

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

DISSERTATION

Untersuchungen zu Immunogenität, Struktur, mechanischen  
Belastbarkeit und Biokompatibilität von dezellularisierten Herz-  
klappengeweben

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor rerum medicinalium (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Oliver Bloch

aus Meppen

Datum der Promotion: 05.06.2016

## Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung .....	1
Abstract .....	2
Einführung .....	4
Zielstellung .....	5
Methodik .....	6
Untersuchung der Immunogenität dezellularisierter Herzklappen .....	6
Bestimmung der anti-Kollagen Typ-I und anti- $\alpha$ -Gal Antikörper .....	6
Bestimmung von löslichem Gesamtprotein und glattmuskuläres $\alpha$ -Aktin .....	7
Untersuchung der Aortenklappen auf GAGs und PGs .....	7
Elektronenmikroskopische Untersuchungen .....	8
Equines Perikard .....	8
Statistische Auswertung .....	9
Ergebnisse .....	10
Antigenität dezellularisierter Klappen .....	10
Nachweis von löslichem Gesamtproteinen und glattmuskulärem $\alpha$ -Aktin in Aortenklappen.....	11
Nachweis der Glykosaminoglykane.....	11
Elektronenmikroskopische Untersuchung .....	12
Equines Perikard .....	12
Diskussion .....	14
Literaturverzeichnis .....	21
Anteilsklärung an den erfolgten Publikationen.....	25
Druckexemplare der Publikationen .....	26
Lebenslauf .....	27
Publikationsliste .....	28
Eidesstattliche Versicherung.....	29
Danksagung.....	30

# **Zusammenfassung**

## **Abstract**

**Einleitung:** Konventionelle biologische Herzklappengewebe werden zum Schutz vor Degeneration und zur Reduktion ihres immunologischen Potentials mit Glutaraldehyd (GA) fixiert. Eine Alternative zur Reduktion der Immunantwort biologischer Herzklappen stellt die Dezellularisierung dar. Hierbei werden alle Zellen und zellulären Bestandteile aus den Geweben entfernt bis nur noch die Extrazelluläre Matrix (EZM) vorhanden ist. Dezellularisieren ist allerdings immer noch umstritten, gerade in Bezug auf die Reduktion des immunologischen Potentials und dem Schutz vor Degeneration der zellfreien Gewebe. Deshalb wurden in dieser Arbeit unterschiedlich behandelte Herzklappengewebe auf ihre Eignung untersucht.

**Methodik:** Zur Bestimmung immunologischer Reaktionen gegen xenogenes Herzklappengewebe wurde Patienten Serum vor, bis zu einer Woche nach und 9 bis 12 Monate nach der Implantation einer biologischen Herzklappe entnommen und auf EZM Antikörper untersucht. Für diese Untersuchung wurde ein auf der ELISA-Technik basierendes Nachweisverfahren etabliert, mit dem Antikörper gegen Kollagen Typ-I und  $\alpha$ -Gal im Serum nachgewiesen werden können. Am Beispiel der porcinen Aortenklappe wurde die Integrität und Konservierung der EZM dezellularisierter Gewebe untersucht, da sie aufgrund ihrer stärkeren Gefäßwand längere Inkubationszeiten zum Dezellularisieren erfordern als z.B. Pulmonalklappen. Die Untersuchungen wurden mit Transmissionselektronen- und Lichtmikroskopie und einem biochemischen Farbnachweis durchgeführt. Für die Untersuchung von dezellularisiertem Perikard wurde es in die *Aorta descendens* von juvenilen Schafen implantiert und nach 4 Monaten explantiert und untersucht.

**Ergebnisse:** Bei Patienten mit einer xenogenen Herzklappe konnte bis zu einem Jahr nach der Implantation kein Anstieg der Antikörper gegen Kollagen Typ-I nachgewiesen werden. Jedoch zeigte sich bei Patienten mit GA-fixierten porcinen Herzklappen eine Erhöhung der Anti- $\alpha$ -Gal Antikörper. Dies war bei dezellularisierten Klappen nicht zu beobachten. Bei den Aortenklappen waren selbst nach den langen DOA-Behandlungszeiten von 48 Stunden keine Schädigungen oder Veränderungen der EZM zu erkennen. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Untersuchungen des dezellularisierten Perikards, das sowohl vor als auch nach der Implantation keine Beeinträchtigungen zeigte und den Bedingungen im systemischen Blutkreislauf standgehalten hatte.

**Schlussfolgerung:** Es konnte gezeigt werden, dass es nach Implantation der zellfreien Matrices zu keinem Anstieg der Antikörper gegen Bestandteile der EZM kam. Vielmehr wurden die wichtigsten Bestandteile der EZM, wie Glykosaminoglykane (GAG) und Proteoglykane (PG), nach Dezellularisierung im Gewebe erhalten. Außerdem wurde im Schaf bewiesen, dass Perikard dezellularisiert werden kann und trotzdem seine guten mechanischen Eigenschaften behält, nicht degradiert und daher den Belastungen im systemischen Blutkreislauf standhalten kann.

**Introduction:** Conventional biological heart valves are treated with GA to prevent degeneration and to reduce their immunological potential. An alternative is decellularization, where all cells and cellular debris are removed from the scaffold, so that solely the extracellular matrix (ECM) remains. However decellularization of tissues is still a matter of debate, especially in terms of their immunological potential and degradation of the cell-free tissue. For this reason several biological tissues have been investigated concerning their suitability as heart valve tissue.

**Methods:** For the determination of immunological reactions elicited by the xenogenic tissues, serum samples from patients have been taken before, one week after and 9 to 12 month following implantation of a biological heart valve and investigated for ECM antibodies. Therefore we have established assays using the ELISA technique to quantify anti collagen type-I and  $\alpha$ -Gal antibodies in the serum. Aortic valves have been investigated to proof integrity and conservation of the ECM after decellularization. They need an intense decellularization protocol compared to i.e. pulmonary heart valves, due to the thickness of their vessel wall. These investigations were done using electron-, light microscopy and a biochemical colorimetric assay. For the examination of decellularized pericardium, the pericardium has been implanted into the *aorta descendens* of juvenile sheep and explanted after four month. It has been inspected macroscopically and microscopically for changes of the ECM.

**Results:** The study patients with a xenogenic heart valve showed no increase in their antibody titres for collagen type-I. But there was a significant increase in the antibodies for  $\alpha$ -Gal in the group with porcine GA-fixed heart valves. This was not seen with decellularized heart valves. For the aortic valves we were able to show, that even after the long incubation with DOA, which is necessary to decellularize the tissue, there was no degradation or detectable changes within the ECM. These results were confirmed with the decellularized pericardial patches. They showed no degradation before or after the implantation and were able to withstand the high pressure of the systemic circulation.

**Conclusion:** We were able to show that implantation of decellularized porcine heart valves does not cause immunological reactions of increased anti-ECM antibody levels. Furthermore our investigations showed that important elements of the ECM like PGs and GAGs are being preserved after decellularization. Additionally, decellularized equine pericardial patches haven proven their suitability in the systemic circulation of juvenile sheep without affecting mechanical properties by degradation.

## Einführung

Der Blutfluss im Herzen wird durch vier Herzklappen gesteuert, die aus Duplikationen des Endokards, der Herzinnenhaut, entstehen. Sie bestehen zu großen Teilen aus Kollagen- und Elastinfasern und ermöglichen somit hohe Zugfestigkeit gepaart mit hoher Elastizität. Um Ablagerungen und Thromben an den Innenseiten der Gefäßwand zu unterbinden, sind sie mit Endothelzellen ausgekleidet.

Bei einer schwerwiegenden Herzklappenerkrankung stellt der operative Austausch der Herzklappe häufig die einzige sinnvolle Möglichkeit dar. Die als Ersatz verwendeten Herzklappenprothesen sind entweder mechanischen oder biologischen Ursprungs, mit ihren spezifischen Vor- und Nachteilen. Nach Implantation einer mechanischen Prothese müssen die Patienten sich einer lebenslangen Antikoagulationstherapie unterziehen. Um diese Einschränkung zu umgehen, werden immer häufiger biologische Herzklappen verwendet, bei denen keine Blutverdünner eingenommen werden müssen. Xenografts werden entweder aus tierischen Herzklappen oder Perikard hergestellt. Alternativ gibt es noch Homografts; Klappen von Verstorbenen. Konventionelle biologische Prothesen werden mit GA fixiert, um die Kollagenstruktur zusätzlich irreversibel zu vernetzen und zu stabilisieren. Weiterhin reduziert diese Behandlung die Antigenität des Gewebes und sichert die Sterilität des Implantats<sup>1</sup>. Allerdings besitzen GA-fixierte biologische Prothesen eine limitierte Haltbarkeit, da sie tendenziell zu Verkalkungen und Degeneration neigen, wodurch ihre Funktion beeinträchtigt wird. Dieser Effekt ist besonders bei Kindern zu beobachten und macht wiederholte Reoperationen notwendig<sup>2</sup>. Der Mechanismus des Kalzifizierens ist noch ungeklärt. Es liegen aber Erkenntnisse vor, die vermuten lassen, dass ein immunologischer Prozess der Auslöser ist<sup>3</sup>.

Innerhalb der letzten Jahre hat sich das Tissue Engineering als ein vielversprechender Ansatz zur Herstellung von Herzklappen erwiesen. Mit den Techniken des Tissue Engineerings ist es möglich funktionelle Gewebe mit spezifischen Charakteristiken herzustellen. Hierbei wurde das Augenmerk besonders auf zellfreie Herzklappen gelegt<sup>4-7</sup>. Allerdings sind nur wenige, komplexe Dezellularisierungsverfahren in der Lage die Zellen und zellulären Bestandteile vollständig aus den Geweben zu entfernen, ohne die extrazelluläre Matrix (EZM) zu beeinträchtigen<sup>8</sup>. Nur zwei Verfahren haben es derzeit bis zur klinischen Anwendung geschafft<sup>9,10</sup>. Unter Verwendung von Desoxycholsäure (DOA) wurde eine zellfreie Matrix für Herzklappen entwickelt<sup>11,12</sup>. Andere Gruppen kombinieren DOA mit weiteren Detergenzien zur Dezellularisierung, wodurch ihre klinische Anwendbarkeit beeinträchtigt wird<sup>13</sup>.

Der größte Vorteil dezellularisierter Gewebe gegenüber glutaraldehydfixierten Geweben ist, dass sie *in vivo* nicht verkalken<sup>14</sup> und Regenerations- und Wachstumspotential zeigen<sup>11,15,16</sup>. Zusätz-

lich liegt es nahe, dass die zellfreien Gewebe ein geringeres immunologisches Potential besitzen, da sie ausschließlich aus der EZM bestehen<sup>17,18</sup>. Allerdings konnte diese These noch nicht eindeutig belegt werden und somit wird das immunologische Potential dezellularisierter Gewebe weiterhin kontrovers diskutiert<sup>19</sup>.

### **Zielstellung**

Bei der Entwicklung von Herzklappen mit einer natürlichen nicht fixierten EZM und annähernd physiologischen Eigenschaften ist das Wichtigste eine zellfreie Matrix, bei der die Struktur und mechanische Belastbarkeit der EZM erhalten bleibt. Diese sollte kein immunologisches Potential besitzen, sich wiederbesiedeln und an die sich verändernden Bedingungen im Körper, zum Beispiel durch Wachstum, anpassen können. Als biologisches Ausgangsmaterial für diesen Ansatz sind sowohl native xenogene Herzklappen als auch aus xenogenem Perikard konstruierte Herzklappen möglich.

Die vorliegende Arbeit sollte dazu beitragen folgende offene Fragen zu beantworten:

1. Ist dezellularisiertes xenogenes pulmonales Herzklappengewebe nach der Implantation noch immunologisch aktiv?
2. Wie ist die Struktur der EZM dezellularisierter Aortenklappen beschaffen?
3. Können lösliche Proteine und das glattmuskuläre  $\alpha$ -Aktin vollständig aus den Aortenklappen entfernt werden?
4. Gibt es nach der Dezellularisation und Sterilisation noch PGs und GAGs in den Aortenklappen?
5. Verhalten sich dezellularisierte equine Perikardpathe ähnlich wie dezellularisierte Herzklappen in Hinblick auf ihre mechanische Belastbarkeit im Hochdruckbereich?
6. Zeigen sich bei dezellularisiertem equinem Perikard Degeneration oder Verkalkung unter Belastung?
7. Zeigt dezellularisiertes equines Perikard ein der dezellularisierten Herzklappe vergleichbares Wiederbesiedlungsmuster?

## **Methodik**

### **Untersuchung der Immunogenität dezellularisierter Herzklappen**

Zur Bestimmung der Antikörperkonzentrationen wurden von 159 Patienten, die eine neue Herzklappe erhalten haben, Serumproben gesammelt. Die Proben wurden, um den Effekt der xenogenen Gewebe darstellen zu können vor (prae), bis zu einer Woche nach (post) und 9 bis 12 Monate nach der Operation (Follow-Up) abgenommen. Insgesamt wurden 44 Patienten mit einer GA-fixierten porcinen Herzklappe und 106 Patienten mit einer zellfreien porcinen Herzklappe auf ihre anti-porcinen Kollagen Typ-I Antikörper untersucht. Neben der Untersuchung auf Kollagen Typ-I Antikörper wurden einige Patienten auf ihre Antikörper gegen das Xenoantigen  $\alpha$ -Gal untersucht. In dieser Gruppe wurden neben 33 Patienten mit einer GA-fixierten porcinen Herzklappe und 70 mit einer zellfreien porcinen, auch 9 Patienten mit einer bovinen Herzklappe aus Perikard untersucht.  $\alpha$ -Gal war auch in diesem Gewebe zu erwarten. Zusätzlich wurde von 24 Patienten zur Kontrolle Serum gesammelt, die kein biologisches Gewebeimplantat erhalten hatten.

### **Bestimmung der anti-Kollagen Typ-I und anti- $\alpha$ -Gal Antikörper**

Zur Bestimmung der Antikörperkonzentration im Serum wurde die Sandwich-ELISA-Technik verwendet. Hierbei wurden die Antigene, Kollagen Typ-I oder  $\alpha$ -Gal, an eine Mikrotiterplatte gebunden und bildeten mit den zu bestimmenden Antikörpern einen messbaren Komplex.

Kollagen Typ-I wurde über Nacht bei 4°C an „highbind“ Mikrotiterplatten (Corning, NY) gebunden, über Nacht geblockt und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert. Für die Messungen wurden die Platten mit Patientenserum für 75 Minuten inkubiert, gewaschen und für weitere 75 Minuten mit dem sekundären Antikörper, entweder anti-human IgG oder anti-human IgM (Rockland, Gilbertsville, PA), inkubiert. Beide sekundären Antikörper sind mit Biotin gekoppelt, um die an Streptavidin gekoppelte Meerrettichperoxidase zu binden. Die Peroxidase setzt in einer Farbreaktion 3,5',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB, Pierce, Rockford, IL) um, das nach dem Abstoppen mit TMB-Stoppreegenz mit einem Photometer quantitativ bestimmt wurde. Prae, Post und Follow-Up Proben wurden jeweils am selben Tag in Triplikaten bestimmt, um Unterschiede bei der Plattenbeschichtung ausschließen zu können. Zusätzlich wurden von den Seren die Antikörpertiter gegen humanes Kollagen Typ-I bestimmt, um die Seren Normalisieren zu können.

Bei der Bestimmung der  $\alpha$ -Gal-Antikörper wurden die Platten mit 500ng pro Well Gal-alpha1,3-Gal-beta1-4GlcNAc-BSA (MoBiTec, Göttingen) über Nacht beschichtet. Als Detektionssystem wurde das gleiche Nachweisverfahren wie beim Kollagen Typ-I ELISA verwendet.



### **Bestimmung von löslichem Gesamtprotein und glattmuskuläres $\alpha$ -Aktin**

Zur Bestimmung von Proteinen und glattmuskulärem  $\alpha$ -Aktin (GMZ- $\alpha$ -Aktin) wurden 500mg/ml Herzklappengewebe in PBS mit einem Ultra-Turrax homogenisiert. Zum Entfernen der unlöslichen Bestandteile wurde das Homogenat bei 2000g für 10 Minuten zentrifugiert und das lösliche Gesamtprotein im Überstand mittels Bradford Assay gemessen. Bis zur Bestimmung des GMZ- $\alpha$ -Aktins wurden die Überstände bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Die Bestimmung von GMZ- $\alpha$ -Aktin erfolgte mittels ELISA. Es wurde der spezifische anti-GMZ- $\alpha$ -Aktin Antikörper (clone E184, Epitomics, CA) 1:500 verdünnt an eine mit anti-Maus IgG vorbeschichteten Mikrotiterplatte (Pierce, IL) gebunden. Im folgenden Schritt wurden 250 $\mu\text{l}$  der zu bestimmenden Probe zugegeben und 120 Minuten inkubiert. Zur Detektion des gebundenen GMZ- $\alpha$ -Aktin wurde ein anti-GMZ- $\alpha$ -Aktin Antikörper (clone AC-40, Sigma, Deisenhofen), der an einem anderen Epitop bindet, in einer Konzentration von 1:500 zugegeben. An diesen Antikörper wurde ein mit Biotin gekoppelter anti-Maus-Antikörper gebunden, der als Empfänger für die Streptavidin gekoppelte Peroxidase diente. Wie im zuvor beschriebenen ELISA wurde als Substrat TMB verwendet.

### **Untersuchung der Aortenklappen auf GAGs und PGs**

Die in den Geweben vorhandenen GAGs wurden nach einem an die Methode von Farndale<sup>20</sup> angelehnten Nachweis mit dem Farbstoff 1,9-Dimethylmethylenblau bestimmt. Der kationische Farbstoff bindet an die negativ geladenen GAGs, welches zu Dimerbildung und einer Absorptionsänderung führt. Zum Isolieren der GAGs wurden die Gewebe mit einem Ultra-Turrax homogenisiert und störende Proteine für 16 Stunden bei  $60^{\circ}\text{C}$  mit Papain verdaut. Im Anschluss wurde Iodoacetat Säure bis zu einer finalen Konzentration von 10mM zugegeben und mit 50mM TRIS/HCl (pH 8,0) auf 5ml aufgefüllt, gemischt und bei 4000g zentrifugiert. Die GAGs im Überstand wurden zweimal mit Ethanol präzipitiert, resuspendiert und in drei Fraktionen aufgeteilt. Die erste Fraktion wurde mit Chondroitinase ABC, die zweite mit Chondroitinase AC verdaut und zur dritten wurde lediglich Puffer zugegeben. Nach dreißigminütiger Inkubation bei  $37^{\circ}\text{C}$  wurden die Proben mit dem Farbstoff gemischt und die entstehende Farbintensität im Photometer bei 540nm bestimmt. Die Chondroitinase ABC verdaut Chondroitin-Sulfat (CS) A sowie C und Dermatan-Sulfat (Chondroitin-Sulfat B, DS), wohingegen Chondroitinase AC nur Chondroitin-Sulfat verdaut.

Für die Auswertung wurden zur Bestimmung des Chondroitin-Sulfates die Differenz der Ansätze aus Puffer und Chondroitinase AC (Puffer-AC) gebildet. Für die Bestimmung des Dermatan-Sulfates wurde die Differenz aus dem Chondroitinase ABC und Chondroitin AC Ansatz verwen-

det und mit Hilfe einer DS-Standardgerade konnte die Konzentration an Dermatan-Sulfat bestimmt werden.

### **Elektronenmikroskopische Untersuchungen**

Bei den ultrahistologischen Untersuchungen mit einem Transmissionselektronenmikroskop (TEM) wurden unbehandelte und behandelte Aortenklappen untersucht. Die Gewebe wurden zum einen mit Cupromeric Blau (CMB) alleine und zum anderen wurde die Färbung mit Osmiumtetroxid ( $\text{OsO}_4$ ) / Thiocarbohydrazid /  $\text{OsO}_4$  (OTO) erweitert. Die CMB Färbung wurden nach dem Protokoll von Rothenburger<sup>21</sup> durchgeführt. Für die CMB-OTO Färbung wurden die Gewebe zusätzlich noch jeweils für drei Stunden mit  $\text{OsO}_4$  (1%), Thiocarbohydrazid (0,1%) und  $\text{OsO}_4$  (1%) behandelt. Im Anschluss wurden sie in Epoxidharz eingebettet um ultradünne Schnitte anzufertigen. Zur Kontrolle wurden die Gewebe mit Toluidin Blau gefärbt, in Epoxidharz eingebettet und lichtmikroskopisch untersucht. Die unterschiedlich gefärbten Präparate wurden sowohl lichtmikroskopisch als auch elektronenmikroskopisch untersucht und fotografiert.

CMB färbt mit  $\text{Na}_2\text{WO}_4$  sehr stark die PGs, während bei der OTO Färbung die Zellmembranen und Kollagen gefärbt werden. Bei der Kombination beider Färbungen, können sowohl die Zellmembranen sowie die Strukturproteine, als auch die PGs gleichzeitig in einer Aufnahme dargestellt werden.

### **Equines Perikard**

Zur Untersuchung der Biokompatibilität und mechanischen Belastbarkeit wurde bei sieben juvenilen Schafen jeweils ein dezellularisierter equiner Perikardpatch implantiert. Hierfür wurde die *Aorta descendens* longitudinal eröffnet und mit einem ovalen Patch verschlossen. Um das Perikard unter erschwerten Bedingungen zu untersuchen wurden die Patche größer als benötigt implantiert, so dass sie nach der Gleichung von La Place einer höheren Wandspannung ausgesetzt waren. Die Gewebe wurden nach vier Monaten explantiert und makroskopisch und histologisch begutachtet. Direkt nach der Explantation wurden die Patche auf Vegetationen, Hämatome und thrombotisches Material untersucht. Zusätzlich wurden die Patche auf Anzeichen von Degeneration, wie zum Beispiel Einrisse, Perforationen, Überwucherung mit fibrösem Gewebe, Aneurysmen, Verkalkungen, Deformationen und Versteifungen untersucht. Bei den histologischen Untersuchungen wurden die Gewebe primär auf ihre Wiederbesiedlung und den Erhalt der EZM untersucht. Hierfür wurden die Gewebe mit Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H&E) als Übersichtsfärbung, Gomori für die Kollagen-Fibrillen, Sirius Rot für die Differenzierung zwischen Kollagen und Prokollagen und von Willebrand für die Identifizierung der Endothelzellen gefärbt.

Zusätzlich wurde Elastin mit der Weigert-Färbung und Verkalkungen mit der Färbung nach van Kossa untersucht. Zur Bestimmung der Wiederbesiedlung wurden die Gewebe immunhistochemisch untersucht. Zur Detektion von Endothelzellen wurden sowohl CD 31 als auch CD 34 Antikörper verwendet. Fibroblasten wurden mit einem anti-Fibroblasten Antikörper nachgewiesen.

### **Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung wurde mit der Software InStat (GraphPad Inc., CA) durchgeführt. Mittels des Kolmogorow-Smirnow Tests wurden die Daten auf ihre Normalverteilung untersucht. Zur Auswertung der Daten wurde der nichtparametrische gepaarte Wilcoxon Test zur Bestimmung von signifikanten Unterschieden verwendet. Ein P-Wert kleiner 0,05 wurde als statistisch signifikant,  $p < 0,01$  als hoch signifikant und ein  $p < 0,001$  als höchst signifikant eingestuft.

