

Aus dem
CharitéCentrum für Chirurgische Medizin CC 08
Chirurgische Klinik
Campus Charité Mitte I Campus Virchow Klinikum
Direktor: Prof. Dr. med. Johann Pratschke

Habilitationsschrift

**Neue Ansätze zur Charakterisierung von dezellularisierten Geweben
und zur Rebesiedelung von Gefäßen**

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Experimentelle Chirurgie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité-
Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Karl Herbert Hillebrandt
geboren in Jena

Eingereicht:	April 2023
Dekan:	Prof. Dr. med. Joachim Spranger
1. Gutachter/in:	Prof. Dr. med. Andreas Pascher
2. Gutachter/in:	Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	4
1.1 Tissue Engineering	5
1.2 Technik der De- und Rezellularisierung	5
1.3 Dezellularisierung und deren Einfluss auf die extrazelluläre Matrix	6
1.4 Eigenschaften und Charakterisierung der dezellularen extrazellulären Matrix	7
1.5 Reendothelialisierung von Gefäßen und Gefäßnetzwerken	10
1.6 Fragestellungen	12
2. Darstellung der eigenen Arbeiten	13
2.1 Das humane Lebermatrisom – proteomische Analyse von nativer und fibrotischer humaner Leber-EZM zum Einsatz im Bereich des <i>Organ Engineering</i>	13
2.2 Mittels Magnetresonanz-Elastographie lässt sich der Fest-flüssig-übergang in dezellularen Lebergewebe quantifizieren	27
2.3 Der solide Gewebeanteil bestimmt die Steifigkeit und Viskosität von dezellularem Pankreasgewebe	39
2.4 <i>In vitro</i> Rebesiedelung von dezellularen <i>bovinen</i> Karotiden mit <i>humanen</i> endothelialen Vorläuferzellen	52
2.5 Die Oberflächenmodifikation von <i>bovinen</i> Karotiden mittels <i>humaner</i> endothelialer Zellen reduziert die Thrombogenität	68
3. Diskussion	90
4. Zusammenfassung und Ausblick	102
5. Literaturverzeichnis	104
6. Danksagung	111
7. Eidesstattliche Erklärung	113

Abkürzungsverzeichnis

3D	-	dreidimensional
AFM	-	atomic force microscopy
DAMP	-	damage-associated molecular pattern
DAPI	-	4,6-Diamidin-2-phenylindol
dBCA	-	decellularized bovine carotic arteries
dEZM	-	dezellularisierte Extrazelluläre Matrix
DNA	-	Desoxyribonukleinsäure
DWI	-	diffusion-weighted imaging
EC	-	endothelial cells
EPC	-	endothelial progenitor cells
ePTFE	-	expanded polytetrafluoroethylene
EZM	-	Extrazelluläre Matrix
GAG	-	Glykosaminoglykane
GO	-	gene ontology
H&E	-	Hämatoxylin und Eosin
HMGB1	-	high mobility group box 1
HSP	-	heat shock protein
HUVEC	-	human umbilical-cord endothelial cells
iPSC	-	induced pluripotent stem cells
LECC	-	luminal endothelial cell coverage
MRE	-	Magnetresonanz-Elastographie
MSC	-	mesenchymal stromal cells
pAVK	-	periphere arterielle Verschlusskrankheit
rBCA	-	recellularized bovine carotic arteries
SDS	-	sodium dodecyl sulfate
TE	-	Tissue Engineering
vWF	-	von-Willebrand-Faktor
RNA	-	Ribonukleinsäure

1. Einleitung

Seitdem Joseph Murray 1954 die erste erfolgreiche Organtransplantation beim Menschen durchgeführt hat, hat sich das Feld der Transplantationsmedizin rasant entwickelt ¹⁻³.

Die Organtransplantation stellt heute ein etabliertes Therapieverfahren für Patienten mit chronischen organbezogenen Erkrankungen im Endstadium dar ². Jedoch steht diese Option aufgrund des Organmangels nicht für alle Patienten zur Verfügung. Zum 1. Januar 2021 waren 14.020 aktive Patienten auf der Warteliste für eine Organtransplantation bei Eurotransplant. Demgegenüber stehen lediglich 6.356 Organtransplantationen von verstorbenen Spendern für das Jahr 2020 ⁴. Um diese klaffende Lücke zu verkleinern, werden unterschiedliche Strategien verfolgt. Hier wären u.a. die Organspende von herztoten Spendern (in Deutschland nicht zulässig), die Erweiterung des Spenderpools (*extended criteria donors*) und die Konditionierung von *marginalen* Spenderorganen mittels Maschinenperfusion zu nennen ⁵⁻⁷. Es bleibt jedoch abzuwarten, ob diese Ansätze langfristig die Lücke zwischen dem Bedarf an Transplantationen und Patienten auf der Warteliste werden schließen können.

Auch in anderen Bereichen besteht ein Mangel an geeigneten Geweben für den Ersatz oder die Rekonstruktion von chronisch geschädigten Geweben. In der Gefäß- und Herzchirurgie stellt aktuell die Verwendung autologer Gefäße (z.B. Vv. saphenae) den Goldstandard für die periphere Bypasschirurgie dar. Jedoch stehen diese bei ca. 20% der Patienten nicht zur Verfügung ⁸. Ähnlich verhält es sich in der koronaren Bypasschirurgie, bei welcher bei einem Drittel der Patienten kein adäquates autologes Gefäß zur Verfügung steht ⁹. Hier finden Gefäße aus prothetischen Materialien Verwendung – diese sind allerdings häufig mit Komplikationen wie dem thrombotischen Verschluss oder Infektionen nach Besiedlung des Fremdmaterials vergesellschaftet ¹⁰⁻¹⁴. Insbesondere aufgrund der Thrombogenität sind die prothetischen Materialien, wie Dacron oder ePTFE (expanded polytetrafluoroethylene), ungeeignet für den Gefäßersatz von kleinen Gefäßen (Durchmesser < 5-6 mm) ^{9,15}.

Um die beschriebenen Probleme des Organ- und Gewebeersatzes zu adressieren, braucht es alternative Ansätze. Hier hat das *Tissue Engineering* in den letzten Jahrzehnten zusehends als ein experimenteller Ansatz mit der Perspektive einer zeitnahen klinischen Translation an Bedeutung gewonnen.

1.1 Tissue Engineering

Tissue Engineering (TE) ist ein interdisziplinäres Forschungsgebiet, welches unterschiedliche wissenschaftliche Teilgebiete wie zum Beispiel die Biomedizin, Biochemie und das Ingenieurwesen vereint ¹⁶. Ziel des TE ist die Entwicklung und Herstellung eines biologischen Organ-/Gewebeersatzes, welcher in der Lage ist, die Funktion eines geschädigten Organs/Gewebes zu erhalten, wiederherzustellen oder zu verbessern ¹⁶. Für die Herstellung dieser biologischen Ersatzstrukturen werden geeignete Zellen, ein synthetisches oder natürliches biokompatibles Gerüst sowie die optimalen biochemischen/biophysikalischen (Kultur-)Bedingungen benötigt ^{16,17}.

1.2 Technik der De- und Rezellularisierung

Der Ansatz der De- und Rezellularisierung stellt einen Teilbereich des TE dar, um natürliche biokompatible Gerüste zu generieren ¹⁸. Unter dem Begriff der Dezellularisierung versteht man die Entfernung bzw. das Herauslösen des zellulären Kompartimentes und damit von immunogenen Komponenten (z.B. alpha-Gal Epitop, DNA und RNA) aus der gewebespezifischen bzw. organspezifischen extrazellulären Matrix (EZM) ¹⁹.

Die spezifische EZM bleibt im Anschluss, mit ihrer Mikro- und Makroanatomie, erhalten. Dieses dreidimensionale (3D) Gerüst kann folgend mit unterschiedlichen Zellen rebesiedelt werden, um so ein *NeoOrgan* oder *NeoGewebe* zu generieren. In einem translationalen Ansatz könnte dieses Konzept so genutzt werden, dass ein *xenogenes* Organ mit ausreichender Größe dezellularisiert wird und im Anschluss mit differenzierten induzierten pluripotenten Stammzellen (induced pluripotent stem cells; iPSC) des späteren Empfängers rebesiedelt wird. Nachdem das NeoOrgan *in vitro* maturiert ist und seine Funktionsfähigkeit aufgenommen hat, kann dieses dann implantiert werden (**Abbildung 1**).

Indes müssen vor einer klinischen Translation dieses Konzeptes noch kritische Probleme gelöst werden ¹⁹. Zu nennen wären hier 1) die Zellquelle und Zelldifferenzierung, 2) die Immunogenität, 3) die Thrombogenität der EZM, 4) Kulturbedingungen für die *ex vivo* Maturation und 5) optimale Eigenschaften des EZM-Gerüsts für die Rebesiedelung ¹⁹⁻²².

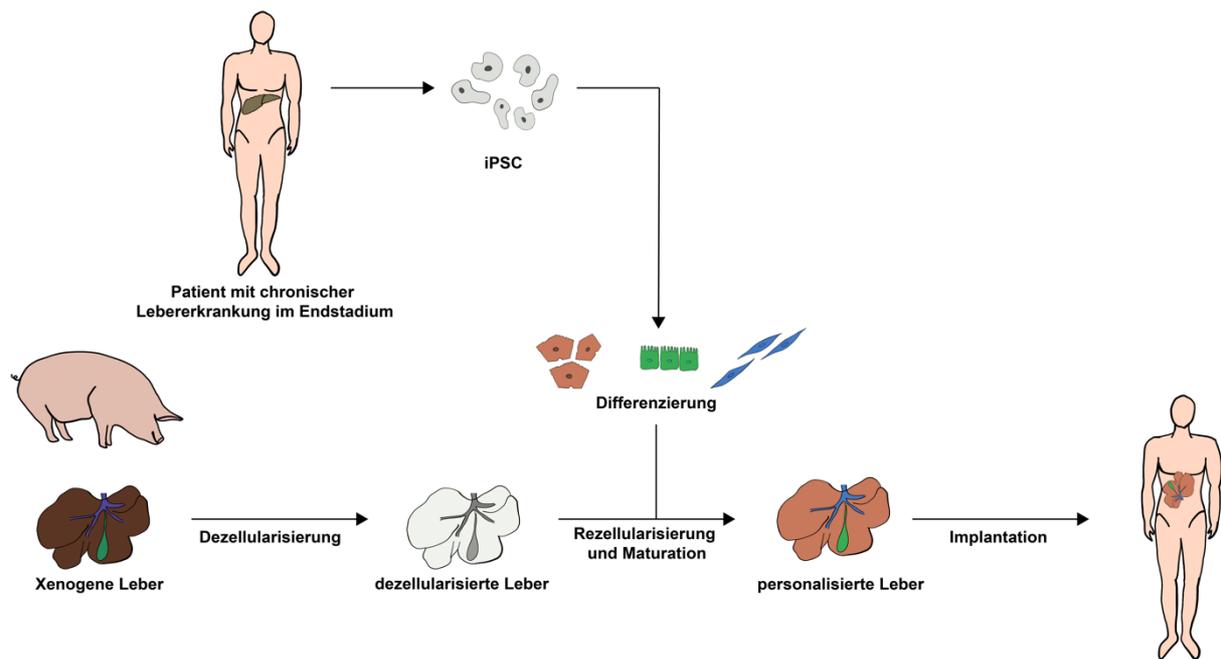


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Konzeptes der De- und Rezellularisierung im translationalen Setting am Beispiel der Leber.

1.3 Dezellularisierung und deren Einfluss auf die extrazelluläre Matrix

Obwohl die Methodik der Dezellularisierung bereits seit langem etabliert ist, gibt es bisher keine eindeutige und allgemeingültige Definition der Dezellularisierung^{19,23}. *Crapo et al.* haben 2011 in einem Übersichtsartikel zusammenfassend festgehalten, dass 1) dezellularisierte EZM weniger als 50 ng/mg Trockengewicht DNA enthalten sollte, 2) die DNA-Fragmente weniger als 200 Basenpaare lang sein sollten und 3) kein Zellkernmaterial mehr in der DAPI oder H&E Färbung sichtbar sein sollte²⁴.

Für den Prozess der Dezellularisierung werden unterschiedliche Agenzien genutzt, deren Aufgabe darin besteht, das zelluläre Kompartiment aufzulösen und dessen Bestandteile (Zellmembran, Zytosol und den Nucleus mit der DNA) aus der EZM herauszulösen¹⁹. Die Agenzien lassen sich grob in chemische und biologische Substanzen einteilen²⁴. Die chemischen Agenzien lassen sich weiter in Säuren/Basen, hypo-/hypertone Lösungen, Lösungsmittel und Detergenzien (zwitterionisch, anionisch und nicht-ionisch) unterteilen. Bei den biologischen Agenzien werden unterschiedliche Enzyme (z.B. Trypsin und Nucleasen) genutzt sowie Chelatbildner²⁴.

Zusätzlich können auch physikalische Verfahrensweisen zur besseren Dezellularisierung angewandt werden, wie zum Beispiel Einfrier-/Auftau-Zyklen, direkte Kraft-Applikation, Druck-Applikation oder die Elektroporation²⁴.

Des Weiteren gibt es bei der Dezellularisierung unterschiedliche Applikationsformen der Agenzien. Die beiden wichtigsten sind hierbei die Perfusion, wobei die Agenzien über das vorhandene Gefäßsystem eines Organs oder Gewebes appliziert werden, und die mechanische Agitation, wobei das zu dezellularisierende Gewebe in einem mit Agenzien gefüllten Behälter platziert wird und dieses mechanisch bewegt wird ²⁴. Welches Agens und welche Applikationsform gewählt werden, hängt sowohl von dem zugrundeliegenden Gewebe als auch der zu untersuchenden Fragestellung ab. Allen bereits genannten Agenzien und methodischen Ansätzen ist inhärent, dass sie in gewissem Umfang auch die EZM alterieren ^{19,24}. Exemplarisch kann hier Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecyl sulfate*, SDS) genannt werden, ein anionisches Detergenz. Beim SDS handelt es sich um eines der am häufigsten genutzten und effizientesten Dezellularisierungsdetergenzien, welches aber auch die Kollagene schädigt und Wachstumsfaktoren sowie Glykosaminoglykane entfernt ²⁴⁻²⁶. Die wenigsten Arbeiten untersuchen jedoch systematisch die dezellularisierten Gewebe/Organe bezüglich der Dezellularisierungsqualität und der Eigenschaften der dezellularisierten EZM (dEZM) ²⁶⁻³⁰.

