



Technische Universität München
Fakultät für Medizin

Humane immortalisierte Endothelzelllinie EA.hy926 im perfundierten 3D-
Tissue-Engineering Konstrukt

Johannes Benjamin Sauter

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen
Universität München zur Erlangung eines

Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Jürgen Schlegel

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Rainer Burgkart
2. Priv.-Doz. Dr. Andreas Schmitt

Die Dissertation wurde am 12.08.2021 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 15.02.2022 angenommen.

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
ZUSAMMENFASSUNG	3
SUMMARY	5
1 EINLEITUNG	6
1.1 GESCHICHTE UND ZIELE DES TISSUE ENGINEERING	6
1.2 DIE TRIADE DES TISSUE ENGINEERING	8
1.3 SCAFFOLDS DES TISSUE ENGINEERING	8
1.3.1 Allgemeine Anforderungen an ein Scaffold.....	9
1.3.2 Methoden der Scaffoldherstellung	9
1.3.3 Die Dezellularisierung ganzer Organe	11
1.4 AUFBAU UND FUNKTIONEN DER EXTRAZELLULÄRMATRIX	13
1.5 DAS GEFÄßSYSTEM.....	15
1.5.1 Aufbau und Funktionen der Gefäße	15
1.5.2 Der Gefäßbaum	15
1.5.3 Typen von Kapillaren.....	16
1.5.4 Funktionen des Endothels	16
1.5.5 Vaskularisierung von Gewebe im Tissue Engineering	18
1.5.6 Der humane Endothelzelltyp EA.hy926.....	20
1.6 DIE NIEREN.....	21
1.6.1 Aspekte der makroskopischen und mikroskopischen Anatomie.....	21
1.6.2 Wesentliche Funktionen der Nieren	22
1.6.3 Die renale Gefäßversorgung.....	23
2 FRAGESTELLUNG UND ZIEL DER ARBEIT	24
3 MATERIAL UND METHODEN	25
3.1 MATERIALIEN.....	25
3.1.1 Verbrauchsmaterialien	25

3.1.2	Chemikalien	26
3.1.3	Laborgeräte.....	27
3.1.4	Antikörper	28
3.2	METHODEN	29
3.2.1	Zellkultur.....	29
3.2.1.1	Amplifikation und Subkultur	29
3.2.1.2	Zellzählung und Trypanblau-Assay	30
3.2.1.3	Anfertigung von Kammerobjektträgern	31
3.2.2	Angiogenese Assay	32
3.2.3	Präparation der Rattenniere.....	33
3.2.4	Dezellularisierung	34
3.2.4.1	DecellControl und Aufbau	34
3.2.4.2	Dezellularisierungsprozess.....	36
3.2.5	Rezellularisierung.....	38
3.2.5.1	Zelleinsaat	38
3.2.5.2	Aufbau des Miniinkubator und Beginn der Perfusion.....	39
3.2.6	Histologische Aufarbeitung.....	42
3.2.6.1	Fixierung und Einbettung.....	42
3.2.6.2	Herstellung histologischer Schnitte.....	42
3.2.6.3	Deparaffinierung und Rehydrierung	43
3.2.7	Histologische Färbemethoden	43
3.2.7.1	H.&E.-Färbung.....	43
3.2.7.2	Immunochemie.....	44
3.2.7.2.1	<i>Fixierung der Kammerobjektträger.....</i>	<i>44</i>
3.2.7.2.2	<i>Antigendemaskierung der FFPE-Schnitte</i>	<i>44</i>
3.2.7.2.3	<i>Immunochemisches Färbeprotokoll.....</i>	<i>45</i>
3.2.7.3	Nick-In-Situ-Translation	46
3.2.8	Semiquantitative Evaluierung	48
4	ERGEBNISSE.....	49
4.1	ZELLKULTUR.....	49
4.1.1	Morphologie	49
4.1.2	Zellwachstum	49

4.1.3	Immunozytochemie	51
4.2	ADHÄSIVES VERHALTEN IM ANGIOGENESE ASSAY	52
4.3	DEZELLULARISIERUNG	53
4.3.1	Vorbereitende Maßnahmen	53
4.3.2	Dezellularisierungsprozess	53
4.3.3	Histologische Darstellung einer azellulären Rattenniere	55
4.4	REZELLULARISIERUNG	56
4.4.1	Aufbau des Miniinkubator	56
4.4.2	Zelleinsaat und dynamische Kultur	56
4.4.3	Evaluierung der Rezellularisierung nach Dezellularisierung mit 3% SDS	58
4.4.3.1	Qualitative Betrachtung	58
4.4.3.2	Semiquantitative Analyse	59
4.4.4	Evaluierung der Rezellularisierung nach Dezellularisierung mit 0,66% SDS	61
4.4.4.1	Qualitative Betrachtung	61
4.4.4.2	Immunhistochemische Färbung mit CD-31	64
4.4.4.3	Immunhistochemische Färbung auf PCNA	65
4.4.4.4	Apoptotisches Verhalten in der Nick-In-Situ-Translation	66
4.4.4.5	Semiquantitative Evaluierung	67
4.4.5	Vergleich der Rezellularisierungsprotokolle	69
4.4.6	Anmerkung zu den aufgetretenen mikrobiellen Komplikationen	70
5	DISKUSSION	71
5.1	ZELLKULTUR UND MORPHOLOGIE	72
5.1.1	Proliferatives Verhalten	72
5.1.2	Endotheliale Marker in der Immunozytochemie	72
5.2	ANGIOGENESE ASSAY	73
5.2.1	Implikation auf das adhäsive Verhalten des Endothelzelltyps EA.hy926	73
5.2.2	Implikation auf die Differenzierung des Endothelzelltyps EA.hy926	74
5.3	DEZELLULARISIERUNGSPROTOKOLL UND DECELLCONTROL	75
5.4	REZELLULARISIERUNG	78
5.4.1	Endotheliale Zellen des <i>Whole Organ Engineerings</i>	78

5.4.2	Rezellularisierungsprotokolle- und Ergebnisse.....	79
5.5	SCHLUSSFOLGERUNG	87
5.6	LIMITATIONEN	89
5.7	AUSBLICK.....	90
7	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	91
8	TABELLENVERZEICHNIS.....	96
9	LITERATURVERZEICHNIS.....	97
10	DANKSAGUNG	118

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
ADP	Adenosindiphosphat
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
ATP	Adenosintriphosphat
BME	Basalmembran Extrakt
BP	Basenpaar
CD	Cluster of differentiation
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DsDNA	Doppelstrang-Desoxyribonukleinsäure
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDHF	Endothelium-derived hyperpolarizing factor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
EMS	Extracellular matrix solution
FBS	Fetales bovines Serum
FFPE	Formalin-fixiert und in Paraffin eingebettet
FGF	Fibroblast growth factor
H.&E.	Hämatoxylin & Eosin
HIF	Hypoxieinduzierter Faktor
HRP	Horseradish Peroxidase
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cell
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1
ICC	Immunocytochemie
ICH	Immunhistochemie
IL-1	Interleukin-1

ISNT	Nick-In-Situ-Translation
MgCl	Magnesiumchlorid
NaCitrat	Natriumcitrat
NaCl	Natriumchlorid
NO	Stickstoffmonoxid
PAF	Plättchen aktivierender Faktor
PAI-1	Plasminogen-Activator-Inhibitor 1
PBS	Phosphate buffered saline
PDGF	Platelet-derived growth factor
PECAM 1	Platelet-endothelial cell adhesion molecule 1
Pen/Strep	Penicillin und Streptomycin
PFA	Paraformaldehyde
PGA	Polyglycolsäure
PGI ₂	Prostazyklin
PLA	Poly lactide
PLGA	Poly lactide-co-glycolide
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
TE	Tissue Engineering
TGF- β	Transforming growth factor β
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
T-PA	Tissue plasminogen activator
TRIS	Tris-aminomethan
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1
VEGF	Vascular endothelial growth factor
vSMC	vascular smooth muscle cells
vWF	von-Willebrand-Faktor

ZUSAMMENFASSUNG

Tissue Engineering ist ein Forschungszweig der Regenerativen Medizin, dessen Ziel die Herstellung von artifiziellem Gewebe und Organen für die experimentelle Forschung oder für klinische Applikationen ist. Hierfür benötigte Scaffolds können durch die Dezellularisierung von ganzen Organen unter dem Erhalt der physiologischen Extrazellulärmatrix und des anatomischen Gefäßbaumes generiert werden. Neben gewebespezifischen Zelltypen ist die Wiederherstellung funktionsfähiger Gefäßstrukturen erforderlich, um eine suffiziente zelluläre Nährstoffversorgung zu gewährleisten. Die Intaktheit entsprechender vaskulärer Strukturen stellt eine besondere Herausforderung in der Entwicklung von artifiziellem Gewebe bereits seit Beginn des Tissue Engineering dar.

In dieser Arbeit etablierten wir zunächst die laboreigene automatisierte Dezellularisierungseinheit DecellControl zur Herstellung azellulärer Scaffolds der Rattenniere. Hierbei wurde neben verschiedenen Spüllösungen das Detergens SDS in einer Konzentration von 3% oder 0,66% gemäß einem laboreigenen Protokoll verwendet, um anschließend die Möglichkeit einer Reendothelialisierung des Gefäßsystems unter Zuhilfenahme einer permanenten Endothelzelllinie in Bezug auf die verwendete SDS-Konzentration zu evaluieren. In den gewonnenen azellulären Nierenscaffolds konnten nach Dezellularisierung zunächst die makroskopische und mikroskopische Unversehrtheit der renalen Extrazellulärmatrix, die Freiheit von zellulären und nukleären Bestandteilen sowie der Erhalt von Laminin, Fibronectin und Kollagen IV gezeigt werden. Die anschließende Rezellularisierung der Gefäßstrukturen des azellulären Nierenscaffolds erfolgte durch Einsaat von permanenten Endothelzellen des Typs EA.hy926 über die Nierenarterie und einer dynamischen Kultivierung über 48 Stunden oder fünf Tage. Das Rezellularisierungsprotokoll wurde nach jedem Versuchsdurchlauf mit histochemischen und immunhistochemischen Färbungen sowie der Zählung von im Gefäßsystem verbliebener Zellen evaluiert und in Bezug auf die Adhäsionszeit und die inserierte Zellzahl adaptiert.

Es konnte gezeigt werden, dass eine erfolgreiche Rezellularisierung mit der permanenten Endothelzelllinie EA.hy926 nur nach Dezellularisierung mit SDS in einer Konzentration von 0,66% möglich war und eine Zelladhärenz an der vaskulären Basalmembran mit teils perlschnurartiger Auskleidung erlaubte. Auch nach fünf Tagen behielten die im Scaffold verbliebenen Zellen ihren endothelialen Phänotyp bei und zeigten proliferatives Verhalten bei gleichzeitig geringer apoptotischer Aktivität.

In der vorliegenden Arbeit konnte somit ein Rezellularisierungsprotokoll für die Herstellung vaskulärer Gewebestrukturen an der artifiziell hergestellten Rattenniere entwickelt werden. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass eine Dezellularisierung mit SDS in einer Konzentration von 3% für eine anschließende Reendothelialisierung mit dem Endothelzelltyp EA.hy926 nicht geeignet ist.

SUMMARY

Tissue engineering is a research branch of regenerative medicine that is focusing on creating artificial tissues or organs for experimental research and clinical applications. For this purpose, scaffolds can be generated by whole organ decellularization while maintaining the site specific extracellular matrix and the vascular tree. Apart from various and tissue-specific cell types, working vascular structures must be implemented in almost all the cases to guarantee oxygen supply and maintain the cellular metabolism. This so-called vascularization remains a major hurdle of tissue engineering.

In this work we first established the automated decellularization system called DecellControl that was designed and manufactured in our laboratory for creating acellular kidney scaffolds. For this purpose, the detergent SDS was applied alongside several fluids at two different concentrations of either 3% or 0.66% according to a protocol of our laboratory to subsequently evaluate the reendothelialization of the vascular system with a permanent endothelial cell line depending on the used SDS concentration. The efficacy of the decellularization process was first shown by the macroscopic and microscopic integrity of the acellular kidney scaffold, absence of cellular or nuclear components and presence of laminin, fibronectin, and collagen IV. For the recellularization of the acellular kidney scaffolds, EA.hy926 immortalized endothelial cells were injected through the renal artery followed by a dynamic culture over 48 hours or five days. Thereafter, cellular integrity was evaluated by histochemical and immunohistochemical staining and by counting the number of cells remaining in the scaffold. The following experiments were then adjusted in terms of the inserted cell count and adhesion time.

The results show that the cell type EA.hy926 has the ability to adhere to the vascular basement membrane and cover it similar to a natural monolayer only after decellularization performed at 0.66% SDS. Furthermore, this result could be improved by increasing the number of injected cells. Even after five days of dynamic culture, the adherent cells maintained the expression of CD-31 and with that their endothelial phenotype. Beyond that, the adherent endothelial cells showed proliferative behavior with only little apoptotic activity.

With these results, a reproducible recellularization protocol could be established. At the same time, the experiments demonstrated fewer adherent cells after prior decellularization at 3% SDS. From that it can be deduced that the higher concentration of SDS damaged the microenvironment of the extracellular matrix and disturbed the endothelial cell niche of the scaffold.

1 EINLEITUNG

1.1 GESCHICHTE UND ZIELE DES TISSUE ENGINEERING

Gewebe und Organe des menschlichen Körpers können auf vielfältige Weise zu Schaden kommen. Abhängig davon, welcher Gewebstyp betroffen ist, können die daraus entstehenden Defekte mehr oder minder durch körpereigene Reparaturprozesse rückgängig gemacht werden. Während *labiles* Gewebe (=Wechselgewebe) meist eine vollständige Regeneration mit funktionell gleichwertigem Gewebe erreicht (=Restitutio ad integrum), durchläuft permanentes Gewebe entweder eine Defektheilung mit der Entstehung von minderwertigem Narbengewebe (Riede et al. 2009) oder zeigt, wie etwa Gelenkknorpel, grundsätzlich nur ein geringes Maß an Heilungstendenz (Desjardins & Hurtig 1990). In Situationen, in denen akute oder chronische Prozesse das Regenerationsvermögen des jeweiligen Gewebes übersteigen, droht langfristig dessen Funktionsverlust, was gesundheitliche Risiken und Einbußen der Lebensqualität zur Folge haben kann. Bei vollständigem Funktionsverlust existiert mit der Transplantation und dem damit verbundenen Austausch des funktionslosen durch gesundes Gewebe eine letzte Therapieoption (Grinyó 2013). Die allogene Transplantation solider Organe ist in vielen Ländern mittlerweile medizinischer Standard. Trotzdem existieren weiterhin Probleme, die die praktische Umsetzung dieses Verfahrens nachhaltig einschränken. Eine der bedeutendsten Limitationen ist dabei der weltweite Organmangel und die daraus resultierende Knappheit passender Spenderorgane für viele Betroffene (Cantarovich 2002, Abouna 2008). Ende 2018 standen allein bei Eurotransplant 14.129 Menschen auf der aktiven Wartelist für die Transplantation eines oder mehrerer Organe (Eurotransplant, Statistics Report Library, 01.10.2019; statistics.eurotransplant.org: 3023P_2018), in den USA waren es zu diesem Zeitpunkt 11.3062 Patienten (United Network for Organ Sharing, Transplant Trends, 21.10.2019; <https://unos.org/data/transplant-trends>). Trotz der vorhandenen technischen Möglichkeiten warten viele Patienten demnach vergeblich. Ein weiterer Aspekt nach erfolgter allogener Transplantation ist die Notwendigkeit einer lebenslangen Immunsuppression (Duncan & Wilkes 2005, Lechler et al. 2005). Sie dient der Vermeidung von Abstoßungsreaktionen durch den Organismus des Empfängers und ist somit unumgänglich, bringt allerdings auch viele Nachteile mit sich. Dazu gehören insbesondere unmittelbare Gefahren wie schwere opportunistische Infektionen (Fishman & Rubin 1998) aber auch langfristige Medikamentennebenwirkungen, die für die Patienten prognoselimitierend sein können (Boots et al. 2004).

Tissue Engineering ist ein experimentelles Forschungsgebiet der regenerativen Medizin, dessen begriffliche Ursprünge in die 1980er Jahre zurückgehen. Obwohl der Ausdruck schon zuvor in der Literatur zu finden war, entstand die erste gängige Definition im Rahmen eines Workshops der National Science Foundation im Jahre 1988 abgehalten am Lake Tahoe im US-amerikanischen Bundesstaat Kalifornien (Heineken & Skalak 1991). Nach dieser Definition ist Tissue Engineering „[...] the application of principles and methods of engineering and life sciences toward fundamental understanding of structure-function relationships in normal and pathological mammalian tissues and the development of biological substitutes to restore, maintain, or improve tissue function“ (Skalak & Fox 1988). Einige Autoren wandelten diese Definition zwar ab (Bell 1993, Langer & Vacanti 1993), sie ist bis dato jedoch weit verbreitet, anerkannt und anwendbar.

Erste Anwendungen des Tissue Engineering finden sich bereits in den 1970er Jahre und beziehen sich auf die Kultivierung von humanen Keratinozyten und die Produktion eines der Epidermis gleichkommenden geschichteten Plattenepithels *in vitro* (Rheinwald & Green 1975, Green et al. 1979). Nur kurze Zeit später fand diese Entdeckung in der Versorgung von Verbrennungswunden klinische Anwendung (Gallico et al. 1984) und wird bis heute für diesen Zweck verwendet (Berthiaume et al. 2011). Hilfreich dürfte Tissue Engineering auch in Zukunft bei Mangel von passendem Entnahmegewebe oder infektiösen und kosmetischen Komplikationen an der Donor-Site im Rahmen von autologem Hauttransfer sein (Otone et al. 2011, Vig et al. 2017, Boyce and Lalley 2018, Goodarzi et al. 2018). Neben dem bereits erwähnten therapeutischen Aspekt kann Tissue Engineering allerdings auch anderweitig genutzt werden. Darunter fallen die Entwicklung von Medikamenten (Khetani et al. 2015, Jensen et al. 2018) und der Erkenntnisgewinn zur Pathophysiologie verschiedener Krankheitsbilder. Beispiele hierfür sind neurodegenerative Erkrankungen (Seidi et al. 2011), kardiale Pathologien (Turnbull et al. 2012) und insbesondere maligne Neoplasien (Fischbach et al. 2007, Kimlin et al. 2013). Mit der Verwendung von dreidimensionalen Krebsmodellen soll das herrschende Mikromilieu *in vitro* imitiert und das Verständnis der Karzinogenese verbessert werden. Mit diesem Ansatz ergibt sich zudem die Chance, pharmazeutische Angriffspunkte zu identifizieren und onkologische Therapieansätze zu modernisieren und zu individualisieren (Nyga et al. 2011, Carpenter et al. 2018, Matei et al. 2018).

1.2 DIE TRIADE DES TISSUE ENGINEERING

Bei der praktischen Umsetzung des modernen Tissue Engineering werden drei Komponenten als basale Bausteine verwendet, die auf verschiedene Art und Weise miteinander kombiniert werden können. Diese drei Komponenten sind 1. aus Gewebe gewonnene differenzierte Zellen oder Stammzellen, 2. synthetische oder natürliche Scaffolds (siehe 1.3) und 3. exogene chemische oder mechanische Stimuli in Bioreaktoren, die ein passendes Milieu gewährleisten (Martin et al. 2004, Murphy et al. 2013). Die gemeinsame Verwendung dieser drei Komponenten wird auch als Triade des Tissue Engineering bezeichnet (O'Brien 2011, Mhanna & Hasan 2017) (Abb. 1).

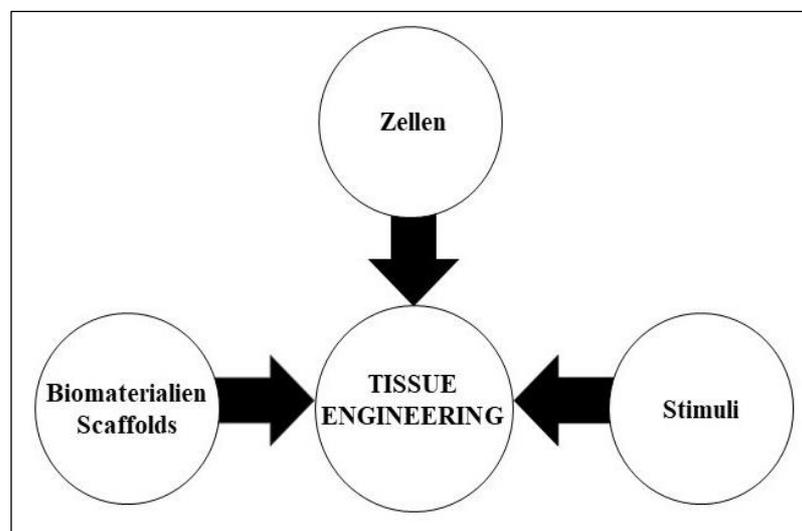


Abbildung 1: Die Triade des Tissue Engineering adaptiert nach O'Brien (2011) bestehend aus Zellen (u.a. primäre Zellen oder Stammzellen), Stimuli (u.a. chemische durch Wachstumsfaktoren oder mechanische durch Bioreaktoren) sowie Scaffolds (u.a. synthetisch oder biologisch).

1.3 SCAFFOLDS DES TISSUE ENGINEERING

Scaffolds sind ein zentraler Bestandteil des Tissue Engineering und fungieren, der Extrazellulärmatrix (=ECM) *in vivo* entsprechend, als strukturelles Grundgerüst. Sie ermöglichen die Erweiterung von zweidimensionalen auf dreidimensionale sowie von statischen auf dynamische Kulturbedingungen (Yuan et al. 2018). Damit kann eine sehr viel bessere Annäherung an die tatsächlichen Gegebenheiten *in vivo* als mit zweidimensionalen und rein statischen Zellkulturen erreicht werden (Fischbach et al. 2007). Die Auswahl des richtigen Scaffolds ist für die jeweilige Anwendung von elementarer Bedeutung und so ist es nicht

verwunderlich, dass sich daraus in den letzten Jahrzehnten ein eigenes Forschungsfeld entwickelt hat.

1.3.1 Allgemeine Anforderungen an ein Scaffold

Um erfolgreich in das Feld des Tissue Engineering implementiert zu werden, müssen die verwendeten Materialien und die daraus entstehenden Scaffolds verschiedene Anforderungen erfüllen. Hierbei ist es entscheidend, den Eigenschaften der Extrazellulärmatrix *in vivo* möglichst nahe zu kommen und sie weitestgehend zu imitieren (Chan & Leong 2008).

Zu den wichtigsten Anforderungen eines Scaffolds gehören Biokompatibilität und Aktivität, biologische Abbaubarkeit, mechanische und architektonische Eigenschaften sowie nicht zuletzt auch ökonomische und praktische Umsetzbarkeit (Chan & Leong 2008, Berthiaume et al. 2011, O'Brien 2011). Biokompatibilität beschreibt dabei die Fähigkeit des Scaffolds, Zellen binden zu können und proliferieren zu lassen (Naahidi et al. 2017). Bioaktivität, also die Einflussnahme auf die Differenzierung und Funktion der Zellen, kann unter anderem durch Inkorporation von Wachstumsfaktoren in das Scaffold erreicht werden (Berthiaume et al. 2011). Für die Einbettung der Zellen werden häufig variköse Hydrogele verwendet. Die Materialien müssen biologisch abbaubar sein, um den verwendeten Zellen die Ausbildung ihrer eigenen, für sie physiologischen Extrazellulärmatrix zu ermöglichen (Bitar & Zakhem 2014). Die Architektur der Matrix sowie die Anzahl und Größe der Poren des Scaffolds müssen Zellmobilität zum einen sowie ausreichend Angebot an Nährstoffen zum anderen gewährleisten (O'Brien 2011). Die mechanischen Eigenschaften und die Steifigkeit, die einen wichtigen Einfluss auf das Verhalten und die Differenzierung der Zellen ausüben, sind außerdem von enormer Wichtigkeit (Discher et al. 2005).

1.3.2 Methoden der Scaffoldherstellung

Heutzutage existieren eine Vielzahl verschiedener Scaffolds, die sich in ihrer Zusammensetzung aber auch in der Art der Herstellung und in ihrem Aufbau unterscheiden lassen. Häufige Verwendung finden insbesondere poröse (im Sinne von viele Poren enthaltende) Scaffolds. Sie können durch verschiedene Techniken generiert werden und bestehen meist aus Biokeramik, natürlichen oder synthetischen Polymeren bzw. deren Kombination (Chan & Leong 2008). Kombinationen werden dabei immer populärer, da sie die gleichzeitige Nutzung der jeweiligen Vorteile der Biomaterialien ermöglichen (Gloria et al. 2010). Diese sind unter anderem eine hohe Biokompatibilität und ein gutes Zelladhäsion- und

Wachstumspotential für natürliche Biomaterialien (O'Brien 2011). Dazu gehören zum Teil in der Extrazellulärmatrix vorkommende Polymere wie Kollagen (Glowacki and Mizuno 2008), Hyaluronsäure (Collins & Birkinshaw 2013) und Gelatine (Afewerki et al. 2018). Gleichzeitig zeigen synthetische Polymere wie Polyglycolsäure (PGA), Polylactide (PLA) und ihr Copolymer Polylactide-co-glycolide (PLGA) bessere physikalische Eigenschaften im Sinne einer höheren mechanischen Stabilität (Gunatillake & Adhikari 2003, Magnusson et al. 2011, BaoLin & Ma 2014). Dasselbe gilt auch für Stoffe aus der Gruppe der Biokeramik wie Hydroxylapatit oder Tri-Calcium-Phosphat (Baino et al. 2015).

Während die Verwendung von porösen Scaffolds darauf basiert, die Zugabe von Zellen an die Herstellung der Matrix anzuschließen, existieren weitere Methoden der Scaffoldherstellung mit anderen Vorgehensweisen. Ein Beispiel hierfür ist die Methode des *cell sheetings*, wo Zellen in einer zweidimensionalen Kultur zur Produktion ihrer eigenen Extrazellulärmatrix angeregt werden (Chan & Leong 2008). Anschließend wird eine Vielzahl dieser 2D-Blätter aufeinandergelegt, sodass man eine von den verwendeten Zellen eigen gebildete dreidimensionale Matrix erhält (Okano et al. 1995, Chen et al. 2015). Daneben existiert auch die Methode der *Enkapsulierung*. Hierbei werden die verwendeten Zellen mit den Rohmaterialien des Scaffolds vermischt, sodass sich diese nach Ausbildung der finalen Matrix in dieser befinden (Nicodemus & Bryant 2008). Insbesondere Hydrogele finden hierbei Anwendung. Aus einem hohen Wasseranteil bestehend und daher von viskoelastischer Konsistenz unterscheiden sie sich von den anderen, nach Herstellung ausgehärteten Materialien (Lee & Kim 2018). Aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften scheinen sie dem dreidimensionalen Milieu der Extrazellulärmatrix besonders nahe zu kommen und werden daher als Scaffold mit hohem Potential angesehen (Ratner & Bryant 2004, Naito et al. 2013). Eine weitere Möglichkeit zur Verwendung von Hydrogelen sind die neuartigen Prinzipien des 3D-Druckens bzw. des *Bioprintings*. Diese ermöglichen es, auch komplexe Strukturen aus Biomaterialien, bioaktiven Molekülen wie Wachstumsfaktoren und sogar Zellen nach einem vorab definierten Modell zu generieren (Rider et al. 2018, Eltom et al. 2019). Es ist denkbar, dass unter anderem diese beiden Methoden zukünftig eine wichtige Stellung im Forschungsgebiet des Scaffolding einnehmen werden.

1.3.3 Die Dezellularisierung ganzer Organe

Eine weitere Methode zur Gewinnung von für das Tissue Engineering verwendbaren Matrices ist die Dezellularisierung von Gewebe und Organen. Obwohl die erste Durchführung an zweidimensionalem Schnittpräparaten schon lange zurückliegt (Lwebuga-Mukasa et al. 1986), wurde die Methode der Dezellularisierung eines ganzen Organes erstmals im Jahr 2008 am Beispiel eines Rattenherzes durchgeführt (Ott et al. 2008). Anschließend wurde sie auf andere Organe wie Leber (Shupe et al. 2010, Uygun et al. 2010), Lunge (Petersen et al. 2010, Price et al. 2010) und Nieren (Liu et al. 2009, Ross et al. 2009) verschiedener Spezies übertragen. Das Ziel der Dezellularisierung ist die effektive Entfernung aller zellulären und nukleären Bestandteile bei möglichst vollständigem Erhalten der Zusammensetzung und der Funktion der zurückbleibenden Extrazellulärmatrix (Gilbert et al. 2006). Das Resultat ist der Verbleib eines komplexen, dreidimensionalen Gerüsts, das im Unterschied zu anderweitig hergestellten Scaffolds ein natürliches Gefäßnetzwerk enthält und organspezifische biologische sowie mechanische Eigenschaften wie *in vivo* besitzt (He & Callanan 2012).

Für die Dezellularisierung stehen eine Vielzahl von Möglichkeiten zur Verfügung, die von physikalischen Ansätzen wie etwa Schockgefrieren oder Sonikation bis zur Anwendung von Säuren und Basen reichen (Gilbert et al. 2006). Als besonders erfolgsversprechend hat sich jedoch die perfusionsbasierte Methode herauskristallisiert, da sie prinzipiell jedes Organ und insbesondere auch zell dichtes Gewebe bewältigen kann (Guyette et al. 2014, Taylor et al. 2018). Hierbei werden bestimmte Substanzen wie enzymatisch wirkendes Trypsin-EDTA oder Detergenzien wie Natrium-Dodecyl-Sulfat (=SDS) und Triton X-100 durch kontrollierte Perfusion über den Gefäßbaum in das Organ eingebracht (Badylak et al. 2011). Auf dem Weg durch das Gewebe lösen die Agenzien die Zellen von der Extrazellulärmatrix ab und transportierten diese im selben Zug aus dem Organ heraus (Gilbert et al. 2006). Eine Kombination der verschiedenen Methoden ist ebenfalls möglich, um die Aggressivität der jeweiligen Agenzien und die damit verbundenen Nebenwirkungen auf die zurückbleibende Extrazellulärmatrix möglichst gering zu halten. Diese können unter anderem der Verlust von Proteoglykanen oder ihrer Glykosaminoglykane (Mendoza-Novelo et al. 2011, Petersen et al. 2012) oder die Reduktion von in der Extrazellulärmatrix enthaltenen Wachstumsfaktoren (Caralt et al. 2015) sein. Auch die Veränderung der Ultrastruktur von wichtigen, unter anderem adhäsiv wirkenden Proteinen wie Laminin, Elastin oder Kollagen stellt einen möglichen negativen Effekt auf die Extrazellulärmatrix dar (Akhyari et al. 2011). Während die Auswahl,

die Konzentration und die Einwirkzeit der jeweiligen Agenzien unter anderem vom zu dezellularisierenden Organ beeinflusst werden (Badylak et al. 2011, He & Callanan 2012), müssen sich zwei Schritte unabhängig davon immer anschließen. Dazu gehört zum einen die restlose Entfernung der zytotoxischen Substanzen, die im Rahmen der Dezellularisierung verwendet wurden, um eine Schädigung der anschließend in das Gewebe gebrachten Zellen zu vermeiden. Dies gelingt durch nachfolgendes Waschen des Scaffolds mit destilliertem Wasser oder PBS (Cebotari et al. 2010). Zum anderen muss nach Abschluss der Dezellularisierung eine Sterilisierung des Gewebes erfolgen, um eine absolute Keimfreiheit zu erreichen (Gilbert et al. 2006).

Die in der Literatur beschriebenen Dezellularisierungsprotokolle sind vielfältig, die Eliminierung zellulärer Bestandteile muss jedoch in jedem Fall gewährleistet sein. Minimalkriterien hierfür sind eine visuelle Freiheit von nukleären Bestandteilen in histologischen Färbungen mit Hämatoxylin & Eosin oder 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI), $< 50\text{ng dsDNA/mg Gewebe}$ (Trockengewicht) und eine DNA Fragmentlänge $< 200\text{bp}$ (Crapo et al. 2011). Grundlage hierfür sind insbesondere die Assoziation zwischen im Gewebe verbliebener DNA und entzündlicher Host-Reaktionen (Zheng et al. 2005, Nagata et al. 2010), die nach Reimplantation in den Empfänger entstehen können. Die beiden Variablen, die sich im Rahmen der Dezellularisierung die Waage halten müssen, sind folglich die effektive Zellentfernung zum einen und der Verbleib einer gesunden, physiologischen und möglichst unbeschädigten Extrazellulärmatrix zum anderen (Akhyari et al. 2011, Caralt et al. 2015).

1.4 AUFBAU UND FUNKTIONEN DER EXTRAZELLULÄRMATRIX

Für die Neubildung der Extrazellulärmatrix ist die Kenntnis ihres natürlichen Aufbaus von besonderer Bedeutung. Zusammengesetzt aus Basalmembran und interstitieller Matrix entspricht sie dem nicht-zellulären Bestandteil aller Gewebe und Organe und wird lokal von Epithelien, Endothelien, Fibroblasten und Adipozyten produziert (Frantz et al. 2010). Ein wesentlicher Bestandteil der ECM sind die Strukturproteine, zu denen neben Elastin auch Kollagene gehören. Sie tragen entscheidend zu den mechanischen Eigenschaften der ECM bei und gewährleisten Stabilität, Zugfestigkeit sowie Elastizität. Außerdem können sie über Beeinflussung der Steifheit des Gewebes die Differenzierung von Stammzellen in die für das Gewebe notwendigen Zelllinien beeinflussen und besitzen somit auch biomechanische Funktionen (Discher et al. 2005, Engler et al. 2006).

Kollagene sind die am häufigsten vorkommenden Proteine der Extrazellulärmatrix (Tanzer 2006). Sie werden anhand struktureller Unterschiede in mehr als 20 Subtypen klassifiziert (Gordon & Hahn 2010), die gewebeabhängig jeweils in unterschiedlicher Quantität und Ausrichtung vorliegen. So zeigen Sehnen zum Beispiel einen hohen Anteil von faserigem Kollagen I (Bosman & Stamenkovic 2003). Die endotheliale Basalmembran enthält dagegen viel retikuläres Kollagen IV, das auch als Ligand für endotheliale Zellen dient (Badylak 2002). Weiterhin besitzt die ECM adhäsive Glykoproteine wie Fibronectin, Laminin, Tenascin und Nidogen (Schwarzbauer 1999, Chiquet-Ehrismann & Tucker 2004). Sie kommen ebenfalls vermehrt in der Basalmembran vor (Tanzer 2006) und ermöglichen wie Kollagen IV spezifische Adhäsion und Migration von Zellen mit bestimmten Mustern von ECM-Rezeptoren wie Syndecan und Integrinen (Fogerty et al. 1990, Miyamoto et al. 1998, Rozario and DeSimone 2010). Insbesondere das β 1-Integrin zeigt hierbei starke Affinität (Yue 2014). Als Transmembranproteine stehen sie im Kontakt mit dem Zytoskelett, regulieren Genexpression und nehmen so wesentlichen Einfluss auf die Zellfunktionen (Bissell et al. 1982, Hynes 1992). Neben diesen physiologischen Funktionen sind insbesondere die Laminine auch an pathologischen Prozessen wie Invasion und Metastasierung von Karzinomen beteiligt (Patarroyo et al. 2002).

Weitere Strukturelemente bilden die Proteoglykane wie Heparansulfat und dem wiederum insbesondere in der Basalmembran angereicherten Perlecan (Tanzer 2006). Mit ihren angehängten Glykosaminoglykanen besitzen sie eine hohe Bindekapazität für Wasser, die der

Extrazellulärmatrix eine Widerstandsfähigkeit für axialen Druck ermöglicht (Yue 2014). Doch auch Wachstumsfaktoren wie VEGF, FGF, TGF- β , EGF und PDGF sind an ihnen gebunden (Hynes 2009), sodass die ECM zudem als Reservoir für jene angesehen werden kann (Kim et al. 2011). Sie können zelluläres Verhalten verändern, initiieren Entwicklungsprozesse (Hynes 2009) und ermöglichen die Wundheilung (Eckes et al. 2010). Die ECM zeigt einen gewebsspezifischen Aufbau (Järveläinen et al. 2009) und unterliegt, abhängig von dessen physiologischen Anforderungen ständigen Anpassungsprozessen (Badylak et al. 2011). Hierbei sind von verschiedenen Zellen wie Endothelien, Epithelien und auch Leukozyten sezernierte aber auch in der ECM liegende Matrix-Metallo-Proteinase von Bedeutung (Bosman and Stamenkovic 2003). Sie sind für den Abbau der bestehenden Matrix und, mit dem damit einhergehenden Freisetzung membrangebundener Wachstumsfaktoren, für die Einleitung dieser Remodellingprozesse verantwortlich (Kular et al. 2014).

Die Extrazellulärmatrix ist somit nicht nur passiver Zuschauer, sondern an elementaren Funktionen des Organismus beteiligt. Mit ihren adhäsiven Glykoproteinen und Wachstumsfaktoren ist sie bioaktiv, vermittelt zelluläres Verhalten wie Adhäsion, Migration, Proliferation und Differenzierung von bestimmten Zellen und trägt so wesentlich zur Morphogenese bei (Mecham 1998, Yue 2014).

1.5 DAS GEFÄßSYSTEM

1.5.1 Aufbau und Funktionen der Gefäße

Das Gefäßsystem ist ein elementarer Bestandteil des Organismus und erfüllt zahlreiche Funktionen. Dazu gehören die Gewährleistung und Aufrechterhaltung der zellulären Energiegewinnung durch den Transport von an Hämoglobin gebundenem Sauerstoff und anderen Substraten wie Glukose als auch der Abtransport von Kohlenstoffdioxid und anderen Abfallprodukten des Stoffwechsels. Können diese Aufgaben nicht mehr erfüllt werden, droht mit der Ischämie ein Absterben des betroffenen Gewebes. Doch werden auch andere Funktionen wie die zelluläre Kommunikation über den Transport von Hormonen und Zytokinen oder die Thermoregulation über den konstanten Blutfluss im Gefäßsystem ermöglicht (Ehmke 2019).

Die Gefäßwand ist bis auf wenige Ausnahmen in der kapillären Endstrombahn dreischichtig aufgebaut. Luminal liegt die Tunica intima, die sich aus stets einschichtigem Endothel, einer angrenzenden Basalmembran und einer subendothelialen Schicht zusammensetzt. Daran anschließend liegt die Tunica media, deren Zusammensetzung zwar abhängig vom Typ des Gefäßes variiert, grundsätzlich aber glatte Muskelzellen und/oder elastische Fasern in einem unterschiedlichen Verhältnis besitzt. Darauf folgt die Tunica adventitia aus lockerem Bindegewebe, die daneben auch die Vasa vasorum und postganglionäre sympathische Nervenfasern enthält (Ulfig 2019).

1.5.2 Der Gefäßbaum

Unmittelbar nach dem linken Ventrikel des Herzens liegen die großen herznahen Arterien wie die Aorta und deren Äste, die zur Aufrechterhaltung der sogenannten Windkesselfunktion viele elastische Fasern in der Tunica media enthalten (Aust et al. 2017). Darauf folgen mittelgroße Arterien und Arteriolen, in denen der Anteil der glatten Muskelzellen in der Tunica media dominiert, um damit den peripheren Gefäßwiderstand und damit den Blutdruck sowie die periphere Durchblutung regulieren zu können (Traore & George 2017). Nach weiterer Aufzweigung in Mesarteriolen folgen die Kapillaren und anschließend die postkapillären Venolen, die lediglich aus Endothelzellen, einer Basalmembran und Perizyten bestehen (Long 1970). Als Teile der Mikrozirkulation findet hier der größte Teil des Stoffaustausches statt, der durch eine dünne Gefäßwand zum einen und durch die große Gesamtoberfläche von etwa 1000m^2 zum anderen begünstigt wird (Ehmke 2019). Ein elementarer Aspekt ist hierbei die

Unterschreitung der maximalen Diffusionsstrecke für Sauerstoff von 100-200 μm , um den aeroben Zellstoffwechsel aufrechterhalten zu können (Jain et al. 2005, Lovett et al. 2009). Der Rückfluss des Blutes zum rechten Herzen erfolgt über dünnwandige Venolen und Venen, die nur eine wenig ausgeprägte Tunica media besitzen. Sie erfüllen zudem eine Reservoirfunktion, sodass sich hier etwa 80% des Blutvolumens befinden (Aust et al. 2017).

1.5.3 Typen von Kapillaren

Gase und andere lipidlösliche Stoffe können die Zellwand problemlos passieren und auf diesem Weg in das Gewebe gelangen. Für Wasser und wasserlösliche Moleküle existieren darüber hinaus drei organspezifische Typen von Kapillarendothel, um auch ihren Transport durch die Gefäßwand zu ermöglichen (Aird 2007). Kontinuierliches Endothel besitzt für diesen Zweck Interzellularfugen und ist unter anderem in der Muskulatur zu finden. Diskontinuierliche Endothelien des Knochenmarkes oder der Leber zeigen große interzelluläre Lücken, die auch die Basalmembran betreffen und auch für Zellen permeabel sind (Okada et al. 2017). In diesen beiden Fällen erfolgt der Transport weitgehend parazellulär. Der dritte Subtyp der Kapillaren besitzt ein fenestriertes Endothel mit kleinen intrazellulären Fenstern, kommt zum Beispiel in den Nierenglomeruli vor und ermöglicht einen transzellulären Transport (Lüllmann-Rauch and Asan 2019).

Perizyten sind ein weiterer Zelltyp, der ebenfalls in den kapillären Gefäßen ansässig ist. Sie umgreifen die Endothelzellen mit zahlreichen Fußfortsätzen von basal und erfüllen neben mechanischer und struktureller Unterstützung weitere wichtige Aufgaben. Dazu gehören die Regulation des Blutflusses im Kapillarbett (Rucker et al. 2000, Kennedy-Lydon et al. 2013) und die Steuerung der Gefäßneubildung. (Lindblom et al. 2003, Bergers & Song 2005).

