

Aus der Klinik für Chirurgie –  
Campus Charité Mitte | Campus Virchow-Klinikum  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Konstruktion eines *Neo-Pankreas* mittels Dezellularisierung  
und Rezellularisierung

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Hannah Katharina Everwien

aus Hannover

Datum der Promotion: 04.03.2022

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>ABSTRACT</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>EINFÜHRUNG</b>	<b>5</b>
<b>3</b>	<b>METHODEN</b>	<b>7</b>
3.1	Versuchstiere	7
3.2	Explantation der Rattenlebern	7
3.3	Dezellularisierungsprotokoll	8
3.4	Isolierung von MSC und Zellkultur	8
3.5	Entwicklung eines geeigneten Kreislaufs	9
3.6	Re-Endothelialisierung und Evaluation	11
3.7	Isolierung von und Rebesiedelung mit Langerhans-Inseln	12
3.8	Evaluation der Funktion der Langerhans-Inseln mittels GSIS	13
3.9	Histologische Aufarbeitung des Neo-Pankreas	14
3.10	Statistik	15
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>15</b>
4.1	Evaluation der Re-Endothelialisierung	15
4.2	Evaluation der Isolierung und Funktion der Langerhans-Inseln	16
4.3	Histologische Aufarbeitung des Neo-Pankreas	17
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>19</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>23</b>
<b>7</b>	<b>EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG UND ANTEILSERKLÄRUNG</b>	<b>29</b>
7.1	Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation als Top-Journal im Rahmen des Promotionsverfahren	30
<b>8</b>	<b>AUSZUG AUS DER JOURNAL SUMMARY LIST (ISI Web of KnowledgeSM)</b>	<b>31</b>
<b>10</b>	<b>AUSGEWÄHLTE PUBLIKATION</b>	<b>32</b>
<b>11</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>46</b>
<b>12</b>	<b>KOMPLETTE PUBLIKATIONS LISTE</b>	<b>48</b>
<b>13</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>49</b>

# 1. ABSTRACT

„Die auf Langerhans-Inseln basierende Rezellularisierung einer dezellularisierten Rattenleber könnte die Grundlage für ein transplantables *Neo-Pankreas* darstellen. Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Etablierung der erforderlichen Protokolle, der Evaluierung der geschaffenen Organstruktur sowie der Funktionsanalyse der Langerhans-Inseln *ex vivo*.

Nach der flussgesteuerten Dezellularisierung von Rattenlebern wurden diese mit Endothelzellen und mesenchymalen Stromazellen der Ratte rebesiedelt, für 8 Tage in einer Perfusionskammer kultiviert und schließlich am 9. Tag mit Langerhans-Inseln der Ratte rebesiedelt. Die Integrität und Funktionalität der Re-Endothelialisierung wurde mittels histologischer Färbungen und der Perfusion mit FITC-Dextran validiert. Die Funktionalität der Langerhans-Inseln wurde an Tag 10 und 12 mit Hilfe eines Glukose-induzierten Insulinsekretionstests überprüft.

Mittels Blutgasanalyse erhobene Parameter bestätigten die Stabilität der Perfusionskultur. Die histologische Auswertung zeigte, dass Endothelzellen innerhalb der intakten Gefäßstruktur ein *Monolayer* ausbildeten. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen bestätigten diese Ergebnisse. Die Langerhans-Inseln, die über den Gallengang infundiert wurden, konnten in der histologischen Auswertung nachgewiesen werden. Eine adäquate Insulinsekretion nach Glukosestimulation sowohl in der eintägigen als auch nach dreitägiger Kultur bestätigte die erhaltene Viabilität und Funktionalität.

Diese Arbeit liefert somit den Nachweis für eine erfolgreiche Kultivierung von Langerhans-Inseln in einer dezellularisierten Rattenleber. Im Rahmen des Projekts implementierten wir die Re-Endothelialisierung des Gefäßsystems als notwendige Voraussetzung für Implantation und Vollblutperfusion. Diese Techniken können als Plattform zu Generierung eines implantierbaren und funktionalen, endokrinen *Neo-Pankreas* gesehen werden.“ (Übersetzung aus [1]).

“Islet-based recellularization of decellularized, repurposed rat livers may form a transplantable *Neo-Pancreas*. The aim of this study is the establishment of the necessary protocols, the evaluation of the organ structure and the analysis of the islet functionality *ex vivo*.

After perfusion-based decellularization of rat livers, matrices were repopulated with endothelial cells and mesenchymal stromal cells, incubated for 8 days in a perfusion chamber and finally repopulated on day 9 with intact rodent islets. Integrity and quality of re-endothelialization was assessed by histology and FITC-dextran perfusion assay. Functionality of the islets of Langerhans was determined on day 10 and day 12 via glucose stimulated insulin secretion.

Blood gas analysis variables confirmed the stability of the perfusion cultivation. Histological staining showed that cells formed a monolayer inside the intact vascular structure. These findings were confirmed by electron microscopy. Islets infused via the bile duct could histologically be found in the parenchymal space. Adequate insulin secretion after glucose stimulation after 1-day and 3-day cultivation verified islet viability and functionality after the repopulation process.

We provide the first proof-of-concept for the functionality of islets of Langerhans engrafted in a decellularized rat liver. Furthermore, a re-endothelialization step was implemented to provide implantability. This technique can serve as a bioengineered platform to generate implantable and functional endocrine *Neo-Pancreases*.” [1]

## 2. EINFÜHRUNG

Die Technik der Dezellularisierung und Rezellularisierung ist eine Methode des sogenannten *Tissue Engineering*. Darunter versteht man die Entwicklung von „biologischen Ersatzstrukturen, die die Funktion von Gewebe ersetzen, aufrechterhalten oder verbessern sollen“ [2]. Dezellularisierung bedeutet, dass alles zelluläre Material eines Organs oder Gewebe durch unterschiedliche Techniken entfernt wird [3,4]. Übrig bleibt die extrazelluläre Matrix (EZM). Also das aus verschiedenen Proteinen bestehende komplexe Gerüst, welches dem jeweiligen Organ seine einzigartige Struktur verleiht [5]. Dieses Gerüst kann nun im Rahmen der Rezellularisierung mit Zellen unterschiedlichen Ursprungs rebesiedelt werden. Dies können primäre adulte Zellen oder Stammzellen eines Patienten sein, welche die Generierung eines patientenspezifischen, individuellen Organs ermöglichen. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass es auf diesem Wege möglich ist, u.a. funktionsfähige Lungen und Nieren im Labor herzustellen [6,7]. Die auf diese Weise gezüchteten Organen könnten zukünftig als Ersatz für solide postmortale und lebende Organspenden dienen.

Eine Alternative für die solide Organtransplantation ist dringend nötig. In Deutschland standen 2019 rund 7100 Patient\*innen auf der Warteliste für eine Nierentransplantation. Im selben Jahr wurden jedoch nur 2132 Nieren transplantiert und 343 Patient\*innen verstarben, während sie auf der Warteliste standen. Die chronische Nierenkrankheit ist der häufigste Grund für eine Listung zur Nierentransplantation [8]. Die häufigste Ursache für ein chronisches Nierenversagen in Deutschland ist hierbei die diabetische Nephropathie [9]. Trotz adäquater Substitution von Insulin leiden Patient\*innen mit Diabetes Mellitus also an Spätkomplikationen, zu denen neben der Nephropathie u.a. auch die diabetische Retinopathie oder Neuropathie zählen. Die einzige alternative Therapie zur exogenen Substitution von Insulin besteht in der Pankreas- bzw. simultanen Pankreas-Nierentransplantation oder aber der Transplantation von Langerhans-Inseln. Hierfür kommen jedoch nur bestimmte Patient\*innen – in der Regel in Kombination mit einer Nierentransplantation – in Frage. Der Eingriff erfordert die, mit unerwünschten Nebenwirkungen einhergehende, lebenslange Einnahme von Immunsuppressiva und ist aus chirurgischer Sicht nicht risikoarm (z.B. Entwicklung einer Transplantatpankreatitis) [10]. In ausgewählten Zentren wird als Alternative zur Pankreastransplantation die Transplantation von Langerhans-Inseln in die Pfortader durchgeführt [11]. Die Ergebnisse sind vielversprechend und diese Patient\*innen können so für einen gewissen Zeitraum insulinunabhängig werden. Jedoch müssen für

eine Transplantation, in Zeiten bestehenden Spenderorganmangels, Inseln aus mehreren Spenderorganen gewonnen werden. Zudem kommt es häufig zum Verlust von 50-60% der Langerhans-Inseln in der frühen Phase nach Transplantation [12–14]. In solchen Fällen müssen sich die Patient\*innen bei Funktionsversagen der transplantierten Inseln einer erneuten Transplantation unterziehen [11]. Die ohnehin schon knapp begrenzte Ressource der transplantablen Organe wird also weiterhin minimiert. Alternativen zur definitiven kurativen Behandlung von Patient\*innen mit Diabetes Mellitus werden also dringend benötigt.

Das *tissue engineering* stellt hierbei perspektivisch eine attraktive Alternative dar. Organe können bedarfsgerecht und patientenspezifisch hergestellt werden und beim Verwenden von empfängereigenen Zellen wie bspw. induzierten pluripotenten Stammzellen entfällt im Idealfall die Notwendigkeit einer immunsuppressiven Therapie [15].

Das Ziel dieser Arbeit war die Konstruktion eines *Neo-Pankreas* im Tiermodell, also eines Organs, welches perspektivisch in der Lage ist, den Blutzuckerspiegel physiologisch zu regulieren. Als Matrix wurde eine dezellularisierte Rattenleber gewählt. Folgende Aspekte waren dabei von wesentlicher Bedeutung:

Die Größe einer Rattenleber ist ideal, um auch später im Menschen eine adäquate Anzahl an Langerhans-Inseln zu beherbergen. Die Leber bietet neben dem arteriellen, venösen und portalvenösen System noch den Gallengang, der einen eleganten Zugang zum parenchymatösen Kompartiment während der Rezellularisierung gewährleistet. Auch im dezellularisierten Zustand weist sie eine hohe Stabilität auf und es besteht aufgrund desselben embryonalen Ursprungs eine ontogenetisch enge Beziehung zum Pankreas [16]. Des Weiteren muss eine ausreichende Vaskularisierung und Re-Endothelialisierung der Matrix gewährleistet sein, da Langerhans-Inseln einen hohen Sauerstoffbedarf aufweisen und freies Kollagen bei einer Implantation zur Aktivierung der Gerinnung führen würde [17–19]. Hierbei wurden neben Endothelzellen auch mesenchymale Stromazellen (MSC) zur Unterstützung verwendet, da in mehreren Studien gezeigt werden konnte, dass sie den Prozess der Revaskularisierung unterstützen und verstärken [20,21]. Zusätzlich war die Testung der Funktion der Langerhans-Inseln *ex vivo* in einem dynamischen Geschehen von essentieller Bedeutung, insbesondere im Hinblick auf deren zentrale Bedeutung für die physiologische Regulation des Blutzuckerspiegels.

## 3. METHODEN

### 3.1 Versuchstiere

Alle notwendigen Eingriffe an Versuchstieren wurden nach den Richtlinien und Gesetzen des Landesamt für Gesundheit und Soziales, Berlin, Deutschland durchgeführt (Reg. No. T 0139/13, T 0301/17, O 0365/11 und L 0013/18). Es wurden Lebern von 25 männlichen Wistar Ratten (FEM, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Berlin und Janvier, Le Genest-Saint-Isle, Frankreich), mit einem Gewicht zwischen 290 g und 560 g explantiert - 23 von diesen Lebern wurden anschließend dezellularisiert. Für die Isolierung der Langerhans-Inseln wurden 36 weibliche Wistar Ratten (FEM, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Deutschland und Janvier, Le Genest-Saint-Isle, Frankreich), mit einem Gewicht von 245 - 430 g, verwendet.