## **Ergebnisse**

### **Antigenität dezellularisierter Klappen**

#### **Antikörper gegen Kollagen Typ-I**

Es konnten von 106 Patienten, die eine dezellularisierte Herzklappe „Matrix P plus“ (Autotissue GmbH, Berlin) erhalten haben die prae- und postoperativen und von 82 Patienten zusätzlich die Antikörpertiter nach einem Jahr bestimmt werden. Bei den porcinen IgG Antikörpern kam es nur zwischen den postoperativen und den Ein-Jahres-Proben zu einer signifikanten Veränderung von -0,6% ( $p = 0,0363$ ). Die IgM Antikörper gegen porcines Kollagen Typ-I zeigten eine Abnahme um 4,0% zwischen den prae- und postoperativen Proben ( $p = 0,0099$ ) und eine Zunahme um 3,3% zwischen den praeoperativen und Follow-Up Proben ( $p = 0,0028$ ). In allen Fällen sind die gemessenen Unterschiede geringer als die für den ELISA bestimmte Intra-Assay Varianz. Außerdem sind die Veränderungen nach dem Normalisieren der Seren nicht mehr zu beobachten, so dass diese Effekte den prinzipiellen Unterschieden der Seren zuzuordnen sind.

Von 44 Patienten mit einer GA-fixierten porcinen Herzklappe wurden die Antikörpertiter vor und nach der Implantation und von 9 Patienten zusätzlich nach einem Jahr bestimmt. Auch hier wurden keine signifikanten Veränderungen zwischen den einzelnen Zeitpunkten festgestellt.

#### **Antikörper gegen das Xenoantigen $\alpha$ -Gal**

Bei 9 Patienten mit einer GA-behandelten porcinen Herzklappe war eine Bestimmung der Antikörperkonzentration in den Follow-Up Proben 12 Monate nach Implantation möglich. Bei den für die späte Immunantwort relevanten IgG Antikörpern konnte bei den Follow-Up Proben nach 12 Monaten ein signifikanter ( $p = 0,0391$ ) Anstieg beobachtet werden. Bei den Antikörpern der IgM Klasse, die für die frühe Immunantwort verantwortlich sind, konnte postoperativ eine geringe aber signifikante ( $p = 0,0213$ ) Abnahme der Antikörper Titer beobachten werden. Die Follow-Up Proben nach 12 Monaten zeigten allerdings eine signifikante Zunahme, sowohl bezogen auf die praeoperativen Proben ( $p = 0,0156$ ) als auch auf die postoperativen Proben ( $p = 0,0117$ ).

Bei den Patienten mit einer dezellularisierten porcinen Herzklappe waren die IgG spezifischen anti- $\alpha$ -Gal-Antikörpertiter über den kompletten Untersuchungszeitraum sehr gering. Die statistischen Mittelwerte der Extinktionen waren zwischen 0,313 und 0,377. Zwischen den einzelnen Zeitpunkten waren keine Veränderungen zu erkennen. Bei den Untersuchungen auf die IgM spezifischen anti- $\alpha$ -Gal Antikörper war festzustellen, dass die Titer höher waren als bei den IgG Antikörpern. Auch hier war zwischen den prae- und postoperativen Proben kein Unterschied

festzustellen. Bei den Follow-Up Proben nach 12 Monaten war eine hoch signifikante Abnahme der Antikörpertiter um ca. 14% ( $p = 0,0009$ ) zu beobachten.

Bei Patienten mit einer GA-fixierten bovinen Perikardklappe war, wie bei den porcinen GA-behandelten Prothesen und den dezellularisierten Prothesen, eine geringe nicht signifikante Abnahme der Antikörpertiter postoperativ festzustellen. Bei der Untersuchung der IgG Antikörper war eine signifikante ( $p = 0,0156$ ) Zunahme bei den Follow-Up Proben gegenüber den praeoperativen zu beobachten. Für die Klasse der IgM Antikörper konnte keine signifikante Veränderung der Antikörper Titer nachgewiesen werden. Prinzipiell konnte festgestellt werden, dass die Messwerte für die IgM Antikörper deutlich weniger divergieren als die der IgG spezifischen Antikörpern.

Bei dezellularisierten Pulmonalklappen waren bei den Patienten bis zu einem Jahr postoperativ keine erhöhten Antikörpertiter gegen Bestandteile der extrazellulären Matrix der Herzklappen nachweisbar. Hiermit ist die Frage, ob dezellularisierte Pulmonalklappen nach der Implantation noch immunologisch aktiv sind, beantwortet.

#### **Nachweis von löslichem Gesamtproteinen und glattmuskulärem $\alpha$ -Aktin in Aortenklappen**

In unbehandelten Aortenklappen wurde ein Mittelwert mit einer Standardabweichung von  $80,41 \pm 10,23$  mg Protein/g Frischgewicht (FG) bestimmt. Der Dezellularisierungsprozess war in der Lage die Proteine um über 90% zu reduzieren. Bei der Bestimmung des in Herzzellen vorkommenden GMZ- $\alpha$ -Aktins wurden die Proben nach dem gleichen Protokoll wie zur Proteinbestimmung aufgeschlossen. Hierbei konnte durch Dezellularisieren für 24 Stunden eine Reduktion des GMZ- $\alpha$ -Aktins ebenfalls von über 90% erreicht werden. Bei Verlängerung der Inkubation auf 48 Stunden konnte keine weitere Reduktion erzielt werden. Diese Ergebnisse liefern die Antwort zur Frage, ob GMZ- $\alpha$ -Aktin und die löslichen Proteine vollständig aus den Aortenklappen entfernt werden können.

#### **Nachweis der Glykosaminoglykane**

Für die Bestimmung der GAGs Chondroitin- (CS) und Dermatan-Sulfat (DS) in Aortenklappen wurden jeweils drei unbehandelte und drei dezellularisierte Klappen in Vierfachbestimmung untersucht. In den unbehandelten Klappen wurde  $0,59 \pm 0,18$  mg/g FG und in dezellularisierten  $1,15 \pm 0,53$  mg/g FG CS gemessen. Bei nativen Aortenklappen wurde ein DS Gehalt von  $0,28 \pm 0,13$  mg/g FG und bei dezellularisierten ein Gehalt von  $0,49 \pm 0,32$  mg/g FG gemessen.

Diese Untersuchung liefert die Antwort auf die Frage, ob die GAGs und PGs nach der Dezellularisierung noch in den Geweben vorhanden sind.

## **Elektronenmikroskopische Untersuchung**

Anhand der elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass im unbehandelten Gewebe die Zellen kompakt und geschlossen, mit intakten Membranen, vorlagen. Auch die Zellkerne waren in ihren Strukturen eindeutig zu beurteilen. Nach der Dezellularisierung waren diese geschlossenen Zellstrukturen nicht mehr auszumachen. Die Zellen bildeten keine klar abgegrenzten Kompartimente mehr im Gewebe. Man konnte deutlich erkennen, dass die Zellen aufgeschlossen wurden und ihre Inhalte ausgetreten waren. Besonders gut war dieses an den Zellkernen zu erkennen, bei denen die Kernmembranen lysiert vorlagen und man die austretende DNA erkennen konnte. Während bei den unbehandelten Geweben die zellulären Strukturen noch gut erkennbar waren, so lagen sie in dezellularisiertem Gewebe nur noch diffus vor und konnten kaum noch zugeordnet werden.

In weiteren Aufnahmen, die speziell die extrazelluläre Matrix darstellen, war gut zu erkennen, dass der PG-gehalt durch die Dezellularisierung nicht gemindert wurde. Bei den Aufnahmen waren große und kleine PG zu erkennen. Die kleinen PGs waren im Bereich des Kollagens zu erkennen und konnten als Decorin identifiziert werden, das die Kollagenfibrillen vernetzt. Die größeren lagen in der locker aufgebauten löslichen Matrix und wurden als Versican bestimmt. Beim Vergleichen der elektronenmikroskopischen Aufnahmen von unbehandelten und behandelten Geweben konnte gezeigt werden, dass die Dichte der PG-CMB Präzipitate gleich blieben und somit auch die Menge an PGs sich nicht zwischen den Geweben unterschieden.

Mit dieser Untersuchung konnte gezeigt werden, dass es durch die Dezellularisierung mit DOA bei Aortenklappen nicht zu strukturellen Veränderungen kam. Damit wäre die Frage beantwortet, wie die Struktur der EZM von dezellularisierten Aortenklappen beschaffen ist und ob sie sich von den nativen Strukturen unterscheidet.

## **Equines Perikard**

Alle Schafe haben die Implantation gut überstanden und den Studienendpunkt nach vier Monaten erreicht. Bei keinem Tier kam es während des Untersuchungszeitraums zu Komplikationen. Die Gewebe wurden direkt nach der Explantation fotografiert und makroskopisch auf Aneurysmen und Ausdünnen des Gewebes untersucht. Bei keinem Explantat zeigten sich Hämatome, Vegetationen, thrombotische Anlagerungen, Verhärtungen oder Verkalkungen. Vielmehr konnte eine Wiederbesiedlung in Form eines „Monolayers“ aus Endothelzellen auf der dem Lumen zugewandten Seite nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass der Patch vollständige von Zellen infiltriert wurde. Hierbei wurden sowohl Fibroblasten als auch Myofibroblasten identifiziert. Neben der Besiedlung wurde mit der Movat-Pentachrom Färbung die

EZM untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass die EZM bei allen Implantaten unverändert gut erhalten war. Es kam während der Implantationszeit von vier Monaten zu keiner histologisch nachweisbaren Degeneration. Mit der van Kossa Färbung konnte bei allen Implantaten die Abwesenheit von Kalziumakkumulationen nachgewiesen werden. Diese Befunde zeigen Heilungs- und Regenerationspotential des zellfreien Gewebes.

Die Ergebnisse des Tierversuchs lieferten die Antworten auf die noch offenen Fragen, ob dezellularisiertes Perikard ähnlich wie zellfreies Herzklappengewebe dem systemischen Druck standhalten kann, ohne zu degenerieren oder zu verkalken und ob es sich ähnlich den zellfreien Herzklappen mit Empfänger Zellen wiederbesiedelt.

## Diskussion

Die größte Hürde bei der Verwendung von tierischem Gewebe in der Herzchirurgie stellt ihr hohes immunologisches Potential dar. Sie können ausschließlich nach einer GA-Fixierung implantiert werden, bei der die Kollagenfasern zusätzlich irreversibel vernetzt werden und das immunologische Potential der Gewebe reduziert wird. Auf diese Art behandelte Gewebe sind deutlich steifer und tendieren zu Verkalkungen. Eine Möglichkeit diese Fixierung zu umgehen und trotzdem das immunologische Potential der Gewebe zu senken stellt das Dezellularisieren dar. Hierbei werden alle Zellen und zellulären Bestandteile mit immunologischem Potential aus der EZM entfernt, ohne diese zu schädigen.

Aus bisherigen Untersuchungen ist bekannt, dass zellfreie Herzklappen im Gegensatz zu konventionellen mit GA fixierten Herzklappen nicht verkalken. Hierzu liegen Untersuchungen am juvenilen Schaf<sup>14,22</sup> und erste Ergebnisse bei Menschen<sup>23,24</sup> vor. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Herzklappen nach der Implantation mit Empfängerzellen wiederbesiedelt werden. In einer Arbeit von Dohmen und Kollegen konnte im juvenilen Schaf gezeigt werden, dass es hierbei keinen Unterschied macht, ob die Klappen vor der Implantation mit Empfängerzellen besiedelt wurden oder nicht; so war nach 6 Monaten zwischen den beiden Gruppen kein Unterschied mehr zu erkennen<sup>25</sup>. Diese Beobachtungen zeigen, dass dezellularisierte Matrizen nicht zytotoxisch sind, sondern vom Körper akzeptiert werden und ein Gerüst darstellen, in dem sich neue Zellen ansiedeln können. Hierbei ist entscheidend, dass die Matrizen vollständig dezellularisiert sind, da es bei unvollständiger Dezellularisierung zu immunologischen Reaktionen gegen die Zellen und Zellreste kommen würde. Diese Reaktionen können im schlimmsten Fall zur Abstoßung des Implantates führen<sup>19</sup>.

Zur Klärung, ob immunologische Reaktionen gegen Bestandteile der Extrazellulären Matrix für das Verkalken der Gewebe verantwortlich sind, wurden Serumproben von Patienten mit biologischen Herzklappen auf Antikörper gegen Matrix Bestandteile untersucht. Bei der Untersuchung standen die Kollagene als Hauptbestandteil der Matrix im Vordergrund. In vorherigen Versuchen, die von unserer Arbeitsgruppe durchgeführt wurden, wurde Elastin und Kollagen Typ-IV bereits als Immunogen ausgeschlossen, da bei Untersuchung mit einer kleineren Kohorte keine Veränderungen der Antikörpertiter nachweisbar waren<sup>26</sup>. Es wurde sich deshalb in dieser Untersuchung auf Kollagen Typ-I, den häufigsten Kollagentyp der EZM von Herzklappen beschränkt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigten, dass auch Kollagen Typ-I als Auslöser für eine Immunreaktion der Patienten gegen das porcine Kollagen ausscheidet. Bei keiner der untersuchten Gruppen wurde eine Zunahme der anti-Kollagen Typ-I Antikörper nach Implantation einer porcinen Herzklappe nachgewiesen. Hieraus lässt sich ableiten, dass porcines Kollagen nicht als



Fremdgewebe identifiziert wurde. Dieses war weder bei GA-fixierten, bei denen das Kollagen mit GA maskiert vorliegt, noch bei dezellularisierten Klappen der Fall, bei denen das native porcine Kollagen vorhanden war. Diese Schlussfolgerung ist nicht selbsterklärend, selbst wenn eine große Homologie zwischen humanem und porcinem Kollagen vorhanden ist. Von einer Forschungsgruppe der Charité wurde zuvor gezeigt, dass sowohl humanes als auch porcines Kollagen in der Lage ist in Zellkulturen die Proliferation von Immunzellen und eine erhöhte Freisetzung von Th1 Zytokinen auszulösen<sup>27</sup>.

Neben den bereits erwähnten Auslösern gibt es auch die Vermutung, dass Phospholipide die Ursache für das Verkalken der fixierten Herzklappen sein könnten<sup>28</sup>. Momentan wird allerdings immer häufiger vermutet, dass  $\alpha$ -Gal eine bedeutende Rolle im Prozess des Verkalkens der Gewebe zukommt.  $\alpha$ -Gal ist das am häufigsten vorkommende Xenoantigen und wird für die hyperakute Abstoßung von xenogenem Gewebe verantwortlich gemacht<sup>29,30</sup>. Das  $\alpha$ -Gal Epitop ist bei beinahe allen Säugetieren auf den Zellen konserviert. Nur einige Affenarten, Primaten und der Mensch stellen hierbei eine Ausnahmen dar. Bei ihnen wurde im Laufe der Evolution das Gen für das Enzym  $\alpha$ -1,3-Galactosyltransferase inaktiviert. Dieses glykosilierende Enzym ist dafür verantwortlich, dass  $\alpha$ -Gal Epitope auf Glykoproteinen und Glykolipiden auf Zelloberflächen gebildet werden<sup>31,32</sup>. Etwa 1% der zirkulierenden B-Zellen des Menschen sind in der Lage Antikörper gegen  $\alpha$ -Gal zu produzieren.

In der Literatur finden sich diverse Untersuchungen zum Thema xenogene Herzklappen und  $\alpha$ -Gal, zum Beispiel die Arbeit von Kasimir und Kollegen, bei der  $\alpha$ -Gal in GA-fixierten Herzklappen und in der Gefäßwand dezellularisierten Synergraft Herzklappen tierischen Ursprungs nachgewiesen wurde<sup>8</sup>. Die Synergraft-Klappen waren die ersten dezellularisierten xenogenen Herzklappen, die für die klinische Anwendung zugelassen wurden. Sie zeigten jedoch Problemen mit Abstoßungsreaktionen aufgrund unvollständiger Dezellularisierung. In der gleichen Arbeit wurde ein gänzlich Entfernen der  $\alpha$ -Gal Epitope nur bei vollständig dezellularisierten Geweben erzielt. Bei der dabei verwendeten Methode wurden drei Substanzen verwendet, von denen eine DOA war. Alle in dieser Arbeit untersuchten dezellularisierten Herzklappen wurden ausschließlich nach dem Autotissue Verfahren mit DOA dezellularisiert. Die Tatsache, dass es nach Implantation dieser Klappen, zu keiner Erhöhung der anti- $\alpha$ -Gal Antikörper kam, spricht dafür, dass alle  $\alpha$ -Gal-Epitope vollständig aus dem Gewebe entfernt wurden. Die  $\alpha$ -Gal-Epitope sind auf den Zellmembranen vorhanden, so dass davon ausgegangen werden kann, dass mit dem  $\alpha$ -Gal die Zellmembranen vollständig aus dem Gewebe entfernt wurden. Es muss allerdings die Möglichkeit berücksichtigt werden, dass die  $\alpha$ -Gal-Epitope nicht entfernt, sondern lediglich maskiert oder inaktiviert wurden. Dieses ist allerdings unwahrscheinlich, weil beim Dezellulari-

sieren keine Stoffe in der Matrix zurückbleiben. Außerdem ist selbst die GA-Behandlung nicht in der Lage die  $\alpha$ -Gal-Epitop vollständig zu maskieren, so wurde in unserer Arbeit und bei Kasimir und Kollegen<sup>8</sup> bei fixierten Herzklappen eine Erhöhung der Antikörper gegen  $\alpha$ -Gal nachgewiesen. Es darf aber bei dieser Untersuchung nicht vernachlässigt werden, dass ausschließlich Antikörper im Blut nachgewiesen wurden. Eine wesentlich präzisere Nachweismethode wäre eine direkte Untersuchung der Gewebe auf das  $\alpha$ -Gal-Epitop, zum Beispiel mit Hilfe einer Antikörperfärbung.

Es konnte gezeigt werden, dass die dezellularisierten Pulmonalklappen keine mit der ELISA Technik nachweisbare immunologische Reaktion im Patienten auslösten. Es war weder für Kollagen Typ-I noch in früheren Studien bei Kollagen Typ-IV und Elastin<sup>26</sup> noch bei dem  $\alpha$ -Gal Assay eine Erhöhung der Antikörper nachweisbar.

Bisher wurde ausschließlich die spezifische Immunabwehr gegen die Implantate betrachtet. Allerdings gibt es auch erfolgsversprechende Ansätze, die sich mit der zellulären, also der unspezifischen Immunreaktion beschäftigen. Eine dieser Arbeiten ist die von Rieder und Kollegen<sup>33</sup>. Mit einem Migrations-Assay zeigten sie eine verringerte Migration der Monozyten und Leukozyten bei Proteinextrakten aus porcinen dezellularisierten Geweben verglichen mit Extrakten aus nativen porcinen Geweben. Diese Reduktion war der von GA-behandelten Geweben gleich, bei denen die Gewebeoberfläche mit GA maskiert war. Allerdings konnte weder durch Dezellularisieren noch durch die Behandlung mit GA die Migration der Granulozyten unterbunden werden. Vielmehr wurde bei beiden Geweben eine deutliche Erhöhung gegenüber den Kontrollen festgestellt. Das Einwandern von Monozyten und Granulozyten wurde bereits in früheren Arbeiten bei kryokonservierten allogenen Herzklappen und bei fixierten Xenografts gezeigt<sup>34,35</sup> - jedoch nicht bei dezellularisierten Herzklappen. Monozyten können zu Makrophagen differenzieren und zwar sowohl zum inflammatorischen Typ M1 als auch zum regenerativen Typ M2. Bei dezellularisierten EZM konnte nach der Implantation ein Wechsel vom Typ M1 zu M2 beobachtet werden, der bei GA-fixierten EZM nicht beobachtet werden konnte<sup>36</sup>. In weiteren Untersuchungen von Kasimir und Kollegen wurde das Verhalten der Granulozyten gegenüber den dezellularisierten Xenografts untersucht. Mit einer Movat-Pentachrom Färbung wurde festgestellt, dass bei vollständig dezellularisierten Geweben, wie sie auch in der Arbeit von Kasimir et al. verwendet wurden<sup>18</sup>, keine PGs mehr im Gewebe vorhanden waren<sup>37</sup>. PGs und weitere Bestandteile der EZM sind in der Lage Einfluss auf die Aktivität des Komplementsystem zu nehmen und haben einen inhibitorischen Einfluss auf die Adhäsion der neutrophilen Granulozyten<sup>38,39</sup>. Nach einer Behandlung der dezellularisierten Klappen mit einem Proteinextrakt aus unbehandelten porcinen Herzklappen, wurde eine geringere Migration der Granulozyten beobachtet, womit die These

unterstützt wird, dass Bestandteile der EZM wie zum Beispiel PGs die Migration von Granulozyten und somit die spezifische Immunreaktion verhindern oder mindestens reduzieren können<sup>37</sup>. Es ist bei der Dezellularisierung deshalb nicht nur notwendig, die Zellen vollständig zu entfernen, sondern es müssen auch die Bestandteile der EZM, wie PG, erhalten bleiben, damit die Gewebe wiederbesiedelt werden können und keine immunologischen Reaktionen auslösen. Diese Beobachtungen zeigen, dass neben den Kollagen- und Elastinstrukturen auch weitere Elemente der EZM beim Dezellularisieren erhalten werden müssen, damit Gewebe entstehen die vom Empfänger akzeptiert und wiederbesiedelt werden können.

Aus diesem Grund wurden dezellularisierte Herzklappen auf ihren PG- und GAG-Gehalt untersucht. Hierfür wurde eine an die Methode von Farndale angelehnte Untersuchung etabliert<sup>20</sup>. Abweichend zum Protokoll von Farndale wurden vor der Messung störende Bestandteile aus dem Lysat der Gewebe mit Ethanol ausgefällt und die Farbstoff-Lysat Ratio wurde für die Anwendung auf Mikrotiterplatten optimiert. Mit der optimierten Methode wurden die PG- und GAG-Gehälter von dezellularisierten und nativen Aortenklappen bestimmt und verglichen. Es wurden für diesen Versuch Aortenklappen verwendet, weil sie aufgrund ihrer verschiedenen Gewebe besonders schwierig zu dezellularisieren sind. Allgemein bestehen Aorten- und Pulmonalklappen aus Gefäßwand, Muskel und den Taschen. Bei der Aortenklappe ist das Verhältnis zwischen der dicken und festen Gefäßwand und den dünnen Segeln der Taschen maximal und erfordert einen aufwändigen Prozess, um die Klappe zu dezellularisieren ohne die Segel der Taschen zu beschädigen. Um die Zellen trotzdem aus dem Gewebe zu entfernen, sind deutlich längere Inkubationszeiten notwendig. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass dieser längere Prozess die EZM der Klappen auch deutlich stärker angreifen würde. Perikard hat dieses Verhältnis nicht, da es nur aus einem Gewebetyp besteht und ist deshalb deutlich einfacher zu dezellularisieren.

