

Aus der Chirurgischen Klinik, Campus Charité Mitte I
Campus Virchow-Klinikum - Charité Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Rezellularisierung perfusionsdezellularisierter Lebermatrices mit
Langerhans-Inseln im Rattenmodell

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Peter Demko
aus Böblingen

Datum der Promotion: 26.06.2022

1 Inhaltsverzeichnis

2	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	4
3	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	5
4	ABSTRACT.....	6
4.1	DEUTSCH.....	6
4.2	ENGLISH.....	7
5	EINLEITUNG.....	9
5.1	DER ABSOLUTE INSULINMANGEL - EIN UNHEILBARES GRUNDLEIDEN.....	9
5.2	MÖGLICHKEITEN DER BETAZELLERSATZTHERAPIE.....	10
5.3	EIN NEUES ORGAN.....	13
5.4	FRAGESTELLUNG.....	16
6	MATERIAL UND METHODEN.....	17
6.1	ETABLIERUNG EINES DRUCKGESTEUERTEN DEZELLULARISIERUNGSPROTOKOLLS.....	17
6.1.1	<i>Versuchsaufbau und Gruppen.....</i>	<i>17</i>
6.1.2	<i>Tiere.....</i>	<i>17</i>
6.1.3	<i>Leberexplantation.....</i>	<i>18</i>
6.1.3.1	Material für Narkoseeinleitung und Operationsverfahren.....	18
6.1.3.2	Narkoseeinleitung und Setup.....	19
6.1.3.3	Operationsverfahren.....	19
6.1.4	<i>Die druckgesteuerte Dezellularisierung.....</i>	<i>25</i>
6.1.4.1	Material und Aufbau für den Dezellularisierungskreislauf.....	25
6.1.4.2	Dezellularisierungsprozess.....	28
6.1.5	<i>Die flussgesteuerte Dezellularisierung.....</i>	<i>29</i>
6.1.5.1	Material und Aufbau des Dezellularisierungskreislaufs.....	29
6.1.5.2	Dezellularisierungsprozess.....	31
6.1.6	<i>Asservierung der Proben.....</i>	<i>31</i>
6.1.7	<i>Kontrollgruppe.....</i>	<i>31</i>
6.1.8	<i>Histologische und immunhistochemische Auswertung.....</i>	<i>32</i>
6.1.8.1	Material für die histologischen und immunhistochemischen Verfahren.....	32
6.1.8.2	Entwässerung, Einbettung in Paraffin und Schnitthanfertigung.....	33
6.1.8.3	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	34
6.1.8.4	Pikro-Siriusrot.....	34
6.1.8.5	Alcianblau-PAS.....	34
6.1.8.6	Collagen IV, Laminin und Fibronectin.....	34
6.1.8.7	Lichtmikroskopische Untersuchung.....	35
6.1.9	<i>Biochemische Auswertung.....</i>	<i>35</i>
6.1.9.1	Material für die biochemische Auswertung.....	36
6.1.9.2	DNA.....	37

6.1.9.3	SDS	37
6.1.9.4	sGAG.....	37
6.1.9.5	Statistik.....	37
6.2	REZELLULARISIERUNG DER LEBERMATRICES MIT LANGERHANS-INSELN	38
6.2.1	<i>Versuchsaufbau und Gruppen</i>	38
6.2.2	<i>Tiere</i>	38
6.2.3	<i>Gewinnung der Lebermatrix im Rattenmodell</i>	38
6.2.4	<i>Inselzellisolation</i>	39
6.2.4.1	Material für die Inselzellisolation	39
6.2.4.2	Narkoseeinleitung und Setup	41
6.2.4.3	Pankreasexplantation.....	41
6.2.4.4	Aufreinigung der Pankreata und Isolierung der Inselzellen.....	42
6.2.4.5	Auszählung.....	43
6.2.5	<i>Rezellularisierung</i>	44
6.2.5.1	Material für die Rezellularisierung	44
6.2.5.2	Rezellularisierung per Infusionspumpe	44
6.2.5.3	manuelle Rezellularisierung	45
6.2.5.4	Asservierung von Proben	45
6.2.6	<i>Histologische Auswertung der rezellularisierten Matrices</i>	45
6.2.6.1	Material für die histologische Auswertung.....	46
6.2.6.2	HE-Färbung.....	46
6.2.6.3	AZAN-Färbung	46
6.2.6.4	Lichtmikroskopische Beurteilung.....	46
7	ERGEBNISSE	48
7.1	BEOBSACHTUNGEN WÄHREND DES DEZELLULARISIERUNGSPROZESSES.....	48
7.2	HISTOMORPHOLOGISCHE UND IMMUNHISTOCHEMISCHE EVALUATION DES DEZELLULARISIERUNGSPROZESSES	49
7.3	QUANTITATIVE BIOCHEMISCHE EVALUATION DES DEZELLULARISIERUNGSPROZESSES	52
7.3.1	<i>DNA-Gehalt</i>	52
7.3.2	<i>sGAG-Gehalt</i>	52
7.3.3	<i>SDS-Gehalt</i>	53
7.4	BEOBSACHTUNGEN WÄHREND DES REZELLULARISIERUNGSPROZESSES.....	54
7.5	HISTOLOGISCHE EVALUATION DER REZELLULARISIERTEN MATRICES.....	55
8	DISKUSSION	62
8.1	DIE NOTWENDIGKEIT EINES INSULINPRODUZIERENDEN NEO-ORGANS.....	62
8.2	DIE DEZELLULARISIERUNGSVERSUCHE	62
8.3	DIE REZELLULARISIERUNGSVERSUCHE	66
8.4	LIMITATIONEN UND AUSBLICK	69
9	LITERATURVERZEICHNIS	72
10	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.....	79

11	LEBENS LAUF.....	80
12	DANKSAGUNG.....	81

2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: OP-Situs mit freigelegter portaler Trias..	21
Abbildung 2: OP-Situs nach intraportaler Infusion von Ringer-Lösung.	22
Abbildung 3: OP-Situs mit zur Kanülierung vorbereitetem Truncus coeliacus.....	24
Abbildung 4: Schema des druckgesteuerten Perfusionskreislaufs.....	26
Abbildung 5: Eine Rattenleber im Bioreaktor.....	27
Abbildung 6: Der vollständig aufgebaute Perfusionskreislauf.....	28
Abbildung 7: Schema des flussgesteuerten Perfusionskreislaufs.	30
Abbildung 8: Schema der dezellularisierten Lebermatrix.	39
Abbildung 9: Lebermatrix nach vollendeter druckgesteuerter Dezellularisierung.....	49
Abbildung 10: HE-Färbung einer druckgesteuert dezellularisierten Leber.	50
Abbildung 11: Histologie und Immunhistochemie des Dezellularisierungserfolges...	51
Abbildung 12: DNA-Gehalt in µg/ml nach stattgefundenener Dezellularisierung.	52
Abbildung 13: sGAG-Gehalt in µg/ml nach stattgefundenener Dezellularisierung.....	53
Abbildung 14: SDS-Gehalt nach stattgefundenener Dezellularisierung.	54
Abbildung 15: HE-Färbung einer über die Pfortader rezellularisierten Matrix.	56
Abbildung 16: HE-Färbung einer über den Gallengang rezellularisierten Matrix.....	57
Abbildung 17: HE-Färbungen der rezellularisierten Organmatrices.	58
Abbildung 18: AZAN-Färbung einer über die Pfortader rezellularisierten Matrix.....	59
Abbildung 19: AZAN-Färbung einer über den Gallengang rezellularisierten Matrix..	60
Abbildung 20: AZAN-Färbungen der rezellularisierten Organmatrices.....	61

3 Abkürzungsverzeichnis

AHP	Arteria hepatica propria
AZAN	Azokarmin & Anilinblau-Orange
DAB	Diaminobenzidin
DHC	Ductus hepaticus communis
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid
FBS	fetal bovine serum
HE	Hämatoxylin & Eosin
HEPES	Hydroxyethylpiperazinylthansulfonsäure
IDF	International Diabetes Federation
LHC	Lobus hepatis caudatus
LHDL	Lobus hepatis dexter lateralis
LHM	Lobus hepatis medialis
LHSL	Lobus hepatis sinister lateralis
MODY	Maturity Onset Diabetes of the Young
PBS	phosphate-buffered saline
SDS	sodium dodecyl sulfate
sGAG	Sulfatierte Glykosaminoglykane
VP	Vena portae

4 Abstract

4.1 Deutsch

Diabetes mellitus Typ 1, Gendefekte und Erkrankungen des exokrinen Pankreas führen über den Untergang oder die Funktionsstörung der Langerhans-Inseln zu einem absoluten Insulinmangel und machen eine lebenslange Insulinsubstitution notwendig. Trotz optimaler Substitutionstherapie drohen akute glykämische Entgleisungen und diabetische Spätkomplikationen. Die isolierte Inselzell-Transplantation über die Pfortader stellt einen innovativen Therapieansatz dar, führt jedoch aufgrund von Thrombosierungen häufig zum Untergang der transplantierten Zellen. Deswegen wird die Verwendung alternativer Trägermedien diskutiert. Die Perfusionsdezellularisierung bietet ein Verfahren, aus ganzen Organen nicht-immunogene Matrices herzustellen, deren extrazelluläre Architektur jedoch erhalten ist. Die Leber bietet zudem den Vorteil von drei möglichen afferenten Rezellularisierungswegen. Sie könnte als Grundlage für ein implantierbares Neo-Organ dienen. Um auf diese Weise eine womöglich längere Insulinfreiheit zu gewährleisten, wurde in der vorliegenden Arbeit ein experimenteller Ansatz versucht, in dem Langerhans-Inseln in das Parenchym dezellularisierter Rattenlebern überführt wurden.

Es wurde zunächst ein Protokoll zur Perfusionsdezellularisierung von Rattenlebern etabliert. Hierzu wurden unter ondulierenden Druckverhältnissen in einem Bioreaktor die Organe bei einem konstanten Perfusionsdruck von 100mmHg über die Arteria hepatica propria mit 1% SDS und 1% Triton-X-100 perfundiert. Der Dezellularisierungserfolg wurde histologisch mittels HE-, Pikrosiriusrot- und Alcianblau-PAS-Färbung, immunhistochemisch mit Nachweis von Collagen IV, Fibronectin und Laminin und quantitativen biochemischen Analysen von DNA-, sGAG- und SDS-Gehalt beurteilt. Anschließend wurden Inselzellen aus Rattenpankreatata isoliert und in die gewonnenen Matrices über die Pfortader oder alternativ über den Gallengang infundiert. Die histologischen Verteilungsmuster wurden anschließend nach HE- und AZAN-Färbungen miteinander verglichen.

Das durchgeführte Dezellularisierungsprotokoll führte zu einer zufriedenstellenden Dezellularisierung. Histologisch zeigten sich keine verbliebenen Zellen bei erhaltener Extrazellulärmatrixarchitektur. Immunhistochemisch konnte nachgewiesen werden,

dass die molekularen Matrixbestandteile erhalten blieben. Biochemisch kam es adäquat zu einem Abfall des DNA-Gehaltes und einem Anstieg des sGAG-Gehaltes bei vorhandenen SDS-Residuen. Die Inselzellinfusion über den Gallengang führte zu histologisch nachweisbaren Inselzellen im Parenchym und damit zu einer freien Verteilung der Langerhans-Inseln innerhalb der dezellularisierten Lebermatrix.

Es ist gelungen, Langerhans-Inseln in das Parenchym einer dezellularisierten Rattenleber zu verbringen. Die Inselzellen befinden sich somit in einer physiologischen Extrazellulärmatrix, die über afferente und efferente Blutgefäße versorgt werden kann. So können in weiteren *in-vitro*-Versuchen die Viabilität und Funktion der infundierten Inselzellen untersucht werden. Perspektivisch eröffnet sich die Möglichkeit von *in-vivo*-Versuchen, in denen die Auswirkungen einer Implantation eines solchen Neo-Organs auf den Glucosestoffwechsel diabetischer Empfänger untersucht werden.

4.2 English

Patients with loss or failure of pancreatic islets of Langerhans require life-long treatment with insulin for survival and despite receiving optimal state of the art therapy, they are still at risk of suffering potentially lethal acute glycemic events or long-term complications of diabetes. One of several relatively new approaches regarding this issue is the transplantation of isolated islets into the recipient's portal vein. However, due to thrombotic events and subsequent loss of the transplanted islets long-term insulin independence is rarely reached.

Perfusion decellularization generates non-immunogenic extracellular matrices of whole organs. A decellularized liver scaffold comes with three vascular systems and could serve as the basic structure of an implantable neo-organ, containing islets that might grant long-term insulin independence. This study is an attempt to transport isolated islets of Langerhans into the parenchymatous tissue of a decellularized rat liver.

At first, a protocol for perfusion decellularization of rat livers was established using oscillating pressure conditions within a bioreactor and applying a constant perfusion pressure of 100mmHg on the hepatic artery. Perfusion was carried out using 1%

SDS and 1% Triton-X-100 solution. The decellularization outcome was assessed by histological stainings, immunohistochemistry and biochemical analysis.

Secondly, rat islets were isolated and infused into the liver scaffolds using two different routes: via the portal vein and via the hepatic duct. Afterwards their distribution was assessed histologically using H&E and AZAN stainings.

The utilized protocol led to a satisfactory decellularization. Histological stains showed no remaining cells within a structurally intact extracellular environment.

Immunohistochemical stains indicated that the molecular components of the extracellular matrix had been preserved. Biochemical analysis showed an adequate decrease of DNA content while sGAG contents increased and SDS remained detectable. The islet infusion via the hepatic duct led to histologically visible islets within the parenchyma and therefore to an unrestricted distribution inside the decellularized liver scaffold.

Islets of Langerhans were successfully transported inside the parenchyma of a decellularized rat liver. It fits a physiological environment with extracellular matrix components with afferent and efferent blood vessels. Thus, further *in vitro* studies can be performed studying the viability and function of the infused islets. Subsequent *in vivo* studies could be possible in order to assess the effect of an implantation of such a neo-organ on the glucose metabolism of diabetic animals.

5 Einleitung

5.1 Der absolute Insulinmangel - ein unheilbares Grundleiden

Die Regulation des Blutzuckers im menschlichen Organismus erfolgt über das so genannte Inselorgan, die Gesamtheit der endokrinen Zellen des Pankreas. Diese Zellen sind in Clustern organisiert, die uneinheitlich unter anderem als Langerhans-Inseln oder Inselzellen bezeichnet werden. Auch wenn es sich nicht um einzelne Zellen, sondern um Zellansammlungen handelt, wird im Folgenden aus Gründen der Kürze und Übersichtlichkeit von Inselzellen gesprochen.

Der Verlust oder die Fehlfunktion dieser Inselzellen führen durch einen absoluten Insulinmangel zu Störungen der Blutzuckerhomöostase, die sowohl akut lebensbedrohlich sein können als auch langfristig zahlreiche schwere Folgeerkrankungen nach sich ziehen. Zu den häufigsten Langzeitkomplikationen gehören Makroangiopathien wie die Koronare Herzkrankheit, die diabetische Nephropathie, die diabetische Neuropathie, die diabetische Retinopathie und das diabetische Fußsyndrom. In jedem Fall machen fehlende oder funktionsuntüchtige Inselzellen eine lebenslange Insulinsubstitution notwendig (1, 2).

Ein auf Verlust oder Fehlfunktion der Inselzellen beruhender Insulinmangel kann verschiedene Gründe haben. Beim Maturity Onset Diabetes of the Young (MODY) und seinen Subtypen führen verschiedene Gendefekte zu einer gestörten Funktion der insulinproduzierenden Betazellen, die etwa 70% des Inselzellvolumens ausmachen (3). Beim pankreopriven Diabetes mellitus Typ 3c führen entweder eine Pankreatektomie oder Erkrankungen des exokrinen Teils des Organs, wie beispielsweise eine chronische Pankreatitis, Malignome, zystische Fibrose oder Hämochromatose, zum Verlust des Inselorgans (4-7). Diabetes Typ 1 wiederum ist durch einen meist autoimmun vermittelten, irreversiblen Untergang der insulinbildenden beta-Zellen charakterisiert (8, 9).

Die International Diabetes Federation mit Sitz in Brüssel bezifferte im Jahr 2019 in der neunten Ausgabe des IDF Diabetes Atlas die weltweite Prävalenz von Diabetes mellitus Typ 1 mit 600 900 Fällen in der Altersgruppe von 0 bis 14 Jahren. Die globale absolute Inzidenz lag bei 98 200, wobei Deutschland mit einer Inzidenz von 2600 Fällen im weltweiten Vergleich die achtgrößte absolute Inzidenz aufwies (10).

Im Jahre 2016 lebten in Deutschland etwa 340 000 Erwachsene mit Diabetes mellitus Typ 1 (11).

Seit der Entdeckung des Insulins im Jahre 1921 konnte unter Zuhilfenahme von Insulinanaloga und sensorgesteuerten Pumpsystemen das Auftreten diabetesassoziierter Komplikationen zwar reduziert werden, allerdings weisen Patienten mit teilweise erhaltener endogener Insulinproduktion immer noch seltener Langzeitkomplikationen auf als Patienten ohne eine eigene Rest-Insulinproduktion unter optimaler Therapie. Es ist zudem bislang weder gelungen, bei diagnostizierter Erkrankung den Untergang der beta-Zellen zu verlangsamen oder zu verhindern, noch die Bildung neuer beta-Zellen herbeizuführen. Die Behebung der Ursache und somit Heilung dieser Erkrankung ist somit bislang nicht möglich (12-17).

Erkrankte sind nach wie vor nicht nur zu einer lebenslangen Insulinsubstitution gezwungen, die eine erhebliche psychosoziale Belastung darstellen kann (18, 19), sie müssen trotz optimaler Therapie schwere Langzeitkomplikationen fürchten, die regelmäßig mit hohem Leidensdruck, Behinderungen oder dem Tod einhergehen (20).

5.2 Möglichkeiten der Betazellersatztherapie

Im Bestreben den oben genannten Krankheitsbildern eine langfristige Therapie entgegenzustellen erfolgte im Jahre 1966 an der Universität Minnesota, USA, die Durchführung der ersten Pankreastransplantation. Seither hat sich dieser Behandlungsansatz weltweit etabliert (21).

Aufgrund der notwendigen lebenslangen immunsuppressiven Therapie und dem Mangel an geeigneten Spenderorganen erfolgt der Eingriff jedoch selten isoliert. Die aktuelle S3-Leitlinie "Therapie des Typ-1-Diabetes" der Deutschen Diabetes Gesellschaft formuliert eine Empfehlung mit dem Grad B zur Prüfung einer kombinierten Nieren- und Pankreastransplantation für alle Patienten mit Typ-1-Diabetes und (prä-)terminaler Niereninsuffizienz, da hier ohnehin eine immunsuppressive Therapie vonnöten ist (22).

Die 5-Jahres-Funktionsrate des Pankreastransplantats liegt bei über 80%, wobei die Insulinfreiheit das ausschlaggebende Kriterium ist. Es konnte nach diesen Kombinationseingriffen insgesamt aber auch eine langfristig verbesserte Funktion der

transplantierten Niere als auch eine bessere Überlebens- und niedrigere Langzeitkomplikationsrate nachgewiesen werden (21, 23). Bei Patienten ohne Indikation zur Nierentransplantation empfiehlt die Deutsche Diabetes Gesellschaft die Prüfung einer so genannten Betazellersatztherapie erst nach Ausschöpfung aller konservativen Therapiemaßnahmen inklusive technischer Hilfsmittel und einer weiter persistierenden schweren metabolischen Instabilität (22). Der verwendete Begriff der Betazellersatztherapie verweist hier auf einen weiteren Weg, das Inselorgan zu transplantieren:

Aufgrund der Invasivität und des daraus resultierenden hohen OP-Risikos kommen nur wenige Patienten für eine Pankreastransplantation in Frage. Nur wenn ein Patient eine ausreichende kardiovaskuläre Belastbarkeit aufweist und die allgemeinen Transplantationskriterien erfüllt, kann eine Abwägung von Risiko und Nutzen einer Pankreastransplantation erfolgen. Diese kardiovaskuläre Belastbarkeit ist häufig nicht gegeben, da die gestörte Blutzuckerregulation oft eine koronare Herzerkrankung bedingt und damit die Folge des Grundleidens die Therapie desselben ausschließen kann. Pankreastransplantationen ziehen häufig postoperative Komplikationen nach sich, da das exokrine Gewebe bei kleinster Manipulation zur Autodigestion und Entzündung neigt (24, 25).

Aus diesen Gründen wurden seit den Anfängen der Pankreastransplantation auch weniger invasive Methoden verfolgt. Im Jahre 2000 veröffentlichten Shapiro et al. mit dem nach seinem Publikationsort benannten Edmonton-Protokoll erstmalig eine klinisch anwendbare Methode der allogenen Inselzelltransplantation. Hierbei wurden jeweils aus Spenderpankreaten durch enzymatischen Verdau große Mengen an Inselzellen von den exokrinen Anteilen des Pankreas isoliert und in die Pfortader des Empfängers infundiert. Als Immunsuppressiva wurden anstelle von Kortikosteroiden Sirolimus und Tacrolimus sowie der anti-CD25-Antikörper Daclizumab eingesetzt (26). Alle sieben Patienten blieben für mehr als ein Jahr insulinunabhängig und obwohl nach fünfjährigem Follow-up die Mehrheit der Patienten wieder insulinpflichtig war, blieb die C-Peptid-Sekretion ausreichend hoch, um diese Patienten vor lebensbedrohlichen Hypoglykämien zu schützen (27).

Während in Deutschland aufgrund komplexer gesetzlicher Regelungen lediglich etwa 10 Inselzelltransplantationen pro Jahr stattfinden, stellt das Verfahren mittlerweile in vielen europäischen Ländern eine etablierte Methode dar (22). Als Implantationsort hat sich die Pfortader als Goldstandard bewährt: Mittels minimalinvasiven Zugangs und ohne die Notwendigkeit einer Allgemeinanästhesie kann hier bei niedrigem Komplikationsrisiko die Inselzelltransplantation innerhalb eines kurzen stationären Aufenthaltes erfolgen. In Bezug auf die Vermeidung lebensbedrohlicher metabolischer Entgleisungen oder diabetesbedingter Langzeitkomplikationen konnten mithilfe der Inselzelltransplantation mit und ohne simultan durchgeführter Nierentransplantation ähnlich positive Effekte erzielt werden wie nach einer Pankreastransplantation. Allerdings ist die Inselzelltransplantation der Pankreastransplantation in Bezug auf die langfristige Insulinunabhängigkeit nach wie vor deutlich unterlegen. Es wird davon ausgegangen, dass 60% der transplantierten Inselzellen innerhalb von Minuten bis Stunden absterben (28-30).

Ursachen hierfür ergeben sich aus Anatomie und Physiologie der Inselzelle: Hierbei handelt es sich um Zellcluster, die jeweils aus mehreren Tausend einzelner Zellen bestehen, einen Durchmesser von 50-200µm haben und über das gesamte Pankreas verteilt sind (31). Neben den bereits erwähnten insulinproduzierenden beta-Zellen enthalten diese Zellcluster Glukagon produzierende alpha-Zellen und Somatostatin produzierende delta-Zellen (32, 33). Im Pankreas eines Erwachsenen finden sich ca. 1 Million Inselzellen. Sie machen damit lediglich 1-2% des Gesamtvolumens des Pankreas aus, erhalten jedoch 15-20% seines arteriellen Blutflusses (31, 34). Jede einzelne Langerhans-Insel wird durch eine Arteriole versorgt, die durch ein fenestriertes Netzwerk auch mit den innenliegenden Zellen einen kontinuierlichen Stoffaustausch gewährleistet (35). Die Hormonausschüttung wird durch sympathische und parasympathische Nervenfasern beeinflusst (36).

Wie alle Zellen des Körpers sind Inselzellen und ihre Bestandteile in die umgebende Extrazellulärmatrix (EZM) eingebunden. Diese extrazelluläre Matrix dient dabei nicht nur als physisches Strukturgerüst. Obwohl die einzelnen Mechanismen bisher nur wenig verstanden werden, konnte gezeigt werden, dass Inselzellen über eine Vielzahl an Membranrezeptoren mit verschiedenen Bestandteilen des aus Peptiden und Polysacchariden bestehenden Netzwerks kommunizieren. So werden Adhäsion,

Migration, Proliferation, Insulin-Sekretion und Apoptose von Bestandteilen der Extrazellulärmatrix beeinflusst (31, 37, 38). Zellkulturversuche zeigen beispielsweise, dass beta-Zellen in Abwesenheit von Laminin kaum Insulin produzieren (39). Die Interaktion zu perivaskulären Basalmembranen scheint zudem eine wichtige Rolle für Adhäsion und Migration von Inselzellen zu spielen (31, 40).

Die Inselzelltransplantation bedeutet eine Herauslösung aus dieser physiologischen Umgebung. Zusätzlich werden die Inselzellen während des Isolationsvorganges mechanischem, osmotischem und enzymatischem Stress ausgesetzt (41). An ihrem Transplantationsort ist die Extrazellulärmatrix mit ihrer Stützfunktion und den vielfältigen Bestandteilen, die für Adhäsion, Funktion und Proliferation der Inselzellen essenziell sind, nicht mehr vorhanden. (30). Statt sauerstoffreicher, arterieller Blutversorgung werden die hypoxieanfälligen Inselzellen nun von sauerstoffarmen portalvenösem Blut umspült. Schließlich sorgen immunologischer Stress und thrombembolische Ereignisse innerhalb der Verzweigungen des Pfortadernetzes für weiteren Zelluntergang (42).

5.3 Ein neues Organ

Um ein besseres Überleben der Inselzellen und damit ein optimales Anwachsen des Transplantates im Organismus sicherzustellen, müssen am Implantationsort ein ausreichender Blutfluss sowie möglichst viele Bestandteile der physiologischen Extrazellulärmatrix vorhanden sein.

Die Regenerative Medizin versucht bereits seit mehreren Jahren mittels tissue engineering funktionstüchtige Organe unter Laborbedingungen herzustellen, um dem stetig wachsenden Bedarf an transplantierbaren Organen zu begegnen, die für zahlreiche Patienten mit beispielsweise Nieren- oder Herzinsuffizienz oder chronisch obstruktiver Lungenerkrankung Heilung versprechen (43, 44). In der Natur entstehen Organe, indem Zellen proliferieren, ihre umgebende Extrazellulärmatrix aufbauen und von dieser wiederum verschiedene Stimuli zur Proliferation und Differenzierung erhalten (45). Es liegt also nahe, eine physiologische Extrazellulärmatrix mit ihren molekularen Bestandteilen, aber auch mit ihrem vaskulärem System als Grundgerüst

zu verwenden, um in ihr verschiedenen Zellpopulationen eines Organes ähnlich einer Zellkultur heranzuzüchten.

