

Fakultät für Medizin, Technische Universität München

Automatisierte Dezellularisierung muriner Nieren und Etablierung mechanischer Stimulation nach Rezellularisierung mit humanen Osteoblasten

Hannes Degenhardt

Vollständiger Abdruck der von

der Fakultät für Medizin

der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Marcus Makowski

Prüfende/-r der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Rainer Burgkart

2. Prof. Dr. Lars Mägdefessel

Die Dissertation wurde am 09.08.2021 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 04.01.2022 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	V
1 Einleitung	8
1.1 Definition und Prinzip des Tissue Engineerings	8
1.2 Problematik des Tissue Engineering	8
1.3 Knochen Tissue Engineering	9
1.4 Scaffolds im Bereich des Tissue Engineerings	10
1.4.1 Anforderungen an Scaffolds	10
1.4.2 Verschiedene Scaffolds	11
1.4.3 Dezellularisierung biologischer Scaffolds	12
1.4.4 Aufbau und Funktion Extrazellulärmatrix	18
1.4.5 Rezellularisierung	20
1.5 Mechanische Stimulation	20
1.5.1 Monolayer-Stimulation	21
1.5.2 3D-Scaffold Stimulation	24
2 Fragestellung und Zielsetzung	26
3 Material und Methoden	27
3.1 Material	27
3.1.1 Laborgeräte	28
3.1.2 Labormaterialien	29
3.1.3 Zellkulturmedien	30
3.1.4 Laborchemikalien	30
3.1.5 Protokolle für Zellkultur und Chemikaliensammensetzungen	31
3.1.6 Primäre und sekundäre Antikörper, Immunhistologie	33
3.1.7 Miniaturinkubator	33
3.1.8 Automatische Dezellularisierungseinheit: DecellControl	34
3.1.9 Mechanische Stimulationseinheit: Tissue Squeezer	34
3.2 Methoden	34
3.2.1 Zellkultur humaner Osteoblasten	34
3.2.2 Vorbereitung der Rattennieren	37
3.2.3 Dezellularisierung der Rattennieren mit unterschiedlichen Systemen	39
3.2.4 Rezellularisierung der Rattennieren mit humanen Osteoblasten	42
3.2.5 Mechanische Stimulation der Rattennieren	49
3.2.6 Beendigung einer Langzeitkultur	51
4 Ergebnisse	56
4.1 Vergleich zwischen manuellem und automatisiertem Dezellularisierungssystem	56

4.2	Nachweis Dezellularisierung	57
4.2.1	Makroskopie und Mikroskopie	58
4.2.2	Immunhistochemie	60
4.2.3	Qualitativer DNA-Nachweis	60
4.2.4	Quantitativer DNA-Nachweis	61
4.3	Wärmeschrank	61
4.4	Miniatürkubator	62
4.5	Mechanische Stimulation	63
4.6	Medienwechsel	65
4.7	Rezellularisierung, Langzeitkultur und mechanische Stimulation	66
4.7.1	Problematik Nierenpräparation und -anatomie	68
4.7.2	Problematik Schlauchsystem	71
4.7.3	Problematik Kontamination	71
4.7.4	Problematik Perfusion	76
5	Diskussion	78
5.1	Dezellularisierung und Dezellularisierungssysteme	78
5.2	Miniatürkubator	82
5.3	Mechanische Stimulation	83
5.4	Medienwechsel	84
5.5	Rezellularisierung und Langzeitkultur	85
5.6	Lösungsansätze	86
5.6.1	Problematik Niere	86
5.6.2	Problematik Schlauchsystem	87
5.6.3	Problematik Kontamination	87
5.6.4	Problematik Perfusion	89
5.7	Limitationen	89
5.8	Schlussfolgerung und Ausblick	90
6	Zusammenfassung	91
7	Abstract	92
8	Literaturverzeichnis	93
9	Danksagung	104

Abkürzungsverzeichnis

3D	dreidimensional
ABC	Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
ATP	Adenosintriphosphat
BMP	bone morphogenetic protein
CHAPS	-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CPE	chloriertem Polyethylen
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid; Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
EZM	Extrazellulärmatrix
FCS	Fetal calf serum
FDM	Fused-Deposition-Modeling
FGF	fibroblast growth factor
GAGs	Glykosaminoglykane
HCl	Salzsäure, Chlorwasserstoff
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HGF	hepatocyte growth factor
KGF	keratinocyte growth factor
MEM	minimum essential medium
NTIRE	Non-thermal irreversible electroporation
PBS	Phosphat buffered saline
PCNA	Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen
PDGF	platelet derived growth factor
PFA	Paraformaldehyd
POM	Polyoxymethylen
SD	sodium deoxycholate
SDS	sodium dodecyl sulfate / Natriumdodecylsulfat
TBP	Tributylphosphat
TGF- β	transforming growth factor β
VEGF	vascular endothelial cell growth factor

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Unterschiedliche Dezellularisierungsverfahren	13
Tabelle 2: Laborgeräte	28
Tabelle 3: Labormaterialien	29
Tabelle 4: Zellkulturmedien und Zusätze	30
Tabelle 5: Laborchemikalien	30
Tabelle 6: Fortsetzung Laborchemikalien	31
Tabelle 7: Osteogenes Medium 1	31
Tabelle 8: Osteogenes Medium 2	31
Tabelle 9: SDS 3 %	32
Tabelle 10: SDS 0,66 %	32
Tabelle 11: Penicillin/Streptomycin	32
Tabelle 12: PBS	32
Tabelle 13: Natrium-Citrat-Puffer	32
Tabelle 14: PFA 4 %	32
Tabelle 15: ABC-Komplex	32
Tabelle 16: Primäre Antikörper	33
Tabelle 17: Sekundäre Antikörper	33
Tabelle 18: Miniaturinkubator	33
Tabelle 19: DecellControl	34
Tabelle 20: Tissue Squeezer	34
Tabelle 21: Dezellularisierungsschema (Schmitt 2017)	39
Tabelle 22: Entparaffinieren und Rehydratation der Schnitte	52
Tabelle 23: HE-Färbung	52
Tabelle 24: Ergebnisse DNA-Quantifizierung mittels DNeasy Blood & Tissue Kit	61
Tabelle 25: Nieren mit mechanischer Stimulation	67
Tabelle 26: Ergebnisse zur Kontamination	73

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vibration im Monolayer. Zellen werden dazu auf Multiwell-Platten ausgesät (a) und durch horizontale Bewegungen gestresst (b); modifiziert nach (Delaine-Smith 2015).	22
Abbildung 2: Flüssigkeitsströmungen im Monolayer. Zellen werden in Multiwell-Platten ausgesät und auf der Wippe platziert (a) und durch Kippbewegungen („rocking see-saw“) gestresst (b); modifiziert nach (Delaine-Smith 2015).	22
Abbildung 3: Parallele Plattenströmungskammern. Zellen werden auf vorbeschichtete Glasobjektträger gesät (a) und durch einen Flüssigkeitsstrom gestresst (b); modifiziert nach (Delaine-Smith 2015).	23
Abbildung 4: FlexCell-System; modifiziert nach (Delaine-Smith 2015)	23
Abbildung 5: Vier-Punkt-Biegemodell; modifiziert nach (Delaine-Smith 2015)	24
Abbildung 6: 3D-Stimulation. Zellen werden auf die Scaffolds gesät und inkubiert (a) und anschließend durch Vibration (b), Flüssigkeitsströmungen (c), Kompression (d) oder Zugbelastung (e) gestresst; modifiziert nach (Delaine-Smith 2015).	25
Abbildung 7: Präparierte, murine Niere mit Braunülen fixiert in Arterie (rosa, G20), und Ureter (violett, G26)	38
Abbildung 8: Aufbau der manuellen Dezellularisierung mit Rollerpumpe, Bioreaktor und Reservoir-Behälter (dH ₂ O (1), SDS (2), Penicillin/Streptomycin/Amphotericin B (3)); Drei-Wege-Hahn als Überlauf-/ Luftventil (schwarzes Kästchen)	40
Abbildung 9: Aufbau der automatisierten Dezellularisierung mit DecellControl mit Rollerpumpe und Laptop (inkl. DecellControl-Software), Ventilstation, Bioreaktor und Reservoir-Behälter (dH ₂ O (1), SDS (2), Penicillin/Streptomycin/Amphotericin B (3))	40
Abbildung 10: Automatische Ventilstation mit drei Ventilen für destilliertes Wasser (Ch1), SDS (Ch2) und Penicillin/Streptomycin (Ch3), programmierbar über DecellControl-Software	41
Abbildung 11: Einstellung für die Ventilstation über die DecellControl-Software zur Dezellularisierung nach Schema (siehe Tabelle 21)	41
Abbildung 12: Aufbau Bioreaktor des DecellControl mit Braunüle (ohne Niere) und Verbindung zur Rollerpumpe über Arthrex-Schlauch (A); Vollständiger Bioreaktor. Dezellularisierung von bis zu vier Nieren (B); Letzter Schritt der Dezellularisierung: Sterilisierung der Niere mit Streptomycin, Penicillin und Amphotericin B (C)	42
Abbildung 13: Schematischer Aufbau Deckel des Miniaturinkubators	43
Abbildung 14: Aufbau Deckel des Miniaturinkubators, Ansicht von oben; rote Linie: jeweilige Markierung des Deckels (darüber liegende Anteile befinden sich außerhalb des Miniaturinkubators), darunter liegende befinden sich innerhalb des Miniaturinkubators); CO ₂ -Anschluss [1]; Anschluss Medienwechselsystem [2]; Abdichtung [3]; Anschluss Niere [4]; „Kurzschluss“-Anschluss [5]; Anschluss Arthrex-Schlauchsystem [6]	44
Abbildung 15: Schaumbildung im Miniaturinkubator während des ersten Durchspülprozesses unter sterilen Bedingungen in der sterilen Werkbank	44
Abbildung 16: Schematischer Aufbau der CO ₂ -Zufuhr zum Miniaturinkubator/Bioreaktor im unbefeuchteten Wärmeschrank, modifiziertes Manual CO ₂ -Controller 2000 (Fa. PeCon)	46
Abbildung 17: Vollständiger Aufbau des Miniaturinkubators mit CO ₂ -Flasche, Rollerpumpe, Medienwechselsystem und Tissue Squeezer; Der Miniaturinkubator wird nachfolgend in den unbefeuchteten Wärmeschrank gestellt.	46
Abbildung 18: Aufbau des Medienwechselsystems, Verbrauchtes Medium (1), Frisches Medium (2), Miniaturinkubator (3), 50 ml-Spritze (weißer Stern)	47

Abbildung 19: Schema zur Darstellung des Medienwechsels: Absaugen des verbrauchten Mediums aus dem Bioreaktor/Miniaturinkubator	48
Abbildung 20: Schema zur Darstellung des Medienwechsels: Verwerfen des verbrauchten Mediums aus dem Bioreaktor/Miniaturinkubator in die Abfallflasche	48
Abbildung 21: Schema zur Darstellung des Medienwechsels: Ansaugen des frischen Mediums aus der Vorratsflasche	49
Abbildung 22: Schema zur Darstellung des Medienwechsels: Hinzufügen des frischen Mediums in den Bioreaktor/Miniaturinkubator	49
Abbildung 23: Aufbau Tissue Squeezer und Miniaturinkubator mit Verbindung zur CO ₂ -Flasche im unbefeuchteten Wärmeschrank	50
Abbildung 24: Schematische Darstellung der Auswirkung der Probengröße auf die DNA-Ausbeute. Wenn mehr als die maximale Menge des Ausgangsmaterials verwendet wird, ist die DNA-Ausbeute geringer als erwartet; modifiziert nach (Qiagen 2006).	55
Abbildung 25: Dezellularisierte Niere nach Luftinsufflation	57
Abbildung 26: Makroskopischer Verlauf während der Dezellularisierung einer Rattenniere mit dH ₂ O und SDS (0,66 %). Native Niere (A), nach 10 Minuten (B), nach 15 Minuten (C), nach 45 Minuten (D), nach 60 Minuten (E), nach 140 Minuten Dezellularisierung (F)	58
Abbildung 27: Dezellularisierung einer Niere bei Bifurkation der A. renales nah an der Aorta abdominalis mit makroskopisch (A) und mikroskopisch (B) sichtbarer einseitiger Dezellularisierung; Maßstabsbalken = 200 µm	59
Abbildung 28: HE-Färbung Niere: native Niere (A1, A2) und dezellularisierte Nieren (B, C, D) nach bisherigem Dezellularisierungssystem (B1, C1, D1) und neuem Dezellularisierungssystem mit DecellControl (B2, C2, D2); Maßstabsbalken = 100 µm	59
Abbildung 29: Repräsentative histologische Abbildungen von nativen (A, B, C) und dezellularisierten Nieren (D, E, F) mit Nachweis von Laminin (A,D), Fibronectin (B, E) und Kollagen Typ IV (C,F); Maßstabsbalken = 100 µm	60
Abbildung 30: DAPI-Färbung Niere, native Niere mit Anfärbung der DNA (blaue Punkte; A) und dezellularisierte Nieren (B, C, D) nach bisherigem Dezellularisierungssystem (B1, C1, D1) und neuem Dezellularisierungssystem mit DecellControl (B2, C2, D2) ohne sichtbare Anfärbung von DNA-Bestandteilen; Maßstabsbalken 100 µm	61
Abbildung 31: Veränderung des Deckels des Miniaturinkubator. Erstes Modell mit Stahldeckel und fünf Löchern (A), POM-Deckel mit 5 Löchern (B), aktueller POM-Deckel mit 7 Löchern	62
Abbildung 32: Dichtungsringe des Bioreaktor aus POM (oben) und Kautschuk (unten)	63
Abbildung 33: Halterung der Rattenniere im Miniaturinkubator im zeitlichen Verlauf. 3D Druck Halterung (A-E), Edelstahlhalterung mit Magneten (F), 90°-Halterung (A-C), 180°-Halterung (D-F)	64
Abbildung 34: Nierenpositionierung in den verschiedenen Halterungen ohne Medium in der Kristallisationsschale (A, B) und mit Medium in der Kristallisationsschale (C) ohne laufende Perfusion der Niere.	65
Abbildung 35: Histologische Bilder Niere „MEC 5“ in HE ohne sichtbaren Pilzhyphen mit bläulich angefärbten Zellkernen bei Rezellularisierung mit humanen Osteoblasten (P5); A, C: 10-fache Vergrößerung; B, D: 32-fache Vergrößerung; schwarze Kästchen zeigen Ausschnitt der 32-fachen Vergrößerung; Maßstabsbalken = 100µm	68
Abbildung 36: Loch in Rattenniere während der Dezellularisierung mit Austritt von Medium (schwarzes Kästchen in A und B; n=1)	69

Abbildung 37: Defekte Niere nach mechanischer Stimulation bei primär kleinem Loch im Parenchym (n=1)	69
Abbildung 38: Repräsentative Bilder von variablen Abgängen der Aa. renales (schwarze Linien) nahe der Aorta abdominalis (schwarze Kästchen; A: zwei Abgänge direkt aus der Aorta abdominalis (rote Linie, n=1); B: Aufzweigung nach Aortenabgang der A. renalis (n=3))	70
Abbildung 39: Repräsentative Bilder von Pilzmyzele während der Langzeitkultur und mechanischer Stimulation bei Verwendung der 3D-Druck-Halterungen in der Kristallisationsschale; B: repräsentative Darstellung der Pilzmyzele im Bereich der Niere sowie der 3D-Druckhalterung (schwarze Kästchen)	72
Abbildung 40: Repräsentative histologische Abbildung von Pilzhyphen intra- und extrakapsulär (A, B) und intraluminal (C), Maßstabsbalken = 100µm	72
Abbildung 41: Präparierte, nicht dezellularisierte Niere (A), dezellularisierte, inkubierte Niere ohne Perfusion (B) und dezellularisierte, inkubierte Niere mit kontinuierlicher Perfusion (C), jeweils ohne mikroskopischen Nachweis von Pilzhyphen, HE-Färbung, Maßstabsbalken = 100 µm	74
Abbildung 42: Makroskopische Pilzmyzele nach 14 Tage Kultivierung einer dezellularisierten Niere („OSTI“; A); Mikroskopisch können ebenso Pilzhyphen dargestellt werden (B; schwarzer Pfeil: exemplarisch markierte Pilzhyphe); Maßstabsbalken = 100µm	74
Abbildung 43: Offene und geschlossene Petrischalen (gefüllt mit osteogenem Medium 2) im unbefeuchteten Wärmeschrank zur Kontaminations-Überprüfung	75
Abbildung 44: Repräsentatives Bild von Pilzmyzele bei Inkubation des 3D-Drucks im osteogenem Medium 2 mit Primocin	76
Abbildung 45: Histologische Färbungen nach Perfusionsminderung der Nieren mit Nachweis von Pilzhyphen im Gefäßlumen mit zum Teil vollständiger Verlegung des Lumens (A: „MEC 2“ Fibronektin-Färbung, B/C: „MEC 4“, HE-Färbung)	77
Abbildung 46: Sichtbare weißlich-derbe Struktur (schwarzes Kästchen) im Bereich der Niere nach 3 Wochen Inkubation; der Versuch wurde aufgrund Malperfusion abgebrochen (n = 1).	77

1 Einleitung

Mit einer immer älter werdenden Weltbevölkerung mit verlängerter Lebenserwartung und erhöhten funktionellen und persönlichen Ansprüchen der Menschen ist ein Anstieg von muskuloskelettalen Erkrankungen wie Frakturen, Skoliose, Osteoporose, Knocheninfektionen oder -tumoren sowie rheumatischen Erkrankungen zu beobachten (Agarwal 2015; Roseti 2017). Als therapeutischer Ansatz sind die Reparatur, Rekonstruktion, Regeneration oder der Ersatz des Gewebes zu nennen. Beim Gewebersatz kommen autologe und allogene Transplantationen sowie ein künstlicher Ersatz in Frage. Alternativ dazu ist das Tissue Engineering eine Methode, die geschädigtes Gewebe durch biologische Ersatzstoffe zu regenerieren und die Funktion wiederherzustellen versucht. (O'Brien 2011)

1.1 Definition und Prinzip des Tissue Engineerings

Tissue Engineering bedeutet Gewebezüchtung bzw. -rekonstruktion und stellt den Überbegriff für die Herstellung von biologischem Gewebe durch kontrollierte Zellkultivierung als Teil der regenerativen Medizin dar. Der Begriff wurde erstmals offiziell als solcher im Jahr 1988 während einer Konferenz der National Science Foundation in Colorado, USA, verwendet (Vacanti 2006; O'Brien 2011).

Das grundlegende Prinzip basiert auf der Zellentnahme von einem Patienten, der Kultivierung und Differenzierung der Zellen *in vitro* und anschließend der Reimplantation des Zellgewebes, um das geschädigte Gewebe zu ersetzen (Langer 1993).

Um Gewebe *in vitro* kultivieren und regenerieren zu können, werden Gerüste, sogenannte Scaffolds, mit Zellen und gelegentlich Wachstumshormonen besiedelt und biophysikalischen Reizen, wie rezidivierende mechanische Kompressionen, durch Nutzung eines Miniaturinkubators, auch Bioreaktors genannt, ausgesetzt (O'Brien 2011). Die Kombination aus Scaffold, Zellen, Wachstumshormonen und gegebenenfalls mechanischer Stimulation ist auch als „Triade des Tissue Engineerings“ bekannt (Gleeson 2011; O'Brien 2011; Murphy 2013). Aufgabe des Scaffolds im Bereich des Tissue Engineerings ist es, die Bestandteile in der komplexen Struktur zu halten, um so die Funktionalität gewährleisten und den zu kultivierenden Zellen eine adäquate Umgebung bieten zu können (Badylak 2007).

1.2 Problematik des Tissue Engineering

Aufgrund der Komplexität ist der Bereich des Tissue Engineerings multidisziplinär und erfordert das Wissen von Experten der klinischen Medizin, der Natur- und Ingenieurwissenschaften (O'Brien 2011; Li 2018). Dabei stellt eines der größten Probleme des Tissue Engineerings die Versorgung der Zellen mit Nährstoffen und

Sauerstoff sowie der Abtransport von Stoffwechselendprodukten dar (Ko 2007; Phelps 2009). Da der Austausch von Sauerstoff, Nährstoffen und Abfallprodukten über Diffusion stattfindet, siedeln sich Zellen im menschlichen Körper und bei durchgeführten Studien im Abstand von 100 bis 200 μm zur Kapillare an, um die Versorgung der Zellen zu gewährleisten (Jain 2005; Rouwkema 2008; Lovett 2009). Somit sind für eine Kultivierung von Zellen im Labor im Bereich des Tissue Engineerings optimale Umgebungsbedingungen zwingend notwendig, um die erforderliche Diffusion von und zu den Zellen sicherstellen zu können. Dafür ist ein ideales Scaffold erforderlich, welches bestmögliche biomechanische und biologische Eigenschaften aufweist.

1.3 Knochen Tissue Engineering

Die dynamische Struktur des Knochens zeigt bemerkenswerte Regenerationsfähigkeiten, sodass Defekte des Knochens nach Traumata, Infektion oder Tumoresektion meist folgenlos ausheilen können (Florencio-Silva 2015; Fillingham 2016). Aufgrund der Veränderung der Bevölkerungsstruktur und einer älter werdenden Population steigt jedoch der Bedarf an Knochenersatzmaterialien stetig an. Bei komplizierten und ausgedehnten Knochendefekten, bei denen das natürliche Heilungspotenzial nicht ausreicht, stehen prinzipiell autologe und allogene Knochenersatzverfahren zur Verfügung. (Holzapfel 2017; Roseti 2017)

Bei autologen Transplantationen wird Gewebe von einer Stelle zu einer anderen bei ein und demselben Patienten transplantiert. Dieses sogenannte Autograft hat Limitationen: die Gewinnung kann aufgrund anatomischer Gegebenheiten eingeschränkt oder mit erheblicher Morbidität wie Schmerzen, Infektionen, Hämatomen und Funktionseinschränkungen assoziiert sein. Allografts hingegen, welche von einem genetisch verschiedenen Individuum derselben Spezies transplantiert werden, gehen mit einer erhöhten Rate an Infektionen und der Gefahr einer Abstoßungsreaktion einher. (Bonassar 1998; Langer 2000; Atala 2004; O'Brien 2011)

Generell ist autologer Knochenersatz das ideale Transplantat, da er osteogen ist, die Knochenbildung induziert und durch die Osteokonduktivität die Adhäsion von Zellen ermöglicht. Autologer Knochen ist jedoch im Bereich der Entnahmestelle in der Menge begrenzt mit Erhöhung der Entnahmemorbidität. (Holzapfel 2017)

Bei zusätzlich notwendigem Knochenersatzmaterial kommt anschließend meist allogener Knochen zum Einsatz. Dabei werden meistens thermodesinfizierte bzw. kryokonservierte Femurköpfe verwendet (Schilling-Leiß 2014). Durch die Aufbereitung der Transplantate werden die osteogenen und -induktiven Eigenschaften entfernt und sie erzielen ihre Wirkung durch die osteokonduktiven Eigenschaften. (Holzapfel 2017)

Zur Unterstützung des biologischen Heilungsprozesses könnte hier das Tissue Engineering als biomechanische und biologische Lösungsmöglichkeit großes Potenzial

haben. Künstlich hergestellter, autologer Knochen ähnelt dabei normalem Knochengewebe und kann so die Osteogenität, -induktivität und -konduktivität erhalten. (Schmidt-Rohlfing 2009)

Aktuell gibt es nur wenige klinische Studien im Bereich des Knochen Tissue Engineering mit nur geringen Fallzahlen. Dabei wurden beispielsweise ausgedehnte Knochendefekte von ca. vier bis acht Zentimeter mittels zellbasiertem Tissue Engineering erfolgreich behandelt mit vollständiger Fusion der Knochen- und Implantatenden nach ca. fünf bis sieben Monaten. Dazu wurden Osteoblasten-Vorläuferzellen aus dem Knochenmark der Patienten isoliert, ex vivo vermehrt, anschließend auf ein Hydroxylapatitgerüst ausgesät und an die Läsionsstelle der Patienten reimplantiert. (Quarto 2001; Marcacci 2007; Schmidt-Rohlfing 2009)

Das Ziel unserer Arbeitsgruppe ist es darüber hinaus im Bereich der Grundlagenforschung den Knochenstoffwechsel sowie den Zusammenhang der verschiedenen Zelllinien besser zu verstehen und die Regenerationsfähigkeit humaner Osteoblasten zu verbessern. Da hierfür ein 3D-Gerüst essentiell ist, wurde von unserer Arbeitsgruppe ein Dezellularisierungsprotokoll muriner Nieren als vaskularisiertes Scaffold entwickelt, um so den Diffusionsabstand zu den Zellen zu verringern (Burgkart 2014).

1.4 Scaffolds im Bereich des Tissue Engineerings

Um geeignete Umgebungsbedingungen zur Regeneration von Gewebe zu gewährleisten, stützt sich der Bereich des Tissue Engineerings überwiegend auf die Verwendung von dreidimensionalen (3D) Scaffolds (O'Brien 2011). Darüber hinaus werden zellbasierte, gerüstfreie Konzepte zur 3D-Organogenese angewendet. Der limitierenden Faktoren hierbei sind jedoch die erhöhten Kosten sowie der hohe Aufwand mit langer Kulturzeit zur Züchtung einer hohen Anzahl von funktionellen Zellen, weshalb das scaffold-freie Tissue Engineering aktuell eine eher untergeordnete Rolle spielt (De Pieri 2021).

1.4.1 Anforderungen an Scaffolds

Um als ideales Scaffold geeignet zu sein, müssen einige Kriterien zutreffen, welche im Jahr 2011 von O'Brien übersichtlich dargestellt worden (O'Brien 2011).

Als primäres Anforderungsmerkmal muss das Scaffold biokompatibel sein, um so die Adhäsion, Proliferation und Differenzierung der Zellen gewährleisten zu können. Ebenso darf hierbei keine überschießende Entzündungsreaktion hervorgerufen werden, um die Heilungschancen zu verbessern und eine Abstoßung des Gewebes zu verhindern. (Hutmacher 2000; Atala 2004; O'Brien 2011)

Eine biologische Abbaubarkeit des Konstruktes muss gegeben sein. Die körpereigenen Zellen sollen im Umbauprozess das Scaffolds durch eine eigene Extrazellulärmatrix (EZM) ersetzt werden (Mikos 1998). Teile dieser Umwandlung sind im Rahmen einer kontrollierten Entzündungsreaktion auch Immunzellen und Makrophagen. Während des Abbaus des Scaffolds ist es nötig, dass keine toxischen oder schädlichen Abbauprodukte entstehen. (Hutmacher 2000; O'Brien 2011)

Idealerweise sollte das Scaffold stabil genug sein, um mechanischen Einflüssen standhalten zu können. Dabei sollte das Gerüst einerseits den anatomischen Anforderungen entsprechen und andererseits auch eine einfache Handhabung durch den Chirurgen ermöglichen. (O'Brien 2011)

Der Schlüssel zum Erfolg des Tissue Engineerings scheint die Struktur bzw. Architektur des Scaffolds mit guter Balance zwischen Porosität und mechanischer Stabilität zu sein, um eine Zellinfiltration, Adhäsion und Vaskularisation zu ermöglichen. Dabei ist die Porengröße ebenso für eine ausreichende Diffusion von Sauerstoff und Nährstoffen sowie für den Abtransport von Abfallprodukten wichtig. (Hutmacher 2000; Atala 2004; O'Brien 2011)

Als letzter Punkt ist wichtig, dass das ideale Scaffold kosteneffizient, auf den Patienten abgestimmt und in entsprechender Menge zeitsparend hergestellt werden kann (Griffith 2001).

1.4.2 Verschiedene Scaffolds

Im Allgemeinen können keramische, synthetische und natürliche, biologische Scaffolds mit spezifischen Vor- und Nachteile unterschieden werden (O'Brien 2011; Bakhshandeh 2017).

Keramische Scaffolds wie Hydroxylapatit und Trikalziumphosphat sind typischerweise durch eine hohe mechanische Stabilität und Steifigkeit charakterisiert, welche dementsprechend eine geringe Elastizität und somit eine starre Oberfläche aufweisen. Aufgrund der exzellenten Biokompatibilität und der positiven Wechselwirkung zwischen osteogenen Zellen können keramische Scaffolds die Differenzierung und Proliferation von Osteoblasten positiv beeinflussen. Im klinischen Alltag ist der Einsatz jedoch deutlich eingeschränkt aufgrund der Sprödigkeit und eingeschränkten Modellierbarkeit zur Anpassung bei Implantation. (Bakhshandeh 2017).

Scaffolds, die aus synthetischen Polymeren, wie Polylactide, Polycaprolacton, Polyglycolsäure, Poly lactid-co-Glycolid oder leitfähigen Polymeren hergestellt sind, können zwar mit einer angepassten Gewebearchitektur aufwarten, haben jedoch ein erhöhtes Risiko für eine Transplantatabstoßung mit reduzierter Biokompatibilität und nachfolgender Hydrolyse bis hin zur Nekrose (Liu 2006; O'Brien 2011; Bakhshandeh 2017).

Im Folgenden wird nur auf die natürlichen und biologischen Scaffolds näher eingegangen. Es werden Bestandteile wie Kollagen, Proteoglykane, alginatbasierte Substrate oder Chitosan zur Herstellung eines Bioscaffolds verwendet. Diese sind biologisch aktiv und fördern die Zelladhäsion und das Zellwachstum. Sie sind biologisch abbaubar und erlauben den Wirtszellen eine eigene EZM zu generieren. Ein Nachteil scheint jedoch die geringe mechanische Stabilität und die Immunogenität zu sein, was den Einsatz im Bereich der Orthopädie einschränkt. (Berthiaume 2011; O'Brien 2011; Bakhshandeh 2017)

Ein weiterer Ansatz ist die natürliche EZM eines gesamten Organs zu verwenden, um so die natürliche Architektur und Struktur nach Dezellularisierung ausnutzen zu können (Bakhshandeh 2017). Nach Dezellularisierung kann so die Gewebearchitektur unter Umgehung der Immunogenität, die bekanntlich vor allem durch die Zellbestandteile ausgelöst wird, ausgenutzt werden (Grauss 2003; Lehr 2011). In diversen Studien konnten so schon Organe dezellularisiert und als Scaffold für eine Rezellularisierung zur Generierung des ursprünglichen Organs genutzt werden (Jagodzinski 2004; Ott 2008; Bader 2010; Ott 2010; Petersen 2010; Uygun 2010).

1.4.3 Dezellularisierung biologischer Scaffolds

Zur Herstellung eines biologischen Scaffolds, bestehend aus EZM, können verschiedene Gewebe dezellularisiert werden. Ziel ist dabei der Erhalt der komplexen Zusammensetzung und der dreidimensionalen Ultrastruktur. Hierbei muss bei allen verwendeten Methoden jedoch auch eine gewisse Schädigung der Architektur und der Oberflächenstruktur in Kauf genommen werden. Dies wurde in der Arbeit von Crapo et al. übersichtlich dargestellt. (Crapo 2011)

Die erfolgreiche Dezellularisierung wird durch Faktoren wie Gewebedichte und -struktur, biologische und geometrische Eigenschaften sowie der Anforderung an das Gewebe bestimmt und durch drei Kriterien nachgewiesen: (1) keine sichtbaren Zellkerne in histologischen Untersuchungen mit Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung und 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)-Färbung, (2) der verbleibende Gehalt an doppelsträngiger Desoxyribonukleinsäure sollte 200 Basenpaare nicht überschreiten und (3) die Menge an doppelsträngiger Desoxyribonukleinsäure sollte nicht größer als 50 Nanogramm pro Milligramm des Trockengewichtes des Gewebes sein (Crapo 2011; Keane 2015). Es stehen verschiedene Methoden zur Dezellularisierung zur Verfügung, wobei oft eine Kombination aus mehreren Verfahren genutzt wird. Dies kann die Wirksamkeit und Sicherheit des Dezellularisierungsverfahrens erhöhen, was unter anderem in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte (Badylak 2011; Tron 2016). Zur Dezellularisierung biologischer Scaffolds werden chemische, biochemische und physikalische Verfahren genutzt, um Zellen zu lysieren und Zellreste nachfolgend

auszuwaschen (Crapo 2011). Durch Kombination der Verfahren wird die Konzentration der Lösungsmittel und die Einwirkzeit der chemischen Substanzen reduziert, wodurch ungewünschte Schäden der EZM verringert werden können (Walles 2003; Poornejad 2016).

Die optimale Auswahl des Dezellularisierungsverfahrens ist abhängig von den Gewebeeigenschaften wie Dicke und Dichte sowie der beabsichtigten klinischen bzw. experimentellen Anwendung des Gewebes (Crapo 2011). Zur Vereinfachung und Verbesserung der Dezellularisierung ist es sinnvoll, vorab nicht notwendiges Gewebe, wie beispielsweise umliegendes Fett- oder Bindegewebe, zu entfernen (Freytes 2008; Yang 2010). Zur Dezellularisierung reicht bei geringer Gewebestärke starke Temperaturänderungen mit relativ kurzer Einwirkungszeit von leicht entfernbaren Detergentien aus, wohingegen bei zunehmender Gewebestärke umfangreichere und aggressivere Dezellularisierungsmethoden notwendig sind. Dabei nimmt die Komplexität und das Ausmaß des Dezellularisierungsprotokolls in der Regel mit den geometrischen und biologischen Anforderungen an das Gewebe zu (Crapo 2011).

1.4.3.1 Dezellularisierungsverfahren

Nachfolgend werden die unterschiedlichen Verfahren zur Dezellularisierung beschrieben und dargestellt. Tabelle 1 zeigt einen Überblick über die chemischen, biochemischen und physikalischen Verfahren (Crapo 2011).

Tabelle 1: Unterschiedliche Dezellularisierungsverfahren

Chemische Verfahren	Säure und Basen
	Hypo- und hypertone Lösungen
	Nicht- ionische Detergentien
	Ionische Detergentien
	Zwitterion CHAPS
	Alkohole
	Weitere Lösungsmittel
Biochemische Verfahren	Enzyme
	Nicht-enzymatische Mittel
Physikalische Verfahren	Temperatur
	Scherkraft und Druck
	Nicht-thermische, irreversible Elektroporation

1.4.3.1.1 Chemische Verfahren

Bei den chemischen Methoden zur Dezellularisierung werden Säuren, Basen, hypotone und hypertone Lösungen sowie Detergentien verwendet, die sich auf die Struktur der Phospholipidzellmembran auswirken (Nazari 2012). Diese Substanzen werden nach

ihrer elektrischen Ladung in ionisch, nicht-ionisch oder zwitterionisch klassifiziert (Gilpin 2017).

Nach durchgeführter Dezellularisierung mit chemischen Substanzen muss darauf geachtet werden, die Chemikalien vollständig aus dem Gewebe auszuspülen, da diese selbst in geringer Konzentration für Zellen zytotoxisch sind und die vorteilhaften Eigenschaften der EZM negativ beeinflussen können (Feil 2006; Cebotari 2010).

Säuren und Basen lösen die Zytoplasmamembran der Zellen, zerstören Nukleinsäuren und neigen dazu, Proteine zu denaturieren. Dabei können sie jedoch gegebenenfalls Kollagen, GAGs und Wachstumsfaktoren schädigen (Crapo 2011). Hier sind vor allem die Essigsäure und Peressigsäure zu nennen. Dabei schädigt Essigsäure auch Kollagene und kann somit zu einer reduzierten Stabilität der EZM-Matrix führen ohne GAGs zu beeinflussen (Dong 2009). Peressigsäure ist ein gängiges Desinfektionsmittel und dient gleichzeitig zur Dezellularisierung indem es DNA-Reste mit minimaler Wirkung auf die EZM-Zusammensetzung entfernt (Hodde 2002; Hodde 2007; Gilbert 2008). So wird Peressigsäure zur Dezellularisierung von Schweinedünndarmmukosa und der Harnblase erfolgreich eingesetzt (Gilbert 2008; Syed 2014). Basen werden meist zur Entfernung von Haaren in Dermisproben in frühen Phasen der Dezellularisierung verwendet. Hier sind vor allem Calciumhydroxid, Natriumsulfid und Natriumhydroxid zu nennen (Prasertsung 2008; Reing 2010). Bei Verwendung werden Kollagenfibrillen gespalten und Querverbindungen abgebaut (Gorschewsky 2005b). Basen können weiterhin auch Wachstumsfaktoren eliminieren und mechanische Eigenschaften deutlich verringern (Reing 2010).

Hypotonische und hypertontische Lösungen zerstören die Zellmembran durch osmotischen Stress und können so effektiv Zellen lysieren und DNA-Protein Interaktionen stören (Xu 2007). Um den maximalen osmotischen Effekt auszunutzen, ist es sinnvoll in mehreren Zyklen hypo- und hypertone Lösungen während der Dezellularisierung abwechselnd zu verwenden. Diese helfen dabei, Zellreste aus dem Gewebe zu spülen. (Crapo 2011)

Nicht ionische Detergentien wie Triton-X-100 unterbrechen Lipid-Lipid- und Lipid-Protein-Verbindungen und in geringem Maße auch Protein-Protein-Interaktionen. Dabei werden auch DNA-Proteine zerstört. Das Ausmaß der Dezellularisierung scheint jedoch geringer als bei ionischen Detergentien zu sein. (Crapo 2011)

Zu den ionischen Detergentien zählen SDS (Sodium dodecyl sulfate), SD (Sodium deoxycholate) und Triton-X-200, die dazu neigen Proteine zu denaturieren und dabei die Membranen der Zellen und Zellkerne zu zerstören (Crapo 2011). In höheren Konzentrationen können sie auch zu Schädigung der Matrixstruktur und -integrität führen (Keane 2015). Eine geringe Denaturierung von Proteinen kann dennoch vorteilhaft sein,

da Antigene eliminiert werden und so das Risiko für unerwünschte immunologische Reaktionen vermindert werden kann (Burgkart 2014).

Als Zwitterion kann CHAPS (-(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat) die Eigenschaften von nicht-ionischen und ionischen Detergentien bei geringer Zerstörung der Ultrastruktur aufweisen (Crapo 2011).

Alkohole wie beispielweise Glycerin führen durch Entzug von Wasser und Lyse der Zellen zur Dezellularisierung (Prasertsung 2008). Tatsächlich sind Alkohole wie Isopropanol, Ethanol und Methanol effektiver in der Entfernung von Lipiden als beispielsweise Lipase (Flynn 2010; Brown 2011). Bei der Verwendung von Alkoholen muss weiterhin darauf geachtet werden, dass diese auch als Fixierungsmittel in der Histologie verwendet werden und die Fähigkeit besitzen, Proteine auszufällen (Jamur 2010) und somit die EZM-Struktur zu schädigen (Cole 1984; Gorschewsky 2005a; Gorschewsky 2005b).

Aceton kann ebenfalls zur Entfernung von Lipiden während der Dezellularisierung verwendet werden (Lumpkins 2008; Montoya 2009). Aufgrund der Nutzung als Gewebefixierung (Jamur 2010) und durch Schädigung der EZM-Ultrastruktur (Cole 1984) wird es jedoch vergleichsweise selten eingesetzt (Gorschewsky 2005a; Gorschewsky 2005b).

Tributylphosphat (TBP) wird vor allem zur Dezellularisierung von Sehnen eingesetzt, da es effektiver zu sein scheint als Triton X-100 und SDS mit widersprüchlichen Effekten auf die EZM und die nativen mechanischen Eigenschaften (Cartmell 2000; Deeken 2011).

1.4.3.1.2 Biochemische Verfahren

Als biochemische Verfahren werden vor allem Enzyme wie Nukleasen, Proteasen, Kollagenasen und nicht-enzymatische Chelatbildner oder Toxine verwendet (Gilpin 2017). Enzyme zeigen eine hohe Spezifität für die Entfernung von Zellresten. Die vollständige Zellentfernung durch enzymatische Behandlung allein ist jedoch schwierig und Enzymreste können die Rezellularisierung beeinträchtigen oder eine negative Immunantwort hervorrufen. (Crapo 2011)

Durch Nukleasen (z.B. DNasen und RNasen) werden Nukleinsäuresequenzen gespalten und helfen so bei der Entfernung von Nukleotiden nach Zelllyse (Elder 2010; Funamoto 2010; Petersen 2010; Yang 2010).

Häufig wird Trypsin, eine Serinprotease, als enzymatische Dezellularisierungssubstanz verwendet. Dabei zeigt sich jedoch ein vermehrter Abbau von Elastin und Kollagen bei langsamerer Dezellularisierung und besserer Erhaltung von GAGs (Kasimir 2003; Rieder 2004; Grauss 2005). Hier zeigt sich eine Korrelation von mechanischen Eigenschaften des Gewebes mit der Wirkung von Trypsin auf die EZM. (Yang 2009)

Kollagenasen können ebenfalls zur Dezellularisierung eingesetzt werden, falls die resultierende EZM nicht entscheidend für die Versuche ist, da durch Kollagenasen die EZM-Ultrastruktur und Kollagenstruktur verändert werden (Crapo 2011).

Zu den nicht-enzymatischen, biochemischen Verfahren zählen Chelatbildner wie Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) und Ethylenglykoltetraessigsäure (EGTA), die durch Sequestrierung von Metallionen zu einer Störung der Protein-Protein-Interaktion führen. Dabei werden Chelatbildner typischerweise in Kombination mit Trypsin oder anderen Detergentien verwendet. (Crapo 2011)

Auch Toxine wie Latrunculin können durch ihre zytotoxische Wirkung zur Dezellularisierung genutzt werden. So konnte Gillies et al. (Gillies 2011) durch Verwendung von Lantruculin, hyper- und hypotonen Lösungen und DNasen die Entfernung von DNA unter Erhalt von GAGs erreichen. (Crapo 2011)

1.4.3.1.3 Physikalische Verfahren

Im Folgenden werden die physikalischen Maßnahmen beschrieben. Dabei muss im Anschluss an diese Verfahren eine Auswaschung der Zellreste stattfinden (Gilpin 2017). Die Verfahren bewirken durch Temperatur, Scherkraft und Druck und nichtthermische, irreversible Elektroporation eine Lyse der Zellen. (Crapo 2011)

Durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen können Gewebe effizient durch Bildung von Eiskristallen und damit einhergehenden Zelllyse dezellularisiert werden (Crapo 2011). Die Änderung der Temperatur muss dabei sorgfältig gewählt und kontrolliert werden, um eine Zerstörung der EZM zu verhindern (Gilbert 2006). Die dabei entstehenden Zellreste müssen durch nachfolgende Auswaschung unter Nutzung von biochemischen Verfahren entfernt werden, um ungewollte immunologische Reaktionen zu vermeiden (Gilbert 2006). Mehrere Zyklen können dabei durchgeführt werden, ohne die EZM-Proteine signifikant zu verändern (Patel 2008; Cortiella 2010; Flynn 2010). Während des Einfrierens und Auftauens kommt es zu kleinen Zerstörungen der EZM-Ultrastruktur, wobei dies nur einen minimalen Einfluss auf die mechanische Stabilität des Gewebes hat (Jackson 1988; Hopkinson 2008; Prasertsung 2008; Elder 2010).

Auch durch mechanische Scherkräfte können Zellen auf der Oberfläche eines Gewebes oder Organs in Kombination mit Enzymen, hypertoner Kochsalzlösung oder Chelatbildnern effektiv entfernt werden (Hopkinson 2008). Zusätzlich können Zellen durch hydrostatischen Druck aus Blutgefäßen und Hornhautgewebe effizient eliminiert werden, wobei es jedoch auch zu einer Schädigung der EZM-Ultrastruktur kommen kann (Sasaki 2009; Funamoto 2010; Hashimoto 2010).