1.5.4 Funktionen des Endothels

Jedes Gefäß des menschlichen Körpers wird luminal durch einen Monolayer aus Endothelzellen ausgekleidet, die durch zahlreiche interzelluläre Kontakte eine Barriere zwischen dem Gefäßlumen und dem Interstitium aufrechterhalten beziehungsweise durch die oben genannten Mechanismen selektiv permeabel sind. Die Folge einer zum Beispiel durch Inflammation pathologisch erhöhten Permeabilität ist eine Flüssigkeitsanreicherung im Interstitium. Des Weiteren regulieren sie sowohl die Thrombozytenfunktion als auch die plasmatische Gerinnung und ermöglichen somit das richtige Maß an Koagulation zur richtigen Zeit. Zur Aufrechterhaltung des Blutflusses sezernieren sie aggregationshemmende Stoffe wie

Stickstoffmonoxid oder Prostazyklin (Cines et al. 1998) und verhindern eine unangebrachte Thrombozytenaktivierung durch hydrolytischen Abbau von hierfür erforderlichem ATP/ADP (Pearson et al. 1980). Auch auf die plasmatische Gerinnung wirken sie durch die Aktivierung des ProteinC/ProteinS Signalweges (Esmon & Owen 1981, Stern et al. 1986), durch die Sekretion von Tissue-Factor-Pathway-Inhibitor (Bajaj et al. 1990, Ameri et al. 1992) und ihr membrangebundenes Heparansulfat (Li et al. 2004) inhibitorisch. Auch regulieren die Endothelzellen durch die Sekretion von t-PA und PAI-1 die Fibrinolyse (Michiels 2003). Während die oben genannten Faktoren eine inadäquate Thrombusbildung hemmen, sind die Endothelzellen jedoch auch an der Blutgerinnung beteiligt. Bei Verletzung des Gefäßendothels aktivieren sie Thrombozyten durch die Sekretion von PAF (Whatley et al. 1987), ermöglichen durch eine gleichzeitige Freisetzung des von-Willebrand-Faktors aus den Weibel-Palade-Körperchen deren Adhäsion an der Gefäßwand (van Mourik et al. 2002) und stimulieren durch Sekretion des Tissue Factors die plasmatische Gerinnungskaskade (Nawroth et al. 1986, Yau et al. 2015).

Eine weitere wichtige Funktion des Endothels ist die Regulation des Gefäßtonus durch die parakrine Sekretion verschiedener vasoaktiver Substanzen. Sie entfalten ihre Wirkung anschließend an den glatten Muskelzellen der Gefäßwand und/oder den kapillären Perizyten als Effektorzellen (Dodge et al. 1991, Haefliger et al. 1994). Vasodilatativ wirkende Stoffe sind Stickstoffmonoxid (Vallance et al. 1989), Prostazyklin (Caughey et al. 2001) und der Endothelium-derived-hyperpolarization-factor (Feletou & Vanhoutte 1988). Während der Auslöser für die Freisetzung von intrazellulär gespeichertem Stickstoffmonoxid insbesondere Scherstress ist, wird die Synthese von Prostazyklin vor allem durch die Wirkung inflammatorische Zytokine stimuliert (Sandoo et al. 2010). Einen vasokonstriktiven Effekt besitzen Thromboxan A₂ (Thomas et al. 1998) und Endothelin-1 (Schiffrin Ernesto 1999), dessen Freisetzung durch Stimuli wie Hypoxie oder freie Radikale initiiert wird (Motte et al. 2006).

Weiterhin besitzen Endothelzellen eine wichtige immunologische Funktion. Im Rahmen einer Infektion vermitteln sie nach Aktivierung durch proinflammatorische Zytokine wie IL-1, TNF- α (Pober & Cotran 1990) die Migration von neutrophilen Granulozyten zur Eradikation etwaiger Erreger. Dieser Vorgang wird wesentlich durch die zytokinvermittelte Expression von adhäsiven Proteinen wie Selectinen, ICAM-1, VCAM-1 und PECAM-1 (=CD-31) durch die

Endothelzellen ermöglicht, die es den Leukozyten folglich erlauben, in das Gewebe zu migrieren (Michiels 2003, Aird 2007, Pober & Sessa 2007).

Endothelzellen sind an der Ausbildung der Gefäße, die sie später auskleiden, von Beginn an beteiligt. Die *de-novo* Synthese von primitiven Blutgefäßen durch endotheliale Vorläuferzellen, den Angioblasten, wird hierbei als Vaskulogenese bezeichnet (Risau & Flamme 1995). Angiogenese bezieht sich hingegen auf die Ausbildung von Blutgefäßen aus einem bereits bestehenden Gefäßsystem (Risau 1997). Im Rahmen beider Prozesse entstehen initial Kapillaren, die sich entweder als primitives kapilläres Netzwerk oder aber als Aussprossung eines vorhandenen Gefäßes darstellen. Durch Einfluss von PDGF wird die Einwanderung von Perizyten und glatten Muskelzellen initiiert, sodass sie anschließend zu größeren Gefäßen ausreifen können (Carmeliet 2000). Während in der Embryonalphase beide Prozesse zu finden sind, ist die Vaskulogenese in der weiteren Entwicklung nur bestimmten Situationen vorbehalten (Balaji et al. 2013). Vielmehr dominiert die Angiogenese (Vailhé et al. 2001), die physiologisch zum Beispiel im Rahmen der Wundheilung (Klagsbrun and D'amore 1991) aber auch als pathologischen Neovaskularisation im Rahmen von Krebswachstum und proliferativen Retinopathien stattfindet (Folkman 1995). Ein wichtiger Auslöser der Angiogenese ist eine Gewebshypoxie bzw. die damit einhergehenden reduzierten Sauerstoffpartialdrücke (Shweiki et al. 1992), die über den Hypoxie-induzierbaren Faktor 1α (HIF- 1α) registriert werden (Fraisl et al. 2009). HIF-1 führt letztend Endes zu einer vermehrten Expression und Synthese von VEGF, der neben FGF2 einer der wichtigsten stimulierenden Wachstumsfaktoren der Neoangiogenese ist (Ruhrberg 2003, Lieu et al. 2011).

1.5.5 Vaskularisierung von Gewebe im Tissue Engineering

Wie die Organe *in vivo* benötigt auch das im Rahmen des Tissue Engineering entstandene Gewebe eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff und anderen Nährstoffen, um den notwendigen zellulären Stoffwechsel aufrecht erhalten zu können. Um dies zu erreichen ist es notwendig, ein funktionierendes mikrovaskuläres System in das Gewebe zu implementieren, das die Diffusionsgrenzen für Sauerstoff unterschreitet, d.h. eine jede Zelle nicht weiter als 100-200 μ m von einem kapillären Gefäß entfernt ist (Jain et al. 2005, Lovett et al. 2009). Durch die Verwendung von dezellularisierten Scaffolds kann diese Anforderung unter Erhaltung des natürlichen Gefäßbaumes und der anschließenden Reendothelialisierung elegant erfüllt werden. Stehen entsprechende Gefäßstrukturen nicht zur Verfügung, muss durch andere Formen der Prävasikularisierung eine Gewebserfusion sichergestellt werden (Rouwkema et al. 2008).

Die Strategien der Prävascularisierung von Gewebe können grundsätzlich in (a) zellbasierte und (b) scaffoldbasierte Methoden unterteilt werden (Novosel et al. 2011). Die zellbasierte Methode nutzt dabei die Eigenschaft von Endothelzellen, in avaskulärem Gewebe Neoangiogenese zu betreiben und die Gefäßlumina somit de novo auszubilden. Durch die Verwendung von Cokulturen bestehend aus Endothelzellen auf der einen und Fibroblasten oder mesenchymalen Zellen auf der anderen Seite kann dieser Prozess weiter optimiert werden (Min et al. 2019). Zur Steigerung der hierbei ablaufenden Neoangiogenese werden für gewöhnlich angiogenetische Wachstumsfaktoren wie VEGF oder bFGF verwendet (Novosel et al. 2011). Eine große Limitation der zellbasierten Methode ist jedoch, dass das entstandene kapilläre Netzwerk häufig zufällig und nicht funktionell organisiert ist, was eine vollständige Versorgung des Gewebes nicht möglich macht (Rouwkema et al. 2008). Um dies zu erreichen besteht in der scaffoldbasierten Methode eine zuverlässigere Möglichkeit der Prävascularisierung, da die tubulären Strukturen, an denen sich die Endothelzellen orientieren, bereits als Scaffold vorhanden sind und somit eine vorab definierte Ausrichtung der späteren Gefäß erlauben (Min et al. 2019). Neben der bereits erwähnten Dezellularisierung können diese Scaffolds auch auf andere Arten aus verschiedenen Materialien gebildet werden. Das grundsätzliche Endprodukt ist dabei ein ECM-Gerüst oder eine Matrix aus Hydrogel (siehe Abschnitt 1.3.2), die weitverzweigte hohle Kanäle aufweisen (Rouwkema et al. 2008). Diese gefäßähnlichen Tunnel können anschließend mit Endothelzellen ausgekleidet werden, sodass ein definiertes Kapillarbett entsteht.

1.5.6 Der humane Endothelzelltyp EA.hy926

Das somatische Zellhybrid namens EA.hy926 ist ein Produkt der Fusion von primären humanen Endothelzellen aus der Umbilikalvene (HUVECs) mit dem Zelltyp A549/8 aus dem Gewebe eines Adenokarzinoms der Lunge (Edgell et al. 1983) und besitzt eine endotheliale Differenzierung (Mutine et al. 1997). So zeigen sich in der elektronenmikroskopischen Darstellung zytoplasmatisch liegende Weibel-Palade-Körperchen (Edgell et al. 1990), die für endotheliale Zellen spezifisch sind (Rondaijs et al. 2006, Valentijn et al. 2011) und insbesondere den von-Willebrand-Faktor enthalten. Der von-Willebrand-Faktor ist auch in der Zellreihe EA.hy926 nachweisbar, zeigt eine den HUVECs gleichender Verteilung und bleibt auch nach mehr als 100 Passagen erhalten (Edgell et al. 1983). Es handelt sich damit um eine permanente Zelllinie. Die Verwandtschaft zu den HUVECS zeigt sich ebenfalls in ihrer Ähnlichkeit in Bezug auf das Endothelin-converting-Enzym (Ahn et al. 1995). Weiterhin erhält der Zelltyp EA.hy926 auch andere für Endothelzellen typische Eigenschaften wie die Expression von CD-31 (PECAM-1) und ICAM-1 als endotheliale Adhäsionsmoleküle (Thornhill et al. 1993, Lidington et al. 1999), die Synthese von Endothelin-1 (Saijonmaa et al. 1991) und Prostazyklin (Suggs et al. 1986) sowie fibrinolytische Funktionen (Emeis & Edgell 1988).

1.6 DIE NIEREN

1.6.1 Aspekte der makroskopischen und mikroskopischen Anatomie

Die Nieren sind paarige Organe, die sich retroperitoneal in der Abdominalhöhle befinden. Unmittelbar umgeben von einer kollagenreichen Kapsel sind sie in lockeres Fettgewebe eingebettet. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendete Niere der Ratte ist mit Dimensionen von etwa 15x9x6mm ungefähr 10mal kleiner als die eines Menschen (Suckow et al. 2006).

Makroskopisch lässt sich das Nierenparenchym in Mark und Rinde unterteilen. Ersteres besteht aus Markpyramiden, deren Spitzen als Papillen bezeichnet werden und jeweils in einen Nierenkelch hineinragen. An den Papillen enden große Gänge, die sich aus mehreren Sammelrohren zusammensetzen und den prozessierten Endharn führen. Während menschliche Nieren etwa 14 Papillen besitzen (Schulte 2017), hat die Niere der Ratte nur eine einzige Papille und wird daher als unipapillär bezeichnet (Bachmann et al. 1986). Die Nierenkelche vereinigen sich im Nierenbecken, das wiederum in den Ureter übergeht. Mikroskopisch befindet sich in den Markpyramiden ein großer Teil des Tubulussystems. Die Nierenrinde ist von halbmondförmiger Gestalt und zieht mit Kolumnen zwischen den Markpyramiden bis an den Hilus heran. Sie besteht mikroskopische aus den Nierenkörperchen, die sich aus einem Glomerulum und der Bowman-Kapsel zusammensetzen.

Das Glomerulum ist ein Gefäßknäuel bestehend aus geschwungenen Kapillaren, in denen der Primärharn filtriert wird. Selektivität für Wasser, Elektrolyte und niedermolekulare Stoffe wird durch die glomeruläre Filtrationsbarriere erreicht, die für größere ($r > 1,8\text{nm}$, Molekülmasse $> \text{ca. } 10\text{kDa}$) und insbesondere negativ geladene Moleküle wenig bis gar nicht durchlässig ist (Silbernagl 2019). Sie besteht aus fenestriertem Endothel ohne Diaphragma, Glykokalyx, einer glomerulären Basalmembran und den Fußfortsätzen der Podozyten, zwischen denen eine Schlitzmembran liegt (Ulfig 2019). Am Harnraum des Nierenkörperchens beginnt das Tubulussystem mit dem proximalen Tubulus, das über einen intermediären-, distalen und Verbindungstubulus in ein Sammelrohr mündet. Teile der ersten drei genannten bilden die Henle-Schleife. Die histologische Darstellung einer unipapillären Niere findet sich in Abbildung 2.

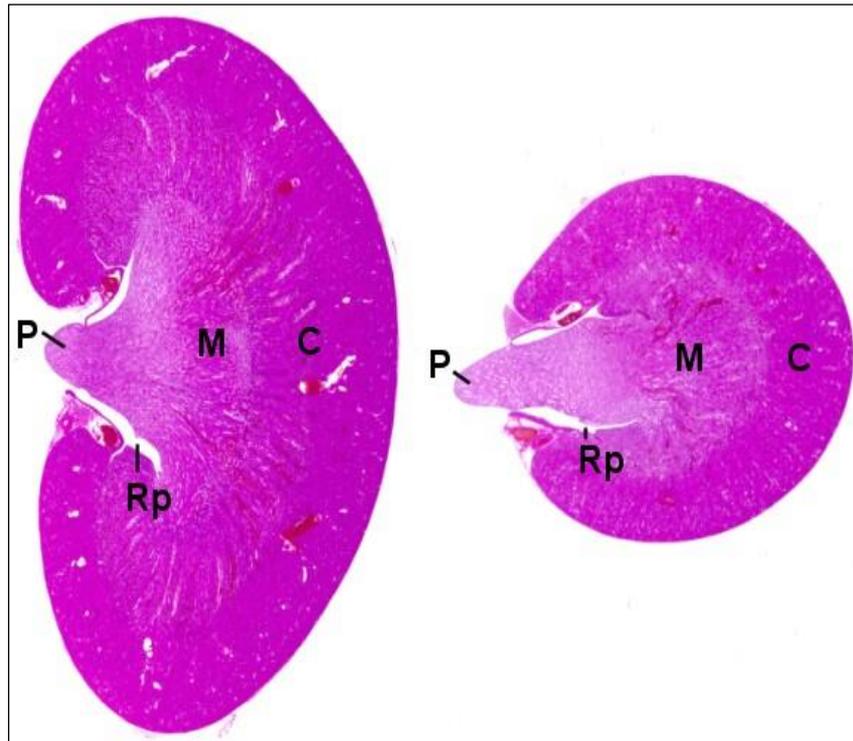


Abbildung 2: Unipapilläre Niere im Transversalschnitt (A) und Axialschnitt (B). C = Cortex, M = Medulla, Rp = Nierenbecken, P = Papille; Die Niere einer Ratte besitzt im Unterschied zur humanen Niere nur eine Papille und wird daher als unipapillär bezeichnet. Abbildung aus Morawietz, Ruehl-Fehlert et al. (2004).

1.6.2 Wesentliche Funktionen der Nieren

Als exokrines Organ dienen die Nieren der Ausscheidung von harnpflichtigen Substanzen und gleichzeitig der Regulation des Wasser-, Elektrolyt und Säure-Basen-Haushaltes. Dies geschieht durch die bedarfsgerechte Reabsorption der jeweiligen Bestandteile aus dem Primärharn, die mittels unterschiedlichsten aktiven und passiven Transportsysteme in den Nierentubuli stattfindet. Das Resultat ist der konzentrierte Endharn, der die Nieren über den Ureter verlässt. Gleichzeitig besitzen die Nieren allerdings auch endokrine Funktionen. Dazu gehören die Synthese von Erythropoetin als wichtigster Stimulator der Erythropoese und von Vitamin D, das essenziell für die Calcium- und Phosphat Homöostase ist. Renin ist ein weiteres wichtiges Molekül, dessen Synthese in den Nieren stattfindet und durch Aktivierung des Renin-Aldosteron-Angiotensin-Systems maßgeblich an der Wasser- und Blutdruckregulation beteiligt ist.

1.6.3 Die renale Gefäßversorgung

Die Gefäßversorgung beginnt in der Aorta abdominalis, die für jede Seite eine große Nierenarterie abgibt. Im Bereich des Nierenhilus teilen sie sich in einen großen ventralen und dorsalen Ast (Yoldas & Dayan 2014), aus denen nach den Aa. interlobares, den Aa. arcuatae und den Aa. interlobulares die arteriellen Vasa afferentia abgehen (Schulte 2017). Diese speisen jeweils ein Nierenkörperchen und verlassen diese als arterielle Vasa efferentia. Anschließend folgt ein zweites, peritubuläre verlaufendes Kapillarnetz der weitere Verlauf als Aa. rectae bis in die tiefen der Nierenpyramiden (Lüllmann-Rauch & Asan 2019). Die Vasa recta verlaufen parallel zu geraden Anteilen der Nierentubuli und der Henle Schleife und dienen durch ihr Gegenstromaustausch gleichzeitig der Harnkonzentrierung (Silbernagl 2019). Der venöse Abfluss erfolgt analog zu den arteriellen Gefäßen.

2 FRAGESTELLUNG UND ZIEL DER ARBEIT

Das Gefäßsystem ist eine elementare Voraussetzung für den Funktionserhalt von Gewebe und Organen. Auch für das Feld des Tissue Engineering ist die Nachbildung von intakten Gefäßstrukturen daher essenziell. Dies gilt auch für experimentelle Ansätze, bei denen das Parenchym von Organen wie der Rattenniere für die Kultivierung organfremder Zellen für metabolische und onkologische Untersuchungen verwendet wird. Nach Etablierung einer Methode, die eine dezellularisierte Rattenniere als Scaffold für ossäres Tissue Engineering verwendet (Burgkart et al. 2014) wurde diese Anwendung in laboreigenen Untersuchungen auf andere Zelltypen wie Osteosarkomzellen erweitert. In beiden Fällen werden die Zellen über den Ureter in das Kelchsystem von azellulären Rattennieren gesät und deren Verhalten nach Durchführung einer dynamischen 3D-Kultur ausgewertet. Darüber hinaus beobachtete die Arbeitsgruppe im Rahmen dieser Arbeiten, dass sich die Biokompatibilität der Rattenniere für humane Osteoblasten nach einer denaturierenden Dezellularisierung mit einer SDS-Konzentration von 3% gegenüber einer schonenderen Dezellularisierung mit einer Konzentration von 0,66% verbesserte. Auf dieser Grundlage soll in der vorliegenden Arbeit die Reendothelialisierung von azellulären Rattennieren evaluiert werden. Speziell soll Folgendes geprüft werden:

- Evaluierung von adhäsiven Eigenschaften und damit der Eignung des Endothelzelltyps EA.hy926 für die Reendothelialisierung von perfundierten 3D-Tissue Matrices unter Verwendung eines in-vitro Angiogenese Assays
- Anwendung der automatisierten Dezellularisierungseinheit DecellControl bei der Rattenniere unter Verwendung eines laboreigenen Dezellularisierungsprotokolles sowie Überprüfung seiner Funktionalität und Etablierung in der Praxis
- Einfluss zweier SDS-Konzentrationen (i.e. 3% und 0,66%) im Rahmen der Dezellularisierung auf die Fähigkeit des Endothelzelltyps EA.hy926 als Modellzelle, nach Einsaat über die Nierenarterie an der vaskulären Basalmembran azellulärer Rattennieren zu adhäreren und zu proliferieren
- Einfluss der Adhäsionszeit, der Zellzahl und der Dauer der dynamischen Kulturbedingungen auf die Anzahl im Gefäßsystem der Rattenniere verbleibender Endothelzellen und Etablierung eines reproduzierbaren Rezellularisierungsprotokolls

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 MATERIALIEN

3.1.1 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 1: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien und deren Hersteller.

Name	Hersteller/Land
Dreiwegehahn Discifix® C	B. Braun Melsungen AG, Deutschland
Glasflaschen Duran; Küvetten	Schott AG, Deutschland
Injekt®-Solo Spritze 5ml/10ml	B. Braun Melsungen AG, Deutschland
Katheter Vasofix® Safety 20G	B. Braun Melsungen AG, Deutschland
Mikrotom Klingen S-35	FEATHER® Safety Razor Co. Ltd., Japan
Nahtmaterial Vincryl 3-0	Ethicon/Johnson-Johnson Medical GmbH, USA
Omnifix®-Solo Spritze 5ml	B. Braun Melsungen AG, Deutschland
Original Perfusor®-Leitung	B. Braun Melsungen AG, Deutschland
Präparationsinstrumente	Karl Hammacher GmbH, Deutschland
Reaktionsgefäß 1,5ml	Biozym Scientific GmbH, Deutschland
Röhrchen CELLSTAR® 25ml, 50ml	Greiner Bio-One GmbH, Deutschland
Rollenpumpenschlauch AR - 6420	Arthrex medizinische Instrumente GmbH, Deutschland
Pipetten SafeSeal Tips Professional 2,5µl/ 10µl/ 20µl/ 100µl/ 200µl/ 1250µl	Biozym Scientific GmbH, Deutschland
Sterican® Kanüle Gr.1, 0,9x40mm	B. Braun Melsungen AG, Deutschland
Verlängerungsleitung Heidelberger 30cm	B. Braun Melsungen AG, Deutschland
Zählkammer Neubauer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Deutschland
Kulturflasche CELLSTAR® 175cm ²	Greiner Bio-One GmbH, Deutschland
Zellsieb EASYstrainer™ 40µm	Greiner Bio-One GmbH, Deutschland
Verlängerungsleitung Heidelberger 140cm, 75cm, 30cm	B. Braun Melsungen AG, Deutschland
Kulturflasche CELLSTAR® 75cm ²	Greiner Bio-One GmbH, Deutschland
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, USA
Pipette 5ml/ 10ml/ 25ml/ 50ml	Greiner Bio-One GmbH, Deutschland
Reaktionsgefäß 0,5ml	Biozym Scientific GmbH, Deutschland
Objektträger Superfrost® Plus	Gerhard Menzel B. V. & Co. KG, Deutschland
Perfusor® Spritze, 50ml	B. Braun Melsungen AG, Deutschland
Cryoware™, Kryoröhrchen 1ml	Nalgene®, USA
Deckgläser für Objektträger	Gerhard Menzel B. V. & Co. KG, Deutschland
CELLSTAR® 96-well-plates	Greiner Bio-One GmbH, Deutschland

3.1.2 Chemikalien

Tabelle 2: Liste der verwendeten Chemikalien und deren Hersteller.

Name	Hersteller/Land
Kulturmedium DMEM 30-2002™	ATCC®, USA
Aceton ≥ 99,5%	Carl Roth, Germany
Methanol ≥ 99%	Carl Roth, Germany
Alkopharm 70, 70% Ethanol	L. Brüggemann GmbH & Co. KG, Deutschland
Ethanol 70%	Fischar GmbH & Co. KG, Deutschland
Ethanol 96%	Fischar GmbH & Co. KG, Deutschland
Ethanol absolut, 100%	Fischar GmbH & Co. KG, Deutschland
Eukitt® Eindeckmittel	O. Kindler & ORSAtec GmbH, Deutschland
Fetales Kälberserum, FCS	Biochrome GmbH, Deutschland
Ecotainer® steriles destilliertes Wasser	B. Braun & Melsungen GmbH, Deutschland
Cell Freezing Medium - DMSO 1x	Sigma-Aldrich Inc., USA
Primocin™ 50mg/ml	InvivoGen, USA
Trypanblau	Sigma-Aldrich Inc., USA
Trypsin - EDTA	Sigma-Aldrich Inc., USA
Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline (DPBS), ohne Calcium oder Magnesium, 1X	Sigma-Aldrich Inc., USA
SDS-Pellets ≥ 99,5%	Carl Roth, Deutschland
Mayer´s Hämatoxylin	Apotheke MRI TUM, Deutschland
PFA 8%	Apotheke MRI TUM, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Deutschland
Kaiser´s Glycerolgelatine	Merck, Deutschland
Roticlear®	Carl Roth, Deutschland
Antibody Diluent	Dako, Dänemark
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich Inc., USA
Eosin G	Carl Roth, Deutschland
Salzsäure (HCl; 1M)	Merck, Deutschland
Natronlauge (NaOH; 1M)	Merck, Deutschland
Na ₂ HPO ₄ ·2 H ₂ O	Merck, Deutschland
K ₂ HPO ₄	Merck Millipore, Deutschland
Tween® 20	Sigma-Aldrich Inc., USA
Proteinase K	Qiagen, Deutschland
Protein Block	Dako, Dänemark
Trinatrium-Citrat-Dihydrat	Carl Roth, Deutschland
Penicillin-Streptomycin (10.000U/ml & 10mg/ml)	Sigma-Aldrich Inc., USA

3.1.3 Laborgeräte

Tabelle 3: Liste der verwendeten Laborgeräte, deren Modelle und der Hersteller.

Gerät	Modell	Hersteller/Land
Arthroskopiepumpe	Continous Wave II AR- 6450	Arthrex medizinische Instrumente GmbH, Deutschland
Autoklav	Varioklav	HP-Labortechnik AG, Deutschland
Brutschrank/Inkubator	HERAcell™ 150/ HERAcell™ 150i	Thermo Fischer Scientific Ltd., USA
Eismaschine		Ziegra GmbH, Deutschland
Magnetrührer	RCT Basic	IKA GmbH & Co. KG, Deutschland
Mikroskop	Axiovert 25CFL	Carl Zeiss GmbH, Deutschland
Mikroskop	AxioObserver.Z1	Carl Zeiss GmbH, Deutschland
Mikrotom	Slide 4003-E	PFM Medical GmbH, Deutschland
Mikrowelle	Multigrill Micromat DUO	AEG GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
Paraffinstreckbad	HI 1210	Leica Biosystems GmbH, Deutschland
Pipettierhilfen	Easy-Pet®, Reference®	Eppendorf AG, Deutschland
Präzisions-pH-Meter	pH-Level-1	InoLab, Deutschland
Präzisionswaage	PEJ	Kern & Sohn GmbH, Deutschland
Spülmaschine	Mielabor G7763	Miele, Germany
Sterile Sicherheitswerkbank	HERAsafe HS 12	Heraeus/Kendro, Deutschland
Trockenofen	ED56	Binder GmbH, Deutschland
Wasserbad	SUB14	Grant Instruments Ltd, UK
Werkbank für Färbungen	Model 4850	Labcaire Systems Ltd., UK
Zentrifuge	5810R	Eppendorf AG, Deutschland

3.1.4 Antikörper

Tabelle 4: Listen der verwendeten primären und sekundären Antikörper, deren Verdünnung und Einwirkzeit sowie der Antikörper für die Isotypenkontrollen.

Primärer Antikörper	Hersteller	Verdünnung	Inkubationszeit/Temperatur
CD-31 (PECAM-1)	Dako	1:50	18 Stunden/4°C
vWF		1:50	18 Stunden/4°C
PCNA		1:500	18 Stunden/4°C
Laminin		1:500	2 Stunden/RT
Fibronectin		1:500	2 Stunden/RT
Kollagen IV	Quartett	1:50	30 Minuten/RT
Sekundärer Antikörper	Hersteller	Verdünnung	Inkubationszeit/Temperatur
Kaninchen biotinyliert	Vector	1:200	30 Minuten/RT
Maus biotinyliert	Laboratories	1:200	30 Minuten/RT
Isotypenkontrolle	Hersteller	Verdünnung	Inkubationszeit/Temperatur
Maus IgG1-Kappa	Peprotech	Gemäß des Erst- antikörpers	Gemäß des Erstantikörpers
Maus IgG2a-Kappa			
Kaninchen IgG			

3.2 METHODEN

3.2.1 Zellkultur

Isolierte Zellen vom Typ EA.hy926 der Firma ATCC® wurden mit freundlicher Unterstützung von PD Dr. med. Jaroslav Pelisek vom Institut für Vaskuläre Biologie & Experimentelle Chirurgie des Klinikums rechts der Isar in gefrorenem Zustand bezogen und bis zur Verwendung in flüssigem Stickstoff bei -196° Celsius gelagert. Zum Auftauen wurde ihr Behältnis vorsichtig im Wasserbad bei 37° Celsius geschwenkt, bis sich das gefrorene Material etwas verflüssigte, einzelne Eisklumpen allerdings noch sichtbar waren. Um eine mögliche Schädigung der Zellen durch das Gefriermedium zu vermeiden, wurde das Gefäß rasch mit 1ml erwärmtem Medium aufgefüllt und in ein mit 9ml Medium gefüllten Falcon überführt. Nach Zählung der Zellen (siehe Abschnitt 3.2.1.2) wurde die Suspension für 10min mit 200g zentrifugiert, der Überstand vorsichtig entfernt, das Zellpellet mit 2ml Medium resuspendiert und in eine 175cm^2 Kulturflasche überführt. Wie den Herstellerangaben zu entnehmen, sollte die Zelldichte hierbei zwischen 2×10^3 und 3×10^3 pro cm^2 betragen. Nach Zugabe von 20ml Kulturmedium wurde die Kulturflasche im Brutschrank bei 37° Celsius, 5% CO_2 und $>95\%$ Luftfeuchtigkeit inkubiert. Das Kulturmedium wurde anschließend alle zwei bis drei Tage gewechselt. Als Kulturmedium wurde, gemäß der Herstellerangaben, DMEM 30-2002™ der Firma ATCC® verwendet und als Zusatz fetales bovines Serum (FBS) in einer Endkonzentration von 10% sowie Primocin™ in einer Endkonzentration von $100\mu\text{g/ml}$ beigelegt.

3.2.1.1 Amplifikation und Subkultur

Die Zellen wurden alle drei bis fünf Tage bei optischer Konfluenz gesplittet und subkultiviert, um eine gleichmäßige Proliferationstendenz zu erhalten. Das gebrauchte Medium wurde dafür aus der Kulturflasche entfernt und die Zellen anschließend mit 10ml PBS gewaschen. Anschließend wurden 5ml 1x Trypsin EDTA hinzugefügt und für etwa fünf Minuten belassen, um ein vollständiges Ablösen der Zellen zu erreichen. Das Trypsin EDTA wurde durch die Zugabe von 5ml Kulturmedium inaktiviert und die daraus entstehende Zellsuspension durch die Verwendung eines EASYstrainer™ Zellsiebess mit einer $40\mu\text{m}$ Maschenweite von Konglomeraten befreit. Nach Zählung der Zellen (siehe Abschnitt 3.2.1.2) wurde die Zellsuspension für 10min mit 200g zentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Das Zellpellet wurde mit 5ml Kulturmedium resuspendiert, die Zellsuspension mit oben

genannter Zellzahl in die Kulturflaschen ausgesät und im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

3.2.1.2 Zellzählung und Trypanblau-Assay

Zur Zellzählung wurde eine Zellkammer des Typs *Neubauer* (Abb. 3A) mit einer Kammertiefe von 0,1mm verwendet. Die untersuchte Fläche beschränkte sich auf die vier außen liegenden Großquadrate, deren Kantenlängen 1mm und ihre Fläche somit jeweils 1mm² betrug. Von den äußeren vier Begrenzungslinien eines jeden Großquadrates wurden nur zwei in die Zählung inkludiert, nämlich jene, die mit dem zentralen Großquadrat in direktem Kontakt standen (Abb. 3B, grüne Linien). Von der gewonnen Zellsuspension wurden 50µl in ein Mikroreaktionsgefäß überführt und anschließend 50µl Trypanblau hinzugefügt. Nach vorsichtiger Resuspension wurden daraufhin 10µl der entstandenen Flüssigkeit auf die Zählkammer gegeben, sodass sich diese homogen unter dem Deckglas verteilte. Die Unterscheidung zwischen vitalen- und avitalen Zellen ermöglichte das zugegebene Trypanblau. Diese konnte in tote Zellen aufgrund der resultierenden Membrandefekten eindringen und färbte diese blau an, während sich vitale, gesunde Zellen farblos darstellten.

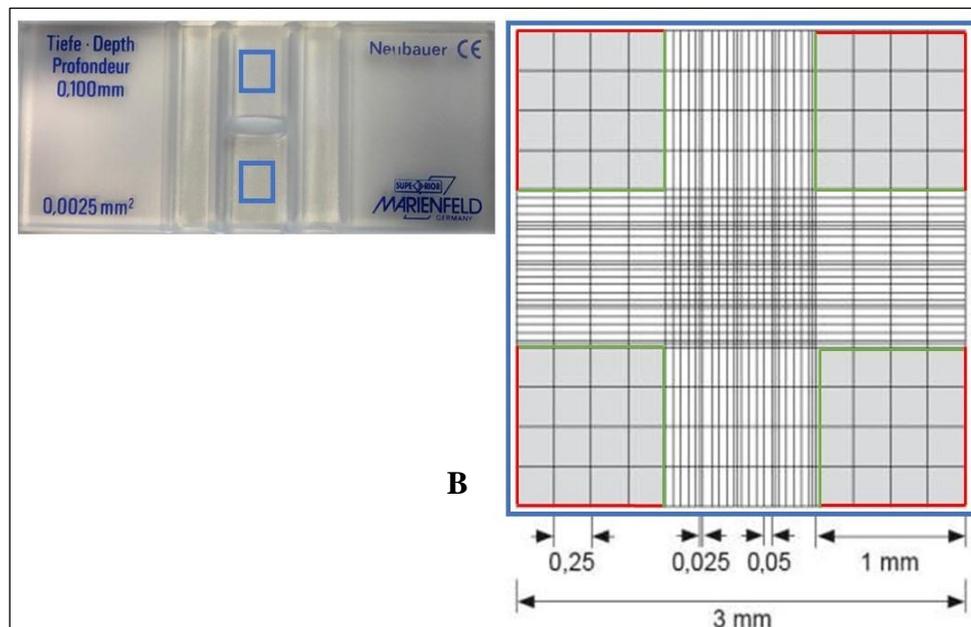


Abbildung 3: Neubauer Zählkammer (A). Die beiden Zählfelder sind blau umrandet. Vergrößerung eines Zählfeldes mit grün/roter Umrandung der vier Großquadrate wobei nur die grünen Grenzlinien in der Zählung berücksichtigt werden (B).

Nur die vitalen Zellen wurden in der Zählung berücksichtigt und deren Anzahl anschließend mit folgender Formel berechnet.

$$\frac{\text{Anzahl der vitalen Zellen}}{1\text{ml}} = \frac{\text{gezählte Zellen}}{4} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Für die Berechnung der Verdopplungszeit (=PDT = Population doubling time) in der jeweiligen Passage wurde die folgende Formel verwendet.

$$PDT = \frac{(t - t_0) \times \log 2}{\log(N) - \log(N_0)}$$

Hierbei entsprach N der Anzahl der Zellen zum Zeitpunkt t und somit der endgültigen Zellzahl während N_0 die Anzahl der Zellen zum Zeitpunkt t_0 und somit zu Beginn der Kultivierung angab.

3.2.1.3 Anfertigung von Kammerobjektträgern

Endothelzellen von Typ EA.hy926 wurden nach Abtrypsinierung (siehe Abschnitt 4.2.1.1) und Zählung (siehe Abschnitt 4.2.1.2) aus der Zellkultur gewonnen und auf Kammerobjektträger, jeweils bestehend aus vier Kammern, ausgesät. Dabei wurde jede Kammer mit 20×10^3 Zellen und 1ml Kulturmedium befüllt. Anschließend wurden Kammerobjektträger für fünf bis sieben Tage bei 37°C, 5% CO₂ und >95% Luftfeuchtigkeit kultiviert, um eine ausreichende Zelldichte auf den Objektträgern zu erreichen. Nach Ablauf der notwendigen Kultivierungszeit wurden die Kammerobjektträger in PBS gewaschen, luftgetrocknet, in Aluminiumfolie verpackt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.2.2 Angiogenese Assay

Zur Evaluierung der Adhäsionsfähigkeit der oben genannten Zelllinie und ihrer endothelialen Differenzierung wurde ein in-vitro Angiogenese Assay unter Verwendung eines Ready-to-use-Kits der Firma Abcam® (Katalognummer ab204726) durchgeführt (Abbildung 4).

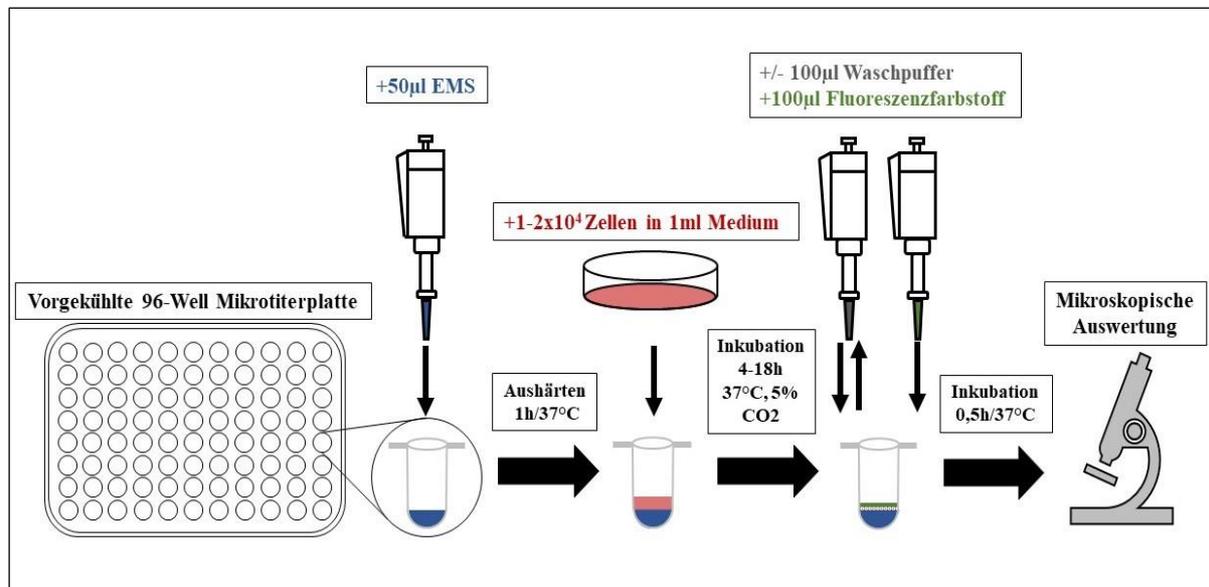


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Angiogenese Assays. Nach Zugabe und Aushärtung des EMS (blau) werden 2×10^4 Zellen hinzugefügt (rot). Nach anschließender variabler Inkubationszeit erfolgt ein Waschvorgang (grau), die Zugabe des Fluoreszenzfarbstoffes (grün) und die mikroskopische Auswertung.

Die darin enthaltene Extrazelluläre-Matrix-Lösung (EMS) wurde vorab über Nacht bei 4°C auf Eis getaut. Ebenfalls wurden eine Mikrotiterplatte mit 96 Wells und $200\mu\text{l}$ Pipetten über Nacht bei -20°C vorgekühlt. Unter sterilen Bedingungen wurden jeweils $50\mu\text{l}$ EMS in die Wells überführt und mit leichtem Klopfen eine homogene Verteilung in diesen erzielt. Während aller Arbeitsschritte wurde die EMS auf Eis gelagert werden, um eine vorzeitige Viskositätserhöhung und damit verbundene Schwierigkeiten im Pipettiervorgang zu vermeiden. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte für eine Stunde in eine Wärmekammer mit 37°C gestellt, sodass die EMS zu einem festen Gel aushärten konnte. Danach wurden 2×10^4 Zellen in 1ml Medium pro Well ausgesät und bei 37°C , 5% CO_2 und $>95\%$ Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die individuellen Inkubationszeiten betragen dabei vier, zehn oder 18 Stunden. Nach Erreichen der jeweiligen Inkubationszeit wurde das Medium vorsichtig abpipettiert und das Gefäß mit $100\mu\text{l}$ Waschlösung gereinigt. Nach vorsichtiger Entfernung des Waschlösung wurden $100\mu\text{l}$ des im Ready-to-use-Kit enthaltenen Fluoreszenzfarbstoffes hinzugefügt und die Mikrotiterplatten erneut für eine halbe Stunde bei 37°C belassen. Die anschließende

mikroskopische Auswertung erfolgt mittels Licht- und Fluoreszenzmikroskopie (Alexa Fluor 488). Die Negativkontrolle erfolgt ohne vorherige Applikation der EMS.

3.2.3 Präparation der Rattenniere

Die Präparation der Rattenniere ist in Abbildung 5 dargestellt.