Zur Gewinnung einer solchen Extrazellulärmatrix werden Organe oder Gewebe herztoter Spender dezellularisiert. Dies bedeutet, dass sämtliches Zellmaterial aus ihnen entfernt wird, ohne dass die Zusammensetzung oder die Struktur der Extrazellulärmatrix verändert wird. Dies kann beispielsweise durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen, enzymatischen Verdau oder chemische Verfahren bewerkstelligt werden (46-51). Auf diese Art gewonnene Matrices haben den Vorteil, nicht-immunogen zu sein. Obwohl bisher kein komplettes funktionstüchtiges Organ implantiert werden konnte, wurden auf diesem Gebiet in den vergangenen Jahren vielversprechende Fortschritte gemacht (52-54).

Eine Methode, die in unserer Arbeitsgruppe für die Dezellularisierung von Organen etabliert ist, stellt die Perfusion mit verschiedenen Tensiden dar. Das Organ wird über afferente Blutgefäße mit Triton X-100 und Sodiumdodecylsulfat (SDS) perfundiert, die beide die aus Lipiden bestehenden Zell- und Zellkernmembranen zerstören (55). Auf diese Weise konnten beispielsweise Rattenlebern bereits dezellularisiert und anschließend mit Endothelzellen und Hepatozyten wiederbesiedelt und so metabolisch funktionstüchtiges Gewebe gewonnen werden (49). Ein dezellularisiertes Rattenpankreas, das mit humanen Langerhans-Inseln rezellularisiert wurde, konnte nach Implantation in diabetischen Ratten Euglykämie herstellen (56).

Da Inselzellen physiologischerweise nur einen Bruchteil des Zellvolumens des Pankreas ausmachen, steht bei einer Rezellularisierung eine sehr kleine Zahl an Inselzellen einem riesigen Volumen an Extrazellulärmatrix gegenüber. Zudem handelt es sich beim Pankreas um ein in seiner strukturellen Integrität instabiles Organ. Seine unscharfe Begrenzung und gallertartige Beschaffenheit erschweren die Handhabung und machen jedwede Arbeit damit sehr störanfällig (57).

Es erschien deshalb sinnvoll, die dezellularisierte Extrazellulärmatrix eines kompakteren Organs zu nutzen, mit dem Ziel, letztendlich ein neues Organ zu schaffen, das lediglich den endokrinen Teil des Pankreas enthält und dennoch über

ein vaskuläres System und eine physiologische Extrazellulärmatrix verfügt. Die Wahl fiel in diesem Projekt auf die Rattenleber, da sie auch nach der Dezellularisierung eine kompakte, in Lappen klar unterteilte Makrostruktur aufweist, über mehrere vaskuläre Zugangswege verfügt und mikrostrukturell in weiträumigen Sinusoiden organisiert ist, die theoretisch genügend Platz für infundierte Inselzellen bieten (58).

Die Perfusionsdezellularisierung von Rattenlebern ist in unserer Arbeitsgruppe seit mehreren Jahren eine etablierte Methode. Die Leber einer adulten Wistar-Ratte wiegt im Durchschnitt ca. 15g und hat ein Fassungsvermögen von ca. 20ml. Sie gliedert sich in 6 Lappen: die beiden größten sind der linke, laterale Leberlappen (lobus hepatis sinister lateralis LHSL) und der mediale Leberlappen (lobus hepatis medialis LHM), der sich aus dem rechten und linken medialen Leberlappen zusammensetzt. Deutlich kleiner sind der rechte, laterale Leberlappen (lobus hepatis dexter lateralis LHDL) und der ebenfalls aus 2 Teilen bestehende kaudale Leberlappen (lobus hepatis caudatus et quadratus LHC). Der physiologische Blutfluss über die Pfortader (Vena portae VP) beträgt 10ml/min, der über die Leberarterie (Arteria hepatica propria AHP) 2ml/min. Die Ratte verfügt nicht über eine Gallenblase. Der Ductus hepaticus communis DHC mündet ins Duodenum (58).

Im Jahr 2017 zeigten Mitglieder unserer Arbeitsgruppe dass die Perfusion mit 1% SDS gefolgt von 1% Triton X-100 über die Arteria hepatica propria bessere Ergebnisse erzielt als die Perfusion über die Pfortader. Zudem konnte der positive Effekt von ondulierenden Druckverhältnissen auf den Dezellularisierungsprozess nachgewiesen werden (59).

Protokolle, die zur Perfusionsdezellularisierung SDS und Triton-X-100 verwenden, wurden bereits zuvor von Harald C. Ott et al. von der Harvard Medical School publiziert (51). Die Kollegen beobachteten, dass sich der Perfusionsdruck bei einer festen Flussrate im Laufe des Dezellularisierungsprozesses vermindert und schlossen daraus auf eine mögliche Schädigung der Basallamina. Sie etablierten Dezellularisierungsprotokolle für Herzen, Lungen und Nieren verschiedener Spezies, basierend auf konstantem Druck, der allein durch die Gravitation mit Hilfe erhöht hängender Detergenzienflaschen aufrechterhalten wird. Einer initialen Spülung mit PBS mit einer Flussrate von 2ml/min schloss sich eine gravitationsgestützte

Perfusion mit 1% SDS für 2-12h an, und hieran eine ebensolche Perfusion mit 1% Triton X-100 für 15-30min. Anschließend wurde das Organ erneut für 3-5 Tage mit PBS und Antibiotika gespült. Dies habe nicht nur zufriedenstellende Ergebnisse bezüglich der Dezellularisierung hervorgebracht, die Perfusion mit Triton X-100 nach der Perfusion mit SDS habe zudem für niedrigere bis nicht nachweisbare SDS-Konzentrationen in der dezellularisierten Organmatrix geführt (51).

Im Hinblick auf eine beabsichtigte Kultivierung von Inselzellen innerhalb der gewonnenen Matrix sind eine intakte Basallamina und die Abwesenheit zytotoxischer Residuen nach dem Dezellularisierungsprozess wünschenswert. Insofern sollen die von Ott et al. publizierten Prinzipien auf das bereits in unserer Arbeitsgruppe etablierte Verfahren angewendet werden.

5.4 Fragestellung

In der vorliegenden experimentellen Arbeit soll im Rattenmodell zunächst ein verlässliches Dezellularisierungsprotokoll auf Basis eines konstanten Perfusionsdruckes etabliert werden, das zudem eine Perfusion mit Triton-X-100 nach der Perfusion mit SDS vorsieht, um einerseits eine möglichst intakte Extrazellulärmatrix zu erhalten und andererseits potentiell zytotoxische SDS-Rückstände in der Matrix zu minimieren.

Die so hergestellten Organmatrices sollen dann mit zuvor aus Spenderpankreatia isolierten Inselzellen wiederbesiedelt werden. Hierbei sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1) Führt eine Perfusionsdezellularisierung einer Rattenleber mit SDS und Triton-X-100 und einem Perfusionsdruck von 100mmHg über die A. hepatica propria unter ondulierenden Druckverhältnissen zu einem zufriedenstellenden Dezellularisierungsergebnis?

2) Können in eine so dezellularisierte Lebermatrix zuvor isolierte Langerhans-Inseln infundiert und anschließend im Parenchym nachgewiesen werden?

6 Material und Methoden

6.1 Etablierung eines druckgesteuerten Dezellularisierungsprotokolls

6.1.1 Versuchsaufbau und Gruppen

Zum Vergleich eines druckgesteuerten mit einem flussgesteuerten Dezellularisierungsprotokoll erfolgte zunächst die Explantation von 12 Rattenlebern am lebenden, narkotisierten Tier mit kanülierter Pfortader, A. hepatica propria, V. cava und kanüliertem Gallengang. Diejenigen Lebern, die nach einem Drucksteuerungs-basierten Protokoll dezellularisiert wurden, bildeten Gruppe 1 mit n=6. Weiter bildeten diejenigen Lebern, die nach dem von Struecker et al. bereits zuvor publizierten und in unserer Arbeitsgruppe etablierten auf einer Flusssteuerung basierenden Protokoll dezellularisiert wurden, die Gruppe 2 mit n=3. Die Kontrollgruppe 3 mit ebenfalls n=3 bestand aus Lebern, die nach ihrer Explantation ohne weitere Behandlung als Nativproben asserviert wurden. Die Auswertung erfolgte als semiquantitative histologische und immunhistochemische Auswertung sowie als quantitative Analyse über die Ermittlung des residuellen DNA-, sGAG- und SDS-Gehaltes.

6.1.2 Tiere

Es wurden insgesamt 12 Ratten (Lewis eGFP und Wistar Han) mit einem Gewicht von jeweils 300 bis 450g verwendet. Die Tiere wurden von der Firma Harlan-Winkelmann (Borchen, Deutschland) bezogen.

Die Tierhaltung erfolgte in den hierfür zertifizierten Forschungseinrichtungen für Experimentelle Medizin der Charité am Campus Virchow-Klinikum in Makrolon Typ-4-Käfigen in Gruppen von 3 bis 5 Tieren. Die Raumtemperatur betrug durchgehend 20-24°C, die relative Luftfeuchte 45-65%, die Luftwechselrate 15-20/h und die Helligkeit im Käfig <60 Lux bei einem Hell-Dunkel-Wechsel von 12:12 Stunden. Die Tiere erhielten ein Alleinfutter mit mittlerem Energiegehalt in Pelletform (Ssniff, Art.-Nr. V1535-000) und Wasser ad libitum.

Sämtliche Tierversuche wurden zuvor durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin unter den Antragsnummern O0262/13 und O0365/11 genehmigt.

6.1.3 Leberexplantation

6.1.3.1 Material für Narkoseeinleitung und Operationsverfahren

Chirurgische Schere, gebogen, 41mm (Fine Science Tools, Art.-Nr. 1405-12)

Federschere 8mm (Fine Science Tools, Art.-Nr. 15024-10)

Nadelhalter Castroviejo (Fine Science Tools, Art.-Nr.12075-12)

2 Arterienklemmen, ultrafein (Fine Science Tools, Art.-Nr. 13021-12)

Chirurgische Pinzette (Fine Science Tools, Art.-Nr. 11021-15)

2x Mikropinzette, gerade, glatt (Fine Science Tools, Art.-Nr.11254-20)

Mikropinzette, gebogen, glatt (Fine Science Tools, Art.-Nr. 11272-30)

Mikropinzette, gebogen, mit Verzahnung (Fine Science Tools, Art.-Nr.11370-31)

Narkosegerät (Drägerwerk AG Lübeck, Modell Sulla 808)

Begasungskammer (Eigenbau)

Operationsmikroskop (Leica Microsystems, Modell M651)

Präzisionswaage (Ohaus Corporation, Modell Scout Pro SPU2001)

Korkplatte

Venenverweilkanülen 16, 18, 24G (BD, Venflon™ Pro Safety)

Injektionsspritzen 1, 10 und 20 ml (BD Discardit™ II)

Injektionskanülen (BD Microlance™ 3)

21G-Butterfly (BD Vacutainer ®)

Schlauchstück aus Polyethylen 0,58/0,96mm (Smiths Medical™ TWR 990-555U)

Urinbecher (Greiner Bio-One, Art.-Nr. 724461)

Nahtmaterial Fadenstärke 4-0 (Ethicon, Art.-Nr. K871 H)

Wattestäbchen 5 mm (HGV Verbandstoffe GmbH, Art.-Nr. 810100)

Mullkompressen unsteril 10x10cm (Paul Hartmann Ges.m.b.H., Art.-Nr. 4110640)

Abdecktücher (Medline SAS, Art.-Nr. ES15221CE)

Rollenpflaster 5 cm (BSN Medical, Art.-Nr. 0103200)

Ketamin 100 mg/ml (CP Pharma GmbH)

Medetomidinhydrochlorid 1 mg/ml (Orion Pharma GmbH)

Metamizol 500 mg/ml (Ratiopharm GmbH)

Isofluran 1 ml/ml (CP Pharma GmbH)

Ringer-Lösung (B. Braun Melsungen AG)

NaCl-Lösung (B. Braun Melsungen AG)

6.1.3.2 Narkoseeinleitung und Setup

Die Narkoseeinleitung erfolgte bei jedem Spendertier zunächst als Inhalationsnarkose mit 3,5 % Isofluran. Hierzu wurde das Tier für 2-6 Minuten in eine Begasungskammer gesetzt. Die Applikationsdauer orientierte sich hierbei vor allem am klinischen Sedierungsgrad des Tieres. Nachdem im Anschluss das Gewicht des Tieres ermittelt wurde, erfolgte die zusätzliche subkutane Injektion von Ketamin (10 mg/kgKG), Medetomidinhydrochlorid (0,1 mg/kgKG) sowie Metamizol (100 mg/kgKG) in die Nackenfalte. Das Tier wurde am gesamten Abdomen rasiert und mittels Pflaster und Injektionskanülen unterhalb des Operationsmikroskops auf einer mit einem Abdecktuch bespannten Korkplatte in Rückenlage fixiert. Über eine Gesichtsmaske erfolgte während der Operation die kontinuierliche Applikation von 1,5 % Isofluran und 0,8 l/min Sauerstoff sowie die Absaugung der Ausatemluft. Vor der ersten Inzision wurde die ausreichende Sedation und Analgesie mittels Prüfung des Zwischenzehenreflexes kontrolliert.

6.1.3.3 Operationsverfahren

Die vorgesehenen Dezellularisierungs- und Rezellularisierungsversuche stellten eine Reihe von Anforderungen an das explantierte Organ: Die Leber sollte an einen Perfusionskreislauf angeschlossen und manuell mit einer Spritze über verschiedene Routen perfundiert werden können, was verschließbare Ein- und Austrittspforten erforderlich machte. Aus diesem Grund erfolgte eine Kanülierung des Truncus coeliacus als Zugang zur A. hepatica propria, der V. portae, des Ductus hepaticus und der infrahepatischen V. cava inferior sowie die Ligatur der suprahepatischen V. cava inferior. Aufgrund der sinusoidalen Struktur des Leberparenchyms und dem Risiko von intraparenchymalen Blutkoageln, die eine gleichmäßige Perfusion und damit eine effektive Dezellularisierung unmöglich machen würden, erfolgte die Explantation am lebenden Tier mit fortbestehendem Blutkreislauf.

Es wurde zunächst eine mediane Laparotomie auf voller Länge des Abdomens durchgeführt, die durch zwei Querschnitte auf jeder Seite erweitert wurde. Mittels

Klemme und Gummiband wurde der Processus xyphoideus retrahiert und fixiert, sodass eine bestmögliche Erreichbarkeit der direkt unter dem Diaphragma anliegenden Leber gewährleistet wurde. Da das Operationsprotokoll die Tötung des Tieres vorsah, musste die postoperative Wundheilung bei der Eröffnung der Bauchhöhle nicht berücksichtigt werden. Zum Schutz vor Austrocknung wurde das gesamte Darmpaket in situ mit in Ringer-Lösung getränkten Mullkompressen abgedeckt. Diese Kompressen wurden während der gesamten Operationsdauer immer wieder befeuchtet. Um Verletzungen des empfindlichen Leberparenchyms zu vermeiden, wurde zur Mobilisation jeglicher Art niemals scharfes chirurgisches Besteck, sondern lediglich Wattetupfer verwendet.

Es erfolgte zunächst die Durchtrennung der Ligg. falciforme und hepatogastricum mittels Federschere und die vorsichtige Mobilisierung des LHM und des LHSL. Anschließend wurden die beiden Leberlappen mittels feuchter Mullkompressen sanft an das Diaphragma angelegt, um die Portale Trias darzustellen. Hier erfolgte zunächst die Durchtrennung des Lig. triangulare dextrum und die vorsichtige Mobilisierung des LHC, dessen größter Anteil sich dorsal des Magens befindet. Anschließend wurde der Truncus coeliacus mittels Mikropinzetten und Tupfern aus dem retroperitonealen Fettgewebe freipräpariert, und zwar in seinem gesamten Verlauf, inklusive seiner Trifurkation bis zu seinem Ursprung aus der Aorta abdominalis. Letztere wurde ebenfalls stumpf ringsum vom Bindegewebe freipräpariert. Nun folgte die zweifache Ligatur der aus dem Truncus coeliacus entspringenden A. gastrica sinistra und der A. lienalis, sodass von der Trifurkation lediglich die A. hepatica communis übrigblieb. Diese zweigt sich vor Eintritt in die Leberpforte in die A. hepatica propria und die A. gastroduodenalis auf, von denen letztere ebenfalls doppelt ligiert und dazwischen durchtrennt wurde, nachdem zuvor die doppelte Ligatur und Durchtrennung der darüber liegenden V. gastroduodenalis, einem Abgang der V. portae, erfolgt war. Mit stumpfer Präparation und Mobilisation von Ductus hepaticus communis und V. portae wurde die Vorbereitung der Portalen

Trias zur Kanülierung abgeschlossen.

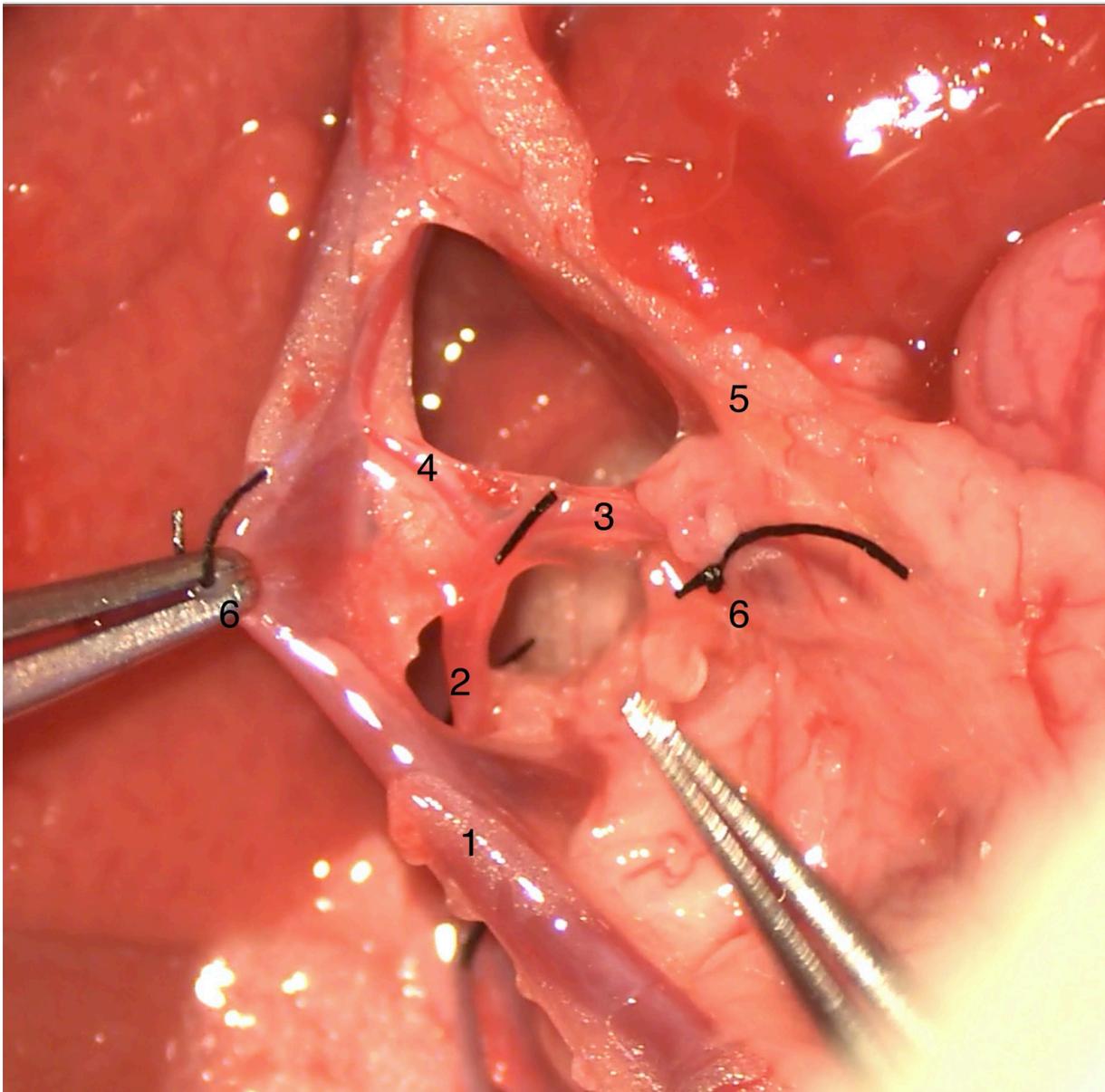


Abbildung 1: OP-Situs mit freigelegter portaler Trias. (1) V. portae, (2) A. hepatica communis, (3) A. gastroduodenalis, (4) A. hepatica propria, (5) Ductus hepaticus communis, (6) ligierte Enden der V. gastroduodenalis.

Zur besseren Erreichbarkeit der infrahepatischen V. cava inferior erfolgte zunächst eine rechtsseitige Nephrektomie. Hierfür wurden entsprechend A. und V. renalis ligiert und durchtrennt und die Niere aus dem perirenal Fett herausgeschnitten. Es erfolgte die stumpfe Präparation der V. cava inferior und die doppelte Ligatur und Durchtrennung ihrer suprarenalen Abgänge. Schließlich wurde die suprahepatische V. cava inferior zwischen Leber und Diaphragma freipräpariert und lose mit einem Faden umschlungen, um eine spätere Ligatur vorzubereiten.

In die distale infrahepatische V. cava inferior wurden nun 500 I.E. Heparin in 1ml NaCl-Lösung injiziert. Anschließend wurde das Diaphragma mit chirurgischer Schere perforiert und das Tier durch Durchtrennung der großen herznahen Gefäße getötet.

Die V. portae wurde umgehend mit einer Arterienklemme fixiert und mittels Fischmaul-Inzision auf Höhe der V. mesenterica inferior eröffnet. Über diese Öffnung wurde eine auf ca. 1,50 cm gekürzte 18-G-Venenverweilkanüle eingeführt, die zuvor auf eine mit Ringerlösung gefüllte 20 ml-Spritze aufgesetzt und entlüftet wurde. Der Inhalt der Spritze wurde infundiert, was zu einer deutlichen Entfärbung des Organs führte und auf eine Exsanguination der Leber schließen ließ. Die Spritze wurde entfernt und die Kanüle mittels doppelter Ligatur fixiert.

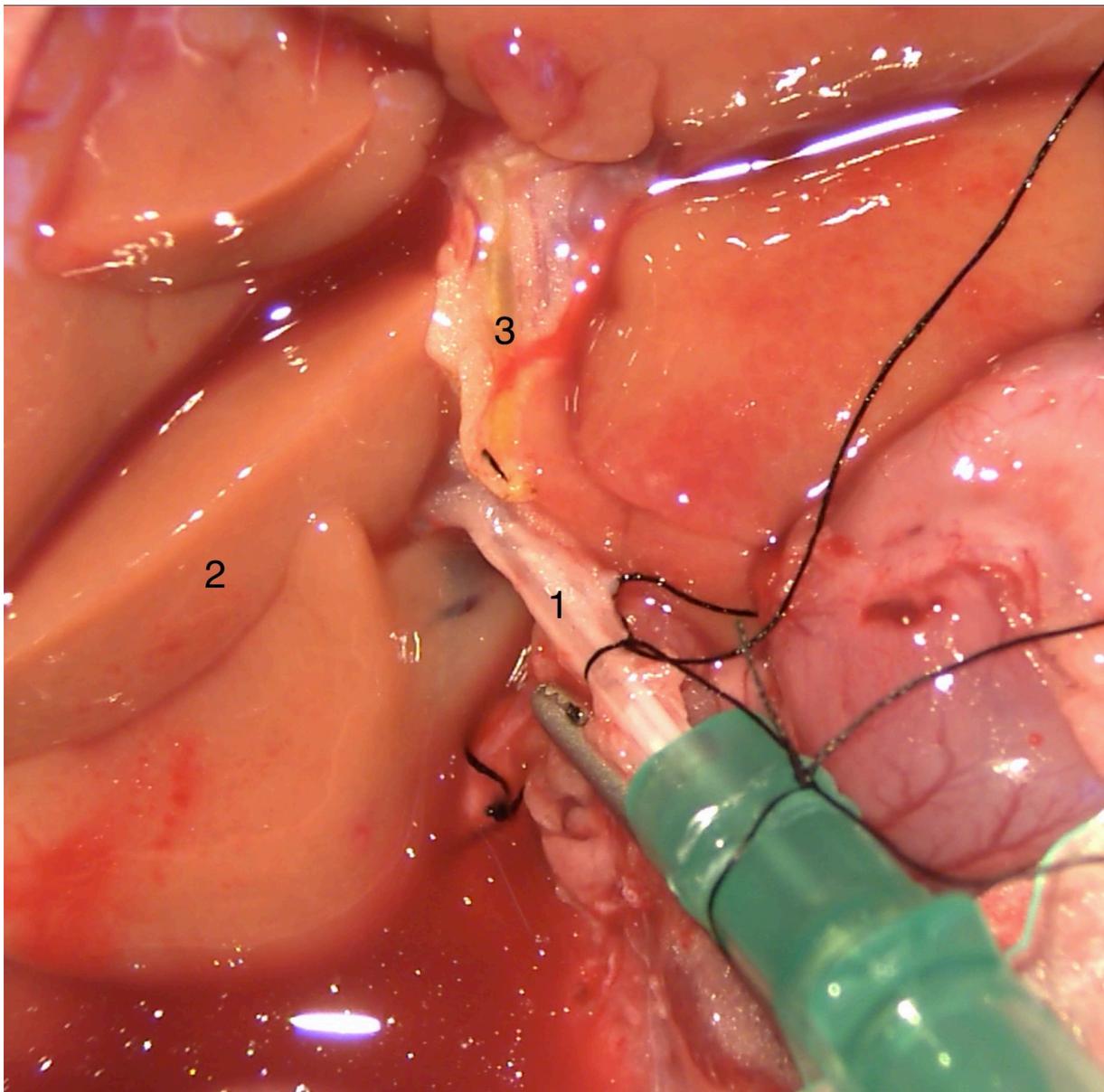


Abbildung 2: OP-Situs nach intraportaler Infusion von Ringer-Lösung. V. portae (1) mitsamt befestigter Kanüle. (2) deutlich aufgehelltes Leberparenchym. (3) D. hepaticus communis.

Analog erfolgten Inzision und Kanülierung des Ductus hepaticus communis mithilfe einer 24-G-Venenverweilkanüle, die zuvor auf ca. 10 mm gekürzt wurde. Eine Infusion von Ringerlösung erfolgte hier nicht.

Im Anschluss wurde ein ca. 5 mm langes, den Truncus coeliacus enthaltendes Segment der abdominalen Aorta in toto exzidiert. Das Lumen wurde gegenüber des Abgangs des Truncus coeliacus eröffnet, sodass schließlich der Truncus coeliacus mitsamt eines trichterartigen Aortenpatches frei lag. Zur Kanülierung diente eine selbstgebaute Kanüle bestehend aus einer 21-G-Flügelkanüle und einem angeklebten Plastikschlauch mit einem Lumendurchmesser von 0,58 mm. Diese wurde mit Ringer-Lösung entlüftet, in den Truncus coeliacus eingeführt und mittels Ligatur sorgfältig fixiert. Die korrekte Positionierung wurde kontrolliert, indem über das Gefäß Ringer-Lösung infundiert und der Flüssigkeitsaustritt aus der kanülierten V. portae beobachtet wurde.