1.4 Eigenschaften und Charakterisierung der dezellularisierten extrazellulären Matrix

Obwohl bereits bekannt ist, dass die Dezellularisierung die EZM alteriert, wird die umfangreiche Charakterisierung der dEZM hinsichtlich ihrer strukturellen, biochemischen und biophysikalischen Integrität meist vernachlässigt ³¹. Nur gelegentlich wird der Fokus im Rahmen von Dezellularisierungsstudien auf Teilaspekte der EZM-Charakterisierung gelenkt. Die meisten Studien beschränken sich auf die (immun)histologischen Untersuchungen sowie die Quantifizierung des DNA-Gehaltes und der wichtigen EZM-Bestandteile (z.B. Glykosaminoglykane, Kollagen und Elastin). Hierzu sei gesagt, dass diese oberflächliche Charakterisierung der Komplexität der dEZM nicht gerecht wird. Die EZM ist ein gut organisiertes, dynamisches, dreidimensionales, azelluläres Netzwerk von gewebespezifischen Makromolekülen^{32,33}. Das Proteom der EZM wird auch als Matrisom bezeichnet ³⁴. Dieses kann unterteilt werden in die Kern-EZM-Proteine (Kern-Matrisom) und die EZM-assoziierten Proteine (Matrisom-assoziierte Proteine) ^{34,35} (**Abbildung 2**). Das

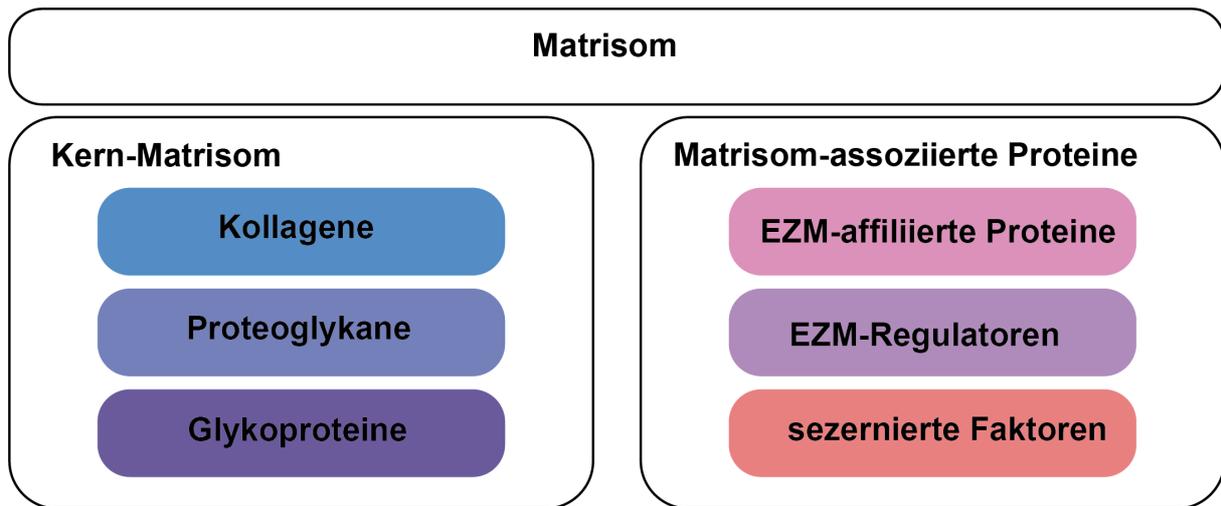


Abbildung 2: Zusammensetzung und Gliederung des Matrisoms.

Matrisom beeinflusst viele wichtige Zellfunktionen wie die Differenzierung, das Wachstum und das Zellüberleben ^{35,36}. Die organspezifische EZM und deren Zellen befinden sich in einem Zustand der dynamischen Reziprozität ^{36,37}. Diese Zell-Matrix-Interaktion wirkt sich nicht nur auf die Zusammensetzung der EZM aus, sondern auch auf deren biomechanische Eigenschaften ³⁶. Dieses Wechselspiel ist essenziell für den Erhalt der organspezifischen Homöostase und Funktion ³⁶. Aus den genannten Gründen erscheint es offensichtlich, dass die dEZM mit ihren spezifischen Eigenschaften (biochemisch und biomechanisch) die Zellen nach Rezellularisierung beeinflussen wird. Um den Prozess der Rezellularisierung sowie die folgende Kultur der Zellen in der dEZM besser verstehen und optimieren zu können, muss zuerst das Ausgangsmaterial (dEZM) tiefgreifend charakterisiert und verstanden werden.

Diese umfangreiche Charakterisierung der dEZM, auf biochemischer und biophysikalischer Ebene, findet bedauerlicherweise nur in wenigen Publikationen statt ³¹. Mittlerweile wurden unterschiedliche Ansätze zur Charakterisierung etabliert.

Beispielweise nutzen *Li et al.* die Proteomik mittels Flüssigchromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie-Kopplung zur Charakterisierung von unterschiedlichen nativen und dezellularisierten Geweben (humane Lunge und Rattenleber) ³⁸. Die Kolleginnen und Kollegen haben schließlich die proteomischen Daten hinsichtlich der Matrisom-Kategorisierung von *Naba et al.* analysiert ^{38,39}. Durch diese Untersuchung war es möglich, eine wesentlich genauere Vorstellung der Zusammensetzung von dEZM zu bekommen. Der Ansatz der Proteomik zur Charakterisierung von dEZM ist mittlerweile ein verbreiteter ⁴⁰⁻⁴².

Die EZM mit ihren spezifischen biomechanischen Eigenschaften beeinflusst viele wichtige zelluläre Funktionen wie die Differenzierung, das Wachstum und das Zellüberleben³⁶. Die gewebespezifischen Zellen und deren EZM befinden sich somit immer in einem Status der dynamischen Reziprozität. Die Zellen stehen mit der EZM über die Integrine in direkter Verbindung und können somit biomechanische Information aus der Umgebung mittels Mechanotransduktion aufnehmen und verarbeiten³⁶. Über diese Verbindung der EZM in die Zelle werden unterschiedliche Mechanismen in der Zelle reguliert, welche wiederum die EZM beeinflussen, um so die Homöostase und damit die Gewebe-Biomechanik aufrecht zu erhalten³⁶. Diese Mechanismen werden sich in ähnlicher Art und Weise auch zwischen der dEZM und den Zellen nach Rebesiedelung abspielen.

Wie bereits erläutert, sind auch die biomechanischen Eigenschaften der dEZM von höchster Relevanz³¹. Hier wurden mittlerweile multiple Ansätze beschrieben, wie unterschiedliche Parameter der mechanischen Eigenschaften auf mehreren Ebenen (mikromechanisch vs. makromechanisch) untersucht werden können³¹. Hier wäre unter anderem die Rasterkraftmikroskopie (*Atomic Force Microscopy*, AFM) zu nennen, die es ermöglicht, auf mikromechanischer Ebene die biomechanischen Eigenschaften räumlich aufgelöst innerhalb der dEZM zu analysieren⁴³⁻⁴⁵. Auf makromechanischer Ebene werden sowohl uniaxiale Zug-, Scher- und Kompressionsuntersuchungen durchgeführt^{31,46,47}.

Für die meisten beschriebenen Verfahren muss das Material irreversibel prozessiert werden oder wird bei der Testung destruiert, was eine Weiternutzung der dEZM unmöglich macht. Aus diesem Grund werden potenziell nicht-invasive Verfahren zur biomechanischen Charakterisierung benötigt.

Eine Technik, die hier eingesetzt werden könnte und für die das Gewebe nicht destruiert werden muss, ist die Magnetresonanz-Elastographie (MRE). Bei dieser bildgebungsbasierten Technik werden die viskoelastischen Eigenschaften des Gewebes bestimmt. Hierbei werden mittels eines Anregungsgeräts Scherwellen unterschiedlicher Frequenzen im zu untersuchenden Gewebe induziert. Diese breiten sich im Gewebe aus und werden mit einer Phasenkontrast-Sequenz in der MRT kodiert⁴⁸. Daraus lassen sich mittels mathematischer Prozessierung unterschiedliche Parameter berechnen wie das komplexe Schermodul mit seinem Speicher- (elastischer Teil, G') und Verlustmodul (viskoser Teil, G'')⁴⁹.

1.5 Reendothelialisierung von Gefäßen und Gefäßnetzwerken

Der Wiederaufbau der Endothelschicht bzw. des Endothelnetzwerks stellt einen wichtigen Teilaspekt für die Implantation und den Anschluss an das Empfänger-Gefäßnetzwerk von rezellularisierten Gefäßen und Organen dar ^{50,51}. Bei der Implantation von dezellularisierten Organen mit Anschluss an das Gefäßnetz hat sich gezeigt, dass diese in Kürze komplett thrombotisch verschlossen sind. Dies liegt an der *freiliegenden* EZM, vorwiegend an den Kollagenen, welche über ihre Interaktion mit Thrombozyten zu einer Thrombosierung führen ^{52–54}. Die Implantation von dezellularisierten Gefäßen als Gefäßersatz in der Gefäßchirurgie ist auch ohne Rezellularisierung möglich, da hier mittels systemischer Antikoagulation ein Gefäßverschluss verhindert werden kann ⁵⁵. Hier gibt es mehrere zugelassene sowie klinisch angewandte dezellularisierte, xenogene Gefäßersatzprothesen ⁵⁰.

Man weiß jedoch, dass auch hier — wie beim synthetischen Gefäßersatz — die Offenheitsraten niedrig sind ^{56,57}. Die Herstellung eines funktionellen TE-Gefäßersatzes stellt also den „heiligen Gral“ in der peripheren Gefäßchirurgie dar ⁵⁸.

Um die langfristige Perfusion bzw. Offenheit von rebesiedelten Organen und Gefäßen zu gewährleisten, ist die erfolgreiche Reendothelialisierung essenziell. Zusätzlich wurden unterschiedliche Ansätze der Oberflächenbeschichtung, das sogenannte *Coating*, etabliert ^{59–66}. Hier kann zwischen mehreren methodischen Vorgehensweisen unterschieden werden: einerseits das Beschichten (Coating) zur Verbesserung der Reendothelialisierung (*in vivo* oder *ex vivo*), andererseits das Coating der ‚freiliegenden‘ dEZM-Strukturen (mit oder ohne Reendothelialisierung), um somit die Thrombogenität zu reduzieren beziehungsweise ganz zu verhindern ^{59,60,62}. Auch Kombinationen beider Ansätze sind möglich.

Durch die unterschiedlichen Optimierungsstrategien konnten mittlerweile vor allem bei der Reendothelialisierung deutliche Fortschritte erzielt werden ⁵¹. So gelang es kürzlich, reendothelialisierte porcine Lebern in Schweine zu implantieren, welche anschließend 15 Tag lang perfundiert waren ⁶⁷. Für die Implantation von rebesiedelten Gefäßen war die Offenheit ebendieser in unterschiedlichen Tiermodellen über mehrere Monate zu beobachten ⁵⁰. In einer von *Olausson et al.* durchgeführten Studie wurden erfolgreich zwei rezellularisierte Venen als Pfortaderersatz in zwei Kinder implantiert. Jedoch benötigte eines der Kinder nach sieben Monaten einen neuen Gefäßersatz ^{68,69}.

Um optimale personalisierte Gefäßersatzprothesen auf Basis von De- und Rezellularisierung herzustellen, werden Gefäße unterschiedlicher Länge und mit unterschiedlichen Durchmessern benötigt. Hier richtet sich die Auswahl nach dem späteren Einsatzgebiet. Es werden hierfür in der Regel *xenogene* Gefäße bzw. Gefäßstrukturen genutzt.

Als optimale Zellquelle für die Rebesiedelung von dezellularisierten Gefäßersatzprothesen haben sich in letzter Zeit die humanen endothelialen Vorläuferzellen etabliert^{8,50,70,71}. Diese lassen sich verhältnismäßig einfach aus peripherem Blut isolieren, welches mittels Venenpunktion gewonnen werden kann. Bei den endothelialen Vorläuferzellen handelt es sich um eine heterogene Zellgruppe mit unterschiedlichen Phänotypen, deren Nomenklatur 2017 angepasst wurde^{72,73}. Zur Vereinfachung und für das bessere Verständnis wird im weiteren Verlauf für diese heterogene Zellgruppe der Terminus Endotheliale Vorläuferzellen (endothelial progenitor cells, EPC) genutzt.

In einem klinischen Setting könnte das Konzept so aussehen, dass für einen Patienten mit einer peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK), der in absehbarer Zeit einen Bypass benötigt, ein *xenogenes* Gefäß mit ausreichender Länge (z.B. bovine Carotiden) dezellularisiert wird und anschließend mit patienteneigenen EPC rebesiedelt wird. Nach einer Zeit der *ex vivo* Maturation könnte dieses individuelle TE-Gefäß schließlich implantiert werden.

Um diese personalisierten Gefäßprothesen am besten an die *in vivo* Situation anzupassen, sollten diese während der *ex vivo* Maturation hinsichtlich der später zu erwartenden Belastung und Exposition gegenüber Vollblut getestet werden. Hierfür werden aussagekräftige *ex vivo* Vollblutperfusions-Untersuchungen benötigt.

1.6 Fragestellungen

Die hier vorgelegte Habilitationsschrift wird sich vor allem mit der tiefgreifenden Charakterisierung der EZM nach Dezellularisierung sowie mit der Re-endothelialisierung von Gefäßen beschäftigen und dabei folgende Fragestellungen adressieren:

1. Lässt sich die proteomische Analyse des Matrisoms einsetzen, um dezellularisierte humane Leberschnitte (gesund und erkrankt) genauer zu charakterisieren?
2. Kann die Magnetresonanz-Elastographie (MRE) genutzt werden, um die biomechanischen Eigenschaften von dezellularisierten Geweben zu bestimmen?
3. Lassen sich bovine Karotiden mit humanen endothelialen Vorläuferzellen und mesenchymalen Stromazellen rebesiedeln?
4. Senkt die Re-Endothelialisierung der *bovinen* Karotiden die Thrombogenität in einem *ex vivo* Vollblut-Perfusionsmodell?

Die im folgenden aufgeführten Arbeiten werden versuchen, die dargelegten Fragestellungen zu adressieren.

2. Darstellung der eigenen Arbeiten

2.1 Das humane Lebermatrisom – proteomische Analyse von nativer und fibrotischer humaner Leber-EZM zum Einsatz im Bereich des *Organ Engineering*.

Daneshgar A, Klein O, Nebrich G, Weinhart M, Tang P, Arnold A, Ullah I, Pohl J, Moosburner S, Raschzok N, Strücker B, Bahra M, Pratschke J, Sauer IM, Hillebrandt KH: The human liver matrisome - Proteomic analysis of native and fibrotic human liver extracellular matrices for organ engineering approaches. Biomaterials. 2020 Oct;257:120247.