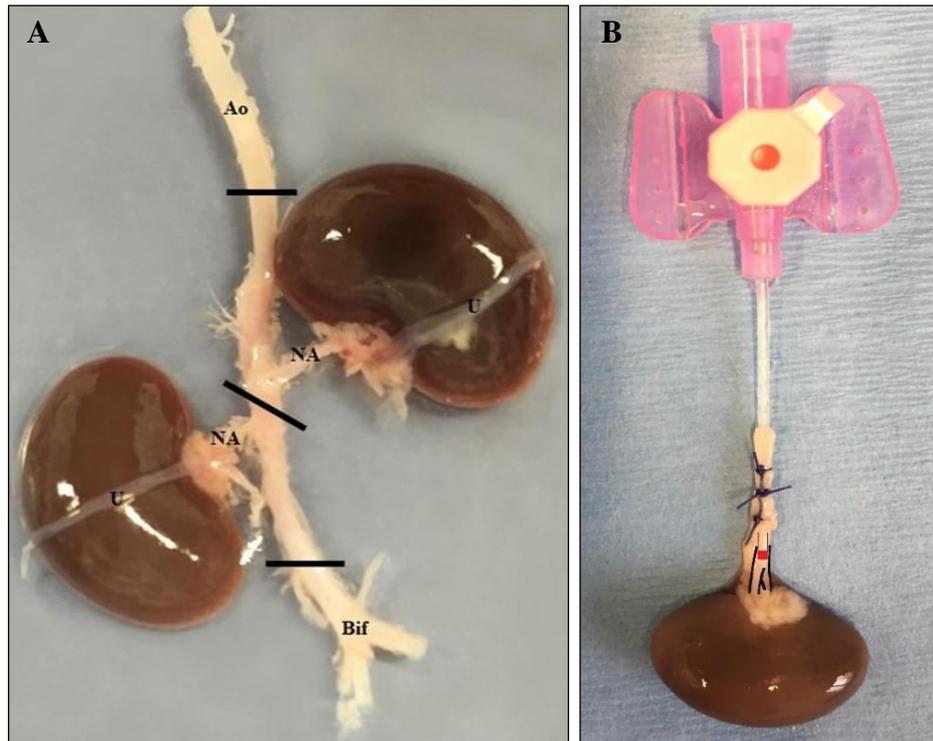


Abbildung 5: (A) Präpariertes Organpaket mit Aorta (Ao), Iliakalbifurkation (Bif), Aa. renales (NA) und Ureteren (U). Die schwarzen Linien zeigen die Schnittlokalisationen. (B) Rattenniere mit 20 Gauge Venenverweilkatheter in der A. renalis, der mit drei chirurgischen Knoten fixiert wurde. Die Katheterspitze (rot eingezeichnet) liegt vor der Aufteilung in zwei große Segmentäste (schwarz verstärkt).

Das gefrorene Organpaket wurde samt Behältnis im Wasserbad bei 37°C komplett enteist und in eine Petrischale befördert. Nach Entfernung des umliegenden Fett- und Muskelgewebes sowie der beiden Nebennieren war eine klare anatomische Orientierung möglich, sodass die Aorta abdominalis nun zwischen den Abgängen der beiden Nierenarterien schräg durchtrennt werden konnte (Abb. 5A). Die beiden Organe wurden anschließend voneinander gelöst. Für die folgenden Schritte wurde nur eine der beiden Nieren verwendet, während die andere in einem mit PBS gefüllt Falcon bei -80°C konserviert wurde. Zur Sondierung der Aorta abdominalis wurde eine 20 Gauge große Venenverweilkathüle ohne Stahl-Mandrin verwendet, die vorab mit Aqua durchgespült wurde, um eine absolute Luftfreiheit sicherzustellen. Der

Kunststoffkatheter wurde in die A. renalis eingeführt und so weit vorgeschoben, bis die Spitze des Katheters vor dem Abgang der großen Segmentarterien zum Liegen kam, um die separate Perfusion lediglich eines Segmentastes zu vermeiden (Abb. 5B, rot verstärkt; vgl. Abschnitt 1.6.3). Zuletzt wurde der Katheter unter Verwendung eines Prolene 5-0 Fadens mit drei chirurgischen Knoten fixiert.

3.2.4 Dezellularisierung

3.2.4.1 DecellControl und Aufbau

Die Dezellularisierung der Rattenniere wurde mit Hilfe eines von Dipl. Ing. Peter Föhr und seinen Mitarbeitern speziell für diesen Zweck entwickelten Systems namens *DecellControl* durchgeführt, das eine vollautomatisierte Dezellularisierung von bis zu vier Organen gleichzeitig ermöglicht. Neben den unten beschriebenen Bestandteilen ist dessen Kern eine Computersoftware, die drei elektromagnetische Ventile ansteuert und diese automatisch öffnet und schließt. Im Folgenden wird näher auf die Einzelteile und den Aufbau dieses Systems eingegangen, der fertige Aufbau der Dezellularisierungseinheit ist in Abbildung 6 dargestellt.

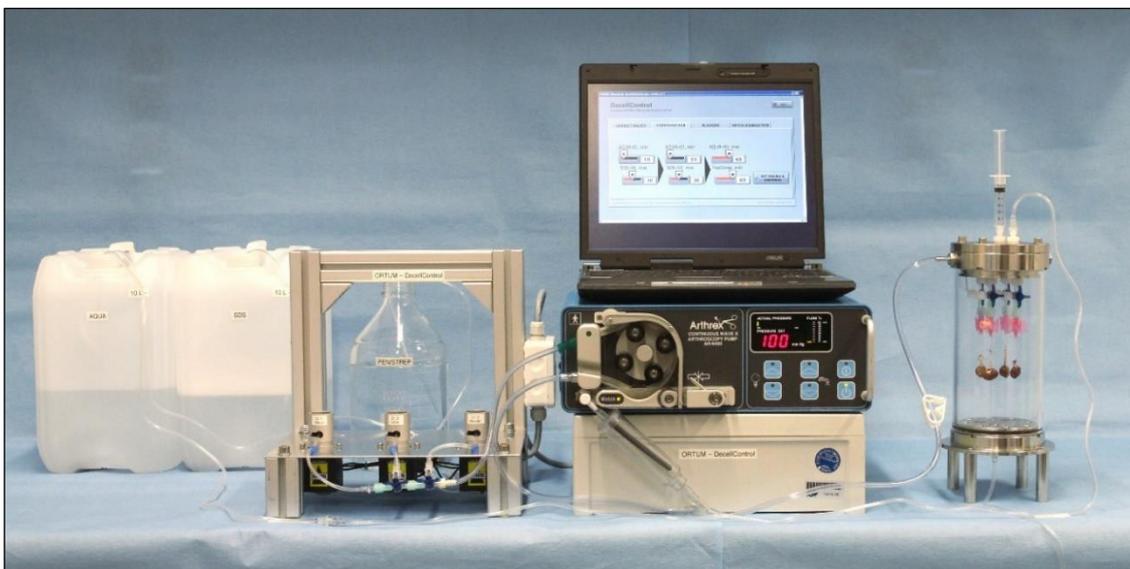


Abbildung 6: Aufbau der Dezellularisierungseinheit mit folgenden Bestandteilen (von links nach rechts): Spülflüssigkeiten, Vorrichtung mit elektromagnetischen Ventilen, Arthroskopiepumpe und Computer mit der Software DecellControl sowie Reaktor mit angehängten Rattennieren.

Im Zentrum befindet sich eine Arthroskopiepumpe der Firma Arthrex (Continuous Wave II AR-6450), die eine dauerhafte druck- und flowkontrollierte Flüssigkeitsbewegung ermöglicht. Hierbei können Perfusionsdrücke bis zu 200mmHg und ein Flow im Bereich zwischen 10% und 100% verwendet werden. An die Arthroskopiepumpe wurde ein passender

Rollenpumpenschlauch der Firma Arthrex (AR-6420) angeschlossen. Um den Rollenpumpenschlauch später mit den außen liegenden Teilen des Systems adaptieren zu können, wurden beide peripheren Enden vorab mit einer Schere abgetrennt. An den zuführenden Schenkel des Rollenpumpenschlauches wurden zwei untereinander verbundene Dreiwegehähne adaptiert, sodass anschließend drei freie Anschlüsse zur Verfügung standen. An jeden dieser drei Anschlüsse wurde ein 140cm langer Verlängerungsschlauch des Typs Heidelberger angeschlossen. Jeder dieser drei Verlängerungsschläuche wurde daraufhin in einem separaten elektromagnetischen Ventil fixiert und endete in jeweils einem unterschiedlichen Behältnis. In einem der Behältnisse befanden sich zehn Liter destilliertes Wasser, im zweiten fünf Liter Natriumdodecylsulfat (=SDS) in entsprechender Konzentration, das vorab in destilliertem Wasser gelöst wurde. Das dritte und letzte Behältnis wurde mit 1,5 Litern einer einprozentigen Penicillin-Streptomycin-Lösung (=Pen/Strep) gefüllt, entsprechend 100U/ml Penicillin und 0,1mg/ml Streptomycin. Der abführende Schenkel des Rollenpumpenschlauches wurde direkt an einen Reaktordeckel adaptiert. An dessen Oberseite konnte das System über eine manuell verschließbare und blind endende Leitung entlüftet werden. Eine nebenan fixierte 5ml Spritze diente als sogenannte Bubbletrap, die während der Dezellularisierung akzidentiell in das Schlauchsystem gelangte Luftblasen auffing. An der Unterseite des Deckels konnte das Organ mitsamt Venenverweilkatheter über einen weiteren Dreiwegehahn adaptiert werden (Abschnitt 3.2.4.2).

Die Computersoftware, das Ventilsystem und alle Einzelteile des Reaktors sind laboreigene Entwicklungen. Die Schläuche und Leitungen sind Verbrauchsmaterialien und wurden nach einmaligem Gebrauch entsorgt, wiederverwendete Teile wurden nach Gebrauch in einem Ultraschallbad gereinigt und anschließend autoklaviert.

3.2.4.2 Dezellarisierungsprozess

Vor Beginn der Dezellarisierung des Organs musste das Protokoll in der Computersoftware wie in Abbildung 7 gezeigt eingestellt werden.

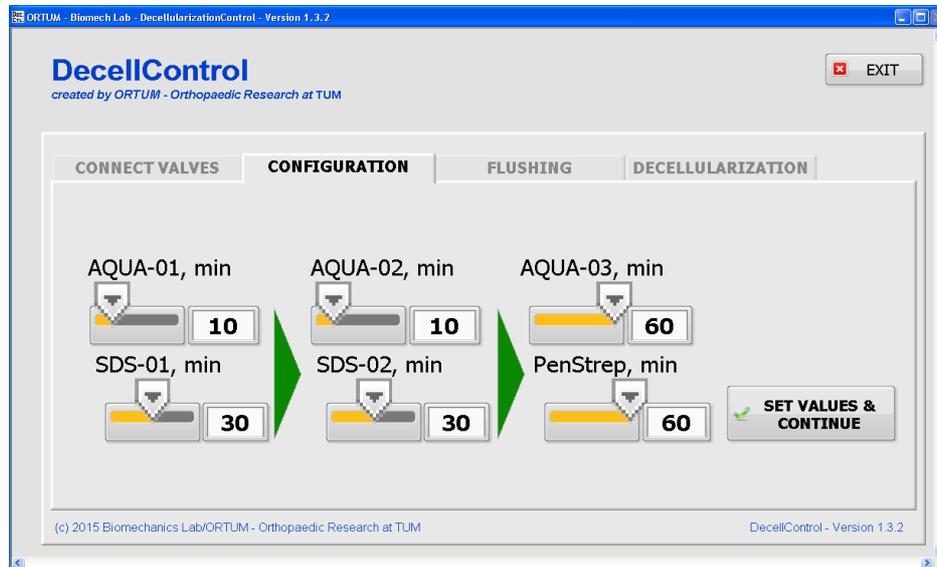


Abbildung 7: Der Computerbildschirm während der Einstellung der Parameter für die Dezellarisierung in der Software DecellControl.

Eine tabellarische Darstellung des Dezellarisierungsprotokolles ist der Tabelle 5 zu entnehmen.

Tabelle 5: Dezellarisierungsprotokoll; * = unterschiedliche Konzentrationen (i.e. 0,66% und 3%) in destilliertem Wasser.

Schritt	Chemikalie	Dauer [min]
1	destilliertes Wasser	10
2	SDS*	30
3	destilliertes Wasser	10
4	SDS*	30
5	destilliertes Wasser	60
6	Pen/Strep	60
Gesamt		200

Das gesamte Schlauchsystem musste vorab über die blind endende Leitung am Reaktordeckel entlüftet werden. Bei sicherer Luftfreiheit konnte die Niere über den Venenverweilkatheter an den Dreiweghahn des Reaktors angeschlossen und das Dezellarisierungsprotokoll manuell

über die Computersoftware gestartet werden. Um Parenchymschäden durch einen plötzlichen Druckanstieg zu vermeiden, wurde der Perfusionsdruck anfangs von 40mmHg stetig erhöht und anschließend über den gesamten Zeitraum bei 100mmHg belassen. Der Flow betrug durchgehend 10%. Eine schematische Darstellung der Dezellularisierungseinheit und der Flussverhältnisse findet sich in Abbildung 8.

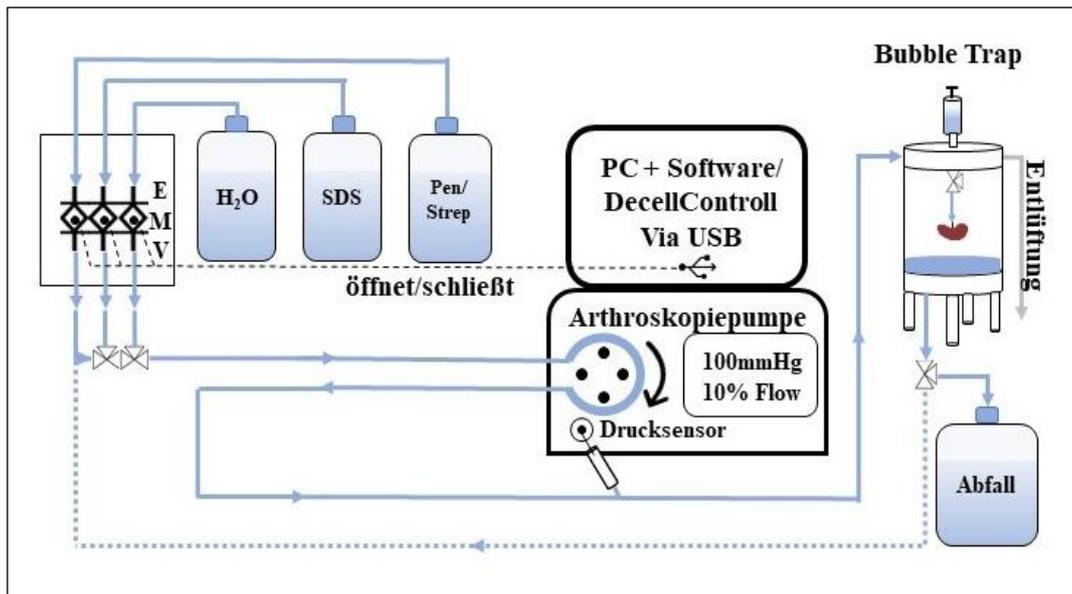


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Dezellularisierungseinheit und der Flussverhältnisse. Während das destillierte Wasser und das SDS verworfen wird (blauer durchgezogener Pfeil unten rechts), wird das Penicillin Streptomycin in einem geschlossenen Kreislauf wiederverwendet (blauer gestrichelter Pfeil mittig unten). Der sonstige Aufbau kann der Abb. 6 entnommen werden.

Aufgrund des ständigen Sogs der Arthroskopiepumpe erfolgte die Steuerung des Zuflusses in die am Bioreaktor angehängte Rattenniere allein durch die von der Computersoftware regulierten Offenheit der elektromagnetischen Ventile (Abb. 8, EMV). Die aus dem Gefäßbaum austretende Flüssigkeit tropfte anschließend in die Reaktorschale ab. Destilliertes Wasser und das SDS wurden verworfen. Die Penicillin-Streptomycin-Lösung wurde wie in Abbildung 8 gezeigt in einem geschlossenen Kreislauf wiederverwendet. Des Weiteren wurde das Reaktorgefäß soweit damit befüllt, bis sowohl das ganze Organ als auch der Venenverweilkatheter vollständig davon umschlossen wurden. Nach insgesamt 200 Minuten war das Protokoll abgeschlossen. Das Organ wurde anschließend in einer sterilen Petrischale in eine sterile Sicherheitswerkbank überführt und zur Rezellularisierung vorbereitet.

3.2.5 Rezellularisierung

3.2.5.1 Zelleinsaat

Die sich in Kultur befindenden Zellen wurden zwischen der fünften und siebten Passage wie in Abschnitt 2.2.1.1 und 2.2.1.2 beschrieben abtrypsiniert, gezählt, zentrifugiert und unabhängig von der Zellzahl in zwei Milliliter Kulturmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde anschließend in eine 5ml Spritze mit Luer Lock aufgezogen, wobei auch hier genauestens auf Luftfreiheit geachtet wurde. Um einen möglichen zytotoxischen Effekt der im Rahmen der Dezellularisierung verwendeten Spüllösungen auf die eingebrachten Zellen zu vermeiden, wurde das Nierenparenchym zu Beginn vorsichtig mit 5ml reinem Medium gewaschen. Anschließend erfolgte die Zelleinsaat, die schematisch in Abbildung 9 dargestellt ist. Hierzu wurde die Spritze mit der Zellsuspension am Venenverweilkatheter befestigt und diese vorsichtig mit gleichbleibendem Druck vollständig injiziert. Die durchschnittliche Flussgeschwindigkeit betrug hierbei 1ml/min, um eine Adhäsion der Zellen an den Gefäßwänden zu gewährleisten, jedoch

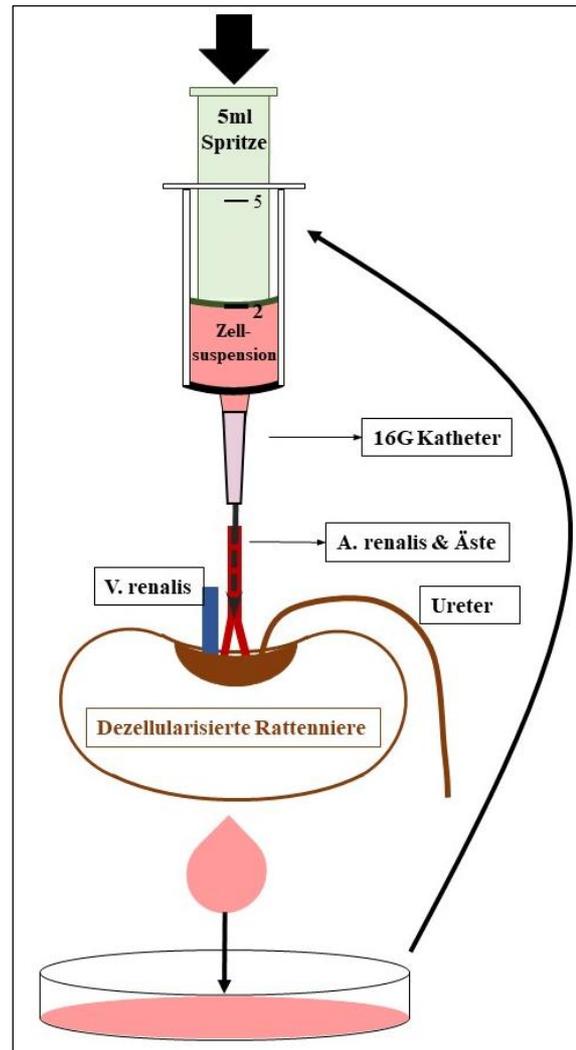


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Zelleinsaat. 2ml Zellsuspension wurden mit 1ml/min über den Venenverweilkatheter in die Nierenarterie eingebracht. Die abgetropfte Suspension wurde anschließend zweimalig aufgezogen und erneut appliziert.

gleichzeitig auch die distalen Gefäßabschnitte zu erreichen. Plötzliche Druckspitzen wurden vermieden, um mögliche Schädigungen des fragilen Parenchyms zu vermeiden. Die während dieses Prozesses von der Nierenwand abtropfende Flüssigkeit wurde in einer Petrischale aufgefangen, erneut in die Spritze aufgezogen und daraufhin reinjiziert. Dieser Vorgang zweimal wiederholt, sodass insgesamt drei Applikationen durchgeführt wurden.

3.2.5.2 Aufbau des Miniinkubator und Beginn der Perfusion

Für die nachfolgende dynamische Kulturen der in das azelluläre Nierengewebe eingebrachten Endothelzellen wurde ein für diesen Zweck entworfener Miniinkubator verwendet. Dieser ist ebenfalls eine hausgemachte Anfertigung. Seine Einzelteile, die vorab autoklaviert wurden und seine fertige Form nach Montage unter sterilen Bedingungen sind in Abbildung 10 dargestellt.

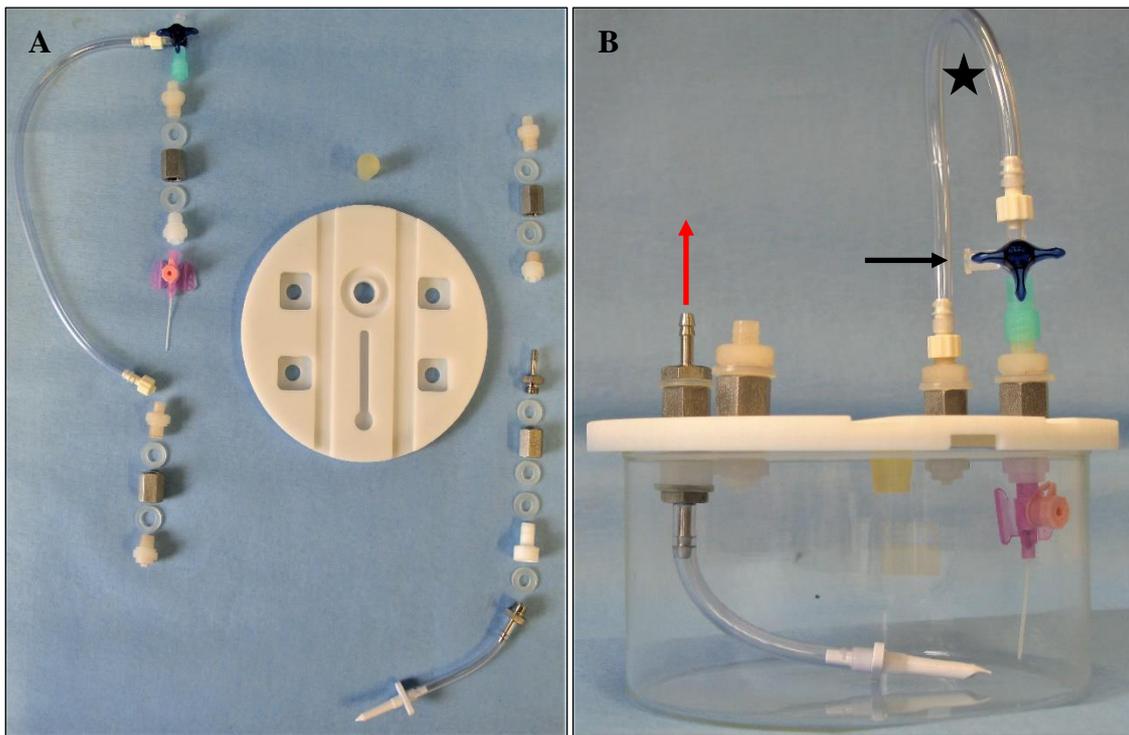


Abbildung 10: (A) Einzelteile des Miniinkubator. Beim Zusammenbau war insbesondere darauf zu achten, dass zwischen allen adaptierten Teilen eine Gummidichtung verbaut wurde und diese die richtige Spannung besaß. (B) Miniinkubator nach Montage. Dreiwegehahn mit Entlüftungsleitung (Sternchen) und freiem Anschluss, an den nachträglich der zuführende Schenkel des Rollenpumpenschlauchs angeschlossen wurde (schwarzer Pfeil). Der abführende Schenkel des Rollenpumpenschlauchs wurde an den metallischen Schlauchadapter angehängt (roter Pfeil).

Nach Montage des Miniinkubators konnte die Rezellularisierungseinheit aufgebaut werden. Auch hier wurden die Arthroskopiepumpe (Continuous Wave II AR-6450) und der passende Rollenpumpenschlauch (AR-6420), dessen Enden wiederum vorab mit einer Schere abgetrennt wurden, verwendet. An dessen zuführenden Schenkel wurde ein Luer-Adapter angebracht und über den Dreiwegehahn an den Deckel des Miniinkubators adaptiert (Abb. 10B, schwarzer Pfeil). Des Weiteren wurde eine 30cm lange Verlängerungsleitung vom Typ Heidelberger als Spül- und Entlüftungsschlauch an den nach oben abgehenden Anschluss des Dreiwegehahnes angebracht (Abb. 10B, Stern). Ihm gegenüber, an der Unterseite des Reaktordeckels, wurde später der Venenverweilkatheter inklusive des zellulären Organes befestigt. Das abführende

Ende des Rollenpumpenschlauches wurde anschließend über einen Schlauchadapter ebenfalls mit der Oberseite des Reaktordeckels verbunden (Abb. 10B, roter Pfeil). Ihm gegenüber wurde ein kurzes Schlauchstück befestigt, das in die Reaktorschale ragte.

Nach fertigem Aufbau konnte die Glasschale des Miniinkubators mit 300ml Kulturmedium sowie 10% FBS gefüllt und das Schlauchsystem entlüftet werden. Während der Zirkulation des Mediums war dabei vor allem auf Undichtigkeiten und Flüssigkeitsaustritt an den Verschraubungen zu achten. Bei sicherer Luftfreiheit des Schlauchsystems konnte die rezellularisierte Niere am Reaktordeckel befestigt werden. Anschließend wurde der Miniinkubator in einen Kulturschrank mit 37°C und 5% CO₂ und >95% Luftfeuchtigkeit transferiert. Eine schematische Darstellung der Rezellularisierungseinheit ist in Abbildung 11 dargestellt.

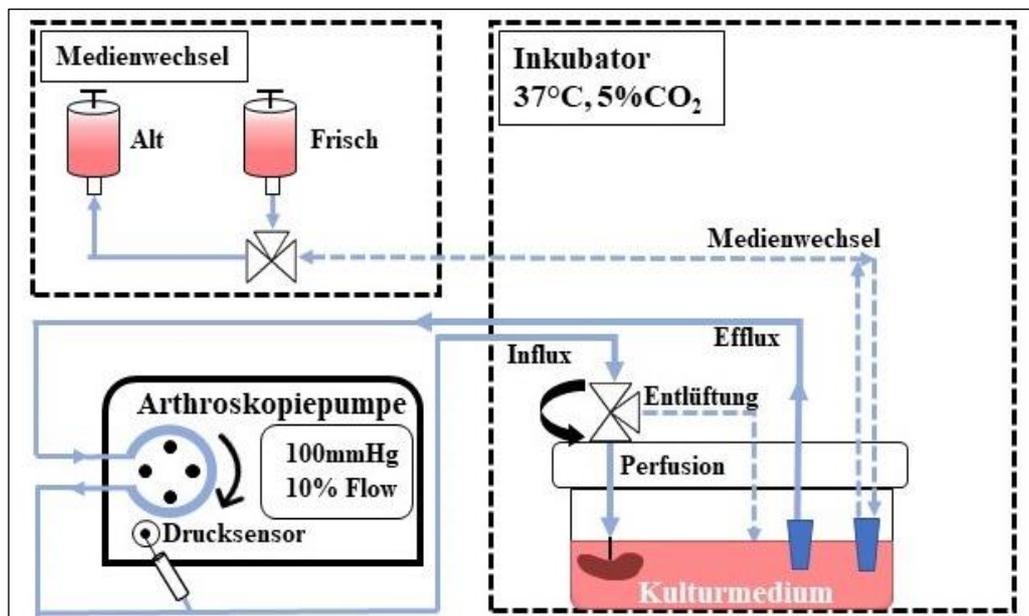


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Rezellularisierungseinheit. Der Miniinkubator befindet sich im Brutschrank, der Hauptfluss verläuft der blau durchgezogenen Linie entsprechend. Das Medium gelangte nach Passage des arteriellen Systems über die Vena renalis und Nierenkelchsystem zurück in die Glasschale. Hier wurde es durch den ständigen Sog der Arthroskopiepumpe erneut abgezogen und wiederum in Richtung Miniinkubator transportiert, sodass ein in sich geschlossener Kreislauf vorliegt. Entlüftung und Medienwechsel wurde durch Drehung des Dreivehahns ermöglicht (blau gestrichelte Linie).

Mit der Perfusion wurde jedoch erst nach der jeweiligen Adhäsionszeit begonnen (siehe Abschnitt 4.4.3 und 4.4.4), die den inserierten Zellen die Möglichkeit geben sollte, eine feste Bindung an die Extrazellulärmatrix aufzubauen. Ähnlich wie zuvor wurde eine Zerreißung des

Parenchyms durch einen plötzlichen Druckanstieg vermieden, indem der Perfusionsdruck, beginnend bei 30mmHg, kontinuierlich auf 60mmHg gesteigert und so über etwa 24 Stunden belassen wurde. Anschließend erfolgte eine weitere Erhöhung des Perfusionsdruckes auf 100mmg, der bis zum Ende des Versuchsdurchlaufes beibehalten wurde. Der Flow betrug durchgehend 10%, das Medium wurde nach drei Tagen gewechselt.

Abhängig vom Arbeitsschritt wurde der Dreiwegehahn am Deckel des Miniinkubators in die dafür notwendige Position gebracht (Abbildung 12).

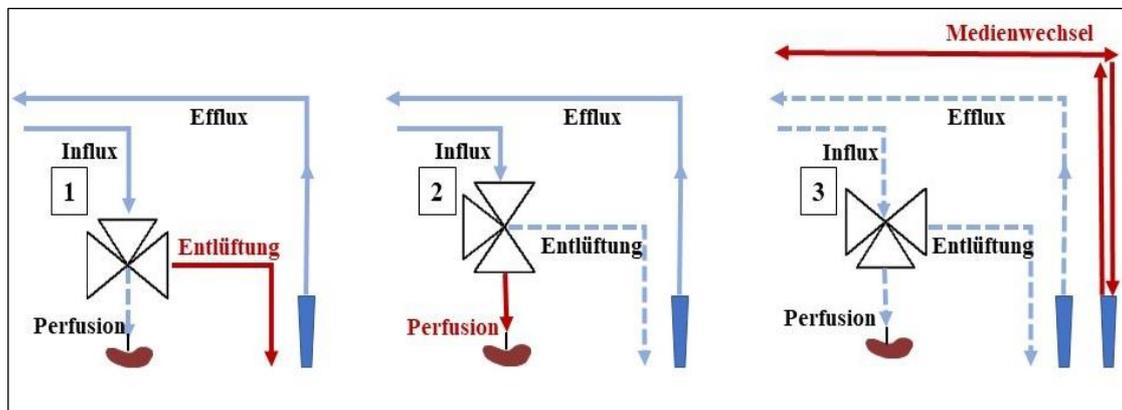


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Flussrichtung abhängig von der Stellung des Dreiwegehahnes. (1) Entlüftung, (2) Perfusion, (3) Medienwechsel. Der rote Pfeil gibt jeweils die effektive Flussrichtung an.

Nach Fixierung der Niere samt eingesäten Zellen am Miniinkubator musste dieser vor Beginn der Perfusion erneut entlüftet werden. Dafür wurde der Dreiwegehahn so gestellt, dass der Fluss über den Entlüftungsschlauch verlief (Position 1). Anschließend konnte mit der Perfusion begonnen, bei der das Medium ausschließlich durch das Nierenparenchym floss (Position 2). Im Rahmen des Medienwechsels wurde der Fluss über die Arthroskopiepumpe unterbrochen (Position 3).

Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit wurde der Dreiwegehahn um 45° gedreht und die Arthroskopiepumpe abgeschaltet, um eine sichere Beendigung der Perfusion gewährleistet. Nach Entnahme der Rattenniere aus dem Miniinkubator wurden Venenverweilkatheter sowie chirurgische Fäden inklusiver jeglicher Fadenreste vorsichtig entfernt, um eine Behinderung des späteren Schneideprozesses zu vermeiden. Anschließend wurde das Organ in ein mit 4% PFA befüllten 50ml Falcon überführt und so für 24-48 Stunden belassen, ehe mit der histologischen Aufbereitung begonnen wurde.

3.2.6 Histologische Aufarbeitung

3.2.6.1 Fixierung und Einbettung

Nach einer 24-48-stündiger Fixierung in vierprozentigem FPA erfolgten die Dehydrierung und die Einbettung in Paraffin. Dies geschah mit freundlicher Unterstützung im Institut für vergleichende experimentelle Pathologie (Klinikum rechts der Isar München, Leitung Dr. med. vet. Katja Steiger). Vorab wurde das rezellularisierte Organ entsprechend der anatomischen Frontalebene halbiert und die Präparate einzeln in Einbettkassetten platziert. Anschließend wurden diese automatisiert mit einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert, in Xylol getränkt und in geschmolzenem Paraffin eingebettet. Nach Aushärtung des Paraffins erfolgte die Herstellung histologischer Schnitte

3.2.6.2 Herstellung histologischer Schnitte

Die histologischen Schnitte wurden an einem Paraffinmikrotom angefertigt. Dazu wurden die Paraffinblöcke vorab für etwa fünf Stunden bei -20°C gelagert, da dies ein Aufrollen der angefertigten Schnitte und deren Festkleben am Mikrotom verhinderte und den Schneidprozess somit erleichterte. Zu Beginn wurde überschüssiges Paraffin mit dem Mikrotom entfernt, bis die Peripherie des Nierenparenchyms erreicht wurde. Anschließend wurde Schnitte von $5\mu\text{m}$ Dicke gemäß der anatomischen Frontalebene angefertigt (vgl. Abbildung 2A). Nach Überführung in ein mit 40°C warmen Wasser gefülltes Streckbad wurden die Schnitte schließlich mit einem adhäsiven Objektträger aufgefangen und für 30 Minuten bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Daraufhin wurden sie horizontal in einer Glasküvette platziert und überschüssiges Paraffin im Trockenofen bei 62°C für acht Stunden geschmolzen, ehe sie bis zur weiteren Verwendung bei Raumtemperatur gelagert wurden.

3.2.6.3 Deparaffinierung und Rehydrierung

Für alle Färbemethoden wurde eine Deparaffinierung und Rehydrierung der in Paraffin eingebetteten Schnitte nach dem in Tabelle 6 dargestellten Protokoll durchgeführt. Zum Entwachsen der histologischen Schnitte wurde hierbei Roticlear® verwendet. Nach der anschließenden absteigenden Alkoholreihe wurden die histologischen Schnitte in destilliertem Wasser gewaschen und abhängig von der jeweiligen Färbemethode weiterverwendet.

Tabelle 6: Deparaffinierung und Rehydrierung.

Substanz	Dauer
Roticlear® 1	10 Minuten
Roticlear® 2	10 Minuten
Ethanol 100%	3 Minuten
Ethanol 100%	3 Minuten
Ethanol 96%	3 Minuten
Ethanol 96%	3 Minuten
Ethanol 70%	3 Minuten
Ethanol 70%	3 Minuten
dH ₂ O 1	5 Minuten
dH ₂ O 2	5 Minuten

3.2.7 Histologische Färbemethoden

3.2.7.1 H.&E.-Färbung

Nach der Deparaffinierung und Rehydrierung der Schnitte wurde eine H&E-Färbung als Übersichtsfärbung aus verschiedenen Schnittebenen der Präparate zur qualitativen und semiquantitativen Evaluation durchgeführt. Das Färbeprotokoll, wird in Tabelle 7 dargestellt. Als Eindeckmedium wurde Eukitt® verwendet.

Tabelle 7: Arbeitsschritte im Rahmen der H&E Färbung.

Substanz	Dauer
Hämalaun	5 Minuten
Leitungswasser	10 Minuten
Eosin	2 Minuten
dH ₂ O	1 Minuten
Ethanol 70%	einige Sekunden
Ethanol 96%	10 Sekunden
Ethanol 100%	2 Minuten
Ethanol 100%	2 Minuten
Roticlear®	5 Minuten
Roticlear®	5 Minuten

3.2.7.2 Immunochemie

Immunochemische Färbemethoden dienen der selektiven Darstellung von bestimmten Antigenen, indem sie durch für sie spezifische Antikörper detektiert werden. Diese Antikörper können sowohl mono-als auch polyklonal sein und werden aus verschiedenen Tierspezies wie z.B. Mäusen oder Kaninchen gewonnen. Neben der direkten Methode existiert auch die im Rahmen dieser Arbeit angewandte indirekte Methode, die in ihrer Durchführung zwar aufwendiger, im Ergebnis jedoch sensitiver ist (Chen et al. 2010). Ein antigenspezifischer primärer Antikörper bindet hierbei zu Beginn an das Epitop des gesuchten Proteins. Anschließend bindet ein an Biotin konjugierter (=biotylinierter), sekundärer Antikörper aus derselben Spezies unspezifisch an den Erstantikörper. Danach erfolgt die Zugabe des Avidin-Biotin-Komplexes (=ABC), in dem ein biotylinierte Horseradish Peroxidase (HRP) enthalten ist. Als Chromogen wird anschließend 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) verwendet, das in Anwesenheit der HRP in eine rote Farbe umschlägt und die Anwesenheit des gesuchten Proteins nachweist. Als Voraussetzung dieser sogenannten ABC-Methode ist eine sehr hohe Affinität zwischen den beiden Proteinen Avidin und Biotin, damit es nach Zugabe des ABC-Komplex auf den Zweiantikörper zu einer engen Bindung zwischen dem Biotin des Zweitantikörpers zum Avidin des ABC-Komplexes kommt.

3.2.7.2.1 *Fixierung der Kammerobjektträger*

Zu immunzytochemischen Färbungen wurden die vorab angefertigten Kammerobjektträger verwendet (Abschnitt 4.2.1.4). Nach Lagerung bei -20°C, wurden diese für 15 Minuten bei Raumtemperatur luftgetrocknet und anschließend für 15 Minuten mit Methanol/Aceton in einem 1:1 Verhältnis oder vierprozentigem PFA fixiert. Nach erneutem Lufttrocknen erfolgte die Rehydrierung in 1xPBS für zehn Minuten.

3.2.7.2.2 *Antigendemaskierung der FFPE-Schnitte*

Nach Deparaffinierung und Rehydrierung (Abschnitt 4.2.6.3) erfolgte eine hitzeinduzierte Epitopendemaskierung der FFPE-Schnitte. Hierfür wurden die Objektträger in einer Plastikkuvette platziert, diese mit 10mM Natrium-Citrat-Puffer (pH 6,0) gefüllt und mit einem Deckel verschlossen. Die Kuvette wurde daraufhin in ein mit Wasser gefülltes Glasbehältnis gestellt und so in einer häuslichen Mikrowelle platziert. Dort werden die Schnitte anschließend bei 850W, 600W und 450W für jeweils fünf Minuten erhitzt. Es wurde darauf geachtet, dass die Schnitte jederzeit vollständig mit Citrat-Puffer bedeckt waren, um eine Beschädigung der Schnitte durch Austrocknen zu verhindern. Falls erforderlich wurde der Vorgang pausiert und

Citrat-Puffer in die Küvette nachgefüllt. Nach einer Abkühlphase bei Raumtemperatur wurden die Objektträger in 1xPBS transferiert.

3.2.7.2.3 Immunochemisches Färbeprotokoll

Nach Fixierung der Kammerobjektträger beziehungsweise Antigendemaskierung der FFPE-Schnitte erfolgte die eigentliche immunochemische Färbung. Alle nachfolgenden Arbeitsschritte wurden in einer befeuchteten Kammer durchgeführt. Zu Beginn wurden die einzelnen Areale der Kammerobjektträger oder die Schnittpräparate mit einem Fettstift umrandet, mit serumfreien Protein-Block bedeckt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die primären Antikörper in einem Antikörper-Verdünnungsmedium auf die gewünschte Endkonzentration verdünnt. Anschließend wurde der Protein-Block vorsichtig abgekippt und der primäre Antikörper appliziert. Eine Liste der verwendeten primären Antikörper findet sich in Tabelle 8.

Tabelle 8: Primäre Antikörper der Immunochemie mit Verdünnung und Inkubationszeit sowie Herstellerangaben.

Primärer Antikörper	Hersteller	Verdünnung	Inkubationszeit/Temperatur
CD-31 (PECAM-1)	Dako	1:50	18 Stunden/4°C
vWF		1:50	18 Stunden/4°C
PCNA		1:500	18 Stunden/4°C
Laminin		1:500	2 Stunden/Raumtemperatur
Fibronectin		1:500	2 Stunden/Raumtemperatur
Kollagen IV		1:25	30 Minuten/Raumtemperatur
β1-Integrin	Millipore	1:200	18 Stunden/4°C
α4-Integrin	Sigma	1:75	18 Stunden/4°C

Nach der für den jeweiligen Antikörper notwendigen Inkubationszeit wurden die Objektträger dreimal für jeweils fünf Minuten in 1xPBS gewaschen und daraufhin ein Zweitantikörper aus derselben Spezies in einer Endkonzentration von 1:200 in 10xPBS aufgetragen (Tabelle 9).

Tabelle 9: Sekundäre Antikörper der Immunochemie mit Verdünnung, Inkubationszeit sowie Herstellerangaben.

Sekundärer Antikörper	Hersteller	Verdünnung	Inkubationszeit/Temperatur
Kaninchen biotinyliert	Vector	1:200	30 Minuten/Raumtemperatur
Maus biotinyliert	Laboratories	1:200	30 Minuten/Raumtemperatur

Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit bei RT wurden die Objektträger erneut dreimal in 1xPBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Applikation von VECTASTAIN® Elite® ABC

HRP Kit (Peroxidase, Standard) und, nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei RT, ein erneutes dreimaliges Waschen in 1xPBS für je fünf Minuten. Es erfolgte nun die Zugabe von kaltem AEC, das unter mikroskopischer Kontrolle für maximal 30 Minuten belassen wurde. Nach anschließendem dreimaligem Waschen in 1xPBS wurden die Zellkerne mit Hämalaun gegengefärbt (fünf Minuten Hämalaun, zehn Minuten fließendes Leitungswasser), die Objektträger mit Kaisers Glyceringelatine bedeckt und mit Deckgläschen versiegelt. Die Negativkontrolle erfolgte über die Verwendung der entsprechenden Isotypen.

