

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Herstellung eines biologischen Bypasses zum Einsatz in der peripheren Gefäßchirurgie

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Aila Daus

aus Neuruppin

Datum der Promotion: 06.09.2019

Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	Varianzanalyse; Analysis of variance
ASS	Acetylsalicylsäure; Acetylsalicylic acid
BAC	Bovine <i>Arteria carotis</i> ; Bovine carotid artery
BSA	Bovines Serumalbumin; Bovine serum albumin
Chaps	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonat
DAB	3,3'-Diaminobenzidin; 3,3'-Diaminobenzidine
DNA	Desoxyribonukleinsäure; Deoxyribonucleic acid
DOA	Desoxycholsäure; Desoxycholic acid
EDC	N-(3-dimethylaminopropyl)-N9-ethylcarbodiimid; N-(3-dimethylaminopropyl)-N9-ethylcarbodiimide
EDTA	Ethylenediamintetraessigsäure; Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EZM	Extrazelluläre Matrix; Extracellular matrix
FGF	Fibroblasten Wachstumsfaktor; Fibroblast growth factor
HE	Hämatoxylin-Eosin; Hematoxylin-eosin
HEK	Humane embryonale Nierenzellen; Human embryonic kidney cells
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure; 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
IHC	Immunhistochemie; Immunohistochemistry
mAB	Monoklonaler Antikörper; Monoclonal antibody
MHC-I	Haupthistokompatibilitätskomplex-I; Major histocompatibility complex-I
NaCl	Natriumchlorid; Sodium chloride
NHS	N-Hydroxysuccinimid; N-Hydroxysuccinimide
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese; polyacrylamide gel electrophoresis
pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit; Peripheral artery disease
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung; Phosphate-buffered saline
PET	Polyethylenterephthalat; Polyethylene terephthalate
PTFE	Polytetrafluorethylen; Polytetrafluoroethylene
RNA	Ribonukleinsäure; Ribonucleic acid
SD	Standardabweichung; Standard deviation
SDS	Natriumdodecylsulfat; Sodium dodecyl sulfate
TEVG	Mittels Tissue Engineering hergestellte Gefäßprothese; Tissue engineered vascular graft
TX100	Triton X 100
UTS	Maximale Zugbelastung; Ultimate tensile strength
VEGF	Vascular endothelial growth factor
α Gal	Gal α 1,3-Gal β 1-4GlcNAc-R

Inhaltsverzeichnis

Abstrakt	I
Abstract	II
1 Einführung	2
1.1 Zielsetzung	3
2 Methodik	4
2.1 Materialgewinnung und -aufbereitung	4
2.2 Nachweis der Zellfreiheit mittels Nukleinsäure- und Proteinquantifizierung	4
2.3 Nachweis der Zellfreiheit und strukturellen Integrität mittels Histologie.....	4
2.4 Nachweis der mechanischen Stabilität mittels Zugbelastungstests.....	5
2.5 Nachweis der Biokompatibilität mittels Analyse der Zytotoxizität	5
2.6 Nachweis der <i>in vitro</i> Immunogenität	5
2.6.1 Dot Blot Analyse	5
2.6.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophoreses (PAGE) und Western Blot Analyse.....	5
2.6.3 Immunohistochemische (IHC) Analyse	6
2.6.4 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) Analyse	6
2.7 <i>In vivo</i> Biokompatibilitätsprüfung einer Heparin-Beschichtung	7
2.8 Statistische Analyse.....	7
3 Ergebnisse	8
3.1 Identifizierung eines geeigneten, chemischen Dezellularisierungsverfahrens.....	8
3.2 Untersuchung der Zellfreiheit	9
3.3 Untersuchung der strukturellen Integrität	10
3.4 Untersuchung der mechanischen Stabilität	10
3.5 Untersuchung der Biokompatibilität	10
3.6 Untersuchung der <i>in vitro</i> Immunogenität	10
3.7 Untersuchung der Biokompatibilität einer Heparin-Beschichtung <i>in vivo</i>	11

4 Diskussion	12
4.1 Bewertung der chemischen Dezellularisierung.....	12
4.2 Bewertung der Immunogenität dezellularisierter BACs	15
4.3 Bewertung der Biokompatibilität einer Heparin-Beschichtung.....	17
4.4 Ausblick	19
5 Literaturverzeichnis.....	20
6 Eidesstattliche Versicherung.....	24
7 Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen.....	25
8 Publikationen.....	27
9 Lebenslauf.....	55
10 Publikationsliste	58
11 Danksagung.....	59

Abstrakt

Einleitung: Aufgrund der steigenden Prävalenz von arteriellen Gefäßerkrankungen, nimmt der Bedarf an Gefäßprothesen stetig zu. Da die Verfügbarkeit von allogenen und autologen Transplantaten stark limitiert ist und alloplastische Prothesen keine zufriedenstellenden Langzeitergebnisse liefern, ist die Entwicklung neuartiger, biologischer Gefäßprothesen erforderlich. Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer azellulären, xenogenen Gefäßprothese aus der bovinen *Arteria carotis* (BAC), die biokompatibel und mechanisch belastbar ist.

Methodik: Zur Entfernung aller tierischen Zellen aus der BAC wurden verschiedene chemische Dezellularisierungsverfahren systematisch untersucht und anhand des verbliebenen DNA-, RNA- sowie Protein-Gehalts in behandelten BACs verglichen. Zellfreie BACs wurden zur Beurteilung der Biokompatibilität auf Toxizität sowie Immunkompatibilität untersucht. Letztere erfolgte anhand von Immunfärbungen auf bekannte Xenoantigene, wie das α Gal-Epitop (Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-R) und das MHC-I (Haupthistokompatibilitätskomplex-I), sowie mittels Humanserum auf unbekannte Immunogene. Ferner wurde die mechanische Belastbarkeit in Zugbelastungstests analysiert. Zur Senkung des thrombogenen Potenzials wurden Gefäßfragmente Heparin-beschichtet und im subkutanen Rattenmodell auf Biokompatibilität geprüft.

Ergebnisse: Von den vier angewendeten Detergenzien konnten BACs nur mit 1 % 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate vollständig dezellularisiert werden. Der DNA-Gehalt wurde auf $0,2 \pm 0,2$ % ($p < 0,001$) und der Protein-Gehalt auf $0,6 \pm 0,3$ % ($p < 0,001$) im Vergleich zu nativen BACs reduziert. RNA- sowie toxische Rückstände konnten nicht nachgewiesen werden. Das immunogene Potenzial dezellularisierter BAC konnte, bezogen auf die native Kontrolle, um 99,9 % ($p < 0,01$) gesenkt werden. Bekannte Immunogene wie α Gal und MHC-I waren nach der Dezellularisierung nicht mehr nachzuweisen. Eine Beeinträchtigung der mechanischen Stabilität dezellularisierter BACs konnte ebenfalls nicht festgestellt werden. Durch die Heparin-Beschichtung wurde die Wiederbesiedlungsfähigkeit der Gefäße signifikant reduziert ($p < 0,05$). Toxische Effekte konnten nicht nachgewiesen werden.

Schlussfolgerung: Die mit dem neu entwickelten Protokoll hergestellte, azelluläre Gefäßprothese aus BAC ist biokompatibel (nicht-toxisch, nicht-immunogen) und mechanisch (zugfest) belastbar. Jedoch sind weitere Untersuchungen zur Thrombogenität und zur mechanischen Belastbarkeit sowie die Überprüfung der Prothese im Tiermodell ausstehend. Die Ergebnisse dieser Arbeit sind vielversprechend, sodass die dezellularisierte BAC möglicherweise zukünftig in der Gefäßersatztherapie Anwendung finden kann.

Abstract

Introduction: Due to the increasing prevalence of arterial vascular diseases, the need for vascular prostheses is constantly increasing. Since the availability of allogeneic and autologous grafts is limited and alloplastic prostheses lack satisfactory long-term results, the development of novel biological vascular prostheses is necessary. Aim of this project was the development of an acellular, xenogeneic vascular prosthesis from the bovine carotid artery (BAC), which is biocompatible and mechanically resistant.

Methods: To remove all xenogeneic cells from BAC, various chemical decellularization methods were systematically investigated and compared by remaining DNA, RNA and protein residues. Cell-free BACs were tested for toxicity and immunocompatibility to verify biocompatibility. Immunocompatibility was analyzed by immunohistochemical staining of known xenoantigens such as the α Gal epitope (Gal α -3 α Gal-4GlcNAc-R) and the MHC-I (main histocompatibility complex I). Furthermore, human serum staining was established to additionally identify unknown immunogens. Mechanical stability was investigated by measuring the ultimate tensile strength. To reduce the thrombogenic potential, vascular fragments were coated with heparin and tested for biocompatibility in a subcutaneous rat model.

Results: Four detergents were tested for decellularization of BACs, only 1 % 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate removed all xenogeneic cells. DNA content was reduced to $0.2 \pm 0.2\%$ ($p < 0.001$) and protein content to $0.6 \pm 0.3\%$ ($p < 0.001$) compared to native BACs. RNA and toxic residues were not detectable. The immunogenic potential of decellularized BACs was reduced by 99.9% ($p < 0.01$) and known immunogens such as α Gal and MHC-I were not detectable after decellularization. The decellularization process did not affect the mechanical stability of BACs. The heparin coating significantly reduced the recellularization of the vessels ($p < 0.05$), but toxic effects were not identified.

Conclusion: The acellular vascular prosthesis made of BAC is biocompatible (non-toxic, non-immunogenic) and mechanically resistant (tensile strength). However, further investigations on thrombogenicity and mechanical strength as well as testing in animal models are necessary. Nevertheless, the results are promising and the decellularized BAC may be used in vascular replacement therapies in the near future.