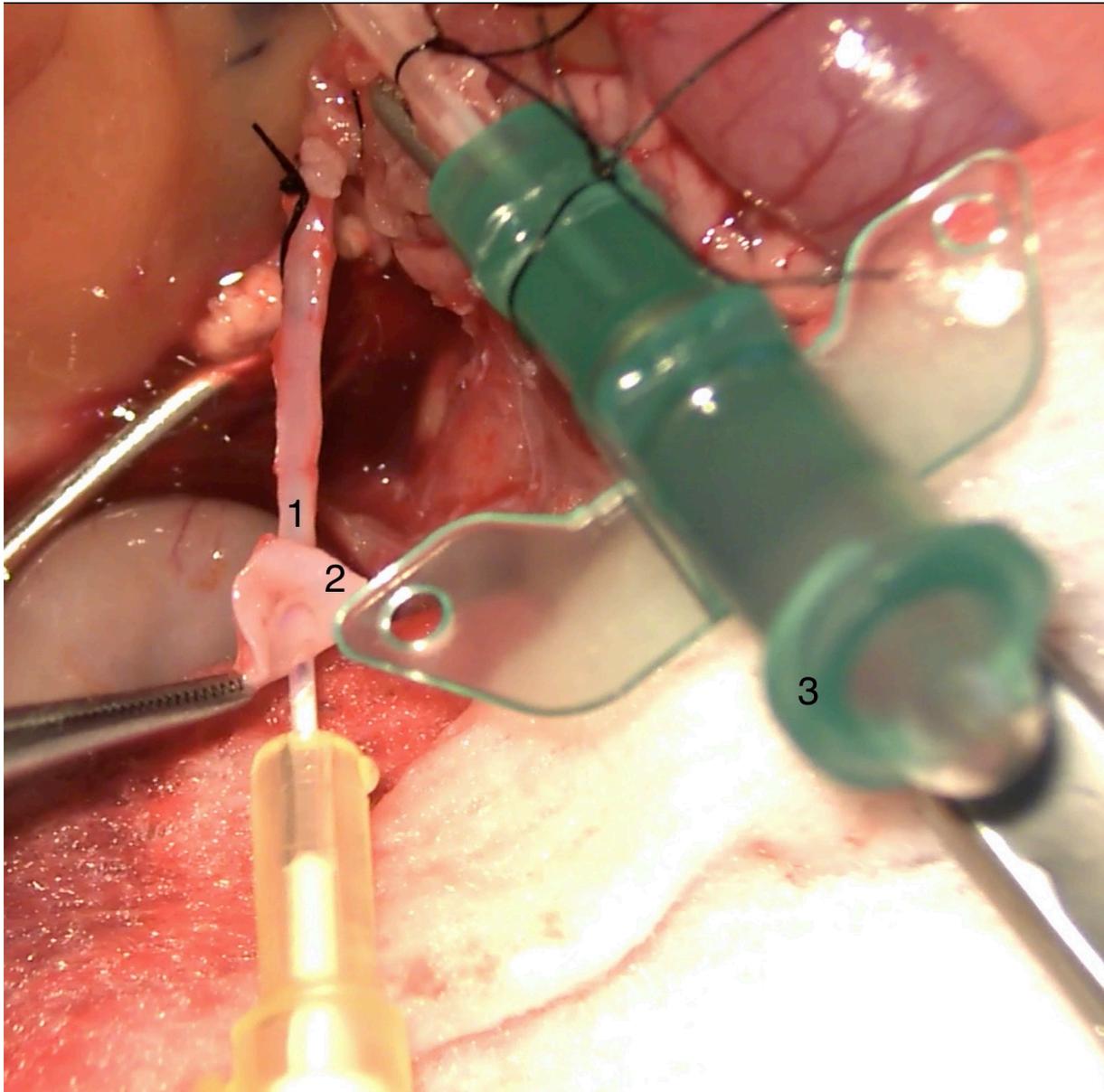


Abbildung 3: OP-Situs mit zur Kanüllierung vorbereitetem Truncus coeliacus. (1) Truncus coeliacus, (2) trichterartiges Aortenpatch, (3) Pfortaderkanüle mit austretender Flüssigkeit, nachdem über den Tr. coeliacus Ringer-Lösung infundiert wurde.

Es erfolgte die Inzision und Kanüllierung der infrahepatischen V. cava inferior mithilfe einer auf ca. 1,50 cm gekürzten 16-G-Venenverweilkanüle. Die zuvor um die suprahepatische V. cava inferior gelegte Ligatur wurde zugezogen und fixiert, das Blutgefäß unter Belassung einer Manschette aus Diaphragma durchtrennt. Abschließend erfolgte die vorsichtige Entnahme der Leber und ihre Platzierung in einem Urinbecher mit 100 ml Ringer-Lösung. Das Organ wurde jeweils bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C konserviert.

6.1.4 Die druckgesteuerte Dezellularisierung

6.1.4.1 Material und Aufbau für den Dezellularisierungskreislauf

Bioreaktor (Eigenbau)

Blasenfänger (Eigenbau)

Druckverteiler (Eigenbau)

Windkessel (Hugo Sachs Elektronik, Art.-Nr. 73-2068)

2x 5 l-Erlenmeyer-Kolben

Mehrkanal-Kassettenpumpe (Ismatec SA, Modell: ISM932)

Druckmessverstärkereinheit (Hugo Sachs Elektronik, Modell: TAM-D Typ 705/2)

Pumpensteuerung (Hugo Sachs Elektronik, Modell: SCP Typ 704)

Beatmungsgerät (ResMed Germany Inc., Modell Airox® Smartair®)

2x Pumpenschlauch (Ismatec SA)

4x 140 cm Heidelberger Verlängerung (B. Braun, Art.-Nr. 4097408)

6x 30 cm Heidelberger Verlängerung (B. Braun, Art.-Nr. 4097300)

3-Wege-Hahn (B. Braun, Discofix® C)

Einmalskalpell (Aesculap AG, Art.-Nr. 5518067)

Einwegpinzette (Carl Roth, Art.-Nr. KL06.1)

Urinbecher (Greiner Bio-One, Art.-Nr. 724461)

Kryoröhrchen 1,8ml (Sarstedt AG & Co. KG, Art.-Nr. 72.379)

1 l TritonX (Carl Roth, Art.-Nr. 3051.1)

1 l SDS 1% (Carl Roth, Art.-Nr. CN30.4)

6 l PBS-Lösung (Bio&SELL GmbH, Art.-Nr. BS.L 1820)

Penicillin/Streptomycin (Bio&SELL GmbH, Art.-Nr. BS.AB 17.07005)

Formaldehydlösung 4 % (Herbeta Arzneimittel)

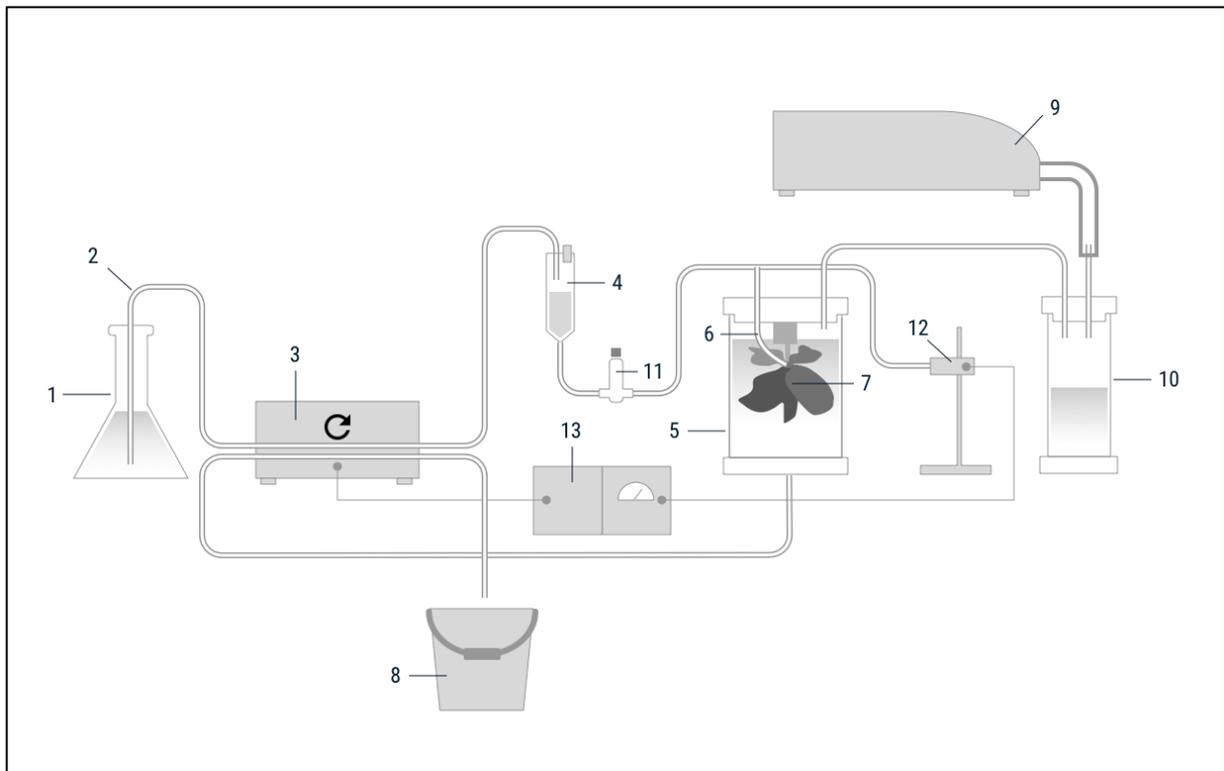


Abbildung 4: Schema des druckgesteuerten Perfusionskreislaufs. (1) Behältnis mit Perfusionslösung, (2) Heidelberger Verlängerung, (3) Mehrkanal-Kassettenpumpe, (4) Blasenfänger, (5) Bioreaktor, (6) Zugang über Leberarterie, (7) Leber, (8) Entsorgungsbehälter, (9) Beatmungsgerät, (10) Druckverteiler, (11) Windkessel, (12) Drucksensor, (13) Druckmesseinheit mit Pumpensteuerung.

Der Aufbau des druckgesteuerten Perfusionssystems ist in Abbildung 4 dargestellt.

Die Perfusionslösung wurde über das freie Ende einer 140 cm Heidelberger Verlängerung angesaugt. Diese wurde mit einem Pumpensegment konnektiert, das wiederum in eine Pumpe eingespannt wurde. Eine weitere 140 cm Heidelberger Verlängerung verband das Pumpensegment mit einem Blasenfänger. Auf diese folgten zwei 30 cm Heidelberger Verlängerungen, denen ein Windkessel zwischengeschaltet wurde, um eventuelle beim Anlaufen der Pumpe entstehende Druckspitzen abzumildern. Hiernach folgte ein Dreiwegehahn, über den als blindes Ende mittels 30 cm Heidelberger Verlängerung ein Drucksensor konnektiert wurde. Das freie Ende wurde mit einer weiteren 30 cm Heidelberger Verlängerung mit dem Bioreaktor verbunden. An diesen wurde nach sorgfältiger Entlüftung des gesamten Systems mit PBS die arterielle Kanüle der Leber angeschlossen. Windkessel und Blasenfänger wurden jeweils ca. zur Hälfte gefüllt. Die Leber selbst wurde an ihrer portalvenösen Kanüle am Deckel des Reaktors aufgehängt und der Reaktor zu ca. 2/3 mit PBS gefüllt, um ein eventuelles von der Schwerkraft bedingtes Abdrücken von Gefäßen zu vermeiden. Der Deckel des Reaktors wurde fest verschlossen und

mit Gewichten beschwert. Da sich das Gewicht der im Perfusionssystem befindlichen Lösung auf den Druck auswirkt, wurde nun sichergestellt, dass sich der Drucksensor auf gleicher Höhe wie die A. hepatica propria der aufgehängten Leber



Abbildung 5: Eine Rattenleber im Bioreaktor. Die Leber wurde mit ihrer Pfortaderkanüle über einen Dreiwegehahn am Deckel des Bioreaktors aufgehängt. Die Perfusion erfolgt über die Leberarterie mittels modifizierter Flügelkanüle.

befand. Der Drucksensor selbst wurde über das mitgelieferte Kabel mit der Druckmessverstärkereinheit verbunden, die ihrerseits mit einer Steuerungseinheit konnektiert war, die über ein weiteres Kabel die Pumpe steuern konnte. Über einen weiteren Anschluss im Deckel des Bioreaktors und zwei 30 cm Heidelberger Verlängerungen wurde mit dazwischen konnektiertem Druckverteiler ein Beatmungsgerät angeschlossen, um innerhalb des Bioreaktors für ondulierende Druckverhältnisse zu sorgen. An einen Abfluss im Boden des Reaktors wurde schließlich eine weitere 140 cm Heidelberger Verlängerung angeschlossen, der ein Pumpensegment folgte, welches in die

oben genannte Pumpe eingespannt wurde. So war sichergestellt, dass ebenso viel Flüssigkeit aus dem Bioreaktor abgepumpt wie hineingepumpt wurde und ein Überlaufen verhindert werden. An das Pumpensegment schloss sich eine letzte 140 cm Heidelberger Verlängerung an, die in ein Behältnis für die anschließende Entsorgung führte.



Abbildung 6: Der vollständig aufgebaute Perfusionskreislauf. Hier gezeigt ist ein Vorversuch zum Zeitpunkt eines bereits fortgeschrittenen Dezellularisierungsprozesses, erkennbar am trüben Inhalt des Bioreaktors.

6.1.4.2 Dezellularisierungsprozess

Das Organ wurde vor Versuchsbeginn für 24 h bei +4 °C aufgetaut. Anschließend erfolgte wie oben beschrieben die Entlüftung und Befüllung des Perfusionsystems mit PBS und der Anschluss der Leber über ihre arterielle Kanüle. Der Drucksensor wurde auf "0" zurückgesetzt und die Pumpensteuerung auf einen Soll-Wert von 100 mmHg gestellt. Das Beatmungsgerät wurde eingeschaltet und die der Pumpe vorgeschaltete Heidelberger-Verlängerung in eine Flasche mit 1l PBS getaucht. Das der Pumpe vorgeschaltete Steuerelement wurde zunächst auf „Flusssteuerung“ gestellt. In Vorversuchen hatte sich gezeigt, dass bei druckgesteuerter Einstellung und einem initialen Druck von 0 mmHg die Pumpensteuerung die Pumpe so stark beschleunigt, dass es zu einem Abriss der arteriellen Kanüle am Organ kommen konnte. Daher wurde zunächst manuell eine Flussrate von ca. 1 ml/min eingestellt und der sich langsam aufbauende Perfusionsdruck am Display der Pumpensteuerung abgelesen. War nach ca. 1-2 Minuten ein Druck von 100-110 mmHg erreicht, konnte die Pumpensteuerung auf „Drucksteuerung“ gestellt werden.

Nun erfolgte eine konstante Messung des Perfusionsdruckes und bei einem Abfall unter 100 mmHg die Aktivierung der Pumpe, was zu einer pulsatilen Arbeitsweise derselben führte, wobei die Flussrate niemals 1ml/min überschritt. Auf diese Weise wurde das Organ für 45 Minuten mit PBS perfundiert. Im Anschluss daran wurde die PBS-Flasche durch einen Erlenmeyer-Kolben mit 5 Litern 1 % SDS ersetzt und das Organ für 12 Stunden perfundiert. Hiernach wurde analog für 45 Minuten mit 1 % TritonX perfundiert, was die eigentliche Dezellularisierung abschloss. Es folgte ein Waschschrift mit PBS und zugesetztem Penicillin und Streptomycin für 12 Stunden bei einer flussgesteuerten Laufrate von 0,7 ml/min. Hierfür wurde die erste Heidelberger Verlängerung in einen 5-Liter-Erlenmeyer-Kolben getaucht, der im Verlauf wieder aufgefüllt werden musste. Die Laufrate wurde so gewählt, dass ein maximaler Perfusionsdruck von 100 mmHg nicht überschritten wurde.

6.1.5 Die flussgesteuerte Dezellularisierung

6.1.5.1 *Material und Aufbau des Dezellularisierungskreislaufs*

Bioreaktor (Eigenbau)

Blasenfänger (Eigenbau)

Druckverteiler (Eigenbau)

1x 5l-Erlenmeyer-Kolben

Mehrkanal-Kassettenpumpe (Ismatec SA, Modell: ISM932)

Beatmungsgerät (ResMed Germany Inc., Modell Airox® Smartair®)

2x Pumpenschlauch (Ismatec SA)

4x 140 cm Heidelberger Verlängerung (B. Braun, Art.-Nr. 4097408)

3x 30 cm Heidelberger Verlängerung (B. Braun, Art.-Nr. 4097300)

3-Wege-Hahn (B. Braun, Discofix® C)

Einmalskalpell (Aesculap AG, Art.-Nr. 5518067)

Einwegpinzette (Carl Roth, Art.-Nr. KL06.1)

Urinbecher (Greiner Bio-One, Art.-Nr. 724461)

Kryoröhrchen 1,8 ml (Sarstedt AG & Co. KG, Art.-Nr. 72.379)

1 l TritonX (Carl Roth, Art.-Nr. 3051.1)

1 l SDS 1% (Carl Roth, Art.-Nr. CN30.4)

6 l PBS-Lösung (Bio&SELL GmbH, Art.-Nr. BS.L 1820)

Penicillin/Streptomycin (Bio&SELL GmbH, Art.-Nr. BS.AB 17.07005)

Formaldehydlösung 4 % (Herbeta Arzneimittel)

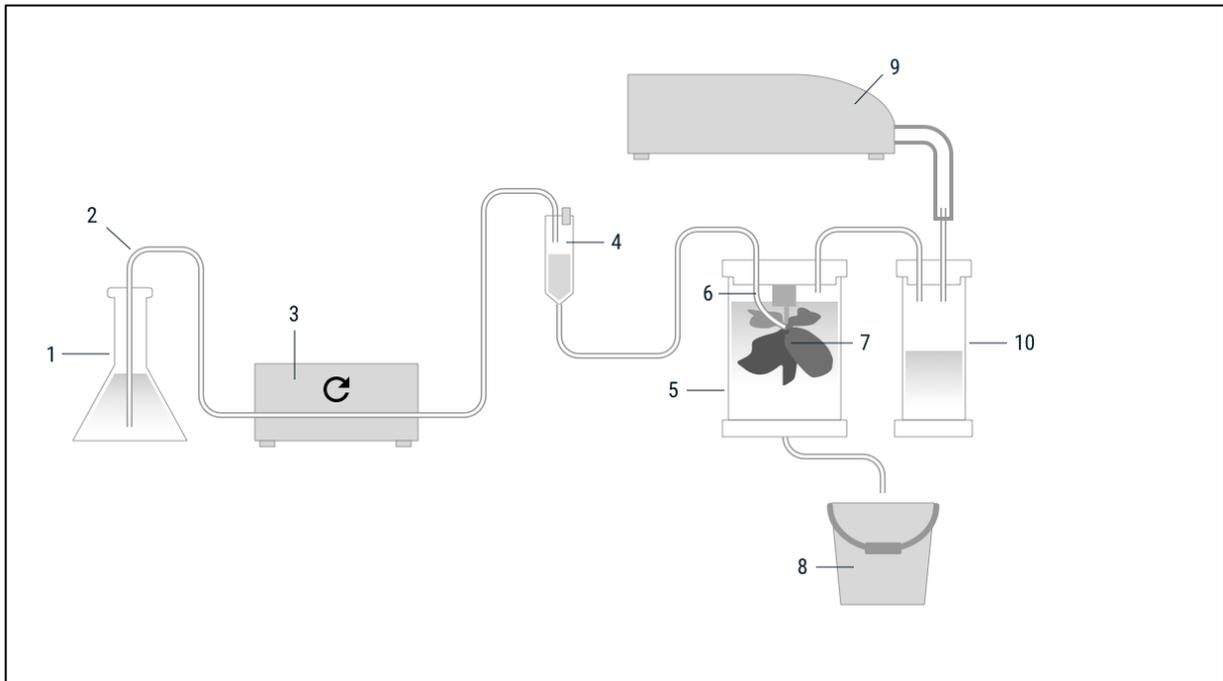


Abbildung 7: Schema des flussgesteuerten Perfusionskreislaufs. (1) Behältnis mit Perfusionslösung, (2) Heidelberger Verlängerung, (3) Mehrkanal-Kassettenpumpe, (4) Blasenfänger, (5) Bioreaktor, (6) Zugang über Leberarterie, (7) Leber, (8) Entsorgungsbehälter, (9) Beatmungsgerät, (10) Druckverteiler.

Das flussgesteuerte Perfusionssystem mit in einem Bioreaktor mit ondulierenden Druckverhältnissen, dessen Aufbau in Abbildung 7 dargestellt ist, wurde 2017 von Struecker et al. publiziert (59). Eine 140cm Heidelberger-Verlängerung wurde mit einem Ende in einen Behälter mit der zu perfundierenden Lösung getaucht und mit dem anderen Ende an ein Pumpensegment angeschlossen, das in eine Pumpe eingespannt wurde. Hieran schloss sich eine weitere 140 cm Heidelberger Verlängerung an, die wiederum mit einem Blasenfänger konnektiert wurde. Diese wurde über eine 30 cm Heidelberger Verlängerung mit dem Bioreaktor verbunden. An diesen erfolgte nach sorgfältiger Entlüftung des gesamten Systems mit PBS der Anschluss der arteriellen Kanüle der Leber. Der Blasenfänger wurde ca. zur Hälfte gefüllt. Die Leber selbst wurde auch hier an ihrer portalvenösen Kanüle am Deckel des Reaktors aufgehängt und der Reaktor zu ca. 2/3 mit PBS gefüllt. Der Deckel des

Reaktors wurde fest verschlossen. Über einen weiteren Anschluss im Deckel des Bioreaktors und zwei 30 cm Heidelberger Verlängerungen wurde mit dazwischen konnektiertem Druckverteiler ein Beatmungsgerät angeschlossen. Der Abfluss wurde wie bei der druckgesteuerten Dezellularisierung gestaltet: An einen Abfluss im Boden des Reaktors wurde eine weitere 140 cm Heidelberger Verlängerung angeschlossen, der ein Pumpensegment folgte, das wiederum in die oben genannte Pumpe eingespannt wurde. An das Pumpensegment schloss sich eine letzte 140 cm Heidelberger Verlängerung an, die zu einem Auffangbehälter führte.

6.1.5.2 *Dezellularisierungsprozess*

Das Organ wurde vor Versuchsbeginn für 24 h bei +4 °C aufgetaut. Anschließend erfolgte der Anschluss der arteriellen Kanüle an das oben beschriebene, entlüftete Perfusionssystem. Das Beatmungsgerät wurde eingeschaltet und die der Pumpe vorgeschaltete Heidelberger-Verlängerung in eine Flasche mit 1 l 1 % TritonX getaucht. Es erfolgte eine 90-minütige Perfusion mit einer Laufrate von 5ml/min. Hiernach wurde die Flasche mit TritonX durch eine mit 1 l 1 % SDS ersetzt und die Leber abermals für 90 Minuten mit einer Laufrate von 5 ml/min perfundiert. Im letzten Schritt wurde abweichend vom ursprünglichen Protokoll von Struecker et al. wie bei der druckgesteuerten Dezellularisierung zuvor für 12 Stunden mit einer Laufrate von 0,7 ml/min mit PBS und zugesetztem Penicillin und Streptomycin perfundiert.

6.1.6 Asservierung der Proben

Nach Ende eines jeden Versuchs wurden mittels Skalpell und Pinzette der LHM und LHSL vorsichtig abgetrennt und für histologische Analysen in Formalin fixiert. LHDL und LHC wurden in Kryoröhrchen platziert und bei -80 °C für spätere biochemische Analysen konserviert.

6.1.7 Kontrollgruppe

Für die Kontrollgruppe wurden 3 Rattenlebern nach oben genanntem Verfahren explantiert und in Ringer-Lösung bei -80 °C bis zur weiteren Analytik gelagert. Anschließend wurden die Organe für 24h bei +4 °C aufgetaut und mithilfe eines Skalpells zerteilt. LHC und LHDL wurden in Kryoröhrchen platziert und bei -80 °C konserviert. LHM und LHSL wurden in Formalin fixiert.

6.1.8 Histologische und immunhistochemische Auswertung

6.1.8.1 *Material für die histologischen und immunhistochemischen Verfahren*

Einbettkassetten Rotilabo® (Carl Roth, Art.-Nr. K113.1)

mehrere Färbekästen

Objektträger SuperFrost Plus ® (R. Langenbrinck, Art.-Nr. 03-0060)

Menzel-Deckelgläschen 24x60mm (Thermo Fisher, Art.-Nr. 15747592)

Hydrophober Stift (Dako, Art.-Nr. S2002)

Wippschüttler (Grant Instruments Cambridge, Modell PMR-30)

Wärmeschrank (Ralf W. Weinkauff Medizin und Umwelttechnik, Art.-Nr. 90002)

Paraffinausgießstation (Leica Microsystems, Modell EG 1160)

Rotationsmikrotom (Leica Biosystems, Modell RM 2255)

Wasserbad-Streichtisch-Kombination (Ralf W. Weinkauff Medizin und Umwelttechnik)

Herdplatte und Kochtopf

Mikroskop (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Modell: Axio Observer Z1)

Mikroskop-Kamera (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Modell: AxioCam ICc6 Color)

Software (Carl Zeiss Microscopy GmbH, ZEN Microscope 2.3 pro)

PBS (Bio&SELL GmbH, Art.-Nr. BS.L 1820)

Ethanol vergällt $\geq 99,8\%$ (Carl Roth, Art.-Nr. K928.4)

Aqua dest.

