

Aus dem  
CharitéCentrum für Chirurgische Medizin  
Chirurgische Klinik  
Campus Charité Mitte | Campus Virchow-Klinikum  
Direktor: Professor Dr. med. Johann Pratschke

## **Habilitationsschrift**

### **Entwicklung von Verfahren zur De- und Rezellularisierung von viszeralen Organen**

zur Erlangung der Lehrbefähigung  
für das Fach Chirurgie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät  
Charité-Universitätsmedizin Berlin  
von

Dr. med. Benjamin Strücker  
geboren in Bad Oeynhausen

Eingereicht: Januar 2018

Dekan: Prof. Dr. med. Axel R. Pries

1. Gutachterin: Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar, Rostock
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Andreas Birkenfeld, Dresden

**Meinem Sohn Malte gewidmet**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>5</b>
1.1.	TISSUE ENGINEERING	5
1.2.	KONZEPT DER DE- UND REZELLULARISIERUNG	5
1.3.	DEZELLULARISIERUNG UND EXTRAZELLULÄRE MATRIX	6
1.4.	REZELLULARISIERUNG	8
1.5.	RE-ENDOTHELIALISIERUNG	10
1.6.	ZIELSETZUNGEN DER VORLIEGENDEN ARBEIT	11
<b>2.</b>	<b>EIGENE ARBEITEN</b>	<b>12</b>
2.1.	IMPLANTATION EINES TISSUE ENGINEERED NEO- GALLENGANGES IN HAUSSCHWEINE	12
2.2.	ENTWICKLUNG EINES OPTIMIERTEN VERFAHRENS ZUR DEZELLULARISIERUNG VON RATTENLEBERN	29
2.3.	ENTWICKLUNG EINES OPTIMIERTEN PROTOKOLLS ZUR DEZELLULARISIERUNG VON SCHWEINELEBERN UND EVALUATION DES EFFEKTS VON OSZILLIERENDEN UMGEBUNGSDRUCKSCHWANKUNGEN AUF DIE HOMOGENITÄT DER PERFUSION	42
2.4.	EVALUIERUNG DER MORPHOLOGIE UND FUNKTION VON REBESIEDELTEN RATTENLEBERN	55
2.5.	ERSCHLIEßUNG VON ZELLQUELLEN FÜR DIE HUMANISIERUNG VON XENOGENEN LEBERN	67
2.6.	REBESIEDLUNG VON DEZELLULARISIERTEN RATTENPANKREATA MIT LANGERHANS'SCHEN INSELN	80
<b>3.</b>	<b>DISKUSSION UND AUSBLICK</b>	<b>94</b>
<b>4.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>100</b>
<b>5.</b>	<b>LITERATURANGABEN</b>	<b>102</b>
<b>6.</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>107</b>
<b>7.</b>	<b>ERKLÄRUNG</b>	<b>108</b>

## Abkürzungen

EZM:	Extrazelluläre Matrix
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
DAPI:	4,6-Diamidin-2-phenylindol
H&E:	Hämatoxylin-Eosin
CD31:	<i>cluster of differentiation 31</i>
CK7:	Zytokeratin-7
CK19:	Zytokeratin-19
GAG:	Glykosaminoglykane
HGF:	<i>hepatocyte growth factor</i>
TUNEL:	<i>TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling</i>
TACE:	Transarterielle Chemoembolisation
PVE:	Portalvenöse Embolisation
DSA:	Digitale Substraktionsangiographie
2D:	Zweidimensional

# 1. Einleitung

## 1.1. Tissue Engineering

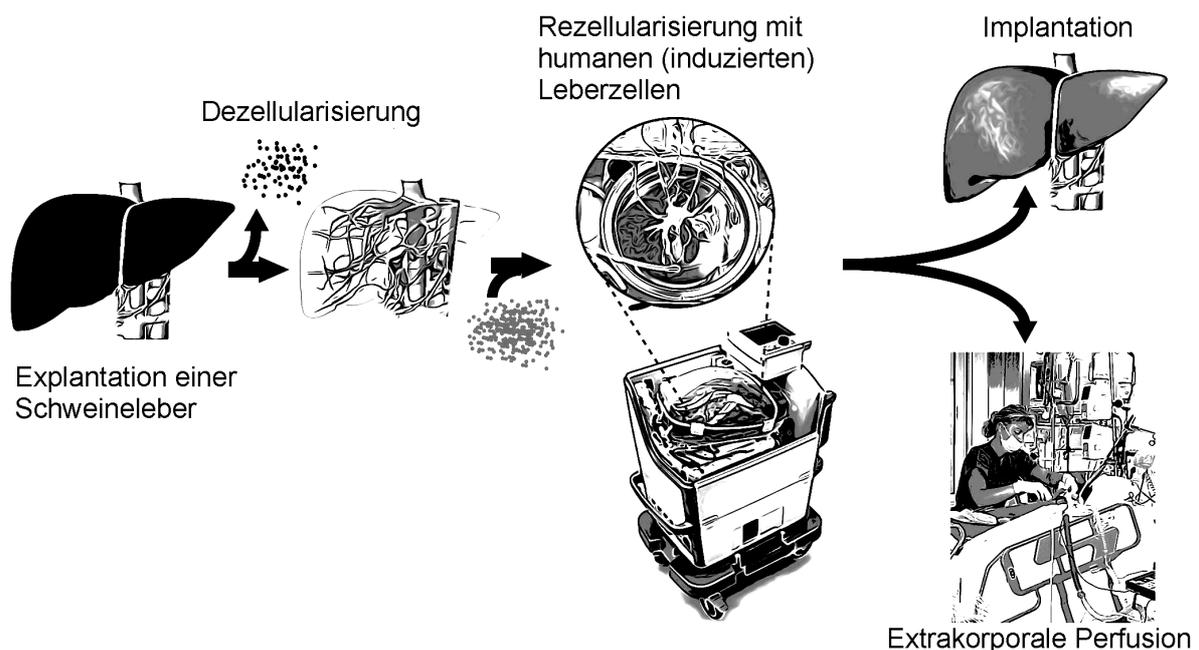
*Tissue Engineering* umschreibt ein multidisziplinäres Fachgebiet, im Rahmen dessen mithilfe von Zellen und Gewebebestandteilen biologische Materialien erschaffen oder manipuliert werden, um spezifische Gewebe- und Organfunktionen zu erhalten, verbessern oder ersetzen<sup>1,2</sup>. In den meisten Fällen werden hierzu drei Hauptbestandteile verwendet<sup>3,4</sup>:

1. Eine Matrix, welche aus natürlichen oder synthetischen Materialien besteht und als Gerüst dient
2. Isolierte lebende Zellen oder Zellvorläufer
3. Kulturmedien, welche Wachstumsfaktoren und Nährstoffe enthalten können

Die klinische Anwendung von Verfahren des *Tissue Engineering* ist in nahezu jedem Bereich der modernen Medizin denkbar, in welchem Gewebe oder Organe ersetzt werden müssen. Besonders hervorzuheben sind aus chirurgischer Sicht die Transplantationsmedizin und die Onkologie sowie einige nicht maligne Erkrankungen (wie z.B. Diabetes mellitus oder die periphere arterielle Verschlusskrankheit)<sup>5,6</sup>.

## 1.2. Konzept der De- und Rezellularisierung

Die De- und Rezellularisierung ist ein Konzept im Rahmen des *Tissue Engineerings* mithilfe dessen die *ex vivo* Generierung von funktionellem Gewebe oder ganzen Organen, welche vom Empfängerorganismus nicht als fremd erkannt werden, möglich erscheint<sup>7,8</sup> (Abbildung 1). Dies gelingt, da im Rahmen der Dezellularisierung Zellen und immunogenes Material (z.B. DNA, alpha-GAL-Epitope etc.) aus dem Gewebe entfernt werden, sodass nur die extrazelluläre Matrix (EZM) erhalten bleibt<sup>9,10</sup>. Die EZM erhält die Architektur eines Organs, ist aber nicht oder nur noch gering immunogen und kann somit als optimale Matrix für die Rebesiedlung mit Zellen eines anderen Ursprungs dienen<sup>11,12</sup>. Im Rahmen dieses Konzeptes ist die „Humanisierung“ von xenogenen bzw. die „Autologisierung“ von allogenen Organen denkbar<sup>13</sup>.



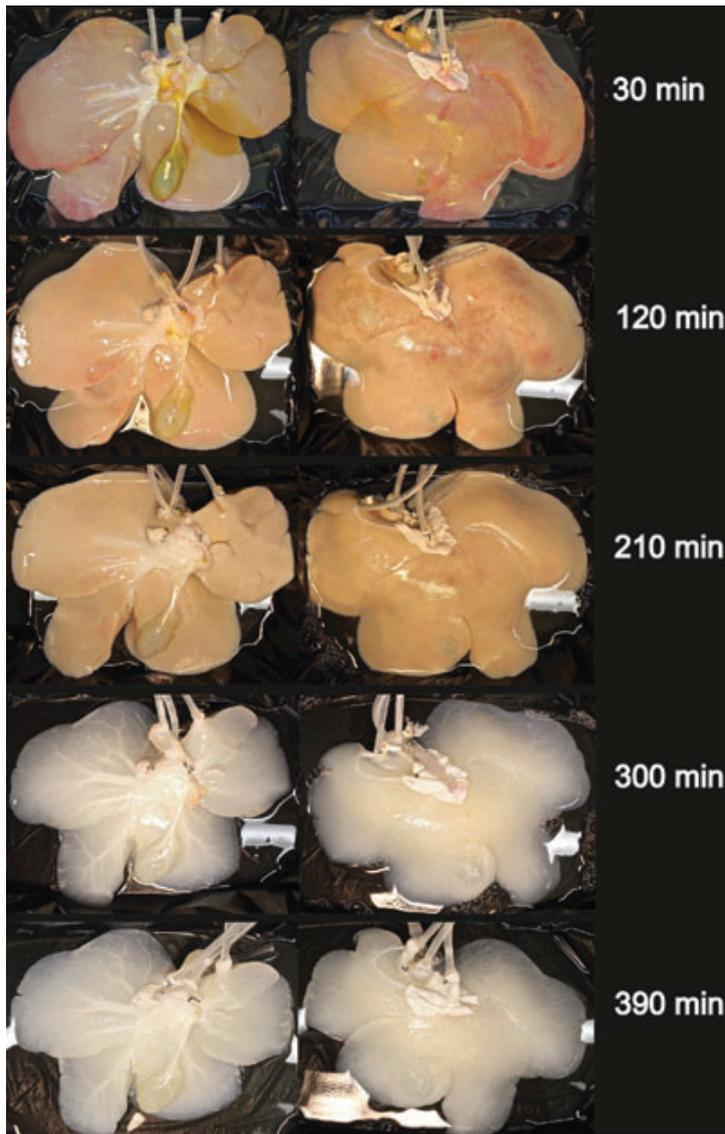
**Abbildung 1:** Mögliches Konzept zur klinischen Anwendung von de- und rezellulierten Lebern