Die bei dieser Untersuchung erzielten Ergebnisse für unbehandelte Aortenklappen waren vergleichbar mit denen in der Literatur. Grand-Allen und Kollegen haben jedoch nur den Gesamt-GAG-Gehalt in den Klappen bestimmt, so dass die Werte von CS und DS addiert werden mußten. Hierbei ergab sich ein Gehalt von 0,73 µg GAG / mg FG in native Aortenklappen bei unserer Messung, verglichen mit 0,69 µg GAG / mg FG<sup>40</sup> [Grand-Allen 2003]. Beim Vergleich der dezellularisierten mit den nativen Aortenklappen zeigte sich jedoch ein deutlich höherer GAG-Gehalt in dezellularisierten als in nativen Geweben. Eine mögliche Ursache kann in der Gewichtsreduktion der Gewebe durch die Dezellularisierung liegen. Bei vollständiger Dezellularisierung werden alle Zellen und zellulären Bestandteile aus dem Gewebe entfernt, so dass bei gleicher Einwaage mehr EZM eingewogen wird. Zusätzlich zu den Zellen werden auch ein

Großteil der löslichen Proteine beim Dezellularisieren aus der Matrix entfernt, welches eine weitere Gewichtsreduktion des Gewebes bedeutet und somit einen Anstieg der nichtlöslichen Proteine erklären könnte.

Zur weiteren Betrachtung der Gewebe und zum Lokalisieren der GAG und PGs wurden native und dezellularisierte Aortenklappen elektronenmikroskopisch untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die Membranen der Zellen durch die Behandlung lysiert wurden und zelluläre Bestandteile austraten. Insbesondere war dieses bei der Kernmembran anhand von austretender DNS auszumachen. Es waren jedoch keine strukturellen Veränderungen zu beobachten und der Aufbau der Kollagen- und Elastinfasern war in beiden Geweben, dezellularisiert und nativ, vergleichbar. Außerdem war zu erkennen, dass sich die Verteilung und die Konzentration der GAGs durch die Dezellularisierung nicht verändert hatte und die strukturelle Integrität der Gewebe somit erhalten blieb<sup>5</sup>. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass es durch die Dezellularisierung mit der Autotissue Methode nicht zu einer Reduktion der GAGs in den Geweben kommt und somit eine weitere Voraussetzung zum Schutz des Gewebes vor Degeneration erhalten bleibt. Die mit diesem Protokoll dezellularisierten Gewebe konservieren die Spongiosa, eine PG-reiche gelartige Schicht, die in der Lage ist Scher- und Kompressionskräfte abzubauen, so dass die Gewebe ihre natürliche Elastizität erhalten und bei Belastung nicht geschädigt werden<sup>41</sup>. Es werden vielmehr die natürlichen Strukturen und elastischen Eigenschaften konserviert, was sich auch an den Leistungen der zellfreien Klappen zeigt, die vergleichbar mit denen der natürlichen Klappe sind<sup>10</sup>. GAGs beeinflussen zusätzlich durch Interaktionen mit Wachstumsfaktoren die Infiltration und Migration von Zellen in die Gewebe<sup>41</sup>. Aufgrund solcher Interaktionen sind sie wichtige Faktoren bei der Neubesiedlung von zellfreien Geweben. Eine Wiederbesiedlung garantiert den Erhalt der EZM, da ihre Bestandteile von den einwachsenden Zellen neu gebildet werden<sup>42</sup>. Ansonsten würden die Bestandteile der EZM über die Zeit abgebaut, insbesondere Elastin, welches selbst durch eine GA-Fixierung nicht vor enzymatischer Degradation geschützt werden kann<sup>43</sup>. Von unserer Gruppe und einer italienischen Forschungsgruppe konnte die *in vivo* Besiedlung dezellularisierter Herzklappen bereits gezeigt werden<sup>44,16</sup>. Auch die Neubildung von Kollagen und Elastin konnte bei implantierten Matrizen im Schaf beobachtet werden<sup>25</sup>. Diese Aussagen werden durch die Ergebnisse hier untermauert, so konnte gezeigt werden, dass es möglich ist Herzklappen vollständig zu dezellularisieren, unter Erhalt der PGs und GAGs. Neben den bereits erwähnten Eigenschaften haben PGs auch eine inhibitorische Wirkung auf das Verkalken der Gewebe<sup>45,46</sup>. Unterstützend wurde bisher bei DOA dezellularisierten Geweben kein Anzeichen von Verkalkungen, weder in tierexperimentellen Untersuchungen noch bei Implantationen im Menschen, insbesondere bei Kindern beobachtet<sup>14,16,47</sup>.

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen, dass das auf xenogenem Gewebe vorhandenen Antigen  $\alpha$ -Gal in der Lage ist bei Patienten eine Immunreaktion auszulösen. Diese Reaktion wurde auch beobachtet, wenn die Gewebe vor der Implantation mit GA maskiert und stabilisiert wurden. Auch bei unvollständig dezellularisierten Geweben wurden Reaktionen gegen  $\alpha$ -Gal nachgewiesen<sup>18,19</sup>. Im Gegensatz dazu wurden bei vollständig dezellularisierten Geweben, wie bei der Matrix P plus, keine Reaktion gegen das Xenoantigen  $\alpha$ -Gal beobachtet. In zukünftigen Untersuchungen wird die Rolle des  $\alpha$ -Gal Epitops im Zusammenhang mit dem Verkalken von Herzklappenprothesen weiter untersucht werden müssen. So wird geklärt werden müssen, ob die immunologischen Reaktionen gegen  $\alpha$ -Gal auch der Auslöser für das Verkalken der biologischen Implantate darstellen, oder ob weitere Faktoren für die limitierte Haltbarkeit der Herzklappen durch Verkalken verantwortlich sind<sup>48</sup>.

Bei neueren Herzklappenprothesen wird immer häufiger Perikard als Ausgangsmaterial verwendet. Es ist ein zellarmes sehr stabiles Gewebe und ermöglicht die Konstruktion von Herzklappen mit deutlich weniger xenogenem Gewebe als bei nativen Herzklappe. Somit ist es möglich Herzklappen mit einem deutlich reduzierten immunologischen Potential herzustellen. So zeigten sich für Prothesen aus bovinem Perikard keine Erhöhung der Antikörper bei den Untersuchungen der Seren.

Ein weiterer Grund für die Verwendung von Perikard ist die Tatsache, dass immer mehr Herzklappen per Katheter implantiert werden. Diese Herzklappen werden vor der Implantation gefaltet, komprimiert und auf einen Katheter geladen, mit dem sie zum Herzen transportiert werden. Eine solche Konstruktion ist bevorzugt mit Perikard zu realisieren, da nur mit diesem dünnen Material die Herzklappen auf einen möglichst geringen Durchmesser komprimiert werden können. Gerade für diese Anwendung wäre dezellularisiertes Perikard ideal, da es dünner und flexibler ist als GA-fixiertes.

Um dezellularisiertes Perikard in solchen Herzklappen testen zu können, muss sichergestellt werden, dass es den hohen mechanischen Belastungen standhält. Aus diesem Grund wurden sechs Perikardpatche im juvenilen Schafmodell untersucht.

In *in vitro* Versuchen konnte bereits gezeigt werden, dass eine Dezellularisierung die mechanischen Eigenschaften der Patche nicht negativ beeinflussen. Allerdings konnte dabei nur die maximale Belastung untersucht werden und keine kontinuierliche, wie in diesem Tierversuch. Alle Tiere haben bis zum Studienendpunkt überlebt und zeigten während der Explantation vollständiges Einheilen der Patche in das umliegende Gewebe. Es waren keine entzündlichen Veränderungen oder Abstoßungsreaktionen an den Implantaten zu erkennen. Bei den anschließenden makroskopischen Untersuchungen waren keine degenerativen Veränderungen wie Ausdünnungen,

Verdickungen, Verkalkungen oder Aneurysmen zu erkennen. Auch bei der histologischen Aufarbeitung der Proben waren keine degenerativen Veränderungen zu erkennen. Vielmehr wurden alle Implantate mit Empfängerzellen wiederbesiedelt. Es zeigte sich ein physiologisch unauffälliges Bild, bei dem das Gewebe vollständig mit Fibroblasten infiltriert war mit einem „Monolayer“ aus Endothezellen auf der Innenseite.

Diese Untersuchung zeigt, dass dezellularisiertes Perikard, trotz seiner geringen Dicke und hohen Flexibilität ein Material ist, das in den systemischen Kreislauf implantiert werden kann. Mit dezellularisiertem Perikard steht somit ein zellfreies Material mit geringstem immunologischem Potential zur Verfügung, das bei zukünftigen kathetergestützten Herzklappensystemen verwendet werden kann. Es wird in weiteren Untersuchungen beobachtet werden müssen, ob das Perikard auch bei diesen Herzklappen nach dem Crimpen (Falten und Komprimieren) seine hervorragenden Eigenschaften behält.

## Literaturverzeichnis

- 1.) Carpentier A., Lemaigre G., Robert L., Carpentier S. und Dubost C.: Biological factors affecting long term results of valvular heterografts. In: *J Thorac Cardiovasc Surg*, Band 58(4):S.467-483, 1969.
- 2.) Curcio C.A., Commerford P.J., Rose A.G., Stevens J.E. und Barnard M.S.: Calcification of glutaraldehyd-preserved porcine xenografts in young patients. In: *J Thorac Cardiovasc Surg*, Band 81(4):S.621-625, 1981.
- 3.) Konakci K.Z., Bohle B., Blumer B., Hoetzenecker W., Roth G., Moser B., Boltz-Nitulescu G., Gorlitzer M., Klepetko W., Wolner E. und Ankersmit H.J.: Alpha-gal on bioprostheses: xenograft immune response in cardiac surgery. In: *Eur J Clin Invest*, Band 35(1):S.17-23, 2005.
- 4.) Steinhoff G., Stock U., Karim N., Mertsching H., Timke A., Meliss R.R., Pethig K., Haverich A. und Bader A.: Tissue engineering of pulmonary heart valves on allogenic acellular matrix conduits: in vivo restoration of valve tissue. In: *Circulation*, Band 102(19 Suppl 3):S.III50-55, 2000.
- 5.) Booth C., Korossis S.A., Wilcox H.E., Watterson K.G., Kearney J.N., Fisher J. und Ingham E.: Tissue engineering of cardiac valve prostheses: development and histological characterization of an acellular porcine scaffold. In: *J Heart Valve Dis*, Band 11(4):S.457-462, 2002.
- 6.) Kasimir M.T., Rieder E., Seebacher G., Silberhumer G., Wolner E., Weigel G. und Simon P.: Comparison of different decellularization procedures of porcine heart valves. In: *Int J Artif Organs*, Band 26(5):S.421-427, 2003.
- 7.) Goldstein S., Clarke D.R., Walsh S.P., Black K.S. und O'Brien M.F.: Transspecies heart valve transplant: advanced studies of a bioengineered xeno-autograft. In: *Ann Thorac Surg*, Band 70(6):S.1962-1969, 2000.
- 8.) Kasimir M.T., Rieder E., Seebacher G., Wolner E., Weigel G. und Simon P.: Presence and elimination of the xenoantigen gal (alpha1, 3) gal in tissue-engineered heart valves. In: *Tissue Eng*, Band 11(7-8):S.1274-1280, 2005.
- 9.) Elkins R.C., Dawson P.E., Goldstein S., Walsh S.P. und Black K.S.: Decellularized human valve allografts. In: *Ann Thorac Surg*, Band 71(5 Suppl):S.428-432, 2001.
- 10.) Konertz W., Dohmen P.M., Liu J., Beholz S., Dushe S., Posner S., Lembcke A. und Erdbrügger W.: Hemodynamic characteristics of the matrix p dezellularized xenograft for pulmonary valve replacement during the Ross operation. In: *J Heart Valve Dis*, Band 14:S.78-81, 2005.
- 11.) Erdbrügger W., Konertz W., Dohmen P.M., Posner S., Ellerbrok H., Brodde O-E., Robenek H., Modersohn D., Pruss A., Holinski S., Stein-Konertz M. und Pauli G.: Decellularized xenogenic heart valves reveal remodeling and growth potential in vivo. In: *Tissue Eng*, Band 12(8):S.2059-2068, 2006.
- 12.) Dohmen P.M., Ozaki S., Verbeke E., Yperman J., Flameng W. und Konertz W.F.: Tissue engineering of an auto-xenograft pulmonary heart valve. In: *Asian Cardiovasc Thorac Ann*, Band 10(1):S.25-30, 2002.
- 13.) Rieder E., Kasimir M.T., Silberhumer G., Seebacher G., Wolner E., Simon P. und Weigel G.: Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells. In: *J Thorac Cardiovasc Surg*, Band 127(2):S.399-405, 2004.

- 14.) Dohmen P.M., Ozaki S., Yperman J., Flameng W. und Konertz W.: Lack of calcification of tissue engineered heart valves in juvenile sheep. In: *Semin Thorac Cardiovasc Surg*, Band 13(4 Suppl 1):S.93-98, 2001.
- 15.) Dohmen P.M., da Costa F., Holinski S., Lopes S.V., Yoshi S., Reichert L.H., Villani R., Posner S. und Konertz W.: Is there a possibility for a glutaraldehyde-free porcine heart valve to grow? In: *Eur Surg Res*, Band 28:S.54-61, 2006.
- 16.) Iop L., Bonetti A., Naso F., Rizzo S., Cagnin S., Bianco R., Dal Lin C., Martini P., Poser H., Franci P., Lanfranchi G., Busetto R., Spina M., Basso C., Maurizio M., Gandaglia A., Ortolani F. und Gerosa G.: Decellularized allogeneic heart valves demonstrate self-regeneration potential after a long-term preclinical evaluation. In: *PLoS ONE*, Band 9(6), 2014.
- 17.) da Costa F.D.A., Dohmen P.M., Lopes S.V., Lacerda G., Pohl F., Vilani R., da Costa M.B.A., Vieira E.D., Yoshi S., Konertz W. und da Costa I.A.: Comparison of cryopreserved homografts and decellularized porcine heterografts implanted in sheep. In: *Artif Organs*, Band 28(4):S.366-370, 2004.
- 18.) Kasimir M.T., Rieder E., Seebacher G., Nigisch A., Dekan B., Wolner E., Weigel G. und Simon P.: Decellularization does not eliminate thrombogenicity and inflammatory stimulation in tissue-engineered porcine heart valves. In: *J Heart Valve Dis*, Band 15(2):S.278-286, 2006.
- 19.) Simon P., Kasimir M.T., Seebacher G., Weigel G., Ullrich R., Salzer-Muhar U., Rieder E. und Wolner E.: Early failure of the tissue engineered porcine heart valve synergraft in pediatric patients. In: *Eur J Cardiothorac Surg*, Band 23(6):S.1002-1006, 2003.
- 20.) Farndale R.W., Buttle D.J. und Barrett A.J.: Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. In: *Biochim Biophys Acta*, Band 883(2):S.173-177, 1986.
- 21.) Rothenburger M., Völker W., Vischer J.P., Glasmacher B., Scheld H.H. und Deiwick M.: Ultrastructure of proteoglycans in tissue-engineered cardiovascular structures. In: *Tissue Eng*, Band 8(6):S.1049-1056, 2002.
- 22.) Dohmen P.M., da Costa F., Lopes S.V., Yoshi S., da Souza F.P., Vilani R., da Costa M.B. und Konertz W.: Results of a decellularized porcine heart valve implanted into the juvenile sheep model. In: *Heart Surg Forum*, Band 8(2):S.E100-104;discussion E104, 2005.
- 23.) Dohmen P.M., Lembcke A., Holinski S., Kivelitz D., Braun J.P., Pruss A. und Konertz W.: Mid-term clinical results using a tissue-engineered pulmonary valve to reconstruct the right ventricular outflow tract during the Ross procedure. In: *Ann Thorac Surg*, Band (84)3:S.729-736, 2007.
- 24.) Konertz W., Angeli E., Tarusinov G., Christ T., Kroll J., Dohmen P.M., Krogmann O., Franzbach B., Napoleone C.P. und Gargiulo G.: Right ventricular outflow tract reconstruction with decellularized porcine xenografts in patients with congenital heart disease. In: *J Heart Valve Dis*, Band 20(3):S.341-347, 2011.
- 25.) Dohmen P.M., da Costa F., Yoshi S., Lopes S.V., da Souza F.P., Vilani R., Wouk A.F., da Costa M. und Konertz W.: Histological evaluation of tissue-engineered heart valves implanted in the juvenile sheep model: Is there a need for in-vitro seeding? In: *J Heart Valve Dis*, Band 15:S.823-829, 2006.
- 26.) Golde P.: Die Immunantwort auf das biologische Implantat bei Patienten mit einer Herzklappenoperation - Untersuchungen zur Rolle der extrazellulären Matrix mittels ELISA. Unveröffentlichte Diplomarbeit, Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg, 2006.



- 27.) Bayrak A., Tyralla M., Ladhoff J., Schleicher M., Stock U.A., Volk H-D. und Seifert M.: Human immune response to porcine xenogenic matrices and their extracellular matrix constituents in vitro. In: *Biomaterials*, Band 31(14):S.3793-3803, 2010.
- 28.) Jorge-Herrero E., Fernández P., de la Torre N., Escudero C., García-Páez J.M., Buján J. und Castillo-Olivares J.L.: Inhibition of the calcification of porcine valve tissue by selective lipid removal. In: *Biomaterials*, Band 15(10):S.815-820, 1994.
- 29.) Galili U.: The alpha-gal epitope (gal alpha 1-3gal beta 1-4glnac-r) in xenotransplantation. In: *Biochimie*, Band 83(7):S.557-563, 2001.
- 30.) Sandrin M.S. und McKenzie I.F.: Gal alpha (1,3)gal, the major xenoantigen(s) recognized in pigs by human natural antibodies. In: *Immunol Rev*, Band 141:S.169-190, 1994.
- 31.) Galili U., Shohet S.B., Kobrin E., Stults C.L. und Macher B.A.: Man, apes, and old world monkeys differ from other mammals in the expression of alpha-galactosyl epitopes on nucleated cells. In: *J Biol Chem*, Band 263(33):S.17755-17762, 1988.
- 32.) Galili U.: The alpha-gal epitope and the anti-gal antibody in xenotransplantation and cancer immunotherapy. In: *Immunol Cell Biol*, Band 83(6):S.674-686, 2005.
- 33.) Rieder E., Nigisch A., Dekan B., Kasimir M.T., Mühlbacher F., Wolner E., Simon P. und Weigel G.: Granulocyte-based immune response against decellularized or glutaraldehyde cross-linked vascular tissue. In: *Biomaterials*, Band 27(33):S.5634-5642, 2006.
- 34.) Trantina-Yates A., Weissenstein C., Human P. und Zilla P.: Stentless bioprosthetic heart valve research: sheep versus primate model. In: *Ann Thorac Surg*, Band 71(5):S.422-427, 2001.
- 35.) Koolbergen D.R., Hazenkamp M.G., de Heer E., Bruggemans E.F., Huysmans H.A., Dion R.A.E. und Bruijn J.A.: The pathology of fresh and cryopreserved homograft heart valves: an analysis of forty explanted homograft valves. In: *J Thorac Cardiovasc Surg*, Band 124(4):S.689-697, 2002.
- 36.) Brown B.N. und Badylak S.F.: Extracellular matrix as an inductive scaffold for functional tissue reconstruction. In: *Transl. Res*, Band 163(4):S.268-285, 2014.
- 37.) Bastian F., Stelzmüller M-E., Kratochwill K., Kasimir M.T., Simon P. und Weigel G.: IgG deposition and activation of the classical complement pathway involvement in the activation of human granulocytes by decellularized porcine heart valve tissue. In: *Biomaterials*, Band 29(12):S.1824-1832, 2008.
- 38.) Ottonello L., Dapino P., Amelotti M., Barbera P., Arduino N., Bertolotto M. und Dallegri F.: Activation of neutrophil respiratory burst by cytokines and chemoattractants regulatory role of extracellular matrix glycoproteins. In: *Inflamm Res*, Band 47(8):S.345-350, 1998.
- 39.) Groeneveld T.W.L., Oroszlán M., Owens R.T., Faber-Krol M.C., Bakker A.C., Arlaud G.J., McQuillan D.J., Kishore U., Daha M.R. und Roos A.: Interaction of the extracellular matrix proteoglycans decorin and biglycan with c1q and collections. In: *J Immunol*, Band 175(7):S.4715-4723, 2005.
- 40.) Grande-Allen K.J., Mako W.J., Calabro A., Shi Y., Ratliff N.B. und Vesely I.: Loss of chondroitin 6-sulfate and hyaluronan from failed porcine bioprosthetic valves. In: *J Biomed Mater Res A*, Band 65(2):S.251-259, 2003.
- 41.) Rozario T. und DeSimone D.W.: The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. In: *Dev Biol*, Band 341(1):S.126-140, 2010.

- 42.) Grauss R.W., Hazekamp M.G., van Vliet S., Gittenberger-de Groot A.C. und DeRuiter M.C.: Decellularization of rat aortic valve allografts reduces leaflet destruction and extracellular matrix remodeling. In: *J Thorac Cardiovasc Surg*, Band 126(6):S.2003-2010, 2003.
- 43.) Isenburg J.C., Simionescu D.T. und Vyavahare N.R. Elastin stabilization in cardiovascular implants: improved resistance to enzymatic degradation by treatment with tannic acid. In: *Bio-materials*, Band 25(16):S.3293-3302, 2004.
- 44.) Dohmen P.M., Hauptmann S., Terytze A. und Konertz W.F.: In-vivo repopulation of a tissue-engineered heart valve in a human subject. In: *J Heart valve dis.* Band 16(4):S.447-449, 2007.
- 45.) Chen C.C., Boskey A.L. und Rosenberg L.C.: The inhibitory effect of cartilage proteoglycans on hydroxyapatite growth. In: *Calcif Tissue Int*, Band 36(3):S.285–290, 1984.
- 46.) Eanes E.D., Hailer A.W., Midura R.J. und Hascall V.C.: Proteoglycan inhibition of calcium phosphate precipitation in liposomal suspensions. In: *Glycobiology*, Band 2(6):S.571-578, 1992.
- 47.) Dohmen P.M., Lembcke A., Holinski S., Pruss A., und Konertz W.: Ten years of clinical results with a tissue-engineered pulmonary valve. In: *Ann Thorac Surg*, Band 92(4):S.1308-1314, 2011.
- 48.) Human P. und Zilla P.: Inflammatory and immune processes: the neglected villain of bio-prosthetic degeneration? In: *J Long Term Eff Med Implants*, Band 11(3-4):S.199-220, 2001.

## Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen

Oliver Bloch hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

Bloch O., Golde P., Dohmen P., Posner S., Konertz W. und Erdbrügger W.: Immune response in patients receiving a bioprosthetic heart valve: lack of response with decellularized valves. In: *Tissue Eng: Part A*, Band 17:S.2399-405, 2011. IF = 4,022.

Beitrag im Einzelnen:

- Studiendesign
- Datenerhebung
- Statistische Auswertung
- Dateninterpretation
- Erstellen des Manuskripts
- Literaturrecherche

Publikation 2:

Bloch O., Erdbrügger W., Völker W., Schenk A., Posner S., Konertz W. und Dohmen P.: Extracellular matrix in deoxycholic acid decellularized aortic heart valves. In: *Med Sci Monit*, Band 18(12):S.487-492, 2012. IF = 1,669.