Die dEZM bzw. das Matrisom vermittelt viele essenzielle Funktionen und Mechanismen im Kontext der Struktur, des Umbaus und der Regeneration von Gewebe und ist somit auch im Zusammenhang mit der De- und Rezellularisierung von Gewebe von Bedeutung. Die tiefgreifende Charakterisierung des Matrisoms eines Organs ist daher von grundlegender Bedeutung.

Insbesondere da der Einfluss von unterschiedlichen Dezellularisierungsdetergenzien und deren Konzentrationen auf die Zusammensetzung der dEZM und somit des Matrisoms für humane Lebern bisher nicht suffizient untersucht wurden, haben wir im Rahmen dieser Arbeit zur Analyse des humanen Lebermatrisoms unterschiedliche Dezellularisierungs- und Entfettungsprotokolle etabliert und getestet. Diese wurden anschließend für die Dezellularisierung von humanen Leberproben genutzt, welche im Rahmen von Leberoperationen gewonnen wurden. Hierfür wurde das Lebergewebe in 10x10x10 mm große Fragmente geschnitten und bei -80°C gelagert. Aus diesen Fragmenten wurden dann 500 µm dicke Schnitte angefertigt, welche schließlich mit den unterschiedlichen Protokollen (16 Protokolle, basierend auf der Kombination von vier Dezellularisierungs- und vier Entfettungsansätzen) behandelt wurden. Diese wurden für vier native humane Leberproben angewandt. Neben der proteomischen Analyse des Matrisoms wurden die Leber-dEZM Schnitte noch auf den DNA- und Triglycerid-Gehalt untersucht sowie (immun)histologisch aufgearbeitet. Nachdem ein optimales Protokoll definiert wurde, wurden zusätzlich jeweils drei Proben mit den vier Fibrosegraden nach *Desmet et al.* dezellularisiert und, wie eben erläutert analysiert⁷⁴. In den histologischen Untersuchungen konnten wir nachweisen, dass die Schnitte

suffizient dezellularisiert waren und deren Mikroanatomie erhalten geblieben ist. In den Immunfluoreszenz-Färbungen (Kollagen I, Kollagen IV, Fibronectin und Laminin) konnten wir weiter zeigen, dass diese vorhanden sind und wie deren örtliche Auflösung ist. Bei der DNA- und Triglycerid-Quantifizierung konnten wir beobachten, dass diese durch die Dezellularisierung ausreichend entfernt wurden. Bei der proteomischen Analyse der Leber-dEZM, welche mit 16 unterschiedlichen Protokollen generiert wurden, wurden zwischen 91 und 110 Matrisom-Proteine identifiziert. Es gab für die Protokolle eine Übereinstimmung zwischen den unterschiedlichen Patienten von 79,51%. Insgesamt konnten in den nativen Leber-dEZM 140 Lebermatrisom-Proteine identifiziert werden. Im Anschluss wurde das beste Protokoll für die Dezellularisierung von fibrotischen Leberschnitten genutzt, welche ebenfalls proteomisch untersucht wurden. Hierbei zeigte sich, dass 70 der Matrisom-Proteine konstant über alle Grade der Fibrose sowie in den nativen Leber-dEZM Proben vorhanden sind.

Die proteomischen Ergebnisse unserer Untersuchung wurde anschließend mittels Western Blot verifiziert.

Der Vorteil des hier gewählten Ansatzes zur Charakterisierung von dEZM ist, dass er sich auf eine Vielzahl von dezellularisierten Geweben übertragen lässt. Zusätzlich bietet die Studie einen umfangreichen Einblick in das Matrisom von nativer sowie fibrotischer Leber-dEZM.

Daneshgar A, Klein O, Nebrich G, Weinhart M, Tang P, Arnold A, Ullah I, Pohl J, Moosburner S, Raschzok N, Strücker B, Bahra M, Pratschke J, Sauer IM, **Hillebrandt KH**: The human liver matrisome - Proteomic analysis of native and fibrotic human liver extracellular matrices for organ engineering approaches.

Biomaterials. 2020 Oct;257:120247.

<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120247>

2.2 Mittels Magnetresonanz-Elastographie lässt sich der Fest-flüssig-übergang in dezellularisierten Lebergewebe quantifizieren

Everwien H, Ariza de Schellenberger A, Haep N, Tzschätzsch H, Pratschke J, Sauer IM, Braun J, **Hillebrandt KH***, Sack I*: *Magnetic resonance elastography quantification of the solid-to-fluid transition of liver tissue due to decellularization. J Mech Behav Biomed Mater. 2020 Apr;104:103640.*

*Contributed equally.

Die biomechanische Charakterisierung von dezellularisiertem Gewebe stellt, wie bereits in der Einleitung erwähnt, einen weiteren wichtigen Teilaspekt dar, insbesondere im Hinblick auf die Rezellularisierung. Da mittlerweile bekannt ist, dass die EZM mit ihren mechanischen Eigenschaften das Verhalten und die Proliferation von Zellen beeinflusst. Für die meisten mechanischen Charakterisierungsverfahren muss die dEZM prozessiert werden oder wird bei der Testung destruiert. Mit der MRE steht ein potenziell nicht-invasives Verfahren zur Verfügung.

Um zu testen, ob die MRE sich zur Charakterisierung von dezellularisierten Geweben und Organen eignet, wurden dezellularisierte Rattenlebern mit einem 0,5-Tesla *tabletop* MRE-Gerät bei unterschiedlichen Frequenzen (400, 500 und 600 Hz) gemessen. Zusätzlich erfolgte eine Analyse der Dezellularisierung. Als Vergleichsgruppe dienten native nicht dezellularisierte Rattenlebern.

Die makroskopische und mikroskopische Analyse der dezellularisierten Lebern ergab, dass diese erfolgreich dezellularisiert wurden. Bei der MRE wurden folgende Parameter erhoben/berechnet: die Wellengeschwindigkeit (c), die Durchdringungsrate (a) beide in m/s sowie das komplexe Schermodul mit seinem Speicher- (G') und Verlustmodul (G''), welche die viskoelastischen Eigenschaften repräsentieren. Aus diesem wurde schließlich der *Verlustwinkel* berechnet. Dieser gibt das Verhältnis zwischen elastischen und viskosen Eigenschaften an und kann einen Wert zwischen 0 und $\pi/2$ annehmen, wobei Werte kleiner $\pi/4$ auf einen festen Zustand hinweisen, während Werte größer $\pi/4$ auf einen flüssigen Zustand hinweisen.

Wir konnten beobachten, dass durch die Dezellularisierung G' und G'' signifikant abgenommen haben im Vergleich zu nativen Lebern. Dies führt dazu, dass der *loss angle* sich mehr Richtung $\pi/2$ bewegt, was für einen Übergang zu einem flüssigen

Zustand spricht. Es lässt sich daraus schließen, dass die biomechanischen Eigenschaften in der nativen Rattenleber maßgeblich durch die Zellen, hauptsächlich die Hepatozyten und deren Interaktion untereinander sowie mit der Matrix definiert werden. Durch die Dezellularisierung werden die Zellen entfernt und deren Platz durch Flüssigkeit eingenommen, was die beobachtete biophysikalische Transformation erklärt.

Die hier vorgestellte Studie zeigt eindrucksvoll, dass die MRE genutzt werden kann, um die viskoelastischen Eigenschaften von dezellularisierten Geweben zu untersuchen. Obwohl die komplette dezellularisierte Rattenleber für die Messungen im tabletop MRE noch zerteilt werden musste, scheint eine nicht-invasive Nutzung der Technik dennoch möglich, da ihr Aufbau beliebig skalierbar ist.

Everwien H, Ariza de Schellenberger A, Haep N, Tzschätzsch H, Pratschke J, Sauer IM, Braun J, **Hillebrandt KH***, Sack I*: *Magnetic resonance elastography quantification of the solid-to-fluid transition of liver tissue due to decellularization.*

J Mech Behav Biomed Mater. 2020 Apr;104:103640.

*Contributed equally.

<https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2020.103640>

2.3 Der solide Gewebeanteil bestimmt die Steifigkeit und Viskosität von dezellularisiertem Pankreasgewebe

Snellings J, Keshi E, Tang P, Daneshgar A, Willma EC, Haderer L, Klein O, Krenzien F, Malinka T, Asbach P, Pratschke J, Sauer IM, Braun J, Sack I, Hillebrandt KH: Solid fraction determines stiffness and viscosity in decellularized pancreatic tissues. Biomaterials Advances. Volume 139, 2022, 212999. (bis Anfang 2022 Materials Science and Engineering: C)

Diese Studie stellt eine inhaltliche und technische Weiterentwicklung der vorangegangenen Untersuchungen dar. Es werden zwei Fragen beantwortet: erstens inwieweit sich unterschiedliche Konzentrationen der Detergenzien auf die Dezellularisierung sowie die biomechanischen Eigenschaften auswirken und zweitens wie der solide Gewebeanteil, welcher nach Dezellularisierung verbleibt, die viskoelastischen Eigenschaften beeinflusst.

Initial wurde ein neuartiges perfusionsbasiertes und druckgesteuertes Dezellularisierungssetup für *porcine* Pankreata etabliert, welches im Anschluss mit zwei Protokollen benutzt wurde. Die beiden Protokolle unterschieden sich in der Konzentration der Detergenz Natriumlaurylsulfat (sodium dodecyl sulfate, SDS): 1% vs. 0,1%. Nach erfolgreicher Dezellularisierung wurde eine frische Probe direkt mittels eines 0,5-Tesla *tabletop* MRE-Gerät bei unterschiedlichen Frequenzen (400-5000 Hz) biomechanisch analysiert. In der (immuno)-histologischen Untersuchung zeigten sich die dezellularisierten Pankreata frei von zellulären Bestandteilen sowie eine erhaltene Mikroanatomie. Bei der Bestimmung der viskoelastischen Eigenschaften zeigte sich kein Unterschied zwischen den beiden Dezellularisierungsprotokollen, was indirekt daraufhin deutet, dass die SDS-Konzentration keinen relevanten Einfluss auf die für die biomechanischen Eigenschaften verantwortliche dEZM hat. Des Weiteren wurde untersucht, wie sich die Steifigkeit und Viskosität von dezellularisierten Geweben über die Zeit verändern. Hierbei konnten wir beobachten, dass nach Dezellularisierung die genannten Parameter über mehr als 60 Stunden stabil bleiben. Für die nativen Pankreata wurde ein initialer Abfall von Steifigkeit und Viskosität beobachtet, gefolgt von einer Stabilisierung.

Zusätzlich war es uns möglich, die Abhängigkeit von Steifigkeit und Viskosität von dem soliden Gewebeanteil nach Dezellularisierung zu zeigen, sprich: Die Steifigkeit und

Viskosität steigen mit zunehmendem soliden Gewebeanteil nach Dezellularisierung an. Im Vergleich zu der vorangegangenen Studie zeigt sich eine Zunahme der Steifigkeit und Viskosität nach Dezellularisierung. Methodisch wurde in dieser Studie residuelles Wasser von der Probe entfernt, was wiederum die Biomechanik der dEZM beeinflusst.

Mit dem hier entwickelten methodischen Ansatz sowie den gewonnenen Erkenntnissen könnte es in Zukunft möglich sein, unterschiedlichste dezellularisierte Gewebe mittels MRE nicht-invasiv zu charakterisieren. Diese Informationen könnten Aufschluss sowohl über den Dezellularisierungsprozess sowie über die strukturelle Integrität des Gewebes nach Dezellularisierung geben.

Snellings J, Keshi E, Tang P, Daneshgar A, Willma EC, Haderer L, Klein O, Krenzien F, Malinka T, Asbach P, Pratschke J, Sauer IM, Braun J, Sack I, **Hillebrandt KH**: Solid fraction determines stiffness and viscosity in decellularized pancreatic tissues. *Biomaterials Advances*. Volume 139, 2022, 212999. (bis Anfang 2022 *Materials Science and Engineering: C*)

<https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2022.212999>

2.4 *In vitro* Rebesiedelung von dezellularisierten *bovinen* Karotiden mit *humanen* endothelialen Vorläuferzellen

Seiffert N, Tang P, Keshi E, Reutzel-Selke A, Moosburner S, Everwien H, Wulsten D, Napierala H, Pratschke J, Sauer IM, Hillebrandt KH, Struecker B*: In vitro recellularization of decellularized bovine carotid arteries using human endothelial colony forming cells.*

J Biol Eng. 2021 Apr 21;15(1):15.

*Contributed equally.

Im Rahmen dieses Projekts haben wir ein bereits in der Arbeitsgruppe etabliertes Dezellularisierungsprotokoll für Gefäße modifiziert und für bovine Karotiden (bovine carotic artery, BCA) adaptiert. Der Erfolg der Dezellularisierung wurde histologisch sowie immunhistologisch untersucht. Zusätzlich wurden der DNA-Gehalt und der GAG-Gehalt vor und nach Dezellularisierung bestimmt. Wir konnten histologisch eine erfolgreiche Dezellularisierung zeigen durch die Abwesenheit von Zellen und DNA-Bestandteilen in der H&E-Färbung sowie der DAPI-Färbung. Zusätzlich zeigte die DNA-Quantifizierung eine signifikante Reduktion durch die Dezellularisierung. Um den Erhalt der biomechanischen Eigenschaften nach Dezellularisierung zu analysieren, wurden definierte Ringe der Gefäße angefertigt und in einer uniaxialen Zugtestmaschine nach Vorspannung mechanisch untersucht. Hier zeigten sich für die erhobenen Parameter graduelle Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsschritten und den nativen Proben.

Für die Re-Endothelialisierung haben wir uns für humane EPC entschieden. Diese wurden erfolgreich aus dem Blut von Patienten mit kardiovaskulären Vorerkrankungen isoliert und charakterisiert. Zur initialen Vereinfachung der Rebesiedelungsversuche wurden aus den dezellularisierten BCA (dBCA) kleine Chips angefertigt und diese statisch *in vitro* rebesiedelt. Initial erfolgte diese nur mit humanen EPC. Hierbei zeigte sich nahezu keine Besiedlung der dBCA. Um die Effizienz der Rebesiedelung zu steigern, kombinierten wir für die Rezellularisierung die hEPC mit Mesenchymalen Stromazellen (MSC), initial von Ratten und später humane. Hierdurch konnte die Rezellularisierung deutlich verbessert werden. Jedoch fiel bei der Untersuchung der zellulären Herkunft auf, dass bei der Kombination von hEPC und rMSC die dBCA

Chips zum Ende der Kultivierung fast ausschließlich mit Zellen mit Ratten-Ursprung besiedelt waren. Im Anschluss kombinierten wir die hEPC mit hMSC und konnten eine partiell erfolgreiche Re-Endothelialisierung beobachten. Es zeigt sich, dass wahrscheinlich für eine erfolgreiche Besiedlung von Gefäßen mit humanen EPC eine Unterstützung von perivaskulären Zellen in Form von humanen MSC notwendig ist.