### 3.2 Explantation der Rattenlebern

Die Einleitung der Narkose erfolgte mit Isofluran und anschließender subkutaner Injektion von Metamizol (100 mg/kg Tiergewicht) und Ketamin (12 mg/kg Tiergewicht). Nach Rasur des Abdomens wurden die Versuchstiere unter kontinuierlicher Isofluran-Zufuhr unter dem Mikroskop positioniert. Vor Eröffnung des Abdomens mittels U-förmiger Laparotomie erfolgte das Setzen eines Schmerzreizes zur Überprüfung der ausreichenden Tiefe der Narkose zwischen den Hinterpfoten mittels chirurgischer Pinzette. Zunächst erfolgte die Mobilisierung der Leber mittels feuchter Wattestäbchen und des Durchtrennens der ligamentären Strukturen. Nach Fixierung des Duodenums und Auslagern des Viszeralpakets erfolgte die Kanülierung des Gallengangs (GG) mittels eines 22G Katheters (Vasofix Braunüle, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) oder eines 24G Katheters (BD Neoflon, Becton Dickinson Corporation, Franklin Lakes, NJ, USA). Die korrekte Lage konnte anhand des Abflusses von Galle überprüft werden. Anschließend wurden die Vena Cava und die Aorta abdominalis präpariert. In die V. cava inferior (VCI) wurden daraufhin 500 IE Heparin (Rotexmedica, Trittau, Deutschland), gelöst in 1 ml Ringer Laktat Lösung (B. Braun) injiziert. Nach ca. zwei Minuten erfolgte die Durchtrennung der Aorta zum Ausbluten des Versuchstiers. Das Diaphragma wurde eröffnet und die A. thoracica geklemmt, danach erfolgte die Kanülierung der Pfortader (PA) mit einer 16G Flexüle (B. Braun) und die anschließende Spülung der Leber mit 20 ml Ringer Laktat Lösung. Abschließend wurde noch die VCI mit einer 16G Venenverweilkanüle (B. Braun) kanüliert und die Leber von den restlichen

Strukturen befreit und aus dem Situs entfernt. Die entnommene Leber wurde nun bei -80°C in Ringer Laktat Lösung (B. Braun) zwischengelagert.

### 3.3 Dezellularisierungsprotokoll

Die Dezellularisierung erfolgte nach dem in der Arbeitsgruppe etablierten Protokoll von *Butter et al.* [22]. Nachdem Auftauen der Leber über Nacht bei 4°C wurden zunächst die zwei großen Leberlappen mit einem 6-0 Seidefaden (Resorba Medical GmbH, Nürnberg, Deutschland) doppelt ligiert. Anschließend erfolgte die Positionierung eines Drei-Wegehahns auf der Pfortaderkanüle und der Anschluss an den Dezellularisierungskreislauf. Zunächst wurde die Perfusion mit 1x PBS (*Phosphate buffered saline*) für 10 min bei einer Förderrate von 5 ml/min durchgeführt. Danach wurde die Leber mit 1% Triton X-100 (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) für 90 min und mit 1% SDS (*sodium dodecyl sulfate*, Carl Roth) für weitere 90 min bei 5 ml/min perfundiert. Um zusätzlich den DNA-Gehalt zu senken, erfolgte eine Perfusion mit 50 U/ml DNase (F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz) über 30 min bei ebenfalls 5 ml/min. Abschließend wurde die Leber über Nacht mit 1x PBS bei einer Förderrate von 1 ml/min perfundiert.

### 3.4 Isolierung von MSC und Zellkultur

Die MSC wurden aus dem Femur, der für die zuvor genannten Eingriffe genutzten Wistar-Ratten, isoliert. Nach Abtrennen der umliegenden Strukturen wurde das Femur zur Sterilisation in 70%igem Ethanol (Carl Roth) gelagert. Das Femur wurde dann unter der Sterilbank aufgebrochen und das Knochenmark mit RPMI 1640 Medium (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), versetzt mit 20% fetalem Kalbsserum (FCS; Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland) und 1% Penicillin-Streptomycin (PenStrep; Gibco), ausgespült. Die so gewonnene Suspension wurde nun bei 37°C (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) in einer T75 Zellkulturflasche (Sarstedt AG& Co. KG, Nümbrecht, Deutschland) inkubiert. Nach 3 Tagen wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und das Medium gewechselt. Bei einer Konfluenz von 100% wurden die Zellen bei -150°C bis zur erneuten Verwendung aufbewahrt.

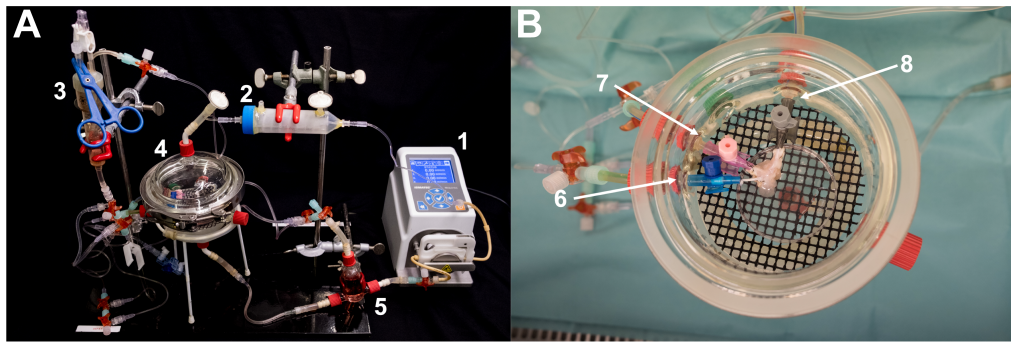
Aortale Endothelzellen der Ratte (rat aortic endothelial cell, RAEC, von Prof. M. Seifert, Medizinische Immunologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin freundlicherweise zur Verfügung gestellt) wurden in einem 50/50 Mix aus EGM-2 (Endothelial Cell Growth Medium-2 BulletKit) und EBM-2 (Endothelial Cell Basal Medium 2) kultiviert (1/1



[vol/vol]; PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland) mit 15% FCS und 1% PenStrep kultiviert und expandiert. Für die Versuche wurden Zellen der Passage 14 - 16 benutzt.

### 3.5 Entwicklung eines geeigneten Kreislaufs

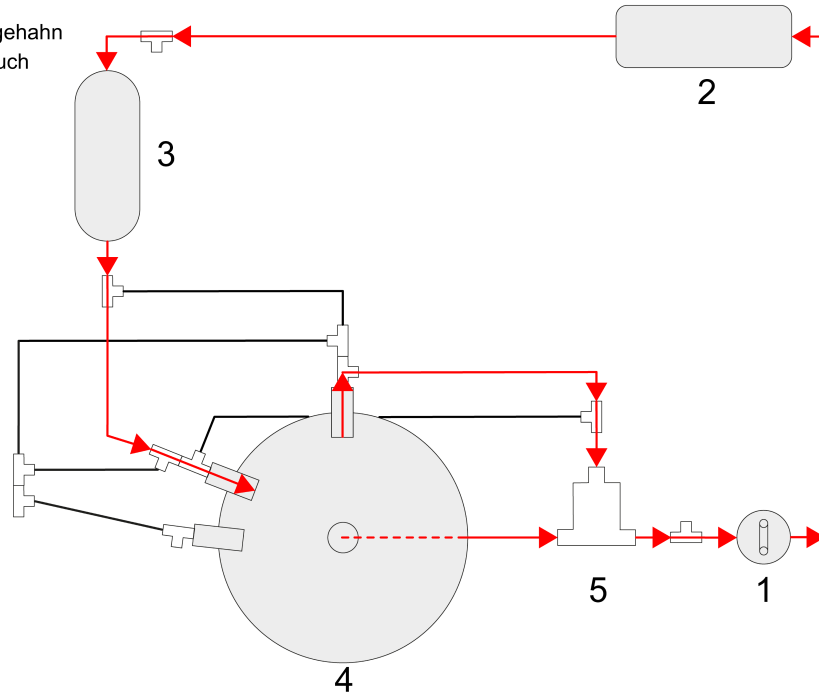
Der Perfusionskreislauf zur extrakorporalen Leberperfusion von *Gassner et al.* [23] wurde für das eigene Projekt so angepasst, dass nach Gabe der Zellen das *Neo-Organ* kontinuierlich perfundiert werden konnte. Dafür wurden die kanülierten Gefäße (PA, VCI und GG) über Drei-Wegehähne an den Perfusionskreislauf angeschlossen (**Abb. 1**). Das Anschließen aller Gefäße ermöglichte zum einen die Gabe von Zellen über PA, VCI und GG und zum anderen die kontinuierliche Perfusion mit Nährmedium entweder über die Pfortader oder über die VCI. Medium, welches die Rattenleber nicht über die Gefäße verließ, wurde am Boden des Reaktors aufgefangen und über das Reservoir dem Kreislauf wieder zugeführt. Somit konnte eine geschlossene Perfusion gewährleistet werden.



**C**  
**Perfusion über die Pfortader**

Legende

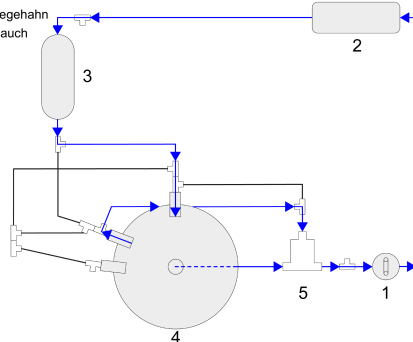
☐ 3-Wegehahn  
 — Schlauch



**D**  
**Perfusion über die Cava**

Legende

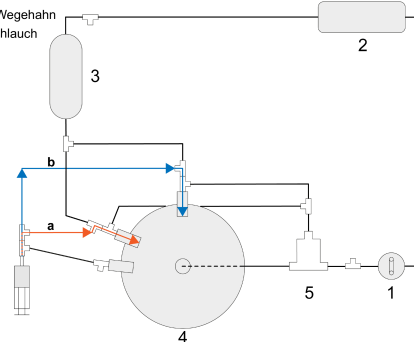
☐ 3-Wegehahn  
 — Schlauch



**E**  
**Rezellularisierung**

Legende

☐ 3-Wegehahn  
 — Schlauch



**Abbildung 1.** Aufbau des Perfusionskreislaufs (A) mit der Pumpe (1), dem Oxygenator (2), der Blasenfalle (3), der Perfusionskammer mit dem Neo-Pankreas (4) und das Reservoir für das Medium (5). Gallengang (6), Pfortader (7) und Vena Cava (8) des Neo-Pankreas sind für Perfusion bzw. Infusion konnektiert (B). Schematischer Aufbau des Perfusionskreislauf während der Perfusion über die PA (C). Aus dem Reservoir (5) gelangt das Medium über die Pumpe (1) zum Oxygenator (2) von dort weiter zur Blasenfalle (3) und schließlich über die PA ins Neo-Organ. Über die VCI bzw. über den Boden der Perfusionskammer gelangt das Medium zurück ins Reservoir. Über den Drei-Wegehahn zwischen 5 und 1 erfolgen die venösen BGAs und der Mediumswechsel. Über den Drei-Wegehahn zwischen 2 und 3 erfolgen die arteriellen BGAs. In D ist analog dazu die Perfusion über die VCI eingezeichnet. Die Zellgabe an Tag 2 (E) erfolgt über die PA (a) oder über die VCI (b). Alle anderen Zugänge werden hierbei geschlossen. Modifiziert aus *Everwien et al.* [1].