### 1.3. Dezellularisierung und Extrazelluläre Matrix (EZM)

Mittels Dezellularisierung werden Gewebe oder Organe so präpariert, dass nur ihre extrazelluläre Matrix (EZM) erhalten bleibt<sup>14</sup>. Die EZM besteht aus verschiedenen Proteinen (z.B. Kollagene, Fibronectin, Integrine, Laminin, etc.), welche interindividuell und speziesübergreifend relativ konstant aufgebaut sind und somit nach einer Transplantation nicht bzw. nur gering immunogen im Empfängerorganismus wirken<sup>15,16</sup>. Außerdem erhält das Proteinnetzwerk der EZM die Mikroanatomie eines Organs – inklusive der dreidimensionalen Architektur der intraparenchymatösen Blutgefäße oder von Gangstrukturen, wie z.B. Gallen- oder Bauchspeicheldrüsengängen<sup>17</sup>. Je nach Methode der Dezellularisierung bleiben gewebespezifische Signal-Moleküle (z.B. Wachstumsfaktoren) in der EZM erhalten<sup>18</sup>, weswegen die EZM die Proliferation und Differenzierung von Zellen induzieren kann<sup>7</sup>. Ferner leiten Zellen die den Integrin-vermittelten Kontakt zur EZM verlieren die Apoptose ein. Dieser Prozess wurde als *anoikis* beschrieben<sup>19</sup>. Deshalb ist die EZM eine Art natürliche Biomatrix, die optimal zur zellulären Rebesiedlung mit Zellen anderen Ursprungs genutzt werden kann<sup>20</sup>.

Die Technik der Dezellularisierung mittels Immersion in Detergentien ist nicht neu und wird für diverse Gewebe (z.B. bei Herzklappen, Perikard, Matrix zur Behandlung

großer Wunden etc.) bereits seit Jahren erfolgreich klinisch angewandt<sup>21</sup>. Im Jahre 2008 wurde die Technik dann aber erstmals auf parenchymatöse Organe übertragen, indem Rattenherzen mit Natriumlaurylsulfat und Triton X-100 über die Koronargefäße perfundiert wurden<sup>22</sup>. Nach diesem Meilenstein wurde die Technik unter anderem auf die Lunge<sup>23</sup>, die Leber (Abbildung 2)<sup>24,25</sup>, das Pankreas<sup>26</sup>, die Niere<sup>27</sup> und die Milz<sup>28</sup> ausgeweitet.



**Abbildung 2 (modifiziert aus Struecker *et al.*<sup>25</sup>):** Dezellularisierung einer Schweineleber im zeitlichen Verlauf.

Seitdem wurden verschiedene Methoden zur Dezellularisierung evaluiert, wobei sich für parenchymatöse Organe die Perfusion mit alkalischen Detergentien (z.B. Natriumlaurylsulfat und Triton-X100) als derzeitiges Standardverfahren etabliert hat<sup>29</sup>. Obwohl je nach Gewebebeschaffenheit jedes Dezellularisierungsverfahren bestimmte Vor- und Nachteile impliziert, geht letztlich jede Dezellularisierung mit

einer gewissen Schädigung der EZM einher<sup>30</sup>. Man sollte deshalb versuchen die Methode der Dezellularisierung so zu wählen, dass die Zellen effektiv entfernt werden, die EZM aber möglichst wenig geschädigt wird<sup>31</sup>.

Interessanterweise ist trotz des vermehrten wissenschaftlichen Interesses in den letzten Jahren, der Terminus „dezellularisiert“ noch nicht abschließend definiert. Der erste Vorschlag diesbezüglich wurde 2011 publiziert und beinhaltet drei Bedingungen, die erfüllt sein müssen<sup>14</sup>:

1. Pro mg EZM weniger als 50 ng dsDNA
2. DNA mit einer Fragmentlänge <200 bp
3. Fehlen von sichtbarem Zellkernmaterial in der DAPI oder HE-Färbung

Letztlich fehlen bisher jedoch experimentelle oder klinische Daten, um dieser Definition universelle Gültigkeit zu verleihen, und es erscheint plausibel, dass für Transplantationen von unterschiedlichen Organen zwischen verschiedenen Spezies durchaus andere Kriterien erfüllt sein müssen, um keine relevante Immunreaktion auszulösen<sup>32</sup>. Deshalb wird weiterhin versucht gültige Qualitätsstandards zu definieren<sup>33</sup>.

#### **1.4. Rezellularisierung**

Bei der *in vitro* - Rebesiedlung von dezellularisierten Organmatrizen können drei Phasen voneinander unterschieden werden: die **Zellinfusion**, die **Integration der Zellen in die Matrix** und die **Maturierung des rebesiedelten Organs**. Es werden hierbei Techniken der klassischen Zellkultur mit Methoden der extrakorporalen Organperfusion kombiniert<sup>34</sup>:

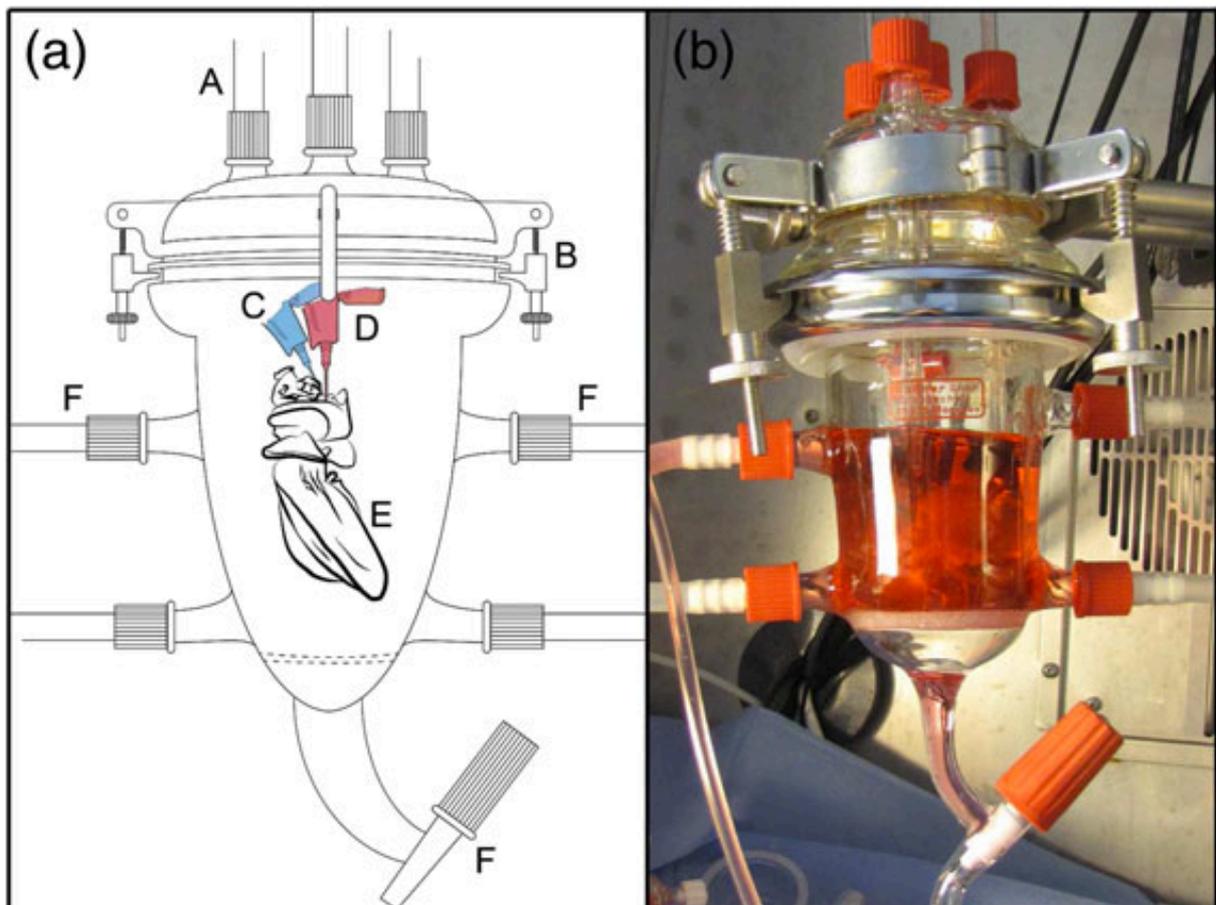
Im Rahmen der Zellinfusion werden isolierte Zellen in Medium in die Matrix eingebracht. Dies geschieht entweder mittels anterograder oder retrograder Perfusion der Matrizen über die vorgegebenen Gefäß- oder Gangstrukturen<sup>35,36</sup> oder mittels Direktpunktion der Matrix mit einer Kanüle<sup>37</sup>. Ferner kann zwischen der einmaligen Zellgabe (*i.e. singlestep*) und mehrfachen Zellgaben (*multistep*) im zeitlichen Abstand unterschieden werden<sup>38</sup>. Im Rahmen der bisher veröffentlichten Arbeiten konnte gezeigt werden, dass prinzipiell jede der o.g. Techniken möglich ist.

Als derzeitiger Standard konnte sich jedoch aufgrund einer hohen Effektivität und guter Verteilung der Zellen in der dezellularisierten Matrix die *multistep*-Infusion über die Blutgefäße etablieren<sup>39</sup>.

Ob und wie die verschiedenen Zellarten eines Organs über die verschiedenen vorgegebenen Wege (z.B. Blutgefäße, Gallengang etc.) gegeben werden müssen, um die Mikroanatomie eines Organs wieder aufzubauen, ist bisher unklar.

Nach der Infusion der Zellen in die Matrix wird diese entweder nur mit sehr geringer Laufrate oder gar nicht mehr perfundiert, um den Zellen den Kontakt zur EZM und somit ein Anwachsen der Zellen zu ermöglichen<sup>40</sup>. Wie lange diese Phase für welche Zellart genau sein sollte, ist bisher unerforscht. Es erscheint logisch, dass eine zu lange Phase ohne adäquate Perfusion und somit Versorgung der Zellen mit Sauerstoff und Nährstoffen die Zellen schädigen könnte. Andererseits wird es den Zellen vermutlich kaum gelingen, im ehemaligen parenchymatösen Raum des Organs anzuwachsen, wenn ständig mechanische Kräfte aufgrund der Perfusion auf sie wirken<sup>41</sup>.