Beitrag im Einzelnen:

- Studiendesign
- Datenerhebung
- Statistische Auswertung
- Dateninterpretation
- Erstellen des Manuskripts
- Literaturrecherche

Publikation 3:

Dohmen P.M., da Costa F., Lopes S., Vilani R., Bloch O. und Konertz W.: Successful implantation of decellularized equine pericardial patch into the systemic circulation. In: *Med Sci Monit Basic Res*, Band 20:S.1-8, 2014. IF = 1,216.

Beitrag im Einzelnen:

- Statistische Auswertung
- Literaturrecherche

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

---

## **Druckexemplare der Publikationen**

# Immune Response in Patients Receiving a Bioprosthetic Heart Valve: Lack of Response with Decellularized Valves

Oliver Bloch, M.Sc.,<sup>1</sup> Pia Golde, M.Sc.,<sup>2</sup> Pascal M. Dohmen, Ph.D., M.D.,<sup>3</sup> Steffen Posner, Ph.D.,<sup>1</sup> Wolfgang Konertz, Ph.D., M.D.,<sup>3</sup> and Wilhelm Erdbrügger, Ph.D., M.B.A.<sup>1</sup>

Conventional biological heart valves treated with glutaraldehyde (GA) reveal a limited lifespan due to calcification. This is assumed to be an immune response initiated process, which is not seen with decellularized valves. However, their immunological potential is still a matter of debate. Therefore, serum samples from patients undergoing heart valve surgery were obtained before (Pre), after (Post), and 9–12 months after operation (Follow Up). Immunoglobulin G (IgG) and M (IgM) antibodies against porcine collagen I and  $\alpha$ -Gal (Gal-alpha1,3-Gal-beta1,4-GlcNAc-R) were determined for decellularized and GA treated valves. Antibody titers for collagen type I revealed no significant alteration for both types of valves. However, a considerable anti- $\alpha$ -Gal antibody response was observed in patients with GA-treated porcine valves. In detail, IgM antibodies were increased during follow up ( $p < 0.05$ ), whereas decellularized valves revealed a minor decrease in the IgM response ( $p < 0.001$ ). IgG antibodies were considerably increased with GA-treated porcine ( $p < 0.05$ ) and bovine ( $p < 0.01$ ) xenografts, whereas there was lack of response with decellularized valves. This indicates that GA treatment is not sufficient to eliminate immune response to the  $\alpha$ -Gal epitope completely. Future investigations will have to verify whether immune response to  $\alpha$ -Gal can be linked to the limited durability of conventional valves.

## Introduction

**I**N HEART VALVE DISEASE, SURGICAL VALVE replacement is often the only reasonable opportunity. Commonly used heart valve implants are either of mechanical or biological origin with both having unique disadvantages. Patients receiving mechanical heart valves have to undergo anti-coagulation therapy, which can lead to complications after long-term use<sup>1</sup> and to a loss in quality of life.<sup>2</sup> Conventional biological valves of different xenogenic origins<sup>3</sup> are cross-linked with glutaraldehyde (GA) to improve mechanical strength and to ensure sterility of the implant.<sup>4</sup> The GA-treatment is necessary to reduce antigenicity compared with native tissues.<sup>4</sup> However, these valves have a limited durability due to calcification<sup>5</sup> and, therefore, often make re-interventions necessary, especially in younger patients.<sup>6</sup> The reasons for this are still unknown, but calcification, in general, is assumed to be an immuno-inflammatory initiated process.<sup>7</sup>

Another alternative are allografts,<sup>8</sup> which are valves of deceased humans. However, adverse immunologic reactions<sup>9</sup> and their limited availability are severe disadvantages. During the last few years, tissue engineering (TE) of heart valves became a promising alternative to the conventional implants. With TE-techniques it is possible to create functional tissues with specific characteristics. Recent investiga-

tions have focused on achieving valves free of cells.<sup>10–13</sup> The decellularization protocols are complex, and only a few approaches were able to show removal of cells and cellular compounds completely without affecting the extracellular matrix (ECM).<sup>14</sup> Most of the suitable decellularization techniques, however, are still in a laboratory stage, and so far only two methods have gained clinical approval.<sup>15,16</sup> One of these methods is the Synergraft protocol, and the other technique led to the development of cellfree porcine pulmonary valves Matrix P<sup>®</sup> and Matrix P plus<sup>®</sup> by using deoxycholic acid (DOA) for decellularization.<sup>16,17</sup> Other protocols also employ DOA but use it in combination with other detergents<sup>14</sup>, which affect their clinical suitability. A major advantage of the Matrix P plus valves is that they do not calcify *in vivo*<sup>18,19</sup> and possess remodeling and growth potential<sup>16</sup> that all other presently available implants lack. Since they consist solely of the ECM, they might, therefore, have a lower immunologic potential.<sup>20,21</sup> However, this is still a matter of debate.<sup>22</sup>

The aim of the present study was, therefore, to compare the immunologic potential of conventional and TE heart valves in patients with regard to the immune response they elicit.

Therefore, patients who received a conventional heart valve were compared with patients receiving a decellularized valve (Matrix P plus<sup>®</sup>) with regard to their antibody

<sup>1</sup>AutoTissue GmbH, Goerzallee 305 D, Berlin, Germany.

<sup>2</sup>Allergopharma J. Ganzer KG, Hermann-Körner-Str. 52, Reinbek, Germany.

<sup>3</sup>Department of Cardiovascular Surgery, Charité, Medical University Berlin, Charite-platz 1, Berlin, Germany.

titers for an ECM protein (collagen I) and for the xenoantigen  $\alpha$ -Gal (Gal- $\alpha$ 1,3-Gal- $\beta$ 1-4GlcNAc-R). The titers were estimated pre-, post-, and late postoperatively (Follow Up). To differentiate between early and late immune response immunoglobulin, class M (IgM) and immunoglobulin class G (IgG) antibodies were investigated.

## Material and Methods

### Patients

Serum samples of 159 patients who underwent heart valve surgery and received a xenograft, either GA treated or decellularized, were collected. Additionally, 24 sets of samples from patients with mechanical heart valves or with a coronary artery bypass graft were investigated as controls. The samples were obtained earlier (Pre), up to one week after (Post), and 9–12 month after surgery (Follow Up). For anti-porcine collagen I antibodies, 44 recipients with porcine GA-treated xenografts were compared with 106 patients receiving porcine decellularized heart valves (Matrix P plus, AutoTissue GmbH, Berlin Germany). The Matrix P plus valves were decellularized with DOA, according to a patented protocol of AutoTissue GmbH. Hereby all cells are removed from the tissue, and the valves were sterilized as described thereafter.<sup>16</sup> The valves were not treated with GA or similar substances.

To estimate the anti  $\alpha$ -Gal response in patients, GA-treated porcine valves ( $n=33$ ), GA-treated bovine valves ( $n=9$ ), and decellularized valves ( $n=70$ , Matrix P plus) were compared. All patients gave written consent for blood sampling and participation in the study.

Table 1 summarizes the patients' characteristics and their age. Serum was obtained from patients' coagulated blood by centrifugation at 2000g for 10 min. The supernatant was collected and stored frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until further use.

### Collagen assay

**Antigens.** Human collagen type I was purchased from Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Germany). Porcine collagen I was isolated from porcine skin according to a protocol of Enriquez-Verdugo et al.<sup>23</sup> Briefly, porcine skin (400 mg) was homogenized using an Ultra Turrax T8 (IKA Labortechnik, Staufen, Germany) in 12 mL 0.5M acetic acid solution containing 333 mg/L Pepsin A (Worthington Biochemical Corp., Lakewood, NJ) The homogenate was incubated for 76 h at

$4^{\circ}\text{C}$  on a shaker. Thereafter, collagen type I was received in the pellet after precipitation and centrifugation for 1 h at 10,000g after successive stirring overnight with 0.7M NaCl, 1.7M NaCl, and 2.5M NaCl, respectively. Protein concentrations were determined according to Bradford et al.<sup>24</sup> using the BioRad assay (BioRad, Hercules, CA).

**Collagen I antibody assay.** The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) technique was used to measure the specific antibody concentration (IgM & IgG) in serum of patients against porcine and human collagen type I. Collagen type I from the different species was coated onto high-bind micro-titer plates (Corning, NY) at  $4^{\circ}\text{C}$  over night. Thereafter, unspecific binding sites were blocked with block buffer (Starting block, Pierce, Rockford, IL). Blocked plates were used either directly or stored at  $4^{\circ}\text{C}$  until use.

Plates were incubated with diluted serum for 75 min, washed, and treated with a secondary antibody for another 75 min (either anti-human IgG or anti-human IgM, Rockland, Gilbertsville, PA). Both antibodies were conjugated with biotin, to bind the streptavidin-conjugated horseradish-peroxidase (HRP, Rockland). Finally, a colour reaction was obtained with peroxidase reagent 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB, Pierce, Rockford, IL). Absorbance was determined at 450 nm with 620 nm as reference wavelength after terminating the reaction with TMB stop-reagent (Sigma-Aldrich) using an Anthos Labtec HTII plate reader. All samples were measured in triplicate. Pre, post, and follow-up samples of each patient were estimated on the same plate to eliminate differences due to plate variances.

**$\alpha$ -Gal antibody assay.** Gal- $\alpha$ 1,3-Gal- $\beta$ 1-4GlcNAc-BSA ( $\alpha$ -Gal) was obtained from MoBiTec (Göttingen, Germany).  $\alpha$ -Gal was immobilized on micro-titer plates at a concentration of 500 ng/well over night. All other processing was done according to the anti collagen assay just described.

### Statistical analysis

Statistical analysis was performed using InStat (GraphPad Inc, CA). Since assay data failed to be normally distributed (tested by the Kolmogorow-Smirnow-test), the nonparametric paired Wilcoxon test was used to calculate significance. A  $p$ -value  $<0.05$  was considered statistically significant,  $p < 0.01$  to be very significant, and  $p < 0.001$  as highly significant.

### Inter- and intra-assay-variance

To estimate the reproducibility of the ELISA assay, the inter-assay- and intra-assay-variances were determined. The inter-assay-variance describes the variance of the assay at different days, and the intra-assay-variance shows the variance of the replicates.

For these assays, human collagen I as immobilized surface antigen and a human serum pool (AutoTissue GmbH, Berlin, Germany) containing primary antibodies were used. The conditions of the inter- and intra-assay-variance determinations were essentially the same as just described for the ELISA assay. To estimate the intra-assay-variance for IgG and IgM antibodies, ten independent measurements were performed for each of the antibodies on the same micro-titer plate under equal conditions. The inter-assay-variance was determined by measuring ten samples at seven different

TABLE 1. PATIENTS' DATA INCLUDING AGE AND SEX DISTRIBUTION FOR THE COLLAGEN I AND  $\alpha$ -GAL ASSAY

Collagen I assay	Mean age (yrs)	SD	Median age (yrs)	Range (yrs)	n	Male (%)
Porcine GA	71,2	9,5	71,0	35–88	44	41
Matrix P plus	58,4	9,4	60,0	34–74	106	75
$\alpha$ -Gal assay						
Control	62,9	14,2	66,5	19–79	24	42
Porcine GA	71,4	9,8	71,0	35–88	33	36
Bovine GA	74,1	3,9	75,0	70–81	9	67
Matrix P plus	59,2	9,3	61,0	34–72	70	66

yrs, years; SD, standard deviation; n, number of patients investigated.

days on different micro-titer plates. From the results of both assays, the coefficients of variation were calculated.

**Results**

*Collagen assay*

In the first experiments, the linear range of the ELISA was determined for IgG and IgM specific anti collagen I antibodies with different dilutions of human serum. A linear range from ~0.5 to 2.5 arbitrary units (AU) for the IgG specific anti-collagen I antibodies and from ~0.25 to 1.2 AU for the IgM specific antibodies was achieved (data not shown).

To verify the designed ELISA for collagen type I, intra- and inter-assay-variance (Table 2) and the resulting variation coefficients were additionally determined. The coefficients achieved were either below 10% or slightly more, which is considered satisfactory.<sup>25</sup>

In this study, two groups of patients were investigated with regard to their anti-porcine collagen I titers. The first group were patients who had received a GA-treated valve of porcine origin, and the second were patients receiving a decellularized porcine valve (Matrix P plus). The results of the statistical evaluation are presented as box plots showing the mean (+), the median (-), and the inter-quartile range (25th–75th percentile). The whiskers represent the 10th and 90th percentile, respectively. Figure 1 represents the results for the Matrix P plus valves and Figure 2 those for the GA-treated porcine heart valves.

The decellularized valves revealed minor but significant changes in the measured anti-porcine collagen type I antibody titers from Post to Follow Up for the IgG ( $p=0,0363$ ) and from pre- to postoperative ( $p=0,0099$ ) and to follow up ( $p=0,0028$ ) for the IgM antibodies. However, the changes of the mean values (IgG = -0.004; [0.6%]; IgM = -0.029, [4.0%] and 0.024, [3.3%]) are negligible, as they are considerably smaller than the estimated inter-assay variance for the assay.

To verify this assumption, anti-human collagen type I titers of the serum samples were determined additionally to estimate the variation among the serum samples itself. Changes in the anti-human collagen I level may only be due to the sample variance and, therefore, are suitable to normalize the anti-porcine collagen I levels. For the anti-human collagen titers, a similar range of variation was found as for the anti-porcine antibodies. After normalization of anti-porcine collagen titers to the anti-human collagen titers, the normalized values were analyzed again. They proved that there is no significant change in anti-porcine collagen titers in serum samples of patients who received a decellularized porcine valve.

The same set of analysis was done for the group with GA-treated valves. Here, no significant changes in the anti-porcine antibody titers (see Fig. 2) were observed, neither measured directly nor after normalization. Although the median and mean values of the follow-up samples for the porcine collagen I titers were increased compared with Pre and Post samples, they revealed no significant changes because of the lower sample numbers. An increase in follow-up values were also observed with human collagen I titers of this group.

*α-Gal assay*

Three groups of patients receiving different types of heart valves were investigated for their anti α-Gal antibody titers. The first two groups consist of patients who received a GA-treated heart valve of porcine or bovine origin. The third group were patients receiving a Matrix P plus decellularized porcine heart valve. In addition to these groups, a control group was investigated, too, consisting of patients who had undergone bypass surgery or received a mechanical valve. In Controls, no significant alterations in IgG or IgM titers were observed (see Fig. 3). However, for this group, only the pre- and postoperative samples were investigated, because too few follow-up samples were available.

In all three groups, a decrease of α-Gal specific IgG antibodies was observed directly postoperatively. These levels stayed unaltered for the Matrix P plus group up to 12 month after implantation (see Fig. 4), whereas for the GA treated bio-prostheses, the α-Gal specific IgG levels increased significantly during follow up. For the porcine GA-treated group, a  $p$ -value of 0.0391 (see Fig. 5) and for the bovine GA treated group, a  $p$ -value of 0.0078 (see Fig. 6) with regard to the postoperative value was achieved. Additionally, for the bovine valves, a significant increase of preoperative versus follow-up values ( $p=0,0117$ , see Fig. 6) was observed.

For α-Gal specific IgM, a similar decrease from pre- to postoperative samples was detected as for the IgG specific antibodies in both GA-treated groups. This effect again was not observed with samples from patients receiving a decellularized heart valve. Here, we found a highly significant decrease pre versus follow up ( $p=0.0009$ , see Fig. 4) of the α-Gal specific IgM titers.

**Discussion**

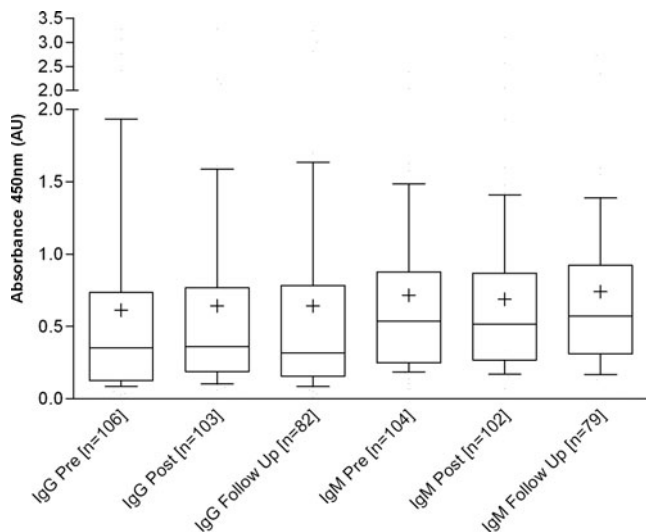
In recent years, tissue-engineered heart valves, which are completely free of all viable cells, became clinically available. However, the immunologic potential of decellularized tissues is still a matter of debate.<sup>22,26</sup> Almost every other

TABLE 2. INTRA- AND INTER-ASSAY-VARIANCE FOR HUMAN COLLAGEN TYPE

	Intra-assay-variance		Inter-assay-variance	
	Anti-human collagen type I IgM	Anti-human collagen type I IgG	Anti-human collagen type I IgM	Anti-human collagen type I IgG
Mean absorbance	0,883	1,249	0,859	1,247
SD	0,051	0,136	0,092	0,142
Coefficient of variance	5,72%	10,9%	10,7%	11,50%

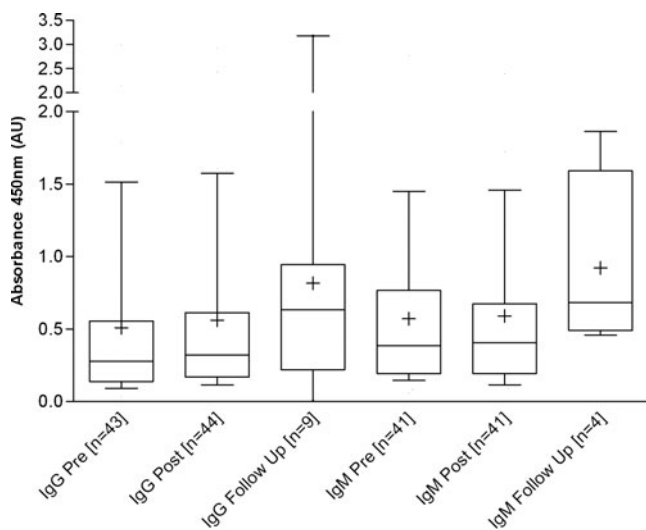
SD, standard deviation; IgG, immunoglobulin G; IgM, Immunoglobulin M.



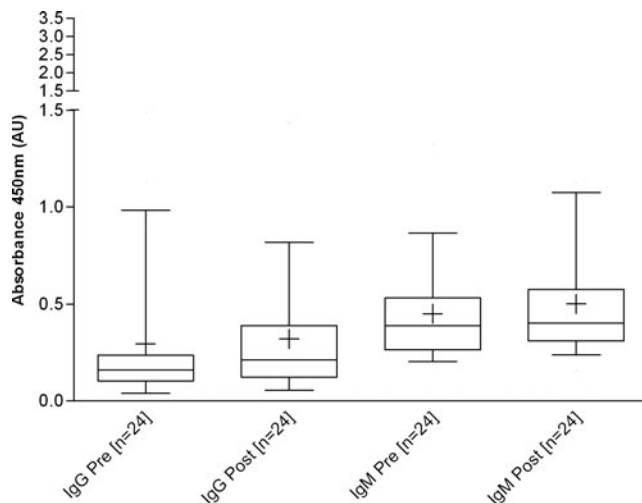


**FIG. 1.** Statistical evaluation of anti-porcine collagen type I in patients with a decellularized porcine xenograft. Immunoglobulin G: IgG, Immunoglobulin M: IgM Pre: preoperatively, Post: postoperatively, Follow Up: 9–12 months postoperatively, AU: arbitrary units, n: number of patients investigated.

commercially available heart valve prostheses is being treated with GA. This treatment is necessary to reduce the immunological potential of the native tissue and to avoid degeneration.<sup>4</sup> However, this cannot prevent the main disadvantage of the conventional biological heart valves, which is their limited lifespan. The main cause for this is calcification, which is presumably an immune response initiated process.<sup>7</sup> This led to the assumption that the GA treatment is not sufficient to entirely eliminate the immunologic potential of the valves. Some immunogenicity seems to persist after



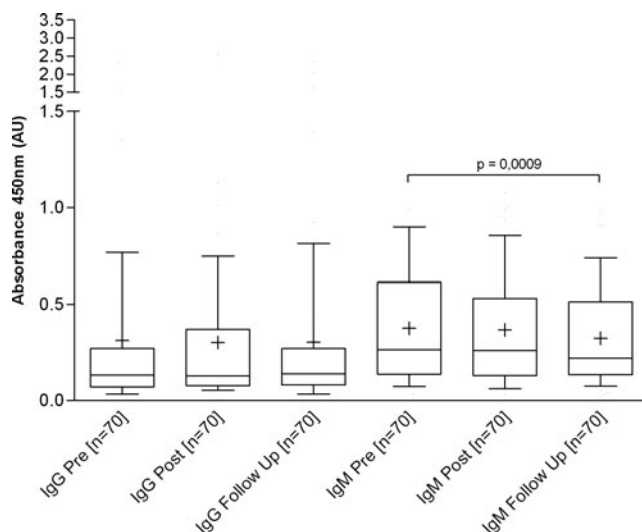
**FIG. 2.** Statistical evaluation of anti-porcine collagen type I in patients with a glutaraldehyde (GA) treated porcine xenograft. Immunoglobulin G: IgG, Immunoglobulin M: IgM Pre: preoperatively, Post: postoperatively, Follow Up: 9–12 months postoperatively, AU: arbitrary units, n: number of patients investigated.



**FIG. 3.** Statistical evaluation of anti- $\alpha$ -Gal in patients with a mechanical heart valve or with bypass surgery. Immunoglobulin G: IgG, Immunoglobulin M: IgM Pre: preoperatively, Post: postoperatively, Follow Up: 9–12 months postoperatively, AU: arbitrary units, n: number of patients investigated.

the GA treatment and might be able to trigger calcification.<sup>27–29</sup>

The present study, therefore, wanted to find proof whether the ECM, and/or the xenoantigen  $\alpha$ -Gal of heart valves, might contribute to an immune response in patients and might thereby help understand the initial process of calcification. Therefore, GA-treated heart valves of biological origin, which are known to calcify lately, were compared with decellularized heart valves which lack calcification.<sup>18,19</sup> In earlier performed investigations, it has been histologically



**FIG. 4.** Statistical evaluation of anti- $\alpha$ -Gal in patients with a decellularized heart valve. Immunoglobulin G: IgG, Immunoglobulin M: IgM Pre: preoperatively, Post: postoperatively, Follow Up: 9–12 months postoperatively, AU: arbitrary units, n: number of patients investigated.



