



Klinikum rechts der Isar

Experimentelle Unfallchirurgie  
(apl. Prof. Dr. Martijn van Griensven)

&

Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie  
(Prof. Dr. Peter Biberthaler)



Technische Universität München

# **Immunogenität dezellularisierter Rattennieren als Biomatrices im Tissue Engineering**

Kira Katharina Florian

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der  
Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen  
Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Martijn van Griensven
2. Prof. Dr. Dr. h.c. Uwe Heemann

Die Dissertation wurde am 20.02.2019 bei der Fakultät für Medizin der  
Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am  
14.08.2019 angenommen.

# I Inhaltsverzeichnis

I Inhaltsverzeichnis .....	I
II Abbildungsverzeichnis .....	III
III Tabellenverzeichnis .....	IV
IV Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Regenerative Medizin und Tissue Engineering .....	1
1.2 Tissue Engineering im Bereich der Orthopädie und Unfallchirurgie .....	2
1.3 Scaffolds im Tissue Engineering .....	3
1.3.1 Eigenschaften eines idealen Scaffolds im Tissue Engineering von Knochengewebe .....	4
1.3.2 Biologische Scaffolds.....	5
1.4 Sauerstoff- und Nährstoffversorgung des Gewebes im Tissue Engineering .....	12
1.4.1 Lösungsansätze zur Verbesserung der Sauerstoff- und Nährstoffversorgung im Tissue Engineering .....	12
1.4.2 Benutzen ganzer Organe mit vorhandenem Gefäßsystem .....	14
1.5 Immunreaktion im Tissue Engineering .....	15
1.5.1 Immunreaktion bei xenogener Organtransplantation .....	16
1.5.2 Anwendung xenogener EZM-Scaffolds im Tissue Engineering .....	16
1.5.3 Immunreaktion auf xenogene EZM-Scaffolds im Tissue Engineering..	17
2 Hintergrund und Zielsetzung der Arbeit .....	19
3 Material und Methoden .....	20
3.1 Material .....	20
3.1.1 Geräte.....	20
3.1.2 Verbrauchsmaterialien .....	21
3.1.3 Chemikalien .....	22
3.1.4 Zellkulturmedien, Puffer und Zusätze .....	23
3.1.5 Zusammensetzung der Zellkulturmedien und Puffer.....	24
3.1.6 Perfusionslösungen zur Dezellularisierung .....	26
3.1.7 Färbelösungen .....	26

3.1.8	ELISA-Sets .....	27
3.1.9	Software.....	28
3.2	Methoden .....	29
3.2.1	Isolation von humanen mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) .....	29
3.2.2	Isolation von primären humanen Osteoblasten.....	29
3.2.3	Isolation von Rattenosteoblasten .....	30
3.2.4	Zellkultur .....	30
3.2.5	Gewinnung der Rattennieren .....	32
3.2.6	Dezellularisierung .....	33
3.2.7	Untersuchung der Immunantwort auf die Bioscaffolds.....	34
3.2.8	Evaluierung der Viabilität und Funktionalität der Osteoblasten.....	35
3.2.9	Statistik .....	39
4	Ergebnisse.....	40
4.1	Feststellung der Dezellularisierung anhand der makroskopischen Erscheinung .....	40
4.2	Immunogenität der Bioscaffolds .....	40
4.2.1	TNF- $\alpha$ .....	40
4.2.2	Interleukin-10 .....	42
4.3	Einfluss der Bioscaffolds auf die Proliferation und Funktion differenzierter Zellen eines anderen Gewebetyps .....	44
4.3.1	Messung der Zellzahl und -viabilität mittels Alamar Blue Assay .....	44
4.3.2	Evaluierung der Zellviabilität mittels Hoechst- und Calcein AM-Fluoreszenzfärbung.....	47
4.3.3	Funktionsnachweis der Rattenosteoblasten .....	48
4.4	Einfluss der Bioscaffolds auf die Proliferation und Funktion differenzierter Zellen einer anderen Spezies.....	51
4.4.1	Messung der Zellzahl und -viabilität mittels Alamar Blue Assay.....	52
4.4.2	Evaluierung der Zellviabilität mittels Hoechst- und Calcein AM-Fluoreszenzfärbung.....	54
4.4.4	Funktionsnachweis der humanen Osteoblasten .....	55
5	Diskussion .....	59