### 3.6 Re-Endothelialisierung und Evaluation

Nach der Perfusion mit PBS über Nacht wurden die nicht dezellularisierten, nativen Lappen der Leber entfernt und lediglich die kleinen, dezellularisierten Lappen in den weiteren Versuche eingesetzt. Die einzelnen Zugänge wurden mit Medium-Mix (bestehend aus 50% EGM-2 und 50% RPMI 1640) auf ihre Durchgängigkeit und die Leber auf ihre Integrität geprüft. Die Re-Endothelialisierung erfolgte über 2 Tage. An Tag 1 des Versuchs wurden  $10,51 \times 10^6 \pm 2,0 \times 10^6$  RAEC und  $2,8 \times 10^6 \pm 0,4 \times 10^6$  MSC in jeweils 2,5 ml des korrespondierenden Mediums nach Trypsinierung und Zellzählung aufgelöst und gemeinsam in eine 10 ml Spritze aufgezogen. Unter der Sterilbank erfolgte dann die Gabe der Zellen im Rahmen eines mehrstufigen Schemas. Die erste Gabe von 1 ml der Zellsuspension erfolgte über die PA, gefolgt von 1 ml Medium-Mix. Nach fünfminütiger Wartezeit wurde dieses Procedere insgesamt fünfmal durchgeführt. Um eine Adhäsion der Zellen zu ermöglichen, wurde das *Neo-Organ* in einer Petrischale für 2 Stunden bei 95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurde das Procedere mit  $8,0 \times 10^6 \pm 1,0 \times 10^6$  RAEC und  $2,7^6 \pm 0,5 \times 10^6$  MSC über die VCI wiederholt. Auch hier schloss sich eine zweistündige Adhäsionsphase an. Abschließend wurde das *Neo-Organ* über PA, VCI und GG an den Perfusionskreislauf angeschlossen und in der Perfusionskammer platziert. Die Perfusion erfolgte über die PA mit einer Förderrate von 0,5 ml/min und der Abfluss über die VCI.

An Tag 2 erfolgte der zweite Schritt der Re-Endothelialisierung. Hierzu wurden mithilfe eines Spritzenperfusors (Perfusor compact, B. Braun)  $26,0 \times 10^6 \pm 4,0 \times 10^6$  RAEC gelöst in 10 ml EGM-2 bei einer Förderrate von 40 ml/h über die VCI infundiert und dann mit 5 ml EGM-2 nachgespült. Nach vierstündiger Adhäsionsphase ohne Perfusion wurde die Prozedur mit  $20,0 \times 10^6 \pm 3,0 \times 10^6$  RAEC über die PA wiederholt. Nach erneuter vierstündiger Adhäsionsphase erfolgte dann die Perfusion mit 0,5 ml/min über die VCI über Nacht.

An Tag 3 wurde morgens zunächst eine arterielle und eine venöse Blutgasanalyse (BGA) entnommen und mit einem Messgerät (ABL800 Flex; Radiometer GmbH, Krefeld, Deutschland) direkt gemessen. Danach wurde das Medium über den 3-Wegehahn am Reservoir gewechselt. Die Perfusionsrate wurde auf 1 ml/min erhöht und die Perfusion auf PA umgestellt. Abends wurde erneut eine BGA durchgeführt und das Medium ausgetauscht. Bis Tag 8 wurden nun täglich morgens und abends eine BGA durchgeführt und das Medium gewechselt. Morgens erfolgte die tägliche Alternierung der Perfusionsroute (PA und VCI im Wechsel). Alle 2 Tage wurde die Förderrate um 1 ml/min erhöht (ab Tag 5 auf 2 ml/min, ab Tag 7 auf 3 ml/min).

Insgesamt wurden 16 Versuche durchgeführt. In sechs dieser Versuche wurden die *Neo-Organe* 9 Tage lang kultiviert und ausschließlich für die Analyse der Re-Endothelialisierung genutzt. Zehn *Neo-Organe* wurden zusätzlich mit Langerhans-Inseln an Tag 9 rebesiedelt und ab diesem Zeitpunkt als *Neo-Pankreas* bezeichnet. Um sowohl die kurzfristige als auch die mittelfristige Funktion des *Neo-Pankreas* zu demonstrieren, wurden sechs der 10 *Neo-Pankreata* für einen weiteren Tag und vier *Neo-Pankreata* für drei weitere Tage kultiviert (**Abb. 2**). Einer der Drei-Tages Versuche wurde aufgrund nicht zufriedenstellender Inselqualität von allen weiteren Analysen ausgeschlossen.

Bei drei der insgesamt 16 Versuche erfolgte an Tag 12 die Funktionalitätsprüfung des wiederaufgebauten Endothels mit FITC-Dextran (500 kDa, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Bei einem intakten Endothel würde man keine Interaktion des fluoreszierenden Zuckers mit der EZM erwarten. Hierzu erfolgte nach Durchführung des GSIS (*Glucose Stimulated Insulin Secretion*) Tests (siehe unten) die Infusion von 25 ml FITC-Dextran (0,2 mg/ml in PBS) über die PA mittels eines Spritzenperfusors bei einer Geschwindigkeit von 90 ml/h. Der Überstand aus VCI und Paravasat wurden separat gesammelt und bei -20°C für weitere Analysen gelagert. Zwei native Leber und zwei dezellularisierte Leber mit ebenfalls abgebundenem LL und ML dienten als Kontrollgruppe. Nach der FITC-Dextran-Infusion wurden die Leberlappen bei -20°C aufbewahrt, anschließend davon 5 µm dicke Schnitte angefertigt, in Aceton (Carl Roth) fixiert und die Fluoreszenz unter einem *Zeiss Axio Observer.Z1* (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) beurteilt.

### 3.7 Isolierung von und Rebesiedelung mit Langerhans-Inseln

Die Isolierung der Langerhans-Inseln wurde nach dem Protokoll von *Schubert et al.* durchgeführt [24]. Nach Tötung der Ratte wurde das Abdomen mittels einer U-förmigen Laparotomie eröffnet. Der Darm wurde ausgelagert und der Pankreasgang dargestellt und angeklemt. Über eine Kanüle erfolgte die Injektion der Verdauungslösung, die Kollagenase (Sigma-Aldrich) und DNase (F. Hoffmann-La Roche) enthielt. Das Pankreas wurde aus dem Abdomen entfernt und in einem Wasserbad bei 37°C für 15 min inkubiert und verdaut. Mittels eines diskontinuierlichen Ficoll-Gradienten (Sigma-Aldrich) wurden die Langerhans-Inseln isoliert, in RPMI 1640 mit 10% (vol/vol) FCS resuspendiert und über Nacht kultiviert.

Am neunten Tag der Rezellularisierungsversuche wurde die Perfusionskammer eine Stunde vor Inselgabe mit einem Mix aus RPMI 1640 und EGM-2 befüllt (7/3 [vol/vol]).

Die am Tag zuvor isolierten Inseln wurden nach einem zuvor veröffentlichten Protokoll [25] unter dem Mikroskop mittels einer 100 µl Pipette einzeln aufgesogen, um so eine reine Inselkultur zu erhalten und eine Kontamination mit überflüssigem Gewebe zu vermeiden. Zur Bestimmung der *islet equivalents* (IEQ) wurde eine Probe der selektierten Inseln mit *Dithizone* (DTZ; Sigma-Aldrich) gefärbt. Die übrigen Langerhans-Inseln wurden anschließend in 5 ml RPMI 1640 re-suspendiert und in eine 10 ml Spritze (B. Braun) gefüllt. Um mögliche Scherkräfte zu minimieren, wurde der Stempel der Spritze hierbei entfernt, die Spitze mittels eines Kombistopfens verschlossen und die Inseln langsam in den Kolben gegossen. Der Stempel wurde anschließend wieder an seiner ursprünglichen Stelle positioniert. Das *Neo-Organ* in der Perfusionskammer wurde mit 2,5 ml RPMI 1640 über den GG angespült und die Inseln nun manuell in einem Zuge infundiert. Der GG wurde erneut mit 2,5 ml RPMI 1640 nachgespült, um festsitzende Inseln in den zuführenden Schläuchen noch ins *Neo-Organ* zu transportieren. Übergelaufenes Paravasat wurde mit einer neuen Spritze aufgesammelt und ebenfalls mit DTZ gefärbt, um die Effizienz der Rezellularisierung zu bestimmen. Nach einer Stunde ohne Perfusion, um eine Adhäsion der Inseln zu gewährleisten, wurde die Perfusion mit RPMI 1640/EGM-2 (7/3 [vol/vol]) bei einer Laufrate von 0,2 ml/min über die PA über Nacht wieder aufgenommen.

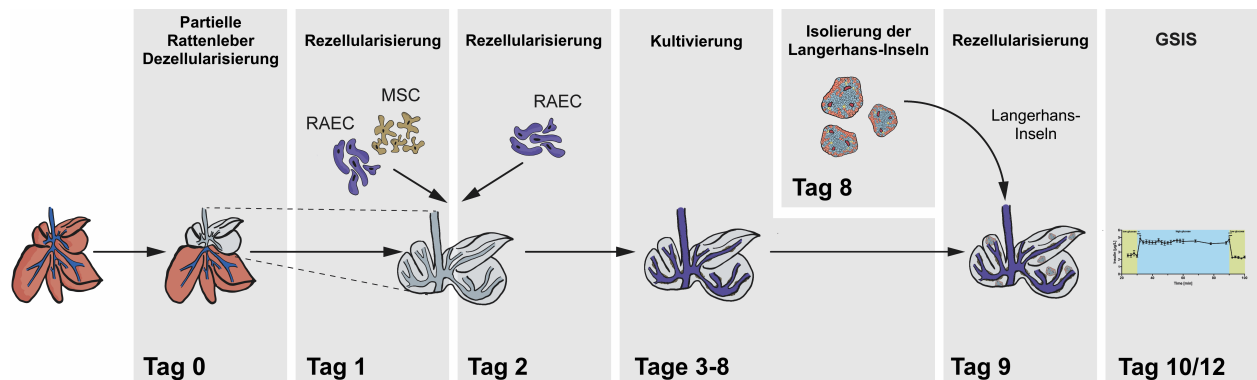
Für die Ein-Tages-Versuche wurden im Durchschnitt  $1304 \pm 257$  IEQ benutzt. Für die Drei-Tagesversuche wurden  $2398 \pm 450$  IEQ benutzt. Hier erfolgte ab Tag 10 die Perfusion über die PA bei einer Laufrate von 1 ml/min. Das Medium wurde einmal am Tag gewechselt. BGA wurden zweimal täglich durchgeführt.