Nichtthermische, irreversible Elektroporation (Non-thermal irreversible electroporation, NTIRE) wurde als Ansatz zur Gewebe-Dezellularisierung untersucht. Dabei werden dem Gewebe elektrische Impulse über Sonden zugeführt, wodurch es zur Bildung von

Mikroporen in der Zellmembran aufgrund der Destabilisierung des elektrischen Potentials kommt und die Zellen so zerstört. Die Mechanismen der Entfernung von Zellresten ist derzeit nicht eindeutig geklärt, wird jedoch als immunvermittelt eingestuft. (Lee 1987; Lee 2005; Crapo 2011)

1.4.3.2 Techniken zur Dezellularisierung

Im Rahmen der Dezellularisierung existieren unterschiedliche Methoden, um dem Gewebe die unterschiedlichen Dezellularisierungssubstanzen zuzuführen. Dabei hängt die Effektivität der Dezellularisierung von der Funktion des Gewebes, der Gewebedicke und -dichte und der verwendeten Detergens ab und muss so jeweils individuell angepasst werden. (Crapo 2011; Gupta 2018)

1.4.3.2.1 Organperfusion

Um die dreidimensionale Architektur des Organs mitsamt der EZM zu erhalten, scheint die Organperfusion am effektivsten. Ebenso ist dies auch eine effiziente Methode, um Zellen mit den Dezellularisierungssubstanzen zu versorgen und Zellreste abtransportieren zu können (Henderson 2010). Dabei konnte in diversen Studien die Dezellularisierung von Herz (Ott 2008; Wainwright 2010), Lunge (Cortiella 2010; Ott 2010; Petersen 2010; Price 2010), Leber (Shupe 2010; Uygun 2010) und Nieren (Baptista 2009; Liu 2009; Ross 2009) unter Erhalt der EZM-Matrix, Retention von Kollagenen, Fibronectin und Laminin sowie die Entfernung von DNA-Bestandteilen nachgewiesen werden. (Crapo 2011)

1.4.3.2.2 Druckgradient

Die Erzeugung eines Druckgradienten über dem Gewebe während der Dezellularisierung kann zur Ergänzung bei Enzymbehandlung durchgeführt werden, um die EZM-Ultrastruktur besser erhalten zu können (Prasertsung 2008). So konnten dadurch Hohlgewebe wie Nabelvenen (Montoya 2009) oder Harnblasen (Bolland 2007) effektiv dezellularisiert werden.

1.4.3.2.3 Überkritisches Kohlenstoffdioxid

Als überkritisches Kohlenstoffdioxid bezeichnet man Kohlenstoffdioxid, welches in einem Aggregatzustand zwischen Gas und Flüssigkeit liegt. Dies kann zur schonenden Entfernung von Zellresten sowie zur Eliminierung von DNA in Verbindung mit Ethanol genutzt werden (Sawada 2008). Dabei ist der Vorteil der überkritischen Gasdezellularisierung die Verwendung einer inaktiven Substanz, wie beispielsweise Kohlenstoffdioxid, zur Zellabtrennung, die minimale Veränderung der mechanischen Eigenschaften der EZM sowie die vereinfachte Aufbewahrung durch Gefriertrocknung (Crapo 2011; Gupta 2018).

1.4.3.2.4 Immersion und Agitation

Da nicht alle Gewebe über ein anatomisch abgeschlossenes, arteriovenöses Gefäßsystem verfügen, kommen auch andere Dezellularisierungsmethoden mit Immersion („Eintauchen“) und Agitation („Bewegung, Rühren“) zum Einsatz (Henderson 2010). Dabei hängt die Dauer des Protokolls von der Gewebedicke und -dichte, des verwendeten Detergens sowie die Intensität der Agitation ab (Crapo 2011). Durch Immersions- und Agitationsmethoden sind bisher eine Vielzahl von Gewebedezellularisierungen beschrieben worden. Dazu gehören Herzklappen (Meyer 2006; Tudorache 2007; Cebotari 2010), Blutgefäße (Montoya 2009; Gui 2010; Lehr 2011), Skelettmuskeln und Sehnen (Cartmell 2000; Woods 2005; Stern 2009; Gillies 2011), periphere Nerven (Hudson 2004; Karabekmez 2009) sowie das Rückenmark (Guo 2010), Knorpel und Menisken (Cheng 2009; Elder 2010), Trachea, Ösophagus (Ozeki 2006), Dermis (Xu 2008; Reing 2010) und Harnblase (Freytes 2008; Yang 2010).

1.4.4 Aufbau und Funktion Extrazellulärmatrix

Da die EZM die ideale physikalische und funktionelle Mikroumgebung für Zellen bereitstellt, gilt sie per Definition als ideales biologisches Scaffold und hat somit in der Verwendung als Bioscaffold an Bedeutung gewonnen (Badylak 2007; Kim 2016). Die jeweilige EZM stellt eine komplexe und dynamische Komponente der verschiedenen Gewebe dar und fungiert als Gerüst für Zellproliferation und -differenzierung und ermöglicht eine organspezifische Interaktion von Zellen untereinander und mit ihrer Umgebung (Bissell 1987; Kleinman 2003; Rosso 2004; Horne-Badovinac 2014).

Zu den Hauptbestandteilen der EZM zählen Kollagen, Laminin, Fibronectin, Glykosaminoglykane (GAGs), welche unterschiedliche Funktionen haben (Hodde 1996; Badylak 2004, 2007; Aamodt 2016).

Als das am häufigsten vorkommende Protein innerhalb der EZM macht Kollagen mehr als 90 % des Trockengewichtes der EZM aus (van der Rest 1991). Dabei entsteht jeder Kollagen-Typ durch Zellen, die während der Zelldifferenzierung jeweils ein spezifisches Genmuster exprimieren. Kollagene sind eng mit glykolysierten Proteinen, Wachstumsfaktoren und anderen strukturellen Proteinen wie Elastin oder Laminin verbunden (van der Rest 1991). Bisher wurden 20 verschiedene Kollagenarten identifiziert. Die Vielfalt und die Assoziation mit anderen Molekülen lässt eine hochkomplexe, gewebespezifische Ultrastruktur der EZM entstehen und zeigt die Schwierigkeit eine künstliche EZM herzustellen. Darunter ist Kollagen Typ I eines der häufigsten und wichtigsten Strukturproteine im Gewebe und zeichnet sich durch eine hohe mechanische Belastungsstabilität aus. Kollagen Typ III ist Teil von Geweben, die eine Flexibilität und Anpassungsfähigkeit vorweisen müssen, wie beispielsweise Lunge,

Leber, Haut, Milz, Harnblase und Gefäßen. Als Bestandteil der Basalmembran von Gefäßen und Geweben spielt beispielsweise Kollagen Typ IV eine entscheidende Rolle (Barnard 1991). Zusätzlich verleiht Kollagen Typ VI als kleines Protein dem Gewebe eine gelartige Beschaffenheit und dient als Verbindungsstruktur zwischen GAGs und größeren Strukturproteinen wie Kollagen Typ I. Als Teil der Basalmembran der Epidermis schützt Kollagen Typ VII die darüber liegenden Keratinozyten vor Scherbelastungen. (Gelse 2003; Badylak 2004)

Fibronektin, ein dimeres Molekül, kommt als zweithäufigster Bestandteil der EZM in submukösen Strukturen, der Basalmembran und interstitiellem Gewebe vor und ist entscheidend an der Zell-Matrix-Kommunikation und der Entwicklung von Gefäßstrukturen beteiligt. (McPherson 1998; Schwarzbauer 1999; Badylak 2004)

Laminin, ein komplexes Adhäsionsprotein, ist als Bestandteil der Basalmembran an der Bildung und Erhaltung von Gefäßstrukturen beteiligt. Aufgrund des Problems der Nährstoffversorgung und Vaskularisierung bei Verwendung von biologischen Scaffolds im Rahmen des Tissue Engineerings sollte Laminin deshalb eine besondere Beachtung geschenkt werden. (Ponce 1999; Schwarzbauer 1999; Werb 1999; Badylak 2004; Ko 2007; Phelps 2009)

Abhängig von der Lokalisation des Gewebes und der Mikroumgebung enthält die EZM unterschiedliche Anteile von GAGs. Dabei binden sie Zytokine und Wachstumsfaktoren, fördern die Retention von Wasser und führen zur gelartigen Struktur der EZM (Badylak 2004). Zu den GAGs zählen Chondroitinsulfat A und B, Heparin, Heparansulfat und Hyaluronsäure (Entwistle 1995; Hodde 1996).

Von anderen Scaffolds im Tissue Engineering unterscheidet sich die intakte EZM weiterhin durch die Vielfalt an strukturellen und funktionellen Proteinen. Dabei bieten die bioaktiven Moleküle mit ihrer einzigartigen, räumlichen Verteilung ein Reservoir an biologischen Signalen. Zu den Zytokinen und Wachstumsfaktoren, welche in der EZM eine Rolle spielen, zählen unter anderem der vascular endothelial cell growth factor (VEGF), der fibroblast growth factor (FGF), der transforming growth factor- β (TGF- β), der keratinocyte growth factor (KGF), der hepatocyte growth factor (HGF), der platelet derived growth factor (PDGF) und das bone morphogenetic protein (BMP) (Roberts 1988; Kagami 1998; Bonewald 1999). (Badylak 2004).

Die EZM befindet sich in einem sensiblen Gleichgewicht mit der umliegenden Mikroumgebung und den jeweiligen Zellen des Gewebes, welche die EZM individuell aufbauen und anpassen können (Bissell 1987). Die EZM ist offensichtlich biokompatibel, da Wirtszellen ihre eigene Matrix produzieren können und bietet neben dem strukturellen Gerüst auch Lymphgefäße, Nerven und Blutgefäße, welche zur Diffusion von Nährstoffen für die Zellen wichtig sind. Grundsätzlich konnten Forscher die einzigartige

Rolle der EZM beim Gewebewachstum sowie der Regeneration verstehen, eine synthetische Herstellung von EZM ist jedoch aufgrund der komplexen dreidimensionalen Struktur weiterhin Bestandteil der Forschung (Kim 2016; Theocharis 2016). (Badylak 2007)

Unter Verwendung einer nativen EZM können die Vorteile für Zellwachstum und -differenzierung durch das Vorhandensein von Wachstumsfaktoren und der dreidimensionalen Ultrastruktur ausgenutzt werden (Roberts 1988; Entwistle 1995; Kagami 1998; Bonewald 1999; Badylak 2004).

1.4.5 Rezellularisierung

Nach Dezellularisierung kann so das Scaffold mit aufgehobener Immunogenität zu erneuter Besiedelung mit Zellen genutzt werden (Florian 2019). Im Rahmen einer Rezellularisierung können so beispielsweise Organe dezellularisiert und anschließend rezellularisiert werden. Um das Problem der Vaskularisation im Bereich des Tissue Engineering zu lösen, wurden so Organe über das vorhandene Gefäßsystem dezellularisiert, anschließend rezellularisiert und durch Perfusion des Gewebes konnte so eine ausreichende Diffusion von Nährstoffen für die rezellularisierten Zellen gewährleistet werden. (He 2013)

Dabei konnten bisher ganze Lungen und Lebern erfolgreich dezellularisiert, rezellularisiert und implantiert werden (Ott 2010; Petersen 2010; Uygun 2010). Im Jahr 2008 konnte ein perfundiertes, pumpendes Herz einer Ratte erzeugt werden, welches nach Dezellularisierung mit Kardiomyozyten und Endothelzellen besät wurde (Ott 2008). Es wurden von den Arbeitsgruppen artgleiche oder artfremde, wie neonatale Zellen, verwendet, um die Funktion des ursprünglichen Organs wiederherzustellen.

Im Unterschied dazu ist das Ziel unserer Arbeitsgruppe ein biologisches Scaffold unter Erhalt der EZM und Ausnutzung des Gefäßnetzes zu generieren, um ein über Artgrenzen und Zelltypen hinweg einsetzbares Gewebekonstrukt zu erhalten. Im Sinne einer Xenotransplantation werden dafür in unserer Arbeitsgruppe humane Osteoblasten in murine Nieren eingebracht. Es soll dabei nicht das Gewebe und die Funktion des ursprünglichen Organs wiederhergestellt werden. In unserem Forschungsansatz wird im Sinne eines doppelten Paradigmenwechsels humaner Knochen in murinen Nieren produziert. (Burgkart 2014)

1.5 Mechanische Stimulation

Im Jahr 1892 publizierte Julius Wolff, ein Berliner Anatom, sein nach ihm benanntes Gesetz: das Wolffsche Gesetz. Dieses besagt, dass der menschliche Knochen und die Knochenstruktur sich an die Belastung im Sinne von „Form folgt Funktion“ anpasst. Dabei verändern Knochen trabekel ihre Ausrichtung in Richtung der mechanischen

Belastung und Festigkeit sowie Knochendichte nehmen zu. Bei ausbleibender Belastung degeneriert der Knochen dementsprechend und nimmt an Festigkeit ab. (Wolff 1892). Eine Stimulation von Knochen führt durch die mechanischen Reize zu einer Freisetzung von chemischen Signalen zwischen Zellen, die das Knochenwachstum steuern (Duncan 1995). Diese, auch als Mechanotransduktion bekannte Signalumwandlung, findet beim Menschen durch alltägliche Belastung des Skelettsystems statt und wird hauptsächlich durch die mechanosensiblen Osteozyten gesteuert. Osteozyten haben durch diverse Signalmoleküle, wie Adenosintriphosphat (ATP) (Rumney 2012), Prostaglandine (Ajubi 1999; Galea 2011) und Stickoxide (Zaman 1999), Einfluss auf die Aktivität von Osteoblasten und Osteoklasten (Kawata 1998; Klein-Nulend 2013). Die genauen Mechanismen und Abläufe sind jedoch weitgehend unerforscht und unerklärt (Rath 2008). Ziel bei *in vitro* durchgeführten Studien ist, unter kontrollierten Zellkulturbedingungen physiologischen und gegebenenfalls auch pathologisch hohen Stress auf die Zellen auszuüben. Dabei können auch verschiedene Belastungsarten isoliert untersucht werden, um die Wirkung auf Knochenzellen zu vergleichen (McGarry 2005; Rumney 2012). Auch wenn physiologisch verschiedene Zellen und Differenzierungsstadien der Zellen zusammenspielen, können in *in vitro* Modellen auch einzelne Zelltypen in bestimmten Phasen untersucht werden (McCoy 2010). Häufig wurden die nicht-physiologischen Umgebungsbedingungen bei *in vitro*-Studien kritisiert, jedoch können nun durch die Fortschritte der Zellkulturtechnik Zellkulturen auch in 3D-Scaffolds gezüchtet und stimuliert werden. Darüber hinaus sind hier Co-Kulturen zwischen Osteoblasten und Osteozyten sinnvoll, um die Interaktion zwischen diesen Zellen genauer zu untersuchen (Vazquez 2014). (Delaine-Smith 2015)

Im Jahr 2015 publizierte Delaine-Smith et al. alle gängigen Methoden zur mechanischen Stimulation von Knochenzellen, welche im Folgenden dargestellt sind (Delaine-Smith 2015). Hierbei werden prinzipiell Stimulationsvarianten zwischen Monolayer-Kulturen, also einschichtigen Zelllagen und 3D-Kulturen unterschieden.

1.5.1 Monolayer-Stimulation

Vibration ist die häufigste Methode, um mechanischen Stress auf Zellen zu bringen. Dabei werden Zellen auf eine Multiwell-Platte bis zu einer Konfluenz von 80 % ausgesät und bei niedriger Amplitude und hoher Frequenz durch horizontale Bewegungen „gestresst“ (siehe Abbildung 1). (Lau 2010; Uzer 2012)

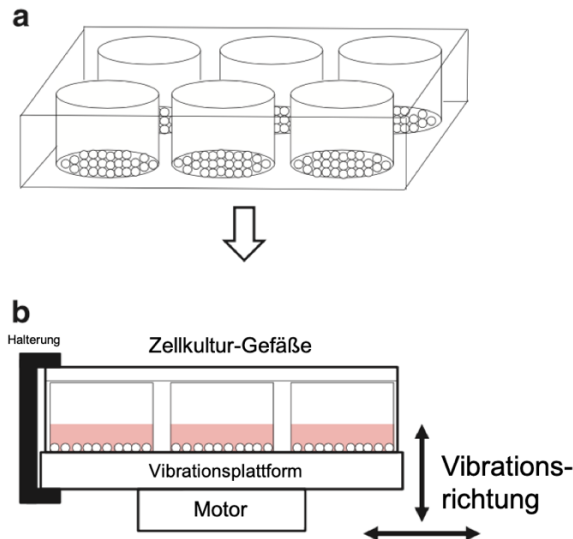


Abbildung 1: Vibration im Monolayer. Zellen werden dazu auf Multiwell-Platten ausgesät (a) und durch horizontale Bewegungen gestresst (b); modifiziert nach (Delaine-Smith 2015).

Durch Flüssigkeitsströmungen kann in zwei unterschiedlichen Varianten ein Wachstumsreiz auf osteogene Zellen ausgeübt werden. Dabei sollen diese Flüssigkeitsbewegungen den interstitiellen Fluss im Knochen nachahmen. Dies kann durch zwei verschiedene Methoden imitiert werden. Bei Variante 1 werden Zellen in Petrischalen bis zu einer Konfluenz von 80 % kultiviert und mit Medium bedeckt. Danach werden diese Platten auf einer elektrischen Wippe platziert und durch die schaukelnden Kippbewegungen („rocking see-saw“) Stress auf die Zellen durch den damit einhergehenden Flüssigkeitsstrom ausgeübt (siehe Abbildung 2). (Zhou 2010; Delaine-Smith 2012)

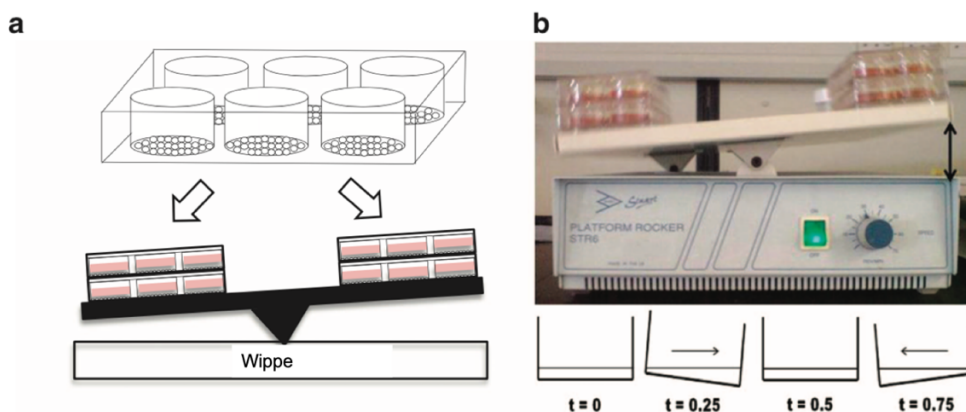


Abbildung 2: Flüssigkeitsströmungen im Monolayer. Zellen werden in Multiwell-Platten ausgesät und auf der Wippe platziert (a) und durch Kippbewegungen („rocking see-saw“) gestresst (b); modifiziert nach (Delaine-Smith 2015).

Als zweite Variante werden parallele Plattenströmungskammern (parallel-plate flow chamber) verwendet, um durch verschiedene Strömungsprofile (kontinuierlich, pulsatil oder oszillierend) physiologische Scherkräfte auf die Zellen zu erzeugen. Dabei werden die Zellen auf vorbeschichtete Glasobjektträger gesät, welche in einem Inkubator

befestigt werden. Das Medium wird dann durch eine Pumpe angetrieben und erzeugt einen Flüssigkeitsstrom, welcher an den Zellen vorbeigeleitet wird und so Stress ausübt (siehe Abbildung 3). (Morris 2010; Lane 2012)

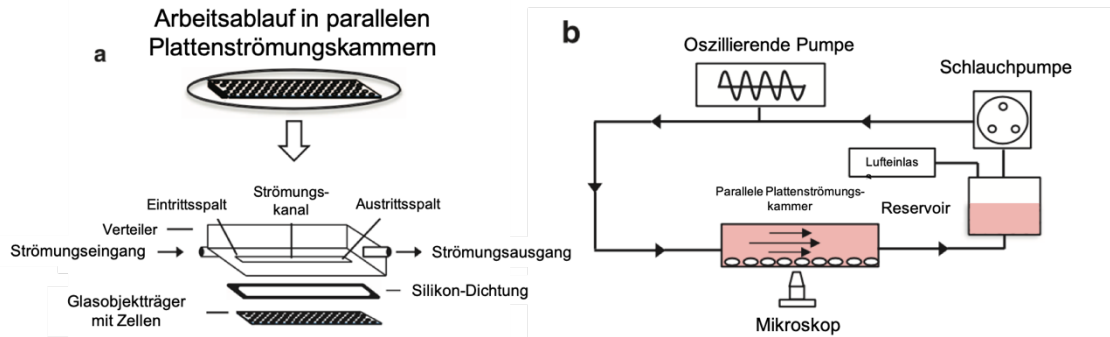


Abbildung 3: Parallele Plattenströmungskammern. Zellen werden auf vorbeschichtete Glasobjektträger gesät (a) und durch einen Flüssigkeitsstrom gestresst (b); modifiziert nach (Delaine-Smith 2015).

In Monolayer-Kulturen kann ebenso durch Dehnung Stress auf osteogene Zellen ausgeübt werden. Dabei werden häufig das sogenannte FlexCell-System und ein Verbiegungs-System verwendet (Delaine-Smith 2015).

Das FlexCell-System besteht aus einer computergesteuerten Vakuum-Einheit und einer Basisplatte (Kautschuk-Membran) zur Befestigung von flexiblen Kulturschalen. Durch Anlegen eines Vakuums wird die Basisplatte gedehnt und verformt, wodurch ein Dehnungsstress auf die in den Kulturschalen befindlichen Zellen ausgeübt wird (siehe Abbildung 4). (Banes 1985)

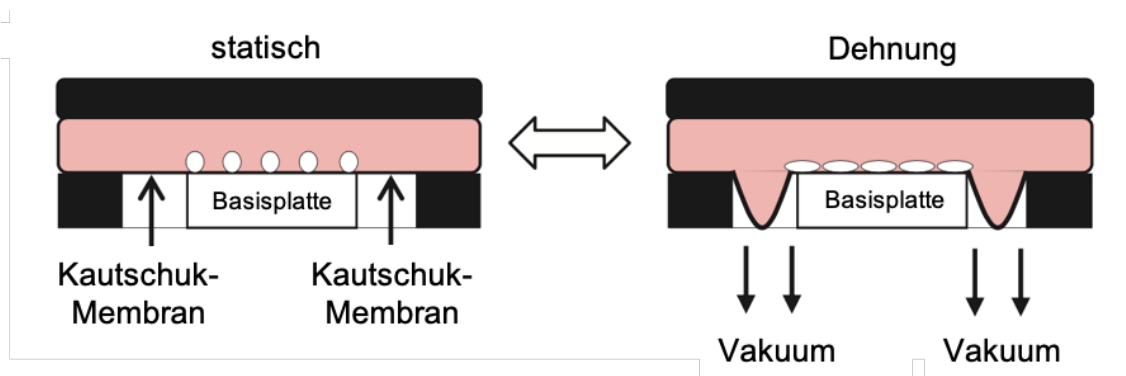


Abbildung 4: FlexCell-System; modifiziert nach (Delaine-Smith 2015)

Durch das Vier-Punkt-Biegemodell (four-point bending model) werden Zellen auf Plastikobjektträger ausgesät und in einer Halterung durch einen Motor verbogen, um so ebenfalls Dehnungsreize auslösen zu können (siehe Abbildung 5) (Jessop 2004; Rumney 2012).

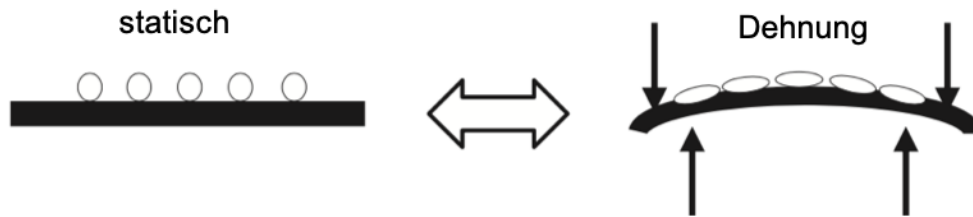


Abbildung 5: Vier-Punkt-Biegemodell; modifiziert nach (Delaine-Smith 2015)

1.5.2 3D-Scaffold Stimulation

3D-Zellkulturen sollen deutlich realistischere und physiologischere Umgebungsbedingungen für Zellen schaffen, um so in den Laborversuchen die in vivo Verhältnisse besser nachzustellen. Dafür werden Zellen kultiviert und in Scaffolds ausgesät, wobei die Scaffolds Zelladhäsion und -proliferation fördern und eine geeignete Steifigkeit und Porosität aufweisen sollen (Sachlos 2003; Wiesmann 2004; Earthman 2006; Murphy 2010). Im Bereich des Knochen Tissue Engineerings werden häufig nicht-vaskularisierte Scaffolds aus Materialien wie Hydroxylapatit, Trikalziumphosphat-Gerüste, Polyurethan-Schwämme, Gerüste auf Kollagenbasis oder elektrogewebene Matrizes verwendet (Yoshimoto 2003; Vance 2005; Dumas 2009; Sittichokechaiwut 2009; Sumanasinghe 2009; Bye 2012). Die mechanische Stimulation kann dabei auch auf verschiedenen Wegen wie Vibration, Strömung durch Perfusion, Dehnung oder direkten Kompressions- und Druckbelastungen ausgeübt werden (siehe Abbildung 6). Dabei muss das ausgewählte Scaffold an die Anforderung angepasst werden. (Delaine-Smith 2015)

Wie auch im Monolayer können 3D-Kulturen auf Vibrationsplatten gestellt werden, um so durch die mechanische Stimulation eine Zunahme der osteogenen Genexpression hervorzurufen (Zhou 2011; Kim 2012). Auch kann durch Flüssigkeitsströmungen die Aktivität der Osteoblasten erhöht werden. Dabei wird das Scaffold in eine Kammer eingebracht und die Flüssigkeit unidirektional, pulsatil oder oszillierend durch die Kammer gepumpt, wodurch die Zellen wiederum Scherbelastungen ausgesetzt werden. Die Flüssigkeit wird dabei, je nach Porosität des Scaffolds, durch oder um das Scaffold gespült (Bancroft 2002; Jaasma 2008; Du 2009).

Im 3D-Scaffold kann ebenso mit Zugbelastung durch Dehnung eine Anregung der Osteoblasten stattfinden. Dabei wird das Scaffold an beiden Seiten fixiert und bei 5-10 % Dehnung mechanischer Stress auf die osteogenen Zellen gebracht (Byrne 2008; Kearney 2010). Auch findet durch Druckbelastung und Kompression der Oberfläche des Scaffolds eine Stimulation der osteogenen Zellen statt. Hier wird das Scaffold zwischen zwei Platten oder einem Stempel platziert und durch statische oder zyklische Druckbelastung komprimiert. Dabei konnten in Versuchen eine Hochregulation von osteogenesfördernden Enzymen in Trikalziumphosphat-Scaffolds beobachtet werden

(Ravichandran 2017). Durch die Verwendung eines Drucksensors kann die applizierten Druckbelastungen kontrolliert und gegebenenfalls angepasst werden (Dumas 2009; Sittichockechaiwut 2009). Bei Kompression wird das Scaffold auch zusätzlich Scherkräften durch Flüssigkeitsströme innerhalb des Scaffolds ausgesetzt. (Delaine-Smith 2015)

Im Gegensatz dazu verfolgt unsere Arbeitsgruppe einen neuen und innovativen Ansatz mit *in vitro* 3D-Stimulation von vaskularisierten murinen Scaffolds nach Rezellularisierung mit xenogenen Osteoblasten. Damit sollen unter anderem die Vorteile der biologischen EZM, des Gerüsts mit entsprechender mechanischer Stabilität und des vorhandenen Gefäßsystems ausgenutzt werden.

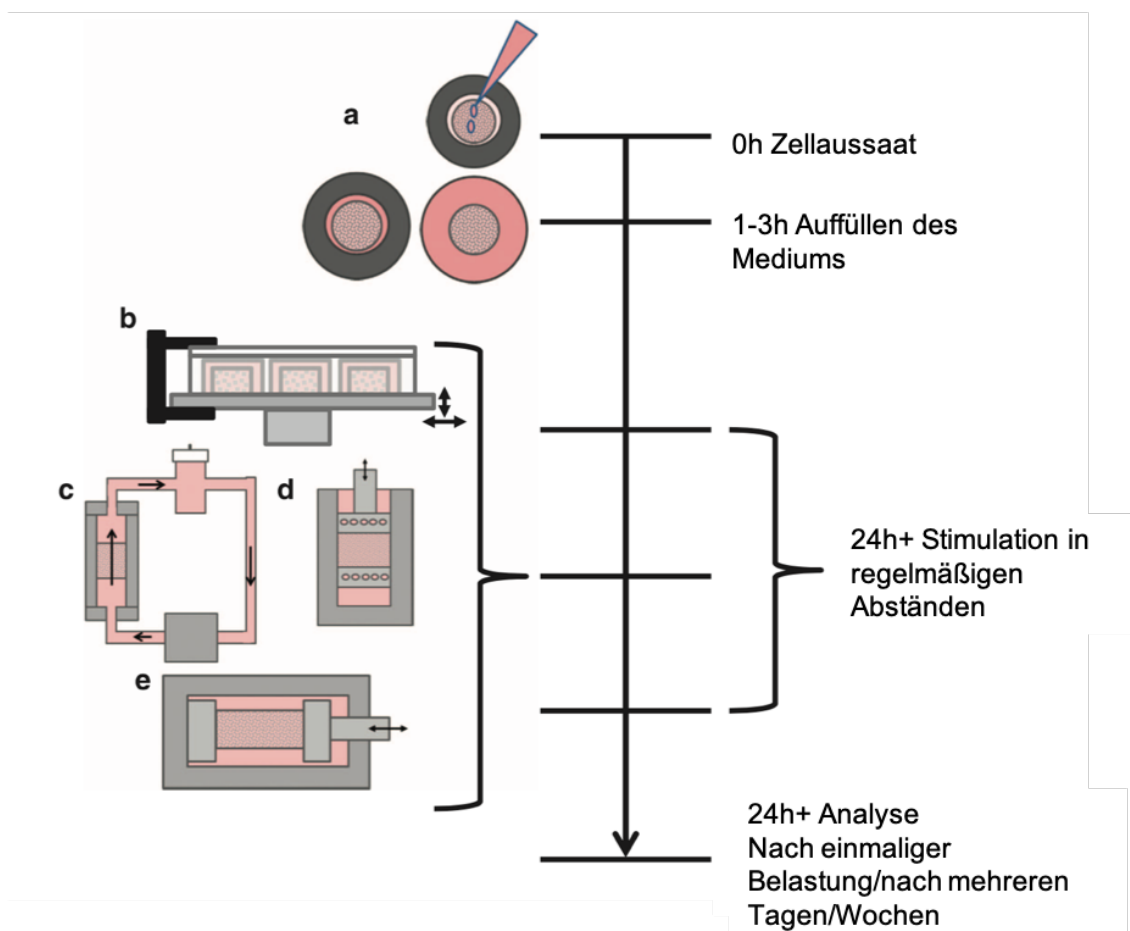


Abbildung 6: 3D-Stimulation. Zellen werden auf die Scaffolds gesät und inkubiert (a) und anschließend durch Vibration (b), Flüssigkeitsströmungen (c), Kompression (d) oder Zugbelastung (e) gestresst; modifiziert nach (Delaine-Smith 2015).

2 Fragestellung und Zielsetzung

Die genauen Prozesse und Signalumwandlungen der Mechanotransduktion sind weiterhin Gegenstand aktueller Forschung. Daher ist es im Bereich des Tissue Engineerings essentiell, möglichst physiologische Bedingungen bei experimentellen Versuchsanordnungen zu schaffen. Um die Auswirkungen von mechanischer Stimulation auf das Wachstumsverhalten von humanen Osteoblasten näher untersuchen zu können, wurde in unserer Arbeitsgruppe ein etabliertes und zeiteffektives Verfahren entwickelt, um biologische Scaffolds als Grundlage des Tissue Engineerings zu schaffen (Burgkart 2014; Schmitt 2017). So wurden Verfahren zur xenogenen Rezellularisierung der Bioscaffolds mit humanen Osteoblasten auf technische Durchführbarkeit und Immunogenität erstmalig entwickelt und der Dezellularisierungs- und Rezellularisierungsprozess systematisch optimiert. Zusätzlich konnte das Scaffold auch für Osteosarkom- und Endothelzellen als Grundlage genutzt werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Experimente folgende Probleme lösen:

- Etablierung und Problembhebung der automatisierten Dezellularisierung mit Hilfe einer automatisierten Dezellularisierungseinheit und Überprüfung der Azellularität der biologischen Scaffolds unter Erhalt der EZM
- Anpassungen des Setups (Miniatürkubator, Wärmeschrank, Medienwechselsystem) zur Langzeitkultur des rezellularisierten Scaffolds im Wärmeschrank unter Einhaltung der Sterilität
- Etablierung der mechanischen Stimulation mit Hilfe einer mechanischen Stimulationseinheit der rezellularisierten Bioscaffolds unter Einhaltung der Sterilität und Ermöglichung von Langzeitkulturen

3 Material und Methoden

Im nächsten Abschnitt werden alle verwendeten Materialien sowie Methoden dargestellt. Dabei konnte durch unsere Arbeitsgruppe schon ein standardisiertes Protokoll zur Aufbereitung der Zellen, der Nieren sowie des Dezellularisierungs- und Rezellularisierungsprogramms entwickelt werden, das für weitere Fragestellungen direkt zu Anwendung kommen kann (Burgkart 2014; Schmitt 2017).

3.1 Material

Im Folgenden werden Materialien aufgelistet, die einerseits zur Proliferation von Osteoblasten sowie zur Bearbeitung der Rattennieren verwendet werden. Dabei müssen die Osteoblasten zuerst isoliert und ausgesät werden, um später zu amplifiziert zu werden und für die Rezellularisierung zur Verfügung zu stehen. Die Rattennieren müssen primär entnommen und gelagert werden. Nach Präparation, Vorbereitung und Dezellularisierung erfolgt die Proliferation von humanen Osteoblasten unter mechanischer Stimulation. Abschließend werden die Nieren histologisch und immunhistochemisch aufgearbeitet.

3.1.1 Laborgeräte

In Tabelle 2 werden alle Laborgeräte, die für die Versuche verwendet wurden, dargestellt.

Tabelle 2: Laborgeräte

Laborgerät	Modell	Hersteller
Steril-Werkbank	Hera Safe	Thermo Fisher Scientific, USA
Brutschrank	Hera Cell 150	
Kühlschrank	Minus-80-Grad-Celsius	
Gewebeeinbettautomat	Excelsior ES	
Spectrophotometer	NanoDrop2000	
Pipette	Reference®	Eppendorf AG, Deutschland
Pipettierhilfe	Easypet®	
Zentrifuge	Centrifuge 5810 R	
Thermomixer	Comfort	Eppendorf
Mikroskop	Axiovert 25	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Deutschland
	Observer Z.1	
Arthroskopie-Rollerpumpe	Continuous Wave II AR-6450	Arthrex Medizinische Instrumente GmbH, Deutschland
	Continuous Wave III	
Wasserbad	SUB	Grant Instruments, UK
	HI 1210	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Deutschland
pH-Meter	InoLab pH Level 1	Xylem Analytics Sales GmbH, Deutschland
Trockenofen	ED115	Binder GmbH, Deutschland
Wärmeschrank		
CO ₂ -Controller	CO ₂ -Controller 2000	PeCon GmbH, Deutschland
Mikrotom	Slide 4003E	pfm medical AG, Deutschland
	Mikrom HM 560	
Vakuumiergerät	VAC Star Easy	VAC-STAR AG, Schweiz
Stickstofftank		Air Liquide Medical GmbH, Deutschland
Waage	Kern PEJ 220-3M	Kern&Sohn GmbH, Deutschland
Magnetrührer	IKA®RCT basic	IKA®-Werte GmbH & Co. KG, Deutschland
Vortex	MS2 Minishaker	
Mikrowelle	Micromat Duo	AEG, Deutschland
3D-Drucker	Ultimaker 2+	Ultimaker
Autoklav	2540 EL	Systemec GmbH, Deutschland

3.1.2 Labormaterialien

In Tabelle 3 werden alle Labormaterialien aufgelistet.

Tabelle 3: Labormaterialien

Produktname	Hersteller
Extension Line Type: Heidelberger	B.Braun Melsungen AG, Deutschland
Discofix [®] C Drei-Wege-Hahn	
Omnifix [®]	
Vasofix [®] Safety 20G	
Spritze Injekt [®] 2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml	
EASYstrainer [™] 40 µm	Greiner Bio-one GmbH, Deutschland
CellStar [®] Tubes 15 ml, 50 ml	
Pipette 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	
Filtertips 10 µl, 1100 µl, 1250 µl	
Zellkulturflasche 50 ml, 25 cm ²	
Suprafrost Ultra Plus Objektträger	Thermo Fisher Scientific, USA
Menzel-Gläser Deckgläser	
Main Tubing AR 6420	Arthrex Medizinische Instrumente GmbH, Deutschland
Eppendorf Tubes	Eppendorf AG, Deutschland
Tissue Culture Flask Vented Cap 750 ml, 175 cm ²	Corning GmbH, Deutschland
Glasflaschen Dura	Schott AG, Deutschland
Norm-Ject [®] , Einmalspritze	Henke Sass Wolf, Deutschland
Ethilon 5-0 Chirurgischer Faden	Johnson&Johnson Medical GmbH, Deutschland
BD Neoflon [™] 26G	Becton Dickinson GmbH, Deutschland
BD Microlance 3	
Trypticase [™] Soy Agarplatte	
Blutagarplatte (Columbia, 5 % Sheep Blood)	
TC-Schale 100 Cell +	Sarstedt AG & Co., Deutschland
Feather Disposable Scalpel No. 15, No. 21	FEATHER [®] Safety Razor Co. Ltd., Japan
Mikrotom Klingen Nr. 35	
Millex [®] -FA	Millipore Corporation, USA
Micro-Touch [®] Coated	Ansell Limited
semperguard [®] comfort	Semperit Technische Produkte GmbH
equiCover Latex	Cross Health Care GmbH
Klarsichtflächbeutel ISO 11607	steriCLIN
Malt Extract Agarplatte	VWR Chemicals, Belgien
DG 18 Metal Agarplatte	
Hohlmeißelzange nach Luer	Aesculap AG, Deutschland

3.1.3 Zellkulturmedien

In Tabelle 4 sind die Zellkulturmedien dargestellt, die zur Dezellularisierung und Perfusion der Nieren, sowie zur Proliferation der Osteoblasten verwendet wurden.

Tabelle 4: Zellkulturmedien und Zusätze

Produktname	Hersteller
L-Glutamine Solution	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
MEM Vitamin Solution	
HEPES buffer solution	
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	
Trypsin EDTA Solution	
L-Ascorbic acid	
Dexamethasone	
Penicillin-Streptomycin Solution	
Dulbecco's MEM w/o Calcium	Pan-Biotec GmbH, Deutschland
Fetal Bovine Serum	Biochrom GmbH, Deutschland
Primocin™	Invivo Gen, USA
Revocery™ Cell Culture Freezing Medium	Thermo Fisher Scientific, USA
Gibco™ Amphotericin B	

3.1.4 Laborchemikalien

Tabelle 5 und 6 zeigt weitere Chemikalien, die zur Behandlung der Zellen, Nieren und Aufarbeitung der Nieren verwendet werden.

Tabelle 5: Laborchemikalien

Produktname	Hersteller
Trypan Blue solution	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Tri-Natriumcitrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Eosin-G	
Roticlear®	
SDS Pellets	
Eukitt®	O. Kindler ORSAtec GmbH, Deutschland
PFA-Lösung 8 %	Apotheke, Klinikum rechts der Isar, Deutschland
Mayers Hämatoxylin	
dH ₂ O 1000 ml	B.Braun Melsungen AG, Deutschland
Alkopharm 70 %, vergällt mit MEK	Brüggemann Alcohol, Deutschland
Ethanol 96 %, 100 % vergällt mit MEK	Otto Fischer GmbH & Co. KG, Deutschland
Fermacidal D2®	IC Products SA, Schweiz

Tabelle 6: Fortsetzung Laborchemikalien

Produktname	Hersteller
Xylol	Aug. Hedinger GmbH & Co. KG, Deutschland
Salzsäure	Merck KGaA, Deutschland
Kaisers Glycerin-Gelatine	
AEC +	Dako GmbH, Deutschland
Antibody Diluent	
Cytomation Peroxidase Blocking	
Protein Block	
IS Mounting Medium DAPI	Dianova GmbH, Deutschland
DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen, Deutschland

3.1.5 Protokolle für Zellkultur und Chemikalienszusammensetzungen

In Tabelle 7 bis Tabelle 15 werden Protokolle zur Erstellung verschiedener Medien aufgelistet.

Tabelle 7: Osteogenes Medium 1

Medium Zellkultur	Dosierung
DMEM (ohne Ca ²⁺)	80 %
FCS	15 %
HEPES	1,6 %
MEM-Vitamine	0,8 %
L-Glutamin	2 mM
L-Ascorbinsäure	2,8 µM
Dexamethason	10 nM

Tabelle 8: Osteogenes Medium 2

Medium Inkubator	Dosierung
DMEM (ohne Ca ²⁺)	80 %
FCS	15 %
HEPES	1,6 %
MEM-Vitamine	0,8 %
L-Glutamin	2 mM
L-Ascorbinsäure	2,8 µM
Dexamethason	10 nM
Primocin™	100 mg/l

Tabelle 9: SDS 3 %

SDS 3 %	Dosierung
dH ₂ O	1000 ml
SDS Pellets	30 g

Tabelle 10: SDS 0,66 %

SDS 0,66 %	Dosierung
dH ₂ O	1000 ml
SDS Pellets	6,6 g

Tabelle 11: Penicillin/Streptomycin

Penicillin/Streptomycin	Dosierung
dH ₂ O	1000 ml
Penicillin-Streptomycin Solution	10 ml

Tabelle 12: PBS

Phosphat Buffered Saline (PBS)	Dosierung
Dulbecco's PBS Lösung (10x)	100 ml
dH ₂ O	900 ml

Tabelle 13: Natrium-Citrat-Puffer

Natrium-Citrat-Puffer	Dosierung
dH ₂ O	1000 ml
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	2,94 g
HCl	Titrieren auf pH=6

Tabelle 14: PFA 4 %

Paraformaldehyd 4 %	Dosierung
PFA 8 %	50 %
PBS	50 %

Tabelle 15: ABC-Komplex

ABC-Komplex	Dosierung
PBS	5 ml
Reagenz A	2 Tropfen
Reagenz B	2 Tropfen

3.1.6 Primäre und sekundäre Antikörper, Immunhistologie

Nachfolgend werden die primären und sekundären Antikörper der Immunhistochemie in Tabelle 16 und Tabelle 17 dargestellt.

