

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Dezellularisierung *porciner* Lebern mittels oszillierenden
Druckschwankungen – Optimierung der Dezellularisierungshomogenität

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Karl Herbert Hillebrandt

aus Jena

Datum der Promotion: 2. März 2018

Inhaltsverzeichnis

1. Abstrakt	3
1.1 Abstrakt	3
1.2 Abstract	5
2. Eidesstattliche Erklärung	7
3. Anteilserklärung	8
4. Auszug aus der Journal Summary List (ISI Web of Knowledge SM)	10
5. Druckexemplar der ausgewählten Publikation	11
6. Lebenslauf	23
7. Publikationsliste	26
8. Danksagung	27

1. Abstrakt

1.1 Abstrakt

Hintergrund: Der Organmangel ist nach wie vor der limitierende Faktor in der klinischen Lebertransplantation. Das Konzept der De- und Rezellularisierung von parenchymatösen Organen könnte langfristig die Generierung, *autologer* und funktioneller *Neo-Lebern* ermöglichen. Dies soll durch die Rebesiedlung von dezellularisierten *porcinen* Lebermatrizes mit hepatisch differenzierten, induzierten, pluripotenten Stammzellen erreicht werden. Das Ziel unserer Untersuchung war die Optimierung der Perfusionshomogenität, um dadurch die Schäden der Dezellularisierung zu minimieren.

Methoden: Es wurde ein bezüglich der Prozessdauer (Gesamtzeit: 7 h) und Effektivität optimiertes Dezellularisierungsprotokoll für Schweinelebern entwickelt. Dies konnte durch die Anwendung einer Druck-kontrollierten Perfusion über die Leberarterie (120mmHg) und die Pfortader (60mmHg) mit 1% Triton X-100 und 1% Natriumlaurylsulfat erreicht werden. Es wurde der Einfluss oszillierender Umgebungsdruckschwankungen auf den Dezellularisierungsprozess von Schweinelebern (n=19) untersucht.

Das eigens für die Erzeugung oszillierender Umgebungsdruckschwankungen entwickelte Gerät imitiert die intraabdominellen Bedingungen während der Respiration, um die Mikroperfusion der Leber zu optimieren und dadurch die Homogenität der Dezellularisierung zu verbessern. Wir analysierten die Effektivität der Perfusionsdezellularisierung mittels makroskopischer Beobachtung, histologischer Färbungen (Hämatoxylin und Eosin [H&E], Sirius - Rot und Alcian Blau), immunohistologischer Färbungen (Kollagen IV, Laminin und Fibronectin) und biochemischer Beurteilung (DNA-, Kollagen- und Glycosaminoglykangehalt) der dezellularisierten Lebermatrizes. Die Integrität der extrazellulären Matrix (EZM) nach der Dezellularisierung wurde mit Hilfe von Ausguss-Präparaten, sowie der 3D Rekonstruktion einer computertomographischen Untersuchung der Matrix analysiert.

Ergebnisse: Es konnte gezeigt werden, dass Lebern, welche mit oszillierenden Umgebungsdruckschwankungen (P(+)) perfundiert wurden, homogener dezellularisiert werden und weniger DNA-Gehalt aufweisen, verglichen mit Lebern welche ohne oszillierende Druckschwankungen (P(-)) perfundiert wurden. Mikroskopisch zeigten Lebern aus der P(-) Gruppe verbliebene Zellnester, während in Lebern der P(+) Gruppe keine Zellen in der EZM mehr sichtbar waren. Der Grad

der EZM-Destruktion war höher in Lebern der P(-) Gruppe, obwohl sich die Perfusionsraten und Perfusionsdrücke nicht signifikant zwischen den Gruppen unterschieden. Die immunohistochemischen Färbungen zeigten, dass die wichtigen EZM-Komponenten nach dem Dezellularisierungsprozess erhalten bleiben. Die Ausgusspräparate zeigten ein intaktes Proteingerüst des ehemaligen Gefäßsystems (Pfortader, Leberarterie und Lebervenen), sowie ein erhaltenes Gallengangproteinnetz.