### 3.8 Evaluation der Funktion der Langerhans-Inseln mittels GSIS

Um die Funktion der Langerhans-Inseln in einem dynamischen Geschehen zu evaluieren, wurde ein sogenannter *Glucose Stimulated Insulin Secretion* (GSIS) Test entweder an Tag 10 (1-Tageskultivierung) oder an Tag 12 (3-Tageskultivierung) durchgeführt. Das Medium wurde zunächst gegen Krebs-Ringer-Puffer (KRB) ohne Glucose ausgetauscht, um im Kreislauf vorhandene Glukose zu entfernen. In niedrigmolarer KRB-Glukoselösung (3,6 mM) wurden die Inseln über 30 Minuten auf eine basale Insulinsekretion eingestellt. Anschließend erfolgte die Stimulation mit hochmolarer KRB-Glukoselösung (16,4 mM) für 60 min, auf die abschließend die 30-minütige Perfusion mit niedrigmolarer KRB-Glukoselösung wiederholt wurde. Alle zwei Minuten wurden Aliquots des Perfusats entnommen und bei -20°C für weitere Analysen

gelagert. Um den Verlauf der Glukosekonzentration zu dokumentieren, wurden alle 5 Minuten BGAs entnommen.

Die Insulinkonzentrationen der Perfusatsproben wurden nach Herstellerangaben mittels Insulin ELISA (Mercodia AB, Uppsala, Schweden) bestimmt und mit dem *FluoStar Optima* (BMG Labtech GmbH, Ortenberg, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.



**Abbildung 2.** Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. An Tag 0 erfolgt die Dezellularisierung der kleinen Leberlappen. An Tag 1 & 2 erfolgt die Rezellularisierung mit RAEC & MSC, gefolgt von der dynamischen Kultivierung an Tag 3-8. An Tag 8 werden die Langerhans-Inseln isoliert und an Tag 9 ins *Neo-Organ* infundiert. An Tag 10 bzw. 12 wird der GSIS zur Funktionalitätsprüfung der Langerhans-Inseln durchgeführt. Modifiziert aus *Everwien et al.* [1].

### 3.9 Histologische Aufarbeitung des *Neo-Pankreas*

Zur histologischen Evaluation wurde nach Beendigung des Versuchs ein Teil des *Neo-Pankreas* in Formalin (Herbeta Arzneimittel) asserviert, in Paraffin gegossen und 5 µm dicke Schnitte angefertigt.

Für eine morphologische Beurteilung wurde zunächst eine Hämatoxylin und Eosin Färbung (H&E, AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) nach Herstellerangaben durchgeführt. Des weiteren wurden folgende Färbungen durchgeführt: CD31 (Endothelzellen), CD90 (MSC), Ki-67 (Proliferationsmarker), Insulin, Glukagon und TUNEL (Apoptose). Das Vorgehen wird ausführlich in *Everwien et al.* beschrieben [1].

Alle Aufnahmen der gefärbten Schnitte wurden mit dem *Zeiss Axio Observer.Z1* (Carl Zeiss) gemacht.

Für weitere detaillierte Aufnahmen wurden in Kooperation mit der Core Facility für Elektronenmikroskopie der Charité – Universitätsmedizin Berlin elektronenmikroskopische Aufnahmen von re-endothelialisierten *Neo-Organen* angefertigt. Die genaue Aufbereitung der Schnitte ist ebenfalls in *Everwien et al.* detailliert beschrieben [1].

### 3.10 Statistik

Zur statistischen Auswertung und Grafikerstellung wurde *GraphPad Prism 7.0* (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) benutzt. Daten im Text und in den Abbildungsunterschriften sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler dargestellt. Die Normalverteilung der Daten wurde mittels Shapiro-Wilk-Test überprüft. Für den direkten Vergleich von zwei Gruppen wurde der t-test bzw. bei nicht normalverteilten Daten der nicht-parametrische Mann-Whitney-Test verwendet. Für den Vergleich mehrerer Gruppen im Falle zweier Variablen wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse (Two-Way Analysis of variance / TWO-Way ANOVA) mit anschließenden Paarvergleichen (post-hoc Test; *multiple comparison*) durchgeführt. Ein p-Wert  $\leq 0,05$  wurde als signifikant erachtet.

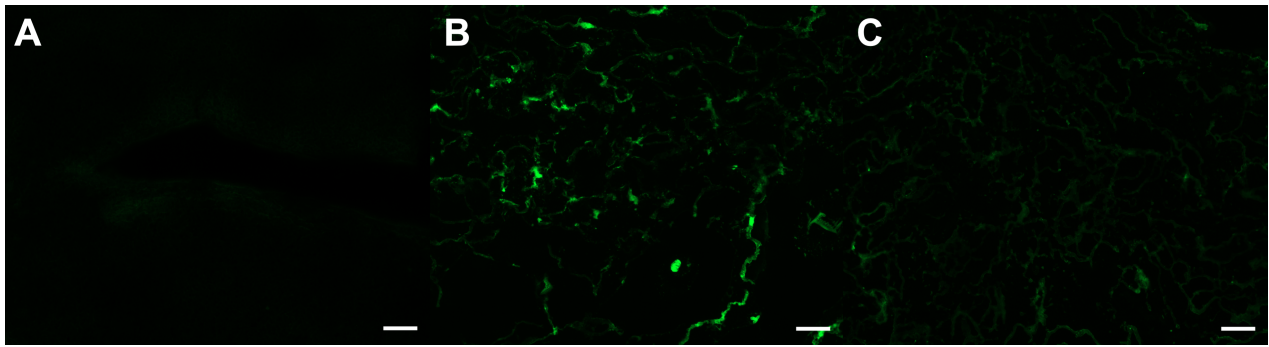
## 4. ERGEBNISSE

### 4.1 Evaluation der Re-Endothelialisierung

Für die Analyse der BGA-Werte der ersten neun Tage wurden alle durchgeführten Experimente verwendet.

Es konnte ein signifikanter Abfall der Glukose-Werte innerhalb der ersten 2 Tage beobachtet werden (Tag 1 vs. Tag 3:  $133 \pm 2$  vs.  $80 \pm 44$  mg/dL,  $p < 0,0001$ ). Ab dem 3. Tag blieb der Wert jedoch auf diesem Niveau stabil (Tag 3 vs. Tag 9:  $80 \pm 44$  vs.  $89 \pm 10$  mg/dL,  $p = 0,4348$ ). Die Laktatwerte stiegen zu Beginn signifikant an (Tag 1 vs. Tag 3:  $21 \pm 1$  vs.  $61 \pm 4$  mg/dL,  $p < 0,0001$ ), stabilisierten sich aber ebenfalls ab dem 3. Tag (Tag 3 vs. Tag 9:  $61 \pm 4$  vs.  $51 \pm 9$  mg/dL,  $p = 0,3362$ ). Kalium- und Natrium-Werte waren ab dem 3. Kultivierungstag auf einem stabilen Niveau (Tag 3 vs. Tag 9:  $5,53 \pm 0,09$  vs.  $5,39 \pm 0,05$  mmol/L,  $p = 0,3251$  und  $143 \pm 2$  vs.  $147 \pm 2$  mmol/L,  $p = 0,0585$ ).

Die Perfusion mit FITC-Dextran zeigte, dass es in der nativen Kontrollleber fast nahezu keine Interaktion mit der Matrix gab (**Abb. 3A**). In der dezellularisierten Leber konnte eine Fluoreszenz der gesamten Leber und der bestehenden EZM beobachtet werden (**Abb. 3B**). Im re-endothelialisierten *Neo-Pankreas* lag das beobachtete Signal zwischen den beiden Kontrollgruppen (**Abb. 3C**).



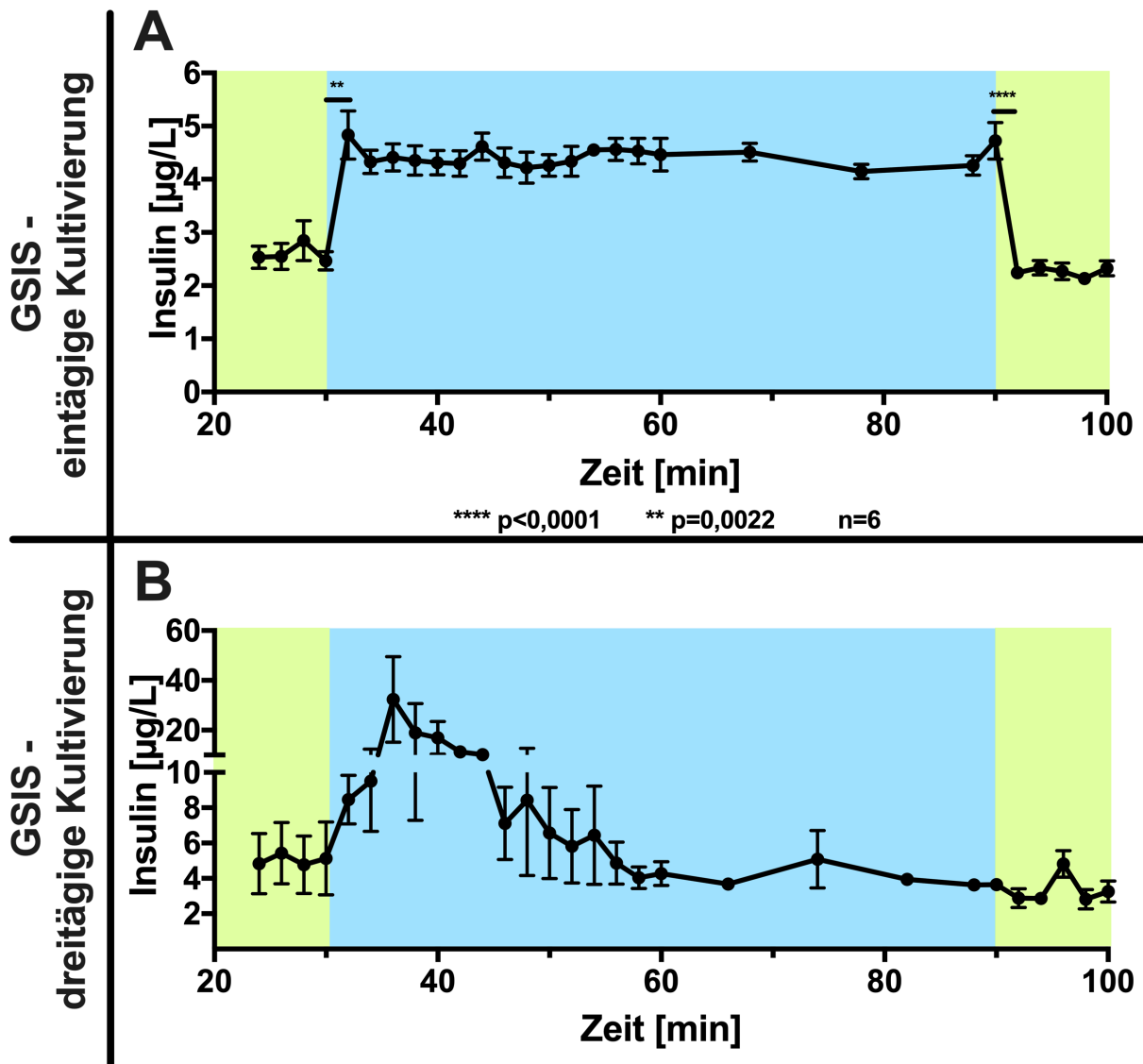
**Abbildung 3.** Immunfluoreszenzaufnahmen von nativer (A), dezellularisierter (B) und re-endothelialisierter (C) Rattenleber nach der Perfusion mit FITC-Dextran (0,2 mg/ml). Maßstabsleiste = 100  $\mu$ m. [1]

#### 4.2 Evaluation der Isolierung und Funktion der Langerhans-Inseln

Nach der Inselgabe wurden für die eintägigen Kultivierungsversuche  $16 \pm 3$  IEQ im Überstand gefunden. Daraus lässt sich schließen, dass  $1288 \pm 257$  IEQ von  $1304 \pm 257$  infundierten IEQ im *Neo-Pankreas* verblieben waren ( $n=6$ ). Für die dreitägigen Kultivierungsversuche waren im Überstand  $12 \pm 1$  IEQ zu finden, es verblieben also  $2386 \pm 449$  IEQ im *Neo-Pankreas* ( $n=3$ ).