Seiffert N, Tang P, Keshi E, Reutzel-Selke A, Moosburner S, Everwien H, Wulsten D, Napierala H, Pratschke J, Sauer IM, **Hillebrandt KH***, Struecker B*: *In vitro* recellularization of decellularized bovine carotid arteries using human endothelial colony forming cells.

J Biol Eng. 2021 Apr 21;15(1):15.

*Contributed equally.

<https://doi.org/10.1186/s13036-021-00266-5>

2.5 Die Oberflächenmodifikation von bovinen Karotiden mittels humaner endothelialer Zellen reduziert die Thrombogenität

Keshi E, Tang P, Weinhart M, Everwien H, Moosburner S, Seiffert N, Lommel M, Kertzsch U, Globke B, Reutzel-Selke A, Strücker B, Pratschke J, Sauer IM, Haep N, Hillebrandt KH*: Surface modification of decellularized bovine carotid arteries with human vascular cells significantly reduces their thrombogenicity.*

J Biol Eng. 2021 Nov 24;15(1):26.

*Contributed equally.

Aufbauend auf den Ergebnissen der vorangegangenen Arbeit haben wir als nächsten Schritt mit der Rebesiedelung von intakten dBCA begonnen. Diese rezellularisierten Gefäße können einerseits potenziell als Gefäßersatz in der Gefäßchirurgie genutzt werden, andererseits helfen sie uns dabei, den Prozess der Re-Endothelialisierung besser zu verstehen.

Zur Dezellularisierung der BCA haben wir das vorher etablierte Protokoll benutzt. Auf eine erneute umfangreiche Charakterisierung wurde deswegen verzichtet. Zur Reendothelialisierung wurden wieder humane MSC and EPC genutzt. Für die Rebesiedelung und dynamische Kultivierung wurde eigens ein Reaktor mit dem dazugehörigen Perfusionssetup entwickelt. Es erfolgte eine dynamische Rebesiedelung über 48 Stunden mit Zwischenphasen der statischen Kultur/Inkubation. Die Kulturbedingungen wurde während der Re-Endothelialisierung regelmäßig mittels Blutgasanalysen (BGA) überwacht. Im Anschluss wurden die rebesiedelten BCA (rBCA) dynamisch mit steigenden Flussraten für zehn bzw. 14 Tage kultiviert. Zur Einschätzung der Rezellularisierung wurden die Gefäße nach Beendigung der Versuche histologisch aufgearbeitet und standardisiert analysiert. Als wichtiger Parameter wurde die luminale Zellbedeckung mit Endothelzellen (*luminal endothelial cell coverage*, LECC) etabliert. Diese wurde von zwei unabhängigen Untersuchern mit einer vorgefertigten Maske bestimmt. Die LECC-Bestimmung wurde dann mit den Messungen der BGA korreliert. Hierbei zeigte sich, dass die LECC mit dem Glucose Verbrauch und der Laktatproduktion am Tag vor der Beendigung der Zehn-Tage Versuche korreliert. Wir haben hierbei herausgefunden, dass ein Glucose-Wert von < 62 mg/dl mit einer luminalen Zellbedeckung von >60% vergesellschaftet ist (Spezifität: 85,7 % Sensitivität: 100 %).

Für die *ex vivo* Vollblutperfusion wurden im Anschluss nur Versuche mit einer LECC >50% genutzt. Die Dauer der Vollblutperfusion betrug zwei Stunden. Verglichen wurden die rezellularisierten Gefäße mit dezellularisierten Gefäßen sowie der einfachen Perfusion im Setup ohne Gefäß. Wir konnten beobachten, dass es bei den dezellularisierten Gefäßen sowohl nach einer sowie zwei Stunden zu einem signifikanten Abfall der Thrombozyten in der *ex vivo* Perfusion kam, wohingegen der Abfall der Thrombozyten bei den rezellularisierten Gefäßen nicht signifikant war und vergleichbar mit der Perfusion des Kreislaufs ohne eingespanntes Gefäß. Zusätzlich konnte bei den dezellularisierten Gefäßen teilweise eine makroskopische Thrombusformierung beobachtet werden.

Keshi E, Tang P, Weinhart M, Everwien H, Moosburner S, Seiffert N, Lommel M, Kertzsch U, Globke B, Reutzel-Selke A, Strücker B, Pratschke J, Sauer IM, Haep N, **Hillebrandt KH***: Surface modification of decellularized bovine carotid arteries with human vascular cells significantly reduces their thrombogenicity.*

J Biol Eng. 2021 Nov 24;15(1):26.

*Contributed equally.

<https://doi.org/10.1186/s13036-021-00277-2>

3. Diskussion

Ziele der hier vorgelegten Arbeiten waren, neue methodische Ansätze zur Charakterisierung von dezellularisierten Geweben und Organen zu etablieren sowie die Rezellularisierung von dBCA mit humanen EPC weiterzuentwickeln und eine Testung ebendieser zu erproben.

Der Ansatz der Dezellularisierung mit der Entfernung des zellulären Kompartments unter dem Erhalt der organ- bzw. gewebe-spezifischen EZM stellt einen ganz besonderen Ansatz im Bereich des Tissue Engineering dar. Obwohl das Ziel ist, die spezifische EZM in ihrer Gesamtheit und Komplexität zu erhalten, wird es bei jedem Dezellularisierungsprozess – bedingt durch die eingesetzten Agenzien – zu einer Alteration der EZM kommen^{19,24}. Die EZM stellt ein wichtiges Element dar, welches essenzielle Funktionen wie die Zelldifferenzierung, -Proliferation und das Zellüberleben reguliert^{32,33,39}. Die Charakterisierung der dezellularisierten Gewebe bzw. Organe und damit der spezifischen EZM, war in den initial publizierten Arbeiten noch sehr oberflächlich¹⁹. Die umfangreiche Charakterisierung ist jedoch besonders wichtig, um zu untersuchen, ob und in welchem Umfang die organ- bzw. gewebe-spezifischen EZM-Eigenschaften nach dem Prozess der Dezellularisierung erhalten bleiben. Obwohl die EZM hinsichtlich ihrer übergeordneten Struktur in den meisten Organen/Geweben gleich ist, gibt es doch organspezifische Unterschiede^{75,76}. Diese spezifischen Unterschiede scheinen von besonderer Bedeutung für die Differenzierung von Zellen zu sein⁷⁶. Es konnte beispielsweise mehrfach gezeigt werden, dass die Leber-dEZM supportive Effekte bei der Differenzierung von iPSC hat im Vergleich zu anderen *in vitro* Kultursystem^{77,78}. So konnten *Jaramillo et al.* unter anderem mittels qRT-PCR zeigen, dass hiPS-K3 Zellen die auf Leber-dEZM kultiviert wurden im Vergleich zu Matrigel, eine deutliche Hochregulation von bestimmten Markern adulter Hepatozyten zeigen⁷⁷. Eine Limitation der Arbeit war jedoch sicherlich, dass die Leber-dEZM nur sehr basal charakterisiert wurde und nur rudimentär auf den Zusammenhang zwischen der Komposition der dEZM und der Differenzierung eingegangen wurde⁷⁷. Hier ist ebenfalls vorstellbar, dass uns eine umfangreiche Charakterisierung der dEZM weiterhelfen könnte, um die beschriebenen Beobachtungen besser zu verstehen.

Die Proteomik zur tieferegreifenden Analyse von dezellularisierten Organen und Geweben konnte uns einen detaillierten Einblick in den proteomischen Aufbau der

Leber-dEZM geben. Ein wichtiger Aspekt scheint, dass trotz makroskopisch und mikroskopisch erfolgreicher Dezellularisierung ein noch relevanter Anteil an nicht-matrisomen Proteinen in der dEZM zu finden ist. So konnten wir für die unterschiedlichen Protokolle insgesamt zwischen 774 – 1103 Proteine identifizieren, wovon nur 91 – 110 in der Matrisom Datenbank von *Naba et al.* vorhanden waren ⁴⁰. Die Tatsache, dass trotz Dezellularisierung noch zelluläre Proteine zu finden sind, wurde auch in anderen Studien beobachtet ^{79–81}. Die Bedeutung der residuellen zellulären Proteine, insbesondere im Kontext der Rezellularisierung oder Implantation von dEZM, ist aktuell noch unklar und wird umfangreicher Untersuchungen benötigen. So wurden beispielsweise Hitzeschockproteine in dEZM (heat shock proteins, HSP) nachgewiesen, welche auch als sogenannte *damage-associated molecular pattern (DAMP)* fungieren ^{40,41,82}. Diese DAMP sind wichtige Vermittler bei inflammatorischen Prozessen ⁸². Jedoch können DAMP auch eine Rolle als bioaktive bzw. bioinduktive Moleküle spielen und darüber die nach einer Implantation in einen Empfänger ablaufende Immunantwort beeinflussen ⁸³. So haben *Daly et al.* in ihrer Arbeit die Bedeutung des DAMPs HMGB1 (High mobility group box 1) gezeigt, welches zu den am besten untersuchten DAMP gehört. In dieser Arbeit konnte dargelegt werden, dass das Ausgangsgewebe, der Dezellularisierungsprozess sowie post-Dezellularisierungsmodifikationen (*Crosslinking*) den Gehalt an HMGB1 beeinflussen. Zusätzlich wurden in dieser Studie deutliche Unterschiede hinsichtlich der Interaktion der unterschiedlichen EZM-Gerüste mit einer monozytären Zelllinie in Abhängigkeit des HMGB1 Gehaltes gezeigt ⁸³. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass DAMPs eine wichtige Rolle bei der Navigation der Immunantwort auf dEZM-Gerüste nach Implantation spielen können ⁸³. Diese Arbeit hebt erneut eindrucksvoll hervor, wie wichtig die möglichst umfangreiche Charakterisierung der dEZM ist. Nicht nur mit Hinsicht auf das Matrisom sondern ebenfalls auf die nicht-Matrisom-Proteine, da diese ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Implantation spielen können.

Was weiterhin aus unserer Sicht ein Problem darstellt, ist die Heterogenität bei der Aufarbeitung, Darstellung und Interpretation proteomischer Daten von dEZM. So stellt der von uns gewählte Ansatz, die Daten anhand der Matrisom-Strukturierung von *Naba et al.* zu analysieren, nur *einen* dar ^{35,39}. Dieser wurde mittlerweile von einigen Gruppen angewandt ^{38,40,41,80,84}. Hier konnten bereits einige Unterschiede zwischen unterschiedlichen Spezies, Organen oder Dezellularisierungsmethoden beobachtet werden. Beispielsweise haben *Asthana et al.* Proben humaner Pankreata

dezellularisiert und proteomisch mittels Flüssigchromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie-Kopplung aufgearbeitet und dabei insgesamt nur 101 Proteine gefunden, wovon nur 39 Matrisom-Proteine waren ⁸⁰. Hier zeigt sich ein eindrucksvoller Unterschied zu unseren Daten ⁴⁰. Vergleicht man jedoch nun unterschiedliche dezellularisierte humane Pankreata, so konnten *Ma et al.* bei ihrer Analyse 120 Matrisom-Proteine identifizieren ^{80,84}.

Legt man nun den Fokus auf den Speziesunterschied, konnten *Berger et al.* in dezellularisierten Pankreata des Schweines deutlich mehr Matrisom- sowie Nicht-matrisom-Proteine nachweisen im Vergleich zu *Asthana et al.* ⁴¹. Für die Leber können ebenfalls zwischen dezellularisierten Ratten- und humanen Proben weitreichende Unterschiede in der Zusammensetzung des Matrisoms beobachtet werden ^{38,40}.

Was diese – doch teilweise großen – Unterschiede in der Zusammensetzung der dEZM bedingen, lässt sich aus unserer Sicht aktuell noch nicht abschätzen. Potenzielle Einflussgrößen sind sicherlich die Probenaufarbeitung und -analyse, die Dezellularisierungsprotokolle sowie die Unterschiede der EZM der einzelnen Organe. Diese relevanten Unterschiede verdeutlichen eindrücklich, wie wichtig die umfangreiche Charakterisierung der dEZM ist.

Bei anderen Ansätzen zur Analyse proteomischer Daten von dEZM werden alle gefundenen Proteine anhand ihrer *Gene Ontology (GO) Annotations* in die drei Kategorien biologische Prozesse, molekulare Funktion und zellulärer Bestandteil eingeteilt. Diese jeweiligen Kategorien haben wiederum Subkategorien ⁸⁵. Zusätzlich sind in der Literatur noch multiple andere Darstellungen bzw. Auswertungen von proteomischen Daten dezellularisierter Gewebe vorhanden.

Des Weiteren können bei den unterschiedlichen Aufarbeitungs- und Darstellungsformen noch vergleichende Anreicherungsanalysen durchgeführt werden. Um die proteomischen Ergebnisse der unterschiedlichen dEZM vergleichbar zu machen, wäre aus unserer Sicht eine einheitliche Aufarbeitung und Darstellung der Daten sicherlich sinnvoll. Welche Form der Datenprozessierung und -darstellung sich für einen Vergleich am besten eignet, lässt sich aktuell noch nicht abschätzen.

Wie bereits erwähnt, ist die Charakterisierung der dEZM vor einer Rebesiedelung essenziell. Diese Tatsache lässt sich mit der Studie von *Guo et al.* untermauern, hier konnte gezeigt werden, dass über die Dauer der Reendothelialisierung von bis zu 21 Tagen von Rattenlebern mit HUVEC sukzessive mehr humane Matrisom-Proteine nachweisbar waren, wohingegen die Ratten-Proteine in der dezellularisierten Leber

über den Kultivierungszeitraum konstant blieben⁸⁶. Dies weist auf einen Umbau der dEZM hin und könnte Hinweise geben, ob bestimmte *xenogene* dEZM mit humanen Matrisom-Proteinen augmentiert werden müssen, um eine bessere Rezellularisierung zu erreichen. Jedoch sind dies erste Daten hinsichtlich der Veränderung des Matrisoms durch Rezellularisierung. Es bleibt also abzuwarten, in welcher Weise sich die dEZM durch die Rebesiedelung auch mit anderen Zelltypen verändern wird.