Tabelle 16: Primäre Antikörper

Antikörper	Firma	Verdünnung	Inkubationszeit (Temperatur)
Laminin	Dako	1:500	Über Nacht (4 °C)
Fibronektin		1:1000	
PCNA		1:400	
Kollagen Typ I	abcam	1:125	
Osteocalcin	Santa Cruz	1:150	
Kollagen Typ IV	Dako	1:30	

Tabelle 17: Sekundäre Antikörper

Antikörper	Firma	Verdünnung
Anti-Kaninchen IgG	Vector	1:200
Anti-Maus IgG	Vector	1:200

3.1.7 Miniaturinkubator

In Tabelle 18 sind alle Bestandteile des Miniaturinkubators aufgeführt.

Tabelle 18: Miniaturinkubator

Produktname	Hersteller
Standplatte	Eigenanfertigung
Klemmplatte	
Gewindestange für Klemmplatte	
Deckel (POM) inkl. Dichtungsring	
Luer-Lock-Adapter (männlich/weiblich; PP)	RCT Reichelt Chemietechnik GmbH + Co., Deutschland
Discofix® C Drei-Wege-Hahn	B.Braun Melsungen AG, Deutschland
Main Tubing AR 6420	Arthrex Medizinische Instrumente GmbH, Deutschland
Arthroskopie-Rollerpumpe	Arthrex Medizinische Instrumente GmbH, Deutschland
Extension Line Type: Heidelberger	B.Braun Melsungen AG, Deutschland
Glasflasche Dura mit konstruiertem CO ₂ -Anschluss	Schott AG, Deutschland
CO ₂ -Controller	PeCon GmbH, Deutschland
CO ₂ -Flasche (Kohlendioxid 3.5; 99,95 Vol. %)	Sauerstoffwerk Friedrichshafen GmbH, Deutschland
Pyrex® Kristallisationsschale	SciLabware Ltd, Großbritannien

3.1.8 Automatische Dezellarisierungseinheit: DecellControl

Tabelle 19 listet verwendete Teile der automatischen Dezellarisierungseinheit („DecellControl“) auf.

Tabelle 19: DecellControl

Produktname	Hersteller
Arthroskopie-Rollerpumpe	Arthrex Medizinische Instrumente GmbH, Deutschland
Main Tubing AR 6420	
Extension Line Type: Heidelberger	B.Braun Melsungen AG, Deutschland
Discofix® C Drei-Wege-Hahn	
Auffangbehälter (Risikoabfallbehälter) E-Safe	Servi-Medical AG, Schweiz
Deckel in Trichterform	Eigenanfertigung
Luer-Lock-Adapter (männlich/weiblich; PP)	RCT Reichelt Chemietechnik GmbH + Co., Deutschland
Dichtungsringe (Silikonplatte)	Eigenanfertigung, SahlTec, Deutschland
Norm-Ject®, Einmalspritze	Henke Sass Wolf, Deutschland
Gewichte für Heidelberger Leitung	Eigenanfertigung

3.1.9 Mechanische Stimulationseinheit: Tissue Squeezer

In Tabelle 20 sind alle verwendeten Teile der mechanischen Stimulationseinheit („Tissue Squeezers“) zur mechanischen Stimulation aufgelistet.

Tabelle 20: Tissue Squeezer

Produktname	Hersteller
Tissue Squeezer, inkl. Stromversorgung	Eigenherstellung mit 3D-Drucker (Ultimaker 2+) aus CPE
Befestigung für Braunüle	
Halterung für Niere	
Stempel und Stempelspitze	
equiCover Latex (Ultraschall-Schutzhülle)	Cross HealthCare GmbH, Deutschland

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur humaner Osteoblasten

Die Kultur der humanen Osteoblasten erfolgt unter stetig gleichen Bedingungen in einem Brutschrank bei 37 °Celsius (°C), 5 % Kohlenstoffdioxid (CO₂) Konzentration sowie 100 % Luftfeuchtigkeit. Die Zellen werden in Zellkulturflaschen mit 25 ml osteogenem Medium 1 (Protokoll siehe Tabelle 7) kultiviert. Nach Erreichen der gewünschten Konfluenz (ca. 80 %) werden die Zellen unter der sterilen Werkbank vom Boden der Zellkulturflaschen abgelöst, quantifiziert und gegebenenfalls mit frischem Medium neu

ausgesät. Im Rahmen dieser Arbeit wurden nur Osteoblasten eines pseudonymisierten Patienten (P5) verwendet.

3.2.1.1 Entnahme der humanen Osteoblasten

Die primären, humanen Osteoblasten konnten aus humanen Femurköpfen gewonnen werden. Diese wurden bei Hüft-Totalendoprothesen-Implantation in der Abteilung für Unfallchirurgie des Klinikums rechts der Isar, München unter sterilen Bedingungen entfernt und nachfolgend im Labor weiterverarbeitet. Eine schriftliche Einverständniserklärung der Patienten im Sinne eines „informed consent“ sowie ein durch die Ethikkommission der Technischen Universität genehmigter Ethikantrag liegen vor.

Nach Entfernung von Spongiosastücken aus den Femurköpfen mit Hilfe einer Hohlmeißelzange nach Luer unter der sterilen Werkbank wurde diese mit PBS (Phosphate buffered saline) gereinigt und anschließend in Zellkulturflaschen mit osteogenem Medium 1 nach der Explant-Methode verteilt (Jonsson 1999). Um ein Auswachsen der Zellen aus den Spongiosastücken zu gewährleisten, sollten die Zellkulturflaschen möglichst ohne Erschütterung und Bewegung gelagert werden. Nach ausreichender Konfluenz konnten die Spongiosastücke entfernt, die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche mit Trypsin gelöst, quantifiziert und für Versuche erneut ausgesät oder in flüssigem Stickstoff bei -196 °C eingefroren werden.

3.2.1.2 Auftauen und Aussäen der Zellen

Bei Zellen, welche in flüssigem Stickstoff bei -196 °C gelagert wurden, ist ein schnelles Auftauen erforderlich, um den Osteoblasten möglichst wenig Schaden zuzufügen. Grund hierfür ist hauptsächlich das zytotoxische Dimethylsulfoxid (DMSO) als Konservierungsmittel, welches im Anschluss durch Zugabe von osteogenem Medium 1 in seiner Wirkung aufgehoben wird. Hierbei werden die tiefgefrorenen Osteoblasten, die in einem kleinen Eppendorf Gefäß gelagert sind, zügig in ein 37 °C warmes Wasserbad überführt und fast vollständig aufgetaut. Danach werden die Zellen in ein mit 10 ml Medium gefülltes Röhrchen gegeben und nach Quantifizierung der Zellen in einer Neubauer-Zählkammer schonend zentrifugiert (5 Minuten bei $200 \times g$). Anschließend wird der Überstand entfernt, das Zellpellet mit 25 ml osteogenem Medium 1 (Protokoll siehe Tabelle 7) resuspendiert und in Zellkulturflaschen ausgesät. Diese werden dann im Inkubator unter stetig gleichbleibenden Bedingungen bei 37 °C , 100 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO_2 -Konzentration gelagert. Die Zellen müssen nach 24 Stunden auf Adhärenz beurteilt und danach regelmäßig mikroskopisch auf Morphologie und Proliferationsverhalten kontrolliert werden.

3.2.1.3 Passagieren der Zellen

Bei Erreichen einer ausreichenden Zelldichte mit einer Konfluenz von ca. 80 % in den Zellkulturflaschen ist es notwendig die humanen Osteoblasten zu teilen bzw. passagieren und ihnen neues osteogenes Medium 1 mit frischen Nährstoffen zuzuführen. Hierfür werden die Zellkulturflaschen aus dem Brutschrank genommen und nach Desinfektion mit 70 %-Ethanol unter die Werkbank gestellt. Nach Entfernung des Mediums werden die Kulturflaschen mit 10 ml sterilem PBS gewaschen, um die Aktivität des nachfolgenden Trypsins durch Bestandteile des osteogenem Mediums 1 nicht zu behindern. Nach Entfernung des PBS und durch Zugabe von 5 ml Trypsin/EDTA werden die Zellen bei Lagerung im Brutschrank für 5 bis 10 Minuten vom Boden abgelöst. Restliche Zellen, welche sich nicht vom Boden abgelöst haben, werden durch vorsichtiges Beklopfen des Unterbodens der Zellkulturflaschen gelöst. Nach Inaktivierung des Trypsins durch Zugabe von 5 ml Medium wurde die so entstandene Zellsuspension durch einen EasyStrain-Filter mit einer Porengröße von 40 µm in ein 50 ml- Röhrcen überführt. Der Filter dient hier dazu, eine Einzelzellsuspension zu erhalten und ein Verklumpen der Zellen zu vermeiden. Von dieser Suspension werden 50 µl in ein Eppendorf-Gefäß zur Quantifizierung der Zellzahl gegeben. Das 50 ml- Röhrcen wird daraufhin für 10 Minuten mit 250 x g zentrifugiert. Der Überstand wird abpipettiert und verworfen, das Zellpellet wird mit osteogenem Medium 1 resuspendiert und in Zellkulturflaschen ausgesät (El-Amin 2006).

3.2.1.4 Zählen der Zellen

Um die Zellanzahl zu quantifizieren wird eine Neubauer Zählkammer verwendet. Diese enthält zwei voneinander getrennte Zählbereiche. Zu der Zellsuspension wurden 50 µl Trypan-Blau hinzugefügt (Volumenfaktor 2). Nach Vermischung wurden ca. 10 µl in die Zählkammer pipettiert und so konnte unter dem Lichtmikroskop die Zellanzahl bestimmt werden. Damit wurde die Zellzahl mit folgender Formel ermittelt:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{(\text{Feld I+II+III+IV})}{4} \times 10^4 \times 2$$

3.2.1.5 Kryokonservierung von Zellen

Um Osteoblasten für spätere Versuche zu konservieren, werden diese ebenso gesplittet, wie in Abschnitt 3.2.1.3 beschrieben. Nach Zählung und Zentrifugation wird der flüssige Überstand vom Pellet so schonend wie möglich abpipettiert. Das Pellet sowie das Einfriermedium mit 10 % DMSO werden auf Eis gekühlt und in einer Dichte von 5×10^6 bis 1×10^7 Zellen/ml Einfriermedium in ein Einfrierrohrchen resuspendiert. Um das

erforderliche, langsame Einfrieren (1 °C/min) zu gewährleisten, wird das Einfrierrohrchen in die mit 1-Propanolol gefüllte Einfrierbox gestellt und im -80 °C-Schrank für maximal 48 Stunden gelagert. Danach werden diese in flüssigem Stickstoff gelagert und sind so für spätere Versuche aufbewahrt.

3.2.2 Vorbereitung der Rattennieren

Die Rattennieren wurden aus Wildtyp-Wistar-Ratten mit einem Gewicht von ca. 500 g gewonnen. Dabei wurden die Ratten im Rahmen von Versuchen andere Abteilungen artgerecht nach den vorgeschriebenen Richtlinien gehalten. Nach Beendigung dieser Versuche wurden sie in Allgemeinanästhesie durch eine intrakardiale Injektion einer Überdosis Pentobarbital (80 mg/kgKG) euthanasiert und konnten in unserer Arbeitsgruppe weiterverwendet werden. Um die Nieren für die De- und Rezellularisierung verwenden zu können, müssen diese, wie zuvor publiziert, entnommen, präpariert und vorbereitet werden (Burgkart 2014). Nach erfolgter Entnahme aus den Ratten ist eine Aufbewahrung mit PBS bei -80 °C möglich. Nach vollständiger Präparation mit Entfernung des umliegenden Fettgewebes sowie der Kapsel ist eine Aufbewahrung nicht mehr möglich. Durch die Einfrierungs- und Auftauungsprozesse wird die Struktur der Niere zerstört und eine nachfolgende Dezellularisierung ist dann nicht mehr möglich.

3.2.2.1 Entnahme der Rattennieren

Nach artgerechter Euthanasie der Ratten werden diese bis zu den Versuchen bei -80 °C aufbewahrt. Zur Entnahme der Nieren müssen die Ratten langsam innerhalb von 24 Stunden aufgetaut werden. Dafür werden diese erst für sechs Stunden in den Kühlschrank gelegt und danach bei Raumtemperatur weiter aufgetaut. Nach Vorbereitung der Arbeitsutensilien und des Arbeitsplatzes wird ein medianer Bauchlängsschnitt nach Desinfektion durchgeführt. Es folgt eine quere Inzision auf Höhe des Rippenansatzes sowie des Afters, um die Haut zur Seite zu präparieren. Nach Durchtrennung von Muskulatur und Peritoneum erfolgt die stumpfe Präparation bis in den Retroperitonealraum. Die Nieren werden vorsichtig mitsamt der Nierenkapsel sowie dem umliegenden Fettgewebe herausgelöst. Hierbei muss darauf geachtet werden die Niere unversehrt zu lassen. Die Aorta abdominalis wird kranial kurz unterhalb des Zwerchfells und kaudal im Bereich der Bifurkation der Iliakalgefäße durchtrennt. Um eine adäquate Länge des Ureters zur Rezellularisierung zu erreichen, muss hierbei insbesondere darauf geachtet werden, das umliegende Fettgewebe zu schonen, in dem der Ureter verläuft. Die Länge des Ureters sollte mindestens drei Zentimeter betragen. Nach kompletter Präparation werden die Nieren bis zur weiteren Verarbeitung in einem mit PBS-gefüllten Röhrchen bei -80 °C gelagert.

3.2.2.2 Präparation der Nieren

Nach langsamem Auftauen der eingefrorenen Nieren im Wasserbad bei 37 °C wird zunächst das restliche Fettgewebe, die Nebenniere sowie die Nierenkapsel entfernt. Hierbei ist es sinnvoll nur die Niere zu präparieren, die verwendet wird, da ein erneutes Einfrieren und nachfolgende Auftauen ohne schützende Kapsel und Fettschicht zu einer Schädigung der Niere führt. Danach werden die arteriellen Gefäße sowie die Ureteren dargestellt und freipräpariert. Die Aorta abdominalis wird im Bereich der Abgänge der Arteriae renales schräg durchtrennt, um so jeweils einen Schenkel der Aorta abdominalis für jede Niere für die spätere Sondierung mit einer G20-Braunüle zu erhalten.

3.2.2.3 Vorbereitung der Nieren für De- und Rezellularisierung

Zur Dezellularisierung wird eine G20-Braunüle in der Arteria renalis und eine G26-Braunüle im Ureter befestigt (siehe Abbildung 7).

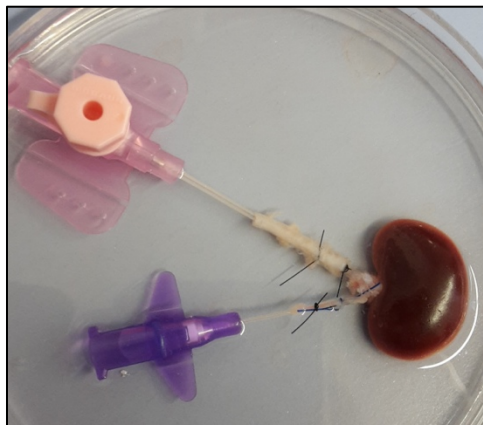


Abbildung 7: Präparierte, murine Niere mit Braunülen fixiert in Arterie (rosa, G20), und Ureter (violett, G26)

Anschließend wird über die Niere über die Arterie nach dem Dezellularisierungsprogramm (siehe Tabelle 21) durchspült. Dazu wird ein vorab mit PBS gespülter Katheter über die Aorta abdominalis in die Arteria renalis eingeführt. Nach Durchspülung der Niere mit PBS und entsprechender intraarterieller Lage wird die Braunüle mit Prolene-Fäden mehrfach fixiert. Ein vorangehendes Durchspülen der Braunüle ist wichtig, da kleinste Luftblasen in der Niere zu deutlichen Schäden führen. Die Rezellularisierung erfolgt über den Ureter, da in vorab durchgeführten Versuchen ein deutlich besseres Wachstum ohne Verstopfung der Arterien erzielt werden konnte. Die Punktierung des Ureters erfolgt mit einer G26-Braunüle. Dabei wird der Ureter mit der Pinzette aufgespannt, mit dem Katheter samt Nadel punktiert und die Braunüle langsam vorgeschoben. Hierbei wird der Katheter ebenfalls vorab mit PBS gespült. Nach korrekter Lage wird die Braunüle ebenfalls mit Prolene-Fäden mehrfach fixiert, sodass die fertig präparierte Niere wie in Abbildung 7 dargestellt, vorliegt.

3.2.3 Dezellularisierung der Rattennieren mit unterschiedlichen Systemen

Nach Präparation und Vorbereitung der Nieren werden diese nach nachfolgendem und veröffentlichtem Dezellularisierung-Schema durchspült und dezellularisiert (Schmitt 2017). Dabei erfolgte in mehreren Einzelschritten eine Weiterentwicklung, um die technischen Schwierigkeiten zu beheben. Außerdem soll durch die automatisierte Dezellularisierung ein deutlich besseres Zeitmanagement erreicht werden, um so während des Dezellularisierungsprozesses die nächsten Schritte vorbereiten zu können. Bis zu vier Nieren können gleichzeitig dezellularisiert werden.

Der Grundaufbau bei beiden Systemen ist gleich: Angetrieben von einer Arthroskopiepumpe (Continuous Wave II AR-6450/ Continuous Wave III; Fa. Arthrex) werden über das dazugehörige Schlauchsystem (Main Tubing AR 6420, Fa. Arthrex) diverse Spülflüssigkeiten über den in der Arterie liegenden Katheter durch die Niere gespült. Dabei wird vorab das komplette Schlauchsystem mit destilliertem Wasser gespült, um die vorhandene Luft aus dem System zu entfernen.

Nach, in Tabelle 21 dargestelltem Schema, wird die Niere über die Arterie dezellularisiert. Im letzten Schritt der Dezellularisierung wird die Niere vollständig in einem mit Penicillin/Streptomycin-gefüllten Glasbehälter befestigt, um diese auch von außen von möglich anhaftenden Keimen zu befreien.

Tabelle 21: Dezellularisierungsschema (Schmitt 2017)

Spüllösung	Dauer
dH ₂ O	10 Minuten
SDS 0,66 %	30 Minuten
dH ₂ O	10 Minuten
SDS 0,66 %	30 Minuten
dH ₂ O	60 Minuten
Penicillin/Streptomycin/Amphotericin B	60 Minuten

Dabei kann man makroskopisch eine Farbveränderung verfolgen und so den Dezellularisierungsprozess kontrollieren.

3.2.3.1 Manuelle Dezellularisierung

In der ersten, manuellen Version des Dezellularisierungssystems wird das Schlauchsystem (Main Tubing AR 6420, Fa. Arthrex) über einen Drei-Wege-Hahn mit einer Heidelberger-Leitung verlängert und mit der Niere verbunden (siehe Abbildung 8). Die Spülflüssigkeiten werden in Reservoir-Behältern aufbewahrt. Hierbei muss der Ansaugschlauch nach jeder verwendeten Spülflüssigkeit umgehängt werden und die

Behälter bei Bedarf ohne Schaumbildung aufgefüllt werden. Um den Ansaugschlauch umhängen zu können, muss dieser zuerst abgeklemmt werden. Es muss explizit darauf geachtet werden, keine Luft in das System anzusaugen, da dies zu einer kompletten Beschädigung der Niere führt. Über den Drei-Wege-Hahn kann bei Bedarf manuell Flüssigkeit oder Luftblasen abgelassen bzw. abgefangen werden.

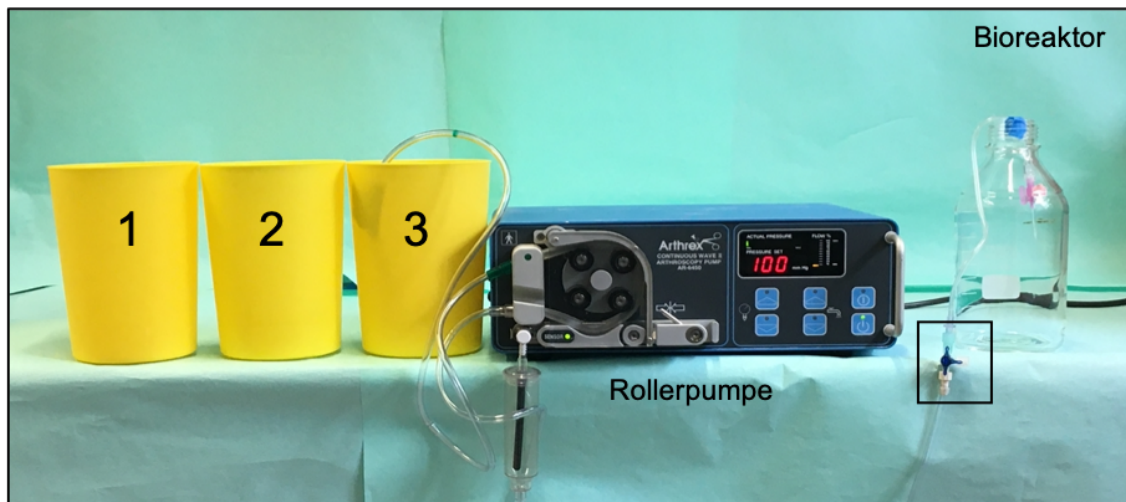


Abbildung 8: Aufbau der manuellen Dezellularisierung mit Rollerpumpe, Bioreaktor und Reservoir-Behälter (dH₂O (1), SDS (2), Penicillin/Streptomycin/Amphotericin B (3)); Drei-Wege-Hahn als Überlauf-/ Luftventil (schwarzes Kästchen)

3.2.3.2 Automatisierte Dezellularisierung mit DecellControl

Der Aufbau des automatisierten Dezellularisierungssystems (DecellControl) wurde in Zusammenarbeit der Labore für Biomechanik und Tissue Engineering der Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie am Klinikum rechts der Isar entwickelt (siehe Abbildung 9).

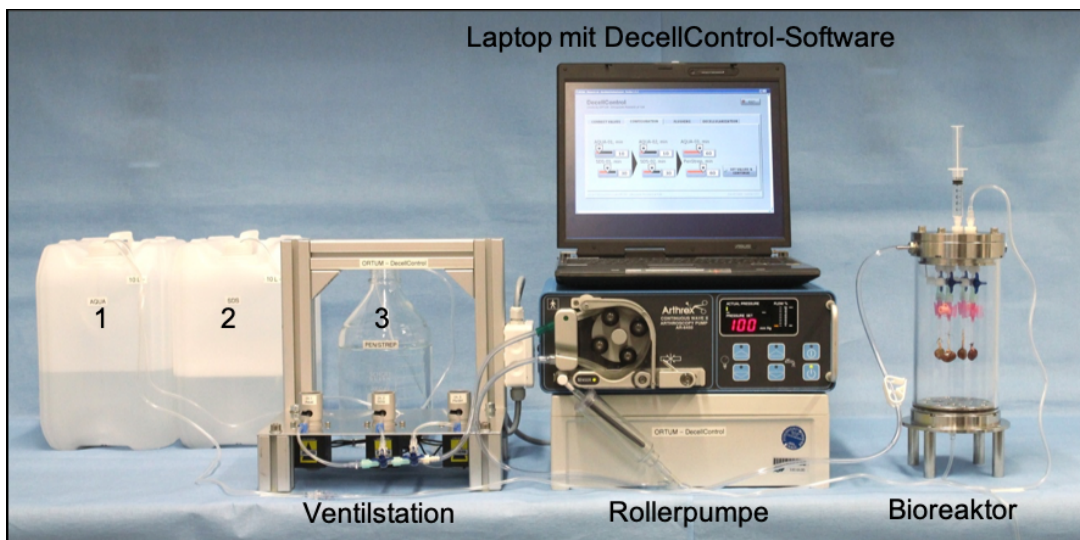


Abbildung 9: Aufbau der automatisierten Dezellularisierung mit DecellControl mit Rollerpumpe und Laptop (inkl. DecellControl-Software), Ventilstation, Bioreaktor und Reservoir-Behälter (dH₂O (1), SDS (2), Penicillin/Streptomycin/Amphotericin B (3))

In der weiterentwickelten Version des Dezellularisierungssystems wird das Schlauchsystem (Main Tubing AR 6420, Fa. Arthrex) mit dem konstruierten Bioreaktor, der Arthrex-Rollerpumpe und den Perfusionsmedien über die Ventilstation verbunden. Dabei werden die Spülflüssigkeiten über zwei Drei-Wege-Hähne sowie drei Perfusorleitungen angesaugt. Die Perfusorleitungen sind in den Ventilen der Ventilstation platziert, welche bei Bedarf geöffnet werden (siehe Abbildung 10).

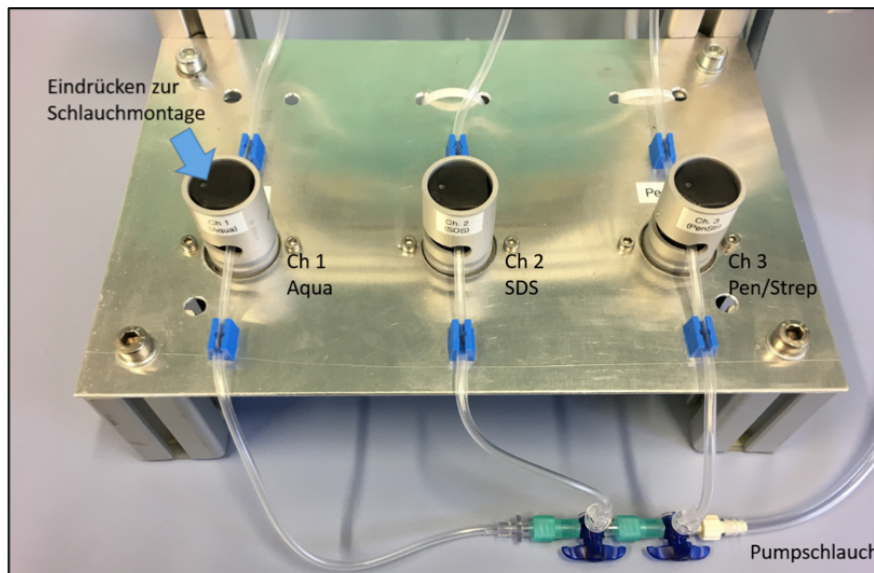


Abbildung 10: Automatische Ventilstation mit drei Ventilen für destilliertes Wasser (Ch1), SDS (Ch2) und Penicillin/Streptomycin (Ch3), programmierbar über DecellControl-Software

So werden die Ventile nach Programmierung der DecellControl-Software automatisch geöffnet (siehe Abbildung 11).

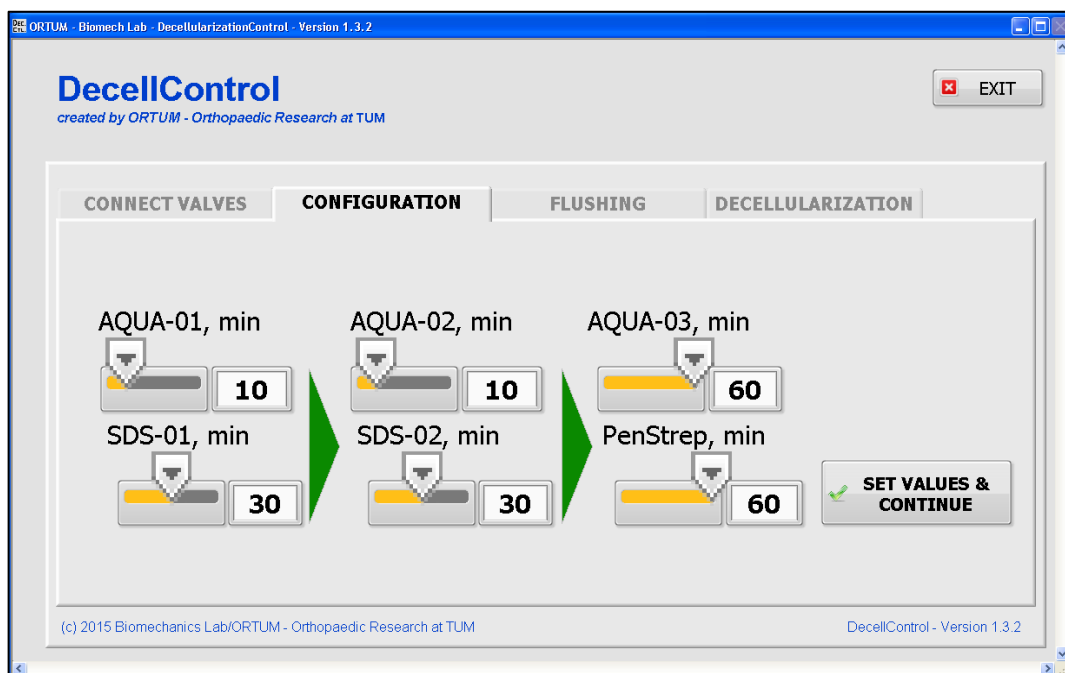


Abbildung 11: Einstellung für die Ventilstation über die DecellControl-Software zur Dezellularisierung nach Schema (siehe Tabelle 21)

Nach Vorbereitung und Spülung des Schlauchsystems wird die Rollerpumpe angeschaltet und die Spülflüssigkeit läuft im Deckel des Bioreaktors zylinderförmig nach unten, wodurch mögliche Luftblasen nach oben über den Entlüftungsschlauch und den Luftfänger entweichen können (siehe Abbildung 12, A). Durch Konstruktion des Bioreaktors können bis zu vier Nieren gleichzeitig dezellularisiert werden (siehe Abbildung 12, B)

Nach oben gezeigtem Dezellularisierungsschema wird die Niere vollständig in das Gemisch aus Streptomycin, Penicillin und Amphotericin B getaucht und damit währenddessen kontinuierlich über die Arterie perfundiert. Ebenso wird der Ansaugschlauch im Bioreaktor befestigt, um so einen Kreislauf herzustellen (siehe Abbildung 12, C)

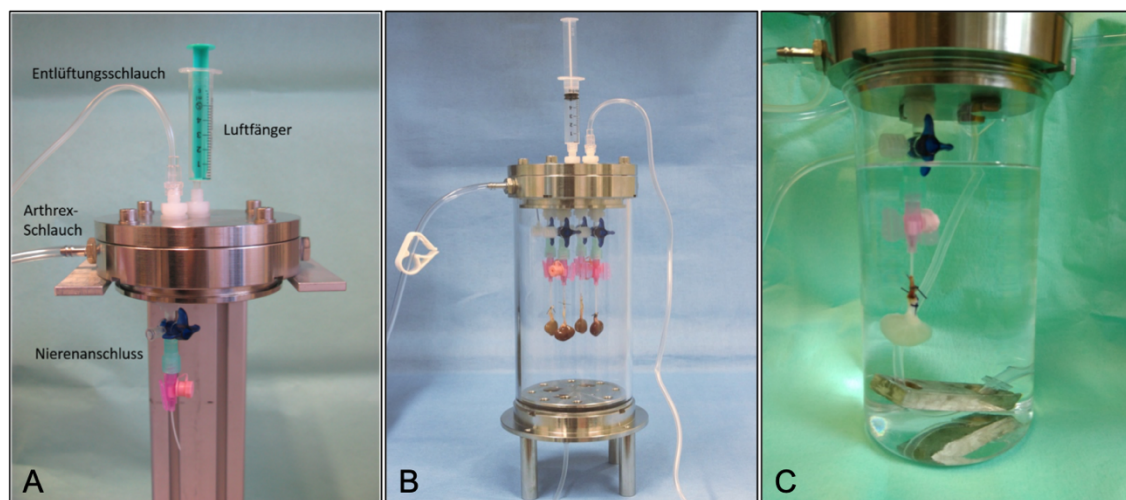


Abbildung 12: Aufbau Bioreaktor des DecellControl mit Braunüle (ohne Niere) und Verbindung zur Rollerpumpe über Arthrex-Schlauch (A); Vollständiger Bioreaktor. Dezellularisierung von bis zu vier Nieren (B); Letzter Schritt der Dezellularisierung: Sterilisierung der Niere mit Streptomycin, Penicillin und Amphotericin B (C)

3.2.4 Rezellularisierung der Rattennieren mit humanen Osteoblasten

Um die Rattennieren mit humanen Osteoblasten zu rezellularisieren und zu kultivieren muss vorab der Miniaturinkubator aufgebaut und die Osteoblasten vorbereitet werden.

3.2.4.1 Aufbau Miniaturinkubator

Der Miniaturinkubator wurde mit Hilfe der Labore für Biomechanik und Tissue Engineering der Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie am Klinikum rechts der Isar entwickelt. Nach Autoklavierung aller benötigten Materialien werden diese unter der sterilen Werkbank vorbereitet und aufgebaut. Hierzu wird auf die Kristallisationschale ein Deckel, bestehend aus Polyoxymethylen (POM), mit Dichtungsring verbaut. Auf diesem Deckel werden verschiedene Luer-Lock-Adapter verschraubt, um Verbindungskreisläufe zur Niere, Rollerpumpe, zum Medienwechselsystem sowie zum

CO₂-Controller herzustellen. Da die ursprünglich verwendeten 3D-Druck-Halterungen nicht autoklavierbar sind, müssen diese für mindestens vier Stunden in der Nassantiseptik-Methode in Fermacidal D2, einem quartären Ammoniumverbindungskomplex, eingelegt werden. Beim Aufbau ist auf Sterilität zu achten, um eine mögliche Kontamination zu vermeiden. Ebenso muss darauf geachtet werden, zwischen die Verbindungsadapter einen Gummidichtungsring zu legen, um einen dichten Kreislauf zu erhalten. Beim Aufbau wird das Schlauchsystem über einen Adapter mit einem Drei-Wege-Hahn verbunden, um über diesen sich im System befindliche Luftblasen nach beispielweise einem Medienwechsel oder Schlauchsystemwechsel in einen zusätzlichen Kreislauf („Kurzschluss“) zu entfernen und den Kreislauf zur Niere so zu umgehen. Ebenso werden Anschlüsse für den CO₂-Controller, den Tissue Squeezer sowie das Medienwechsel-System verbaut. Nach Konnektion der Niere wird die Rollerpumpe erst nach vier Stunden angeschaltet, um den injizierten Osteoblasten Zeit zur Adhäsion zu geben. Nachfolgend wird die Kristallisationsschale auf einer Standplatte mit kleinen Klemmplatten befestigt. Diese wird dann im Wärmeschrank für die Dauer des Experiments inkubiert. Der Aufbau ist in Abbildung 13 und Abbildung 14 nachzuvollziehen.

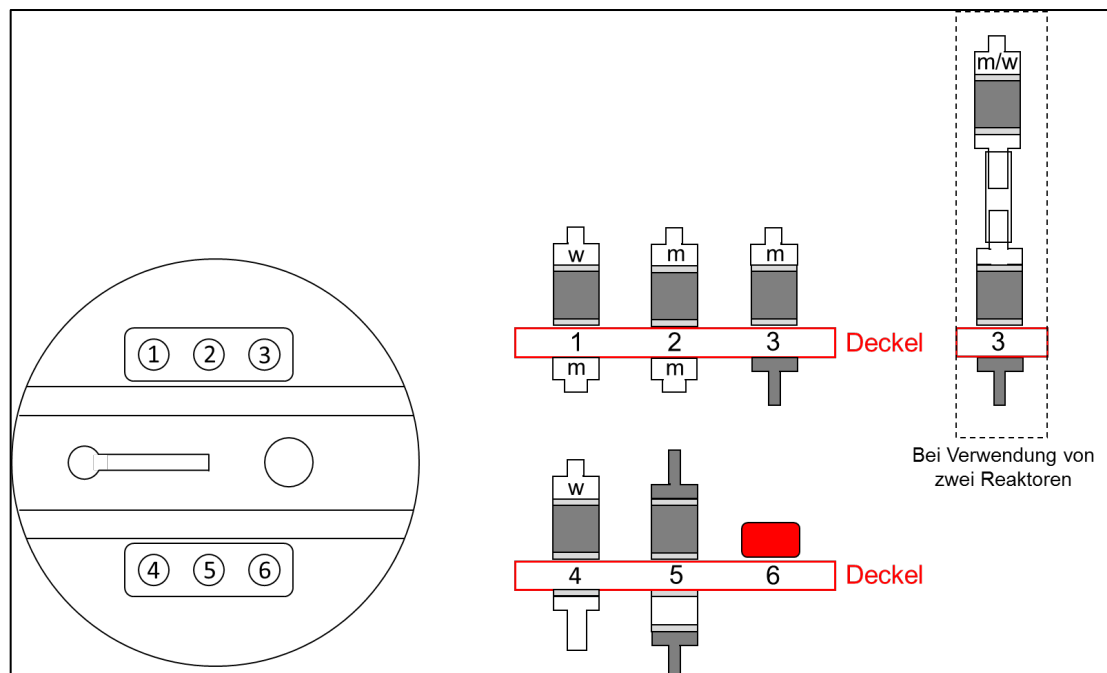


Abbildung 13: Schematischer Aufbau Deckel des Miniaturinkubators

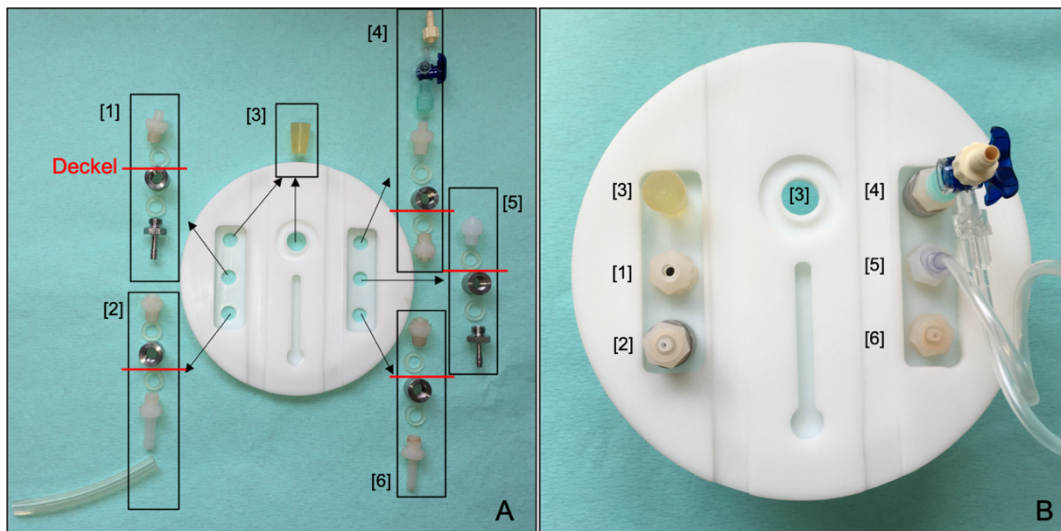


Abbildung 14: Aufbau Deckel des Miniaturinkubators, Ansicht von oben; rote Linie: jeweilige Markierung des Deckels (darüber liegende Anteile befinden sich außerhalb des Miniaturinkubators, darunter liegende befinden sich innerhalb des Miniaturinkubators); CO₂-Anschluss [1]; Anschluss Medienwechselsystem [2]; Abdichtung [3]; Anschluss Niere [4]; „Kurzschluss“-Anschluss [5]; Anschluss Arthrex-Schlauchsystem [6]

Nach Aufbau des Inkubators wird dieser mit der Arthrex-Rollerpumpe und dem Schlauchsystem verbunden und über zehn Minuten mit osteogenem Medium 2 (Protokoll siehe Tabelle 8) durchgespült. Dabei kommt es zu Beginn zu Luftblasen im System sowie deutlicher Schaumbildung im Inkubator (siehe Abbildung 15)



Abbildung 15: Schaumbildung im Miniaturinkubator während des ersten Durchspülprozesses unter sterilen Bedingungen in der sterilen Werkbank

Bevor die Niere angeschlossen wird, wird die Rollerpumpe pausiert und sichergestellt, dass sich keine Luftblasen im System befinden. Zu Beginn des Experiments werden circa 500 ml osteogenes Medium 2 hinzugegeben.

3.2.4.2 Vorbereitung der humanen Osteoblasten

Hierbei werden die Zellen wie in Abschnitt 3.2.1.3 vorbereitet, gezählt und zentrifugiert. Für unsere Versuche wurden pro Niere ca. 15 Millionen Osteoblasten verwendet. Überschüssige Zellen wurden entweder erneut ausgesät oder kryokonserviert zur erneuten Verwendung.

3.2.4.3 Einsaat der humanen Osteoblasten über Ureter

Das nun entstehende Zellpellet wird mit circa einem Milliliter Medium unter der sterilen Werkbank in eine Spritze aufgezogen und dann langsam über den Ureter in die Niere injiziert. Dabei muss auf die korrekte Lage der Braunüle geachtet werden, um sicherzustellen, dass die Zellen in die Niere eingebracht werden können. Hier wäre eine erneute Präparation oder Sondierung enorm kompliziert. Ebenso muss die Injektion langsam erfolgen, um ein Anhaften der Zellen zu gewährleisten, sowie der Niere durch den Perfusionsdruck keine Schädigung zuzuführen. Anschließend wird die Niere über die arterielle Braunüle an den Inkubator angeschlossen. Um die Adhäsion der Zellen im Gefäßsystem zu gewährleisten und die Zellen nicht sofort auszuwaschen, darf die Rollerpumpe erst circa vier Stunden nach Injektion angeschaltet werden.

3.2.4.4 Kultivierung der rezellularisierten Rattennieren in befeuchtetem Wärmeschrank

Die rezellularisierten Rattennieren können in einem befeuchteten Wärmeschrank als Langzeitkultur inkubiert werden. Dabei werden diese im Wärmeschrank bei 37 °C und 5 % CO₂-Konzentration gestellt. Das Schlauchsystem wird über eine Öffnung in der Rückwand des Wärmeschrankes zur Rollerpumpe ausgeleitet. Das Loch wird nun luftdicht mit einer Klebefolie abgeschlossen, um konstante Kulturbedingungen ermöglichen zu können.

3.2.4.5 Kultivierung der rezellularisierten Rattennieren in Wärmeschrank

Um das Problem der Luftfeuchtigkeit zu umgehen, wird der Inkubator in einem Wärmeschrank bei 37 °C gelagert. Dabei wird von außen über ein Schlauchsystem mit einem CO₂-Controller 5 % Kohlenstoffdioxid in den Miniaturinkubator hinzugefügt (siehe Abbildung 16). Da der Miniaturinkubator ein luftdichtes System darstellt, kann so eine 100 %-Luftfeuchtigkeit garantiert werden und der Tissue Squeezer problemlos im Wärmeschrank verwendet werden. Der vollständige Aufbau des Miniaturinkubators im Wärmeschrank mit CO₂-Controller, Medienwechselsystem, Rollerpumpe und Tissue Squeezer ist in Abbildung 17 dargestellt.