Während der Perfusion mit niedrigmolarem Glukose-Medium konnte für die eintägigen Kultivierungsversuche eine niedrige basale Insulinsekretion beobachtet werden. Es zeigte sich ein statistisch signifikanter Anstieg in der Insulinsekretion nach Stimulation mit hochmolarem Glukose-Medium ( $n=6$ , Minute 30 vs. Minute 32:  $2,5 \pm 0,2$  vs.  $4,8 \pm 0,5$   $\mu$ g/L,  $p=0,0022$ ). Während der gesamten Stimulationsperiode blieb der hohe Insulinspiegel bestehen ( $n=6$ , Minute 32 vs. Minute 90:  $4,8 \pm 0,5$  vs.  $4,7 \pm 0,3$   $\mu$ g/L,  $p=0,9372$ ). Dieser fiel statistisch signifikant wieder ab, als zur Perfusion mit niedrigmolarer Glukose-Lösung zurückgekehrt wurde ( $n=6$ , Minute 90 vs. Minute 92:  $4,7 \pm 0,3$  vs.  $2,25 \pm 0,06$   $\mu$ g/L,  $p<0,0001$ ). Eine niedrige basale Insulinsekretion während der Perfusion mit niedrigmolare Glukose-Lösung konnte bei den dreitägigen Kultivierungsversuchen ebenfalls beobachtet werden. Nach Stimulation mit der hochmolaren-Glukoselösung wurde ein steiler Anstieg beobachtet. Dieser war statistisch jedoch nicht signifikant ( $n=3$ , Minute 30 vs. Minute 38:  $5 \pm 2$   $\mu$ g/L vs.  $19 \pm 12$   $\mu$ g/L,  $p=0,2$ ). Die Insulin-Sekretion sank dann auf ein niedrigeres Niveau und erreichte unter der abschließenden Perfusion mit niedrigmolarer Glukose-Lösung mit der Anfangsphase der Versuche vergleichbare Werte ( $n=3$ , Minute 30 vs. Minute 92:  $5 \pm 2$   $\mu$ g/L vs.  $2,9 \pm 0,5$   $\mu$ g/L,  $p=0,7$ , **Abb. 4**).

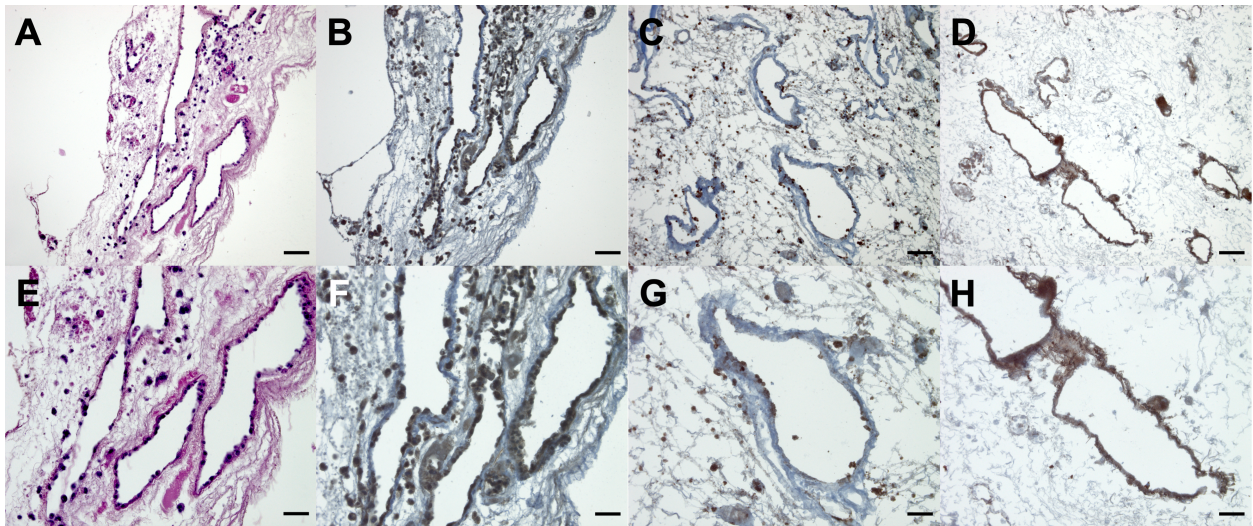




**Abbildung 4.** Ergebnisse des GSIS von eintägigen (A) und dreitägigen Kultivierungsversuchen (B). Bei den eintägigen Kultivierungsversuchen konnten ein signifikanter Anstieg des im Perfusat gemessenen Insulins nach Stimulation durch hochmolare Glukose beobachtet werden, sowie ein signifikanter Abfall bei Rückkehr zu niedrigmolarer Glukose. Für die dreitägigen Kultivierungsversuche wurde ein kurzzeitiger, nicht signifikanter Anstieg beobachtet. Modifiziert aus *Everwien et al.* [1].

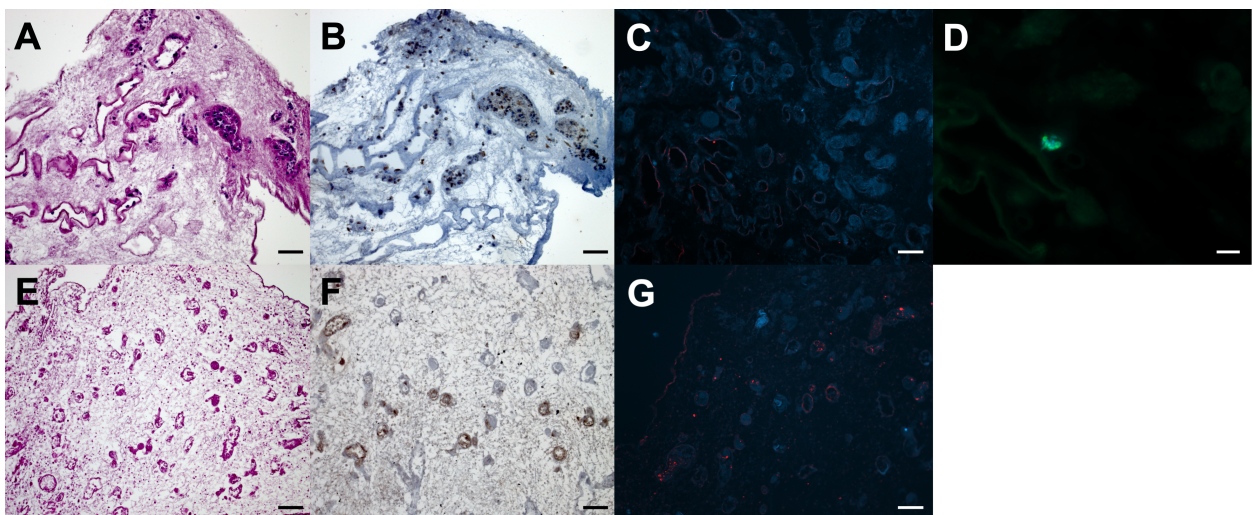
#### 4.3 Histologische Aufarbeitung des *Neo-Pankreas*

In der HE-Färbung zeigte sich, dass sich vor allem in und um die Gefäße neue Zellen angesiedelt hatten. Besonders die größeren Gefäße waren von einem *monolayer* ausgekleidet (**Abb. 5 A,E**). Die CD31-Färbung belegte, dass es sich bei diesen, nur innerhalb der Gefäße lokalisierten Zellen, um Endothelzellen handelte. Eine Endothelialisierung auf kapillärer Ebene konnte jedoch nicht beobachtet werden (**Abb. 5 B,F**). Die MSC konnten mittels CD90-Färbung dargestellt werden und waren ebenfalls um die Gefäße angesiedelt (**Abb. 5 D,H**). Die erhaltene Proliferationsfähigkeit dieser Zellen konnte durch die positive Ki-67 Färbung nachgewiesen werden (**Abb. 5 C,G**).



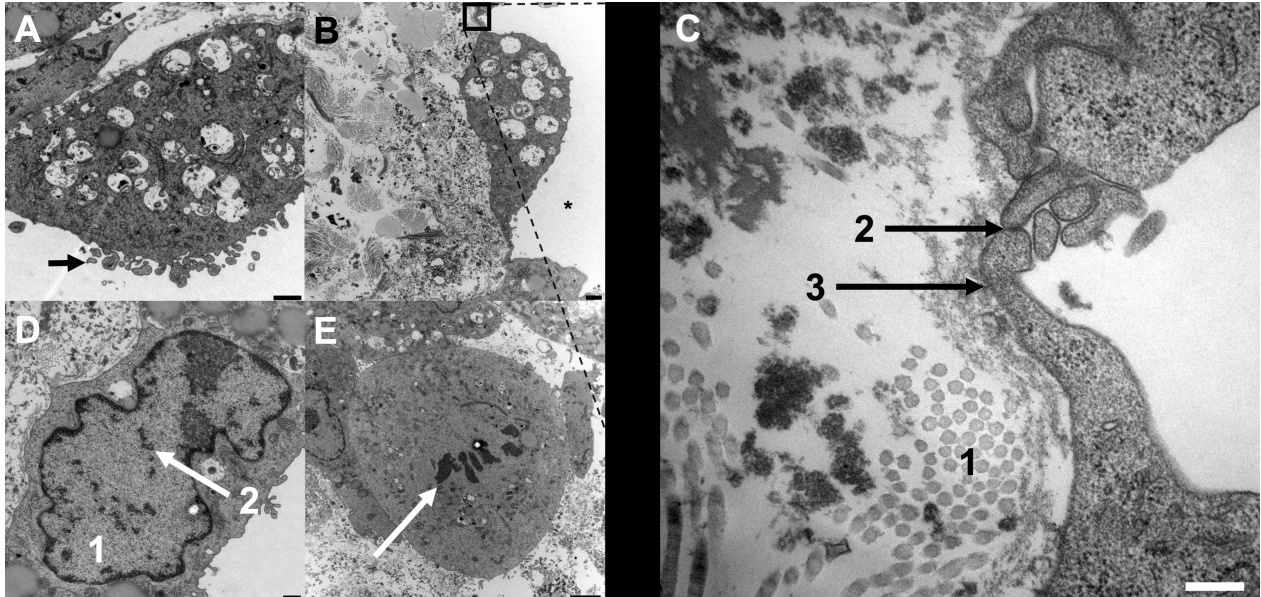
**Abbildung 5.** Histologische Färbungen der re-endothelialisierten Rattenleber. Die HE-Färbung zeigt monolayerbildende Zellen in den Gefäßen (A,E), die sich als CD31-positive Zellen (Endothelzellen) präsentieren (B,F). Diese Zellen sind zudem positiv für den Proliferationsmarker Ki-67 (C,G). Die CD90-positiven Zellen (also MSC) sind um die Gefäße herum lokalisiert (D,H). Die Maßstabsmarkierung für A-D ist 100 µm und für E-H 50 µm. Aus *Everwien et al.* [1].