Ein weiterer wichtiger Aspekt in unserer Arbeit war die Aufarbeitung und Analyse von fibrotischer bzw. zirrhotischer Leber-dEZM. So war es uns möglich Matrisom-Proteine zu identifizieren, welche in unserer Analyse ausschließlich bei bestimmten Graden der Fibrose/Zirrhose zu finden waren⁴⁰. Zusätzlich haben wir in unserer Arbeit ein Modell etabliert, welches geeignet ist, *in vitro* die Interaktion von Zellen mit der EZM zu untersuchen^{40,87}. Wie vielversprechend solche krankheitspezifischen – dEZM-basierten Modelle sind konnte eine Arbeit von *Mazza et al.* verdeutlichen⁸¹. In deren Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch die Kultivierung von HepG2 Zellen in zirrhotischer Leber-dEZM bestimmte Epithelial-mesenchymale Transition vermittelte prokarzinogene Marker hochreguliert werden⁸¹. Zudem konnte die Gruppe demonstrieren, dass das Modell auch geeignet ist, um Medikamententestungen durchzuführen⁸¹. Diese und weitere Arbeiten legen nahe, dass dEZM basierte *in vitro* Kultursysteme geeignet sein könnten, krankheitsspezifische Interaktionen zwischen Zellen und der EZM zu untersuchen und besser zu verstehen^{88,89}. Hierfür stellt die proteomische Charakterisierung der dEZM einen wichtigen Ausgangspunkt dar. Jedoch muss einschränkend festgehalten werden, dass sich noch nicht abschätzen lässt, inwieweit diese dEZM basierten Modelle in der Lage sind die *in vivo* vorherrschende Komplexität von Krankheiten abzubilden. Beispielweise wurden in den bisher eingesetzten dEZM-basierten Krankheitsmodellen Immunzellen außenvorgelassen. Jedoch spielen bei der Leberfibrose/-zirrhose Immunzellen eine essenzielle Rolle⁹⁰. Es bleibt also abzuwarten, ob sich auch komplexere Mechanismen in den dEZM-basierten Modellen abbilden lassen.

Die Biomechanik der EZM und damit auch der dEZM hat eine wichtige Bedeutung bei der Vermittlung von multiplen zellulären Prozessen^{36,91}. In einer umfangreiche Übersichtsarbeit von *Behmer Hansen et al.* wurden bisher eingesetzte Charakterisierungsverfahren für die biomechanischen Eigenschaften der dEZM zusammengefasst³¹.

Die Nutzung der MRE zur Charakterisierung viskoelastischer Eigenschaften von dezellularisierten Geweben stellt einen innovativen Ansatz dar. Unsere Arbeitsgruppe hat diese Nutzung weltweit als erstes beschrieben und weiterentwickelt^{92,93}. Aus diesem Grund lassen sich unsere quantitativen Messdaten nur schwer mit denen anderer Gruppen und Modalitäten vergleichen. *Perepelyuk et al.* konnte eine Dezellularisierungs-bedingte Abnahme des Ausgangswertes des Schermoduls G' auf 10% von nativen Rattenlebern beobachten⁴⁶. Zusätzlich konnten die Gruppe einen nahezu kompletten Verlust der Kompressionsversteifung, bedingt durch die Dezellularisierung feststellen⁴⁶. Die Vergleichbarkeit zu unserer Studie ist jedoch limitiert, da diese Werte mittels eines Rheometers generiert wurden⁴⁶. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Zellen in der Leber, maßgeblich die Hepatozyten, wesentlich zur mechanischen Integrität beitragen⁹². Da während des Prozesses der Dezellularisierung das zelluläre Kompartiment entfernt wird und mit Flüssigkeit ersetzt wird, scheint der Übergang von einem soliden Gewebezustand hin zu einem flüssigeren Gewebezustand logisch. Jedoch muss limitierend festgehalten werden, dass sich die biomechanischen Eigenschaften verändern, wenn die Flüssigkeit aus der dEZM entfernt wird und sich die residuelle Matrix retrahiert. Es ist anzunehmen, dass die dEZM dadurch kompakter und somit steifer wird⁹³. Welchen Einfluss diese Veränderung der viskoelastischen Eigenschaften der dezellularisierten Leber bei der Rebesiedelung auf die Zellen haben, sollte zeitnah untersucht werden. Außerdem sollte weiterhin untersucht werden, inwieweit die rezellularisierten Zellen die dEZM verändern und damit die biomechanischen Eigenschaften verändern bzw. anpassen. Für rezellularisierte Herz-dEZM konnte gezeigt werden, dass sich durch die suffiziente Rebesiedelung und Maturation die Elastizität wieder der des nativen Gewebes anpasst⁹⁴.

Auch für dezellularisiertes Pankreasgewebe sind bisher nur wenige Daten hinsichtlich der biomechanischen Eigenschaften verfügbar. Diese Daten sind allerdings nur eingeschränkt auf unsere Beobachtungen übertragbar, da sie mittels eines anderen methodischen Ansatzes erhoben wurden⁹⁵. So haben *Goh et al.* mittels AFM das Elastizitätsmodul (Young-Modul) bestimmt. Die Gruppe konnte ähnlich wie wir einen Anstieg der Steifigkeit nach Dezellularisierung beobachten. Jedoch muss hier mit äußerster Vorsicht verglichen werden, da die AFM die dEZM auf mikromechanischer Ebene charakterisiert und die MRE unsere Pankreas-dEZM auf makromechanischer Ebene untersucht hat^{93,95}. Des Weiteren unterscheiden sich die dynamischen

Bereiche der AFM und MRE deutlich voneinander. Während AFM im quasi-statischen Bereich angewandt wird, nutzt die MRE Frequenzen im Kilohertz-Bereich. Zusätzlich konnten wir in unserer Untersuchung darlegen, dass die Steifigkeit und Viskosität vom soliden Gewebeanteil der EZM nach Dezellularisierung abhängt⁹³. Diese Information ist wichtig, da der Dezellularisierungsprozess und die genutzten Detergenzien einen Einfluss auf die dEZM haben. So können unterschiedliche Dezellularisierungsprotokolle den Kollagen-, Elastin- und GAG-Gehalt beeinflussen, was wiederum mit dem soliden Gewebeanteil korreliert und somit mit den viskoelastischen Eigenschaften⁹³. Daraus lässt sich ableiten, dass sich über die Wahl des Dezellularisierungsprotokolls (Applikationsmodus und Expositionsdauer) sowie der Detergenzien die Zusammensetzung der dEZM und damit die biomechanischen Eigenschaften beeinflussen lassen. Wir konnten bereits zeigen, dass bei der Dezellularisierung von bovinen Karotiden nach dem dritten Dezellularisierungszyklus die Gesamtkonzentration an GAG abnimmt⁷¹. *He et al.* konnten ebenfalls zeigen, dass die Detergenzienkonzentration und deren Expositionszeit die Konzentration von GAG in dezellularisierten Rattennieren beeinflusst. Ähnliche Beobachtungen hinsichtlich der zeitlichen Exposition von Detergenzien und der Veränderung von wichtigen EZM-Proteinen konnten *Lin et al.* bei porcinen Koronararterien machen⁹⁶. Zusätzlich konnten *Lin et al.* darstellen, dass sich mit der Dauer der Dezellularisierung bestimmte biomechanische Eigenschaften, in dem Fall das pseudoelastische Verhalten verändert⁹⁶. Diese Ergebnisse und unsere Beobachtungen hinsichtlich des Zusammenhangs zwischen der EZM-Komposition und den biomechanischen Eigenschaften, können somit als erste Hinweise angesehen werden, dass sich die biomechanischen Eigenschaften durch den Prozess der Dezellularisierung modifizieren lassen. Dies könnte wiederum weitreichende Implikationen für eine erfolgreiche Rebesiedelung haben. Jedoch fehlen diesbezüglich noch Studien für die Rebesiedelung von dezellularisiertem Leber- und Pankreasgewebe mit unterschiedlichen biomechanischen Eigenschaften.

Es ist zudem vorstellbar, dass die MRE als kontinuierliches Monitoring-Verfahren für den Prozess der Dezellularisierung von ganzen Organen genutzt wird. Bisher werden für die Verifizierung des erfolgreichen Dezellularisierungsprozesses zumeist destruirende Charakterisierungsverfahren, wie u.a. Histologie, Immunhistologie und Elektronenmikroskopie genutzt. Hier könnte die MRE eine wertvolle Alternative oder Ergänzung darstellen. Der Vorteil der MRE ist die Skalierbarkeit des technischen

Ansatzes und die Tatsache, dass neben Informationen hinsichtlich der viskoelastischen Eigenschaften auch bildbasierte Informationen über das dezellularisierte Gewebe erhoben werden können. Hier wäre beispielweise die Wasser-Diffusion in (dezellularisierten) Geweben zu nennen, welche im Rahmen der Magnetresonanz Bildgebung, welche für die MRE durchgeführt wird, mittels DWI-Sequenz (diffusion-weighted imaging) mitbestimmt werden kann ^{97,98}. Einen methodisch ähnlichen Ansatz zum Monitoring der Dezellularisierung haben *Geerts et al.* bereits für ganze Rattenlebern evaluiert ⁹⁹. Hierfür hat die Gruppe neben konventionellen Charakterisierungstechniken zusätzlich sequenzielle μ -Computertomographie Untersuchungen während des Dezellularisierungsprozesses der Rattenlebern durchgeführt. Hier konnte gezeigt werden, dass der Dann-Gehalt mit den Hounsfield-Einheiten korreliert und somit mit einer nicht-destruierenden Technik Aussagen über die Entfernung des zellulären Kompartiments getroffen werden können ⁹⁹. Inwiefern sich dieser Ansatz auf die Anwendung der MRE zum kontinuierlichen Monitoring übertragen lässt, muss nun in weiterführenden Studien, im Optimalfall mit unterschiedlichen Organen bzw. Geweben evaluiert werden. Als mögliche Parameter wären beispielsweise G' und G'' (Speicher- und Verlust-Modul) vorstellbar. Über deren Reduktion, wie in unserer Studie beobachtet, könnte sich der Zeitpunkt der optimalen Dezellularisierung in Kombination mit der makroskopischen Erscheinung des dezellularisierten Organs ermitteln lassen ⁹².

Im Rahmen meiner Arbeiten wurden bereits umfangreiche Charakterisierungen von unterschiedlichen dEZM durchgeführt – einige Aspekte konnten jedoch bisher nicht berücksichtigt werden: So haben in den letzten Jahren mehrere Publikationen gezeigt, dass sich in der dEZM matrix-gebundene Nanovesikel befinden und wie diese isoliert sowie charakterisiert werden können ¹⁰⁰⁻¹⁰². Des Weiteren war es möglich zu demonstrieren, dass diese biologisch aktiv sind und zum Beispiel einen Einfluss auf die Polarisierung von Makrophagen haben ^{100,101}. Dieses Beispiel verdeutlicht erneut eindrucksvoll, wie essenziell eine tiefgreifende Charakterisierung der dEZM ist für eine spätere Interpretation der Rezellularisierungs- und/oder der Implantationsergebnisse. Deshalb sollte eine standardisierte analytische Pipeline etabliert werden, um dEZM strukturiert und so umfangreich wie möglich zu charakterisieren. Dieser Ansatz hätte den Vorteil, dass der Dezellularisierungsprozess und dezellularisierte Gewebe bzw. Organe zwischen verschiedenen Gruppen besser verglichen werden können. Zusätzlich wäre es durch die Standardisierung besser möglich, den Einfluss der

unterschiedlichen Agenzien auf die dEZM zu analysieren. Ebenso bedeutsam wäre die standardisierte Charakterisierung, wie bereits erwähnt, auch für die vergleichende Analyse von Rezellularisierungsergebnissen. Erfreulicherweise werden die aktuell publizierten Arbeiten, welche sich mit der De- und Rezellularisierung von Geweben und Organen beschäftigen, immer umfangreicher hinsichtlich ihrer Charakterisierungsmethodik.

Ein weiterer Fokus der Arbeiten lag auf der Reendothelialisierung von dBCA mit humanen EPC und perivaskulären Zellen in Form von MSC sowie deren Evaluation *ex vivo*. Die Rekonstruktion des Endothelsystems stellt einen wichtigen Baustein für die *in vivo* Implantation von rebesiedelten Gefäßen und Organen dar. Bei dem klinischen Einsatz von dezellularisierten Gefäßen/Gefäßstrukturen (z.B. dezellularisierter boviner Carotiden und boviner Ureteren) waren die Ergebnisse vergleichbar mit denen von etablierten klinischen Verfahren und konnten bisher keine wesentlichen Verbesserungen der therapeutischen Optionen erzielen^{103–106}. Insbesondere bei der Implantation von TE-Gefäßen könnte die Rezellularisierung selbiger die Ergebnisse optimieren. Bei der Implantation in unterschiedlichen Tiermodellen konnten durch die Rebesiedelung der dezellularisierten Gefäße deutlich bessere Offenheitsraten erzielt werden^{50,107,108}. Als Zellquelle scheinen die EPC die beste Option darzustellen für eine spätere klinische Translation¹⁰⁷. Diese lassen sich über eine einfache Blutabnahme isolieren⁷¹. Ein weiterer Vorteil der EPC besteht darin, dass diese in allen gewebe-typischen Endothelzellen differenziert werden können¹⁰⁹. Diese Eigenschaft macht EPC zu einem idealen Zelltyp, nicht nur für die Rebesiedelung von dezellularisierten Gefäßen, sondern auch für die Rezellularisierung von dezellularisierten Geweben bzw. Organen. Alternative wäre an normale primäre Endothelzellen (primary endothelial cells, pEC) oder Nabelschnurvenen-Endothelzellen (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) zu denken. Jedoch stehen personalisierte HUVEC nicht für alle Patienten zur Verfügung und pEC benötigen in der Regel eine invasive Materialgewinnung, was auch sie zu ungeeigneten Zellen für TE-Gefäße macht¹¹⁰. Für die EPC bestehen jedoch ebenfalls Limitationen: So konnte gezeigt werden, dass deren Vorkommen und Phänotyp durch zugrundeliegende kardiovaskuläre Risikofaktoren (z.B. Nikotinabusus, Übergewicht, Diabetes Mellitus oder Hypertonie) beeinflusst wird^{111,112}. Es war uns möglich, EPC von diesem Patientenkollektiv zu isolieren⁷¹. Jedoch liegen bisher keine Daten vor über die Performance von EPC von Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren oder Erkrankungen bei der