3.2.7.3 Nick-In-Situ-Translation

Die Methode der Nick-In-Situ-Translation dient der Darstellung von DNA-Doppelstrangbrüchen und wurde verwendet, um apoptotische Zellen sichtbar zu machen. Grundsätzlich werden hierbei Strangbrüche durch die Zugabe einer Polymerase mit markierten Nukleotiden aufgefüllt, die anschließend visualisiert werden. Nach erstmaliger Entdeckung der Methode im Jahre 1977 (Rigby et al. 1977) wurde im Folgenden ein adaptiertes Protokoll nach Gold et al. (1993) verwendet. Die FFPE-Schnitte wurden wie unter Abschnitt 3.2.6.3 deparaffiniert, rehydriert und in eine mit destilliertem Wasser gefüllten Küvette gestellt. Anschließend erfolgte die Applikation und Inkubation von Proteinase K in einer Verdünnung von 1:1000 in destilliertem Wasser für exakt 20 Minuten bei Raumtemperatur. Nach 5 Minuten in destilliertem Wasser erfolgte die Zugabe von dreiprozentigem H₂O₂ mit einer Inkubationszeit von 18-20 Minuten bei Raumtemperatur. Danach wurden die Schnitte in destilliertem Wasser gewaschen und 1xNick-Puffer (100µl/Schnitt) hinzugegeben. Nach zehn Minuten bei Raumtemperatur wurde dieser abgekippt, die Schnitte mit einem Glasplättchen bedeckt und anschließend in einem Wärmeschrank bei 37°C platziert. Nach einer Inkubationszeit von 75 Minuten wurde die Reaktion durch die Applikation des Terminationspuffer für 15 Minuten bei Raumtemperatur gestoppt. Daraufhin wurden die Objektträger in 1xPBS gewaschen, 10 Minuten mit FCS (1% in PBS) inkubiert und erneut in 1xPBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation in ExtrAvidin®-Peroxidase (1:50 Konzentration im Verdünnungspuffer) für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Nach Waschen in 1xPBS erfolgte die Applikation von AEC (max. fünf Minuten) und nach erneutem Waschen die Gegenfärbung mit Hämalaun (fünf Minuten Hämalaun, zehn Minuten fließendes Leitungswasser) und anschließendes Versiegeln mit Kaisers Glyceringelatine. Eine Darstellung der verschiedenen Substrate und der Herstellung der Puffer findet sich in Tabelle 10.

Tabelle 10: Agenzien und Rezeptur der einzelnen Lösungen für die Nick-In-Situ-Translation.

Die Mengenangaben sind absolut oder bei den mit *-markierten Angaben als Menge/Schnitt bezeichnet.

Puffer	Substrat	Menge, *Menge/Schnitt
10xNick-Puffer	TRIS 1M	1000µl
	MgCl 1M	100µl
	β-Mercaptoethanol 13M	15µl
	BSA 20mg/ml	10µl
	destilliertes Wasser	875µl
1xNick-Puffer	10xNick-Puffer	1ml
	destilliertes Wasser	9ml
Nick-Translations-Mastermix 40µl/Schnitt	10xNick-Puffer	4µl*
	destilliertes Wasser	29,6µl*
	Biotin-7-dATP	2µl*
	dGTP	0,8µl*
	dCTP	0,8µl*
	dTTP	0,8µl*
	Klenow-Fragment 2U/µl	2µl*
Klenow-Fragment 2U/µl	Klenow-Fragment 10U/µl	10µl
	Klenow-Puffer	40µl
Terminationspuffer	NaCl	8,8g
	NaCitrat	4,4g
	destilliertes Wasser	500ml
Verdünnungspuffer für ExtrAvidin®-Peroxidase	Bovines Serumalbumin	500mg
	Tween20	250µl
	PBS 0,05M	50ml

3.2.8 Semiquantitative Evaluierung

Eine semiquantitative Analyse erfolgte über eine Zählung der im Gewebe verbliebenen Endothelzellen. Dafür wurden histologische H.&E.-Schnitte von jedem rezellularisierten Organ verwendet und die darin verbliebenen Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt. Insgesamt wurden dabei wie in Abbildung 13 dargestellt aus drei verschiedenen Schnittebenen 20 zufällig ausgewählte Bereiche in einer 200-fachen Vergrößerung betrachtet.

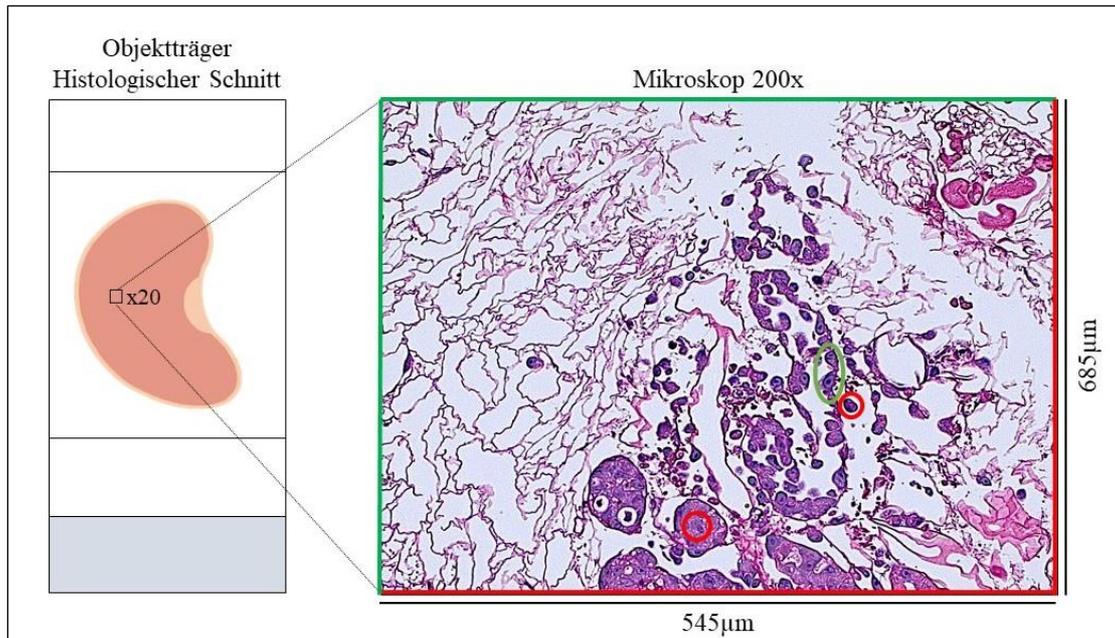


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Zählung von im Parenchym verbliebenen Endothelzellen. Von mindestens drei histologischen Schnitten auf Objektträgern wurden 20 Bereiche (x20) in 200facher Vergrößerung (200x) betrachtet. Vom Bild werden die obere und die linke Grenzlinie mit in die Zählung einbezogen (grüne Linien), die recht und untere Grenzlinie dagegen nicht (rote Linie). Nur an der Gefäßwand adhärente Zellen werden gezählt (grüner Kreis), sich frei im Lumen befindende Zellen jedoch nicht (roter Kreis).

Um eine vergleichbare Auswertung zu erhalten, wurden dabei nur Zellen mit in die Zählung einbezogen, die adhärent zur extrazellulären Matrix waren (Abb. 13, grüner Kreis). Ausgenommen von der Zählung waren Zellen, die sich entweder frei im Gefäßlumen befanden oder lediglich an eine andere verbliebene Zelle gebunden waren (Abb. 13, rote Kreise). Ähnlich wie bei einem Hämozytometer wurden die äußeren Grenzen der Aufnahme definiert. Dabei wurden Zellen, die auf dem oberen oder linken Bildrand lagen, in die Zählung inkludiert, jene, die auf dem unteren oder rechten Bildrand lagen, wurden von der Zählung ausgeschlossen. Zum Vergleich der Rezellularisierungsprotokoll wurden die gezählten Zellen (=absolute Zellzahl) in Relation zu einer Million infundierter Zellen gesetzt und so die relative Zellzahl berechnet.

4 ERGEBNISSE

4.1 ZELLKULTUR

4.1.1 Morphologie

Isolierte Endothelzellen vom Typ EA.h926 der Firma ATCC® wurden in gefrorenem Zustand bezogen, aufgetaut und die Zellkultur übertragen. Lichtmikroskopisch zeigten sich nach 24-stündiger Kultivierung wie in Abbildung 14 dargestellt vitale und polygonale Zellen mit länglichen zytoplasmatischen Ausläufern und einem prominenten Zellkern. Als Kulturmedium wurde für den Zelltyp EA.hy926 empfohlenes DMEM 30-2002™ der Firma ATCC® mit FBS in einer Endkonzentration von 10% sowie antimikrobiellem Primocin™ in einer Endkonzentration von 100µg/ml verwendet. Über den gesamten Zeitraum der Zellkultur kam es zu keinen mikrobiellen Komplikationen.

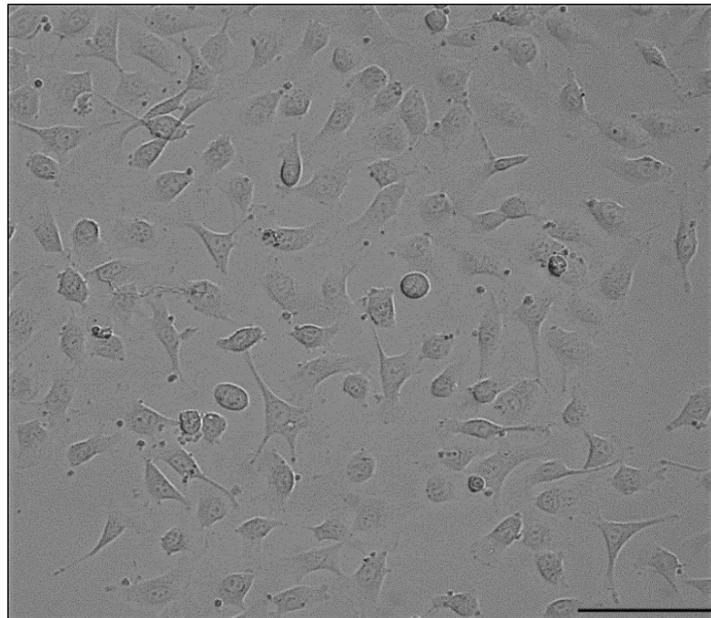


Abbildung 14: Lichtmikroskopisches Bild des Endothelzelltyps EA.hy926 nach 24-stündiger Kultivierung. Es zeigten sich polygonale Zellen mit länglichen Zytoplasmaausläufern; 200fache Vergrößerung, Maßstabsbalken = 100 µm.

4.1.2 Zellwachstum

Das proliferative Verhalten des Zelltyps EA.hy926 in der Zellkultur wurde ermittelt, indem die Population doubling time kontinuierlich anhand der in Abschnitt 3.2.1.2 dargestellten mathematischen Formel berechnet wurde. Eine graphische Darstellung der PDT in

Abhängigkeit von der Passage ist in Abbildung 15 dargestellt. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zellen zeigten nach Auftauen und Überführung in die Zellkultur eine langsame Anpassung an die Kulturbedingung mit einer Verdopplungszeit von 45,2 Stunden in der ersten Passage. Anschließend wurde eine rasche Adaption mit einer PDT von 31,5 Stunden in der dritten Passage beobachtet. In der sechsten Passage betrug sie 25,7 Stunden und veränderte sich in der siebten Passage mit 24,5 Stunden nur gering, sodass sich die PDT in diesem Zeitraum auf ungefähr einen Tag einpendelte.

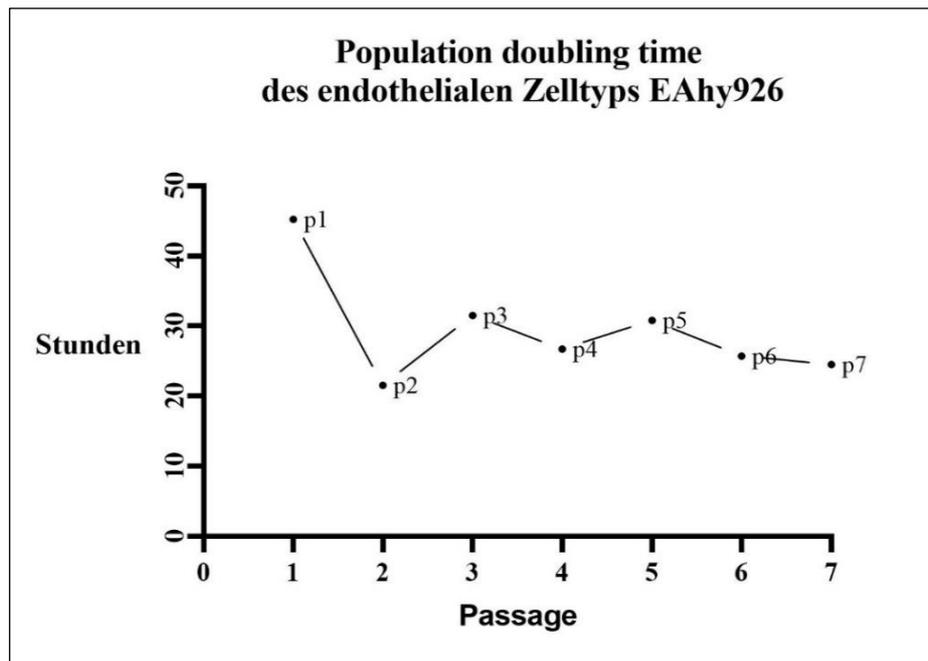


Abbildung 15: Population doubling time des endothelialen Zelltyps EA.hy 926. Nach einer langsamen Adaption und einem unregelmäßigen Zellzyklus zu Beginn der Zellkultur (p1, p2, p3) zeigte sich in der fünften, sechsten und siebten Passage ein gleichmäßiges Bild mit einer Verdopplungszeit von ungefähr einem Tag.

4.1.3 Immunozytochemie

Immunozytochemische Färbungen des Zelltyps EA.hy926 wurden nach fünftägiger Kultivierung der Zellen auf Kammerobjektträgern durchgeführt und sind in Abbildung 16 dargestellt.

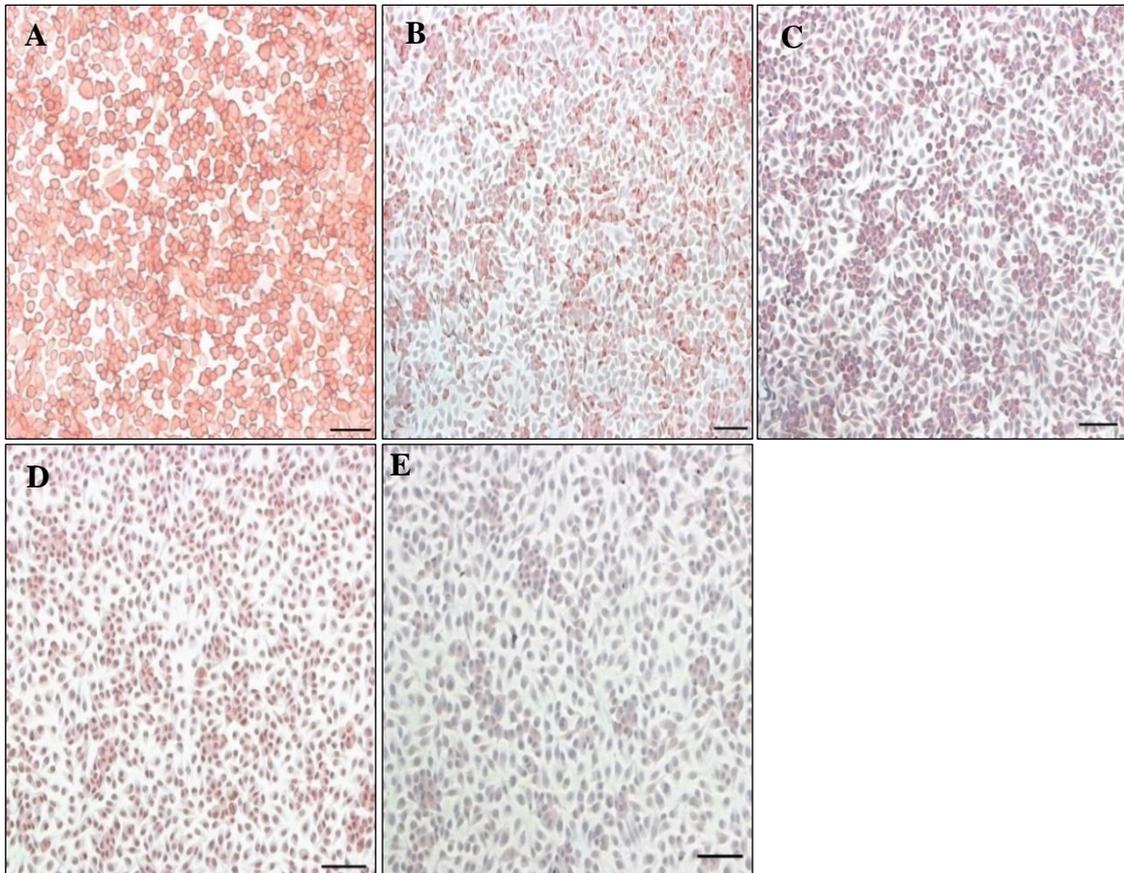


Abbildung 16: Immunozytochemische Färbung des Endothelzelltyps EA.hy926 auf Kammerobjektträgern. Es zeigt sich eine deutliche Positivität für CD-31 (A), für den vWF (B) und PCNA (C), β 1-Integrin (D) und α 4-Integrin (E). 100fache Vergrößerung, Maßstabsbalken = 100 μ m.

Es zeigte sich eine deutliche Positivität für CD-31 (PECAM-1) als klassischer und etablierter endothelialer Marker (Abb. 16A). Des Weiteren wurde ebenfalls eine für Endothelzellen typische Positivität für den von-Willebrand-Faktor beobachtet (Abb. 16B). Das Färbeverhalten variierte im Falle des vWF allerdings in Abhängigkeit vom vorangegangenen Fixierungsprozess. So wurde eine positive Färbung nur nach vorangegangener Fixierung mit Methanol/Aceton, nicht aber mit PFA dargestellt. Dazu zeigten die Zellen auf den Kammerobjektträgern als Ausdruck für die passenden Kulturbedingungen eine deutliche Positivität für das Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen (Abb. 16C) und für die Darstellung

wichtiger zellulärer Adhäsionsproteine wie das β 1-Integrin (Abb. 16D) und α 4-Integrin (Abb. 16E). Die jeweiligen Isotypenkontrollen stellten sich negativ dar.

4.2 ADHÄSIVES VERHALTEN IM ANGIOGENESE ASSAY

Zur Evaluierung der adhäsiven Eigenschaften des Zelltyps EA.hy926 wurden ein Angiogenese Assay durchgeführt. Dafür wurden 2×10^4 Endothelzellen auf eine Hydrogel gesät, das sich aus Proteinen der Extrazellulärmatrix zusammensetzte und ihr Verhalten nach vier, zehn oder 18 Stunden beobachtet. Um die Handhabung mit der Extrazellulär-Matrix-Lösung sicher anzuwenden, wurden zwei Vorversuche durchgeführt, deren Ergebnisse nicht dargestellt sind. Alle verwendeten Materialien wurden zu Beginn auf Eis gelagert, um ein verfrühtes Aushärten des Hydrogeles und damit verbundene Probleme beim Pipettiervorgang zu verhindern. Repräsentative mikroskopische Bilder sind in Abbildung 17 dargestellt.

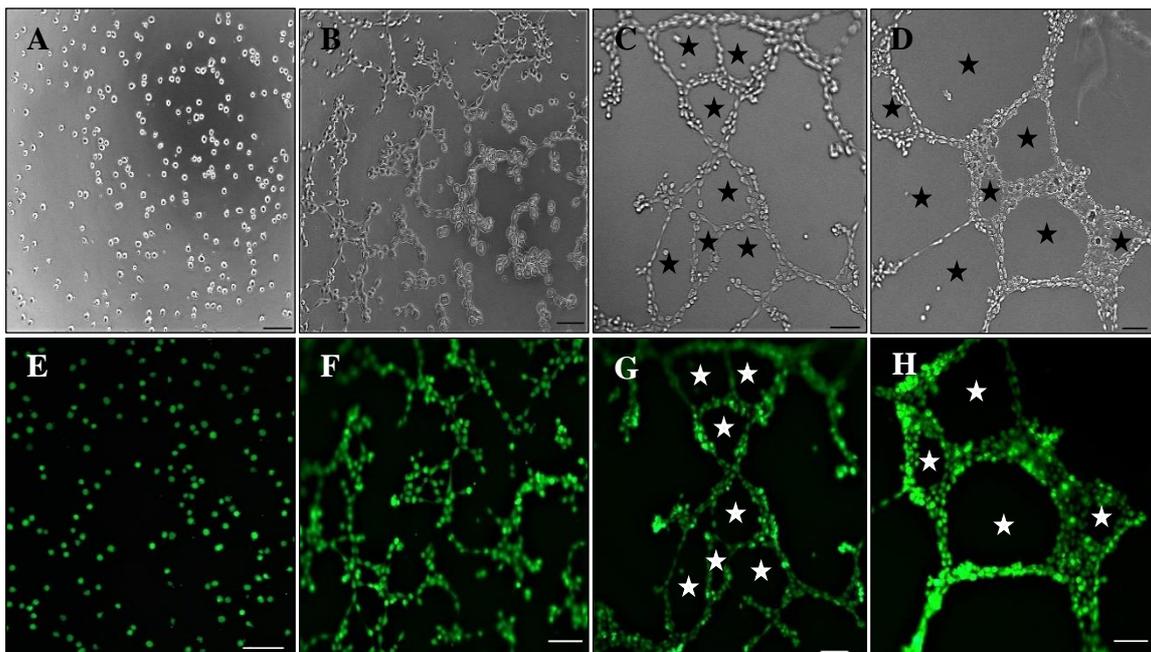


Abbildung 17: Mikroskopische Darstellung des in-vitro Angiogenese Assays in 100facher Vergrößerung. A-D: nativ, E-H: Fluoreszenzfarbstoff mit Alexa Fluor 488. Unmittelbar nach Pipettieren von 2×10^4 Endothelzellen auf die Extrazellulär-Matrix-Lösung ($t=0$ min) zeigten sich diese rundlich konfiguriert (A+B). Nach vier Stunden zeigte sich eine beginnende Konfluenz der Zelle mit der Ausbildung länglicher Zytoplasmata (B+F). Nach 10 Stunden waren bereits tubuläre Strukturen (Sterne) zu erkennen (C+G), die nach 18 Stunden geschlossen und dicht erschienen (D+H). Maßstabsbalken = 100 μ m.

Während sich die Zellen unmittelbar nach Aussaat auf die Extrazellulär-Matrix-Lösung unverändert darstellten (Abb. 17A+E), konnte Bereits nach vier Stunden beobachtet werden, dass die Zellen adhäsionsbedingt auf die Extrazellulär-Matrix-Lösung reagierten. Es zeigte sich

eine deutliche Konfluenz der Zellen mit Ausbildung interzellulären Kontakten, die durch längliche Verformung des Zytoplasmas ermöglicht wurden (Abb. 17B+F). Nach zehn Stunden ließ sich eine deutliche Zunahme dieser Veränderungen erkennen, die sich in ihrer Summe als tubuläre Strukturen darstellten, allerdings noch blind endende Ausläufer besaßen (Abb. 17C+G). Nach 18 Stunden zeigte sich schließlich ein dichtes Netzwerk von gefäßartigen Strukturen, die von einer dicken Zellschicht umgeben wurden und in sich geschlossen waren (Abb. 17D+H). Die Negativkontrolle ohne Extra-Zellulärmatrix-Lösung erbrachte weder Veränderungen in der Zellmorphologie noch zeigten sich die Ausbildung von tubulären Strukturen (nicht dargestellt).

4.3 DEZELLULARISIERUNG

4.3.1 Vorbereitende Maßnahmen

Zu den notwendigen vorbereitenden Maßnahmen gehörten unter anderem die Präparation der Rattenniere sowie das Anbringen und Fixieren des Venenverweilkatheters. Aus technischer Sicht war dies insgesamt gut zu bewältigen, sodass das Auftreten von Parenchymverletzungen oder anderer etwaigen Schädigungen des Präparates bis auf wenige Ausnahmen reduziert werden konnte.

Des Weiteren musste die Dezellularisierungseinheit montiert, das gewünschte Protokoll ausgewählt und das gesamte Schlauchsystem entlüftet werden. Auch dieser Arbeitsschritt konnte aus technischer Perspektive problemlos absolviert werden. Hervorzuheben ist, dass das Schlauchsystem nach manueller Entlüftung dank suffizienter Abdichtungen durchgehend luftfrei blieb und etwaige dadurch entstehende Parenchymschäden vermieden werden konnten.

4.3.2 Dezellularisierungsprozess

Mit dem Ziel, ein azelluläres Scaffold zu generieren, wurde eine perfusionsbasierte Dezellularisierung der präparierten Rattenniere durchgeführt (vgl. Abschnitt 2.3.3). Hierbei gelangten verschiedene Spüllösungen unter der Verwendung einer Arthroskopiepumpe druckkontrolliert in das Gefäßbett des Nierenparenchym. Neben destilliertem Wasser wurden unter anderem SDS-Lösungen (verdünnt in destilliertem Wasser) in zwei verschiedenen Konzentrationen, 3% oder 0,66% verwendet. Zu Beginn wurde die präparierte Rattenniere an die automatisierte Dezellularisierungseinheit DecellControl angeschlossen und das Protokoll manuell gestartet. Anschließend regulierte die Computersoftware die Offenheit der

elektromagnetischen Ventile und steuerte somit, welche der verschiedenen Spüllösungen in das Organ gelang. Ein zeitlicher Verlauf der Dezellularisierung ist in Abbildung 18 dargestellt.

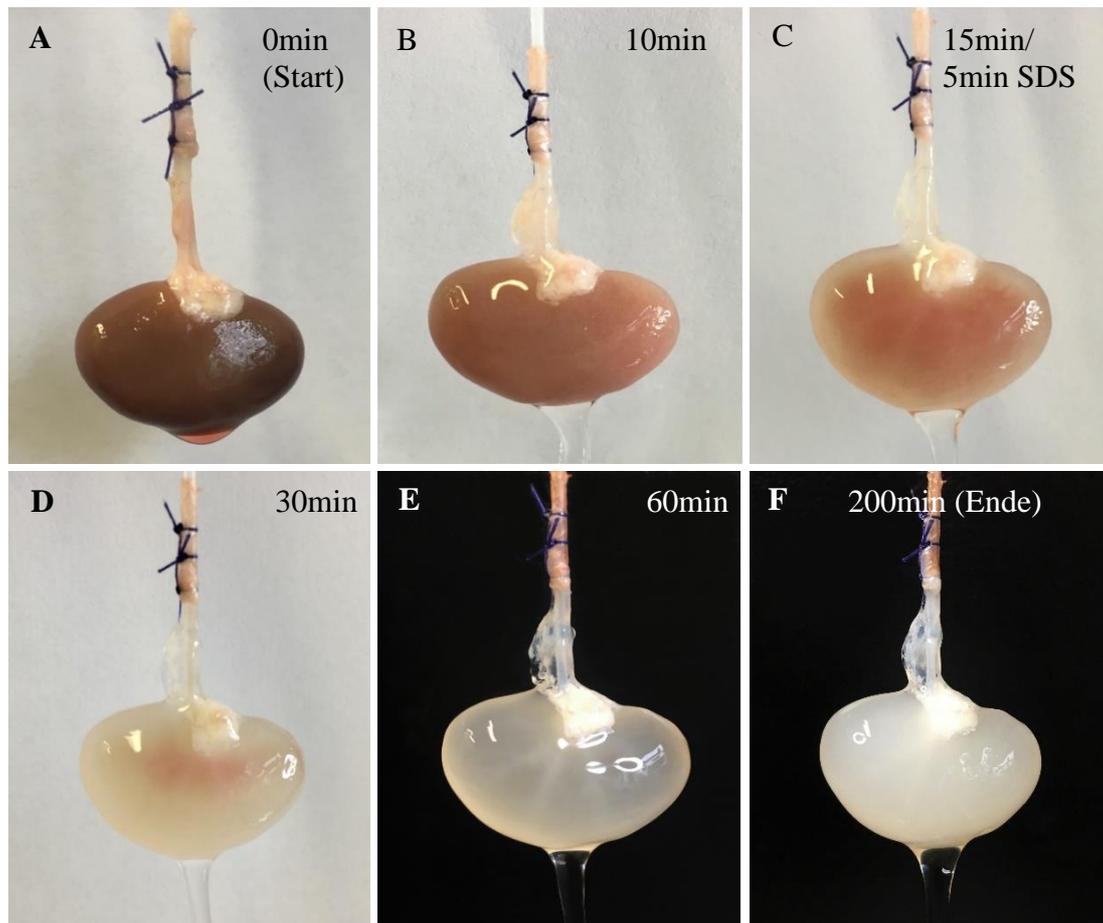


Abbildung 18: Darstellung der Dezellularisierung und Einwirkung der Spüllösungen auf das Nierenparenchym im zeitlichen Verlauf. Zu Beginn dunkelrotes Parenchym (A), Ablassen durch destilliertes Wasser (B) und SDS (C=15min gesamt, davon 5min SDS & D =30min gesamt, davon 20min SDS). Zur Verbesserung des optischen Kontrastes wurde zum Ende ein schwarzer Hintergrund gewählt. Nach 60 Minuten durchsichtiges Parenchym mit radiären Gefäßen (E). Nach Abschluss des Protokolls erschien das Parenchym fast milchig (F).

Während das Parenchym zu Beginn dunkelrot war (Abb. 18A), ließ sich schon wenige Minuten nach Beginn des Dezellularisierungsprotokolles allein durch das durchlaufende destillierte Wasser ein Ablassen des Parenchyms erkennen (Abb. 18B). Von der Computersoftware gesteuert öffnete sich nach zehn Minuten automatisch das Ventil für SDS, während sich das Ventil für destilliertes Wasser schloss. Auch hier dauerte es nur wenige Minuten, bis die Wirkung des SDS erkennbar wurde und sich eine periphere Ablassung verdeutlichte (Abb. 18C). Diese sichelförmige Aufhellung des Parenchyms schritt anschließend zügig in Richtung des Hilus vor und hinterließ nach 30 Minuten lediglich einen kleinen, hellroten Saum im Zentrum des Organs (Abb. 18D). Auch dieser wurde im nächsten Zyklus komplett ausgewaschen, sodass die Niere anschließend farblos und nahezu durchsichtig erschien, sich

radiäre verlaufende Gefäße erkennen ließen und makroskopisch keine Verletzung bzw. Undichtigkeiten zu sehen waren (Abb. 18E). Die Entfernung des Zellmaterials war Beginn der Perfusion von Penicillin/Streptomycin bereits abgeschlossen. Dieser Schritt diente zum Ende des Protokolls lediglich dafür, ein keimfreies Organ zu hinterlassen. Das Parenchym trübte durch die Einwirkung der Penicillin-Streptomycin-Lösung zunächst etwas ein und erschien am Ende fast milchig (Abb. 18F).

4.3.3 Histologische Darstellung einer azellulären Rattenniere

Zur Evaluierung der Dezellularisierung wurden anschließend histologische Färbungen von Schnittpräparaten einer azellulären Rattenniere angefertigt. Diese sind in Abbildung 19 dargestellt.

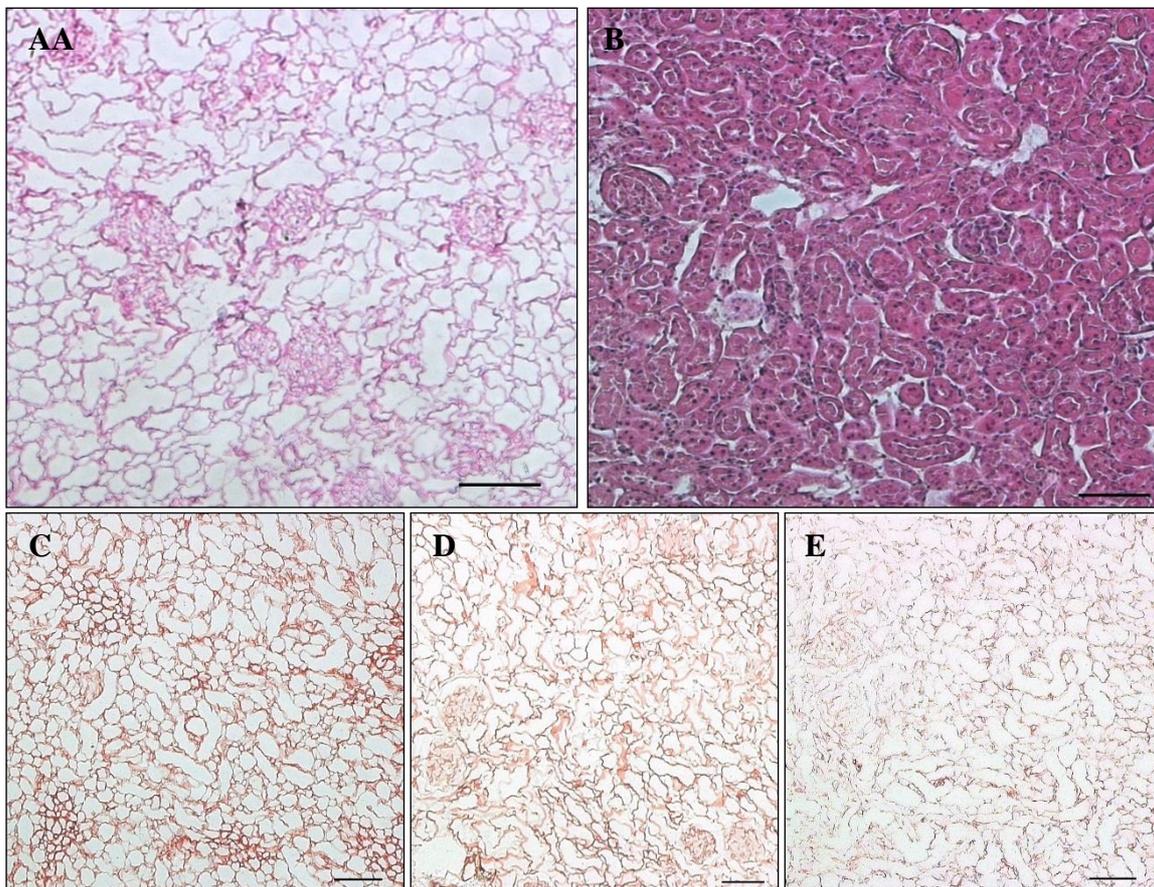


Abbildung 19: Histologische Darstellung der Rattenniere nach Durchführung der Dezellularisierung und Schnitt einer nicht-dezellularisierte Niere (B) zum Vergleich. In der H.&E.-Färbung (A) zeigt sich ein physiologisch organisiertes Parenchym ohne sichtbare Verletzungen. In der immunohistochemischen Darstellungen sieht man einen Erhalt von Fibronectin (C), Laminin (D) sowie Kollagen IV (E). 100fache Vergrößerung, Maßstabsbalken = 100µm.

Auch mikroskopisch wurde das Parenchym durch die einwirkenden Druckverhältnisse nicht zerstört oder beschädigt. Es präsentierte sich weiterhin eine physiologisch organisierte Matrix mit gut abgrenzbaren Nierenkörperchen und einem weiten Gerüst aus Basalmembranen und Extrazellulärmatrix. In der H.&E.-Färbung ließen sich keine zurückgebliebenen zellulären Bestandteile nachweisen (Abb. 19A). Dies wird insbesondere im Vergleich zu einem H.&E.-Schnitt einer nativen Rattenniere deutlich (Abb. 19B). Gleichzeitig konnte der Erhalt wichtiger Proteine der Extrazellulärmatrix wie Fibronectin (Abb. 19C), Laminin (Abb. 19D) und Kollagen IV (Abb. 19E) durch positive immunhistochemische Färbungen gezeigt werden.

4.4 REZELLULARISIERUNG

4.4.1 Aufbau des Miniinkubator

Für die Rezellularisierung der azellulären Rattenniere war es notwendig den dafür verwendeten Miniinkubator vorab aus den autoklavierten Einzelteilen zu montieren. Anschließend erfolgte eine probatorische Perfusion mit reinem Kulturmedium und ohne angehängtes Organ, um Flüssigkeitsaustritt an den artikulieren Teilen zu erkennen. Im Falle von Undichtigkeiten wurden die Verschraubungen so lange entsprechend nachjustiert, bis der Flüssigkeitsaustritt sistierte.

4.4.2 Zelleinsaat und dynamische Kultur

Nach Zusammenbau des Miniinkubators konnte die Zelleinsaat erfolgen. Diese wurde unter der Verwendung zweier 5ml-Spritzen mit Luer-Lock durchgeführt, die über den Venenverweilkatheter an das dezellularisierte Organe adaptiert werden konnten. Der erste Schritt im Rahmen der Zelleinsaat war, Residuen von Spüllösungen der Dezellularisierung aus dem Gefäßbett zu entfernen. Dafür wurden 5ml reines Kulturmedium mit einer der beiden Spritzen aufgezogen und anschließend vorsichtig in den Venenverweilkatheter injiziert. Sofort kam es zu einer, durch das Kulturmedium bedingten, rötlichen Verfärbung des Parenchyms, die sich wiederum von zentral nach peripher ausbreitete. Gleichzeitig war zu beobachten, dass ein Großteil der applizierten Flüssigkeit die Niere gemäß der natürlich Flussrichtung wieder verließ und von dieser abtropfte. Die Menge der aus dem Organ austretenden Flüssigkeit hing dabei vor allem von der Injektionsgeschwindigkeit ab. Anschließend daran erfolgte die Injektion der Zellsuspension, die sich aus 2ml Kulturmedium und einer vom Rezellularisierungsprotokoll abhängigen Zellzahl von Endothelzellen des Typs EA.hy926 zwischen der fünften und siebten Passage zusammensetzte. Die Flussgeschwindigkeit im

Rahmen der Zelleinsaat betrug 1ml/min. Auch ein Großteil der trüben Zellsuspension verließ das Organ nach dessen Passage und tropfte von diesem ab, wurde hierbei jedoch in einer sterilen Petrischale aufgefangen, erneut in die Spritze aspiriert und reappliziert. Dieser Vorgang wurde zweimalig wiederholt. Nach der insgesamt dritten und letzten Injektion konnte beobachtet werden, dass die Trübung der Zellsuspension im Vergleich zum Beginn des Prozesses abgenommen hatte. Dies wurde als Anzeichen dafür gewertet, dass ein wesentlicher Teil der injizierten Zellen im Nierenparenchym verblieb und war insbesondere nach einer Dezellularisierung mit 0,66% SDS zu beobachten. Anschließend erfolgte der Anschluss an den Bioreaktor und die Adhäsionszeit, die einer rein statischen Kultur entsprach. Nach der jeweiligen Adhäsionszeit (siehe Abschnitt 4.4.3 und 4.4.4) folgte der Beginn der Perfusion, die bis zum ersten Medienwechsel so belassen wurde. Nach Ablauf der jeweiligen Perfusionszeit waren die Organe weiterhin von weicher Konsistenz und rötlicher Farbe ohne makroskopisch sichtbaren Parenchymverletzungen. Eine Darstellung während der dynamischen Rezellularisierung zeigt Abbildung 20.

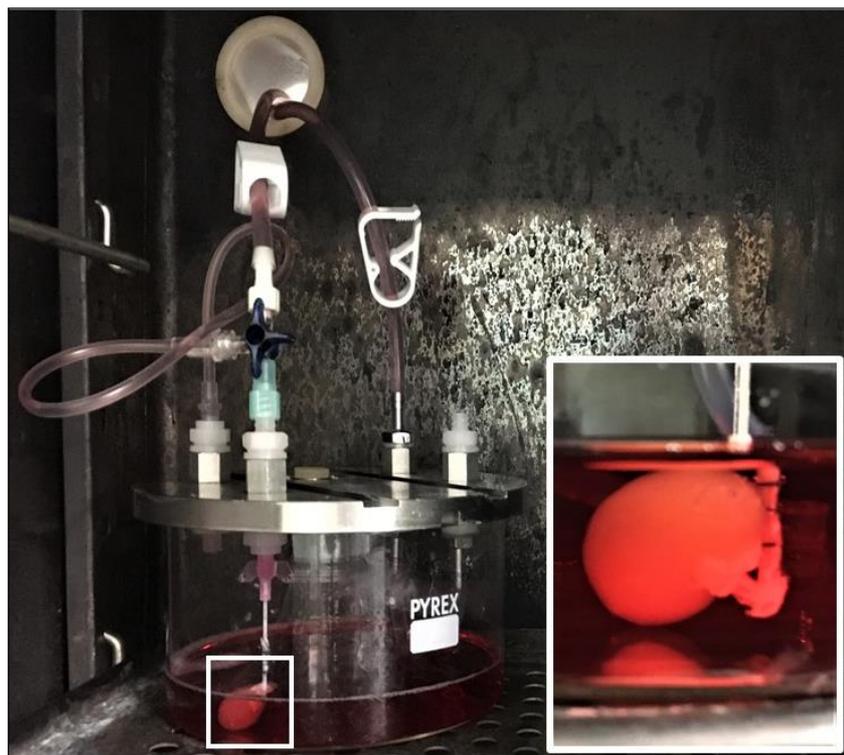


Abbildung 20: Fotografische Aufnahme während der Rezellularisierung. Der Miniinkubator befindet sich im Brutschrank, zu- und abführende Schläuche verlassen diesen durch ein kleines Loch (links oben). Über dem Deckel des Miniinkubators ist zusätzlich die Entlüftungsleitung (Schleife) zu sehen. Der Dreiwegehahn leitet das ankommende Medium in die angehängt Rattenniere, die sich vollständig in Kulturmedium befindet (Vergrößerung rechts) und über den Venenverweilkatheter am Reaktordeckel befestigt ist.