Xylol (J.T. Baker, Art.-Nr. 8080.2500)

Paraffinwachs, Pellets, weiß (Sigma-Aldrich, Art. Nr. 76242)

Eukitt Einbettmedium (Sigma-Aldrich, Art.-Nr. 03989)

Aquatex® Einbettmedium (Sigma-Aldrich, Art.-Nr. 108562)

Hämatoxylin, sauer nach Mayer (Morphisto, Art.-Nr. 10231.01000)

Eosin 1%, alkoholisch (Morphisto, Art.-Nr. 11503.01000)

Weigert Stammlösung A (Morphisto, Art.-Nr. 10225A)

Weigert Stammlösung B (Morphisto, Art.-Nr. 10225B)

Pikro-Siriusrot (Morphisto, Art.-Nr. 13422.00250)

Essigsäure 30% (Morphisto, Art.-Nr. 13428.00250)

Alcianblau 1% pH 2,5 in Essigsäure (Morphisto, Art.-Nr. 12696.00250)

Perjodsäure 1% (Morphisto, Art.-Nr. 11415.00250)

Schiff'sches Reagenz (Morphisto, Art.-Nr. 11686.00250)

Hämatoxylin nach GILL-III (Morphisto, Art.-Nr. 11773.01000)

Wasserstoffperoxid 3% (Morphisto, Art.-Nr. 15838.01000)

Citratpuffer 0,01 M, pH6 (Agilent Technologies, Art.-Nr. S169984-2)

Normales Ziegenserum (Abcam, Art.-Nr. ab7481)

3,3'-Diaminobenzidin DAB (Abcam, Art.-Nr. ab64238)

Primärantikörper (Kaninchen) gegen Collagen IV (Abcam, Art.-Nr. ab6586)

Primärantikörper (Kaninchen) gegen Laminin (Abcam, Art.-Nr. ab11575)

Primärantikörper (Kaninchen) gegen Fibronectin (Abcam, Art.-Nr. ab23751)

Sekundärantikörper (Ziege) gegen Kaninchen-IgG (Abcam Art.-Nr. ab205718)

6.1.8.2 Entwässerung, Einbettung in Paraffin und Schnitthanfertigung

Die in Formalin fixierten Leberlappen, der ML und LL eines jeden Versuchs, wurden jeweils in eine Einbettkassette gegeben, mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und anschließend in Paraffin eingebettet. Hierzu wurden die Einbettkassetten in einem Färbekasten für jeweils 2 Stunden in PBS und dann in 50 %, 70 %, 80 %, 96 % und 98 % Ethanol platziert und auf einem Wippschüttler geschüttelt. Anschließend wurde das Ethanol durch Xylol ersetzt und die Proben für weitere 3 Stunden geschüttelt. Schließlich erfolgte der Transfer in einen Wärmeschrank in geschmolzenes Paraffin, wo die Proben mindestens 12 Stunden verblieben. Anschließend erfolgte die Einbettung in Paraffin an der Paraffinausgießstation.

Mit einem Rotationsmikrotom wurden 40 Schnitte mit einer Dicke von 5 µm angefertigt, im Wasserbad gestreckt und auf Objektträger überführt.

Vor jeder Färbung wurden die Schnitte zunächst für 12 Stunden in einem Wärmeschrank bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Entparaffinierung und

Rehydrierung mithilfe einer absteigenden Alkoholreihe, wobei die Schnitte für 20 Minuten in Xylol und anschließend für jeweils 2 Minuten in 98 %, 96 %, 80 %, 70 %, 50 % Ethanol und abschließend in Aqua dest. getaucht wurden. Nach den jeweiligen Färbungen, die in den folgenden Unterkapiteln dargelegt werden, wurden die Schnitte mittels aufsteigender Alkoholreihe wieder entwässert und nach einem erneuten Xylolbad in Eukitt eingebettet und mit einem Menzel-Deckelglaschen versehen.

6.1.8.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Jeder 5. Schnitt einer Probe wurde mittels Hämatoxylin und Eosin (HE) gefärbt. Zunächst erfolgte ein 10-minütiges Bad in Hämatoxylin nach Mayer, und anschließend eine Spülung für ca. 8 Minuten unter fließendem warmen Leitungswasser. Schließlich wurden die Proben für 30 Sekunden in Eosin getaucht und anschließend für wenige Sekunden in kaltes Leitungswasser gegeben.

6.1.8.4 Pikro-Siriusrot

Jeweils ein Schnitt jeder Probe wurde mittels Pikro-Siriusrot gefärbt. Zunächst wurden die Schnitte für 8 Minuten in Weigerts Eisenhämatoxylin, bestehend aus den Stammlösungen A und B, platziert und anschließend für 10 Minuten in fließendem Leitungswasser gebläut. Anschließend erfolgte für eine Stunde ein Bad in Pikro-Siriusrot, woran sich zwei Waschschrte mit Essigsäure anschlossen.

6.1.8.5 Alcianblau-PAS

Jeweils ein Schnitt jeder Probe wurde mittels Alcianblau-PAS gefärbt. Zunächst erfolgte ein Bad in Alcianblau 1 % zur Anfärbung der Mucosubstanzen. Hieran schloss sich ein dreiminütiger Waschschrte unter fließendem Leitungswasser und ein Bad für 20 Minuten in Perjodsäure 1 % zur Oxidation an. Nach erneutem Waschen erfolgte für 20 Minuten ein Bad in Schiff'schem Reagenz zum Aldehydnachweis, gefolgt von einer Kernfärbung mit Hämatoxylin nach GILL-III.

6.1.8.6 Collagen IV, Laminin und Fibronectin

Für die Immunhistochemische Auswertung wurden die in Punkt 6.1.8.2 hergestellten Schnitte verwendet. Jeweils ein Schnitt jeder Probe wurde immunhistologisch auf

Collagen IV, Laminin und Fibronectin untersucht. Es erfolgte zunächst die Rehydrierung wie in Punkt 6.1.8.2. Anschließend wurden die Schnitte für 15 Minuten in Wasserstoffperoxidlösung 3 % gegeben und 2x 3 Minuten mit PBS gespült. Citratpuffer 0,01 M mit einem pH von 6 wurde bis zum Siedepunkt erhitzt und die Schnitte hierin für 15 Minuten platziert. Nach erneutem Spülen in PBS wurden die Gewebeproben auf dem Objektträger mithilfe eines hydrophoben Stiftes eingekreist und für 1 Stunde bei Raumtemperatur in normalem Ziegenserum geblockt. Nun erfolgte für 1 Stunde die Inkubation bei 37 °C mit dem Primärantikörper entweder gegen Collagen IV, Laminin bzw. Fibronectin, der in Ziegenserum gelöst wurde. Nach erneutem Waschen mit PBS wurde der ebenfalls in Ziegenserum gelöste Sekundärantikörper für 30 Minuten bei 37 °C aufgebracht und erneut mit PBS abgewaschen. Schließlich wurde unter visueller Kontrolle das Peroxidasesubstrat 3,3'-Diaminobenzidin aufgeträufelt und nach Erscheinen des dunkelbraunen Reaktionsproduktes mit Aqua dest. zum Stoppen der Reaktion abgewaschen. Es schloss sich eine zehnmünütige Gegenfärbung mit Hämatoxylin nach Mayer an. Danach wurden die Schnitte für ca. 8 Minuten mit fließendem warmem Leitungswasser gespült. Schließlich wurden die Schnitte wie in Kapitel 6.1.8.2 erneut dehydriert und mittels Aquatex® eingebettet.

6.1.8.7 Lichtmikroskopische Untersuchung

Die gefärbten bzw. immunhistochemisch markierten Schnitte wurden mithilfe eines Mikroskops des Modells Zeiss Axio Observer Z1 qualitativ auf den Erfolg der Dezellularisierung hin beurteilt. Als Kriterien für eine erfolgreiche Dezellularisierung dienten hier die Abwesenheit von Zellkernen und Zytoplasma sowie das Vorhandensein erhaltener EZM-Architektur und ihrer Bestandteile in Form von kollagenen und retikulären Fasern, Laminin, Kollagen IV und Fibronectin. Hierbei wurden pro Leberlappen sämtliche gefärbten Schnitte hinsichtlich Zellkernresiduen untersucht, um sowohl hilusnahe als auch periphere Teile der dezellularisierten Lebermatrix abzudecken. Die Aufnahme von Bildern erfolgte mithilfe der Software Zen microscope 2.3 pro.

6.1.9 Biochemische Auswertung

Für die biochemischen Auswertung wurden die bei -80 °C gelagerten kleineren Leberlappen jedes Versuchs sowie die Proben der Nativlebern lyophilisiert.

Anschließend wurde für jedes Verfahren jeweils eine Probe entnommen und das Gewicht notiert.

6.1.9.1 Material für die biochemische Auswertung

DNeasy blood and tissue kit (Quiagen, Art.-Nr. 69504)

Spektrophotometer (Thermo Fisher, Modell: NanoDrop™ 2000C)

Vortex (VELP Scientifica, Modell: ZX3 Advanced Vortex Mixer)

Photometerküvetten (Brand®, Art.-Nr. 759150)

Mikrozentrifuge (Thermo Fisher, Modell Fresco™ 21)

Zentrifugenröhrchen 15ml (Falcon, Art.-Nr. 352097)

Pipetten und Pipettenspitzen verschiedener Größe (Biozym, Modell Serie: Surphob)

Chloroform (Carl Roth, Art.-Nr. 7331.1)

Methylenblau (Carl Roth, Art.-Nr. A514.1)

0,7 mM Tris-Hydrochloridlösung mit pH von 7,0 (Carl Roth, Art.-Nr. 9090.2)

Dimethylmethylenblau-Lösung 1l, *bestehend aus*

3,04 g Glycin (Carl Roth, Art.-Nr. HN07.2)

2,37 g NaCl (Carl Roth, Art.-Nr. 9265.1)

95 ml 0,1 M HCl (Carl Roth, Art.-Nr. N075.1)

0,016 g 1,9-Dimethylmethylen (Sigma-Aldrich, Art.-Nr. 341088-1G)

Aqua dest. (aufzufüllen auf 1 Liter)

Papain-Puffer, 1l, *bestehend aus*

20 mM Natriumphosphatpuffer (MW: 119.98 g/mol)

1 mM EDTA (MW: 372.2 g/mol) (Carl Roth, Art.-Nr. CN34.1)

2 mM Dithiothreitol (MW: 154.2 g/mol) (Sigma-Aldrich, Art.-Nr. 10197777001)

0,03 g Papain zugeben (Sigma-Aldrich, Art.-Nr. 10108014001)

Aqua dest. (aufzufüllen auf 1 Liter)

Chondroitin-Sulfat Stammlösung, *bestehend aus*

100 mg Chondroitin-Sulfat (Sigma-Aldrich, Art.-Nr.C9819),

in 10 ml Papain-Puffer, verdünnt in 1:10 und anschließend 4:10 Papain-Puffer

6.1.9.2 DNA

Der DNA-Gehalt der Proben wurde mithilfe des DNeasy blood and tissue kits nach den Anweisungen des Herstellers ermittelt. Zunächst wurden die Gewebeproben zum Verdau mit Proteinase K vermischt und über Nacht bei 56°C inkubiert. Anschließend wurde die Mischung mehrfach zentrifugiert und gewaschen. Die Messung erfolgte durch ein NanoDrop Spektrophotometer.

6.1.9.3 SDS

Der SDS-Gehalt wurde mithilfe eines adaptierten Protokolls von Hayashi et al. (60) bestimmt. Da dieses Protokoll den SDS-Gehalt von Lösungen misst, wurde jede Probe zunächst für 48h bei Raumtemperatur in 1ml Aqua dest. auf einem Schüttler inkubiert und anschließend bei 10 000 G für 10 Minuten zentrifugiert. Dem Überstand wurden dann jeweils 0,5ml Methylenblau in 100facher Verdünnung und 3ml Chloroform hinzugefügt. Anschließend wurde die Probe für 3 Minuten bei 2000rpm zentrifugiert und schließlich die Absorption von 1ml der Chloroform-Phase bei 625nm in einem Ultraviolett-spektrometer gemessen. Zur Kalibrierung diente eine geometrische Verdünnung von SDS in Aqua dest mit jeweils 1ml Tris HCl.

6.1.9.4 sGAG

Zur Bestimmung des sGAG-Gehaltes wurden die Proben mit einem Papain-Puffer über Nacht bei 60 °C inkubiert und anschließend bei 10 000 G für 10 Minuten zentrifugiert. 400 µl des Überstandes einer jeden Probe wurden jeweils 400 µl DMMB-Lösung hinzugefügt. Anschließend wurde die Absorption jeweils zweimal zügig bei 525 nm in einem Ultraviolett-spektrometer gemessen. Die Kalibrierung des Assays erfolgte mithilfe einer Chondroitin-Sulfat-Lösung in geometrischer Verdünnung.

6.1.9.5 Statistik

Die statistische Analyse der biochemischen Daten erfolgte mittels der GraphPad Prism 7 Software (Statcon; La Jolla, CA, USA). Eine Normalverteilung der Daten wurde mit dem D'Agostino&Pearson Omnibus Normalitätstest überprüft. Die generierten Daten wurden im Falle kontinuierlicher Variablen als Mittelwert und Standardabweichung (SD) im Text bzw. Standardfehler (SE) in den Grafiken

angegeben. Zum Vergleich mehrerer Gruppen (>2) erfolgte die Analyse mit Hilfe der einfaktoriellen ANOVA (One-way analysis of variance) bzw. dem nicht-parametrischen Kruskal-Wallis Test. Für multiple paarweise Vergleiche wurde der Dunn's Test verwendet.

6.2 Rezellularisierung der Lebermatrixes mit Langerhans-Inseln

6.2.1 Versuchsaufbau und Gruppen

Es wurden insgesamt 12 Rezellularisierungsversuche durchgeführt. Für jeden Rezellularisierungsversuch wurde zunächst eine Lebermatrix nach dem in Kapitel 6.1.4 beschriebenen druckgesteuerten Dezellularisierungsprotokoll hergestellt. Anschließend erfolgte für jeden einzelnen Versuch die Explantation von 6 Rattenpankreatata zur Isolation der Langerhans-Inseln. Die eigentliche Implantation der Inselzellen in die Matrix erfolgte über zwei verschiedenen Infusionsrouten und mittels zweier verschiedener Techniken, woraus sich folgende Gruppen mit jeweils n=3 ergaben: (I) Inselzellinfusion über die Pfortader mittels Infusionspumpe, (II) Inselzellinfusion über den Gallengang mittels Infusionspumpe, (III) manuelle Inselzellinfusion über die Pfortader und (IV) manuelle Inselzellinfusion über den Gallengang. Anschließend erfolgte die semiquantitative histologische Auswertung mithilfe von HE- und AZAN-Färbung.

6.2.2 Tiere

Es wurden insgesamt 72 weibliche Ex-Breeder Wistar-Ratten als Pankreasspendertiere verwendet. Die Tierversuche wurden zuvor durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin unter der Antragsnummer O0264/13 genehmigt.

Alle weiteren Aspekte der Tierhaltung und die Provenienz der Leberspendertiere wurden bereits in Punkt 6.1.2 aufgeführt.

6.2.3 Gewinnung der Lebermatrix im Rattenmodell

Die Leberexplantation wurde bereits in Kapitel 6.1.3 beschrieben. Zur Reduktion des Volumens der später zu rezellularisierenden Lebermatrix wurden mithilfe eines Fadens der LHSL und der LHM sorgfältig abgebunden, sodass im Folgenden lediglich LHDL und LHC für die Perfusionsdezellularisierung und Rezellularisierung zur Verfügung standen. Der Grund hierfür lag im geringen Volumen der zur

Verfügung stehenden Langerhans-Inseln und dem Bestreben, die Anzahl der Pankreasspendertiere gering zu halten unter gleichzeitiger Wahrung aussagekräftiger Ergebnisse bezüglich der Zelldistribution. Die Dezellularisierung erfolgte nach dem in Kapitel 6.1.4 beschriebenen Protokoll. Nach Abschluss des letzten Waschschriffs mit PBS plus Penicillin und Streptomycin wurde die so gewonnene Matrix umgehend zur Rezellularisierung verwendet.

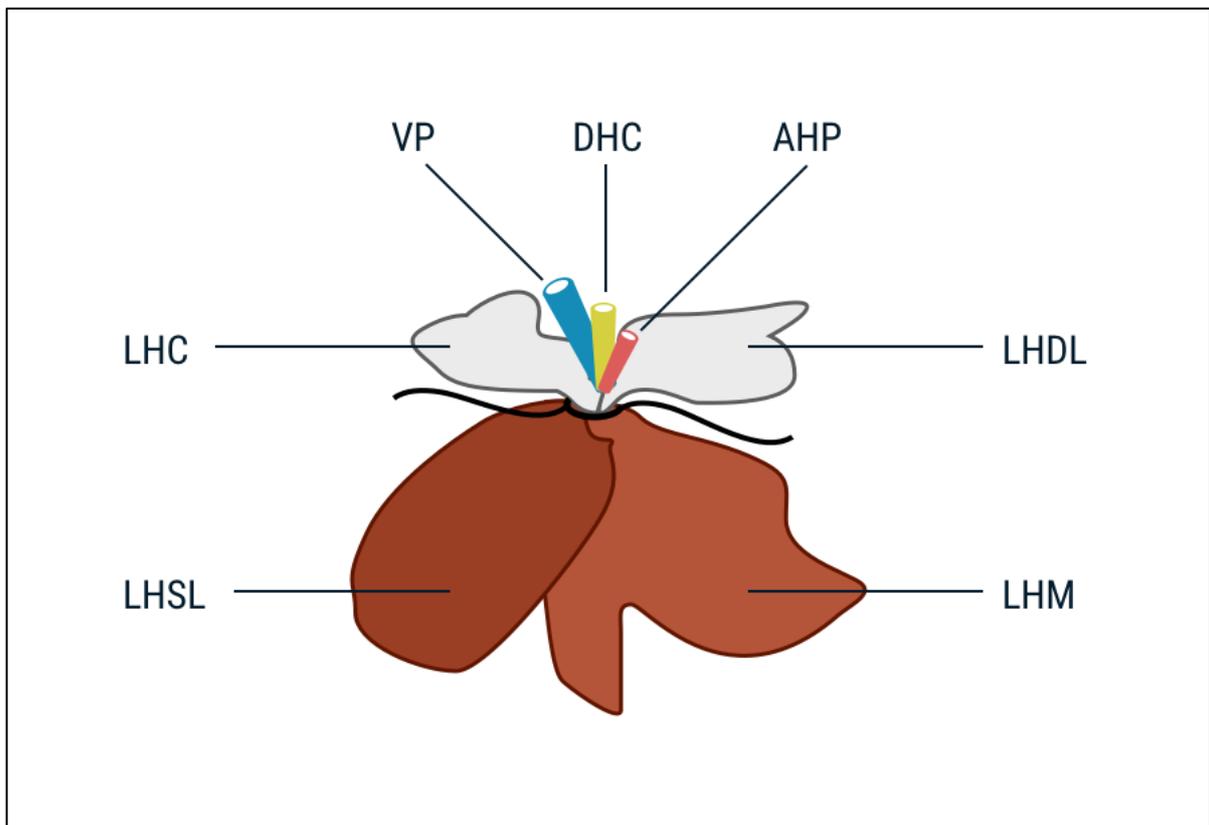


Abbildung 8: Schema der dezellularisierten Lebermatrix. Die großen Leberlappen wurden ligiert.

6.2.4 Inselzellisolation

6.2.4.1 Material für die Inselzellisolation

Zentrifuge (Heraeus, Modell: Multifuge X3R)

Wasserbad (Köttermann Labortechnik, Modell: 3044)

Sicherheitswerkbank (Thermo Fisher, Modell: S2020 1.2)

Densitometer 30PX (Mettler-Toledo, Art.-Nr. 51324450)

Vakuumpumpe (Integra BioSciences, Modell: Vacusafe comfort)

Pipettierhilfe (Integra Life Sciences, Modell Pipetboy Acu 2)

Zellsieb (Sigma-Aldrich, Art.-Nr. CD1-1KT)
Pipetten in den Größen 25, 10 und 5 ml (Greiner Bio-One, Cellstar ®)
Zentrifugenröhrchen 50 ml (Thermo Fisher, Art.-Nr. 10788561)
Zellkulturschalen 35 mm, kariert (Thermo Fisher, Art.-Nr. 174926)
Sterilfilter (Thermo Fisher Nalgene™ Rapid-Flow™, Art.-Nr. 566-0010)
Spritzenfilter 0,20 µm (Millex, Art.-Nr. SLGP033RS)
autoklavierte Glasflaschen (VWR, Borosilicate 3.3)
500 ml Becherglas
Kühlbehälter
Eis
Aluminiumfolie

Waschmedium mit einem Glucosegehalt von 5,5mM, *bestehend aus*

450 ml Gibco™ RPMI (+) L-Glutamin, (-) D-Glucose (Thermo Fisher,
Art.-Nr. 11879020)
450 ml Gibco™ RPMI (+) L-Glutamin (Thermo Fisher,
Art.-Nr. 21875034)
100 ml FBS (heat inactivated) (Thermo Fisher, Art.-Nr. S0615)

Inselzellkulturmedium mit einem Glucosegehalt von 5,5mM, *bestehend aus*

432,25 ml Gibco™ RPMI (+) L-Glutamin, (-) D-Glucose
(Thermo Fisher, Art.-Nr. 11879020)
50 ml FBS, heat inactivated, (Thermo Fisher, Art.-Nr. S0615)
10 ml HEPES 1M, pH7,4 (Carl Roth, Art.-Nr. 9105.4)
5 ml Penicillin/Streptomycin (Bio&SELL GmbH, Art.-Nr. BS.AB 17.07005)
2,75 ml 1M Glucoselösung (Millipore, Art.-Nr. 1.08337.1000)

Enzymlösung für die Inselzellisolation aus 6 Tieren, *bestehend aus*

90 ml Gibco™ RPMI (+) L-Glutamin, (-) D-Glucose (Thermo Fisher,
Art.-Nr.11879020)
90 mg Collagenase aus Clostridium histolyticum (Sigma-Aldrich,
Art.-Nr. C9263)

9 mg DNase I aus Rinderpankreas (Roche, Art.-Nr. 10104159001)

Dithizon-Lösung zum Zählen der Inselzellen, *bestehend aus*

20 mg Dithizon (Sigma-Aldrich, Art.-Nr. 194832)

2 ml Dimethylsulfoxid (Sigma-Aldrich, Art.-Nr. 472301)

8 ml PBS (Bio&SELL GmbH, Art.-Nr. BS.L 1820)

Euro-Collins-Lösung zur Herstellung der Separationslösungen, *bestehend aus*

4,0830 g Kaliumdihydrogenphosphat (Supelco, Art.-Nr. 1.04873)

2,2369 g Kaliumchlorid (Supelco, Art.-Nr. 1.04936)

14,8013 g Di-Kaliummonohydrogenphosphat (Supelco, Art.-Nr. 1.05104)

1,6805 g Natriumhydrogenkarbonat (Supelco, Art.-Nr. 1.06329)

70,0013 g Glucose (Millipore, Art.-Nr. 1.08337)

40 ml Elektrolytlösung E 153 (Serumwerk Bernburg AG)

Ficoll®-Stammlösung zur Herstellung der Separationslösungen, *bestehend aus*

500 g Ficoll® PM 400 (Sigma-Aldrich, Art.-Nr. F4375)

1 l Euro-Collins-Lösung

8,9404 g HEPES (Carl Roth, Art.-Nr. 9105.4)

4 Ficoll®-Separationslösungen, *je nach Dichte bestehend aus*

Dichte der Lösung	1,069g/ml	1,080g/ml	1,096g/ml	1,125g/ml
Ficoll®-Stammlösung	189,5 ml	235,6 ml	302,3 ml	423,4 ml
Euro-Collins-Lösung	300,4 ml	254,4 ml	187,7 ml	66,6 ml
FBS	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml

6.2.4.2 Narkoseeinleitung und Setup

Das operative Setup und die Narkoseeinleitung erfolgten in gleicher Weise wie in Kapitel 6.1.3.2.

6.2.4.3 Pankreasexplantation

Es erfolgte eine Längslaparotomie mit seitlichen Erweiterungen und die umgehende Tötung des Tieres durch Perforation des Zwerchfells und anschließendes

Durchschneiden der großen Herzgefäße mittels chirurgischer Schere, da für die Durchführung der Explantation kein physiologischer Blutkreislauf notwendig war. Der Brustkorb des Tieres wurde manuell mit der flachen Hand komprimiert, sodass die abdominalen Organe hervorquollen und die Leber nach kranial umgeklappt werden konnte. Es erfolgte nun die Fischmaul-Inzision des nun freiliegenden Ductus hepaticus communis. Mittels einer 20 ml-Spritze mit aufgesetzter 24 G Venenverweilkanüle wurden 10-15 ml gekühlter Enzymlösung injiziert. Die Menge richtete sich nach der Größe des Spendertieres. Es wurde so viel Enzymlösung injiziert, bis das Pankreas nicht mehr weiter anschwellte. Das sich nun durch die Injektion deutlich vom umliegenden Bindegewebe abhebende Pankreas wurde rasch mittels Federschere aus der Bauchhöhle herausgelöst und von etwaigem anhaftendem Fettgewebe befreit. Es erfolgte die umgehende Lagerung in einem 50ml Zentrifugenröhrchen auf Eis, um die Enzymlösung bis zum Abschluss der Explantationen zu inaktivieren, wobei jeweils die Pankreata von 2 Tieren in einem Röhrchen gelagert wurden. Für einen Rezellularisierungsversuch wurden jeweils die Inselzellen aus 6 Spendertieren isoliert.

6.2.4.4 Aufreinigung der Pankreata und Isolierung der Inselzellen

Nachdem alle Pankreasexplantationen abgeschlossen waren, wurden die in Zentrifugenröhrchen auf Eis gelagerten Pankreata aus dem OP- in den Laborbereich verbracht. Die Enzymlösung wurde aktiviert, indem die Zentrifugenröhrchen in einem Wasserbad bei 37 °C für 15 Minuten manuell geschüttelt wurden, bis sich der Röhrcheninhalt makroskopisch als weitgehend homogene, gelblich-milchige Flüssigkeit darstellte. Das weitere Vorgehen erfolgte unter einer Sicherheitswerkbank.

Der Verdauungsvorgang wurde unterbrochen, indem die Röhrchen desinfiziert und mit auf +4 °C gekühltem Waschmedium aufgefüllt wurden. Diese erste Suspension wurde durch wiederholtes Aufnehmen und Ausstoßen mittels einer 25 ml-Pipette und eines Pipetboy homogenisiert. Die Suspension wurde schließlich durch ein Zellsieb in ein Becherglas überführt, um irrtümlich mitexplantiertes Fett- und Bindegewebe zurückzuhalten. Der Inhalt des Becherglases wurde erneut auf Zentrifugenröhrchen verteilt. Das Becherglas und der Filter wurden mit Waschmedium ausgespült und letzteres ebenfalls in ein Zentrifugenröhrchen gefüllt, um gegebenenfalls noch anhaftende Inselzellen zu gewinnen.

Die Zentrifugenröhrchen wurden mithilfe einer Multifuge-X3R-Universalzentrifuge für 1 Minute bei 4 °C und 277 g zentrifugiert. Hiernach fand sich ein etwa 6mm messendes Pellet am Grund des Röhrchens. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und das Pellet durch leichtes Klopfen gegen den Handballen gelöst. Jedes Zentrifugenröhrchen wurde wieder mit Waschmedium aufgefüllt und die Suspension durch Aufnehmen und Ausstoßen mittels Pipette homogenisiert, um dann abermals zentrifugiert zu werden. Dieser Schritt wurde noch ein- bis zweimal wiederholt, bis sich keine Fett- und Blutreste mehr im Überstand zeigten.