Rezellularisierung von dezellularisierten Gefäßen/Gefäßstrukturen. Diese Daten sind für eine spätere klinische Translation von herausragender Bedeutung, da über die Zellauswahl sicherlich Modifikationen der Rezellularisierung möglich sein werden. Die bisher generierten Daten in Tiermodellen sind alle an nicht vorgeschädigten Organen durchgeführt worden ⁵⁰. Unsere Beobachtung, dass humane EPC allein nicht in der Lage waren, die BCA-Schnitte zu besiedeln, könnte ein erster Hinweis auf eine mögliche Funktionseinschränkung sein. Limitierend muss man jedoch sagen, dass wir die Rezellularisierung nicht mit EPC von gesunden Spendern verglichen haben. Unter Zuhilfenahme von *xenogenen* und *allogenen* mesenchymalen Stromazellen war dann jedoch eine Rebesiedelung der BCA-Schnitte möglich ⁷¹. Die Nutzung von MSC als perivaskuläre Zellen für Endothelzellen und deren positiver Effekt wurden bereits mehrfach gezeigt ¹¹⁰. Hier kommen u.a. die Sekretion von pro-angiogenen Faktoren maßgeblich zum Tragen ¹¹³. Zusätzlich sind mechanische Stimuli wichtig für die Stabilisierung von vaskulären Strukturen, welche durch perivaskuläre Zellen ausgeübt werden ¹¹⁴. MSC können meist über wenig invasive Maßnahmen aus unterschiedlichen Geweben gewonnen werden ¹¹⁰. Interessanterweise konnten wir nachweisen, dass bei der Ko-Kultur von *xenogenen* MSC (Ratte) und humaner EPC am Ende der Kulturversuche keine humanen Zellen mehr auf der Oberfläche der BCA-Schnitte vorhanden waren. Interessanterweise waren die Zellen nach 14 bzw. 23 Tagen bei den Ko-Kultur Versuchen von *xenogenen* MSC (Ratte) mit humanen EPC positiv für zwei wichtige endotheliale Marker, der Von Willebrand Faktor (vWF) und CD-31. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass die Ratten-MSCs durch das Endothelzell-Medium (EGM-2), welches Supplemente beinhaltet und 50:50 mit dem Ratten-MSK Medium (M-199) für die Versuche gemischt wurde, zur Differenzierung angeregt worden sind. Dass diese Differenzierung möglich ist, könnte bereits hinreichend gezeigt werden ¹¹⁴. Es ist also vorstellbar, dass die *xenogenen* MSC so sehr stimuliert wurden, dass sie deutlich schneller gewachsen sind als die EPC und diese verdrängt haben. Dies könnte ebenfalls auf eine eingeschränkte Performance der EPC von vorerkrankten Spendern hinweisen. Jedoch war bei der Ko-Kultur von humanen EPC und MSC eine suffiziente Rebesiedelung in unseren weiterführenden Versuchen möglich ^{8,71}. Hier sind weitere tiefgreifende Analysen hinsichtlich der Ursachenklärung für diese Beobachtung notwendig, um gegebenenfalls den Rezellularisierungsprozess weiter anzupassen und dadurch zu optimieren. Ein möglicher Erklärungsansatz mag der Versuchsaufbau und -ablauf sein, welcher in der

zweiten Studie doch deutliche Unterschiede aufwies⁸. Der in der zweiten Studie gewählte Ansatz der Rezellularisierung von intakten dBCA unter einer Kombination von dynamischen und statischen Bedingungen, ist deutlich mehr auf eine klinische Translation ausgerichtet⁸. Um den *ex vivo* Rezellularisierungsprozess und die Maturation der TE-Gefäße zu monitoren, bedarf es nicht-invasiver Marker bzw. Untersuchungen, welche den aktuellen Stand des Rezellularisierungsprozesses widerspiegeln und uns eine Auskunft über den bestmöglichen Zeitpunkt für die Implantation geben könnten. Wir haben regelhaft Blutgasanalysen des Perfusionsmediums durchgeführt, um mögliche Parameter zu identifizieren. Hier haben sich sowohl die Laktat- als auch Glucose-Konzentration als vielversprechende Marker herausgestellt, die gut mit der luminalen Zellbedeckung der rezellularisierten dBCA korrelieren (Laktat: positive Korrelation und Glucose: negative Korrelation). Der hohe Verbrauch von Glucose (niedrige Glucose-Konzentration an Tag 9) ist also mit einer hohen luminalen Zellbedeckung in unseren Versuchen vergesellschaftet gewesen. Umgekehrtes gilt für das Laktat. Diese Ergebnisse decken sich mit den Beobachtungen von *Shaheen et al.* welche die *Glucose-Consumption-Rate* ebenfalls als Marker für eine suffiziente Reendothelialisierung von *porcinen* Lebern mit HUVEC genutzt haben⁶⁷.

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Thrombogenität der de- bzw. rezellularisierten TE-Gefäße, denn diese wird in letzter Konsequenz die Offenheitsraten der TE-Gefäße beeinflussen. So wird vor allem initial bei der Thrombogenitäts-Testung von TE-Gefäßstrukturen auf *in vitro* bzw. *ex vivo* Verfahren zurückgegriffen. Das beste Testsystem stellt hier sicherlich die *in vivo* Implantation in einem menschenähnlichen Tiermodell dar. Hier sind die Modelle der Wahl sicherlich Schweine- und Schaf-Modelle¹¹⁵. Die Lokalisation für die Implantation von rezellularisierten TE-Gefäßen im Tiermodell orientiert sich am später geplanten Gefäßersatz¹¹⁵. Jedoch sind diese in der Regel mit großem Aufwand und Kosten verbunden¹¹⁵.

Deshalb scheint die Nutzung von *ex vivo* Testungen der Thrombogenität unter möglichst realen, sprich *in vivo*, Bedingungen ein sinnvoller Ansatz, da zum Beispiel die Fließgeschwindigkeit des Blutes bzw. Blutsurrogates Gerinnungseigenschaften beeinflusst¹¹⁶. Das am besten geeignete Ausgangsmaterial für die Thrombogenitäts-Testung von rezellularisierten TE-Gefäße, im Falle eines später intendierten Einsatz beim Menschen, stellt humanes Vollblut dar¹¹⁷. Dies lässt sich u.a. damit begründen,

dass es spezies-spezifische Unterschiede hinsichtlich der Aktivierung von Thrombozyten, in Abhängigkeit von deren Stimulation gibt ^{117,118}.

Für die Thrombogenitäts-Testung von Biomaterialien für den Gefäßersatz bzw. von TE-Gefäßstrukturen gibt es sowohl statische als auch dynamische Testverfahren ¹¹⁷. Wir haben, um die *in vivo* Situation so realistisch wie möglich abzubilden, eine dynamische Perfusion von rBCA mit leicht heparinisiertem humanem Vollblut gewählt und konnten zeigen, dass es im Vergleich zu dBCA nicht zu einem signifikanten Abfall der Thrombozyten bei einer Perfusion über zwei Stunden kommt, was für eine Verringerung der Thrombogenität durch die Rebesiedelung spricht ⁸. Damit waren wir die ersten, die eine humanisierte rBCA in einem *ex vivo* Perfusionskreislauf erfolgreich testen konnten⁸. Hierfür muss erwähnt werden, dass wir für die Vollblut-Perfusion nur rBCA mit einem Glucose-Wert von < 62mg/dl genutzt haben, da wir beobachtet haben, dass dies mit einer luminalen Zellbedeckung bei >60% vergesellschaftet ist (Sensitivität: 100% und Spezifität: 85,7%) ⁸. Der hohe Glucoseverbrauch und damit die hohe luminalen Zellbedeckung sind somit als indirekte Marker für eine gute Funktion der rBCA in den *ex vivo* Perfusionsversuchen zu werten. Ob dies auch auf die *in vivo* Implantation von rBCA zu übertragen ist bleibt abzuwarten. Ähnliche Beobachtungen wie wir haben *Shaheen et al.* hinsichtlich der *in vitro* und *in vivo* Performance von reendothelialisierten porcinen Lebern gemacht ⁶⁷. In ihrer Arbeit konnten Shaheen et al. zeigen, dass die Spitzen-*Glucose-Consumption-Rate* mit der *in vitro* und *in vivo* Offenheit der reendothelialisierten porcinen Lebern korreliert ⁶⁷.

Limitation unseres Versuchsaufbaus ist die Nutzung von Blut von gesunden freiwilligen ProbandInnen ohne kardiovaskuläre Risikofaktoren für unsere Perfusionsversuche ⁸. Dies ist kritisch zu betrachten, da beispielsweise bekannt ist, dass durch kardiovaskuläre Risikofaktoren die Thrombozytenfunktion bzw. Aktivierung direkt oder indirekt beeinflusst wird ^{119,120}. Ob Blut von Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren bzw. Erkrankungen in unserem *ex vivo* Perfusionsmodell andere Ergebnisse hinsichtlich der Thrombogenität der rezellularisierten dBCA erbringt, muss in weiteren Versuchen untersucht werden.

Obwohl es einige andere *ex vivo* Perfusionssysteme gibt, fehlt es diesen jedoch an physiologischer Relevanz ⁸. Ob unser Perfusionsmodell und die daraus generierten Erkenntnisse eine Relevanz, für die *in vivo* Implantation hat, bleibt ebenfalls abzuwarten.

Unser Perfusionssystem induzierte Scherstress an der Gefäßwand, welcher mit dem in der V. saphena magna vergleichbar ist ¹²¹. Dies scheint dahingehend relevant, da dieses autologe Gefäß den Goldstandard in der Bypasschirurgie darstellt. In weiteren Untersuchungen, vor allem *in vivo*, muss nun die langfristige Offenheit unserer rBCA gezeigt werden. Eine methodische Schwachstelle unserer Arbeit ist, dass wir nur die Oberfläche der dBCA mit hEPC und hMSC rebesiedelt haben. Beispielsweise haben *Olausson et al.* bei der Rebesiedelung einer Iliakalvene welche als Pfortaderersatz hergestellt wurde, zusätzlich zu den Endothelzellen noch glatte Muskelzellen hinzugefügt. In deren Arbeit konnten sie die glatten Muskelzellen auch in der *Tunica media* der rezellularisierten Iliakalvene nachweisen ⁶⁹. Dass die Rezellularisierung von dezellularisierten Gefäßen auch zu morphologisch und funktionell besseren Ergebnissen führen kann, wurde bereits von *Neff et al.* gezeigt¹²². Die Gruppe konnte bei der kombinierten Rezellularisierung von glatten Muskelzellen mit Endothelzellen in einem porcinem Model zeigen, dass die Maturation der *Tunica media* deutlich besser funktioniert als bei der Rezellularisierung von dezellularisierten porcinen Karotiden nur mit Endothelzellen. Auch hinsichtlich der *in vitro* Kontraktilität zeigten die Gefäße, welche mit beiden Zelltypen rebesiedelt wurden bessere Ergebnisse¹²².

Die erwähnten Arbeiten zeigen eindrücklich, wie wichtig eine möglichst native Rekonstruktion der Gefäßstruktur erscheint. Der Fokus unserer Arbeit lag jedoch vorerst auf der Rekonstruktion des Endotheliums zur Reduktion der Thrombogenität. In weiteren Untersuchungen sollte jedoch auch die komplette Rezellularisierung der Gefäßschichten berücksichtigt werden. Dies ist wichtig dafür, dass rezellularisierte und konsekutiv implantierte Gefäße sich über unterschiedliche Adaptationsmechanismen an veränderte physiologische Situationen anpassen können ¹²³.

In den hier zusammengefassten Arbeiten konnten substantielle Weiterentwicklungen hinsichtlich der Charakterisierung von dezellularisierten Geweben sowie zur Rebesiedelung von dezellularisierten Gefäßen erreicht werden. Nichts destotrotz müssen die beschriebenen Ansätze weiterentwickelt und evaluiert werden.

4. Zusammenfassung und Ausblick

Die De- und Rezellularisierung von Geweben und Organen hat sich zu einem spannenden Forschungsfeld im Bereich der regenerativen Medizin und des *Tissue Engineerings* entwickelt. Obwohl in den letzten Jahren große Fortschritte im Bereich der Rezellularisierung gemacht wurden, ist der Organersatz mittels eines rezellularisierten Organes noch weit entfernt von der klinischen Translation. Auf die mannigfaltigen noch vorhandenen Probleme wurde bereits in der Einleitung hingewiesen. Sollten diese in der nahen Zukunft suffizient adressiert werden, scheint eine Translation dennoch möglich.

Die hier vorgelegte Arbeit hat vor allem zum Ziel, neue Verfahren zur Charakterisierung von dezellularisierten Geweben zu etablieren sowie neue Ansätze der Rezellularisierung von Gefäßen und der Testung ebendieser zu erproben.

So ist es uns gelungen, ein humanes dEZM-Modell für native und fibrotische Lebern zu etablieren und auf proteomischer Ebene tiefgreifend zu charakterisieren. Des Weiteren ist es uns gelungen, die MRE als eine potenziell nicht-invasive Methodik zur Charakterisierung der viskoelastischen Eigenschaften von de- und später rezellularisierten Geweben zu etablieren sowie diese an unterschiedlichen Geweben zu testen. Diese methodischen und inhaltlichen Fortschritte haben das Potenzial, die Charakterisierung von dezellularisierten Geweben substantiell voranzutreiben und gegebenenfalls deutlich besser zu standardisieren. Diese tiefgreifende Charakterisierung der Eigenschaften von dEZM scheint besonders wichtig vor dem Hintergrund der folgenden Rezellularisierung, da die Ergebnisse der Rezellularisierung selbstverständlich immer auf der Basis des Ausgangsmaterials interpretiert werden sollten.

Zusätzlich ist es gelungen, die Rebesiedelung von dBCA mit humanen EPC und MSCs relevant weiterzuentwickeln. Ebenfalls konnte eine Methodik zur nicht-invasiven Überwachung der Rebesiedelung sowie eine *ex vivo* Vollblutperfusionstestung der rezellularisierten Gefäße etabliert werden. Mit diesen Methoden könnte es in Zukunft möglich sein, *ex vivo* personalisierte sowie autologisierte Gefäßersatzstücke herzustellen, zu maturieren und zu testen.

Jedoch haben sich in den letzten Jahren auch spannende neue Einsatzgebiete für dezellularisierte Organe und Gewebe ergeben. Hier wäre vor allem die Nutzung für 3D

Tumormodelle oder allgemein als Krankheitsmodelle zu nennen ^{81,124,125}. Hierbei könnten beispielsweise unsere zirrhotischen Leber-dEZM mit unterschiedlichen Zelltypen besiedelt werden und deren Zell-Matrix-Interaktion untersucht werden ⁴⁰. Zusätzlich kann unser Leber-dEZM Modell in einem Bioreaktor dynamisch kultiviert werden ⁸⁷.