4.4.3 Evaluierung der Rezellularisierung nach Dezellularisierung mit 3% SDS

4.4.3.1 Qualitative Betrachtung

Chronologisch wurden zuerst diejenigen Nieren betrachtet, bei denen im Rahmen der Dezellularisierung eine dreiprozentige SDS-Lösung verwendet wurde. Sie sind nachfolgend in H.&E.-Färbungen in Abbildung 21 dargestellt.

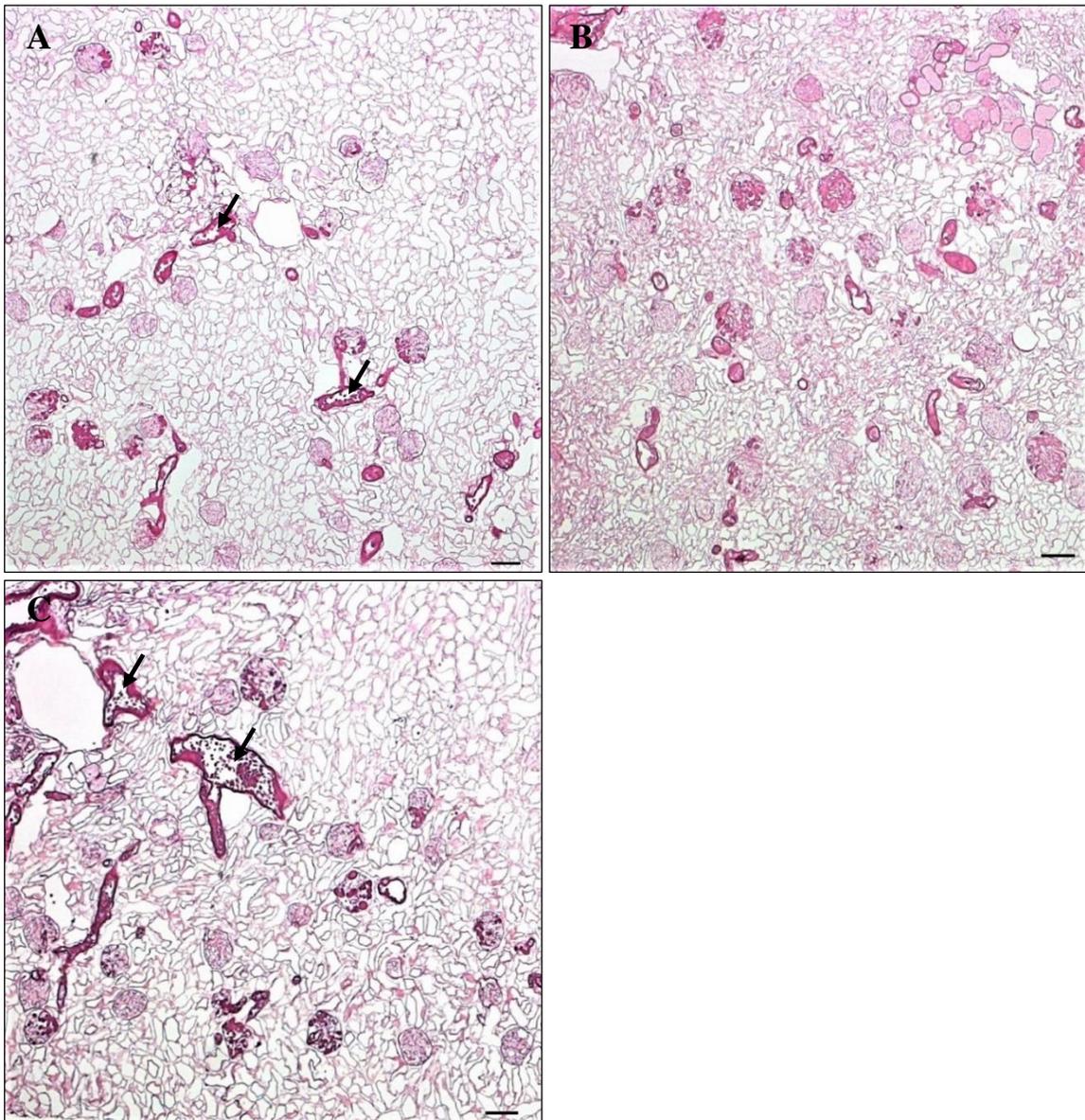


Abbildung 21: Histologische Schnitte (H.&E.) der Rezellularisierung nach vorangegangener Dezellularisierung mit 3% SDS. Es zeigte sich im Rahmen aller Versuche ein weitgehend leeres Parenchym mit nur wenig abgrenzbaren Zellen. Teilweise befinden sich trotz fünftägiger dynamischer Kulturbedingung lose, nicht adhärenente Zellen in den Gefäßlumina (Pfeile). (A) 10 Millionen Zellen, 3 Stunden Adhäsionszeit. Auch durch Verlängerung der Zellzahl auf 20 Millionen und Verlängerung der Adhäsionszeit auf acht Stunden (B) und eine Anpassung auf fünf Stunden (C) veränderte das Bild nur unwesentlich. 50fache Vergrößerung, Maßstabsbalken = 100 μm .

Nach Injektion von acht Millionen Zellen, einer darauffolgenden Adhäsionszeit von drei Stunden und einer dynamischen Kultur von 5 Tagen im ersten Versuchsdurchlauf stellte sich das Parenchym in der H.&E.-Färbung weitgehend leer dar. Nur sehr sporadisch konnten an der Gefäßwand adhären Zellen, dann insbesondere die großen Gefäße der Nierenrinde betreffend, dargestellt werden. Diese zeigten sich morphologisch wechselnd konfiguriert mit einem dezenten Zellkern. Des Weiteren waren teilweise intraluminal liegend Zellen beziehungsweise spitz bis eckig anmutende Zellfragmente zu sehen (Abb. 21A&C, Pfeile). Um eine mögliche Akkumulation von Zellen in der ventralen und dorsalen Peripherie des Organes auszuschließen, erfolgte eine Erweiterung der histologischen Schnittebene in Richtung Facies anterior bzw. posterior, wo sich jedoch dasselbe Bild zeigte. Zur Bestätigung dieses Ergebnisses erfolgte ein weiterer Versuchsdurchlauf, für den lediglich eine unwesentliche Erhöhung der Zellzahl auf zehn Millionen erfolgte, während alle anderen Parameter vom Vorversuch übernommen wurden. Hierbei zeigten sich verglichen mit dem Erstversuch keine wesentlichen Unterschiede (Abb. 21A). Anschließend sollte evaluiert werden, inwieweit die Adhäsionszeit vor Beginn der dynamischen Kultivierung einen Einfluss auf den Rezellularisierungserfolg hatte. Dafür wurde diese zunächst auf acht Stunden erhöht, während gleichzeitig eine Erhöhung der infundierten Zellzahl auf 20 Millionen erfolgte (Abb. 21B). Anschließend erfolgte eine Anpassung der Adhäsionszeit auf fünf Stunden (Abb. 21C). Auch diese Maßnahmen erbrachten qualitativ keine wesentliche Verbesserung des Rezellularisierungsergebnisses. Weiterhin waren nur wenige, an der Gefäßwand adhären Zellen erkennbar und weiterhin befanden sich diese unregelmäßig, teilweise alleinstehend an der Gefäßwand des Rindenparenchyms. Aufgrund der geringen Menge im Parenchym verbliebener Zellen wurde auf eine immunhistochemische Auswertung verzichtet.

4.4.3.2 Semiquantitative Analyse

Die verwendeten Rezellularisierungsprotokolle sind zur Übersicht in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11: Rezellularisierungsprotokolle nach vorangegangener Dezellularisierung mit 3% SDS.

Versuchsnummer	Zellzahl [Millionen]	Adhäsionszeit [h]	Dauer [Tage]
1	8	3	5 Tage
2	10	3	5 Tage
3	20	8	5 Tage
4	20	8	5 Tage
5	20	5	5 Tage

Die semiquantitative Analyse erfolgte durch zweimalige Auszählung adhärenter Zellen in 20 zufällig ausgewählten Bereichen aus verschiedenen Schnittebenen in 200facher Vergrößerung. Anschließend wurden die Mittelwerte und die Standardabweichungen der 20 untersuchten Flächen (hier als Flächeneinheit = FE bezeichnet) sowie die relative Zellzahl (siehe Abschnitt 3.2.8) eines Organes berechnet. Diese sind graphisch werden in Abbildung 22 erfasst.

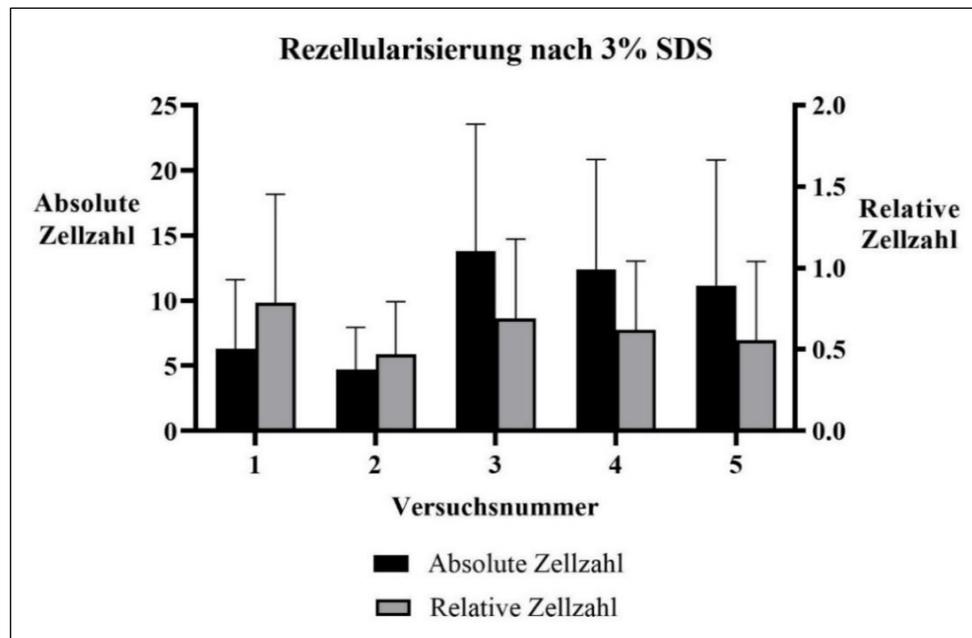


Abbildung 22: Semiquantitative Analyse der Rezellularisierung von 20 zufällig ausgewählten Bereichen nach Dezellularisierung mit 3% SDS. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte für die Zellzahl pro Flächeneinheit. Die linke y-Achse bezieht sich auf die gezählte, absolute Zellzahl (schwarze Balken). Die rechte y-Achse bezieht sich auf die relative Zellzahl und damit der gezählten Zellzahl im Verhältnis zu einer Million applizierten Zellen (grauer Balken). Im Rahmen aller Versuchsnummer zeigte sich ein insuffizienter Rezellularisierungserfolg mit einer maximalen Zellzahl von 13,8 ($\pm 9,7$) Zellen/FE (absolut) und 0,8 ($\pm 0,7$) Zellen/FE (relativ).

Es ergaben sich ein Mittelwert von 6,3 ($\pm 5,1$) Zellen/FE für den ersten und 4,7 ($\pm 3,2$) Zellen/FE für den zweiten Versuchsdurchlauf. Nach Anpassung der Adhäsionszeit zeigten sich 13,8 ($\pm 9,7$) Zellen/FE und 12,4 ($\pm 8,4$) Zellen/FE nach Erhöhung dieser auf acht Stunden sowie 11,2 ($\pm 9,6$) Zellen/FE nach Anpassung auf 5 Stunden. Nachdem die absolute Zellzahl in Relation zu einer Million inserierter Zellen gesetzt wurde, ergab sich für den ersten Versuchsdurchlauf nach dreistündiger Adhäsionszeit ein Mittelwert von 0,8 ($\pm 0,7$) Zellen/FE, für den zweiten ein Mittelwert 0,5 ($\pm 0,3$) Zellen/FE. Für jene nach achtsündiger Adhäsionszeit zeigte sich ein vergleichbarer Mittelwert von 0,7 ($\pm 0,5$) Zellen/FE und 0,6 ($\pm 0,4$) Zellen/FE, nach fünfständiger Adhäsionszeit 0,6 ($\pm 0,5$) Zellen/FE. Nach Dezellularisierung mit dreiprozentiger SDS-Lösung hatte die Veränderung der Adhäsionszeit zwischen drei und acht Stunden somit

nur einen unwesentlichen Einfluss auf das Ergebnis der Rezellularisierung. In allen Versuchsdurchläufen konnte keine relevante Anzahl verbliebener Zellen beobachtet werden.

4.4.4 Evaluierung der Rezellularisierung nach Dezellularisierung mit 0,66% SDS

4.4.4.1 Qualitative Betrachtung

Nach den oben genannten Ergebnissen erfolgte die Adaption des Rezellularisierungsprotokolls im Sinne einer Erniedrigung der SDS-Konzentration im Rahmen der Dezellularisierung auf 0,66%, die anschließend mittels H.&E.-Färbung evaluiert wurde (Abbildung 23).

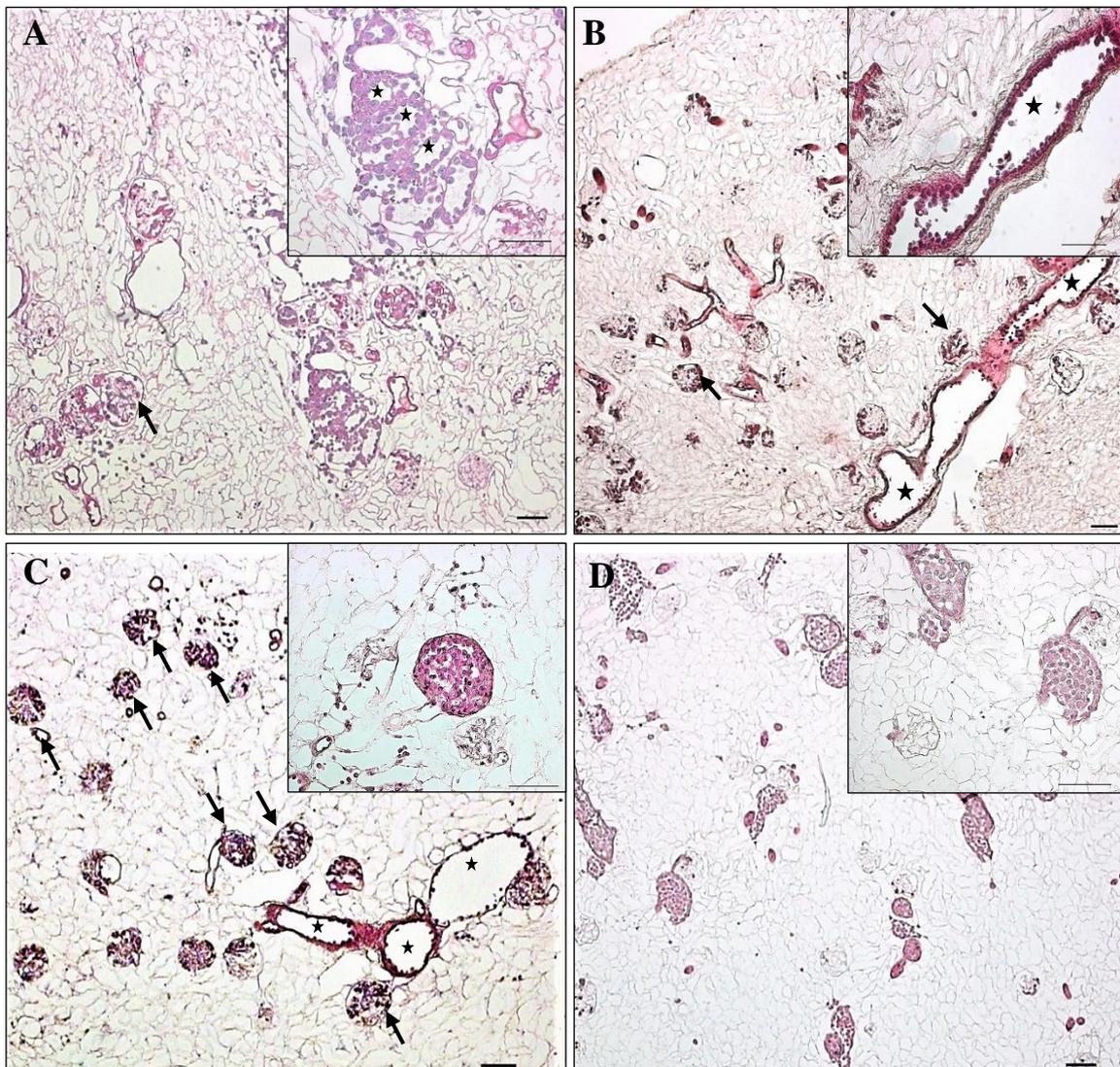


Abbildung 23: Histologische Übersichtsschnitte (H.&E.) der Rezellularisierung mit 40 Millionen Zellen und fünf Stunden Adhäsionszeit nach vorangegangener Dezellularisierung mit 0,66% SDS sowie fünf Tagen (A) und (B), 48 Stunden (C) und ohne (D) dynamische Kulturbedingungen in 50facher Vergrößerung, 200fache Vergrößerung in den kleinen Rechtecken. Es zeigte sich ein wesentlich zell dichteres Parenchym mit deutlich mehr an den Gefäßwänden (exemplarisch Sternchen) und in den Glomeruli (exemplarisch Pfeile) adhärennten Zellen. Ohne Perfusion (D) zeigten sich intraluminale Zellkonglomerate. Maßstabsbalken = 100 μ m.

Für die erste anschließende Rezellularisierung nach Dezellularisierung mit 0,66% SDS und den insgesamt sechsten Versuchsdurchlauf wurden gemäß dem vorangegangenen Versuch eine Zellzahl von 20 Millionen, eine Adhäsionszeit von 5 Stunden und eine dynamische Kultivierung von 5 Tagen gewählt. Hierbei zeigten sich qualitativ erstmals eine Verbesserung des Rezellularisierungserfolges im Sinne einer höheren Zahl von an den Gefäßwänden adhären Zellen. Allerdings waren diese weiterhin sporadisch und ungleichmäßig verteilt, sodass die Zellzahl im nächsten Versuchsdurchlauf auf 40 Millionen erhöht wurde, während die übrigen Parameter unverändert blieben. Diese Anpassung erbrachte das Ergebnis eines wesentlich zell dichteren Parenchyms, das zwar weiterhin vornehmlich den Rindenbereich, nun jedoch auch in geringem Maße die Gefäße des Nierenmarks betraf (Abb. 23A). Die adhären Zellen kleideten in ihrer Gesamtheit einzelne Gefäßwände, einem endothelialen Monolayer ähnelnd, perlschnurartig aus. Morphologisch waren diese Zellen oval konfiguriert und zeigten einen deutlichen Zellkern. Wie dem natürlichen Blutfluss entsprechend fanden sich ebenfalls eine Ansiedlung von Endothelzellen innerhalb der Glomeruli, die von diesen teilweise vollständig ausgefüllt wurden. Trotz der im Vergleich besseren Ergebnisse waren die Zellen jedoch weiterhin inhomogen und ungleichmäßig verteilt. Während sich einige Abschnitte gut mit adhären Zellen ausgefüllt darstellten, waren anderen Bereiche wiederum weitgehend leer. Durch einen weiteren, exakt gleich durchgeführten Versuchsdurchlauf konnte dieses Ergebnis bestätigt werden (Abb. 23B). Daraufhin sollte evaluiert werden, inwieweit die Dauer der dynamischen Kulturbedingungen das Ergebnis der Rezellularisierung beeinflusste. Dafür wurde sie unter Erhaltung der anderen Parameter zunächst auf 48 Stunden reduziert, was in qualitativer Hinsicht den Ergebnissen der fünftägigen Kultur entsprach (Abb. 23C). In einem weiteren Versuchsdurchlauf wurde die dynamische Kultur weggelassen, sodass dieser den Verhältnissen nach alleiniger fünfstündiger Adhäsionszeit und somit rein statischen Kulturbedingungen entsprach. Gleichzeitig spiegelte dies die Verteilung der Zellen wider, die durch die Zelleinsaat erreicht werden konnte. Bereits hier konnten an der Gefäßwand adhären Zellen deutlich abgegrenzt werden, während gleichzeitig aufgrund fehlender Perfusion eine Fülle von Zellen intraluminal erkennbar waren (D). Auffallend war, dass die Glomeruli nach alleiniger statischer Inkubation über fünf Stunden im Vergleich zu fünf Tagen dynamischer Kulturbedingungen kaum bis keine Zellen enthielten. Ein invasives Wachstum wurde in keinem der genannten Versuchsdurchläufe beobachtet.

Nach Verkürzung der dynamischen Kulturbedingungen sollte daraufhin eine Verlängerung dieser auf 14 Tage erfolgen. Dabei kam es unerwartet zu mykotischen Komplikationen, die die

Durchführung dieser Versuchsdurchläufe unmöglich machte. Bereits nach dem ersten Versuch, der daher nach sechs Tagen abgebrochen werden musste, begann eine allumfassende Fehlersuche. Des Weiteren wurde der Sterilisierungsprozess nach der Dezellularisierung durch Amphotericin B in einer Endkonzentration von 2,5mg/L erweitert. Alle unternommenen Veränderungen erbrachten keine Lösung des Problems, sodass zwei weitere angefangene Versuchsdurchläufe ebenfalls nach fünf bzw. vier Tagen abgebrochen werden mussten. Die drei betroffenen Versuchsdurchläufe konnten somit nicht in die Evaluierung mit einbezogen werden.

4.4.4.2 Immunhistochemische Färbung mit CD-31

Zur Evaluierung, ob der Zelltyp EA.hy926 im Mikromilieu des Nierenparenchyms seinen endothelialen Phänotyp behielt, wurde eine immunhistochemische Färbung auf CD-31 (PECAM-1) durchgeführt (Abbildung 24).

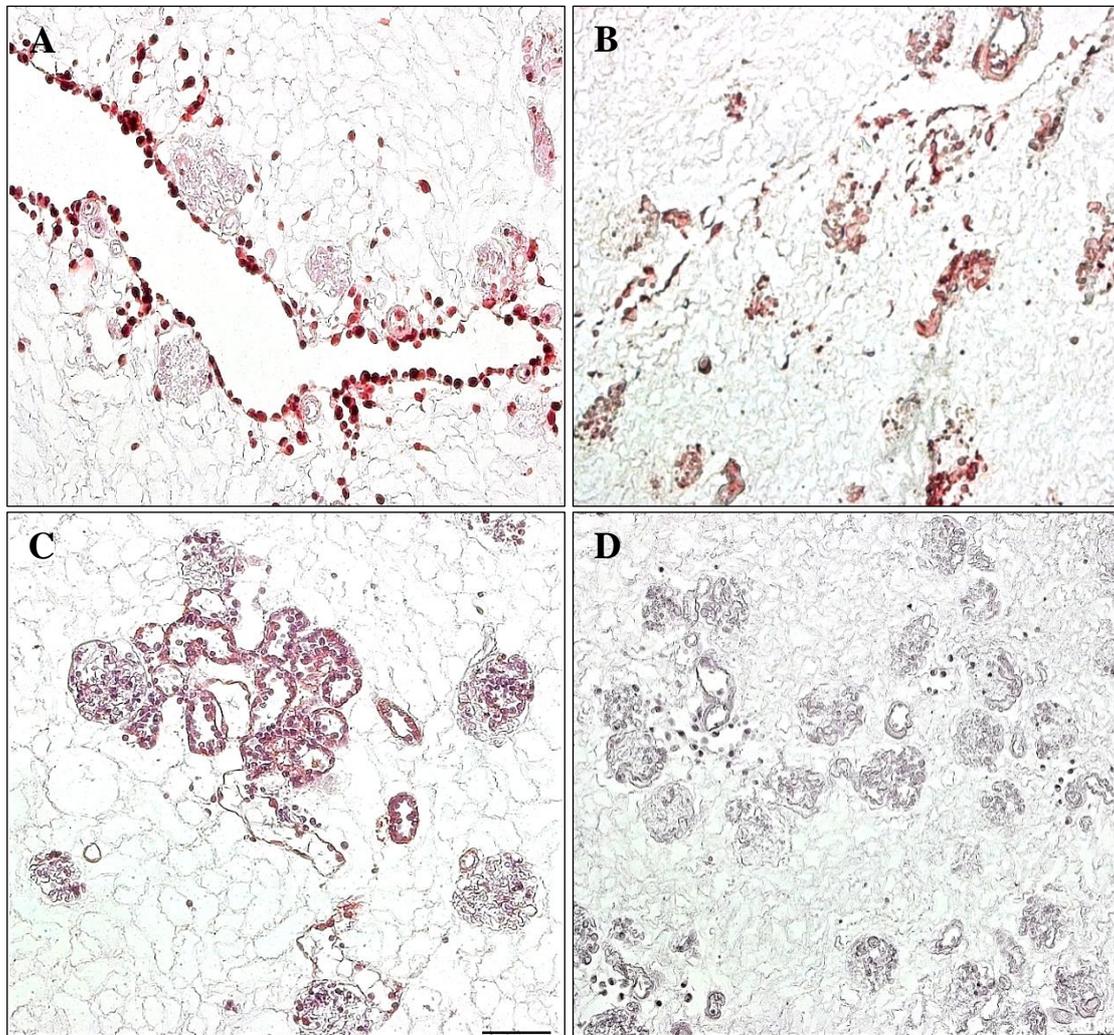


Abbildung 24: Immunhistochemische Färbung auf CD-31 (PECAM-1) zeigte eine deutliche Positivität nach 5 Tagen (A + B) und 48 Stunden (C) dynamischer Kulturbedingungen sowie eine negative Isotypenkontrolle (D). 100fache Vergrößerung, Maßstabsbalken = 100 µm.

Diese ergab, dass sich die eingebrachten Zellen sowohl nach 48 Stunden (Abb. 24C) als auch nach fünf Tagen (Abb. 24A+B) dynamischer Kulturbedingungen weiterhin hochpositiv für diesen zeigten. Damit behielten sie auch nach etwaiger dynamischer Kultur ihren endothelialen Phänotyp. Vergleichend ergab die Isotypenkontrolle einen negativen Befund (Abb. 24D).

4.4.4.3 Immunhistochemische Färbung auf PCNA

Um zu erkennen, ob und inwieweit die eingebrachten Zellen nach der jeweiligen Inkubationszeit proliferatives Verhalten zeigten, wurde eine immunhistochemische Färbung auf Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen (=PCNA) durchgeführt (Abb. 25).

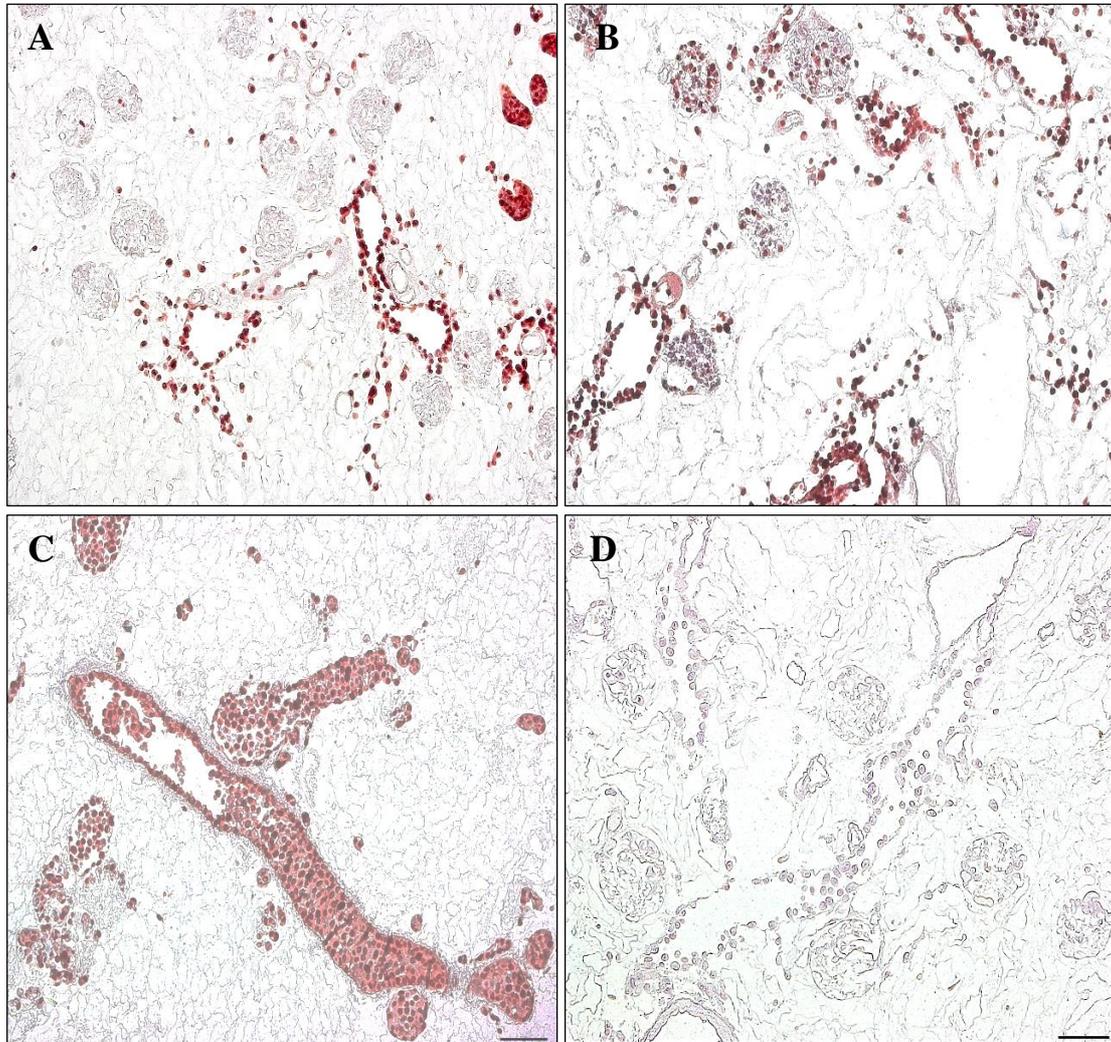


Abbildung 25: Immunhistochemische Färbung auf PCNA zeigte eine deutliche Positivität nach 5 Tagen (A), nach 48 Stunden (B) und ohne (C) dynamische Kulturbedingungen sowie eine negative Isotypenkontrolle (D). 100fache Vergrößerung, Maßstabsbalken = 100 μ m.

Dabei zeigte sich weiterhin zwar eine unterschiedlich starke, jedoch nahezu durchgehende Positivität. Dies betraf sowohl den Versuchsdurchlauf ohne dynamische Kultur (Abb. 25C) sowie diejenige nach 48-stündiger (Abb. 25B) und fünftägiger (Abb. 25A) dynamischer Kulturbedingungen. Die eingebrachten Endothelzellen zeigten somit eine deutliche Proliferationstendenz. Vergleichend ergab die Isotypenkontrolle einen negativen Befund (Abb. 25D).

4.4.4.4 Apoptotisches Verhalten in der Nick-In-Situ-Translation

Zur Darstellung von apoptotischem und avitalen Zellen wurde eine Nick-In-Situ-Translation durchgeführt (Abbildung 26).

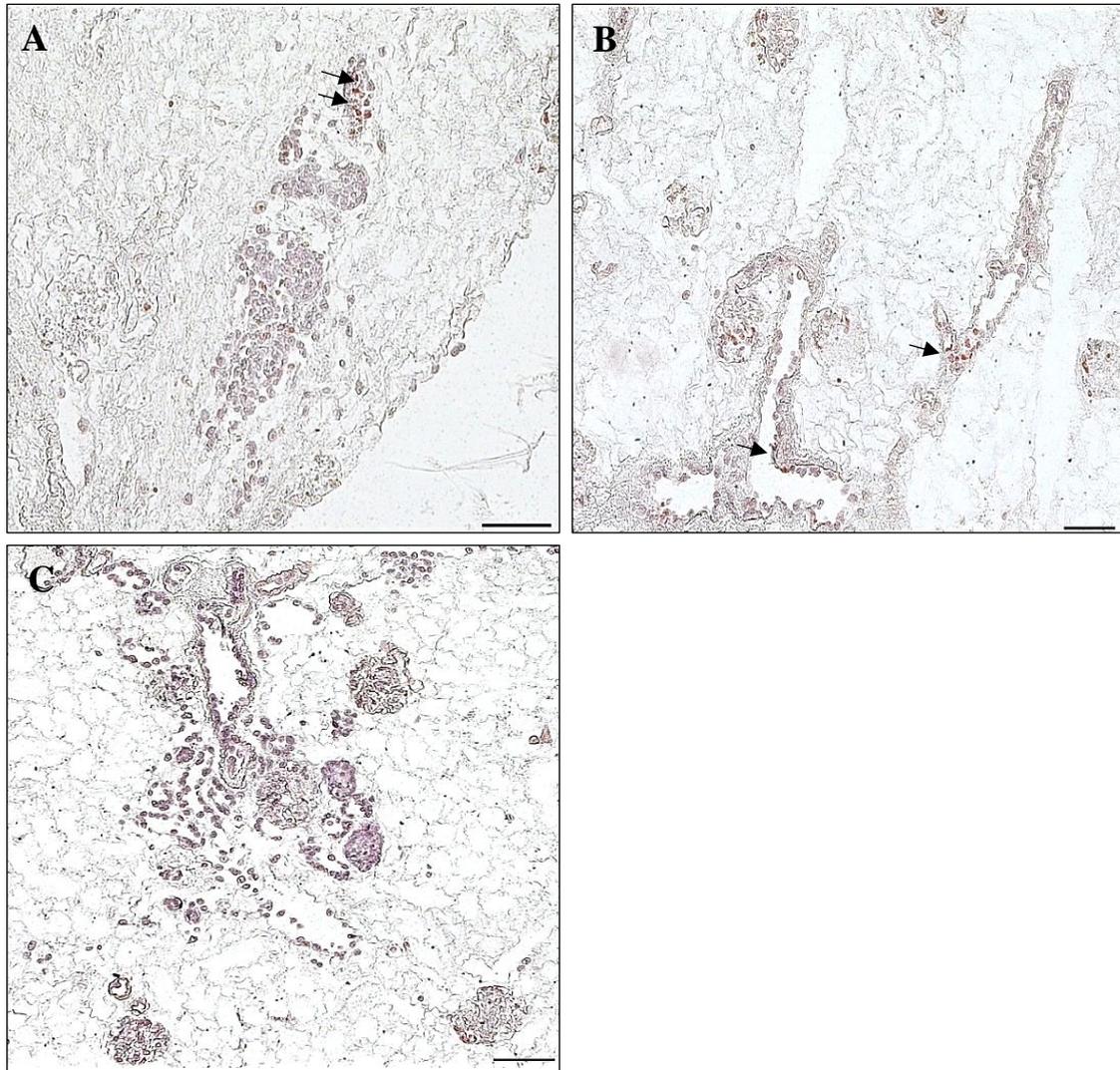


Abbildung 26: Ergebnisse der Nick-In-Situ-Translation. Während nach fünf Tagen dynamischer Kulturbedingungen (A+B) einzelne Zellen eine leichte rötliche Verfärbung zeigten (Pfeile), war nach 48 Stunden dynamischer Kulturbedingungen (C) keine apoptotische Aktivität erkennbar. 100fache Vergrößerung, Maßstabsbalken = 100 µm.

Nach 48 Stunden dynamischer Kulturbedingungen zeigten sich die an den Gefäßwänden verbliebenen Endothelzellen darauf negativ und waren somit vollständig vital (Abb. 26 C). Nach fünftägiger Kultur zeigten lediglich einzelne eine leichte rötliche Verfärbung als Zeichen einer beginnenden Apoptose, während der Großteil der abgrenzbaren Endothelzellen weiterhin negativ reagierte. Auch nach fünf Tagen dynamischer Kultur zeigte sich somit die meisten Zellen vital und gesund (Abb. 25A+B).

4.4.4.5 Semiquantitative Evaluierung

Auch nach der Dezellularisierung mit 0,66-prozentigem SDS erfolgte eine zweimalige Zählung von im Parenchym verbliebenen Zellen. Die hierfür verwendeten Rezellularisierungsprotokolle sind in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12: Rezellularisierungsprotokolle nach vorangegangener Dezellularisierung mit 0,66% SDS. *Wegen mikrobieller Komplikationen nicht in die Auswertung miteinbezogen.

Versuchsnummer	Zellzahl [Millionen]	Adhäsionszeit [h]	Dauer
6	20	5	5 Tage
7	40	5	5 Tage
8	40	5	5 Tage
9	40	5	48 Stunden
10	40	5	keine
11*	40	5	Abbruch nach 6 Tagen
12*	40	5	Abbruch nach 5 Tagen
13*	40	5	Abbruch nach 4 Tagen

Eine graphische Darstellung der Ergebnisse findet sich in Abbildung 27.

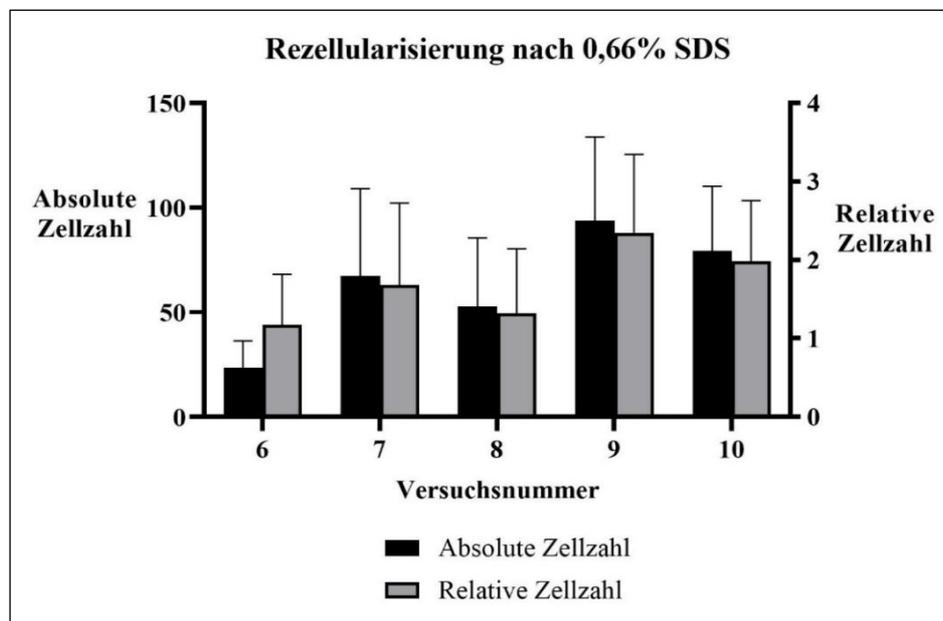


Abbildung 27: Semiquantitative Analyse der Rezellularisierung von 20 zufällig ausgewählten Bereichen nach Dezellularisierung mit 0,66% SDS. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte für die Zellzahl pro Flächeneinheit. Die linke y-Achse bezieht sich auf die gezählte, absolute Zellzahl (schwarze Balken). Die rechte y-Achse bezieht sich auf die relative Zellzahl und damit auf die gezählte Zellzahl im Verhältnis zu einer Million applizierten Zellen (grauer Balken). Beobachtet wurde eine deutliche Verbesserung des Rezellularisierung mit max. 67,3 (± 42) Zellen/FE (absolut) und 1,7 (± 1) Zellen /FE (relativ) nach dynamischen Kulturbedingungen.

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte und Standardabweichung von 20 zufällig ausgewählten Bereichen angegeben, diese werden hier als Flächeneinheit (=FE) bezeichnet. Für den ersten Versuchsdurchlauf (i.e. 20 Millionen Zellen, fünfstündige Adhäsionszeit und fünf Tage dynamische Kultur) ergab sich ein Mittelwert von 23,5 (± 13) Zellen/FE beziehungsweise 1,2 ($\pm 0,6$) Zellen/FE in Relation zu einer Million inserierter Zellen. Dies entsprach mehr als einer Verdopplung der nachweisbaren Zellen im Vergleich zum vorangegangenen Versuchsdurchlauf, der sich lediglich in der verwendeten SDS-Konzentration unterschied. Nach Erhöhung der verwendeten Zellzahl auf 40 Millionen zeigten sich für beide Versuchsdurchläufe, die gleich durchgeführt worden waren, Mittelwerte von 67,3 (± 42) und 53 (± 33) Zellen/FE. Gleichzeitig konnte beobachtet werden, dass auch der relative Wert mit 1,7 (± 1) und 1,3 ($\pm 0,8$) pro eine Million Zellen/FE angestiegen war. Anschließend erfolgte zunächst die Verkürzung der dynamischen Kulturbedingung auf 48 Stunden mit einem Mittelwert von 94 (± 40) Zellen und die Betrachtung nach alleiniger fünfstündiger Adhäsionszeit ohne Perfusion mit 79 (± 31) Zellen. Im Verhältnis zu einer Million inserierten Zellen waren es demnach 2,3 (± 1) Zellen nach einer 48-stündigen dynamischen Kultur und 1,9 ($\pm 0,8$) Zellen ohne dynamische Kultur. Der höchste Wert war somit nach einer 48-stündigen dynamischen Kultur zu beobachten, was mit den Beobachtungen der qualitativen Auswertung (Abschnitt 4.4.4.1) übereinstimmte.

4.4.5 Vergleich der Rezellularisierungsprotokolle

Eine Gegenüberstellung des Rezellularisierungserfolges in Abhängigkeit der im Rahmen der Dezellularisierung verwendeten SDS-Konzentration erfolgte durch den Vergleich der relativen Zellzahl von drei repräsentativen Versuchen beider Gruppen, diese sind in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13: Ausgewählte Versuche für die vergleichende Gegenüberstellung der SDS-Konzentration; Die Kulturdauer betrug jeweils fünf Tage.

SDS-Konzentration [%]	Versuchsnummer	Zellzahl [Mio.]	Adhäsionszeit [h]
3	3	20	8
	4	20	8
	5	20	5
0,66	6	20	5
	7	40	5
	8	40	5

Eine graphische Darstellung findet sich in Abbildung 28.