Zusammenfassung: Das hier vorgestellte Protokoll zur Dezellularisierung von *porcinen* Lebern ist im Vergleich zu bestehenden Protokollen schneller (7h) und effektiver. Die Anwendung oszillierender Umgebungsdruckschwankungen verbessert die Perfusionshomogenität und daraus resultierend das Ergebnis des Dezellularisierungsprozesses.

Übersetzt und modifiziert aus: Struecker B*, Hillebrandt KH*, Voitl R, Butter A, Schmuck RB, Reutzel-Selke A, Geisel D, Joehrens K, Pickerodt PA, Raschok N, Puhl G, Neuhaus P, Pratschke J, Sauer IM. Porcine liver decellularization under oscillating pressure conditions - A technical refinement to improve the homogeneity of the decellularization process. *Tissue Eng Part C Methods*. 2015 Mar;21(3):303-13.

* both authors contributed equally to this work

1.2 Abstract

Background: Organ scarcity is the major limiting factor in clinical liver transplantation programs. Decellularization and recellularization of parenchymal organs may facilitate the generation of autologous functional liver like-organs by repopulation of decellularized porcine liver matrices with induced liver cells. The aim of this study was to optimize the perfusion homogeneity in order to minimize matrix damages caused by the decellularization process.

Methods: An accelerated (7 h overall perfusion time) and effective protocol for human-scale liver decellularization by pressure-controlled perfusion with 1% Triton X-100 and 1% sodium dodecyl sulfate via the hepatic artery (120 mmHg) and portal vein (60 mmHg) was developed. Furthermore, the effect of oscillating pressure conditions on pig liver decellularization (n=19) was analyzed. The proprietary perfusion device used to generate these pressure conditions mimics intra-abdominal conditions during respiration to optimize microperfusion within livers and thus optimize the homogeneity of the decellularization process. The efficiency of perfusion decellularization was analyzed by macroscopic observation, histological staining (hematoxylin and eosin [H&E], Sirius red, and alcian blue), immunohistochemical staining (collagen IV, laminin, and fibronectin), and biochemical assessment (DNA, collagen, and glycosaminoglycans) of decellularized liver matrices. The integrity of the extracellular matrix (ECM) after decellularization was visualized by corrosion casting and three-dimensional computed tomography scanning.

Results: Livers perfused under oscillating pressure conditions (P(+)) showed a more homogenous course of decellularization and contained less DNA compared with livers perfused without oscillating pressure conditions (P(-)). Microscopically, livers from the (P(-)) group showed remnant cell clusters, while no cells were found in livers from the (P(+)) group. The grade of disruption of the ECM was higher in livers from the (P(-)) group, although the perfusion rates and pressure did not significantly differ. Immunohistochemical staining revealed that important matrix components were still present after decellularization. Corrosion casting showed an intact vascular (portal vein and hepatic artery) and biliary framework.

Conclusion: In summary, the presented protocol for pig liver decellularization is quick (7 h) and effective. The application of oscillating pressure conditions improves the homogeneity of perfusion and thus the outcome of the decellularization process.

Modifiziert aus : Struecker B*, Hillebrandt KH*, Voitl R, Butter A, Schmuck RB, Reutzel-Selke A, Geisel D, Joehrens K, Pickerodt PA, Raschzok N, Puhl G, Neuhaus P, Pratschke J, Sauer IM.

Porcine liver decellularization under oscillating pressure conditions - A technical refinement to improve the homogeneity of the decellularization process. *Tissue Eng Part C Methods*. 2015 Mar;21(3):303-13.

* both authors contributed equally to this work

2. Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Karl Herbert Hillebrandt, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *„Dezellularisierung porciner Lebern mittels oszillierenden Druckschwankungen – Optimierung der Dezellularisierungshomogenität“* selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

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

Mein Anteil an der ausgewählten Publikation entspricht dem, der in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer/in, angegeben ist.