1 Einführung

Arterielle und venöse Gefäßerkrankungen nehmen aufgrund der stetig alternden Gesellschaft sowie durch ungesunde Lebensführung kontinuierlich zu. Dabei erkranken in den Industrieländern ca. 5 % der 45- bis 49-jährigen und ca. 18 % der 85- bis 89-jährigen an der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK), Prävalenz steigend.¹

Die pAVK bezeichnet eine arteriosklerotische Verengung (Stenosierung) bzw. einen Verschluss (Okkludierung) der Extremitäten-versorgenden Arterien, deren klinischer Schweregrad in vier Stadien nach Fontaine eingeteilt werden kann: Im ersten Stadium treten symptomfreie Durchblutungsstörungen auf, welche sich bei zunehmender Stenosierung der Arterien im zweiten Stadium charakteristisch als Gehbeschwerden äußern. Therapeutisch sind diese Stadien durch die Gabe von Thrombozytenaggregationshemmern, wie Acetylsalicylsäure (ASS) oder Clopidogrel, zu behandeln. Im fortgeschrittenen Stadium drei treten bereits im Ruhezustand Schmerzen in den betroffenen Extremitäten auf. Das akute vierte Stadium führt zu trophischen Störungen (Mangelversorgung der Gliedmaßen), was sich in Geschwüren (Ulzeration) und Absterben von Gewebe (Nekrosen) bis hin zur amputationsbedrohten Extremitätenischämie äußert.¹ Um die betroffenen Gliedmaßen vor der Amputation zu bewahren, ist eine invasive Therapie notwendig. Bei kurzstreckigen Verschlüssen wird durch eine Ballonangioplastie und bei langstreckigen Stenosen (> 8 cm) durch eine sogenannte Thrombendarteriektomie bzw. durch eine Gefäßersatztherapie (Bypässe) die Durchblutung wiederhergestellt.²

Für den Ersatz arterieller Gefäße ist heutzutage die autologe *Vena saphena magna*, aufgrund von ausgezeichneten Offenheitsraten, der Goldstandard. Durch das zusätzliche Trauma bei der Entnahme der Vene sowie deren begrenzter Verfügbarkeit ist der Einsatz alternativer Materialien häufig erforderlich.³ Synthetische Prothesen aus Polyethylenterephthalat (PET) und Polytetrafluorethylen (PTFE) sind elastisch, einfach handhabbar und in jeglichen Größen verfügbar. Jedoch liegen die Offenheitsraten synthetischer Prothesen lediglich bei 30 bis 40 % nach 5 Jahren.^{3,4}

Aufgrund der Nachteile autologer und synthetischer Gefäßprothesen werden aktuell im Labor hergestellte, biologische Gefäßprothesen (TEVG - Tissue engineered vascular grafts) erforscht. Die Ansätze lassen sich im Wesentlichen in folgende Gruppen untergliedern: Prothesen aus synthetischen Polymeren (Polycaprolakton, Polyhydroxyessigsäure, Tetrafluorethylen) und/ oder biologischen Polymeren (Fibrin, Elastin, Hyaluron, Kollagen), TEVGs ohne ein zusätzliches synthetisches Stützgerüst (i.d.R. Zellkulturen) und Prothesen aus behandelten, tierischen Gewebestrukturen (Xenografts).⁵

Werden unbehandelte, xenogene Gewebe für die Transplantation verwendet, so ist mit immunologischen Abstoßungsreaktionen aufgrund der phylogenetischen Unterschiede zwischen Donor und Rezipient zu rechnen.⁶ Die Initiierung der angeborenen und erworbenen Immunantwort kann entweder durch chemische Kreuzvernetzung des Gewebes mit Glutaraldehyd oder durch die vollständige Entfernung zellulärer Bestandteile aus der extrazellulären Matrix (EZM) mittels Dezellularisierung verhindert werden. Bekannte Auslöser, der in den ersten 24 Stunden stattfindenden, hyperakuten Abstoßungsreaktion sind antigene Oberflächenstrukturen, wie das α Gal-Epitop (Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc-R), welches, mit Ausnahme von Menschen und höheren Primaten, von allen Säugetieren auf der Zelloberfläche als Glykoprotein oder Glykolipid exprimiert wird⁷ sowie der Haupthistokompatibilitätskomplex-I (MHC-I), welcher auf allen kernhaltigen Zellen präsentiert wird und für die Aktivierung des Komplementsystems verantwortlich ist.⁸

Bei der Dezellularisierung werden diese Zellkomponenten durch chemische, physikalische und/oder enzymatische Prozesse aus dem Gewebe entfernt, wobei die EZM sowie deren mechanischen und strukturelle Eigenschaften vollständig erhalten bleiben soll. Allerdings werden dabei auch die gefäßauskleidenden Endothelzellen aus dem Gefäßlumen entfernt. Bei Blutkontakt könnte somit ein Thromboserisiko von der azellulären Gefäßoberfläche ausgehen. Durch Beschichtung mit dem Antikoagulans Heparin könnte einer eventuellen Thrombogenität der dezellularisierten Gefäße entgegengewirkt werden.⁹

1.1 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer biologischen Gefäßprothese, die biokompatibel (nicht-toxisch, nicht-immunogen, nicht-thrombogen, besiedlungsfähig) und mechanisch belastbar (Zug-, Dauer-, Druck-, Naht-belastbar) ist. Als Ausgangsmaterial sollte die bovine *Arteria carotis* (BAC) dienen, die sowohl in Länge, Durchmesser und Verfügbarkeit beste Voraussetzungen für einen peripheren Bypass bietet. Zur Entfernung aller xenogener Zellen aus der EZM sollten Detergenzien-basierte Verfahren systematisch anhand des DNA-, RNA- sowie Proteingehalts in behandelten BACs verglichen, bewertet und optimiert werden. Zellfreie BACs sollten zum Nachweis der Biokompatibilität auf Toxizität, Immunkompatibilität sowie Thrombogenität untersucht werden. Mittels einer humanen Zelllinie wurde indirekt mittels Vitalitätsbestimmung die Zytotoxizität zellfreier BACs bestimmt. Das immunogene Potenzial dezellularisierter BACs wurde in Immunfärbungen auf Xenoantigene untersucht. Zur Reduktion der Thrombogenität wurden Heparin-beschichtete Gefäßfragmente im subkutanen Rattenmodell auf ihre Biokompatibilität überprüft. Die mechanische Belastbarkeit dezellularisierter BACs wurde in Zugbelastungstests analysiert.

2 Methodik

2.1 Materialgewinnung und -aufbereitung

30-40 cm lange BACs wurden in einem lokalen Schlachtbetrieb entnommen und immer tagesfrisch aus dem perivaskulären Gewebe präpariert. Die Gefäßverzweigungen wurden mit 2-0 Mersilene® (Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, D) ligiert.

Für die Etablierung eines geeigneten Dezellularisierungsverfahrens wurden verschiedene Detergenzien, Inkubationszeiten, Konzentrationen, Prozesstemperaturen, Puffersysteme und Waschprotokolle getestet und auf ihre Wirksamkeit überprüft. Die Dezellularisierung erfolgte in einer Perfusionskammer, in der verschiedene Volumenströme und Kammerschaltungen untersucht wurden. Im optimierten, zweistufigen Verfahren wurden BACs für 16 und 22 h (16+22 h) bei 37 °C mit Detergenzien behandelt. Die Dezellularisierung erfolgte in 1 % (w/v) Desoxycholsäure (DOA) in 0,1 M Tris-HCl Puffer (pH 8,3) oder in 1 % (w/v) 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (Chaps) in PBS mit 1 M NaCl und 25 mM EDTA. Dezellulisierte BACs wurden sterilisiert und über 7 d in 0,1 M Tris-HCl Puffer oder in 0,9 % NaCl gewaschen. Anschließend wurde jede BAC mit den folgenden Methoden analysiert.

2.2 Nachweis der Zellfreiheit mittels Nukleinsäure- und Proteinquantifizierung

BACs wurden bis zur DNA- und Protein-Analyse bei -20 °C gelagert. Dazu wurden 100 mg Gewebe in TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,2) mit Stahlkugeln bei 3000 rpm für 1 min homogenisiert (Microtube Homogenizer, GeneOn, Ludwigshafen, D) und für 15 min mit Ultraschall (35 kHz) behandelt. Anschließend wurde das Gewebe zentrifugiert und der Überstand zur DNA- und Protein-Bestimmung verwendet. Zur Analyse des RNA-Gehalts wurden in RNA-later (Qiagen GmbH, Hilden, D), bei -20 °C gelagerte BACs verwendet. 30 mg Gewebe wurden nach dem GF-1 Total RNA Extraction Kit (GeneOn, Ludwigshafen, D) aufgereinigt. Der DNA- und RNA-Gehalt der Proben wurde mit dem Qubit® dsDNA und Qubit® RNA Assay Kit (Life Technologies, Darmstadt, D) quantifiziert. Die Detektion der DNA war auf 0,05 µg/g sowie die der RNA auf 0,7 µg/g limitiert und wird als nicht detektierbar (n.d.) gekennzeichnet. Der Proteingehalt wurde mittels Bradford Nachweis (Biorad, München, D) bestimmt.

2.3 Nachweis der Zellfreiheit und strukturellen Integrität mittels Histologie

Von Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeproben wurden mit einem Rotationsmikrotom 3 µm dicke histologische Schnitte angefertigt, die anschließend mittels Hämatoxy-

lin-Eosin- (HE) ¹⁰ oder Movat's Pentachrom-Färbung ¹¹ analysiert wurden. Das lichtmikroskopische Bild wurde fotodokumentiert (Axiovert 25, Carl Zeiss AG, Oberkochen, D).

2.4 Nachweis der mechanischen Stabilität mittels Zugbelastungstests

Zum Nachweis der mechanischen Eigenschaften von nativen und dezellularisierten BACs wurden diese in radialer und axialer Ausrichtung in 5 mm breite Fragmente geschnitten. Die Fragmente wurden in der Dicke vermessen und anschließend am Kraftmesser maximal belastet. Die maximale Zugbelastung (UTS) wurde mithilfe der gemessenen Maximalkraft wie folgt berechnet:

$$\text{UTS [MPa]} = \text{Maximalkraft [N]} / \text{Spannungsquerschnitt [mm}^2\text{]}$$

2.5 Nachweis der Biokompatibilität mittels Analyse der Zytotoxizität

5 mg Gewebe wurden zu 300 µl einer Zellsuspension, bestehend aus 10⁶ HEK 293 Zellen/ ml M199-Zellkulturmedium mit 0,1 % Kollagenase, gegeben und für 5 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Die Zellsuspension wurde anschließend mit Trypanblau gefärbt und vitale Zellen in einer Neubauer-Zählkammer mikroskopisch ausgezählt. Kontrollen ohne Gewebe bzw. mit nativen BACs wurden mitgeführt.