Nach dem Anwachsen der Zellen wird die Matrix in einem Bioreaktor mit oxygeniertem Medium perfundiert, um die Zellen mit ausreichend Sauerstoff und Nährstoffen zu versorgen<sup>42</sup> (Abbildung 3).



**Abbildung 3:** (aus Butter et al.<sup>43</sup>) a) Schematische Darstellung und (b) Fotografie eines proprietären Bioreaktors zur Rebesiedlung und Maturierung von Rattenlebern. Das Kulturmedium wird durch den Einlass (A) in die versiegelte Perfusionskammer (B) eingebracht und kann selektiv in die Leberarterie (C) oder die Pfortader (D) perfundiert werden. Die Rattenlebermatrix (E) hängt entweder frei in der Kammer oder schwimmt im Medium, welches über die Auslässe (F) reguliert werden kann.

Je nach den weiteren Zusätzen zum verwendeten Perfusat (z.B. Wachstumsfaktoren) sowie den mechanischen Gegebenheiten der Perfusion wird versucht, eine lokale Proliferation oder Differenzierung der Zellen im Sinne einer Organmaturation zu erreichen<sup>44,45</sup>. Besonderes Augenmerk wird hierbei auf den funktionellen Wiederaufbau der Mikroanatomie des Organs gesetzt<sup>46</sup>. Im Optimalfall ist das rebesiedelte Organ dann funktionell und bereit für die Implantation<sup>47</sup>.

### 1.5. Re-Endothelialisierung

Bevor eine langfristige Integration eines rebesiedelten Organs in den Blutkreislauf eines Empfängers möglich ist, müssen noch diverse Probleme experimentell gelöst werden. Eines der dringlichsten ist die Verhinderung der Thrombosierung des rebesiedelten Transplantats nach *in vivo* Implantation und Perfusion mit Blut<sup>48</sup>. Der

Kontakt von bestimmten Bestandteilen der EZM zu Blut dient als starker Auslöser der Blutgerinnungskaskade<sup>49</sup>. Deshalb ist ein vielversprechender Ansatz, der eine langfristige Implantation möglich machen könnte, die sog. Re-endothelialisierung: hierbei wird versucht, die Integrität des Endothels mittels Perfusion von Endothelzellen über die Blutgefäße wieder herzustellen<sup>50</sup>.

### **1.6. Zielsetzungen der vorliegenden Arbeit**

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die in der Literatur beschriebene Technik der De- und Rezellularisierung für viszerale Gewebe und Organe zu etablieren und weiterzuentwickeln:

Dabei wurden besonders folgende Fragen experimentell adressiert:

- 1.) Wie kann die De- und Rezellularisierung eingesetzt werden, um extrahepatische Gallengänge zu generieren?
- 2.) Welche Probleme bestehen bei der Dezellularisierung von Lebern und wie kann man diese im Kleintiermodell optimieren?
- 3.) Kann die Technik auf eine klinisch relevante Größe übertragen werden?
- 4.) Welche morphologischen und funktionellen Prozesse laufen nach erfolgter Rebesiedlung in Lebern ab?
- 5.) Welche humanen Zellquellen können zur Rebesiedlung von Lebern erschlossen werden?
- 6.) Lässt sich die Technik auf Pankreata übertragen, um funktionelle endokrine Pankreata *in vitro* zu generieren?

Zur Beantwortung der o.g. Fragen werden im Rahmen der vorliegenden Arbeit vorab publizierte Ergebnisse zusammengefasst<sup>25,43,51-54</sup>.

## 2. Eigene Arbeiten

### 2.1. Implantation eines *tissue engineered* Neo-Gallenganges in Hausschweine

**Struecker B.**, Hillebrandt K., Raschzok N., Jöhrens K., Butter A., Tang P., Andreou A., Napierala H., Polenz D., Reutzel-Selke A., Denecke T., Pratschke J., Sauer I.M.

Implantation of a Tissue-Engineered Neo-Bile Duct in Domestic Pigs

Eur Surg Res. 2016;56(1-2):61-75. <https://doi.org/10.1159/000441720>

Im Rahmen dieses Projekts nutzten wir die Technik der De- und Rezellularisierung, um *in vitro* aus Blutgefäßen extrahepatische Gallengänge zu generieren. Diese könnten klinisch eingesetzt werden um – z.B. bei Kindern mit Gallengangsatresie oder nach akzidenteller Verletzung des Gallengangs im Rahmen chirurgischer Eingriffe (e.g. Cholezystektomie) – den extrahepatischen Gallengang zu ersetzen.

Hierzu wurde ein bereits publiziertes Verfahren zur Dezellularisierung von Blutgefäßen<sup>56</sup> an den explantierten abdominalen Aorten von Hausschweinen angewandt. Die Gefäße wurden anschließend mittels Histologie, Elektronenmikroskopie und Bestimmung des DNA-Gehaltes charakterisiert, um eine adäquate Dezellularisierung sicherzustellen.

Anschliessend wurde bei den Empfängerschweinen eine offene Cholezystektomie durchgeführt, wobei die entfernte Gallenblase genutzt wurde, um die die Innenwand bedeckenden Epithelzellen (i.e. Cholangiozyten) zu isolieren. Die isolierten Cholangiozyten wurden genutzt, um die dezellularisierten Aortenstücke wieder zu besiedeln und so *in vitro* die Neo-Gallengänge herzustellen.

Im dritten Schritt wurde am Folgetag beim selben Schwein eine extrahepatische Gallengangsresektion durchgeführt und die vorbereiteten Neo-Gallengänge in die Schweine (n=5) implantiert. Da die Schweine Neo-Gallengänge implantiert bekommen hatten, welche mit ihren eigenen Cholangiozyten besiedelt waren, wurde keine Immunsuppression verabreicht. Die Schweine durften sofort postoperativ Futter und Wasser *ad libitum* zu sich nehmen und wurden für 14 Tage nach der Implantation beobachtet. Am Tag der Cholezystektomie, am Tag der Implantation sowie an Tag 7 und an Tag 14 nach der Implantation wurde den Tieren Blut

entnommen und auf z.B. Entzündungswerte, Cholestaseparameter und Leberenzyme untersucht. Danach wurden die Schweine finalisiert und die Neo-Gallengänge wieder explantiert. Bei einem Schwein wurde am Tag der Explantation eine Magnetresonanz-Cholangiopankreatikographie (MRCP) durchgeführt, um den Neo-Gallengang *in vivo* zu beurteilen. Die Operationen wurden foto-dokumentiert und die explantierten Neo-Gallengänge analysiert. Hierzu wurden die Neo-Gallengänge (immun-)histologisch mittels HE-, CD31-, CK7-, CK19-, Mannose Rezeptor Typ 1-Färbung aufgearbeitet. Ferner wurde der DNA-Gehalt gemessen. Alle fünf Schweine haben die Prozedur ohne große Komplikationen für die geplanten 14 Tage überlebt und wurden anschließend finalisiert. Die Neo-Gallengänge waren in allen Fällen gut in das umliegende Gewebe eingewachsen, es wurden keinerlei Gallecks beobachtet. In einem Fall wurde ein intraabdomineller Abszess gefunden, ein Schwein entwickelte eine Cholestase aufgrund einer chirurgisch bedingten Anastomosenstenose. Mittels Histologie konnte eine ausgeprägte Infiltration der Neo-Gallengänge von neutrophilen Granulozyten gezeigt werden. Dies könnte Ausdruck einer Fremdkörperreaktion oder einer Infektion sein. Letztlich konnten wir zeigen, dass der Ersatz des extrahepatischen Gallenganges mit experimentell verändertem Gewebe prinzipiell möglich ist – bis zur Anwendung in der Klinik die Technik aber optimiert und durch Langzeitversuche im Tiermodell hinsichtlich seiner Nachhaltigkeit untersucht werden muss.































## 2.2. Entwicklung eines optimierten Verfahrens zur Dezellularisierung von Rattenlebern

**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.

Improved rat liver decellularization by arterial perfusion under oscillating pressure conditions

J Tissue Eng Regen Med. 2014 Sep 4. <https://doi.org/10.1002/term.1948>

Bei der Etablierung des Dezellularisierungsverfahrens für Rattenlebern mittels Perfusion von Detergentien ist uns wiederholt aufgefallen, dass manche Lebern nicht homogen perfundiert und somit unzureichend dezellularisiert wurden. Dabei konnten die Bereiche des Organs, in denen makroskopisch Gewebereste gesehen wurden, ebenfalls dezellularisiert werden, indem man die Perfusionslaufrate oder -dauer erhöhte. Da die Perfusion mit Detergentien aber die extrazelluläre Matrix (EZM) schädigt, war das Ziel des Projektes, die Dezellularisierung möglichst homogen und effektiv im Organ ablaufen zu lassen, um die schädigende Wirkung auf die EZM zu minimieren.

Dazu wurde zunächst die Perfusion über die Pfortader mit der Perfusion über die Leberarterie miteinander verglichen, wobei die Technik der Dezellularisierung über die Leberarterie ein *bis dato* nicht beschriebenes Verfahren darstellte. Des weiteren wurde evaluiert, ob die Einwirkung von oszillierenden Umgebungsdrücken einen Effekt auf die Homogenität der Perfusion hat. Die Leber ist *in situ* mit dem Zwerchfell verbunden und während der Atmung Druckschwankungen ausgesetzt. Bei der Inspiration erhöht sich der intraabdominelle Druck und presst das Blut aus der Leber in die *vena cava* Richtung Herz. Bei der Expiration sinkt der Druck, die Leber hebt sich samt dem Zwerchfell, und der Einstrom von Blut in die Leber über die Pfortader wird maximiert. Durch diesen Mechanismus wird die Mikroperfusion in der Leber optimiert<sup>57</sup>. Wir haben im Rahmen des Projektes eine Perfusionsapparatur entwickelt, mithilfe derer diese äußeren Druckschwankungen während der Perfusion von Rattenlebern simuliert wurden und haben den Effekt experimentell evaluiert. Insgesamt dezellularisierten wir so 24 Rattenlebern und analysierten diese mittels

Histologie (HE, Gömöri-Trichrom, Kollagen IV, Laminin, Fibronectin), biochemisch (DNA-, GAG, HGF-Gehalt) und Ausgusspräparat.