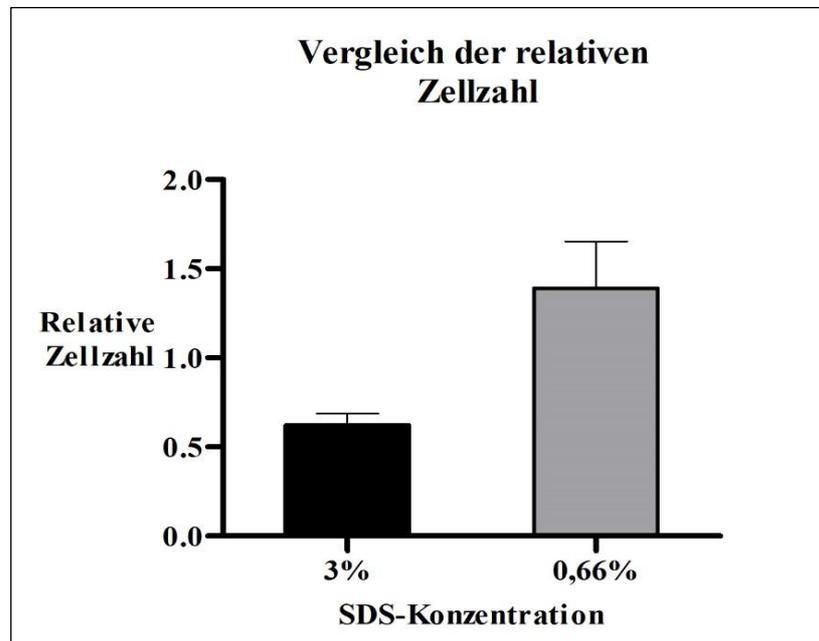


Abbildung 28: Vergleich von jeweils drei Versuchsdurchläufen jeder Kohorte (schwarzer Balken: 3% SDS, grauer Balken: 0,66% SDS. Es konnte mehr als eine Verdoppelung der relativen Zellzahl durch Erniedrigung der SDS Konzentration auf 0,66% im Rahmen der Dezellularisierung beobachtet werden.

Bei jedem dieser Versuche betrug die Dauer der dynamischen Kulturbedingungen fünf Tage. Für die Kohorte der mit 3% SDS dezellularisierten Nieren (Versuchsnummern drei bis fünf) ergab sich ein Mittelwert der relativen Zellzahl von 0,62 (\pm 0,07) Zellen/FE. Nach einer Dezellularisierung mit 0,66% SDS die Versuchsnummer sechs bis acht war es ein Mittelwert der relativen Zellzahl von 1,39 (\pm 0,26) Zellen/FE.

Wie in Abbildung 28 dargestellt, konnte mehr als eine Verdoppelung der relativen Zellzahl durch Erniedrigung der SDS Konzentration im Rahmen der Dezellularisierung beobachtet werden.

4.4.6 Anmerkung zu den aufgetretenen mikrobiellen Komplikationen

Drei Versuchsdurchläufe, deren Ziel die Evaluierung einer Langzeitkultur über 14 Tage war, mussten aufgrund von mikrobiellen Komplikationen vorzeitig beendet werden. In allen drei Versuchsansätzen konnte das Wachstum eines Pilzes sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch gesehen werden. Während makroskopisch eine deutlich gelbliche Verfärbung und Inhomogenität imponierte, konnten mikroskopisch Pilzhyphen dargestellt werden, die das gesamte Parenchym durchzogen (Abb. 29A). Dies führte u.a. zu einer durch die Pilzhyphen bedingten Verlegung der arteriellen Gefäße (Abb. 29B) und damit zu einem Anstieg des notwendigen Perfusionsdruckes. Sobald dieser den vorab eingestellten Perfusionsdruck der Arthroskopiepumpe von 100mmHg überschritt, resultierte ein Perfusionsstopp und damit das Versiegen des Mediumtransportes. Die entsprechenden Versuchsdurchläufe wurden in keine Auswertung mit einbezogen.

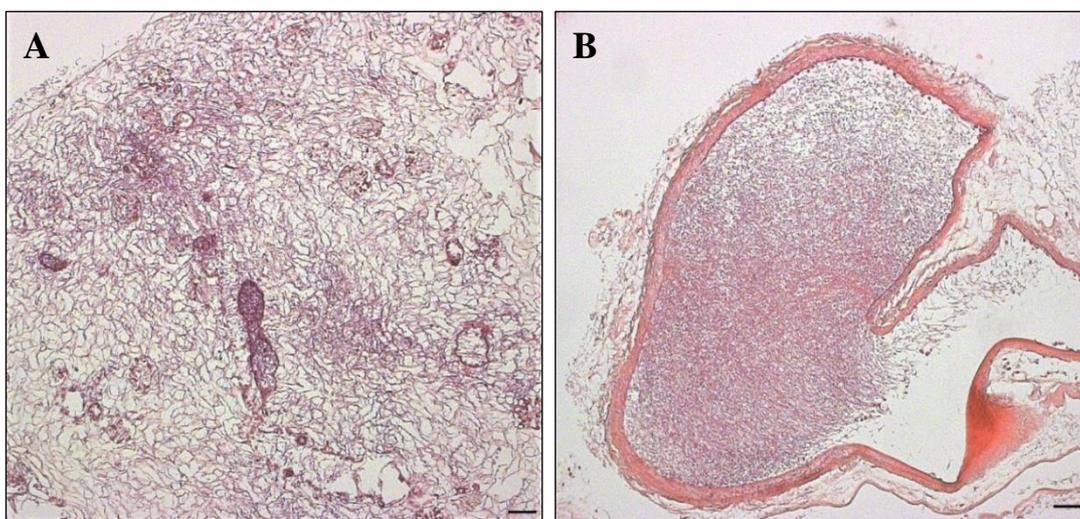


Abbildung 29: Histologische Darstellung des Nierenparenchyms bei Abbruch der dynamischen Kulturbedingung nach fünf Tagen aufgrund mikrobieller Komplikationen. (B) zeigt dichte Pilzhyphen im Nierenparenchym. (A) zeigt eine weitgehende Verlegung des Lumens der Arterien. 50fache Vergrößerung, Maßstabsbalken = 100 μ m.

5 DISKUSSION

In etwas mehr als drei Dekaden hat sich das Tissue Engineering von seinen Anfängen bis heute zu einem erfolgsversprechenden Forschungsfeld entwickelt und zu verschiedenen klinischen Applikationen geführt. Allen voran ist dabei artifizielles Gewebe der Haut zu nennen, das wohl die am meisten ausgereifte Anwendung darstellt und von verschiedenen Herstellern in unterschiedliche Ausführungen erhältlich ist (Berthiaum et al. 2011). Gelenkknorpel ist ein weiteres flaches Gewebe, das wie die Chondrozyten den Weg in die klinische Anwendung gefunden hat (Macmull et al. 2011). Des Weiteren existiert, wenn auch in Einzelfällen, die operative Verwendung von artifiziiellen tubulären Strukturen. Dazu gehören die Transplantation einer dezellularisierten und anschließend mit Zellen des Empfängers rezellularisierten Trachea (Macchiarini et al. 2008), autologer Harnblasen (Atala et al. 2006) oder Harnröhren (Raya-Rivera et al. 2011). Die klinischen Erfolge sind faszinierend und geben guten Grund, große Hoffnungen in das Feld des Tissue Engineering zu legen.

Neben den Erfolgen bestehen jedoch weiterhin auch ungelöste Probleme, die die Umsetzung des Tissue Engineering nachhaltig einschränken. Eine der größten Hürden stellt dabei die Vaskularisierung des artifiziiellen Gewebes und damit die Implementation eines den *in vivo* Verhältnissen gleichenden vaskulären Netzwerkes dar (Rouwkema et al. 2008, Lovett et al. 2009, Traore & George 2017, Pellegata et al. 2018). Trotz verschiedener Ansätze konnte diese Aufgabe bislang noch nicht befriedigend gelöst werden (Min et al. 2019). Dies ist aufgrund der Komplexität und der weitreichenden Funktionen des Gefäßsystems nicht verwunderlich. Die erfolgreiche Herstellung von Haut und Gelenkknorpel liegt nicht zuletzt an deren Geometrie und an der Tatsache, dass dieses Gewebe nicht vaskularisiert werden muss oder, im Fall von Gelenkknorpel, nicht vaskularisiert werden soll (Auger et al. 2013, Costa-Almeida et al. 2014). Ein Aspekt, der im Rahmen der Vaskularisierung von besonderer Bedeutung ist, ist ein gleichmäßiges und vollständiges Auskleiden der vaskulären Basalmembran mit Endothelzellen. Das Fehlen eines homogenen Monolayers von Endothelzellen würde schließlich jederzeit das Risiko einer Thrombosierung und der damit verbundenen Zerstörung des Konstruktes bergen (Pellegata et al. 2018).

5.1 ZELLKULTUR UND MORPHOLOGIE

5.1.1 Proliferatives Verhalten

Der Endothelzelltyp EA.hy926 zeigte in der Zellkultur mit einer PDT von 24,5 Stunden in der siebten Passage ein gutes Proliferationsverhalten. Dabei war zu beobachten, dass sich dieses bereits ab der vierten Passage mit einer PDT von 26,7 Stunden einstellte und in der sechsten Passage mit 25,7 Stunden fast gleichbleibend war. Die hohe Proliferationsrate kam der Anforderung, für die Rezellularisierung hohe Zellzahlen zur Verfügung zu haben, entgegen.

In der Erstpublikation über die Zelllinie EA.hy926 wurde die PDT mit zwölf Stunden angegeben, allerdings entsprach diese der PDT in der 52. Passage (Edgell et al. 1983). Eine PDT zu früheren Passagen oder der Einfluss der jeweiligen Passage auf die PDT wurde hierbei nicht erläutert. Demnach ist es aufgrund der unterschiedlichen Zahl der Passage nicht möglich zu sagen, dass die Verdopplungszeit im Vergleich zur Erstbeschreibung wesentlich länger war. Andere Autoren gaben eine PDT von ungefähr 19 Stunden (Mahieu et al. 1995) und 25,32 Stunden (Lu et al. 2009) an. Insbesondere letztere entspricht den Gegebenheiten dieser Arbeit, da sie einer Auswertung über die ersten elf Tage nach Beginn der Zellkultur entstammten und somit als Vergleichswert dienen können. Demnach ist davon auszugehen, dass passende Kulturbedingungen gewährleistet und die Proliferationstendenz adäquat war, was des Weiteren durch eine positive immunozytochemische Färbung für PCNA bewiesen werden konnte. Gleichzeitig wird diese Aussage dadurch bekräftigt, dass über den gesamten Zeitraum der Zellkultur keine apoptotischen Komplikationen beobachtet werden konnten und auch mikrobielle Kontaminationen ausblieben.

5.1.2 Endotheliale Marker in der Immunozytochemie

Weitere immunozytochemische Färbungen wurden für CD-31 (PECAM-1) und den vWF durchgeführt. Eine deutliche Positivität für CD-31 konnte bei gleichzeitig negativer Isotypenkontrolle problemlos dargestellt werden, was im Konsens mit der Literatur steht (Thornhill et al. 1993, Mutin et al. 1997). Obwohl CD-31 nicht ausschließlich auf Endothelzellen vorkommt und unter anderem auch auf Thrombozyten und Monozyten zu finden ist (Newman 1997), ist er dennoch ein weitverbreiteter und klassischer endothelialer Marker (Ilan et al. 2000). Die immunhistochemische Färbung für den von-Willebrand-Faktor stellte sich nach Veränderung des Fixierungsprotokolles auf Methanol/Aceton in einem Verhältnis 1:1 ebenfalls positiv dar. Die variable Intensität bei immunhistochemischer Färbung

für den vWF war bei der Zelllinie EA.hy926 bereits bekannt (Unger et al. 2002), sodass im Rahmen der Immunhistochemie der FFPE-Schnitte auf die Darstellung des vWF verzichtet wurde.

5.2 ANGIOGENESE ASSAY

Werden primäre Endothelzellen auf ein Gel bestehend aus Proteinen der extrazellulären Matrix (Kleinman et al. 1982) gegeben, so zeigen sie innerhalb weniger Stunden eine Ausbildung von tubulären Strukturen, die kapillaren Gefäßen ähneln (Lawley & Kubota 1989). Dieses angiogenetische Potential unterliegt dabei der Regulation von vielen pro- und antiangiogenetischen Faktoren, die sowohl bei physiologischen als auch bei pathologischen Prozessen wie Krebserkrankungen eine wesentliche Rolle spielen (Tahergerabi & Khazaei 2012). Angiogenese Assays werden demnach insbesondere zur Identifizierung dieser Regulatoren, ihrer Einflüsse auf die Pathogenese verschiedener Krankheiten und möglicher pharmazeutischer Angriffspunkte verwendet (Goodwin 2007). Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein in-vitro Angiogenese Assay durchgeführt, um insbesondere das adhäsive Verhalten des Endothelzelltyps EA.hy926 zu evaluieren.

5.2.1 Implikation auf das adhäsive Verhalten des Endothelzelltyps EA.hy926

Ein Angiogenese Assay impliziert wichtige Fähigkeiten der verwendeten endothelialen Zellreihe wie Adhäsion, Degradierung der bestehenden Matrix, Migration und Differenzierung (Staton et al. 2009). Hierbei hat insbesondere der erste Schritt in der Kette, die Adhäsion, eine grundlegende Bedeutung für die weitere Morphogenese und spielt damit eine wichtige Rolle in ihrer Regulation. Im Rahmen dieser Arbeit wurde beobachtet, dass auch der verwendete endotheliale Zelltyp EA.hy926 die Fähigkeit besitzt, solch kapillären Strukturen nach Pipettieren auf eine Extrazellulär-Matrix-Lösung auszubilden. Hierbei zeigten sich deutliche Veränderungen in der Zellmorphologie- und Ausrichtung bereits nach vier Stunden. Dies impliziert zum einen, dass der verwendete Endothelzelltyp dazu befähigt ist, an adhäsive Proteine der Extrazellulärmatrix zu binden und zum anderen, dass bereits zu diesem Zeitpunkt eine Adhäsion stattfand und diese relevant war. Mit dem Adhäsionsverhalten war damit eine wesentliche Voraussetzung für die Rezellularisierung erfüllt.

5.2.2 Implikation auf die Differenzierung des Endothelzelltyps EA.hy926

Die Eigenschaft der Tubulogenese ist zwar typisch, gleichzeitig jedoch nicht spezifisch für endothelial differenzierte Zellreihen. So zeigen auch anderen Zelltypen wie primäre humane Fibroblasten und diverse Karzinomzellen diese Fähigkeit, wenn sie auf Matrigel gesät werden (Donovan et al. 2001). Beim Zelltyp A549/8 aus einem Adenokarzinom der Lunge, der wie oben beschrieben den nicht endothelialen Bestandteil des Zellhydrids EA.hy926 darstellt, wurde dies allerdings nicht beobachtet (Bauer et al. 1992). Damit beruht dessen Fähigkeit, auf die Extrazellulär-Matrix-Lösung zu reagieren, und dessen angiogenetisches Potential auf den phänotypischen Einflüssen der zur Entwicklung der Zelllinie EA.hy926 verwendeten HUVECs.

5.3 DEZELLULARISIERUNGSPROTOKOLL UND DECELLCONTROL

Die Dezellularisierung der Rattenniere wurde durchgeführt, um ein azelluläres Scaffold bei gleichzeitigem Erhalt des Gefäßbaumes und der organspezifischen Extrazellulärmatrix zu gewinnen. Im Rahmen der hierfür verwendeten perfusionsbasierten Methode wurde das Nierenparenchym über einen sich in der Nierenarterie befindenden Katheter mit verschiedenen Substanzen perfundiert, von denen eine das ionische Detergens Sodium-Dodecyl Sulfate enthielt. Basierend auf einem hauseigenen Protokoll wurde zu einem SDS in einer 0,66 prozentigen Konzentration über insgesamt 60 Minuten verwendet, wodurch eine effektive, sichere und schnelle Zellentfernung unter Erhalt wichtiger ECM-Proteinen gezeigt werden konnte (Burgkart et al. 2014, Schmitt et al. 2017). Daneben wurde in anderen Versuchsdurchläufen eine zweite SDS-Konzentration von 3% ebenfalls über 60 Minuten gewählt. Die Auswahl von 3% SDS basierte auf der Tatsache, dass durch dieses denaturierende Dezellularisierungsprotokoll in laboreigenen Untersuchungen eine verbesserte Biokompatibilität für eine Rezellularisierung mit humanen Osteoblasten erreicht werden konnte. Als Perfusionsdruck wurde bei allen Dezellularisierungen 100mmHg gewählt, um die physiologisch in der Nierenarterie von Ratten herrschende Druckverhältnisse von über 100mmHg (Arendshorst et al. 1975) zu imitieren.

Eine sinnvolle Erweiterung des Protokolls war die erstmalige Implementierung von DecellControl zu dem Zweck, die Dezellularisierung automatisiert und ohne manuellen Handlungsbedarf während des Protokolls ablaufen zu lassen. Als Grundlage dafür diente ein Computerprogramm, das die Steuerung elektromagnetischer Ventile und damit die Perfusion mit verschiedenen Spülflüssigkeiten regulierte. Automatisierte Dezellularisierungssysteme sind moderne Innovationen, die in der Literatur bisher nur wenig beschrieben sind. So verwendeten Pellegata et al. (2014) und Pellegata et al. (2012) ein solches System im Rahmen der Dezellularisierung von ganzen Gefäßen und Price et al. (2014) für die Dezellularisierung von Schweinelungen. Insbesondere letzteres ist dem System DecellControl bezüglich der Funktionsweise sehr ähnlich. In Bezug auf die Dezellularisierung von Nieren der Ratte ist DecellControl nach unserem Kenntnisstand das erste vergleichbare Modell. Aus technischer Perspektive war die praktische Umsetzung einfach und zeitsparend möglich. Schon binnen weniger Minuten war das System komplett montiert, entlüftet und bereit mit der Dezellularisierung zu beginnen. Auch funktionell hatte es verglichen mit der bisher

verwendeten manuellen Methode keine Nachteile. Die Dezellularisierung erfolgt schonend und effektiv.

Dem natürlichen arteriellen Blutfluss entsprechend begann die Abblassung des Parenchyms im Rindbereich und schritt anschließend in Richtung Hilus vor. Dabei zeigten sich weder makroskopische Verletzungen des Parenchyms, die sich zum Beispiel durch Inhomogenitäten im Nierengewebe oder an dessen Kapsel sowie Flüssigkeitsaustritt an der Organoberfläche äußern können. Am Ende war das gesamte Parenchym durchsichtig bis milchig, was auf eine effektive Zellentfernung hindeutete. Auch mikroskopisch konnte eine physiologisch organisiert Matrix dargestellt werden, die frei von zellulären Bestandteilen war. Die positive immunhistochemische Färbung auf Kollagen IV, Laminin und Fibronectin deutete des Weiteren auf den Erhalt dieser wichtigen Proteine der ECM hin. Die Etablierung des automatischen Dezellularisierungssystems DecellControl war auf in Hinblick auf diese Kriterien erfolgreich und bietet die Möglichkeit, den Prozess der Dezellularisierung in Zukunft noch einfacher und praktischer zu gestalten. Zudem können anwenderbedingte Fehler mit DecellControll reduziert und die Effizienz durch die gleichzeitige Dezellularisierung mehrerer Organe noch weiter gesteigert werden.

Die Verwendung von SDS hat im Rahmen der Dezellularisierung ihre Berechtigung insbesondere aufgrund seiner Fähigkeit, zelluläre Bestandteile effektiv aus dem Gewebe zu entfernen (Gilpin & Yang 2017). Insbesondere in zelldichtem Gewebe ist es in entsprechender Konzentration anderen Detergenzien wie Triton X-100 überlegen, um einer vollständigen Zellentfernung nahezukommen (Sullivan et al. 2012, Nakayama et al. 2013, Caralt et al. 2015). Dementsprechend ist der Gebrauch von SDS weit verbreitet und wird, abhängig von der Größe und Zelldichte des Organes, typischerweise in Konzentrationen zwischen 0,1-1% verwendet (Destefani et al. 2017). Gleichzeitig ist bekannt, dass SDS auch spezielle negative Effekte auf die zurückbleibende Extrazellulärmatrix besitzt, die das anschließende Reseeding nachhaltig beeinträchtigen können. Zu diesen gehören zum einen eine Reduktion von in der ECM enthaltenen Wachstumsfaktoren wie bFGF (Reing et al. 2010). Dazu entdeckten He et al. (2017) einen direkten Zusammenhang zwischen SDS-Konzentration und dessen Einwirkzeit auf die Menge von bFGF, VEGF und auch der sulfatierten Glykosaminoglykane. Des Weiteren kann SDS nachteilige Effekte auf die Ultrastruktur und die Zusammensetzung der ECM bedeuten (Gilbert et al. 2006), was zum Beispiel anhand einer einprozentigen Lösung gezeigt wurde (Faulk et al. 2014, Choi et al. 2015). Im Rahmen dieser Arbeit konnte der

immunhistochemische Verbleib von Kollagen IV, Laminin und Fibronectin nach erfolgter Dezellularisierung allerdings gezeigt werden.

Es ist nicht verwunderlich, dass eine Fülle verschiedener Dezellularisierungsprotokolle existieren, die sich bei der Rattenniere hinsichtlich der verwendeten Chemikalien sowie deren Konzentration und Einwirkzeit unterscheiden, ohne, dass sich bislang ein überlegenes Protokoll herauskristallisiert hat (Destefani et al. 2017). Dies wird allein aus der Diskrepanz der perfusionsbasierten Dezellularisierungsprotokolle verschiedener Arbeitsgruppen erkennbar, die sich mit dem Ziel der Rezellularisierung von azellulären Nieren der Ratte beschäftigten. Noch größer wird dementsprechend die Vielfalt der Protokolle, wenn man sie für ganz verschiedene Organe unterschiedlicher Spezies betrachtet. Auffallend ist dabei insbesondere, dass sowohl die Gesamtdauer als auch die Wirkdauer der Detergenzien häufig vergleichsweise lange waren und sich die gesamte Dezellularisierung als sehr zeitintensiv darstellte. So verwendeten Ross et al. (2009) und Ross et al. (2012) unter anderem 3% Triton X-100 und 4% SDS bei einem Perfusionsdruck von 100mmHg über insgesamt 5 Tage und damit das verglichen aggressivste Protokoll. Dagegen benutzten Song et al. (2013) 1 %SDS und 1 %Triton X-100 bei einem Perfusionsdruck von lediglich 30mmHg über insgesamt 4 Tage und Bonandrini et al. (2014) 1%SDS über 17 Stunden. Letztes Protokoll findet weiterhin Anwendung (Ciampi et al. 2019). Damit verglichen erfordert das von uns verwendete Dezellularisierungsprotokoll nach Burgkart et al. (2014) nicht nur geringeren zeitlichen Aufwand, sondern bedeutet in Bezug auf verwendete Chemikalien und deren Expositionszeit eine Schonung für die zurückbleibende Matrix.

5.4 REZELLULARISIERUNG

5.4.1 Endotheliale Zellen des *Whole Organ Engineerings*

Die Anwendung der immortalisierten humanen Endothelzelllinie EA.hy926 beschränkte sich bislang auf die *in vitro* Forschung, insbesondere auf Adhäsionsassays unter gleichzeitiger Verwendung von Leukozyten (Bouis et al. 2001). Im Rahmen des Tissue Engineering ganzer Organe spielt sie dagegen eine untergeordnete Rolle. Nach unserem Kenntnisstand wurde sie diesbezüglich lediglich von Hussein et al. (2016) und Devalliere et al. (2018) zur Optimierung ihrer Adhäsion und Stabilität in azellulärem Lebergewebe, nicht aber in azellulärem Nierengewebe verwendet.

Der Goldstandard für das Tissue Engineering waren bisher HUVECs, die als primäre humane Endothelzellen aus der Umbilikalvene gewonnen werden (Pellegata et al. 2018) und in verschiedenen Organen wie Herz (Weymann et al. 2014), Lunge (Zhou et al. 2018), Leber (Baptista et al. 2011) und Niere (Song et al. 2013) der Ratte Verwendung fanden. Sie zeichnen sich als primäre humane Endothelzellen durch eine hohe Verfügbarkeit und vergleichsweise einfache Isolierung aus (Ganguly et al. 2012). Auf der anderen Seite besitzen sie auch zahlreiche Limitationen, von denen eine wichtige ihre begrenzte Lebensdauer ist (Jaffe et al. 1973). HUVECs sind gleichzeitig eine von zwei Mutterzellen des Zelltyps EA.hy926 und haben viele ihrer Eigenschaften an sie weitergegeben, sodass sich die zwei Zelltypen in ihrem Phänotyp sehr nahekomen (Unger et al. 2002). Trotzdem existieren Unterschiede im Hinblick auf ihr adhäsives Verhalten, die insbesondere für die Rezellularisierung relevant sein können. So beschrieben Baranska et al. (2005) eine signifikante Reduktion der Expression von Integrin $\beta 1$, $\alpha 2$ und $\alpha 5$ -Untereinheiten und eine gleichzeitig signifikant verminderte Bindekapazität des Zelltyps EA.hy926 zu Fibronectin, Kollagen I im Vergleich mit HUVECs. Insbesondere die $\beta 1$ -Untereinheit der Integrine spielt dabei eine wichtige Rolle in der Fixierung der Endothelzellen an der vaskulären Basalmembran (Hallmann et al. 2005). Die Darstellung von $\beta 1$ - und $\alpha 4$ -Untereinheit der Integrine erfolgte in der Immunocytochemie mit einem positiven Ergebnis. Außerdem wurde im Rahmen des Angiogenese Assays die Fähigkeit des Zelltyps EA.hy926 nachgewiesen, an Proteine der Extrazellulärmatrix zu adhären. Inwieweit sich die unterschiedliche Expression der erwähnten Integrine zwischen HUVECs und dem Endothelzelltyp EA.hy926 auf die Rezellularisierung von perfundierten Tissue Matrices widerspiegelt, wurde nach unserem Wissen hingegen bis dato nicht untersucht.

Eine weitere Quelle für Endothelzellen stellen verschiedene Stammzellen dar. So zeigten embryonale Stammzellen nach Einsaat in azelluläres Nierengewebe Eigenschaften einer endothelialen Differenzierung (Ross et al. 2012, Bonandrini et al. 2014). Ihre Anwendung wird jedoch insbesondere durch ethische Probleme und das Potential, Teratome zu generieren (Hentze et al. 2009), limitiert (Figliuzzi et al. 2017). Neben den embryonalen Stammzellen werden insbesondere induzierte pluripotente Stammzellen als erfolgversprechende Zellquelle angesehen. Diese können sich aufgrund ihrer Pluripotenz sowohl in diverse parenchymale und supportive Zelltypen differenzieren (Badylak et al. 2011). Obwohl auch sie das Risiko einer Teratomentwicklung bergen, können sie um einiges einfacher gewonnen werden. Von ihnen abgeleitete endotheliale Zellen konnten von Caralt et al. (2015) und Du et al. (2016) erfolgreich in dezellularisiertes Nierengewebe eingebracht werden.

5.4.2 Rezellularisierungsprotokolle- und Ergebnisse

Die Rezellularisierung der azellulären Rattenniere erfolgte durch die Einsaat einer Zellsuspension bestehend aus humanen Endothelzellen vom Typ EA.hy926 unterschiedlicher Anzahl und 2ml Kulturmedium. Die Injektion erfolgte dabei manuell unter konstantem Druck mit einer durchschnittlichen Geschwindigkeit von 1ml/min über die Nierenarterie in den Gefäßbaum des Organes. Nach Passage des Nierenparenchyms wurde die abgetropfte Flüssigkeit und die darin enthaltenen Zellen erneut zweimal aspiriert und reappliziert. Um zu evaluieren, ob und inwieweit das verwendete Dezellularisierungsprotokoll die Bindung der Endothelzellen an der Extrazellulärmatrix beeinflusste, wurden dabei zwei SDS-Konzentrationen verwendet: 0,66% und 3%. Des Weiteren wurde untersucht, wie sich die Veränderung verschiedener Parameter, nämlich die verwendete Zellzahl, die Adhäsionszeit und die Dauer der dynamischen Kultur auf die Rezellularisierung auswirkte. Es soll hierbei erwähnt werden, dass zu dem Vorhaben, endotheliale Zellen in azelluläres Nierengewebe einzubringen, nur wenige Bezugspunkte in der Literatur zu finden sind. Es ist zwar kein neuartiges Vorhaben, trotzdem ist die Methodik keinesfalls ausgreift.

Insgesamt wurden fünf Rezellularisierungsversuche nach vorangegangener Dezellularisierung mit dreiprozentigem SDS durchgeführt, die alle mit einer dynamischen Kultur von fünf Tagen verbunden waren. Alle fünf Versuchsdurchläufe erbrachten das Resultat eines weitgehend leeren Parenchyms mit nur wenig abgrenzbaren Zellen. Auch eine Verlängerung der Adhäsionszeit, also die Zeit, in der den inserierten Zellen erlaubt wurde, eine Bindung zur Extrazellulärmatrix aufzubauen, erbrachte keine wesentlichen Veränderungen des Ergebnisses.

Zwar wurde bei den Versuchen drei bis fünf, nach Anhebung der Adhäsionszeit auf acht oder fünf Stunden, eine Erhöhung der absoluten Zahl verbliebener Zellen beobachtet. Dieser Effekt war jedoch sehr wahrscheinlich auf die gleichzeitige Erhöhung der verwendeten Zellzahl zurückzuführen, da sich die relative Zellzahl in Bezug zur verwendeten Zellzahl nicht wesentlich änderte. Eine alleinige Verlängerung der Adhäsionszeit von drei Stunden auf acht Stunden erbrachte in Bezug auf das Rezellularisierungsergebnis in den durchgeführten Versuchen keinen nennenswerten Unterschied.

In Abschnitt 5.3. wurden diverse Nebenwirkungen von SDS auf die Extrazellulärmatrix genannt. Die wahrscheinlichste Ursache für die geringe Zellausbeute der Rezellularisierung ist somit, dass das SDS in einer Konzentration von 3% die Ultrastruktur und die Funktionalität der vaskulären Basalmembran nachhaltig veränderte. Daraus resultierte, dass die applizierten Endothelzellen entweder nicht an der vaskulären Basalmembran adhäreren konnten oder deren Bindung derart schwach war, dass sie sich durch den perfusionsbedingten Scherstress nach Anbringen der dynamischen Kulturbedingungen wieder von dieser lösten. Ebenfalls wahrscheinlich ist eine Kombination aus beiden Annahmen. Das Phänomen, dass zu starke Flussverhältnisse zu einer Verschlechterung der Reendothelialisierung führen können beziehungsweise diese flussabhängig ist, wurde bereits beschrieben (Lichtenberg et al. 2006). Ein weiterer Hinweis, dass sich die eingebrachten Zellen mitunter nach Beginn der dynamischen Kulturbedingungen von der ECM lösten, ist die weiterhin intraluminale Anreicherung auch nach fünftägiger Perfusion. Wäre allein der Aufbau einer Bindung an die vaskuläre Basalmembran gestört, wären die Zellen sofort nach Beginn der dynamischen Kultur aus dem Parenchym entfernt worden und somit in keiner Weise mehr darstellbar gewesen.

Die Verwendung einer dreiprozentigen SDS-Lösung im Rahmen der Dezellularisierung ist weder für Rattennieren noch andere Organe verschiedener Spezies üblich. Lediglich Ross et al. (2009) und Ross et al. (2012) verwendeten zur Dezellularisierung einer Rattenniere unter anderem eine vierprozentige SDS-Lösung in einem sehr aggressiven Protokoll. Trotzdem konnten Ross et al. (2009) nach Einsaat von zwei Millionen muriner embryonaler Stammzellen über die Nierenarterie und einer eintägigen statischen Kultur einen histologischen Verbleib dieser Zellen mit insbesondere kortikaler Verteilung darstellen. Eine anschließende Kultivierung über einen längeren Zeitraum wurde größtenteils statisch und außerdem nicht als ganzes Organ, sondern in Form von breiten Schnittpräparaten durchgeführt. Auch der Großteil der histologischen Auswertung, die einen Verbleib der eingebrachten Zellen darstellte, wurde

auf der Grundlage dieser Methode angegeben. Zwar wurden ebenfalls dynamische Kultur mit Perfusion als ganzheitliches Organ durchgeführt und dabei auch ähnliche Ergebnisse beschrieben, vergleichende histologische Korrelate fehlten jedoch in der Originalpublikation. In einer weiteren Arbeit von Ross et al. (2012) wurde dasselbe Dezellularisierungs- und Rezellularisierungsprotokoll verwendet. Auch hier wurden größtenteils statische Kulturbedingungen verwendet und ebenfalls histologisch dargestellt. Fasst man diese zwei Arbeiten zusammen, so war eine Adhäsion von Zellen wie den hier verwendeten murinen embryonalen Stammzellen an der vaskulären Basalmembran trotz der hohen SDS-Konzentration grundsätzlich möglich. Inwieweit die dynamischen Kulturbedingungen und der damit verbundene Scherstress ihre Bindung an die Extrazellulärmatrix beeinträchtigte, wurde jedoch nicht erörtert. Die unterschiedliche Art der Kultivierung ist in jedem Fall ein fundamentaler Unterschied verglichen zu der in der vorliegenden Arbeit verwendeten dynamischen Kulturbedingungen.

Als eine weitere Erklärung für die geringe Zellularität wäre denkbar, dass eine achtstündige Adhäsionszeit zu lange war. In dieser Zeit gelangte kein frisches Medium an die Zellen heran, sodass eine durch Minderversorgung bedingte Nekrose der Zellen die Folge gewesen sein könnte. Zwar verwendeten Song et al. (2013) in einem ähnlichen Versuchsaufbau HUVECs und keine Endothelzellen vom Typ EA.hy926, jedoch gaben sie in ihrer Arbeit eine Adhäsionszeit von „über Nacht“ an. Trotz dieser ungenauen Zeitangabe ist davon auszugehen, dass sie mindestens acht Stunden betrug und das Resultat erbrachte, dass die eingebrachten HUVECs weiterhin vital waren. Dieser Erklärungsversuch erscheint somit unwahrscheinlich und wird gleichzeitig dadurch unwahrscheinlicher, dass auch nach Reduktion der Adhäsionszeit auf fünf Stunden keine relevanten Unterschiede der Zahl im Parenchym verbliebener Zellen erreicht werden konnte.

Laboreigene Arbeiten zeigten, dass die retrograde Einsaat von humanen Osteoblasten in den Ureter nach Dezellularisierung mit 0,66% und 3% SDS zum einen möglich ist und das Adhäsions- und Wachstumsverhalten der humanen Osteoblasten nach einem stärker denaturierenden Protokoll mit der dreiprozentigen SDS-Lösung aufgrund einer Erhöhung der Biokompatibilität vergleichsweise besser war. Diese Tatsache und die Beobachtung, dass dies für den Endothelzelltyp EA.hy926 nach anterograder Rezellularisierung in die Nierenarterie nicht zutraf, war am ehesten den herrschenden Fluss- und Druckverhältnissen geschuldet. Während der physiologische Perfusionsdruck in der Nierenarterie der Ratte über 100mmHg ist

(Arendshorst et al. 1975) auch in den glomerulären Kapillaren noch knapp 60mmHg beträgt (Aukland et al. 1977), fällt er in der Bowman-Kapsel schlagartig auf 11,3cm H₂O (=8,3mmHg) ab und ist auch im Ureter vergleichbar niedrig (Brenner et al. 1971). Der mit dem Perfusionsdruck entstehende Scherstress ist im arteriellen Stromgebiet somit wesentlich höher als in der Bowman-Kapsel und dem Tubulussystem und affektiert die eingebrachten Zellen und ihr Bindungsverhalten in den beiden Kompartimenten folglich unterschiedlich stark. Die wahrscheinlichste Folge ist, dass der Scherstress die adhäsive Kapazität der in das Gefäßsystem eingebrachten Endothelzellen überstieg und sie ihren Kontakt verloren, während die Bindung der in den Ureter eingebrachten Osteoblasten ausreichte, um dem Scherstress standzuhalten und im Gewebe zu verbleiben.

Der beste Beweis, dass der Erfolg der Rezellularisierung mit dem Endothelzelltyp EA.hy926 wesentlich von der im Rahmen der Dezellularisierung verwendeten SDS-Konzentration abhängt, zeigen die Ergebnisse, die nach Verwendung einer 0,66-prozentigen SDS-Konzentration erbracht wurden. Hierbei konnte man schon nach alleiniger Zelleinsaat und einer Adhäsionszeit von fünf Stunden deutlich erkennen, dass die eingebrachten Endothelzellen eine Bindung an die vaskuläre Basalmembran aufgebaut hatten. Diese zeigten außerdem eine deutliche immunhistochemische Positivität für PCNA und damit ein starkes proliferatives Verhalten. Die oben genannte Hypothese, dass eine Adhäsionszeit von fünf Stunden zu lange gewesen sein könnte, wird durch diese Erkenntnis praktisch widerlegt. Gleichzeitig erkannte man intraluminale Zellkonglomerate, die dort aufgrund der in diesem Fall rein statischen Kulturbedingungen verblieben. Die Lokalisation der eingebrachten Zellen reduzierte sich dabei insbesondere auf die arteriellen Gefäße, während in den Kapillaren der Glomeruli nur wenig Zellen erkennbar waren. Ebenso wenig Zellen waren folglich im zweiten, peritubulären Kapillarnetz des Nierenmarkes abzugrenzen. Auf dieses Phänomen wird im Folgenden näher eingegangen.

Der gesamte Arbeitsschritt der Zelleinsaat beeinflusst maßgeblich die Verteilung der Zellen im Parenchym und stellt einen fundamentalen Baustein der Rezellularisierung dar (Remuzzi et al. 2017). Bei der allgemein üblichen alleinigen Injektion in die Nierenarterie (Pellegata et al. 2018) gelangen die Zellen über die arteriellen Gefäße bis an die kortikalen Glomeruli und können diese beiden Strukturen auskleiden. Gleichzeitig wird das zweite, peritubuläre Kapillarnetz oftmals nicht oder nur in geringem Ausmaß erreicht. Entsprechende Befunde wurden auch von Ross et al. (2009) und Bonandrini et al. (2014) erhoben, die beide eine

Infusionsgeschwindigkeit von 0,2ml/min verwendeten. Remuzzi et al. (2017) beschäftigten sich sehr kritisch mit diesem Phänomen und erkannten, dass eine solche mangelnde Verteilung auch bei einer Infusionsgeschwindigkeit von 1ml/min zu erkennen war. Die von uns beobachtete vornehmlich kortikale Verteilung der Zellen ist somit übereinstimmend mit den Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen.

Um eine bessere und gleichmäßigere Verteilung der Zellen zu erreichen existieren verschiedene Ansätze. Naheliegender wäre es, den Infusionsdruck während der Zelleinsaat zu erhöhen, damit die Zellen bis an die Nierenkörperchen und die Tiefen des Gewebes transportiert werden. Gleichzeitig besteht jedoch die Gefahr, dass ein zu hoher Druck das Nierenparenchym beziehungsweise die Extrazellulärmatrix beschädigen kann, diese rupturiert und eine ungewollte Extravasation von Zellen stattfindet. Ein Beispiel hierfür ist die Arbeit von Caralt et al. (2015), die unmittelbar nach der Zelleinsaat von iPSCs-abgeleiteten endothelialen Zellen über die Nierenarterie eine Hochdruckperfusion mit 232mmHg begannen, um eine optimierte Verteilung der Zellen zu erreichen. In der Auswertung waren die Zellen aus den arteriellen Gefäßen ausgetreten und in Form von peritubulären Konglomeraten zu finden. Während Caralt et al. (2015) eine physiologische Migration der Zellen postulierten ist es wahrscheinlicher, dass die Zellen aufgrund einer druckbedingten Ruptur der vaskulären Basalmembran transloziert wurden (Remuzzi et al. 2017). Ein weiteres Problem durch zu hohe Druck- und Flussverhältnisse während der Zelleinsaat ist die Beeinträchtigung der Zelladhäsion an der vaskulären Basalmembran. Die Zellen verbleiben dann nicht im Organ, sondern würden der physiologischen Flussrichtung entsprechend durch die Vena renalis wieder nach draußen, mit der Folge einer verminderten Zellularität, transportiert werden.

Die Methode der Zelleinsaat kann mit dem Ziel, eine homogenere Verteilung der eingebrachten Zellen zu erreichen, jedoch auch durch andere Zusätze erweitert werden. Song et al. (2013) inserierten eine Zellsuspension von $50,67 \pm 12,84$ Millionen HUVECs in 2ml Kulturmedium mit einer Geschwindigkeit von 1ml/min in die Nierenarterie, während das Organ einem Unterdruck von $-40\text{cmH}_2\text{O}$ ausgesetzt war. Nach einer Adhäsionszeit über Nacht und einer dynamischen Kultur von drei bis fünf Tagen wurde eine gleichmäßige Verteilung der HUVECs im renalen Gefäßsystem beobachtet. Bis auf den Zusatz des Unterdruckes von -40mmHg war diese Technik der Zelleinsaat dem im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Protokoll sehr ähnlich. Es ist somit denkbar, dass der verwendete Unterdruck eine wesentlich homogenere Verteilung der eingebrachten Zellen ermöglichte. Ein weiterer Unterschied betraf den verwendeten Zelltyp.