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

Datum,

Unterschrift

3. Anteilserklärung

Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation

Struecker B*, Hillebrandt KH*, Voitl R, Butter A, Schmuck RB, Reutzel-Selke A, Geisel D, Joehrens K, Pickerodt PA, Raschzok N, Puhl G, Neuhaus P, Pratschke J, Sauer IM.

Porcine liver decellularization under oscillating pressure conditions - A technical refinement to improve the homogeneity of the decellularization process. Tissue Eng Part C Methods. 2015 Mar;21(3):303-13.

* both authors contributed equally to this work

Beitrag im Einzelnen:

Versuche:

Durchführung aller Schweineleberentnahmen, sowie deren Dezellularisierung (n=19). Anschließende Asservierung sämtlicher Proben.

Probenbearbeitung:

Weiterverarbeitung der Proben für die biochemischen Analysen, sowie Aufarbeitung der Proben für die histologischen und immunohistologischen Färbungen.

Datenerhebung:

Durchführung der biochemischen Analysen (DNA, Kollagen und Glucosaminoglykane). Anfertigung sämtlicher (immuno-) histologischer Färbungen (H&E, Sirius - Red, Alcain Blue, Kollagen IV, Laminin und Fibronectin).

Auswertung:

Analyse aller (immuno-) histologischen Präparate. Erhebung der Daten der biochemischen Analysen.

Interpretation:

Mithilfe bei der Interpretation der erhobenen Daten.

Manuskript:

Mitverfassung des Manuskripts, sowie teilweise Anfertigung von Abbildungen.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden

4. Auszug aus der Journal Summary List (ISI Web of KnowledgeSM)

2014 JCR Science Edition
Journal Title Changes

WELCOME ? HELP

Journal Citation ReportsSM

Journal Summary List

subject categories BIOTECHNOLOGY & APPLIED MICROBIOLOGY VIEW CATEGORY SUMMARY LIST

Sorted by: Impact Factor SORT AGAIN

Journals 21 - 40 (of 163)

MARK ALL UPDATE MARKED LIST

Ranking is based on your journal and sort selections.

Mark	Rank	Abbreviated Journal Title <i>(linked to Journal Information)</i>	ISSN	Total Cites	Impact Factor	JCR Data ^(j)			Articles	Cited Half-life	Eigenfactor [®] Metrics ^(j)	
						5-Year Impact Factor	Immediacy Index	Eigenfactor [®] Score			Article Influence [®] Score	
<input type="checkbox"/>	21	TISSUE ENG	2152-4947	19620	4.448	4.916	0.860	457	5.4	0.04222	1.203	
<input type="checkbox"/>	22	MICROB CELL FACT	1475-2859	3541	4.221	4.642	0.489	180	3.8	0.01068	1.168	
<input type="checkbox"/>	23	BIOFUEL BIOPROD BIOR	1932-104X	1916	4.214	5.482	0.727	55	4.9	0.00510	1.446	
<input type="checkbox"/>	24	BIOTECHNOL BIOENG	0006-3592	23334	4.126	4.289	0.988	247	9.4	0.03108	1.188	
<input type="checkbox"/>	25	J NANOBIOTECHNOL	1477-3155	1405	4.115		0.483	58	4.0	0.00314		
<input type="checkbox"/>	26	BMC GENOMICS	1471-2164	25105	3.986	4.360	0.512	1234	4.3	0.08645	1.346	
<input type="checkbox"/>	27	MOL PLANT MICROBE IN	0894-0282	9794	3.944	4.414	0.788	118	8.2	0.01424	1.241	
<input type="checkbox"/>	28	ANNU REV ANIM BIOSCI	2165-8102	114	3.857	3.857	1.320	25	1.3	0.00033	1.004	
<input type="checkbox"/>	29	HUM GENE THER	1043-0342	5460	3.755	3.413	1.023	86	8.4	0.00989	1.038	
<input type="checkbox"/>	30	EXPERT OPIN BIOL TH	1471-2598	3736	3.743	3.222	0.738	141	4.6	0.01038	0.918	
<input type="checkbox"/>	31	STEM CELL RES	1873-5061	1471	3.693	4.157	0.661	127	3.0	0.00623	1.283	
<input type="checkbox"/>	32	MUTAT RES-FUND MOL M	0027-5107	8024	3.680	3.521	0.330	94	9.6	0.01053	1.100	
<input type="checkbox"/>	33	BRIEF FUNCT GENOMICS	2041-2649	1241	3.670	3.565	0.929	42	4.5	0.00425	1.201	
<input type="checkbox"/>	34	APPL ENVIRON MICROB	0099-2240	91772	3.668	4.359	0.711	821	>10.0	0.10891	1.290	
<input type="checkbox"/>	35	BIOTECHNOL J	1860-6768	3137	3.490		1.570	151	3.9	0.00905		
<input type="checkbox"/>	36	PHARMACOGENET GENOM	1744-6872	3206	3.481	3.561	0.452	73	5.5	0.00772	0.988	
<input type="checkbox"/>	37	BIOFOULING	0892-7014	3211	3.415	3.896	0.602	108	5.2	0.00610	0.854	
<input type="checkbox"/>	38	BIOMASS BIOENERG	0961-9534	15391	3.394	4.273	0.414	415	5.8	0.03023	1.054	
<input type="checkbox"/>	39	APPL MICROBIOL BIOT	0175-7598	30133	3.337	3.848	0.656	874	6.8	0.05255	0.976	
<input type="checkbox"/>	40	REV ENVIRON SCI BIO	1569-1705	1102	3.333		0.286	28	6.4	0.00197		