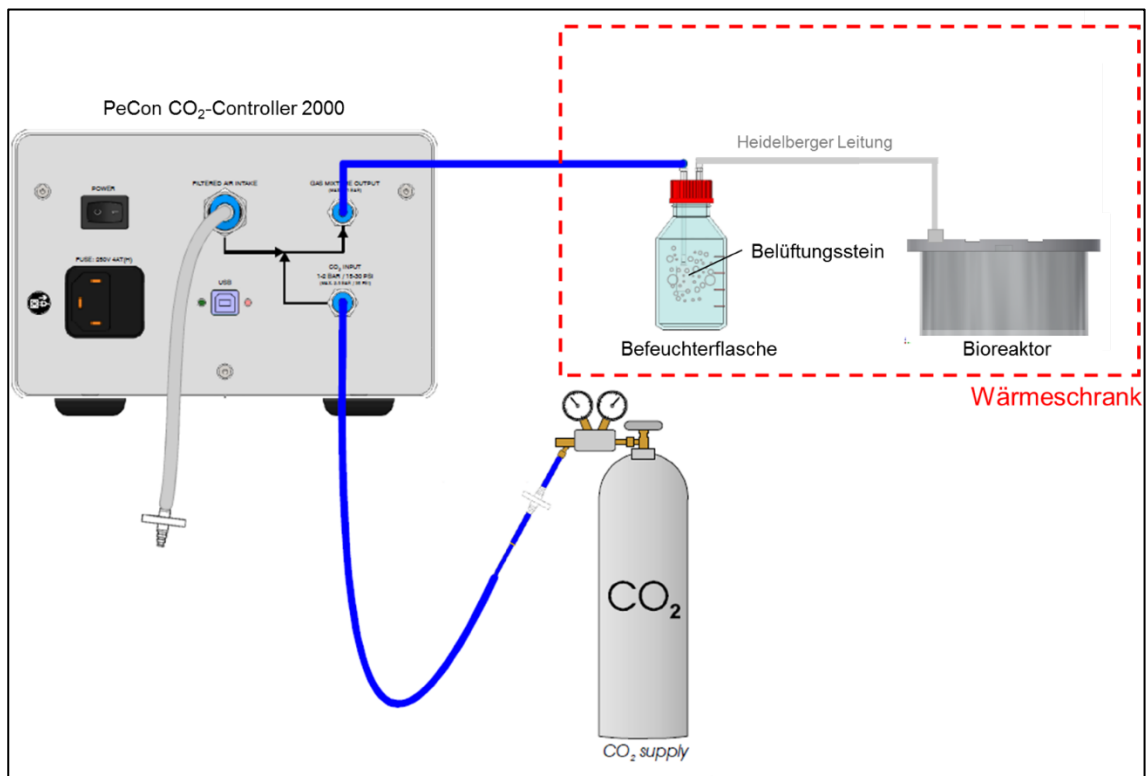


Abbildung 16: Schematischer Aufbau der CO₂-Zufuhr zum Miniaturinkubator/Bioreaktor im unbefeuchteten Wärmeschrank, modifiziertes Manual CO₂-Controller 2000 (Fa. PeCon)

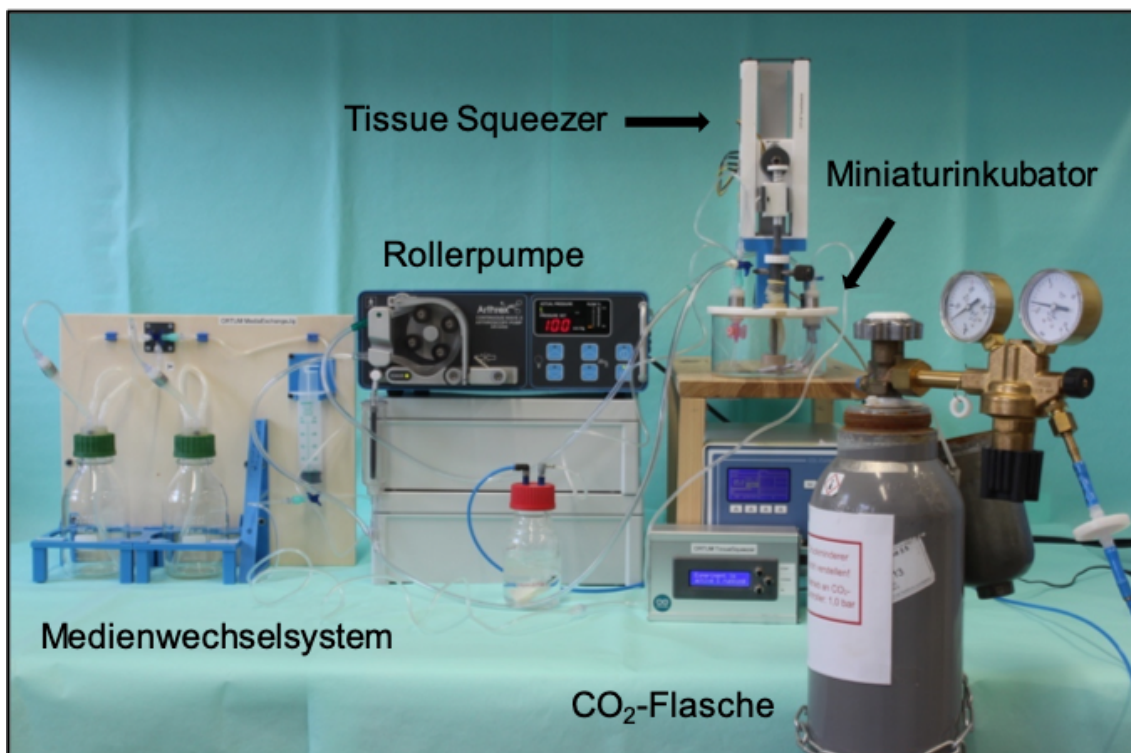


Abbildung 17: Vollständiger Aufbau des Miniaturinkubators mit CO₂-Flasche, Rollerpumpe, Medienwechselsystem und Tissue Squeezer; Der Miniaturinkubator wird nachfolgend in den unbefeuchteten Wärmeschrank gestellt.

3.2.4.6 Medienwechselsystem

Das Medienwechselsystem wurde mit Hilfe der Labore für Biomechanik und Tissue Engineering der Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie am Klinikum rechts der Isar

entwickelt. Um das verbrauchte Medium im System während der Langzeitkultur zu erneuern, wurde zu Beginn der Arbeit der komplette Miniaturinkubator diskonnektiert, in der sterilen Werkbank geöffnet und mit einer 50 ml Pipette das Medium händisch ausgetauscht. Mit Hilfe des Medienwechselsystems wird über Heidelberger-Leitungen und Drei-Wege-Hähne ein Anschluss zum Inkubator verbaut. Daran wird eine leere Abfall-Glasflasche sowie eine Glasflasche mit frischem, osteogenen Medium 2 verbunden (siehe Abbildung 18).

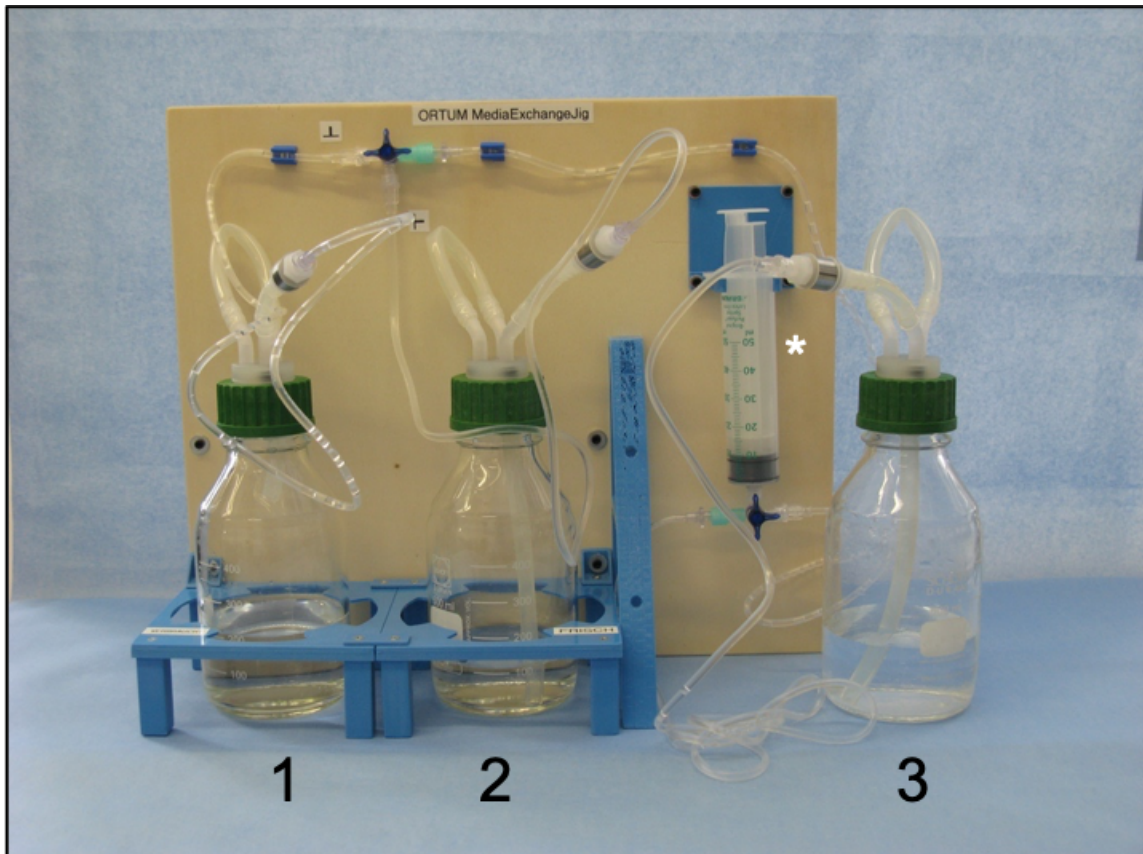


Abbildung 18: Aufbau des Medienwechselsystems, Verbrauchtes Medium (1), Frisches Medium (2), Miniaturinkubator (3), 50 ml-Spritze (weißer Stern)

Nun wird über eine Spritze zuerst Medium aus dem Inkubator abgesaugt und in die Abfallflasche gespritzt (siehe Abbildung 19 und Abbildung 20). Dabei müssen die Drei-Wege-Hähne dementsprechend umgestellt werden. Um zu verhindern, dass Luft ins Schlauchsystem gelangt, ist es sinnvoll, zuerst den Drei-Wege-Hahn am Miniaturinkubator so umzustellen, dass der Perfusionskreislauf die Niere umgeht und über den zusätzlich verbauten Kreislauf pumpt.

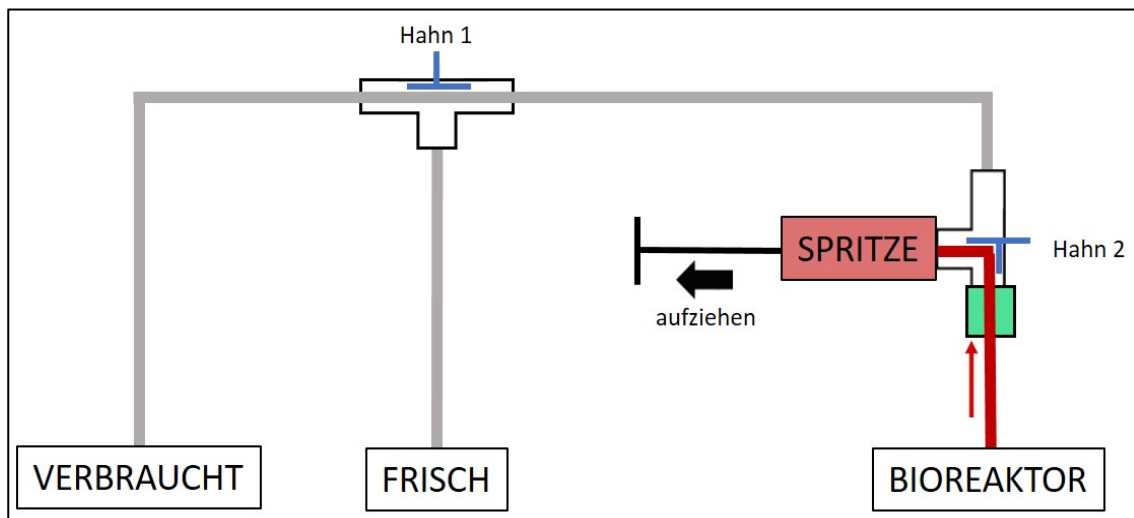


Abbildung 19: Schema zur Darstellung des Medienwechsels: Absaugen des verbrauchten Mediums aus dem Bioreaktor/Miniaturinkubator

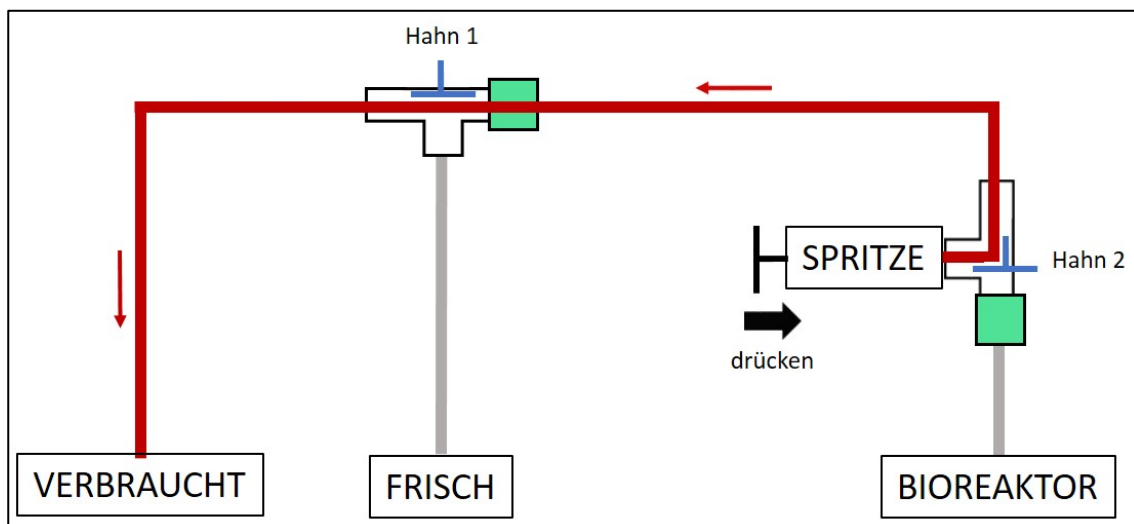


Abbildung 20: Schema zur Darstellung des Medienwechsels: Verwerfen des verbrauchten Mediums aus dem Bioreaktor/Miniaturinkubator in die Abfallflasche

Danach wird mit der Spritze neues Medium aus der Glasflasche angesaugt und nach Umstellen der Drei-Wege-Hähne in das Inkubator-System gebracht (siehe Abbildung 21 und Abbildung 22). Dies muss langsam erfolgen, da es sonst durch das kleine Lumen der Spritze und der Heidelberger-Leitung zu Schaumbildung des Mediums kommt, welches zu einer Schädigung der Niere führen kann. Sinnvoll ist es hierbei die Rollerpumpe während des Medienwechsels zu pausieren. Beim Medienwechsel werden circa alle zwei bis drei Tage 200 ml gewechselt.

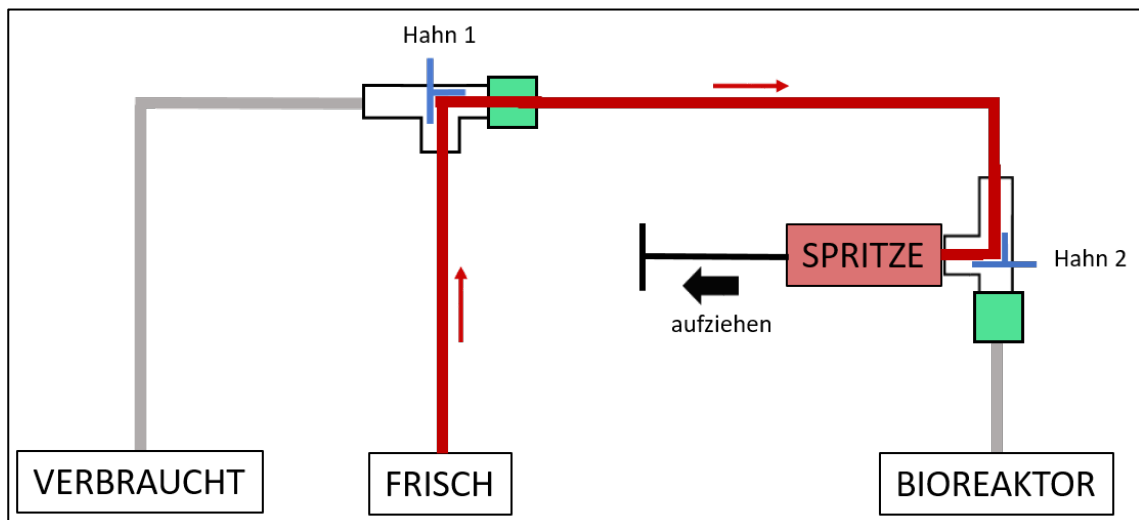


Abbildung 21: Schema zur Darstellung des Medienwechsels: Ansaugen des frischen Mediums aus der Vorratsflasche

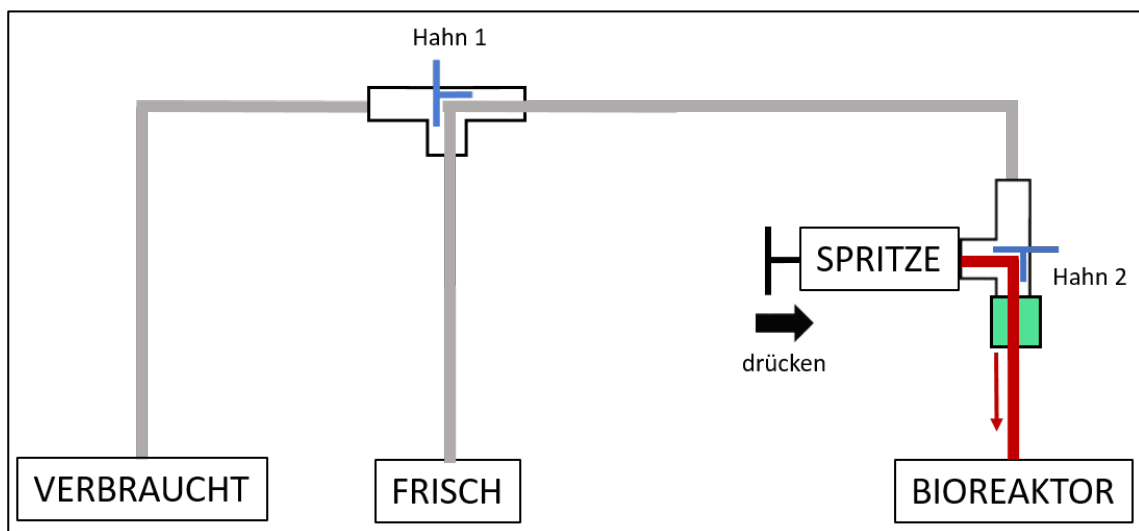


Abbildung 22: Schema zur Darstellung des Medienwechsels: Hinzufügen des frischen Mediums in den Bioreaktor/Miniaturinkubator

3.2.5 Mechanische Stimulation der Rattennieren

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die ersten Versuche der mechanischen Kompression der Nieren und somit der Osteoblasten durchgeführt, um so einen zusätzlichen Wachstumsreiz zu setzen. Die Mechanostimulation wurde mit Hilfe des Tissue Squeezers durchgeführt, welcher mit Hilfe der Labore für Biomechanik und Tissue Engineering der Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie am Klinikum rechts der Isar entwickelt wurde.

Dabei wurde die Stimulationsdauer nach Vorversuchen und Literaturrecherche angepasst (siehe Abschnitt 3.2.5.2). Primäres Ziel war dabei eine technische Durchführung prinzipiell zu ermöglichen und eine adäquate Voraussetzung für eine mechanische Stimulation in der Langzeitkultur zu schaffen.

Die Komponenten des Tissue Squeezers sowie der Nierenhalterung innerhalb des Miniaturinkubators wurden dabei mit Hilfe eines Fused-Deposition-Modeling (FDM) 3D-

Druckers (Ultimaker 2+) aus chloriertem Polyethylen (CPE) gefertigt und mit Schrauben, Druckfedern und Kugellagern ergänzt. Der elektrische Antrieb wurde durch einen Motor gewährleistet, welcher über eine elektrische Steuereinheit eingestellt und gesteuert werden konnte. Zusätzlich wurde zur ersten Versuchsreihe ein Kraftsensor mit verbaut. Nachfolgend wird der genaue Aufbau und die Einstellungen beschrieben.

3.2.5.1 Mechanostimulation: Tissue Squeezer

Zum Aufbau des Tissue Squeezer wurde der Stempel während des Aufbaus des Inkubators unter sterilen Kautelen am Deckel befestigt (siehe Abbildung 23). Nachfolgend wird der Tissue Squeezer auf dem Miniaturinkubator im Wärmeschrank befestigt. Anschließend muss die Stempelhöhe an die Niere so angepasst werden, dass die Stempelspitze leicht auf der Niere zu liegen kommt. Nach Verbindung mit dem Stromnetz kann der Tissue Squeezer eingestellt werden.

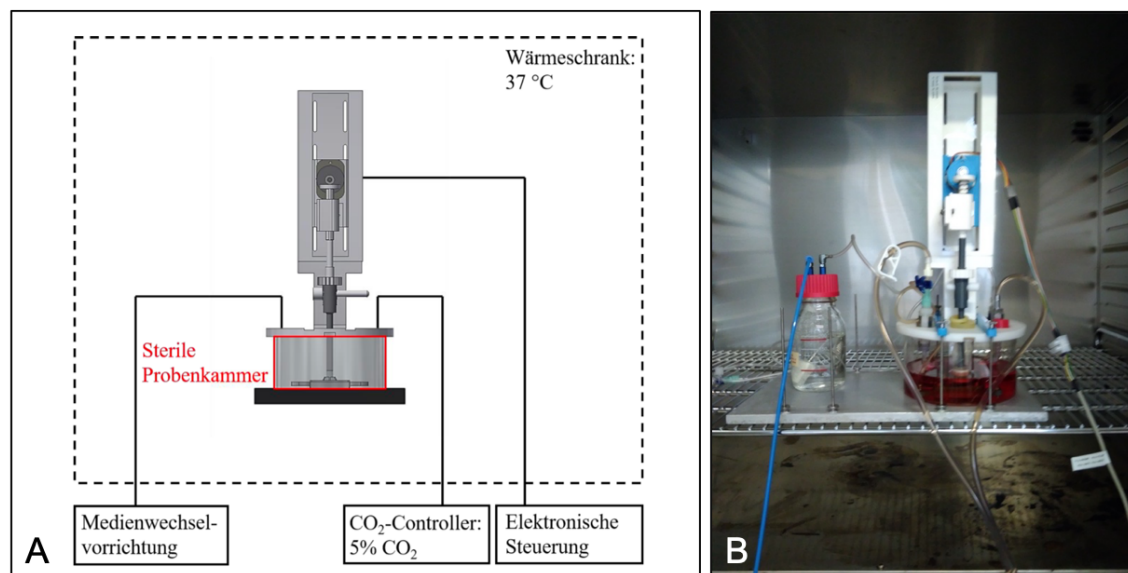


Abbildung 23: Aufbau Tissue Squeezer und Miniaturinkubator mit Verbindung zur CO₂-Flasche im unbefeuchteten Wärmeschrank

3.2.5.2 Tissue Squeezer Einstellungen

Der Tissue Squeezer kann in unterschiedlichen Frequenzen und Zeitspannen eingestellt werden. Aufgrund des hochexperimentellen Ansatzes gibt es dafür nach Literaturrecherche keine standardisierten Parameter mit zum Teil sehr heterogenen Einstellungen (Rath 2008; Ng 2009; Sittichokechaiwut 2009; Damaraju 2014). Für unsere Versuche wurde eine Frequenz von 1 Hertz und Stimulation für eine Stunde mit sieben Stunden Pause festgelegt. Die Kompressionstiefe kann beim Aufbau des Stempels an die Niere angepasst werden. Um dies zu vereinfachen und genauer evaluieren zu können, wurde ein Kraftsensor implementiert. In den durchgeführten Versuchen wurde eine Kompressionstiefe von 10 % zur Gesamthöhe der Niere angewandt.

3.2.6 Beendigung einer Langzeitkultur

Nach durchgeführter Langzeitkultur müssen einerseits die verwendeten Materialien verworfen oder erneut aufbereitet werden, um diese für die nächsten Versuche nutzen zu können. Die Dauer der Langzeitkultur variiert im Rahmen dieser Arbeit je nach Vorgabe und Ziel des Versuches zwischen sieben und 28 Tagen. Andererseits muss die Niere zur weiteren histologischen Verarbeitung und Auswertung eingebettet, geschnitten und gefärbt werden.

3.2.6.1 Abbau des Miniaturinkubators

Nach Beendigung des Versuchs wird zunächst die Niere entfernt und zur weiteren Verarbeitung eingebettet (siehe Abschnitt 3.2.6.2). Der Miniaturinkubator wird schrittweise abgebaut, grob gesäubert und anschließend in die Spülmaschine zur Reinigung gegeben. Danach werden sämtliche Teile in Sterilisationsschläuche eingeschweißt und mittels Autoklav sterilisiert und für folgende Versuche aufbewahrt.

3.2.6.2 Dehydratation und Einbetten der Nieren

Nach Versuchsabbau wird die Niere entweder in PBS eingefroren oder in vierprozentigem PFA für mindestens 48 Stunden eingelegt. Die anschließende Verarbeitung mit Dehydratation und Einbettung der Niere in Paraffin wurde mit Hilfe des Labors für vergleichende experimentelle Pathologie (Klinikum rechts der Isar, Leitung Dr. med. vet. Katja Steiger). Dazu wird die Niere in einer Einbettkassette platziert und automatisiert in einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol dehydriert und nachfolgend ein Paraffin eingebettet. Nach Aushärtung des Paraffins konnte die Weiterverarbeitung beginnen. Dabei ist bei der stimulierten Niere die Orientierung wichtig, um die Stimulationsdrücke nachvollziehen zu können.

3.2.6.3 Schneiden der Paraffinblöcke

Nach Einbettung in Paraffinblöcke werden diese für eine halbe Stunde in den Tiefkühlschrank bei -20 °C gelagert. Mit dem Mikrotom werden nun 4 µm dicke Schnitte angefertigt und zur Entfaltung in ein 38 °C warmes Wasserbad gelegt. Währenddessen ist strengstens auf die Orientierung bei stimulierten Nieren zu achten. Nach Aufziehen der Schnitte auf die Objektträger werden diese für mindestens sechs Stunden bei 60 °C in einem Trockenofen erhitzt.

3.2.6.4 Entparaffinieren und Rehydratation der Schnitte

Zur Entparaffinierung und Rehydratation der Schnitte geht man nach folgendem Schema vor (siehe Tabelle 22).

Tabelle 22: Entparaffinieren und Rehydratation der Schnitte

Reagenz	Dauer
Roticlear / Xylolersatz	2 x 10 min
Ethanol 100 %	2 x 3 min
Ethanol 96 %	2 x 3 min
Ethanol 70 %	2 x 3 min
dH ₂ O	3 min

3.2.6.5 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Hierbei wird nach durchgeführter Entparaffinierung und Rehydratation folgendermaßen gefärbt (siehe Tabelle 23).

Tabelle 23: HE-Färbung

Reagenz	Dauer
Hämalaun	10 min
Leitungswasser	5 min
Eosin-G	2 min
Leitungswasser	5 min
Ethanol 70 %	3 min
Ethanol 96 %	3 min
Ethanol 100 %	2 x 3 min
Roticlear	5 min, 15 min

Danach werden die Schnitte unverzüglich mit Eukitt und einem Deckglas eingedeckt.

3.2.6.6 Immunhistochemische Färbungen der Gewebeschnitte

Immunhistochemische Färbungen von Gewebeschnitten können über eine direkte oder indirekte Antigen-Antikörper-Reaktion mit Darstellung durch Enzyme oder Fluoreszenzfarbstoffe angefertigt werden. Bei der direkten Methode bindet ein markierter (konjugierter) Antikörper an das Antigen, welches sich auf der Oberfläche der Struktur befindet und nachgewiesen werden soll. Bei indirektem Nachweis bindet ein unmarkierter (unkonjugierter) Primärantikörper an das Oberflächen-Antigen, welcher anschließend durch einen markierten Sekundärantikörper gebunden und lichtmikroskopisch nachgewiesen werden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die indirekte Avidin-Biotin-Methode angewandt (Hsu 1981). Dabei wird der biotinylierte Sekundärantikörper durch den Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (ABC) gebunden. Durch eine ausgelöste Reaktion mit 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) kommt es zu einer rötlichen Färbung und so zum sichtbaren

Nachweis des Oberflächenproteins. Voraussetzung dafür ist eine hohe Affinität zwischen Avidin und Biotin und eine spezifische Bindung der Primärantikörper an das nachzuweisende Oberflächenantigen. Zusätzlich wird die Bindungsaffinität durch Einbettung in Paraffin eingeschränkt, weshalb eine Vorbehandlung (Andauung) der Gewebeschnitte durch Hitzebehandlung oder proteolytische Enzyme notwendig ist.

Zur thermischen Andauung wird zu den Schnitten Citratpuffer in eine Plastikküvette gefüllt. Für den Citratpuffer wird hierbei mit 2,94 g Natriumcitrat zu einem Liter destillierten Wasser gegeben und unter Zugabe von Salzsäure bzw. Natronlauge auf einen pH-Wert von 6 titriert. Die Schnitte werden im Citratpuffer dreimalig für jeweils fünf Minuten in der Mikrowelle bei 600 Watt erhitzt. Dabei wird immer wieder Citratpuffer aufgefüllt. Nach Abkühlung bei Raumtemperatur über 30 Minuten werden die Schnitte zur weiteren Verarbeitung in PBS eingelegt.

Zur enzymatischen Vorbehandlung bei der Laminin-Färbung werden die Objektträger zunächst in PBS gelagert. Nach Trocknung der Schnitte erfolgt die Umrandung mit einem Fettstift. Die Schnitte werden mit ca. 100 µl und 1:1000 verdünnter Proteinkinase für 20 Minuten in einer Feuchtkammer gelagert. Danach erfolgt ebenfalls die Einlegung in PBS zur weiteren Verarbeitung.

Nach Einwirkung des Proteinblocks für 60 Minuten bei Raumtemperatur werden nachfolgend ca. 70 µl der ersten Antikörper (Verdünnung nach Schema je nach Antikörper, siehe Tabelle 16) aufgetragen und über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer gelagert.

Nach Akklimatisierung bei Raumtemperatur werden die Schnitte nach Abklopfen der ersten Antikörper zweimalig mit PBS Tween und einmal PBS gewaschen. Es erfolgt die Auftragung der zweiten Antikörper, welche im Verhältnis 1:200 mit PBS verdünnt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur gelagert werden. Nach erneutem Waschen mit PBS Tween wird der ABC Komplex für 30 Minuten aufgebracht und erneut mit PBS Tween entfernt. Nach Einwirkung des AEC-Komplexes für 20 bis 30 Minuten erfolgt ein erneutes Waschen mit PBS und eine Gegenfärbung mit Hämalaun. Zur Konservierung werden die Objektträger nun mit Kaiser Gelatine mit einem Deckglas abgedeckt.

3.2.6.7 Qualitativer DNA-Nachweis: DAPI-Färbung

Um kontrollieren zu können, ob die Dezellularisierung erfolgreich war und somit sämtliches DNA-Material entfernt wurde, wurden die Nieren im Anschluss mit Hilfe der DAPI-Färbung aufgearbeitet. DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der zur Markierung von DNA eingesetzt wird. Er lagert sich nach Zugabe zu fixierten Gewebeschnitten an doppelsträngige DNA an und fluoresziert bei Anregung mit ultraviolettem Licht (Wellenlänge 405 Nanometer) im sichtbaren Bereich mit blauer bis cyaner Farbe. Das

Absorptionsmaximum liegt dabei bei einer Wellenlänge von 358 Nanometer, das Emissionsmaximum liegt bei 461 Nanometer.

In unseren Versuchen wurden jeweils drei Nieren nach dem Dezellarisierungsprozess mit dem neuen und alten Dezellarisierungssystem zur weiteren Verarbeitung in Paraffin eingebettet, und wie in Abschnitt 3.2.6.3 geschnitten und getrocknet.

Nachfolgend wurde zur qualitativen Kontrolle von DNA-Resten ein bis zwei Tropfen des DAPI Eindeckmediums direkt auf die Schnitte aufgetragen und mit einem Deckglas abgedeckt. Um eine Abschwächung des Signals zu vermeiden, sollten die Schnitte dunkel gelagert werden. Direkt im Anschluss werden die Schnitte unter dem Fluoreszenzmikroskop mit dem DAPI Filter bei zehnfacher Vergrößerung betrachtet und mit der Positiv-Kontrolle einer nativen Niere bei gleicher Belichtungszeit verglichen.

Zur Einstellung des Fluoreszenzmikroskops wird das AVEXIO-Softwareprogramm verwendet. Hierbei wird zuerst die Positivkontrolle mit der geschnittenen nativen Niere unter das Mikroskop gelegt und fokussiert. Am Computer wird der Schnitt automatisch gemessen und korrekt belichtet. Diese Belichtungszeit wird auf die Schnitte der dezellulierten Nieren angewendet, um eine standardisierte Auswertung der Ergebnisse zu gewährleisten.

3.2.6.8 Quantitativer DNA-Nachweis: DNeasy Blood & Tissue Kit

Zur quantitativen Messung der enthaltenen DNA werden in der Literatur unterschiedliche Kit-System verschiedener Firmen verwendet. Hierzu zählen beispielsweise das DNeasy Blood & Tissue Kit (Fa. Qiagen, Deutschland), das Invitrogen™ Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit (Fa. Thermo Fisher Scientific, USA) oder das Invitrogen™ PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Fa. Thermo Fisher Scientific, USA). In unserer Arbeitsgruppe wird routinemäßig das DNeasy Kit Blood & Tissue Kit (Fa. Qiagen, Deutschland) verwendet.

Hierfür wird die DNA im ersten Schritt extrahiert, anschließend mittels Spectrophotometer sichtbar gemacht und kann so quantifiziert werden. DNeasy gereinigte DNA hat ein A260/A280-Verhältnis von 1,7-1,9 und Absorptionsscans zeigen einen symmetrischen Peak bei 260 Nanometer, was die hohe Reinheit bestätigt. Nach Anleitung des Handbuches werden zu Beginn 25 mg der Proben abgewogen und in Eppendorfer-Gefäße abgefüllt (Qiagen 2006). Anschließend folgt die Lysierung nach Zugabe von 180 µl ATL-Puffer und 20 µl Proteinase K bei 56 °C unter gelegentlichem vortexen. Nachdem keine festen Bestandteile mehr sichtbar sind, werden 200 µl AL-Puffer und 200 µl Ethanol (96 % - 100 %) unter zwischenzeitlichen Vortexen hinzugefügt und anschließend in das DNeasy Mini-Spin Röhrchen pipettiert. Dieses beinhaltet ein kleines Filterröhrchen, welches in einem größeren Sammelröhrchen platziert ist. Durch

anschließende Zentrifugation bei 6000 x g (8000 U/min) für eine Minute, wird der flüssige Überstand durch den Filter gedrückt und die DNA an die Membran des MiniSpin-Röhrchens gebunden. Die durchgeflossene Flüssigkeit sowie das Sammelröhrchen können verworfen werden. Nachfolgend wird das DNeasy Mini-Spin Röhrchen in einem neuen Sammelröhrchen platziert und die DNA durch Zugabe von AW1-Puffer und AW2-Puffer gewaschen. Abschließend wird der Probe 100 µl AE-Puffer hinzugefügt und erneut bei 6000 x g (8000 U/min) für eine Minute zentrifugiert. Nun befindet sich die DNA in der abgepressten Flüssigkeit und kann mit dem Spectrophotometer sichtbar gemacht werden.

Dafür wird von unserer Arbeitsgruppe der NanoDrop2000 (Fa. Thermo Fisher Scientific, USA) verwendet. Dazu wird zunächst der AE-Puffer als Null-Wert eingestellt und 1,5 µl auf den NanoDrop 2000 pipettiert. Anschließend kann das Programm die enthaltene DNA in der Einheit Nanogramm pro Mikroliter (ng/µl) darstellen. Zur weiteren Berechnung wird das Ergebnis mit 100 multipliziert, da die enthaltene DNA in 100 µl AE-Puffer gelöst wurde. Nun kann das Ergebnis mit dem Trockengewicht der Probe dividiert werden, um die DNA pro Milligramm Trockengewicht der Probe zu erhalten.

Bei relativ hohem DNA-Gehalt der Probe, wie beispielweise nativen Nieren, ist es sinnvoll zu Beginn des Versuches weniger als 25 mg abzuwiegen. Durch die sehr hohe Zellzahl kann im Verlauf der Durchführung die Bindungskapazität der Membran des DNeasy Kit Systems abnehmen und so falsche Werte generieren (siehe Abbildung 24) (Qiagen 2006). In unserem Versuchsaufbau wurden hierfür kleinere Proben als 10 mg verwendet.

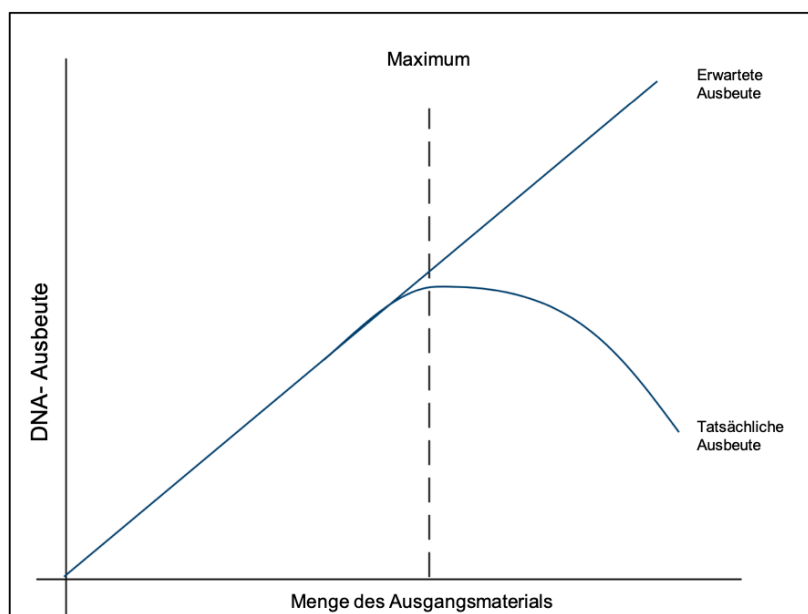


Abbildung 24: Schematische Darstellung der Auswirkung der Probengröße auf die DNA-Ausbeute. Wenn mehr als die maximale Menge des Ausgangsmaterials verwendet wird, ist die DNA-Ausbeute geringer als erwartet; modifiziert nach (Qiagen 2006).

4 Ergebnisse

Nachfolgend werden die Ergebnisse der Dezellularisierungssysteme, die Nachweise der Dezellularisierung, Rezellularisierung und mechanischen Stimulation dargestellt. Ebenso werden die Veränderungen im Aufbau des Miniaturinkubators, des Tissue Squeezers und die Lösungen zur Problembhebung präsentiert.

4.1 Vergleich zwischen manuellem und automatisiertem Dezellularisierungssystem

Hauptaugenmerk dieser Arbeit lag auf der Etablierung und Automatisierung des Dezellularisierungsprozesses. Das verwendete Dezellularisierungsprotokoll (siehe Tabelle 21) mit den verwendeten Perfusionsmedien sowie die Einstellungen zu Perfusionsdruck, -flow und -dauer wurde in laborinternen Versuchen erstellt und zeigte in der nachfolgenden Verwendung gute Ergebnisse bezüglich De- sowie Rezellularisierung. Um eine Vergleichbarkeit der laboreigenen Versuche gewährleisten zu können, wird deshalb das erstellte Dezellularisierungsprotokoll weiterhin verwendet. Somit kommt es durch die Automatisierung des Dezellularisierungssystems bei gleichem Dezellularisierungsprotokoll zu keiner Verkürzung der Perfusionsdauer. Aufgrund der Möglichkeit zur gleichzeitigen Dezellularisierung mehrerer Scaffolds und das parallele Vorbereiten der Folgeschritte kann jedoch indirekt eine Zeitersparnis erreicht werden. Im manuellen Dezellularisierungssystem müssen alle zugeführten Medien durch den Versuchsleiter gewechselt werden, inklusive erneuter Positionierung des Ansaugschlauches. Dabei werden die Enden des Ansaugschlauches in SDS und destilliertes Wasser (dH₂O) getaucht und befestigt. Da aufgrund der kurzen Schlauchenden nur kleine Behälter verwendet werden können, muss hier häufig das Medium erneuert werden. Falls dies nicht beachtet wird, kann Luft ins System gelangen. Das DecellControl kann hier durch die Verwendung zusätzlicher Schlauchsysteme und der automatischen Ventilstation mehrere Probleme lösen. Dabei wird für jedes Medium ein einzelnes Schlauchsystem in den Ventilen positioniert. Durch die programmierte Öffnung und Schließung der Ventile wird nur das entsprechende Medium angesaugt, sodass das DecellControl selbständig arbeiten kann und kein zusätzlicher Handlungsbedarf durch den Versuchsleiter besteht. Aufgrund der Länge der Schlauchsysteme können darüber hinaus größere Behälter für die Medien verwendet werden, wodurch das manuelle Auffüllung der Medien entfällt. Während der automatisierten Dezellularisierung können so Folgeschritte und -versuche parallel vorbereitet werden.

Darüber hinaus besteht im manuellen Dezellularisierungssystem die Gefahr der Luftinsufflation in das Schlauchsystem mit nachfolgender Zerstörung des

Nierenparenchyms. Diese können während des Auffüllens der Medien, durch versäumtes Auffüllen der Medienbehälter oder Schlauchdislokationen ins System gelangen. Nachfolgend wird Luft ungehindert bis zur Niere gespült, wodurch das Nierenparenchym zerstört wird und die Niere für den Versuch unbrauchbar macht (siehe Abbildung 25).

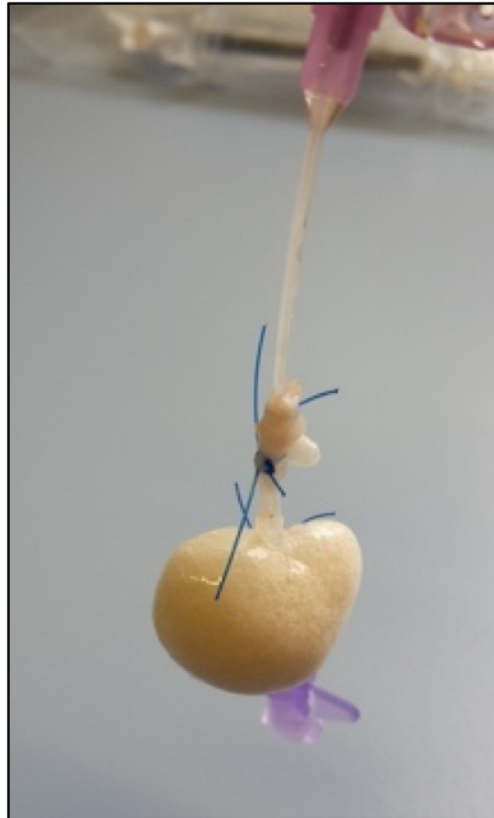


Abbildung 25: Dezellularisierte Niere nach Luftinsufflation

Durch den Versuchsaufbau des DecellControl-Automaten ist hier die Lösung in der Druckkammer gefunden worden. Dabei ist der Hohlraum in der Druckkammer trichterförmig aufgebaut. Die Perfusionsmedien werden oben angeschlossen, die zu dezellularisierenden Nieren werden unten über Luer-Lock-Adapter montiert. Zusätzlich gibt es eine Überlaufspritze und einen weiteren Ablauf. Falls sich eine Luftblase im System befindet, wird diese durch das trichterförmige Konstrukt nach oben über die Überlaufspritze abgefangen und kann die Nieren so nicht schädigen.