Des Weiteren zeigte die HE-Färbung, dass die Langerhans-Inseln über das gesamte Parenchym verteilt waren (**Abb. 6 A,E**). Diese Zellen wiesen eine positive Insulin-Färbung auf und waren sowohl in den 1- als auch 3-Tageskultivierungsversuchen zu finden (**Abb. 6 B,F**). In beiden Gruppen konnte mit der TUNEL Färbung gezeigt werden, dass die meisten Langerhans-Inseln TUNEL-negativ und somit vital waren (**Abb. 6 C,G**). Die Glukagon-Färbung zur Darstellung der Alpha-Zellen fiel nur in der Gruppe nach eintägiger Kultivierung positiv aus (**Abb. 6D**).



**Abbildung 6.** Histologische Auswertung des *Neo-Pankreas* (A-D: 1-Tageskultivierungsversuche und E-G: 3-Tageskultivierungsversuche). Insulin-positive Zellen zeigten sich in beiden Versuchsgruppen über die gesamte Matrix verteilt (B,F). Die meisten dieser Zellen waren TUNEL-negativ und somit als viabel zu betrachten (C,G). Der Nachweis Glukagon-positiver Zellen gelang nur in der Gruppe nach eintägiger Kultivierung (D). Die Maßstabsmarkierung für A-D markiert 100 µm und für E-G 50 µm. Aus *Everwien et al.* [1].

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten die Ausbildung von *tight junctions* zwischen zwei mutmaßlichen Endothelzellen und deren Interaktion mit der Basallamina (**Abb. 7 B,C**). Des Weiteren sah man Zellen, die sich in Mitose befanden (**Abb. 7E**) und somit für eine Proliferation der Zellen sprechen, sowie einen Zellkern mit Anteilen von Heterochromatin und Euchromatin (**Abb. 7D**). MSC konnten anhand ihrer charakteristischen oberflächlichen Ausstülpungen identifiziert werden (**Abb. 7A**) [26].



**Abbildung 7.** Elektronenmikroskopische Aufnahme des *Neo-Organs*. Es konnten MSC anhand ihrer charakteristischen oberflächlichen Ausstülpungen identifiziert werden (A, Pfeil). C ist die Vergrößerung des Quadrats in B. Hier zeigt sich die gebildete *tight junction* (2) zweier Zellen, die der Basallamina aufliegen (3) neben freiem Kollagen (1) der EZM. In (D) präsentiert sich ein Zellkern mit Euchromatin (1) und Heterochromatin (2), sowie eine Zelle in Mitose (E, Pfeil). Für A & B entspricht die Maßstabsmarkierung 1000 nm, für C 250 nm, für D 500 nm und für E 2500 nm. Aus Everwien et al. [1]

## 5. DISKUSSION

Zur kurativen und definitiven Therapie von Patient\*innen mit Typ 1 Diabetes stehen aktuell nur die Pankreas- oder die simultane Pankreas-Nierentransplantation sowie die Inseltransplantation zur Verfügung [11]. Der bestehende eklatante Mangel an verfügbaren Organen und eine große Diskrepanz zwischen der Anzahl von Patient\*innen, die auf der Warteliste stehen und der Anzahl derer die tatsächlich jährlich transplantiert werden, zeugen von der Notwendigkeit, neue innovative therapeutische Ansätze für dieses Patientenkontingent zu entwickeln [27].

In dieser Arbeit konnte das, nach unserem Wissen, erste Protokoll für eine dezellularisierte, re-endothelialisierte und mit Langerhans-Inseln rebesiedelte Rattenleber, die als endokrines *Neo-Pankreas* dienen soll, etabliert werden. In den

Versuchen konnte eine Integrität der Langerhans-Inseln nach einem bzw. drei Tagen Kultivierung sowie eine adäquate Reaktion des *Neo-Pankreas* auf sich ändernde Glucosespiegel gezeigt werden.

Die Verwendung einer dezellularisierten Rattenleber als *Neo-Pankreas* ist zum jetzigen Zeitpunkt noch eine wenig erprobte Methode und wird bisher eher nicht als sog. *scaffold* für insulinproduzierende Zellen benutzt [28]. Zwei andere Arbeitsgruppen verwendeten ebenfalls dezellularisierte Rattenlebern für die Rebesiedelung mit Langerhans-Inseln [29,30]. Vier Eigenschaften machen die Rattenleber jedoch zu einer attraktiven Matrix: Die Größe, der anatomische Aufbau mit Gallengangssystem sowie arteriellem, portalvenösem und venösem Gefäßsystem, die Integrität und Stabilität des Organs auch im dezellularisierten Zustand und nicht zuletzt eine mit der des Pankreas' vergleichbaren Komposition der Extrazellulärmatrix.

Rattenlebern haben im Durchschnitt ein Volumen von 22cm<sup>3</sup> [31]. Ein menschliches Pankreas hat im Vergleich dazu ein Volumen von 76,9 cm<sup>3</sup> - die endokrinen Zellen stellen jedoch nur einen Anteil von 2%, also von ungefähr 1,54 cm<sup>3</sup> [32]. Um die Relation diese Volumina nochmals zu verdeutlichen, sei zusätzlich auf das „*islet device*“ von *Ludwig et al.* verwiesen [33]. Dieses implantierbare Gerät konnte in diabetischen Primaten eine metabolische Kontrolle des Blutzuckers über einen gewissen Zeitraum, jedoch keine komplette Insulinunabhängigkeit, gewährleisten. Das „*islet device*“ hat insgesamt ein Volumen von 65,37 cm<sup>3</sup>, wobei ein großer Anteil für die Oxygenierung der Inseln genutzt wird. Der eigentliche Raum für die Langerhans-Inseln beträgt hier nur 4,36 cm<sup>3</sup>. Eine dezellularisierte Rattenleber bietet also mehr als genügend Raum, um als Matrix für Langerhans-Inseln und weitere Zellen zur Kontrolle des Blutzuckerspiegels im Menschen zu dienen. Zur Etablierung der Hypothese wurden in dieser Arbeit allerdings zunächst nur die kleinen Leberlappen verwendet.

Ein wichtiger Aspekt für die Konstruktion unseres *Neo-Pankreas* war die Tatsache, dass die Leber durch das Gallengangssystem einen direkten Zugang zum Parenchym hat. Trotz der schwankenden Größe der Inseln, die zwischen 20 und 400 µm groß sind, gingen wir in meiner Arbeitsgruppe davon aus, dass die Langerhans-Inseln über den Gallengang ins Leberparenchym gegeben werden können [34]. *Napierala et al.* konnten zeigen, dass bei der Verwendung eines dezellularisierten Rattenpankreas, die Langerhans-Inseln, die über den Pankreasgang gegeben wurden, am besten ins Parenchym gelangten [35]. Die histologische Aufarbeitung des *Neo-Pankreas* zeigte in der H&E und in der Insulin-Färbung eine klare Verteilung der Langerhans-Inseln im parenchymatösen Raum. Die vorher erwähnten Arbeiten von *Xu et al.* und *Zhou et al.*

konnten dies nicht zeigen. Dort blieben die Langerhans-Inseln in den Gefäßen stecken [29,30].

Die Stabilität einer dezellularisierten Rattenleber und die damit verbundene gute und einfache Handhabung sind wichtige Voraussetzungen für eine potenzielle nachfolgende Implantation. *Napierala et al.* konnten zeigen, dass diese Stabilität bei einem dezellularisiertem Rattenpankreas nicht gegeben ist und sich somit eher nicht als Matrix eignet [35].

EZM und Zellen stehen in einer engen dynamischen Beziehung zueinander und beeinflussen sich z.B. durch die Sekretion von Zytokinen und Botenstoffen [3]. Sowohl für Endothelzellen als auch für Langerhans-Inseln konnte eine verbesserte Funktion in Zellkulturen im Falle der Kultivierung mit EZM-Bestandteilen wie z.B. Kollagen IV gezeigt werden [36,37]. Da Leber und Pankreas demselben Endoderm entstammen [16], sollte somit eine ähnliche Komposition der EZM zu erwarten sein, die die Funktion der Langerhans-Inseln unterstützt. Mehrere Arbeiten habe sich mit dem Aufbau und der Komposition von dezellularisierter Rattenleber und dezellularisiertem Rattenpankreas beschäftigt, bisher allerdings noch nicht auf einem funktionellen Level [38,39].

*Citro et al.* verwendeten dezellularisierte Rattenlungen für die Herstellung sog. *vascularized islet organs* (VIOs). In ihrer Arbeit verglichen sie die Zusammensetzung des Proteoms und konnten Übereinstimmungen in wichtigen Matrixbestandteilen feststellen [40]. Die Verwendung eines anderen Organs als eines Pankreas zur Beherbergung von Langerhans-Inseln scheint also durchaus vielversprechend.

Nach Auswahl einer geeigneten Matrix sollte in der eigenen Arbeit ein weiterer wichtiger Punkt adressiert werden: Die Unerlässlichkeit eines intakten Endothels vor Implantation. Freies Kollagen aktiviert die Gerinnungskaskade und kann so zu einem Transplantatversagen führen [17,19]. Um eine ausreichende Re-Endothelialisierung zu ermöglichen, wurde in dieser Arbeit die Re-Endothelialisierung nicht nur mit Endothelzellen sondern zusätzlich mit MSC durchgeführt. MSC dienen als sog. *nursing cells* und unterstützen Endothelzellen in ihrer Funktion und verstärken die Ausbildung eines vaskulären Netzwerks [41]. Die Ergebnisse dieser Arbeit sind vielversprechend. Die Zellen konnten über einen Zeitraum von neun Tagen in einer dynamischen Umgebung mit stabilen metabolischen Parametern kultiviert werden. Die histologische Auswertung zeigte die Ausbildung eines sog. *monolayer* innerhalb der Gefäße. Die CD31-Färbung belegte, dass es sich hierbei um Endothelzellen handelt. Um die Gefäße herum fanden sich CD90 positive Zellen, also vermutlich MSC. Dies deutet darauf hin, dass sich unsere Hypothese der *nursing cells* bestätigte. Eine Re-Endothelialisierung

konnte jedoch nur in größeren Gefäßen und nicht auf einem kapillären Level beobachtet werden. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten die Ausbildung von *tight junctions*, die bekannter Weise vorwiegend von Endothelzellen ausgebildet werden. Des Weiteren fanden sich hier Zellen in Mitose, also in aktiver Zellteilung. Dies kann als Hinweis auf die vorliegende Viabilität der Zellen gedeutet werden. Die Perfusion mit FITC-Dextran ergab, dass die Integrität des Endothels, zumindest auf einem niedrigen Level, wiederhergestellt werden konnte. Um die Funktionalität des ausgebildeten Endothels weiter belegen zu können, sollten sich weitere Studien z.B. eine Perfusion des *Neo-Pankreas* mit Vollblut anschließen. Ein funktionierendes Endothel ist von zentraler Bedeutung, da Langerhans-Inseln einen hohen Sauerstoffbedarf haben und es bei nicht adäquater Sauerstoffversorgung schnell zu zentralen Nekrosen und somit zu einem Funktionsausfall kommen kann. Bereits existierende *islet devices* scheitern genau an diesen zentralen Aspekten [42,43].

