM:10357134
- [108] Vyavahare, N. R.; Hirsch, D.; Lerner, E. et al (1998): Prevention of calcification of glutaraldehyde-crosslinked porcine aortic cusps by ethanol preincubation: mechanistic studies of protein structure and water-biomaterial relationships, *J.Biomed.Mater.Res.* 40 [4], Seite 577-585. URL: PM:9599034
- [109] Walluscheck, K. P.; Steinhoff, G. und Haverich, A. (1996): Endothelial cell seeding of native vascular surfaces, *Eur.J.Vasc.Endovasc.Surg* 11 [3], Seite 290-303. URL: PM:8601239
- [110] Webb, C. L.; Schoen, F. J. und Levy, R. J. (1988): AL preincubation



inhibits calcification of bioprosthetic heart valve tissue in the rat subdermal model, ASAIO Trans. 34 [3], Seite 855-859. URL: PM:3143392

[111] Werner, M.; Kaloutsi, V.; Walter, K. et al (1992): Immunohistochemical examination of routinely processed bone marrow biopsies, Pathol.Res.Pract. 188 [6], Seite 707-713. URL: PM:1437832

[112] Wilhelmi, M.; Fischer, S.; Mertsching, H. et al (2002): [Is chronic graft rejection the reason for degenerative changes in allogeneic and xenogeneic heart valve prostheses: immunohistochemical evaluation of inflammatory factors], Z.Kardiol. 91 [10], Seite 825-832. URL: PM:12395223

[113] Wu, H.; Riha, G. M.; Yang, H. et al (2005): Differentiation and proliferation of endothelial progenitor cells from canine peripheral blood mononuclear cells, J.Surg.Res. 126 [2], Seite 193-198. URL: PM:15919419

## 9 Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei all jenen Personen bedanken, die mich auf unterschiedliche Weise unterstützt und zu dieser Dissertation beigetragen haben.

An erster Stelle richtet sich mein Dank an Herrn Universitäts-Professor Dr. med. W. Konertz für die Möglichkeit dieses interessante Promotionsthema in der Klinik für Kardiovaskuläre Chirurgie der Charité Universitätsmedizin Berlin bearbeiten zu können.

Besonderer Dank gilt Herrn Privatdozent Dr. med. P. M. Dohmen für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die es mir ermöglichte, mich mit diesem faszinierenden Thema zu beschäftigen. Überaus dankbar bin ich für die interessante Aufgabenstellung, die weit genug gefasst war, mir nicht die Freiheit bei der Ausgestaltung der Arbeit zu nehmen und die vielfältige Unterstützung durch immerwährende Diskussionsbereitschaft. Ich hoffe, dass ich seine Ratschläge umsetzen konnte und der Leser meinem Gedankengang folgen kann.

Danken möchte ich Herrn Dr. med. S. Holinski für die geduldige Einarbeitung in die operative Vorgehensweise bei diesem Versuch.

Ein großes Dankeschön gilt Frau Katrin Krüger im Labor für Tissue Engineering der Klinik für Kardiovaskuläre Chirurgie für die Geduld und Unterstützung bei den Tierversuchen und den vielen histologischen Färbungen die sie für diese Arbeit anfertigte.

Den Mitarbeitern der Firma AutoTissue GmbH möchte ich danken für die stetige und freundliche Unterstützung bei der Vorbereitung der Versuche.

Ein sehr herzlicher Dank gilt meiner Familie und besonders natürlich meinen Eltern, die mich stets unterstützt haben und alle auf ihre Art und Weise zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Ebenso sei allen denen ein Dankeschön ausgesprochen, die nicht namentlich Erwähnung fanden, aber zum Gelingen dieser Arbeit beigesteuert haben.

## **10 Curriculum vitae**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## 11 Publikationsliste

1. "Is there a histological difference between decellularized aortic tissue and pulmonic trunk tissue?"

Torsten Christ, MD, Pascal Maria Dohmen, MD, PhD, Sebastian Holinski, MD, Melanie Schönau, MD and Wolfgang Konertz, MD

CARDIOVASCULAR SCIENCES FORUM, Jan-Mar 2010, Volume 5 / Number 1

[http://servcor.com/Vol5\\_n1\\_2010.pdf](http://servcor.com/Vol5_n1_2010.pdf)

2. "Is there a histological difference between aortic and pulmonic tissue engineered heart valves?"

Torsten Christ, Pascal M. Dohmen, Wolfgang Konertz

Poster presentation at the "3rd BIENNIAL HEART VALVE BIOLOGY AND TISSUE ENGINEERING MEETING" 2008

[http://www.shvd.org/documents/London Abstracts/P32.pdf](http://www.shvd.org/documents/London%20Abstracts/P32.pdf)

## 12 Erklärung an Eides Statt

„Ich, Torsten Christ, geboren am 20.11.1977 in Lichtenstein, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema:

„Evaluation der Biokompatibilität von mit autologen Zellen beschichtetem xenogenen Gewebe im Tiermodell“

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift