

Aus der Klinik für Herz- und Gefäßchirurgie
(Direktor: Prof. Dr. med. J. Cremer)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Dezellularisierung und Besiedlung porciner Pulmonalklappensegel mit ovinen
mesenchymalen Stammzellen
-vorbereitende Forschung für die Erprobung des kardialen Tissue-
Engineerings am Großtiermodell Schaf-**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Miriam Hansen
aus Lüneburg

Kiel 2021

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Georg Lutter, Klinik für Herz- und Gefäßchirurgie
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Markus Steinfath, Klinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin

Tag der mündlichen Prüfung: 16.08.2022

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 02.05.2022

gez.: Prof. Dr. med. Assad Haneya

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	III
ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	IV
1 EINLEITUNG	1
1.1 DIE ANATOMIE UND PHYSIOLOGIE DES HERZENS.....	1
1.2 HERZKLAPPENERKRANKUNGEN	2
1.2.1 ÄTIOLOGIE UND EPIDEMIOLOGIE.....	2
1.2.2 THERAPIEMÖGLICHKEITEN	4
1.3 TISSUE ENGINEERING.....	6
1.3.1 GRUNDGERÜST	7
1.3.2 DEZELLULARISIERUNGSMETHODEN	8
1.3.3 BESIEDLUNG.....	9
1.4 TIERMODELL SCHAF.....	11
1.5 ZIELE DES FORSCHUNGSVORHABENS	11
2 METHODEN UND MATERIAL.....	12
2.1 METHODEN	12
2.1.1 ZELLKULTUR	12
2.1.2 GEWINNUNG UND KULTIVIERUNG OVINER MSCs	12
2.1.2.1 Lösen der ovinen MSCs.....	13
2.1.2.2 Passagieren der ovinen MSCs	13
2.1.2.3 Einfrieren der ovinen MSCs	13
2.1.2.4 Auftauen der ovinen MSCs	14
2.1.3 PRÄPARATION DER SEGEL EINER PORCINEN PULMONALKLAPPE	14
2.1.4 DEZELLULARISIERUNG.....	15
2.1.5 STATISCHE BESIEDLUNG	16
2.1.6 TOXIZITÄTSANALYSE	17
2.1.7 DNA-ISOLIERUNG UND DNA-QUANTIFIZIERUNG	19
2.1.8 HISTOLOGIE.....	20
2.1.8.1 Formalin-Fixierung, Einbettung und Schnittherstellung	20
2.1.8.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	20
2.1.9 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSEN (FACS-FÄRBUNG)	21
2.2 MATERIAL.....	22
2.2.1 TECHNISCHE GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIAL.....	22
2.2.2 REAGENZIEN.....	24

2.2.3	MEDIEN UND LÖSUNGEN	25
2.2.4	KITS UND ANTIKÖRPER.....	27
3	ERGEBNISSE.....	28
3.1	DEZELLULARISIERUNG	28
3.1.1	VERKÜRZTES PROTOKOLL	28
3.1.2	VERGLEICH VON NATIVEN UND DEZELLULARISIERTEN SEGELN.....	28
3.1.3	KONTROLLSEGEL.....	32
3.2	OVINE MSCs.....	32
3.2.1	GEWINNUNG UND KULTIVIERUNG DER OVINEN MSCs	32
3.2.2	CHARAKTERISIERUNG DER OVINEN MSCs.....	33
3.3	BESIEDLUNG	36
3.3.1	VERGLEICH VON DEZELLULARISIERTEN UND BESIEDELTEN SEGELN	36
3.4	TOXIZITÄTSANALYSE	38
3.5	EINROLLEN DER SEGEL BEI ERSTEN BESIEDLUNGSVERSUCHEN MIT OVINEN MSCs.....	40
4	DISKUSSION.....	41
4.1	DEZELLULARISIERUNGSMETHODEN	41
4.2	ZELLEN FÜR DIE BESIEDLUNG	43
4.3	MÖGLICHE URSACHEN FÜR DEN AUSBLEIBENDEN BESIEDLUNGSERFOLG	46
5	FAZIT UND AUSBLICK.....	49
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	51
7	SUMMARY.....	52
8	LITERATURVERZEICHNIS	53
9	DANKSAGUNG.....	60
10	LEBENS LAUF	61
11	ANHANG.....	62

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
AV-Klappe	Atrioventrikularklappe
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol-Färbung
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser (<i>double-distilled water</i>)
DNase	Desoxyribonuklease
DMEM high glucose	Dulbecco's Modified Eagle Medium high glucose
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPCs	endotheliale Progenitorzellen (<i>endothelial progenitor cells</i>)
ESCs	embryonale Stammzellen (<i>embryonic stem cells</i>)
EZM	Extrazellulärmatrix
FBS	fetales Kälberserum (<i>fetal bovine serum</i>)
HE-Färbung	Hämytoxylin-Eosin-Färbung
iPSCs	induziert pluripotente Stammzellen (<i>induced pluripotent stem cells</i>)
IE	Internationale Einheit
M	Molarität; Quotient aus der Stoffmenge eines gelösten Stoffes und dem Volumen der Lösung; Einheit: mol/L
MSCs	mesenchymale Stammzellen (<i>mesenchymal stromal/stem cells</i>)
pH	<i>potential Hydrogenii</i> (lateinisch); der pH-Wert ist ein Maß für den sauren oder basischen Charakter einer wässrigen Lösung
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TAVI	kathetergestützte Aortenklappenimplantation (<i>transcatheter aortic valve implantation</i>)

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Längsschnitt durch das menschliche Herz. Modifiziert nach „Sun und Kortaridis (2018)“	8
Abbildung 2: Entwicklung der verschiedenen Typen von Herzklappenerkrankungen in den industrialisierten Ländern. Modifiziert nach „Soler-Soler und Galve (2000)“	10
Abbildung 3: Schema einer transapikalen TAVI. Modifiziert nach „Hassan (2010)“	12
Abbildung 4: Herzklappenprothesen. A) Mechanische Herzklappenprothese, B) Biologische Herzklappenprothese. Modifiziert nach „Richau et al. (2017)“	13
Abbildung 5: Das Prinzip des Tissue Engineerings. Modifiziert nach „Serbo und Gerecht (2013)“	14
Abbildung 6: Gewinnung von ovinen MSCs aus rotem Knochenmark	19
Abbildung 7: Präparation eines porcinen Pulmonalklappensegels	21
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Kategorien des Fluoreszenstestes	24
Abbildung 9: Absteigende Alkoholreihe bei der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)	27
Abbildung 10: Aufsteigende Alkoholreihe in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung	28
Abbildung 11: Optischer Vergleich eines nativen und eines dezellularisierten Pulmonalklappensegels	36
Abbildung 12: Repräsentative HE-Färbungen eines nativen und eines dezellularisierten porcinen Pulmonalklappensegels	36
Abbildung 13: Säulendiagramm. Vergleich der DNA-Konzentrationen der nativen und dezellularisierten Herzklappensegel	38
Abbildung 14: Lichtmikroskopische Aufnahmen der kunststoffadhärenten spindelförmigen ovinen MSCs in der Zellkultur	40
Abbildung 15: Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenmarker der ovinen MSCs	41
Abbildung 16: Besiedeltes Herzklappensegel an Tag 14 der Besiedlung	42
Abbildung 17: Repräsentative HE-Färbung eines besiedelten, zuvor dezellularisierten Herzklappensegels	43
Abbildung 18: Säulendiagramm. Vergleich der DNA-Konzentrationen der dezellularisierten und besiedelten Herzklappensegel	44
Abbildung 19: Toxizitätsanalyse	45
Abbildung 20: 6-Lochplatte mit besiedelten Herzklappensegeln an Tag 1 und Tag 7 der Besiedlung	46

Tabelle 1: Werte der DNA-Analyse der nativen und dezellularisierten Herzklappensegel37
Tabelle 2: Werte der DNA-Analyse der dezellularisierten Kontrollsegel38
Tabelle 3: Werte der DNA-Analyse der besiedelten Herzklappensegel43

1 Einleitung

1.1 Die Anatomie und Physiologie des Herzens

Das menschliche Herz ist der Antriebsmotor des Blutkreislaufes. Es arbeitet wie eine muskuläre Pumpe, indem es sich in einem rhythmischen Wechsel anspannt (Systole) und entspannt (Diastole) und so einen gerichteten Blutstrom im Organismus erzeugt.

Gegliedert in zwei Vorhöfe und zwei Kammern, wird das Herz entsprechend den Druckverhältnissen in ein rechtes Herz (kleiner Kreislauf: Niederdrucksystem- Lungenperfusion und Oxygenierung des Blutes) und ein linkes Herz (großer Kreislauf: Hochdrucksystem- Perfusion der Organe und der Körperperipherie mit oxygeniertem Blut) unterteilt (Abbildung 1).

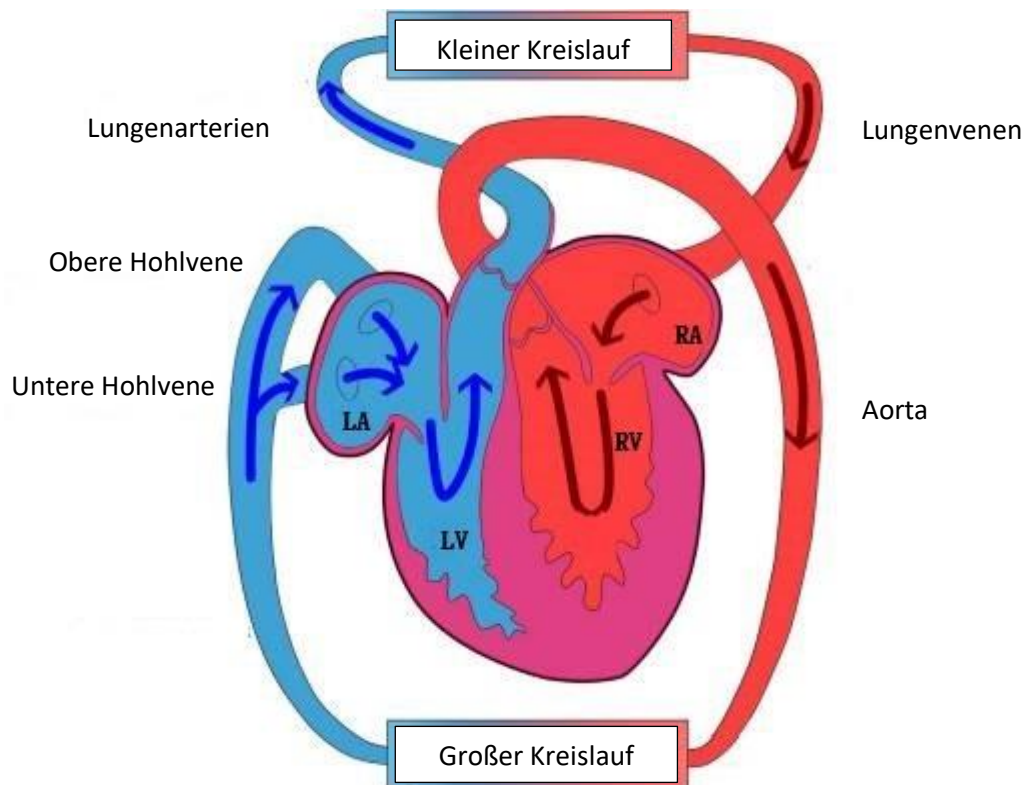


Abbildung 1: Längsschnitt durch das menschliche Herz. Modifiziert nach „Sun und Kortaridis (2018)“. Die Pfeile geben die Richtung des Blutstromes an. Blaue Pfeile = venöses Blut, rote Pfeile = arterielles Blut. LA = Linkes Atrium, LV = Linker Ventrikel, RA = Rechtes Atrium, RV = Rechter Ventrikel.

Das Herz wird durch vier Herzklappen unterteilt: die Trikuspidal- und Pulmonalklappe befinden sich im rechten Herzen und die Mitralklappe und Aortenklappe im linken Herzen. Sie wirken wie Ventile und verhindern einen Rückstrom des Blutes aus den Kammern in die

Vorhöfe, bzw. aus Aorta und Pulmonalarterie in die Kammern und geben somit die Strömungsrichtung des Blutes vor.

Die Herzklappen bestehen aus Endokardduplikaturen, welche ihren Ansatz an vier bindegewebigen Ringen (Anuli fibrosi) des Herzskeletts haben. Dies ist eine Platte aus straffem Bindegewebe, die das Vorhof- und Kammermyokard vollständig trennt und es elektrisch voneinander isoliert.

Die Klappen lassen sich in zwei Gruppen unterteilen. Zwischen den Vorhöfen und Kammern liegen die Atrioventrikularklappen (AV-Klappen), die anatomisch zu den Segelklappen gehören. Im rechten Herzen die Trikuspidalklappe mit drei Segeln und im linken Herzen die Mitralklappe mit zwei Segeln. Sie öffnen sich in der diastolischen Füllungsphase der Kammern durch den Druckanstieg in den Vorhöfen und schließen sich während der systolischen Austreibungsphase, damit kein Blut aus den Ventrikeln zurück in die Vorhöfe fließt. Als besonderes Merkmal besitzen die Segelklappen einen Halteapparat aus Sehnenfäden (*Chordae tendinae*), die zu den Papillarmuskeln in den Ventrikeln ziehen. So soll ein Rückschlag der Segel in die Vorhöfe während der Systole verhindert werden. Die zweite Gruppe bilden die sogenannten Taschenklappen, auch Semilunarklappen genannt, zu denen die Aortenklappe und die Pulmonalklappe zählen. Sie liegen jeweils am arteriellen Ausflusstrakt der beiden Herzkammern und bestehen aus je drei Endotheltaschen. Sie sind während der systolischen Austreibungsphase geöffnet und schließen sich in der Diastole, um einen Rückstrom des oxygenierten Blutes in die Kammern zu verhindern (1).

1.2 Herzklappenerkrankungen

1.2.1 Ätiologie und Epidemiologie

Kardiovaskuläre Erkrankungen zählen weltweit zu den häufigsten Todesursachen (2). Erkrankungen der Herzklappen stellen dabei eine bedeutende Untergruppe dar (3). Sie können zu Verengungen (Stenosen) oder Schlussunfähigkeiten (Insuffizienzen) der Klappen führen. Bei einer Stenose staut sich das Blut vor der verengten Klappe und führt zu einer unphysiologischen Druckbelastung. Dies führt vorerst zu einer konzentrischen Hypertrophie der Herzmuskulatur und später zunehmend zu einer Dilatation und einer insuffizienten Pumpleistung des Herzabschnittes. Bei einer Herzklappeninsuffizienz kommt es zu einem Blutrückstrom aus der Kammer in den Vorhof oder aus der arteriellen Auswurfbahn in die Kammer. Das Pendelvolumen führt zu einer Dilatation des betroffenen Herzabschnittes und

zu einer kompensatorischen Herzmuskelhypertrophie. Die Endstrecke ist jedoch auch hier eine Dekompensation des Herzabschnittes (4).

Herzklappenerkrankungen können erworben oder angeboren sein und beschäftigen sowohl die Erwachsenenmedizin als auch die Pädiatrie. Ursachen können rheumatische oder endokarditische Entzündungen der Herzklappen, angeborene Bindegewebschwächen oder degenerative Veränderungen sein (5). Lange Zeit war das rheumatische Fieber mit nachfolgender Endokarditis der wichtigste Auslöser von Herzklappenerkrankungen. Durch einen verbesserten Lebensstandard und einem breiteren Antibiotikagebrauch hat das rheumatische Fieber, wie in Abbildung 2 zu sehen, in der industrialisierten Welt an Bedeutung verloren (3). Die Rate an Herzklappenoperationen ist jedoch weiter gestiegen (6). Gründe hierfür sind zum einen die immer weiter steigende Lebenserwartung in den entwickelten Ländern und der damit verbundene Anstieg an degenerativen Herzklappenerkrankungen (7). Zum anderen steigt die Verfügbarkeit neuer, weniger invasiver Operationsmethoden, die gute Ergebnisse in älteren, multimorbiden Patienten erzielen und die Indikationsstellung einer Herzklappenoperation erweitert haben (6).

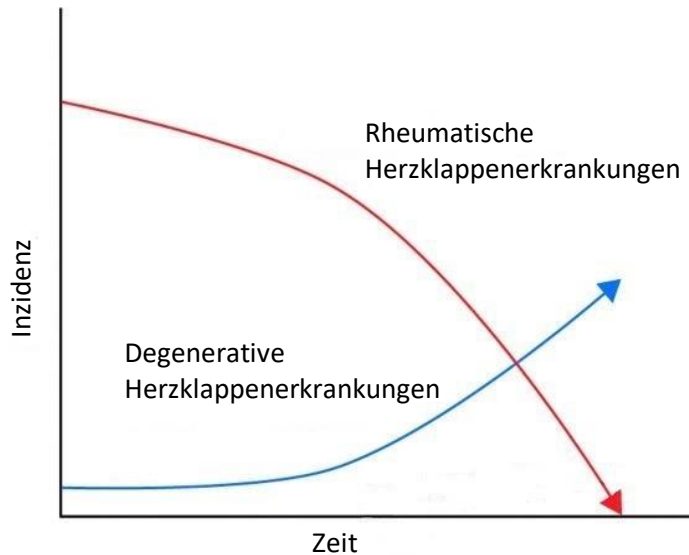


Abbildung 2: Entwicklung der verschiedenen Typen von Herzklappenerkrankungen in den industrialisierten Ländern. Modifiziert nach „Soler-Soler und Galve (2000)“.

Bei etwa 13 % der ≥ 75 jährigen ist eine mittelgradige oder schwere Herzklappenerkrankungen festzustellen (8). Vor allem die Aortenklappenstenose aufgrund eines jahrelangen Kalzifizierungsprozesses und die Mitralklappeninsuffizienz aufgrund eines Mitralprolapses

oder einer linksventrikulären Dysfunktion haben in den letzten Jahren an Häufigkeit stark zugenommen (7,8). In Deutschland ist die Zahl der Operationen von degenerativen Herzklappenerkrankungen in den letzten Jahrzehnten stetig gestiegen. Waren es im Jahr 2011 noch 26.972 klappenchirurgische Eingriffe laut Deutschem Herzbericht 2011, so sind im Jahr 2015 insgesamt 32.346 klappenchirurgische Eingriffe erfolgt (9).

1.2.2 Therapiemöglichkeiten

Die Therapiemöglichkeiten von Herzklappenerkrankungen sind vielfältig. Sie reichen von Lebensstiländerungen über medikamentöse Therapieregime bis hin zu interventionell kardiologischen und chirurgischen Verfahren. Kommt es in Folge von Arteriosklerose zu einer Verkalkung der Klappensegel und damit zu einer Stenose oder Insuffizienz, so ist es sinnvoll, die Summe der Risikofaktoren für eine Arteriosklerose zu reduzieren. Hierzu zählen Alter, männliches Geschlecht, erbliche Belastung, Hypercholesterinämie, arterieller Hypertonus, Stoffwechselerkrankungen wie Fettstoffwechselstörungen oder Diabetes mellitus, Rauchen, Übergewicht, Stress und Bewegungsmangel (10). Die medikamentöse Behandlung von Begleiterkrankungen und Symptomen ist angezeigt, jedoch ist weder bei der Aortenstenose noch bei der Mitralinsuffizienz eine medikamentöse Therapie bekannt, die den Progress der Erkrankung nachweislich aufhält (11). Symptomatische Patienten sollten schnellstmöglich einer interventionellen oder chirurgischen Therapie zugeführt werden. In der Herzchirurgie wird unterschieden zwischen offen chirurgischen, minimalinvasiven und katheterbasierten Operationsverfahren und zwischen klappenerhaltender Therapie und Klappenersatz durch eine Herzklappenprothese. Im Jahr 2015 wurden insgesamt 15.164 offen chirurgische Herzklappenoperationen (über eine komplette Sternotomie) und 6.576 über minimalinvasive Zugangswege vorgenommen. Bei den **minimalinvasiven Verfahren** bleibt die Stabilität der knöchernen Brustwand fast vollständig intakt und die Patienten sind schneller wieder belastbar. Gerade dem älteren Patientenkontext kommt dies zugute (9).

Beim Aortenklappenersatz hat die kathetergestützte Aortenklappenimplantation (TAVI; *transcatheter aortic valve implantation*) in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen. Dabei kann eine Aortenklappenprothese über einen Herzkatheter implantiert werden, ohne dass eine offene Operation an der Herz-Lungen-Maschine erforderlich ist (12) (Abbildung 3).

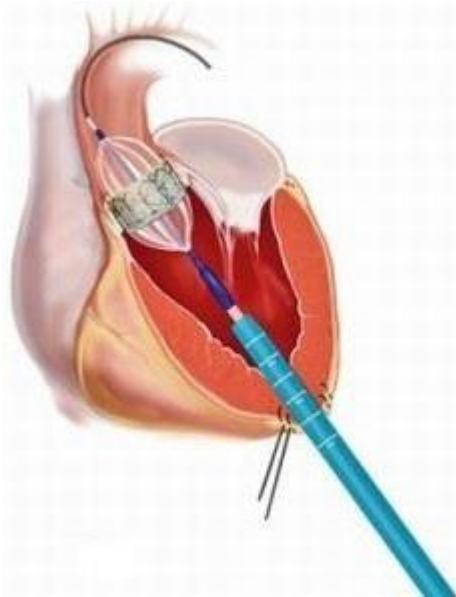


Abbildung 3: Schema einer transapikalen TAVI. Modifiziert nach „Hassan (2010)“.

TAVI ist die Abkürzung für eine kathetergestützte Aortenklappenimplantation (*transcatheter aortic valve implantation*). Der Zugang erfolgt bei einer transapikalen TAVI über die Herzspitze.

Wurde im Jahr 2002 die erste TAVI-Prozedur am Patienten durchgeführt (13), so entfielen im Jahr 2015 bereits 62,1 % der Aortenklappeneingriffe auf das TAVI-Verfahren (9). Bisher durften vor allem ältere multimorbide Patienten mit einem hohen Operationsrisiko für konventionell chirurgische Verfahren von dieser Therapie profitieren (14). Bei Patienten mit niedrigem Operationsrisiko bleibt die konventionelle offen chirurgische Therapie der Goldstandart (11). Bei der Mitralklappeninsuffizienz, der am zweithäufigsten operierten Herzklappenerkrankung in Deutschland, hat die Rekonstruktion der Klappe den vollständigen Ersatz durch eine Prothese über die letzten Jahre abgelöst (9). Für Patienten mit einem zu hohen Risiko für einen offenchirurgischen Eingriff, gibt es seit einigen Jahren ein neues kathetergestütztes Behandlungsverfahren. Dabei wird ein Clip über einen Katheter in das linke Herzen eingeführt und so an der Mitralklappe befestigt, dass die Schlussfähigkeit der Klappe verbessert wird (9).

Muss ein vollständiger Herzklappenersatz erfolgen, gibt es zwei Möglichkeiten. Entweder den Einsatz einer **mechanischen** (Abbildung 4A) oder einer **biologischen Herzklappenprothese** (Abbildung 4B).

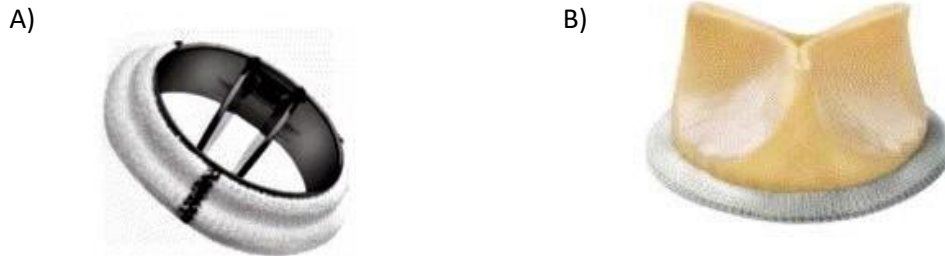


Abbildung 4: Herzklappenprothesen. A) Mechanische Herzklappenprothese B) Biologische Herzklappenprothese. Modifiziert nach „Richau et al. (2017)“.

Die mechanische Herzklappenprothese besteht aus einem Klappenring und zwei halbmondförmigen Klappensegeln aus Karbon. Die biologische Herzklappenprothese besteht aus einem biologischen Grundgerüst und einem stabilisierenden Metallstent.

Beides bringt Vor- und Nachteile mit sich. Die mechanische Herzklappenprothese verspricht eine lange Haltbarkeit, ist aber an eine dauerhafte Antikoagulation gebunden, was zu einem erhöhten Blutungsrisiko führt (15). Die biologischen Herzklappenprothesen haben eine individuell sehr verschiedene, aber begrenzte Haltbarkeit von circa 10 bis 15 Jahren, die eine Reoperation notwendig machen kann (9). Dem steht der Vorteil gegenüber, dass eine dauerhafte Nachbehandlung mit Antikoagulanzen nicht notwendig ist (15). Insgesamt hat der Anteil an biologischen Herzklappenprothesen in den letzten Jahren stark zugenommen. Bei der Notwendigkeit eines Aortenklappenersatzes wurden in Deutschland im Jahr 2015 zu 88,25 % (2014: 88,4 %, n=10.375) biologische Prothesen und zu 11,2 % (2014: 11,6 %, n=1.360) mechanische Prothesen verwendet (9). Durch eine eingeschränkte Gewebekompatibilität, eine mangelhafte biologische Integration und ein fehlendes Wachstumspotenzial ist der Therapieerfolg beider Modelle limitiert. Aus diesem Grund ist die Entwicklung eines adäquaten Herzklappenersatzes ständiger Gegenstand der Forschung. Ein Forschungsgebiet ist das Tissue Engineering.

1.3 Tissue Engineering

Das Tissue Engineering ist ein junger interdisziplinärer Forschungsbereich, mit dem vielversprechenden Ziel der Anzucht von vitalem Gewebe, um geschädigte körpereigene Strukturen zu ersetzen (16). Die drei Hauptkomponenten des Tissue Engineerings sind das

Grundgerüst, die Zellen zum Besiedeln des Gerüsts und der Umwandlungsprozess zu vitalem Gewebe durch zelluläre, biochemische und physikalische Faktoren (17) (Abbildung 5).

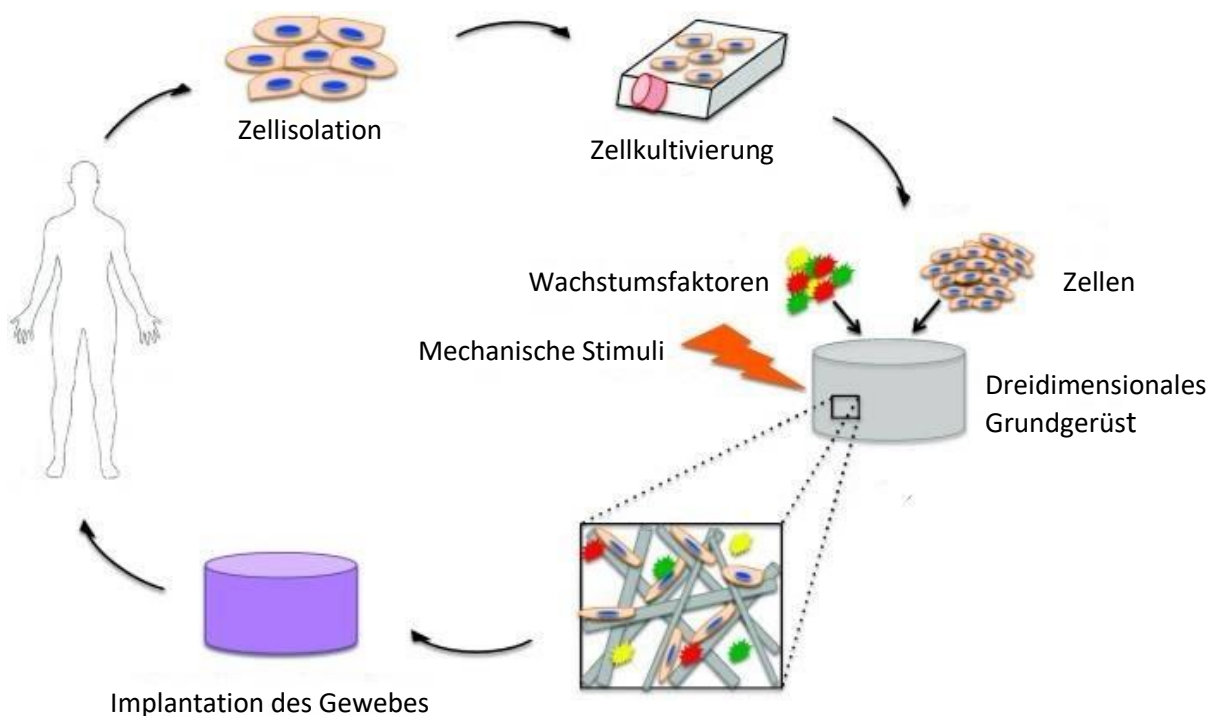


Abbildung 5: Das Prinzip des Tissue Engineerings. Modifiziert nach „Serbo und Gerecht (2013)“. Zuerst erfolgt eine Zellisolation aus menschlichem Gewebe und eine anschließende Zellkultivierung. Dann wird ein dreidimensionales Grundgerüst mit den Zellen besiedelt und das Gewebe mit spezifischen Reizen konditioniert. Nachfolgend wird das Gewebe in den Menschen transplantiert.

Schon in den achtziger Jahren hat die Arbeitsgruppe um R. Langer erste Polymergerüste mit autologen Zellen besiedelt, um sie anschließend in ein Tiermodell zu implantieren (18). Beim kardialen Tissue Engineering wird an der Entwicklung einer vitalen Herzklappenprothese geforscht, die eine lebenslange Haltbarkeit aufweist, antithrombogen und immunneutral ist und sich in die Wachstums- und Stoffwechselprozesse des Körpers integriert (19). Sie soll einer nativen Herzklappe in Anatomie und Funktionalität entsprechen.

1.3.1 Grundgerüst

Das Grundgerüst soll den Zellen beim Tissue Engineering als Leitstruktur dienen, bis diese in der Lage sind, ihre eigene Extrazellulärmatrix (EZM) zu produzieren und ein vitales Gewebe zu bilden (20). Dafür dienen Polymerstrukturen, sowie xenogene und allogene dezellularisierte biologische Grundgerüste (21). Bei den Polymerstrukturen kann es sich um natürliche

Polymere, wie Kollagen, oder um synthetisch hergestellte Polymere handeln. Sie können in Form von vorgefertigten Grundgerüsten verwendet werden, die mit Zellen besiedelt werden können (21). Oder beispielsweise in Form eines Hydrogels, bestehend aus wasserlöslichen Polymeren, in welches die Zellen *in vitro* eingebettet werden und dann in den Körper appliziert werden (22,23).

Bei den dezellularisierten Grundgerüsten kann allogenes oder xenogenes Gewebe verwendet werden. Der Vorteil hierbei ist die bereits vorhandene 3D-Struktur des Gewebes (24). Die Herausforderung bei der Verwendung eines allogenen oder xenogenen Grundgerüstes ist die vollständige Dezellularisierung, um eine immunneutrale Matrix für die Besiedlung zu erhalten.

1.3.2 Dezellularisierungsmethoden

Die Wahl der geeignetsten Dezellularisierungsmethode ist von vielen Faktoren abhängig, beispielsweise vom Zellgehalt, der Gewebedichte, der Gewebedicke und dem Lipidgehalt des Gewebes und von der zugeordneten klinischen Verwendung (24). Entscheidend für den Erfolg der weiterführenden Schritte ist zum einen die möglichst vollständige Entfernung zellulären Materials, um Probleme im Hinblick auf die Zellkompatibilität *in vitro* und Abstoßungsreaktionen *in vivo* zu vermeiden. Zum anderen ist der bestmögliche Erhalt der EZM anzustreben, da gezeigt wurde, dass die EZM Auswirkungen auf die Mitose der Zellen, die Chemotaxis und die Zelldifferenzierung hat (24). Auf dem Gebiet des Tissue Engineerings werden verschiedene Dezellularisierungsmethoden angewendet, die sich hauptsächlich in chemische, biologisch enzymatische und nicht-enzymatische sowie physikalische Wirkweisen einteilen lassen. Physikalische Methoden können zu irreversiblen Schädigungen der EZM führen und scheinen für Herzklappensegel zu aggressiv zu sein (25). Weit verbreitet ist die Anwendung biologischer und chemischer Agenzien im Bereich des kardialen Tissue Engineerings. Die gebräuchlichste Dezellularisierungsmethode für tissue-engineerte Herzklappen ist die Dezellularisierung mit Trypsin/ Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (26). Andere Dezellularisierungsprotokolle nutzen beispielsweise Detergenzien wie Sodiumdodecylsulfat (SDS) und Triton X-100 in Kombination mit Nukleasen. Die Detergenzien lösen Membranproteine aus den Zellmembranen heraus und machen sie permeabel, die Nukleasen spalten die Nukleinsäureketten. Auch hypertone und hypotone Lösungen führen über osmotische Effekte zu einer Zelllyse (24), sodass nachfolgend die Nukleasen eingesetzt werden können. Ein weiterer Aspekt ist die Entfernung xenogener Antigene von den

Grundgerüsten, da diese eine Immunreaktion hervorrufen können (27). Eine optimale Dezellularisierungsmethode, die zu einer vollständigen Zellfreiheit und einer anti-immunogenen Matrix führt und gleichzeitig nicht die EZM angreift, wurde jedoch bisher noch nicht entwickelt und bleibt weiterhin Ziel der Forschung.

1.3.3 Besiedlung

Die Besiedlung der dezellularisierten Herzklappe soll idealerweise die Zellpopulationen einer nativen Herzklappe imitieren. Es gibt Studien, in denen dezellularisierte Herzklappen ohne anschließende Besiedlung eingesetzt wurden (28,29). Es wurde jedoch gezeigt, dass nach der Implantation einer dezellularisierten Herzklappe keine vollständige autologe Re-Besiedlung *in vivo* erreicht werden konnte (30). Eine andere Strategie ist die Besiedlung von dezellularisierten Herzklappen oder künstlich hergestellten Polymerstrukturen *in vitro*. Für die Besiedlung der Grundgerüste gibt es statische und dynamische Kultivierungsmöglichkeiten oder die Möglichkeit einer Kultivierung im Bioreaktor. Die geeignetste Variante ist vom Zelltyp abhängig. Ein Bioreaktor kann helfen, die biochemischen und physikalischen Bedingungen zu schaffen, die die Zellen brauchen, um zu proliferieren, sich zu differenzieren und um EZM zu bilden (31). Durch die Einstellung bestimmter Parameter wird versucht, die physiologische Umgebung des Zielgewebes zu imitieren und das Gewebe bereits *in vitro* zu konditionieren. Beispielsweise können pH-Wert, Temperatur, Sauerstoffgehalt und mechanische Kräfte, wie der herrschende Druck, eingestellt werden (32).

Im Bereich des kardialen Tissue Engineerings wird an Besiedlungsstrategien mit verschiedenen Zelltypen geforscht. Es gilt die beiden großen Zelltypen von Herzklappen, die valvulären interstitiellen und die valvulären endothelialen Zellen zu imitieren (33). Zu Beginn des kardialen Tissue Engineerings wurden vor allem adulte ausdifferenzierte Zellen verwendet. So wurde beispielsweise das Interstitium eines Herzklappengerüsts mit Myofibroblasten besiedelt und anschließend mit Endothelzellen gedeckt (34). Aufgrund verschiedener Limitationen dieser Technik, wie zu geringe Proliferations- und Wachstumsaktivität der Zellen, erwies sie sich als unzulänglich. Neue Erkenntnisse im Bereich der Stammzellforschung haben das Tissue Engineering nachhaltig beeinflusst und führten zu neuen Besiedlungskonzepten (34).

Stammzellen sind das Ersatzteillager unseres Körpers. Aus ihnen können sich verschiedene Zellarten differenzieren und alte, geschädigte oder tote Zellen ersetzt werden. Die typischen

Eigenschaften von Stammzellen sind die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, der langsam laufende Zellzyklus und der niedrige Differenzierungsgrad. Je nach Entwicklungsstadium weisen die Stammzellen unterschiedliche Differenzierungspotenzen auf. Bis zum 8-Zell-Stadium der Embryonalentwicklung sind die Stammzellen totipotent, das heißt aus ihnen können alle Zellen eines Embryos einschließlich der Plazenta entstehen. Die darauffolgenden Stammzellen des Embryos sind pluripotent und können sich in alle Zelltypen entwickeln, aus denen der menschliche Organismus aufgebaut ist. Postnatal handelt es sich um adulte Stammzellen. Sie weisen höchstens eine Multipotenz auf, das heißt, dass aus ihnen viele, aber nicht alle Zelltypen hervorgehen können. Aus oligo- oder monopotenten adulten Stammzellen können wenige oder sogar nur ein Zelltyp entstehen (1).

Aufgrund des hohen Differenzierungspotenzials sind embryonale Stammzellen (ESCs; *embryonic stem cells*) von besonderem Interesse für die Forschung. In Deutschland und in vielen anderen Ländern sind die Verwendung und die Einfuhr embryonaler Stammzellen aber bis auf wenige Ausnahmen verboten (35,36), da die nötige Tötung von Embryonen ethisch und moralisch nicht vertretbar ist. Die Gewinnung von adulten Stammzellen hingegen ist ethisch und moralisch vertretbar und findet in der Forschung eine breite Anwendung. Ein Beispiel für adulte Stammzellen sind die multipotenten mesenchymalen Stammzellen (MSCs). Für den therapeutischen Einsatz humaner MSCs wurden minimale Kriterien zur Identifizierung dieser von der *International Society for Cellular Therapy* beschrieben. Hierbei müssen die Zellen plastikadhärent sein, die spezifischen Oberflächenantigene CD73, CD90 und CD105 exprimieren, nicht aber CD45, CD34, CD14 oder CD11b, CD79alpha oder CD19 und HLA-DR aufweisen und das Potenzial besitzen, sich *in vitro* in Osteoblasten, Adipozyten und Chondrozyten zu differenzieren (41). Die Expansion *in vitro* von humanen MSCs ist erforscht (42). Studien zeigen die Besiedlung von Herzklappengrundgerüsten mit humanen MSCs (33,43). Es konnte beispielsweise eine gute Re-Besiedlung des Klappeninterstitiums erreicht werden (44). Die humanen MSCs bieten ein großes Potenzial für die Anwendung bei der Herstellung tissue-engineerter Herzklappen, da sie sich in unterschiedliche Zelllinien differenzieren können und eine phänotypische Ähnlichkeit zu den nativen valvulären interstitiellen Zellen aufweisen (45). Außerdem scheinen humane MSCs immunmodulatorische Eigenschaften zu haben, die helfen könnten, Entzündungsreaktionen zu minimieren (46).

1.4 Tiermodell Schaf

Die Erprobung der tissue-engineerten Herzklappenprothesen muss vor dem Einsatz im Menschen am Großtiermodell erfolgen. Nur im Rahmen einer *in vivo* Evaluation kann die vollständige Funktionalität erforscht werden. Im Bereich der kardialen Forschung wurden bereits verschiedene Tiermodelle verwendet, darunter Hund, Schwein, Kalb und Schaf (47). Das Schaf hat sich als Tiermodell, insbesondere in der Herzklappenforschung, etabliert. Die Anatomie der ovinen Herzklappen ähnelt der Anatomie der menschlichen Herzklappen und die Hämodynamik ist vergleichbar (48,49). Außerdem haben Studien gezeigt, dass es im juvenilen Schaf, früher als beim Menschen, zu Kalzifizierungsprozessen an der Herzklappe kommt (29), wodurch insbesondere dieser Alterungsprozess in dem Modell Schaf untersucht werden kann. Die Gewinnung von ovinen MSCs aus peripherem Blut (37), Fettgewebe, Leber (38), Nabelschnurgewebe (39) und Fruchtwasser (40) wurde bereits beschrieben, die Gewinnung aus dem rotem Knochenmark ist noch wenig untersucht.

1.5 Ziele des Forschungsvorhabens

Diese Doktorarbeit soll vorbereitende Forschung für die Erprobung eines tissue-engineerten Herzklappenersatzes im Tiermodell leisten. Es sollen die Forschungsansätze mit humanen MSCs auf das Großtiermodell Schaf übertragen werden, um vorbereitende Arbeit für nötige Tierversuche zu leisten. Ziel ist die Herstellung einer tissue-engineerten Herzklappe für den Einsatz im Großtiermodell Schaf. Dazu sollen dezellularisierte porcine Herzklappen als Grundgerüst verwendet werden und mit ovinen MSCs besiedelt werden. Für dieses Vorhaben gilt es

1. ein verkürztes Dezellularisierungsprotokoll zu erarbeiten, welches in kurzer Zeit effektiv die xenogenen Bestandteile von der porcinen Herzklappe entfernt und eine immunneutrale Matrix schafft und
2. eine Methode zur Isolierung von ovinen MSCs aus rotem Knochenmark zu entwickeln. Die oMSCs sollen während der Erprobung vorerst *post mortem* aus dem roten Knochenmark von Schafen isoliert werden.
3. Es soll das Potenzial der statischen Re-Besiedlung von dezellularisierten porcinen Pulmonalklappen mit ovinen MSCs untersucht werden und der Erfolg histologisch und DNA-analytisch ausgewertet werden.

2 Methoden und Material

2.1 Methoden

2.1.1 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in einem S1-Sicherheitslabor nach Gentechnik-Sicherheitsverordnung durchgeführt. Die Arbeiten fanden unter einer sterilen Werkbank statt und der Brutschrank hatte eine Temperatur von 37 °C mit 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit.

2.1.2 Gewinnung und Kultivierung oviner MSCs

Das Protokoll richtet sich nach der von Ute Degenhardt in ihrer Dissertation beschriebenen Vorgehensweise (50).

Bei den Tieren handelte es sich um männliche Schafe der Rasse Suffolk, die nicht älter als 12 Monate und für die Schlachtung vorgesehen waren.

Nachdem der Schlachter („Schlachtere Pirdzuhn“, Todesfelde, Deutschland) das ovine Becken *post mortem* entnommen hatte, wurden es in der Mitte geteilt und bestmöglich von Muskel- und Fettgewebe freipräpariert (Abbildung 6).

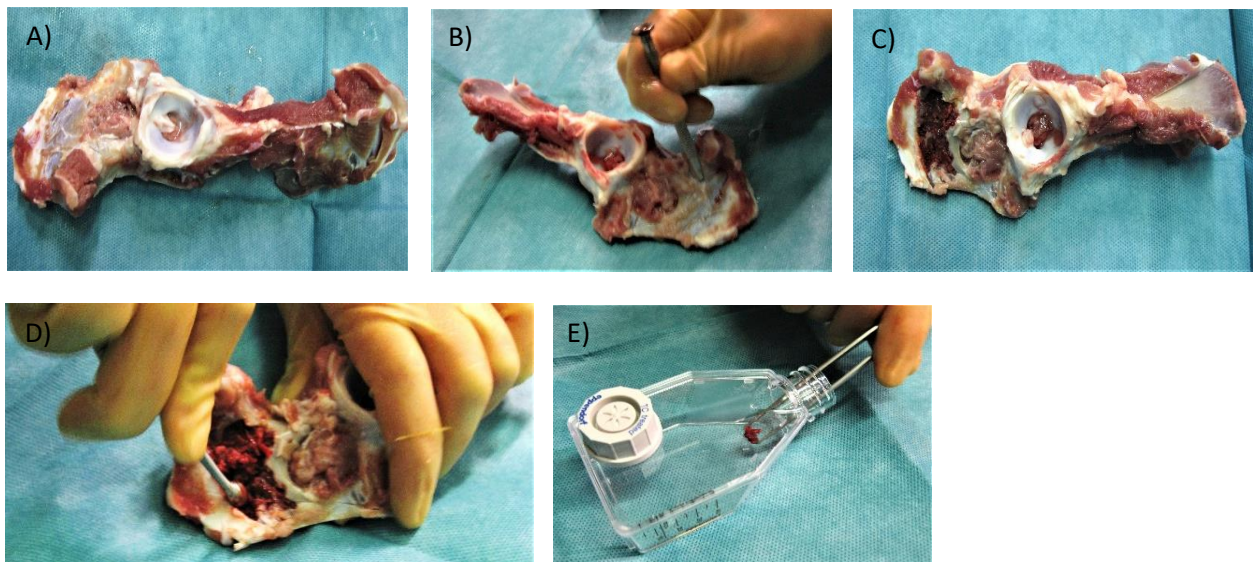


Abbildung 6: Gewinnung von ovinen MSCs aus rotem Knochenmark.

A) Oviner Beckenknochen vor der Entnahme. B) Präparation der Probenentnahmestelle. C) Präparierte *Facies glutea*. D) Probenentnahme mit scharfer Löffelkürette. E) Beschickung der Zellkulturflaschen mit ovinem rotem Knochenmark.

Anschließend wurden die Beckenknochen gründlich mit 70 % EtOH abgespült und in 1,5 L gekühlter Transportlösung bei 4 °C in einer sterilen Box transportiert. Das Knochenmark wurde innerhalb von maximal drei Stunden aus den Gewebeproben entnommen. Hierfür wurden die ovinen Beckenhälften erneut mit 70 % EtOH gründlich abgespült und unter der Sterilwerkbank weiterverarbeitet.

Die Probenentnahmestelle (*Facies glutea*) wurde so gut es geht von restlichem Muskel- und Fettgewebe sowie vom Periost befreit. Anschließend wurde die Kompakta vorsichtig mit Hammer und Meißel bis zur Freilegung des spongiösen Knochenmarks entfernt. Das Knochenmark wurde mit der Löffelkürette entnommen (Abbildung 6).

Pro halbiertem Becken wurden jeweils drei 25 cm²-Zellkulturflaschen mit Knochenmark beschickt und 8 mL im Wasserbad auf 37 °C vorgewärmtes ovines MSC-Medium zugegeben. Die Gewebeproben wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Nach 24 Stunden wurde das Medium abgenommen, die Gewebeproben einmal mit 37 °C warmem PBS gespült und frisches auf 37 °C vorgewärmtes Medium hinzugegeben. Danach erfolgte alle zwei Tage ein Mediumwechsel. Eine Kontrolle des Zellwachstums erfolgte unter dem Lichtmikroskop.

2.1.2.1 Lösen der ovinen MSCs

Zum Lösen der Zellen wurden sie zweimal mit auf 37 °C vorgewärmtem PBS 1x gewaschen. Anschließend wurde 1 mL 37 °C warmes Trypsin-EDTA 0,05 % für 5-7 Minuten hinzugefügt und die Flasche bei 37°C inkubiert. Die Ablösung wurde unter dem Mikroskop kontrolliert. Der Lösevorgang wurde mit 2 mL auf 37 °C vorgewärmten Medium abgestoppt.

2.1.2.2 Passagieren der ovinen MSCs

Die gelösten Zellen wurden zusammengeführt und dann 1:10 gesplittet oder 1:1 in ein größeres Zellkulturgefäß überführt. Eine Passagierung wurde durchgeführt, wenn 70 % bis 80 % der Oberfläche einer Zellkulturflasche oder einer Zellkulturplatte mit Zellen bedeckt waren.

2.1.2.3 Einfrieren der ovinen MSCs

Zur Aufbewahrung der Zellen wurden diese, wie unter 2.1.2.1 beschrieben, gelöst und für fünf Minuten bei RT und 1 000 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Einfriermedium aufgenommen und vorsichtig gelöst. Je ein Milliliter der Zelllösung wurde auf ein

kältebeständiges Röhrchen verteilt. In einem Milliliter der Zelllösung befanden sich in etwa die Zellen von 1 cm² bewachsener Oberfläche einer Zellkulturflasche. Die Röhrchen wurden in einen Gefrierbehälter gestellt und für 24 Stunden bei -80 °C gelagert. Mittels des Gefrierbehälters wurden die Zellen kontrolliert um -1 °C/min runtergekühlt und anschließend in den Stickstofftank überführt.

2.1.2.4 Auftauen der ovinen MSCs

Um die gefrorenen Zellen aufzutauen, wurde das Röhrchen vorsichtig im 37 °C warmen Wasserbad geschwenkt, bis nur noch ein kleiner Eiskern vorhanden war. Dann wurde die Zelllösung in ein 15 mL-Röhrchen überführt und tropfenweise 10 mL auf 37 °C vorgewärmtes Medium hinzugefügt. Im Anschluss wurden die Zellen für 5 Minuten bei RT und 540 x g und aktivierter Bremse abzentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in neues 37 °C warmes Medium aufgenommen und resuspendiert.

2.1.3 Präparation der Segel einer porcinen Pulmonalklappe

Die Schweineherzen wurden von einem lokalen Schlachter („Bio-Hofschlachtereie Muhs“, Krummbek, Deutschland) bezogen.

Für die Präparation der Herzklappensegel wurde die Herzklappe freigelegt, die Segel leicht gespannt (Abbildung 7) und mit einer Präparationsschere vorsichtig am *Anulus fibrosus* abgesetzt. Die Segel wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei RT in sterilem ddH₂O gelagert.

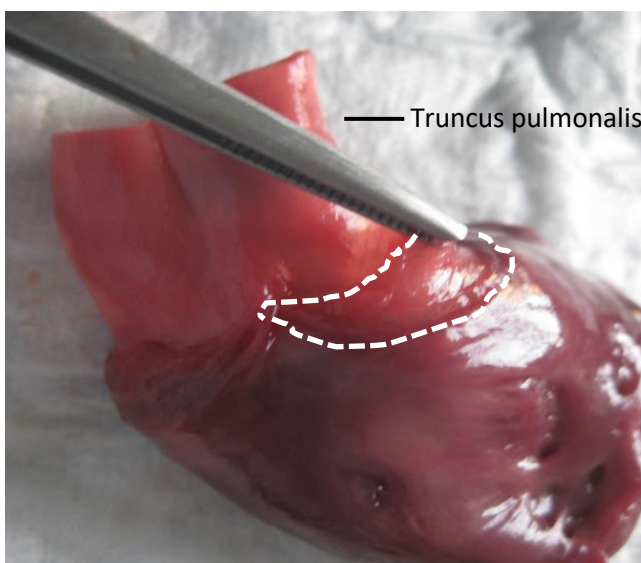


Abbildung 7: Präparation eines porcinen Pulmonalklappensegels.

Der *Truncus pulmonalis* ist nach außen gestülpt und der markierte Bereich zeigt ein Pulmonalklappensegel.

2.1.4 Dezellularisierung

Die Dezellularisierung wurde in 50 mL-Röhrchen durchgeführt. In einem Röhrchen wurden maximal drei Segel dezellularisiert. Die folgenden Mengenangaben beziehen sich auf drei Segel pro Röhrchen. Die Inkubations- und Waschschriffe auf dem Schüttler wurden mit 400 Umdrehungen/min durchgeführt.

Die präparierten Segel wurden in fünf Durchgängen je 10x in ddH₂O invertiert und über Nacht bei 4 °C in 50 mL 0,02 % Natrium-Azid in PBS inkubiert. Nach 24 Stunden wurden die Segel der Pulmonalklappe dreimal fünf Minuten mit 50 mL ddH₂O auf einem Schüttler gewaschen. Anschließend wurde die Probe in 50 mL 0,05 M NaOH-Lösung für maximal eine Stunde bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen für je fünf Minuten wurden 50 mL der auf 4 °C vorgekühlten 5mM Tris-HCl-Lösung mit 1 µM PMSF zu der Probe gegeben und diese für 24 Stunden bei 4 °C geschüttelt.

Am folgenden Tag wurde die Inkubationslösung durch 50 mL auf 4 °C vorgekühlte 5mM Tris-HCl-Lösung mit 1 µM PMSF und 1 % Triton X 100 ersetzt und die Segel wiederum für 24 Stunden bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Probe dreimal fünf Minuten mit ddH₂O gewaschen. Zur enzymatischen Entfernung der zellulären Bestandteile wurden die Segel in 50 mL einer auf 37 °C vorgewärmten Dezellularisierungslösung für 2 Stunden bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurde die Probe dreimal für jeweils fünf Minuten mit einfachem PBS gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Inkubation der Segel in 50 mL einer 5 mM Tris-HCl-Lösung mit 1 % Triton X 100 bei 4 °C für 24 Stunden auf dem Schüttler. Es folgte erneut ein viermaliges Waschen mit PBS. Im Anschluss wurden die Segel in einer Lösung aus 49,5 % DMEM high glucose, 49,5 % FBS und 1 % Penicillin Streptomycin für 24 Stunden bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Dieser Schritt soll die Segel auf die anschließende Besiedlung vorbereiten. Abschließend wurden die Segel dreimal fünf Minuten mit PBS gewaschen.

Im Rahmen der Besiedlung der Segel wurde die vorangegangene Dezellularisierung mittels Kontrollsegel in einem Zwischenschritt kontrolliert. Ein Segel wurde nach der abgeschlossenen Dezellularisierung für 24 Stunden in 2,5 mL oMSC-Medium im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Anschließend wurde mit je einem halben Segel der Dezellularisierungserfolg mittels DNA-Analyse (siehe 2.1.7) und Histologie (siehe 2.1.8) kontrolliert. Die restlichen Segel wurden für die Besiedlung verwendet.

2.1.5 Statische Besiedlung

Die dezellularisierten Segel wurde mit etwa $4 \cdot 10^6$ ovinen MSCs besiedelt. Die Zellen wurden in ausreichender Anzahl in unbeschichteten Zellkulturflaschen kultiviert. Für die Besiedlung von sechs Segeln wurden die Zellen aus acht 75 cm^2 -Zellkulturflaschen benötigt. Für die Besiedlung wurden die Zellen gelöst und mit Medium fünf Minuten bei RT und $1\ 000 \times g$ und aktivierter Bremse zentrifugiert, um das Trypsin herauszuwaschen. Es folgten drei weitere Waschschrte mit PBS 1x. Hierbei wurde das Pellet jeweils in 10 mL PBS gelöst und die Zellen danach abzentrifugiert und dann der Überstand verworfen. Anschließend wurden die Zellen in $37 \text{ }^\circ\text{C}$ warmem oMSC-Medium aufgenommen und gezählt.

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurden der Zellmischung $10 \text{ }\mu\text{L}$ entnommen und mit $990 \text{ }\mu\text{L}$ PBS gemischt (1:100-Verdünnung), dies wurde in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Die Zellen in den vier Großquadraten wurden gezählt und ein Mittelwert (\emptyset) gebildet. Die Zellzahl wurde folgendermaßen berechnet:

$$\emptyset * 10 (\text{Zellen}/\mu\text{L}) * \text{Volumen in } \mu\text{L} * 100 (\text{Verdünnungsfaktor}) = \text{Zellen gesamt}$$

$$\text{Zellen gesamt} / \text{Volumen in mL} = \text{Zellen/mL}$$

Die Zellmischung wurde mit oMSC-Medium auf die gewünschte Zellzahl eingestellt und ausreichend Zellen für den Fluoreszenztest abgenommen (siehe 2.1.6).

Zur Besiedelung der porcinen dezellularisierten Pulmonalklappensegel mit ovinen MSCs wurde anschließend je ein dezellularisiertes Segel in ein Loch einer für Suspensionskulturen geeignete 6-Lochplatte gegeben. Pro Segel benötigte man einen Milliliter der Zellmischung. Diese wurde vorsichtig und tropfenweise auf das Gewebe pipettiert. Die besiedelten Segel wurden für 20 Minuten bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 5 % CO_2 und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert und anschließend mit auf $37 \text{ }^\circ\text{C}$ vorgewärmtem oMSC-Medium auf vier Milliliter pro Loch aufgefüllt.

Das Medium durfte dabei nicht direkt auf die besiedelten Segel gegeben werden. Die besiedelten Segel wurden im Brutschrank bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 5 % CO_2 und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Für 14 Tage wurde jeden zweiten Tag das Medium zur Hälfte gewechselt. Zur anschließenden Analyse wurden die besiedelten Segel dreimal fünf Minuten mit PBS

gewaschen und anschließend vorsichtig halbiert. Die eine Hälfte wurde für die DNA-Isolation und die andere Hälfte für die Histologie verwendet.

2.1.6 Toxizitätsanalyse

Residuen der benutzen Detergenzien, die sich im Zuge des Dezellularisierungsprozesses im Medium auswaschen könnten, würden möglicherweise zu einer Zytotoxizität bei der Besiedlung führen. Um dies auszuschließen, wurde ein sogenannter Überstand generiert, indem ein Segel nach der abgeschlossenen Dezellularisierung für 24 Stunden in 2,5 mL oMSC-Medium im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert wurde und das Medium im Anschluss für die Kultivierung oMSCs genutzt wurde. Die in dem sogenannten Überstand kultivierten oMSCs bildeten eine Gruppe der Toxizitätsanalyse. Die beiden Kontrollgruppen bildeten oMSCs in normalem Medium und mit Lysepuffer versetzte oMSCs (Abbildung 8). Die Zellen wurden anschließend mittels fluoreszierender Farbstoffe auf die Integrität ihrer Zellmembran und somit auf ihre Vitalität überprüft.

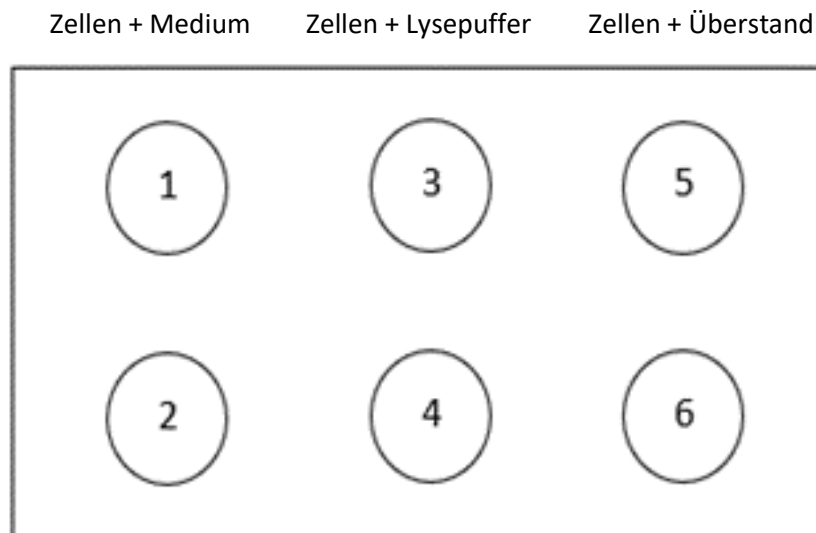


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Kategorien des Fluoreszenstestes.

In Loch 1 und 2 befanden sich ovine MSCs und frisches Medium, in Loch 3 und 4 ovine MSCs und Lysepuffer und in Loch 5 und 6 ovine MSCs und 24 Stunden alter Überstand des Kontrollsegels.

Der im ersten Schritt verwendete Cell Tracker Orange lässt sowohl in vitalen als auch in toten Zellen ein orangenes Fluoreszenzsignal entstehen. Im zweiten Schritt wurden nach 24 Stunden mittels der CellTox[®] Green Dye die avitalen Zellen angefärbt, da die CellTox[®] Green Dye nur an die intrazelluläre DNA von Zellen mit geschädigter Zellmembran bindet und dort ein grünes

Fluoreszenzsignal auslöst. So lässt sich feststellen, ob das Medium, in dem sich die ovinen MSCs befanden, einen zytotoxischen Effekt hatte.

Dafür wurden am Tag der Besiedlung $1,810^6$ Zellen der ovinen MSCs abgenommen und in ein Reagiergefäß überführt. Die Zellen wurden mit MSC-Medium (ovine) auf 2 mL aufgefüllt und für die Zeit der Besiedlung bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

Im Anschluss an die Besiedlung wurden die Zellen für den Fluoreszenztest zweimal mit PBS gewaschen. Dafür wurden 5 mL 37 °C warmes PBS hinzugefügt und die Zellen für 5 Minuten bei RT zentrifugiert (1 000 g, Bremse aktiviert). Anschließend wurde der Überstand verworfen.

Das Zellpellet wurde in 2 mL 37 °C warmes PBS aufgenommen und resuspendiert. Es wurde 1 µL Cell Tracker Orange hinzugefügt (Verdünnung von 1:2 000) und erneut resuspendiert. Dann wurden die Zellen für 30 Minuten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei RT und 1 000 g und aktivierter Bremse abzentrifugiert und einmal, wie oben beschrieben, mit 37 °C warmen PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen in 1,8 mL auf 37 °C vorgewärmtem Zellmedium aufgenommen. In 6 Löcher einer 24-Lochplatte wurden jeweils 700 µL auf 37 °C vorgewärmtes Zellmedium vorgelegt und 300 µL der Zellsuspension hinzugegeben und resuspendiert. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Nach 24 h erfolgte die Zugabe der CellTox[®] Green Dye. Es wurden 4 mL auf 37 °C vorgewärmtes Zellmedium mit 4 µL CellTox[®] Green Dye gemischt (1:1 000-Verdünnung). Von Loch 1-4 wurde das alte Medium abgenommen und pro Loch 1 mL neues Medium mit CellTox[®] Green Dye hinzugegeben. Vom Überstand des Kontrollsegels wurden 2 mL abgenommen und diese mit 2 µL CellTox[®] Green Dye gemischt. Dann wurde das alte Medium von Loch 5 und 6 abgenommen und je 1 mL des Überstandes gemischt mit CellTox[®] Green Dye hinzugefügt. Anschließend wurden die Zellen 24 Stunden bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubiert. Dann wurden zu Loch 3 und 4 jeweils 40 µL Lysepuffer hinzugegeben und resuspendiert. Es erfolgte die Inkubation im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit für 30 Minuten.

Anschließend wurde der Zytotoxizitätstest mittels eines Lichtmikroskops mit den passenden Filtern für Fluoreszenzproben ausgewertet (Filter für grünes Fluoreszenzsignal: 512-532 nm, Filter für orangenes Fluoreszenzsignal: 541-565 nm). Jedes Loch der 6-Loch-Platte wurde einmal ohne Filter, einmal mit dem Filter für das Spektrum der orangenen Fluoreszenz und

anschließend mit dem Filter für das Spektrum der grünen Fluoreszenz betrachtet. Es wurden digitale Aufnahmen erstellt und jeweils die Aufnahmen mit dem Filter für die orangene und die grüne Fluoreszenz übereinandergelegt. So ist zu erkennen welche vitalen Zellen (orange) anschließend avital waren (grün).

2.1.7 DNA-Isolierung und DNA-Quantifizierung

Zur Vorbereitung der DNA-Isolation wurden die halbierten Pulmonalklappensegel zunächst gewogen und dann über Nacht im Wärmeschrank bei 55 °C in einem offenen 1,5 mL SafeSeal Reagiergefäß getrocknet. Die Reduzierung der Segel auf das Trockengewicht ist wichtig für die Vergleichbarkeit des DNA-Gehalts, welcher in ng/mg Trockengewicht angegeben wird. Nach dem Messen des Trockengewichts wurde den Proben je 600 µL Lysepuffer und 12 µL Proteinase K hinzugefügt. Die Proben wurden zur vollständigen Auflösung des Gewebes über Nacht in den Heizblock bei 55 °C gestellt.

Nach einigen Stunden wurden die Proben leicht gevortext. Am Folgetag wurden die Proben zehn Minuten bei 4 °C inkubiert. Es folgte die Zugabe von 210 µL gesättigtem NaCl, ein Durchmischen der Probe und die erneute Inkubation für zehn Minuten bei 4 °C. Anschließend wurden die Proben für zehn Minuten bei 4 °C und 20 000 x g zentrifugiert. Während der Zentrifugation wurden je 800 µL Isopropanol 100 % in neue Röhrchen vorgelegt. In diese wurde 800 µL des Überstands aus den zentrifugierten Röhrchen transferiert und anschließend gevortext. Daraufhin wurden alle Proben für mindestens zehn Minuten bei -20 °C inkubiert. Es folgte eine erneute Zentrifugation für zehn Minuten bei 4 °C und 20 000 x g. Danach wurde der Überstand der Röhrchen dekantiert. Zu den Pellets wurden 500 µL Isopropanol hinzugefügt und die Proben wurden kurz gevortext. Die Röhrchen wurden drei Minuten bei 4 °C und 20 000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und 500 µL 80 %-iges Ethanol hinzugefügt. Der dreiminütige Zentrifugationsschritt bei 4 °C und 20 000 x g wurde wiederholt. Der Überstand wurde abermals abgenommen und die Proben luft-trocknen gelassen. Anschließend wurden den Proben je 200 µL ddH₂O hinzugegeben, diese für zehn Minuten im Heizblock bei 55 °C inkubiert und anschließend mit einer Pipette resuspendiert.

Die Quantifizierung der enthaltenen DNA erfolgte gemäß der Anleitung mittels des NanoDrop und der dazugehörigen Computersoftware.

Nachdem alle Messungen abgeschlossen waren, wurden die Proben bei -20 °C eingefroren.

2.1.8 Histologie

Eine Methode zur Untersuchung des Dezellularisierungs- und Besiedlungserfolges stellte die mikroskopische Gewebeuntersuchung der Herzklappensegel dar.

2.1.8.1 Formalin-Fixierung, Einbettung und Schnittherstellung

Die halbierten Segel wurden in eine 4 %-ige Formalinlösung gelegt und bei RT 22-24 Stunden gelagert. Am Folgetag wurden die Proben fixiert (freundlicherweise durchgeführt am Institut für Pathologie am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein in Kiel). Dort wurden die Proben mit ddH₂O gespült und durchliefen im Entwässerungsautomaten eine aufsteigende Alkoholreihe mit anschließender Imprägnierung des Gewebes mit flüssigem Paraffin. Nach der abgeschlossenen Fixierung wurden die Segel in Paraffin eingeblockt.

Dazu wurden die fixierten Proben im Einbettautomaten erwärmt und mit Paraffin mit der Schnittkante nach unten in eine Kassette eingeschlossen. Nach Erkalten wurden am Mikrotom 5 µm dicke Schnitte hergestellt. Anschließend wurden die Schnitte auf Objektträger aufgebracht, mithilfe eines Warmwasserbades geglättet und anschließend getrocknet.

2.1.8.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Alle Färbungen wurden unter dem Abzug durchgeführt.

Zunächst wurde eine Xylol- und Alkoholreihe angesetzt (zweimal Xylol, je einmal EtOH 100 %, 96 %, 80 %, 70 %, einmal ddH₂O). Die Objektträger mit den zu färbenden Schnitten wurden auf einen Metallträger geladen und durchliefen zur Entparaffinierung die absteigende Alkoholreihe (Abbildung 9).

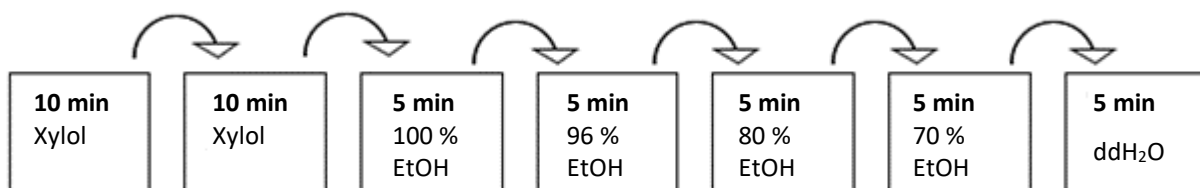


Abbildung 9: Absteigende Alkoholreihe bei der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung).

Die Objektträger wurden in eine Färbekammer gelegt und ein Tropfen Mayers Hämalanlösung auf das Präparat getropft, welches zweieinhalb Minuten einwirkte. Danach wurden die Objektträger kurz in ddH₂O gespült, in eine Küvette gestellt und unter fließendem Leitungswasser vier Minuten lang gespült. Die Schnitte wurden leicht abgetrocknet und wieder in die Färbekammer überführt. Dort wurde je ein Tropfen der Eosin G-Lösung 0,5 %

auf das Präparat getropft und für zweieinhalb Minuten einwirken gelassen. Die Objektträger wurden auf den Metallträger geladen, für 10 Sekunden in ddH₂O gespült und anschließend für je fünf Sekunden in das 70-, 80- und 96-prozentige EtOH gestellt, dann für je fünf Minuten in 100 %-iges EtOH und die zwei Xylol-Behälter (Abbildung 10).

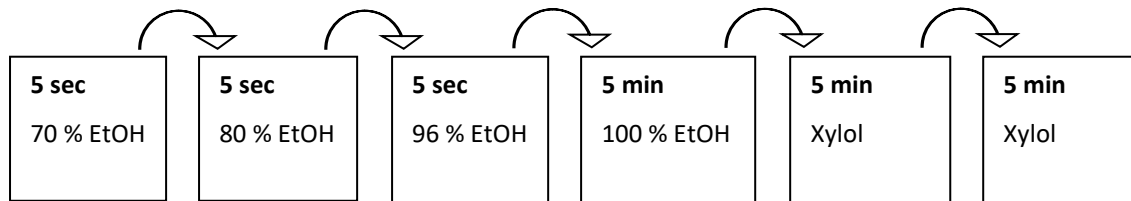


Abbildung 10: Aufsteigende Alkoholreihe in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung.

Abschließend wurden die Präparate mit Eindeckmedium bedeckt und mit Deckgläsern versiegelt.

2.1.9 Durchflusszytometrische Analysen (FACS-Färbung)

Eine weitere Charakterisierung der ovinen MSCs erfolgte mithilfe der Durchflusszytometrie. Die Durchflusszytometrie (*fluorescence-activated cell sorting* = FACS) ist eine Methode zur automatisierten Untersuchung von Zellen anhand Größe und Granularität sowie Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper. Die zu untersuchenden Zellen fließen hintereinander durch eine dünne Messkammer und werden durch die hydrodynamische Fokussierung in Einzelzellsuspension gebracht. Dabei werden sie mit einem Laser angestrahlt und erzeugen ein für jeden Zelltyp charakteristisches Streulicht. Das von Fotomultiplikatoren aufgefangene Streulicht wird in Seitwärtsstreulicht (*side scatter* = SSC), als Maß für die Granularität, und Vorwärtsstreulicht (*forward scatter* = FSC), als Maß für Größe der Zellen, unterteilt. Zusätzlich können die Zellen nach Markierung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern anhand ihrer Oberflächenmolekülen oder in der Zelle lokalisierten Proteinen charakterisiert werden. Zu jeder Probe wurde auch eine Negativkontrolle durchgeführt. Dazu dienten Messungen der oMSCs ohne fluoreszenzmarkierte Antikörper. Die Proben wurden mit dem Durchflusszytometers „LSR II“ gemessen.

Für die Messungen wurden jeweils 500 000 ovine MSCs auf ein Rundbodenröhrchen verteilt. Die Zellen wurden für 5 Minuten bei 4 °C und 540 x g zentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Dann wurden die Zelle mithilfe des FACS-Waschpuffers gewaschen.