Interessanterweise zeigte sich die Perfusion über die Arterie effektiver als die Perfusion über die Pfortader. Der Einsatz von oszillierenden Druckschwankungen hatte ebenfalls einen positiven Effekt auf die Effektivität der Perfusion, sodass Lebern, welche unter dem Einsatz von oszillierenden Druckschwankungen und über die Arterie perfundiert worden waren, am schnellsten und effektivsten dezellularisiert waren. Mithilfe dieser Technik gelang uns die Etablierung einer neuartigen, wenig invasiven und schnellen Methode zur Rattenleberdezellularisierung.























### **2.3. Entwicklung eines optimierten Protokolls zur Dezellularisierung von Schweinelebern und Evaluation des Effekts von oszillierenden Umgebungsdruckschwankungen auf die Homogenität der Perfusion**

**Struecker B\***, Hillebrandt K\*, Voitl R, Butter A, Schmuck R, 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.

<https://doi.org/10.1089/ten.TEC.2014.0321> Epub 2014 Oct 16.

Nach der Etablierung der optimierten Rattenleberperfusion war das Ziel dieses Projektes, die Technik auf Lebern von klinisch relevanter Größe zu erweitern. Im Rahmen des Projektes wurde eine Perfusionsapparatur zur extrakorporalen Schweineleber-Perfusion für die Dezellularisierung adaptiert und der Einfluss von oszillierenden Umgebungsdruckschwankungen auf die Dezellularisierung einer Schweineleber evaluiert. Hierfür wurden insgesamt 17 porcine Lebern mit oder ohne Druckschwankungen dezellularisiert und anschließend histologisch, biochemisch und radiologisch analysiert.

Die dezellularisierten Lebern der Gruppe, in denen die Druckschwankungen eingesetzt wurden, zeigten einen tendenziell niedrigeren DNA Gehalt und einen höheren Kollagen-Gehalt im Vergleich zu Lebern nach Dezellularisierung ohne Druckschwankungen. Selbst makroskopisch waren deutliche Unterschiede sichtbar: eindeutig nicht dezellularisierte Flächen auf der ventralen Oberseite der Lebern, welche ohne Druckschwankungen dezellularisiert wurden. Diese Beobachtung bestätigte sich in der Histologie, wobei in keinem einzigen der angefertigten Schnitte von Lebern, welche mit Druckschwankungen perfundiert wurden, Zellreste gefunden werden konnten. Lebern beider Gruppen zeigten eine erhaltene Mikroarchitektur, was mittels Angiographie und Ausgusspräparat visualisiert werden konnte. Insgesamt gelang es uns, mithilfe der entwickelten Apparatur ein schnelles, reproduzierbares Protokoll zur effektiven und schonenden Dezellularisierung von Lebern klinisch relevanter Größe zu entwickeln. Dieses Protokoll könnte unserer

Ansicht nach mit kleinen Anpassungen auch für die Dezellularisierung von humanen Lebern angewandt werden.























## 2.4. Evaluierung der Morphologie und Funktion von rebesiedelten Rattenlebern

Butter A, Aliyev K, Hillebrandt KH, Raschzok N, Kluge M, Seiffert N, Tang P, Napierala H, Muhamma AI, Reutzel-Selke A, Andreou A, Pratschke J, Sauer IM, **Struecker B.**

Evolution of graft morphology and function after recellularization of decellularized rat livers.

J Tissue Eng Regen Med. 2016 Dec 13. <https://doi.org/10.1002/term.2383>

[Epub ahead of print]

Nach erfolgreicher Entwicklung von Protokollen zur Dezellularisierung von Ratten- und Schweinelebern, sollte im Rahmen dieses Projektes die Rebesiedlung der dezellularisierten Lebern im Kleintiermodell etabliert werden.

Hierzu haben wir zunächst die bereits entwickelte Perfusionsapparatur an die Erfordernisse der Rezellularisierung angepasst und einen proprietären Bioreaktor entwickelt. Der Bioreaktor besteht aus einer Kammer, in der die Lebern von der Außenwelt abgeschlossen selektiv über die Pfortader und/oder die Leberarterie perfundiert werden können, aus einer peristaltischen Pumpe, Schlauchsystemen, einem Oxygenator sowie einem Brutschrank, um die Versuche bei 37°C durchführen zu können. Um die Vorgänge im Organ im zeitlichen Verlauf nach erfolgter Rebesiedlung besser zu verstehen, wurden insgesamt 21 Rattenlebern mit  $150 \times 10^6$  Rattenhepatozyten rebesiedelt, verschieden lang *ex vivo* perfundiert (1h, 6h, 12h, 24h, 3d, 5d, 7d) und anschließend analysiert. Außerdem wurden zu den o.g. Zeitpunkten Proben des Perfusates aus dem Bioreaktor entnommen und auf den Albumingehalt und die Höhe der freigesetzten Leberenzyme hin überprüft. Um den Effekt der Matrix auf die Zellfunktion zu objektivieren, nahmen wir isolierte Rattenhepatozyten für ebenfalls sieben Tage lang in Kultur und untersuchten das Kulturmedium zu denselben Zeitpunkten auf Albumin.

Analog zu unseren Arbeiten zur Dezellularisierung waren wir die erste Gruppe, die eine Rezellularisierung über die Leberarterie zeigen konnte. Mithilfe der entwickelten Apparatur gelang es uns, die rebesiedelten Konstrukte bis zu sieben Tage lang ohne Kontamination *ex vivo* zu perfundieren. Selbst nach sieben Tagen waren mittels histologischer Untersuchung (TUNEL-Färbung) noch lebende Zellen im Organ

nachweisbar. Interessanterweise scheinen sich die Zellen direkt nach der Rebesiedlung eher im Netzwerk der ehemaligen Gefäße zu befinden, wobei sie innerhalb von 24 Stunden die Gefäße tendenziell verlassen und in den dezellularisierten ehemaligen Parenchymraum migrieren. Die Funktion der Zellen steigt für die ersten 24 Stunden nach Rebesiedlung an und zeigt sich zum Zeitpunkt 24h signifikant höher, als in der vergleichenden 2d Kultur. Danach fällt die Funktion konstant ab und erreicht nach sechs bzw. sieben Tagen ihren tiefsten Wert. Obwohl wir anhand der vorliegenden Daten keine abschließende Empfehlung abgeben können, erscheint es plausibel, dass rebesiedelte Organe vermutlich möglichst zeitnah, nach Abschluss der Re-Organisation implantiert werden sollten. Um die Frage endgültig zu klären, ist jedoch eine weitere experimentelle Untersuchung der Prozesse in Konstrukten, welche mit verschiedenen Zellarten (Hepatozyten, Endothelzellen, Cholangiozyten etc.) rebesiedelt wurden, nötig.





















## 2.5. Erschließung von Zellquellen für die *Humanisierung* von xenogenen Lebern

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.

Human Hepatocyte Isolation: Does Portal Vein Embolization Affect the Outcome?

Tissue Eng Part C Methods. 2016 Jan;22(1):38-48.

<https://doi.org/10.1089/ten.TEC.2015.0190>

Bevor nach derzeitigem Stand der Technik die Verwendung von rezellularisierten Organen klinisch möglich erscheint, müssen günstige und sichere Quellen von humanen Zellen erschlossen werden. Langfristig könnten Zellen, welche gezielt aus induzierten pluripotenten Stammzellen differenziert werden, dieses Problem lösen. Zur Etablierung der Technik und zum besseren Verständnis der Interaktion einer xenogenen Organmatrix mit humanen Zellen, werden jedoch schon jetzt günstige und einfach verfügbare Zellen benötigt. In diesem Zusammenhang ist die Isolation von humanen Leberzellen aus reseziertem Lebergewebe ein lange etabliertes Verfahren. Da jedoch zunehmend Lebern vor einer geplanten Resektion vorbehandelt werden (z.B. durch portalvenöse Embolisation, Chemotherapie, TACE etc.), ist es wichtig, die Einflüsse der Vorbehandlung auf die isolierten Zellen zu verstehen.

Deshalb wurde im Rahmen dieses Projektes der Einfluss der portalvenösen Embolisation (PVE) auf die Isolation von humanen Hepatozyten aus Resektaten analysiert. Im Rahmen der PVE wird ca. 6 Wochen präoperativ der rechte Hauptstamm der Pfortader interventionell verschlossen, um eine Hypertrophie des linken Teils der Leber zu induzieren. So werden die linken Segmente präkonditioniert und das Risiko einer postoperativen Leberinsuffizienz nach ausgedehnter rechtsseitiger Resektion minimiert. Im Rahmen des Projektes wurden aus den Leberresektaten von 190 Patienten die Hepatozyten isoliert, wobei 27 dieser Patienten zuvor eine PVE erhalten hatten. Nach der Isolierung wurden die Hepatozyten für bis zu sechs Tage kultiviert und der Überstand des Mediums auf z.B. freigesetzte Transaminasen, Harnstoff- und Albumingehalt analysiert. Zusammenfassend lässt sich anhand dieses Projektes feststellen, dass die

präoperative PVE keinen Einfluss auf die freigesetzten Leberenzyme oder die gemessene metabolische Aktivität der Zellen hatte. Somit können humane Hepatozyten, welche aus Resektaten von Patienten mit stattgehabter PVE gewonnen werden, allem Anschein nach unkompliziert für u. A. De- und Rezellularisierungsexperimente genutzt werden.























## 2.6. Rebesiedlung von dezellularisierten Rattenpankreatata mit Langerhans'schen Inseln

Napierala H, Hillebrandt KH, Haep N, Tang P, Tintemann M, Gassner J, Noesser M, Everwien H, Seiffert N, Kluge M, Teegen E, Polenz D, Lippert S, Geisel D, Reutzel Selke A, Raschzok N, Andreou A, Pratschke J, Sauer IM, **Struecker B**.

Engineering an endocrine Neo-Pancreas by repopulation of a decellularized rat pancreas with islets of Langerhans.

Sci Rep. 2017 Feb 2;7:41777. <https://doi.org/10.1038/srep41777>

Diabetes mellitus ist eine medizinisch und gesundheits-ökonomisch wichtige Erkrankung in westlichen Gesellschaften. Der Bedarf an innovativen, neuen Therapien ist nach wie vor immens. Ein gutes Insulinschema kann bei Patienten zwar zu einer relativ stabilen Kurzzeitsituation führen, aber im Langzeitverlauf entwickeln trotzdem viele dieser Patienten sekundäre Erkrankungen (z.B. Diabetische Nephropathie, Angiopathie, Neuropathie, Retinopathie etc.).

Nach Transplantation eines Pankreas kann es zu einer schwerwiegenden und potentiell lebensbedrohlichen Entzündung des exokrinen Anteils der Drüse kommen (i.e. Transplantat-Pankreatitis), welche häufig die Explantation des Organs nötig macht. Außerdem machen Transplantationen von allogenen Gewebe eine lebenslange Immunsuppression nötig.