Hinsichtlich der dEZM-basierten Tumormodelle scheinen diese die tumorspezifischen Eigenschaften besser widerzuspiegeln als konventionelle *in vitro* Tumormodelle ^{124,125}. Auch für diese Anwendung scheinen die hier erprobten Charakterisierungsansätze von substantieller Bedeutung, da diese es ermöglichen könnten, die Biologie und das Verhalten in den dEZM-basierten Tumormodellen besser zu verstehen.

5. Literaturverzeichnis

1. Linden PK. History of Solid Organ Transplantation and Organ Donation. *Crit Care Clin.* 2009;25(1):165-184.
2. Watson CJE, Dark JH. Organ transplantation: historical perspective and current practice. *Br J Anaesth.* 2012;108:i29-i42.
3. Merrill JP, Murray JE, Harrison JH, Guild WR. SUCCESSFUL HOMOTRANSPLANTATION OF THE HUMAN KIDNEY BETWEEN IDENTICAL TWINS. *J Am Med Assoc.* 1956;160(4):277-282.
4. Preliminary Eurotransplant annual figures 2021 online - Eurotransplant. Accessed June 20, 2023. <https://www.eurotransplant.org/2022/01/20/preliminary-eurotransplant-annual-figures-2021-online/>.
5. Gardiner D, Charlesworth M, Rubino A, Madden S. The rise of organ donation after circulatory death: a narrative review. *Anaesthesia.* 2020;75(9):1215-1222.
6. O'Neill S, Srinivasa S, Callaghan CJ, et al. Novel Organ Perfusion and Preservation Strategies in Transplantation – Where Are We Going in the United Kingdom? *Transplantation.* 2020;104(9):1813-1824.
7. López-Navidad A, Caballero F. Extended criteria for organ acceptance. Strategies for achieving organ safety and for increasing organ pool. *Clin Transplant.* 2003;17(4):308-324.
8. Keshi E, Tang P, Weinhart M, et al. Surface modification of decellularized bovine carotid arteries with human vascular cells significantly reduces their thrombogenicity. *J Biol Eng.* 2021;15(1):26.
9. Rashid ST, Fuller B, Hamilton G, Seifalian AM. Tissue engineering of a hybrid bypass graft for coronary and lower limb bypass surgery. *The FASEB Journal.* 2008;22(6):2084-2089.
10. Nguyen KP, Moneta G, Landry G. Venous Conduits Have Superior Patency Compared with Prosthetic Grafts for Femorofemoral Bypass. *Ann Vasc Surg.* 2018;52:126-137.
11. Loh SA, Howell BS, Rockman CB, et al. Mid- and long-term results of the treatment of infrainguinal arterial occlusive disease with precuffed expanded polytetrafluoroethylene grafts compared with vein grafts. *Ann Vasc Surg.* 2013;27(2):208-217.
12. Uhl C, Grosch C, Hock C, Töpel I, Steinbauer M. Comparison of Long-term Outcomes of Heparin Bonded Polytetrafluoroethylene and Autologous Vein Below Knee Femoropopliteal Bypasses in Patients with Critical Limb Ischaemia. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2017;54(2):203-211.
13. Baguneid MS, Seifalian AM, Salacinski HJ, Murray D, Hamilton G, Walker MG. Tissue engineering of blood vessels. *Br J Surg.* 2006;93(3):282-290.
14. Pashneh-Tala S, MacNeil S, Claeysens F. The Tissue-Engineered Vascular Graft—Past, Present, and Future. *Tissue Eng Part B Rev.* 2016;22(1):68.
15. Kumar VA, Brewster LP, Caves JM, Chaikof EL. Tissue Engineering of Blood Vessels: Functional Requirements, Progress, and Future Challenges. *Cardiovasc Eng Technol.* 2011;2(3):137.
16. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science.* 1993;260(5110):920-926.
17. Berthiaume F, Maguire TJ, Yarmush ML. Tissue Engineering and Regenerative Medicine: History, Progress, and Challenges. *Annu Rev Chem Biomol Eng.* 2011;2(1):403-430.

18. Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*. 2006;27(19):3675-3683.
19. Hillebrandt KH, Everwien H, Haep N, Keshi E, Pratschke J, Sauer IM. Strategies based on organ decellularization and recellularization. *Transplant International*. 2019;32(6).
20. Massaro MS, Pálek R, Rosendorf J, Červenková L, Liška V, Moulisová V. Decellularized xenogeneic scaffolds in transplantation and tissue engineering: Immunogenicity versus positive cell stimulation. *Materials Science and Engineering: C*. 2021;127:112203.
21. Boehm AK, Hillebrandt KH, Dziodzio T, et al. Tissue Engineering for the Diaphragm and its Various Therapeutic Possibilities – A Systematic Review. *Adv Ther (Weinh)*. Published online April 30, 2022:2100247.
22. Li K, Tharwat M, Larson EL, et al. Re-Endothelialization of Decellularized Liver Scaffolds: A Step for Bioengineered Liver Transplantation. *Front Bioeng Biotechnol*. 2022;10:287.
23. Saldin LT, Cramer MC, Velankar SS, White LJ, Badylak SF. Extracellular matrix hydrogels from decellularized tissues: Structure and function. *Acta Biomater*. 2017;49:1-15.
24. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*. 2011;32(12):3233-3243.
25. Ren H, Shi X, Tao L, et al. Evaluation of two decellularization methods in the development of a whole-organ decellularized rat liver scaffold. *Liver International*. 2013;33(3):448-458.
26. He M, Callanan A, Lagaras K, Steele JAM, Stevens MM. Optimization of SDS exposure on preservation of ECM characteristics in whole organ decellularization of rat kidneys. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2017;105(6):1352-1360.
27. Felgendreff P, Schindler C, Mussbach F, et al. Identification of tissue sections from decellularized liver scaffolds for repopulation experiments. *Heliyon*. 2021;7(2):e06129.
28. Caralt M, Uzarski JS, Iacob S, et al. Optimization and critical evaluation of decellularization strategies to develop renal extracellular matrix scaffolds as biological templates for organ engineering and transplantation. *Am J Transplant*. 2015;15(1):64-75.
29. Moulisová V, Jiřík M, Schindler C, et al. Novel morphological multi-scale evaluation system for quality assessment of decellularized liver scaffolds. *J Tissue Eng*. 2020;11:204173142092112.
30. Wallis JM, Borg ZD, Daly AB, et al. Comparative assessment of detergent-based protocols for mouse lung de-cellularization and re-cellularization. *Tissue Eng Part C Methods*. 2012;18(6):420-432.
31. Behmer Hansen RA, Wang X, Kaw G, Pierre V, Senyo SE. Accounting for Material Changes in Decellularized Tissue with Underutilized Methodologies. *Biomed Res Int*. 2021;2021:1-15.
32. Theocharis AD, Skandalis SS, Gialeli C, Karamanos NK. Extracellular matrix structure. *Adv Drug Deliv Rev*. 2016;97:4-27.
33. Karamanos NK, Theocharis AD, Piperigkou Z, et al. A guide to the composition and functions of the extracellular matrix. *FEBS J*. 2021;288(24):6850-6912.
34. Tellman T v, Dede M, Aggarwal VA, Salmon D, Naba A, Farach-Carson MC. Systematic Analysis of Actively Transcribed Core Matrisome Genes Across Tissues and Cell Phenotypes. *Matrix Biol*. Published online June 14, 2022.

35. Naba A, Clauser KR, Ding H, Whittaker CA, Carr SA, Hynes RO. The extracellular matrix: Tools and insights for the “omics” era. *Matrix Biol.* 2016;49:10-24.
36. Humphrey JD, Dufresne ER, Schwartz MA. Mechanotransduction and extracellular matrix homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(12):802-812.
37. Bissell MJ, Aggeler J. Dynamic reciprocity: how do extracellular matrix and hormones direct gene expression? *Prog Clin Biol Res.* 1987;249:251-262.
38. Li Q, Uygun BE, Geerts S, et al. Proteomic analysis of naturally-sourced biological scaffolds. *Biomaterials.* 2016;75:37-46.
39. Naba A, Clauser KR, Hoersch S, Liu H, Carr SA, Hynes RO. The Matrisome: In Silico Definition and In Vivo Characterization by Proteomics of Normal and Tumor Extracellular Matrices. *Molecular & Cellular Proteomics.* 2012;11(4):M111.014647.
40. Daneshgar A, Klein O, Nebrich G, et al. The human liver matrisome - Proteomic analysis of native and fibrotic human liver extracellular matrices for organ engineering approaches. *Biomaterials.* 2020;257:120247.
41. Berger C, Bjørlykke Y, Hahn L, et al. Matrix decoded - A pancreatic extracellular matrix with organ specific cues guiding human iPSC differentiation. *Biomaterials.* 2020;244.
42. Calle EA, Hill RC, Leiby KL, et al. Targeted proteomics effectively quantifies differences between native lung and detergent-decellularized lung extracellular matrices. *Acta Biomater.* 2016;46:91-100.
43. Jorba I, Beltrán G, Falcones B, et al. Nonlinear elasticity of the lung extracellular microenvironment is regulated by macroscale tissue strain. *Acta Biomater.* 2019;92:265.
44. Luque T, Melo E, Garreta E, et al. Local micromechanical properties of decellularized lung scaffolds measured with atomic force microscopy. *Acta Biomater.* 2013;9(6):6852-6859.
45. Jorba I, Uriarte JJ, Campillo N, Farré R, Navajas D. Probing Micromechanical Properties of the Extracellular Matrix of Soft Tissues by Atomic Force Microscopy. *J Cell Physiol.* 2017;232(1):19-26.
46. Perepelyuk M, Chin L, Cao X, et al. Normal and Fibrotic Rat Livers Demonstrate Shear Strain Softening and Compression Stiffening: A Model for Soft Tissue Mechanics. *PLoS One.* 2016;11(1).
47. Chani B, Puri V, Sobti RC, Jha V, Puri S. Decellularized scaffold of cryopreserved rat kidney retains its recellularization potential. *PLoS One.* 2017;12(3).
48. Sack I. Magnetresonanz-Elastographie. *DMW - Deutsche Medizinische Wochenschrift.* 2008;133(6):247-251.
49. Manduca A, Bayly PJ, Ehman RL, et al. MR elastography: Principles, guidelines, and terminology. *Magn Reson Med.* 2021;85(5):2377-2390.
50. Lin CH, Hsia K, Ma H, Lee H, Lu JH. In Vivo Performance of Decellularized Vascular Grafts: A Review Article. *Int J Mol Sci.* 2018;19(7).
51. Li K, Tharwat M, Larson EL, et al. Re-Endothelialization of Decellularized Liver Scaffolds: A Step for Bioengineered Liver Transplantation. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022;10:1.
52. Uygun BE, Yarmush ML, Uygun K. Application of whole-organ tissue engineering in hepatology.
53. Kehrel B. Platelet-collagen interactions. *Semin Thromb Hemost.* 1995;21(2):123-129.

54. Clemetson KJ. Platelets and primary haemostasis. *Thromb Res.* 2012;129(3):220-224.
55. Chandra P, Atala A. Engineering blood vessels and vascularized tissues: technology trends and potential clinical applications. *Clin Sci.* 2019;133(9):1115-1135.
56. Reilly B, Khan S, Dosluoglu H, et al. Comparison of Autologous Vein and Bovine Carotid Artery Graft as a Bypass Conduit in Arterial Trauma. *Ann Vasc Surg.* 2019;61:246-253.
57. Chemla ES, Morsy M. Randomized clinical trial comparing decellularized bovine ureter with expanded polytetrafluoroethylene for vascular access. *British Journal of Surgery.* 2008;96(1):34-39.
58. Kakisis JD, Liapis CD, Breuer C, Sumpio BE. Artificial blood vessel: The Holy Grail of peripheral vascular surgery. *J Vasc Surg.* 2005;41(2):349-354.
59. Ko IK, Peng L, Peloso A, et al. Bioengineered transplantable porcine livers with re-endothelialized vasculature. *Biomaterials.* 2015;40:72-79.
60. Bao J, Wu Q, Sun J, et al. Hemocompatibility improvement of perfusion-decellularized clinical-scale liver scaffold through heparin immobilization. *Sci Rep.* 2015;5.
61. Kim DH, Ahn J, Kang HK, et al. Development of highly functional bioengineered human liver with perfusable vasculature. *Biomaterials.* 2021;265.
62. Devalliere J, Chen Y, Dooley K, Yarmush ML, Uygun BE. Improving functional re-endothelialization of acellular liver scaffold using REDV cell-binding domain. *Acta Biomater.* 2018;78:151-164.
63. Hussein KH, Park KM, Kang KS, Woo HM. Heparin-gelatin mixture improves vascular reconstruction efficiency and hepatic function in bioengineered livers. *Acta Biomater.* 2016;38:82-93.
64. Layer-by-layer heparinization of decellularized liver matrices to reduce thrombogenicity of recellularized liver grafts. *J Clin Transl Res.* Published online July 19, 2015.
65. Liu P, Tian B, Yang L, et al. Hemocompatibility improvement of decellularized spleen matrix for constructing transplantable bioartificial liver. *Biomedical Materials (Bristol).* 2019;14(2).
66. Dias ML, Paranhos BA, Ferreira JRP, et al. Improving hemocompatibility of decellularized liver scaffold using Custodiol solution. *Biomaterials advances.* 2022;133:112642.
67. Shaheen MF, Joo DJ, Ross JJ, et al. Sustained perfusion of revascularized bioengineered livers heterotopically transplanted into immunosuppressed pigs. *Nat Biomed Eng.* 2020;4(4):437-445.
68. Olausson M, Kuna VK, Travnikova G, et al. In Vivo Application of Tissue-Engineered Veins Using Autologous Peripheral Whole Blood: A Proof of Concept Study. *EBioMedicine.* 2014;1(1):72-79.
69. Olausson M, Patil PB, Kuna VK, et al. Transplantation of an allogeneic vein bioengineered with autologous stem cells: a proof-of-concept study. *The Lancet.* 2012;380(9838):230-237.
70. Kaushal S, Amiel GE, Guleserian KJ, et al. Functional Small Diameter Neovessels using Endothelial Progenitor Cells Expanded Ex Vivo. *Nat Med.* 2001;7(9):1035.
71. Seiffert N, Tang P, Keshi E, et al. In vitro recellularization of decellularized bovine carotid arteries using human endothelial colony forming cells. *J Biol Eng.* 2021;15(1):15.