Dazu wurden 2 mL des auf 4 °C vorgekühlten Waschpuffers zum Zellpellet gegeben und die Zellen anschließend erneut für 5 Minuten bei 4 °C und 540 x g zentrifugiert. Dieser Schritt wurde noch ein zweites Mal wiederholt. Im Anschluss wurden die spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörper zu den ovinen MSCs gegeben. Die Antikörper Anti-Schaf CD31, Anti-Schaf CD44 und Anti-Schaf CD45 wurden in einer Konzentration von 5 µg/µL zum Zellpellet gegeben, der Antikörper Anti-Human CD166 in einer Konzentration von 6,25 µg/µL. Anschließend wurden die Zellen bei 4 °C im Dunkeln für 25 Minuten inkubiert und anschließend erneut zweimal für 5 Minuten bei 4 °C und 540 x g gewaschen. Im nächsten Schritt wurde das Zellpellet in 200 µL vorgekühltem PFA aufgenommen und die Probe bis zur Messung bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

2.2 Material

2.2.1 Technische Geräte und Verbrauchsmaterial

* = steril

GERÄT/VERBRAUCHSMATERIAL	HERSTELLER
10 mL, 25 mL Serological Pipette*	Greiner bio-one, Österreich
5 mL Disposable Plastic Pipette*	Thermo Scientific, USA
Abdecktuch* Foliodrape® Protect	Hartmann, Deutschland
Becher 100 mL*	Sarstedt, Deutschland
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf, Deutschland
Chromatography Paper 3MM Chr Löschpapier	Whatman®, Großbritannien
CO ₂ -Inkubator HeraCell 150	Thermo Scientific, USA
CO ₂ -resistenter Schüttler	Thermo Scientific, USA
CryoTube™ Vials 1,8 mL*	Nunc, Dänemark
Dako-Pen hydrophober Stift	Dako, Dänemark
Deckgläser 24x24 mm, 24x32 mm	Th. Geyer Gruppe, Deutschland
Durchflusszytometer LSR II	BD Biosciences, USA
Einbettautomat HistoCore Arcadia H	Leica, Deutschland
Einwegskalpell No. 22*	Feather, Japan
Eukitt Eindeckmedium	Fluka®, Deutschland
Flüssigkeits-Absaugsystem BVC professional	Vacuubrand, Deutschland
Gefrierbehälter Corning® CoolCell™	Merck, Deutschland
Halbautomatischer Dampfsterilisator	HMC Europe, Deutschland

Hammer*, Länge 52 mm, Kopfdurchmesser 12 mm	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Kiel, Deutschland
Handschuhe Micro-Touch Nitrile, unsteril, puderfrei	Ansell, Australien
Handschuhe* puderfrei, Vasco® OP Sensitive	B. Braun Melsungen AG, Deutschland
Heizblock	Grant, England
Kühlplatte HistoCore Arcadia C	Leica, Deutschland
Kühlschrank	Liebherr, Schweiz
Lichtmikroskop ID 03	Zeiss, Deutschland
Live Zell-Analysator JuLi™ Br	NanoEnTek, Südkorea
Löffelkürette	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Kiel, Deutschland
Meißel*, Länge 90 mm, Breite 4 mm	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Kiel, Deutschland
Mikroskop Axiovert 135	Zeiss, Deutschland
Mikrotom RM2155	Leica, Deutschland
Mikrotom-Klinge N35	Feather, Japan
Mikrowelle	OK., Deutschland
Mundschutz Visma earloop	B. Braun Melsungen AG, Deutschland
NanoDrop 2000c Spectrophotometer	Thermo Scientific, USA
Neubauer Zählkammer, 0,100 mm Tiefe	Assistent®, Deutschland
Objektträger Superfrost Ultra Plus	Thermo Scientific, USA
OP-Mantel* Sentinex PRO	Lohmann & Rauscher, Deutschland
Paraffin, pastillenförmig	Merck, Deutschland
Parafilm® „M“ Verschlussfolie	Bemis, USA
pH Meter HI 221	Hanna Instruments, USA
Pinzette* anatomisch, Länge 14,5 cm	Fuhrmann, Deutschland
Pipette 2,5 µL, 100 µL, 200 µL, 1000 µL	Eppendorf research, Deutschland
Pipettenspitzen 2,5 µL, 100 µL, 200 µL, 1000 µL *	Sarstedt, Deutschland
Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte, Deutschland
Präzisionstücher Kimwipes®	Kimberly-Clark, USA
Präzisionswaage ABJ 220-4NM	Kern, Deutschland
Reagiergefäß 1,5 mL Biosphere® plus SafeSeal*	Sarstedt, Deutschland
Reinstwasseranlage Puranility TU	VWR®, USA
Röhrchen 15 mL, 50 mL*	Sarstedt, Deutschland
Rundbodenröhrchen 5 mL, Polystyrol	Corning, USA
Schere chirurgisch*, spitz-spitz, 14 cm	Teqler, Luxemburg
Schere chirurgisch*, spitz-stumpf, 14 cm	Teqler, Luxemburg

Schüttelplatte	Thermo Scientific, USA
Sterilwerkbank HeraSafe	Thermo Scientific, USA
Stickstofftank Chronos 200	Cryotherm, Deutschland
TC-Platte 6 Well, Standard.F*	Sarstedt, Deutschland
Tiefkühlschrank Forma -86C ULT Freezer	Thermo Scientific, USA
Tissue Culture Plate, 96 Well, 24 Well, 12 Well*	Becton Dickinson, USA
Transferpipetten	Sarstedt, Deutschland
Vortex-Schüttler VF2	Janke & Kunkel IKA®-Labortechnik, Deutschland
Wärmeplatte für Mikrotom-Schnitte	Medax, Deutschland
Wärmeschrank	Memmert, Deutschland
Wasserbad	GFL, Deutschland
Wasserbad für Mikrotom-Schnitte	Leica, Deutschland
Zellkulturflaschen 25 cm ² , 75 cm ² *	VWR®, USA
Zentrifuge 5804 R	Eppendorf, Deutschland

2.2.2 Reagenzien

REAGENZ	HERSTELLER
Amphotericin B	EuroClone, Italien
Cell Tracker™ Orange CMTMR Dye	Thermo Fisher Scientific, USA
Cryo-Sure DMSO	WAK-Chemie, Deutschland
DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium + 4.5g/L D-Glucose, L-Glutamine (DMEM high glucose)	Gibco®, USA
DNAse I aus bovinem Pankreas 15000 U/48 mg	Sigma®, USA
Dulbecco's PBS 1x	Gibco®, USA
EDTA	Sigma®, USA
Ethanol 99,9% Chemsolute®, mit zweifach destilliertem Wasser (ddH ₂ O) auf Ethanol 96%, 80 %, 70 % verdünnt	Th. Geyer, Deutschland
FBS Heat Inactivated Fetal Bovine Serum	Gibco®, USA
Ficoll 400	Sigma-Aldrich, Deutschland
Formaldehydlösung	J. T. Baker®, Niederlande
Heparin-Natrium 25 000 IE / 5 mL	Braun, Deutschland
C ₃ H ₈ O Emsure®, ≥ 99,8%	Merck, Deutschland
Lymphoprep, Dichtegradientenmedium	Fresenius, Deutschland
MgCl ₂ wasserfrei	Merck, Deutschland

Mayers Hämaunlösung	Merck, Deutschland
C ₂ H ₃ NaO ₂ wasserfrei	Merck, Deutschland
NaN ₃ reinst	AppliChem, Deutschland
NaCl reinst, rieselfähig	AppliChem, Deutschland
NaOH	Roth®, Deutschland
Paraformaldehyd	Roth®, Deutschland
Penicillin Streptomycin	Gibco®, USA
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	AppliChem, Deutschland
Proteinase K 20 mg/mL	Roth®, Deutschland
RNase A (Dnase free) 107 U/mg	AppliChem, Deutschland
SDS	AppliChem, Deutschland
Trispuffer Hydrochlorid	Sigma®, USA
Triton X-100	Sigma®, USA
Trizma Base	Sigma®, USA
Trypsin from bovine pancreas	Sigma®, USA
Xylol technisch	ChemSolute®, Th. Geyer Gruppe, Deutschland
Ethansäure/Essigsäure 98-100 % (60,05 g/mol)	Sigma®, USA
Eosin G-Lösung 0,5 %	Roth®, Deutschland
Trypsin-EDTA 0,25 %	Gibco®, USA
Collagen Typ I Rattenschwanz 3,58 mg/mL	Corning, USA

2.2.3 Medien und Lösungen

MEDIUM/LÖSUNG	ZUSAMMENSETZUNG
Dezellularisierungslösung	5 mM MgCl ₂ 0,02 % NaN ₃ in PBS 50 U/mL DNase 50 U/mL RNase 100 mg/L Trypsin
NaN ₃ 0,02 % in PBS	0,2 g NaN ₃ reinst in 1 000 mL PBS gelöst
NaCl-Lösung 5 g/mol	5 mol NaCl in 1 000 mL ddH ₂ O
NaCl-Lösung 10 g/mol	10 mol NaCl in 1 000 mL ddH ₂ O
NaOH 0,05 g/mol	0,05 mol NaOH in 1 000 mL ddH ₂ O
KCl 10 mg/mol, steril	0,01 mol KCl in 1 000 ml ddH ₂ O
MgCl ₂ 5 mg/mol in 0,02 % NaN ₃ in PBS	0,5 mmol MgCl ₂ 0,2 g NaN ₃ in 1 000 mL PBS
Tris-HCl-Lösung 10 mM	10 mM Trispuffer Hydrochlorid

	0,8 mM Trizma Base in ddH ₂ O pH 7,4
Tris-HCl-Lösung 500 mM	500 mM Trispuffer Hydrochlorid 80 mM Trizma Base in ddH ₂ O pH 8,0
Trypsin-EDTA 0,05 %	1:5-Verdünnung von Trypsin-EDTA 0,25 % Nutzung für die Ablösung der Zellen in der Zellkultur
Collagen Platten/Flaschen Beschichtung	Collagen I Rattenschwanz (3,58 mg/mL, Konzentration 5 µg/cm ²) Verdünnung mit 20 mM Essigsäure auf 50 µg/mL (Faktor 1:71,6) µL pro Well/Flasche: 24-Well Platte (1,9 cm ²) = 190 µL 12-Well Platte (3,8 cm ²) = 380 µL 6-Well Platte (9,6 cm ²) = 961 µL T75 Flasche (75 cm ²) = 7,5 mL Für eine Stunde bei RT inkubieren Mit PBS waschen, direkt verwenden Lagerung: PBS abziehen, Lufttrocknung, bei 4 °C eine Woche haltbar
Einfriermedium	1:10 Cryo-Sure DMSO in FBS vor Zellablösung herstellen, bei 4°C bis zum Gebrauch lagern
FACS-Waschpuffer	2 % FBS in PBS
Gesättigtes NaCl	6 M NaCl erhitzen bis gelöst, dann bei RT lagern
Lysepuffer	10 mM Tris-HCl-Lösung 100 mM NaCl-Lösung 10 mM EDTA 0,5 % SDS (20 %) mit ddH ₂ O auf 500 mL auffüllen
MSC-Medium, human (hMSC-Medium)	DMEM + 4,5 g/L D-Glucose 10 % FBS 1 % Penicillin Streptomycin

MSC-Medium, ovin (oMSC-Medium)	DMEM +4,5 g/L D-Glucose 15 % FBS 1 % Penicillin Streptomycin 1 % Amphotericin B (nur in Passage 0, wenn keine Verunreinigung)
PBS 10x, steril	1,37 mol NaCl 0,027 mol KCl 0,1 mol Na ₂ HPO ₄ 0,018 mol KH ₂ PO ₄ in 800 mL ddH ₂ O auflösen auf pH 7,4 einstellen mit ddH ₂ O auf 1 000 mL auffüllen autoklavieren
PBS 1x (im Text nur PBS)	1:10-Verdünnung von PBS 10x
PFA	1 % Paraformaldehyd in PBS
PMSF	200 mM Stock Lösung in 5 mL Isopropanol
Transportlösung	PBS 1x 1 % Penicillin Streptomycin 1 % Amphotericin B

2.2.4 Kits und Antikörper

CellTox® Green Cytotoxicity Assay 10 mL	Verwendung der CellTox® Green Dye nach Herstellerangaben in einer 1:1 000 - Verdünnung
Cell Tracker Orange ^{CM} TMR Working Dye Solution	Cell Tracker Orange CMTMR Dye auf RT aufwärmen lassen, Verdünnung mit DMSO auf eine Konzentration von 10 mM, dann Verdünnung mit PBS auf 5 µM (Faktor 1:2 000)
Antikörper: Anti-Schaf CD31 FITC, monoklonal, Klon CO.3E1D4 Anti-Schaf CD44 FITC, monoklonal, Klon 25.32 Anti-Schaf CD45 FITC, monoklonal, Klon 1.11.32 PE Anti-Human CD166, monoklonal, Klon 3A6	Bio-Rad, England Bio-Rad, England Bio-Rad, England BioLegend®, USA

3 Ergebnisse

Die Ziele dieser Forschungsarbeit waren

1. ein effektives, zeitsparendes Dezellularisierungsprotokoll für porcine Herzklappen zu erarbeiten
2. eine Methode zur Isolierung oviner MSCs aus rotem Knochenmark zu erarbeiten und
3. die statische Re-Besiedlung von dezellularisierten porcinen Pulmonalklappensegeln mit ovinen MSCs zu untersuchen.

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen ein verkürztes Dezellularisierungsprotokoll zu erarbeitet, welches in nur 5 Tagen zu einer nahezu azellulären Matrix führt. Weiter wurde eine Methode zur Gewinnung von oMSCs aus rotem Knochenmark etabliert. Die Zellen konnten nach der Isolierung zellmorphologisch und immunphänotypisch charakterisiert und den oMSCs zugeordnet werden. Es konnte ein Protokoll entwickelt werden, wonach man nach 10 Tagen Zellkultivierung ausreichend oMSCs für die Besiedlung von 6 porcinen Herzklappensegeln zu Verfügung hat. Das Potenzial der statischen Re-Besiedlung von dezellularisieren porcinen Pulmonalklappensegeln mit oMSCs wurde untersucht.

3.1 Dezellularisierung

3.1.1 Verkürztes Protokoll

In dieser Arbeit sollten Besiedlungsversuche von dezellularisierten porcinen Herzklappensegeln mit ovinen MSCs unternommen werden. Um in kurzer Zeit ein nahezu azelluläres Grundgerüst mit bestehender Ultrastruktur zu erhalten, wurde hier ein verkürztes Dezellularisierungsprotokoll von nur fünf Tagen Dauer entwickelt. Dieses sollte in der Lage sein, die zellulären Komponenten fast vollständig zu entfernen und dabei das azelluläre Grundgerüst und die Ultrastruktur der Herzklappensegel zu erhalten. Die porcinen Herzklappensegel wurden mit einer Kombination aus Detergenzien (Triton X-100) und Nukleasen (DNase und RNase) behandelt.

3.1.2 Vergleich von nativen und dezellularisierten Segeln

Vergleicht man das native und das dezellularisierte porcine Herzklappensegel makroskopisch, so fällt auf, dass sie sich in ihrer Farbe unterscheiden (Abbildung 11). Zugrunde liegt die

Entfernung der zellulären Bestandteile beim dezellularisierten Segel. Strukturell wiesen beide Segel eine ähnliche Festigkeit und Dicke auf.

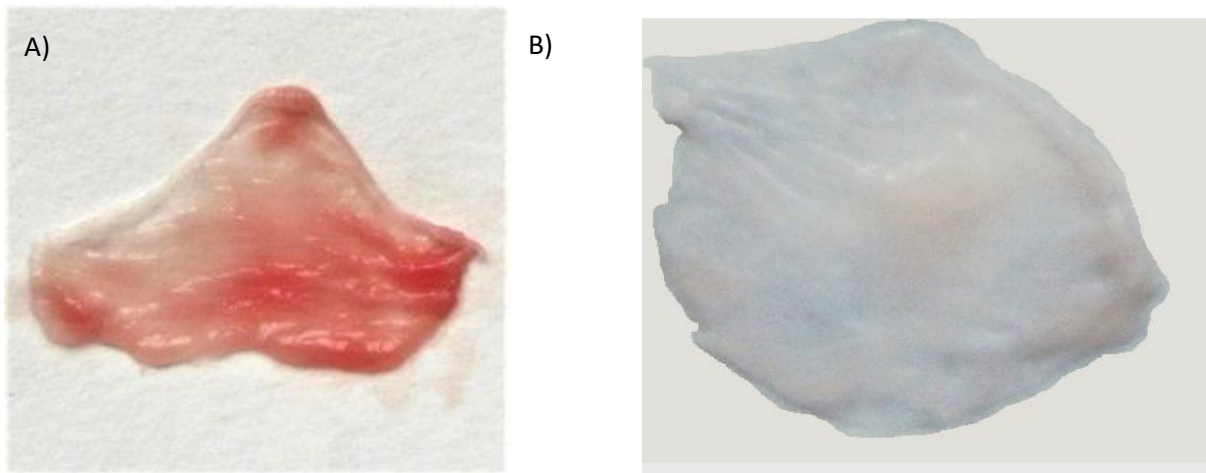


Abbildung 11: Optischer Vergleich eines nativen und eines dezellularisierten porcinen Pulmonalklappensegels. A) Natives porcines Herzklappensegel. B) Dezellularisiertes porcines Herzklappensegel.

Zum histologischen Vergleich (Abbildung 12) wurden HE-Färbungen der Segel durchgeführt. Die nativen Segel zeigten eine intakte Ultrastruktur mit einer Schichtung in Ventrikularis, Spongiosa und Fibrosa. In Blau gefärbt sind die Zellkerne erkennbar.

Die HE-gefärbten dezellularisierten Segel wiesen ebenfalls eine intakte extrazelluläre Grundstruktur auf. Allerdings waren keine blau gefärbten Zellkerne mehr sichtbar.

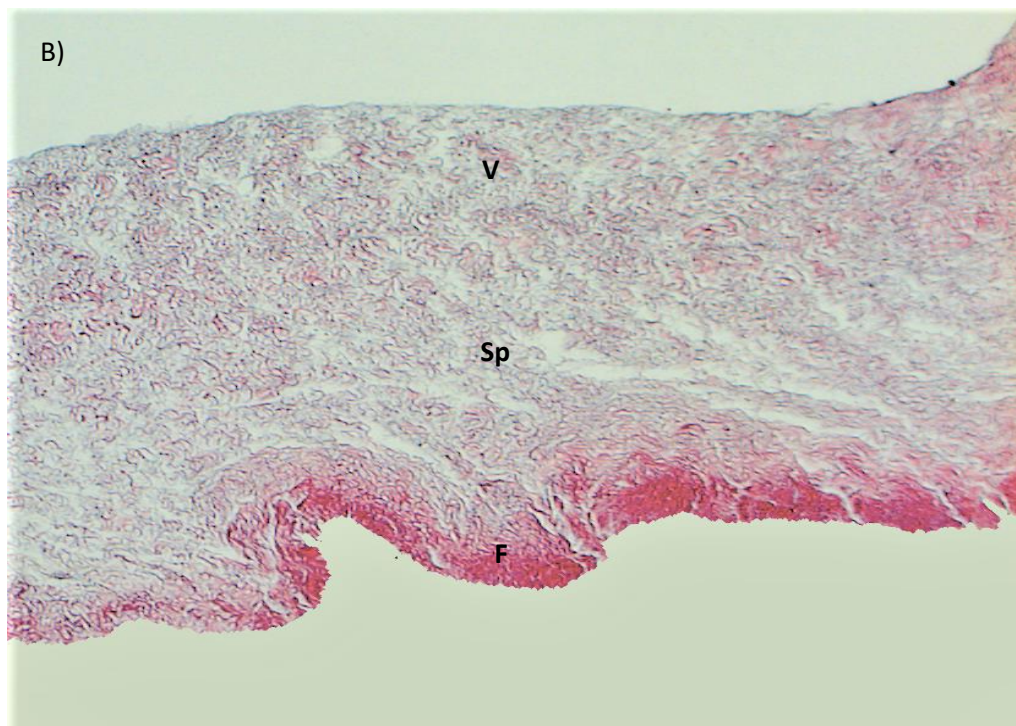


Abbildung 12: Repräsentative HE-Färbungen eines nativen und eines dezellularisierten porcinen Pulmonalklappensegels. A) natives Herzklappensegel: V=Ventrikularis, Sp=Spongiosa, F=Fibrosa, En=Endothel. B) dezellularisiertes Herzklappensegel: V=Ventrikularis, Sp=Spongiosa, F=Fibrosa.

Um den Erfolg der Dezellularisierung zu quantifizieren, wurden die vorliegenden DNA-Mengen in den nativen und dezellularisierten Herzklappensegel verglichen. Die nativen

Herzklappensegel wiesen einen DNA-Gehalt von 10.444,5 ng DNA/mg Trockengewicht auf. In den dezellularisierten Segeln konnten nur noch 216,9 ng DNA/mg Trockengewicht gemessen werden (Tabelle 1). Somit zeigte sich in den Herzklappensegeln durch das neu entwickelte Dezellarisierungsprotokoll eine signifikante Reduzierung der DNA-Menge um 97,9 % (Abbildung 13).

	DNA-Konzentration in ng/mg Trockengewicht	
	nativ	dezellularisiert
Mittelwert	10444,531	216,852
Standardabweichung	1499,946	194,959
%	100	2,076

Tabelle 1: Werte der DNA-Analyse der nativen und dezellularisierten Herzklappensegel.

Nativ: n=33 (Tabelle mit allen Einzelmessungen im Anhang unter 11)

Dezellularisiert: n=47 (Tabelle mit allen Einzelmessungen im Anhang unter 11)

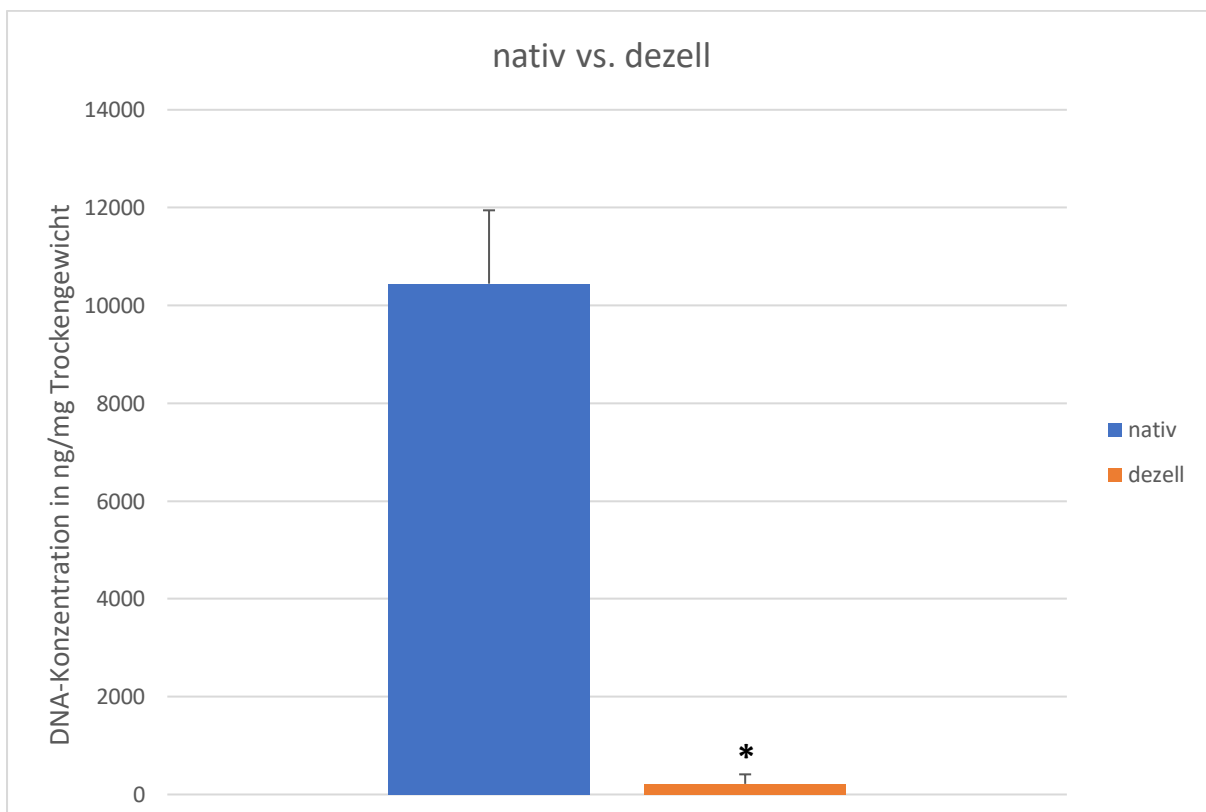


Abbildung 13: Säulendiagramm. Vergleich der DNA-Konzentrationen der nativen und dezellularisierten Herzklappensegel. Die obere Kante der Säule markiert den Mittelwert der jeweiligen Gruppe. Der Whisker zeigt den positiven Bereich der Standardabweichung an. Die statistische Signifikanz wurde mithilfe eines t-Tests für unabhängige Stichproben ermittelt (* $p < 0,05$).