Zeigte sich der Überstand jeweils klar, wurde dieser wie zuvor dekantiert und das Pellet durch Klopfen gelöst. Statt in Waschmedium wurde es jedoch nun in 10 ml Ficoll®-Separationslösung mit einer Dichte von 1,125 g/cm³ resuspendiert und in ein neues Zentrifugenröhrchen pipettiert. Anschließend wurden vorsichtig übereinander Schichten von Ficoll®-Separationslösungen mit Dichten von 1,096 g/cm³, 1,08 g/cm³ und 1,069 g/cm³ pipettiert. Die so präparierten Zentrifugenröhrchen wurden nun für 15 Minuten bei 4 °C bei 1590 g zentrifugiert.

Im Anschluss wurde die oberste Ficoll®-Schicht vorsichtig abgesaugt, und da sie hauptsächlich Fett enthielt, verworfen. Mithilfe einer 25 ml-Pipette wurden die makroskopisch erkennbaren Inselzellen, die sich zwischen den Ficoll®-Schichten von 1,069 g/cm³ und 1,08 g/cm³ Dichte gesammelt hatten, abpipettiert und in ein frisches Zentrifugenröhrchen transferiert. Ebenso wurde mit den Inselzellen zwischen den Ficoll®-Schichten von 1,08 g/cm³ und 1,096 g/cm³ Dichte verfahren, sodass 2 Röhrchen übrigblieben, die jeweils sämtliche Inseln einer Schicht beinhalteten. Diese beiden Zentrifugenröhrchen wurden nun wieder mit Waschmedium aufgefüllt, homogenisiert und bei 277 g, Acc 6, Dec 6 bei +4 °C für 1 Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und die Pellets in jeweils 10ml Inselzellkulturmedium homogenisiert, zusammengefügt und bei 37 °C bis zur Verwendung im Rahmen eines Rezellularisierungsversuches in einer Zellkulturflasche gelagert.

6.2.4.5 Auszählung

Zur Auszählung wurde die Suspension zunächst durch manuelles Schütteln homogenisiert. Anschließend wurden mittels Pipette 1ml der Suspension in eine Zellkulturschale mit quadratischem Raster transferiert. Es wurden ca. 5 Tropfen

sterilfiltrierter Dithizion-Lösung hinzugefügt. Anschließend erfolgte wurden die Inselzellen lichtmikroskopisch ausgezählt.

6.2.5 Rezellularisierung

6.2.5.1 *Material für die Rezellularisierung*

Infusionspumpe (B. Braun, Modell: Perfusor® F)

Perfusorspritze 50ml (B. Braun, Art.-Nr. 8728810F)

Heidelberger Verlängerung 30cm (B. Braun, Art.-Nr. 4097300)

20 ml Injektionsspritzen (BD Discardit™ II)

Kombi-Stopfen (Fresenius Kabi AG, Art.-Nr. 8501512)

Petrischale (Corning®, Art.-Nr. BP94S-01)

Lebermatrix, siehe Kapitel 6.1.4

Inselzellsuspension, siehe Kapitel 6.2.4

PBS (Bio&SELL GmbH, Art.-Nr. BS.L 1820)

6.2.5.2 *Rezellularisierung per Infusionspumpe*

Die dezellularisierte Lebermatrix wurde zunächst in eine Petrischale platziert.

Anschließend wurden sämtliche kanüllierte Zugangswege mittels Stopfen verschlossen, ausgenommen des für die Rezellularisierung vorgesehen Zugangs.

Bei Lebermatrices der Gruppe I wurden dann zunächst ca. 10-20 ml PBS über die Pfortader infundiert, bis sich die Matrix makroskopisch aufblähte. Anschließend erfolgte umgehend die Infusion der Inselzellsuspension. Hierzu wurde zunächst die Suspension in eine Perfusorspritze aufgezogen und diese mit einer mit PBS entlüfteten 30 cm Heidelberger Verlängerung konnektiert und diese in eine Infusionspumpe eingespannt. Nun wurde die Heidelberger Verlängerung mit der Pfortaderkanüle konnektiert und für die Dauer der Inselzellinfusion händisch am Rand der Petrischale festgehalten. Der Perfusor wurde mit einer Laufrate von 99 ml/min gestartet und während des gesamten Infusionsprozesses kontinuierlich mit nach unten zeigender Spitze geschüttelt. Bei Lebermatrices der Gruppe II erfolgte die Infusion analog über den kanüllierte Gallengang. Nach erfolgter Infusion wurde die Perfusorspritze diskonnektiert und weitere ca. 5 ml PBS infundiert, um verbliebene Inselzellsuspension aus der Heidelberger Verlängerung und der Kanüle

ins Gewebe zu spülen. Die auf diese Weise rezellularisierte Lebermatrix wurde dann mit konnektierter Spritze 5-10 Minuten belassen, in welchem Zeitraum sich das Matrixvolumen wieder auf die ursprüngliche Größe reduzierte.

6.2.5.3 manuelle Rezellularisierung

Die Rezellularisierung für Lebermatrices der Gruppen III und IV gestaltete sich zunächst gleich wie im vorangegangenen Kapitel: Auch hier wurden zunächst die Zugänge verschlossen und das Gewebe mittels PBS expandiert. Die anschließende Inselzellinfusion erfolgte jedoch manuell und ohne Zuhilfenahme einer Infusionspumpe. Die Inselzellsuspension wurde in eine 20ml-Spritze aufgezogen und durchgehend geschüttelt, um ein Verklumpen der Suspension zu vermeiden. Anschließend wurde in Gruppe III die Spritze in schneller Folge mit nach unten zeigender Spitze auf die Pfortaderkanüle aufgesteckt und die Suspension rasch infundiert, wobei der manuelle Druck hoch genug gehalten wurde, um die gesamte Lösung in 4-6 Sekunden zu infundieren und niedrig genug, um eine Ruptur der Lebermatrix oder ein Abgleiten der Kanüle oder Spritze zu verhindern. Gelegentlich gestaltete sich der Widerstand als zu groß, um in so kurzer Zeit das gesamte Volumen zu infundieren. Dann wurde die Spritze diskonnektiert, geschüttelt und neu angesetzt, um Verklumpungen zu lösen. In gleicher Weise wurde mit Lebermatrices der Gruppe IV verfahren, jedoch wurde hier statt über die Pfortader über den Gallengang infundiert. Hiernach wurden jeweils noch ca. 1-2 ml PBS infundiert, um eventuell in der Kanüle verbliebene Inselzellen in die Matrix zu spülen. Diese letzte PBS-Spritze verblieb dann in der Kanüle und die Matrix wurde für 5-10 Minuten in der Petrischale belassen. In diesem Zeitraum reduzierte sich das Matrixvolumen wieder auf die ursprüngliche Größe.

6.2.5.4 Asservierung von Proben

Nach Ablauf der oben genannten Ruhezeit wurden sämtliche Stopfen entfernt und Spritzen inklusive den respektiven Verlängerungen diskonnektiert und das Organ bis zur weiteren Analyse in einem Urinbecher in Formalin fixiert.

6.2.6 Histologische Auswertung der rezellularisierten Matrices

Zur histologischen Auswertung wurden die rezellularisierten LHC und LHDL abgetrennt und jeweils in eine Einbettkassette gegeben. Es erfolgte anschließend die

Entwässerung und Einbettung in Paraffin, wie sie bereits in Kapitel 6.1.8.2 beschrieben wurde. Es wurden jeweils 40 Schnitte à 5µm angefertigt. Jeder 5. bzw. 4. Schnitt wurde anschließend mit HE bzw. AZAN gefärbt. Um Redundanzen zu minimieren sind in der unten genannten Materialliste lediglich die für die AZAN-Färbung zusätzlich nötigen Medien aufgeführt.

6.2.6.1 Material für die histologische Auswertung

Anilinalkohol (Morphisto, Art.-Nr. 10138.00250)

Azokarmin (Morphisto, Art.-Nr. 10147.00250)

Essigsaurer Alkohol 1% (Morphisto, Art.-Nr. 11374.00250)

Phosphorwolframsäure 5% (Morphisto, Art.-Nr. 10324.00250)

Anilinblau-Orange G (Morphisto, Art.-Nr. 10144.00250)

6.2.6.2 HE-Färbung

Die Durchführung der HE-Färbung wurde bereits in Kapitel 6.1.8.3 dargelegt.

6.2.6.3 AZAN-Färbung

Nach Entparaffinierung und Rehydrierung wie in Punkt 6.1.8.2 wurden die Schnitte nach dem Bad in 50 % Ethanol für 5 Minuten in Anilinalkohol platziert. Anschließend folgte ein Bad für 45 Minuten in auf 60°C erwärmtem Azokarmin. Es schlossen sich Waschschriffe mit Aqua dest., Anilinalkohol und 1 % Essigsauem Alkohol an, gefolgt von 1,5 Stunden in 5 % Phosphorwolframsäure. Diese wurde mit Aqua des. abgespült und die Schnitte wurden schließlich für 1 Stunde in Anilinblau-Orange G platziert. Hiernach folgte wieder die aufsteigende Alkoholreihe, ein Xylolbad und die Einbettung wie in Punkt 6.1.8.2.

6.2.6.4 Lichtmikroskopische Beurteilung

Die gefärbten Schnitte wurden mithilfe eines Zeiss Axio Observer Z1 untersucht. Der Rezellularisierungserfolg wurde anhand der Verteilung der Inselzellen innerhalb der Extrazellulärmatrix bewertet. Hierbei wurden pro Leberlappen sämtliche gefärbten Schnitte untersucht, um sowohl hilusnahe als auch periphere Teile der Lebermatrix

abzudecken. Die Erstellung von Bildern erfolgte mithilfe der Software Zen microscope 2.3 pro.

7 Ergebnisse

7.1 Beobachtungen während des Dezellularisierungsprozesses

Sowohl die Lebern der Gruppe 1 (Drucksteuerungs-basiertes Protokoll) als auch der Gruppe 2 (Flusssteuerungs-basiertes Protokoll) wurden initial mit PBS perfundiert.

Hierbei konnte bereits ein erythroider Ausstrom aus der kanülierten Vena cava beobachtet werden, der vor Ablauf der PBS-Infusion zum Erliegen kam. Gleichzeitig änderte sich makroskopisch bereits die Farbe des Organs, sie war zum Ende der Perfusion deutlich blasser als zu Beginn. Es ist zu vermuten, dass es sich hierbei um die Ausschwemmung von verbliebenem Blut aus den Lebersinusoiden handelt.

Lebern der Gruppe 2 wurden anschließend mit Triton X mit einer konstanten Laufrate von 5ml/min perfundiert. Hierbei zeigten sich als Ausfluss lediglich transparente Schlieren aus der Vena cava, die makroskopisch dem verwendeten Triton X entsprachen. Gleichzeitig änderte das Organ jedoch seine Farbe zu einem opaken Weiß bis Blassrosa. Während der nachfolgenden Perfusion mit SDS wurde der Ausfluss deutlich wolkig und die Leber begann, vom Hilus ausgehend hin zur Peripherie, transparent zu werden. Bis zum Ende der SDS-Perfusion erhielt man so ein vollständig transparentes Organ. Während des Prozesses wurden ca. 500 ml Triton X und 500 ml SDS verbraucht.

In der Gruppe 1 schloss sich an die PBS-Perfusion sogleich eine Perfusion mit SDS an, und zwar mit einem definierten Perfusionsdruck von 100 mmHg. Hieraus ergab sich zunächst eine grundlegend andere Arbeitsweise der Pumpe: Sie wurde lediglich aktiviert, wenn der gemessene Druck unter 100 mmHg fiel, und deaktiviert, wenn der Zieldruck erreicht war. Dies führte zu einer rhythmisch-pulsatilen Arbeitsweise, wobei die Pumpe ca. alle 5 Sekunden kurzzeitig ansprang und eine Flussrate von 1ml/min nie überschritt. Aufgrund des insgesamt deutlich niedrigeren Flusses zeigte sich auch der Ausfluss aus der kanülierten Vena cava im Vergleich zu Gruppe 2 deutlich dünner und weniger wolkig. Über einen Zeitraum von 12-14 Stunden erhielt man auch hier ein vollständig transparentes Organ, wieder zeigten sich die makroskopischen Veränderungen initial an der Leberpforte und breiteten sich zur Peripherie hin aus. Die anschließende Perfusion mit Triton X führte zu keinerlei makroskopischen Veränderungen, der Ausfluss zeigte sich ebenso transparent wie in Gruppe 2. Während des Dezellularisierungsprozesses wurden ca. 4000 ml SDS und ca. 30 ml Triton X verbraucht.

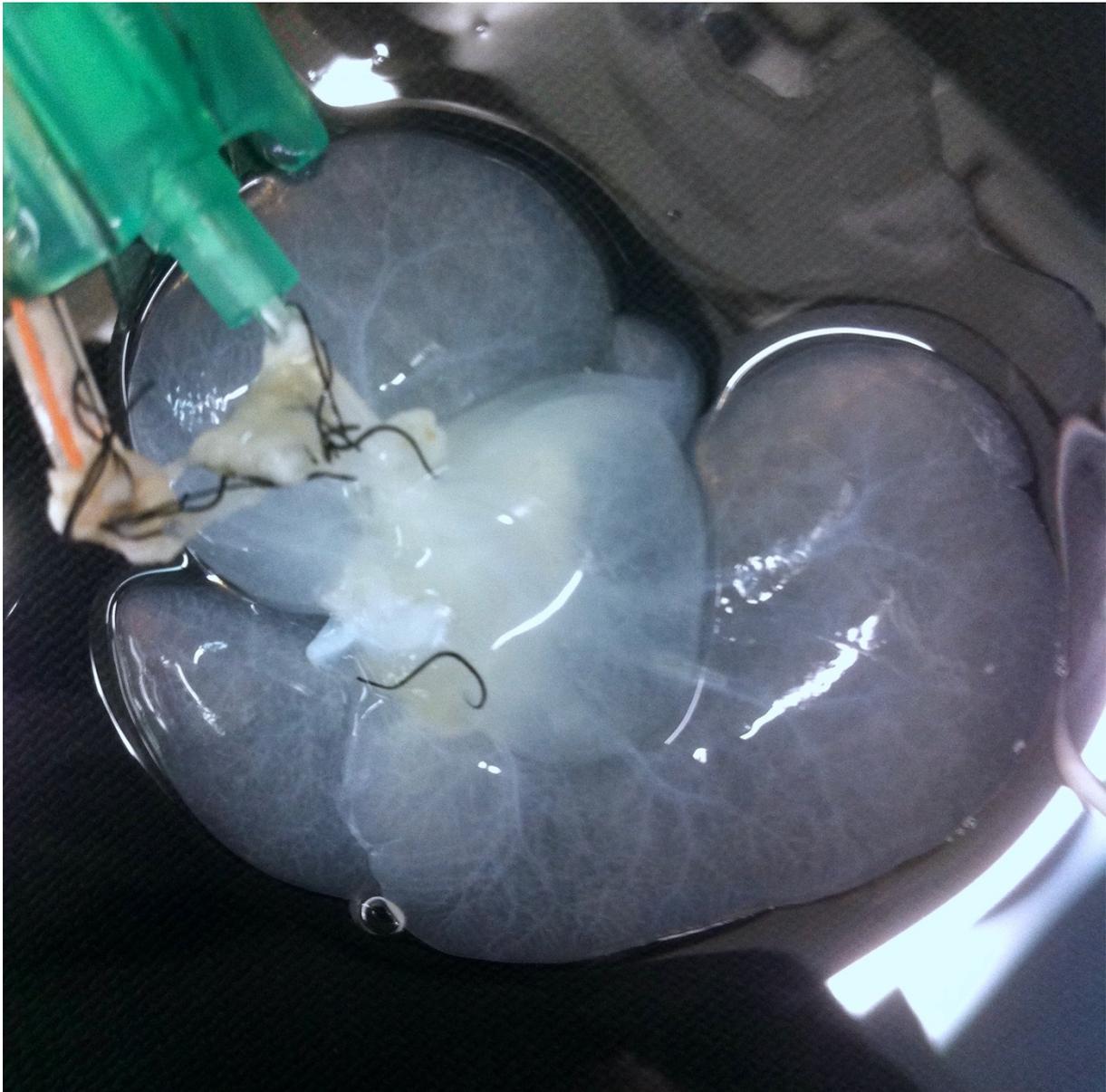


Abbildung 9: Lebermatrix nach vollendeter druckgesteuerter Dezellularisierung. Deutlich zu sehen ist das nahezu vollständig transparente Leberparenchym bei erhaltener Gefäßarchitektur. Im Bereich der Gefäßkanülen und des Hilus stellen sich Fragmente perihepatischen Fettgewebes und des Diaphragmas gelblich dar.

7.2 Histomorphologische und immunhistochemische Evaluation des Dezellularisierungsprozesses

In den dezellularisierten Gruppen zeigte die Färbung mit Hämatoxylin und Eosin die Abwesenheit von Zellkernen und Zytoplasma und den Verbleib einer intakten Extrazellulärmatrix mit sich wiederholender Glisson-Trias (siehe Abbildung 10). Die Sirius-Red-Färbung zeigte in beiden Gruppen die Abwesenheit von Parenchymzellen (gelb) und das Vorhandensein von Kollagenfasern (rot). In den Gruppen 1 und 2 zeigten sich in der Alcian-Blue-Färbung das Vorhandensein von

Glykosaminoglykanen (blau) und das Fehlen von Nuclei und Zytoplasma (rosa bis rot).

Immunhistochemisch konnten in beiden Gruppen Kollagen IV, Laminin und Fibronectin nachgewiesen werden (siehe jeweils Abbildung 11).

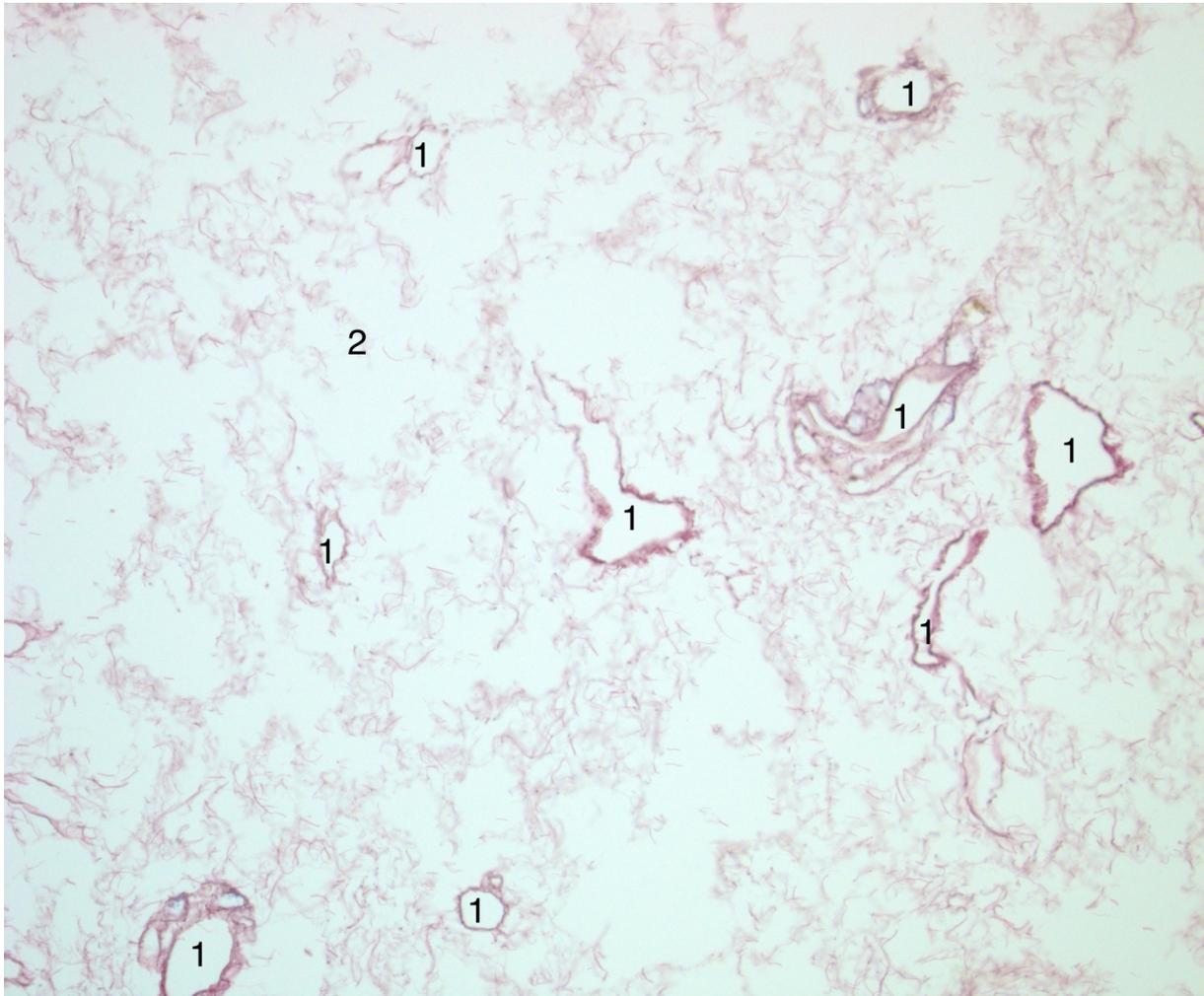


Abbildung 10: HE-Färbung einer druckgesteuert dezellularisierten Leber. (1) Angeschnittene Gefäße der Glisson-Trias, (2) Zellfreies ehemaliges Leberparenchym, Extrazellulärmatrix.

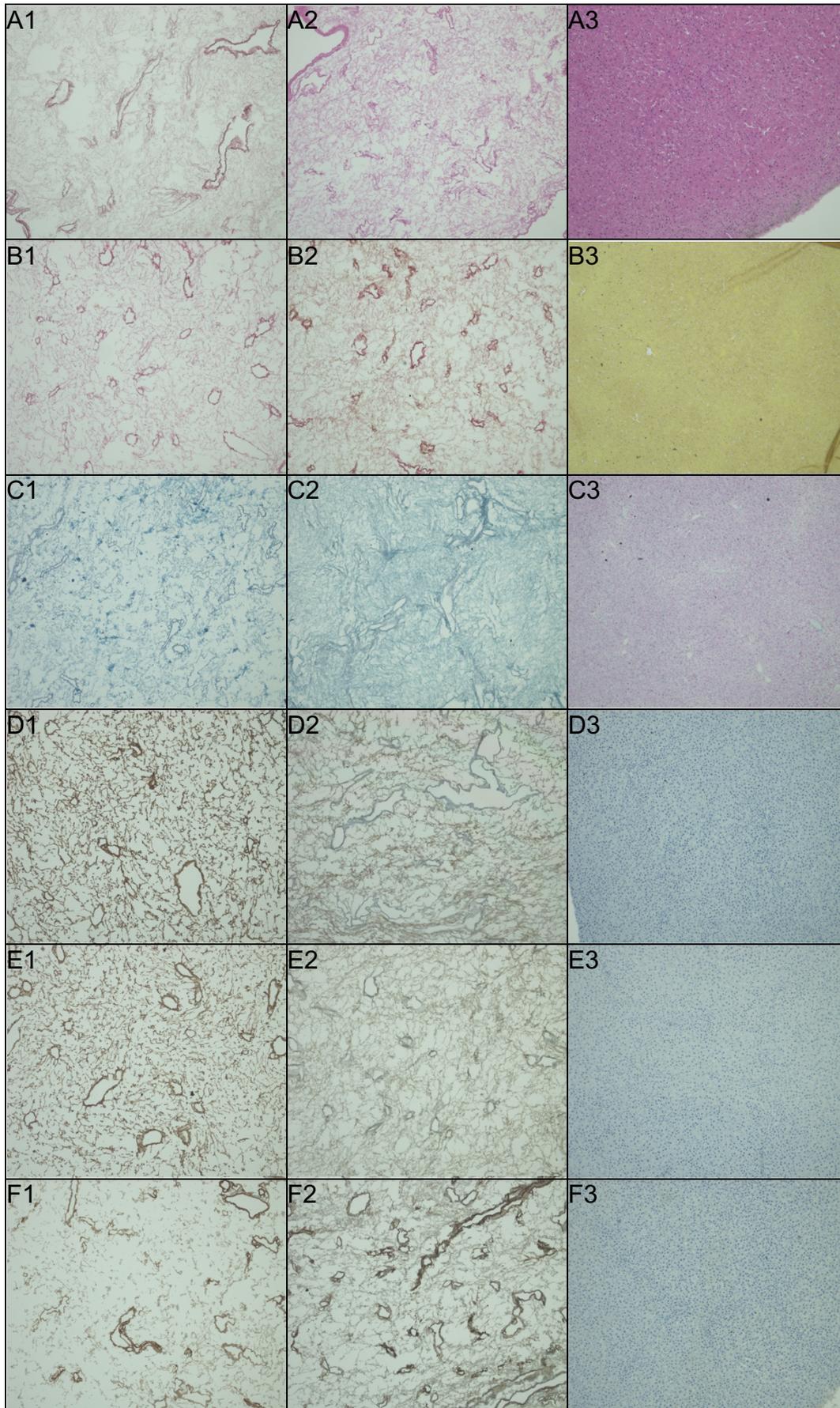


Abbildung 11: Histologie und Immunhistochemie des Dezellularisierungserfolges. (1) Druckgesteuerte Dezellularisierung; (2) Flussgesteuerte Dezellularisierung; (3) Kontrollgruppe mit Nativelebern. A: Hämatoxylin & Eosin; B: Picro-Siriusrot; C: Alcian-Blau-PAS; D: Collagen IV; E: Fibronectin; F: Laminin.

7.3 Quantitative biochemische Evaluation des Dezellularisierungsprozesses

7.3.1 DNA-Gehalt

Im Vergleich zur Kontrollgruppe war der DNA-Gehalt nach flussgesteuerter Dezellularisierung signifikant reduziert (Kontrolle: $140,10 \pm 42,66 \mu\text{g}/\text{mg}$ vs. flussgesteuert: $2,44 \pm 1,74 \mu\text{g}/\text{mg}$; $p=0.0237$). Auch nach einer druckgesteuerter Dezellularisierung war ein deutlicher Abfall des DNA-Gehaltes gegenüber der Kontrollgruppe zu beobachten (Kontrolle: $140,10 \pm 42,66 \mu\text{g}/\text{mg}$ vs. druckgesteuert: $18,89 \pm 23,12 \mu\text{g}/\text{mg}$; $p=0.0586$). Zwischen den beiden Versuchsgruppen konnte kein signifikanter Unterschied gefunden werden (fluss- vs. druckgesteuert: n.s.).