5.1	Dezellularisierung ganzer Organe.....	59
5.2	Immunogenität der Bioscaffolds aus dezellularisierten Rattennieren.....	62
5.3	Einfluss der Bioscaffolds auf die Proliferation und Funktion differenzierter Zellen eines anderen Gewebetyps und einer anderen Spezies .....	66
5.4	Konklusion.....	70
5.5	Limitationen und Ausblick.....	71
6	Zusammenfassung.....	72
7	Literatur .....	74
8	Abstract .....	85
9	Selbstständigkeitserklärung.....	86
10	Danksagung .....	87

## II Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Modell des Diamond-Konzeptes für die Regeneration von Knochengewebe .....	3
Abb. 2:	Schematisches Diagramm der Dezellularisierung ganzer Organe und ihrer klinischen Anwendungen.....	15
Abb. 3:	Dezellularisierung einer Rattenniere. ....	40
Abb. 4:	Relative TNF- $\alpha$ Konzentration normiert auf hPBMCs + LPS.....	41
Abb. 5:	Relative TNF- $\alpha$ Konzentration dezellularisierte Rattennieren normiert auf hPBMCs + LPS .....	42
Abb. 6:	Relative IL-10 Konzentration normiert auf hPBMCs + LPS .....	43
Abb. 7:	Relative IL-10 Konzentration dezellularisierte Rattennieren normiert auf hPBMCs + LPS .....	44
Abb. 8:	Alamar Blue Assay Rattenosteoblasten .....	45
Abb. 9:	Alamar Blue Assay Rattenosteoblasten und dezellularisierte Rattennieren 0,66% SDS.....	46
Abb. 10:	Alamar Blue Assay Rattenosteoblasten und dezellularisierte Rattennieren 3% SDS.....	46
Abb. 11:	Alamar Blue Assay Rattenosteoblasten und dez. Rattennieren Tag 14.....	47
Abb. 12:	Calcein AM- und Hoechst-Färbung Rattenosteoblasten und dezellularisierte Rattenniere.....	48

Abb. 13: Alkalische Phosphatase-Aktivität (AP-Aktivität) Rattenosteoblasten und dezellularisierte Rattennieren.....	49
Abb. 14: Alkalische Phosphatase-Aktivität (AP-Aktivität) Rattenosteoblasten und dezellularisierte Rattennieren Tag 14.....	50
Abb. 15: Alkalische Phosphatase-Färbung (AP-Färbung) Rattenosteoblasten und dezellularisierte Rattenniere.....	51
Abb. 16: Alamar Blue Assay humane Osteoblasten .....	52
Abb. 17: Alamar Blue Assay humane Osteoblasten und dezellularisierte Rattennieren 3% SDS .....	53
Abb. 18: Alamar Blue Assay humane Osteoblasten und dezellularisierte Rattennieren 0,66% SDS .....	53
Abb. 19: Alamar Blue Assay humane Osteoblasten und Rattennieren Tag 14 .....	54
Abb. 20: Calcein AM- und Hoechst-Färbung humane Osteoblasten und dezellularisierte Rattenniere.....	55
Abb. 21: Alkalische Phosphatase-Aktivität (AP-Aktivität) humane Osteoblasten und dezellularisierte Rattennieren.....	56
Abb. 22: Alkalische Phosphatase-Aktivität (AP-Aktivität) humane Osteoblasten und dezellularisierte Rattennieren Tag 14.....	57
Abb. 23: Alkalische Phosphatase-Färbung (AP-Färbung) humane Osteoblasten und dezellularisierte Rattenniere.....	58

### III Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Geräte .....	21
Tab. 2: Verbrauchsmaterialien .....	22
Tab. 3: Chemikalien .....	23
Tab. 4: Zellkulturmedien, Puffer und Zusätze.....	24
Tab. 5: Zusammensetzung der Zellkulturmedien und Puffer.....	25
Tab. 6: Perfusionslösungen zur Dezellularisierung .....	26
Tab. 7: Färbelösungen .....	27
Tab. 8: ELISA Sets und Lösungen .....	28
Tab. 9: Software .....	28
Tab. 10: Dezellularisierungsprotokoll .....	34