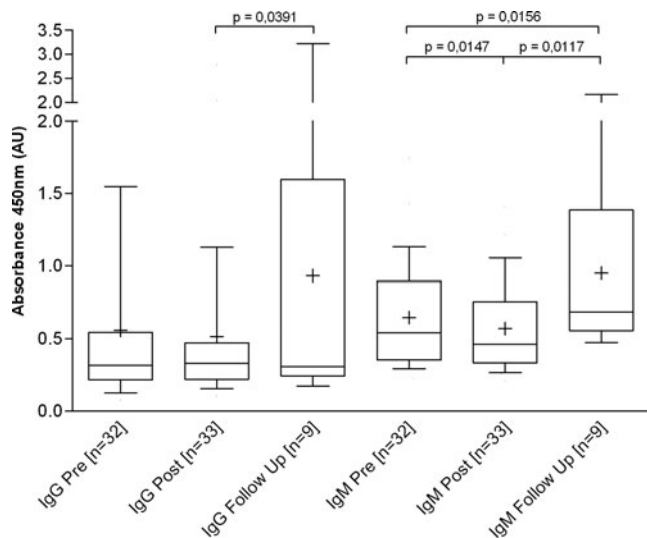


FIG. 5. Statistical evaluation of anti-  $\alpha$ -Gal in patients with a GA-treated porcine heart valve. Immunoglobulin G: IgG, Immunoglobulin M: IgM Pre: preoperatively, Post: postoperatively, Follow Up: 9–12 months postoperatively, AU: arbitrary units, n: number of patients investigated.

shown that  $\alpha$ -Gal epitopes are still present in GA treated valves and in the vessel wall of Synergraft valves but not in completely decellularized valves.<sup>14</sup>

To address this question, a species specific ELISA against collagen I, the most common protein of the ECM, was developed. In conjunction with the collagen assay, the response to  $\alpha$ -Gal, a major xenoantigen present on the valves, was investigated.  $\alpha$ -Gal titers in blood samples from patients who had received GA-treated heart valves of bovine or porcine

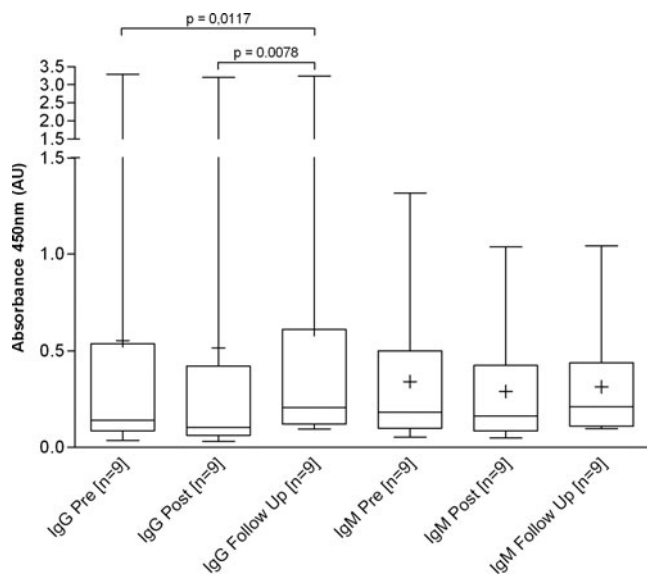


FIG. 6. Statistical evaluation of anti-  $\alpha$ -Gal in patients with a GA-treated bovine heart valve. Immunoglobulin G: IgG, Immunoglobulin M: IgM Pre: preoperatively, Post: postoperatively, Follow Up: 9–12 months postoperatively, AU: arbitrary units, n: number of patients investigated.

origin were determined and compared with samples from patients who had received a decellularized heart valve.

This investigation revealed that with regard to collagen I there was no significant alteration in the porcine or human antibody titers in samples of GA-treated or decellularized valves of porcine origin. This leads to the conclusion that there is no immune response toward porcine collagen I in patients receiving a heart valve prosthesis of porcine origin, regardless of whether they are treated with GA or decellularized.

On the other hand, an immune response against  $\alpha$ -Gal in patients receiving a GA-treated porcine heart valve could be observed. IgM antibodies were considerably increased during follow up in patients receiving these valves, whereas with decellularized valves there was even a decrease in the IgM response. The subsequent immune response of the specific IgG antibodies showed a considerable increase in porcine GA-treated valves and bovine GA-treated xenografts as well, whereas there was no response in decellularized valves. The data on conventional GA-treated xenografts confirm previous results achieved in similar designed studies such as those of Park et al. and Mangold et al.<sup>30,31</sup> Park et al. reported a significant decrease of the IgG and IgM titers on the first postoperative day, which corresponds well with our findings. They further observed an increase of titers for both isotypes during the first week after implantation. After one week, the IgM titers decreased, whereas the IgG remained increased after two months. Mangold et al. showed similar results in their study, where they investigated 19 patients who had received a GA-treated bioprosthesis. They also described a significant increase in IgG antibody titers 3 months post operation. This corresponds with our data, as we observed an equal decrease in antibody titers directly postoperatively for all groups followed by an increase during follow up for the GA-treated valves up to 12 months. Opposite to this, we were able to show that there is no immune response in patients who received a decellularized porcine heart valve up to 12 months after surgery.

It is known from previous investigations that valves free of cells such as the Matrix P plus in contrast to conventional valves do not calcify at all, as shown in the juvenile sheep model<sup>18,19</sup> and in midterm results with patients.<sup>32</sup> Further they demonstrated that seeding of the valves is not necessary for repopulation, which confirms the assumption that the decellularized tissue is not cytotoxic.

From the present results, it can be ruled out that the process of calcification is being triggered by an immune response initiated by collagen I, because there is no detectable immune response toward collagen I. This is regardless of whether the collagen I is crosslinked with GA or in its native form present in decellularized valves. This, however, is not self-evident. Although there is a considerable homology between human and porcine collagen, a former study revealed that human and porcine collagen I both elicit proliferation in co-stimulated immune cell sub-populations associated with a strong release of Th1 cytokines.<sup>33</sup>

Previously, it has been discussed that phospholipids might induce calcification, observed in conventional biological heart valves.<sup>34</sup> However, several investigators now believe that the  $\alpha$ -Gal epitope plays a major role in calcification.<sup>7</sup> Moreover,  $\alpha$ -Gal is the major xenoantigen, and it has been assumed to be responsible for hyper-acute

rejection of xenogenic tissues.<sup>35,36</sup> The  $\alpha$ -Gal epitope is conserved in most mammalian species except human, apes, and old-world monkeys<sup>37</sup> and it has been shown that approximately 1% of all circulating B cells are able to produce antibodies against  $\alpha$ -Gal.<sup>38</sup>

Previously conducted investigations by Kasimir et al.<sup>14</sup> detected  $\alpha$ -Gal in GA-treated heart valves and in the vessel wall of Synergraft valves, the first clinically used decellularized heart valve. In the same study, a complete lack of  $\alpha$ -Gal could solely be achieved by an extensive decellularization protocol, which combines three different substances with one of them being DOA. The absence of anti- $\alpha$ -Gal antibodies in the serum of patients receiving Matrix P plus valves leads to the conclusion that the  $\alpha$ -Gal epitopes must have been entirely removed or masked by the employed decellularization protocol for these valves using DOA alone.<sup>16</sup>

The results achieved in the present study indicate that  $\alpha$ -Gal present in xenogenic tissues might elicit an immune response in GA-treated or incomplete decellularized implants,<sup>21,22</sup> which is lacking in complete decellularized tissues. Future investigations on the role of the  $\alpha$ -Gal epitope will have to find proof whether this observed response is the reason for inducing calcification in conventional valves or whether there are additional factors responsible for the limited durability by calcification of these valves in patients.<sup>39</sup>

### Acknowledgments

The excellent technical assistance of Mrs. Soren Lück and Mrs. Elke Wachsmuth is gratefully acknowledged.

### Disclosure Statement

The authors want to disclose the following relations to AutoTissue GmbH, the manufacturer of the Matrix P plus valves Prof. Dohmen and Prof. Konertz are shareholders, Dr. Erdbrügger and Dr. Posner are employees, and Mr. Bloch and Mrs. Golde have done some work presented here in their Ph.D. and diploma thesis at AutoTissue, respectively.

### References

- Casselmann, F.P., Bots, M.L., Van Lommel, W., Knaepen, P.J., Lensen, R., and Vermeulen, F.E. Repeated thromboembolic and bleeding events after mechanical aortic valve replacement. *Ann Thorac Surg* **71**, 1172, 2001.
- Maliwa, M.A., van derHeijden, G.J., Bots, M.L., van Hout, B.A., Casselman, F.P., van Swieten, H., and Vermeulen, F.E. Quality of life and NYHA class 30 years after mechanical aortic valve replacement. *Cardiovasc Surg* **11**, 381, 2003.
- Westaby, S. The stentless aortic bioprosthesis. In: Piwnicka, A., Westaby, S., eds. *Surgery for acquired aortic valve disease*. Oxford: Isis Medical Media, 1997, pp. 83–101.
- Carpentier, A., Lemaigre, G., Robert, L., Carpentier, S., and Duborst, C. Biological factors affecting long-term results of valvular heterografts. *J Thorac Cardiovasc Surg* **58**, 467, 1969.
- Levy, F.J. Glutaraldehyde and the calcification mechanism of bioprosthetic heart valves. *J Heart Valve Dis* **3**, 101, 1994.
- Curcio, C.A., Commerford, P.J., Rose, A.G., Stevens, J.E., and Barnard, M.S. Calcification of glutaraldehyde-preserved porcine xenografts in young patients. *J Thorac Cardiovasc Surg* **81**, 621, 1981.
- Konakci, K.Z., Bohle, B., Blumer, R., Hoetzenecker, W., Roth, G., Moser, B., Boltz-Nitulescu, G., Gorlitzer, M., Klepetko, W., Wolner, E., and Ankersmit, H.J. Alpha-Gal on bioprostheses: xenograft immune response in cardiac surgery. *Eur J Clin Invest* **35**, 17, 2005.
- O'Brien, M.F., Harrocks, S., Stafford, E.G., Gardner, M.A., Pohlner, P.G., Tesar, P.J., and Stephens, F. Homograft aortic valve: a 29-year, 99.3% follow up of 1,022 valve replacements. *J Heart Valve Dis* **10**, 334, 2001.
- Oei, F.B.S., Welters, M.J.P., Vaessen, L.M.B., Stegmann, A.P.A., Bogers, A.J.J.C., and Weimar, W. Induction of cytotoxic T lymphocytes with destructive potential after cardiac valve allograft implantation. *J Heart Valve Dis* **9**, 761, 2000.
- Steinhoff, G., Stock, U., Karim, N., Mertsching, H., Timke, A., Meliss, R.R., Pethig, K., Haverich, A., and Bader, A. Tissue engineering of pulmonary heart valves on allogenic acellular matrix conduits: *in vivo* restoration of valve tissue. *Circulation* **102**, 50, 2000.
- Booth, C., Korossis, S.A., Wilcox, H.E., Watterson, K.G., Kearney, J.N., Fisher, J., and Ingham, E. Tissue engineering of cardiac valve prosthesis I: development and histological characterization of an acellular porcine scaffold. *J Heart Valve Dis* **11**, 457, 2002.
- Kasimir, M.T., Rieder, E., Seebacher, G., Silberhumer, G., Wolner, E., Weigel, G., and Simon, P. Comparison of different decellularization procedures of porcine heart valves. *Int J Artif Organs* **26**, 421, 2003.
- Goldstein, S., Clarke, D.R., Walsh, S.P., Black, K.S., and O'Brien, M.F. Transpecies heart valve transplant: advanced studies of a bioengineered xeno-autograft. *Ann Thorac Surg* **70**, 1962, 2000.
- Simon, P., Kasimir, M.T., Rieder, P., Seebacher, G., Wolner, E., and Weigel, G. Presence and Elimination of the Xenantigen Gal ( $\alpha$ 1, 3) Gal in Tissue-Engineered Heart Valves. *Tissue Eng* **11**, 1274, 2005.
- Sievers, H.H., Stierle, U., Schmidtke, C., and Bechtel, M. Decellularized pulmonary homograft (Synergraft) for reconstruction of the right ventricular outflow tract: first clinical experience. *Z Kardiol* **92**, 53, 2003.
- Erdbrügger, W., Konertz, W., Dohmen, P.M., Posner, S., Ellerbrok, H., Brodde, O.E., Robenek, H., Modersohn, D., Pruss, A., Holinski, S., Stein-Konertz, M., and Pauli, G. Decellularized xenogenic heart valves reveal remodeling and growth potential *in vivo*. *Tissue Eng* **12**, 2059, 2006.
- Dohmen, P.M., Ozaki, S., Verbeken, E., Yperman, J., Flameng, W., and Konertz, W. Tissue engineering of a pulmonary xenograft heart valve. *Asian Cardiovasc Thorac Surg* **10**, 25, 2002.
- Dohmen, P.M., Ozaki, S., Yperman, J., Flameng, W., and Konertz, W. Lack of calcification of tissue engineered auto-xenografts in juvenile sheep. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* **13**, 93, 2001.
- Dohmen, P.M., da Costa, F., Yoshi, S., Lopes, S., da Souza, F., Vilani, R., Wouk, F., and Konertz, W. Results of a decellularized heart valve implanted into the juvenile sheep model. *Heart Surg Forum* **8**, 100, 2005.
- Costa, F.D.A., Dohmen, P., Lopes, S.V., Lacerda, G., Pohl, F., Vilani, R., Costa, M.B.A., Viera, E.D., Yoschi, S., Brofman, P., Konertz, W., and Costa, I.A. Comparison of cryopreserved homografts and decellularized porcine heterografts implanted in sheep. *Artif Organs* **28**, 366, 2004.
- Kasimir, M.T., Rieder, E., Seebacher, G., Nigisch, A., Dekan, B., Wolner, E., Weigel, G., and Simon, P. Decellularization does not eliminate thrombogenicity and inflammatory

- stimulation in tissue-engineered porcine heart valves. *J Heart Valve Dis* **15**, 278, 2006.
22. Simon, P., Kasimir, M.T., Seebacher, G., Weigel, G., Ullrich, R., Salzer-Muhar, U., Rieder, E., and Wolner, E. Early failure of the tissue engineered porcine heart valve SYNERGRAFT™ in pediatric patients. *Eur J Cardiothorac Surg* **23**, 1002, 2003.
  23. Enriquez-Verdugo, I., Guerriero, A.L., Serrano, J.J., Godinez, D., Rosales, J.L., Tenorio, V., and De La Garza, M. Adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to swine-lung collagen. *Microbiology* **150**, 2391, 2004.
  24. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248, 1976.
  25. Murray, A., and Lawrence, G.P. How should the repeatability of clinical measurements be analysed? An assessment of analysis technique with data from cardiovascular autonomic function tests. *Q J Med* **12**, 831, 1993.
  26. Bastian, F., Stelmüller, M.E., Kratochwill, K., Kasimir, M.T., Simon, P., and Weigel, G. IgG deposition and activation of the classical complement pathway involvement in the activation of human granulocytes by decellularized porcine heart valve tissue. *Biomaterials* **29**, 1824, 2008.
  27. Schussler, O., Shen, M., Shen, L., Carpentier, S.M., Kaveri, S., and Carpentier, A. Effect of human immunoglobulins on the immunogenicity of porcine bioprostheses. *Ann Thorac Surg* **71**, 396, 2001.
  28. Schoen, L.J., and Levy, R.J. Calcification of tissue heart valve substitutes: progress toward understanding and prevention. *Ann Thorac Surg* **79**, 1072, 2005.
  29. Lila, N., McGregor, C.G., Carpentier, S., Rancic, J., Byrne, G.W., and Carpentier, A. Gal knockout pig pericardium: new source of material for heart valve bioprostheses. *J Heart Lung Transplant* **29**, 538, 2010.
  30. Park, C.S., Park, S.S., Choi, S.Y., Yoon, S.H., Kim, W.H., and Kim, Y.J. Anti alpha-gal immune response following porcine bioprosthesis implantation in children. *J Heart Valve Dis* **19**, 124, 2010.
  31. Mangold, A., Szerafin, T., Hoetzenecker, K., Hacker, S., Lichtenauer, M., Niederpold, T., Nickl, S., Dworschak, M., Blumer, R., Auer, J., and Ankersmit, H.J. Alpha-Gal specific IgG immune response after implantation of bioprostheses. *Thorac Cardiovasc Surg* **57**, 191, 2009.
  32. Dohmen, P.M., Lembcke, A., Holinski, S., Kivelitz, D., Braun, J.P., Pruss, A., and Konertz, W. Mid-term clinical results using a tissue-engineered pulmonary valve to reconstruct the right ventricular outflow tract during the Ross procedure. *Ann Thorac Surg* **84**, 729, 2007.
  33. Bayrak, A., Tyralla, M., Ladhoff, J., Schleicher, M., Stock, U.A., Volk, H.D., and Seifert, M. Human immune responses to porcine xenogenic matrices and their extracellular matrix constituents *in vitro*. *Biomaterials* **31**, 3793, 2010.
  34. Jorge-Herrero, E., Fernandez, P., de la Torre, N., Escudero, C., Garcia-Paez, J.M., Bujan, J., and Castillo-Olivares, J.L. Inhibition of the calcification of porcine valve tissue by selective lipid removal. *Biomaterials* **15**, 815, 1994.
  35. Galili, U. The alpha-gal epitope (Gal alpha 1-3Gal beta 1-4GlcNAc-R) in xenotransplantation. *Biochimie* **83**, 557, 2001.
  36. Sandrin, M.S., and McKenzie, I.F.C. Gala(1,3) Gal, the major xenoantigen(s) recognized in pigs by human natural antibodies. *Immunol Rev* **141**, 169, 1994.
  37. Galili, U., Shohet, S.B., Korbin, E., Stults, C.L.M., and Macher, B.A. Man, apes and Old World monkeys differ from other mammals in the expression of  $\alpha$ -galactosyl epitopes on nucleated cells. *J Biol Chem* **263**, 17755, 1988.
  38. Galili, U., Anaraki, F., Thal, A., Hill-Black, C., and Radic, M. One percent of human circulating B-lymphocytes are capable of producing the natural anti-Gal antibody. *Blood* **82**, 2485, 1993.
  39. Human, P., and Zilla, P. Inflammatory and immune processes: the neglected villain of bioprosthetic degeneration? *J Long Term Eff Med Implants* **35**, 199, 2001.

Author correspondence to:

Wilhelm Erdbrügger, Ph.D., M.B.A.  
 AutoTissue GmbH  
 Goerzallee 305 D  
 D-14167 Berlin  
 Germany

E-mail: erdbruegger@autotissue.de

Received: January 26, 2011

Accepted: May 09, 2011

Online Publication Date: June 16, 2011



Received: 2012.05.30  
Accepted: 2012.09.21  
Published: 2012.12.04

Authors' Contribution:

- A** Study Design
- B** Data Collection
- C** Statistical Analysis
- D** Data Interpretation
- E** Manuscript Preparation
- F** Literature Search
- G** Funds Collection

## Extracellular matrix in deoxycholic acid decellularized aortic heart valves

Oliver Bloch<sup>1ABCDEF</sup>, Wilhelm Erdbrügger<sup>2ABCDE</sup>, Wolfgang Völker<sup>3BCD</sup>,  
Alexander Schenk<sup>2BCD</sup>, Steffen Posner<sup>2BCDEF</sup>, Wolfgang Konertz<sup>1ACDEFG</sup>,  
Pascal M. Dohmen<sup>4ACDEFG</sup>

<sup>1</sup> Department of Cardiovascular Surgery, Charité, Medical University Berlin, Berlin, Germany

<sup>2</sup> AutoTissue Ltd., Berlin, Germany

<sup>3</sup> Leibniz Institute for Arteriosclerosis Research, Münster, Germany

<sup>4</sup> Heart Center Leipzig, University of Leipzig, Leipzig, Germany

**Source of support:** This work was in part supported by the BMWi (Bundesministerium für Wirtschaft), project IW05-36

### Background:

Only limited information is available regarding the influence of decellularization on the extracellular matrix in heart valves. Within the extracellular matrix proteoglycans (PG) play a central role in the structural organization and physical functioning of valves and in their capability of settling with endothelial and interstitial cells partially myofibroblasts. We have therefore estimated the effects of decellularization using deoxycholic acid on the structure of the extracellular matrix and PG's in porcine aortic valves.

### Material/Methods:

Cupromeronic blue was used, alone or in combination with OsO<sub>4</sub>/thio-carbo-hydrazide/OsO<sub>4</sub> for electron microscopic visualization. For PG and glycosaminoglycan (GAG) investigation a papain digestion was employed in combination with photometric determination using dimethylmethylene blue.

### Results:

The results indicate that deoxycholic acid affects the compartmentation of the PG-associated interstitial network not significantly. Compared to controls the PG-rich network was preserved even after deoxycholic acid treatment for 48 h. In parallel to electron microscopy immune assays (ELISA) showed smooth muscle cell  $\alpha$ -actin to be reduced to 0.96%±0.71 and total soluble protein to 6.68%±2.0 (n=3) of untreated controls. Protein loss corresponded well with the observations in electron micrographs of rupture and efflux of cell content. Further signs of lysis were irregular cell contours and loss of the basement membrane.

### Conclusions:

Efficient cell-lysis without disintegration or loss of integrity of the interstitial PG network can be achieved by treatment of aortic valves with deoxycholic acid for 48h. This protocol might also be suitable for clinical use to optimize conditions for growth and autologous remodelling of valves.

### key words:

tissue engineering • xenograft • aortic valve • replacement • *in vitro* studies • bioengineering

### Full-text PDF:

<http://www.medscimonit.com/fulltxt.php?ICID=883618>

### Word count:

2485

### Tables:

–

### Figures:

2

### References:

31

### Author's address:

Pascal M. Dohmen, Heart Center Leipzig, University of Leipzig, Struempellstr 39, D-04289 Leipzig, Germany, e-mail: pascal.dolmen@yahoo.de



## BACKGROUND

Decellularization of heart valves is a promising approach to overcome the limitations associated with conventional manufacturing techniques of bioprostheses. During the last years xenografts prepared with methods of decellularization have been used clinically [1–5]. However, there were also drawbacks with some of these products, mostly related to incomplete cell removal [6]. Nevertheless promising results have been achieved with deoxycholic acid decellularized pulmonary heart valves. These xenografts showed growth and remodelling of the valves in the juvenile sheep [1,7]. Furthermore these valves show excellent clinical performance for now up to 10 years [8–10] and also lack immunological response by the patient [11]. Encouraged by these results, the focus has now been set on the influence of the deoxycholic acid treatment on the preservation of the interstitial fine structure of aortic valves, in which proteoglycans (PG) represent a major component.

PGs are involved in the organization, hydration, electrolyte regulation, cell surface interaction, antithrombogenicity, prevention of calcification, and in the binding of growth factors [12–14]. Therefore, they might also play a significant role in mechanisms related to remodelling and growth of decellularized valves in patients. Due to their molecular composition PGs are ideal candidates for ultracytochemical investigations by electron microscopy. They contain polysulfated glycosaminoglycan (GAG) side chains which are covalently attached to a filamentous core protein. These GAGs interact with tetracationic dyes such as cuproinic blue or cupromeronic blue (CMB) [15,16]. Both dyes offer a number of sophisticated methods for electron microscopic detection and characterization of PGs *in situ*. In each case, electron contrast must be enhanced by  $\text{Na}_2\text{WO}_4$ . PG molecules then appear as long-shaped precipitates and can be discriminated by criteria like size, location, critical electrolyte concentration and their susceptibility towards GAG-degrading enzymes as shown previously in arterial and valve tissues [15,17–20].