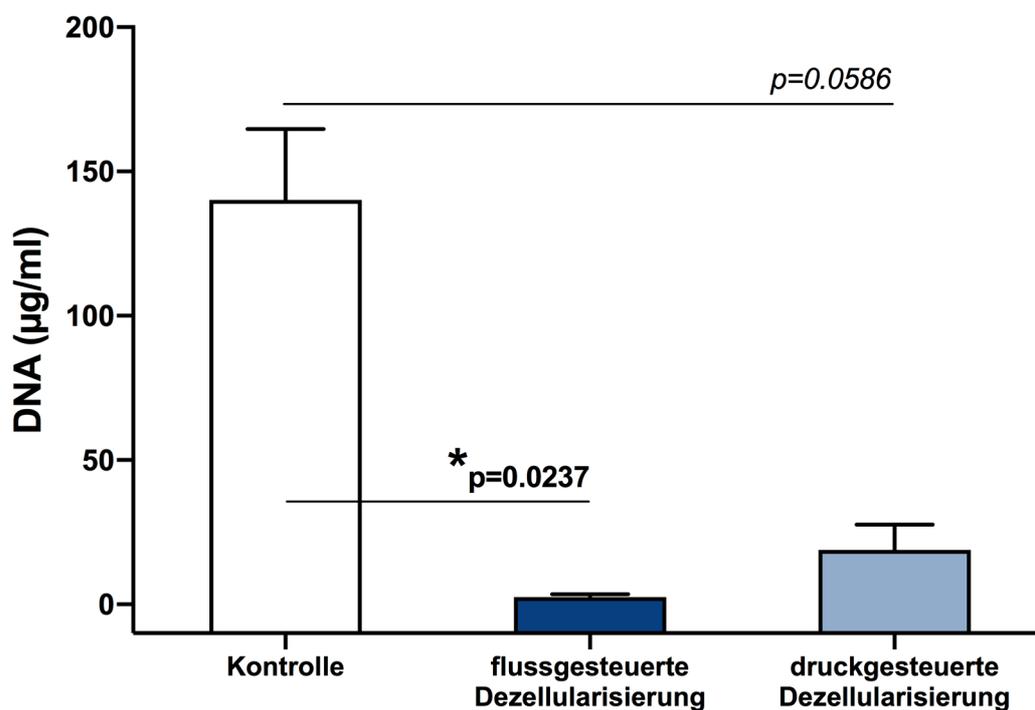


Abbildung 12: DNA-Gehalt in $\mu\text{g}/\text{ml}$ nach stattgefundenener Dezellularisierung.

7.3.2 sGAG-Gehalt

Der sGAG-Gehalt war nach flussgesteuerter Dezellularisierung signifikant höher als in der Kontrollgruppe (Kontrolle: $3,68 \pm 0,99 \mu\text{g}/\text{mg}$ vs. flussgesteuert: $17,89 \pm 7,03 \mu\text{g}/\text{mg}$; $p=0.0471$). Ebenso war der sGAG-Gehalt nach druckgesteuerter Dezellularisierung gegenüber der Kontrollgruppe deutlich, wenn auch nicht signifikant, erhöht (Kontrolle: $3,68 \pm 0,99 \mu\text{g}/\text{mg}$ vs. druckgesteuert: $15,65 \pm 10,33 \mu\text{g}/\text{mg}$; $p=0.0525$). Auch hier konnte kein Unterschied zwischen den beiden Dezellularisierungsgruppen beobachtet werden (fluss- vs. druckgesteuert: n.s.).

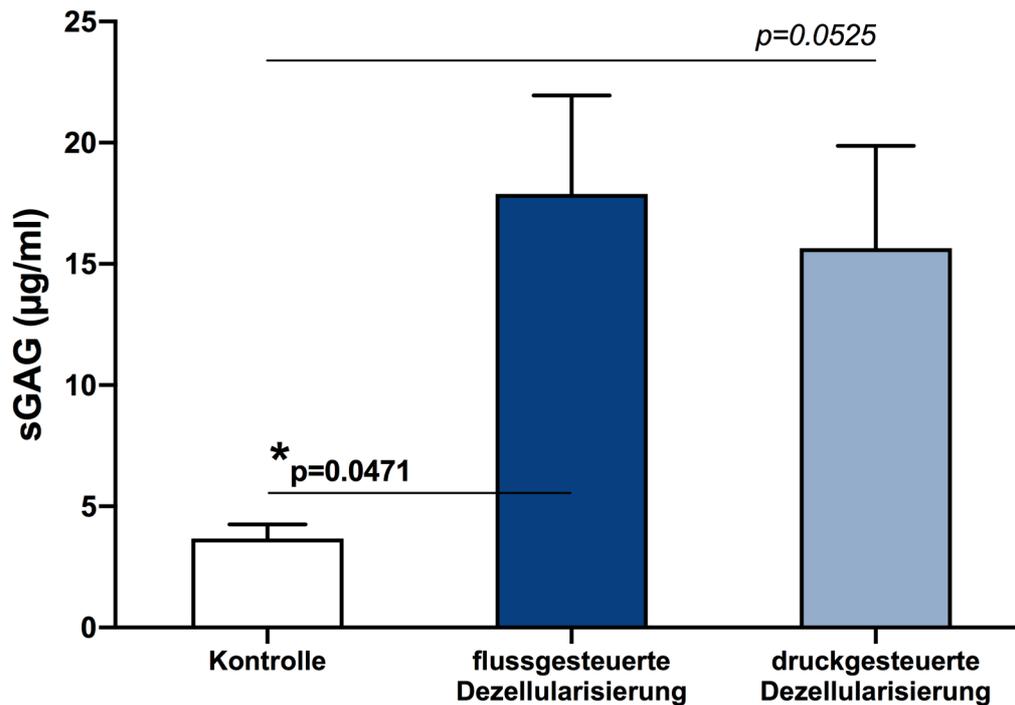


Abbildung 13: sGAG-Gehalt in µg/ml nach stattgefundenener Dezellularisierung..

7.3.3 SDS-Gehalt

Der residuale SDS-Gehalt nach Dezellularisierung zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen (flussgesteuert: $0,54 \pm 0,48$ µg/mg vs. druckgesteuert: $0,29 \pm 0,31$ µg/mg; n.s.). Der SDS-Gehalt in der Kontrollgruppe lieferte aufgrund deutlicher makroskopischer Eintrübung der hierfür verwendeten Proben überhöhte Absorptionswerte außerhalb der Standardkurve. Diese Messergebnisse konnten daher nicht zum Vergleich herangezogen werden.

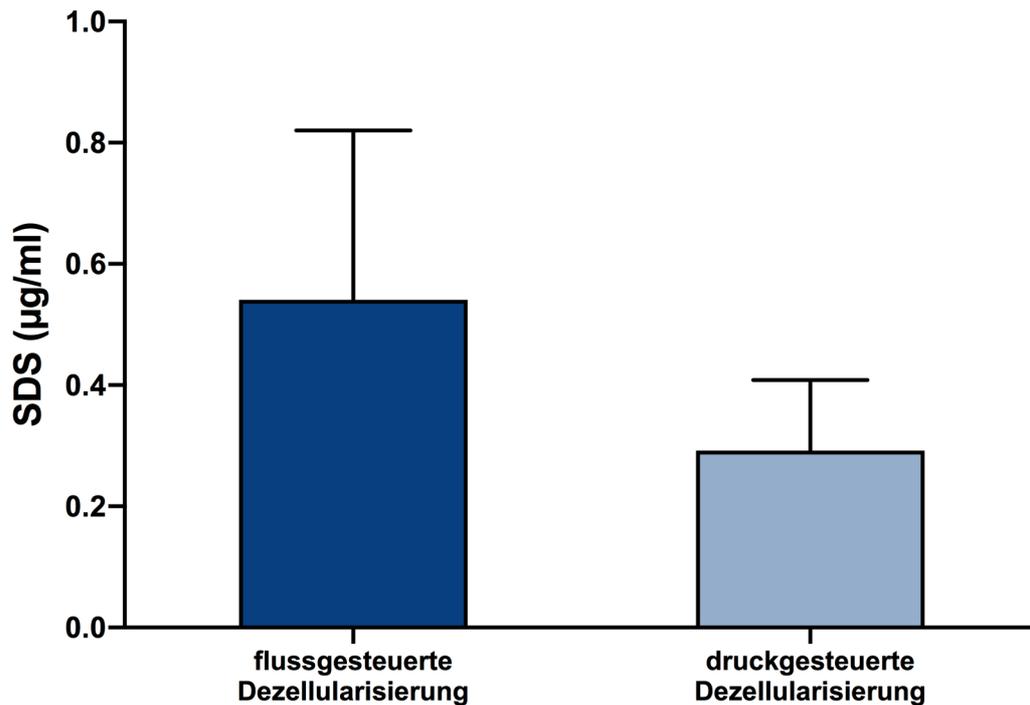


Abbildung 14: SDS-Gehalt nach stattgefundener Dezellularisierung. Die Messergebnisse der der Kontrollgruppe 3 wurden verworfen und sind hier nicht dargestellt.

7.4 Beobachtungen während des Rezellularisierungsprozesses

Grundsätzlich bestand die größte Herausforderung im Umgang mit den isolierten Inselzellen in ihrer Tendenz, innerhalb der Inselzell-Medium-Suspension zu verklumpen. Eine solche Suspension konnte nur durch beständiges und verhältnismäßig energisches Schütteln homogen gehalten werden. Bereits eine kurze Ruhephase führte zum sofortigen Absinken und zur Agglutination der Inselzellen was eine homogene Verteilung im rezellularisierten Gewebe von vornherein unmöglich machten oder im ungünstigsten Fall zur Verstopfung des kanülierten Gefäßes führten.

Unabhängig von der Infusionsroute konnte diesem Problem in den Gruppen III und IV aufgrund der manuellen Inselzellinfusion verhältnismäßig einfach durch zügiges Arbeiten begegnet werden. Die Spritze mit der Inselzellsuspension wurde geschüttelt, schnell konnektiert und die Suspension rasch infundiert, bevor sich größere Klumpen bilden konnten.

In den Gruppen I und II, in denen die Inselzellinfusion mittels Infusionspumpe vonstatten ging, konnte das Problem der Zellverklumpung nur schwer oder gar nicht gelöst werden. Die Infusion ging sehr langsam vonstatten und währenddessen musste die gesamte Infusionspumpe mit eingespannter Spritze über einen Zeitraum von ca. 10 Minuten kontinuierlich geschüttelt werden. Dies machte eine

Schlauchverlängerung zwischen Infusionskanüle und Perfusorspritze nötig, um die Schüttelbewegungen nicht auf die empfindliche Lebermatrix zu übertragen und sie durch den mechanischen Stress zu beschädigen oder die Kanüle abzureißen.

Während die Inselzellsuspension innerhalb der Perfusorspritze durch diese Maßnahmen homogen gehalten werden konnte, kam es aufgrund der langsamen Wanderung der Inselzellen durch die Schlauchverlängerung in ihrem Lumen zur Bildung von Klumpen.

In Organmatrices der Gruppen I und III, die jeweils über die Pfortader rezellularisiert wurden, zeigten sich unmittelbar nach der Rezellularisierung makroskopische Zellklumpen innerhalb der großen Gefäße, ähnlich einem Ausgussmodell, umgeben von transparentem Matrixgewebe.

Bei den Gruppen II und IV, in denen die Organmatrices über den Gallengang infundiert wurden, zeigten sich makroskopisch ebenfalls Zellklumpen, die jedoch keinem so klaren Verteilungsmuster folgten. Es zeigten sich lediglich diffus verteilte Areale mit großen Anhäufungen von Inselzellen, während andere Bereiche transparent blieben.

In allen Gruppen wurde die Lebermatrix zunächst durch Infusion von PBS aufgebläht. Nach erfolgter Rezellularisierung fiel das Organoid langsam in sich zusammen und in der Petrischale sammelten sich PBS und Medium, die aufgrund nicht vollständig dicht kanüllierten Gefäßen austraten. Eine lichtmikroskopische Kontrolle des mit Dithizon gefärbten Exfluates zeigte nur vereinzelt vorkommende Inselzellen, die in ihrer geringen Anzahl auch durch nicht ganz tropfenfreies Hantieren mit der Inselzellspritze in die Petrischale gelangt sein konnten. Jedenfalls ergab sich bei keiner der Gruppen ein Anhalt auf eine vermehrte Leckage von Inselzellen, sie verblieben vielmehr in allen Gruppen größtenteils in der Lebermatrix.

7.5 Histologische Evaluation der rezellularisierten Matrices

Die HE-Färbung gab zunächst Aufschluss über die generelle Verteilung der infundierten Inselzellen. In allen vier Gruppen konnten diese innerhalb der dezellularisierten Lebermatrix nachgewiesen werden. Sie lagen in allen vier Gruppen mehrheitlich nicht singulär, sondern in Clustern bis hin zu größeren Konglomeraten vor. Darüber hinaus konnten in allen Gruppen Inselzellen sowohl in der Nähe des Hilus, als auch in der Peripherie nachgewiesen werden. Organmatrices der Gruppen

I und III, die über die Pfortader rezellularisiert wurden, zeigten hierbei ein anderes Verteilungsmuster als die Organoide der Gruppen II und IV, die über den Gallengang rezellularisiert wurden. Die Inselzellen in den Organoiden der Gruppen I und III lagen zu ganz überwiegendem Teil in klar definierten und vom umliegenden Matrixgewebe scharf abgegrenzten Formen vor.

Diese Formen stellten sich teils elliptisch, teils länglich-schlauchförmig und zu einem beträchtlichen Teil klar dendritisch dar und bildeten so das Lumen verschieden angeschnittener Pfortaderäste ab (siehe Abbildung 15).

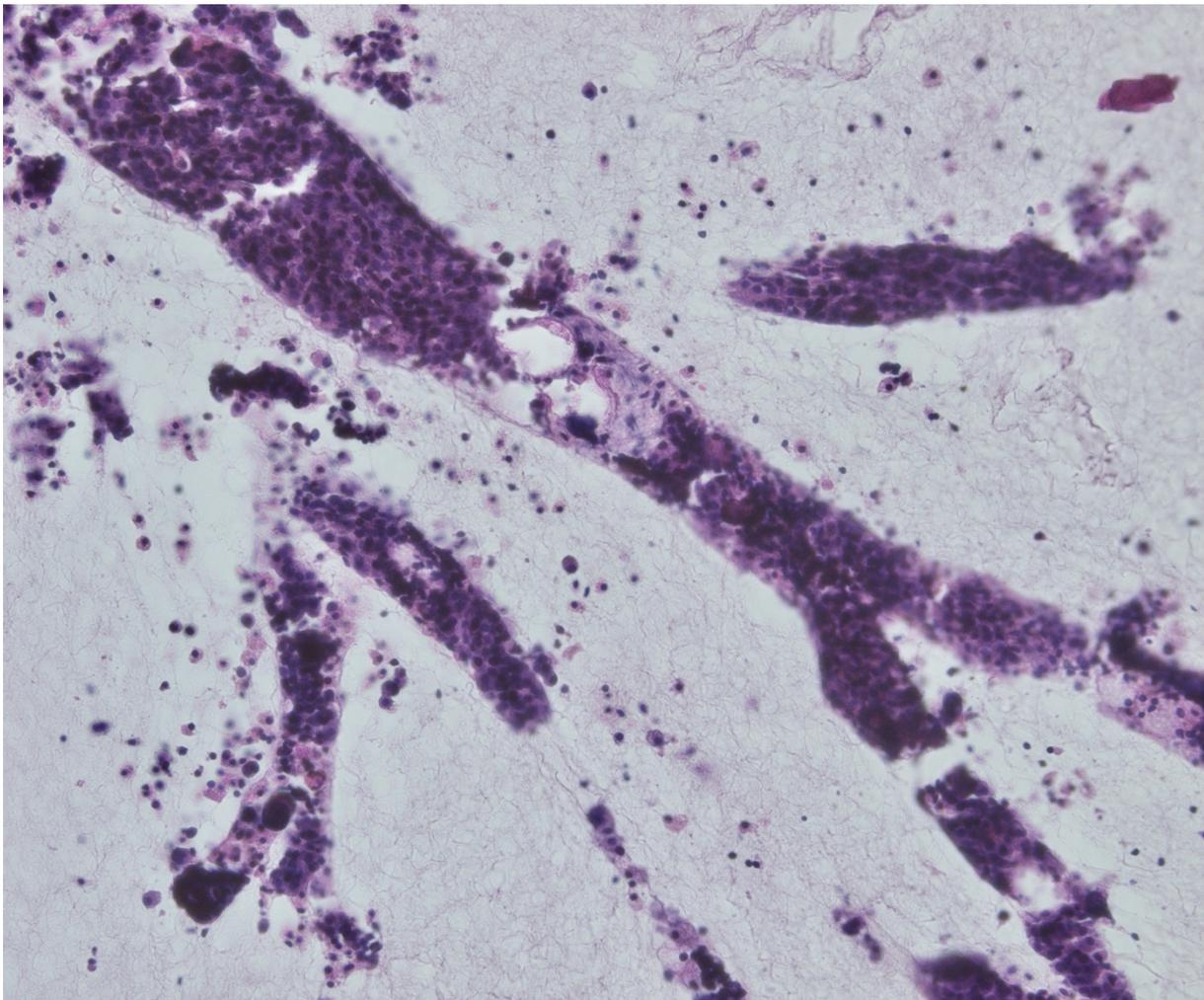


Abbildung 15: HE-Färbung einer über die Pfortader rezellularisierten Matrix. Deutlich zu sehen ist die scharfe Abgrenzung der Zellkonglomerate vom umliegenden Matrixgewebe und ihre dendritische Form.

In den Gruppen II und IV hingegen traten die Inselzellen nicht in diesen genannten scharf umgrenzten Formen auf. Vielmehr waren sie generell über die gesamte Parenchymmatrix hin verteilt, in Nachbarschaft der dezellularisierten Gefäßäste. Wohl kamen jedoch große Zellkonglomerate vor, die mit Durchmessern von teilweise 1000 μm deutlich größer waren als diejenigen in den Gruppen I und III. Diese Zellkonglomerate waren wie erwähnt nicht scharf begrenzt oder geformt, sondern

zerfielen an ihren Rändern scheinbar in lockerere Ansammlungen einzelner Inselzellcluster und Inselzellen (siehe Abbildung 16).

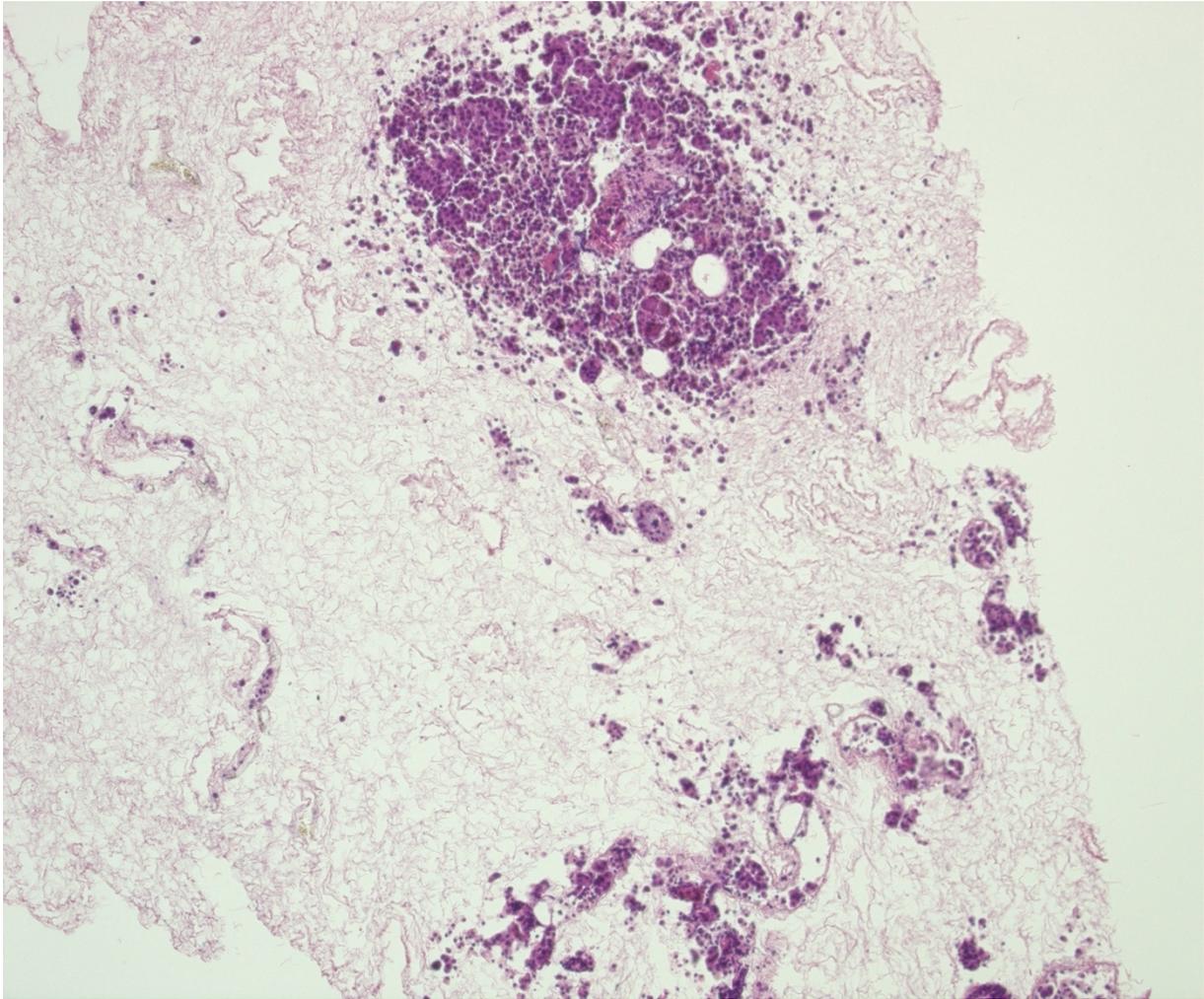


Abbildung 16: HE-Färbung einer über den Gallengang rezellularisierten Matrix. Es treten diffuse Inselzellhaufen und teilweise sehr große Inselzellkonglomerate auf, jedoch ohne scharfe Abgrenzung zum umliegenden Gewebe und ohne klare, wiederkehrende Form.

Das Infusionsverfahren (manuell vs. Infusionspumpe) führte zu keinen sichtbaren Unterschieden im Verteilungsmuster (siehe Abbildung 17).

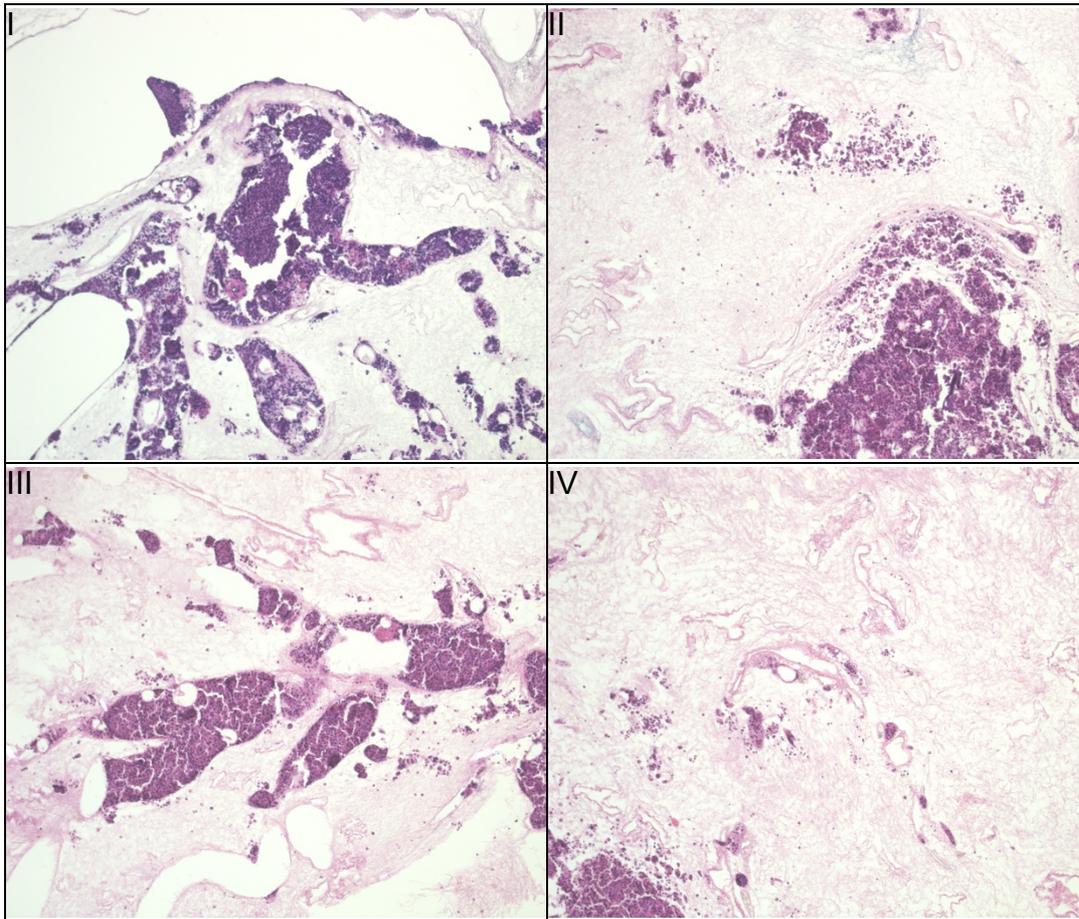


Abbildung 17: HE-Färbungen der rezellularisierten Organmatrices. (I) Inselzellinfusion über die Pfortader mittels Infusionspumpe, (II) Inselzellinfusion über den Gallengang mittels Infusionspumpe, (III) manuelle Inselzellinfusion über die Pfortader und (IV) manuelle Inselzellinfusion über den Gallengang.

Die AZAN-Färbung des jeweils benachbarten Schnittes gab weiteren Aufschluss über das Verteilungsmuster der infundierten Inselzellen: Inselzellen wurden rot gefärbt und kollagenhaltiges und retikuläres Gewebe blau, somit war eine einfachere Differenzierung der verschiedenen Strukturen möglich. Die zuvor erwähnten scharf begrenzten Zellkonglomerate der Gruppen I und III stellten sich hier rot dar und waren vom umliegenden, weitgehend transparenten Matrixgewebe durch dicke, blau gefärbte Schichten retikulären oder kollagenösen Gewebes getrennt. Aufgrund der Form ist anzunehmen, dass es sich hierbei um die Basalmembran der Pfortaderäste handelt und diese eine Barriere für die infundierten Inselzellen darstellt. Diese verblieben demnach weitgehend innerhalb des portalvenösen Systems (siehe Abbildung 18).