3.1.3 Kontrollsegel

Die Messungen des DNA-Gehalts der dezellularisierten Kontrollsegel erfolgte nach einer 24-stündigen Inkubation der Segel bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit in oMSC-Medium. Der Mittelwert des DNA-Gehalts betrug 115,357 ng/mg Trockengewicht. Dies entspricht einem Verbleib von porciner DNA von 1,04 % und liegt damit bei den dezellularisierten Segeln im Bereich der Standardabweichung.

	DNA-Konzentration in ng/mg Trockengewicht
Mittelwert	115,357
Standardabweichung	96,067
%	1,036

Tabelle 2: Werte der DNA-Analyse der dezellularisierten Kontrollsegel.
n=6 (Tabelle mit allen Einzelmessungen im Anhang unter 11)

3.2 Ovine MSCs

3.2.1 Gewinnung und Kultivierung der ovinen MSCs

Die Gewinnung der ovinen MSCs (Abbildung 13) erfolgte weitestgehend nach dem Protokoll von Ute Degenhardt (50).

Die Hüften der schlachtwarmen Schafe wurden vor Ort vom Schlachter entnommen. Im Unterschied zur beschriebenen Vorgehensweise von Ute Degenhardt vergingen zwischen der Tiertötung und der Entnahme des Knochenmarks maximal drei Stunden. Außerdem wurden die Hüften bis zur Probenentnahme nicht bei RT, sondern in einer 4 °C kalten Transportlösung ins Labor transportiert, um die Zellen bestmöglich zu schützen. Die Hüftknochen wurden nicht nur im Labor vor der Entnahme des Knochenmarks mit 70 % EtOH abgespült, sondern in einem ersten Schritt schon beim Schlachter vor dem Transport. Die Transportlösung bestand aus PBS 1x mit 1 % Penicillin Streptomycin und 1 % Amphotericin B. Die Entnahme des ovinen Knochenmarks unter der Sterilwerkbank erfolgte gemäß dem Protokoll. Es wurden pro halbiertem ovinen Becken je drei 25-cm²-Zellkulturflaschen mit den entnommenen Proben beschickt. Der erste Mediumwechsel erfolgte auch hier nach 24 Stunden. Nach Abnahme des alten Mediums wurde nicht direkt neues Medium hinzugegeben, sondern die Proben wurden als Zwischenschritt einmal mit auf 37 °C vorgewärmtem PBS gespült. Im Anschluss wurde

neues 37 °C warmes oMSC-Medium hinzugegeben. Nun erfolgte alle zwei Tage ein Mediumwechsel. Der restliche Vorgang erfolgte gemäß dem oben erwähnten Protokoll.

So konnte eine Methode etabliert werden, mit der man die ovinen MSCs aus rotem Knochenmark isolieren konnte und nach bereits 10 Tagen Zellkultivierung ausreichend oMSCs für die Besiedlung von 6 porcinen Herzklappensegeln zur Verfügung stehen hatte.

3.2.2 Charakterisierung der ovinen MSCs

Die erfolgreiche Isolierung der ovinen MSCs aus dem roten Knochenmark wurde durch die typische Zellmorphologie und die Expression bestimmter Oberflächenmarker bestätigt. Lichtmikroskopisch zeigten sich erstmals an Tag 3 eine Vermehrung von mononuklearen spindelförmigen Zellen, die sich am Boden der Zellkulturflasche als Einzelschicht anordneten (Abbildung 14). Sie wiesen eine Kunststoffadhärenz auf.

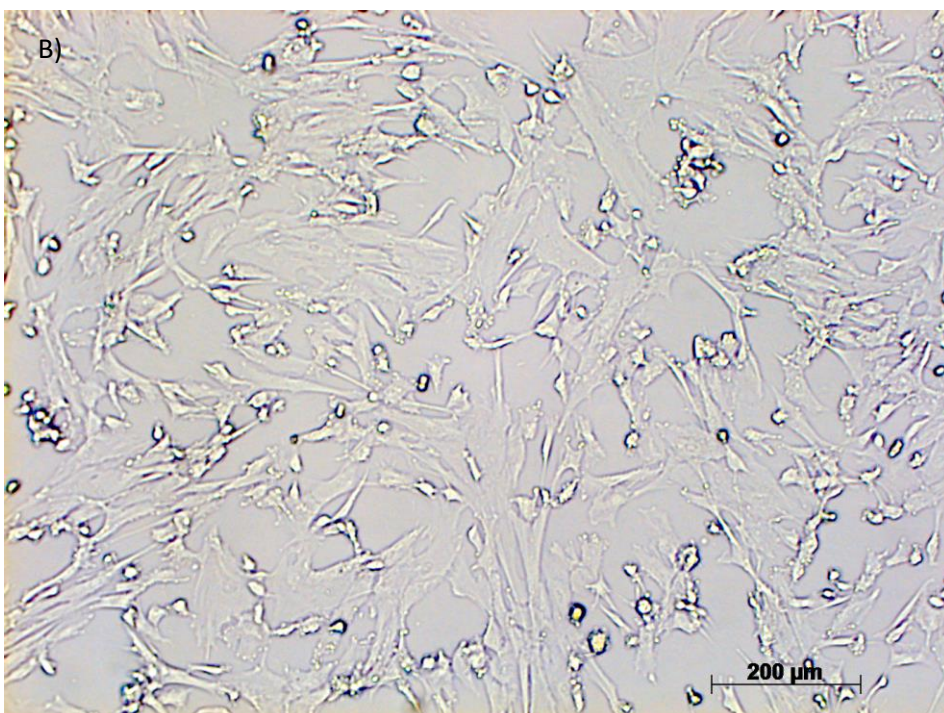
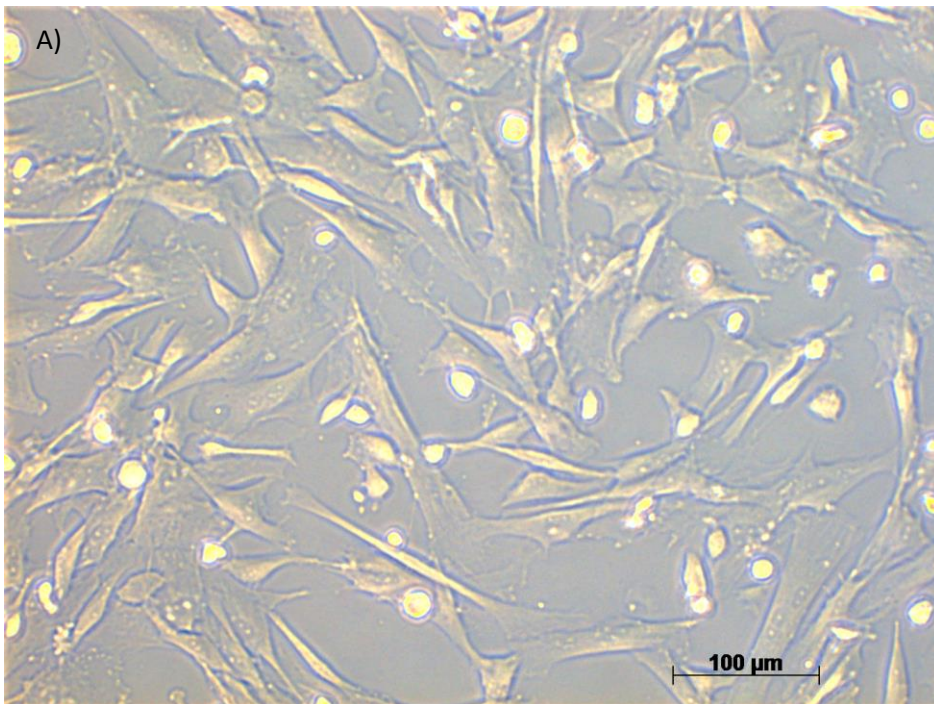


Abbildung 14: Lichtmikroskopische Aufnahmen der kunststoffadhärenten spindelförmigen ovinen MSCs in der Zellkultur. A) nach 13 Tagen und B) nach 28 Tagen.

Mithilfe der Durchflusszytometrie ließ sich ein Profil der Oberflächenmarker der ovinen MSCs ermitteln (Abbildung 15). Dies erfolgte angelehnt an die bereits gut erforschten Oberflächenmarker von humanen MSCs. Dafür wurden Messungen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern durchgeführt und ausgewertet. Im oberen linken Bild der Abbildung bildet jeder

Punkt ein gemessenes Signal ab. Um die für uns relevante Teilgesamtheit der Zellen auszuwählen, wurden mittels Gating-Strategie eine Vorauswahl der Rohdaten vorgenommen. Durch das Gate R-1 wurden Zelltrümmer aussortiert und die neue Teilgesamtheit der Messdaten im oberen rechten Bild zusammengefasst. In einem zweiten Schritt wurden mittels Gate R-2 aneinanderklebende Zellen und Zellhaufen aussortiert. Die relevanten Messdaten wurden im unteren Abschnitt der Abbildung als Histogramm dargestellt. Es zeigt die Verteilung der Fluoreszenzintensitäten der Einzelmessungen anhand einer relativen Skala. Die Oberflächenantikörper CD44 und CD166 riefen ein positives Fluoreszenzsignal hervor (weiß), die Oberflächenantikörper CD31 und CD45 zeigten kein positives Ergebnis. Bei den isolierten Zellen handelt es sich folglich um $CD31^-CD44^+CD45^-CD166^+$ Zellen.

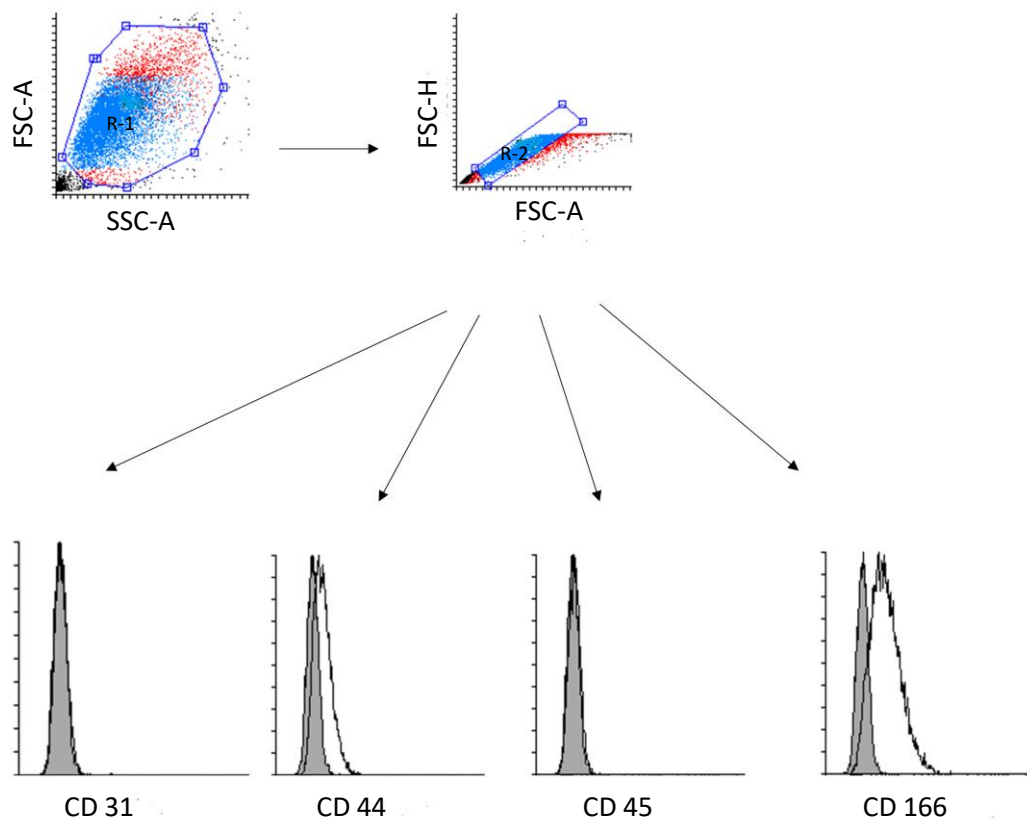


Abbildung 15: Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenmarker der ovinen MSCs. Weiß: positives Fluoreszenzsignal in der Gruppe der ovinen MSCs, grau: Negativkontrolle.

3.3 Besiedlung

3.3.1 Vergleich von dezellularisierten und besiedelten Segeln

Der Verlauf der statischen Besiedlung wurde makroskopisch dokumentiert und der Erfolg anschließend mittels Histologie und Messung des DNA-Gehalts ermittelt. Nach einer zweiwöchigen Besiedlungsdauer wurden die besiedelten Segel mit den dezellularisierten Segeln verglichen (siehe Abbildung 16). Die Segel hatten wieder eine rosige Farbe angenommen und schienen nicht mehr so weißlich und durchscheinend wie zum Zeitpunkt nach der Dezellularisierung. Allerdings präsentierten sich die besiedelten Segel zusammengerollt (Abbildung 16).



Abbildung 16: Besiedeltes Herzklappensegel an Tag 14 der Besiedlung.

Die HE-Färbung der besiedelten dezellularisierten Herzklappensegel wies eine gut erhaltene Ultrastruktur auf und es ließ sich die bekannte innere Dreischichtung des Segels erkennen. Blau angefärbte Zellkerne der zur Besiedelung verwendeten oMSCs konnte nicht identifiziert werden (Abbildung 17).

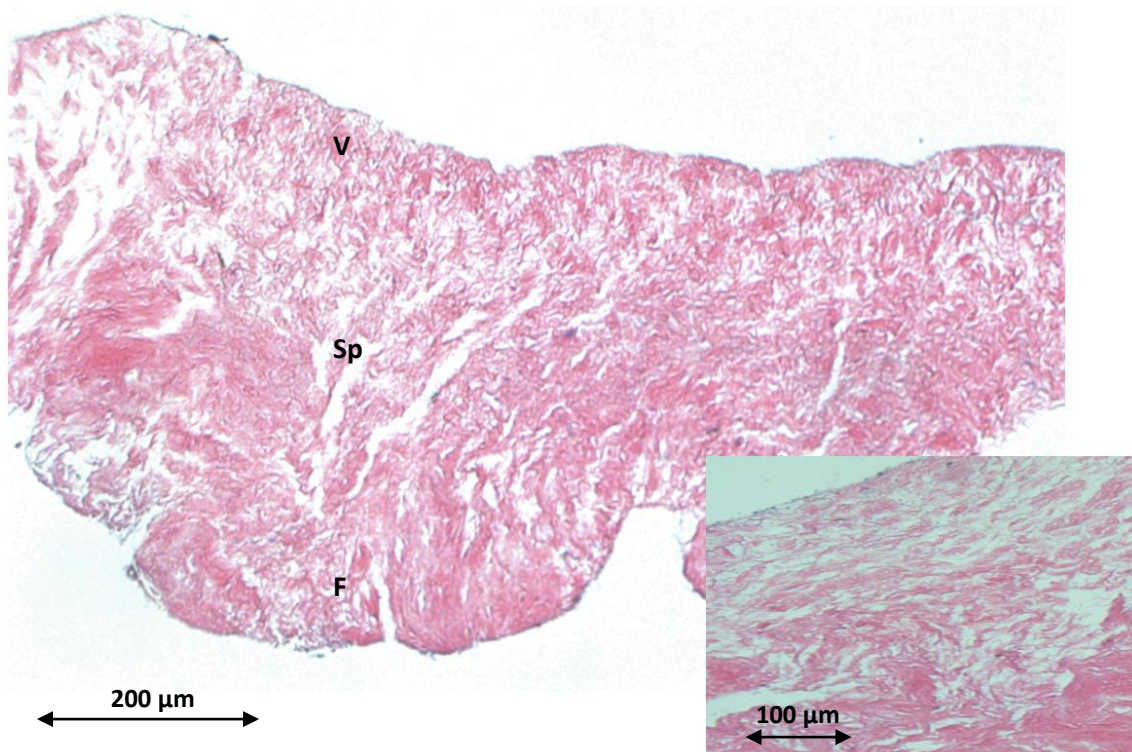


Abbildung 17: Repräsentative HE-Färbung eines besiedelten, zuvor dezellulierten Herzklappensegels. V=Ventrikularis, Sp=Spongiosa, F=Fibrosa

Um die Besiedelung zu quantifizieren, wurde der DNA-Gehalt der besiedelten Segel analysiert (Tabelle 3). Hierbei wiesen die besiedelten Segel einen Gehalt von 117,8 ng DNA/mg Trockengewicht auf. Somit ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den unbesiedelten dezellulierten (siehe Tabelle 1) und besiedelten dezellulierten Herzklappensegeln (Abbildung 18).

Besiedelte Segel:

	DNA-Konzentration in ng/mg Trockengewicht
Mittelwert	117,818
Standardabweichung	118,487
%	1,128

Tabelle 3: Werte der DNA-Analyse der besiedelten Herzklappensegel.
n=12 (Tabelle mit allen Messungen unter 11)

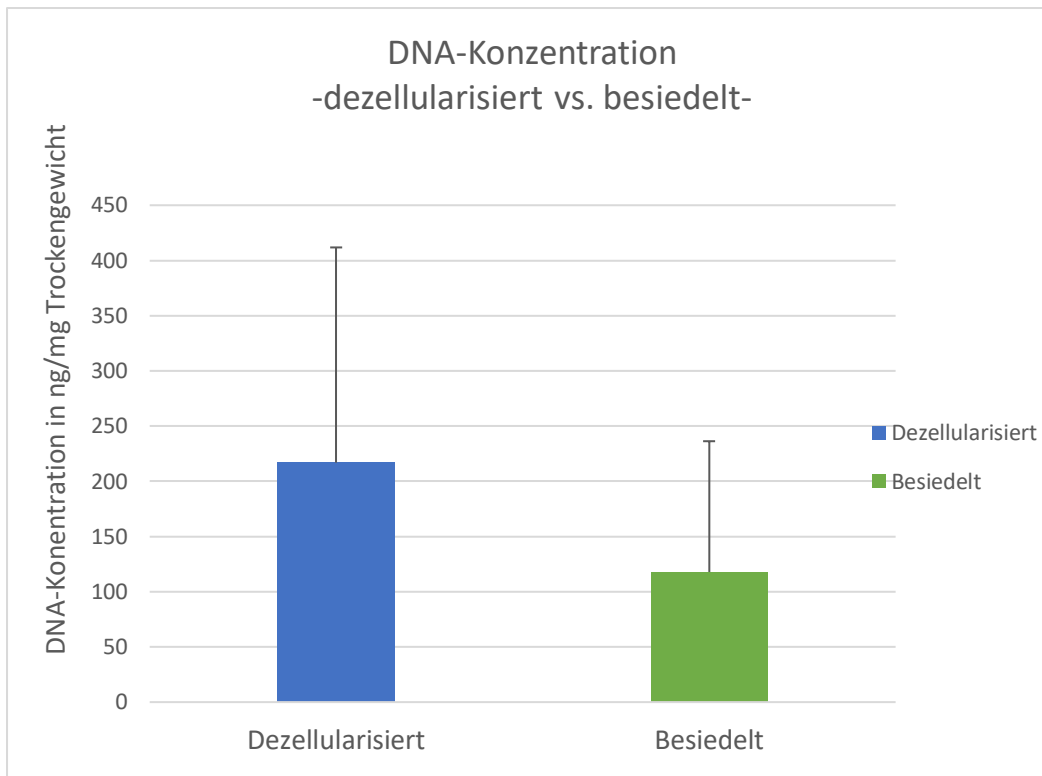
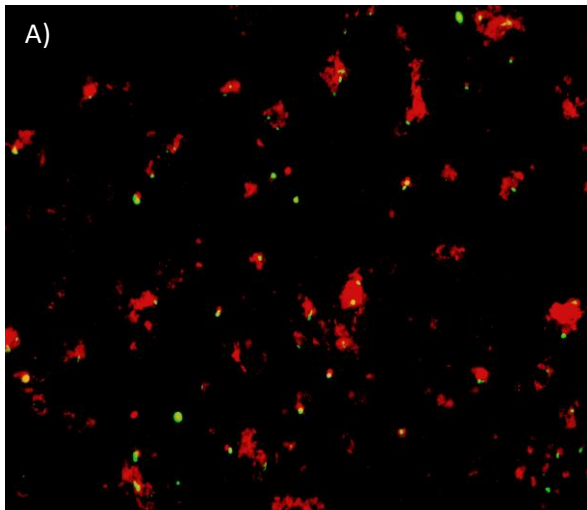


Abbildung 18: Säulendiagramm. Vergleich der DNA-Konzentrationen der dezellularisierten und besiedelten Herzklappensegel. Die obere Kante der Säule markiert den Mittelwert der jeweiligen Gruppe. Der Whisker zeigt den positiven Bereich der Standardabweichung an.

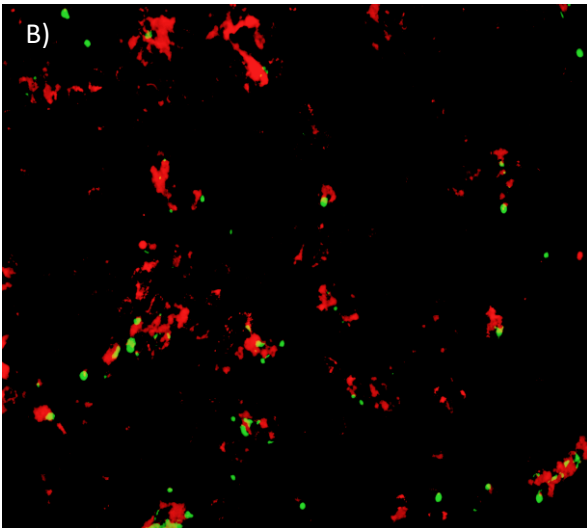
3.4 Toxizitätsanalyse

Um ein mögliches Vorliegen von toxischen Residuen der Inhaltsstoffe der Dezellularisierungslösung in den für die Besiedlung verwendeten Herzklappensegeln auszuschließen, führten wir eine Toizitätsanalyse durch. Zwischen den Zellen, die mit frischem Medium inkubiert wurden und den Zellen, die mit dem Überstand eines dezellularisierten Segels inkubiert wurden, war lichtmikroskopisch kein beachtlicher Unterschied zu erkennen. Es sind in beiden Bildern deutlich mehr vitale (orange gefärbt) als tote Zellen (grün gefärbt) zu erkennen (Abbildung 19, Bild A und B). Das lässt darauf schließen, dass keine zytotoxische Wirkung des Überstandes der dezellularisierten Segel auf die ovinen MSCs ausging. Im Vergleich dazu zeigt sich in der Positivkontrolle, in welcher die Zellen mit Lysepuffer inkubiert wurden, ein starker Anstieg an avitalen Zellen (Abbildung 19, Bild C).