Als weitere deutliche Verbesserung können zusätzlich an der Druckkammer bis zu vier Nieren befestigt und gleichzeitig dezellularisiert werden.

Zusammenfassend zeigt sich eine deutlich einfachere und automatisiertere Dezellularisierung durch Verwendung des DecellControl.

4.2 Nachweis Dezellularisierung

In unserer Arbeitsgruppe konnte in Vorversuchen bereits nachgewiesen werden, dass das verwendete Dezellularisierungsprotokoll zu einer vollständigen Dezellularisierung

mit Erhalt der EZM mit der manuellen Dezellularisierung führt (Burgkart 2014; Schmitt 2017). Zum Vergleich zur automatisierten Dezellularisierung mit DecellControl und Kontrolle der vollständigen Dezellularisierung wurden jeweils drei Nieren nach gleichem Protokoll dezellularisiert, in Paraffin eingebettet und anschließend histologisch und immunhistochemisch ausgewertet. Die Paraffinschnitte der Nieren wurden dabei miteinander und mit einer nativen Niere als Positiv-Kontrolle verglichen. Zusätzlich wurde zum qualitativen Nachweis einer vollständigen Dezellularisierung die DAPI-Färbung zum Nachweis von DNA-Bestandteilen angewendet und mit DNeasy Blood & Tissue Kit (Fa. Qiagen, Deutschland) eine DNA-Quantifizierung durchgeführt.

4.2.1 Makroskopie und Mikroskopie

Eine visuelle Kontrolle der Dezellularisierung kann während des Dezellularisierungsprozesses makroskopisch durchgeführt werden. Hier wirkt das Nierenparenchym im Verlauf durchsichtig und farblos (siehe Abbildung 26).

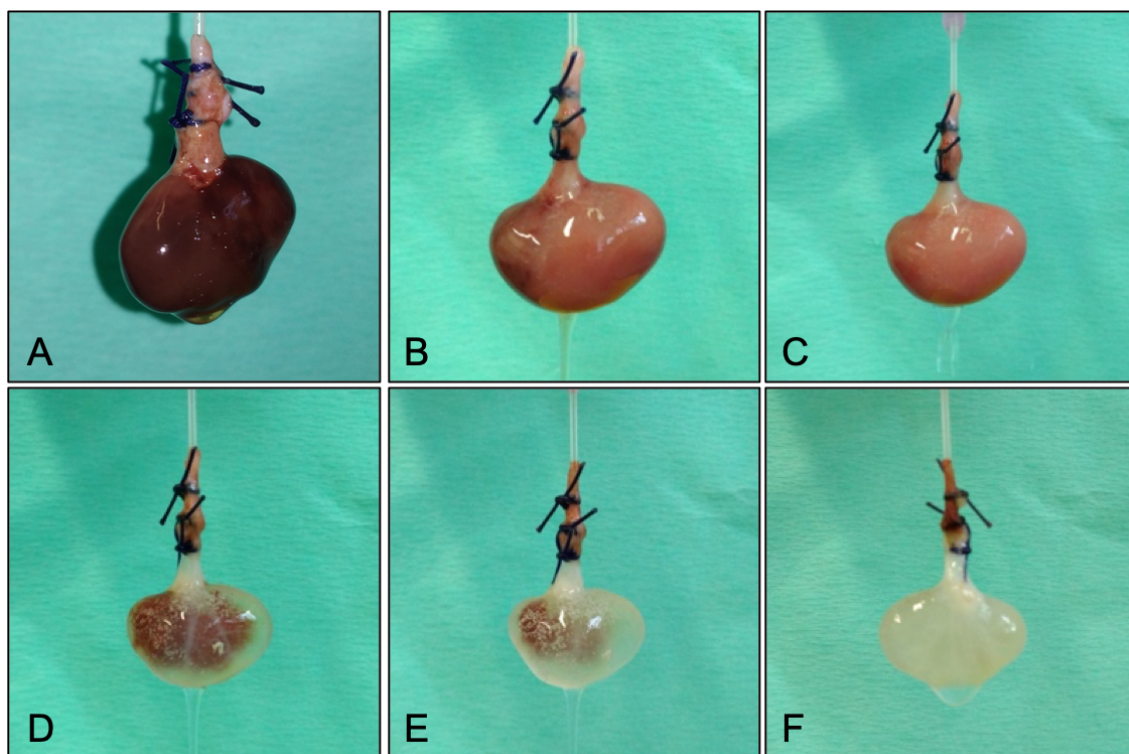


Abbildung 26: Makroskopischer Verlauf während der Dezellularisierung einer Rattenniere mit dH₂O und SDS (0,66 %). Native Niere (A), nach 10 Minuten (B), nach 15 Minuten (C), nach 45 Minuten (D), nach 60 Minuten (E), nach 140 Minuten Dezellularisierung (F)

Funktionell kann über den anhaltenden Ausfluss von Spülflüssigkeit über die Nierenvene und den Ureter die Intaktheit des Gefäßnetzes kontrolliert werden. Bei anatomischen Normvarianten der Nierenarterien mit einer Aufteilung der Arteriae renales in zwei Äste muss bei Bedarf eine Neujustierung der Braunüle vorgenommen werden, um eine einseitige Dezellularisierung zu verhindern. Dies wurde im unserem Labor in

Vorversuchen zu Versuchszwecken einmalig bis zur vollständigen Dezellularisierung durchgeführt und ist in Abbildung 27 dargestellt.

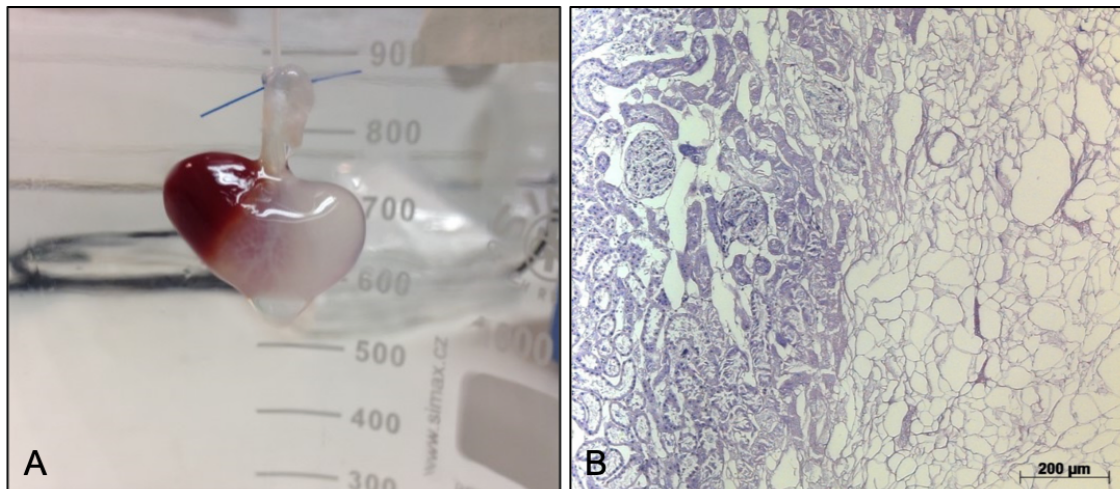


Abbildung 27: Dezellularisierung einer Niere bei Bifurkation der A. renales nah an der Aorta abdominalis mit makroskopisch (A) und mikroskopisch (B) sichtbarer einseitiger Dezellularisierung; Maßstabsbalken = 200 µm

Zur mikroskopischen Kontrolle wurden Paraffinschnitte der Nieren in HE gefärbt, um so die Struktur bzw. Architektur der Niere sowie die Zellkerne zu beurteilen (siehe Abbildung 28).

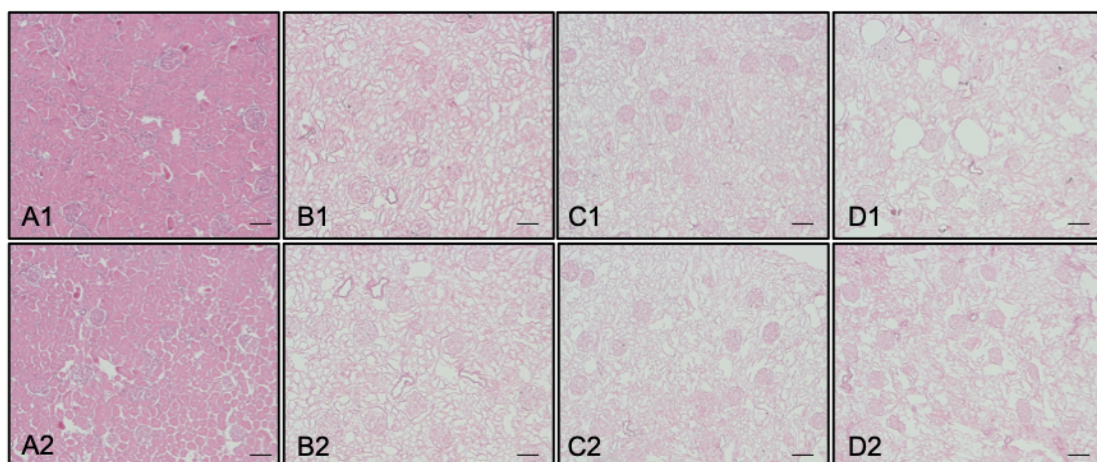


Abbildung 28: HE-Färbung Niere: native Niere (A1, A2) und dezellularisierte Nieren (B, C, D) nach bisherigem Dezellularisierungssystem (B1, C1, D1) und neuem Dezellularisierungssystem mit DecellControl (B2, C2, D2); Maßstabsbalken = 100 µm

Dabei zeigt die native Niere (Abbildung 28: A1, A2) deutliche Zellanreicherung mit klassischer Struktur der Niere mit Aufteilung in Nierenrinde mit Glomeruli, Nierenmark mit dem Tubulussystem und Nierenbecken. Im Vergleich dazu blieb in allen dezellularisierten Nieren (Abbildung 28: B1, B2, C1, C2, D1, D2) die Struktur erhalten bleiben ohne dass, als Zeichen der Dezellularisierung, Zellkerne nachgewiesen werden konnten. In Abbildung 28 werden die Nieren miteinander verglichen werden, wobei die Nieren B1, C1 und D1 mit dem bisherigen, manuellen Dezellularisierungssystem und die

Nieren B2, C2 und D2 mit Hilfe des hier weiterentwickelten Dezellularisierungssystem mit DecellControl dezellularisiert wurden.

4.2.2 Immunhistochemie

An allen Schnitten der nativen sowie dezellularisierten Nieren wurden in unserer Arbeitsgruppe immunhistochemische Färbungen für Laminin, Fibronectin und Kollagen Typ IV durchgeführt, um die erhaltene EZM darzustellen.

4.2.2.1 Laminin, Fibronectin und Kollagen Typ IV

Wie in Abbildung 29 repräsentativ dargestellt, zeigten sich in allen nativen und dezellularisierten Nieren positive Nachweise der Anfärbungen für Laminin, Fibronectin und Kollagen Typ IV als Zeichen einer erhaltenen EZM.

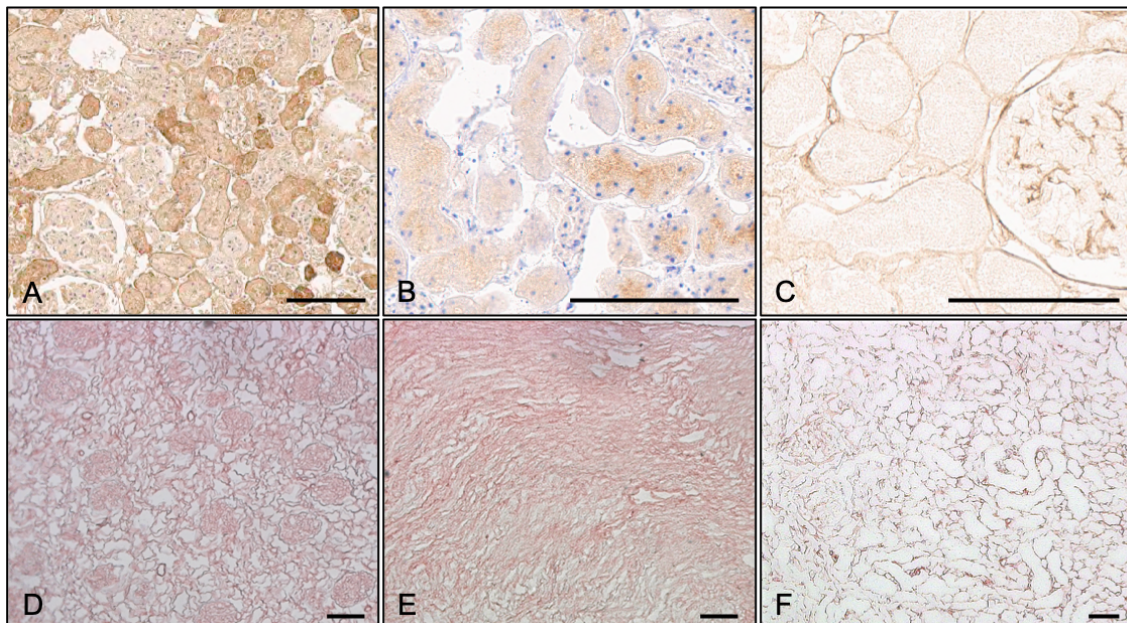


Abbildung 29: Repräsentative histologische Abbildungen von nativen (A, B, C) und dezellularisierten Nieren (D, E, F) mit Nachweis von Laminin (A,D), Fibronectin (B, E) und Kollagen Typ IV (C,F); Maßstabsbalken = 100 µm

4.2.3 Qualitativer DNA-Nachweis

Wie in Abschnitt 3.2.6.7 beschrieben, wird zunächst die native Niere als Positivkontrolle vermessen. In den durchgeführten Versuchen wurde die Belichtungszeit als Standard mit 136 Millisekunden bei zehnfacher Vergrößerung festgelegt. Dabei stellten sich die Zellkerne als blaue Punkte in der nativen Niere im Bereich der gesamten Niere dar (siehe Abbildung 30: A).

Nun wurden alle weiteren Nieren jeweils anhand von zwei Schnitten auf DNA-Reste bei 136 Millisekunden Belichtungszeit und zehnfacher Vergrößerung kontrolliert und dokumentiert. Dabei zeigte sich bei Nieren, die mit dem bisherigen sowie dem aktuellen

Dezellarisierungssystem dezellularisiert wurden, ein vollständiges Entfernen aller DNA-Bestandteile in den Zellkernen (siehe Abbildung 30: B1, B2, C1, C2, D1, D2).

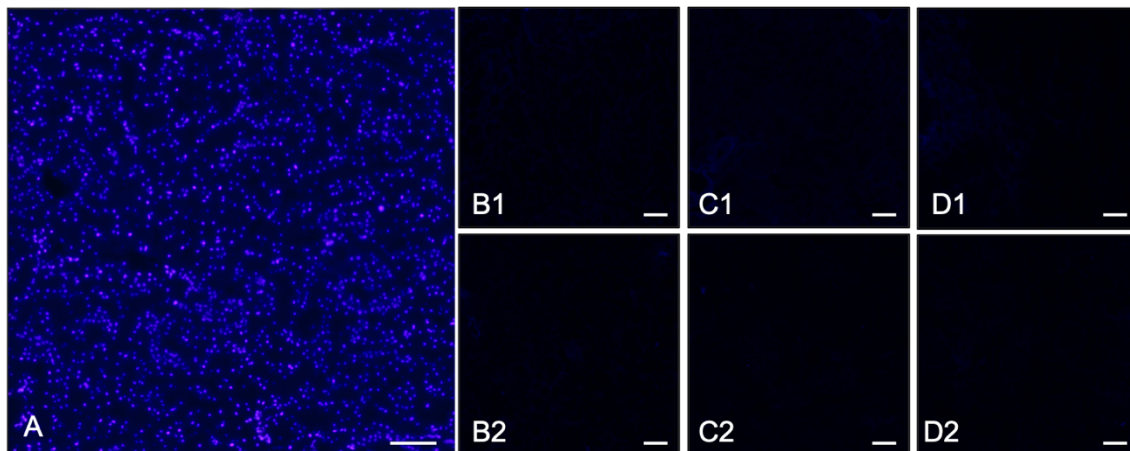


Abbildung 30: DAPI-Färbung Niere, native Niere mit Anfärbung der DNA (blaue Punkte; A) und dezellularisierte Nieren (B, C, D) nach bisherigem Dezellarisierungssystem (B1, C1, D1) und neuem Dezellarisierungssystem mit DecellControl (B2, C2, D2) ohne sichtbare Anfärbung von DNA-Bestandteilen; Maßstabsbalken 100 μ m

4.2.4 Quantitativer DNA-Nachweis

Wie in Abschnitt 3.2.6.8 beschrieben, wird zur Quantifizierung der DNA das DNeasy Blood & Tissue Kit (Fa. Qiagen, Deutschland) verwendet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 24 aufgelistet. Als Referenzwert gilt hierbei als vollständige Dezellularisierung ein Wert kleiner als 50 Nanogramm pro Milligramm Trockengewicht der EZM (Crapo 2011). In allen dezellularisierten Nieren zeigte sich eine vollständige, quantitative Dezellularisierung. Die native Niere als Positivkontrolle erreichte als einziges ein Testergebnis von über 50 Nanogramm pro Milligramm Trockengewicht.

Tabelle 24: Ergebnisse DNA-Quantifizierung mittels DNeasy Blood & Tissue Kit

Niere (Trockengewicht)	DNA-Gehalt in ng/mg EZM
Niere nativ (6 mg)	161,7
Niere B1 (23 mg)	35,2
Niere B2 (23 mg)	18,7
Niere C1 (22 mg)	36,8
Niere C2 (23 mg)	32,6
Niere D1 (21 mg)	22,9
Niere D2 (23 mg)	28,3

4.3 Wärmeschrank

Da der Tissue Squeezer als Teil der mechanischen Stimulation und der Langzeitkultur implementiert werden sollte, konnte der bisher eingesetzte befeuchtete Wärmeschrank nicht verwendet werden. Der Tissue Squeezer wurde als Prototyp mit dem 3D-Drucker hergestellt, mit elektronischen Schaltkreisen verbunden und ist somit nicht

feuchtigkeitsresistent. Daher wurde der Versuchsaufbau und die Kultivierung auf einen unbefeuchteten Wärmeschrank adaptiert. Hierzu musste weiterhin die Temperatur kontinuierlich bei 37 °C, CO₂-Konzentration von 5 % und Luftfeuchtigkeit von 100 % gewährleistet werden. Die Temperatur des Wärmeschrankes reguliert und über den abgeschlossenen Miniaturinkubator die Luftfeuchtigkeit stabil gehalten werden. Um einen regelmäßigen Gasaustausch und die 5 %-CO₂-Konzentration sicherzustellen, wurde eine CO₂-Zufuhr zum Miniaturinkubator implementiert und mit Hilfe des CO₂-Controllers überwacht.

4.4 Miniaturinkubator

Zur Verwendung des Tissue Squeezers sowie zur Kultivierung im unbefeuchteten Wärmeschrank wurde im ersten Schritt der Deckel des Miniaturinkubators angepasst. Im Rahmen dessen wurde der autoklavierbare Stahldeckel durch einen autoklavierbaren POM-Deckel ersetzt. Hierbei wurden weitere Zugänge für die mechanische Stimulation, die CO₂-Zufuhr sowie für den Mediumwechsel hinzugefügt (siehe Abbildung 31). Das geringere Gewicht sorgt gleichzeitig für eine einfachere Handhabung.

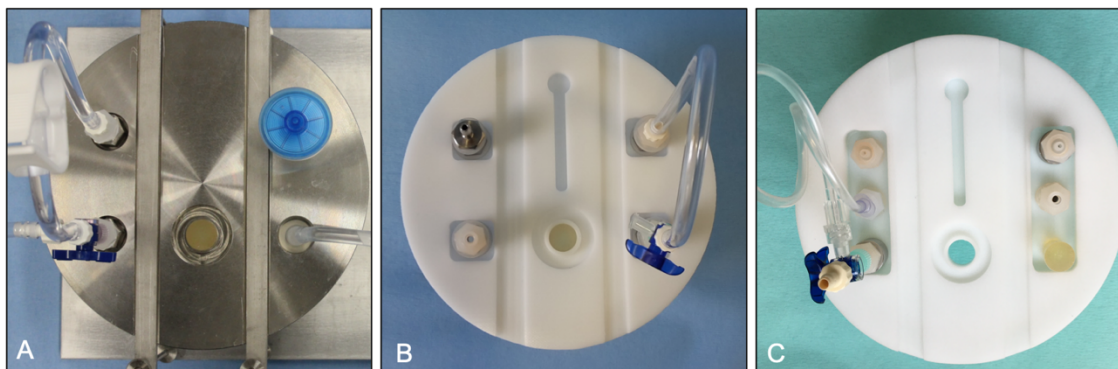


Abbildung 31: Veränderung des Deckels des Miniaturinkubator. Erstes Modell mit Stahldeckel und fünf Löchern (A), POM-Deckel mit 5 Löchern (B), aktueller POM-Deckel mit 7 Löchern

Von enormer Bedeutung ist ein abgedichtetes System, um einerseits den Austritt von Medium und andererseits eine Kontamination zu verhindern. Eine fehlerhafte Verbindung der Adapter führt aufgrund der Undichtigkeit zu Austritt von Medium. Dies führte wiederholt dazu, dass ein Großteil des Mediums über undichte Stellen ausgetreten ist, der Ansaugschlauch nachfolgend statt Medium Luft angesaugt hat und somit Luft in das Schlauchsystem gelangen konnte (n=3). Diese wurde bis zur Niere gespült, wodurch das Nierenparenchym zerstört wurde und somit der Versuch abgebrochen werden muss. Diesbezüglich wurden Dichtungsringe implementiert, verbessert und zusammen mit den Adaptern angepasst. In unseren Versuchen stellten sich Dichtungsringe aus Kautschuk als bessere Alternative dar, ohne dass es erneut zu Austritt von Medium kam (siehe Abbildung 32). Zur Kontrolle wird der Miniaturinkubator unter der sterilen Werkbank

aufgebaut und mit Medium durchgespült, um eine mögliche Leckage zu erkennen und frühzeitig beseitigen zu können.

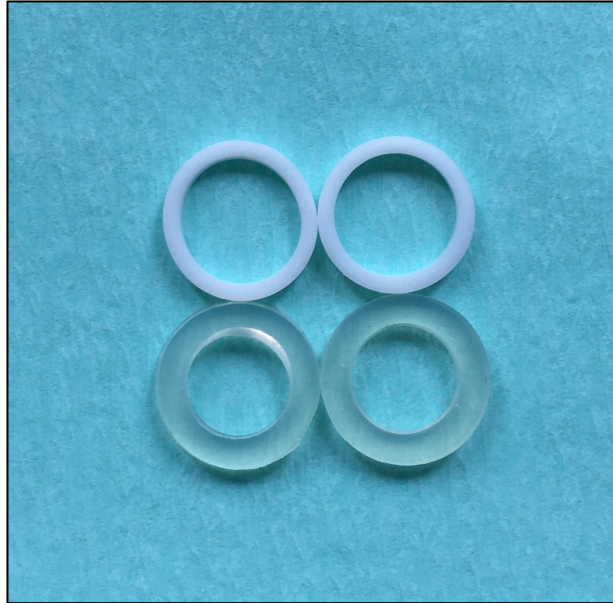


Abbildung 32: Dichtungsringe des Bioreaktor aus POM (oben) und Kautschuk (unten)

Zwingend notwendig ist dabei eine sichere und stabile Befestigung der Niere sowie des Ansaugschlauches. Der Ansaugschlauch, der im Miniaturinkubator das Medium ansaugt, sollte dabei möglichst kurz und stabil befestigt sein, um ein Ansaugen der Niere durch die Sogwirkung in den Schlauch zu verhindern. Auch dieses Problem führte aufgrund der irreversiblen mechanischen Schädigung der Niere zum Abbruch des Versuchs (n=1).

4.5 Mechanische Stimulation

Zur Mechanostimulation der Osteoblasten wird der Tissue Squeezer verwendet, welcher in Zusammenarbeit der Labore für Biomechanik und Tissue Engineering der Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie am Klinikum rechts der Isar entwickelt wurde. Dieser wurde in Kombination mit Änderungen des Deckels des Miniaturinkubators sowie dem Wechsel in einen unbefeuchteten Wärmeschrank optimiert, um nachfolgend die Parameter zur Einstellung der mechanischen Stimulation ändern zu können.

Für die mechanische Stimulation einer murinen Niere galt es zunächst eine Nierenhalterung zu entwerfen, um eine Positionierung der Niere während des gesamten Versuches direkt unter dem Stempel gewährleisten zu können. In Vorversuchen veränderte sich die Position der Niere in der Kristallisationschale und der Nierenhalterung zum Teil deutlich, sodass diese nachfolgend nicht mehr gleichmäßig durch den Stempel des Tissue Squeezers stimuliert wurde. Ursächlich hierfür war einerseits die ständige Perfusion der Niere und andererseits die Bewegung durch die mechanische Stimulation. Nach Aufbau des Miniaturinkubators unter sterilen Kautelen

und Justierung der Niere und des Stempels können nachfolgend nur bedingt Neupositionierungen durchgeführt werden, da der Miniaturinkubator ein geschlossenes, steriles System bleiben sollte. Weiterhin wird die Niere zunächst nach Rezellularisierung in der Langzeitkultur für vier Stunden perfundiert, sodass die Niere an Größe verliert und so eine Positionierung unter der Stempereinheit zusätzlich erschwert. Dies ist in Abbildung 34 (C) zu erkennen.

In Abbildung 33 kann die Entwicklung der verschiedenen Nierenhalterungen nachvollzogen werden. In der Versuchsreihe wurde jede Halterung mindestens einmal im vollständigen Versuchsaufbau verwendet. Die Verwendung der 180°-Halterungen konnte nur durch einen zusätzlichen 90-Grad-Winkel-Adapter aufgrund der Größe der Glasschale genutzt werden. Bei den 90°-Halterungen konnte keine kontinuierliche Positionierung der Niere sichergestellt werden. Bei Kultivierung stellte sich der 3D-Druck als eine potentielle Kontaminationsquelle heraus, weil dieser nicht mittels physikalischer Verfahren sterilisiert, sondern nur durch Nassantiseptik desinfiziert werden konnte. Die entwickelte Edelstahlhalterung inklusive Magnetführung konnte hingegen autoklaviert werden und der Versuchsleiter konnte durch Verschiebung der Magnete außerhalb der Kristallisationsschale die Niere unter Einhaltung der Sterilität neu positionieren.

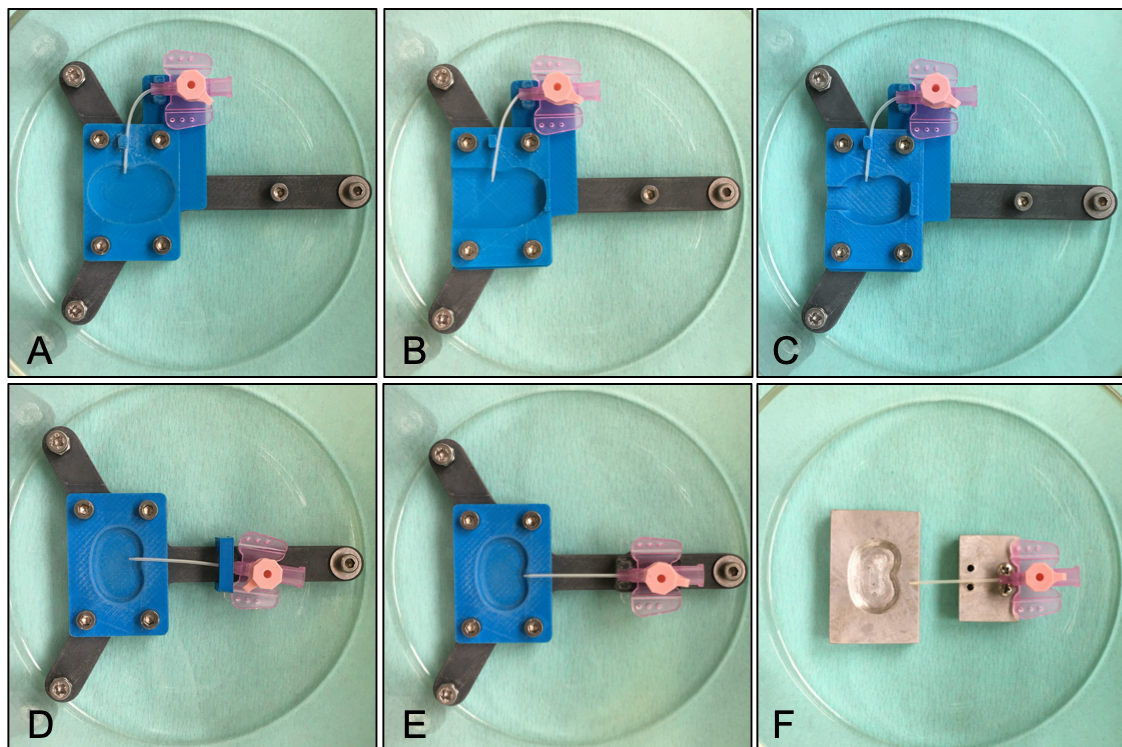


Abbildung 33: Halterung der Rattenniere im Miniaturinkubator im zeitlichen Verlauf. 3D Druck Halterung (A-E), Edelstahlhalterung mit Magneten (F), 90°-Halterung (A-C), 180°-Halterung (D-F)

In Abbildung 34 ist die Positionierung der verschiedenen Halterungen mit Niere zu sehen.

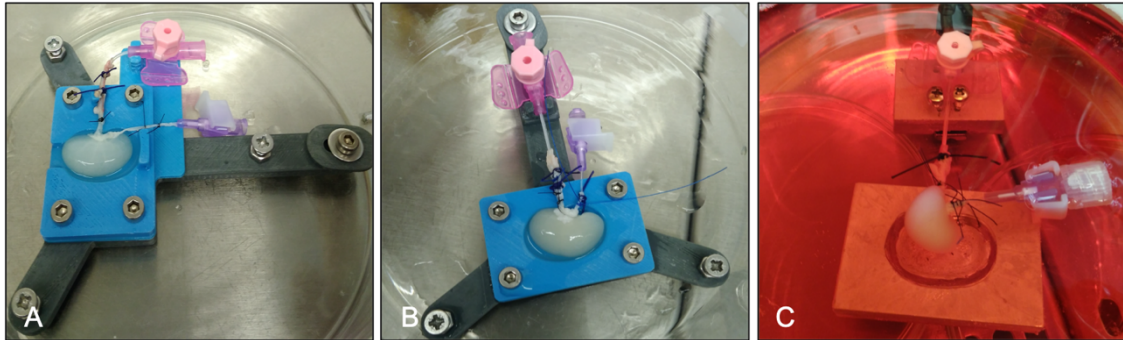


Abbildung 34: Nierenpositionierung in den verschiedenen Halterungen ohne Medium in der Kristallisationsschale (A, B) und mit Medium in der Kristallisationsschale (C) ohne laufende Perfusion der Niere.

Nach Literaturrecherche, welche in Abschnitt 5.3 genauer beschrieben ist, wurden die Einstellungen über die Computer-Einheit mit einer Stunde Stimulationszeit und sieben Stunden Stimulationspause festgelegt. Über einen Kraftsensor und die Anpassung der Höhe und Position des Stempels während der Perfusion der Niere konnte eine Kompressionstiefe von 10 % in Bezug auf die Gesamthöhe der Niere eingestellt werden. Die Messungen des Kraftsensors sind in die Auswertung aufgrund der ersten Versuchsreihe und Inhomogenität nicht in diese Arbeit eingeflossen. Der Kraftsensor konnte jedoch dabei helfen, die initiale Höheneinstellung der Stempereinheit zur erleichtern, wodurch die Kompressionstiefe reproduzierbarer wurde.

Zur Einstellung dieser Parameter konnte die Frequenz sowie die Dauer der Stimulations- und Pausephasen über die elektronische Steuereinheit des Tissue Squeezers programmiert werden.

Die Kompressionstiefe der Stimulation muss während der Perfusion der Niere erfolgen. Hierbei wird der Stempel in Nullstellung auf die Niere gelegt, möglichst ohne Druck auszuüben und dann in dieser Stellung am Gerüst des Tissue Squeezers mit Hilfe der Stellschrauben fixiert. Vorab wird die Nierenhöhe während der Perfusion gemessen und anschließend nach Anschalten des Motors visuell eine Kompressionstiefe der Niere von 10 % eingestellt. Nach Einführung des Kraftsensors konnte dies objektiviert und kontrolliert werden, was jedoch noch weitere Anpassungen benötigt.

4.6 Medienwechsel

Während einer Langzeitkultur muss das perfundierte osteogene Medium 2 ca. alle zwei bis drei Tage erneuert werden. Zu Beginn des Projektes musste das Medium ohne das Medienwechselsystem händisch in der sterilen Werkbank mit Hilfe einer 50 ml Pipette getauscht werden. Da dies sich durch komplette Diskonnektion des Miniaturinkubators, Transport in die sterile Werkbank mit Öffnung des Miniaturinkubator sowie Pausieren

der Perfusion der Niere als aufwendig und fehleranfällig darstellte, konnte durch das Medienwechselsystem eine deutliche Erleichterung und Vereinfachung implementiert werden. Hierbei kann das Medium sowie beide Glasflaschen vorab unter der sterilen Werkbank vorbereitet und nachfolgend unter Beachtung der Sterilität mit dem Miniaturinkubator über Heidelberger-Leitungen und Drei-Wege-Hähne verbunden werden. Darüber hinaus ist es sinnvoll den Umgehungskreislauf des Miniaturinkubators zu verwenden, da einerseits Luft ins Schlauchsystem gelangen kann und andererseits sich beim Durchspülen anfangs erneut Schaum bildet. Während des Mediumwechsels ist es daher sinnvoll, die Perfusion zu pausieren, ebenso um eine Luftinsufflation zu vermeiden.

4.7 Rezellularisierung, Langzeitkultur und mechanische Stimulation

Zu Beginn wurde die in unserer Arbeitsgruppe etablierte Rezellularisierung nachvollzogen und ebenfalls durchgeführt. Als Ziel dieser Arbeit sollten murine Nieren im Anschluss im Rahmen einer Langzeitkultur mechanisch mit dem Tissue Squeezer kontinuierlich stimuliert werden.

Nach standardisierter Dezellularisierung mittels DecellControl erfolgte die Rezellularisierung der Nieren über den Ureter. Nach Aufbau und Inbetriebnahme des Miniaturinkubators wird die Perfusion der Niere nach vier Stunden Adhäsionszeit begonnen. Die Kontrolle der adäquaten Perfusion erfolgt durch An- und Abschalten der Rollerpumpe, wodurch eine Volumenzunahme bzw. -abnahme der Niere zu sehen sein sollte. Während der Langzeitkultur muss täglich das Schlauchsystem, alle Verbindungen zum Miniaturinkubator, das Medium, der CO₂-Gehalt sowie die Positionierung und Zustand der Niere kontrolliert und gegebenenfalls ausgetauscht oder angepasst werden. Im gesamten Projekt wurden 23 Nieren verwendet, von denen fünf Nieren („MEC 1-5“) in die Auswertung der mechanischen Stimulation eingeschlossen werden konnten (siehe Tabelle 25). Dabei wurden zu Beginn vor allem die technischen Voraussetzungen geschaffen, um nachfolgend auf eine Kultivierung und Stimulation von mehr als 21 Tagen hinzuarbeiten. Die Versuche mit der Niere „MEC 1“ galt als Pilotversuch mit geplantem Abbruch nach sieben Tagen. Bei Perfusionsminderung der Niere durch Kontamination mit Pilzen wurden die Versuche der Nieren „MEC 2“, „MEC 3“ und „MEC 4“ abgebrochen. Histologische Bilder zur Kontamination sind in Abbildung 40, Abbildung 42 und Abbildung 45 zu sehen.

Tabelle 25: Nieren mit mechanischer Stimulation

Bezeichnung Niere	Dauer Kultivierung (in Tagen)	Dauer Stimulation (in Tagen)	Anzahl Stimulationszyklen	Anzahl humane Osteoblasten (in Mio)	Grund für Abbruch
MEC 1	7	5	14	18	Geplante Beendigung (1. Versuch)
MEC 2	12	10	29	16	Perfusionsminderung, Ausfällung
MEC 3	8	6	18	16	Perfusionsminderung, Ausfällung
MEC 4	7	5	15	19	Perfusionsminderung, makroskopisch Schimmel
MEC 5	28	26	77	8	Geplante Beendigung des Versuchs nach 4 Wochen

Es gelang nach wiederholten Stimulationsversuchen, die vor allem aufgrund von Kontaminationen abgebrochen werden mussten, letztendlich mit der Niere „MEC 5“ die anvisierte Dauer von mindestens 21 Stimulationstagen zu erreichen. Abbildung 35 zeigt die histologische Aufarbeitung der rezellularisierten Niere „MEC 5“. Hier sind in der HE-Färbung bläuliche Zellkerne der humanen Osteoblasten zu erkennen, ohne Darstellung von Pilzhyphen. Da die Stempereinheit im Rahmen dieser Arbeit nicht erneuert werden konnte und weiterhin aus CPE bestand, wurden zwei Ultraschallschutzhüllen über der Stempereinheit positioniert, um eine weitere Absicherung gegenüber einer Kontamination zu erreichen.

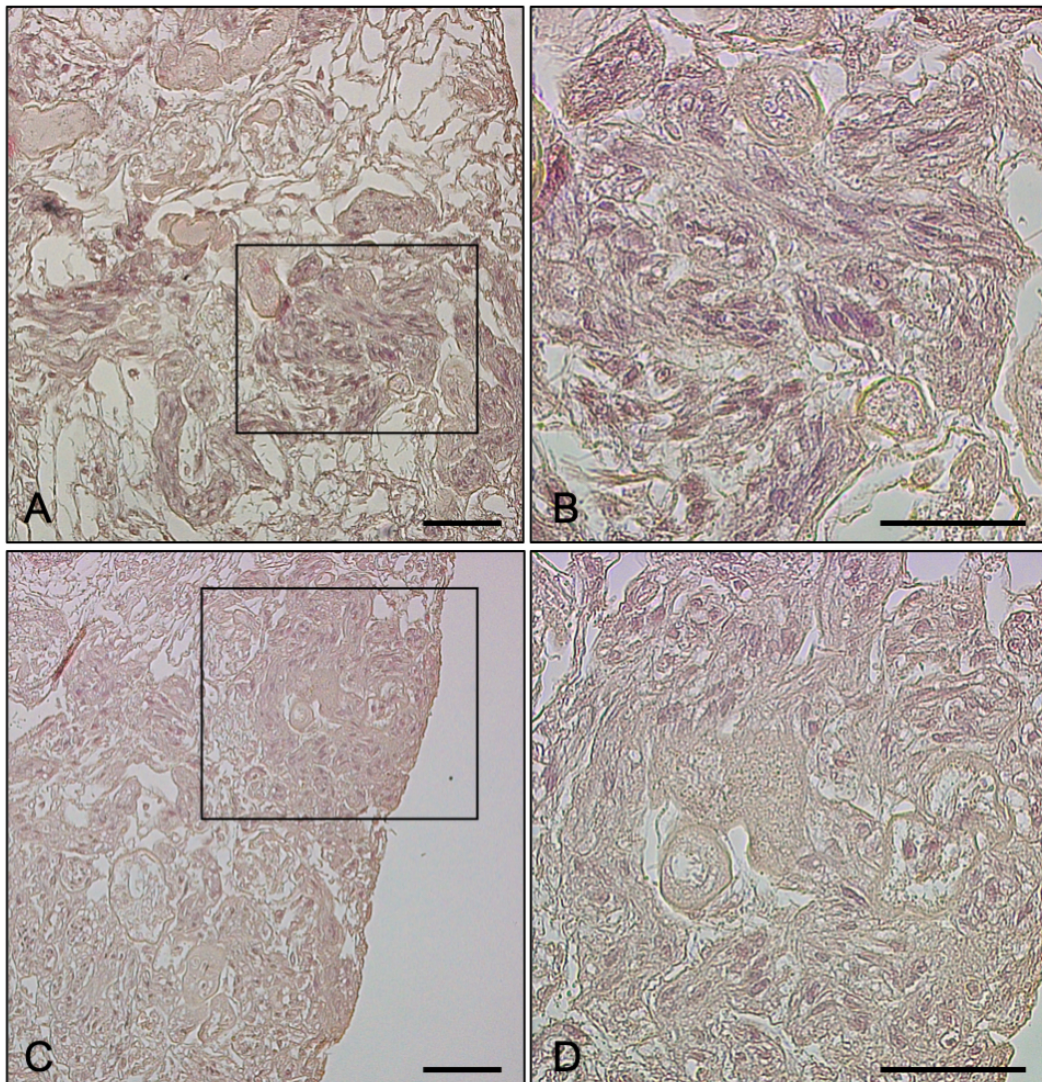


Abbildung 35: Histologische Bilder Niere „MEC 5“ in HE ohne sichtbaren Pilzhyphen mit bläulich angefärbten Zellkernen bei Rezellularisierung mit humanen Osteoblasten (P5); A, C: 10-fache Vergrößerung; B, D: 32-fache Vergrößerung; schwarze Kästchen zeigen Ausschnitt der 32-fachen Vergrößerung; Maßstabsbalken = 100µm

Wir konnten in unseren Versuchen zeigen, dass nach Behebung diverser Probleme eine kontinuierliche Perfusion der Niere über einen Zeitraum von vier Wochen bei gleichzeitiger mechanischer Stimulation möglich ist. Als größtes Problem stellte sich die Kontamination mit Pilzhyphen dar, welche schrittweise behoben werden konnte und in Abschnitt 4.7.3 beschrieben wird.

Während des hochkomplexen Versuchsaufbaus dieser experimentellen Arbeit zeigten sich vielfältige Probleme, welche im Folgenden beschrieben werden.

4.7.1 Problematik Nierenpräparation und -anatomie

Die Präparation und Vorbereitung der Rattennieren ist abhängig von der Anatomie der Niere und der operativen Expertise und Erfahrung des Versuchsleiters. Die Entnahme und Präparation der Nieren muss sehr vorsichtig und sorgfältig durchgeführt werden.

Dabei muss auf die schonende Entnahme der Nieren geachtet werden, da bereits kleinste Verletzungen des Nierenparenchyms bei der Dezellularisierung (siehe Abbildung 36) zu großen Rissen während der Kultivierung und mechanischen Stimulation führen können (siehe Abbildung 37) (n=1).