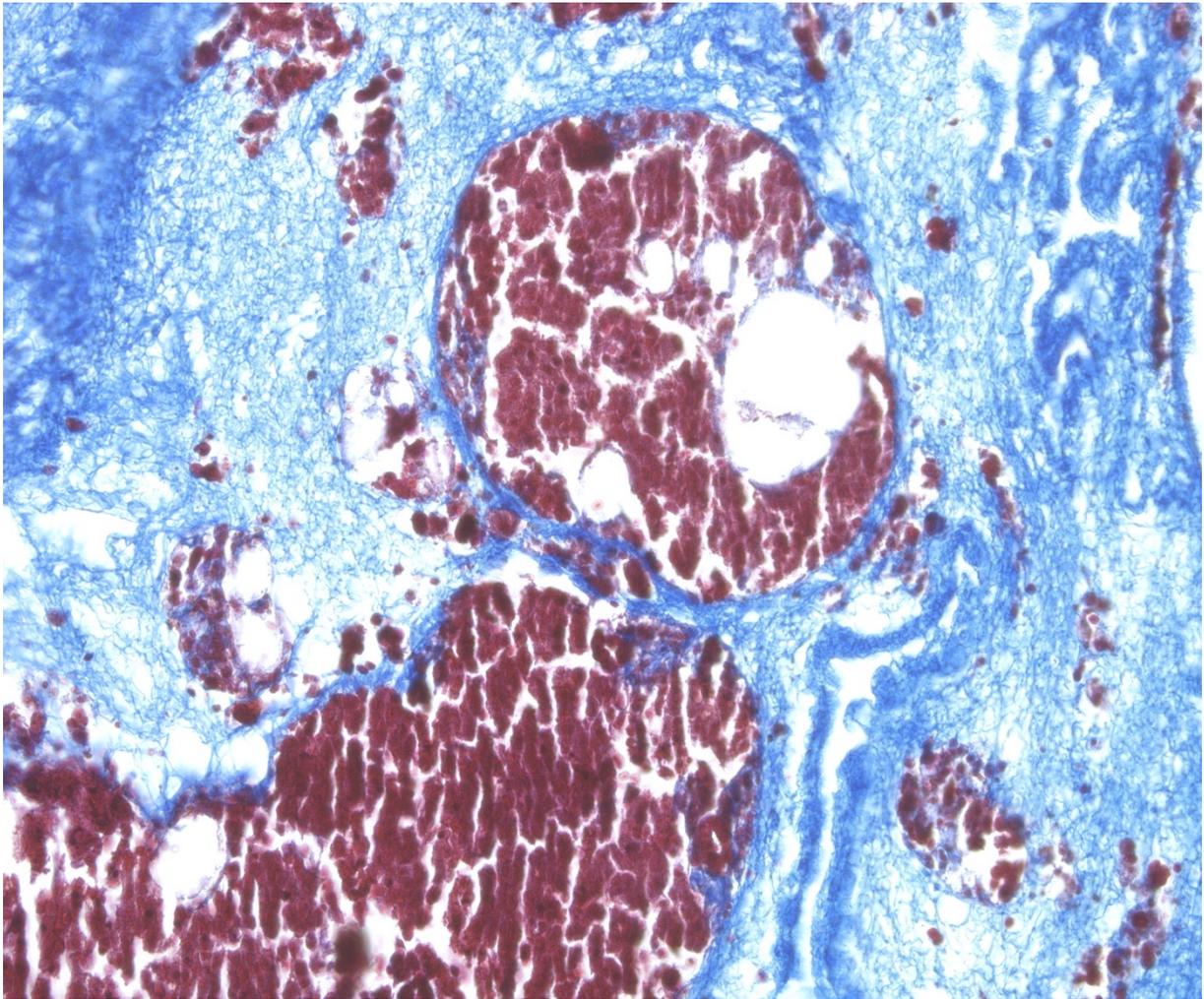


Abbildung 18: AZAN-Färbung einer über die Pfortader rezellularisierten Matrix. Scharf begrenzte, elliptische, rot gefärbte Inselzellansammlungen sind von einer dicken, stark blau gefärbten Basalmembran umgeben.

In den Gruppen II und IV zeigten die Zellkonglomerate keine solche Begrenzung durch retikuläres oder kollagenöses Gewebe. Während bei den vorgenannten sehr großen Zellkonglomeraten keine allgemeine Aussage über die Lagebeziehung zu verschiedentlich angeschnittenen Gefäßästen möglich ist (außer, dass sie eindeutig außerhalb des Lumens auftreten), traten kleinere Zellcluster gehäuft in direkter Nachbarschaft solcher retikulärer bzw. kollagenöser Strukturen auf (siehe Abbildung 19).

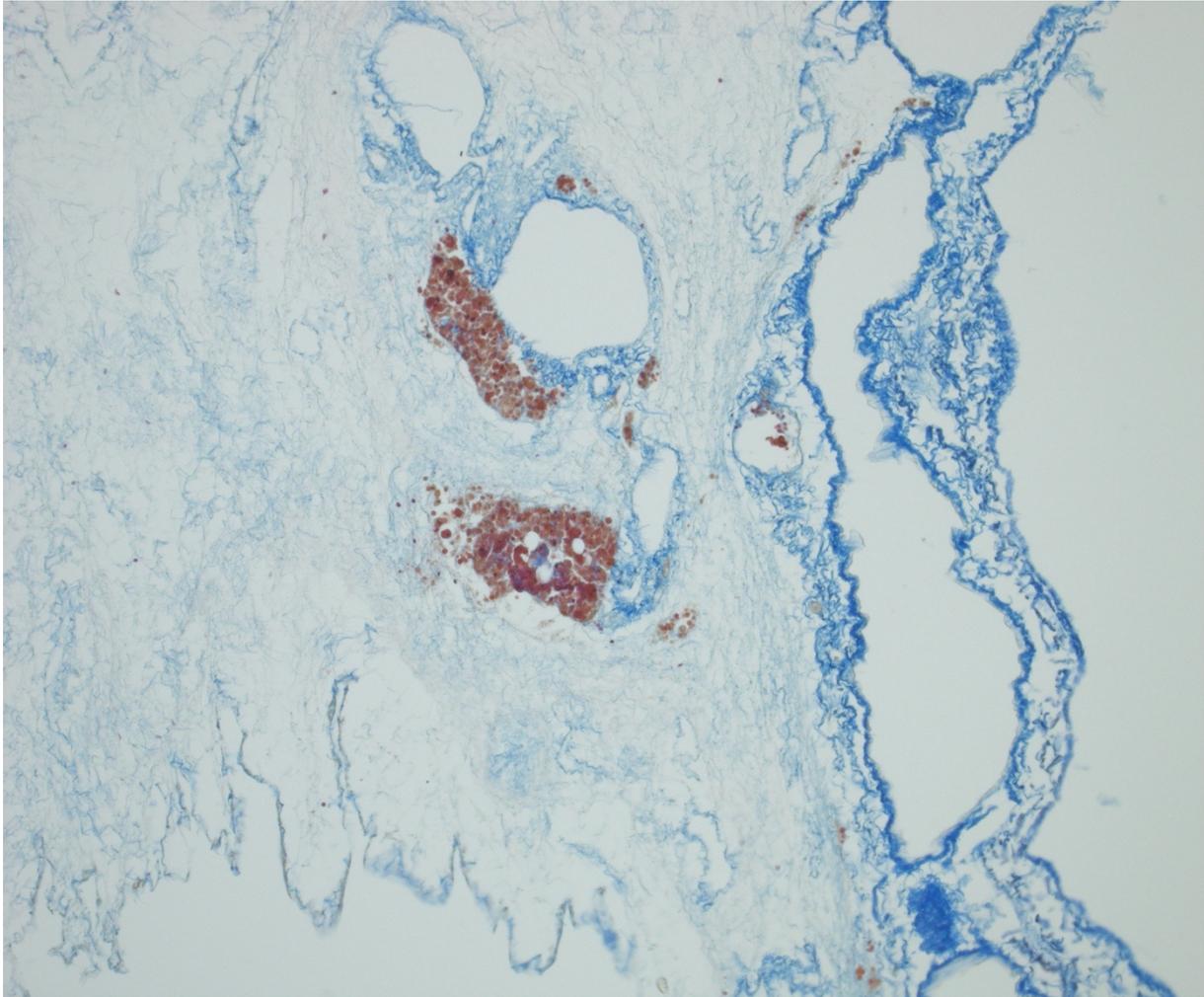


Abbildung 19: AZAN-Färbung einer über den Gallengang rezellularisierten Matrix. Diffuse Inselzellhaufen finden sich außerhalb der angeschnittenen Gefäßlumen, in direkter Nachbarschaft ihrer blau gefärbten Basalmembran.

Auch hier führte das Infusionsverfahren (manuell vs. Infusionspumpe) zu keinen sichtbaren Unterschieden im Verteilungsmuster (siehe Abbildung 20).

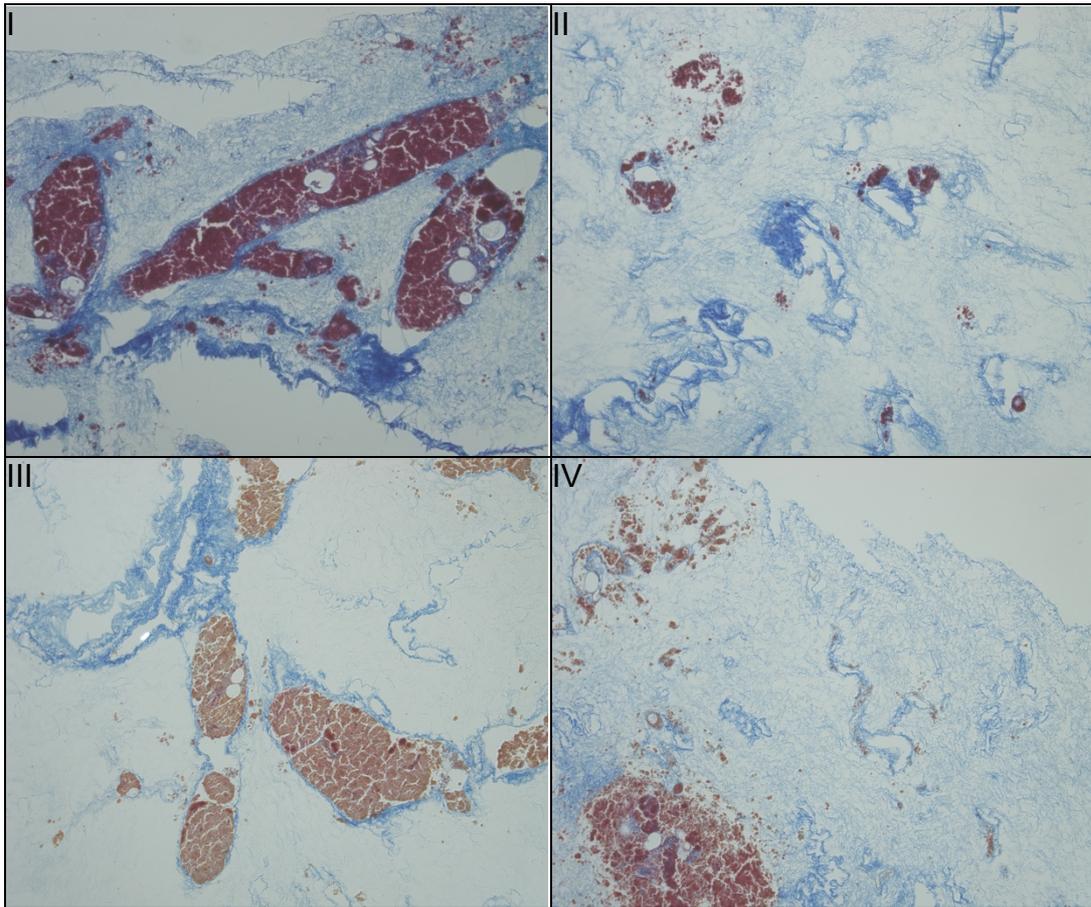


Abbildung 20: AZAN-Färbungen der rezellularisierten Organmatrices. (I) Inselzellinfusion über die Pfortader mittels Infusionspumpe, (II) Inselzellinfusion über den Gallengang mittels Infusionspumpe, (III) manuelle Inselzellinfusion über die Pfortader und (IV) manuelle Inselzellinfusion über den Gallengang.

8 Diskussion

8.1 Die Notwendigkeit eines insulinproduzierenden Neo-Organs

Seit mehreren Jahrzehnten verfolgt die medizinische Forschung im Bereich des tissue engineering das Ziel, unter Laborbedingungen implantierbare Organe zu generieren (61). Im Falle des endokrinen Pankreas müsste dieses aus den endokrin aktiven Inselzellen und einem passenden umgebenden Trägermedium bestehen, welches eine ausreichende Blutversorgung gewährleistet, bestenfalls molekulare Bestandteile der physiologischen Umgebung der Inselzellen enthält und strukturell ausreichend stabil ist, um eine Implantation zu ermöglichen.

Das Verfahren, Inselzellen durch enzymatischen Verdau zu isolieren und direkt in die Pfortader des Empfängers zu applizieren, findet bereits klinische Anwendung.

Jedoch gehen hier große Mengen der Inselzellen unter, sodass die Technik nach wie vor einer Transplantation des Pankreas in toto unterlegen ist. Es wurden diverse Versuche unternommen, Inselzellen entweder auf unterschiedliche Art und Weise zu ummanteln oder in artifizielle Devices einzubringen, um sie nach einer Implantation vor immunogenem Stress zu schützen. Allerdings konnte dies nicht das Problem einer fehlenden Vaskularisierung und der damit einhergehenden Hypoxie lösen. Zudem fehlen bei künstlichen Devices weiterhin die Bestandteile der physiologischen Extrazellulärmatrix, mit denen Inselzellen interagieren und somit deren Einfluss auf die Funktion der Inselzellen (30, 62-64). In der vorliegenden Arbeit wurde deswegen in einem Rattenmodell der Versuch unternommen, Inselzellen in eine perfusionsdezellularisierte Lebermatrix einzubringen.

8.2 Die Dezellularisierungsversuche

In unserer Arbeitsgruppe ist die Perfusionsdezellularisierung mittlerweile eine etablierte Methode (59). Das in diesem Projekt angewandte Protokoll stellt eine Synthese aus den eigenen, weiterentwickelten Verfahren (59) und Methoden dar, die bereits von Ott et al. für Herz, Lunge und Niere publiziert wurden (51). Das Setup der Perfusion über die A. hepatica unter oszillierenden Druckverhältnissen wurde beibehalten. Allerdings wurde statt einer starren Flussrate von 5ml/min, die für einen hohen Perfusionsdruck zu Beginn und niedrigere Druckwerte am Ende der Perfusion sorgt, ein druckgesteuerter Aufbau gewählt, der die Flussrate kontinuierlich an einen fixen Perfusionsdruck von 100 mmHg anpasst und so die Extrazellulärmatrix weniger

Stress aussetzen soll. Auch wurde die Reihenfolge der Detergenzien verändert, um etwaige SDS-Rückstände in der dezellularisierten Matrix zu minimieren: Statt einer initialen Perfusion mit Triton-X-100 und einer folgenden mit SDS für jeweils 45 Minuten, erfolgte zuerst die weitaus längere Perfusion mit SDS über 12 Stunden und anschließend eine kurze Perfusion mit Triton-X-100 für 45 Minuten. Der deutlich niedrigere Perfusionsdruck machte jedoch bis zum Erreichen einer zufriedenstellenden Dezellularisierung, d.h. zunächst bis zum Erhalt eines makroskopisch durchsichtigen Organs, eine wesentlich längere Perfusion und damit erheblich größere Mengen an SDS-Lösung erforderlich. Somit ist diese Methode zeitaufwendiger und materialintensiver als das zuvor verwendete Protokoll von Struecker et al.. Auch ist das Perfusionssystem störanfälliger, da Materialfehler oder kleinste Leckagen an den Schlauchverbindungen über einen Zeitraum von 12 Stunden durchaus zu einem Leerlauf des Systems führen können. Je nach Außentemperatur musste die Perfusionsdezellularisierung zum Teil in einem temperierten Brutschrank bei 20°C erfolgen, da zu hohe Temperaturen zu Geruchsentwicklung führten. Eine allgemeine Limitierung jedes Dezellularisierungsverfahrens stellt die Tatsache dar, dass es bisher nicht gelungen ist, eine vollständig sterile Extrazellulärmatrix herzustellen (56).

Die Dezellularisierungsergebnisse wurden zunächst histomorphologisch nach einer simplen HE-Färbung beurteilt. Die gewählte hohe Schnittdicke von 5µm ergab sich aus der im Vergleich zu einer nativen Leber deutlich niedrigeren strukturellen Stabilität der dezellularisierten Lebermatrix nach der Einbettung in Paraffin. Es wurden Schnitte sowohl aus der Peripherie als auch aus dem Zentrum der dezellularisierten Organe gefärbt und beurteilt. Die HE-Färbung ist eine Standardmethode und geeignet, das Vorhandensein von Zellkernen und damit den Erfolg einer Dezellularisierung zu beurteilen. Es erfolgten zudem Färbungen mit Alcianblau und Pikro-Siriusrot, die in unserem Labor etablierte Methoden darstellen. Alcianblau erlaubt durch die selektive Blaufärbung von Glykosaminoglykanen Aussagen zur Erhaltung der dezellularisierten Extrazellulärmatrix (65). Gleiches gilt für Pikro-Siriusrot, das Kollagenfasern (rot) deutlich von Zytoplasma (gelb) abgrenzt und auch in der klinischen Leberfibrosediagnostik Anwendung findet (66, 67). Auch die immunhistochemischen Verfahren zur Bestimmung von Laminin, Kollagen IV und Fibronectin sind in unserem Labor bereits etabliert und stellen gängige Verfahren in

der Beurteilung des Dezellularisierungserfolges dar (51). Ähnlich wie die oben genannten Färbungen erlauben sie zwar nur sehr bedingt quantitative Aussagen über das Dezellularisierungsprodukt, allerdings liefern sie verlässliche qualitative Aussagen über den Erfolg einer Dezellularisierung und über die Zusammensetzung der verbliebenen Extrazellulärmatrix (59).

Makroskopisch und histomorphologisch zeigten Rattenlebern, die nach dem druckgesteuerten Protokoll dezelluliert wurden, reproduzierbar zufriedenstellende Dezellularisierungsergebnisse. Im Vergleich zu den Schnitten der Nativlebern wurden Zellen zuverlässig entfernt während die Extrazellulärmatrixarchitektur erhalten blieb (siehe Abbildung 11). Immunhistochemisch konnte die Konservierung von Laminin, Kollagen und Fibronectin sowie der Erhalt der Basalmembranen nachgewiesen werden. Im Vergleich zu Rattenlebern, die nach dem flussgesteuerten Protokoll dezelluliert wurden, zeigten sich die Ergebnisse gleichwertig, wobei bei den angewendeten Verfahren mögliche Unterschiede hier schwierig zu identifizieren und quantifizieren sind (siehe ebenda).

Zur Quantifizierung der Dezellularisierung wurden biochemische Analysen durchgeführt. Die Bestimmung des DNA-Gehaltes eignet sich für die Quantifizierung des Dezellularisierungserfolgs, da die Dezellularisierung durch eine möglichst vollständige Entfernung von Zellen und deren Bestandteilen wie Nukleinsäuren definiert ist. Die Verwendung des DNeasy Blood & Tissue Kit ist ein etabliertes Verfahren und wurde bereits zuvor in unserer Arbeitsgruppe zur Beurteilung von Dezellularisierungsversuchen verwendet. Die abschließende Messung unter Nutzung des Nanodrop Spektrometers ermöglichte die Bestimmung auch kleinster Probenmengen.

Unsere Ergebnisse zeigten, dass der DNA-Gehalt in der Gruppe der druckgesteuert dezellulierten Lebern im Vergleich zur Nativgruppe signifikant abfiel (siehe Abbildung 12). Die gemessenen Werte zeigten keinen signifikanten Unterschied zur flussgesteuerten Gruppe und waren mit Messergebnissen vergleichbar, die in unserer Arbeitsgruppe bereits für die Etablierung des flussgesteuerten Protokolls publiziert wurden (59).

Die photometrische Bestimmung des sGAG-Gehaltes wurde in unserer Arbeitsgruppe ebenfalls bereits mehrfach zur Charakterisierung dezellularisierter Organmatrices angewendet. Im Vergleich zur Nativgruppe stieg der sGAG-Gehalt der druckgesteuert dezellularisierten Lebern signifikant an (siehe Abbildung 13). Dies spricht für eine erfolgreiche Dezellularisierung, da die sulfatierten Glykosaminoglykane nicht nur in ausreichendem Maß die Dezellularisierung überstehen konnten, sondern auch andere Organbestandteile zuverlässig entfernt wurden, sodass ein Anstieg des sGAG-Gehaltes pro Gewichtseinheit zu verzeichnen war. Vergleicht man diesbezüglich das druckgesteuerte und das flussgesteuerte Verfahren, so zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

Eine Quantifizierung des SDS-Gehaltes mittels Spektrophotometer ist ein allgemein gängiges Verfahren und fand beispielsweise in anderer Form auch bei Ott et al. Anwendung, die hieraus ihre Dezellularisierungsprotokolle herleiteten. Im Hinblick auf eine spätere Zellkultur innerhalb der gewonnenen Extrazellulärmatrices sollten hierdurch zytotoxische Effekte etwaiger SDS-Residuen berücksichtigt und möglichst gering gehalten werden (51, 68, 69). In der vorliegenden Arbeit wurde ein Methylen-Blau-Assay angewendet, der in unserer Arbeitsgruppe bereits für flüssige Lösungen etabliert war (60). Zur Bereitstellung solcher Lösungen wurden dezellularisierte Matrixteile in Aqua dest. inkubiert. Die Inkubation der druck- und flussgesteuert dezellularisierten Extrazellulärmatrices brachte makroskopisch klare Flüssigkeiten hervor, die im Methylenblau-Assay aussagekräftige Messergebnisse lieferten, jedoch ohne signifikanten Unterschied zwischen den beiden unterschiedlichen Verfahren (siehe Abbildung 14). Im Gegensatz hierzu führte die Inkubation der Nativproben zu einer makroskopisch bräunlich-trüben Lösung, was am ehesten auf das in den Nativleber enthaltene Hämoglobin und andere Zellbestandteile zurückzuführen war. Hiermit waren unweigerlich falsch-hohe Absorptionen und damit falsche Messergebnissen verbunden. Ein Vergleich der Dezellularisierungsverfahren mit Nativproben war somit nicht möglich, die Messergebnisse der Nativproben mussten verworfen werden.

Die in der druckgesteuerten Gruppe gemessenen SDS-Residuen waren möglicherweise dadurch bedingt, dass die Durchflussmenge des verwendeten Triton-X-100 in dem bemessenen Zeitraum bei einem Druck von 100mm Hg nach der

deutlich verlängerten Perfusion mit SDS zu gering war, um eine ausreichende Wirkung zu zeigen.

Insgesamt jedoch kann die Etablierung eines druckgesteuerten Dezellularisierungsprotokolls als erfolgreich bezeichnet werden. Es liegt nun ein reproduzierbares Protokoll vor, bei dem unter ondulierenden Druckverhältnissen, welche die physiologischen, atemabhängigen Druckverhältnisse unterhalb des Diaphragmas simulieren, mit einem konstanten, physiologischen Perfusionsdruck von 100 mmHg über die A. hepatica propria, verlässlich Rattenlebern vollständig dezellularisiert werden können. Aufgrund des zufriedenstellenden Dezellularisierungsergebnisses und der Tatsache, dass andere Arbeitsgruppen bereits die Vorteile einer Perfusionsdezellularisierung mit konstantem Druck und niedrigeren Flussraten gezeigt hatten (51), fiel der Entschluss, das druckgesteuerte Dezellularisierungsverfahren für die nachfolgenden Rezellularisierungsversuche zu verwenden. Da in der hier vorliegenden Arbeit die Funktion der infundierten Inselzellen von zunächst untergeordnetem Interesse war und lediglich ihre Verteilung beurteilt werden sollte, spielten die weiterhin in geringer Menge nachweisbaren SDS-Rückstände in den gewonnenen Extrazellulärmatrices keine Rolle. Im Hinblick auf mögliche zukünftige Versuche, in denen die Funktion der Inselzellen in der rezellularisierten Extrazellulärmatrix überprüft werden sollen, wäre das Protokoll allerdings durch eine verlängerte Perfusion mit Triton-X-100 und eine längere Spülung mit PBS zu modifizieren. Ein Anschlussprojekt der Arbeitsgruppe verwendete zunächst weiterhin die Methode von Struecker et al. (73).

8.3 Die Rezellularisierungsversuche

Nachdem nun ein Verfahren etabliert war, mit dem für diesen Versuch geeignete dezellularisierte Extrazellulärmatrices generiert werden konnten, galt es nun, Inselzellen bereitzustellen und diese in die genannten Matrices zu infundieren. In unserer Arbeitsgruppe waren Untersuchungen im Rattenmodell bereits seit langer Zeit etabliert, somit bot es sich an, als Spendertiere für die Inselzellen dieselbe Spezies zu verwenden. Aufgrund einer sehr guten Inselzellausbeute wurden als Spendertiere weibliche Wistar-Ex-Breeder verwendet. Das Protokoll für die Inselzellisolierung wurde unserer Arbeitsgruppe von Ludwig et al. (70, 71) zur Verfügung gestellt. Diese Methode ist mittlerweile Standardverfahren im Bereich der

Inselzellforschung (57). Sie liefert verlässlich und reproduzierbar zufriedenstellende Mengen an Inselzellen. Um während des Isolationsprozesses den Stress für die Inselzellen zu minimieren, ist ein zügiges, aber behutsames Arbeiten vor allem dann von Bedeutung, wenn im weiteren Verlauf auch die Funktion und das Überleben der Inselzellen untersucht werden sollen. Derartige Versuche werden in den Folgeprojekten der Arbeitsgruppe mittlerweile bereits durchgeführt, worauf an späterer Stelle näher eingegangen wird.

In der vorliegenden Arbeit sollte nun sowohl eine geeignete Technik der Rezellularisierung als auch eine geeignete Infusionsroute für die Inselzellen gefunden werden. Die Rezellularisierung begann in jeder Gruppe zunächst gleich: Vor jeder Inselzellinfusion wurde die Lebermatrix mittels PBS-Infusion expandiert. Vorversuche hatten gezeigt, dass dies einem frühzeitigen Verstopfen der Infusionskanüle vorbeugt. Anschließend wurden zwei verschiedene Infusionstechniken verglichen: Die Infusion mittels Infusionspumpe sollte ein standardisiertes und damit reproduzierbares Verfahren zur Rezellularisierung bieten. Es erwies sich jedoch als ausgesprochen langwierig, durch das nötige fortlaufende Schütteln als mühselig und aufgrund ständiger Klumpenbildung und möglicher Abrisse der Kanüllierung zudem als äußerst fehleranfällig. Das zweite, manuelle Infusionsverfahren war deutlich einfacher in der Handhabung und war dadurch, schneller und sicherer anzuwenden. Allerdings hängt hierbei der Erfolg der Rezellularisierung wesentlich von der Erfahrung des Anwenders ab, der den angewandten Druck selbst wählen muss. Eine strenge Standardisierung dieser Technik ist somit nicht möglich.