Zentraler Punkt dieser Arbeit war jedoch der Nachweis einer adäquaten Reaktion der Langerhans-Inseln auf sich ändernde Glukosewerte als Beleg für die Funktionalität des *Neo-Pankreas*. Sowohl nach der eintägigen als auch nach der dreitägigen Kultivierung zeigte sich ein adäquater Anstieg der Insulinproduktion nach Perfusion mit hochmolarer Glukoselösung. In beiden Gruppen sank die Insulinausschüttung bei erneuter Perfusion mit niedrigmolarer Glukoselösung. Dies kann durchaus als Zeichen der vollen Integrität und Funktion der Langerhans-Inseln interpretiert werden. Jedoch fiel auf, dass in der Gruppe nach dreitägiger Kultivierung die Insulinproduktion während der Stimulationsphase nicht aufrechterhalten werden konnte. Dies könnte für eine Abnahme der Inselfunktion unter den beschriebenen Kultivierungsbedingungen sprechen und somit eine frühzeitige Implantation des *Neo-Pankreas* nahelegen. Zukünftige Studien sollten sich u.a. mit der Unterstützung und Verbesserung der Funktion von Langerhans-Inseln beschäftigen. Solche Untersuchungen könnten z.B. eine Fokussierung auf die sog. *islet niche* beinhalten. Darunter versteht man die Mikroumgebung der Langerhans-Inseln, die aus einem dichten und gut vaskularisiertem Netzwerk besteht [44]. Ein Ansatz hierfür könnte die vorrangige Kultivierung von Langerhans-Inseln mit Endothelzellen und MSC sein. Die Co-Kultivierung von Langerhans-Inseln mit MSC konnte in verschiedenen Studien eine deutliche Verbesserung ihrer Funktion zeigen [45–47].

Die Ergebnisse dieser Arbeit, insbesondere die adäquate Insulinantwort nach Glukosestimulation und die histologischen Analysen sind vielversprechend. Wesentliche nun folgende Schritte sind die Herstellung eines für die Implantation ausreichend re-

endothelialisierten Gefäßsystems, die Evaluierung im Transplantationsmodell und schließlich die Verwendung humaner Zellen.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

- [1] H. Everwien, E. Keshi, K.H. Hillebrandt, B. Ludwig, M. Weinhart, P. Tang, A.S. Beierle, H. Napierala, J.M. Gassner, N. Seiffert, S. Moosburner, D. Geisel, A. Reutzelselke, B. Strücker, J. Pratschke, N. Haep, I.M. Sauer, Engineering an endothelialized, endocrine Neo-Pancreas: Evaluation of islet functionality in an ex vivo model, *Acta Biomater.* 117 (2020) 213–225. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.09.022>.
- [2] H. Walles, T. Walles, 2.220 - Extracellular Matrix as Biomimetic Biomaterial: Biological Matrices for Tissue Regeneration, in: P. Ducheyne (Ed.), *Comprehensive Biomaterials*, Elsevier, Oxford, 2011: pp. 361–367. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-055294-1.00077-5>.
- [3] S.F. Badylak, The extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction, *Semin Cell Dev Biol.* 13 (2002) 377–83.
- [4] P.M. Crapo, T.W. Gilbert, S.F. Badylak, An overview of tissue and whole organ decellularization processes, *Biomaterials.* 32 (2011) 3233–3243. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.01.057>.
- [5] S.F. Badylak, D.O. Freytes, T.W. Gilbert, Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function, *Acta Biomater.* 5 (2009) 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.09.013>.
- [6] S.E. Gilpin, J.P. Guyette, G. Gonzalez, X. Ren, J.M. Asara, D.J. Mathisen, J.P. Vacanti, H.C. Ott, Perfusion decellularization of human and porcine lungs: bringing the matrix to clinical scale, *J. Heart Lung Transplant.* 33 (2014) 298–308. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2013.10.030>.
- [7] J.J. Song, J.P. Guyette, S.E. Gilpin, G. Gonzalez, J.P. Vacanti, H.C. Ott, Regeneration and experimental orthotopic transplantation of a bioengineered kidney, *Nat Med.* 19 (2013) 646–51. <https://doi.org/10.1038/nm.3154>.
- [8] Deutsche Stiftung Organtransplantation, Deutsche Stiftung Organtransplantation, Jahresbericht 2019 Organspende und Transplantation in Deutschland., 2020.

- [9] G. Herold, ed., *Innere Medizin 2016: eine vorlesungsorientierte Darstellung ; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung ; mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis*, Selbstverlag, Köln, 2016.
- [10] P.G. Dean, A. Kukla, M.D. Stegall, Y.C. Kudva, Pancreas transplantation, *BMJ*. 357 (2017) j1321.
- [11] B. Ludwig, S. Ludwig, A. Steffen, H.D. Saeger, S.R. Bornstein, Islet versus pancreas transplantation in type 1 diabetes: competitive or complementary?, *Curr Diab Rep*. 10 (2010) 506–11. <https://doi.org/10.1007/s11892-010-0146-y>.
- [12] J.J. Casey, J.R. Lakey, E.A. Ryan, B.W. Paty, R. Owen, K. O’Kelly, S. Nanji, R.V. Rajotte, G.S. Korbitt, D. Bigam, N.N. Kneteman, A.M. Shapiro, Portal venous pressure changes after sequential clinical islet transplantation, *Transplantation*. 74 (2002) 913–5.
- [13] S.J. Hughes, S.E. Davies, S.H. Powis, M. Press, Hyperoxia improves the survival of intraportally transplanted syngeneic pancreatic islets, *Transplantation*. 75 (2003) 1954–9. <https://doi.org/10.1097/01.TP.0000066805.39716.23>.
- [14] L. Moberg, H. Johansson, A. Lukinius, C. Berne, A. Foss, R. Källen, Ø. Østraat, K. Salmela, A. Tibell, G. Tufveson, G. Elgue, K. Nilsson Ekdahl, O. Korsgren, B. Nilsson, Production of tissue factor by pancreatic islet cells as a trigger of detrimental thrombotic reactions in clinical islet transplantation, *Lancet*. 360 (2002) 2039–45.
- [15] C. Loretelli, E. Assi, A.J. Seelam, M.B. Nasr, P. Fiorina, Cell therapy for type 1 diabetes, *Expert Opinion on Biological Therapy*. 20 (2020) 887–897. <https://doi.org/10.1080/14712598.2020.1748596>.
- [16] K.S. Zaret, Hepatocyte differentiation: from the endoderm and beyond, *Curr Opin Genet Dev*. 11 (2001) 568–74.
- [17] J. Bao, Q. Wu, J. Sun, Y. Zhou, Y. Wang, X. Jiang, L. Li, Y. Shi, H. Bu, Hemocompatibility improvement of perfusion-decellularized clinical-scale liver scaffold through heparin immobilization, *Scientific Reports*. 5 (2015) 10756. <https://doi.org/10.1038/srep10756>.
- [18] K.E. Dionne, C.K. Colton, M. Lyarmush, Effect of Hypoxia on Insulin Secretion by Isolated Rat and Canine Islets of Langerhans, (1993). <https://doi.org/10.2337/diab.42.1.12>.
- [19] B. Furie, B.C. Furie, The molecular basis of blood coagulation, *Cell*. 53 (1988)



- [20] W.L. Fu, Z. Xiang, F.G. Huang, Z.P. Gu, X.X. Yu, S.Q. Cen, G. Zhong, X. Duan, M. Liu, Coculture of peripheral blood-derived mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells on strontium-doped calcium polyphosphate scaffolds to generate vascularized engineered bone, *Tissue Eng Part A*. 21 (2015) 948–59. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2014.0267>.
- [21] G. Gurel Pekozer, G. Torun Kose, V. Hasirci, Influence of co-culture on osteogenesis and angiogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells and aortic endothelial cells, *Microvasc Res*. 108 (2016) 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2016.06.005>.
- [22] A. Butter, K. Aliyev, K.H. Hillebrandt, N. Raschzok, M. Kluge, N. Seiffert, P. Tang, H. Napierala, M.I. Ashraf, A. Reutzel-Selke, A. Andreou, J. Pratschke, I.M. Sauer, B. Struecker, Evolution of graft morphology and function after recellularization of decellularized rat livers, *J Tissue Eng Regen Med*. (2016). <https://doi.org/10.1002/term.2383>.
- [23] J. Gassner, M. Nossler, S. Moosburner, R. Horner, P. Tang, L. Wegener, D. Wyrwal, F. Claussen, R. Arsenic, J. Pratschke, I.M. Sauer, N. Raschzok, Improvement of normothermic ex vivo machine perfusion of rat liver grafts by dialysis and Kupffer Cell inhibition with glycine, *Liver Transplantation: Official Publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. (2018). <https://doi.org/10.1002/lt.25360>.
- [24] U. Schubert, J. Schmid, S. Lehmann, X.Y. Zhang, H. Morawietz, N.L. Block, W. Kanczkowski, A.V. Schally, S.R. Bornstein, B. Ludwig, Transplantation of pancreatic islets to adrenal gland is promoted by agonists of growth-hormone-releasing hormone, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110 (2013) 2288–93. <https://doi.org/10.1073/pnas.1221505110>.
- [25] E.J. Zmuda Powell, C.A., Hai, T., A Method for Murine Islet Isolation and Subcapsular Kidney Transplantation, *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. (2011). <https://doi.org/10.3791/2096>.
- [26] G. Pasquinelli, P. Tazzari, F. Ricci, C. Vaselli, M. Buzzi, R. Conte, C. Orrico, L. Foroni, A. Stella, F. Alviano, G.P. Bagnara, E. Lucarelli, Ultrastructural Characteristics of Human Mesenchymal Stromal (Stem) Cells Derived from Bone Marrow and Term

Placenta, Ultrastructural Pathology. 31 (2007) 23–31.  
<https://doi.org/10.1080/01913120601169477>.

[27] R.F. Saidi, S.K. Hejazii Kenari, Challenges of organ shortage for transplantation: solutions and opportunities, *Int J Organ Transplant Med.* 5 (2014) 87–96.

[28] G.A. Salg, N.A. Giese, M. Schenk, F.J. Hüttner, K. Felix, P. Probst, M.K. Diener, T. Hackert, H.G. Kenngott, The emerging field of pancreatic tissue engineering: A systematic review and evidence map of scaffold materials and scaffolding techniques for insulin-secreting cells, *J Tissue Eng.* 10 (2019) 2041731419884708.  
<https://doi.org/10.1177/2041731419884708>.

[29] T. Xu, M. Zhu, Y. Guo, D. Wu, Y. Huang, X. Fan, S. Zhu, C. Lin, X. Li, J. Lu, H. Zhu, P. Zhou, Y. Lu, Z. Wang, Three-dimensional culture of mouse pancreatic islet on a liver-derived perfusion-decellularized bioscaffold for potential clinical application, *J Biomater Appl.* 30 (2015) 379–87. <https://doi.org/10.1177/0885328215587610>.

[30] P. Zhou, Y. Guo, Y. Huang, M. Zhu, X. Fan, L. Wang, Y. Wang, S. Zhu, T. Xu, D. Wu, Y. Lu, Z. Wang, The dynamic three-dimensional culture of islet-like clusters in decellularized liver scaffolds, *Cell Tissue Res.* 365 (2016) 157–71.  
<https://doi.org/10.1007/s00441-015-2356-8>.

[31] K. Vdoviaková, E. Petrovová, L. Krešáková, M. Maloveská, J. Teleky, J. Jenčová, J. Živčák, A. Jenča, Importance Rat Liver Morphology and Vasculature in Surgical Research, *Med Sci Monit.* 22 (2016) 4716–4728. <https://doi.org/10.12659/MSM.899129>.

[32] S.V. DeSouza, R.G. Singh, H.D. Yoon, R. Murphy, L.D. Plank, M.S. Petrov, Pancreas volume in health and disease: a systematic review and meta-analysis, *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 12 (2018) 757–766.  
<https://doi.org/10.1080/17474124.2018.1496015>.