Zellen + Medium



Zellen + Überstand



Zellen + Lysepuffer

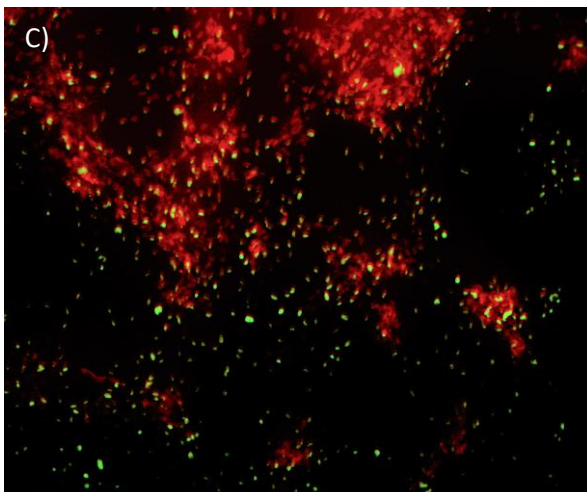


Abbildung 19: Toxizitätsanalyse. A) Zellen+Medium, B) Zellen+Überstand, C) Zellen+Lysepuffer. Rot=vitale Zellen, grün=tote Zellen

3.5 Einrollen der Segel bei ersten Besiedlungsversuchen mit ovinen MSCs

Während der statischen Besiedlung der porcinen Pulmonalklappensegel mit ovinen MSCs fiel auf, dass sich die Segel schon innerhalb der ersten Besiedlungstage aufrollten. Bereits 48 Stunden nach der Besiedlung fingen die Ränder der Pulmonalklappensegel an sich nach oben zu biegen und sich schließlich gänzlich zusammen zu rollen (Abbildung 20).

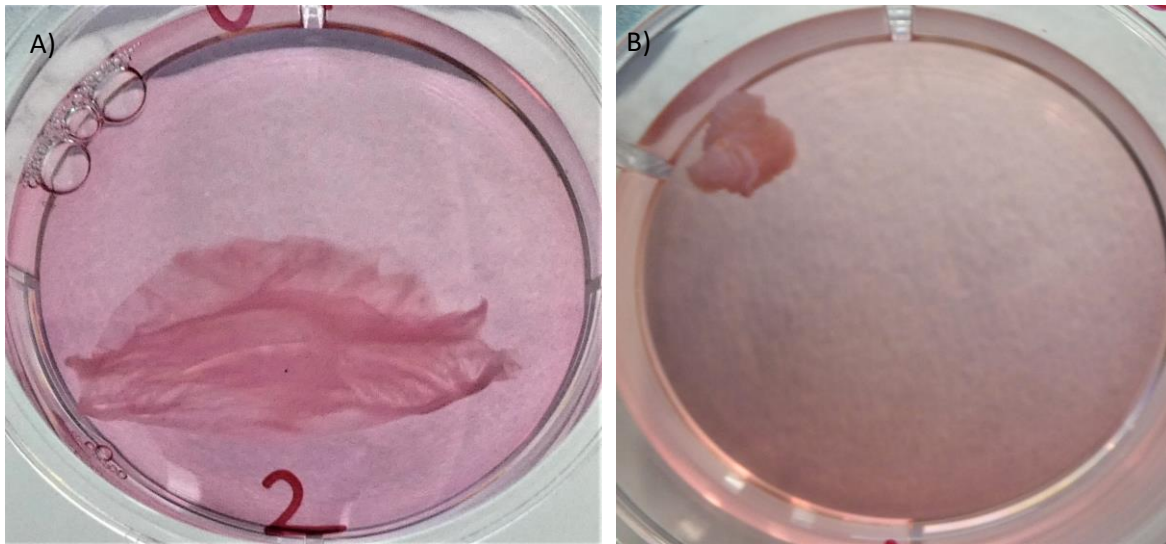


Abbildung 20: 6-Lochplatte mit besiedelten Herzklappensegeln an Tag 1 und Tag 7 der Besiedlung. A) Tag 1 der Besiedlung. B) Tag 7 der Besiedlung. Die Herzklappensegel haben sich eingerollt.

Unter dem Lichtmikroskop betrachtet fiel auf, dass die ovinen MSCs zum größten Teil frei im Medium flottierten und nicht an den Segeln anhafteten.

Insgesamt ist festzustellen, dass die DNA-Konzentration der dezellularisierten Segel deutlich geringer als die der nativen Segel ist. Dies spiegelt den Erfolg des verkürzten Dezellularisierungsprotokolls wider. Die DNA-Konzentration der besiedelten Segel liegt unter dem Mittelwert der dezellularisierten Segel. Der Versuch einer statischen Re-Besiedlung der dezellularisierten porcinen Herzklappensegel mit ovinen MSCs ist folglich nicht geglückt.

Im Rahmen der Fehlersuche wurde ein Zytotoxizitätstest durchgeführt. Hierbei konnten keine toxischen Rückstände der Dezellularisierungslösung für den fehlenden Besiedlungserfolg verantwortlich gemacht werden. Weitere mögliche Ursachen, wie ungeklärte Reaktionen zwischen den ovinen MSCs und dem porcinen Gewebe der Herzklappensegel oder mangelnde Stimulation im Rahmen der statischen Besiedlung sind zu diskutieren.

4 Diskussion

Herzklappenerkrankungen gehören mit ihrer steigenden Prävalenz zu den häufigsten Todesursachen weltweit. Der bisherige Herzklappenersatz weist aufgrund der Struktur und der Eigenschaften der Herzklappenprothesen verschiedene Limitierungen auf, wie Immunogenität, Thrombogenität, Kalzifizierung, eine begrenzte Haltbarkeit und fehlendes Anpassungs- und Wachstumsvermögen (51). Das kardiovaskuläre Tissue Engineering zeigt in dieser Hinsicht einen vielversprechenden Ansatz, der die bisherigen Limitierungen überwinden könnte. Aktuell werden bevorzugt zwei unterschiedliche Typen von Grundgerüsten für das Tissue Engineering verwendet: dezellularisierte Herzklappen und synthetisch hergestellte Grundgerüste. Dezellularisierte Grundgerüste scheinen eine vielversprechende Wahl für das kardiovaskuläre Tissue Engineering zu sein. Sie können allogenen oder xenogenen Ursprungs sein. Im Hinblick auf die mangelnde Verfügbarkeit von allogenen menschlichen Herzklappen scheinen die xenogenen dezellularisierten Herzklappen die beste Alternative zu sein, auch wenn hier größere immunogene Hürden überwunden werden müssen. Das Konzept ist die Besiedlung eines biologischen Grundgerüsts mit autologen Zellen und die anschließende Kultivierung und Konditionierung *in vitro* unter nativ-ähnlichen Bedingungen (52). So soll ein vitaler, dynamischer Herzklappenersatz ohne immunogenes Potential entstehen, der sich *in vivo* gut in den Empfängermechanismus integrieren kann.

4.1 Dezellularisierungsmethoden

Der Aufbau und die mechanischen Eigenschaften von nativen Herzklappensegeln sind hochkomplex und einzigartig. Die Herstellung eines geeigneten Herzklappenersatzes, der einer nativen Herzklappe in Funktion und Haltbarkeit ähnelt und antithrombogen und immunneutral ist, bleibt weiter Gegenstand der Forschung. Die Nutzung von xenogenen Herzklappen ist gebräuchlich. Deshalb wurden in dieser Arbeit dezellularisierte Segel einer porcinen Pulmonalklappe als biologisches Grundgerüst gewählt. In der Literatur sind verschiedene Dezellularisierungsmethoden für Herzklappensegel zu finden, die sich hauptsächlich in chemische, biologisch enzymatische und nicht-enzymatische Wirkweisen einteilen lassen. Häufig werden diese Verfahren miteinander kombiniert. Die Wahl der geeignetsten Methode ist von vielen Faktoren abhängig. Erfolgsentscheidend ist zum einen die möglichst vollständige Entfernung des immunogenen zellulären Materials und zum

anderen der bestmögliche Erhalt der EZM als Grundgerüst für die Re-Besiedlung. Hier ist eine genaue Abwägung erforderlich, da die Zellbeseitigung meist auf Kosten der Unversehrtheit der EZM geht. Als Standard galt lange Zeit die Dezellularisierung mit der Serinprotease Trypsin in Kombination mit dem Chelatkomplexbildner EDTA (24). Von Rieder *et al.* durchgeführte Dezellularisierungen porciner Herzklappen mit Trypsin-EDTA zeigten jedoch den Verbleib xenogener Zellen (53). Vergleichbare Ergebnisse konnten auch in Dezellularisierungsversuchen unserer Arbeitsgruppe festgestellt werden (54). Eine anschließend von uns durchgeführte Vergleichsstudie mehrerer Dezellularisierungsmethoden bestätigte diese Ergebnisse. Bei der Dezellularisierung mit Trypsin-EDTA konnten etwa 20 % der DNA nicht entfernt werden und die Ultrastruktur des Gewebes wurde beschädigt (26). In dieser Studie wurde eine weitere Methode zur Dezellulaisierung unter der Verwendung von Accutase (proteolytische und kollagenolytische Enzyme) in Kombination mit den Nukleasen RNase und DNase eingeschlossen. Hier zeigte sich eine fast vollständige Dezellularisierung, jedoch mit einer Beschädigung der Ultrastruktur der verwendeten Herzklappensegel (26). Die ist wahrscheinlich auf die proteolytischen und kollagenolytischen Eigenschaften der Accutase zurückzuführen.

Weit verbreitet ist die Nutzung von Detergenzien im Bereich des kardialen Tissue Engineerings. Detergenzien sind sehr effektiv in der Entfernung zellulären Materials. Sie sind in der Lage, Membranproteine aus den Zellmembranen heraus zu lösen und sie dadurch permeabel zu machen und DNA von Proteinen zu lösen (55). Die kombinierte Verwendung von SDS und Triton X-100 ermöglicht die Herstellung einer zellfreien, biologischen, kardialen Matrix mit intakter Ultrastruktur (56,57). Sierad *et al.* beschrieb die Verwendung von Detergenzien zur Dezellularisierung von Herzklappen, in diesem Fall SDS und Triton X-100, zusammen mit Nukleasen. Dieses Dezellularisierungsprotokoll zeigte in der histologischen Auswertung und in der DNA-Analyse eine vollständige Entfernung der zellulären Bestandteile sowie einen guten Erhalt der azellulären Gewebestrukturen (58). Der Nachteil dieser Methode ist die lange Dauer von 21 Tagen. Ziel dieser Arbeit war es, eine Dezellularisierungsmethode mit geringem Zeitaufwand zu entwickeln, die die zellulären Bestandteile zuverlässig entfernt, ohne dabei die Gewebestruktur zu verletzen. Ein verkürztes Dezellularisierungsprotokoll bietet die Vorteile, dass das zu dezellularisierende Gewebe weniger strapaziert wird, der Zeitaufwand für einen Besiedlungsversuch im Labor deutlich reduziert wird und das Vorgehen so reproduzierbarer ist und Ressourcen geschont werden. In dieser Studie wurde eine

Kombination aus Triton X-100 und den Nukleasen DNase und RNase für die Dezellularisierung der porcinen Herzklappensegel verwendet (siehe 3.1). Verglichen mit der Methode von Sierad *et al.* konnte hier das Dezellularisierungsprotokoll auf eine Dauer von 5 Tagen verkürzt werden. DNA-Analysen zeigten eine Entfernung des zellulären Materials von 97,8 % und die Herzklappensegel präsentierten nach der Dezellularisierung eine unbeschädigte Ultrastruktur. Allgemein angenommene Kriterien für eine erfolgreiche Dezellularisierung in diesem Forschungsbereich sind <50 ng doppelsträngige DNA (dsDNA) pro Milligramm Trockengewicht der EZM, eine DNA-Fragmentlänge von <200 Basenpaaren und das Fehlen von sichtbaren Zellkernen in der 4',6-Diamidino-2-phenylindol-Färbung (DAPI) oder in der HE-Färbung (55). In dieser Arbeit konnte durch die genutzte Dezellularisierungsmethode eine Verminderung des nativen DNA-Gehaltes auf im Mittel 231,705 ng/mg Trockengewicht erzielt werden. Dieser Wert liegt etwas über dem genannten Zielwert von <50 ng dsDNA pro mg Trockengewicht. Die Dezellularisierungsmethode kann den DNA-Gehalt effektiv vermindern, bedarf aber einer weiteren Erprobung und ggf. Optimierung. Die DNA-Fragmentlänge wurde in dieser Arbeit nicht untersucht.

Neuere Studien zeigen, dass eine Azellularität der xenogenen Grundgerüste trotzdem keine Garantie für eine immunogene Kompatibilität zwischen dem dezellularisierten Gewebe und den verwendeten Zellen für die Re-Besiedlung darstellt (27,59). Auch die dezellularisierten Gewebe sind in der Lage Entzündungs- und Abstoßungsreaktionen hervorzurufen. Von großer Bedeutung im Hinblick auf eine immunogene Verträglichkeit scheinen auch die Struktur und die Zusammensetzung der Proteine im xenogenen Grundgerüst zu spielen (55). Nicht nur xenogene Zellreste, sondern auch in den xenogenen Grundgerüsten enthaltene Antigene können zu Unverträglichkeitsreaktionen führen (27).

4.2 Zellen für die Besiedlung

Im Bereich des kardialen Tissue Engineerings wurden verschiedene Zellen für die Besiedlung erprobt. Gebräuchlich ist die Verwendung sowohl von differenzierte Zellen, als auch von Progenitorzellen, beispielsweise valvuläre interstitielle Zellen (VICs), valvuläre endotheliale Zellen (VECs), mesenchymale Stammzellen (MSCs), knochenmarksentstammende mononukleäre Zellen (MNCs), Fibroblasten, EPCs und kardiale Stammzellen (CSCs) (60,61).

Für die Besiedlung im Rahmen dieses Forschungsvorhabens wurden multipotente ovine MSCs genutzt. Durch ihr Potenzial, sich in verschiedene Zelltypen zu differenzieren und ihrer

phänotypischen Ähnlichkeit zu glatten Muskelzellen und Fibroblasten, scheinen sie eine potenzielle Zellquelle für das kardiale Tissue Engineering zu sein (62). Bei beschriebenen Besiedlungsversuchen mit humanen MSCs konnten in den Herzklappensegeln Fibroblasten, Myofibroblasten und glatte Muskelzellen, sowie eine oberflächliche Rezellularisierung mit Endothelzellen nachgewiesen werden (63). Die Zellen sollten in die Herzklappensegel einwandern und eine bioaktive Matrix entstehen lassen, die nicht-immunogen und antithrombogen ist und ein Wachstums- und Anpassungspotential hat (52). Im Vergleich zu den humanen MSCs wurde die Besiedlung mit ovinen MSCs bisher kaum untersucht. Da für die Entwicklung von tissue-engineerten Herzklappen jedoch Großtierversuche unausweichlich sind, ist die Erprobung von oMSCs für den Großtierversuch am Schaf ein wichtiger Schritt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde als Quelle das ovine rote Knochenmark verwendet und eine Methode zur Gewinnung der Zellen erarbeitet. Der Vorteil dieser Methode ist, dass die Gewinnung unabhängig vom Geschlecht des Tieres erfolgen kann und keine vorangegangene Trächtigkeit vonnöten ist. Bei der erprobten Isolierung von oMSCs aus Nabelschnurgewebe (39) und Fruchtwasser (40) ist diese Unabhängigkeit nicht gegeben.

Für die Charakterisierung der ovinen MSCs orientierten wir uns an den festgelegten Kriterien der *International Society for Cellular Therapy* für humane MSCs (41). Die isolierten Zellen zeigten eine Plastikadhärenz und wiesen eine optische Ähnlichkeit zu Fibroblasten auf. Das durchflusszytometrisch ermittelte Oberflächenmarkerprofil zeigte, dass die isolierten oMSCs CD44 und CD166 positiv sowie CD31 und CD45 negativ waren. Diese identifizierten Marker stimmen nur zum Teil mit den definierten Oberflächenmarkern für MSCs der *International Society for Cellular Therapy* aus dem Jahr 2006 überein. Diese fordert eine Exprimierung von CD105, CD73 und CD90 und ein Fehlen der Oberflächenmarker CD45, CD34, CD14 oder CD11b, CD79alpha oder CD19 und HLA-DR (41). In der Zwischenzeit konnten allerdings weitere Oberflächenmarker für humane MSCs identifiziert werden. So wurde in einer Arbeit von Haddouti *et al.* die Exprimierung von CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166 und das Fehlen von CD14, CD34, CD45, HLA-DR sowohl bei humanen MSCs als auch bei ovinen MSCs beschrieben (64). Da im Rahmen dieser Arbeit neben der Plastikadhärenz und dem phänotypischen Aussehen, jedoch nur vier Oberflächenmarker zur Charakterisierung der oMSCs untersucht wurden, liegt hier eine Limitierung der Arbeit vor. Zur weiteren Spezifizierung könnte man weitere Oberflächenmarker untersuchen, beispielsweise CD29, CD13, CD90 und CD106, die in der Literatur ein positives Signal zeigen (39,64,65). Ebenso kann

man eine Kreuzreaktivität von monoklonalen Antikörpern gegen CD73, CD90, CD105, CD271 und MHC-1 finden, die sich normalerweise gegen humane MSCs richten (66). Zu den Oberflächenmarkern mit negativem Signal könnte man noch die weiteren Marker CD117, MHC-2 (66) und CD34, CD14, CD11b, CD19 und HLA-DR (64,67) hinzufügen. Schafsspezifische Oberflächenmarker zu identifizieren, bleibt Gegenstand der Forschung. Zurzeit gilt es die beste Zusammensetzung von Oberflächenmarkern für die Identifikation der oMSCs zu definieren. Die große Variabilität innerhalb der bestimmten Oberflächenmarker ist auch auf fehlende Standards bei der Zellkultur und der Immunphänotypisierung zurückzuführen (68). Ein anderer Ansatzpunkt bei der Charakterisierung der oMSCs ist das Differenzierungspotenzial in Osteo-, Chondro- und Adipozyten mit der einhergehenden Expression bestimmter Gene und Oberflächenmarker (37,65,69). Indem man die Zellen in speziellen Medien kultiviert, kann untersucht werden, ob eine Multipotenz der Zellen vorliegt. Zhao *et al.* konnten die beschriebenen Differenzierungspotenziale der oMSCs bereits nachweisen (39). Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Differenzierungspotenzial der oMSCs nicht untersucht. Für eine vollständige Charakterisierung der oMSCs muss die Multipotenz der Zellen jedoch analysiert werden.

Autologe Zellen sind die erste Wahl im Bereich des kardialen Tissue Engineerings. Sie können bei ihrer Gewinnung von alten oder kardiovaskulär Erkrankten jedoch Funktionseinschränkungen aufweisen (70). Von besonderem Interesse ist das hohe Differenzierungspotenzial von embryonalen Stammzellen. Da die Gewinnung und Verwendung in Deutschland verboten ist, gelten die induziert pluripotente Stammzellen (iPSCs) als vielversprechende Alternative. Hierbei werden somatische Zellen wieder in einen pluripotenten Zustand zurückversetzt (71). So könnte man die Problematik der dysfunktionalen autologen Zellen von Erkrankten umgehen und autologe, funktionale und differenzierungsfreudige Zellen programmieren. Die somatischen Zellen können ohne größere Eingriffe am lebenden Organismus gewonnen werden und es ist keine Tötung von Embryonen erforderlich. Untersuchungen zeigen jedoch auch Risiken für die therapeutische Nutzung von iPSCs auf. So können genetische und epigenetische Anomalien zu Störung in der Reprogrammierung und in der Zellkultivierung führen. Außerdem scheinen iPSCs ein erhöhtes Risiko einer kanzerogenen Entartung aufzuweisen und es konnten immunogene Reaktionen im Zusammenhang mit iPSCs-basierter Therapie beobachtet werden (72).

4.3 Mögliche Ursachen für den ausbleibenden Besiedlungserfolg

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für die Besiedlung der Segel die isolierten oMSCs, dezellularisiert mit der neu entwickelten Methode, eingesetzt. In einem ersten Ansatz wurde ein Besiedlungszeitraum von 14 Tagen unter statischen Bedingungen gewählt. Während des Besiedlungsprozesses fielen morphologische Veränderungen der Herzklappensegel auf. Die Segel rollten sich innerhalb der ersten Tage ein. Nach Beendigung der Besiedlung konnte histologisch keine Anhaftung der ovinen MSCs an der Oberfläche der Segel festgestellt werden. Auch die Messung des DNA-Gehaltes zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den dezellularisierten und den besiedelten Herzklappensegeln.

Die Gründe hierfür müssen schnellstmöglich erforscht werden, damit in naher Zukunft eine Evaluation von tissue-engineerten Herzklappen im Großtiermodell Schaf stattfinden kann. Eine Ursache, die eine Besiedlung erschwert haben könnte, wäre das Vorliegen von toxischen Residuen der Inhaltsstoffe der Dezellularisierungslösung in den für die Besiedlung verwendeten Herzklappensegeln. Die Ergebnisse der zu diesem Zweck durchgeführten Toxizitätsanalyse lieferten jedoch keine Hinweise auf eine ausgehende Toxizität der dezellularisierten Segel. In einer Arbeit von *Rieder et al.* wurde die Dezellularisierung von porcinen Herzklappensegel mit vergleichbaren Detergenzien durchgeführt, die anschließenden Waschschriffe mit PBS sind jedoch zahlreicher und die Ultrastruktur in der nachfolgenden Analyse nicht beschädigt (73). Eine weitere Möglichkeit, um verbliebene Detergenzien auszuwaschen, wäre die Behandlung der Herzklappensegel mit 70 %-igem Ethanol als Zwischenschritt (58). Dieser Schritt würde jedoch möglicherweise eine Beschädigung der Herzklappensegel nach sich ziehen. Ein weiterer Ansatz wäre, die Segel in Anlehnung an die dezellularisierten Kontrollsegel nach den durchgeführten Waschschriffen noch weitere 24 Stunden in oMSC-Medium zu inkubieren und im Anschluss erst mit der Besiedlung zu beginnen. Gegebenenfalls würden sich noch aktive Enzyme der Dezellularisierungslösung in dieser Zeit abschwächen. Um in weiteren Untersuchungen mögliche Langzeitwirkungen von eventuell enthaltenen Rückständen der Dezellularisierungslösung sicher auszuschließen, könnte man weitere Waschschriffe ins Protokoll aufnehmen.

Ein weiterer Grund für die schlechte Besiedlungseffizienz könnte die Gewebeveränderung der Segel während der Besiedlung sein. Auch wenn die Dezellularisierung der xenogenen Herzklappensegel sehr effektiv ist, so kann eine Besiedlung nur erfolgreich verlaufen, wenn

die Segel während des Prozesses entfaltet bleiben. Doch schon zu Beginn der Besiedlung begannen sich die Segel einzurollen. So stand den ovinen MSCs weniger Segeloberfläche zur Verfügung, an der sie anhaften konnten. Möglich wäre auch, dass das Einrollen der Segel eine Reaktion in den Zellen auslöste, die letztendlich zum Absterben der oMSCs geführt hat. Ursächlich für dieses Einrollen der dezellularisierten Segel könnte eine Veränderung des bindegewebigen Grundstocks der Herzklappensegel durch Autolyse oder durch eine Verschiebung des Wassergehaltes des Gewebes *post mortem* sein. Möglicherweise sind in den Segeln auch einige glatte Muskelzellen enthalten, die sich *post mortem* kontrahieren und so das Zusammenrollen bewirken. Eine weitere Ursache für das in dieser Studie beobachtete Einrollen der Segel könnte eine ungeklärte Reaktion zwischen den ovinen MSCs und dem porcinen Gewebe der Herzklappensegel sein. Immunogene Reaktionen auf xenogenes, dezellularisiertes Gewebe wurden in zahlreichen Studien beschrieben. So zeigte sich eine Aktivierung von Thrombozyten (59), eine Aktivierung des Komplementsystems (74) und eine verstärkte Antwort verschiedener Immunzelltypen (73–76). Die Reaktionen können durch die Persistenz von Antigenen in den xenogenen Grundgerüsten hervorgerufen werden (27). Ein Beispiel für ein schweinespezifisches Antigen, welches nach herkömmlichen Dezellularisierungsmethoden zu persistieren scheint und Immunreaktionen hervorrufen kann, ist alpha-Gal (77). Für die Entfernung spezifischer Xenoantigene wurden im Laufe der letzten Jahre spezifische Methoden entwickelt. Ein Beispiel ist die Entfernung von alpha-Gal-Epitopen durch den Einsatz von alpha-Galaktosidase (78).