Wie oben bereits beschrieben existieren wesentliche Unterschiede in der phänotypischen Expression von adhäsiven Proteinen und dem Bindungsverhalten an Proteine der Extrazellulärmatrix wie Fibronectin und Kollagen I zwischen HUVECs und dem Zelltyp EA.hy926 (Baranska et al. 2005). Inwieweit diese Unterschiede das Adhäsionsverhalten der beiden Zelltypen im Gefäßbett der azellulären Rattenniere tatsächlich beeinflussen ist jedoch nicht bekannt. Neben der Einsaat unter Unterdruckbedingungen wurden auch anderen Maßnahmen zur Optimierung der Zellverteilung wie zum Beispiel eine sukzessive (zweizeitige) Applikation über die arterielle und venöse Strombahn (i.e. A. und V. renales) erprobt. Ciampi et al. (2019) zeigten hierbei, dass eine sukzessive Einsaat von humanen iPSCs-abgeleiteten Endothelzellen anterograd in die Nierenarterie und retrograd in die Nierenvene zu einer gleichmäßigeren Verteilung führte, die auch die peritubulären Kapillaren des Marks betrafen. Auch sie verwendeten eine Infusionsgeschwindigkeit von 1ml/min und erlaubten den Zellen für zwei Stunden, an die Extrazellulärmatrix zu binden. Anschließend begannen sie mit der dynamischen Kultur, deren Flussintensität langsam und graduell erhöht wurde. Eine ähnliche Erkenntnis erbrachte die Arbeit von Leuning et al. (2019), die ebenfalls eine sukzessive Infusion von hgMVECs in Vena und Arteria renales wählten, wobei hier gleichzeitig ein Unterdruck von -30mmHg verwendet wurde. Wie groß der Effekt der Zelleinsaat über die zwei Achsen also tatsächlich war, kann allein durch diese Arbeit nicht gesagt werden. Eine gänzlich andere Methode etablierten Ko et al. (2014). Sie konjugierten die renale vaskuläre Matrix vor Injektion von Endothelzellen mit Antikörpern gegen CD-31 (=PECAM-1) und konnten dadurch eine Verbesserung der Verteilung und des Verbleibs dieser im renalen Gefäßbett beobachten.

Die von uns durchgeführte Verlängerung der dynamischen Kulturbedingungen auf 48 Stunden und fünf Tage nach vorangegangener Dezellularisierung mit 0,66-prozentigem SDS zeigte weiterhin eine gute Adhärenz von Endothelzellen an den arteriellen Gefäßen und auch in den glomerulären Kapillaren, die sie teilweise perlschnurartig auskleideten. Ein weiterer wichtiger Aspekt dieser Beobachtung war, dass die adhärennten Zellen die vaskuläre Basalmembran nicht durchbrachen und somit nicht in das Parenchym einwuchsen. Diese fehlende Invasivität war insbesondere in der Hinsicht wichtig, dass eine der beiden Mutterzellen des Zelltyps EA.hy926 aus einem Adenokarzinom der Lunge abstammte.

Verglichen mit den Ergebnissen nach Dezellularisierung mit 3% SDS konnte auch nach dynamischen Kulturbedingungen über fünf Tage mehr als eine Verdoppelung der relativen

Zellzahl beobachtet werden. Auch nach dieser Zeit hielten sie die Expression von CD-31 (PECAM-1) und somit ihren endothelialen Phänotyp bei und es fand, auch im Hinblick der fehlenden Invasivität, keine Entdifferenzierung des Zelltyps EA.hy926 statt. Die abgrenzbaren Zellen zeigten eine immunhistochemische Positivität auf PCNA bei gleichzeitig weitgehender Negativität in der Nick-in-Situ-Translation. Daraus ist abzuleiten, dass das Mikromilieu und die verwendeten Kulturbedingungen es ermöglichten, die eingebrachten Zellen adhären und proliferieren zu lassen. Die an der vaskulären Basalmembran verbliebenen Zellen waren dabei größtenteils vital und behielten ihre endotheliale Differenzierung. Obwohl dies eine qualitative und semiquantitative Verbesserung des Rezellularisierungserfolges darstellt, war die Verteilung bei kritischer Betrachtung auch hier weiterhin eher sporadisch und wenig homogen. Während einige arterielle Gefäß und Glomeruli eine große Zahl von Zellen enthielten, waren andere Bereiche wiederum komplett leer. Dies spiegeln nicht zuletzt die Standardabweichungen der semiquantitativen Analyse wider. Die Verteilung der Zellen beschränkte sich außerdem weiterhin vornehmlich auf die Nierenrinde und entsprach in großen Teilen derjenigen, die allein durch die Zelleinsaat erreicht werden konnte. Ein Unterschied war jedoch, dass mit der dynamischen Kulturbedingung auch eine größere Zellzahl in den glomerulären Kapillaren abgrenzbar war. Dies deutet eindrücklich darauf hin, dass die im vaskulären Gefäßbett adhären Zellen nicht nur proliferierten, sondern auch eine Migration dieser in die weiter distal gelegenen Gefäßabschnitte stattfand.

Eine Erhöhung der Zellzahl von 20 Millionen auf 40 Millionen und eine anschließende dynamische Kultur von fünf Tagen konnte sowohl einen Anstieg der absoluten als auch der relativen Zellzahl erreichen. Dass das Verhältnis von applizierten und verbliebenen Zellen miteinander korreliert ist nachvollziehbar. Dass sich jedoch auch die relative Zellzahl erhöhte, deutet insgesamt auf eine Verbesserung der Rezellularisierung hin. Wie schon von Bonandrini et al. (2014) bei der Verwendung von murinen embryonalen Stammzellen beschrieben, führte die Verwendung einer höheren Zellzahl zu einer Verbesserung des Ergebnisses der Rezellularisierung. Ebenso führte bei Remuzzi et al. (2017) eine Verringerung der Zellzahl zu einer Verschlechterung der Ergebnisse. Dass die verwendete Zellzahl somit einen wichtigen Einfluss auf das Ergebnis der Rezellularisierung nimmt, ist somit im Konsens mit anderen Autoren.

In der semiquantitativen Evaluierung war ferner zu beobachten, dass sich die Zellzahl mit der Dauer der Perfusion veränderte. Während sie innerhalb der ersten 48 Stunden nach der

Zelleinsaat von 79 (\pm 31) Zellen/FE auf 94 (\pm 40) Zellen/FE anstieg, war anschließend, also nach fünf Tagen mit 67,3 (\pm 42) und 53 (\pm 33) Zellen/FE tendenziell eine Abnahme der Zellzahl zu erkennen. Dieses Phänomen wurde von Remuzzi et al. (2017), die die Zelldichte des Nierenparenchyms nach 24 Stunden und 72 Stunden untersuchten, ebenfalls beobachtet. Eine mögliche Erklärung für die zeitabhängige Abnahme der Zellzahl zwischen 48 Stunden und fünf Tagen kann ein Verlust der stabilen Bindung der Endothelzellen an die vaskuläre Basalmembran sein. Ursächlich hierfür können die Kombination aus den bereits erwähnten Druck- und Flussverhältnissen (Lichtenberg et al. 2006) beziehungsweise dem damit verbundenen Scherstress und dem gleichzeitigen Fehlen von akzessorischen Zellen wie den Perizyten und vSMC sein, die unter anderem durch die Sekretion von Angiopoetin-1 einen wesentlichen Beitrag zur Stabilität und Reifung der Gefäße und zum Überleben der Endothelzellen leisten (Bergers & Song 2005, Brindle et al. 2006, von Tell et al. 2006). Auch wenn Wachstumsfaktoren bisher nur gelegentlich angewendet wurden, konnte ihr positiver Einfluss im Rahmen der Reendothelialisierung von Leuning et al. (2019) doch gezeigt werden. Hierbei wurde demonstriert, dass hgMVECs auf vorab mit VEGF oder Angiopoetin-1 inkubierten Schnittpräparaten einer azellulären Rattenniere verbesserte Adhäsion und Überleben zeigten. Dies bezog sich allerdings nur auf die Auswertung nach einer 24-stündigen und gleichzeitig statischen Kultur. VEGF ist dafür bekannt, die Stabilität von Endothelzellen zu reduzieren, vaskuläre Undichtigkeiten und Gefäßinstabilität auszulösen, um damit die Neoangiogenese zu gewährleisten (Bates 2010). Im Rahmen von längeren Kulturbedingungen wäre die Verwendung von VEGF somit eher kontraproduktiv, da es die gebundenen Endothelzellen und ihre vaskuläre Basalmembran destabilisieren und zu deren Verlust führen könnte.

Die Verteilung und die Zellularität nach Durchführungen einer dynamischen Langzeitkultur wäre weiterhin von großem Interesse gewesen. Unglücklicherweise mussten alle Versuche, die mit dieser Absicht begonnen wurden, nach maximal sieben Tagen aufgrund mikrobieller Komplikationen abgebrochen werden. Aus diesem Grund können über das Verhalten des Endothelzelltyps EA.hy926 im Rahmen einer Langzeitkultur keine Aussagen getroffen werden. Es muss im Zuge dessen klargestellt werden, dass das Auftreten dieser limitierenden Geschehnisse weder durch den Anwender noch durch die Methode an sich bedingt war. Dies wird insbesondere dadurch erkenntlich, dass auch andere Mitarbeiter und Arbeitsgruppen des Labors davon betroffen waren und bis zum elften Versuchsdurchlauf keine derartigen Probleme auftraten.

5.5 SCHLUSSFOLGERUNG

Die neu entwickelte automatisierte Dezellularisierungseinheit DecellControl ist eine sinnvolle und praktische Erweiterung zur bisher praktizierten manuellen Methode. Die Etablierung dieses anwenderfreundlichen Systems war problemlos umsetzbar und erleichterte den gesamten Prozess dahingehend, dass nach Beginn der Dezellularisierung kein individueller Handlungsbedarf bestand. Dies ermöglichte es, alle vorbereitenden Arbeitsschritte für die nachfolgende Rezellularisierung simultan zu absolvieren, reduzierte den totalen Zeitaufwand und optimierte somit den gesamten Ablauf des Projektes. Die nach perfusionsbasierter Dezellularisierung zurückbleibende Extrazellulärmatrix zeigte keine makroskopischen oder mikroskopischen Parenchymschäden bei gleichzeitigem Erhalt wichtiger adhäsiver Proteine wie Laminin, Fibronectin und Kollagen IV, sodass die renale Matrix weiterhin als passendes Scaffold angesehen werden kann.

Die Biokompatibilität der azellulären Rattenniere für die nachfolgende Rezellularisierung mit Endothelzellen vom Typ EA.hy926 durch die Arteria renalis unterschied sich in Abhängigkeit von der im Rahmen der Dezellularisierung verwendeten Konzentration der SDS-Lösungen. Dies zeigte sich in einem unterschiedlichen Adhäsionsverhalten der Endothelzellen nach der dynamischen Kultur. Während nach Verwendung einer dreiprozentigen SDS-Konzentration qualitativ und semiquantitativ nur wenig Zellen im Gefäßbett der Rattenniere verblieben, konnte dieses Ergebnis nach Durchführung der Dezellularisierung mit einer 0,66-prozentigen SDS-Konzentration deutlich verbessert werden. Die Annahme, dass ein stark denaturierendes Dezellularisierungsprotokoll die Biokompatibilität für die verwendeten Endothelzellen, wie bei der Verwendung von humanen Osteoblasten beobachtet, erhöht, traf somit nicht zu. Vielmehr führte eine schonendere Dezellularisierung zu einem besseren Mikromilieu mit Erhalt einer höheren Zellzahl in der vaskulären Matrix. Diese hielten auch nach fünf Tagen ihre phänotypische Expression von CD-31 (PECAM-1) bei, zeigten ein proliferatives Verhalten, nur geringe apoptotische Aktivität. Ein invasives Wachstum wurde nicht beobachtet. Die azelluläre Rattenniere bot nach schonender Dezellularisierung mit 0,66% SDS somit passende Nischenverhältnisse für den endothelialen Zelltyp EA.hy926, während das denaturierende Protokoll mit 3% SDS kein passendes Mikromilieu schuf.

Die Veränderung der Adhäsionszeit in einem Bereich zwischen drei und acht Stunden nach vorangegangener Dezellularisierung mit 3-prozentigem SDS hatte keinen Einfluss auf das

Ergebnis der Rezellularisierung. Eine Erhöhung der Zellzahl von 20 Millionen auf 40 Millionen nach Dezellularisierung mit 0,66-prozentigem SDS verbesserte dagegen die Effektivität der Rezellularisierung, sodass eine hohe Zellzahl favorisiert werden sollte. Es wurde eine Abnahme der Zellzahl zwischen dem dritten und dem fünften Tag der dynamischen Kulturbedingungen beobachtet. Eine Lösung dafür kann unter Berücksichtigung der Literatur eine Korrektur der Druck- und Flussverhältnisse nach unten sein. Ebenso ist es denkbar, dass eine Langzeitkultur über 14 Tage durch Verlängerung der Proliferationsspanne zu einer Erhöhung der Zellularität führt. Dies konnte aufgrund der mikrobiellen Komplikationen nicht geprüft werden.

5.6 LIMITATIONEN

Eine wesentliche Limitation im Rahmen dieser Arbeit war, dass jeder Versuchsdurchlauf einen hohen zeitlichen Aufwand mit sich brachte. Die Anzahl der Versuche, die in einem definierten Zeitrahmen durchgeführt werden konnten, wurde dadurch wesentlich eingeschränkt. Die mikrobiellen Komplikationen zum Ende der Versuchsreihe führten außerdem dazu, dass die Rezellularisierung mit dynamischen Langzeitkulturen nicht durchführbar waren und die totale Versuchszahl weiter reduzierte. Wie bereits angesprochen waren diese mikrobiellen Geschehnisse jedoch keine Limitation der Methode an sich, sondern stellten ein grundsätzliches Problem dar.

Die Kernidee des gesamten Projektes und die praktische Umsetzung sind kompliziert und technisch anspruchsvoll. Es erforderte daher eine gewisse Einarbeitungszeit, bis die verschiedenen Techniken der einzelnen Arbeitsschritte sicher beherrscht und umgesetzt werden konnten. Trotzdem besaßen einige dieser Arbeitsschritte diverse individuelle Fehlerquellen bei einer gleichzeitig niedrigen Fehlertoleranz, die im schlimmsten Fall zu einer Unbrauchbarkeit des Organes führen konnten. Von besonderer Wichtigkeit war die Luftfreiheit von jeder Flüssigkeit, die im Rahmen jeglicher Arbeitsschritte in das Organ gelangte. Auch kleinste Luftblasen hätten zu einer Zerreißung und folglich zu einer Zerstörung des Parenchyms geführt. Kritische Momente waren daneben insbesondere die Präparation der Rattenniere und die Fixierung des Katheters in der Nierenarterie, Prozedur der Zelleinsaat, das Anbringen des rezellularisierten Organes an den Miniinkubator und der Beginn der dynamischen Kulturbedingungen. Die Umsetzung dieser Arbeitsschritte hing in erster Linie vom Durchführenden ab. Diese Tatsache führte zu einer individuellen Fehleranfälligkeit und dazu, dass die Arbeitsschritte nie vollkommen identisch reproduzierbar waren, sondern sich, wenn auch nur um Nuancen, unterschieden.

5.7 AUSBLICK

Die Endothelzelllinie EA.hy926 diente in den dargestellten grundlegenden Voruntersuchungen als Modellzelle. Eine sinnvolle Erweiterung ist eine vergleichende Versuchsreihe mit der Verwendung von der Endothelzelllinie EA.hy926 und primären Endothelzellen wie HUVECs oder HMVECs. Weiterhin kann die Anwendung auch mit anderen Zelltypen im Sinne einer Cokultur evaluiert werden. Es ist denkbar, dass die gleichzeitige bzw. sukzessive Einsaat von Osteoblasten oder gar Osteosarkomzellen in den Ureter und von Endothelzellen in die Nierenarterie sogar eine Verbesserung des Rezellularisierungserfolges zur Folge haben kann. Möglicherweise können Osteoblasten als akzessorische Zellen die Stabilität der endothelialen Zellen in der Extrazellulärmatrix verbessern. Bevor weitere Rezellularisierungsversuche durchgeführt werden können, muss allerdings die Ursache der oben genannten mikrobiellen Kontamination identifiziert und beseitigt werden.

Mit der automatisierten Dezellularisierungseinheit DecellControl ist es möglich, bis zu vier Rattennieren gleichzeitig dezellularisieren zu lassen. Vor der Etablierung der simultanen Dezellularisierung muss jedoch geprüft werden, ob sie bei allen angehängten Organen vergleichbar erfolgreich ist oder ob sich zwischen den simultan dezellularisierten Organen wesentliche Unterschiede bezüglich dessen Erfolg feststellen lassen. Die Anzahl der gleichzeitig durchführbaren Rezellularisierungsversuche ließe sich dadurch langfristig steigern, was einen erheblichen zeitlichen Benefit für weitere Versuchsreihen hätte.

7 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abbildung 1: Die Triade des Tissue Engineering adaptiert nach O'Brien (2011) bestehend aus Zellen (u.a. primäre Zellen oder Stammzellen), Stimuli (u.a. chemische durch Wachstumsfaktoren oder mechanische durch Bioreaktoren) sowie Scaffolds (u.a. synthetisch oder biologisch)..... 8
- Abbildung 2: Unipapilläre Niere im Transversalschnitt (A) und Axialschnitt (B). C = Cortex, M = Medulla, Rp = Nierenbecken, P = Papille; Die Niere einer Ratte besitzt im Unterschied zur humanen Niere nur eine Papille und wird daher als unipapillär bezeichnet. Abbildung aus (Morawietz, Ruehl-Fehlert et al. 2004)..... 22
- Abbildung 3: Neubauer Zählkammer (A). Die beiden Zählfelder sind blau umrandet. Vergrößerung eines Zählfeldes mit grün/roter Umrandung der vier Großquadrate wobei nur die grünen Grenzlinien in der Zählung berücksichtigt werden (B)..... 30
- Abbildung 4: Schematische Darstellung des Angiogenese Assays. Nach Zugabe und Aushärtung des EMS (blau) werden 2×10^4 Zellen hinzugefügt (rot). Nach anschließender variabler Inkubationszeit erfolgt ein Waschvorgang (grau), die Zugabe des Fluoreszenzfarbstoffes (grün) und die mikroskopische Auswertung..... 32
- Abbildung 5: (A) Präpariertes Organpaket mit Aorta (Ao), Iliakalbifurkation (Bif), Aa. renales (NA) und Ureteren (U). Die schwarzen Linien zeigen die Schnittlokalisationen. (B) Rattenniere mit 20 Gauge Venenverweilkatheter in der A. renalis, der mit drei chirurgischen Knoten fixiert wurde. Die Katheterspitze (rot eingezeichnet) liegt vor der Aufteilung in zwei große Segmentäste (schwarz verstärkt)..... 33
- Abbildung 6: Aufbau der Dezellularisierungseinheit mit folgenden Bestandteilen (von links nach rechts): Spülflüssigkeiten, Vorrichtung mit elektromagnetischen Ventilen, Arthroskopiepumpe und Computer mit der Software DecellControl sowie Reaktor mit angehängten Rattennieren. 34
- Abbildung 7: Der Computerbildschirm während der Einstellung der Parameter für die Dezellularisierung in der Software DecellControl. 36
- Abbildung 8: Schematische Darstellung der Dezellularisierungseinheit und der Flussverhältnisse. Während das destillierte Wasser und das SDS verworfen wird (blauer durchgezogener Pfeil unten rechts), wird das Penicillin Streptomycin in einem geschlossenen

- Kreislauf wiederverwendet (blauer gestrichelter Pfeil mittig unten). Der sonstige Aufbau kann der Abb. 6 entnommen werden. 37
- Abbildung 9: Schematische Darstellung der Zelleinsaat. 2ml Zellsuspension wurden mit 1ml/min über den Venenverweilkatheter in die Nierenarterie eingebracht. Die abgetropfte Suspension wurde anschließend zweimalig aufgezogen und erneut appliziert..... 38
- Abbildung 10: (A) Einzelteile des Miniinkubator. Beim Zusammenbau war insbesondere darauf zu achten, dass zwischen allen adaptierten Teilen eine Gummidichtung verbaut wurde und diese die richtige Spannung besaß. (B) Miniinkubator nach Montage. Dreiwegehahn mit Entlüftungsleitung (Sternchen) und freiem Anschluss, an den nachträglich der zuführende Schenkel des Rollenpumpenschlauches angeschlossen wurde (schwarzer Pfeil). Der abführende Schenkel des Rollenpumpenschlauchs wurde an den metallischen Schlauchadapter angehängt (roter Pfeil)..... 39
- Abbildung 11: Schematische Darstellung der Rezellularisierungseinheit. Der Miniinkubator befindet sich im Brutschrank, der Hauptfluss verläuft der blau durchgezogenen Linie entsprechend. Das Medium gelangte nach Passage des arteriellen Systems über die Vena renalis und Nierenkelchsystem zurück in die Glasschale. Hier wurde es durch den ständigen Sog der Arthroskopiepumpe erneut abgezogen und wiederum in Richtung Miniinkubator transportiert, sodass ein in sich geschlossener Kreislauf vorliegt. Entlüftung und Medienwechsel wurde durch Drehung des Dreiwegehahns ermöglicht (blau gestrichelte Linie)..... 40
- Abbildung 12: Schematische Darstellung der Flussrichtung abhängig von der Stellung des Dreiwegehahnes. (1) Entlüftung, (2) Perfusion, (3) Medienwechsel. Der rote Pfeil gibt jeweils die effektive Flussrichtung an. 41
- Abbildung 13: Schematische Darstellung der Zählung von im Parenchym verbliebenen Endothelzellen. Von mindestens drei histologischen Schnitten auf Objektträgern wurden 20 Bereiche (x20) in 200facher Vergrößerung (200x) betrachtet. Vom Bild werden die obere und die linke Grenzlinie mit in die Zählung einbezogen (grüne Linien), die recht und untere Grenzlinie dagegen nicht (rote Linie). Nur an der Gefäßwand adhärente Zellen werden gezählt (grüner Kreis), sich frei im Lumen befindende Zellen jedoch nicht (roter Kreis). 48
- Abbildung 14: Lichtmikroskopisches Bild des Endothelzelltypes EA.hy926 nach 24-stündiger Kultivierung. Es zeigten sich polygonale Zellen mit länglichen Zytoplasmaausläufern; 200fache Vergrößerung, Maßstabsbalken = 100 µm. 49

- Abbildung 15: Population doubling time des endothelialen Zelltyps EA.hy 926. Nach einer langsamen Adaption und einem unregelmäßigen Zellzyklus zu Beginn der Zellkultur (p1, p2, p3) zeigte sich in der fünften, sechsten und siebten Passage ein gleichmäßiges Bild mit einer Verdopplungszeit von ungefähr einem Tag. 50
- Abbildung 16: Immunozytochemische Färbung des Endothelzelltypes EA.hy926 auf Kammerobjektträgern. Es zeigt sich eine deutliche Positivität für CD-31 (A), für den vWF (B) und PCNA (C), β 1-Integrin (D) und α 4-Integrin (E). 100fache Vergrößerung, Maßstabsbalken = 100 μ m. 51
- Abbildung 17: Mikroskopische Darstellung des in-vitro Angiogenese Assays in 100facher Vergrößerung. A-D: nativ, E-H: Fluoreszenzfarbstoff mit Alexa Fluor 488. Unmittelbar nach Pipettieren von 2×10^4 Endothelzellen auf die Extrazellulär-Matrix-Lösung (t=0min) zeigten sich diese rundlich konfiguriert (A+B). Nach vier Stunden zeigte sich eine beginnende Konfluenz der Zelle mit der Ausbildung länglicher Zytoplasmata (B+F). Nach 10 Stunden waren bereits tubuläre Strukturen (Sterne) zu erkennen (C+G), die nach 18 Stunden geschlossen und dicht erschienen (D+H). Maßstabsbalken = 100 μ m..... 52
- Abbildung 18: Darstellung der Dezellularisierung und Einwirkung der Spülflüssigkeiten auf das Nierenparenchym im zeitlichen Verlauf. Zu Beginn dunkelrotes Parenchym (A), Abblassen durch destilliertes Wasser (B) und SDS (C=15min gesamt, davon 5min SDS & D =30min gesamt, davon 20min SDS). Zur Verbesserung des optischen Kontrastes wurde zum Ende ein schwarzer Hintergrund gewählt. Nach 60 Minuten durchsichtiges Parenchym mit radiären Gefäßen (E). Nach Abschluss des Protokolls erschien das Parenchym fast milchig (F). 54
- Abbildung 19: Histologische Darstellung der Rattenniere nach Durchführung der Dezellularisierung und Schnitt einer nicht-dezellularisierte Niere (B) zum Vergleich. In der H.&E.-Färbung (A) zeigt sich ein physiologisch organisiertes Parenchym ohne sichtbare Verletzungen. In der immunhistochemischen Darstellungen sieht man einen Erhalt von Fibronektin (C), Laminin (D) sowie Kollagen IV (E). 100fache Vergrößerung, Maßstabsbalken = 100 μ m. 55
- Abbildung 20: Photographische Aufnahme während der Rezellularisierung. Der Miniinkubator befindet sich im Brutschrank, zu- und abführende Schläuche verlassen diesen durch ein kleines Loch (links oben). Über dem Deckel des Miniinkubators ist zusätzlich die Entlüftungsleitung (Schleife) zu sehen. Der Dreiwegehahn leitet das ankommende Medium in die angehängt

- Rattenniere, die sich vollständig in Kulturmedium befindet (Vergrößerung rechts) und über den Venenverweilkatheter am Reaktordeckel befestigt ist. 57
- Abbildung 21: Histologische Schnitte (H.&E.) der Rezellularisierung nach vorangegangener Dezellularisierung mit 3% SDS. Es zeigte sich im Rahmen aller Versuche ein weitgehend leeres Parenchym mit nur wenig abgrenzbaren Zellen. Teilweise befinden sich trotz fünftägiger dynamischer Kulturbedingung lose, nicht adhärenente Zellen in den Gefäßlumina (Pfeile). (A) 10 Millionen Zellen, 3 Stunden Adhäsionszeit. Auch durch Verlängerung der Zellzahl auf 20 Millionen und Verlängerung der Adhäsionszeit auf acht Stunden (B) und eine Anpassung auf fünf Stunden (C) veränderte das Bild nur unwesentlich. 50fache Vergrößerung, Maßstabsbalken = 100 µm. 58
- Abbildung 22: Semiquantitative Analyse der Rezellularisierung von 20 zufällig ausgewählten Bereichen nach Dezellularisierung mit 3% SDS. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte für die Zellzahl pro Flächeneinheit. Die linke y-Achse bezieht sich auf die gezählte, absolute Zellzahl (schwarze Balken). Die rechte y-Achse bezieht sich auf die relative Zellzahl und damit der gezählten Zellzahl im Verhältnis zu einer Million applizierten Zellen (grauer Balken). Im Rahmen aller Versuchsnummer zeigte sich ein insuffizienter Rezellularisierungserfolg mit einer maximalen Zellzahl von 13,8 ($\pm 9,7$) Zellen/FE (absolut) und 0,8 ($\pm 0,7$) Zellen/FE (relativ). 60
- Abbildung 23: Histologische Übersichtsschnitte (H.&E.) der Rezellularisierung mit 40 Millionen Zellen und fünf Stunden Adhäsionszeit nach vorangegangener Dezellularisierung mit 0,66% SDS sowie fünf Tagen (A) und (B), 48 Stunden (C) und ohne (D) dynamische Kulturbedingungen in 50facher Vergrößerung, 200fache Vergrößerung in den kleinen Rechtecken. Es zeigte sich ein wesentlich zell dichteres Parenchym mit deutlich mehr an den Gefäßwänden (exemplarisch Sternchen) und in den Glomeruli (exemplarisch Pfeile) adhärenente Zellen. Ohne Perfusion (D) zeigten sich intraluminal Zellkonglomerate. Maßstabsbalken = 100 µm. 61
- Abbildung 24: Immunhistochemische Färbung auf CD-31 (PECAM-1) zeigte eine deutliche Positivität nach 5 Tagen (A + B) und 48 Stunden (C) dynamischer Kulturbedingungen sowie eine negative Isotypenkontrolle (D). 100fache Vergrößerung, Maßstabsbalken = 100 µm. ... 64
- Abbildung 25: Immunhistochemische Färbung auf PCNA zeigte eine deutliche Positivität nach 5 Tagen (A), nach 48 Stunden (B) und ohne (C) dynamische Kulturbedingungen sowie eine negative Isotypenkontrolle (D). 100fache Vergrößerung, Maßstabsbalken = 100 µm. 65

- Abbildung 26: Ergebnisse der Nick-In-Situ-Translation. Während nach fünf Tagen dynamischer Kulturbedingungen (A+B) einzelne Zellen eine leichte rötliche Verfärbung zeigten (Pfeile), war nach 48 Stunden dynamischer Kulturbedingungen (C) keine apoptotische Aktivität erkennbar. 100fache Vergrößerung, Maßstabsbalken = 100 μm 66
- Abbildung 27: Semiquantitative Analyse der Rezellularisierung von 20 zufällig ausgewählten Bereichen nach Dezellularisierung mit 0,66% SDS. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte für die Zellzahl pro Flächeneinheit. Die linke y-Achse bezieht sich auf die gezählte, absolute Zellzahl (schwarze Balken). Die rechte y-Achse bezieht sich auf die relative Zellzahl und damit auf die gezählte Zellzahl im Verhältnis zu einer Million applizierten Zellen (grauer Balken). Beobachtet wurde eine deutliche Verbesserung der Rezellularisierung mit max. 67,3 (± 42) Zellen/FE (absolut) und 1,7 (± 1) Zellen /FE (relativ) nach dynamischen Kulturbedingungen. 67
- Abbildung 28: Vergleich von jeweils drei Versuchsdurchläufen jeder Kohorte (schwarzer Balken: 3% SDS, grauer Balken: 0,66% SDS). Es konnte mehr als eine Verdoppelung der relativen Zellzahl durch Erniedrigung der SDS Konzentration auf 0,66% im Rahmen der Dezellularisierung beobachtet werden. 69
- Abbildung 29: Histologische Darstellung des Nierenparenchyms bei Abbruch der dynamischen Kulturbedingung nach fünf Tagen aufgrund mikrobieller Komplikationen. (B) zeigt dichte Pilzhyphen im Nierenparenchym. (A) zeigt eine weitgehende Verlegung des Lumens der A. renalis. 50fache Vergrößerung, Maßstabsbalken = 100 μm 70

8 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien und deren Hersteller.	25
Tabelle 2: Liste der verwendeten Chemikalien und deren Hersteller.	26
Tabelle 3: Liste der verwendeten Laborgeräte, deren Modelle und der Hersteller.	27
Tabelle 4: Listen der verwendeten primären und sekundären Antikörper, deren Verdünnung und Einwirkzeit sowie der Antikörper für die Isotypenkontrollen.	28
Tabelle 5: Dezellularisierungsprotokoll; * = unterschiedliche Konzentrationen (i.e. 0,66% und 3%) in destilliertem Wasser.	36
Tabelle 6: Deparaffinierung und Rehydrierung.	43
Tabelle 7: Arbeitsschritte im Rahmen der H&E Färbung.	43
Tabelle 8: Primäre Antikörper der Immunochemie mit Verdünnung und Inkubationszeit sowie Herstellerangaben.	45
Tabelle 9: Sekundäre Antikörper der Immunochemie mit Verdünnung, Inkubationszeit sowie Herstellerangaben.	45
Tabelle 10: Agenzien und Rezeptur der einzelnen Lösungen für die Nick-In-Situ-Translation.	47
Tabelle 11: Rezellularisierungsprotokolle nach vorangegangener Dezellularisierung mit 3% SDS.	59
Tabelle 12: Rezellularisierungsprotokolle nach vorangegangener Dezellularisierung mit 0,66% SDS. *Wegen mikrobieller Komplikationen nicht in die Auswertung miteinbezogen.	67
Tabelle 13: Ausgewählte Versuche für die vergleichende Gegenüberstellung der SDS-Konzentration; Die Kulturdauer betrug jeweils fünf Tage.	69

9 LITERATURVERZEICHNIS

Abouna, G M. "Organ shortage crisis: problems and possible solutions." *Transplantation proceedings* vol. 40,1 (2008): 34-8. doi:10.1016/j.transproceed.2007.11.067

Afewerki, S., A. Sheikhi, S. Kannan, S. Ahadian and A. Khademhosseini (2018). "Gelatin-polysaccharide composite scaffolds for 3D cell culture and tissue engineering: Towards natural therapeutics." *Bioengineering & translational medicine* 4(1): 96-115.

Ahn, K., S. Pan, K. Beningo and D. Hupe (1995). "A permanent human cell line (EA.hy926) preserves the characteristics of endothelin converting enzyme from primary human umbilical vein endothelial cells." *Life Sciences* 56(26): 2331-2341.

Aird, W. C. (2007). "Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms." *Circulation research* 100(2): 158-173.

Akhyari, P., H. Aubin, P. Gwanmesia, M. Barth, S. Hoffmann, J. Huelsmann, K. Preuss and A. Lichtenberg (2011). "The Quest for an Optimized Protocol for Whole-Heart Decellularization: A Comparison of Three Popular and a Novel Decellularization Technique and Their Diverse Effects on Crucial Extracellular Matrix Qualities." *Tissue Engineering Part C: Methods* 17(9): 915-926.

Ameri, A., M. N. Kuppaswamy, S. Basu and S. P. Bajaj (1992). "Expression of tissue factor pathway inhibitor by cultured endothelial cells in response to inflammatory mediators." *Blood* 79(12): 3219-3226.

Arendshorst, W., W. Finn and C. Gottschalk (1975). "Autoregulation of blood flow in the rat kidney." *American Journal of Physiology-Legacy Content* 228(1): 127-133.

Atala, A., S. B. Bauer, S. Soker, J. J. Yoo and A. B. Retik (2006). "Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty." *The Lancet* 367(9518): 1241-1246.

Auger, F. A., L. Gibot and D. Lacroix (2013). "The pivotal role of vascularization in tissue engineering." *Annual review of biomedical engineering* 15: 177-200.

Aukland, K., K. H. Tønder and G. Naess (1977). "Capillary pressure in deep and superficial glomeruli of the rat kidney." *Acta physiologica Scandinavica* 101(4): 418-427.

Aust, G., J. Engele, S. Mense and W. Schmidt (2017). Einführung in funktionelle Systeme. In G. Aumüller, G. Aust, A. Conrad, J. Engele and J. Kirsch (Eds.), *Duale Reihe Anatomie* (pp. 112-195). Stuttgart: Thieme.

- Bachmann S., Sakai T., Kriz W. (1986) Nephron and Collecting Duct Structure in the Kidney, Rat. In Jones T.C., Mohr U., Hunt R.D. (Eds.), Urinary System. Monographs on Pathology of Laboratory Animals (pp. 3-24). Berlin, Heidelberg: Springer.
- Badylak SF. The extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Semin Cell Dev Biol.* 2002;13(5):377-383. doi:10.1016/s1084952102000940
- Badylak, S. F., D. Taylor and K. Uygun (2011). "Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds." *Annual review of biomedical engineering* 13: 27-53.
- Baino, F., G. Novajra and C. Vitale-Brovarone (2015). "Bioceramics and Scaffolds: A Winning Combination for Tissue Engineering." *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 3: 202-202.
- Bajaj, M. S., M. N. Kuppuswamy, H. Saito, S. G. Spitzer and S. P. Bajaj (1990). "Cultured normal human hepatocytes do not synthesize lipoprotein-associated coagulation inhibitor: evidence that endothelium is the principal site of its synthesis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87(22): 8869-8873.
- Balaji, S., A. King, T. M. Crombleholme and S. G. Keswani (2013). "The Role of Endothelial Progenitor Cells in Postnatal Vasculogenesis: Implications for Therapeutic Neovascularization and Wound Healing." *Advances in Wound Care* 2(6): 283-295.
- BaoLin, G. and P. X. Ma (2014). "Synthetic biodegradable functional polymers for tissue engineering: a brief review." *Science China. Chemistry* 57(4): 490-500.
- Baptista, P. M., M. M. Siddiqui, G. Lozier, S. R. Rodriguez, A. Atala and S. Soker (2011). "The use of whole organ decellularization for the generation of a vascularized liver organoid." *Hepatology* 53(2): 604-617.
- Baranska, P., H. Jerczynska, Z. Pawlowska, W. Koziolkiewicz and C. s. Cierniewski (2005). "Expression of integrins and adhesive properties of human endothelial cell line EA. hy 926." *Cancer Genomics-Proteomics* 2(5): 265-269.
- Bates, D. O. (2010). "Vascular endothelial growth factors and vascular permeability." *Cardiovascular research* 87(2): 262-271.
- Bauer, J., M. Margolis, C. Schreiner, C.-J. Edgell, J. Azizkhan, E. Lazarowski and R. L. Juliano (1992). "In vitro model of angiogenesis using a human endothelium-derived permanent cell

line: Contributions of induced gene expression, G-proteins, and integrins." *Journal of Cellular Physiology* 153(3): 437-449.

Bell, E. (1993). *Tissue Engineering: Current Perspectives*, Boston: Birkhäuser Boston

Bergers, G. and S. Song (2005). "The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance." *Neuro-oncology* 7(4): 452-464.

Berthiaume, F., T. J. Maguire and M. L. Yarmush (2011). "Tissue Engineering and Regenerative Medicine: History, Progress, and Challenges." *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering* 2(1): 403-430.

Bissell, M. J., H. G. Hall and G. Parry (1982). "How does the extracellular matrix direct gene expression?" *Journal of theoretical biology* 99(1): 31-68.

Bitar, K. N. and E. Zakhem (2014). "Design strategies of biodegradable scaffolds for tissue regeneration." *Biomedical engineering and computational biology* 6: 13-20.

Bonandrini, B., M. Figliuzzi, E. Papadimou, M. Morigi, N. Perico, F. Casiraghi, C. Dipl, F. Sangalli, S. Conti and A. Benigni (2014). "Recellularization of well-preserved acellular kidney scaffold using embryonic stem cells." *Tissue Engineering Part A* 20(9-10): 1486-1498.

Boots, J. M. M., M. H. L. Christiaans and J. P. van Hooff (2004). "Effect of Immunosuppressive Agents on Long-Term Survival of Renal Transplant Recipients." *Drugs* 64(18): 2047-2073.

Bosman, F. T. and I. Stamenkovic (2003). "Functional structure and composition of the extracellular matrix." *The Journal of Pathology* 200(4): 423-428.

Bouis, D., G. A. Hospers, C. Meijer, G. Molema and N. H. Mulder (2001). "Endothelium in vitro: a review of human vascular endothelial cell lines for blood vessel-related research." *Angiogenesis* 4(2): 91-102.

Boyce, S. T. and A. L. Lalley (2018). "Tissue engineering of skin and regenerative medicine for wound care." *Burns & trauma* 6: 4-4.

Brenner, B. M., J. L. Troy and T. M. Daugharty (1971). "The dynamics of glomerular ultrafiltration in the rat." *The Journal of clinical investigation* 50(8): 1776-1780.

Brindle, N. P. J., P. Saharinen and K. Alitalo (2006). "Signaling and functions of angiopoietin-1 in vascular protection." *Circulation research* 98(8): 1014-1023.

Burgkart, R., A. Tron, P. Prodingler, M. Culmes, J. Tuebel, M. van Griensven, B. Saldamli and A. Schmitt (2014). "Decellularized kidney matrix for perfused bone engineering." *Tissue Engineering Part C: Methods* 20(7): 553-561.

Cantarovich, F. (2002). "Improvement in organ shortage through education." *Transplantation* 73(11): 1844-1846.

Caralt, M., J. S. Uzarski, S. Jacob, K. P. Obergfell, N. Berg, B. M. Bijonowski, K. M. Kiefer, H. H. Ward, A. Wandinger-Ness, W. M. Miller, Z. J. Zhang, M. M. Abecassis and J. A. Wertheim (2015). "Optimization and Critical Evaluation of Decellularization Strategies to Develop Renal Extracellular Matrix Scaffolds as Biological Templates for Organ Engineering and Transplantation." *American Journal of Transplantation* 15(1): 64-75.

Caralt, M., J. S. Uzarski, S. Jacob, K. P. Obergfell, N. Berg, B. M. Bijonowski, K. M. Kiefer, H. H. Ward, A. Wandinger-Ness, W. M. Miller, Z. J. Zhang, M. M. Abecassis and J. A. Wertheim (2015). "Optimization and critical evaluation of decellularization strategies to develop renal extracellular matrix scaffolds as biological templates for organ engineering and transplantation." *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 15(1): 64-75.

Carmeliet, P. (2000). "Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis." *Nature Medicine* 6(4): 389-395.

Carpenter, R. A., J.-G. Kwak, S. R. Peyton and J. Lee (2018). "Implantable pre-metastatic niches for the study of the microenvironmental regulation of disseminated human tumour cells." *Nature Biomedical Engineering* 2(12): 915-929.

Caughey, G. E., L. G. Cleland, P. S. Penglis, J. R. Gamble and M. J. James (2001). "Roles of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in prostanoid production by human endothelial cells: selective up-regulation of prostacyclin synthesis by COX-2." *The Journal of Immunology* 167(5): 2831-2838.

Cebotari, S., I. Tudorache, T. Jaekel, A. Hilfiker, S. Dorfman, W. Ternes, A. Haverich and A. Lichtenberg (2010). "Detergent Decellularization of Heart Valves for Tissue Engineering: Toxicological Effects of Residual Detergents on Human Endothelial Cells." *Artificial Organs* 34(3): 206-210.

Chan, B. and K. Leong (2008). "Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations." *European spine journal* 17(4): 467-479.