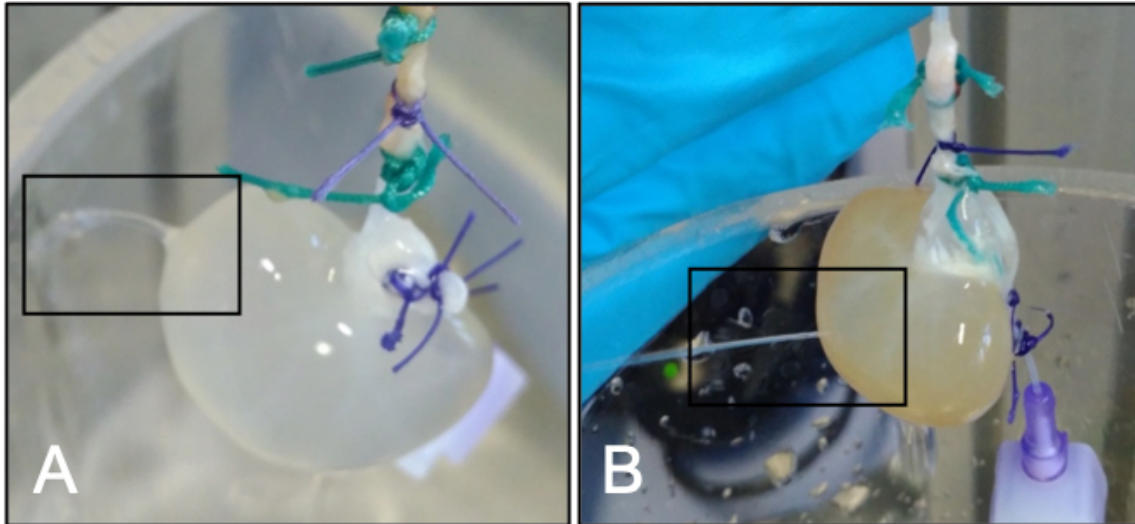


Abbildung 36: Loch in Rattenniere während der Dezellularisierung mit Austritt von Medium (schwarzes Kästchen in A und B; n=1)

Im Versuchsaufbau konnte dann bei geschädigter Niere während der kontinuierlichen Perfusion und mechanischen Stimulation eine deutliche Zunahme der Aktivität der Rollerpumpe beobachtet werden, was durch den fehlenden Widerstand des Nierenparenchyms erklärbar ist.

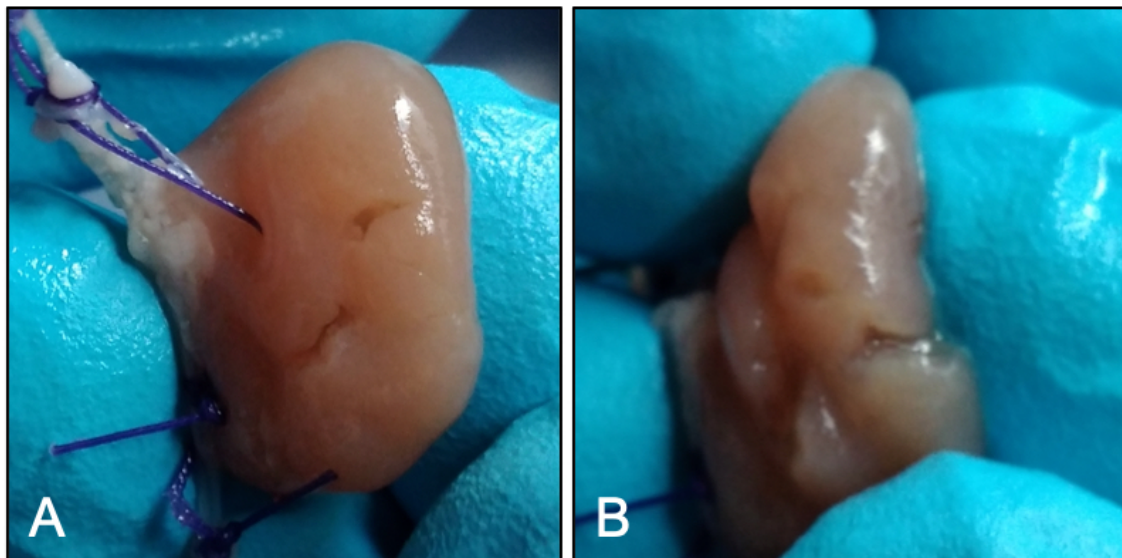


Abbildung 37: Defekte Niere nach mechanischer Stimulation bei primär kleinem Loch im Parenchym (n=1)

Variable Gefäßausbildung mit beispielsweise einer nah an der Aorta abdominalis gelegenen Bifurkation der Arteria renalis können bei Befestigung der Braunüle in einer der Abzweigungen zu einer partiellen Dezellularisierung führen (siehe Abbildung 38). Dies muss bei der Präparation mit entsprechender Positionierung der Braunüle beachtet

werden. Wie in Abbildung 38 (A) zu sehen, können als Normvariante zwei Arteriae renales direkt aus der Aorta abdominalis abgehen, sodass hier keine vollständige Dezellularisierung des gesamten Organs mit einer Braunüle durchgeführt und die Niere somit für unseren Versuchsaufbau nicht verwendet werden kann (n=1). Bei Aufzweigungen der Arteria renalis nach dem Aortenabgang kann dies gegebenenfalls noch möglich sein, indem die Braunüle vor der Bifurkation befestigt wird und somit alle Anteile der Niere durchspült werden (n=2).

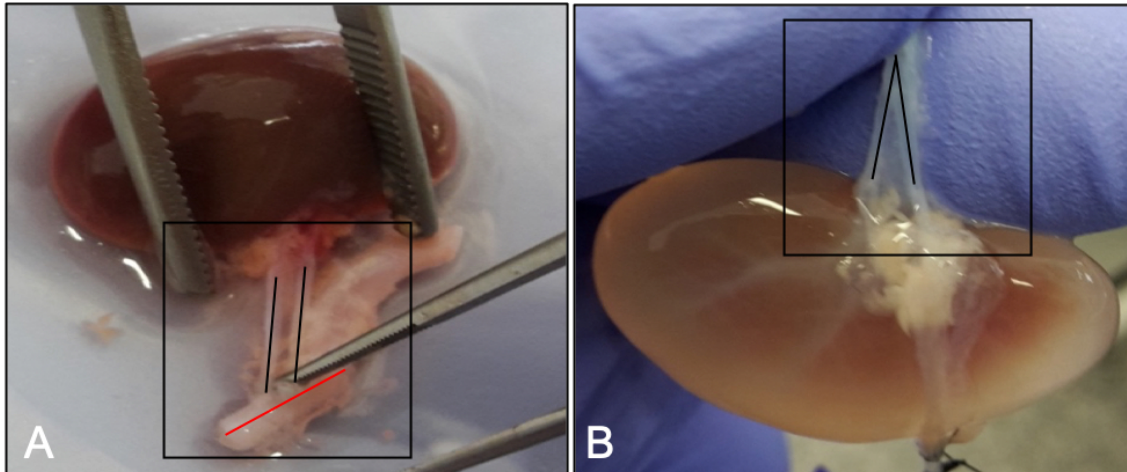


Abbildung 38: Repräsentative Bilder von variablen Abgängen der Aa. renales (schwarze Linien) nahe der Aorta abdominalis (schwarze Kästchen; A: zwei Abgänge direkt aus der Aorta abdominalis (rote Linie, n=1); B: Aufzweigung nach Aortenabgang der A. renalis (n=3))

Des Weiteren ist aufgrund der Perfusionsdrücke eine adäquate Fixierung der Braunülen essentiell, um die sichere Lage im Gefäßsystem für die Dauer des gesamten Versuches zu gewährleisten. Bei inadäquater Befestigung kann es hier leicht zur Dislokation kommen, wobei sich erneute Fixierung als deutlich erschwert darstellt.

Voraussetzung für eine Rezellularisierung über den Ureter der Niere ist die korrekte Sondierung, Lage und Fixierung der Braunüle im Ureter. In unseren Versuchen konnten insgesamt fünf Nieren nicht zur Rezellularisierung verwendet werden, da der Ureter bei Präparation der Nieren aus den Ratten zu kurz (kleiner als drei Zentimeter) abgesetzt wurde oder eine Sondierung des Ureters nicht durchführbar war (n=5). Eine Dislokation der Braunüle nach einmaliger Fixierung mit Prolene-Fäden bedeutet ebenfalls ein Ende des Versuches. Der fragile Ureter ist durch Punktion und Fixierung nicht erneut sondierbar bzw. gegebenenfalls zu kurz für eine erneute Refixation der Braunüle. Als sehr hilfreich zeigte sich, nach Sondierung des Ureters vor endgültiger Fixierung den Ureter mit PBS über die Braunüle zu spülen, um eine intraluminale Lage bestätigen zu können und erst im Anschluss die Braunüle zu fixieren.

Für die Rezellularisierung wurde das Zellpellet in ca. 1 ml osteogenem Medium 1 resuspendiert. Bei Verwendung größerer Volumina kann aufgrund der kleinen Niere und des Fassungsvermögens keine vollständige Injektion stattfinden. Dabei muss die

Injektion langsam mit geringem Druck durchgeführt werden, da durch zu hohe Druckspitzen eine Schädigung des Nierenparenchyms nicht ausgeschlossen werden kann. Hilfreich ist dabei die Injektion mit Pausen durchzuführen.

4.7.2 Problematik Schlauchsystem

Das Schlauchsystem (MainTube, Fa. Arthrex) der Rollerpumpe ist im klinischen Alltag bei arthroskopischen Operationen in Verwendung und somit für einen limitierten zeitlichen Gebrauch ausgelegt. Im Rahmen der Langzeitkultur bei Inkubation von humanen Osteoblasten in murinen Nieren ist eine kontinuierliche Perfusion der Niere notwendig und damit auch eine Verwendung des Schlauchsystems über Tage hinweg zwingende Voraussetzung.

Im Laufe unserer Versuche zeigte sich mit Dauer des Versuches eine Schwachstelle im Bereich der Rolleneinheit der Rollerpumpe und des einliegenden Schlauchsystems. Dabei entstanden feine Risse im Schlauchsystem nach im Mittel vier Tagen ohne Mediumaustritt. Um ein Auslaufen des Mediums mit nachfolgender Luftinsufflation und Versuchsabbruch zu vermeiden, wurde mindestens alle fünf Tage das Schlauchsystem gewechselt. Hier mussten die Schwachstellen jedoch regelmäßig kontrolliert werden, da in mehreren Versuchen ein kompletter Riss nach einem Tag aufgetreten ist und somit der Versuch abgebrochen werden musste (n=3).

Komplikationen können während der Langzeitkultur und Dauerperfusion ebenso durch Luftblasen oder Diskonnektion des Schlauchsystems entstehen. Da die Verbindung des Schlauchsystems über Luer-Lock-Adapter zum Miniaturinkubator erfolgt, zeigten sich vor allem zu Beginn undichte Verbindungen im Schlauchsystem. Diese können zwar über den integrierten Luftblasenfänger bis zu einer gewissen Menge abgefangen werden, bei Übersteigen kann es jedoch zu einer Schädigung der Niere kommen. Ebenso kann es durch die Bewegung des Schlauchsystems durch die wirkenden Kräfte im Bereich der Rollerpumpe zu einer Diskonnektion des Schlauchsystems und der Verbindung zum Miniaturinkubator kommen. Folge ist hierbei ebenso ein Versuchsabbruch. Durch regelmäßige Kontrolle des Schlauchsystems konnte die Häufigkeit dieser Komplikationen in unseren Versuchen deutlich minimiert werden. Nach Aufbau des Miniaturinkubators wurde dieser auch ohne Niere über 15 Minuten gespült, um einerseits eine Schaumbildung des Mediums zu vermeiden und andererseits mögliche undichte Stellen zu detektieren. Wie beschrieben sind in Einzelfällen frühzeitige Risse oder Diskonnektionen jedoch nicht zu verhindern.

4.7.3 Problematik Kontamination

Im Rahmen der Implementierung der mechanischen Stimulation und während der Langzeitkultivierung wurde eine wiederholte Kontamination mit Pilzen festgestellt (siehe

Abbildung 39). Meist zeigten sich makroskopisch nach ca. fünf bis sechs Tagen der Langzeitkultur Pilzmyzele. Die Myzele haben sich dabei zu Beginn im Bereich des 3D-Drucks angelagert, sind im Medium ausgefällt und haben sich anschließend im gesamten Medium ausgebreitet.

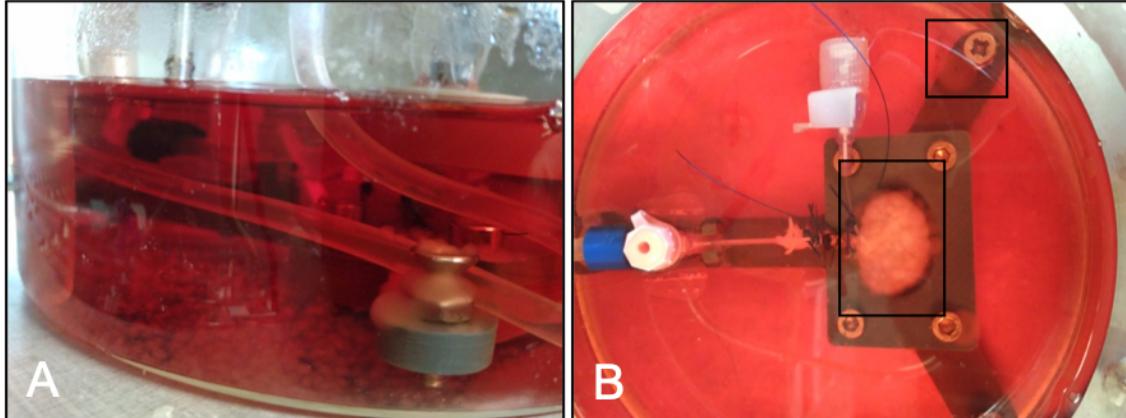


Abbildung 39: Repräsentative Bilder von Pilzmyzele während der Langzeitkultur und mechanischer Stimulation bei Verwendung der 3D-Druck-Halterungen in der Kristallisationsschale; B: repräsentative Darstellung der Pilzmyzele im Bereich der Niere sowie der 3D-Druckhalterung (schwarze Kästchen)

Nach Abbruch des Versuches wurden die Nieren histologisch aufgearbeitet. Dabei zeigten sich in intraluminalen sowie in intra- und extrakapsulären Bereichen Pilzhyphen (siehe Abbildung 40). Für die weitere Auswertung der Nieren nach Rezellularisierung konnten die Nieren nicht weiter verwendet werden (n=5).

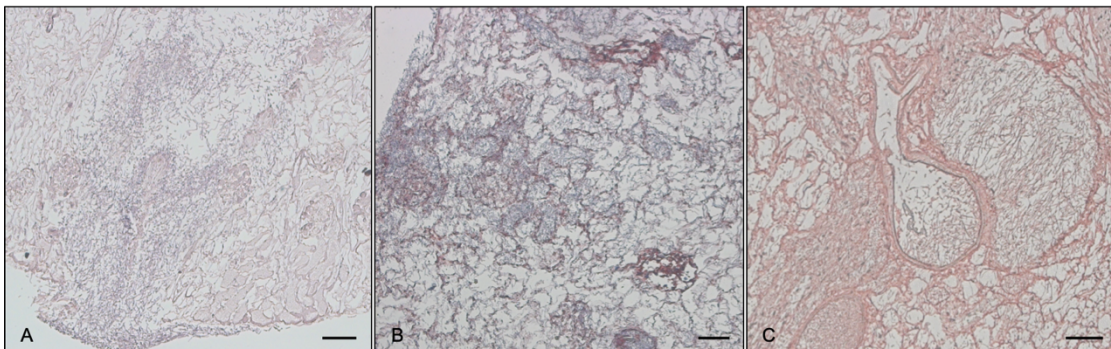


Abbildung 40: Repräsentative histologische Abbildung von Pilzhyphen intra- und extrakapsulär (A, B) und intraluminal (C), Maßstabsbalken = 100µm

Durch eine bis dahin fehlende antimykotische Abschirmung des Mediums bei der Dezellularisierung wurde dem Dezellularisierungsmedium zunächst Amphotericin B zugesetzt. In erneuten Versuchen konnte dadurch jedoch ein Wachstum der Pilzmyzele nicht verhindert werden.

Um die Quelle der Kontamination zu detektieren, wurden schrittweise und systematisch die möglichen Kontaminationsquellen ausgeschlossen. Zusammenfassend wird dies in Tabelle 26 dargestellt.

Tabelle 26: Ergebnisse zur Kontamination

Material	Methode	Dauer	Ergebnis
Autoklav	Autoklavierung und Kultivierung Eppendorf-Gefäß	14 Tage	Keine Kontamination
Osteogenes Medium 2 ohne Primocin	Kultivierung im Miniaturinkubator	7 Tage	bakterielle Kontamination
Osteogenes Medium 2 mit Primocin	Kultivierung im Miniaturinkubator	7 Tage	Keine Kontamination
Osteoblasten	Kultivierung	14 Tage	Regelrechtes Wachstum der Osteoblasten, keine Kontamination
Rattenniere	Kultivierung von nativer Niere	14 Tage	Keine Kontamination
Rattenniere	Kultivierung von dezellularisierter Niere ohne Perfusion	14 Tage	Keine Kontamination
Rattenniere	Kultivierung von dezellularisierter Niere mit Perfusion	14 Tage	Keine Kontamination
Wärmeschrank	Offene und geschlossene Petrischalen mit osteogenem Medium 2	14 Tage	Keine Kontamination
Miniaturinkubator	Kultivierung in osteogenem Medium 2	14 Tage	Keine Kontamination
DecellControl	Kultivierung dezellularisierter Niere („INKU“)	14 Tage	Keine Kontamination
CO ₂ -Controller	Verwendung Miniaturinkubator mit Agarplatte	14 Tage	Keine Kontamination
3D-Druckhalterung	Kultivierung im Miniaturinkubator ohne Mediumwechsel	10 Tage	Positive Kontamination mit makroskopisch Pilzmyzele und mikroskopisch Pilzhyphen
Edelstahlhalterung	Kultivierung im Miniaturinkubator ohne Mediumwechsel	10 Tage	Keine Kontamination (n = 2)

Als Kontaminationsquelle konnte der verwendete Autoklav ausgeschlossen werden, da dieser von anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppen verwendet wurde, ohne dass diese eine Kontamination berichteten. Zur Kontrolle wurde jedoch ein Eppendorfer-Gefäß autoklaviert und anschließend in sterilem Medium für 14 Tage kultiviert, ohne dass sich makroskopisch oder mikroskopisch ein Wachstum zeigte (n=1).

Zusätzlich wurde das osteogene Medium 2 für 14 Tage kultiviert, ohne dass eine Kontamination eintrat (n=1).

Eine Kontamination der Osteoblasten konnte durch die Kultivierung der Zellen über 14 Tage, regelmäßiges Splitten und mikroskopische Kontrolle ausgeschlossen werden. Eine Kontamination mit Pilzen wäre einerseits makroskopisch und mikroskopisch sichtbar und hätte des Weiteren das Osteoblasten-Wachstum deutlich eingeschränkt.

Um die Rattennieren als Kontaminationsquelle ausschließen zu können, wurde einerseits eine präparierte Niere ohne Dezellularisierung inkubiert (n=1, Abbildung 41, A). Andererseits wurde eine Niere präpariert, dezellularisiert und nachfolgend ohne Perfusion in einer Petrischale kultiviert (n=1, Abbildung 41, B). Um eine Kontamination durch die Perfusion auszuschließen wurde zudem eine Niere dezellularisiert und im Miniaturinkubator ohne Verwendung des 3D-Drucks perfundiert (n=1, siehe Abbildung 41, C). In beiden Fällen zeigten sich weder makroskopisch Pilzmyzele noch mikroskopisch Pilzhyphen.

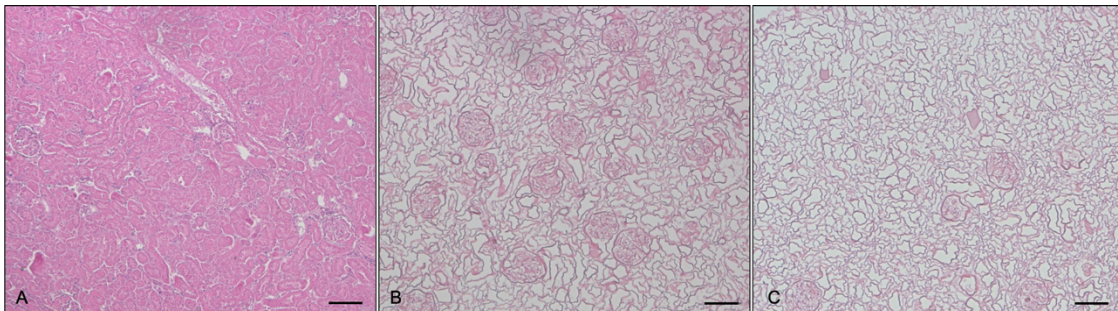


Abbildung 41: Präparierte, nicht dezellularisierte Niere (A), dezellularisierte, inkubierte Niere ohne Perfusion (B) und dezellularisierte, inkubierte Niere mit kontinuierlicher Perfusion (C), jeweils ohne mikroskopischen Nachweis von Pilzhyphen, HE-Färbung, Maßstabsbalken = 100 μm

Andererseits wurde eine Niere nach dem Dezellularisierungsschema dezellularisiert und anschließend für 14 Tage im Miniaturinkubator mit ständiger Perfusion ohne mechanische Stimulation kultiviert („OSTI“, n=1, siehe Abbildung 42). Dabei zeigten sich trotz Medienwechsel makroskopisch Pilzmyzele mit mikroskopischen Nachweis von Pilzhyphen. Während dieses Versuches wurde die Nierenhalterung entfernt, die Stempelvorrichtung war jedoch weiter Bestandteil des Aufbaus.

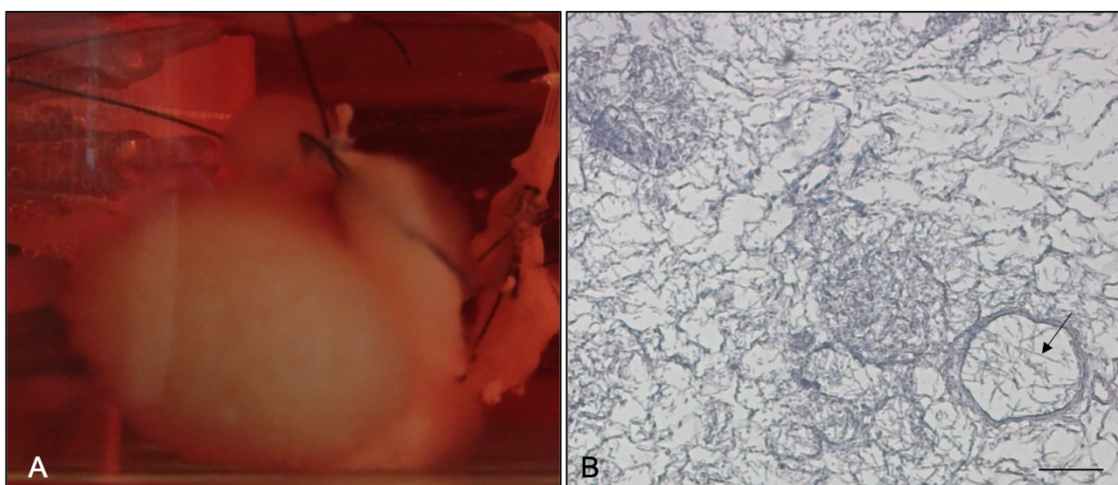


Abbildung 42: Makroskopische Pilzmyzele nach 14 Tage Kultivierung einer dezellularisierten Niere („OSTI“, A); Mikroskopisch können ebenso Pilzhyphen dargestellt werden (B; schwarzer Pfeil: exemplarisch markierte Pilzhyphexemplar); Maßstabsbalken = 100 μm

Nach Auslegen von Petrischalen im Wärmeschrank konnte keine Kontamination nachgewiesen werden. Dabei wurden im Wärmeschrank geöffnete und verschlossene

Petrischalen platziert, welche mit sterilem Medium gefüllt wurden (n=2, siehe Abbildung 43). Hierbei muss jedoch erwähnt werden, dass der Inkubator ein in sich geschlossenes System darstellt und bei Wahrung der Sterilität und des standardisierten Arbeitsablaufes kein direkter Kontakt zum Wärmeschrank besteht. Der Wärmeschrank wird auch im Rahmen der Versuche nicht als keimfreies oder steriles Arbeitsumfeld angesehen und kann durchaus bei Abstrich Entnahme Kontaminationen aufweisen.



Abbildung 43: Offene und geschlossene Petrischalen (gefüllt mit osteogenem Medium 2) im unbefeuchteten Wärmeschrank zur Kontaminations-Überprüfung

Weiterhin wurden auch Teile des Miniaturinkubators und des Mediumwechselsystems nach entsprechender Autoklavierung ohne Hinweis auf Kontamination kultiviert (n=1). Um eine Kontamination durch den CO₂-Zustrom ausschließen zu können, wurde der standardisierte Aufbau des Inkubators durchgeführt und in der Glasschale verschiedene Agarplatten direkt unterhalb des CO₂-Zustroms platziert. Auch hier zeigte sich kein Wachstum (n=3).

Ein deutliches Wachstum von Pilzmyzele zeigte sich bei Kultivierung der 3D-Druck-Halterungen in Medium inklusive Primocin (n=2, siehe Abbildung 44). Zur weiteren Verarbeitung wurden im Anschluss feste Bestandteile der Pilzmyzele sowie das kontaminierte osteogene Medium 2 auf verschiedene Blutagarplatten verteilt und inkubiert ohne ein weiteres Wachstum zu beobachten und den Pilz zu identifizieren. Ebenso wurde das Medium zentrifugiert und mit dem Verfahren der Matrix-Assistierten Laser-Desorptions-Ionisierung (MALDI) mit der Flugzeitanalyse (engl. Time of light, TOF) zur Identifizierung der Spezies versucht zu analysieren, ohne eine Ergebnis zu erhalten.

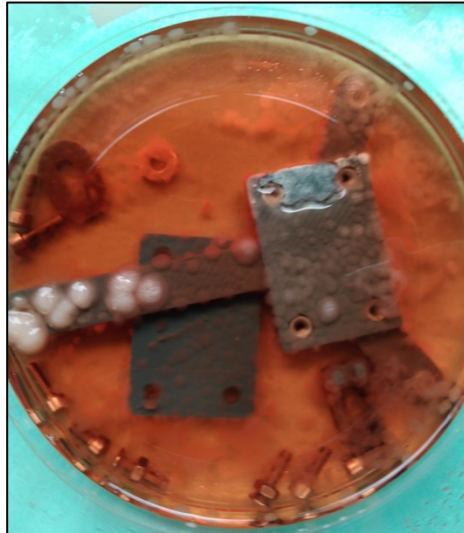


Abbildung 44: Repräsentatives Bild von Pilzmyzele bei Inkubation des 3D-Drucks im osteogenem Medium 2 mit Primocin

Nachfolgend wurde als Lösung der Problematik eine Nierenhalterung aus Edelstahl konstruiert, um diese ebenso wie die restlichen Bauteile des Miniaturinkubators autoklavieren zu können. Bei Kultivierung der Edelstahlkonstruktion in Medium im Miniaturinkubator zeigte sich keine Kontamination (n=2).

4.7.4 Problematik Perfusion

Bei Langzeitkulturen und der damit einhergehenden Perfusion kann es neben den oben beschriebenen Problematiken auch zu Schwierigkeiten der Perfusion kommen. Dabei wurde beobachtet, dass nach einigen Tagen der Perfusionsdruck zur ständigen Perfusion der Niere nicht mehr ausreichte und dieser erhöht werden musste. Dies zeigte sich meist durch eine deutlich verminderte Geschwindigkeit, mit der die Rollerpumpe arbeitete, als Zeichen eines erhöhten Flusswiderstandes der Niere (n=3). Zur Überprüfung dieser Malperfusion wurde die Rollerpumpe pausiert. Im Normalfall würde das Volumen der Niere abnehmen und nach erneutem Start der Rollerpumpe wieder zunehmen. Der standardmäßige Perfusionsdruck von 100 mmHg musste dabei je nach Versuch auf teilweise bis zu 150 mmHg erhöht werden, um weiterhin einen Perfusionskreislauf zu erhalten.

In einigen Fällen führte dies zum Abbruch des Versuches, da keine weitere Perfusion der Niere erfolgte und man davon ausgehen musste, dass keine adäquate Nährstoffversorgung der Zellen vorliegt. Mikroskopisch konnten nach histologischer Auswertung Pilzhyphen im Lumen der Gefäße nachgewiesen werden, was als Verlegung des Lumens zu werten ist (siehe Abbildung 45).

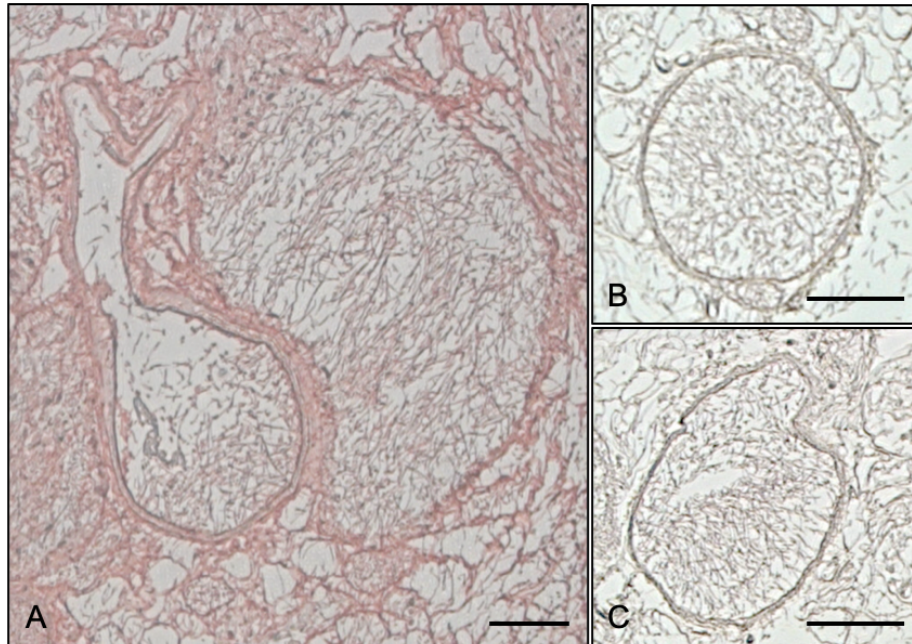


Abbildung 45: Histologische Färbungen nach Perfusionsminderung der Nieren mit Nachweis von Pilzhyphen im Gefäßlumen mit zum Teil vollständiger Verlegung des Lumens (A: „MEC 2“ Fibronektin-Färbung, B/C: „MEC 4“, HE-Färbung)

Makroskopisch konnte in einem Versuch eine weißlich-derbe Struktur erkannt und palpirt werden (n=1, siehe Abbildung 46). In der histologischen Auswertung konnten neben Pilzhyphen in diesem Bereich keine weiteren strukturellen Veränderungen oder Zellansammlungen dargestellt werden, sodass von einer Knotenbildung durch vermehrte Anlagerung von Pilzhyphen oder ausgefällten Mediumproteinen auszugehen ist.

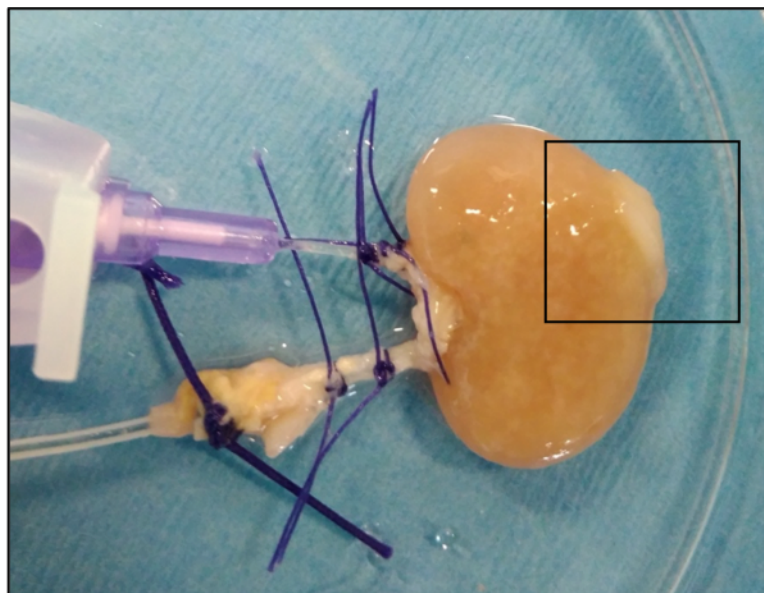


Abbildung 46: Sichtbare weißlich-derbe Struktur (schwarzes Kästchen) im Bereich der Niere nach 3 Wochen Inkubation; der Versuch wurde aufgrund Malperfusion abgebrochen (n = 1).

5 Diskussion

Durch Implementierung des DecellControl-Dezellularisierungssystems konnten im Rahmen dieser Arbeit weitere Fortschritte zur zeiteffektiven und standardisierten Herstellung von biologischen Scaffolds im Bereich des Tissue Engineerings erzielt werden, wobei die EZM erhalten bleibt und eine vollständige Entfernung der DNA nachgewiesen werden konnte. Ebenso konnte im Kontext der mechanischen Stimulation erstmals ein 3D-Bioscaffold nach Rezellularisierung mit humanen Osteoblasten über vier Wochen erfolgreich stimuliert werden. In diversen Teilschritten wurde hierzu der Aufbau des Miniaturinkubators und der Nierenhalterungen angepasst um unter anderem Fehlerquellen und Kontaminationsherde zu beseitigen.

Im Folgenden werden die Ergebnisse zur Dezellularisierung und der Dezellularisierungssysteme sowie der Rezellularisierung diskutiert. Darüber hinaus werden die Fortschritte zur Verbesserung und Einführung der mechanischen Stimulation beurteilt. Abschließend folgt eine kritische Auseinandersetzung mit den Lösungen zur Kontaminationsvermeidung sowie ein Ausblick des Tissue Engineerings.

5.1 Dezellularisierung und Dezellularisierungssysteme

Da es nach Literaturrecherche kein für alle Gewebearten standardisiertes Dezellularisierungsprotokoll gibt, wurde im Rahmen dieser Arbeit das etablierte Dezellularisierungsschema unserer Arbeitsgruppe verwendet und verbessert (Burgkart 2014; Schmitt 2017). So wurde die Kombination aus physikalischen und chemischen Verfahren verwendet, um die Perfusionszeit des Detergens möglichst kurz zu halten. Dafür wurden die Nieren primär bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ kryokonserviert und nach dem Auftauen mit 0,66 %-SDS oder 3 %-SDS durch Perfusion dezellularisiert. In unseren Versuchen konnte so eine erfolgreiche und zeitsparende Dezellularisierung mit Erhalt der EZM erfolgen.

Es hat sich im Bereich des Knochen Tissue Engineerings bei Herstellung biologischer Scaffolds die Dezellularisierung ganzer Organe über das Gefäßsystem etabliert und bietet aufgrund des Erhaltes der EZM und des Gefäßnetzes Vorteile in Bezug auf die Biokompatibilität, mechanische Stabilität sowie auf die Verringerung des Diffusionsabstandes zu den Zellen (Badylak 2007; Crapo 2011).

Für die Biokompatibilität sowie die mechanische Stabilität ist es entscheidend, dass das Parenchym der Niere mitsamt der Nierenstruktur sowie der Basalmembran erhalten bleibt (Badylak 2007; Crapo 2011). Studien konnten zeigen, dass eine vollständige Dezellularisierung mit SDS ohne Zerstörung der Nierenarchitektur erreicht werden kann (Ross 2009; Song 2013; He 2017). Durch den histologischen Nachweis von Laminin, Fibronectin und Kollagen Typ IV konnte der Erhalt der EZM in dieser Versuchsreihe

sowie in Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe bestätigt werden und bildet so die Grundlage als biologisches Scaffold für eine Rezellularisierung (Burgkart 2014).

Oft wird eine Kombination der verschiedenen Verfahren genutzt, um die Wirksamkeit der Dezellularisierung zu verbessern, gleichzeitig jedoch die Konzentration von chemischen Lösungsmitteln zu reduzieren (Walles 2003; Badylak 2011; Poornejad 2016). Dabei wird eine unvermeidbare geringe Schädigung der Mikrostruktur und Denaturierung von Proteinen akzeptiert, um das Risiko für unerwünschte immunologische Reaktionen bei der Rezellularisierung zu reduzieren (Crapo 2011; Burgkart 2014). Durch die Perfusion von Medien über das Gefäßsystem des Organes kann bei murinen Nieren (mit einer Stärke von bis zu 10 mm) eine adäquate Dezellularisierung erreicht werden, wohingegen Immersionsverfahren nur bei Geweben bis ca. 5 mm Stärke erfolgreich angewendet werden können (Sandmann 2009; Crapo 2011).

Zur Dezellularisierung von murinen Nieren über Organperfusion werden diverse Dezellularisierungsprotokolle mit verschiedenen Detergenzien, Konzentrationen und Einwirkzeiten verwendet, ohne dass sich bisher ein Standardprotokoll herauskristallisiert hat (Destefani 2017). So werden teilweise Kombinationen der Detergenzien von bis zu 3% Triton-X-100 und 4% SDS über Zeiträume von vier bis fünf Tagen angewendet (Ross 2009; Ross 2012; Song 2013). Weitere Arbeitsgruppen verwenden hingegen geringere Konzentrationen mit 1% SDS über 17 Stunden mit ebenso erfolgreicher Dezellularisierung der murinen Nieren (Bonandrini 2014; Ciampi 2019). Im Vergleich zu den erwähnten Studien wird in unserer Arbeitsgruppe ein deutlich kürzeres Dezellularisierungsprotokoll mit geringerer Detergens-Konzentration angewendet (Ross 2009; Ross 2012; Song 2013; Bonandrini 2014; Burgkart 2014; Schmitt 2017; Ciampi 2019). He et al. führten als einzige Arbeitsgruppe eine systematische Reduktion der SDS-Konzentration sowie Dezellularisierungsdauer durch (He 2017). Dabei reichte eine sehr geringe SDS-Konzentrationen von 0,125% und eine kurze Perfusionsdauer von vier Stunden aus, um eine adäquate Dezellularisierung mit verbessertem Erhalt von GAGs, Wachstumsfaktoren und der EZM weiterhin zu erreichen. Somit kann kein Grund für die unterschiedlichen Dezellularisierungsprotokolle herausgearbeitet werden, da meist nur eine ausreichende Dezellularisierung mit Erhalt der EZM nachgewiesen werden soll, ohne dass eine systematische Aufarbeitung mit dem Ziel der Verbesserung des Protokolls und Reduktion der Detergenzien stattfindet (He 2017).

Die präparierten Nieren werden in unserer Arbeit darüber hinaus mitsamt Kapsel und dem umliegenden Bindegewebe nach Entnahme aus den Ratten zunächst bei -80 °C kryokonserviert, um erst bei Versuchsbeginn aufgetaut und anschließend dezellularisiert zu werden (Burgkart 2014; Schmitt 2017). Im Gegensatz dazu werden die Nieren in anderen Arbeitsgruppen meist direkt aus den Ratten entnommen und weiterverarbeitet

oder zunächst in PBS bzw. Kochsalzlösung bis zur weiteren Verwendung eingelegt (Ross 2009; Ross 2012; Bonandrini 2014; Ciampi 2019; Mallis 2021). Dieser Unterschied könnte ein weiterer Grund für das deutlich kürzere, jedoch weiterhin effektive Dezellularisierungsschema sein, da eine Kryokonservierung bekanntlich zu Schädigungen und Lyse von Zellen führt (Crapo 2011; Burgkart 2014; Schmitt 2017). Beim Vergleich von den Dezellularisierungsdetergenzien SDS und Triton-X-100 (nicht-ionisches Detergens) werden in der Literatur unterschiedliche Resultate hinsichtlich einer adäquaten Zellentfernung unter Erhalt der EZM und von Wachstumsfaktoren beschrieben (Destefani 2017). Insbesondere bei Organen mit hoher Zelldichte scheint SDS jedoch bessere Ergebnisse zur Dezellularisierung unter Erhalt der Bestandteile der EZM zu liefern (Ott 2008; Nakayama 2010; Crapo 2011; Destefani 2017). Trotz Erhalt der EZM bei Verwendung von SDS sind negative Effekte auf die Bestandteile der EZM mit Reduktion von Wachstumsfaktoren bekannt, weshalb die Konzentration sowie Einwirkzeit von SDS möglichst gering und kurz gehalten werden sollte (Choi 2015; He 2017). Da SDS zu den aggressiven Detergentien zählt, ist es nach Perfusion des Gewebes wichtig, das Detergens vollständig auszuspülen, da verbleibendes SDS zytotoxisch für die rezellularisierten Zellen ist (Cebotari 2010; Zvarova 2016).

Im Rahmen von Versuchsreihen unserer Arbeitsgruppe zeigten sich eine ausreichende Dezellularisierung mit 0,5 %, 0,66 %, 1 % und 3 % SDS Konzentrationen mit effektiv reduzierter Immunogenität. Bezüglich der Immunantwort konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Konzentrationen von SDS festgestellt werden. Deshalb wird davon ausgegangen, dass SDS, als sehr aggressives Detergens, bereits in niedriger Konzentration zu einer ausreichenden Dezellularisierung führt. Daraufhin wurden die Dezellularisierung mit 0,66 %-SDS und 3 %-SDS als Ober- und Untergrenze der zuvor verwendeten SDS-Konzentrationen genauer untersucht. In einer statischen Kultur wurden murine Gefrierschnitte mit humanen Osteoblasten nach Dezellularisierung mit 0,66 % und 3 %-SDS besät und lieferten vielversprechende Ergebnisse mit signifikant erhöhter Proliferation der Zellen bis Tag 14. Darüber hinaus zeigte sich bei Verwendung von 3%-SDS eine signifikant erhöhte Proliferation im Vergleich zu 0,66%-SDS. (Florian 2019)

In dynamischen 3D-Kulturen unserer Arbeitsgruppe, in denen dezellularisierte, murine Nieren mit allogenen und xenogenen Osteoblasten besiedelt und kontinuierlich perfundiert wurden, konnte die Beobachtung einer verbesserten Proliferation bei Verwendung von 3%-SDS bisher nicht bestätigt werden. Eine Rezellularisierung der murinen Nieren mit humanen Endothelzellen zeigte jedoch eine verbesserte Proliferation und Zellviabilität bei Verwendung von 0,66%-SDS. Aufgrund der ausreichenden Dezellularisierung sowie der zukünftigen Versuchsreihen mit Co-Kulturen wurde in

unseren Versuchen überwiegend mit der geringeren Konzentration (0,66%-SDS) als vermeintlich schonendere Variante gearbeitet.

Um die Wirksamkeit beider Dezellularisierungsprotokolle zu vergleichen, wurden die Nieren qualitativ sowie quantitativ beurteilt, um eine vollständige Entfernung aller DNA-Bestandteile und eine ausreichende Dezellularisierung der Nieren nachzuweisen. Zur qualitativen Kontrolle wurden HE- und DAPI-Färbungen angewendet. Dabei zeigten sich im Vergleich zu nativen Nieren keine sichtbaren Zellkerne. Auch in der quantitativen Untersuchung mit Hilfe des DNeasy Kit Systems konnte für alle dezellularisierten Nieren der Referenzwert von 50 Nanogramm DNA pro Milligramm Trockengewicht des Gewebes unterschritten werden (Crapo 2011; Keane 2015). Somit ist von einer adäquaten und ausreichenden Azellularität auszugehen.