In dieser Studie wurden die porcinen Herzklappensegel statisch über 14 Tage unter gleichbleibenden Bedingungen besiedelt. Es ist zu prüfen, ob die statische Besiedlung für ovine MSCs ungeeignet ist und sich aufgrund einer mangelnden Stimulierung und Konditionierung der Zellen kein Besiedlungserfolg einstellte (30). Gegebenenfalls muss eine dynamische Besiedlung unter nativ-ähnlichen Bedingungen im Bioreaktor stattfinden. In der Literatur sind erfolgreiche Besiedlungen mit humanen MSCs unter dynamischen Bedingungen beschrieben (79–83). Dabei erfolgt eine Konditionierung der Herzklappen *in vitro* um das entstehende Gewebe auf die komplexen hämodynamischen Bedingungen nativer Herzklappen vorzubereiten (84). Durch eine pulsatile Konditionierung (85) können die physiologischen Druck- und Flusseigenschaften simuliert werden, denen eine native Herzklappe ausgesetzt ist. Durch Konvektion können Temperatur, pO₂, pCO₂ und der pH-Wert im Medium und im Gewebe konstant gehalten werden (86). Auch die Einstellung nicht-physiologischer

Konditionierungsparameter im Bioreaktor könnten bei der Besiedlung positive Effekte haben, beispielsweise eine Hypoxämie oder hohe Drücke (87). Obwohl sich das Schaf als Tiermodell im Bereich des kardialen Tissue Engineerings etabliert hat, gibt es bislang kaum Informationen über den Gebrauch von ovinen MSCs für Re-Besiedlungen von Herzklappen im Zuge präklinischer Studien. Es gilt in Zukunft zu untersuchen, inwieweit sich die neusten Erkenntnisse im Bereich des kardialen Tissue Engineerings mit humanen MSCs auf die ovinen MSCs übertragen lassen. Die Optimierung der Parameter und die Etablierung einer Methode für die dynamische Besiedlung mit ovinen MSCs bleibt Bestandteil der weiteren Forschung.

5 Fazit und Ausblick

Herzklappenerkrankungen sind ein bedeutsames Erkrankungsspektrum in der Medizin. Der Behandlungserfolg mit Herzklappenprothesen unterliegt noch immer Limitierungen. Bei einem biologischen Herzklappenersatz ist mit einer begrenzten Haltbarkeit zu rechnen und die Empfangenden müssen immunsupprimiert werden, um eine Abstoßung zu vermeiden. Bei einem mechanischen Herzklappenersatz wird eine lebenslange Antikoagulation benötigt. Das kardiale Tissue Engineering liefert zukunftsweisende Ansätze, deren Ziel es ist, einen vitalen Herzklappenersatz mit autologen Zellen zu schaffen. Er soll nicht-immunogen und antithrombogen sein, ein Regenerations- und Anpassungspotenzial aufweisen, sowie über ein Wachstumspotenzial verfügen, welches für pädiatrische Patientinnen und Patienten von besonderer Bedeutung ist. Diese Arbeit liefert ein schnelles und effektives Dezellularisierungsprotokoll für Herzklappensegel. Es ermöglicht die Herstellung eines nahezu azellulären und immunneutralen Grundgerüsts in nur 5 Tagen. Ein weiterer Erfolg ist die Etablierung einer neuen Methode zur Gewinnung der verwendeten ovinen MSCs aus ovinem roten Knochenmark. Diese erlaubt die Isolierung von ovinen MSCs unabhängig von Geschlecht und Trächtigkeit des Schafes. Die Isolierung wurde in der Erprobungsphase *post mortem* durchgeführt, um keinem Tier unnötig zu schaden. Bei künftigen Tierversuchen können die oMSCs per Knochenmarkpunktion am lebenden Tier gewonnen werden und der tissue-engineerte Herzklappenersatz am selben Tier *in vivo* evaluiert werden. Die ersten Besiedlungsversuche konnten noch keine zufriedenstellenden Ergebnisse liefern. Der künftig wohl vielversprechendste Ansatz wäre die Erprobung der Besiedlung von dezellularisierten porcinen Pulmonalklappensegeln mit ovinen MSCs im Bioreaktor. Studien zeigen erfolgreiche dynamische Besiedlungen von dezellularisierten Herzklappensegeln. Ein weiterer Ansatz wäre die Untersuchung möglicher Rückstände der Dezellularisierungslösung im Medium oder in den Herzklappensegeln mittels chemischer Analysen oder Zytotoxizitäts-Essays. Ein weiterer Aspekt der aktuellen Forschung ist die Verwendung von pluripotenten Stammzellen im Rahmen des Tissue Engineerings. Aufgrund des hohen Differenzierungspotentials sind pluripotente Stammzellen für die Besiedlung von besonderem Interesse. Aus Ihnen können alle Zelllinien hervorgehen, aus denen die Herzklappen aufgebaut sind. Da nur embryonale Stammzellen dieses Potential aufweisen, ist die Gewinnung in Deutschland aus ethischen und moralischen Gründen verboten. Eine Alternative könnten die iPSCs sein. Hier wird daran geforscht adulte multipotente Stammzellen wieder in den pluripotenten Zustand

zurückzusetzen. In dieser Arbeit wurde vorbereitende Forschung für die Durchführung eines tissue-engineerten Herzklappenersatzes im Tiermodell geleistet. Weitere Forschung in diesem Bereich ist notwendig, damit künftig *in vivo* Evaluationen der tissue-engineerten Herzklappen im Tiermodell stattfinden können. Bis zu den ersten klinischen Versuchen am Menschen bleibt es ein spannender und vielversprechender Weg.

6 Zusammenfassung

Ziele

Ziel dieser Arbeit war es, 1. ein verkürztes Dezellularisierungsprotokoll zu erarbeiten, 2. eine Methode zur Isolierung von ovinen MSCs aus rotem Knochenmark zu entwickeln und 3. das Potenzial der statischen Re-Besiedlung von dezellulierten porcinen Pulmonalklappensegeln mit oMSCs zu untersuchen.

Methoden

In dieser Arbeit wurde ein neues verkürztes Dezellularisierungsprotokoll von 5 Tagen Dauer entwickelt. Hierbei wurde eine Kombination aus Detergenzien und Nukleasen verwendet. Der Dezellularisierungserfolg wurde mittels DNA-Isolierung und -Quantifizierung analysiert. Des Weiteren wurde die Isolation und Kultivierung von ovinen oMSCs aus dem Knochenmark von Schafen etabliert und die isolierten Zellen charakterisiert. Anschließend wurden die dezellulierten Herzklappensegel unter statischen Konditionen mit den oMSCs besiedelt. Der Erfolg der Besiedlung wurde mittels DNA-Isolierung und -Quantifizierung analysiert.

Ergebnisse

Das neue verkürzte Dezellularisierungsprotokoll für porcine Herzklappensegel führt zu einem nahezu azellulären Grundgerüst mit einer intakten Architektur. Die erfolgreiche Gewinnung von oMSCs aus dem roten Knochenmark konnte durch eine Charakterisierung der Zellen bestätigt werden. Die Zellen zeigten vergleichbare Charakteristika zu humanen MSCs mit mononuklearem, spindelförmigem Aussehen und Kunststoffadhärenz. Das Profil der Oberflächenmarker ergab CD31⁻ CD44⁺CD45⁻CD166⁺ Zellen. Bei statischer Besiedlung der dezellulierten Pulmonalklappensegel mit oMSCs zeigten sich morphologische Veränderungen der Herzklappensegel sowie eine kaum nachweisbare Zellanhaftung der oMSCs an die Herzklappensegel nach 14 Tagen. Eine negative Wirkung von toxischen Residuen der Dezellularisierungslösung auf den Besiedlungsvorgang konnte als Ursache jedoch ausgeschlossen werden.

Diskussion

Im Rahmen dieser Forschungsarbeit konnten ein verkürztes Dezellularisierungsprotokoll für porcine Herzklappensegel sowie die Isolation und Kultur von oMSCs erfolgreich entwickelt werden.

Die statische Re-Besiedlung der dezellulierten porcinen Pulmonalklappensegeln zeigte nach 14 Tagen jedoch keine Anhaftung der oMSCs. Weitere Forschung auf diesem Gebiet ist notwendig, damit künftig erfolgreiche Versuche im Tiermodell stattfinden können.

7 Summary

Goals

The aim of this study was 1. to develop a shortened decellularization protocol, 2. to develop a method for isolating ovine MSCs from red bone marrow and 3. to investigate the potential of static reseeding of decellularized porcine pulmonary valve leaflets with oMSCs.

Methods

In this work, a new shortened decellularization protocol of 5 days duration was developed. A combination of detergents and nucleases was used. The decellularization success was analyzed by DNA-Isolation and -Quantification. Furthermore, the preparation of ovine bone marrow-derived oMSCs (with subsequent cell culture) was established and the isolated cells were characterized. Afterwards, the decellularized heart valve leaflets were reseeded under static conditions with oMSCs. The success of reseeding was analyzed by DNA-Isolation and -Quantification.

Results

The new shortened decellularization protocol for porcine heart valve leaflets led to an almost acellular matrix with an intact architecture. The success of the new method for extracting ovine MSCs from the red bone marrow was confirmed by a characterization of the cells.

The cells showed comparable characteristics to human MSCs, such as mononuclear, spindle-shaped appearance and plastic adherence. The profile of the surface markers resulted in CD31- CD44+CD45-CD166+ cells. First attempt of a static colonization of decellularized porcine pulmonary valve leaflets with ovine MSCs showed morphological changes in the heart valve leaflets during the reseeding process as well as hardly detectable cell attachment of the oMSCs to the heart valve sails after 14 days. A negative impact of toxic residuals of the decellularization solution on the settlement process could be largely ruled out as a cause.

Discussion

As part of this research a shortend decellularization protocol for porcine heart valve sails could be developed as well as the isolation and cell culture of oMSCs.

The static re-settlement of decellularized porcine pulmonary valve sails shows no detectable cell attachment of the oMSCs after 14 days.

Further research is needed to allow successful experiments in the animal model in the future.

8 Literaturverzeichnis

1. Lüllmann-Rauch R, Paulsen F. Taschenlehrbuch Histologie: 10 Tabellen. 4., vollständig überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2012. 680 S.
2. WHO | The top 10 causes of death [Internet]. WHO. [zitiert 10. Mai 2017]. Verfügbar unter: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>
3. Soler-Soler J, Galve E. Worldwide perspective of valve disease. Heart. Juni 2000;83(6):721–5.
4. Renz-Polster H, Krautzig S, Bätge B, Stoll M, Herausgeber. Basislehrbuch Innere Medizin: kompakt - greifbar - verständlich ; [Plus im Web, mediscript]. 5. Auflage. München: Elsevier, Urban & Fischer; 2013. 1202 S.
5. Henne-Bruns D, Barth E, Herausgeber. Chirurgie. 4., aktualisierte Aufl. Stuttgart: Thieme; 2012. 1297 S. (Duale Reihe).
6. Geißler HJ, Schlensak C, Südkamp M, Beyersdorf F. Heart Valve Surgery Today. Dtsch Arztebl Int. März 2009;106(13):224–34.
7. Hasenfuß G. Herzklappenerkrankungen. Der Internist. April 2016;57(4):301–3.
8. Webb J, Arden C, Chambers JB. Heart valve disease in general practice: a clinical overview. Br J Gen Pract. 1. März 2015;65(632):e204–6.
9. Meinertz T, Hamm C, Schlensak C, Fleck E, Cremer J, Stiller B, u. a. Deutscher Herzbericht 2016 28. Bericht/Sektorenübergreifende Versorgungsanalyse zur Kardiologie, Herzchirurgie und Kinderherzmedizin in Deutschland. 2017.
10. Arteriosklerose [Internet]. [zitiert 21. Juli 2017]. Verfügbar unter: <http://www.deutsche-gefaessliga.de/index.php/gefaesserkrankungen/arteriosklerose>
11. Guidelines on the management of valvular heart disease (version 2012) ESC/EACTS GUIDELINES [Internet]. [zitiert 20. Juli 2017]. Verfügbar unter: https://oup.silverchair-cdn.com/oup/backfile/Content_public/Journal/eurheartj/33/19/10.1093_eurheartj_ehs109/1/ehs109.pdf?Expires=1500636148&Signature=D-MtCiUIBxQH46COxrb5dNO019sfCMZhq1-wQcWMO7905bdrD-qKyZ-SaHK58EoPiidF2CNayZSsqvFadl8BUK3DIHfBYVSGNiNdsvoc23e~0ZBscEHvaxXSUvvZ7w9ZCDBeKuqJ-erfjd6zT91fVIFKEjrJ6BrH1pCAQBW0Ytx25l07BDmJOLXN~AlK9o7zBu5y2TuhGOctx2hqlqNyZxIJXYDPXCzz0zmHI7WHKuaHqSiFzkym5YnyL0Lsk4W1swwX8LazY2cQTrBU4-uXXcl6OIIDfYuy4KXdkjMjUHvJAEKuGIVKCDDDeEu7ClzaeLo3Ct4bklDf7QliZTrPYg__&Key-Pair-Id=APKAIUCZBIA4LVPVAVW3Q
12. Kacmaz K. Herzklappen-Innovationen: Bei immer mehr Erkrankungen gibt es Katheter-Alternativen zur Operation [Internet]. [zitiert 5. April 2017]. Verfügbar unter: <https://dgk.org/pressemitteilungen/2016-jahrestagung/2016-ft-aktuelle-pm/statements/2016-ft-statements-tag3/herzklappen-innovationen-bei-immer-mehr-erkrankungen-gibt-es-katheter-alternativen-zur-operation/>

13. Cribier A, Eltchaninoff H, Bash A, Borenstein N, Tron C, Bauer F, u. a. Percutaneous Transcatheter Implantation of an Aortic Valve Prosthesis for Calcific Aortic Stenosis. *Circulation*. 10. Dezember 2002;106(24):3006–8.
14. Kilic T, Yilmaz I. Transcatheter aortic valve implantation: a revolution in the therapy of elderly and high-risk patients with severe aortic stenosis. *J Geriatr Cardiol*. März 2017;14(3):204–17.
15. Trujillo JF, Hollenberg SM. Valvular Heart Disease in Adults: Management of Prosthetic Heart Valves. *FP Essent*. Juni 2017;457:23–9.
16. Tissue Engineering and Regenerative Medicine [Internet]. National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering. 2013 [zitiert 22. Juli 2017]. Verfügbar unter: <https://www.nibib.nih.gov/science-education/science-topics/tissue-engineering-and-regenerative-medicine>
17. Shinoka T, Miyachi H. Current Status of Tissue Engineering Heart Valve. *World Journal for Pediatric and Congenital Heart Surgery*. 1. November 2016;7(6):677–84.
18. Vacanti JP, Morse MA, Saltzman WM, Domb AJ, Perez-Atayde A, Langer R. Selective cell transplantation using bioabsorbable artificial polymers as matrices. *J Pediatr Surg*. Januar 1988;23(1 Pt 2):3–9.
19. Iop L, Gerosa G. Guided Tissue Regeneration in Heart Valve Replacement: From Preclinical Research to First-in-Human Trials [Internet]. *BioMed Research International*. 2015 [zitiert 22. Juli 2017]. Verfügbar unter: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/432901/>
20. Dar A, Shachar M, Leor J, Cohen S. Optimization of cardiac cell seeding and distribution in 3D porous alginate scaffolds. *Biotechnol Bioeng*. 5. November 2002;80(3):305–12.
21. Chaudhuri R, Ramachandran M, Moharil P, Harumalani M, Jaiswal AK. Biomaterials and cells for cardiac tissue engineering: Current choices. *Materials Science and Engineering: C*. 1. Oktober 2017;79:950–7.
22. Emmert MY, Hitchcock RW, Hoerstrup SP. Cell therapy, 3D culture systems and tissue engineering for cardiac regeneration. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 20. April 2014;69:254–69.
23. Georgiadis V, Knight RA, Jayasinghe SN, Stephanou A. Cardiac tissue engineering: renewing the arsenal for the battle against heart disease. *Integr Biol (Camb)*. Februar 2014;6(2):111–26.
24. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*. April 2011;32(12):3233–43.
25. Azhim A, Yamagami K, Muramatsu K, Morimoto Y, Tanaka M. The use of sonication treatment to completely decellularize blood arteries: a pilot study. *Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc*. 2011;2011:2468–71.

26. Jessica Haupt, Georg Lutter, Stanislav N. Gorb, Dan T. Simionescu, Derk Frank, Jette Seiler, u. a. Detergent-based decellularization strategy preserves macro- and microstructure of heart valves. *Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery*. under review;
27. Wong ML, Griffiths LG. Immunogenicity in xenogeneic scaffold generation: Antigen removal versus decellularization. *Acta Biomater*. Mai 2014;10(5):1806–16.
28. Dohmen PM, da Costa F, Holinski S, Lopes SV, Yoshi S, Reichert LH, u. a. Is there a possibility for a glutaraldehyde-free porcine heart valve to grow? *Eur Surg Res*. 2006;38(1):54–61.
29. Goldstein S, Clarke DR, Walsh SP, Black KS, O'Brien MF. Transpecies heart valve transplant: advanced studies of a bioengineered xeno-autograft. *The Annals of Thoracic Surgery*. 1. Dezember 2000;70(6):1962–9.
30. VeDepo MC, Detamore MS, Hopkins RA, Converse GL. Recellularization of decellularized heart valves: Progress toward the tissue-engineered heart valve. *J Tissue Eng [Internet]*. 25. August 2017 [zitiert 24. November 2020];8. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5574480/>
31. Zhao J, Griffin M, Cai J, Li S, Bulter PEM, Kalaskar DM. Bioreactors for tissue engineering: An update. *Biochemical Engineering Journal*. 15. Mai 2016;109:268–81.
32. Yoon HH, Bhang SH, Shin J-Y, Shin J, Kim B-S. Enhanced Cartilage Formation via Three-Dimensional Cell Engineering of Human Adipose-Derived Stem Cells. *Tissue Eng Part A*. Oktober 2012;18(19–20):1949–56.
33. Jana S, Tranquillo RT, Lerman A. Cells for tissue engineering of cardiac valves. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2016;10(10):804–24.
34. Akhyari P, Minol P, Assmann A, Barth M, Kamiya H, Lichtenberg A. Tissue Engineering von Herzklappen. *Chirurg*. 1. April 2011;82(4):311.
35. Embryonenschutzgesetz vom 13. Dezember 1990 (BGBl. I S. 2746), das zuletzt durch Artikel 1 des Gesetzes vom 21. November 2011 (BGBl. I S. 2228) geändert worden ist.
36. Stammzellgesetz vom 28. Juni 2002 (BGBl. I S. 2277), das zuletzt durch Artikel 50 des Gesetzes vom 29. März 2017 (BGBl. I S. 626) geändert worden ist.
37. Lyahyai J, Mediano DR, Ranera B, Sanz A, Remacha AR, Bolea R, u. a. Isolation and characterization of ovine mesenchymal stem cells derived from peripheral blood. *BMC Vet Res*. 22. September 2012;8:169.
38. Heidari B, Shirazi A, Akhondi MM, Hassanpour H, Behzadi B, Naderi MM, u. a. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of sheep mesenchymal stem cells derived from bone marrow, liver, and adipose tissue. *Avicenna J Med Biotechnol*. April 2013;5(2):104–17.
39. Zhao S, Tao L, Tian Y, Tai D, Liu P, Liu D. Isolation and characterization of ovine umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. *Cytotechnology*. Februar 2019;71(1):277–86.

40. Fei X, Jiang S, Zhang S, Li Y, Ge J, He B, u. a. Isolation, culture, and identification of amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells. *Cell Biochem Biophys*. November 2013;67(2):689–94.
41. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, u. a. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315–7.
42. Crapnell K, Blaesius R, Hastings A, Lennon DP, Caplan AI, Bruder SP. Growth, differentiation capacity, and function of mesenchymal stem cells expanded in serum-free medium developed via combinatorial screening. *Exp Cell Res*. 10. Juni 2013;319(10):1409–18.
43. Rippel RA, Ghanbari H, Seifalian AM. Tissue-engineered heart valve: future of cardiac surgery. *World J Surg*. Juli 2012;36(7):1581–91.
44. VeDepo M, Buse E, Paul A, Hopkins R, Converse G. Comparison of Candidate Cell Populations for the Recellularization of Decellularized Heart Valves. *Cell Mol Bioeng*. 30. April 2018;11(3):197–209.
45. Duan B, Hockaday LA, Das S, Xu C, Butcher JT. Comparison of Mesenchymal Stem Cell Source Differentiation Toward Human Pediatric Aortic Valve Interstitial Cells within 3D Engineered Matrices. *Tissue Eng Part C Methods*. 1. August 2015;21(8):795–807.
46. Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, u. a. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*. 1. Januar 2006;107(1):367–72.
47. Gallegos RP, Nockel PJ, Rivard AL, Bianco RW. The current state of in-vivo pre-clinical animal models for heart valve evaluation. *J Heart Valve Dis*. Mai 2005;14(3):423–32.
48. Ali ML, Kumar SP, Bjornstad K, Duran CM. The sheep as an animal model for heart valve research. *Cardiovasc Surg*. August 1996;4(4):543–9.
49. Ouyang DW, Salerno CT, Pederson TS, Bolman RM, Bianco RW. Long-Term Evaluation of Orthotopically Implanted Stentless Bioprosthetic Aortic Valves in Juvenile Sheep. *Journal of Investigative Surgery*. 1. Januar 1998;11(3):175–83.
50. Degenhardt U. Individuelle in-vitro-Reaktionen oviner und humaner mesenchymaler Stammzellen durch GBP-L.pdf. 2010.
51. Weber B, Emmert MY, Hoerstrup SP. Stem cells for heart valve regeneration. *Swiss Medical Weekly [Internet]*. 16. Juli 2012 [zitiert 4. März 2020];142(2930). Verfügbar unter: <https://smw.ch/article/doi/smw.2012.13622>
52. Weber B, Robert J, Ksiazek A, Wyss Y, Frese L, Slamecka J, u. a. Living-Engineered Valves for Transcatheter Venous Valve Repair. *Tissue Eng Part C Methods*. 1. Juni 2014;20(6):451–63.
53. Rieder E, Kasimir M-T, Silberhumer G, Seebacher G, Wolner E, Simon P, u. a. Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 1. Februar 2004;127(2):399–405.