Die rezellularisierten Organmatrices wurden histomorphologisch ausgewertet. Die Schnittdicken von $5\mu\text{m}$ wurden von der bereits bewährten Technik für dezellularisierte Lebermatrices abgeleitet, da auch nach der Rezellularisierung nur ein Bruchteil des Matrixvolumens mit Zellen gefüllt war. Die HE-Färbung bot hier als etabliertes Standardverfahren verlässlichen Aufschluss über das Verteilungsmuster der Inselzellen. Die AZAN-Färbung bot aufgrund ihres kontrastierenden Farbmusters für Zellen und Extrazellulärmatrixbestandteile weiteren Aufschluss über die Lagebeziehungen innerhalb der rezellularisierten Organmatrix (72). Aufgrund des langwierigen Färbeprotokolls eignet es sich jedoch eher für spezielle

Fragestellungen, die nicht durch die wesentlich einfachere HE-Färbung beantwortet werden können.

Es zeigte sich, dass die Wahl zwischen einer manuellen und einer Infusionspumpen-gestützten Inselzellinfusion keinerlei Auswirkungen auf das Verteilungsmuster der Inselzellen innerhalb der dezellularisierten Lebermatrix hat (siehe Abbildung 15 und Abbildung 16). Das Verfahren der Inselzellinfusion mittels Infusionspumpe kann deshalb aufgrund seiner mangelnden Praktikabilität als ungeeignet zugunsten der manuellen Inselzellinfusion verworfen werden. Es bleibt festzuhalten, dass eine schnelle und sichere Applikation der Inselzellen bei der manuellen Infusion essenziell ist, um ein vorzeitiges Verstopfen der Infusionskanüle zu vermeiden.

Rezellularisierungsmuster, bei dem sich Areale mit großen Inselzellagglutinaten mit schwach bis nicht besiedelten Arealen abwechseln, lassen sich möglicherweise vermeiden, wenn ein mehrstufiges Infusionsverfahren mit jeweils weniger Inselzellen pro Volumen Medium verwendet wird.

Deutliche Unterschiede ergaben sich hingegen im Vergleich der gewählten Infusionsrouten. Die Infusion über die Pfortader entsprach dabei der bereits angewandten gängigen klinischen Praxis (26). Dieser Methode wurde die Infusion über den Gallengang gegenübergestellt. Grund hierfür war sein anatomischer Verlauf innerhalb der Glisson-Trias, d.h. benachbart zur Basallamina der Pfortader, jedoch endend innerhalb des Leberparenchyms (58). Histomorphologisch zeigte sich bei Lebermatrices, bei denen Inselzellen über die Pfortader infundiert wurden, in der HE-Färbung eindrucksvoll scharf umgrenzte, mit Inselzellen angefüllte Querschnitte des Pfortaderlumens bis hin zu komplett verzweigten, quer angeschnittenen Gefäßbäumen. Die AZAN-Färbungen verdeutlichten zusätzlich die Abgrenzung der roten Inselzellkonglomerate vom dezellularisierten Leberparenchym durch eine dicke, tiefblaue Basalmembran. Die Infusion von Inselzellen in eine dezellularisierte Lebermatrix über die Pfortader erbringt also das gleiche Resultat wie die bereits klinisch praktizierte Inselzelltransplantation in die Pfortader: Inselzellen verbleiben im Pfortaderlumen. Das Vorhandensein oder Nichtvorhandensein von Endothel- oder Leberparenchymzellen spielt also keine Rolle für die Verteilung der Inselzellen, wenn sie über die Pfortader infundiert werden. Das verwendete Dezellularisierungsverfahren scheint somit eine intakte Basalmembran

zurückzulassen, die infundierte Zellen in ihrer Verteilung effektiv einzugrenzen vermag.

Ganz anders verhielten sich Inselzellen, die über den Gallengang infundiert wurden: Eine Verklumpung mit teilweise sehr großen Zellkonglomeraten trat zwar auch hier auf, jedoch waren diese großen Ansammlungen in keiner Weise geformt, scharf abgegrenzt oder konzentriert. Darüber hinaus konnten hier einzelne Inselzellen und Inselzellcluster nachgewiesen werden. In der AZAN-Färbung bestätigte sich der Eindruck, dass sich die Inselzellen frei im dezellularisierten Leberparenchym verteilen konnten und nicht durch eine Basalmembran begrenzt wurden. Sie traten teilweise in unmittelbarer Nachbarschaft von Gefäßlumen oder bindegewebsreichen Strukturen auf, die zum anatomischen Verlauf des Gallengangs innerhalb der Glisson-Trias passen. Untersuchungen haben bereits gezeigt, dass eine Inselzellkultur in Medium, das Extrazellulärmatrixbestandteile enthält, vorteilhaft für das Überleben der Zellen ist (31). Die freie Verteilung der Inselzellen in den Sinusoiden bei gleichzeitiger enger Nachbarschaft der Inselzellen zur Basalmembran könnte sich in Zellkulturversuchen positiv auf das Überleben der Inselzellen auswirken. Die Ansiedelung der Inselzellen außerhalb des Pfortaderlumens kann thrombembolischen Ereignissen vorbeugen.

Die zweite Fragestellung der vorliegenden Arbeit kann somit positiv beantwortet werden: Die Inselzellinfusion über den Gallengang führt im Gegensatz zur Inselzellinfusion über die Pfortader zu histologisch nachweisbaren Inselzellen im Parenchym und damit zu einer freien Verteilung der Langerhans-Inseln innerhalb der dezellularisierten Lebermatrix. Die manuelle Inselzellinfusion ist hierbei der perfusionspumpengestützten Methode überlegen. Die Langerhans-Inseln befinden sich damit innerhalb der Extrazellulärmatrix auf molekularer Ebene in einer physiologischen Umgebung und auf makroskopischer Ebene in einem perspektivisch implantierbaren Organ, das über afferente und efferente Blutgefäße verfügt.

8.4 Limitationen und Ausblick

Die in der vorliegenden Arbeit etablierten Protokolle bieten in ihrer Gesamtheit trotz der äußerst vielversprechenden Ergebnisse im Hinblick auf Folgeversuche noch Raum für Verbesserungen: Nach der druckgesteuerten Dezellularisierung konnten

weiterhin potenziell zytotoxische SDS-Residuen nachgewiesen werden. Hierzu wäre eine weitere Optimierung der Methode notwendig. Gegebenenfalls müsste eine längere Perfusion mit Triton-X-100 und PBS erfolgen, um diese Residuen zu minimieren. Die dem infusionspumpengestützte Rezellularisierungsverfahren überlegene manuelle Rezellularisierung führte trotz sorgfältiger Vorgehensweise zur Verklumpung. Sie könnte eventuell in einem mehrstufigen Verfahren erprobt werden, um eine noch bessere Inselzellverteilung zu erreichen, da die hier überlegene manuelle Technik ebenfalls störanfällig sein kann und vom jeweiligen Anwender abhängt. Ein weiteres technisches Problem stellte das Verhältnis des Matrixvolumens zur Anzahl der gewonnenen Inseln dar. Trotz des vorangegangenen Abbindens der großen Leberlappen war das Volumen der zu rezellularisierenden Matrix im Vergleich zur Menge der zur Verfügung stehenden isolierten Inseln sehr groß. Diese Diskrepanz liegt u.a. in der limitierten Tierversuchszahl unseres Kleintiermodells begründet, in dem nur eine begrenzte Anzahl der Versuchstiere als Inselzell-Spendertiere pro Versuch eingesetzt werden konnten.

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse, insbesondere die Selektion des Gallengangs als den geeigneteren Applikationsweg, bildeten die Grundlage für weitere *in-vitro*-Versuche unserer Arbeitsgruppe, in denen nicht nur intakte Inselzellen über den Gallengang, sondern zusätzlich Endothelzellen und mesenchymale Stomazellen über die Pfortader in eine dezellularisierte Rattenleber infundiert wurden (73). Histomorphologisch zeigten sich auch hier nicht nur Inselzellen im Parenchym der dezellularisierten Lebermatrix, sondern zudem eine einschichtige Auskleidung des Pfortaderlumens mit Endothelzellen. Darüber hinaus wurde ein dem hier beschriebenen sehr ähnlicher Perfusionskreislauf um ein Element zur Oxygenierung erweitert und das so gewonnene Organoid für mehrere Tage perfundiert. Nach drei Tagen konnte so nach Glukosestimulation eine adäquate Insulinsekretion und damit intakte Viabilität und Funktion der infundierten Inselzellen nachgewiesen werden (73).

Sollten sich die so erstellten Organoiden auch über längere Zeiträume als funktionstüchtig und überlebensfähig erweisen, müsste im Anschluss in *in-vivo*-Versuchen geprüft werden, ob und wie sich eine Implantation des Neo-Organs tatsächlich auf den Glukosestoffwechsel diabetischer Empfängertiere auswirkt.

Werden zudem weitere Quellen für transplantierbare Inselzellen erschlossen, könnten die hier etablierten Verfahren dazu beitragen, in Zukunft Therapien zu entwickeln, die Menschen mit absolutem Insulinmangel dauerhaft vor glykämischen Entgleisungen, diabetischen Spätkomplikationen und einer lebenslangen Insulinsubstitution zu bewahren vermögen.

9 Literaturverzeichnis

1. DiMeglio LA, Evans-Molina C, Oram RA. Type 1 diabetes. *Lancet*. 2018;391(10138):2449-62.
2. Melendez-Ramirez LY, Richards RJ, Cefalu WT. Complications of type 1 diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2010;39(3):625-40.
3. Hattersley A, Bruining J, Shield J, Njolstad P, Donaghue KC. The diagnosis and management of monogenic diabetes in children and adolescents. *Pediatr Diabetes*. 2009;10 Suppl 12:33-42.
4. Hart PA, Bellin MD, Andersen DK, Bradley D, Cruz-Monserrate Z, Forsmark CE, Goodarzi MO, Habtezion A, Korc M, Kudva YC, Pandol SJ, Yadav D, Chari ST, Consortium for the Study of Chronic Pancreatitis D, Pancreatic C. Type 3c (pancreatogenic) diabetes mellitus secondary to chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2016;1(3):226-37.
5. Ewald N, Bretzel RG. Diabetes mellitus secondary to pancreatic diseases (Type 3c)--are we neglecting an important disease? *Eur J Intern Med*. 2013;24(3):203-6.
6. Mohapatra S, Majumder S, Smyrk TC, Zhang L, Matveyenko A, Kudva YC, Chari ST. Diabetes Mellitus Is Associated With an Exocrine Pancreatopathy: Conclusions From a Review of Literature. *Pancreas*. 2016;45(8):1104-10.
7. Ewald N, Kaufmann C, Raspe A, Kloer HU, Bretzel RG, Hardt PD. Prevalence of diabetes mellitus secondary to pancreatic diseases (type 3c). *Diabetes Metab Res Rev*. 2012;28(4):338-42.
8. Bluestone JA, Herold K, Eisenbarth G. Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. *Nature*. 2010;464(7293):1293-300.
9. Todd JA. Etiology of type 1 diabetes. *Immunity*. 2010;32(4):457-67.
10. International Diabetes Federation B. IDF Diabetes Atlas 9th Edition. 2019. <https://www.diabetesatlas.org/en/>, abgerufen am 17.07.2020.
11. Rosenbauer J, Neu A, Rothe U, Seufert J, Holl RW. Diabetestypen sind nicht auf Altersgruppen beschränkt: Typ-1-Diabetes bei Erwachsenen und Typ-2-Diabetes bei Kindern und Jugendlichen. *Journal of Health Monitoring*. 2019;4(2):31--53.
12. Atkinson MA, Eisenbarth GS, Michels AW. Type 1 diabetes. *Lancet*. 2014;383(9911):69-82.

13. Yeh HC, Brown TT, Maruthur N, Ranasinghe P, Berger Z, Suh YD, Wilson LM, Haberl EB, Brick J, Bass EB, Golden SH. Comparative effectiveness and safety of methods of insulin delivery and glucose monitoring for diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med.* 2012;157(5):336-47.
14. Bergenstal RM, Tamborlane WV, Ahmann A, Buse JB, Dailey G, Davis SN, Joyce C, Peoples T, Perkins BA, Welsh JB, Willi SM, Wood MA, Group SS. Effectiveness of sensor-augmented insulin-pump therapy in type 1 diabetes. *N Engl J Med.* 2010;363(4):311-20.
15. Pickup JC. Insulin-pump therapy for type 1 diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 2012;366(17):1616-24.
16. Steffes MW, Sibley S, Jackson M, Thomas W. Beta-cell function and the development of diabetes-related complications in the diabetes control and complications trial. *Diabetes Care.* 2003;26(3):832-6.
17. Hirsch IB. Clinical review: Realistic expectations and practical use of continuous glucose monitoring for the endocrinologist. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(7):2232-8.
18. Whittemore R, Jaser S, Chao A, Jang M, Grey M. Psychological experience of parents of children with type 1 diabetes: a systematic mixed-studies review. *Diabetes Educ.* 2012;38(4):562-79.
19. Barnard KD, Lloyd CE, Skinner TC. Systematic literature review: quality of life associated with insulin pump use in Type 1 diabetes. *Diabet Med.* 2007;24(6):607-17.
20. Huxley RR, Peters SA, Mishra GD, Woodward M. Risk of all-cause mortality and vascular events in women versus men with type 1 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2015;3(3):198-206.
21. Gruessner RW, Gruessner AC. The current state of pancreas transplantation. *Nat Rev Endocrinol.* 2013;9(9):555-62.
22. Gesellschaft DD. S3-Leitlinie Therapie des Typ-1-Diabetes 2. Auflage, https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/057-013l_S3-Therapie-Typ-1-Diabetes_2018-08.pdf, abgerufen am 14.07.2020. 2018.
23. Gruessner AC, Gruessner RW. Pancreas Transplantation of US and Non-US Cases from 2005 to 2014 as Reported to the United Network for Organ Sharing (UNOS) and the International Pancreas Transplant Registry (IPTR). *Rev Diabet Stud.* 2016;13(1):35-58.

24. Venstrom JM, McBride MA, Rother KI, Hirshberg B, Orchard TJ, Harlan DM. Survival after pancreas transplantation in patients with diabetes and preserved kidney function. *JAMA*. 2003;290(21):2817-23.
25. Maffi P, Scavini M, Socci C, Piemonti L, Caldara R, Gremizzi C, Melzi R, Nano R, Orsenigo E, Venturini M, Staudacher C, Del Maschio A, Secchi A. Risks and benefits of transplantation in the cure of type 1 diabetes: whole pancreas versus islet transplantation. A single center study. *Rev Diabet Stud*. 2011;8(1):44-50.
26. Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbutt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med*. 2000;343(4):230-8.
27. Ryan EA, Paty BW, Senior PA, Bigam D, Alfadhli E, Kneteman NM, Lakey JR, Shapiro AM. Five-year follow-up after clinical islet transplantation. *Diabetes*. 2005;54(7):2060-9.
28. Rickels MR, Robertson RP. Pancreatic Islet Transplantation in Humans: Recent Progress and Future Directions. *Endocr Rev*. 2019;40(2):631-68.
29. Shapiro AM, Pokrywczynska M, Ricordi C. Clinical pancreatic islet transplantation. *Nat Rev Endocrinol*. 2017;13(5):268-77.
30. Gamble A, Pepper AR, Bruni A, Shapiro AMJ. The journey of islet cell transplantation and future development. *Islets*. 2018;10(2):80-94.
31. Stendahl JC, Kaufman DB, Stupp SI. Extracellular matrix in pancreatic islets: relevance to scaffold design and transplantation. *Cell Transplant*. 2009;18(1):1-12.
32. Cabrera O, Berman DM, Kenyon NS, Ricordi C, Berggren PO, Caicedo A. The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(7):2334-9.
33. Brissova M, Fowler MJ, Nicholson WE, Chu A, Hirshberg B, Harlan DM, Powers AC. Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. *J Histochem Cytochem*. 2005;53(9):1087-97.
34. Lifson N, Kramlinger KG, Mayrand RR, Lender EJ. Blood flow to the rabbit pancreas with special reference to the islets of Langerhans. *Gastroenterology*. 1980;79(3):466-73.
35. Bonner-Weir S, Orci L. New perspectives on the microvasculature of the islets of Langerhans in the rat. *Diabetes*. 1982;31(10):883-9.

36. Ahren B. Autonomic regulation of islet hormone secretion--implications for health and disease. *Diabetologia*. 2000;43(4):393-410.
37. Nelson CM, Bissell MJ. Of extracellular matrix, scaffolds, and signaling: tissue architecture regulates development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2006;22:287-309.
38. Larsen M, Artym VV, Green JA, Yamada KM. The matrix reorganized: extracellular matrix remodeling and integrin signaling. *Curr Opin Cell Biol*. 2006;18(5):463-71.
39. Kaido T, Yebra M, Cirulli V, Rhodes C, Diaferia G, Montgomery AM. Impact of defined matrix interactions on insulin production by cultured human beta-cells: effect on insulin content, secretion, and gene transcription. *Diabetes*. 2006;55(10):2723-9.
40. Nikolova G, Jabs N, Konstantinova I, Domogatskaya A, Tryggvason K, Sorokin L, Fassler R, Gu G, Gerber HP, Ferrara N, Melton DA, Lammert E. The vascular basement membrane: a niche for insulin gene expression and Beta cell proliferation. *Dev Cell*. 2006;10(3):397-405.
41. Bottino R, Balamurugan AN, Tse H, Thirunavukkarasu C, Ge X, Profozich J, Milton M, Ziegenfuss A, Trucco M, Piganelli JD. Response of human islets to isolation stress and the effect of antioxidant treatment. *Diabetes*. 2004;53(10):2559-68.
42. Delaune V, Berney T, Lacotte S, Toso C. Intraportal islet transplantation: the impact of the liver microenvironment. *Transpl Int*. 2017;30(3):227-38.
43. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*. 2011;32(12):3233-43.
44. Ott HC, Matthiesen TS, Goh SK, Black LD, Kren SM, Netoff TI, Taylor DA. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nat Med*. 2008;14(2):213-21.
45. Dzamba BJ, DeSimone DW. Extracellular Matrix (ECM) and the Sculpting of Embryonic Tissues. *Curr Top Dev Biol*. 2018;130:245-74.
46. Yang M, Chen CZ, Wang XN, Zhu YB, Gu YJ. Favorable effects of the detergent and enzyme extraction method for preparing decellularized bovine pericardium scaffold for tissue engineered heart valves. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2009;91(1):354-61.

47. Nonaka PN, Campillo N, Uriarte JJ, Garreta E, Melo E, de Oliveira LV, Navajas D, Farre R. Effects of freezing/thawing on the mechanical properties of decellularized lungs. *J Biomed Mater Res A*. 2014;102(2):413-9.
48. Sullivan DC, Mirmalek-Sani SH, Deegan DB, Baptista PM, Aboushwareb T, Atala A, Yoo JJ. Decellularization methods of porcine kidneys for whole organ engineering using a high-throughput system. *Biomaterials*. 2012;33(31):7756-64.
49. Uygun BE, Soto-Gutierrez A, Yagi H, Izamis ML, Guzzardi MA, Shulman C, Milwid J, Kobayashi N, Tilles A, Berthiaume F, Hertl M, Nahmias Y, Yarmush ML, Uygun K. Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix. *Nat Med*. 2010;16(7):814-20.
50. Fu RH, Wang YC, Liu SP, Shih TR, Lin HL, Chen YM, Sung JH, Lu CH, Wei JR, Wang ZW, Huang SJ, Tsai CH, Shyu WC, Lin SZ. Decellularization and recellularization technologies in tissue engineering. *Cell Transplant*. 2014;23(4-5):621-30.
51. Guyette JP, Gilpin SE, Charest JM, Tapias LF, Ren X, Ott HC. Perfusion decellularization of whole organs. *Nat Protoc*. 2014;9(6):1451-68.
52. Mostow EN, Haraway GD, Dalsing M, Hodde JP, King D, Group OVUS. Effectiveness of an extracellular matrix graft (OASIS Wound Matrix) in the treatment of chronic leg ulcers: a randomized clinical trial. *J Vasc Surg*. 2005;41(5):837-43.
53. Boyd WD, Johnson WE, 3rd, Sultan PK, Deering TF, Matheny RG. Pericardial reconstruction using an extracellular matrix implant correlates with reduced risk of postoperative atrial fibrillation in coronary artery bypass surgery patients. *Heart Surg Forum*. 2010;13(5):E311-6.
54. Cornwell KG, Landsman A, James KS. Extracellular matrix biomaterials for soft tissue repair. *Clin Podiatr Med Surg*. 2009;26(4):507-23.
55. Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*. 2006;27(19):3675-83.
56. Song JJ, Ott HC. Organ engineering based on decellularized matrix scaffolds. *Trends Mol Med*. 2011;17(8):424-32.
57. 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;7:41777.

58. Vdoviakova K, Vdoviakova K, Petrovova E, Kresakova L, Maloveska M, Teleky J, Jencova J, Zivcak J, Jenca A, Jr. Importance Rat Liver Morphology and Vasculature in Surgical Research. *Med Sci Monit.* 2016;22:4716-28.

59. 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, Johrens 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.* 2017;11(2):531-41.

60. Hayashi K. A rapid determination of sodium dodecyl sulfate with methylene blue. *Anal Biochem.* 1975;67(2):503-6.

61. Bakhshandeh B, Zarrintaj P, Oftadeh MO, Keramati F, Fouladiha H, Sohrabi-Jahromi S, Ziraksaz Z. Tissue engineering; strategies, tissues, and biomaterials. *Biotechnol Genet Eng Rev.* 2017;33(2):144-72.

62. Wang T, Lacik I, Brissova M, Anilkumar AV, Prokop A, Hunkeler D, Green R, Shahrokhi K, Powers AC. An encapsulation system for the immunoisolation of pancreatic islets. *Nat Biotechnol.* 1997;15(4):358-62.

63. Desai T, Shea LD. Advances in islet encapsulation technologies. *Nat Rev Drug Discov.* 2017;16(5):338-50.

64. Calafiore R, Basta G, Luca G, Boselli C, Bufalari A, Bufalari A, Cassarani MP, Giustozzi GM, Brunetti P. Transplantation of pancreatic islets contained in minimal volume microcapsules in diabetic high mammals. *Ann N Y Acad Sci.* 1999;875:219-32.

65. Morphisto. Färbeprotokoll für Alcianblau-PAS 2020 [Available from: https://www.morphisto.de/uploads/tx_aimeos/faerbeprotokolle/Faerbeprotkoll_Alcianblau-PAS_11388.pdf. Abgerufen am 08.09.2020.

66. Huang Y, de Boer WB, Adams LA, MacQuillan G, Rossi E, Rigby P, Raftopoulos SC, Bulsara M, Jeffrey GP. Image analysis of liver collagen using sirius red is more accurate and correlates better with serum fibrosis markers than trichrome. *Liver Int.* 2013;33(8):1249-56.

67. Morphisto. Färbeprotokoll für Pikro-Siriusrot 2020 [Available from: https://www.morphisto.de/uploads/tx_aimeos/faerbeprotokolle/Faerbeprotkoll_Pikro-Siriusrot_13425.pdf. Abgerufen am 08.09.2020.

68. Rusconi F, Valton E, Nguyen R, Dufourc E. Quantification of sodium dodecyl sulfate in microliter-volume biochemical samples by visible light spectroscopy. *Anal Biochem.* 2001;295(1):31-7.
69. Gilpin SE, Guyette JP, Gonzalez G, Ren X, Asara JM, Mathisen DJ, Vacanti JP, Ott HC. Perfusion decellularization of human and porcine lungs: bringing the matrix to clinical scale. *J Heart Lung Transplant.* 2014;33(3):298-308.
70. Schubert U, Schmid J, Lehmann S, Zhang XY, Morawietz H, Block NL, Kanczkowski W, Schally AV, Bornstein SR, Ludwig B. Transplantation of pancreatic islets to adrenal gland is promoted by agonists of growth-hormone-releasing hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(6):2288-93.
71. Ludwig B, Ziegler CG, Schally AV, Richter C, Steffen A, Jabs N, Funk RH, Brendel MD, Block NL, Ehrhart-Bornstein M, Bornstein SR. Agonist of growth hormone-releasing hormone as a potential effector for survival and proliferation of pancreatic islets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(28):12623-8.
72. Morphisto. Färbeprotokoll für AZAN nach Heidenhain 2020 [Available from: https://www.morphisto.de/uploads/tx_aimeos/faerbeprotokolle/Faerbeprotkoll_AZAN_HEIDENHAIN_12079.pdf. Abgerufen am 08.09.2020.
73. 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, Strucker 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;117:213-25.

10 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Peter Demko, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: "Rezellularisierung perfusionsdezellularisierter Lebermatrices mit Langerhans-Inseln im Rattenmodell" - "Recellularization of perfusion decellularized liver scaffolds with islets of Langerhans in a rat model" 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.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; 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

11 Lebenslauf

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

12 Danksagung

Mein Dank gilt zunächst meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Igor M. Sauer. Er hat mir nicht nur das Promotionsthema überlassen, sondern mit seiner Arbeitsgruppe eine Umgebung geschaffen, in der die Forschung an dem hier vorliegenden Thema stets Freude bereitete. Ich danke Dr. med. Eva-Maria Dobrindt für die fundierte Begleitung meines Forschungsthemas, ihre stete Anleitung und Unterstützung.

Peter Tang, Steffen Lippert und Dipl. Ing. Kirsten Führer haben mir nicht nur sämtliche Arbeitsweisen im Labor vermittelt, sondern standen mir stets mit Rat und Tat zur Seite. Ich danke ihnen ebenso wie Herrn Dipl. Ing. Dietrich Polenz für die hervorragende mikrochirurgische Ausbildung. Besonders bedanken möchte ich mich nicht zuletzt bei Dr. rer. medic. Anja Reutzel-Selke für ihre fachliche und moralische Unterstützung, ohne die diese Doktorarbeit nicht möglich gewesen wäre. Selbstverständlich danke ich dem gesamten Team der AG Sauer, insbesondere meinen Kollegen und Freunden Joseph Gaßner, Dr. med. Karl Hillebrandt, Maximilian Nösser, Rosa Horner, Dr. med. Rebeka Dalma Major und Dr. med. Martin Kluge.

Mein Dank gilt zudem meinen Eltern Miroslav und Dagmar Demko, die mir durch Flucht und Arbeit ein Medizinstudium in Deutschland ermöglicht haben. Ich danke auch meinem Bruder Andrej Demko für seine finanzielle Unterstützung, die mein Promotionsvorhaben erst ermöglicht hat.

Ferner danke ich allen, die mich während der Arbeit an meiner Dissertation unterstützt haben, insbesondere Dr. med. Maximilian Beck, Philipp Schröder, Dr. phil. Gabriel Yoran, Fabian Fallert, Rasim İlhan, Turhan Davarci, P. Kilian Müller OCist, P. Philemon Dollinger OCist und Dr. Dipl.-Psych. Laura Kuhle.