Die HE- und DAPI-Färbungen sind als qualitative Kontrolle häufig verwendete Methoden im Bereich des Tissue Engineerings, um quantitative DNA-Messungen zu verifizieren (Woods 2005; Crapo 2011; Keane 2015). Die Hämatoxylin-Eosin Färbung ist dabei eine der Standardfärbungen der Histologie, da sie die mikroskopisch sichtbaren Strukturen schnell, kostengünstig und technisch einfach darstellen kann (Wittekind 2003; Titford 2005). Dabei werden durch das Hämatoxylin effektiv Zellkerne blau angefärbt, was bei nativen und dezellularisierten murinen Nieren zum Nachweis von DNA-Bestandteilen genutzt werden kann (Woods 2005; Crapo 2011; Keane 2015). Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI, der Adenin-Thymin-Verbindungen der DNA bindet, gilt als DNA-spezifischer Farbstoff und wird in vielen Bereich der Medizin erfolgreich eingesetzt (Kapusinski 1995; Crapo 2011).

Als quantitativen Nachweis der vollständigen Entfernung aller DNA-Bestandteile werden aufgrund der einfachen und schnellen Handhabung häufig Kit Systeme verschiedener Anbieter verwendet, welche laut Literatur ähnliche Ergebnisse zum Nachweis erzielen und in vielen Studien zum Einsatz kommen (Gilbert 2006; Crapo 2011). In dieser Arbeit wird das in unserem Labor etablierte DNeasy Blood & Tissue Kit (Fa. Qiagen, Deutschland) angewandt. Bei Proben mit hohem Gehalt an DNA und einer erhöhten Zelldichte, wie beispielweise eine native Niere, sollten deutlich weniger als die generell empfohlene Probenmenge verwendet werden. So zeigten sich auch bei unserer Versuchsreihe zu Beginn falsch-niedrige Ergebnisse der DNA-Messung der nativen Niere bei 21 Milligramm Trockengewicht (19 ng DNA/mg EZM), was dem Ergebnis einer dezellularisierten Niere entsprechen würde. Diese fehlerhaften Ergebnisse werden auf die überschrittene Bindungskapazität der Membran des DNeasy Kit Systems zurückgeführt, woraufhin die nachfolgenden Reaktionen des Kit Systems fehlerhaft und nicht mehr vollständig durchlaufen werden können (Qiagen 2006). Bei Verringerung der

Probe bis auf 6 Milligramm Trockengewicht konnten die Ergebnisse der native Niere als Positiv-Kontrolle gewertet werden.

Nach Literaturrecherche ist der Einsatz von automatisierten Dezellularisierungseinheiten im Bereich des Tissue Engineerings bisher vergleichsweise gering. Sie werden aktuell beispielsweise zur Dezellularisierung von Gefäßen sowie porcinen Lungen eingesetzt (Pellegata 2012; Price 2015). Die in dieser Arbeit verwendete DecellControl-Einheit stellt zur Dezellularisierung von murinen Nieren eine neue, automatisierte Dezellularisierungseinheit dar.

Im Vergleich zwischen manuellem und automatisiertem System wurde durch das DecellControl-System keine Veränderung des Dezellularisierungsprotokolls vorgenommen, wodurch keine Zeitersparnis des Dezellularisierungsprozesses erreicht werden konnte. Aufgrund der Automatisierung konnten jedoch während der Dezellularisierung parallel nachfolgende Arbeitsschritte vorbereitet werden. Zudem bietet es die Möglichkeit zur simultanen Dezellularisierung von bis zu vier murinen Nieren und resultiert im Endeffekt in einer Optimierung des Zeitmanagements des gesamten Versuches.

5.2 Miniaturinkubator

Um konstante Kulturbedingungen für Langzeitkulturen humaner Osteoblasten in biologischen Scaffolds voraussetzen zu können, ist dabei die Nutzung eines Inkubators unabdinglich. Dabei müssen vor allem Temperatur, pH-Wert, Feuchtigkeit, CO₂-Gehalt sowie Sterilität gewährleistet sein. Darüber hinaus muss eine Perfusion des Scaffolds mit Medium, angetrieben durch eine Pumpe, implementiert werden können und ein suffizienter Gasaustausch möglich sein. (Ng 2017; Schuerlein 2017)

Nach diversen Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe hat sich hier der oben dargestellte Aufbau etabliert und konnte im Rahmen dieser Arbeit an die Anforderung angepasst werden (Burgkart 2014; Schmitt 2017). Voraussetzung aller Veränderungen war dabei die Möglichkeit zur Sterilisation im Autoklaven. Durch Wechsel des Deckels von Stahl auf POM konnte dies weiterhin gewährleistet und eine deutliche Gewichtsreduktion mit vereinfachter Handhabung erreicht werden. Dabei wurde der Miniaturinkubator entsprechend unseren Anforderungen für die mechanische Stimulation mit Befestigung des Tissue Squeezers sowie weitere Löcher für Zu- und Abläufe zum Miniaturinkubator angepasst. So konnte auch die Verbindung zum Medienwechselsystem sowie zum CO₂-Controller verbaut werden. Dabei wurden Luer-Lock-Adapter und Dichtungsringe angepasst, um ein stabiles und dichtes System verwenden zu gewährleisten.

Um eine bessere Kontrolle über die Kulturbedingungen innerhalb des Miniaturinkubators zu erhalten, ist es sinnvoll eine stetige pH-Wert- und Temperaturmessung zu implementieren (Schuerlein 2017). In unseren Versuchen kann die Temperatur indirekt

über die Einstellungen des Wärmeschrankes oder eines Temperaturfühlers innerhalb des Wärmeschrankes und der pH-Wert über die Kontrolle der Farbe des Mediums kontrolliert werden (siehe Abschnitt 5.4).

Nach Literaturrecherche stellen Miniaturinkubatoren im Allgemeinen ein sehr geringes Kontaminationsrisiko dar und führten nicht zur häufigen Kontaminationen der Versuche (Pörtner 2005; Wang 2013). Auch bei Vorliegen einer Kontamination in unserem Versuchsaufbau konnte der Miniaturinkubator als Quelle bzw. Ursache der Kontamination ausgeschlossen werden. Bei dem verwendeten Miniaturinkubator handelt es sich um eine Glasschale mit passendem, aufliegenden Deckel und einliegendem Dichtungsring. Kritisch betrachtet, stellt dies mitsamt der verwendeten Verbindungen kein komplett abgeschlossenes und dichtes System dar, weshalb bei Aufbau des Miniaturinkubators, bei Schlauchwechsel und Medienwechsel auf Sterilität geachtet werden muss.

5.3 Mechanische Stimulation

Um den Einfluss von mechanischer Stimulation auf das Wachstum von primären humanen Osteoblasten näher untersuchen zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit nach Rezellularisierung muriner Nieren mit primären humanen Osteoblasten ein 3D-Scaffold generiert und nachfolgend durch Kompression stimuliert. Da es sich um das Pilot-Projekt zur mechanischen Stimulation handelt, können noch keine endgültigen histologischen Ergebnisse präsentiert werden.

Um das Wissen auf dem Gebiet des Knochenwachstums und der Knochenheilung zu erweitern, ist es dabei wichtig die Grundlagen der Umwandlung von physikalischen Reizen in Zellantworten im Sinne der Mechanotransduktion zu verstehen. Aufgrund physiologischer Kulturbedingungen und einer höheren klinischen Relevanz, sind dabei vor allem dreidimensionale Kulturen im Fokus der Forschung. (Reilly 2010; Krishnan 2011) Durch die mechanische Stimulation konnte in anderen Studien gezeigt werden, dass dadurch die Apoptose von Knochenzellen reduziert werden kann. Bei Langzeitkulturen ist häufig ein geringeres Wachstum der Zellen mit geringerer Proliferation und Differenzierung zu erkennen, weshalb durch die mechanische Stimulation ein Wachstumsreiz gesetzt werden kann. (Mann 2006).

Da es keine standardisierten Protokolle gibt und die aktuelle Datenlage für mechanische Kompression im Bereich des Knochen Tissue Engineerings gering ist, wurden Ergebnisse anderer Stimulationsprotokolle und Zelllinien zusammengetragen und so auf die eigenen Anforderungen übertragen (Rath 2008; Ng 2009; Sittichokechaiwut 2009; Damaraju 2014). In den verfügbaren Studien wurden unterschiedliche Druckbelastungen durchgeführt, wobei häufig eine sinusförmige Kompression mit einer Frequenz von 1 Hertz zur Anwendung kam (Sittichokechaiwut 2009; Rumney 2012; Damaraju 2014).

Dies entspricht in etwa der menschlichen Schrittfrequenz beim gemütlichen Spaziergehen. Kompressionstiefen werden meist zwischen 5 % (Sittichokechaiwut 2010; Damaraju 2014) und 10 % (Ng 2009; Thomopoulos 2011) angegeben. Während Stimulationszyklen wechseln sich in der Regel Stimulations- und Pausephasen ab (Mann 2006; Sittichokechaiwut 2009). Sehr heterogene Ergebnisse ergab die Literaturrecherche zur Dauer von Stimulations- sowie Pausephasen, wobei keine klare Empfehlung herausgearbeitet werden konnte. Einerseits finden sich Stimulationsprotokolle von täglicher Stimulation von vier Stunden mit nachfolgend 16 Stunden Pause (Damaraju 2014) bis hin zu zwei Stunden Stimulation an Versuchstag 5, 10 und 15 (Sittichokechaiwut 2009). Diskutiert werden kann hier sicherlich eine physiologische Belastung der humanen Osteoblasten des Menschen in einem gewissen Tag/Nacht-Rhythmus und Stimulationsprotokollen mit regelmäßigen Zeitspannen. Da in dieser Arbeit die mechanische Stimulation in 3D-Scaffolds eingeführt werden sollte und als Pilot-Projekt zu verstehen ist, soll das verwendete Versuchsprotokoll als Referenz für unsere Projektreihe dienen und kann im Anschluss nach Etablierung variiert und angepasst werden.

Darüber hinaus muss in diesem Sinne auch die Stimulation der humanen Osteoblasten durch Flüssigkeitsströmungen beachtet werden, da die Niere kontinuierlich mit osteogenem Medium 2 perfundiert wurde (Delaine-Smith 2015). In Studien konnten Unterschiede der Proliferation von Osteoblasten bei unidirektionaler, pulsatiler oder oszillierender Perfusion im 3D-Scaffold beobachtet werden (Bancroft 2002; Jaasma 2008; Du 2009). Im Rahmen dieser Arbeit spielt dies für die Osteoblasten sicherlich eine Rolle, jedoch wird dieses Verfahren in allen Versuchen unserer Forschungsgruppe angewendet. Somit wird lediglich der Unterschied zur mechanischen Kompression untersucht. In diesem Rahmen ist nicht zu entschlüsseln, welchen Einfluss Flüssigkeitsbewegungen haben. Darüber hinaus kann die Niere in verschiedene Kompartimente aufgeteilt werden: in das Tubulussystem sowie das arteriovenöse System. Als Verbindungsstelle wird im Bereich der Glomeruli das Blut filtriert. Da man die Osteoblasten in das Ureter-System injiziert und die Perfusion über das arteriovenöse System stattfindet, ist somit der mechanische Stress durch Perfusion unklar.

5.4 Medienwechsel

Aufgrund der kontinuierlichen Perfusion der Niere und Osteoblasten ist im Rahmen einer Langzeitkultur die regelmäßige Erneuerung des osteogenen Mediums 2 erforderlich. Es werden dabei neue Nährstoffe zugefügt und verbrauchte Nährstoffe und Abfallprodukte entfernt.

Um dem menschlichen Blutfluss und pH-Wert zu imitieren, wurde in unseren Versuchen das oben beschriebene DMEM-Medium samt Zusätzen mit einem pH-Wert von 7,4

verwendet. Dabei lassen sich Änderungen des pH-Wertes des Kulturmediums optisch durch einen Farbumschlag erkennen. So ist dem verwendeten DMEM-Medium samt Zusatzstoffen Phenolrot als pH-Indikator zugesetzt, welcher bei einem pH-Wert von 7,4 rot ist (Pan-Biotech 2016). Bei steigendem pH-Wert wird das Medium pink bis violett, bei sinkendem pH-Wert findet ein Farbwechsel von orange zu gelb statt. In Studien konnte bisher gezeigt werden, dass es bei sauren pH-Werten eher zu einer Osteoklasten-Stimulierung und Autophagie von Osteoblasten kommt (Arnett 2008; Zhang 2017). Dementsprechend scheint ein alkalisches Milieu physiologischere Umgebungsbedingungen für Osteoblasten darzustellen und so ein besseres Wachstum zu ermöglichen (Galow 2017). Mit einem funktionierendem CO₂-System sollte der pH-Wert in einem Bioreaktor jedoch kein Problem darstellen.

Da das System und der Versuch keimfrei durchgeführt werden soll, ist auch eine regelmäßige Erneuerung des im Medium enthaltenen Primocins sinnvoll. Dabei hat sich in eigenen Versuchen und nach Angaben des Herstellers (Fa. Invivo Gen, USA) gezeigt, dass es sinnvoll ist, das Medium alle drei Tage zu erneuern.

5.5 Rezellularisierung und Langzeitkultur

Eines der größten Probleme des Tissue Engineerings ist die Versorgung der Zellen mit Nährstoffen und Sauerstoff sowie der Abtransport von Stoffwechselendprodukten. Hier spielt die Vaskularisation eine entscheidende Rolle, da die Versorgung der Zellen von der Durchblutung abhängig ist und letztendlich über Diffusion stattfindet (Ko 2007; Phelps 2009). Für eine erfolgreiche Rezellularisierung und Langzeitkultur ist also ein optimales Scaffold mit kleinem Diffusionsabstand zur Lösung dieses Problems zwingend erforderlich. In diversen Studien konnten so Organe dezellularisiert und als Scaffold für eine Rezellularisierung zur Generierung des ursprünglichen Organs genutzt werden (Jagodzinski 2004; Ott 2008; Bader 2010; Ott 2010; Petersen 2010; Uygun 2010). Trotz vielversprechender Ergebnisse nach Rezellularisierung, auch in den eigenen Versuchen, sind weiterhin Versuche notwendig, die eine Reendothelialisierung des Gefäßsystems ermöglichen und somit bei Co-Kulturen mit Osteoblasten eine verbesserte Sauerstoff- und Nährstoffversorgung erreichen können.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Idee von Burgkart et al. (Burgkart 2014; Schmitt 2017) weiter verfolgt werden, in der ein universell einsetzbares Bioscaffold generiert wird, um dieses im Rahmen des Knochen Tissue Engineering mit humanen Osteoblasten zu besiedeln und in einer Langzeitkultur mechanisch zu stimulieren. Durch Versuche unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass eine Rezellularisierung mit xenogenen, humanen Osteoblasten über die Arterie zu einem Perfusionsproblem und somit Beeinträchtigung einer Langzeitkultur führt. Nach Rezellularisierung über den

Ureter konnte diese Problematik behoben und auch erfolgreich histologische Nachweise erbracht werden.

Eine bekannte Problematik im Bereich des Tissue Engineering ist die Apoptose von rezellularisierten Zellen im Rahmen einer Langzeitkultur. Dabei scheint es nach einer Besiedelung zunächst zu einer Proliferation und zum Teil auch Differenzierung zu kommen, jedoch im Verlauf auch zu einer begleitenden Apoptose. Diesbezüglich scheint die mechanische Stimulation einen sinnvollen Reiz zur Verhinderung der Apoptose darzustellen. (Mann 2006)

Aktuell werden in unserer Versuchsreihe ausschließlich humane Osteoblasten verwendet. Das Zusammenspiel und die Interaktion im Knochen ist jedoch nicht nur abhängig von Osteoblasten, sondern unter anderem auch von Osteoklasten und Osteozyten, die als Mechanosensoren im Rahmen der mechanischen Stimulation sowie im Um- und Abbau des Knochens eine entscheidende Rolle einnehmen (Aarden 1994; Mann 2006; Rubin 2006). Diesbezüglich müssen in Zukunft weitere Versuche folgen, die Co-Kulturen und Zellvorgänge bei mechanischer Stimulation in biologischen Scaffolds erforschen.

Da in dieser Arbeit das Hauptaugenmerk auf der technischen und praktischen Durchführbarkeit der mechanischen Stimulation lag, erfolgt keine weitere Diskussion und Aufarbeitung der histologisch gewonnenen Ergebnisse der stimulierten Nieren. Hierbei waren die Ergebnisse zu heterogen bei zu kleiner Fallzahl und aufgrund der Kontaminationsproblematik konnte keine einheitlichen und fest definierten Zeiträume stimuliert werden.

Weiterhin unklar bleibt bei Rezellularisierung über den Ureter, wie viele Zellen letztlich durch die Injektion in der Niere adhären konnten und deren Verteilung. Dies ist einerseits von der Anzahl der injizierten Zellen, dem Volumen des resuspendierten Zellpellets und andererseits dem Druck der Injektion abhängig. Darüber hinaus spielt in diesem Sinne die Anatomie der Niere eine Rolle. Voraussetzung ist dabei logischerweise die korrekte Lage der Braunüle im Ureter, welche schon bei der Präparation vor der Dezellularisierung überprüft und sichergestellt werden muss, da eine spätere Korrektur kaum möglich ist.

5.6 Lösungsansätze

Anschließend werden die Ergebnisse zur Problemlösung diskutiert und mögliche Verbesserungsvorschläge getroffen.

5.6.1 Problematik Niere

Die Ergebnisse bei Präparation der Nieren zeigt eine Variabilität der Arteriae renales mit diversen Normvarianten. Dabei wird eine frühe Aufteilung der Arteria renalis meist erst

bei präziser Präparation der Nieren zur Vorbereitung des Versuches sichtbar. Nichtsdestotrotz ist während der Entnahme der Niere aus den Ratten, der Präparation der Nieren sowie des vollständigen Dezellularisierungs- und Rezellularisierungsprozesses vorsichtiges Arbeiten notwendig, um das Parenchym der Niere nicht zu beschädigen. Ebenso ist bei Entnahme der Niere und bei Präparation der Niere darauf zu achten, möglichst lange Ureteren (mindestens drei Zentimeter) zu erhalten, um eine spätere einfachere Sondierung zu ermöglichen. Da sich eine fehlerhafte oder inadäquate Positionierung der Braunüle spätestens bei Rezellularisierung zeigte, können Fehler hier direkt erkannt und behoben werden, sodass kein Systemfehler vorliegt.

5.6.2 Problematik Schlauchsystem

Zur Vorbeugung von Rissen im Schlauchsystem der Rollerpumpe ist hier eine regelmäßige Kontrolle und ein frühzeitiger Wechsel sinnvoll. Die Schlauchsysteme der Firma Arthrex sind für arthroskopische Operationen als Tagesschlauch produziert und eine mehrtägige Nutzung entspricht nicht der Zweckbestimmung (Arthrex 2020). Im Rahmen dieser Arbeit werden die Schlauchsysteme jedoch kontinuierlich für mehrere Tage genutzt. Bei Austritt des Mediums aufgrund eines Risses ist hier binnen Sekunden Luft im Schlauchsystem, die Niere wird damit perfundiert und das Parenchym zerstört. Auf eine sichere Verbindung der Schlauchenden zum Inkubator ist zu achten, um einer Diskonnektion vorzubeugen. Somit sollte eine tägliche Kontrolle des Schlauchsystems stattfinden und dieses frühzeitig gewechselt werden. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte das meist nach ca. fünf Tagen.

5.6.3 Problematik Kontamination

Das größte Problem während der Implementierung der mechanischen Stimulation stellt die Kontamination mit Pilzen dar. Während des ganzen Versuches ist sauberes und keimfreies Arbeiten zwingend notwendig.

Systematisch konnten durch Versuchsreihen folgende Quellen als Ursache der Kontamination ausgeschlossen werden: Niere, Osteoblasten, Kulturmedium, Autoklav, DecellControl-Einheit, Wärmeschrank, CO₂-Controller und Miniaturinkubator. Bei Inkubation der 3D-Druckhalterungen kam es erneut zu einer Kontamination mit Pilzmyzele, welche somit als Kontaminationsquelle identifiziert werden konnte. Nach Ersetzen der Nierenhalterung durch eine Edelstahlhalterung konnten die anschließenden Versuche ohne erneute Kontamination durchgeführt werden. Einschränkend konnte im Rahmen dieser Versuchsreihe die Stempereinheit aufgrund der komplexen Konstruktion und des Gewichtes nicht durch Edelstahl ersetzt werden und ist Bestandteil weiterer Optimierungen. Durch die Verwendung von sterilen

Ultraschallhüllen wurde versucht, den Miniaturinkubator komplett abzudichten. Von einer Sterilität des Schlauchsystems, der Drei-Wege-Hähne sowie den Heidelberger-Leitungen ist bei entsprechenden Kennzeichnungen auf der Verpackung als Medizinprodukt auszugehen.

Da die 3D-Druckhalterungen als Prototyp aus CPE gefertigt wurden, sind diese nicht autoklavierbar und wurde durch eine chemische Sterilisation mittels Fermacidal D2 in Nassantiseptik sterilisiert (Gilbert 2005). Fermacidal D2 ist dabei laut Herstellerangaben bakterizid, fungizid und begrenzt viruzid (IC-Products-SA 2020). Da während der Herstellung der Prototypen kleine Poren und Risse bestehen bleiben, besteht so die Möglichkeit, dass sich Mikroorganismen in diesen Prototypen festsetzen, ohne, dass diese durch Fermacidal D2 und die Nassantiseptik-Methode abgetötet werden können. So kann auch erklärt werden, dass es im Verlauf wiederholt zur Kontamination mit Pilzen kam, diese jedoch zu Beginn der Versuchsreihe noch nicht vorhanden waren. Im Vergleich zur Nassantiseptik mit beispielweise einem quartäre Ammonium-Verbindungskomplex, wie Fermacidal, ist die Dampfsterilisation mittels Autoklav überlegen (Rutala 1999; Panta 2019).

Ferner konnte in der Langzeitkultur beobachtet werden, dass sich meist nach Tag 5 Pilzmyzele makroskopisch zeigten. Dabei wurden Primocin sowie Amphotericin B als Hemmstoffe für Mikroorganismen verwendet. Amphotericin B wurde als reines Antimykotikum verwendet. Primocin selbst ist nach Herstellerangaben wirksam gegen Bakterien, Mykoplasmen sowie Pilze und sollte alle drei bis vier Tage erneuert werden (Fa. Invivo Gen, USA).

Je nach Spezies beschreiben die Wachstumskurven von Pilzen unterschiedliche Phasen und können in eine Verzögerungs-, Beschleunigungs-, Exponential-, Verlangsamungs- und abschließend eine Plateauphase eingeteilt werden. Je nach Spezies variiert dabei der Beginn und die Dauer der jeweiligen Phase. Bei verschiedenen Pilzspezies beginnt die Exponentialphase nach ca. ein bis drei Tagen mit zeitversetzter Bildung von makroskopisch sichtbarem Schimmel. (Meletiadis 2001; Moore 2020)

Eine hypothetische Überlegung als Begründung der verspäteten Ausfällung in unseren Versuchen stützt sich dabei auf die oben genannten Wachstumskurven von Pilzen sowie die Pufferkapazität von Primocin/Amphotericin B. Da davon ausgegangen werden muss, dass es direkt zu Beginn des Versuches zu einer Kontamination mit Pilzen durch die 3D-Druckhalterung kommt, scheint dabei im Rahmen der Langzeitkultur die Pufferkapazität von Primocin sowie Amphotericin B überstiegen worden zu sein und folglich kam es zu einer Vermehrung und Ausbreitung des Pilzes. Auch ein zeitiger Wechsel des Mediums mit Erneuerung der Antimykotika konnte dies nur hinauszögern, jedoch nicht verhindern, da die Pilzlast zu diesem Zeitpunkt schon deutlich erhöht sein muss. Im Rahmen dieser

Arbeit konnte aufgrund der Komplexität des Versuchsansatzes und anschließender histologischer Auswertung nicht evaluiert werden, wann eine mikroskopisch nachweisbare Kontamination mit Pilzhyphen und die Vermehrung stattfand.

Mit geringer Wahrscheinlichkeit können auch Keime in den Miniaturinkubator über die Öffnungen sowie die Ringabdichtung des Deckels gelangen. Da der Miniaturinkubator kein 100 %-dichtes System, auch aufgrund des Gasaustausches und des Druckausgleiches darstellt, die Möglichkeit für Keimeintritt jedoch gering sind, scheint der Miniaturinkubator inklusive der Verbindungen als Quelle der Kontamination als sehr unwahrscheinlich. Voraussetzung für Miniaturinkubatoren ist generell, dass diese bei mehrmaliger Verwendung sterilisierbar sein müssen oder sterilisierte Einwegmaterialien verwendet werden. (Plunkett 2011)

5.6.4 Problematik Perfusion

Als mögliche Erklärung für die Perfusionsproblematik kommen unterschiedliche Theorien in Frage, welche nicht vollends geklärt werden können. In früheren Versuchen unserer Arbeitsgruppen wurde die Rezellularisierung zunächst über das arterielle System durchgeführt. Dabei zeigten sich Thrombosierungen in den Arterien mit Perfusionsminderung. Als Lösung wurde die Rezellularisierung der Niere über das Uretersystem durchgeführt, wodurch die Perfusion konstant gehalten wurde. Die adäquate Rezellularisierung konnte ebenfalls histologisch nachgewiesen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit stellten sich erneut Perfusionsprobleme ein. Als Ursache scheint hier eine Perfusionsminderung durch Emboli im arteriellen System ausgelöst durch die Kontamination mit Pilzen wahrscheinlich. Dabei liegt der Verdacht nahe, dass ausgefällte Proteine oder Mineralien bzw. Bestandteile der Pilzmyzele über den Perfusionskreislauf in die Niere gespült worden und so zu einer mechanischen Verlegung des arteriellen Systems geführt haben. Da dies ausschließlich eine Problematik bei Versuchen mit Kontamination durch Pilze war, scheint hier kein Systemfehler vorzuliegen.

5.7 Limitationen

Obwohl die Ergebnisse dieser Arbeit ermutigend sind und als Grundlage für weitere Forschungsprojekte dienen, weisen sie jedoch einige Limitationen auf.

Es ist bei der Rezellularisierung nicht abschließend geklärt, wie viele der injizierten Zellen adhären können und wie die Verteilung in der Niere ist. Unklar ist ebenso, wie sich nach Rezellularisierung in der Langzeitkultur die Perfusion der Niere darstellt und ob alle injizierten Zellen in der Nähe von perfundierten Kapillaren adhären können. Dabei ist ebenso ungewiss, ob eine Adhäsionszeit von vier Stunden als optimale Zeitspanne ausreichend ist. So kann durch den komplexen und langwierigen

Versuchsaufbau und die Versuchsvorbereitung immer erst nach histologischer Aufarbeitung ein Ergebnis analysiert werden. Durch die Anatomie der Niere und die Versuchsdurchführung scheint hierbei eine große Variabilität vorhanden zu sein.

Aufgrund der Kontaminationsproblematik konnten noch keine Aussagen über Proliferations- und Differenzierungsverhalten der Zellen bzw. der Nierenstruktur nach mechanischer Stimulation getroffen werden. Hierzu werden weitere Versuchsreihen unter optimierten Vorkehrungen zur Vermeidung von Kontamination folgen.

5.8 Schlussfolgerung und Ausblick

Tissue Engineering im Bereich der Medizin ist ein Forschungsfeld mit sehr großem Potential und so ist es nicht verwunderlich, dass viele Arbeitsgruppen sich diesem Thema widmen. Dabei ist aktuell im Bereich der Orthopädie in der Behandlung von Knorpeldefekten die autologe Chondrozyten-Transplantation in der klinischen Anwendung. Dabei werden Knorpel-Knochen-Zylinder des Patienten in einer ersten Operation entnommen und nach Aufarbeitung und Züchtung von Knorpelzellen im Labor in einer zweiten Operation reimplantiert. Dies ist in manchen Ländern zum Teil als einzige zellbasierte Knorpeltherapie zugelassen. (Davies 2019)

In anderen Bereichen der Medizin konnten durch weitere Forschung und Entwicklung Bader et al. (Bader 2010) im Jahr 2010 die weltweit erste vollständige gewebegestützte Organtransplantation einer Trachea am Menschen mit gutem postoperativen Outcome durchführen (Berthiaume 2011).

Eines der größten Probleme des Tissue Engineerings ist dabei weiterhin die fehlende Vaskularisation und damit einhergehend die eingeschränkte Diffusion von Nährstoffen und Sauerstoff sowie der Abtransport von Abfallprodukten (Ko 2007; Phelps 2009). So konnte jedoch durch das Konzept der Nutzung von dezellularisierten Organen und Rezellularisierung eine Möglichkeit zur Lösung dieses Probleme gefunden werden.

In Bezug auf das Knochen Tissue Engineering ist weitere Forschung nötig und sinnvoll, um die Veränderung des Wachstums von Knochenzellen bei mechanischer Belastung zu untersuchen und die Prozesse der Mechanotransduktion besser zu verstehen. Hierbei ist die Co-Kultur mit Osteoklasten und Osteoblasten/Osteozyten zur möglichst physiologischen Abbildung des humanen Knochens sicher vielversprechend. So ist der Einfluss verschiedener Stimulationsprogramme, Kraft- und Druckverteilungen und auch die Verwendung von Zellen von verschiedenen Patienten zu eruieren. Dabei ist die Verwendung von Kraftsensoren sicherlich hilfreich und kann so zusätzliche Informationen und Anpassungsoptionen liefern. Mit diesem Versuchsansatz kann das seit vielen Jahren geltende Wolffsche Gesetz, dass Knochenstrukturen sich an dessen Belastung anpassen, wissenschaftlich genauer untersucht werden (Wolff 1892).

6 Zusammenfassung

Da die Prozesse und Signalumwandlungen der Mechanotransduktion weiterhin nicht vollständig erschlossen und Gegenstand aktueller Forschung sind, ist es im Bereich des Tissue Engineerings essentiell, möglichst physiologische Bedingungen bei experimentellen Versuchen zu schaffen. Um dies im Bereich des Knochen Tissue Engineerings näher untersuchen zu können, wurde in unserer Arbeitsgruppe ein etabliertes und zeiteffektives Verfahren entwickelt, um biologische Scaffolds als Grundlage des Tissue Engineerings zu schaffen (Burgkart 2014; Schmitt 2017).

In Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe wurden Verfahren zur xenogenen Rezellularisierung der Bioscaffolds mit humanen Osteoblasten auf technische Durchführbarkeit und Immunogenität überprüft und der Dezellularisierungs- und Rezellularisierungsprozess optimiert.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte mit Etablierung einer automatisierten Dezellularisierungseinheit eine erfolgreiche und zeiteffektive Methode zur Dezellularisierung muriner Nieren erreicht werden. Dabei zeigt sich vor allem eine technische gute und einfache Lösung, um biologische Scaffolds zu generieren, die als Grundlage für die Rezellularisierung dienen. Mit dem DecellControl können mehrere Nieren gleichzeitig dezellularisiert werden, um so die Quantität der Versuche zu erhöhen. Darüber hinaus können nachfolgende Schritte während der automatisierten Dezellularisierung vorbereitet werden, was die Versuchsdurchführung zeiteffektiver gestaltet. So konnte das Setup als Vorbereitung für die mechanische Stimulation angepasst werden und erlaubt durch entsprechende Modifikationen im Aufbau ebenso eine Langzeitkultur von mindestens zwei Nieren im Miniaturinkubator.

Um nachfolgend die rezellularisierten Biomatrices mechanisch stimulieren zu können, konnte ein neu entwickeltes Stimulationsgerät zur mechanischen Stimulation während der Experimente erfolgreich implementiert und angepasst werden. Darüber hinaus konnten erhebliche Verbesserungen des Tissue Squeezers im Hinblick auf die Kontaminationsgefahr erreicht werden. So wurde eine Langzeitkultur mit Stimulation über vier Wochen durchgeführt und dient nun als Basis für zukünftige Untersuchungen verschiedener Co-Kulturen und Stimulationsprotokolle.

7 Abstract

Introduction: As processes and signal transductions of mechanotransduction continue to be the subject of current research, it is essential in the field of tissue engineering to create conditions that are as physiological as possible during experimental trials. In order to be able to investigate this more closely in the field of bone tissue engineering, an established and time-effective procedure was developed in our research group to create biological scaffolds as a basis for tissue engineering. Furthermore, procedures for non-species-specific recellularization of bioscaffolds with human osteoblasts could be tested for technical feasibility and immunogenicity and the decellularization and recellularization process could be optimized. The aim of this study was to implement an automated decellularization system (DecellControl) and to demonstrate adequate acellularity while preserving the extracellular matrix (ECM). Furthermore, this work was intended to introduce mechanical stimulation of the bioscaffold in the context of long-term culture.

Methods: Rat kidneys were decellularized using a combination of physical and chemical methods in the automated DecellControl unit. To verify for complete acellularity, kidneys were analyzed qualitatively by HE staining as well as DAPI staining and quantitatively by DNeasy Blood&Tissue Kit (Qiagen Company) for residual DNA. The designed tissue squeezer was integrated into the setup of the bioreactor used and prepared for long-term cultures.

Results: Qualitative and quantitative control of acellularity showed complete decellularization without visible cell nuclei and DNA concentration. Furthermore, histological examinations continued to show the preservation of laminin, fibronectin as well as collagen type IV as signs of preserved ECM. After contamination issues were addressed, the Tissue Squeezer was successfully installed in the bioreactor and long-term culture was performed for 28 days.

Conclusion: The automated DecellControl unit and the Tissue Squeezer were successfully implemented. The decellularized kidneys showed complete acellularity with preserved ECM. A long-term culture with mechanical stimulation over four weeks could be performed and now provides a basis for further investigation of different co-cultures and stimulation protocols.

8 Literaturverzeichnis

- Aamodt, Joseph M. und Grainger, David W. 2016. 'Extracellular matrix-based biomaterial scaffolds and the host response', *Biomaterials*, 86: 68-82.
- Aarden, E. M., Burger, E. H. und Nijweide, P. J. 1994. 'Function of osteocytes in bone', *J Cell Biochem*, 55: 287-99.
- Agarwal, R. und García, A. J. 2015. 'Biomaterial strategies for engineering implants for enhanced osseointegration and bone repair', *Adv Drug Deliv Rev*, 94: 53-62.
- Ajubi, N. E., Klein-Nulend, J., Alblas, M. J., Burger, E. H. und Nijweide, P. J. 1999. 'Signal transduction pathways involved in fluid flow-induced PGE2 production by cultured osteocytes', *Am J Physiol*, 276: E171-8.
- Arnett, T. R. 2008. 'Extracellular pH regulates bone cell function', *J Nutr*, 138: 415s-18s.
- Arthrex. 2020. 'Produktbeschreibung und Hinweise zu Pumpenschlauchsystem AR-6420'.
- Atala, A. 2004. 'Tissue engineering and regenerative medicine: concepts for clinical application', *Rejuvenation Res*, 7: 15-31.
- Bader, A. und Macchiarini, P. 2010. 'Moving towards in situ tracheal regeneration: the bionic tissue engineered transplantation approach', *J Cell Mol Med*, 14: 1877-89.
- Badylak, S. F. 2004. 'Xenogenic extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction', *Transpl Immunol*, 12: 367-77.
- Badylak, S. F. 2007. 'The extracellular matrix as a biologic scaffold material', *Biomaterials*, 28: 3587-93.
- Badylak, S. F., Taylor, D. und Uygun, K. 2011. 'Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds', *Annu Rev Biomed Eng*, 13: 27-53.
- Bakhshandeh, B., Zarrintaj, P., Oftadeh, M. O., Keramati, F., Fouladiha, H., Sohrabi-Jahromi, S. und Ziraksaz, Z. 2017. 'Tissue engineering; strategies, tissues, and biomaterials', *Biotechnol Genet Eng Rev*, 33: 144-72.
- Bancroft, G. N., Sikavitsas, V. I., van den Dolder, J., Sheffield, T. L., Ambrose, C. G., Jansen, J. A. und Mikos, A. G. 2002. 'Fluid flow increases mineralized matrix deposition in 3D perfusion culture of marrow stromal osteoblasts in a dose-dependent manner', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 12600-5.
- Banes, A. J., Gilbert, J., Taylor, D. und Monbureau, O. 1985. 'A new vacuum-operated stress-providing instrument that applies static or variable duration cyclic tension or compression to cells in vitro', *J Cell Sci*, 75: 35-42.
- Baptista, P. M., Orlando, G., Mirmalek-Sani, S. H., Siddiqui, M., Atala, A. und Soker, S. 2009. 'Whole organ decellularization - a tool for bioscaffold fabrication and organ bioengineering', *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 2009: 6526-9.
- Barnard, K. und Gathercole, L. J. 1991. 'Short and long range order in basement membrane type IV collagen revealed by enzymic and chemical extraction', *Int J Biol Macromol*, 13: 359-65.
- Berthiaume, F., Maguire, T. J. und Yarmush, M. L. 2011. 'Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress, and challenges', *Annu Rev Chem Biomol Eng*, 2: 403-30.
- Bissell, M. J. und Aggeler, J. 1987. 'Dynamic reciprocity: how do extracellular matrix and hormones direct gene expression?', *Prog Clin Biol Res*, 249: 251-62.
- Bolland, F., Korossis, S., Wilshaw, S. P., Ingham, E., Fisher, J., Kearney, J. N. und Southgate, J. 2007. 'Development and characterisation of a full-thickness acellular porcine bladder matrix for tissue engineering', *Biomaterials*, 28: 1061-70.
- Bonandrini, Barbara, Figliuzzi, Marina, Papadimou, Evangelia, Morigi, Marina, Perico, Norberto, Casiraghi, Federica, Dipl, Chemistry, Sangalli, Fabio, Conti, Sara, Benigni, Ariela, Remuzzi, Andrea und Remuzzi, Giuseppe. 2014. 'Recellularization of well-preserved acellular kidney scaffold using embryonic stem cells', *Tissue engineering. Part A*, 20: 1486-98.

- Bonassar, L. J. und Vacanti, C. A. 1998. 'Tissue engineering: the first decade and beyond', *J Cell Biochem Suppl*, 30-31: 297-303.
- Bonewald, L. F. 1999. 'Regulation and regulatory activities of transforming growth factor beta', *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 9: 33-44.
- Brown, B. N., Freund, J. M., Han, L., Rubin, J. P., Reing, J. E., Jeffries, E. M., Wolf, M. T., Tottey, S., Barnes, C. A., Ratner, B. D. und Badylak, S. F. 2011. 'Comparison of three methods for the derivation of a biologic scaffold composed of adipose tissue extracellular matrix', *Tissue Eng Part C Methods*, 17: 411-21.
- Burgkart, R., Tron, A., Prodinger, P., Culmes, M., Tuebel, J., van Griensven, M., Saldamli, B. und Schmitt, A. 2014. 'Decellularized kidney matrix for perfused bone engineering', *Tissue Eng Part C Methods*, 20: 553-61.
- Bye, F. J., Wang, L., Bullock, A. J., Blackwood, K. A., Ryan, A. J. und MacNeil, S. 2012. 'Postproduction processing of electrospun fibres for tissue engineering', *J Vis Exp*.
- Byrne, E. M., Farrell, E., McMahon, L. A., Haugh, M. G., O'Brien, F. J., Campbell, V. A., Prendergast, P. J. und O'Connell, B. C. 2008. 'Gene expression by marrow stromal cells in a porous collagen-glycosaminoglycan scaffold is affected by pore size and mechanical stimulation', *J Mater Sci Mater Med*, 19: 3455-63.
- Cartmell, J. S. und Dunn, M. G. 2000. 'Effect of chemical treatments on tendon cellularity and mechanical properties', *J Biomed Mater Res*, 49: 134-40.
- Cebotari, S., Tudorache, I., Jaekel, T., Hilfiker, A., Dorfman, S., Ternes, W., Haverich, A. und Lichtenberg, A. 2010. 'Detergent decellularization of heart valves for tissue engineering: toxicological effects of residual detergents on human endothelial cells', *Artif Organs*, 34: 206-10.
- Cheng, N. C., Estes, B. T., Awad, H. A. und Guilak, F. 2009. 'Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells by a porous scaffold derived from native articular cartilage extracellular matrix', *Tissue Eng Part A*, 15: 231-41.
- Choi, S. H., Chun, S. Y., Chae, S. Y., Kim, J. R., Oh, S. H., Chung, S. K., Lee, J. H., Song, P. H., Choi, G. S., Kim, T. H. und Kwon, T. G. 2015. 'Development of a porcine renal extracellular matrix scaffold as a platform for kidney regeneration', *J Biomed Mater Res A*, 103: 1391-403.
- Ciampi, Osele, Bonandrini, Barbara, Derosas, Manuela, Conti, Sara, Rizzo, Paola, Benedetti, Valentina, Figliuzzi, Marina, Remuzzi, Andrea, Benigni, Ariela, Remuzzi, Giuseppe und Tomasoni, Susanna. 2019. 'Engineering the vasculature of decellularized rat kidney scaffolds using human induced pluripotent stem cell-derived endothelial cells', *Scientific Reports*, 9: 8001.
- Cole, M. B., Jr. 1984. 'Alteration of cartilage matrix morphology with histological processing', *J Microsc*, 133: 129-40.
- Cortiella, J., Niles, J., Cantu, A., Brettler, A., Pham, A., Vargas, G., Winston, S., Wang, J., Walls, S. und Nichols, J. E. 2010. 'Influence of acellular natural lung matrix on murine embryonic stem cell differentiation and tissue formation', *Tissue Eng Part A*, 16: 2565-80.
- Crapo, P. M., Gilbert, T. W. und Badylak, S. F. 2011. 'An overview of tissue and whole organ decellularization processes', *Biomaterials*, 32: 3233-43.
- Damaraju, S., Matyas, J. R., Rancourt, D. E. und Duncan, N. A. 2014. 'The effect of mechanical stimulation on mineralization in differentiating osteoblasts in collagen-I scaffolds', *Tissue Eng Part A*, 20: 3142-53.
- Davies, Rebecca L. und Kuiper, Nicola J. 2019. 'Regenerative Medicine: A Review of the Evolution of Autologous Chondrocyte Implantation (ACI) Therapy', *Bioengineering (Basel, Switzerland)*, 6: 22.
- De Pieri, Andrea, Rochev, Yury und Zeugolis, Dimitrios I. 2021. 'Scaffold-free cell-based tissue engineering therapies: advances, shortfalls and forecast', *npj Regenerative Medicine*, 6: 18.