Wird anstelle des ganzen Organs nur der endokrine Anteil des Organs transplantiert (i.S. einer Insel-Transplantation), ist diese häufig deutlich weniger effektiv und muss im Verlauf wiederholt werden. Inseln sind sehr Ischämie-intolerant und leiden deshalb besonders unter der Transplantation. Die derzeit klinisch etablierte Technik für eine Insel-Transplantation ist die Infusion der Inseln in die Pfortader des Empfängers. Das intrahepatische Milieu weist gegenüber dem im Pankreas jedoch einen deutlich verringerten Sauerstoffgehalt auf. Außerdem kann die Transplantation zu schwerwiegenden Komplikationen (wie z.B. einer Pfortaderthrombose) führen. Deshalb wäre es von potentiell großer klinischer Bedeutung, eine bessere Art der Pankreas- bzw. Insel-Transplantation zu entwickeln. Die De- und Rezellularisierung von Pankreatata impliziert diesbezüglich bedeutende Möglichkeiten: so erscheint die Generierung eines rein endokrinen Pankreas mittels Rebesiedlung eines dezellularisierten Organs mit Inseln möglich. Aufgrund der erhaltenen

Gefäßarchitektur könnte dieses Neo-Pankreas unkompliziert auxilär implantiert werden. So würde das Risiko einer schweren Komplikation (wie z.B. einer Pankreatitis oder Pfortaderthrombose) entfallen, und gleichzeitig hätten die Inseln ein optimales, sauerstoffreiches Milieu in der Pankreasmatrix. Deshalb war nach der erfolgreichen Etablierung der Rebesiedlungstechnik für Lebern das Ziel dieses Projektes die Ausweitung der Technik auf Pankreata.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst die Dezellularisierung von Ratten-Pankreas über drei verschiedene Routen (i.e. Arterie, Vene, Pankreasgang) etabliert und verglichen. Mittels Digitaler Subtraktionsangiographie (DSA) wurde nach erfolgreicher Dezellularisierung die Integrität des vaskulären Gefäßbaumes (Arterie, Vene) bestätigt, während das Kontrastmittel aus dem Pankreasgang in das ehemalige Parenchym austrat. Dieser Unterschied wurde im Rahmen der Rebesiedlung mit Inseln bestätigt und ausgenutzt: Inseln sind im Vergleich zu einzelnen Zellen sehr viel größer, weshalb sie bei Infusion in das Gefäßsystem dieses verstopfen. Bei Infusion der Inseln in das Gangsystem traten diese jedoch aus dem Gangsystem aus und sammelten sich im peri-duktalem Raum, trotz ihrer Größe. Die so generierten „endokrinen Neo Pankreata“ wurden dann in einer eigens konstruierten Vorrichtung *ex vivo* perfundiert. Ein Glukose-stimulierter Insulin Sekretions-Test zeigte, dass die Inseln den Prozess überlebt haben und funktionell waren. Dies wurde durch anschließende histologische Aufarbeitung mittels TUNEL-Färbung bestätigt. Die vorliegende Arbeit ist die erste, die eine erfolgreiche De- und Rebesiedlung von Rattenpankreatata sowie die Funktionalität der generierten *Neo-Pankreata* zeigt.

























### 3. Diskussion und Ausblick

Das Ziel der vorgestellten Arbeiten war es, die De- und Rezellularisierung in einem viszeralchirurgischen Kontext zu etablieren, da die Technik ein besonders vielversprechendes Konzept des *Tissue Engineerings* darstellt, um funktionelle Organe zu konstruieren.

Obwohl man seit der Beschreibung der Technik ein deutlich zunehmendes wissenschaftliches Interesse an der Thematik beobachten kann, sind zum Teil weiterhin grundlegende Fragen nicht abschließend geklärt und Begrifflichkeiten nicht eindeutig festgelegt: so ist zum Beispiel selbst der Terminus "dezellularisiert" bisher nicht konsistent definiert<sup>30</sup>. Badylak und Kollegen schlagen vor, den Begriff *outcome*-orientiert zu definieren und schreiben, dass Gewebe, welches die von ihnen definierten Kriterien erfüllt, nach erfolgter Transplantation vermeintlich keine Immunreaktion im Empfänger mehr hervorrufen wird<sup>15</sup>. Die klinische und/oder experimentelle Datenlage diesbezüglich ist bisher jedoch alles andere als eindeutig, und somit sollte dieser Definition noch keine universelle Gültigkeit verliehen werden<sup>17,33</sup>. Im Rahmen des beschriebenen Projektes zur Implantation von Neo-Gallengängen haben wir Blutgefäße dezellularisiert, rebesiedelt und in allogene Hausschweine ohne Immunsuppression implantiert. In den dezellularisierten Blutgefäßen wurden hierbei eine Restmenge von  $226,9 \pm 211$  ng/mg DNA nachgewiesen, was in etwa 4-5 fach über dem von Badylak vorgeschlagenen Höchstwert (50 ng/mg) liegt. Trotzdem konnten wir in den Neo-Gallengängen 2 Wochen nach erfolgter Implantation keine Immunreaktion im Sinne einer klassischen Abstoßung beobachten, sondern gehen aufgrund einer Infiltration mit Neutrophilen eher von einer Fremdkörperreaktion oder Infektionsreaktion bei Kontamination aus. Laut *Badylak et al.* kommt es nach der Implantation von dezellularisiertem Gewebe entweder zu einem destruktiven oder produktiven Abbau des Gewebes<sup>58</sup>. Wie das Immunsystem des Empfängers, reagiert hängt dabei maßgeblich von den biochemischen Eigenschaften der Matrix und somit stark vom gewählten Dezellularisierungsverfahren ab<sup>59-61</sup>. Ob es langfristig zu einem produktiven Abbau der Neo-Gallengänge mit konsekutiver Integration in den Empfänger oder zu einer destruktiven Reaktion gekommen wäre, lässt sich anhand der vorhandenen Literatur bei der relativ kurzen Implantationsphase von zwei Wochen leider nicht abschließend

beantworten<sup>62</sup>.

Die Implantation der Neo-Gallengänge zeigt, dass es schwer vorhersehbar ist, zu welcher Reaktion das dezellularisierte Gewebe im Empfänger führen wird. Letztlich ist nur sicher, dass die Dezellularisierung immer auch zu einer Schädigung der EZM führt, sodass das Ziel bei der Wahl des Verfahrens sein sollte, die Zellen und das immunogene Material effektiv zu entfernen und gleichzeitig die Matrix möglichst zu schonen<sup>63</sup>. Diesbezüglich ist uns aufgefallen, dass die Homogenität der Dezellularisierung bisher nicht evaluiert worden ist: wenn Bereiche eines Organs nicht gut perfundiert sind, können dort die Detergentien ihre Wirkung nicht entfalten und es kommt zu einer ungleichmäßigen Dezellularisierung. Man kann diese Bereiche dann ebenfalls von den Zellen befreien, indem man den Perfusionsdruck oder die Dauer der Perfusion erhöht, wobei somit in gut perfundierten Bereichen die Detergentien zu mehr Schaden an der EZM führen können. Deshalb war es unser Ziel im Rahmen der Etablierung der Perfusions-Dezellularisierung diese möglichst homogen ablaufen zu lassen. Hierzu haben wir den Einfluss von oszillierenden Umgebungsdruckschwankungen auf die Homogenität der Dezellularisierung evaluiert. Der Einsatz von oszillierenden Umgebungsdruckschwankungen wurde bereits bei der extrakorporalen Perfusion von Lebern beschrieben und basiert auf dem physiologischen Mechanismus zur Optimierung der Leberperfusion *in situ*<sup>57,64</sup>: die Leber ist im Abdomen unter dem Zwerchfell aufgehängt. Bei der Inspiration folgt sie dem Zwerchfell nach unten und aufgrund der Steigerung des intraabdominellen Druckes wird der Ausstrom von Blut aus der Leber in die Lebervenen und schließlich die untere Hohlvene maximiert. Bei der Expiration hebt sich das Zwerchfell samt Leber, die Pfortader stellt sich auf und der intraabdominelle Druck sinkt, wodurch der Einstrom von Blut über die Pfortader maximiert wird. Wir haben im Rahmen unserer Versuche diesen Mechanismus extrakorporal nachgebaut und den Einfluss der Druckschwankungen auf die Dezellularisierung evaluiert. Interessanterweise konnten wir sowohl bei Ratten- als auch bei Schweinelebern zeigen, dass die Effektivität der Dezellularisierung verbessert wird, wenn diese unter oszillierenden Druckschwankungen durchgeführt wird. Nachgewiesen haben wir dieses mittels makroskopischen und mikroskopischen Beobachtungen sowie mittels Nachweis von geringeren Resten an verbliebener DNA in den Organmatrizes. Welchen Einfluss das Verfahren auf spätere Implantationen hat, muss experimentell evaluiert werden.

Bevor die Implantation von rebesiedelten Organen *in vivo* langfristig möglich wird, muss es gelingen, die Mikroanatomie dieser Organe wieder aufzubauen<sup>65</sup>. Gemeint sind hierbei sowohl die verschiedenen funktionellen Kompartimente eines Organs (z.B. das Gallengangsystem, die ableitenden Harnwege, das Gangsystem des exokrinen Pankreas etc.) als auch die Integrität des Blutgefäßsystems<sup>66</sup>. Die meisten Zellarten benötigen für ein dauerhaftes, funktionelles Überleben Blutgefäße in einem Abstand von ca. 1-3 mm, um eine adäquate Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen sowie den Abtransport von Stoffwechselprodukten zu gewährleisten<sup>67,68</sup>. In diesem Zusammenhang erscheint die Technik der De- und Rezellularisierung sehr vorteilhaft gegenüber anderen Techniken (wie z.B. dem *Organ Printing* oder der Besiedlung von künstlich hergestellten Matrizen), da mit der extrazellulären Matrix zumindest die Proteinstruktur des Organs, inklusive der Blutgefäße sowie der Gangstrukturen erhalten bleibt<sup>12</sup>. Der Kontakt von Blut zu Bestandteilen der EZM fungiert als starker Auslöser der Blutgerinnungskaskade<sup>65,69</sup>. Deshalb verwundert es nicht, dass in Arbeiten über die Implantation von dezellularisierten oder partiell rebesiedelten Organen die Thrombosierung der Transplantate nach Reperfusion mit Blut als Hauptproblem berichtet wird<sup>49</sup>. Es werden daher einerseits verschiedene Strategien entwickelt, um die Aktivierung der Blutgerinnung lokal zu hemmen<sup>70-72</sup> und andererseits wird versucht, im Rahmen der sog. Re-endothelialisierung spezifisch die mono-zelluläre Oberfläche im Inneren der Blutgefäße wiederaufzubauen<sup>73</sup>. Hierzu werden Endothelzellen selektiv über die verschiedenen Gefäßsysteme infundiert und zunächst eine Zeit lang im Organ ruhen gelassen, damit sie anwachsen können (i.e. *engrafting*)<sup>73</sup>. Danach folgt die konstante Perfusion des Organs, damit die Zellen sich im Gefäßsystem ausbreiten und die Gefäßinnenwände komplett auskleiden können<sup>48</sup>. Ott und Kollegen haben gezeigt, dass die Verwendung von unterschiedlichen Perfusionsmedien während beider Phasen entscheidend zu sein scheint<sup>50</sup>.