Page 2 of 9

5. Druckexemplar der ausgewählten Publikation

Tissue Engineering Part C: Methods. October 2014, 21(3): 303-313.

<http://dx.doi.org/10.1089/ten.TEC.2014.0321>

Porcine liver decellularization under oscillating pressure conditions - A technical refinement to improve the homogeneity of the decellularization process.

Struecker B*, Hillebrandt KH*, Voitl R, Butter A, Schmuck RB, Reutzel-Selke A, Geisel D, Joehrens K, Pickerodt PA, Raschzok N, Puhl G, Neuhaus P, Pratschke J, Sauer IM.

* both authors contributed equally to this work

6. Lebenslauf

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

7. Publikationsliste

	Erstautor	Impact Factor
1	Porcine liver decellularization under oscillating pressure conditions - A technical refinement to improve the homogeneity of the decellularization process. Struecker B*, Hillebrandt KH* , Voitl R, Butter A, Schmuck RB, Reutzel-Selke A, Geisel D, Joehrens K, Pickerodt PA, Raschzok N, Puhl G, Neuhaus P, Pratschke J, Sauer IM. <i>Tissue Eng Part C Methods</i> . 2015 Mar;21(3):303-13. * both authors contributed equally to this work	4,448
2	Procedure for Decellularization of Rat Livers in an Oscillating-Pressure Perfusion Device. Hillebrandt K , Polenz D, Butter A, Tang P, Reutzel-Selke A, Andreou A, Napierala H, Raschzok N, Pratschke J, Sauer IM, Struecker B.. <i>J. Vis. Exp.</i> (102), e53029,(2015).	1,325

	Co-Autor	Impact Factor
1	Improved rat liver decellularization by arterial perfusion under oscillating pressure conditions. Struecker B, Butter A, Hillebrandt K , Polenz D, Reutzel-Selke A, Tang P, Lippert S, Leder A, Rohn S, Geisel D, Denecke T, Aliyev K, Jöhrens K, Raschzok N, Neuhaus P, Pratschke J, Sauer IM. <i>J Tissue Eng Regen Med</i> . 2014 Sep 4.	5,199
2	Human hepatocyte isolation: Does portal vein embolization affect the outcome? Kluge M, Reutzel-Selke A, Napierala H, Hillebrandt KH , Major RD, Struecker B, Leder A, Siefert J, Tang P, Lippert S, Sallmon H, Seehofer D, Pratschke J, Sauer IM, Raschzok N. <i>Tissue Eng Part C Methods</i> . 2015 Oct 9.	4,448
3	Implantation of a Tissue-Engineered Neo-Bile Duct in Domestic Pigs. Struecker B, Hillebrandt KH , Raschzok N, Jöhrens K, Butter A, Tang P, Andreou A, Napierala H, Reutzel-Selke A, Denecke T, Pratschke J, Sauer IM. <i>Eur Surg Res</i> . 2015 Dec 19;56(1-2):61-75.	2,474

8. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Igor M. Sauer für die Überlassung des Themas und stetige wissenschaftliche Förderung. Er hat mein wissenschaftliches Profil geprägt und gab mir stets hilfreiche Anregungen, wissenschaftliche Kontexte aus unterschiedlichen Perspektiven zu betrachten. Des Weiteren möchte ich ihm dafür danken, dass er mir mehrfach die Möglichkeit gab, meine wissenschaftlichen Ergebnisse national, sowie international zu präsentieren.

Ein nicht weniger großer Dank gilt meinem Mentor und Förderer Dr. med. Benjamin Strücker, welcher mein wissenschaftliches Denken elementar geprägt hat und mich zu jedem Zeitpunkt mit außerordentlichem Engagement unterstützte. Er ermöglichte mir die Bearbeitung unterschiedlicher Projekte und bestärkte mich immer in meinem Willen, eine wissenschaftliche Karriere einzuschlagen. Stets unterstützte er mich bei chirurgischen Fragestellungen, wofür ich ihm äußerst dankbar bin. Durch seine exzellente chirurgische Förderung war ich schnell in der Lage, eigenständig Schweineleber zu explantieren.

Des Weiteren möchte ich Frau Dr. rer. medic. Anja Reutzel-Selke dafür danken, dass sie stets ein offenes Ohr für mich hatte. Sowohl in wissenschaftlicher, als auch in menschlicher Hinsicht. Sie war mir stets eine unverzichtbare Hilfe, die ich nicht missen möchte.

Zu besonderem Dank bin ich Dr. med. Philipp Pickerodt verpflichtet. Er stellte mir die notwendigen Schweinelebern zur Verfügung, ohne die die Anfertigung dieser Dissertation nicht möglich gewesen wäre. Auch stand er mir ebenfalls bei wissenschaftlichen und anästhesiologischen Fragestellungen helfend zur Seite.

Ebenfalls gebührt mein Dank Herrn Dipl.-Ing. Dietrich Polenz für meine mikrochirurgische Ausbildung, sowie die beratende Hilfe bei diversen technischen Fragestellungen.

Für die Hilfe im Labor und beim Erlernen sämtlicher Labortechniken möchte ich meinen Mitarbeitern und Freunden Peter Tang und Steffen Lippert danken. Ohne die Beiden würde ich noch heute verzweifelt im Labor sitzen.

Dr. med. Nathanael Raschzok gilt ebenfalls großer Dank für die Hilfe bei wissenschaftlichen Fragestellungen, sowie für die konstruktive Kritik, die stets hilfreich war.

Anschließend möchte ich Antje Butter, Robert Voitl, Khalid Aliyev, Hendrik Napierala, Nora Ebermann, Dr. med. Jeanette Klein, Dr. med. Rosa Schmuck, PD Dr. med.

Dominik Geisel und PD Dr. med. Korinna Jöhrens danken, ohne deren Hilfe diese Dissertation nicht möglich gewesen wäre.

Abschließend möchte ich meinen Eltern, Esther und Peter Hillebrandt danken, die mich als Menschen formten und mir mein Studium und meine Promotion mit ihrer Unterstützung ermöglichten.

Meiner großen Schwester Julia Hillebrandt möchte ich dafür danken, dass sie alle meine Kongressreisen mitfinanziert hat. Ohne sie wäre mir vieles nicht möglich gewesen.

Zum Schluss will ich meiner Freundin Vanessa Dostal danken, die immer Verständnis zeigte, besonders während der langen Tage und Nächte im Labor. Sie hat mich bei allem unterstützt und bestärkt, was ich mir vorgenommen habe. Sie hat mich immer vorangetrieben und mir den Mut geschenkt, mit allem weiterzumachen, auch wenn es mal nicht so besonders lief.