[33] B. Ludwig, S. Ludwig, A. Steffen, Y. Knauf, B. Zimerman, S. Heinke, S. Lehmann, U. Schubert, J. Schmid, M. Bleyer, U. Schönmann, C.K. Colton, E. Bonifacio, M. Solimena, A. Reichel, A.V. Schally, A. Rotem, U. Barkai, H. Grinberg-Rashi, F.J. Kaup, Y. Avni, P. Jones, S.R. Bornstein, Favorable outcome of experimental islet xenotransplantation without immunosuppression in a nonhuman primate model of diabetes, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 114 (10) 11745–11750.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1708420114>.

[34] H.H. Huang, K. Ramachandran, L. Stehno-Bittel, A replacement for islet

equivalents with improved reliability and validity, *Acta Diabetol.* 50 (2013) 687–96. <https://doi.org/10.1007/s00592-012-0375-4>.

[35] H. Napierala, K.H. Hillebrandt, N. Haep, P. Tang, M. Tintemann, J. Gassner, M. Noesser, H. Everwien, N. Seiffert, M. Kluge, E. Teegen, D. Polenz, S. Lippert, D. Geisel, A. Reutzel Selke, N. Raschzok, A. Andreou, J. Pratschke, I.M. Sauer, B. Struecker, Engineering an endocrine Neo-Pancreas by repopulation of a decellularized rat pancreas with islets of Langerhans, *Sci Rep.* 7 (2017) 41777. <https://doi.org/10.1038/srep41777>.

[36] A. Llacua, B.J. de Haan, S.A. Smink, P. de Vos, Extracellular matrix components supporting human islet function in alginate-based immunoprotective microcapsules for treatment of diabetes, *J Biomed Mater Res A.* 104 (7) 1788–96. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35706>.

[37] J.C. Stendahl, D.B. Kaufman, S.I. Stupp, Extracellular matrix in pancreatic islets: relevance to scaffold design and transplantation, *Cell Transplant.* 18 (2009) 1–12.

[38] H. Bi, K. Ye, S. Jin, Proteomic analysis of decellularized pancreatic matrix identifies collagen V as a critical regulator for islet organogenesis from human pluripotent stem cells, *Biomaterials.* 233 (2020) 119673. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119673>.

[39] Q. Li, B.E. Uygun, S. Geerts, S. Ozer, M. Scalf, S.E. Gilpin, H.C. Ott, M.L. Yarmush, L.M. Smith, N.V. Welham, B.L. Frey, Proteomic analysis of naturally-sourced biological scaffolds, *Biomaterials.* 75 (2016) 37–46. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.10.011>.

[40] A. Citro, P.T. Moser, E. Dugnani, T.K. Rajab, X. Ren, D. Evangelista-Leite, J.M. Charest, A. Peloso, B.K. Podesser, F. Manenti, S. Pellegrini, L. Piemonti, H.C. Ott, Biofabrication of a vascularized islet organ for type 1 diabetes, *Biomaterials.* 199 (2019) 40–51. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.01.035>.

[41] S.M. Nassiri, R. Rahbarghazi, Interactions of mesenchymal stem cells with endothelial cells, *Stem Cells Dev.* 23 (2014) 319–332. <https://doi.org/10.1089/scd.2013.0419>.

[42] A. Espona-Noguera, J. Ciriza, A. Cañibano-Hernández, G. Orive, R.M. Hernández, L. Saenz del Burgo, J.L. Pedraz, Review of Advanced Hydrogel-Based Cell Encapsulation Systems for Insulin Delivery in Type 1 Diabetes Mellitus, *Pharmaceutics.*

11 (2019). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11110597>.

[43] A. Sterkers, T. Hubert, V. Gmyr, F. Torres, G. Baud, N. Delalleau, M.C. Vantighem, J. Kerr-Conte, R. Caiazzo, F. Pattou, Islet Survival and Function Following Intramuscular Autotransplantation in the Minipig, *American Journal of Transplantation*. 13 (2013) 891–898. <https://doi.org/10.1111/ajt.12136>.

[44] A. Citro, H.C. Ott, Can We Re-Engineer the Endocrine Pancreas?, *Current Diabetes Reports*. 18 (2018) 122. <https://doi.org/10.1007/s11892-018-1072-7>.

[45] A.A. Arzouni, A. Vargas-Seymour, C.L. Rackham, P. Dhadda, G.-C. Huang, P. Choudhary, N. Nardi, A.J.F. King, P.M. Jones, Mesenchymal stromal cells improve human islet function through released products and extracellular matrix, *Clin. Sci*. 131 (2017) 2835–2845. <https://doi.org/10.1042/CS20171251>.

[46] E.-J. Jung, S.-C. Kim, Y.-M. Wee, Y.-H. Kim, M.Y. Choi, S.-H. Jeong, J. Lee, D.-G. Lim, D.-J. Han, Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells support rat pancreatic islet survival and insulin secretory function in vitro, *Cytotherapy*. 13 (2011) 19–29. <https://doi.org/10.3109/14653249.2010.518608>.

[47] A. Scuteri, E. Donzelli, V. Rodriguez-Menendez, M. Ravasi, M. Monfrini, B. Bonandrini, M. Figliuzzi, A. Remuzzi, G. Tredici, A double mechanism for the mesenchymal stem cells' positive effect on pancreatic islets, *PloS One*. 9 (2014) e84309. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084309>.

## 7. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG UND ANTEILSERKLÄRUNG

„Ich, Hannah Katharina Everwien, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Konstruktion eines *Neo-Pankreas* mittels Dezellularisierung und Rezellularisierung / Construction of a *Neo-Pancreas* using decellularization and recellularization methods“ 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/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Erstbetreuer, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

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

Datum

Unterschrift

## 7.1 Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation als Top-Journal im Rahmen des Promotionsverfahren

Publikation 1: **Everwien H**, Keshi E, Hillebrandt KH, Ludwig B, Weinhart M, Tang P, Beierle AS, Napierala H, Gassner JM, Seiffert N, Moosburner S, Geisel D, Reutzelselke A, Strücker B, Pratschke J, Haep N, Sauer IM. **Engineering an endothelialized, endocrine Neo-Pancreas: Evaluation of islet functionality in an ex vivo model.** Acta Biomater. 2020

Beitrag im Einzelnen: Alleinige Durchführung der Re-Endothelialisierungsversuche, gemeinsame Durchführung der Neo-Pankreasversuche. Auswertung der GSIS-Daten mit Entstehen von Abbildung 11. Mithilfe bei der histologischen Auswertung mit Anfertigung der Abbildungen 3, 6, 8, 9 und 10. Statistische Auswertung der BGA-Daten mit Entstehung von Abbildung 4. Schreiben und Einreichen des Papers, Durchführung der nachträglichen Versuche im Rahmen der Revision, Wiedereinreichen.

---

Unterschrift Hannah Everwien

## 8. AUSZUG AUS DER JOURNAL SUMMARY LIST (ISI Web of KnowledgeSM)

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2018** Selected Editions: SCIE,SSCI  
 Selected Categories: **"ENGINEERING, BIOMEDICAL"** Selected Category  
 Scheme: WoS

**Gesamtanzahl: 80 Journale**

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	Nature Biomedical Engineering	1,540	17.135	0.006440
2	Annual Review of Biomedical Engineering	4,634	12.257	0.004980
3	BIOMATERIALS	109,384	10.273	0.102160
4	MEDICAL IMAGE ANALYSIS	7,694	8.880	0.013370
5	IEEE TRANSACTIONS ON MEDICAL IMAGING	19,545	7.816	0.024990
6	Biofabrication	3,599	7.236	0.006680
<b>7</b>	<b>Acta Biomaterialia</b>	<b>34,157</b>	<b>6.638</b>	<b>0.050150</b>
8	Advanced Healthcare Materials	9,022	6.270	0.023290
9	Photoacoustics	512	5.250	0.001330
10	Journal of Neural Engineering	7,336	4.551	0.012190
11	IEEE TRANSACTIONS ON BIOMEDICAL ENGINEERING	23,794	4.491	0.021670
12	Artificial Cells Nanomedicine and Biotechnology	3,209	4.462	0.003030
13	IEEE Transactions on Biomedical Circuits and Systems	3,380	4.252	0.006910
14	CLINICAL ORAL IMPLANTS RESEARCH	13,819	3.825	0.015930
15	EUROPEAN CELLS & MATERIALS	3,184	3.682	0.003620
16	Journal of NeuroEngineering and Rehabilitation	4,974	3.582	0.008800
17	ARTIFICIAL INTELLIGENCE IN MEDICINE	2,462	3.574	0.002960
18	Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials	9,407	3.485	0.019210
19	IEEE TRANSACTIONS ON NEURAL SYSTEMS AND REHABILITATION ENGINEERING	6,548	3.478	0.008600

1

Selected JCR Year: 2018; Selected Categories: "ENGINEERING, BIOMEDICAL"

## 10. AUSGEWÄHLTE PUBLIKATION

**Everwien H**, Keshi E, Hillebrandt KH, Ludwig B, Weinhart M, Tang P, Beierle AS, Napierala H, Gassner JM, Seiffert N, Moosburner S, Geisel D, Reutzel-Selke A, Strücker B, Pratschke J, Haep N, Sauer IM.

**Engineering an endothelialized, endocrine Neo-Pancreas: Evaluation of islet functionality in an ex vivo model.**

Acta Biomater. 2020;117:213-225.

<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.09.022>.

Epub 2020 Sep 16.

PMID: 32949822































## 11. LEBENS LAUF

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



## 12. KOMPLETTE PUBLIKATIONSLISTE

**Everwien H**, Keshi E, Hillebrandt KH, Ludwig B, Weinhart M, Tang P, Beierle AS, Napierala H, Gassner JM, Seiffert N, Moosburner S, Geisel D, Reutzel-Selke A, Strücker B, Pratschke J, Haep N, Sauer IM. **Engineering an endothelialized, endocrine Neo-Pancreas: Evaluation of islet functionality in an ex vivo model.** Acta Biomater. 2020 Nov;117:213-225. doi: 10.1016/j.actbio.2020.09.022. Epub 2020 Sep 16.

*(Impact Factor: 6,638 im Jahr 2018)*

**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. doi: 10.1016/j.jmbbm.2020.103640. Epub 2020 Jan 14.

*\* Zu gleichen Teilen zum Manuskript beigetragen.*

*(Impact Factor: 3,485 im Jahr 2018)*

Hillebrandt KH, **Everwien H**, Haep N, Keshi E, Pratschke J, Sauer IM. **Strategies based on organ decellularization and recellularization.** Transpl Int. 2019 Jun;32(6):571-585. doi: 10.1111/tri.13462.

*(Impact Factor: 3,526 im Jahr 2018)*

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. doi: 10.1038/srep41777.

*(Impact Factor: 4,44 im Jahr 2017)*



## 13. DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt meinen Mentoren Dr. med. Karl Herbert Hillebrandt und Prof. Dr. med. Igor Sauer aus der Klinik für Chirurgie – Campus Charité Mitte | Campus Virchow-Klinikum der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin für ihre stetige Unterstützung im Rahmen meiner wissenschaftlichen Tätigkeit. Des weiteren danke ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für Experimentelle Chirurgie insbesondere Herrn Peter Tang und Frau Eriselda Keshi, sowie allen Kooperationspartner\*innen, die diese Arbeit erst möglich gemacht haben. Und zuletzt gilt mein besonderer Dank meinen Freund\*innen und meiner Familie, die mich auch auf diesem Weg begleitet haben.