2.6 Nachweis der *in vitro* Immunogenität

2.6.1 Dot Blot Analyse

5 µl Proteinextrakt (siehe 2.2) wurden auf eine Nitrozellulosemembran getropft und getrocknet. Die Membran wurde in Blockpuffer inkubiert und anschließend primär sowie sekundär gefärbt (siehe Tab. 1). Die gebundenen Antikörper wurden mit DAB Substrat nachgewiesen.

2.6.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophoreses (PAGE) und Western Blot Analyse

Proteinextrakte (siehe 2.2) wurden mit 6x Lämmli-Puffer versetzt und für 5 min auf 95 °C erhitzt. Die SDS-Gele (5 % Sammelgel, 10 % Trenngel) wurden mit 10 µl Probe sowie Protein Ladder PS10 PLUS (GeneOn GmbH, Ludwigshafen, D) beladen. Die Elektrophorese wurde in Lauffpuffer (0,1 M Tris, 0,1 M HEPES, 3,5 mM SDS) bei 150 V für 45 min durchgeführt. Die Gele wurden mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt oder für den Western Blot in Transferpuffer (25 mM Tris-Base, 200 mM g Glycin, 10 % Methanol) überführt. Mittels Semi-dry Blotting wurden die Proteinen bei 25 V für 20 min auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Membran wurde in Blockpuffer inkubiert und anschließend primär sowie sekundär gefärbt (siehe Tab. 1). Die gebundenen Antikörper wurden mit dem DAB Substrat nachgewiesen.

2.6.3 Immunohistochemische (IHC) Analyse

Die Gewebeproben wurden für 16 h in Carnoy-Puffer (60 % Ethanol, 30 % Chloroform, 10 % Essigsäure) fixiert, entwässert und in Paraffin eingebettet. 5 µm dicke Schnitte der Gewebeproben wurden rehydriert und die endogenen Peroxidasen inaktiviert. Unspezifische Bindungsstellen wurden in Blockpuffer abgesättigt und anschließend die Primär- sowie Sekundärfärbung durchgeführt (siehe Tab. 1). Die gebundenen Antikörper wurden mit dem UltraVision Quanto HRP DAB Detection System (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) nachgewiesen. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hematoxylin für 3 min. Die Gewebeschnitte wurden mit Roti-Mount Aqua (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D) eingedeckt und am Lichtmikroskop fotodokumentiert.

2.6.4 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) Analyse

96er-Wellplatten (Corning Inc., New York, USA) wurden mit 100 µl Proteinextrakt (siehe 2.2) für 2 h beschichtet. Proben nativer BACs wurden in Verdünnungen von 1:5 bis 1:10.000 und dezellularisierte Proben unverdünnt aufgetragen. Unspezifische Bindungsstellen wurden in Blockpuffer abgesättigt und anschließend die Primär- sowie Sekundärfärbung durchgeführt (siehe Tab. 1). Die gebundenen Antikörper wurden mit dem Ultra TMB Reagenz (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) nachgewiesen. Die Extinction wurde bei 450/620 nm gemessen.

Tab. 1: Verwendete Blockpuffer, Antikörper und deren Verdünnungen sowie Inkubationszeiten.

Färbung	Human Serum	MHC-I	αGal
Blocken 30-60 min bei 25 °C	0,5 % Fischgelatine in PBS-T	1 % BSA in PBS-T	0,5 % Fischgelatine in PBS-T
Primär 16 h bei 4°C oder 2 h bei 25 °C	Humaner Serumpool (PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, D) unverdünnt (alle Methoden)	Maus-anti-bovin MHC-I mAB, Klon B5C (Kingfisher Biotech Inc., Santa Clara, USA) Dot Blot/ Western Blot/ ELISA → 1:5.000 IHC → 1:100	Maus-anti-αGal Epitope mAB, Klon M86 (Enzo Life Sciences, Lö- rrach, D) Dot Blot/ ELISA → 1:50 IHC → 1:5
Sekundär 1-2 h bei 25 °C	Ziege-anti-human Ig(G, A, M)-Peroxidase (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D) Dot Blot → 1:2.000 Western Blot → 1:2.000 IHC → 1:100 ELISA → 1:6.000	Ziege-anti-murin IgG- Peroxidase (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA) Dot Blot/ Western Blot/ ELISA → 1:2,000 Ziege-anti-murin IgG- Biotin +Peroxidase-Avidin (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) IHC → unverdünnt	Ziege-anti-murin IgM- Peroxidase (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D) Dot Blot/ ELISA → 1:2.000 IHC → 1:100

2.7 *In vivo* Biokompatibilitätsprüfung einer Heparin-Beschichtung

Alle Experimente wurden nach dem Leitfaden der Labortierpflege und -verwendung durchgeführt, wie sie vom National Institute of Health herausgegeben wurde (NIH Publ. 85-23, Rev. 1985). Diese Studie wurde von der Ethikkommission der Charité genehmigt.

Porcine Aorta wurde nach einem bestehenden Verfahren dreimal für 16 h in 1 % DOA dezelluliert und anschließend intensiv gewaschen sowie sterilisiert.¹² Die Aorta wurde in 1 cm² große Stücke konfektioniert und die Struktur mittels N-(3-Dimethylaminopropyl)-N⁹-ethylcarbodiimid (EDC; Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D) und N-hydroxysuccinimid (NHS; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D) kreuzvernetzt. Über die EDC-NHS-Kreuzvernetzung wurde Heparin (AppliChem GmbH, Darmstadt, D) kovalent an die EZM gekoppelt und die Wachstumsfaktoren FGF (Fibroblast Growth Factor) und VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) (Biochrom GmbH, Berlin, D) in einer Konzentration von 5 ng/ml über ihre Heparin-Bindedomäne gebunden.¹³ Mit FGF oder VEGF beschichtete Gewebestücke wurden subkutan in 36 Lewis-Ratten (Charles River Laboratories, Sulzfeld, D) implantiert.¹⁴ Nach Einleitung der Anästhesie mit Ursotamin und Rompun wurden die Rücken der Ratten rasiert und desinfiziert. Mit einer Schere wurden subdermale Taschen hergestellt, in welche die Gewebestücke implantiert wurden. Nach 2, 4 und 6 Wochen erfolgten bei jeweils 12 Ratten die Entnahmen und die makroskopischen Begutachtungen der Explantate. Die Gewebestücke wurden molekularbiologisch auf ihren RNA-Gehalt und histologisch mittels HE- (siehe 2.3) sowie CD68-Färbung (Acris Antibodies GmbH, Herford, D) untersucht.

2.8 Statistische Analyse

Die statistische Analyse erfolgte mit Graphpad Prism (Graphpad, La Jolla, USA). Ausreißer wurden mit dem Grubb's Test identifiziert und von der weiteren Auswertung ausgeschlossen. Die Daten wurden anschließend mit dem D'Agostino-Pearson-Test auf Normalverteilung untersucht. Parametrische Datensätze wurden mittels der Varianzanalyse one-way ANOVA und nicht-parametrische Daten mit dem Kruskal-Wallis-Test auf Signifikanz geprüft. Der Vergleich von Gruppen erfolgte mittels two-way ANOVA (Zeilenmittel wurden verglichen). Die Daten sind jeweils als Mittelwerte ± Standardabweichung (SD) dargestellt. Ein p-Wert <0,05 wurde als signifikant (*), <0,01 als hoch signifikant (**) und <0,001 als höchst signifikant (***) angenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Identifizierung eines geeigneten, chemischen Dezellularisierungsverfahrens

In Bezug auf Länge, Wandstärke und Innendurchmesser wurde die BAC als geeignetes Ausgangsmaterial für einen biologischen, peripheren Bypass identifiziert (siehe Abb. 1). Zur Herstellung einer zellfreien Gefäßprothese wurden verschiedene, chemische Dezellularisierungsverfahren angewendet und verglichen. Die Bewertung der Prozesse erfolgte anhand des DNA-, RNA- sowie Protein-Gehalts (zelluläre Rückstände) in den dezellularisierten Proben. Der Gehalt zellulärer Rückstände sollte in dezellularisierten BACs möglichst gering sein.

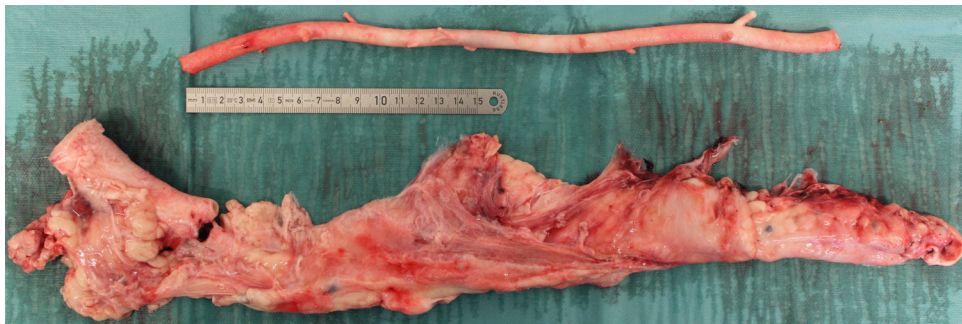


Abb. 1: Bovine *Arteria carotis* nach der Entnahme (unten) und der Feinpräparation (oben)

Zur Dezellularisierung von BACs wurden die Detergenzien DOA, Chaps, SDS und TX100 verwendet, wobei mit DOA (vs. TX100: $p < 0,01$) und Chaps (vs. TX100: $p < 0,001$; vs. SDS: $p < 0,01$) signifikant mehr zelluläre Rückstände aus der EZM entfernt werden konnten, als mit SDS oder TX100. Entsprechend wurde die Dezellularisierung mit den Detergenzien DOA und Chaps weiter optimiert (Daugis 2017, Abb. 1).

Für die Dezellularisierungs- und Waschschriffe im DOA-Prozess wurde ein Tris-Puffer eingesetzt. Im Vergleich zu einem nicht-gepufferten System konnten zellulären Rückstände signifikant reduziert werden ($p < 0,01$) (Daugis 2017, Abb. 2). Hingegen erfolgte die Dezellularisierung mit Chaps in einem Phosphat-gepufferten System. Durch den Zusatz von Natriumchlorid und EDTA zum Dezellularisierungspuffer konnten zelluläre Rückstände effizienter entfernt werden.

Die Dezellularisierung mit DOA und Chaps wurde weiterhin bei Temperaturen zwischen 4 und 50 °C untersucht. Bei höheren Temperaturen konnten signifikant mehr zelluläre Rückstände entfernt werden, als bei Temperaturen von 4 °C ($p < 0,001$) (Daugis 2017, Abb. 3a+b).

Zusätzlich wurde die Dezellularisierung mit DOA und Chaps für 16 h, 40 h oder in einem zweistufigen Prozess für 16 und 22 h (16+22 h) durchgeführt. Durch Verlängerung der Dezellularisierung mit DOA konnten signifikant mehr zelluläre Rückstände aus der EZM entfernt werden

($p < 0,001$). Zwischen dem 40 h und 16+22 h Prozess konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Daug 2017, Abb. 3c+d).

Um die Entfernung zellulärer Rückstände aus der EZM zu verbessern, wurden BACs nach der Detergenzienbehandlung intensiv gewaschen, dabei konnten, durch Verlängerung der Waschschriffe von 1 auf 7 Tage, zelluläre Rückstände in dezellularisierten BACs signifikant reduziert werden ($p < 0,001$) (Daug 2017, Abb. 5).

Weiterhin wurden zur Dezellularisierung von mehreren BACs drei Perfusionskammern in Reihe geschaltet und jede BAC an drei Bereichen auf Positionseffekte untersucht. BACs, die sich während der Dezellularisierung in Kammer eins befanden, enthielten signifikant weniger zelluläre Rückstände, als BACs der zweiten ($p < 0,05$) und dritten Kammer ($p < 0,01$). Für die Dezellularisierung mit DOA und Chaps wurde anschließend ein geschlossener Kreislauf etabliert, wobei die Untersuchung der zellulären Rückstände der drei Positionen keine signifikanten Unterschiede aufwies. Die Dezellularisierung bei verschiedenen Volumenströmen zeigte, dass bei hohen Volumenströmen von 300 l/h signifikant mehr zelluläre Bestandteile aus der EZM entfernt werden als bei 0 l/h ($p < 0,05$) bzw. 4 l/h ($p < 0,01$) (Daug 2017, Abb. 7).

Anhand aller analysierten Prozessparameter wurden die zwei erfolgversprechendsten Dezellularisierungsprozesse zusammengestellt: BACs wurden in 1 % DOA in 0,1 M Tris-HCl Puffer oder in 1 % Chaps in PBS mit 1 M NaCl und 25 mM EDTA für 16+22 h bei 37 °C dezellularisiert. Anschließend wurden die BACs sterilisiert und für 7 Tage in 0,1 M Tris-HCl Puffer oder in 0,9 % NaCl gewaschen. Jede dezellularisierte BAC wurde anschließend auf Zellfreiheit, strukturelle Integrität, mechanische Belastbarkeit, Bio- und Immunkompatibilität untersucht.

3.2 Untersuchung der Zellfreiheit

Der DNA-Gehalt konnte durch die Dezellularisierung mit DOA auf $0,5 \pm 0,1$ % ($p < 0,001$) und mit Chaps auf $0,2 \pm 0,2$ % ($p < 0,001$) im Vergleich zu nativen BACs reduziert werden. Der Gehalt an löslichen Proteinen wurde im DOA-Prozess auf $0,6 \pm 0,2$ % ($p < 0,001$) und im Chaps-Prozess auf $0,6 \pm 0,3$ % ($p < 0,001$) gesenkt. Die Behandlungen mit beiden Detergenzien führte zu einem nicht nachweisbaren RNA-Gehalt ($p < 0,001$).

Neben dem quantitativen Nachweis zellulärer Bestandteile wurden auch histologische Übersichtsfärbungen durchgeführt. BACs die mit Chaps dezellularisiert wurden, wiesen in der HE-Färbung keine nuklearen DNA-Rückstände auf. In DOA-behandelte Proben konnten jedoch noch geringfügig nukleare DNA-Reste nachgewiesen werden.

3.3 Untersuchung der strukturellen Integrität

Die Untersuchung der strukturellen Integrität dezellularisierter BACs erfolgte mittels Movat's Pentachrom-Färbung. Nach der Dezellularisierung konnten keine Veränderungen der Faserstruktur nachgewiesen werden, die Proteoglykane (grün-blau) und Kollagenfasern (gelb) blieben erhalten. Durch die Dezellularisierung wurden jedoch die glattmuskulären Zellen (rot) und die Endothelzellen (violett) aus der EZM entfernt (Daug 2017, Abb. 8).

3.4 Untersuchung der mechanischen Stabilität

Die mechanische Stabilität dezellularisierter BACs wurde durch die Messung der maximalen Zugbelastung bestimmt. Sowohl in axialer als auch radialer Ausrichtung der Gewebe konnten keine signifikanten Änderungen der maximalen Zugbelastung im Vergleich zu nativen BACs nachgewiesen werden. Ebenso konnte keine Veränderung der Wandstärke durch die Dezellularisierung gemessen werden (Daug 2017, Abb. 9).

3.5 Untersuchung der Biokompatibilität

Um verbleibende Prozesssubstanzen sowie die Biokompatibilität dezellularisierter BACs nachzuweisen, wurde die Zytotoxizität dieser bestimmt. Nach Optimierung der Dezellularisierungs- und Waschprozesse wurde die Zytotoxizität von DOA-behandelten BACs auf <4 % gesenkt. Bei Chaps-behandelten BACs konnten keine zytotoxischen Effekte detektiert werden (Daug 2017, Abb. 6).

3.6 Untersuchung der *in vitro* Immunogenität

Bekannte Auslöser der hyperakuten Abstoßungsreaktion sind antigene Oberflächenstrukturen, wie α Gal und MHC-I. Die dezellularisierten BACs wurden im Dot Blot und der IHC auf Rückstände der bekannten Immunogene untersucht, dabei konnte weder α Gal noch MHC-I nachgewiesen werden. In nativen BACs waren jedoch beide Immunogene zu detektieren (Daug 2018, Abb. 1 und 4).

Zur Bewertung des gesamten immunogenen Potenzials dezellularisierter BACs wurde ein neues Nachweissystem basierend auf humanem Serum als Primärantikörper entwickelt, welches sich bei Dot Blot- (Daug 2018, Abb. 1), Western Blot- (Abb. 2), ELISA- (Abb. 6) und IHC-Analysen (Abb. 4) anwenden lässt. Bei allen Analysen wurde das immunogene Potential nativer und dezellularisierter BACs verglichen. Native Proben zeigten in allen Testsystemen das stärkste Signal. BACs, die nach dem optimierten Chaps-Protokoll dezellularisiert wurden, zeigten kein immunogenes Potenzial. Im ELISA wurde gezeigt, dass 99,9 % ($p < 0,01$) der potenziellen Immunogene durch die Dezellularisierung mit Chaps entfernt wurden.

3.7 Untersuchung der Biokompatibilität einer Heparin-Beschichtung *in vivo*

Bei der Dezellularisierung werden alle Zellen, auch die gefäßauskleidenden Endothelzellen, entfernt. Bei Blutkontakt könnte von der azellulären Oberfläche des Gefäßlumens ein Thromboserisiko ausgehen. Durch Beschichtung mit dem blutgerinnungshemmenden Heparin könnte einer eventuellen Thrombogenität der dezellularisierten Gefäße entgegengewirkt werden. Gleichzeitig sollte durch die Beschichtung mit den Wachstumsfaktoren VEGF und FGF2 die Besiedlung mit Endothelzellen des Transplantatempfängers gefördert werden.

In einem subkutanen Rattenmodell wurden dezellularisierte, Heparin-Wachstumsfaktorbeschichtete Arterienfragmente nach einem Implantationszeitraum von 2, 4 und 6 Wochen auf ihre Biokompatibilität und Wiederbesiedlungsfähigkeit untersucht. Als Kontrolle wurden dezellularisierte, unbeschichtete Gefäßstücke mitgeführt. Alle Ratten überlebten die Studienzeiträume ohne Komplikationen. Nach der Explantation der Gefäßstücke konnte makroskopisch bei keinem Implantat inflammatorische Reaktionen detektiert werden.

Zur Quantifizierung der Wiederbesiedlung wurde der RNA-Gehalt in allen Proben bestimmt. Dieser stieg in allen Gewebeproben im Verlauf von 2 auf 4 Wochen, reduzierte sich aber bei 6 Wochen Implantation. In den beschichteten Proben konnte ein signifikant geringerer RNA-Gehalt als in den unbeschichteten Gewebestücken gemessen werden (Lehmann 2017, Abb. 2).

Bei der semi-quantitativen Bewertung HE-gefärbter Gewebeschnitte konnten in beschichteten Proben signifikant weniger Zellen detektiert werden, als in unbeschichteten Geweben. Die Besiedlung beschichteter Gewebe war vorrangig an den Randregionen nachzuweisen, wohingegen bei unbeschichteten Proben auch eine Zellinfiltration in die Gewebematrix gezeigt werden konnte (Lehmann 2017, Abb. 3 und 4).

Die Wiederbesiedlung der Gefäßstücke wurde über IHC-Färbungen differenzierter betrachtet. Durch Färbung des Oberflächenprotein CD68 konnten immunologisch aktive Zellen, wie Makrophagen identifiziert werden. In allen Gruppen nahm über einen Zeitraum von 2 auf 6 Wochen die Anzahl an CD68-positiven Zellen signifikant ab. In unbeschichteten Proben wurden nach 2 Wochen Implantation signifikant mehr CD68-positive Zellen nachgewiesen, als in beschichteten Proben (vs. FGF: $p < 0,05$; vs. VEGF: $p < 0,001$). Nach 4 und 6 Wochen konnten in allen Explantaten etwa gleichviele CD68-positive Zellen nachgewiesen werden (Lehmann 2017, Abb. 5 und 6).

4 Diskussion

Die pAVK ist mit einer Gesamtprävalenz, die im Alter auf ca. 18 % steigt, bereits heute eine der häufigsten Erkrankungen unserer Zeit. Bei einer fortgeschrittenen Stenosierung bzw. Okkludierung der Extremitäten-versorgenden Arterien wird das betroffene Gefäß bevorzugt mit allogenen oder autologen Transplantaten rekonstruiert, welche jedoch in der Verfügbarkeit stark limitiert sind. Alternativ werden daher vielfach alloplastische Gefäßprothesen aus PET oder PTFE implantiert, die allerdings aufgrund von Aneurysmen, intimaler Hyperplasie, Thrombosen, Infektionen und fehlender Endothelialisierung keine zufriedenstellenden Langzeitergebnisse liefern.^{4,15}

Entsprechend sollte eine neuartige, biologische Gefäßprothese entwickelt werden, die zukünftig als peripherer Bypass in der Gefäßchirurgie Anwendung finden kann. Als Ausgangsmaterial sollen BACs verwendet werden, da diese sich in Länge, Durchmesser und Verfügbarkeit eignen. Mittels chemischer Dezellularisierung sollten alle zellulären Bestandteilen und potentielle Immunogene aus der EZM entfernt werden, gleichzeitig darf die strukturelle Integrität sowie die mechanische Belastbarkeit des Gewebes nicht beeinträchtigt werden.

4.1 Bewertung der chemischen Dezellularisierung

Für die chemische Dezellularisierung werden vorrangig Detergenzien verwendet, da diese amphipathische Eigenschaften (hydrophiler Kopf- und hydrophober Schwanzteil) aufweisen. Bei einer Detergens-spezifischen Konzentration können die Detergensmoleküle zu Mizellen aggregieren und sich gleichzeitig in die Phospholipidmembran der Zelle einlagern, um diese zu zerstören. Zur Etablierung eines geeigneten Dezellularisierungsverfahrens für BACs wurden Detergenzien mit Phenyl- (TX100) und Alkyl-Resten (SDS) sowie Detergenzien mit Steroid-Gerüst (DOA und Chaps) auf ihre Dezellularisierungseigenschaften verglichen.

TX100 ist ein weit verbreitetes nichtionisches Tensid und wurde bereits allein und in Kombination zur Dezellularisierung von Geweben und Organen eingesetzt. Fitzpatrick et al. dezellulierten mit 1 % TX100 und 0,02 % EDTA die porcine *Aorta descendens* und berichteten über eine unvollständige Entfernung glattmuskulärer Zellen aus der EZM.¹⁶ In dieser Studie wurden BACs mit 1 % TX100 dezellularisiert, was ebenfalls in einer unvollständigen Dezellularisierung resultierte. TX100 bildet als nichtionisches Detergens mit verzweigten hydrophoben Alkylgruppen große, sphärische Mizellen mit einer Größe von 48 bis 106 kDa. Im Gegensatz dazu bilden DOA und Chaps Mizellen unter 10 kDa.^{17,18} Aufgrund der großen Mizellen von TX100 könnte das Eindringen der Detergens in die Gewebematrix verhindert werden, was zu einer unvollständigen Dezellularisierung der BACs geführt haben könnte.

SDS ist das am häufigsten verwendete Detergens für die Zellyse. Das Detergens ist aber auch dafür bekannt, die meisten Proteine zu denaturieren und kann somit die native Gewebestruktur schädigen.^{17,19,20} Rieder et al. dezellularisierten pulmonale und aortale Gefäßen nur mit 0,1 % SDS und wiesen eine effektive Zellentfernung nach.²¹ In dieser Arbeit wurden BACs ebenfalls mit 0,1 % SDS behandelt, jedoch wurden bei der Dezellularisierung weniger als 50 % der zellulären RNA entfernt. Die Detergenskonzentration von 0,1 % SDS war für die Dezellularisierung von BACs nicht ausreichend.

DOA ist ein Oxidationsprodukt des Cholesterins und wird natürlich in der Gallenblase sekretiert.¹⁷ Es wurde erfolgreich zur Dezellularisierung von leporinen und porcinen Blutgefäßen eingesetzt.^{22,23} Chaps ist ein chemisch synthetisiertes Derivat des DOA. Bei der Synthese wird an die Carbonsäure des DOA ein zwitterionischer Amidosulfonsäureteil amidiert.²⁴ Bisher wurde es ausschließlich zur Dezellularisierung von Lungengeweben von Menschen, Schweinen und Nagetieren verwendet.^{25,26} Mit DOA und Chaps konnten mehr zelluläre Rückstände aus der EZM entfernt werden, als mit SDS und TX100. Entsprechend wurden SDS und TX100 von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen und die Dezellularisierung mit DOA und Chaps optimiert.

Die Dezellularisierung hängt von vielen Faktoren ab. Untersucht wurde die Detergenzkonzentration, die Pufferzusammensetzung, die Temperatur und Inkubationszeit. Bei der Dezellularisierung von BACs wurden Konzentrationen von 1 % DOA bzw. Chaps eingesetzt, da höhere Konzentrationen von >2 % zur Degeneration der Proteinstrukturen führen können.²² Weiterhin bildet DOA bei einem pH <7,8 Riesen-Mizellen und aggregiert bei pH <6,9.¹⁸ Um dies zu verhindern und die Löslichkeit von DOA zu verbessern, wurde das System mit 0,1 M Tris-HCl bei pH 8,3 gepuffert, wodurch die Dezellularisierung im Vergleich zu einem ungepufferten System signifikant verbessert werden konnte. Die Dezellularisierung mit Chaps wurde in einer phosphatgepufferten Lösung bei pH 7,4 mit bis zu 1 M NaCl allein und in Kombination mit EDTA bis 50 mM getestet, wobei die Kombination von 1 M NaCl und 25 mM EDTA die besten Dezellularisierungsergebnisse erbrachte. Andere Arbeitsgruppen zeigten bei der Dezellularisierung von Lungengewebe, dass durch Erhöhung der Ionenstärke mit NaCl die Löslichkeit verbessert werden konnte.^{19,26} Zusätzlich wurde EDTA als Stabilisator und Protease-Inhibitor hinzugefügt.¹⁸

Weiterhin konnte durch Temperaturerhöhung auf 37 °C und 50 °C die Dezellularisierung mit DOA und Chaps signifikant verbessert werden. Da die Größe und Form der Mizellen temperaturabhängig ist, wurden mehr Mizellen bei gleicher Konzentration gebildet, was die Zellyse verbessert.¹⁸ Jedoch können Temperaturen über 50 °C zur Denaturierung, Dehydrierung und

Schrumpfung der Kollagenfasern führen.²⁷ Bereits die Erwärmung des bovinen Kollagen I auf über 65 °C beeinträchtigte dessen mechanische Festigkeit stark,²⁸ weshalb alle weiteren Dezellularisierungsschritte bei 37 °C durchgeführt wurden.

Darüber hinaus war die 16-stündige Dezellularisierung mit DOA und Chaps für BACs nicht ausreichend, um alle zellulären Rückstände aus der EZM zu entfernen. Mit einem längeren, mehrstufigen Verfahren (16+22 h) konnten zelluläre Rückstände in der Gewebematrix deutlich reduziert werden. Allerdings können die Detergenzien deshalb tiefer in die Matrix eindringen, sodass eine Verlängerung des Waschprozesses notwendig wurde. Ein siebentägiger Waschprozess konnte sowohl die Zytotoxizität behandelte Gewebe, als auch zelluläre Rückstände signifikant reduzieren.

Da die Dezellularisierung 30 bis 40 cm langer BACs unter Strömung in einer Perfusionskammer erfolgte, wurden zusätzlich der Einfluss der Kammerschaltung und des Volumenstroms auf die Dezellularisierung untersucht. Bei drei in Reihe geschalteten Kammern wurde aufgrund von Positionseffekten in BACs ein geschlossener Perfusionskreislauf mit einer Kammer gewählt, um die gleichmäßige Dezellularisierung einer BAC gewährleisten zu können. Weiterhin verbesserte die Erhöhung des Volumenstroms auf bis zu 300 l/h die Entfernung zellulärer Rückstände. Dabei korreliert der Volumenstrom von 300 l/h mit dem physiologischen Blutfluss in den menschlichen Halsschlagadern.²⁹ Eine erhöhte Flussrate beeinflusst den Strömungswiderstand, den Druck und den Stofftransport vom Lumen in das Gefäß³⁰ und konnte die Dezellularisierung verbessern.

Alle optimierten Parameter zur Dezellularisierung mit DOA und Chaps wurden kombiniert, wodurch mehr als 99 % der zellulären Rückstände entfernt werden konnten. Jedoch wurden bei der HE-Färbung DOA-dezellularisierter BACs geringfügig DNA-Rückstände nachgewiesen. Hohe DOA-Konzentrationen könnten die Nukleosomen destabilisiert und die gepackte DNA geschädigt haben.³¹ Hingegen wirkt Chaps stabilisierend auf die Nukleosomen³² und die hochkompakte DNA wurde leichter aus der EZM gewaschen. Alternativ kann zur Entfernung von DNA-Rückständen auch ein enzymatischer Verdau mit Endonukleasen als Prozessschritt eingeführt werden. Böer et al. behandelten eine equine *A. carotis* für 4 h mit 75 U/ml Endonuklease und wiesen mit 0,9 % bis 2,2 % mehr Rest-DNA nach,⁶ als in dezellularisierten BACs.

Ferner wurde die mechanische Stabilität und die strukturelle Integrität dezellularisierter BACs analysiert. Nach der Dezellularisierung mit DOA und Chaps konnte keine Veränderung der Wandstärke und somit weder ein Schwellen noch ein Schrumpfen des Gewebes im Vergleich zu nativen BACs festgestellt werden. Ebenfalls konnte keine Reduktion der maximalen Zugbelastung in axialer und radialer Ausrichtung im Vergleich zu nativen BACs nachgewiesen werden.

Hingegen zeigten Böer et al., dass die Wanddicke nach der Dezellularisierung mit SDS und DOA um mehr als 10 % reduziert wurde. Gleichzeitig rissen dezellularisierte Gewebe bereits bei einer ca. 50 % geringeren Zugbelastung als native Gewebe.⁶ Eine zu intensive Dezellularisierung kann das extrazelluläre Fasernetzwerk irreversibel schädigen und somit die biomechanischen Eigenschaften des Gewebes verändern.³³ Mittels Pentachrom-Färbung konnte der Erhalt der Matrix-Proteine Kollagen (gelb) und Elastin (rot) gezeigt werden. Weiterhin befinden sich in der Gefäßmedia viele spindelförmige, glattmuskuläre Zellen. Diese sind reich an filamentösem F-Actin, welches ebenfalls rot gefärbt wird und auch nach der Dezellularisierung aufgrund seiner netzartigen Struktur in der EZM verbleibt. Das Strukturprotein Actin ist evolutionär hochkonserviert,³⁴ entsprechend kann von einem geringen immunogenen Potenzial ausgegangen werden.

Ebenso unerlässlich ist die Entfernung von zytotoxischen Prozesssubstanzen nach der Dezellularisierung, um die Biokompatibilität dezellularisierter BACs sicherzustellen. Durch Verlängerung der Waschschriffe nach der Dezellularisierung mit DOA und Chaps konnten alle zytotoxischen Prozessrückstände aus der Gewebematrix erfolgreich entfernt werden. Dies ist grundlegend für die zukünftige Wiederbesiedlung *in vitro* und *in vivo*.

Insgesamt erzielten die beiden, optimierten Dezellularisierungsverfahren hinsichtlich der Zellfreiheit, der strukturellen Integrität sowie der Biokompatibilität vergleichbare Ergebnisse. Allerdings wurden bei DOA-dezellularisierten BACs geringfügig mehr zelluläre Rückstände und eine etwas höherer Zytotoxizität als bei Chaps-behandelten BACs detektiert. Aufgrund dessen wurde sich bei der Analyse der Immunogenität dezellularisierter BACs auf den Chaps-Prozess konzentriert.

4.2 Bewertung der Immunogenität dezellularisierter BACs

Die Haupteinschränkung für die Verwendung von Xenografts ist die immunologische Abstoßungsreaktion des Empfängers auf das Spendermaterial.⁶ Durch die vollständige Entfernung aller zellulären Komponenten aus der xenogenen Matrix soll die Aktivierung der Immunantwort verhindert werden. Entsprechend wurde überprüft, ob die zellfreien, Chaps-behandelten BACs ein immunogenes Potenzial aufweisen.

Der Nachweis der Immunogenität von Xenografts erfolgt standardmäßig über ein α Gal- oder MHC-I-Detektionsverfahren, denn diese bekannten Immunogene sollen hauptsächlich für die Serumantikörper-vermittelte, hyperakute Transplantatabstoßung verantwortlich sein.^{8,35,36} In Dot Blot- und IHC-Analysen wurden in nativen BACs α Gal und MHC-I identifiziert, hingegen waren diese in dezellularisierten BACs nicht mehr nachweisbar. Jedoch wurden bei *in vivo* Studien

Organe von α Gal-Knockout-Schweinen in Affen transplantiert, trotz der Entfernung des α Gal-Epitops wurden akute und chronische Abstoßungsreaktionen nachgewiesen, was auf das Vorhandensein von unbekanntem nicht- α Gal-Xenoantigenen hinweist.³⁷ Entsprechend sollten nicht einzelne Moleküle zur Begutachtung des immunogenen Potenzials xenogener Gewebe berücksichtigt werden, sondern möglichst die Gesamtheit aller Xenoantigene.

Entsprechend wurde ein neuartiges, Humanserum-basierendes Detektionssystem etabliert, welches die Bewertung des immunogenen Potenzials von xenogenen Geweben erlaubt. Die im Humanserum zirkulierenden, polyklonalen anti- α Gal IgM- und IgA-Antikörper, anti-MHC-I IgG-Antikörper sowie Antikörper gegen unbekannte Immunogene vermitteln die hyperakuten Transplantatabstoßung.^{7,35,38} Diese Antikörper des Humanserums dienen in diesem Detektionssystem als Primärantikörper, deren Nachweis anschließend mittels Peroxidase-markierter, polyvalenter Ig(A, M, G)-Antikörper erfolgt.

Mit dieser Methode wurde das immunogene Potenzial nativer und dezellularisierter BACs im Dot Blot, Western Blot, ELISA und in der IHC verglichen. In allen Analysen konnte in nativen Proben, welche die meisten Immunogene enthalten, das stärkste Signal detektiert werden. Chaps-dezellularisierte BACs (16+22 h) wiesen hingegen kein immunogenes Potenzial auf. Im semi-quantitativen ELISA wurde gezeigt, dass 99,9 % der potenziellen Immunogene durch die Dezellularisierung eliminiert wurden, was auf eine vollständige Entfernung aller zellulären Rückstände hindeutet.

Diese Methode ermöglicht den Vergleich und die Bewertung verschiedener xenogener Proteine und Gewebe unterschiedlicher Herkunft hinsichtlich ihrer Immunverträglichkeit. Allerdings lässt dieser Nachweis nur Rückschlüsse auf die hyperakute Abstoßungsreaktion zu. Die akute und chronische Abstoßung kann nicht betrachtet werden, denn diese treten erst Wochen nach der Transplantation auf, wenn Antidonor-Antikörper produziert werden³⁵ und kann nur in Tiermodellen untersucht werden. Entsprechend analysierten Helder et al. die akute Immunantwort auf nicht- α Gal-Antigene durch Messung der Antidonor-Antikörper im Empfänger.³⁹ Böer et al. immunisierten Mäusen mit löslichen Matrix-Komponenten und untersuchten die Bildung spezifischer Serum-Antikörper.¹⁵

Zudem ist unklar, ob allein die zellulären Komponenten des Gewebes für die Immunreaktion im Empfänger verantwortlich sind. Bisher wurde die EZM nicht vollständig charakterisiert, aber Biomoleküle wie z.B. das evolutionär hoch konservierte Kollagen, Elastin und Laminin wurden erfolgreich isoliert und identifiziert. Bisher konnte die Immunogenität dieser Matrixproteine nicht nachgewiesen werden,^{36,40} was auch in dieser Studie mittels IHC bestätigt werden konnte.

4.3 Bewertung der Biokompatibilität einer Heparin-Beschichtung

Durch die Entfernung der gefäßauskleidenden Endothelzellen bei der Dezellularisierung kann bei Blutkontakt von dem azellulären Gefäßlumen ein erhöhtes Thromboserisiko ausgehen.⁹ Da die Besiedlung mit patienteneigenen Endothelzellen sehr aufwendig ist, wurden alternative Methoden etabliert, welche die Thrombozytenaktivierung sowie -aggregation verhindern sollen. Die Gewährleistung des Blutflusses kann u.a. medikamentös durch die perioperative Applizierung von ASS oder Clopidogrel erfolgen, aber auch durch Beschichtung der intimalen Oberfläche mit Prostaglandinen (vor allem Prostazyklin), mit Stickstoffmonoxid-Molekülen oder mit Heparin.⁴¹

Conklin et al. beschreiben, dass über eine EDC-NHS-Kreuzvernetzung Heparin kovalent an eine dezellularisierte Gefäßmatrix gebunden und die Thrombogenität dieser reduziert werden kann.⁴² Zusätzlich können zur Verbesserung der Endothelzellproliferation *in vivo* die Wachstumsfaktoren VEGF und FGF2 über ihre Heparin-Bindedomäne an die Gewebematrix koppelt werden.^{43,44} In dieser Arbeit wurden dezellularisierte, arteriellen Gefäßfragmenten mit Heparin-VEGF und Heparin-FGF2 beschichtet und in einem subkutanen Rattenmodell für 2, 4 und 6 Wochen auf ihre Biokompatibilität und Wiederbesiedlungsfähigkeit untersucht. Als Kontrollgruppe wurden unbeschichtete Gewebefragmente mitgeführt.

Mittels RNA-Analytik und HE-Färbung konnten in beschichteten Gewebeproben signifikant weniger Zellen detektiert werden, als in Unbeschichteten. Die Besiedlung Heparin-VEGF- und -FGF2-beschichteter Gewebe war vorrangig an den Randregionen der Explantate nachzuweisen, wohingegen bei unbeschichteten Proben eine bessere Zellinfiltration in die Gewebematrix gezeigt werden konnte. Die Immobilisierung des Heparins an die EZM erfolgt über die Kreuzvernetzung mit EDC und NHS. Dabei werden die Carboxylgruppen des Heparins aktiviert, welche kovalent an die Aminogruppen der Kollagen- und Elastinstruktur gebunden werden. Durch Kreuzvernetzung der EZM kann die Zellinfiltration durch die strukturelle Veränderung des Gewebes negativ beeinflusst worden sein. Sionkowska et al. analysierten atomkraftmikroskopisch kreuzvernetzte und unvernetzte Kollagenstrukturen und zeigten, dass die Rauheit der Kollagenstruktur durch eine EDC-NHS-Fixierung reduziert wurde.⁴⁵ Gleichzeitig wird aber, wie Everaerts et al. beschreiben, die Kollagenstruktur stabilisiert, was zu einer erhöhten Steifigkeit des Gewebes führt.⁴⁶ Trotz einer verminderten Wiederbesiedlung konnten die nicht-zytotoxischen Eigenschaften der EDC-NHS-Beschichtung im subkutanen Rattenmodell bestätigt werden.⁴⁴ Insgesamt ergeben sich daraus aber keine Vorteile der Beschichtung im Vergleich zu unbeschichteten Gefäßfragmenten.

Mittels der IHC-Färbung auf das Oberflächenprotein CD68 zur Färbung von Monozyten und Makrophagen wurde in allen Gruppen über den Zeitverlauf von 2 auf 6 Wochen eine signifikante Reduktion dieser Zellen nachgewiesen. Nach 2 Wochen Implantation wurden in unbeschichteten Proben signifikant mehr CD68-positive Zellen detektiert, als in beschichteten Proben. Nach 4 und 6 Wochen glichen sich die Werte aller Gruppen an. Die erhöhte Makrophagen-Infiltration in unbeschichteten Geweben nach 2 Wochen kann gleichzeitig auf entzündungsfördernde- sowie entzündungshemmende Prozesse hindeuten, da Makrophagen in den Phänotypen M1 und M2 vorkommen und unterschiedliche Prozesse auslösen: M1-Makrophagen vermitteln die inflammatorischen Reaktionen, die auch zur Transplantatabstoßung führen können. Hingegen fördern die M2-Makrophagen die Immunregulation, die Gewebereparatur und den konstruktiven Gewebeumbau.⁴⁷ Allerdings konnten zu keinem Untersuchungszeitpunkt makroskopische Anzeichen für Entzündungsreaktionen nachgewiesen werden. Um die Zellen eindeutig charakterisieren zu können, sollte in weiterführenden Untersuchungen zusätzlich zur Identifizierung von M1-Makrophagen eine CD80- und von M2-Makrophagen eine CD163-Färbung durchgeführt werden.⁴⁷ Weiterhin könnte die verminderte Makrophageninfiltration bei beschichteten Explantaten auch auf die Kreuzvernetzung der Gewebe zurückzuführen sein. Damit könnte die Beschichtung eventuelle Immunreaktionen senken, aber auch die Wiederbesiedlung und den strukturellen Umbau des Gewebes verzögern oder sogar verhindern. Makrophagen konnten auch noch nach 4 und 6 Wochen in allen Gruppen nachgewiesen werden.

Insgesamt blieb die Biokompatibilität durch Beschichtung der Gefäßprothesen erhalten. Die Wiederbesiedlungsfähigkeit wurde allerdings durch die Beschichtung reduziert. Jedoch muss berücksichtigt werden, dass die Gefäßfragmente nicht unter den mechanischen und physiologischen Bedingungen des Blutkreislaufs getestet wurden. Im subkutanen Rattenmodell kann somit nicht der Einfluss der Beschichtung auf die Thrombogenität sowie der Einfluss der Wachstumsfaktoren VEGF und FGF2 auf die Endothelzellproliferation untersucht werden. Um diese zu realisieren, sollten beschichtete und unbeschichtete, dezellularisierte Gefäßprothesen unter physiologischen Bedingungen getestet werden.

4.4 Ausblick

Aufgrund der steigenden Prävalenz von arteriellen Gefäßerkrankungen, wie der pAVK, nimmt der Bedarf an Gefäßprothesen stetig zu. Dies macht die Entwicklung neuartiger, biologischer Gefäßprothesen erforderlich, da die Verfügbarkeit von allogenen und autologen Transplantaten stark limitiert ist und alloplastische Prothesen aus PET oder PTFE keine zufriedenstellenden Langzeitergebnisse liefern.^{4,15}

In dieser Arbeit wurde eine dezellularisierte Gefäßprothese aus BAC entwickelt, die biokompatibel (nicht-toxisch, nicht-immunogen) und mechanisch (zugfest) belastbar ist. In weiterführenden Untersuchungen sollte die Prothese auf ihre Dauer-, Druck-, Knick-, und Nahtbelastungsfähigkeit in Vergleich zu nativen Gefäßen überprüft werden. Zur Analyse der Thrombogenität beschichteter und unbeschichteter Gefäßprothesen sollte ein akutes Tiermodell durchgeführt werden, bei dem die dezellularisierten BACs im Blutstrom implantiert werden. Nachdem sichergestellt ist, dass die Prothese alle genannten Anforderungen erfüllt, sollte die dezellularisierte BAC im chronischen Tiermodell getestet werden, damit zukünftig eine sichere und wirksame Gefäßprothese im Menschen Anwendung finden kann.

5 Literaturverzeichnis

1. **Siewert JR**, Brauer RB. *Basiswissen Chirurgie*. Heidelberg: Springer Medizin Verlag, **2010**; 2:195-219.
2. **Debus ES**, Gross-Fengels W. *Operative und interventionelle Gefäßmedizin*. In: Amann-Vesti B, Bernhardt A, Debus ES, Hillebrand M, Jahnke T, von Kodolitsch Y, Kölbel T, Kuhlencordt, Larena-Avellaneda A, Müller JG, Rybczynski M, Sheikhzadeh S, Wenk H. *Pathogenese und klinische Grundlagen*. In: Riepe G. *Alloplastische Materialien*. Heidelberg: Springer Medizin Verlag, **2012**; 1:97-184, 283-290.
3. **Menu P**, Stoltz JF, Kerdjoudj H. *Progress in vascular graft substitute*. Clin Hemorheol Microcirc, **2013**; 53:117-29.
4. **Catto V**, Farè S, Freddi G, Tanzi MC. *Vascular Tissue Engineering: Recent Advances in Small Diameter Blood Vessel Regeneration*. ISRN Vasc Med, **2014**; 2014:1-27.
5. **Pashneh-Tala S**, MacNeil S, Claeysens F. *The Tissue-Engineered Vascular Graft - Past, Present, and Future*. Tissue Eng Part B, **2016**; 22:68-100.
6. **Böer U**, Hurtado-Aguilar LG, Klingenberg M, Lau S, Jockenhoevel S, Haverich A, Wilhelmi M. *Effect of Intensified Decellularization of Equine Carotid Arteries on Scaffold Biomechanics and Cytotoxicity*. Ann Biomed Eng, **2015**; 43:2630-41.
7. **Galili U**. *The alpha-gal epitope and the anti-Gal antibody in xenotransplantation and in cancer immunotherapy*. Immunol Cell Biol, **2005**; 83:674-86.
8. **Li S**, Waer M, Billiau AD. *Xenotransplantation: role of natural immunity*. Transpl Immunol, **2009**; 21:70-4.
9. **Zhou M**, Liu Z, Liu C, Jiang X, Wei Z, Qiao W, Ran F, Wang W, Qiao T, Liu C. *Tissue engineering of small-diameter vascular grafts by endothelial progenitor cells seeding heparin-coated decellularized scaffolds*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, **2012**; 100:111-20.
10. **Mulisch M**, Welsch U. *Romeis – Mikroskopische Technik*. Heidelberg: Springer Spektrum Verlag, **2010**; 19: 201-2.
11. **Torzewski M**. *Die Movat-Pentachromfärbung - eine farbenprächtige Darstellung verschiedener zellulärer und extrazellulärer Gewebekomponenten*. Mikroskopie, **2015**; 2:204-8.
12. **Bloch O**, Erdbrügger W, Völker W, Schenk A, Posner S, Konertz W, Dohmen P. *Extracellular matrix in deoxycholic acid decellularized aortic heart valves*. Med Sci Monit, **2012**; 18:487-92.

13. **Zhou** M, Liu Z, Wei Z, Liu C, Qiao T, Ran F, Bai Y, Jiang X, Ding Y. *Development and validation of small-diameter vascular tissue from a decellularized scaffold coated with heparin and vascular endothelial growth factor*. *Artif Organs*, **2009**; 33:230-9.
14. **Mako** WJ, Shah A, Vesely I. *Mineralization of glutaraldehyde-fixed porcine aortic valve cusps in the subcutaneous rat model: analysis of variations in implant site and cuspal quadrants*. *J Biomed Mater Res*, **1999**; 45:209-13.
15. **Böer** U, Lohrenz A, Klingenberg M, Pich A, Haverich A, Wilhelmi M. *The effect of detergent-based decellularization procedures on cellular proteins and immunogenicity in equine carotid artery grafts*. *Biomaterials*, **2011**; 32:9730-7.
16. **Fitzpatrick** JC, Clark PM, Capaldi FM. *Effect of decellularization protocol on the mechanical behavior of porcine descending aorta*. *Int J Biomater*, **2010**; 2010:1-11.
17. **Orwick-Rydmark** M, Arnold T, Linke D. *The Use of Detergents to Purify Membrane Proteins*. *Curr Protoc Protein Sci*, **2016**; 84:4.8.1-4.8.35.
18. **Rehm** H, Letzel T. *Der Experimentator – Proteinchemie/ Proteomics*. Heidelberg: Springer-Spektrum Verlag, **2010**; 6: 111-25.
19. **Faulk** DM, Carruthers CA, Warner HJ, Kramer CR, Reing JE, Zhang L, D'Amore A, Badylak SF. *The effect of detergents on the basement membrane complex of a biologic scaffold material*. *Acta Biomater*, **2014**; 10:183-93.
20. **Gilbert** TW, Sellaro TL, Badylak SF. *Decellularization of tissues and organs*. *Biomaterials*, **2006**; 27:3675-83.
21. **Rieder** E, Kasimir MT, Silberhumer G, Seebacher G, Wolner E, Simon P, 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*. *J Thorac Cardiovasc Surg*, **2004**; 127:399-405.
22. **Bertanha** M, Moroz A, Jaldin RG, Silva RA, Rinaldi JC, Golim MA, Felisbino SL, Domingues MA, Sobreira ML, Reis PP, Deffune E. *Morphofunctional characterization of decellularized vena cava as tissue engineering scaffolds*. *Exp Cell Res*, **2014**; 326:103-11.
23. **Konertz** W, Dohmen PM, Liu J, Beholz S, Dushe S, Posner S, Lembcke A, Erdbrügger W. *Hemodynamic characteristics of the Matrix P decellularized xenograft for pulmonary valve replacement during the Ross operation*. *J Heart Valve Dis*, **2005**; 14:78-81.
24. **Hjelmeland** LM. *A nondenaturing zwitterionic detergent for membrane biochemistry: Design and synthesis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1980**; 77:6368-70.
25. **Petersen** TH, Calle EA, Colehour MB, Niklason LE. *Matrix composition and mechanics of decellularized lung scaffolds*. *Cells Tissues Organs*, **2012**; 195:222-31.