Ein funktionales Organ bedarf natürlich nicht nur ausgekleidete Blutgefäße, sondern auch funktionelle Zellen, die wieder in den dezellularisierten Parenchymraum gebracht werden müssen. Hierbei ergeben sich diverse Probleme: da im Rahmen der Dezellularisierung zwar die Endothelzellen der Blutgefäße entfernt werden, aber die Basalmembranen der Blutgefäße erhalten bleiben, können Parenchymzellen, die

über das Blutgefäßsystem infundiert werden, in den Gefäßen stecken bleiben und mitunter nur unzureichend in den dezellularisierten Parenchymraum übertreten<sup>49</sup>. Deshalb wurde evaluiert, ob eine direkte Injektion der Zellen mittels Punktion der EZM gegenüber einer Infusion über die dezellularisierten Blutgefäße vorteilhaft sein könnte<sup>74,75</sup>. Die Autoren der beiden Studien kommen hierbei zu unterschiedlichen Ergebnissen, die sich aber teilweise durch die experimentellen Aufbauten erklären lassen: So könnte beispielsweise die Basalmembran durch die divergierenden Dezellularisierungsmethoden unterschiedlich stark zerstört worden sein. Oder die mechanische Kraft bei der Rezellularisierung über die Blutgefäße könnte die Basalmembran beschädigt haben, wenn der Perfusionsdruck hoch genug ist. Außerdem könnte der Zeitpunkt der Analyse von Bedeutung sein: Während Shirakigawa und Kollegen ihre Transplantate nach 24h histologisch aufgearbeitet haben<sup>74</sup>, analysierten Soto-Gutiérrez und Kollegen diese erst nach sieben Tagen Perfusion<sup>75</sup>. Interessanterweise konnten wir zeigen, dass innerhalb von ca. 24h Perfusion Hepatozyten aus dem Gefäßbaum von de- und rezellularisierten Rattenlebern in den Parenchymraum migriert waren, was die unterschiedlichen Beobachtungen der erwähnten Studien erklären könnte.

Da Langerhans'sche Inseln als sog. „Zellorgane“ vielfach größer sind als Hepatozyten<sup>76</sup>, stellt die Rebesiedlung von dezellularisierten Pankreata eine besondere Herausforderung dar. Im Gegensatz zu unseren eigenen Ergebnissen bei der Leber-Dezellularisierung<sup>52</sup> und Ergebnissen von Goh et al.<sup>26</sup>, konnten wir im Rahmen der Etablierung der Rattenpankreas-Dezellularisierung zunächst keine signifikanten Unterschiede bei den drei Perfusionsrouten (i.e. über das arterielle System, über das portalvenöse System oder über den Pankreasgang) finden. Alle drei Wege zeigten ähnlich wirkende histologische Ergebnisse. Um die Intaktheit der drei Perfusionswege nach der Dezellularisierung zu visualisieren, haben wir eine Kontrastmitteldarstellung (i.S. einer Angiographie) der dezellularisierten Pankreata durchgeführt. Interessanterweise zeigten sich hierbei erstmals deutliche Unterschiede: während die Proteinstruktur des arteriellen und portalvenösen Blutgefäßsystems komplett erhalten geblieben war, zeigte die Basalmembran des Pankreasgangsystems viele durchlässige Bereiche mit Kontrastmittelaustritt in den parenchymatösen Raum. Diese Beobachtung wurde im Rahmen der Rezellularisierung mit Inseln bestätigt und ausgenutzt: während Inseln, welche über

das Blutgefäßsystem infundiert worden waren, häufig die Blutgefäße entweder verstopften oder komplett durch das Organ durchflossen, traten Inseln, die über das Gangsystem infundiert wurden, vermehrt in den Parenchymraum über und blieben dort.

Letztlich reicht eine rein histologische Analyse von rebesiedelten Organen aber nicht aus, da sie nur unzureichende Aussagen über die funktionelle Kapazität dieser zulässt. Deshalb haben wir verschiedene Vorrichtungen zur Perfusion und Maturierung der Organe (i.e. Bioreaktoren) entwickelt und experimentell evaluiert. Gemein war all diesen Aufbauten, dass sie aus einer Perfusionskammer, einem mit Medium gefüllten Kreislauf, einer Pumpe sowie Oxygenatoren bestand. Diese Bioreaktoren wurden dann entsprechend der Bedürfnisse der einzelnen Versuchsreihen angepasst und modifiziert. Bei Versuchen mit lebenden Zellen, wurden die Reaktoren in Brutschränken aufgebaut, um bei 37°C arbeiten zu können. Mithilfe dieser Reaktoren wurden parenchymatös rebesiedelte Rattenlebern für bis zu sieben Tage und rebesiedelte Rattenpankreatata für bis zu 24 Stunden perfundiert. Die Analyse des in das Perfusat sezernierten Albumins enthüllte zwei Dinge:

1. Die Hepatozyten in den rebesiedelten und perfundierten Lebern zeigten eine bessere Funktion als Hepatozyten in herkömmlicher, statischer 2D-Kultur.
2. Innerhalb der ersten 24h stieg die Funktion der Zellen leicht an, um dann bis zum Ende der Perfusion stetig abzufallen.

Diese Ergebnisse sind im Einklang mit vergleichbaren Arbeiten<sup>25,75</sup> und führten uns zu der Annahme, dass rebesiedelte Organe vermutlich zeitnah und ohne eine lange Phase der *ex vivo* Maturierung implantiert werden sollten.

Um die Technik in die Klinik translationieren zu können, ist nach der Etablierung im Kleintiermodell der nächste konsequente Schritt, das Hochskalieren auf Lebern klinisch relevanter Größe<sup>77,78</sup>. Da hierzu jedoch große Zellmassen nötig sind, wird dieser Schritt zeit- und kostenintensiv werden und es müssen neue, klinisch-nutzbare Zellquellen erschlossen werden<sup>78</sup>. Eine mögliche Lösung dieses Problems ist die gezielte Differenzierung von induzierten pluripotenten Stammzellen<sup>79</sup>, zumal die dezellularisierte Matrix einen Einfluss auf ihre Differenzierung hat<sup>80,81</sup>. Ein Vorteil dieser Technik wäre, dass die Zellen von einem Patienten, welcher an einem

Organversagen leidet, genutzt werden könnten, um ein dezellularisiertes Organ zu rebesiedeln<sup>82</sup>. Somit wäre die Generierung eines autologen Organs denkbar und der Patient müsste nach einer Transplantation nicht immunsupprimiert werden<sup>83,84</sup>. Dies hätte nicht nur weitreichende Konsequenzen für die Transplantationsmedizin sondern auch für andere Felder, wie z.B. die Onkologie<sup>85,86</sup>: So könnten maligne Tumoren, welche aufgrund ihrer Ausdehnung heute als nicht resektabel gelten, im Gesunden reseziert werden, indem das betroffene Organ chirurgisch komplett entfernt und durch ein *ex vivo* konstruiertes, autologes ersetzt würde. Die Lebertransplantation beim Hepatozellulären Karzinom stellt ein ähnliches, bereits heute klinisch etabliertes Therapieverfahren dar<sup>87</sup>.

Derzeit ist die Technik der De- und Rezellularisierung von parenchymatösen Organen aufgrund der genannten Probleme noch nicht klinisch einsetzbar. Trotzdem macht die klinische Anwendung von dezellularisiertem (und rebesiedeltem) Gewebe bzw. weniger komplexen Organen wie z.B. Speiseröhren, Blutgefäßen, ableitenden Harnwegen, Herzklappen etc. Hoffnung, dass auch die Anwendung von komplexen parenchymatösen Organen zukünftig möglich wird<sup>22</sup>. Der potentielle Nutzen einer solchen Technik wäre immens und rechtfertigt die großen Anstrengungen, die hierzu nötig sind.

#### **4. Zusammenfassung**

Im Rahmen der Dezellularisierung werden Zellen und antigenes Material (z.B. DNA) aus Gewebe und Organen entfernt und nur die extrazelluläre Matrix (EZM) erhalten. Diese EZM ist im Optimalfall nicht immunogen, konserviert die Mikroanatomie des Organs und wirkt positiv auf die Proliferation und Differenzierung von Zellen, auch anderen Ursprungs (allogen oder xenogen). Sie stellt somit eine optimale Biomatrix zur Rebesiedlung und Generierung von funktionellen Organen *ex vivo* dar. So ließe sich die Technik u. A. dazu nutzen, Organmatrizen tierischen Ursprungs mit humanen Zellen zu rebesiedeln und so „autologisierte“ Organe zu generieren, die vom Immunsystem des Empfängers nicht als fremd erkannt würden. Die nebenwirkungsreiche Immunsuppression würde nach erfolgter Transplantation überflüssig und der derzeit vorherrschende sog. Organmangel könnte überwunden werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die o.g. Technik für abdominelles Gewebe (i.e. extrahepatischer Gallengang) bzw. parenchymatöse Organe (i.e. Leber und Pankreas) etabliert. Hierzu wurden verschiedene proprietäre Perfusionsvorrichtungen und Bioreaktoren für Versuche im Kleintier- und Großtiermodell konstruiert und experimentell evaluiert.

Dabei wurde zunächst der Fokus auf die Optimierung der Dezellularisierung im Rattenmodell gesetzt: so wurde gezeigt, dass durch den Einsatz von oszillierenden Umgebungsdruckschwankungen die Homogenität und Effektivität der Dezellularisierung signifikant gesteigert werden kann. Diese oszillierenden Druckschwankungen imitieren die physiologischen intraabdominellen Druckverhältnisse während der Atmung und optimieren so die Mikroperfusion der Leber im *ex vivo* Modell. Diese Beobachtungen wurden anschließend an Lebern klinisch relevanter Größe (Schweinmodell) bestätigt.