- Chen, G., Y. Qi, L. Niu, T. Di, J. Zhong, T. Fang and W. Yan (2015). "Application of the cell sheet technique in tissue engineering." *Biomedical reports* 3(6): 749-757.
- Chen, X., D.-B. Cho and P.-C. Yang (2010). "Double staining immunohistochemistry." *North American journal of medical sciences* 2(5): 241-245.
- Chiquet-Ehrismann, R. and R. P. Tucker (2004). "Connective tissues: signalling by tenascins." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36(6): 1085-1089.
- Choi, S. H., S. Y. Chun, S. Y. Chae, J. R. Kim, S. H. Oh, S. K. Chung, J. H. Lee, P. H. Song, G.-S. Choi, T.-H. Kim and T. G. Kwon (2015). "Development of a porcine renal extracellular matrix scaffold as a platform for kidney regeneration." *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 103(4): 1391-1403.
- Ciampi, O., B. Bonandrini, M. Derosas, S. Conti, P. Rizzo, V. Benedetti, M. Figliuzzi, A. Remuzzi, A. Benigni and G. Remuzzi (2019). "Engineering the vasculature of decellularized rat kidney scaffolds using human induced pluripotent stem cell-derived endothelial cells." *Scientific reports* 9(1): 8001.
- Ciampi, O., B. Bonandrini, M. Derosas, S. Conti, P. Rizzo, V. Benedetti, M. Figliuzzi, A. Remuzzi, A. Benigni, G. Remuzzi and S. Tomasoni (2019). "Engineering the vasculature of decellularized rat kidney scaffolds using human induced pluripotent stem cell-derived endothelial cells." *Scientific Reports* 9(1): 8001.
- Cines, D. B., E. S. Pollak, C. A. Buck, J. Loscalzo, G. A. Zimmerman, R. P. McEver, J. S. Pober, T. M. Wick, B. A. Konkle and B. S. Schwartz (1998). "Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders." *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* 91(10): 3527-3561.
- Collins, M. N. and C. Birkinshaw (2013). "Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering—A review." *Carbohydrate Polymers* 92(2): 1262-1279.
- Costa-Almeida, R., P. Granja, R. Soares and S. Guerreiro (2014). "Cellular strategies to promote vascularisation in tissue engineering applications." *Eur Cell Mater* 28: 51-66.
- Crapo, P. M., T. W. Gilbert and S. F. Badylak (2011). "An overview of tissue and whole organ decellularization processes." *Biomaterials* 32(12): 3233-3243.
- Desjardins, M. R. and M. B. Hurtig (1990). "Cartilage healing: A review with emphasis on the equine model." *The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne* 31(8): 565-572.

- Destefani, A. C., G. M. Sirtoli and B. V. Nogueira (2017). "Advances in the knowledge about kidney decellularization and repopulation." *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 5: 34.
- Devalliere, J., Y. Chen, K. Dooley, M. L. Yarmush and B. E. Uygun (2018). "Improving functional re-endothelialization of acellular liver scaffold using REDV cell-binding domain." *Acta biomaterialia* 78: 151-164.
- Discher, D. E., P. Janmey and Y.-l. Wang (2005). "Tissue Cells Feel and Respond to the Stiffness of Their Substrate." *Science* 310(5751): 1139-1143.
- Dodge, A. B., H. B. Hechtman and D. Shepro (1991). "Microvascular endothelial-derived autacoids regulate pericyte contractility." *Cell motility and the cytoskeleton* 18(3): 180-188.
- Donovan, D., N. Brown, E. Bishop and C. Lewis (2001). "Comparison of three in vitro human 'angiogenesis' assays with capillaries formed in vivo." *Angiogenesis* 4(2): 113-121.
- Du, C., K. Narayanan, M. F. Leong, M. S. Ibrahim, Y. P. Chua, V. M. H. Khoo and A. C. A. Wan (2016). "Functional Kidney Bioengineering with Pluripotent Stem-Cell-Derived Renal Progenitor Cells and Decellularized Kidney Scaffolds." *Advanced Healthcare Materials* 5(16): 2080-2091.
- Duncan, M. D. and D. S. Wilkes (2005). "Transplant-related immunosuppression: a review of immunosuppression and pulmonary infections." *Proceedings of the American Thoracic Society* 2(5): 449-455.
- Eckes, B., Nischt, R., & Krieg, T. (2010). Cell-matrix interactions in dermal repair and scarring. *Fibrogenesis & tissue repair*, 3(1), 1-11.
- Edgell, C.-J. S., J. E. Haizlip, C. R. Bagnell, J. P. Packenham, P. Harrison, B. Wilbourn and V. J. Madden (1990). "Endothelium specific Weibel-Palade bodies in a continuous human cell line, EA. hy926." *In vitro cellular & developmental biology* 26(12): 1167-1172.
- Edgell, C. J., C. C. McDonald and J. B. Graham (1983). "Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80(12): 3734-3737.
- Ehmke, H. (2019). Funktion des Kreislaufsystems. In H.-C. Pape, A. Kurtz and S. Silbernagl (Eds.), *Physiologie* (pp. 217-218), Stuttgart: Thieme.

- Eltom, A., G. Zhong and A. Muhammad (2019). "Scaffold Techniques and Designs in Tissue Engineering Functions and Purposes: A Review." *Advances in Materials Science and Engineering* 2019.
- Emeis, J. and C. Edgell (1988). "Fibrinolytic properties of a human endothelial hybrid cell line (Ea. hy 926)." *Blood* 71(6): 1669-1675.
- Engler, A. J., S. Sen, H. L. Sweeney and D. E. Discher (2006). "Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification." *Cell* 126(4): 677-689.
- Esmon, C. T. and W. G. Owen (1981). "Identification of an endothelial cell cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78(4): 2249-2252.
- Faulk, D. M., C. A. Carruthers, H. J. Warner, C. R. Kramer, J. E. Reing, L. Zhang, A. D'Amore and S. F. Badylak (2014). "The effect of detergents on the basement membrane complex of a biologic scaffold material." *Acta biomaterialia* 10(1): 183-193.
- Feletou, M. and P. M. Vanhoutte (1988). "Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle." *British journal of pharmacology* 93(3): 515-524.
- Figliuzzi, M., B. Bonandrini and A. Remuzzi (2017). "Decellularized kidney matrix as functional material for whole organ tissue engineering." *Journal of applied biomaterials & functional materials* 15(4): e326-e333.
- Fischbach, C., R. Chen, T. Matsumoto, T. Schmelzle, J. S. Brugge, P. J. Polverini and D. J. Mooney (2007). "Engineering tumors with 3D scaffolds." *Nature Methods* 4(10): 855-860.
- Fishman, J. A. and R. H. Rubin (1998). "Infection in Organ-Transplant Recipients." *New England Journal of Medicine* 338(24): 1741-1751.
- Fogerty, F. J., S. K. Akiyama, K. M. Yamada and D. F. Mosher (1990). "Inhibition of binding of fibronectin to matrix assembly sites by anti-integrin (alpha 5 beta 1) antibodies." *The Journal of cell biology* 111(2): 699-708.
- Folkman, J. (1995). "Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease." *Nature medicine* 1(1): 27.
- Fraisl, P., M. Mazzone, T. Schmidt and P. Carmeliet (2009). "Regulation of Angiogenesis by Oxygen and Metabolism." *Developmental Cell* 16(2): 167-179.

- Frantz, C., K. M. Stewart and V. M. Weaver (2010). "The extracellular matrix at a glance." *Journal of cell science* 123(Pt 24): 4195-4200.
- Gallico, G. G., N. E. O'Connor, C. C. Compton, O. Kehinde and H. Green (1984). "Permanent Coverage of Large Burn Wounds with Autologous Cultured Human Epithelium." *New England Journal of Medicine* 311(7): 448-451.
- Ganguly, A., H. Zhang, R. Sharma, S. Parsons and K. D. Patel (2012). "Isolation of human umbilical vein endothelial cells and their use in the study of neutrophil transmigration under flow conditions." *Journal of visualized experiments : JoVE*(66): e4032-e4032.
- Gilbert, T. W., T. L. Sellaro and S. F. Badylak (2006). "Decellularization of tissues and organs." *Biomaterials* 27(19): 3675-3683.
- Gilpin, A. and Y. Yang (2017). "Decellularization Strategies for Regenerative Medicine: From Processing Techniques to Applications." *BioMed research international* 2017: 9831534-9831534.
- Gloria, A., R. De Santis and L. Ambrosio (2010). "Polymer-based Composite Scaffolds for Tissue Engineering." *Journal of Applied Biomaterials and Biomechanics* 8(2): 57-67.
- Glowacki, J. and S. Mizuno (2008). "Collagen scaffolds for tissue engineering." *Biopolymers* 89(5): 338-344.
- Gold, R., M. Schmied, G. Rothe, H. Zischler, H. Breitschopf, H. Wekerle and H. Lassmann (1993). "Detection of DNA fragmentation in apoptosis: application of in situ nick translation to cell culture systems and tissue sections." *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 41(7): 1023-1030.
- Goodarzi, P., K. Falahzadeh, M. Nematizadeh, P. Farazandeh, M. Payab, B. Larijani, A. Tayanloo Beik and B. Arjmand (2018). *Tissue Engineered Skin Substitutes. Cell Biology and Translational Medicine, Volume 3: Stem Cells, Bio-materials and Tissue Engineering*. K. Turksen. Cham, Springer International Publishing: 143-188.
- Goodwin, A. M. (2007). "In vitro assays of angiogenesis for assessment of angiogenic and anti-angiogenic agents." *Microvascular research* 74(2-3): 172-183.
- Gordon, M. K. and R. A. Hahn (2010). "Collagens." *Cell and tissue research* 339(1): 247.

- Green, H., O. Kehinde and J. Thomas (1979). "Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76(11): 5665-5668.
- Grinyó, J. M. (2013). "Why is organ transplantation clinically important?" *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 3(6): a014985.
- Gunatillake, P. A. and R. Adhikari (2003). "Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering." *Eur Cell Mater* 5(1): 1-16.
- Guyette, J. P., S. E. Gilpin, J. M. Charest, L. F. Tapias, X. Ren and H. C. Ott (2014). "Perfusion decellularization of whole organs." *Nature Protocols* 9: 1451.
- Haefliger, I., A. Zschauer and D. R. Anderson (1994). "Relaxation of retinal pericyte contractile tone through the nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway." *Investigative ophthalmology & visual science* 35(3): 991-997.
- Hallmann, R., N. Horn, M. Selg, O. Wendler, F. Pausch and L. M. Sorokin (2005). "Expression and Function of Laminins in the Embryonic and Mature Vasculature." *Physiological Reviews* 85(3): 979-1000.
- He, M. and A. Callanan (2012). "Comparison of methods for whole-organ decellularization in tissue engineering of bioartificial organs." *Tissue Engineering Part B: Reviews* 19(3): 194-208.
- He, M., A. Callanan, K. Lagaras, J. Steele and M. Stevens (2017). "Optimization of SDS exposure on preservation of ECM characteristics in whole organ decellularization of rat kidneys." *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 105(6): 1352-1360.
- Heineken, F. G. and R. Skalak (1991). "Tissue Engineering: A Brief Overview." *Journal of Biomechanical Engineering* 113(2): 111-112.
- Hentze, H., P. L. Soong, S. T. Wang, B. W. Phillips, T. C. Putti and N. R. Dunn (2009). "Teratoma formation by human embryonic stem cells: Evaluation of essential parameters for future safety studies." *Stem Cell Research* 2(3): 198-210.
- Hussein, K. H., K.-M. Park, K.-S. Kang and H.-M. Woo (2016). "Heparin-gelatin mixture improves vascular reconstruction efficiency and hepatic function in bioengineered livers." *Acta Biomaterialia* 38: 82-93.

- Hynes, R. O. (1992). "Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion." *Cell* 69(1): 11-25.
- Hynes, R. O. (2009). "The extracellular matrix: not just pretty fibrils." *Science* 326(5957): 1216-1219.
- Ilan, N., L. Cheung, E. Pinter and J. A. Madri (2000). "Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31), a scaffolding molecule for selected catenin family members whose binding is mediated by different tyrosine and serine/threonine phosphorylation." *Journal of Biological Chemistry* 275(28): 21435-21443.
- Jaffe, E. A., R. L. Nachman, C. G. Becker and C. R. Minick (1973). "Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria." *The Journal of clinical investigation* 52(11): 2745-2756.
- Jain, R. K., P. Au, J. Tam, D. G. Duda and D. Fukumura (2005). "Engineering vascularized tissue." *Nature Biotechnology* 23(7): 821-823.
- Järveläinen, H., A. Sainio, M. Koulu, T. N. Wight and R. Penttinen (2009). "Extracellular matrix molecules: potential targets in pharmacotherapy." *Pharmacological reviews* 61(2): 198-223.
- Jensen, G., C. Morrill and Y. Huang (2018). "3D tissue engineering, an emerging technique for pharmaceutical research." *Acta pharmaceutica Sinica. B* 8(5): 756-766.
- Kennedy-Lydon, T., C. Crawford, S. S. Wildman and C. M. Peppiatt-Wildman (2013). "Renal pericytes: regulators of medullary blood flow." *Acta physiologica* 207(2): 212-225.
- Khetani, S. R., D. R. Berger, K. R. Ballinger, M. D. Davidson, C. Lin and B. R. Ware (2015). "Microengineered liver tissues for drug testing." *Journal of laboratory automation* 20(3): 216-250.
- Kimlin, L. C., G. Casagrande and V. M. Virador (2013). "In vitro three-dimensional (3D) models in cancer research: an update." *Molecular carcinogenesis* 52(3): 167-182.
- Klagsbrun, M. and P. D'amore (1991). "Regulators of angiogenesis." *Annual review of physiology* 53(1): 217-239.
- Kleinman, H. K., M. L. McGarvey, L. A. Liotta, P. G. Robey, K. Tryggvason and G. R. Martin (1982). "Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma." *Biochemistry* 21(24): 6188-6193.

- Ko, I. K., M. Abolbashari, J. Huling, C. Kim, S.-H. Mirmalek-Sani, M. Moradi, G. Orlando, J. D. Jackson, T. Aboushwareb, S. Soker, J. J. Yoo and A. Atala (2014). "Enhanced re-endothelialization of acellular kidney scaffolds for whole organ engineering via antibody conjugation of vasculatures." *Technology* 02(03): 243-253.
- Kular, J. K., Basu, S., & Sharma, R. I. (2014). The extracellular matrix: Structure, composition, age-related differences, tools for analysis and applications for tissue engineering. *Journal of Tissue Engineering*. <https://doi.org/10.1177/2041731414557112>
- Langer, R. and J. Vacanti (1993). "Tissue engineering." *Science* 260(5110): 920-926.
- Lawley, T. J. and Y. Kubota (1989). "Induction of Morphologic Differentiation of Endothelial Cells in Culture." *Journal of Investigative Dermatology* 93(2, Supplement): S59-S61.
- Lechler, R. I., M. Sykes, A. W. Thomson and L. A. Turka (2005). "Organ transplantation—how much of the promise has been realized?" *Nature Medicine* 11(6): 605-613.
- Lee, J.-H., & Kim, H.-W. (2018). Emerging properties of hydrogels in tissue engineering. *Journal of Tissue Engineering*. <https://doi.org/10.1177/2041731418768285>
- Leuning, D. G., F. M. R. Witjas, M. Maanaoui, A. M. A. de Graaf, E. Lievers, T. Geuens, C. M. Avramut, L. E. Wiersma, C. W. van den Berg, W. M. P. J. Sol, H. de Boer, G. Wang, V. L. S. LaPointe, J. van der Vlag, C. van Kooten, B. M. van den Berg, M. H. Little, M. A. Engelse and T. J. Rabelink (2019). "Vascular bioengineering of scaffolds derived from human discarded transplant kidneys using human pluripotent stem cell-derived endothelium." *American Journal of Transplantation* 19(5): 1328-1343.
- Li, W., D. J. Johnson, C. T. Esmon and J. A. Huntington (2004). "Structure of the antithrombin–thrombin–heparin ternary complex reveals the antithrombotic mechanism of heparin." *Nature structural & molecular biology* 11(9): 857.
- Lichtenberg, A., S. Cebotari, I. Tudorache, G. Sturz, M. Winterhalter, A. Hilfiker and A. Haverich (2006). "Flow-dependent re-endothelialization of tissue-engineered heart valves." *Journal of Heart Valve Disease* 15(2): 287.
- Lidington, E. A., D. L. Moyes, A. M. McCormack and M. L. Rose (1999). "A comparison of primary endothelial cells and endothelial cell lines for studies of immune interactions." *Transplant Immunology* 7(4): 239-246.

- Lieu, C., J. Heymach, M. Overman, H. Tran and S. Kopetz (2011). "Beyond VEGF: inhibition of the fibroblast growth factor pathway and antiangiogenesis." *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 17(19): 6130-6139.
- Lindblom, P., H. Gerhardt, S. Liebner, A. Abramsson, M. Enge, M. Hellström, G. Bäckström, S. Fredriksson, U. Landegren and H. C. Nyström (2003). "Endothelial PDGF-B retention is required for proper investment of pericytes in the microvessel wall." *Genes & development* 17(15): 1835-1840.
- Liu, C., S. Liu, A. Xu, Y. Kang, S. Zheng and H. Li (2009). "Preparation of whole-kidney acellular matrix in rats by perfusion." *Nan fang yi ke da xue xue bao= Journal of Southern Medical University* 29(5): 979-982.
- Long, D. M. (1970). Capillary Ultrastructure and the Blood-Brain Barrier in Human Malignant Brain Tumors, *Journal of Neurosurgery*, 32(2), 127-144.
- Lovett, M., K. Lee, A. Edwards and D. L. Kaplan (2009). "Vascularization strategies for tissue engineering." *Tissue Engineering Part B: Reviews* 15(3): 353-370.
- Lu, Z. J., Y. Q. Ren, G. P. Wang, Q. Song, M. Li, S. S. Jiang, T. Ning, Y. S. Guan, J. L. Yang and F. Luo (2009). "Biological behaviors and proteomics analysis of hybrid cell line EAhy926 and its parent cell line A549." *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* 28(1): 16-16.
- Lüllmann-Rauch, R. and E. Asan (2019). *Taschenlehrbuch Histologie*. Stuttgart: Thieme.
- Lwebuga-Mukasa, J. S., D. H. Ingbar and J. A. Madri (1986). "Repopulation of a human alveolar matrix by adult rat type II pneumocytes in vitro: a novel system for type II pneumocyte culture." *Experimental cell research* 162(2): 423-435.
- Macchiarini, P., P. Jungebluth, T. Go, M. A. Asnaghi, L. E. Rees, T. A. Cogan, A. Dodson, J. Martorell, S. Bellini, P. P. Parnigotto, S. C. Dickinson, A. P. Hollander, S. Mantero, M. T. Conconi and M. A. Birchall (2008). "Clinical transplantation of a tissue-engineered airway." *The Lancet* 372(9655): 2023-2030.
- Macmull, S., M. T. Parratt, G. Bentley, J. A. Skinner, R. W. Carrington, T. Morris and T. W. Briggs (2011). "Autologous chondrocyte implantation in the adolescent knee." *The American journal of sports medicine* 39(8): 1723-1731.
- Magnusson, J. P., A. O. Saeed, F. Fernández-Trillo and C. Alexander (2011). "Synthetic polymers for biopharmaceutical delivery." *Polymer Chemistry* 2(1): 48-59.

- Mahieu, I., A. Sagggar-Malik, E. Hollande and N. Carter (1995). Localisation and characterisation of carbonic anhydrase isozymes (CA I. CA II. CA III and CA IV) in an umbilical vein endothelial cell line (EA-hy926). *Biochem Soc Trans*; 23 (2): 308S. doi: <https://doi.org/10.1042/bst023308s>
- Martin, I., D. Wendt and M. Heberer (2004). "The role of bioreactors in tissue engineering." *Trends in Biotechnology* 22(2): 80-86.
- Matei, I., S. Rampersaud and D. Lyden (2018). "Engineered niches model the onset of metastasis." *Nature biomedical engineering* 2(12): 885.
- Mecham, R.P. (1998), Overview of Extracellular Matrix. *Current Protocols in Cell Biology*, 00: 10.1.1-10.1.14. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb1001s00>
- Mendoza-Novelo, B., E. E. Avila, J. V. Cauich-Rodríguez, E. Jorge-Herrero, F. J. Rojo, G. V. Guinea and J. L. Mata-Mata (2011). "Decellularization of pericardial tissue and its impact on tensile viscoelasticity and glycosaminoglycan content." *Acta Biomaterialia* 7(3): 1241-1248.
- Mhanna, R. and A. Hasan (2017). "Introduction to tissue engineering." *Tissue Engineering for Artificial Organs: Regenerative Medicine, Smart Diagnostics and Personalized Medicine* 1: 1-34.
- Michiels, C. (2003). "Endothelial cell functions." *Journal of Cellular Physiology* 196(3): 430-443.
- Min, S., I. K. Ko and J. J. Yoo (2019). "State-of-the-Art Strategies for the Vascularization of Three-Dimensional Engineered Organs." *Vascular specialist international* 35(2): 77-89.
- Min, S., I. K. Ko and J. J. Yoo (2019). "State-of-the-Art Strategies for the Vascularization of Three-Dimensional Engineered Organs." *Vascular specialist international* 35(2): 77.
- Miyamoto, S., B.-Z. Kathz, R. M. Lafrenie and K. M. Yamada (1998). "Fibronectin and Integrins in Cell Adhesion, Signaling, and Morphogenesis." *Annals of the New York Academy of Sciences* 857(1): 119-129.
- Morawietz, G., C. Ruehl-Fehlert, B. Kittel, A. Bube, K. Keane, S. Halm, A. Heuser and J. Hellmann (2004). "Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice—Part 3: A joint publication of the RITA) and NACAD) groups." *Experimental and Toxicologic Pathology* 55(6): 433-449.

- Motte, S., K. McEntee and R. Naeije (2006). "Endothelin receptor antagonists." *Pharmacology & therapeutics* 110(3): 386-414.
- Murphy, Ciara & O'Brien, Fergal & Little, David & Schindeler, Aaron. (2013). Cell-scaffold interactions in the bone tissue engineering triad. *European cells & materials*. 26. 120-32. 10.22203/eCM.v026a09.
- Mutin, M., F. Dignat-George and J. Sampol (1997). "Immunologic phenotype of cultured endothelial cells: quantitative analysis of cell surface molecules." *Tissue Antigens* 50(5): 449-458.
- Naahidi, S., M. Jafari, M. Logan, Y. Wang, Y. Yuan, H. Bae, B. Dixon and P. Chen (2017). "Biocompatibility of hydrogel-based scaffolds for tissue engineering applications." *Biotechnology Advances* 35(5): 530-544.
- Nagata, S., R. Hanayama and K. Kawane (2010). "Autoimmunity and the Clearance of Dead Cells." *Cell* 140(5): 619-630.
- Naito, H., M. Yoshimura, T. Mizuno, S. Takasawa, T. Tojo and S. Taniguchi (2013). "The advantages of three-dimensional culture in a collagen hydrogel for stem cell differentiation." *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 101(10): 2838-2845.
- Nakayama, K. H., C. C. I. Lee, C. A. Batchelder and A. F. Tarantal (2013). "Tissue specificity of decellularized rhesus monkey kidney and lung scaffolds." *PloS one* 8(5): e64134.
- Nawroth, P. P., D. A. Handley, C. T. Esmon and D. M. Stern (1986). "Interleukin 1 induces endothelial cell procoagulant while suppressing cell-surface anticoagulant activity." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 83(10): 3460-3464.
- Newman, P. J. (1997). "The biology of PECAM-1." *The Journal of clinical investigation* 99(1): 3-8.
- Nicodemus, G. D. and S. J. Bryant (2008). "Cell encapsulation in biodegradable hydrogels for tissue engineering applications." *Tissue engineering. Part B, Reviews* 14(2): 149-165.
- Novosel, E. C., C. Kleinans and P. J. Kluger (2011). "Vascularization is the key challenge in tissue engineering." *Advanced drug delivery reviews* 63(4-5): 300-311.
- Nyga, A., U. Cheema and M. Loizidou (2011). "3D tumour models: novel in vitro approaches to cancer studies." *Journal of cell communication and signaling* 5(3): 239-248.

- O'Brien, F. J. (2011). "Biomaterials & scaffolds for tissue engineering." *Materials today* 14(3): 88-95.
- Okada, H., G. Takemura, K. Suzuki, K. Oda, C. Takada, Y. Hotta, N. Miyazaki, A. Tsujimoto, I. Muraki, Y. Ando, R. Zaikokuji, A. Matsumoto, H. Kitagaki, Y. Tamaoki, T. Usui, T. Doi, T. Yoshida, S. Yoshida, H. Ushikoshi, I. Toyoda and S. Ogura (2017). "Three-dimensional ultrastructure of capillary endothelial glycocalyx under normal and experimental endotoxemic conditions." *Critical care (London, England)* 21(1): 261-261.
- Okano, T., N. Yamada, M. Okuhara, H. Sakai and Y. Sakurai (1995). "Mechanism of cell detachment from temperature-modulated, hydrophilic-hydrophobic polymer surfaces." *Biomaterials* 16(4): 297-303.
- Otene, C. I., P. B. Olaitan, I. S. Ogbonnaya and R. E. Nnabuko (2011). "Donor site morbidity following harvest of split-thickness skin grafts in south eastern nigeria." *Journal of the West African College of Surgeons* 1(2): 86-96.
- Ott, H. C., T. S. Matthiesen, S.-K. Goh, L. D. Black, S. M. Kren, T. I. Netoff and D. A. Taylor (2008). "Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart." *Nature Medicine* 14(2): 213-221.
- Patarroyo, M., K. Tryggvason and I. Virtanen (2002). "Laminin isoforms in tumor invasion, angiogenesis and metastasis." *Seminars in Cancer Biology* 12(3): 197-207.
- Pearson, J. D., J. S. Carleton and J. L. Gordon (1980). "Metabolism of adenine nucleotides by ectoenzymes of vascular endothelial and smooth-muscle cells in culture." *Biochemical Journal* 190(2): 421.
- Pellegata, A. F., M. A. Asnaghi, S. Zonta, G. Zerbini and S. Mantero (2012). "A Novel Device for the Automatic Decellularization of Biological Tissues." *The International Journal of Artificial Organs* 35(3): 191-198.
- Pellegata, A. F., T. Dominioni, F. Ballo, S. Maestroni, M. A. Asnaghi, G. Zerbini, S. Zonta and S. Mantero (2014). "Arterial Decellularized Scaffolds Produced Using an Innovative Automatic System." *Cells Tissues Organs* 200(6): 363-373.
- Pellegata, A. F., A. M. Tedeschi and P. De Coppi (2018). "Whole organ tissue vascularization: engineering the tree to develop the fruits." *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 6.
- Petersen, T. H., E. A. Calle, M. B. Colehour and L. E. Niklason (2012). "Matrix composition and mechanics of decellularized lung scaffolds." *Cells, tissues, organs* 195(3): 222-231.

- Petersen, T. H., E. A. Calle, L. Zhao, E. J. Lee, L. Gui, M. B. Raredon, K. Gavrillov, T. Yi, Z. W. Zhuang and C. Breuer (2010). "Tissue-engineered lungs for in vivo implantation." *Science* 329(5991): 538-541.
- Pober, j. s. and r. s. Cotran (1990). "The role of endothelial cells in inflammation." *Transplantation* 50(4): 537-544.
- Pober, J. S. and W. C. Sessa (2007). "Evolving functions of endothelial cells in inflammation." *Nature Reviews Immunology* 7(10): 803-815.
- Price, A. P., K. A. England, A. M. Matson, B. R. Blazar and A. Panoskaltsis-Mortari (2010). "Development of a decellularized lung bioreactor system for bioengineering the lung: the matrix reloaded." *Tissue engineering Part A* 16(8): 2581-2591.
- Price, A. P., L. M. Godin, A. Domek, T. Cotter, J. D'Cunha, D. A. Taylor and A. Panoskaltsis-Mortari (2014). "Automated decellularization of intact, human-sized lungs for tissue engineering." *Tissue Engineering Part C: Methods* 21(1): 94-103.
- Ratner, B. D. and S. J. Bryant (2004). "Biomaterials: Where We Have Been and Where We Are Going." *Annual Review of Biomedical Engineering* 6(1): 41-75.
- Raya-Rivera, A., D. R. Esquiliano, J. J. Yoo, E. Lopez-Bayghen, S. Soker and A. Atala (2011). "Tissue-engineered autologous urethras for patients who need reconstruction: an observational study." *Lancet (London, England)* 377(9772): 1175-1182.
- Reing, J. E., B. N. Brown, K. A. Daly, J. M. Freund, T. W. Gilbert, S. X. Hsiong, A. Huber, K. E. Kullas, S. Tottey and M. T. Wolf (2010). "The effects of processing methods upon mechanical and biologic properties of porcine dermal extracellular matrix scaffolds." *Biomaterials* 31(33): 8626-8633.
- Remuzzi, A., M. Figliuzzi, B. Bonandrini, S. Silvani, N. Azzollini, R. Nossa, A. Benigni and G. Remuzzi (2017). "Experimental Evaluation of Kidney Regeneration by Organ Scaffold Recellularization." *Scientific Reports* 7: 43502.
- Rheinwatd, J. G. and H. Green (1975). "Seria cultivation of strains of human epidemal keratinocytes: the formation keratinizin colonies from single cell is." *Cell* 6(3): 331-343.
- Rider, P., Ž. P. Kačarević, S. Alkildani, S. Retnasingh and M. Barbeck (2018). "Bioprinting of tissue engineering scaffolds." *Journal of tissue engineering* 9: 2041731418802090-2041731418802090.

- Riede, U., Blum, H., Freudenberg, N. (2009). Adaptationsmuster. In U. Riede, H. Blum, N. Freudenberg (Eds.), *Basiswissen Allgemeine und Spezielle Pathologie*. Berlin, Heidelberg: Springer.
- Rigby, P. W. J., M. Dieckmann, C. Rhodes and P. Berg (1977). "Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I." *Journal of Molecular Biology* 113(1): 237-251.
- Risau, W. (1997). "Mechanisms of angiogenesis." *Nature* 386(6626): 671.
- Risau, W. and I. Flamme (1995). "Vasculogenesis." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 11(1): 73-91.
- Rondaij, M. G., R. Bierings, A. Kragt, J. A. van Mourik and J. Voorberg (2006). "Dynamics and plasticity of Weibel-Palade bodies in endothelial cells." *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 26(5): 1002-1007.
- Ross, E. A., D. R. Abrahamson, P. St. John, W. L. Clapp, M. J. Williams, N. Terada, T. Hamazaki, G. W. Ellison and C. D. Batich (2012). "Mouse stem cells seeded into decellularized rat kidney scaffolds endothelialize and remodel basement membranes." *Organogenesis* 8(2): 49-55.
- Ross, E. A., M. J. Williams, T. Hamazaki, N. Terada, W. L. Clapp, C. Adin, G. W. Ellison, M. Jorgensen and C. D. Batich (2009). "Embryonic stem cells proliferate and differentiate when seeded into kidney scaffolds." *Journal of the American Society of Nephrology* 20(11): 2338-2347.
- Ross, E. A., M. J. Williams, T. Hamazaki, N. Terada, W. L. Clapp, C. Adin, G. W. Ellison, M. Jorgensen and C. D. Batich (2009). "Embryonic stem cells proliferate and differentiate when seeded into kidney scaffolds." *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 20(11): 2338-2347.
- Rouwkema, J., N. C. Rivron and C. A. van Blitterswijk (2008). "Vascularization in tissue engineering." *Trends in biotechnology* 26(8): 434-441.
- Rozario, T. and D. W. DeSimone (2010). "The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view." *Developmental biology* 341(1): 126-140.
- Rucker, H. K., H. J. Wynder and W. E. Thomas (2000). "Cellular mechanisms of CNS pericytes." *Brain research bulletin* 51(5): 363-369.

- Ruhrberg, C. (2003). "Growing and shaping the vascular tree: multiple roles for VEGF." *BioEssays* 25(11): 1052-1060.
- Saijonmaa, O., T. Nyman, U. Hohenthal and F. Fyhrquist (1991). "Endothelin-1 is expressed and released by a human endothelial hybrid cell line (EA. hy 926)." *Biochemical and biophysical research communications* 181(2): 529-536.
- Sandoo, A., J. J. C. S. V. van Zanten, G. S. Metsios, D. Carroll and G. D. Kitas (2010). "The endothelium and its role in regulating vascular tone." *The open cardiovascular medicine journal* 4: 302-312.
- Schiffirin Ernesto, L. (1999). "Role of Endothelin-1 in Hypertension." *Hypertension* 34(4): 876-881.
- Schmitt, A., R. Csiki, A. Tron, B. Saldamli, J. Tübel, K. Florian, S. Siebenlist, E. Balmayor and R. Burgkart (2017). "Optimized protocol for whole organ decellularization." *European journal of medical research* 22(1): 31.
- Schulte, E. (2017). Urogenitalsystem und Nebenniere. In G. Aumüller, G. Aust, A. Conrad et al. (Eds.), *Duale Reihe Anatomie* (pp. 684 - 772). Stuttgart: Thieme.
- Schwarzbauer, J. (1999). "Basement membrane: Putting up the barriers." *Current Biology* 9(7): R242-R244.
- Seidi, A., H. Kaji, N. Annabi, S. Ostrovidov, M. Ramalingam and A. Khademhosseini (2011). "A microfluidic-based neurotoxin concentration gradient for the generation of an in vitro model of Parkinson's disease." *Biomicrofluidics* 5(2): 022214.
- Shupe, T., M. Williams, A. Brown, B. Willenberg and B. E. Petersen (2010). "Method for the decellularization of intact rat liver." *Organogenesis* 6(2): 134-136.
- Shweiki, D., A. Itin, D. Soffer and E. Keshet (1992). "Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis." *Nature* 359(6398): 843-845.
- Silbernagl, S. (2019). Die Funktion der Nieren. In, H.-C. Pape, A. Kurtz and S. Silbernagl (Eds.), *Physiologie* (pp. 330-382). Stuttgart: Thieme.
- Skalak, R. and C. F. Fox (1988). *Tissue engineering: proceedings of a workshop, held at Granlibakken, Lake Tahoe, California, February 26-29, 1988*, Alan R. Liss.

- Song, J. J., J. P. Guyette, S. E. Gilpin, G. Gonzalez, J. P. Vacanti and H. C. Ott (2013). "Regeneration and experimental orthotopic transplantation of a bioengineered kidney." *Nature medicine* 19(5): 646.
- Staton, C. A., M. W. R. Reed and N. J. Brown (2009). "A critical analysis of current in vitro and in vivo angiogenesis assays." *International journal of experimental pathology* 90(3): 195-221.
- Stern, D., J. Brett, K. Harris and P. Nawroth (1986). "Participation of endothelial cells in the protein C-protein S anticoagulant pathway: the synthesis and release of protein S." *The Journal of cell biology* 102(5): 1971-1978.
- Suckow, M. A., Weisbroth, S. H., & Franklin, C. L. (2005). *The Laboratory Rat* (Second Edition). Amsterdam: Elsevier
- Suggs, J. E., M. C. Madden, M. Friedman and C. Edgell (1986). "Prostacyclin expression by a continuous human cell line derived from vascular endothelium." *Blood* 68(4): 825-829.
- Sullivan, D. C., S.-H. Mirmalek-Sani, D. B. Deegan, P. M. Baptista, T. Aboushwareb, A. Atala and J. J. Yoo (2012). "Decellularization methods of porcine kidneys for whole organ engineering using a high-throughput system." *Biomaterials* 33(31): 7756-7764.
- Tahergorabi, Z. and M. Khazaei (2012). "A review on angiogenesis and its assays." *Iranian journal of basic medical sciences* 15(6): 1110-1126.
- Tanzer, M. L. (2006). "Current concepts of extracellular matrix." *Journal of orthopaedic science : official journal of the Japanese Orthopaedic Association* 11(3): 326-331.
- Taylor, D. A., L. C. Sampaio, Z. Ferdous, A. S. Gobin and L. J. Taite (2018). "Decellularized matrices in regenerative medicine." *Acta Biomaterialia* 74: 74-89.
- Thomas, D. W., R. B. Mannon, P. J. Mannon, A. Latour, J. A. Oliver, M. Hoffman, O. Smithies, B. H. Koller and T. M. Coffman (1998). "Coagulation defects and altered hemodynamic responses in mice lacking receptors for thromboxane A2." *The Journal of clinical investigation* 102(11): 1994-2001.
- Thornhill, m. H., j. Li and d. O. Haskard (1993). "Leucocyte Endothelial Cell Adhesion: a Study comparing Human Umbilical Vein Endothelial Cells and the Endothelial Cell Line EA-hy-926." *Scandinavian Journal of Immunology* 38(3): 279-286.

- Traore, M. A. and S. C. George (2017). "Tissue engineering the vascular tree." *Tissue Engineering Part B: Reviews* 23(6): 505-514.
- Turnbull, I. C., D. K. Lieu, R. A. Li and K. D. Costa (2012). "Cardiac tissue engineering using human stem cell-derived cardiomyocytes for disease modeling and drug discovery." *Drug Discovery Today: Disease Models* 9(4): e219-e227.
- Ulfig, N. (2019). *Kurzlehrbuch Histologie*. Stuttgart: Thieme.
- Unger, R. E., V. Krump-Konvalinkova, K. Peters and C. J. Kirkpatrick (2002). "In vitro expression of the endothelial phenotype: comparative study of primary isolated cells and cell lines, including the novel cell line HPMEC-ST1. 6R." *Microvascular research* 64(3): 384-397.
- Uygun, B. E., A. Soto-Gutierrez, H. Yagi, M.-L. Izamis, M. A. Guzzardi, C. Shulman, J. Milwid, N. Kobayashi, A. Tilles and F. Berthiaume (2010). "Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix." *Nature medicine* 16(7): 814.
- Vailhé, B., D. Vittet and J.-J. Feige (2001). "In Vitro Models of Vasculogenesis and Angiogenesis." *Laboratory Investigation* 81(4): 439-452.
- Valentijn, K. M., J. E. Sadler, J. A. Valentijn, J. Voorberg and J. Eikenboom (2011). "Functional architecture of Weibel-Palade bodies." *Blood* 117(19): 5033-5043.
- Vallance, P., J. Collier and S. Moncada (1989). "Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man." *The Lancet* 334(8670): 997-1000.
- van Mourik, J. A., T. Romani de Wit and J. Voorberg (2002). "Biogenesis and exocytosis of Weibel-Palade bodies." *Histochemistry and Cell Biology* 117(2): 113-122.
- Vig, K., A. Chaudhari, S. Tripathi, S. Dixit, R. Sahu, S. Pillai, V. A. Dennis and S. R. Singh (2017). "Advances in Skin Regeneration Using Tissue Engineering." *International journal of molecular sciences* 18(4): 789.
- von Tell, D., A. Armulik and C. Betsholtz (2006). "Pericytes and vascular stability." *Experimental cell research* 312(5): 623-629.
- Weymann, A., N. P. Patil, A. Sabashnikov, P. Jungebluth, S. Korkmaz, S. Li, G. Veres, P. Soos, R. Ishtok, N. Chaimow, I. Pätzold, N. Czerny, C. Schies, B. Schmack, A.-F. Popov, A. R. Simon, M. Karck and G. Szabo (2014). "Bioartificial heart: a human-sized porcine model--the way ahead." *PloS one* 9(11): e111591-e111591.

- Whatley, R. E., G. A. Zimmerman, T. M. McIntyre, R. Taylor and S. M. Prescott (1987). Production of platelet-activating factor by endothelial cells. *Seminars in thrombosis and hemostasis*, New York: Thieme Medical Publishers, Inc.
- Yau, J. W., H. Teoh and S. Verma (2015). "Endothelial cell control of thrombosis." *BMC cardiovascular disorders* 15: 130-130.
- Yoldas, Atilla, and Mustafa Orhun Dayan. "Morphological characteristics of renal artery and kidney in rats." *TheScientificWorldJournal* vol. 2014 468982, doi:10.1155/2014/468982
- Yuan, H., K. Xing and H.-Y. Hsu (2018). "Trinity of Three-Dimensional (3D) Scaffold, Vibration, and 3D Printing on Cell Culture Application: A Systematic Review and Indicating Future Direction." *Bioengineering* 5(3): 57.
- Yue, B. (2014). "Biology of the extracellular matrix: an overview." *Journal of glaucoma* 23(8 Suppl 1): S20-S23.
- Zheng, M. H., J. Chen, Y. Kirilak, C. Willers, J. Xu and D. Wood (2005). "Porcine small intestine submucosa (SIS) is not an acellular collagenous matrix and contains porcine DNA: Possible implications in human implantation." *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 73B(1): 61-67.
- Zhou, H., K. Kitano, X. Ren, T. K. Rajab, M. Wu, S. E. Gilpin, T. Wu, L. Baugh, L. D. Black and D. J. Mathisen (2018). "Bioengineering human lung grafts on porcine matrix." *Annals of surgery* 267(3): 590-598.

10 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für experimentelle Orthopädie für die Unterstützung während dieses Projektes bedanken. Gleichzeitig möchte ich vier Menschen hervorheben, ohne die an eine Fertigstellung dieser Dissertation nicht zu denken gewesen wäre.

Für die Bereitstellung des Fundaments und die Möglichkeit, mich mit dieser Thematik auseinandersetzen zu dürfen gilt ein besonderer Dank an Prof. Dr. Rainer Burgkart. Seine professionelle Leitung und Ihre konstruktive Kritik haben mir ständig neuen Schwung gegeben. Seine äußerst freundliche und respektvolle Art wird mir in meiner eigenen akademischen Laufbahn ein großes Vorbild sein.

Mein besonderer Dank gilt auch PD Dr. Andreas Schmitt, der mich ebenso mit seinem besonderen Engagement von Beginn an über die gesamte Dauer der Arbeit angeleitet und betreut hat.

Großen Anteil an dieser Dissertation trägt auch Dipl.-Ing. Peter Föhr für die Entwicklung und Anleitung in den Umgang mit der automatisierten Dezellularisierungseinheit. Eine besondere Erwähnung möchte ich an Jutta Tübel richten. Geduldig hat sie mir die Grundlagen der Laborarbeit nähergebracht, mich auch in ernüchternden Phasen stets ermutigt und mir in unzähligen Gesprächen den richtigen Weg gezeigt.

Mit ständiger Unterstützung haben mir meine Eltern, meine Brüder und meine Freunde die nötige Kraft und Motivation gegeben. Dies gilt insbesondere für Laureen, dir mir verständnisvoll stets ein offenes Ohr geschenkt hast.