In the present electron microscopic study we have focussed our interest on the integrity of the interstitial compartments, in which decorin as a collagen-associated PG and versican in the soluble matrix are dominating [21,22]. Decorin is a small PG with one dermatan-sulphate (DS) GAG side chain. DS controls the fibrillogenesis and is responsible for the interspaces between collagenfibrills. Versican is one of the larger PGs and contains multiple GAG side chains, most of them being chondroitin-sulphate (CS). CS possesses the ability to bind large amounts of water to build a gel like layer. This layer plays an important role in the tissue and supports to resist compressive deformations and to absorb loads. Combined DS and CS represent 90% of the total GAG content in heart valves [17]. Decellularization experiments with the aim to produce low antigenetic bioscaffolds suitable as xenografts must take care of this three-dimensional extracellular network in which these different types of PG are present and specifically located. When applied alone, the CMB method excludes collagen and elastic fibers to be stained intensively. Therefore, an overall staining of PG-related structures was applied also by extending CMB staining in some specimens and by using  $\text{OsO}_4$ /thiocarbohydrazide/ $\text{OsO}_4$  (OTO) before dehydration and embedding of the tissues in epoxy resin [20].

## MATERIAL AND METHODS

### Preparation of heart valves

Porcine hearts were obtained from a local slaughterhouse. The aortic valves were dissected and stored at 4°C in antibiotic solution (200 U/ml Penicillin, 200 mg/ml Streptomycin and 10 µg/ml Amphotericin B). Incubation with 1% deoxycholic acid (sodium salt, Fluka, Deisenhofen) was performed for 24 h and for 48 h at 37°C in physiological saline (PBS). Deoxycholic acid and products of lysis were removed afterwards by washing the specimens several times with PBS alone at room temperature, as described earlier [1]. As reference tissues, aortic valves were prepared and stored at 4°C in antibiotic solution without deoxycholic acid treatment. For ultracytochemical processing, small tissue samples were chemically fixed with 2.5% glutaraldehyde.

### Protein quantification

In parallel to our ultrastructural investigations immune assays were used to quantify the loss of cellular proteins by deoxycholic acid treatment compared to native tissue expressed as percent of residual smooth muscle cell-(SMC)- $\alpha$ -actin and of soluble total protein. SMC- $\alpha$ -actin is present in most valvular cells and is therefore a adequate marker for cells in heart valves. Treated and untreated aortic tissues were homogenized in PBS (0.5 g/ml, pH 7.4) with an Ultra-Turrax (Jahnke & Kunkel, Germany). The homogenates were centrifuged at 2000 × g for 10 min. The supernatant was collected and kept at –80°C until use. Protein determinations were performed according to Bradford [23].

Sandwich ELISA was initiated by binding of anti-SMC- $\alpha$ -actin (clone E184, Epitomics, CA, USA, 1:500) for 120min to anti-mouse IgG coated microtiter plates (Pierce, IL, USA). Then 250 µl heart valve samples were added and incubated for 120 min. After washings with PBS 4 µg/ml of second, different primary anti-SMC- $\alpha$ -actin antibody (clone AC-40, Sigma, Deisenhofen, Germany, 1:500) was added and incubation continued for 120 min. Then primary antibodies were labelled with a biotinylated anti-mouse IgG secondary antibody (Rockland, PA, USA, 100 µl, 1:10.000) followed by streptavidin-horseradish-peroxidase (HRP, Rockland, 100 µl, 1:10.000). A colour reaction was obtained with peroxidase reagent after 25 min (100 µl, TMB: 3,5',5,5'-tetramethylbenzidine, Pierce). The reaction was terminated with TMB stop reagent (100 µl, Sigma). Optical density was measured at 450 nm with 620 nm as reference using an Anthos Labtec HATII plate reader (Anthos, Austria). Incubation steps with antibodies, samples or enzymes were followed by washings with PBS (3×250 µl each). All samples were determined in triplicate. Standard curves were estimated with supernatant of untreated aortic valves covering two fold dilutions of 15 steps.  $\alpha$ -actin content of treated valves were estimated from the standard curves as percentage of the  $\alpha$ -actin content of untreated valves.

### Glycosaminoglycan determination

For the determination of the GAG content in the tissues the method of Farndale was used [24]. Briefly, the tissues were homogenated first and interfering proteins were digested for 16 h at 60°C with papain. Following digestion iodoacetic

acid was added to a final concentration of 10 mM and the sample was filled up to a final volume of 5 ml with 50 mM TRIS/HCL (pH 8.0). For further purification of the GAGs the samples were treated twice with ethanol to precipitate the GAGs. Following solubilization the samples were divided each into three tubes. The first was digested with chondroitinase ABC, the second with chondroitinase AC and to the third solely buffer was added. Following 30 minutes of incubation at 37°C the samples were mixed with the colour reagent and the resulting optical density was determined at 540 nm. The chondroitinase ABC digests chondroitin- and dermatan-sulphate whereas chondroitinase AC solely digests chondroitin-sulphate. For the chondroitin-sulphate the reduction achieved by the chondroitinase AC digestion compared to buffer alone was calculated. For the determination of the dermatan-sulphate the reduction achieved by the chondroitinase ABC digestion was calculated in relation to the chondroitinase AC digestion. With previously maintained standard curves the concentrations of the samples were estimated.

### Ultrahistochemical processing

Treated and untreated tissue samples of aortic heart valves were fixed with 2.5% glutaraldehyde. Cupromeronic blue (Seikagaku, Japan) staining was done in acetate buffer at pH 5.6 and counterstaining was performed with Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> according to Rothenburger et al. [18]. In parallel to CMB staining alone, CMB staining was extended with a sequence of OsO<sub>4</sub>/thio-carbo-hydrazide/OsO<sub>4</sub> (OTO) as described [19]. After washing, specimens were dehydrated in a graded series of ethanol and embedded in epoxy resin for ultra thin sectioning. They were digitally photographed in a transmission electron microscope (Philips EM 201, FEI, Germany) using imaging plates (DITABIS, Aschaffenburg, Germany).

### Data analysis

Data given are mean and standard deviation (SD) of the number of independent experiments indicated (n). GraphPad Prism (GraphPad Inc., CA, USA) was used to analyse ELISA experiments by curve fitting. The evaluation and standard curves for the biochemical investigations of chondroitin- and dermatan-sulphate were performed with GraphPad Prism as well.

## RESULTS

For the preparation of bioscaffolds from porcine aortic heart valves a protocol employing deoxycholic acid has been used to remove all cells. The effects of deoxycholic acid lysis were estimated after 24 h and 48 h of incubation with regard to protein and GAG content and, by electron microscopy, with regard to the preservation of the topography of the PGs in the interstitial space.

As shown by ELISA the residual content of smooth muscle cell (SMC)  $\alpha$ -actin in decellularized valves was 0.96%±0.71 (n=3). The low amount of remaining  $\alpha$ -actin indicated a high efficiency of cellular lysis. After a 24 h deoxycholic acid treatment the total soluble protein content representing intra and extracellular protein (6.68%±2.0, n=3) did not decline further even when the incubation time of the treatment was extended to 48 h.

Similar results were obtained with regard to the CS and DS content in the tissues investigated. Here we achieved a considerable higher GAG concentration in decellularized compared to untreated tissues. The measured CS concentration was app. 1.2±0.5 mg CS/g fresh weight (fw) in decellularized tissues and 0.6±0.2 mg CS/g fw in native tissues. The DS concentration in the treated tissues was 0.5±0.3 mg DS/g fw and in native tissues 0.3±0.1 mg DS/g fw.

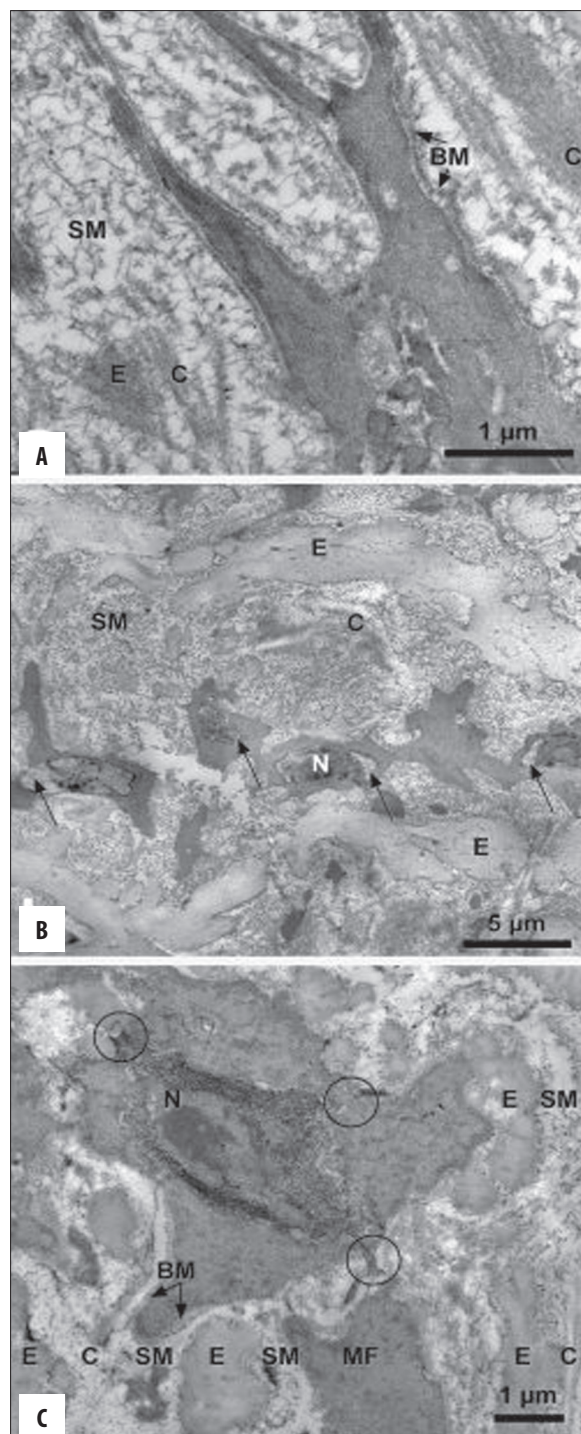
These findings were confirmed by electron microscopic observations. CMB-OTO overall staining showed disruption of the nuclear envelope and of the cytoplasmic membrane as well as the release of nuclear filaments through the cytoplasm into the proximity of the cells (Figure 1). Cytoskeletal filaments were not visible any more, the shape of the cells appeared rough, and their basement membrane was largely removed.

The influence of cell lysis and protein extraction by deoxycholic acid on the integrity of the PG-rich network in the interstitial space was investigated in valve tissues exclusively stained with CMB (n=3). These specimens revealed faintly stained elastic layers and collagen bundles but intensively and more clearly defined PG-CMB precipitates (Figure 2). We observed small PG-CMB precipitates aligned along collagen-fibrils formerly characterized as dermatansulfate/chondroitin-4-sulfate PGs (decorin), or at elastic fibers as well as on the cell surface, as heparansulfate-rich ones [15,17]. Large PG-CMB precipitates about 200 nm in length were located outside the collagen-fibrils in an area called soluble matrix. These PGs were described as chondroitin-6-sulfate-rich ones (versican). When compared with controls high magnification electron micrographs revealed that the molecular network of these different types of PG was not disrupted by the deoxycholic acid treatments, neither after 24 h nor after 48 h of incubation (Figure 2).

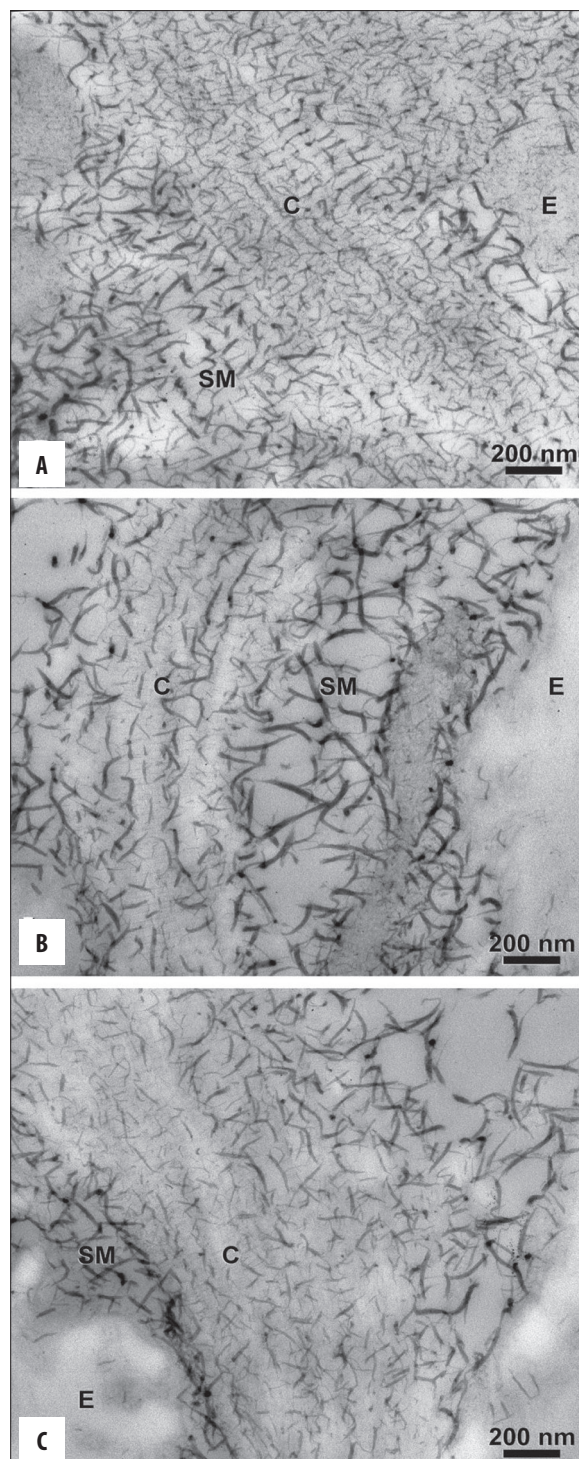
## DISCUSSION

In the present study a similar method as recently described for porcine pulmonary heart valves has been used for decellularization of porcine aortic heart valves applying deoxycholic acid [1]. The focus of this study was set on biochemical and electron microscopic investigations of aortic valve tissue following deoxycholic acid treatment, with special emphasis to PGs and their GAG side chains. As a major component of the interstitial space PGs are essential for maintaining physical and physiological properties of arterial tissue and, therefore, must resist deoxycholic acid induced destruction of their extracellular network to be clinically applicable. The biochemical investigation of the tissues revealed an even higher concentration of relevant GAGs following decellularization. This increase can be most likely be explained by the reduction of the specific weight of the tissue by decellularization due to the considerable reduction of cellular components like proteins, i.e. the protein content of treated valves was reduced by 93% compared to native valves. Alternatively it is also possible that the assay is being affected by cellular components in native tissues following papain digestion. Thus, some GAGs, which are associated with cells, might be lost during purification. Nevertheless these results underline that there is no overall decrease in GAG concentration following decellularization of the tissue. The present data are consistent with previous investigations





**Figure 1.** Electron micrographs of porcine aortic heart valve tissues double-stained with CMB/OTO. (A) The outside of a native myofibroblast is covered with a basement membrane layer (BM) and an interstitial network around with areas of soluble matrix (SM), elastic fibers (E) and collagen fibrils (C). PGs are seen as fuzzy long-shaped precipitates cross-linking the extracellular matrix (B). The overview electron micrograph of valve tissue treated with deoxycholic acid for 24 h shows adjacent myofibroblasts (MF) with ruptured nuclei (N, arrows). The integrity of the extracellular matrix is not disturbed. (C) 48 h of deoxycholic acid incubation shows bursts of cells releasing their nuclear and cytoplasmic content (circles) into the pericellular space.



**Figure 2.** Electron micrographs of porcine aortic heart valve tissues stained with CMB. PGs are stained strongly and show a characteristic pattern of compartmentation. Large CMB precipitates are located inside the soluble matrix (SM), which represents amorphous areas in the space between collagen bundles (C), elastic fibers (E) and the cell surface. Small precipitates are preferentially located along collagen fibrils (C), the surface of elastic fibers (E) and the cell surface. The electron micrographs in (A) control, (B) 24 h deoxycholic acid treatment, (C) 48 h deoxycholic acid treatment show that there is no significant change in the patterns of distribution and compartmentation of the PGs.



of Grand-Allen et al who estimated a total GAG content of 0.69 mg/g in aortic valves [25], which is close to the GAG content achieved in this study. The preservation of GAGs following decellularisation could be confirmed by electron micrographs showing PGs and their associated extracellular structure *in situ* to be intact after 48 h deoxycholic acid treatment. Prior to the ultra-histological examinations the effectiveness of lysis and the loss of cellular components was checked by estimating residual SMC- $\alpha$ -actin and total protein content. As the total protein content remained stable and did not decline further in the prolonged deoxycholic acid treatment of 48 h there is evidence that the soluble cellular proteins were sufficiently and quantitatively extracted. SMC- $\alpha$ -actin is presumably a suitable indicator for effectiveness of decellularisation of vascular segments of the valves, since it is a contractile protein which needs solubilization as prerequisite for its complete removal from the tissue. Estimating residual proteins after decellularization has advantages over methods of measuring residual RNA and DNA content of the tissues. Complete removal of the filamentous nucleotides is achieved hardly without the use of DNAase or RNAase [1]. In principle, the use of enzymes during decellularization procedures for the production of bioscaffolds might lead to adverse immunological reactions in patients if they are not removed completely including the residuals and therefore limits their value in clinical applications. As seen in electron micrographs cellular and filamentous nuclear material was released from bursting cells by the deoxycholic acid treatment even in deep regions of the valve tissue. This aim in the preparation of bioscaffolds was accompanied now by the electron microscopic finding that the fine structure of the PG-associated interstitial network remained well preserved in the aortic heart valves during one or even two days of deoxycholic acid treatment. This was best seen in specimens selectively stained with CMB alone.

Preservation of the extracellular matrix with respect to the suitability of different decellularization techniques is also in the focus of other investigators [26–30]. The reason for this is that the mechanical properties of the scaffolds might not be sufficient if structures of the extracellular matrix are altered as it has been shown for trypsin-EDTA decellularized valves [28]. But on the other side incomplete decellularization leads to adverse immunological reactions [6]. Therefore it is now more and more accepted that detergent based decellularization techniques are preferable to other methods [31].

Previous work indicated that the extracellular matrix and its PGs play an important role in the development of cardiac valves [12] and therefore might be important for remodelling and growth of decellularized tissues [1]. Until now there is only limited information available whether and how decellularization techniques affect the distribution and structure of PGs and GAGs within the extracellular matrix of heart valves [28]. This study demonstrates that deoxycholic acid treatment of porcine aortic valves for up to 48 h does not affect the extracellular matrix architecture and its network of PGs inside the valves. Whether this is also true in porcine pulmonary valves and whether this is responsible for the observed remodelling and growth of the valves *in vivo* [7] needs further investigation. There is evidence that an intact extracellular matrix plays an important role in remodelling but less is known which co-factors are additionally required for the recellularization of bioscaffolds *in vivo*.

## Acknowledgements

The excellent technical assistance of Mr. Daniel Ziomek, Mrs. Soren Lück and Mrs. Elke Wachsmuth is gratefully acknowledged.

## REFERENCES:

1. Erdbrügger W, Konertz W, Dohmen PM et al: Decellularized xenogenic heart valves reveal remodeling and growth potential *in vivo*. *Tissue Eng*, 2006; 12: 2059–68
2. Konertz W, Dohmen PM, Liu J et al: Hemodynamic characteristics of the Matrix P decellularized xenograft for pulmonary valve replacement during the Ross operation. *J Heart Valve Dis*, 2005; 14: 78–81
3. Bechtel JF, Stierle U, Sievers HH: Fifty-two months' mean follow up of decellularized SynerGraft-treated pulmonary valve allografts. *J Heart Valve Dis*, 2008; 17: 98–104
4. Dohmen PM, Lembcke A, Hotz H et al: Ross operation with a tissue-engineered heart valve. *Ann Thorac Surg*, 2002; 79: 1438–42
5. da Costa F, Costa A, Prestes R et al: The early and midterm function of decellularized aortic valve allografts. *Ann Thorac Surg*, 2010; 90: 1854–60
6. Simon P, Kasimir MT, Seebacher G et al: Early failure of the tissue engineered porcine heart valve SYNERGRAFT in pediatric patients. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2003; 23: 1002–6
7. Dohmen PM, da Costa F, Holinski S et al: Is there a possibility for a glutaraldehyde-free porcine heart valve to grow? *Eur Surg Res*, 2006; 38: 54–61
8. Dohmen PM, Lembcke A, Holinski S et al: Mid-term clinical results using a tissue-engineered pulmonary valve to reconstruct the right ventricular outflow tract during the Ross procedure. *Ann Thorac Surg*, 2007; 84: 729–36
9. Dohmen PM, Lembcke A, Holinski S et al: Ten years of clinical results with a tissue-engineered pulmonary valve. *Ann Thorac Surg*, 2011; 92: 1308–14
10. Dohmen PM, Hauptmann S, Terytze A, Konertz W: *In-vivo* repopularization of a tissue-engineered heart valve in a human subject. *J Heart Valve Dis*, 2007; 16: 447–49
11. Bloch O, Golde P, Dohmen PM et al: Immune response in patients receiving a bioprosthetic heart valve: lack of response with decellularized valves. *Tissue Eng Part A*, 2011; 17: 2399–405
12. Iwamoto R, Mine N, Kawaguchi T et al: HB-EGF function in cardiac valve development requires interaction with heparan sulfate proteoglycans. *Development*, 2010; 137: 2205–14
13. Grande-Allen KJ, Calabro A, Gupta V et al: Glycosaminoglycans and proteoglycans in normal mitral valve leaflets and chordate: association with regions of tensile and compressive loading. *Glycobiology*, 2004; 14: 621–33
14. Stephens EH, Chu C-K, Grande-Allen KJ: Valve proteoglycan content and glycosaminoglycan fine structure are unique to microstructure, mechanical load and age: Relevance to an age-specific tissue-engineered heart valve. *Acta Biomaterialia*, 2008; 4: 1148–60
15. Völker W, Schmidt A, Buddecke E: Compartmentation and characterization of different proteoglycans in bovine arterial wall. *J. Histochem. Cytochem*, 1986; 34: 1293–99
16. Scott JE: Morphometry of cupromeronic blue-stained proteoglycan molecules in animal corneas, versus that of purified proteoglycans stained *in vitro*, implies that tertiary structures contribute to corneal ultrastructure. *J Anat*, 1992; 180: 155–64
17. Völker W, Strazynski M, Rothenburger M, Vischer P: Engineering of vascular tissue with a structurally organized extracellular matrix. In: Sames K, Sethe S, Stolzing A (eds.) *Extending the Lifespan – Biotechnical, Gerontological, and Social Problems*. LIT Verlag Münster, Germany, ISBN 3-8258-8563-1. 205-216 (2005)
18. Rothenburger M, Völker W, Vischer P et al: Ultrastructure of proteoglycans in tissue-engineered cardiovascular structures. *Tissue Eng*, 2002; 8: 1049–56
19. Rothenburger M, Völker W, Vischer P et al: Tissue engineering of heart valves: formation of a three-dimensional tissue using porcine heart valve cells. *ASAIO J*, 2002; 48: 586–91
20. Seligman AM, Wasserkrug HL, Hanker JS: A new staining method (OTO) for enhancing contrast of lipid-containing membranes and droplets in osmium tetroxide-fixed tissue with osmiophilic thiocarbonylhydrazide (TCH). *J Cell Biol*, 1966; 30: 424–32