72. Pelliccia F, Zimarino M, de Luca G, Viceconte N, Tanzilli G, de Caterina R. Endothelial Progenitor Cells in Coronary Artery Disease: From Bench to Bedside. *Stem Cells Transl Med.* 2022;11(5):451-460.
73. Medina RJ, Barber CL, Sabatier F, et al. Endothelial Progenitors: A Consensus Statement on Nomenclature. *Stem Cells Transl Med.* 2017;6(5):1316.
74. Desmet VJ, Gerber M, Hoofnagle JH, Manns M, Scheuer PJ. Classification of chronic hepatitis: Diagnosis, grading and staging. *Hepatology.* 1994;19(6):1513-1520.
75. Zhang Y, He Y, Bharadwaj S, et al. Tissue-specific extracellular matrix coatings for the promotion of cell proliferation and maintenance of cell phenotype. *Biomaterials.* 2009;30(23-24):4021-4028.
76. Liu C, Pei M, Li Q, Zhang Y. Decellularized extracellular matrix mediates tissue construction and regeneration. *Front Med.* 2022;16(1):56-82.
77. Jaramillo M, Yeh H, Yarmush ML, Uygun BE. Decellularized human liver extracellular matrix (hDLM)-mediated hepatic differentiation of human induced pluripotent stem cells (hiPSCs). *J Tissue Eng Regen Med.* 2018;12(4):e1962-e1973.
78. Park KM, Hussein KH, Hong SH, et al. Decellularized Liver Extracellular Matrix as Promising Tools for Transplantable Bioengineered Liver Promotes Hepatic Lineage Commitments of Induced Pluripotent Stem Cells. *Tissue Eng Part A.* 2016;22(5-6):449-460.
79. Klak M, Łojarczyk I, Berman A, et al. Impact of Porcine Pancreas Decellularization Conditions on the Quality of Obtained dECM. *International Journal of Molecular Sciences 2021, Vol 22, Page 7005.* 2021;22(13):7005.
80. Asthana A, Tamburrini R, Chaimov D, et al. Comprehensive characterization of the human pancreatic proteome for bioengineering applications. *Biomaterials.* 2021;270:120613.
81. Mazza G, Telese A, Al-Akkad W, et al. Cirrhotic Human Liver Extracellular Matrix 3D Scaffolds Promote Smad-Dependent TGF- β 1 Epithelial Mesenchymal Transition. *Cells.* 2019;9(1):83.
82. Schaefer L. Complexity of danger: The diverse nature of damage-associated molecular patterns. *Journal of Biological Chemistry.* 2014;289(51):35237-35245.
83. Daly KA, Liu S, Agrawal V, et al. Damage associated molecular patterns within xenogeneic biologic scaffolds and their effects on host remodeling. *Biomaterials.* 2012;33(1):91-101.
84. Ma F, Tremmel DM, Li Z, et al. In Depth Quantification of Extracellular Matrix Proteins from Human Pancreas. *J Proteome Res.* 2019;18(8):3156.
85. Hu M, Bi H, Moffat D, et al. Proteomic and Bioinformatic Analysis of Decellularized Pancreatic Extracellular Matrices. *Molecules.* 2021;26(21).
86. Guo B, Zhou Q, Jiang J, et al. Functionalized Vascular Structure in Bioengineered Liver Identified with Proteomics. *ACS Biomater Sci Eng.* 2020;6(11):6394-6404.
87. Daneshgar A, Tang P, Remde C, et al. Teburu—Open source 3D printable bioreactor for tissue slices as dynamic three-dimensional cell culture models. *Artif Organs.* 2019;43(10):1035-1041.
88. Elowsson Rendin L, Löfdahl A, Åhrman E, et al. Matrisome Properties of Scaffolds Direct Fibroblasts in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Int J Mol Sci.* 2019;20(16):4013.
89. Thanapirom K, Caon E, Papatheodoridi M, et al. Optimization and Validation of a Novel Three-Dimensional Co-Culture System in Decellularized Human Liver

- Scaffold for the Study of Liver Fibrosis and Cancer. *Cancers (Basel)*. 2021;13(19):4936.
90. Koyama Y, Brenner DA. Liver inflammation and fibrosis. *Journal of Clinical Investigation*. 2017;127(1):55-64.
 91. Girardeau-Hubert S, Lynch B, Zuttion F, et al. Impact of microstructure on cell behavior and tissue mechanics in collagen and dermal decellularized extracellular matrices. *Acta Biomater*. 2022;143:100-114.
 92. Everwien H, Ariza de Schellenberger A, Haep N, et al. Magnetic resonance elastography quantification of the solid-to-fluid transition of liver tissue due to decellularization. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2020;104:103640.
 93. Snellings J, Keshi E, Tang P, et al. Solid fraction determines stiffness and viscosity in decellularized pancreatic tissues. *Biomaterials Advances*. 2022;139.
 94. Hochman-Mendez C, Pereira de Campos DB, Pinto RS, et al. Tissue-engineered human embryonic stem cell-containing cardiac patches: evaluating recellularization of decellularized matrix. *J Tissue Eng*. 2020;11.
 95. Goh SK, Bertera S, Olsen P, et al. Perfusion-decellularized pancreas as a natural 3D scaffold for pancreatic tissue and whole organ engineering. *Biomaterials*. 2013;34(28):6760.
 96. Lin CH, Kao YC, Ma H, Tsay RY. An investigation on the correlation between the mechanical property change and the alterations in composition and microstructure of a porcine vascular tissue underwent trypsin-based decellularization treatment. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2018;86:199-207.
 97. Bihan D le. Molecular diffusion, tissue microdynamics and microstructure. *NMR Biomed*. 1995;8(7):375-386.
 98. Keller S, Chapiro J, Brangsch J, et al. Quantitative MRI for Assessment of Treatment Outcomes in a Rabbit VX2 Hepatic Tumor Model. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*. 2020;52(3):668-685.
 99. Geerts S, Ozer S, Jaramillo M, Yarmush ML, Uygun BE. Nondestructive Methods for Monitoring Cell Removal During Rat Liver Decellularization. *Tissue Eng Part C Methods*. 2016;22(7):671-678.
 100. Huleihel L, Hussey GS, Naranjo JD, et al. Matrix-bound nanovesicles within ECM bioscaffolds. *Sci Adv*. 2016;2(6).
 101. Huleihel L, Bartolacci JG, Dziki JL, et al. Matrix-Bound Nanovesicles Recapitulate Extracellular Matrix Effects on Macrophage Phenotype. *Tissue Eng Part A*. 2017;23(21-22):1283-1294.
 102. Quijano LM, Naranjo JD, El-Mossier SO, et al. Matrix-bound nanovesicles: The effects of isolation method upon yield, purity, and function. *Tissue Eng Part C Methods*. 2020;26(10):528-540.
 103. Lindsey P, Echeverria A, Cheung M, Kfoury E, Bechara CF, Lin PH. Lower Extremity Bypass Using Bovine Carotid Artery Graft (Artegraft): An Analysis of 124 Cases with Long-Term Results. *World J Surg*. 2018;42(1):295-301.
 104. Das N, Bratby MJ, Shrivastava V, et al. Results of a seven-year, single-centre experience of the long-term outcomes of bovine ureter grafts used as novel conduits for haemodialysis fistulas. *Cardiovasc Intervent Radiol*. 2011;34(5):958-963.
 105. Chemla ES, Morsy M. Randomized clinical trial comparing decellularized bovine ureter with expanded polytetrafluoroethylene for vascular access. *Br J Surg*. 2009;96(1):34-39.
 106. Reilly B, Khan S, Dosluoglu H, et al. Comparison of Autologous Vein and Bovine Carotid Artery Graft as a Bypass Conduit in Arterial Trauma. *Ann Vasc Surg*. 2019;61:246-253.

107. Kaushal S, Amiel GE, Guleserian KJ, et al. Functional Small Diameter Neovessels using Endothelial Progenitor Cells Expanded Ex Vivo. *Nat Med.* 2001;7(9):1035.
108. Sagban TA, Schiegel E, Grabitz K, Sandmann W, Balzer KM. Bioengineering of a Semiautologous Arterial Vessels with Reconstructed Media and Intima, Longtime Tested In Vivo. *Adv Eng Mater.* 2011;13(12):B518-B528.
109. Peters EB. Endothelial Progenitor Cells for the Vascularization of Engineered Tissues. *Tissue Eng Part B Rev.* 2018;24(1):1-24.
110. Wang K, Lin RZ, Melero-Martin JM. Bioengineering human vascular networks: trends and directions in endothelial and perivascular cell sources. *Cell Mol Life Sci.* 2019;76(3):421-439.
111. Fadini GP, Losordo D, Dimmeler S. Critical Reevaluation of Endothelial Progenitor Cell Phenotypes for Therapeutic and Diagnostic Use. *Circ Res.* 2012;110(4):624-637.
112. Stroncek JD, Grant BS, Brown MA, Povsic TJ, Truskey GA, Reichert WM. Comparison of Endothelial Cell Phenotypic Markers of Late-Outgrowth Endothelial Progenitor Cells Isolated from Patients with Coronary Artery Disease and Healthy Volunteers. *Tissue Eng Part A.* 2009;15(11):3473.
113. Huang H, Huang W. Regulation of Endothelial Progenitor Cell Functions in Ischemic Heart Disease: New Therapeutic Targets for Cardiac Remodeling and Repair. *Front Cardiovasc Med.* 2022;9.
114. Rautiainen S, Laaksonen T, Koivuniemi R. Angiogenic Effects and Crosstalk of Adipose-Derived Mesenchymal Stem/Stromal Cells and Their Extracellular Vesicles with Endothelial Cells. *Int J Mol Sci.* 2021;22(19):10890.
115. Swartz DD, Andreadis ST. Animal models for vascular tissue-engineering. *Curr Opin Biotechnol.* 2013;24(5):916-925.
116. Bennett PC, Silverman SH, Gill PS, Lip GYH. Peripheral arterial disease and Virchow's triad. *Thromb Haemost.* 2009;101(6):1032-1040.
117. Braune S, Latour RA, Reinthaler M, Landmesser U, Lendlein A, Jung F. In Vitro Thrombogenicity Testing of Biomaterials. *Adv Healthc Mater.* 2019;8(21):1900527.
118. Lu Q, Hofferbert B v., Koo G, Malinauskas RA. In Vitro Shear Stress-Induced Platelet Activation: Sensitivity of Human and Bovine Blood. *Artif Organs.* 2013;37(10):894-903.
119. Alexandru N, Popov D, Georgescu A. Platelet dysfunction in vascular pathologies and how can it be treated. *Thromb Res.* 2012;129(2):116-126.
120. Khodadi E. Platelet Function in Cardiovascular Disease: Activation of Molecules and Activation by Molecules. *Cardiovasc Toxicol.* 2020;20(1):1-10.
121. Golledge D. Vein grafts: Haemodynamic forces on the endothelium — A review. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery.* 1997;14(5):333-343.
122. Neff LP, Tillman BW, Yazdani SK, et al. Vascular smooth muscle enhances functionality of tissue-engineered blood vessels in vivo. *J Vasc Surg.* 2011;53(2):426-434.
123. Halper J. Basic Components of Vascular Connective Tissue and Extracellular Matrix. In: ; 2018:95-127.
124. Piccoli M, D'Angelo E, Crotti S, et al. Decellularized colorectal cancer matrix as bioactive microenvironment for in vitro 3D cancer research. *J Cell Physiol.* 2018;233(8):5937-5948.
125. Tian X, Werner ME, Roche KC, et al. Organ-specific metastases obtained by culturing colorectal cancer cells on tissue-specific decellularized scaffolds. *Nat Biomed Eng.* 2018;2:443-452.

6. Danksagung

Außerordentlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Johann Pratschke, Direktor der Chirurgischen Klinik, Campus Charité Mitte | Campus Virchow Klinikum, Charité – Universitätsmedizin Berlin, für die fortwährende Förderung und Unterstützung meiner wissenschaftlichen sowie klinischen Karriere bedanken.

Mein besonderer und außerordentlicher Dank gilt meinem Doktorvater und wissenschaftlichen Mentor, Herrn Prof. Dr. med. Igor M. Sauer, der mich seit dem Beginn meiner Dissertation uneingeschränkt gefördert hat, mein wissenschaftliches Denken geprägt und mir immer wieder Anstöße für neue Projekte gegeben hat. Zusätzlich stand mir Prof. Sauer jederzeit mit Rat und Tat zur Seite und hat mir wissenschaftlich Freiräume gegeben, neue Ansätze zu entwickeln. Dabei war das Verhältnis immer von gegenseitigem Vertrauen geprägt, was die vielen Projekte, die wir gemeinsam gestaltet haben, erst ermöglicht hat.

Prof. Dr. rer. nat. Ingolf Sack bin ich ebenfalls außerordentlich dankbar dafür, dass er mir mit dem Einsatz der MRE einen ganz neuen wissenschaftlichen Ansatz vermittelt hat und mich fortwährend bei den gemeinsamen Projekten unterstützt hat.

Mein ganz besonderer Dank gilt Priv.-Doz. Dr. med. Benjamin Strücker, der mich vom Beginn meiner wissenschaftlichen Karriere stets gefördert hat und mir bis heute als Mentor und Berater zur Seite steht.

Frau Dr. med. Assal Dansghar, Frau Dr. rer. medic. Anja Reutzel-Selke, Herrn Peter Tang, Frau Eriselda Keshi, Herrn Dr. med. Nicolai Seifert, Herrn Joachim Snellings, und Herrn Dr. rer. medic. Oliver Klein gilt mein außerordentlicher Dank. Ohne ihre Bemühungen, Unterstützung und besonderen Arbeitseinsatz wäre die Umsetzung der Projekte nicht möglich gewesen. Ebenfalls danken möchte ich meinen anderen DoktorandInnen, die unermüdlich an unseren gemeinsamen Projekten arbeiten, um unsere Forschung voranzubringen.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Kolleginnen und Kollegen der Chirurgischen Klinik und den MitarbeiterInnen der Experimentellen Chirurgie bedanken, die uns bei der Durchführung der Projekte unterstützt haben.

Meiner Frau, Dr. med. Vanessa Hillebrandt, bin ich zutiefst dankbar für ihre kontinuierliche Unterstützung, die sie mir jeden Tag entgegenbringt und die unbeschreibliche Motivation, die mir immer wieder zu Teil wurde während der Anfertigung dieser Arbeit. Meinen Eltern und meiner Familie möchte ich für die besondere Unterstützung während meines gesamten Studiums und wissenschaftlichen Laufbahn dafür danken, dass sie mir in allen Belangen immer eine Stütze sind.

7. Eidesstattliche Erklärung

Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

.....
Datum

.....
Unterschrift