Im nächsten Schritt wurde die parenchymatöse Rebesiedlung von dezellularisierten Rattenlebern etabliert. Die rebesiedelten Lebern wurden dabei für bis zu sieben Tage im Bioreaktor perfundiert und zu verschiedenen Zeitpunkten funktionell und histologisch analysiert, um zu verstehen, welche Prozesse nach erfolgter

Rezellularisierung ablaufen. Im Rahmen dieser Versuche wurde beobachtet, dass die Zellen innerhalb der ersten 24 Stunden aus dem dezellularisierten Blutgefäßnetz in den ehemaligen Parenchymraum migrieren. Die Funktion der generierten Organe erreichte innerhalb dieses Zeitraumes ihr Maximum, fiel dann stetig bis zum Ende des Versuches konstant ab, zeigte sich aber im Vergleich zur statischen 2D-Zellkultur signifikant besser.

Mithilfe der o.g. Technik könnte eine rein endokrine Bauchspeicheldrüse generiert werden, die nach erfolgter Implantation etliche bestehende Probleme der verfügbaren Therapien des Diabetes mellitus (i.e. Insulinsubstitution, Pankreas- oder Insel-Transplantation) umgehen könnte. Deshalb wurden die gewonnenen Erkenntnisse auf Rattenpankreatata ausgeweitet: so wurde zunächst die Dezellularisierung über verschiedene Wege (arteriell, venös oder duktal) etabliert und evaluiert. Interessanterweise zeigte sich hierbei, dass die Basalmembran des Gefäßsystems im Gegensatz zu der des Gangsystem erhalten bleibt und somit das Gefäßsystem für die zelluläre Rebesiedlung, gerade mit großen Langerhans-Inseln, nicht geeignet ist. Wurden die Inseln hingegen über das dezellularisierte Gangsystem infundiert, traten sie in den peri-duktalem Raum über, überlebten das Verfahren und zeigten im Rahmen eines Glucose-stimulierten Insulin Sekretionstests eine stabile Funktion im perfundierten *Neo-Pankreas*.

Um die o.g. Techniken translationieren zu können, müssen noch etliche bestehende Probleme (z.B. die Erschließung von geeigneten Zellquellen, der Wiederaufbau der Mikroanatomie und die Re-endothelialisierung der Organe) gelöst werden. Die Auswirkungen auf verschiedene Bereiche der Medizin (z. B. die Transplantationsmedizin, die onkologische Chirurgie, die Regenerative Medizin etc.) wären jedoch immens. Die großen Fortschritte auf dem Gebiet des *tissue engineering* und die bereits erfolgten klinischen Anwendungen von dezellularisierten (und rebesiedelten) Geweben und weniger komplexen Organen (z. B. Speiseröhren, ableitende Harnwege, Blutgefäße) lässt auch den klinischen Gebrauch von rebesiedelten parenchymatösen Organen zukünftig möglich erscheinen. Die großen Anstrengungen die hierzu noch notwendig sind, wirken in Relation zum potentiellen Nutzen absolut lohnenswert.

## 5. Literaturangaben

1. Langer, R. & Vacanti, J.P. Tissue engineering. *Science* **260**, 920-926 (1993).
2. Langer, R. & Vacanti, J. Advances in tissue engineering. *Journal of pediatric surgery* **51**, 8-12 (2016).
3. Caddeo, S., Boffito, M. & Sartori, S. Tissue Engineering Approaches in the Design of Healthy and Pathological In Vitro Tissue Models. *Frontiers in bioengineering and biotechnology* **5**, 40 (2017).
4. Jang, J., Park, J.Y., Gao, G. & Cho, D.W. Biomaterials-based 3D cell printing for next-generation therapeutics and diagnostics. *Biomaterials* **156**, 88-106 (2017).
5. Orlando, G., Soker, S. & Stratta, R.J. Organ bioengineering and regeneration as the new Holy Grail for organ transplantation. *Annals of surgery* **258**, 221-232 (2013).
6. Yagi, H., Soto-Gutierrez, A. & Kitagawa, Y. Whole-organ re-engineering: a regenerative medicine approach to digestive organ replacement. *Surgery today* **43**, 587-594 (2013).
7. Gilpin, A. & Yang, Y. Decellularization Strategies for Regenerative Medicine: From Processing Techniques to Applications. *BioMed research international* **2017**, 9831534 (2017).
8. Wang, Y., *et al.* Method for perfusion decellularization of porcine whole liver and kidney for use as a scaffold for clinical-scale bioengineering engrafts. *Xenotransplantation* **22**, 48-61 (2015).
9. Hynes, R.O. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science (New York, N.Y.)* **326**, 1216-1219 (2009).
10. Nakayama, K.H., Batchelder, C.A., Lee, C.I. & Tarantal, A.F. Decellularized rhesus monkey kidney as a three-dimensional scaffold for renal tissue engineering. *Tissue Eng Part A* **16**, 2207-2216 (2010).
11. Faulk, D.M., Wildemann, J.D. & Badylak, S.F. Decellularization and cell seeding of whole liver biologic scaffolds composed of extracellular matrix. *J Clin Exp Hepatol* **5**, 69-80 (2015).
12. Rana, D., Zreiqat, H., Benkirane-Jessel, N., Ramakrishna, S. & Ramalingam, M. Development of decellularized scaffolds for stem cell-driven tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med* **11**, 942-965 (2017).
13. Faulk, D.M., Johnson, S.A., Zhang, L. & Badylak, S.F. Role of the extracellular matrix in whole organ engineering. *J Cell Physiol* **229**, 984-989 (2014).
14. Crapo, P.M., Gilbert, T.W. & Badylak, S.F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials* **32**, 3233-3243 (2011).
15. Keane, T.J., Swinehart, I.T. & Badylak, S.F. Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance. *Methods (San Diego, Calif.)* **84**, 25-34 (2015).
16. Morris, A.H., Stamer, D.K. & Kyriakides, T.R. The host response to naturally-derived extracellular matrix biomaterials. *Seminars in immunology* **29**, 72-91 (2017).
17. Song, J.J. & Ott, H.C. Organ engineering based on decellularized matrix scaffolds. *Trends in molecular medicine* **17**, 424-432 (2011).
18. Guyette, J.P., *et al.* Perfusion decellularization of whole organs. *Nature protocols* **9**, 1451-1468 (2014).
19. Frisch, S.M. & Screaton, R.A. Anoikis mechanisms. *Current opinion in cell biology* **13**, 555-562 (2001).

20. Hussey, G.S., Keane, T.J. & Badylak, S.F. The extracellular matrix of the gastrointestinal tract: a regenerative medicine platform. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* **14**, 540-552 (2017).
21. Parmaksiz, M., Dogan, A., Odabas, S., Elçin, A.E. & Elçin, Y.M. Clinical applications of decellularized extracellular matrices for tissue engineering and regenerative medicine. *Biomedical materials (Bristol, England)* **11**, 22003 (2016).
22. Ott, H.C., *et al.* Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nat Med* **14**, 213-221 (2008).
23. Ott, H.C., *et al.* Regeneration and orthotopic transplantation of a bioartificial lung. *Nat Med* **16**, 927-933 (2010).
24. Uygun, B.E., *et al.* Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix. *Nat Med* **16**, 814-820 (2010).
25. Struecker, B., *et al.* Porcine liver decellularization under oscillating pressure conditions: a technical refinement to improve the homogeneity of the decellularization process. *Tissue engineering. Part C, Methods* **21**, 303-313 (2015).
26. Goh, S.K., *et al.* Perfusion-decellularized pancreas as a natural 3D scaffold for pancreatic tissue and whole organ engineering. *Biomaterials* **34**, 6760-6772 (2013).
27. Song, J.J., *et al.* Regeneration and experimental orthotopic transplantation of a bioengineered kidney. *Nat Med* **19**, 646-651 (2013).
28. Xiang, J.-X.X., *et al.* Liver regeneration using decellularized splenic scaffold: a novel approach in tissue engineering. *Hepatobiliary & pancreatic diseases international : HBPD INT* **14**, 502-508 (2015).
29. Faulk, D.M., *et al.* The effect of detergents on the basement membrane complex of a biologic scaffold material. *Acta Biomater* **10**, 183-193 (2014).
30. Aamodt, J.M. & Grainger, D.W. Extracellular matrix-based biomaterial scaffolds and the host response. *Biomaterials* **86**, 68-82 (2016).
31. Keane, T.J. & Badylak, S.F. The host response to allogeneic and xenogeneic biological scaffold materials. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* (2014).
32. Badylak, S.F. Xenogeneic extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Transplant immunology* **12**, 367-377 (2004).
33. Kaweckki, M., *et al.* A review of decellurization methods caused by an urgent need for quality control of cell-free extracellular matrix' scaffolds and their role in regenerative medicine. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* (2017).
34. Struecker, B., Raschzok, N. & Sauer, I.M. Liver support strategies: cutting-edge technologies. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **11**, 166-176 (2014).
35. Wang, X., *et al.* Decellularized liver scaffolds effectively support the proliferation and differentiation of mouse fetal hepatic progenitors. *J Biomed Mater Res A* **102**, 1017-1025 (2014).
36. Baptista, P.M., *et al.* The use of whole organ decellularization for the generation of a vascularized liver organoid. *Hepatology* (2010).
37. Shirakigawa, N., Takei, T. & Ijima, H. Base structure consisting of an endothelialized vascular-tree network and hepatocytes for whole liver engineering. *Journal of bioscience and bioengineering* **116**, 740-745 (2013).
38. Barakat, O., *et al.* Use of decellularized porcine liver for engineering humanized liver organ. *J Surg Res* **173**, e11-25 (2012).

39. Scarritt, M.E., Pashos, N.C. & Bunnell, B.A. A review of cellularization strategies for tissue engineering of whole organs. *Frontiers in bioengineering and biotechnology* **3**, 43 (2015).
40. Welman, T., Michel, S., Segaren, N. & Shanmugarajah, K. Bioengineering for Organ Transplantation: Progress and Challenges. *Bioengineered* **6**, 257-261 (2015).
41. Wang, Y., *et al.* Recent Advances in Decellularization and Recellularization for Tissue-Engineered Liver Grafts. *Cells, tissues, organs* **204**, 125-136 (2017).
42. Kadota, Y., *et al.* Mesenchymal stem cells support hepatocyte function in engineered liver grafts. *Organogenesis* **10**, 268-277 (2014).
43. Butter, A., *et al.* Evolution of graft morphology and function after recellularization of decellularized rat livers. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* (2016).
44. Yagi, H., *et al.* Human-Scale Whole-Organ Bioengineering for Liver Transplantation: a Regenerative Medicine Approach. *Cell transplantation* (2012).
45. Zheng, W., *et al.* Fluid flow stress induced contraction and re-spread of mesenchymal stem cells: a microfluidic study. *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro* **4**, 1102-1111 (2012).
46. Moser, P.T. & Ott, H.C. Recellularization of organs: what is the future for solid organ transplantation? *Current opinion in organ transplantation* **19**, 603-609 (2014).
47. Tapias, L.F. & Ott, H.C. Decellularized scaffolds as a platform for bioengineered organs. *Current opinion in organ transplantation* **19**, 145-152 (2014).
48. Robertson, M.J., Dries-Devlin, J.L., Kren, S.M., Burchfield, J.S. & Taylor, D.A. Optimizing recellularization of whole decellularized heart extracellular matrix. *PloS one* **9**(2014).
49. Uygun, B.E., Yarmush, M.L. & Uygun, K. Application of whole-organ tissue engineering in hepatology. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* **9**, 738-744 (2012).
50. Ren, X., *et al.* Ex vivo non-invasive assessment of cell viability and proliferation in bio-engineered whole organ constructs. *Biomaterials* **52**, 103-112 (2015).
51. Struecker, B., *et al.* Implantation of a Tissue-Engineered Neo-Bile Duct in Domestic Pigs. *European surgical research. Europäische chirurgische Forschung. Recherches chirurgicales europeennes* **56**, 61-75 (2016).
52. Struecker, B., *et al.* Improved rat liver decellularization by arterial perfusion under oscillating pressure conditions. *J Tissue Eng Regen Med* (2014).
53. Kluge, M., *et al.* Human Hepatocyte Isolation: Does Portal Vein Embolization Affect the Outcome? *Tissue engineering. Part C, Methods* **22**, 38-48 (2016).
54. Napierala, H., *et al.* Engineering an endocrine Neo-Pancreas by repopulation of a decellularized rat pancreas with islets of Langerhans. *Scientific reports* **7**, 41777 (2017).
55. Olausson, M., *et al.* Transplantation of an allogeneic vein bioengineered with autologous stem cells: a proof-of-concept study. *Lancet* (2012).
56. Neuhaus, P. & Blumhardt, G. Extracorporeal liver perfusion: applications of an improved model for experimental studies of the liver. *The International journal of artificial organs* **16**, 729-739 (1993).

57. Dziki, J.L., *et al.* Solubilized extracellular matrix bioscaffolds derived from diverse source tissues differentially influence macrophage phenotype. *Journal of biomedical materials research. Part A* **105**, 138-147 (2017).
58. Bharat, A. & Mohanakumar, T. Immune Responses to Tissue-Restricted Nonmajor Histocompatibility Complex Antigens in Allograft Rejection. *Journal of immunology research* **2017**, 6312514 (2017).
59. Leifer, C.A. Dendritic cells in host response to biologic scaffolds. *Seminars in immunology* **29**, 41-48 (2017).
60. Galili, U. Avoiding detrimental human immune response against Mammalian extracellular matrix implants. *Tissue engineering. Part B, Reviews* **21**, 231-241 (2015).
61. Cravedi, P., *et al.* Regenerative immunology: the immunological reaction to biomaterials. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation* **30**, 1199-1208 (2017).
62. Li, Q., *et al.* Proteomic analysis of naturally-sourced biological scaffolds. *Biomaterials* **75**, 37-46 (2016).
63. Schon, M.R., *et al.* Liver transplantation after organ preservation with normothermic extracorporeal perfusion. *Ann Surg* **233**, 114-123 (2001).
64. Yesmin, S., Paget, M.B., Murray, H.E. & Downing, R. Bio-scaffolds in organ-regeneration: Clinical potential and current challenges. *Current research in translational medicine* **65**, 103-113 (2017).
65. Mao, A.S. & Mooney, D.J. Regenerative medicine: Current therapies and future directions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**, 14452-14459 (2015).
66. Folkman, J. & Hochberg, M. Self-regulation of growth in three dimensions. *The Journal of experimental medicine* **138**, 745-753 (1973).
67. Lovett, M., Lee, K., Edwards, A. & Kaplan, D.L. Vascularization Strategies for Tissue Engineering. *Tissue Engineering Part B: Reviews* **15**, 353-370 (2009).
68. Orlando, G., *et al.* Production and Implantation of Renal Extracellular Matrix Scaffolds From Porcine Kidneys as a Platform for Renal Bioengineering Investigations. *Ann Surg* **256**, 363-370 (2012).
69. Hussein, K.H., Park, K.M., Kang, K.S. & Woo, H.M. Heparin-gelatin mixture improves vascular reconstruction efficiency and hepatic function in bioengineered livers. *Acta Biomater* **38**, 82-93 (2016).
70. Bao, J., *et al.* Hemocompatibility improvement of perfusion-decellularized clinical-scale liver scaffold through heparin immobilization. *Scientific reports* **5**, 10756 (2015).
71. Bruinsma, B.G., *et al.* Layer-by-layer heparinization of decellularized liver matrices to reduce thrombogenicity of tissue engineered grafts. *Journal of clinical and translational research* **1**(2015).
72. Baptista, P.M., Vyas, D., Moran, E., Wang, Z. & Soker, S. Human liver bioengineering using a whole liver decellularized bioscaffold. *Methods Mol Biol* **1001**, 289-298 (2013).
73. Shirakigawa, N., Ijima, H. & Takei, T. Decellularized liver as a practical scaffold with a vascular network template for liver tissue engineering. *J Biosci Bioeng* (2012).
74. Soto-Gutierrez, A., *et al.* A whole-organ regenerative medicine approach for liver replacement. *Tissue engineering. Part C, Methods* **17**, 677-686 (2011).
75. von Mach, M.A., *et al.* Size of pancreatic islets of Langerhans: a key parameter for viability after cryopreservation. *Acta diabetologica* **40**, 123-129 (2003).

76. Versteegen, M., *et al.* Decellularization of whole human liver grafts using controlled perfusion for transplantable organ bioscaffolds. *Stem cells and development* (2017).
77. Mazza, G., *et al.* Decellularized human liver as a natural 3D-scaffold for liver bioengineering and transplantation. *Scientific reports* **5**, 13079 (2015).
78. Collin de l'Hortet, A., *et al.* Liver-Regenerative Transplantation: Regrow and Reset. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* **16**, 1688-1696 (2016).
79. Park, K.-M.M., *et al.* Decellularized Liver Extracellular Matrix as Promising Tools for Transplantable Bioengineered Liver Promotes Hepatic Lineage Commitments of Induced Pluripotent Stem Cells. *Tissue engineering. Part A* **22**, 449-460 (2016).
80. Hassanein, W., *et al.* Recellularization via the bile duct supports functional allogenic and xenogenic cell growth on a decellularized rat liver scaffold. *Organogenesis* **13**, 16-27 (2017).
81. Stoltz, J.F.F., Zhang, L., Ye, J.S. & De Isla, N. Organ reconstruction: Dream or reality for the future. *Bio-medical materials and engineering* **28**(2017).
82. Wagner, D.E., *et al.* Can stem cells be used to generate new lungs? Ex vivo lung bioengineering with decellularized whole lung scaffolds. *Respirology* **18**, 895-911 (2013).
83. Orlando, G. Immunosuppression-free transplantation reconsidered from a regenerative medicine perspective. *Expert review of clinical immunology* **8**, 179-187 (2012).
84. De Coppi, P. & Grikscheit, T.C. Regenerative medicine: is this the biggest change in surgery? *Seminars in pediatric surgery* **23**, 103-105 (2014).
85. Orlando, G., Soker, S., Stratta, R.J. & Atala, A. Will regenerative medicine replace transplantation? *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* **3**(2013).
86. El-Serag, H.B. Hepatocellular Carcinoma. *The New England Journal of Medicine* **365**, 1118-1127 (2011).

## Danksagung

Mein außerordentlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Johann Pratschke, Direktor der Chirurgischen Klinik, Campus Charité Mitte | Campus Virchow-Klinikum, Charité – Universitätsmedizin Berlin, für seine großzügige Unterstützung meiner wissenschaftlichen und klinischen Karriere und für die Bereitstellung optimaler Arbeitsbedingungen. Ebenfalls danken möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Peter Neuhaus für dessen Förderung zu Beginn meiner wissenschaftlichen Karriere.

Mein besonderer und ganz außerordentlicher Dank gilt meinem wissenschaftlichen Mentor Herrn Prof. Dr. med. Igor M. Sauer, der maßgeblich mein wissenschaftliches Denken geschult und geformt hat. Die Zusammenarbeit mit Prof. Sauer war zu jedem Zeitpunkt geprägt von großem Vertrauen und Sympathie und die inspirierende Mischung aus Freiheit und Führung, die ich in seiner Arbeitsgruppe erfahren habe, machte die vorliegende Arbeit erst möglich. Überdies danke ich Frau Prof. Dr. med. Duska Dragun und ihrem gesamten Team für die Förderung und das Mentoring im Rahmen des Clinician Scientist Programms.

Ganz besonders danken möchte ich außerdem Herrn Dr. med. Karl Herbert Hillebrandt, auf den ich mich stets verlassen konnte und der mit unglaublichem Einsatz entscheidend zum Gelingen der Projekte beigetragen hat. Dies gilt ebenso für Herrn Peter Tang, Frau Dr. rer. med. Anja Reutzel-Selke, Herrn Hendrik Napierala und Herrn Nicolai Seiffert, denen ich für die wunderbare Zusammenarbeit danke.

Den Herren PD Dr. med. Andreas Andreou und PD Dr. med. Nathanael Raschzok sowie Frau Dr. med. Rosa Schmuck danke ich für die langjährige, freundschaftliche und produktive Zusammenarbeit in Klinik und Forschung.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dr. med. Antje Butter, Herrn Nils Haep, Frau Hannah Everwien, Frau Madeleine Tintemann, Frau Dr. med. Eva Teegen, Herrn Dietrich Polenz, Herrn Steffen Lippert, Herrn Robert Voitl, Frau Nora Kähler, Herrn Dr. med. Philipp Pickerodt, allen aktiven und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Sauer sowie allen Co-Autor(inn)en.

Meiner Frau Dr. med. Katharina Strücker danke ich für die unglaubliche Geduld und Energie, die sie aufgebracht hat, um mir den Rücken frei zu halten. Meiner Familie sowie meinen Freunden Arne Göbber und David Krüger danke ich für die Unterstützung und die Ablenkung von der Wissenschaft. Dem AS Pirin (Schwarz-Weiß wie Schnee) danke ich immer noch für alles.

## 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