21. Stephens EH, Chu CK, Grande-Allen KJ: Valve proteoglycan content and glycosaminoglycan fine structure are unique to microstructure, mechanical load and age: Relevance to an age-specific tissue-engineered heart valve. *Acta Biomater*, 2008; 4: 1148–60
22. Chen JH, Simmons CA: Cell-matrix interactions in the pathobiology of calcific aortic valve disease: critical roles for matricellular, matricrine, and matrix mechanics cues. *Circ Res*, 2011; 108: 1510–24
23. Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976; 72: 248–54
24. Farndale RW, Buttle DJ, Barrett AJ: Improved quantification and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochim Biophys Acta*, 1986; 833: 173–77
25. Grande-Allen KJ, Mako WJ, Calabro A et al: Loss of chondroitin 6-sulfate and hyaluronan from failed porcine bioprosthetic valves. *J Biomed Mater Res A*, 2003; 65: 2519
26. Arai S, Orton EC: Immunoblot detection of soluble protein antigens from sodium dodecyl sulfate- and sodium deoxycholate-treated candidate bioscaffold tissues. *J Heart Valve Dis*, 2009; 18: 439–43
27. Kasimir MT, Rieder E, Seebacher G et al: Comparison of different decellularization procedures of porcine heart valves. *Int J Artif Organs*, 2003; 26: 421–27
28. Schenke-Layland K, Vasilevski O, Opitz F et al: Impact of decellularization of xenogeneic tissue on extracellular matrix integrity for tissue engineering of heart valves. *J Struct Biol*, 2003; 143: 201–8
29. Zhou J, Fritze O, Schleicher M et al: Impact of heart valve decellularization on 3-D ultrastructure, immunogenicity and thrombogenicity. *Biomaterials*, 2010; 31: 2549–54
30. Bastian F, Stelzmüller ME, Kratochwill K et al: IgG deposition and activation of the classical complement pathway involvement in the activation of human granulocytes by decellularized porcine heart valve tissue. *Biomaterials*, 2008; 29: 1824–32
31. Tudorache I, Cebotari S, Sturz G et al: Tissue engineering of heart valves: biomechanical and morphological properties of decellularized heart valves. *J Heart Valve Dis*, 2007; 16: 567–73

Received: 2013.10.16  
Accepted: 2013.12.11  
Published: 2014.01.10

# Successful implantation of a decellularized equine pericardial patch into the systemic circulation

Authors' Contribution:  
Study Design A  
Data Collection B  
Statistical Analysis C  
Data Interpretation D  
Manuscript Preparation E  
Literature Search F  
Funds Collection G

ABCDEF 1 **Pascal M. Dohmen**  
ABCDEF 2 **Francisco da Costa**  
BDF 2 **Sergio V. Lopes**  
BCDE 3 **Ricardo Vilani**  
CF 4 **Oliver Bloch**  
ABCDEF 4 **Wolfgang Konertz**

1 Department of Cardiac Surgery, Heart Center Leipzig, University of Leipzig, Leipzig, Germany  
2 Department of Cardiac Surgery, Santa Casa Hospital, Curitiba, Brasil  
3 Department of Veterinary Medicine, Pontificia Universidade Catolica do Parana, Curitiba, Brasil  
4 Department of Cardiovascular Surgery, Charité Hospital, Medical University Berlin, Berlin, Germany

**Corresponding Author:** Pascal M. Dohmen, e-mail: [pascal.dohmen@yahoo.de](mailto:pascal.dohmen@yahoo.de)  
**Source of support:** Departmental sources

**Background:** In the past, successful use of decellularized xenogenic tissue was shown in the pulmonary circulation. This study, however, evaluates a newly developed decellularized equine pericardial patch under high pressure circumstances.





**Material/Methods:** Seven decellularized equine pericardial scaffolds were implanted into the descending aorta of the juvenile sheep. The implanted patches were oversized to evaluate the durability of the decellularized tissue under high surface tension (Law of Laplace). After 4 months of implantation, all decellularized patches were inspected by gross examination, light microscopy (H&E, Sirius red, Gomori, Weigert, and von Kossa staining), and immunohistochemical staining.

**Results:** The juvenile sheep showed fast recovery after surgery. There was no mortality during follow-up. At explantation, only limited adhesion was seen at the surgical site. Gross examination showed a smooth and pliable surface without degeneration, as well as absence of aneurysmatic dilatation. Light microscopy showed a well preserved extracellular scaffold with a monolayer of endothelial cells covering the luminal side of the patch. On the outside part of the patch, a well developed neo-vascularization was seen. Host fibroblasts were seen in all layers of the scaffolds. There was no evidence for structural deterioration or calcification of the decellularized equine pericardial scaffolds.

**Conclusions:** In the juvenile sheep, decellularized equine tissue showed no structural deterioration, but regeneration and remodeling processes at systemic circulation.

**Keywords:** **tissue engineering • juvenile sheep • equine patch • xenografts • decellularization • remodelling potential**

**Full-text PDF:** <http://www.basic.medscimonit.com/download/index/idArt/889915>

 2857  —  3  49

## Background

Patch reconstruction for tissue deficiencies due to congenital diseases is a common problem in cardiovascular surgery [1,2]. Besides autologous pericardium, which is often unavailable due to previous operations, implants used are made of synthetic materials such as Dacron (based on Polyethyleneterephthalate) or Gore-Tex (based on polytetrafluoroethylene) and biological materials like glutaraldehyde-fixed bovine pericardium [3,4]. A limitation of these implants is that they are permanent foreign bodies with the potential for infection and the absence of remodeling, regeneration, and growth potential [5,6]. Furthermore, the glutaraldehyde-treated material shows early deterioration and should ideally be avoided in young patients [7].

Tissue engineering could overcome these limitations, as an interdisciplinary field which applies the principles of biology and engineering to develop functional substitutes for damaged tissue [8]. Materials, however, should be ideally available from the shelf, and recellularize and remodel in the host to overcome a waiting time for the patient and to avoid additional surgery [9] or intervention [10] to harvest autologous tissue materials. Furthermore these structures would also have growth potential, which is of enormous interest in treating congenital heart diseases. Limited clinical data are available of tissue engineered materials for pericardial reconstruction [11], pediatric patients with congenital cardiac anomalies [12], or aortic annulus enlargement [13].

This study was performed to evaluate the possibilities of a decellularized equine pericardial patch in the high pressure system and the mechanism of recellularization during these circumstances.

## Material and Methods

All experiments were performed in accordance with the "Principles of Laboratory Animal Care" prepared by the National Society of Medical Research, and the "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" prepared by the Institute of Laboratory Animal Resources and published by the National Institutes of Health (NIH publication, revised 1996). The study was approved by the ethics committee of the Pontificia Universidade Catolica de Parana. We performed implantation of a decellularized equine pericardial patch in 7 juvenile sheep. Equine pericardium was chosen due to the similar strength as in bovine material, which is significantly higher compared to porcine pericardium [14]. We did not prefer to use bovine material due to previous reports of limited risk for contamination [15], latent general transmission of other diseases [16] and, eventually, immune response [17]. The decellularization procedure has been described previously [18]. In brief, after preparing the equine pericardium, it was stored in

a physiological solution, adding antibiotics (penicillin, streptomycin, and amphotericin B) until decellularization was performed with deoxycholic acid (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO) followed by an ethanol treatment. Additional extensive raising with physiologic solutions was performed. The decellularized equine pericardial patches were stored in an antibiotic solution until sterility was proven.

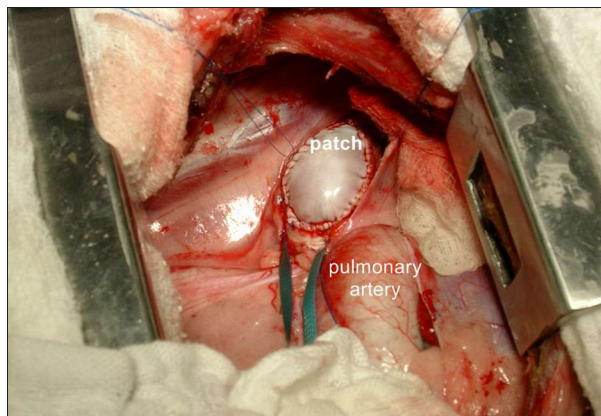
## Surgery

All juvenile sheep were female, mean age of  $14 \pm 2$  weeks, with a mean body weight of  $28.8 \pm 7.0$  kg. Each animal was hospitalized 4 weeks prior to the procedure in the Veterinary Hospital of the Catholic Pontifical University of Parana State, to be certified for freedom of pulmonary diseases, vaccinated for clostridiosis and, additionally, all animals received anti-helminthics and systematic anti-parasitologic treatment. Hematocrit examinations were done weekly. Animals were fasted prior to the surgical procedure.

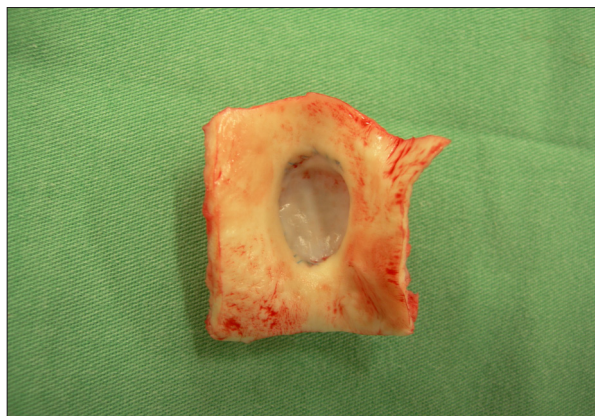
Pre-medication was performed with 0.5 mg/kg diazepam i.v. (Valium®, Roche Quim. e Farm. S/A, São Paulo – Brazil) and 0.4 mg/kg i.v. butorphanol tartrate (Torbugesic®, Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas – Brazil). After induction of anesthesia with 10 mg/kg of ketamine chloridrate i.v. (Vetaset®, Fort Dodge Saúde Animal, Campinas – Brazil), 3% halothane (Halothano, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., São Paulo – Brazil) with an oxygen mixture was given. Afterwards, animals were intubated with a 7.0 size endotracheal tube and ventilated with an OXIGEL 1722 (Oxigel Mats Hosps Ind. E Com. Ltda, São Paulo - Brazil) respirator. Oxygen saturation,  $ETCO_2$ , blood pressure, heart rate, 3-lead electrocardiogram, and rectal and nasopharyngeal temperature were monitored by the cardioscopy DIXTAL DX-2010 (Dixtal Biomedica Ind. E Com. Ltda., Manaus – Brazil). Blood gas values were measured by the AGS12 DRAKE Gasometer (Drake Electronic Com. Ltda, São Paulo – Brazil). The values were adjusted within normal ranges. The sheep were placed in a lateral decubitus position. Invasive arterial blood pressure measurement was obtained by cannulation of the left central ear artery. A left mini-thoracotomy was performed at the second intercostal space. The descending aorta was carefully dissected free, partially clamped, and incised. The decellularized equine pericardial patch was implanted using a running 6-0 polypropylene suture lines (Figure 1). Hemostasis was controlled, a chest drain was inserted, and the chest was closed in layers.

At the time of skin closure, 1% bupivacaine chloridrate (Marcaína® Astra Quím. E Farm. Ltda., São Paulo – Brazil) was given in the wound as local pain medication. The chest drain was removed approximately 30 minutes after surgery in all cases. Two mg/kg of Flunixin meglumine (Excenel RTU Pharmacia Brazil Ltda., São Paulo – Brazil) was administered intramuscularly given as pain medication. Antibiotic therapy was performed





**Figure 1.** This representative sample shows an implanted decellularized equine pericardial patch into the descending aorta.



**Figure 2.** This representative sample is a decellularized equine pericardial patch at explantation after 4 months of implantation.

by administering 4 mg/kg of gentamicin (Schering-Plough S/A, São Paulo – Brazil) and 1 mg/kg of ceftiofur (Excenel RTU Pharmacia Brazil Ltda., São Paulo – Brazil) during the first 5 postoperative days.

After 1 day, the animals were transported back to the farm. Clinical examinations were performed daily by a veterinarian.

### Explants and analysis

The animals were observed for external abnormalities, including palpable masses and skin scarring. After the animals were pre-medicated and intubated, 3 mg/kg of heparin was administered intravenously. The descending aorta were carefully prepared and the experiments terminated by administering an overdose of potassium. When there was no heart activity seen on the ECG, the patches were dissected and removed. All animals were exsanguinated at 4 months (n=7) based on previous experience, since recellularization in the systemic circulation was seen to be completed after 4 months [19], confirmed by clinical data of Scholl et al. [20].

### Gross examination

The explanted decellularized patches were inspected and color photographs were taken before fixation. Special attention was given to identify vegetations, hematomas, thrombotic material, and signs of mechanical or biological degradation (tears or perforations, fibrous tissue overgrowth, aneurysmatic dilatation, calcific deposits, deformations, retractions or hardness).

### Histology

Histological examination was performed to observe the in vivo repopulation of the decellularized equine pericardial patches. Representative samples were taken from different areas of the patches.

### Light microscopy

Longitudinal sections were imbedded in paraffin and four-micrometer thick sections were stained. Hematoxylin-eosin staining was performed to allow general evaluation of the samples. Gomori staining showed collagen fibers in general. Sirius red staining was used to visualize the difference between mature and immature collagen fibers. Weigert staining expressed elastin fibers. Von Kossa staining identified valve area's with calcification if present.

### Immunohistochemistry

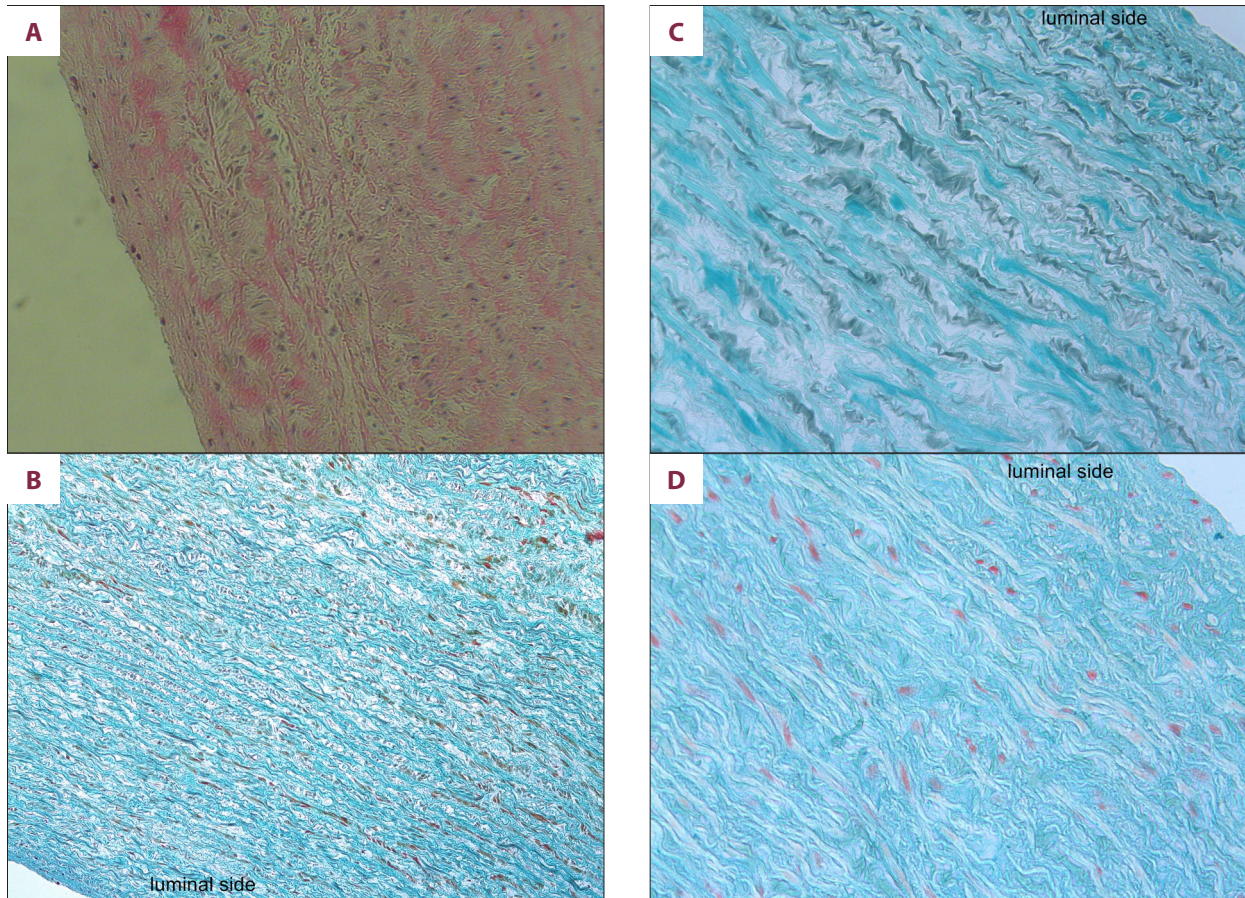
Endothelial cells were characterized by the presence of factor VIII-related antigen (DAKO, Hamburg, Germany) as well as CD 31 and CD 34 (DAKO, Hamburg, Germany). Fibroblasts were identified by anti-fibroblast factor (DAKO, Hamburg, Germany).

## Results

During follow-up, no events were observed. All animals survived the follow-up period of 4 months.

### Gross examination

Explantations were undertaken without any problem, as identification of the implanted decellularized equine patches showed only minimal adhesions. The decellularized equine patches were pliable comparable to pre-implantation, without losing wall thickness (Figure 2). No hematomas, vegetations, or thrombotic materials were seen at the inner surfaces of the patch. Furthermore, there was no evidence of aneurysmatic dilatation or tissue deterioration, although the patches were largely oversized. No calcific spots were visible on the decellularized patches.



**Figure 3A-D.** (A) Histological examination of a piece of the explanted decellularized pericardial patch shows a normal extracellular matrix with a monolayer of endothelial-like cells (H&E staining). (B) Goldner stained pericardial patch showed the well preserved collagen structures of the pericardial patch confirmed with Gomori staining (C). (D) Pentachrome staining reflects an intact extracellular matrix.

## Histology

### Light microscopy

Hematoxylin-eosin staining showed in all implanted patches complete repopulation of the decellularized scaffolds (Figure 3A). The inner surface showed a complete intact monolayer of endothelial-like cells. The orientation and integrity of the extracellular matrix showing a well preserved collagen and elastin. In all areas of the decellularized scaffolds, there was a complete infiltration of interstitial cells. These included fibroblast-like and myofibroblast-like cells showed partially large nucleus, characteristic for young fibroblasts.

Goldner and Gomori staining supported the findings show at the hematoxylin-eosin staining by a normal pattern of collagen in all layers of the extracellular matrix. The decellularized patches were not affected by high pressure and showed a well preserved integrity of the extracellular matrix (Figure 3B, 3C).

Pentachrome staining showed a similar pattern for the preserved elastin fibers, without structural deterioration as well as the collagen fibers (Figure 3D).

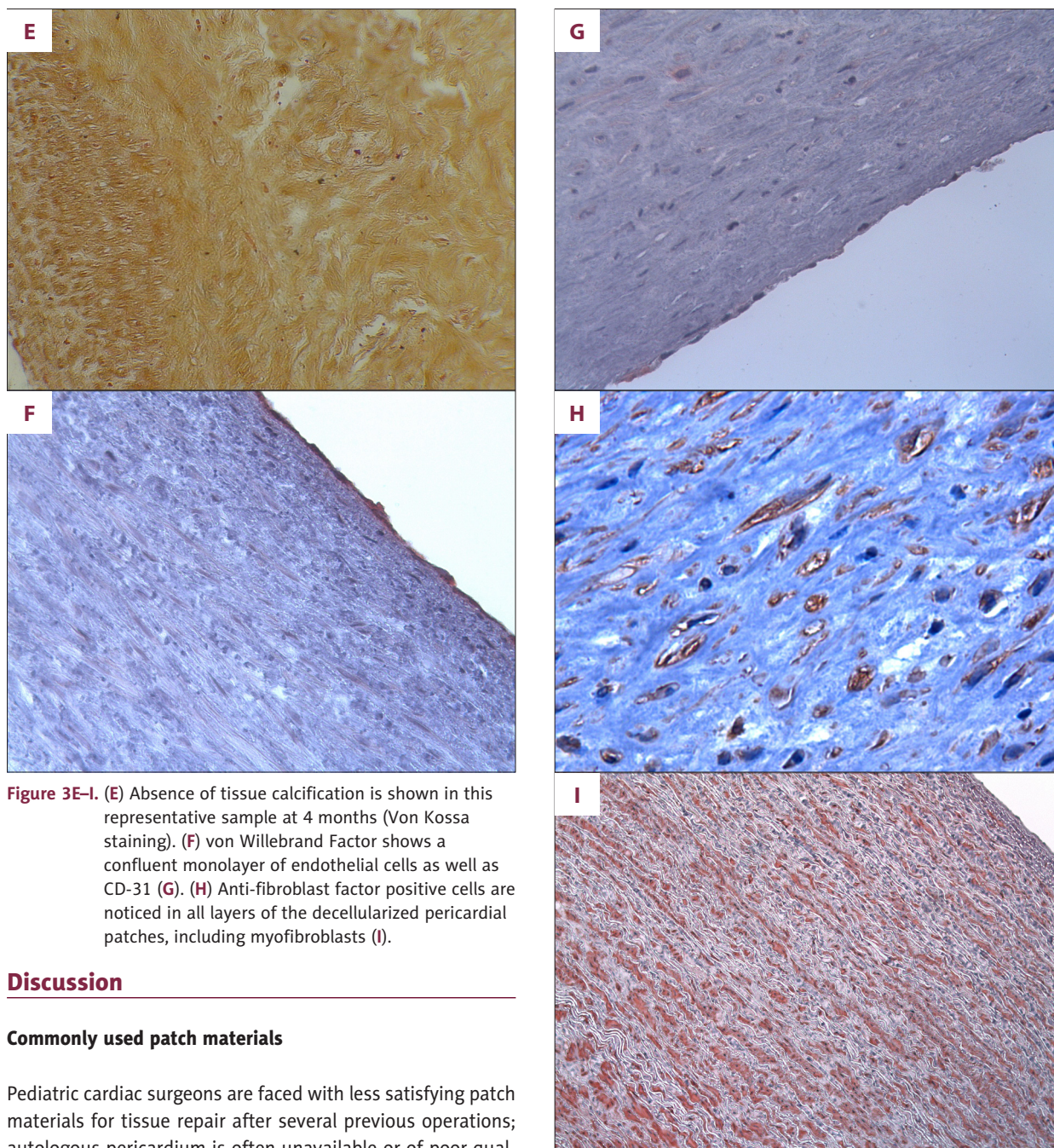
Serius red staining showed mature and immature collagen structures of the extracellular scaffold as well as the well preservation of the extracellular matrix at the systemic circulation.

Von Kossa staining was able to support the findings that there is no calcification at any part of the decellularized patches (Figure 3E).

### Immunohistochemistry

With immunohistochemic analyses it was possible to identify that the inner surface was covered by a monolayer of endothelial cells (Figure 3F). This was confirmed by CD-31 (Figure 3G) and CD-34 staining. The interstitial cells were positive stained by a specific anti-fibroblast marker, showing that these interstitial cells were fibroblasts (Figure 3H) and also myofibroblast (Figure 3I).