26. **Wallis** JM, Borg ZD, Daly AB, Deng B, Ballif BA, Allen GB, Jaworski DM, Weiss DJ. *Comparative assessment of detergent-based protocols for mouse lung de-cellularization and re-cellularization*. Tissue Eng Part C, **2012**; 18:420-32.
27. **Rossmann** C, Garrett-Mayer E, Rattay, Haemmerich D. *Dynamics of tissue shrinkage during ablative temperature exposures*. Physiol Meas, **2015**; 35:55-67.
28. **Bailey** AJ, Sims TJ. *Meat Tenderness: Distribution of Molecular Species of Collagen in Bovine Muscle*. J Sci Fd Agric, **1977**; 28:565-70.
29. **Urbanski** PP, Lenos A, Lindemann Y, Zacher M, Frank S, Diegeler A. *Use of a carotid artery for arterial cannulation: side-related differences*. Thorac Cardiovasc Surg Rep, **2010**; 58:276-9.
30. **Li** Z, Tan FP, Soloperto G, Wood NB, Xu XY, Gillard. *Flow pattern analysis in a highly stenotic patient-specific carotid bifurcation model using a turbulence model*. Comput Methods Biomech Biomed Eng, **2015**; 18:1099-107.
31. **Glinghammar** B, Inoue H, Rafter JJ. *Deoxycholic acid causes DNA damage in colonic cells with subsequent induction of caspases, COX-2 promoter activity and the transcription factors NF-kB and AP-1*. Carcinogenesis, **2002**; 23:839-45.
32. **Menshikova** I, Menshikov E, Filenko N, Lyubchenko YL. *Nucleosomes structure and dynamics: effect of CHAPS*. Int J Biochem Mol Biol, **2011**; 2:129-37.
33. **Cissell** DD, Hu JC, Griffiths LG, Athanasiou KA. *Antigen removal for the production of biomechanically functional, xenogeneic tissue grafts*. J Biomech, **2014**; 47:1987-96.
34. **Dominguez** R, Holmes KC. *Actin structure and function*. Annu Rev Biophys, **2011**; 40:169-86.
35. **Edinur** HA, Manaf SM, Che Mat NF. *Genetic barriers in transplantation medicine*. World J Transplant, **2016**; 6:532-41.
36. **Badylak** SF. *The extracellular matrix as a biologic scaffold material*. Biomaterials, **2007**; 28:3587-93.
37. **Galili** U. *Induced anti-non gal antibodies in human xenograft recipients*. Transplantation, **2012**; 93:11-6.
38. **Taylor** CJ, Tang KG, Smith SI, White DJ, Davies HF. *HLA-specific antibodies in highly sensitized patients can cause a positive crossmatch against pig lymphocytes*. Transplantation, **1998**; 65:1634-41.
39. **Helder** MRK, Stoyles NJ, Tefft BJ, Hennessy RS, Hennessy RRC, Dyer R, Witt T, Simari RD, Lerman A. *Xenoantigenicity of porcine decellularized valves*. J Cardiothorac Surg, **2017**; 12:1-9.

40. **Hynes RO**. *The evolution of metazoan extracellular matrix*. J Cell Biol, **2012**; 196:671-9.
41. **Scharn DM**, Daamen WF, van Kuppevelt TH, van der Vliet JA. *Biological mechanisms influencing prosthetic bypass graft patency: possible targets for modern graft design*. Eur J Vasc Endovasc Surg, **2012**; 43:66-72.
42. **Conklin BS**, Richter ER, Kreutziger KL, Zhong D, Chen C. *Development and evaluation of a novel decellularized vascular xenograft*. Med Eng Phys, **2002**; 24:173-83.
43. **Neufeld G**, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. *Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors*. FASEB J, **1999**; 13:9-22.
44. **Conklin BS**, Huakang W, Lin PH, Lumsden AB, Chen C. *Basic Fibroblast Growth Factor Coating and Endothelial Cell Seeding of a Decellularized Heparin-coated Vascular Graft*. Artif Organs, **2004**; 28:668-75.
45. **Sionkowska A**, Skopinska-Wisniewska J, Gawron M, Kozłowska J, Planecka A. *Chemical and thermal cross-linking of collagen and elastin hydrolysates*. Int J Biol Macromol, **2010**; 47:570-7.
46. **Everaerts F**, Torrianni M, Hendriks M, Feijen J. *Biomechanical properties of carbodiimide crosslinked collagen: influence of the formation of ester crosslinks*. J Biomed Mater Res A, **2008**; 85:547-55.
47. **Badylak SF**, Gilbert TW. *Immune response to biologic scaffold materials*. Semin Immunol, **2008**; 20:109-16.

6 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Aila Daus, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Herstellung eines biologischen Bypasses zum Einsatz in der peripheren Gefäßchirurgie“ 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) 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

Unterschrift

7 Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen

Aila Daus hat folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

Daus, A., Hutzler, B., Meinke, M., Schmitz, C., Lehmann, N., Markhoff, A., Bloch, O. **Detergent-based decellularization of bovine carotid arteries for vascular tissue engineering.** Annals of Biomedical Engineering, 2017. (Impact Factor: 3,221)

Anteil an der Publikation: 80 %

Beitrag im Einzelnen:

Eigenständige Planung der Versuche inklusive Literaturrecherche, Betreuung von Studenten, Vorbereitung und Durchführung der Versuche, selbstständige Durchführung der Datenanalyse und statistischen Auswertung, eigenständige strukturelle sowie inhaltliche Planung und die Erstellung des Papers.

Publikation 2:

Daus, A.*, Lehmann, N.*, Eroglu, D., Meinke, M., Markhoff, A., Bloch, O. ***In vitro* detection system to evaluate the immunogenic potential of xenografts.** Tissue Engineering: Part C, 2018. (Impact Factor: 3,485)

*geteilte Erstautorenschaft

Anteil an der Publikation: 60 %

Beitrag im Einzelnen:

Eigenständige Planung der Versuche inklusive Literaturrecherche, Betreuung von Studenten, Vorbereitung und Durchführung der Versuche, selbstständige Durchführung der Datenanalyse und statistischen Auswertung, eigenständige strukturelle sowie inhaltliche Planung und die Erstellung des Papers.

Publikation 3:

Lehmann, N.* , Christ, T.* , Daug, A., Bloch, O., Holinski, S. **EDC cross-linking of decellularized tissue: A promising approach?** Tissue Engineering: Part A, 2017. (Impact Factor: 3,485)

*geteilte Erstautorenschaft

Anteil an der Publikation: 30 %

Beitrag im Einzelnen:

Gemeinschaftliche Planung der Versuche, Durchführung der Literaturrecherche, Betreuung von Studenten, Vorbereitung und Durchführung der Versuche, Mitwirkung bei der Datenanalyse und statistischen Auswertung, Korrektur des Manuskripts.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

8 Publikationen

Annals of Biomedical Engineering, 2017:

Detergent-based decellularization of bovine carotid arteries for vascular tissue engineering

Daug, A., Hutzler, B., Meinke, M., Schmitz, C., Lehmann, N., Markhoff, A., Bloch, O.

<https://doi.org/10.1007/s10439-017-1892-7>

Tissue Engineering: Part C, 2018:

***In vitro* detection system to evaluate the immunogenic potential of xenografts**

Daug, A.*, Lehmann, N.*, Eroglu, D., Meinke, M., Markhoff, A., Bloch, O.

<https://doi.org/10.1089/ten.tec.2017.0532>

Tissue Engineering: Part A, 2017:

EDC cross-linking of decellularized tissue: A promising approach?

Lehmann, N.*, Christ, T.*, Daus, A., Bloch, O., Holinski, S.

<https://doi.org/10.1089/ten.tea.2016.0416>

9 Lebenslauf

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

10 Publikationsliste

Artikel: Dausgs, A., Hutzler, B., Meinke, M., Schmitz, C., Lehmann, N., Markhoff, A., and Bloch, O. **Detergent-Based Decellularization of Bovine Carotid Arteries for Vascular Tissue Engineering.** *Annals of Biomedical Engineering*, 45(11)2683, 2017.

Dausgs, A.*, Lehmann, N.*, Eroglu, D., Meinke, M., Markhoff, A., and Bloch, O. **In vitro detection system to evaluate the immunogenic potential of xenografts.** *Tissue Engineering: Part C*, 24(5)1, 2018.

Lehmann, N.*, Christ, T.*, Dausgs, A., Bloch, O., and Holinski, S. **EDC Cross-linking of Decellularized Tissue: A Promising Approach?** *Tissue Engineering: Part A*, 23(13+14)675, 2017.*

Koban, R., Neumann, M., Dausgs, A., Bloch, O., Nitsche, A., Langhammer, S., Ellerbrok, H. **A novel three-dimensional cell culture method enhances antiviral drug screening in primary human cells.** *Antiviral Research*, 150(2018)20, 2018.

Poster: Bourquain, D., Dausgs, A., and Nitsche, A. **Partners of poxviral host-range factors via yeast 2-hybrid screening.** *Robert Koch Institut*, 2010.

*geteilte Erstautorenschaft

11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Zuallererst möchte ich mich bei Herrn Stefan Seidl sowie Frau Prof. Dr. Martina Meinke bedanken, die diese Dissertation ermöglicht und mich stets unterstützt haben.

Weiterhin möchte ich Herrn Dr. Oliver Bloch für die fachliche Begleitung meiner Arbeit, für die anregenden Diskussionen und die konstruktiven Gespräche danken sowie Herrn Dr. Steffen Posner für die Bereitstellung des Themas und sein stets offenes Ohr.

Ebenfalls möchte ich mich bei meinen Kolleginnen Annina Markhoff, Nadine Lehmann, Beate Hutzler, Maja Kühne, Hatice Kilinc, Dilem Eroglu, My Linh Nguyen, Jacqueline Sonnenberger und Elena Lochau bedanken, für ihre Unterstützung, ihren Rat sowie ein tolles und motivierendes Arbeitsklima. Ein besseres Team kann ich mir nicht wünschen.

Ein besonderer Dank gilt meinem Ehemann für seine Liebe, seinen Beistand, seine unermüdliche Geduld und seine beruhigende Art, besonders während der schwierigen Phasen dieser Arbeit. Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern für ihre Unterstützung während meiner Dissertation und meines gesamten Studiums bedanken.