- Deeken, C. R., White, A. K., Bachman, S. L., Ramshaw, B. J., Cleveland, D. S., Loy, T. S. und Grant, S. A. 2011. 'Method of preparing a decellularized porcine tendon using tributyl phosphate', *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 96: 199-206.
- Delaine-Smith, R. M., MacNeil, S. und Reilly, G. C. 2012. 'Matrix production and collagen structure are enhanced in two types of osteogenic progenitor cells by a simple fluid shear stress stimulus', *Eur Cell Mater*, 24: 162-74.
- Delaine-Smith, R.M., Javaheri, B., Helen Edwards, J., Vazquez, M. und Rumney, R. M. 2015. 'Preclinical models for in vitro mechanical loading of bone-derived cells', *Bonekey Rep*, 4: 728.
- Destefani, A. C., Sirtoli, G. M. und Nogueira, B. V. 2017. 'Advances in the Knowledge about Kidney Decellularization and Repopulation', *Front Bioeng Biotechnol*, 5: 34.
- Dong, X., Wei, X., Yi, W., Gu, C., Kang, X., Liu, Y., Li, Q. und Yi, D. 2009. 'RGD-modified acellular bovine pericardium as a bioprosthetic scaffold for tissue engineering', *J Mater Sci Mater Med*, 20: 2327-36.
- Du, D., Furukawa, K. S. und Ushida, T. 2009. '3D culture of osteoblast-like cells by unidirectional or oscillatory flow for bone tissue engineering', *Biotechnol Bioeng*, 102: 1670-8.
- Dumas, V., Perrier, A., Malaval, L., Laroche, N., Guignandon, A., Vico, L. und Rattner, A. 2009. 'The effect of dual frequency cyclic compression on matrix deposition by osteoblast-like cells grown in 3D scaffolds and on modulation of VEGF variant expression', *Biomaterials*, 30: 3279-88.
- Duncan, R. L. und Turner, C. H. 1995. 'Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain', *Calcif Tissue Int*, 57: 344-58.
- Earthman, J. C., Li, Y., VanSchoiack, L. R., Sheets, C. G. und Wu, J. C. 2006. 'Reconstructive materials and bone tissue engineering in implant dentistry', *Dent Clin North Am*, 50: 229-44, ix.
- El-Amin, S. F., Botchwey, E., Tuli, R., Kofron, M. D., Mesfin, A., Sethuraman, S., Tuan, R. S. und Laurencin, C. T. 2006. 'Human osteoblast cells: isolation, characterization, and growth on polymers for musculoskeletal tissue engineering', *J Biomed Mater Res A*, 76: 439-49.
- Elder, B. D., Kim, D. H. und Athanasiou, K. A. 2010. 'Developing an articular cartilage decellularization process toward facet joint cartilage replacement', *Neurosurgery*, 66: 722-7; discussion 27.
- Entwistle, J., Zhang, S., Yang, B., Wong, C., Li, Q., Hall, C. L., A, J., Mowat, M., Greenberg, A. H. und Turley, E. A. 1995. 'Characterization of the murine gene encoding the hyaluronan receptor RHAMM', *Gene*, 163: 233-8.
- Feil, G., Christ-Adler, M., Maurer, S., Corvin, S., Rennekampff, H. O., Krug, J., Hennenlotter, J., Kuehs, U., Stenzl, A. und Sievert, K. D. 2006. 'Investigations of urothelial cells seeded on commercially available small intestine submucosa', *Eur Urol*, 50: 1330-7.
- Fillingham, Y. und Jacobs, J. 2016. 'Bone grafts and their substitutes', *Bone Joint J*, 98-b: 6-9.
- Florencio-Silva, R., Sasso, G. R., Sasso-Cerri, E., Simões, M. J. und Cerri, P. S. 2015. 'Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells', *BioMed research international*, 2015: 421746.
- Florian, K. 2019. 'Immunogenität dezellularisierter Rattennieren als Biomatrices im Tissue Engineering '.
- Flynn, L. E. 2010. 'The use of decellularized adipose tissue to provide an inductive microenvironment for the adipogenic differentiation of human adipose-derived stem cells', *Biomaterials*, 31: 4715-24.
- Freytes, D. O., Stoner, R. M. und Badylak, S. F. 2008. 'Uniaxial and biaxial properties of terminally sterilized porcine urinary bladder matrix scaffolds', *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 84: 408-14.
- Funamoto, S., Nam, K., Kimura, T., Murakoshi, A., Hashimoto, Y., Niwaya, K., Kitamura, S., Fujisato, T. und Kishida, A. 2010. 'The use of high-hydrostatic pressure treatment to decellularize blood vessels', *Biomaterials*, 31: 3590-5.

- Galea, G. L., Sunters, A., Meakin, L. B., Zaman, G., Sugiyama, T., Lanyon, L. E. und Price, J. S. 2011. 'Sost down-regulation by mechanical strain in human osteoblastic cells involves PGE2 signaling via EP4', *FEBS Lett*, 585: 2450-4.
- Galow, Anne-Marie, Rebl, Alexander, Koczan, Dirk, Bonk, Sebastian M., Baumann, Werner und Gimsa, Jan. 2017. 'Increased osteoblast viability at alkaline pH in vitro provides a new perspective on bone regeneration', *Biochemistry and biophysics reports*, 10: 17-25.
- Gelse, K., Poschl, E. und Aigner, T. 2003. 'Collagens--structure, function, and biosynthesis', *Adv Drug Deliv Rev*, 55: 1531-46.
- Gilbert, P. und Moore, L. E. 2005. 'Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet', *J Appl Microbiol*, 99: 703-15.
- Gilbert, T. W., Sellaro, T. L. und Badylak, S. F. 2006. 'Decellularization of tissues and organs', *Biomaterials*, 27: 3675-83.
- Gilbert, T. W., Wognum, S., Joyce, E. M., Freytes, D. O., Sacks, M. S. und Badylak, S. F. 2008. 'Collagen fiber alignment and biaxial mechanical behavior of porcine urinary bladder derived extracellular matrix', *Biomaterials*, 29: 4775-82.
- Gillies, A. R., Smith, L. R., Lieber, R. L. und Varghese, S. 2011. 'Method for decellularizing skeletal muscle without detergents or proteolytic enzymes', *Tissue Eng Part C Methods*, 17: 383-9.
- Gilpin, Anna und Yang, Yong. 2017. 'Decellularization Strategies for Regenerative Medicine: From Processing Techniques to Applications', *BioMed research international*, 2017: 9831534-34.
- Gleeson, John und O'Brien, Fergal. 2011. 'Composite Scaffolds for Orthopaedic Regenerative Medicine.' in.
- Gorschewsky, O., Klakow, A., Riechert, K., Pitzl, M. und Becker, R. 2005a. 'Clinical comparison of the Tutoplast allograft and autologous patellar tendon (bone-patellar tendon-bone) for the reconstruction of the anterior cruciate ligament: 2- and 6-year results', *Am J Sports Med*, 33: 1202-9.
- Gorschewsky, O., Puetz, A., Riechert, K., Klakow, A. und Becker, R. 2005b. 'Quantitative analysis of biochemical characteristics of bone-patellar tendon-bone allografts', *Biomed Mater Eng*, 15: 403-11.
- Grauss, R. W., Hazekamp, M. G., Oppenhuizen, F., van Munsteren, C. J., Gittenberger-de Groot, A. C. und DeRuiter, M. C. 2005. 'Histological evaluation of decellularised porcine aortic valves: matrix changes due to different decellularisation methods', *Eur J Cardiothorac Surg*, 27: 566-71.
- Grauss, R. W., Hazekamp, M. G., van Vliet, S., Gittenberger-de Groot, A. C. und DeRuiter, M. C. 2003. 'Decellularization of rat aortic valve allografts reduces leaflet destruction and extracellular matrix remodeling', *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 126: 2003-10.
- Griffith, L. G. und Grodzinsky, A. J. 2001. 'Advances in biomedical engineering', *Jama*, 285: 556-61.
- Gui, L., Chan, S. A., Breuer, C. K. und Niklason, L. E. 2010. 'Novel utilization of serum in tissue decellularization', *Tissue Eng Part C Methods*, 16: 173-84.
- Guo, S. Z., Ren, X. J., Wu, B. und Jiang, T. 2010. 'Preparation of the acellular scaffold of the spinal cord and the study of biocompatibility', *Spinal Cord*, 48: 576-81.
- Gupta, S. K., Mishra, N. C. und Dhasmana, A. 2018. 'Decellularization Methods for Scaffold Fabrication', *Methods Mol Biol*, 1577: 1-10.
- Hashimoto, Y., Funamoto, S., Sasaki, S., Honda, T., Hattori, S., Nam, K., Kimura, T., Mochizuki, M., Fujisato, T., Kobayashi, H. und Kishida, A. 2010. 'Preparation and characterization of decellularized cornea using high-hydrostatic pressurization for corneal tissue engineering', *Biomaterials*, 31: 3941-8.
- He, M. und Callanan, A. 2013. 'Comparison of methods for whole-organ decellularization in tissue engineering of bioartificial organs', *Tissue Eng Part B Rev*, 19: 194-208.

- He, M., Callanan, A., Lagaras, K., Steele, J. A. M. und Stevens, M. M. 2017. 'Optimization of SDS exposure on preservation of ECM characteristics in whole organ decellularization of rat kidneys', *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 105: 1352-60.
- Henderson, P. W., Nagineni, V. V., Harper, A., Bavinck, N., Sohn, A. M., Krijgh, D. D., Jimenez, N., Weinstein, A. L. und Spector, J. A. 2010. 'Development of an acellular bioengineered matrix with a dominant vascular pedicle', *J Surg Res*, 164: 1-5.
- Hodde, J. und Hiles, M. 2002. 'Virus safety of a porcine-derived medical device: evaluation of a viral inactivation method', *Biotechnol Bioeng*, 79: 211-6.
- Hodde, J., Janis, A., Ernst, D., Zopf, D., Sherman, D. und Johnson, C. 2007. 'Effects of sterilization on an extracellular matrix scaffold: part I. Composition and matrix architecture', *J Mater Sci Mater Med*, 18: 537-43.
- Hodde, J. P., Badylak, S. F., Brightman, A. O. und Voytik-Harbin, S. L. 1996. 'Glycosaminoglycan content of small intestinal submucosa: a bioscaffold for tissue replacement', *Tissue Eng*, 2: 209-17.
- Holzapfel, B. M., Rudert, M. und Hutmacher, D. W. 2017. '[Scaffold-based Bone Tissue Engineering]', *Orthopade*, 46: 701-10.
- Hopkinson, A., Shanmuganathan, V. A., Gray, T., Yeung, A. M., Lowe, J., James, D. K. und Dua, H. S. 2008. 'Optimization of amniotic membrane (AM) denuding for tissue engineering', *Tissue Eng Part C Methods*, 14: 371-81.
- Horne-Badovinac, Sally. 2014. 'Cell-cell and cell-matrix interactions', *Molecular biology of the cell*, 25: 731-31.
- Hsu, S. M., Raine, L. und Fanger, H. 1981. 'Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures', *J Histochem Cytochem*, 29: 577-80.
- Hudson, T. W., Liu, S. Y. und Schmidt, C. E. 2004. 'Engineering an improved acellular nerve graft via optimized chemical processing', *Tissue Eng*, 10: 1346-58.
- Hutmacher, D. W. 2000. 'Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage', *Biomaterials*, 21: 2529-43.
- IC-Products-SA. 2020. 'Produktbeschreibung Fermacidal D2'.
- Jaasma, M. J. und O'Brien, F. J. 2008. 'Mechanical stimulation of osteoblasts using steady and dynamic fluid flow', *Tissue Eng Part A*, 14: 1213-23.
- Jackson, D. W., Grood, E. S., Wilcox, P., Butler, D. L., Simon, T. M. und Holden, J. P. 1988. 'The effects of processing techniques on the mechanical properties of bone-anterior cruciate ligament-bone allografts. An experimental study in goats', *Am J Sports Med*, 16: 101-5.
- Jagodzinski, M., Cebotari, S., Tudorache, I., Zeichen, J., Hankermeier, S., Krettek, C., van Griensven, M. und Mertisching, H. 2004. '[Tissue engineering of long bones with a vascular matrix in a bioreactor]', *Orthopade*, 33: 1394-400.
- Jain, R. K., Au, P., Tam, J., Duda, D. G. und Fukumura, D. 2005. 'Engineering vascularized tissue', *Nat Biotechnol*, 23: 821-3.
- Jamur, M. C. und Oliver, C. 2010. 'Cell fixatives for immunostaining', *Methods Mol Biol*, 588: 55-61.
- Jessop, H. L., Suswillo, R. F., Rawlinson, S. C., Zaman, G., Lee, K., Das-Gupta, V., Pitsillides, A. A. und Lanyon, L. E. 2004. 'Osteoblast-like cells from estrogen receptor alpha knockout mice have deficient responses to mechanical strain', *J Bone Miner Res*, 19: 938-46.
- Jonsson, K. B., Frost, A., Nilsson, O., Ljunghall, S. und Ljunggren, O. 1999. 'Three isolation techniques for primary culture of human osteoblast-like cells: a comparison', *Acta Orthop Scand*, 70: 365-73.
- Kagami, S., Kondo, S., Loster, K., Reutter, W., Urushihara, M., Kitamura, A., Kobayashi, S. und Kuroda, Y. 1998. 'Collagen type I modulates the platelet-derived growth factor (PDGF) regulation of the growth and expression of beta1 integrins by rat mesangial cells', *Biochem Biophys Res Commun*, 252: 728-32.
- Kapuscinski, Jan. 1995. 'DAPI: a DNA-Specific Fluorescent Probe', *Biotechnic & Histochemistry*, 70: 220-33.

- Karabekmez, F. E., Duymaz, A. und Moran, S. L. 2009. 'Early clinical outcomes with the use of decellularized nerve allograft for repair of sensory defects within the hand', *Hand (N Y)*, 4: 245-9.
- Kasimir, M. T., Rieder, E., Seebacher, G., Silberhumer, G., Wolner, E., Weigel, G. und Simon, P. 2003. 'Comparison of different decellularization procedures of porcine heart valves', *Int J Artif Organs*, 26: 421-7.
- Kawata, A. und Mikuni-Takagaki, Y. 1998. 'Mechanotransduction in stretched osteocytes--temporal expression of immediate early and other genes', *Biochem Biophys Res Commun*, 246: 404-8.
- Keane, T. J., Swinehart, I. T. und Badylak, S. F. 2015. 'Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance', *Methods*, 84: 25-34.
- Kearney, E. M., Farrell, E., Prendergast, P. J. und Campbell, V. A. 2010. 'Tensile strain as a regulator of mesenchymal stem cell osteogenesis', *Ann Biomed Eng*, 38: 1767-79.
- Kim, I. S., Song, Y. M., Lee, B. und Hwang, S. J. 2012. 'Human mesenchymal stromal cells are mechanosensitive to vibration stimuli', *J Dent Res*, 91: 1135-40.
- Kim, Y., Ko, H., Kwon, I. K. und Shin, K. 2016. 'Extracellular Matrix Revisited: Roles in Tissue Engineering', *Int Neurolog J*, 20: S23-29.
- Klein-Nulend, J., Bakker, A. D., Bacabac, R. G., Vatsa, A. und Weinbaum, S. 2013. 'Mechanosensation and transduction in osteocytes', *Bone*, 54: 182-90.
- Kleinman, H. K., Philp, D. und Hoffman, M. P. 2003. 'Role of the extracellular matrix in morphogenesis', *Curr Opin Biotechnol*, 14: 526-32.
- Ko, H. C., Milthorpe, B. K. und McFarland, C. D. 2007. 'Engineering thick tissues--the vascularisation problem', *Eur Cell Mater*, 14: 1-18; discussion 18-9.
- Krishnan, V., Shuman, L. A., Sosnoski, D. M., Dhurjati, R., Vogler, E. A. und Mastro, A. M. 2011. 'Dynamic interaction between breast cancer cells and osteoblastic tissue: comparison of two- and three-dimensional cultures', *J Cell Physiol*, 226: 2150-8.
- Lane, W. O., Jantzen, A. E., Carlon, T. A., Jamiolkowski, R. M., Grenet, J. E., Ley, M. M., Haseltine, J. M., Galinat, L. J., Lin, F. H., Allen, J. D., Truskey, G. A. und Achneck, H. E. 2012. 'Parallel-plate flow chamber and continuous flow circuit to evaluate endothelial progenitor cells under laminar flow shear stress', *J Vis Exp*.
- Langer, R. 2000. 'Biomaterials in drug delivery and tissue engineering: one laboratory's experience', *Acc Chem Res*, 33: 94-101.
- Langer, R. und Vacanti, J. P. 1993. 'Tissue engineering', *Science*, 260: 920-6.
- Lau, E., Al-Dujaili, S., Guenther, A., Liu, D., Wang, L. und You, L. 2010. 'Effect of low-magnitude, high-frequency vibration on osteocytes in the regulation of osteoclasts', *Bone*, 46: 1508-15.
- Lee, R. C. 2005. 'Cell injury by electric forces', *Ann N Y Acad Sci*, 1066: 85-91.
- Lee, R. C. und Kolodney, M. S. 1987. 'Electrical injury mechanisms: electrical breakdown of cell membranes', *Plast Reconstr Surg*, 80: 672-9.
- Lehr, E. J., Rayat, G. R., Chiu, B., Churchill, T., McGann, L. E., Coe, J. Y. und Ross, D. B. 2011. 'Decellularization reduces immunogenicity of sheep pulmonary artery vascular patches', *J Thorac Cardiovasc Surg*, 141: 1056-62.
- Li, J. J., Ebied, M., Xu, J. und Zreiqat, H. 2018. 'Current Approaches to Bone Tissue Engineering: The Interface between Biology and Engineering', *Adv Healthc Mater*, 7: e1701061.
- Liu, C. X., Liu, S. R., Xu, A. B., Kang, Y. Z., Zheng, S. B. und Li, H. L. 2009. '[Preparation of whole-kidney acellular matrix in rats by perfusion]', *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 29: 979-82.
- Liu, Huinan, Slamovich, Elliott B. und Webster, Thomas J. 2006. 'Less harmful acidic degradation of poly(lactico-glycolic acid) bone tissue engineering scaffolds through titania nanoparticle addition', *International journal of nanomedicine*, 1: 541-45.
- Lovett, M., Lee, K., Edwards, A. und Kaplan, D. L. 2009. 'Vascularization strategies for tissue engineering', *Tissue Eng Part B Rev*, 15: 353-70.

- Lumpkins, S. B., Pierre, N. und McFetridge, P. S. 2008. 'A mechanical evaluation of three decellularization methods in the design of a xenogeneic scaffold for tissue engineering the temporomandibular joint disc', *Acta Biomater*, 4: 808-16.
- Mallis, P., Oikonomidis, C., Dimou, Z., Stavropoulos-Giokas, C., Michalopoulos, E. und Katsimpoulas, M. 2021. 'Optimizing Decellularization Strategies for the Efficient Production of Whole Rat Kidney Scaffolds', *Tissue Eng Regen Med*.
- Mann, V., Huber, C., Kogianni, G., Jones, D. und Noble, B. 2006. 'The influence of mechanical stimulation on osteocyte apoptosis and bone viability in human trabecular bone', *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 6: 408-17.
- Marcacci, M., Kon, E., Moukhachev, V., Lavroukov, A., Kutepov, S., Quarto, R., Mastrogiacomo, M. und Cancedda, R. 2007. 'Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair: 6- to 7-year outcome of a pilot clinical study', *Tissue Eng*, 13: 947-55.
- McCoy, R. J. und O'Brien, F. J. 2010. 'Influence of shear stress in perfusion bioreactor cultures for the development of three-dimensional bone tissue constructs: a review', *Tissue Eng Part B Rev*, 16: 587-601.
- McGarry, J. G., Klein-Nulend, J., Mullender, M. G. und Prendergast, P. J. 2005. 'A comparison of strain and fluid shear stress in stimulating bone cell responses--a computational and experimental study', *Faseb j*, 19: 482-4.
- McPherson, T.B. und Badylak, S.F. 1998. 'Characterization of Fibronectin Derived from Porcine Small Intestinal Submucosa', *Tissue Engineering*, 4: 75-83.
- Meletiadiis, J., Meis, J. F., Mouton, J. W. und Verweij, P. E. 2001. 'Analysis of growth characteristics of filamentous fungi in different nutrient media', *Journal of clinical microbiology*, 39: 478-84.
- Meyer, S. R., Chiu, B., Churchill, T. A., Zhu, L., Lakey, J. R. und Ross, D. B. 2006. 'Comparison of aortic valve allograft decellularization techniques in the rat', *J Biomed Mater Res A*, 79: 254-62.
- Mikos, A. G., McIntire, L. V., Anderson, J. M. und Babensee, J. E. 1998. 'Host response to tissue engineered devices', *Adv Drug Deliv Rev*, 33: 111-39.
- Montoya, C. V. und McFetridge, P. S. 2009. 'Preparation of ex vivo-based biomaterials using convective flow decellularization', *Tissue Eng Part C Methods*, 15: 191-200.
- Moore, David. 2020. *21st Century Guidebook to Fungi - SECOND EDITION - Reviews and Contents*.
- Morris, H. L., Reed, C. I., Haycock, J. W. und Reilly, G. C. 2010. 'Mechanisms of fluid-flow-induced matrix production in bone tissue engineering', *Proc Inst Mech Eng H*, 224: 1509-21.
- Murphy, C. M., Haugh, M. G. und O'Brien, F. J. 2010. 'The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering', *Biomaterials*, 31: 461-6.
- Murphy, C. M., O'Brien, F. J., Little, D. G. und Schindeler, A. 2013. 'Cell-scaffold interactions in the bone tissue engineering triad', *Eur Cell Mater*, 26: 120-32.
- Nakayama, K. H., Batchelder, C. A., Lee, C. I. und Tarantal, A. F. 2010. 'Decellularized rhesus monkey kidney as a three-dimensional scaffold for renal tissue engineering', *Tissue Eng Part A*, 16: 2207-16.
- Nazari, M., Kurdi, M. und Heerklotz, H. 2012. 'Classifying surfactants with respect to their effect on lipid membrane order', *Biophys J*, 102: 498-506.
- Ng, J., Spiller, K., Bernhard, J. und Vunjak-Novakovic, G. 2017. 'Biomimetic Approaches for Bone Tissue Engineering', *Tissue Eng Part B Rev*, 23: 480-93.
- Ng, K. W., Mauck, R. L., Wang, C. C., Kelly, T. A., Ho, M. M., Chen, F. H., Ateshian, G. A. und Hung, C. T. 2009. 'Duty Cycle of Deformational Loading Influences the Growth of Engineered Articular Cartilage', *Cell Mol Bioeng*, 2: 386-94.
- O'Brien, Fergal J. 2011. 'Biomaterials & scaffolds for tissue engineering', *Materials Today*, 14: 88-95.
- Ott, H. C., Clippinger, B., Conrad, C., Schuetz, C., Pomerantseva, I., Ikonou, L., Kotton, D. und Vacanti, J. P. 2010. 'Regeneration and orthotopic transplantation of a bioartificial lung', *Nat Med*, 16: 927-33.

- Ott, H. C., Matthiesen, T. S., Goh, S. K., Black, L. D., Kren, S. M., Netoff, T. I. und Taylor, D. A. 2008. 'Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart', *Nat Med*, 14: 213-21.
- Ozeki, M., Narita, Y., Kagami, H., Ohmiya, N., Itoh, A., Hirooka, Y., Niwa, Y., Ueda, M. und Goto, H. 2006. 'Evaluation of decellularized esophagus as a scaffold for cultured esophageal epithelial cells', *J Biomed Mater Res A*, 79: 771-8.
- Pan-Biotech. 2016. 'Composition DMEM'.
- Panta, G., Richardson, A. K. und Shaw, I. C. 2019. 'Effectiveness of autoclaving in sterilizing reusable medical devices in healthcare facilities', *J Infect Dev Ctries*, 13: 858-64.
- Patel, N., Solanki, E., Picciani, R., Cavett, V., Caldwell-Busby, J. A. und Bhattacharya, S. K. 2008. 'Strategies to recover proteins from ocular tissues for proteomics', *Proteomics*, 8: 1055-70.
- Pellegata, A. F., Asnaghi, M. A., Zonta, S., Zerbini, G. und Mantero, S. 2012. 'A novel device for the automatic decellularization of biological tissues', *Int J Artif Organs*, 35: 191-8.
- Petersen, T. H., Calle, E. A., Zhao, L., Lee, E. J., Gui, L., Raredon, M. B., Gavrilov, K., Yi, T., Zhuang, Z. W., Breuer, C., Herzog, E. und Niklason, L. E. 2010. 'Tissue-engineered lungs for in vivo implantation', *Science*, 329: 538-41.
- Phelps, E. A. und Garcia, A. J. 2009. 'Update on therapeutic vascularization strategies', *Regen Med*, 4: 65-80.
- Plunkett, N. und O'Brien, F. J. 2011. 'Bioreactors in tissue engineering', *Technol Health Care*, 19: 55-69.
- Ponce, M. L., Nomizu, M., Delgado, M. C., Kuratomi, Y., Hoffman, M. P., Powell, S., Yamada, Y., Kleinman, H. K. und Malinda, K. M. 1999. 'Identification of endothelial cell binding sites on the laminin gamma 1 chain', *Circ Res*, 84: 688-94.
- Poornejad, N., Schaumann, L. B., Buckmiller, E. M., Momtahan, N., Gassman, J. R., Ma, H. H., Roeder, B. L., Reynolds, P. R. und Cook, A. D. 2016. 'The impact of decellularization agents on renal tissue extracellular matrix', *J Biomater Appl*, 31: 521-33.
- Pörtner, R., Nagel-Heyer, S., Goepfert, C., Adamietz, P. und Meenen, N. M. 2005. 'Bioreactor design for tissue engineering', *J Biosci Bioeng*, 100: 235-45.
- Prasertsung, I., Kanokpanont, S., Bunaprasert, T., Thanakit, V. und Damrongsakkul, S. 2008. 'Development of acellular dermis from porcine skin using periodic pressurized technique', *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 85: 210-9.
- Price, A. P., England, K. A., Matson, A. M., Blazar, B. R. und Panoskaltsis-Mortari, A. 2010. 'Development of a decellularized lung bioreactor system for bioengineering the lung: the matrix reloaded', *Tissue Eng Part A*, 16: 2581-91.
- Price, A. P., Godin, L. M., Domek, A., Cotter, T., D'Cunha, J., Taylor, D. A. und Panoskaltsis-Mortari, A. 2015. 'Automated decellularization of intact, human-sized lungs for tissue engineering', *Tissue Eng Part C Methods*, 21: 94-103.
- Qiagen. 2006. "DNeasy® Blood & Tissue Handbook." In, edited by Qiagen.
- Quarto, R., Mastrogiacomo, M., Cancedda, R., Kutepov, S. M., Mukhachev, V., Lavroukov, A., Kon, E. und Marcacci, M. 2001. 'Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells', *N Engl J Med*, 344: 385-6.
- Rath, Bjoern, Nam, Jin, Knobloch, Thomas J., Lannutti, John J. und Agarwal, Sudha. 2008. 'Compressive forces induce osteogenic gene expression in calvarial osteoblasts', *Journal of biomechanics*, 41: 1095-103.
- Ravichandran, A., Lim, J., Chong, M. S. K., Wen, F., Liu, Y., Pillay, Y. T., Chan, J. K. Y. und Teoh, S. H. 2017. 'In vitro cyclic compressive loads potentiate early osteogenic events in engineered bone tissue', *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 105: 2366-75.
- Reilly, G. C. und Engler, A. J. 2010. 'Intrinsic extracellular matrix properties regulate stem cell differentiation', *J Biomech*, 43: 55-62.
- Reing, J. E., Brown, B. N., Daly, K. A., Freund, J. M., Gilbert, T. W., Hsiong, S. X., Huber, A., Kullas, K. E., Tottey, S., Wolf, M. T. und Badylak, S. F. 2010. 'The effects of processing methods

- upon mechanical and biologic properties of porcine dermal extracellular matrix scaffolds', *Biomaterials*, 31: 8626-33.
- Rieder, E., Kasimir, M. T., Silberhumer, G., Seebacher, G., Wolner, E., Simon, P. und Weigel, G. 2004. 'Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells', *J Thorac Cardiovasc Surg*, 127: 399-405.
- Roberts, R., Gallagher, J., Spooncer, E., Allen, T. D., Bloomfield, F. und Dexter, T. M. 1988. 'Heparan sulphate bound growth factors: a mechanism for stromal cell mediated haemopoiesis', *Nature*, 332: 376-8.
- Roseti, L., Parisi, V., Petretta, M., Cavallo, C., Desando, G., Bartolotti, I. und Grigolo, B. 2017. 'Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives', *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 78: 1246-62.
- Ross, E. A., Williams, M. J., Hamazaki, T., Terada, N., Clapp, W. L., Adin, C., Ellison, G. W., Jorgensen, M. und Batich, C. D. 2009. 'Embryonic stem cells proliferate and differentiate when seeded into kidney scaffolds', *J Am Soc Nephrol*, 20: 2338-47.
- Ross, Edward A., Abrahamson, Dale R., St John, Patricia, Clapp, William L., Williams, Matthew J., Terada, Naohiro, Hamazaki, Takashi, Ellison, Gary W. und Batich, Christopher D. 2012. 'Mouse stem cells seeded into decellularized rat kidney scaffolds endothelialize and remodel basement membranes', *Organogenesis*, 8: 49-55.
- Rosso, F., Giordano, A., Barbarisi, M. und Barbarisi, A. 2004. 'From cell-ECM interactions to tissue engineering', *J Cell Physiol*, 199: 174-80.
- Rouwkema, J., Rivron, N. C. und van Blitterswijk, C. A. 2008. 'Vascularization in tissue engineering', *Trends Biotechnol*, 26: 434-41.
- Rubin, J., Rubin, C. und Jacobs, C. R. 2006. 'Molecular pathways mediating mechanical signaling in bone', *Gene*, 367: 1-16.
- Rumney, R. M., Sunters, A., Reilly, G. C. und Gartland, A. 2012. 'Application of multiple forms of mechanical loading to human osteoblasts reveals increased ATP release in response to fluid flow in 3D cultures and differential regulation of immediate early genes', *J Biomech*, 45: 549-54.
- Rutala, W. A. und Weber, D. J. 1999. 'Infection control: the role of disinfection and sterilization', *J Hosp Infect*, 43 Suppl: S43-55.
- Sachlos, E. und Czernuszka, J. T. 2003. 'Making tissue engineering scaffolds work. Review: the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds', *Eur Cell Mater*, 5: 29-39; discussion 39-40.
- Sandmann, G. H., Eichhorn, S., Vogt, S., Adamczyk, C., Aryee, S., Hoberg, M., Milz, S., Imhoff, A. B. und Tischer, T. 2009. 'Generation and characterization of a human acellular meniscus scaffold for tissue engineering', *J Biomed Mater Res A*, 91: 567-74.
- Sasaki, S., Funamoto, S., Hashimoto, Y., Kimura, T., Honda, T., Hattori, S., Kobayashi, H., Kishida, A. und Mochizuki, M. 2009. 'In vivo evaluation of a novel scaffold for artificial corneas prepared by using ultrahigh hydrostatic pressure to decellularize porcine corneas', *Mol Vis*, 15: 2022-8.
- Sawada, K., Terada, D., Yamaoka, T., Kitamura, S. und Fujisato, T. 2008. 'Cell removal with supercritical carbon dioxide for acellular artificial tissue', *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 83: 943-49.
- Schilling-Leiß, D., Witt, F. und Tönjes, R. R. 2014. '[Report on notifications according to section 8d of the German Transplantation Act (TPG) for the years 2009-2011]', *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 57: 111-27.
- Schmidt-Rohlfing, B., Tzioupis, C., Menzel, C. L. und Pape, H. C. 2009. 'Tissue Engineering von Knochengewebe', *Der Unfallchirurg*, 112: 785-95.
- Schmitt, A., Csiki, R., Tron, A., Saldamli, B., Tubel, J., Florian, K., Siebenlist, S., Balmayor, E. und Burgkart, R. 2017. 'Optimized protocol for whole organ decellularization', *Eur J Med Res*, 22: 31.

- Schuerlein, S., Schwarz, T., Krzimirski, S., Gatzner, S., Hoppensack, A., Schwedhelm, I., Schweinlin, M., Walles, H. und Hansmann, J. 2017. 'A versatile modular bioreactor platform for Tissue Engineering', *Biotechnol J*, 12.
- Schwarzbauer, J. 1999. 'Basement membranes: Putting up the barriers', *Curr Biol*, 9: R242-4.
- Shupe, T., Williams, M., Brown, A., Willenberg, B. und Petersen, B. E. 2010. 'Method for the decellularization of intact rat liver', *Organogenesis*, 6: 134-6.
- Sittichockechaiwut, A., Scutt, A. M., Ryan, A. J., Bonewald, L. F. und Reilly, G. C. 2009. 'Use of rapidly mineralising osteoblasts and short periods of mechanical loading to accelerate matrix maturation in 3D scaffolds', *Bone*, 44: 822-9.
- Sittichockechaiwut, A., Edwards, J. H., Scutt, A. M. und Reilly, G. C. 2010. 'Short bouts of mechanical loading are as effective as dexamethasone at inducing matrix production by human bone marrow mesenchymal stem cell', *Eur Cell Mater*, 20: 45-57.
- Song, Jeremy J., Guyette, Jacques P., Gilpin, Sarah E., Gonzalez, Gabriel, Vacanti, Joseph P. und Ott, Harald C. 2013. 'Regeneration and experimental orthotopic transplantation of a bioengineered kidney', *Nature medicine*, 19: 646-51.
- Stern, M. M., Myers, R. L., Hammam, N., Stern, K. A., Eberli, D., Kritchevsky, S. B., Soker, S. und Van Dyke, M. 2009. 'The influence of extracellular matrix derived from skeletal muscle tissue on the proliferation and differentiation of myogenic progenitor cells ex vivo', *Biomaterials*, 30: 2393-9.
- Sumanasinghe, R. D., Osborne, J. A. und Lobo, E. G. 2009. 'Mesenchymal stem cell-seeded collagen matrices for bone repair: effects of cyclic tensile strain, cell density, and media conditions on matrix contraction in vitro', *J Biomed Mater Res A*, 88: 778-86.
- Syed, O., Walters, N. J., Day, R. M., Kim, H. W. und Knowles, J. C. 2014. 'Evaluation of decellularization protocols for production of tubular small intestine submucosa scaffolds for use in oesophageal tissue engineering', *Acta Biomater*, 10: 5043-54.
- Theocharis, A. D., Skandalis, S. S., Gialeli, C. und Karamanos, N. K. 2016. 'Extracellular matrix structure', *Adv Drug Deliv Rev*, 97: 4-27.
- Thomopoulos, S., Das, R., Birman, V., Smith, L., Ku, K., Elson, E. L., Pryse, K. M., Marquez, J. P. und Genin, G. M. 2011. 'Fibrocartilage tissue engineering: the role of the stress environment on cell morphology and matrix expression', *Tissue Eng Part A*, 17: 1039-53.
- Titford, M. 2005. 'The long history of hematoxylin', *Biotech Histochem*, 80: 73-8.
- Tron, Alexandru-Cristian. 2016. 'Decellularized whole organs as vascularized bioscaffolds for bone tissue engineering'.
- Tudorache, I., Cebotari, S., Sturz, G., Kirsch, L., Hurschler, C., Hilfiker, A., Haverich, A. und Lichtenberg, A. 2007. 'Tissue engineering of heart valves: biomechanical and morphological properties of decellularized heart valves', *J Heart Valve Dis*, 16: 567-73; discussion 74.
- Uygun, B. E., Soto-Gutierrez, A., Yagi, H., Izamis, M. L., Guzzardi, M. A., Shulman, C., Milwid, J., Kobayashi, N., Tilles, A., Berthiaume, F., Hertl, M., Nahmias, Y., Yarmush, M. L. und Uygun, K. 2010. 'Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix', *Nat Med*, 16: 814-20.
- Uzer, G., Manske, S. L., Chan, M. E., Chiang, F. P., Rubin, C. T., Frame, M. D. und Judex, S. 2012. 'Separating Fluid Shear Stress from Acceleration during Vibrations in Vitro: Identification of Mechanical Signals Modulating the Cellular Response', *Cell Mol Bioeng*, 5: 266-76.
- Vacanti, C. A. 2006. 'History of tissue engineering and a glimpse into its future', *Tissue Eng*, 12: 1137-42.
- van der Rest, M. und Garrone, R. 1991. 'Collagen family of proteins', *Faseb j*, 5: 2814-23.
- Vance, J., Galley, S., Liu, D. F. und Donahue, S. W. 2005. 'Mechanical stimulation of MC3T3 osteoblastic cells in a bone tissue-engineering bioreactor enhances prostaglandin E2 release', *Tissue Eng*, 11: 1832-9.
- Vazquez, M., Evans, B. A., Riccardi, D., Evans, S. L., Ralphs, J. R., Dillingham, C. M. und Mason, D. J. 2014. 'A new method to investigate how mechanical loading of osteocytes controls osteoblasts', *Front Endocrinol (Lausanne)*, 5: 208.

- Wainwright, J. M., Czajka, C. A., Patel, U. B., Freytes, D. O., Tobita, K., Gilbert, T. W. und Badylak, S. F. 2010. 'Preparation of cardiac extracellular matrix from an intact porcine heart', *Tissue Eng Part C Methods*, 16: 525-32.
- Walles, T., Herden, T., Haverich, A. und Mertsching, H. 2003. 'Influence of scaffold thickness and scaffold composition on bioartificial graft survival', *Biomaterials*, 24: 1233-9.
- Wang, T., Gardiner, B. S., Lin, Z., Rubenson, J., Kirk, T. B., Wang, A., Xu, J., Smith, D. W., Lloyd, D. G. und Zheng, M. H. 2013. 'Bioreactor design for tendon/ligament engineering', *Tissue Eng Part B Rev*, 19: 133-46.
- Werb, Z., Vu, T. H., Rinkenberger, J. L. und Coussens, L. M. 1999. 'Matrix-degrading proteases and angiogenesis during development and tumor formation', *Apmis*, 107: 11-8.
- Wiesmann, H. P., Joos, U. und Meyer, U. 2004. 'Biological and biophysical principles in extracorporeal bone tissue engineering. Part II', *Int J Oral Maxillofac Surg*, 33: 523-30.
- Wittekind, D. 2003. 'Traditional staining for routine diagnostic pathology including the role of tannic acid. 1. Value and limitations of the hematoxylin-eosin stain', *Biotechnic & Histochemistry*, 78: 261-70.
- Wolff, J. 1892. *Das Gesetz der Transformation der Knochen* (Berlin).
- Woods, T. und Gratzer, P. F. 2005. 'Effectiveness of three extraction techniques in the development of a decellularized bone-anterior cruciate ligament-bone graft', *Biomaterials*, 26: 7339-49.
- Xu, C. C., Chan, R. W. und Tirunagari, N. 2007. 'A biodegradable, acellular xenogeneic scaffold for regeneration of the vocal fold lamina propria', *Tissue Eng*, 13: 551-66.
- Xu, H., Wan, H., Sandor, M., Qi, S., Ervin, F., Harper, J. R., Silverman, R. P. und McQuillan, D. J. 2008. 'Host response to human acellular dermal matrix transplantation in a primate model of abdominal wall repair', *Tissue Eng Part A*, 14: 2009-19.
- Yang, B., Zhang, Y., Zhou, L., Sun, Z., Zheng, J., Chen, Y. und Dai, Y. 2010. 'Development of a porcine bladder acellular matrix with well-preserved extracellular bioactive factors for tissue engineering', *Tissue Eng Part C Methods*, 16: 1201-11.
- Yang, M., Chen, C. Z., Wang, X. N., Zhu, Y. B. und Gu, Y. J. 2009. 'Favorable effects of the detergent and enzyme extraction method for preparing decellularized bovine pericardium scaffold for tissue engineered heart valves', *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 91: 354-61.
- Yoshimoto, H., Shin, Y. M., Terai, H. und Vacanti, J. P. 2003. 'A biodegradable nanofiber scaffold by electrospinning and its potential for bone tissue engineering', *Biomaterials*, 24: 2077-82.
- Zaman, G., Pitsillides, A. A., Rawlinson, S. C., Suswillo, R. F., Mosley, J. R., Cheng, M. Z., Platts, L. A., Hukkanen, M., Polak, J. M. und Lanyon, L. E. 1999. 'Mechanical strain stimulates nitric oxide production by rapid activation of endothelial nitric oxide synthase in osteocytes', *J Bone Miner Res*, 14: 1123-31.
- Zhang, Z., Lai, Q., Li, Y., Xu, C., Tang, X., Ci, J., Sun, S., Xu, B. und Li, Y. 2017. 'Acidic pH environment induces autophagy in osteoblasts', *Sci Rep*, 7: 46161.
- Zhou, X., Liu, D., You, L. und Wang, L. 2010. 'Quantifying fluid shear stress in a rocking culture dish', *J Biomech*, 43: 1598-602.
- Zhou, Y., Guan, X., Zhu, Z., Gao, S., Zhang, C., Li, C., Zhou, K., Hou, W. und Yu, H. 2011. 'Osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells on bone-derived scaffolds: effect of microvibration and role of ERK1/2 activation', *Eur Cell Mater*, 22: 12-25.
- Zvarova, B., Uhl, F. E., Uriarte, J. J., Borg, Z. D., Coffey, A. L., Bonenfant, N. R., Weiss, D. J. und Wagner, D. E. 2016. 'Residual Detergent Detection Method for Nondestructive Cytocompatibility Evaluation of Decellularized Whole Lung Scaffolds', *Tissue Eng Part C Methods*, 22: 418-28.

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen Personen bedanken, die mich während dieser Dissertation begleitet und in der Anfertigung unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Rainer Hanns Hermann Burgkart, für die Ermöglichung und Betreuung meiner Dissertation. Er stand mir stets mit zahlreichen Anregungen und Hilfestellungen zur Seite, um dieses Projekt auch in schwierigen Situationen weiter voran zu bringen.

Darüber hinaus danke ich meinem Mentor, Herrn PD Dr. med. Andreas Schmitt, der mir jederzeit auf fachlicher und persönlicher Ebene mit Rat und Tat zur Seite stand und mich auch in schwierigen Phasen stets unterstützt und motiviert hat.

Einen entscheidenden Anteil an der Durchführung dieses experimentellen Projektes hatte das Team der Labore für Biomechanik und Tissue Engineering der Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie (Klinikum rechts der Isar). Insbesondere bedanke ich mich bei Jutta Tübel und Carmen Marthen für die Einführung in das wissenschaftliche und korrekte Arbeiten in einem Labor sowie die Anleitungen zur Durchführungen der Versuche. Ebenso gilt mein Dank Carina Micheler und Peter Föhr, die dieses Projekt von technischer Seite unterstützt haben und mir diverse Hilfestellungen zur technischen Durchführbarkeit geben konnten.

Zudem bedanke ich mich bei meinem restlichen Laborteam mit Johannes Sauter, Alexander Otto, Philipp Knöckel und Kira Florian für die Zusammenarbeit während dieses Projektes und den stetigen Austausch zu etwaigen Fortschritten. Des Weiteren danke ich Fiona Charitou für Ratschläge und Tipps zur formalen und inhaltlichen Fertigstellung dieser Dissertation. Ebenso freue ich mich, dass sie dieses spannende Projekt weiterführen wird.

Ganz besonders muss ich mich bei meiner Familie für die stetige Unterstützung und Motivation zur Fertigstellung dieser Arbeit bedanken. Insbesondere danke ich meiner Mutter und meinem Bruder Tom für die konstruktive Kritik bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Schließlich bedanke ich mich bei meiner Ehefrau, die mir stets den Rücken frei hält, um Zeit für dieses Projekt (und weitere Projekte) und die Fertigstellung der Dissertation zu haben. Darüber hinaus ist ihre Geduld und Ruhe, auch in schwierigen Phasen dieser Arbeit und dieses Lebensabschnittes, bewundernswert.

Danken möchte ich auch meiner Tochter Marie, die mir während der schriftlichen Fertigstellung dieser Dissertation, entweder auf meinem Bauch liegend oder im Kindersitz neben mir, stets Gesellschaft leistete.