**Figure 3E-I.** (E) Absence of tissue calcification is shown in this representative sample at 4 months (Von Kossa staining). (F) von Willebrand Factor shows a confluent monolayer of endothelial cells as well as CD-31 (G). (H) Anti-fibroblast factor positive cells are noticed in all layers of the decellularized pericardial patches, including myofibroblasts (I).

## Discussion

### Commonly used patch materials

Pediatric cardiac surgeons are faced with less satisfying patch materials for tissue repair after several previous operations; autologous pericardium is often unavailable or of poor quality. Any prosthetic patch material is difficult to handle, prone to infection, and stiffened after some time in the blood circulation [21,22]. Recurrent coarctation repair is exceptional high; in as high as 30% in tube graft insertion, compared with 12% and 11% in patch aortoplasty and end-to-end anastomosis, respectively [23].

In a study including 317 patients with patch aortoplasty, Hehrlein et al. [24] showed that 18 patients (5.7%) developed an aneurysm. Twelve patients (66.7%) underwent extensive resection of the intimal layer, the so-called fibrous coarctation

membrane, which was the only factor predictive of developing an aneurysm. Experimental data of DeSanto et al. [25], in which aneurysm formation was found in 8 out of 12 animals (66.7%), support these findings.

Other studies showed the impact of using synthetic materials and explained the formation of an aneurysm by the development of a hemodynamic pulsatile wave, which is completely absorbed by the posterior native wall due to the rigid patch that is anteriorly placed [26,27]. Further differences have been

found in the use of various materials, including knitted grafts, which showed a significant higher rate of aneurysm compared to woven Dacron grafts [28,29]. Backer et al. [30] showed, by using polytetrafluoroethylene grafts versus Dacron, a statistically significant reduction of aneurysms; 0.3% (1/326 patients) and 11.9%, respectively (70/586 patients) ( $P < 0.001$ ).

Bovine, porcine, or equine bioprosthetic patches classically are tanned with glutaraldehyde and thus undergo stiffening and calcification over time, especially in young patients [31–33]. Surgical handling and resistance to infection of pericardial tissue is much better than prosthetic material; however, Roussin et al. [34] showed that 3 out of 4 glutaraldehyde-fixed xenopericardial patches needed to be explanted after aortic arch reconstruction within 1 year, and 3 out of 4 pulmonary homograft patches were explanted within 18 months of follow-up. Mirsadraei et al. [35] was able to show significantly lower calcium levels in fresh/frozen pericardia compared with glutaraldehyde-fixed pericardia, 117 mg/g versus 332  $\mu\text{g/g Ca}^{2+}$ , respectively, of tissue dry weight ( $p < 0.001$ ). Other studies showed the fate of using autogenic pericardia, even in the systemic circulation [36,37].

In an experimental study, Cheung et al. [38] reported early postoperative fibrosis as well as tissue retraction of the autologous pericardium, probably due to high serum levels. Increase cellular accumulation within parts of the tissue could not be explained.

All of the currently available patch materials, however, show no regeneration, remodeling, or growth potential, which is a serious drawback in the setting of cardiac repair in infants and children, which results in reoperations. These problems could be overcome by tissue with regeneration, remodeling, and growth potential, especially in the high-pressure circulation such as enlargements of the aorta in the Norwood I procedure, mitral or aortic valve repair, or complex repair of coarctation of the thoracic aorta.

Several experimental and clinical studies were performed to evaluate tissue-engineered materials, however, these were mainly within the low-pressure system [39,40]. Limited studies show results of decellularized heart valves implanted into the high-pressure system [41,42].

#### Alternative tissue-engineered patch materials in clinics

Recent studies present a few new tissue-engineered patches available to be used in congenital heart diseases. One commercially available patch is the so-called CorMatrix (CorMatrix Cardiovascular, Alpharetta, GA, USA). This is a decellularized porcine small intestinal submucosa extracellular matrix (SIS-ECM) including elastin, glycosaminoglycans, proteoglycans, and adhesion glycoproteins.

In an initial study, Boyd et al. [11] demonstrated the effect of pericardial closure with SIS-ECM in adult patients. In this study there was a statistically significant reduction seen of postoperative atrial fibrillation in coronary artery bypass patients versus the controls. Scholl et al. [20] used this new acellular xenograft patch in 43 congenital heart diseased patients. In 16 patients, the pericardium was closed with the SIS-ECM, which in 37 SIS-ECM was used for cardiac or great vessel repair. However, the SIS-ECM generally was used in the low-pressure system. In 1 patient, SIS-ECM was used for tricuspid valve anterior leaflet augmentation and 4 months after surgery a catheter-based valve replacement was performed due to severe regurgitation. Stelly et al. [43] reported that more than 50,000 of these implants have been performed. In this reoperation case study, limited adhesion was found if SIS-ECM was used for pericardial closure. Quari et al. [44] reported the use of SIS-ECM in 26 patients, including 5 aortic valves, 1 mitral valve repair, and 7 vascular repairs (including 4 ascending aorta and 3 aortic arch repairs). Early results of this study look promising. Schomisch et al. [45], however, reported that the use 3 different extracellular matrices (small intestinal mucosa (SIS), acellular dermal matrix, and urinary bladder matrix) could not prevent stricture after esophageal mucosectomy. Another caution was reported by Weber et al. [46], presenting early asymptomatic pseudoaneurysm degeneration by using SIS for carotid repair.

Lofland et al. [47] used a decellularized allograft pulmonary artery patch (MatrACELL, LifeNet Health, Virginia Beach, VA, USA) to reconstruct right ventricular outflow tract reconstruction. During complementation of the surgical procedure, a right ventricle-to-pulmonary artery conduit was implanted, histological examination was performed from a small biopsy of the patch, showing recellularization with absence of inflammation.

Neethling et al. [12] evaluated a tissue-engineered bovine pericardial patch treated with ADAPT. In total, 30 patches of this type have been implanted with (CardioCel, Celxcel Pty Ltd., Perth, Western Australia). At least 6 vascular reconstructions were performed, which needs to withstand the circulatory pressure. During 18-36 months of follow-up, 19 out of 30 patients underwent echocardiographic examination with absence of device calcification, infection, thromboembolic events, or device failure.

These early result show the potential of tissue-engineered patches to be used for correction of congenital cardiac defect. The SIS-ECM, however, needs further evaluation, especially if this material is to be able to withstand the systemic circulation. Therefore, we evaluated equine pericardium implanted into the system circulation.

#### Evaluation different pericardial patches

Gauvin et al. [14] showed that bovine pericardium has superior biomechanical strength, ultimate tensile strength, and linear



modulus, compared with porcine pericardium. Furthermore, this study showed that the fibrocollagenous surfaces of bovine and porcine tissue were not equal, showing that the serous side of porcine pericardium retained more platelets when compared with bovine material, with increase risk of acute thrombogenicity and building of a biofilm.

On the other hand, Umashankar et al. [48] studied the inflammation and immune response on regeneration induced by decellularized bovine pericardium. Therefore, these un-cross-linked decellularized bovine pericardia were compared with mild cross-linked decellularized bovine pericardia, showing a reduction of inflammatory response for plasma cells and macrophages of  $2.0 \pm 0.9$  cells/hpf versus  $1.1 \pm 0.2$  cells/hpf and  $2.89 \pm 0.33$  cells/hpf versus  $2.47 \pm 0.74$  cells/hpf, respectively, ( $p < 0.05$ ). The adaptive immune response at 90 days showed statistically significant higher antibody response in un-cross-linked decellularized bovine pericardium as compared with mild cross-linked decellularized bovine pericardium ( $p = 0.006$ ).

Since bovine pericardium seems to be stronger, limited reports have been presented that bovine pericardium can be contaminated, which is a serious problem, especially in non-cross-linked bovine pericardium [15]. If there is a risk of *Onchocerca armillata* availability in bovine pericardium, a potential risk will arise in unfixed tissue, resulting in acute aortitis with necrosis, which in turn results in aneurysm formation and eventual rupture.

## References:

1. Ozkara A, Mert M, Cetin G et al: Right ventricular outflow tract reconstruction for tetralogy of Fallot with abnormal coronary artery: Experience with 35 patients. *J Card Surg*, 2006; 21(2): 131–36
2. Jonas RA, Freed MD, Mayer JE Jr, Castaneda AR: Long-term follow-up of patients with synthetic right heart conduits. *Circulation*, 1985; 72(3Pt2): I177–83
3. Mayer JE Jr: Uses of homograft conduits for right ventricle to pulmonary artery connections in the neonatal period. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*, 1995; 7(3): 130–32
4. Smaill BH, McGiffin DC, Legrice IJ et al: The effect of synthetic patch repair of coarctation on regional deformation of the aortic wall. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2000; 120(6): 1053–63
5. Kirklın JK, Kirklın JW, Blackstone EH et al: Effect of transannular patching on outcome after repair of tetralogy of Fallot. *Ann Thorac Surg*, 1989; 48(6): 783–91
6. Valente M, Laborde F, Thiene G et al: Glutaraldehyde-fixed bovine iliac veins used as bioprothetic conduits: an experimental animal study. *J Card Surg*, 1992; 7(2): 156–62
7. Fiddler GI, Gerlis LM, Walker DR et al: Calcification of glutaraldehyde-preserved porcine and bovine xenograft valves in young children. *Ann Thorac Surg*, 1983; 35(3): 257–61
8. Langer R, Vacanti JP: *Tissue Engineering*. Science, 1993; 260(5110): 920–26
9. Dohmen PM, Lembcke A, Holinski S et al: Midterm results of right ventricular outflow tract reconstruction with a tissue engineered pulmonary valve in eleven consecutive patients. *Ann Thorac Surg*, 2007; 84(3): 729–36
10. Dohmen PM, da Costa F, Yoschi S et al: Histological evaluation of tissue engineered heart valves implanted in the juvenile sheep model: is there a need for *in-vitro* seeding? *J Heart Valve Dis*, 2006; 15(6): 823–29
11. Boyd WD, Johnson WE III, Sultan PK et al: Pericardial reconstruction using an extracellular matrix implant correlates with reduced risk of postoperative atrial fibrillation in coronary artery bypass surgery patients. *Heart Surg Forum*, 2010; 13(5): E311–16
12. Neethling WML, Strange G, Firth L, Smit FE: Evaluation of a tissue-engineered bovine pericardial patch in paediatric patients with congenital cardiac anomalies: initial experience with the ADAPT-treated CardioCel patch. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*, 2013; 17(4): 698–702
13. Gerdisch MW, Akinwande AO, Matheny RG: Use of a novel acellular xenograft as a patch for aortic annular enlargement during aortic valve replacement. *Innovations*, 2010; 5: 60–62
14. Gauvin R, Marinov G, Mehri Y et al: A comparative study of bovine and porcine pericardium to highlight their potential advantages to manufacture percutaneous cardiovascular implants. *J Biomater Appl*, 2013; 28(4): 552–65
15. Mather C, Treuting P: *Onchocerca armillata* contamination of a bovine pericardial xenograft in a human patient with repaired tetralogy of Fallot. *Cardiovasc Pathol*, 2012; 12(3): e35–38
16. Martin M, Trouvin JH: Risk of transmission of Creutzfeldt-Jakob disease via blood and blood products. The French risk-analysis over the last 15 years. *Transfus Clin Biol*, 2013; 20(11): 398–404
17. Bloch O, Golde P, Dohmen PM et al: Immune response in patients receiving a bioprothetic heart valve: lack of response with decellularized valves. *Tissue Eng Part A*, 2011; 17(19–20): 2399–405

The present study with a decellularized equine pericardial patch implanted into the aortic wall proved, macroscopically, the strength of the material. Although the patches were not seeded, no thrombotic material was noticed at the inner surface of the patch, and there was an absence of biofilm resulting in tissue infection. This could be another advantage over porcine and eventually also unfixed bovine pericardium.

Histologically, an intact extracellular matrix was seen with ingrowth of interstitial cells and absence of tissue retraction. A monolayer of endothelial cells had formed at the inner surface, providing the development of a pseudo-intima. The reason for this controlled process of repopulation may be the tissue-conserving decellularization process, which results in an intact functional extracellular matrix [41]. This has been shown previously by our group for decellularized valves in the pulmonary position [8–10,39,40].

## Conclusions

The decellularized equine pericardial patch showed excellent hemodynamic performance at systemic pressures, was easy to handle, free from calcification and tissue degeneration, and, as it has growth potential, it may become an ideal source for cardiac repair.

## Acknowledgements

We would like to thank Mrs. Krüger and Mrs. Noronha for assistance on preparing and staining the histological sections.

18. Dohmen PM, da Costa F, Lopes SV et al: Is there a possibility for a Glutaraldehyd-free porcine heart valve to grow? *Eur Surg Res*, 2006; 38(1): 54–61
19. Dohmen PM, da Costa F, Yoshi S et al: An experimental study of decellularized xenografts implanted into the aortic position with 4 months of follow-up. *J Clin Experiment Cardiol*, 2012; 54: 004
20. Scholl FG, Boucek MM, Chan KC et al: Preliminary experience with cardiac reconstruction using decellularized porcine extracellular matrix scaffold: human applications in congenital heart disease. *World J Pediatr Congenit Heart Surg*, 2010; 1(1): 132–36
21. Tremblay D, Zigras T, Cartier R et al: A comparison of mechanical properties of materials used in aortic arch reconstruction. *Ann Thorac Surg*, 2009; 88(5): 1481–91
22. Hesslein PS, McNamara DG, Morriss MJH et al: Comparison of resection versus patch aortoplasty for repair of coarctation in infants and children. *Circulation*, 1981; 64(1): 164–68
23. Brown JW, Ruzmetov M, Hoyer MH et al: Recurrent coarctation: Is surgical repair of recurrent coarctation of the aorta safe and effective? *Ann Thorac Surg*, 2009; 88(6): 1923–31
24. Hehrlein FW, Mulch J, Rautenburg HW et al: Incidence and pathogenesis of late aneurysm after patch graft aortoplasty for coarctation. *J Thoracic Cardiovasc Surg*, 1986; 92(2): 226–30
25. DeSanto A, Bills RG, King H et al: Pathogenesis of aneurysm formation opposite prosthetic patches used for coarctation repair. An experimental study. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1987; 94(5): 720–23
26. Bromberg BI, Beekman RH, Rocchini AP et al: Aortic aneurysm after patch aortoplasty repair of coarctation: a prospective analysis of prevalence, screening test and risks. *J Am Coll Cardiol*, 1989; 14(3): 734–41
27. Dietl CA, Torres AR, Favalaro RG et al: Risk of recoarctation in neonates and infants after repair with patch aortoplasty, subclavian flap, and the combined resection-flap procedure. *J Thoracic Cardiovasc Surg*, 1992; 103(4): 724–32
28. Monaghan RA, Meban S: Expanded polytetrafluoroethylene patch in hernia repair: a review of clinical experience. *Can J Surg*, 1991; 34(5): 502–5
29. Wilson SE, Krug R, Mueller G, Wilson L: Late disruption of Dacron aortic grafts. *Ann Vasc Surg*, 1997; 11(4): 383–86
30. Backer CL, Paape K, Zales VR et al: Coarctation of the aorta. Repair with polytetrafluoroethylene patch aortoplasty. *Circulation*, 1995; 92(9 Suppl.): II132–36
31. Moulton AL, De Leval MR, Macartney FJ et al: Rastelli procedure for transposition of the great arteries, ventricular septal defect, and left ventricular outflow tract obstruction. Early and late results in 41 patients 1971 to 1978. *Br Heart J*, 1981; 45(1): 20–28
32. Williams DB, Danielson GK, McGoan DC et al: Porcine heterograft valve replacement in children. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1982; 84(3): 446–50
33. Lloyd TR, Marvin WJ Jr, Mahoney LT, Lauer RM: Balloon dilation valvuloplasty of bioprothetic valves in extracardiac conduits. *Am Heart J*, 1987; 114: 268–74
34. Roussin R, Belli E, Lacour-Gayet F et al: Aortic arch reconstruction with pulmonary autograft patch aortoplasty. *J Thoracic Cardiovasc Surg*, 2002; 123(3): 443–48
35. Mirsadraee S, Wilcox HE, Watterson KG et al: Biocompatibility of acellular human pericardium. *J Surg Res*, 2007; 143(3): 407–14
36. Schulte HD, Bircks W, Frenzel H et al: Patch-graft enlargement of the aortic root using autologous pericardium (long-term results). *Thorac Cardiovasc Surg*, 1983; 31(4): 219–23
37. Dalichau H, Hannekum A, Niehues B et al: Hemodynamic and angiographic late results following enlargement of narrow aortic root using autologous pericardium in prosthetic aortic valve replacement. *Thorac Cardiovasc Surg*, 1985; 33(5): 288–95
38. Cheung DT, Choo SJ, Grobe AC et al: Behavior of vital and killed autologous pericardium in the descending aorta of sheep. *J Thoracic Cardiovasc Surg*, 1999; 118(6): 998–1005
39. Dohmen PM, Lembcke A, Holinski S, Pruss A, Konertz W: Ten years of clinical results with a tissue-engineered pulmonary valve. *Ann Thorac Surg*, 2011; 92(4): 1308–14
40. Konertz W, Angeli E, Tarusinov G et al: Right ventricular outflow tract reconstruction with decellularized porcine xenografts in patients with congenital heart disease. *J Heart Valve Dis*, 2010; 20(3): 341–47
41. Honge JL, Funder J, Hansen E et al: Recellularization of aortic valve in pigs. *Eur J Cardiothor Surg*, 2011; 39(6): 829–34
42. Dohmen PM: Tissue engineered aortic valve. *HSR Proc Intensive Care Cardiovasc Anesth*, 2012; 4(2): 89–93
43. Stelly M, Stelly TC: Histology of CorMatrix bioscaffold 5 years after pericardial closure. *Ann Thorac Surg*, 2013; 96: e127–29
44. Quarti A, Nardone S, Colaneri M et al: Preliminary experience in the use of fan extracellular matrix to repair congenital heart diseases. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*, 2011; 13(6): 569–72
45. Schomisch SJ, Yu Y, Pauli EM et al: Commercially available biological mesh does not prevent stricture after esophageal mucosectomy. *Endoscopy*, 2013; Nov 11. [Epub ahead of print]
46. Weber SS, Annenberg AJ, Wright CB et al: Early pseudoaneurysm degeneration in biologic extracellular matrix patch for carotid repair. *J Vasc Surg*, 2013; pii: S0741-5214(13)00949-X
47. Lofland GK, O'Brien JE Jr, Gandy KL et al: Initial pediatric cardiac experience with decellularized allograft patches. *Ann Thorac Surg*, 2012; 93(3): 968–71
48. Umashankar PR, Arun T, Kumary TV: Effect of chronic inflammation and immune response on regeneration induced by decellularized bovine pericardium. *J Biomed Mater Res Part A*, 2013; 101A: 2202–9
49. Dohmen PM, Konertz W: Tissue-engineered heart valve scaffolds. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*, 2009; 15(6): 362–67

## **Lebenslauf**

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

# Publikationsliste

## 1. Veröffentlichungen als Erstautor

Bloch O., Erdbrügger W., Völker W., Schenk A., Posner S., Konertz W. und Dohmen P.: Extracellular matrix in deoxycholic acid decellularized aortic heart valves. In: *Med Sci Monit*, Band 18(12):S.487-492, 2012.  
IF = 1,669

Bloch O., Golde P., Dohmen P., Posner S., Konertz W. und Erdbrügger W.: Immune response in patients receiving a bioprosthetic heart valve: lack of response with decellularized valves. In: *Tissue Eng: Part A*, Band 17:S.2399-2405, 2011.  
IF = 4,022

Bloch O.: Nachweis von Markern, die eine Aussage über den Grad der Dezellularisierung von Geweben erlauben. Unveröffentlichte Diplomarbeit, Technische Universität Berlin, 2007.

## 2. Veröffentlichungen als Mitautor

Dohmen P.M., da Costa F., Lopes S., Vilani R., Bloch O. und Konertz W.: Successful implantation of decellularized equine pericardial patch into the systemic circulation. In: *Med Sci Monit Basic Res*, Band 20:S.1-8, 2014.  
IF = 1,216

Dohmen P.M., da Costa F., Yoshi S., da Souza F.P., Vilani R., Bloch O. und Konertz W.: An experimental study of decellularized xenografts implanted into the aortic position with 4 month of follow up. In: *J Clinic Experiment Cardiol*, S4-004, 2012.  
IF = 1,33

## 3. Kongressbeitrag als Vortrag

Linneweber J., Voss F., Bloch O., Dohmen P., Erdbrügger W. und Konertz W.: Anti-thrombogenic surface modifications in xenogenic pericardial vascular grafts: Initial in-vivo evaluation.  
40. Jahrestagung der DGTHG in Stuttgart, 2011.

## 4. Kongressbeitrag als Poster

Schenk A., Völker W., Bloch O., Konertz W. und Erdbrügger W.: Extracellular matrix in deoxycholic acid decellularized aortic and pulmonary heart valves.  
Biofuture in Ghent, Belgien, 2011.

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Oliver Bloch, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Untersuchungen zu Immunogenität, Struktur und Biokompatibilität von dezellularisierten Herzklappengeweben“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum            30.09.2015

\_\_\_\_\_  
Unterschrift

## **Danksagung**

Ich möchte mich bei allen Personen herzlich für Ihre Unterstützung bei dieser Arbeit bedanken. Insbesondere Herrn Universitäts-Professor Dr. med. W. Konertz, der es mir ermöglichte dieses spannende Promotionsthema in der Klinik der Kardiovaskulären Chirurgie der Charité Universitätsmedizin Berlin zu bearbeiten.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Herrn Universitäts-Professor Dr. med. P. Dohmen bedanken, der die Betreuung der Arbeit übernommen hat und mir mit menschlicher und fachlicher Hilfe jederzeit bei der Erstellung der Arbeiten zur Seite gestanden hat.

Ich möchte mich bei allen Verantwortlichen für das überaus spannende Thema bedanken, das so umfangreich ist, dass es keinerlei Einschränkung zulässt und mir jede Freiheit beim Erstellen der Arbeiten ließ.

Ich möchte mich bei allen Mitarbeitern der Auto Tissue Berlin GmbH für ihre Unterstützung bedanken, insbesondere Herrn Stefan Seidl und Frau Dr. med Stein-Konertz, die mich zu jedem Zeitpunkt bei diesem Vorhaben unterstützt haben. Auch möchte ich mich bei Dr. Wilhelm Erdbrügger und Dr. Steffen Posner für die immerwährende Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit bedanken.

Natürlich möchte ich mich auch bei allen bisher noch nicht erwähnten Autoren und Mitautoren bedanken, ohne die eine solche Arbeit nicht möglich wäre und die alle ihren Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein ganz besonderer Dank geht auch an meine Familie, die mich jederzeit während des Studiums und später unterstützten und damit diese Arbeit erst ermöglichten. Hervorzuheben ist hierbei auch meine Frau Claudia, die mir auch in den unruhigen Phasen dieser Arbeit immer zur Seite gestanden hat.

Ein besonderer Dank gebührt bei dieser Arbeit auch meinem Vater, der sie leider nicht mehr vollendet erleben durfte aber ein stetiger Antreiber dieser war. Deshalb möchte ich ihm diese Arbeit widmen.