54. Boldt J, Lutter G, Pohanke J, Fischer G, Schoettler J, Cremer J, u. a. Percutaneous Tissue-Engineered Pulmonary Valved Stent Implantation: Comparison of Bone Marrow-Derived CD133+-Cells and Cells Obtained from Carotid Artery. *Tissue Engineering Part C: Methods*. 26. Oktober 2012;19(5):363–74.
55. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*. April 2011;32(12):3233–43.
56. Singelyn JM, DeQuach JA, Seif-Naraghi SB, Littlefield RB, Schup-Magoffin PJ, Christman KL. Naturally derived myocardial matrix as an injectable scaffold for cardiac tissue engineering. *Biomaterials*. Oktober 2009;30(29):5409–16.
57. Ott HC, Matthiesen TS, Goh S-K, Black LD, Kren SM, Netoff TI, u. a. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nature Medicine*. Februar 2008;14(2):213–21.
58. Sierad LN, Shaw EL, Bina A, Brazile B, Rierson N, Patnaik SS, u. a. Functional Heart Valve Scaffolds Obtained by Complete Decellularization of Porcine Aortic Roots in a Novel Differential Pressure Gradient Perfusion System. *Tissue Eng Part C Methods*. Dezember 2015;21(12):1284–96.
59. Kasimir M-T, Rieder E, Seebacher G, Nigisch A, Dekan B, Wolner E, u. a. Decellularization does not eliminate thrombogenicity and inflammatory stimulation in tissue-engineered porcine heart valves. *J Heart Valve Dis*. März 2006;15(2):278–86; discussion 286.
60. Jover E, Fagnano M, Angelini G, Madeddu P. Cell Sources for Tissue Engineering Strategies to Treat Calcific Valve Disease. *Front Cardiovasc Med* [Internet]. 6. November 2018 [zitiert 4. März 2020];5. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6232262/>
61. Tang J, Cui X, Caranasos TG, Hensley MT, Vandergriff AC, Hartanto Y, u. a. Heart Repair Using Nanogel-Encapsulated Human Cardiac Stem Cells in Mice and Pigs with Myocardial Infarction. *ACS Nano*. 24. Oktober 2017;11(10):9738–49.
62. Nachlas ALY, Li S, Jha R, Singh M, Xu C, Davis ME. Human iPSC-derived mesenchymal stem cells matured into valve interstitial-like cells using PEGDA hydrogels. *Acta Biomater*. 15. April 2018;71:235–46.
63. Iop L, Renier V, Naso F, Piccoli M, Bonetti A, Gandaglia A, u. a. The influence of heart valve leaflet matrix characteristics on the interaction between human mesenchymal stem cells and decellularized scaffolds. *Biomaterials*. 1. September 2009;30(25):4104–16.
64. Haddouti E-M, Randau TM, Hilgers C, Masson W, Walgenbach KJ, Pflugmacher R, u. a. Characterization and Comparison of Human and Ovine Mesenchymal Stromal Cells from Three Corresponding Sources. *Int J Mol Sci* [Internet]. 27. März 2020 [zitiert 15. August 2020];21(7). Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7177787/>
65. Tian Y, Tao L, Zhao S, Tai D, Liu D, Liu P. Isolation and morphological characterization of ovine amniotic fluid mesenchymal stem cells. *Exp Anim*. 2016;65(2):125–34.

66. Khan MR, Chandrashekan A, Smith RKW, Dudhia J. Immunophenotypic characterization of ovine mesenchymal stem cells. *Cytometry Part A*. 2016;89(5):443–50.
67. White IA, Sanina C, Balkan W, Hare JM. Mesenchymal Stem Cells in Cardiology. *Methods Mol Biol*. 2016;1416:55–87.
68. Fabre H, Ducret M, Degoul O, Rodriguez J, Perrier-Groult E, Aubert-Foucher E, u. a. Characterization of Different Sources of Human MSCs Expanded in Serum-Free Conditions with Quantification of Chondrogenic Induction in 3D. *Stem Cells Int* [Internet]. 20. Juni 2019 [zitiert 19. Januar 2021];2019. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6610765/>
69. Sanjurjo-Rodríguez C, Castro-Viñuelas R, Hermida-Gómez T, Fernández-Vázquez T, Fuentes-Boquete IM, de Toro-Santos FJ, u. a. Ovine Mesenchymal Stromal Cells: Morphologic, Phenotypic and Functional Characterization for Osteochondral Tissue Engineering. *PLoS One* [Internet]. 31. Januar 2017 [zitiert 6. April 2017];12(1). Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5283731/>
70. Poggio P, Sainger R, Branchetti E, Grau JB, Lai EK, Gorman RC, u. a. Noggin attenuates the osteogenic activation of human valve interstitial cells in aortic valve sclerosis. *Cardiovasc Res*. 1. Juni 2013;98(3):402–10.
71. Rawat N, Singh MK. Induced pluripotent stem cell: A headway in reprogramming with promising approach in regenerative biology. *Vet World*. Juni 2017;10(6):640–9.
72. Okano Hideyuki, Nakamura Masaya, Yoshida Kenji, Okada Yohei, Tsuji Osahiko, Nori Satoshi, u. a. Steps Toward Safe Cell Therapy Using Induced Pluripotent Stem Cells. *Circulation Research*. 1. Februar 2013;112(3):523–33.
73. Rieder Erwin, Seebacher Gernot, Kasimir Marie-Theres, Eichmair Eva, Winter Birgitta, Dekan Barbara, u. a. Tissue Engineering of Heart Valves. *Circulation*. 31. Mai 2005;111(21):2792–7.
74. Bastian F, Stelzmüller M-E, Kratochwill K, Kasimir M-T, Simon P, 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*. April 2008;29(12):1824–32.
75. Rieder E, Seebacher G, Kasimir M-T, Eichmair E, Winter B, Dekan B, u. a. Tissue engineering of heart valves: decellularized porcine and human valve scaffolds differ importantly in residual potential to attract monocytic cells. *Circulation*. 31. Mai 2005;111(21):2792–7.
76. Bayrak A, Tyralla M, Ladhoff J, Schleicher M, Stock UA, Volk H-D, u. a. Human immune responses to porcine xenogeneic matrices and their extracellular matrix constituents in vitro. *Biomaterials*. Mai 2010;31(14):3793–803.
77. Kasimir M-T, Rieder E, Seebacher G, Wolner E, Weigel G, Simon P. Presence and elimination of the xenoantigen gal (α 1, 3) gal in tissue-engineered heart valves. *Tissue Eng*. August 2005;11(7–8):1274–80.

-
78. Choi S-Y, Jeong H-J, Lim H-G, Park S-S, Kim S-H, Kim YJ. Elimination of alpha-gal xenoreactive epitope: alpha-galactosidase treatment of porcine heart valves. *J Heart Valve Dis.* Mai 2012;21(3):387–97.
 79. Rath S, Salinas M, Villegas AG, Ramaswamy S. Differentiation and Distribution of Marrow Stem Cells in Flex-Flow Environments Demonstrate Support of the Valvular Phenotype. *PLoS One* [Internet]. 4. November 2015 [zitiert 20. Januar 2021];10(11). Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4633293/>
 80. Ramaswamy S, Gottlieb D, Engelmayr GC, Aikawa E, Schmidt DE, Gaitan-Leon DM, u. a. THE ROLE OF ORGAN LEVEL CONDITIONING ON THE PROMOTION OF ENGINEERED HEART VALVE TISSUE DEVELOPMENT IN-VITRO USING MESENCHYMAL STEM CELLS. *Biomaterials.* Februar 2010;31(6):1114.
 81. Gonzalez BA, Perez-Nevarez M, Mirza A, Perez MG, Lin Y-M, Hsu C-PD, u. a. Physiologically Relevant Fluid-Induced Oscillatory Shear Stress Stimulation of Mesenchymal Stem Cells Enhances the Engineered Valve Matrix Phenotype. *Front Cardiovasc Med* [Internet]. 19. Mai 2020 [zitiert 20. Januar 2021];7. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7248568/>
 82. Ramaswamy S, Boronyak SM, Le T, Holmes A, Sotiropoulos F, Sacks MS. A Novel Bioreactor for Mechanobiological Studies of Engineered Heart Valve Tissue Formation Under Pulmonary Arterial Physiological Flow Conditions. *J Biomech Eng.* Dezember 2014;136(12):1210091–12100914.
 83. Castellanos G, Nasim S, Almora DM, Rath S, Ramaswamy S. Stem Cell Cytoskeletal Responses to Pulsatile Flow in Heart Valve Tissue Engineering Studies. *Front Cardiovasc Med* [Internet]. 5. Juni 2018 [zitiert 20. Januar 2021];5. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5996090/>
 84. Parvin Nejad S, Blaser MC, Santerre JP, Caldarone CA, Simmons CA. Biomechanical conditioning of tissue engineered heart valves: Too much of a good thing? *Adv Drug Deliv Rev.* 15. Januar 2016;96:161–75.
 85. VeDepo M, Buse E, Quinn R, Hopkins R, Converse G. Extended bioreactor conditioning of mononuclear cell-seeded heart valve scaffolds. *J Tissue Eng* [Internet]. 10. April 2018 [zitiert 5. März 2020];9. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5896845/>
 86. Tefft BJ, Choe JA, Young MD, Hennessy RS, Morse DW, Bouchard JA, u. a. Cardiac valve bioreactor for physiological conditioning and hydrodynamic performance assessment. *Cardiovasc Eng Technol.* März 2019;10(1):80–94.
 87. VeDepo MC, Buse EE, Paul A, Converse GL, Hopkins RA. Non-physiologic Bioreactor Processing Conditions for Heart Valve Tissue Engineering. *Cardiovasc Eng Tech.* 1. Dezember 2019;10(4):628–37.

9 Danksagung

Ohne die Unterstützung von zahlreichen Personen, wäre die Umsetzung des Forschungsprojektes nicht möglich gewesen. Hierfür möchte ich mich bei allen Beteiligten herzlich bedanken.

Danken möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Georg Lutter, Inhaber des Lehrstuhls für Experimentelle Herzchirurgie und Herzklappenersatz, für die Bereitstellung der Promotionsthemas und die ansteckende Begeisterung für die wissenschaftliche Forschung.

Mein größter Dank gilt meiner Betreuerin Frau Dr. Irma Kollenda, damalige Leiterin der Abteilung für experimentelle Forschung, die mich systematisch in die wissenschaftliche Praxis eingeführt und von Beginn an intensiv betreut hat und mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ein besonderer Dank gilt der wissenschaftlichen Mitarbeiterin der oben genannten Abteilung für experimentelle Forschung, Frau Jette-Anika Seiler, die mir in allen Fragen bezüglich der experimentellen Laborarbeit beratend zur Seite stand und durch den wissenschaftlichen Austausch maßgeblich an der Entstehung dieser Arbeit beteiligt war. Auch für die Zellpflege fernab der Dienstzeiten möchte ich ihr danken.

Danken möchte ich auch Frau Alina Paur, ebenfalls Doktorandin der Klinik für Herz- und Gefäßchirurgie, für die enge Zusammenarbeit, die konstruktiven Diskussionen und die Begeisterung für das Thema, die mich stets bestärkt und motiviert haben.

10 Lebenslauf

von Miriam Hansen, geboren am 30. Oktober 1993 in Lüneburg, verheiratet, 2 Kinder

Schulbildung:

09/1999 - 07/2003: Grundschule Bienenbüttel, Bienenbüttel

08/2003 - 07/2004: Orientierungsstufe Bad Bevensen, Bad Bevensen

08/2004 – 06/2011: Gymnasium Wilhelm-Raabe-Schule, Lüneburg

Studium:

10/2012 – 11/2020: Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

11/2020 – 09/2021: Promotionsstudium an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Abschlüsse:

Abitur 2011

1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Physikum) Herbst 2014

2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung Herbst 2017

3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung Herbst 2020

Approbation als Ärztin November 2020

Beruf:

seit 02/2021 Ärztin in Weiterbildung in der Inneren Medizin, St. Josefs-Krankenhaus,
Potsdam

Beginn der Promotion im Mai 2017

11 Anhang

Tabellen DNA-Konzentrationen

native Herzklappensegel:

Probe	DNA-Konzentration in ng/mg Trockengewicht
Versuchsreihe 17-10	
Probe 1	10378,83
Probe 2	11162,791
Probe 3	11364,238
Probe 4	10419,58
Probe 5	10341,176
Probe 6	10179,567
Probe 7	8961,373
Probe 8	8242,545
Probe 9	10567,839
Probe 10	8836,82
Probe 11	7145,455
Probe 12	8126,866
Versuchsreihe 17-14	
Probe 1	10047,619
Probe 2	9013,453
Probe 3	9582,353
Versuchsreihe 17-15	
Probe 1	11386,364
Probe 2	9168,399
Probe 3	12728,324
Probe 4	9347,921
Versuchsreihe 18-02	
Probe 1	8923,729
Probe 2	11014,706
Probe 3	10847,222
Probe 4	11777,778
Probe 5	11984,962
Probe 6	9699,605
Probe 7	10593,023
Versuchsreihe 18-03	
Probe 1	9856,41
Probe 2	10979,592
Probe 3	12147,368
Probe 4	12989,011
Probe 5	13922,078
Probe 6	12189,349
Probe 7	10743,169
Mittelwert	10444,531
Standardabweichung	1499,946

Varianz	2249839,187
%	100

dezellularisierte Herzklappensegel:

Probe	DNA-Konzentration in ng/mg Trockengewicht
Versuchsreihe 17-11	
Probe 1	46,479
Probe 2	243,421
Probe 3	75,304
Probe 4	67,241
Probe 5	162,539
Versuchsreihe 17-12	
Probe 1	187,156
Probe 2	809,434
Probe 3	329,221
Probe 4	520,253
Probe 5	257,143
Probe 6	106,780
Versuchsreihe 17-14	
Probe 1	170,175
Probe 2	345,882
Probe 3	144,878
Probe 4	214,007
Versuchsreihe 17-15	
Probe 1	682,857
Probe 2	480,836
Probe 3	168,085
Probe 4	336,735
Versuchsreihe 18-01	
Probe 1	76,384
Probe 2	98,456
Probe 3	76,538
Probe 4	39,884
Probe 5	129,851
Probe 6	122,400
Versuchsreihe 18-02	
Probe 1	88,938
Probe 2	188,824
Probe 3	100,000
Probe 4	97,647
Probe 5	132,000
Probe 6	291,973
Probe 7	371,480
Probe 8	327,404
Versuchsreihe 18-03	

Probe 1	87,054
Probe 2	44,223
Probe 3	77,830
Probe 4	50,233
Probe 5	202,841
Probe 6	154,667
Probe 7	611,952
Probe 8	780,899
Kontrollsegel	
MF 17-14	85,714
MF 17-15	94,444
MF 18-02	266,667
MF 18-02'	191,845
MF 18-03	40,426
MF 18-03'	13,043
Mittelwert	216,852
Standardabweichung	194,959
Varianz	38008,84
%	2,076

dezellularisierte Kontrollsegel:

Probe	DNA-Konzentration in ng/mg Trockengewicht
MF 17-14	85,714
MF 17-15	94,444
MF 18-02	266,667
MF 18-02'	191,845
MF 18-03	40,426
MF 18-03'	13,043
Mittelwert	115,357
Standardabweichung	96,067
%	1,104

besiedelte Herzklappensegel:

Probe	DNA-Konzentration in ng/mg Trockengewicht
Versuchsreihe 18-02	
Probe 1	94,681
Probe 2	202,358
Probe 3	151,807
Probe 4	310,949
Probe 5	368,333
Probe 6	77,419
Versuchsreihe 18-03	
Probe 1	70,234

Probe 2	49,640
Probe 3	33,333
Probe 4	26,627
Probe 5	20,096
Probe 6	8,333
Mittelwert	117,818
Standardabweichung	118,487
Varianz	14039,055
%	1,128

Veröffentlichungen:**Abstract**

eCM Periodical, 2019, Collection 3; 2019 TERMIS EU Abstracts (page 967)
www.ecmconferences.org

Shortened decellularization protocol for porcine pulmonary heart valves as matrix for seeding with human and ovine progenitor cells

M. Freytag¹, J. Seiler¹, A. Paur¹, S.N. Gorb², G. Lutter^{1,3}, I. Haben^{1,3}

Presenting author: Irma Haben, irma.haben@uksh.de

¹Department of Cardiovascular Surgery, University Hospital Schleswig-Holstein (UKSH), Kiel, Germany ²Zoological Institute, Christian-Albrechts-University of Kiel, Kiel, Germany ³DZHK (German Centre for Cardiovascular Research), partner site Hamburg/Kiel/Lübeck, Hamburg, Germany

INTRODUCTION: Tissue engineering has the unique opportunity to provide a living valve, capable of growth and biological integration. Biological tissue has great potential to function as bioprotheses in patients for heart valve replacement. The challenge is to reduce immunogenicity without damaging the structure to allow recolonization with autologous cells. For clinical use, it is important that human cells adhere to the decellularized matrix. However, for our large animal model, decellularized heart valves need to be reseeded with ovine cells to generate autologous tissue engineered heart valves. Here, we established a new decellularization protocol for porcine pulmonary heart valves and reseeded the treated leaflets with human and ovine progenitor cells.

METHODS: Our new decellularization protocol is short in time (5 days) and includes a combination of NaOH, Triton X-100, Trypsin and endonucleases for the treatment of porcine pulmonary heart valves. Decellularization was assessed by histological and DNA analysis. Macroscopic structures and cytotoxicity of treated valves were analysed. Isolation of human EPCs from blood was confirmed by surface marker expression and formation of capillary-like structures. Isolation of ovine precursor cells was established and cell types were confirmed by surface marker expression. The decellularized leaflets were reseeded with human and ovine precursor cells with various seeding procedures. Histological and biochemical analysis quantified the reseeded success and morphology of the leaflets.

RESULTS & DISCUSSION: Histological analysis of decellularized leaflets revealed complete removal of all cellular components. The DNA amount was reduced by more than 98.4% compared to native porcine leaflets. The acellular heart valves showed an intact architecture, layer composition and surface topography. In addition, a cytotoxicity of the treated tissues was excluded. Reseeding of decellularized, porcine pulmonary valves with human EPCs resulted in a closed cell layer on the surface of the leaflet tissues. Similarly, decellularized leaflets reseeded with ovine progenitor cells showed cell attachment to the surface.

CONCLUSIONS: Our observations showed conserved leaflet structures after decellularization. Promising results in human and ovine cell reseeded indicated that the decellularized leaflets are suitable as an excellent scaffold for further application in tissue engineering. Additional studies are needed to investigate the mechanical properties to quantify the functionality of the reseeded leaflets before in vivo evaluation of the tissue engineered heart valves in the sheep model can be performed.

ACKNOWLEDGEMENTS: Financial support was received from the German Centre for Cardiovascular Research (DZHK) and the German Heart Research Foundation (DSHF).

Poster



SHORTENED DECELLULARIZATION PROTOCOL FOR PORCINE PULMONARY HEART VALVES AS MATRIX FOR SEEDING WITH HUMAN AND OVINE PROGENITOR CELLS

Miriam Freytag¹, Jette Seiler¹, Alina Paur¹, Stanislav N. Gorb², Georg Lutter^{1,3} and Irma Haben^{1,3}

¹Department of Cardiovascular Surgery, University Hospital Schleswig-Holstein (UKSH), Kiel, Germany, ²Zoological Institute, Christian-Albrechts-University of Kiel, Kiel, Germany, ³DZHK (German Centre for Cardiovascular Research), partner site Hamburg/Kiel/Lübeck, Hamburg, Germany

Decellularization of porcine heart valves

Heart valve disease is an increasingly prevalent and clinically serious condition resulting in substantial morbidity and death worldwide. Biological tissue has great potential to function as bioprostheses in patients for heart valve replacement. To remove the antigenicity of the tissue, bioscaffolds must be decellularized while preserving the complex mixture of structural and functional proteins that constitute the extracellular matrix. An intact microstructure of the material is mandatory since reseeding of scaffolds can prevent calcification. Unfortunately, an optimal decellularization protocol of heart valve leaflets resulting in adequate preservation of the extracellular architecture is still lacking.

Here, we developed a shortened decellularization protocol (5 days) to maintain acellular scaffolds with a preserved heart valve ultrastructure. Porcine pulmonary heart valves were treated with detergents in combination with nucleases (DET+ENZ short). Histological analysis of decellularized leaflets revealed complete removal of all cellular components. The DNA amount was reduced by more than 99% compared to native porcine leaflets. The acellular heart valves showed an intact architecture, layer composition and surface topography (Fig. 1).

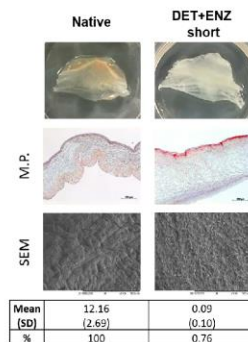


Figure 1. Representative images of pulmonary valves before (native) and after decellularization with DET+ENZ short. Macroscopic images of heart valves. Movat's pentachrome-stained sections reveal nuclei, elastic fibres (black), collagen, reticular fibres (yellow), ground substance, mucin (blue), fibrin (bright red) and muscle (red) of leaflet tissues. SEM images of leaflet tissue. Absolute and relative quantification of DNA content of pulmonary valves before (native) and after decellularization with DET+ENZ short. Data are expressed as the mean \pm standard deviation [mg DNA / mg dry tissue] and percentage.

Human progenitor cells

Ideal candidates for vascular regenerative therapy are endothelial colony-forming cells (ECFCs) present in peripheral blood. To confirm the ECFC state and their functionality, the cells have to form a cobblestone-like monolayer cultured on a plate coated with type I collagen (Fig. 2A). Furthermore, the formation of capillary-like structures of the cells grown on a basement membrane-like matrix shows their functionality (Fig. 2B).

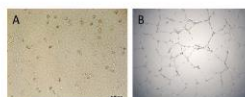


Figure 2. Humane ECFCs isolated from peripheral blood. **A:** ECFCs monolayer of cobblestone-appearing cells. **B:** ECFCs were plated on Matrigel for the formation of capillary-like structures.

Ovine progenitor cells

Isolation of ovine precursor cells from bone marrow was established and the mesenchymal cell type was confirmed by cell morphology and surface marker expression (Fig. 3).

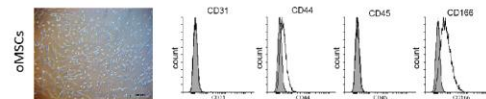


Figure 3. Light microscopy images demonstrating the cell morphology of ovine MSCs. Flow cytometric analysis of surface markers of oMSCs (white: oMSCs, grey: negative control).

Reseeding potential of decellularized leaflets

Reseeding of decellularized, porcine pulmonary valves with human ECFCs resulted after 5 days of static incubation in adhesion of the cells to the surfaces of the leaflet tissues (Fig. 4B). An endothelium-specific staining of the surface protein von Willebrand factor showed a closed layer on the surface of the leaflet tissues (Fig. 4C). Similarly, decellularized leaflets reseeded with ovine progenitor cells showed cell attachment to the surface (Fig. 4D).

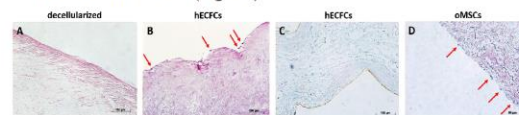


Figure 4. Reseeding of decellularized pulmonary leaflets **A:** H.E. staining of a decellularized pulmonary leaflet serves as negative control. **B:** H.E. staining of a human ECFC-populated decellularized pulmonary leaflet tissues (red arrows: blue stained nuclei). **C:** immunohistochemical staining for von Willebrand factor from decellularized pulmonary leaflets that were statically incubated with human ECFCs for 5 days (brown: positive vWF staining, blue: hemalaun contrast staining). **D:** H.E. staining of a decellularized pulmonary leaflet reseeded with ovine MSCs for 5 days (red arrows: blue stained nuclei).

Summary/Outlook

Our observations showed conserved leaflet structures after decellularization. Promising results in human and ovine cell reseeding indicated that the decellularized leaflets are suitable as an excellent scaffold for further application in tissue engineering. Additional studies are needed to investigate the mechanical properties to quantify the functionality of the reseeded leaflets *before in vivo* evaluation of the tissue engineered heart valves in the sheep model can be performed.