## IV Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Beschreibung</b>
$\alpha$ -MEM	Minimum Essential Medium Eagle Alpha Modification
Abb.	Abbildung
AP	Alkalische Phosphatase
BSA	Bovines Serumalbumin
BMP	bone morphogenic protein (knochenmorphogenetisches Protein)
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA (DNS)	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
ddH <sub>2</sub> O	Doppelt destilliertes Wasser
(D)PBS	(Dulbecco's) Phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EZM	Extrazellulärmatrix
FBS (FKS)	Fetal bovine serum (Fetales Kälberserum)
FGF	Fibroblast Growth Factor (Fibroblasten Wachstumsfaktor)
GAGs	Glykosaminoglykane
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
IL-10	Interleukin-10
KI	Konfidenzintervall
LSM	Lymphozyten-Separationsmedium
LPS	Lipopolysaccharid
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
NaOH	Natriumhydroxid
NTIRE	Non-thermal irreversible electroporation
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
(h)PBMC	(human) Peripheral blood mononuclear cell ((humane) Mononukleäre Zelle des peripheren Blutes)
PAA	Peracetic acid (Peressigsäure)
RT	Raumtemperatur

SDS	Sodium dodecyl Sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SEM	standard error of the mean (Standardfehler)
SIS-ECM	small intestinal submucosa extracellular matrix (EZM-Scaffold aus Schweinedünndarmmukosa)
Tab.	Tabelle
TEP	Totalendoprothese
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor (Transformierender Wachstumsfaktor)
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	ultraviolett
WHO	World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)

# 1 Einleitung

## 1.1 Regenerative Medizin und Tissue Engineering

Erkrankungen, Verletzungen und Traumata können Gewebe des menschlichen Körpers schädigen und zu einer Degeneration führen. Je nach Ausmaß der entstandenen Defekte ist eine Reparatur, ein Ersatz oder die Regeneration des Gewebes erforderlich. Üblicherweise werden zur Defektüberbrückung und -rekonstruktion Gewebe autolog oder allogene transplantiert. Vor allem bei der Gewinnung von Autografts ist man jedoch aufgrund anatomischer Limitationen und einer nicht unerheblichen Morbidität im Spenderbereich durch Infektionen, Hämatome und persistierende Schmerzen eingeschränkt. Allografts sind durch die begrenzte Verfügbarkeit, die Gefahr einer Infektionsübertragung, sowie aufgrund einer Transplantatabstoßung durch den Empfänger ebenfalls nur bedingt verwendbar (Langer 2000, Atala 2004).

Auch aufgrund der altersdemographischen Entwicklung, sowie der größer werdenden Erwartungen der Patienten und der sich folglich immer komplexer darstellenden klinischen Situationen sind neue verlässliche Regenerationsstrategien notwendig (Black, Goriainov et al. 2015). Einen Lösungsansatz bietet das Tissue Engineering, dessen Zielsetzung die Regeneration des geschädigten Gewebes durch Entwicklung und Transplantation biologischer Ersatzgewebe ist.

Obwohl das Gebiet des Tissue Engineerings ein relativ neues Gebiet der Forschung darstellt, ist die Idee fehlendes oder krankes Gewebe zu ersetzen schon im 16. Jahrhundert dokumentiert worden. Gasparo Tagliacozzi (1546-99), Professor der Chirurgie und Anatomie der Universität Bologna, beschrieb in seiner 1597 publizierten Arbeit *De Custorum Chirurgia per Insitionem* bereits eine Nasenrekonstruktion mittels Unterarmklappen (O'Brien 2011).

Heute ist das Fachgebiet der regenerativen Medizin und des Tissue Engineerings multidisziplinär und macht die Zusammenarbeit von Experten aus der klinischen Medizin und unterschiedlichsten Disziplinen des Ingenieurwesens und der Naturwissenschaften notwendig (O'Brien 2011).

## 1.2 Tissue Engineering im Bereich der Orthopädie und Unfallchirurgie

Speziell auf dem Gebiet der Orthopädie und Unfallchirurgie sind die Zielgewebe der regenerativen Medizin Knochen und Knorpel, aber auch Bänder, Sehnen, Menisci, Bandscheiben, Muskeln, Nerven und Fettgewebe (Muschler, Nakamoto et al. 2004). Der Schwerpunkt der folgenden Arbeit liegt auf dem Bereich der Knochenregeneration. Knochengewebe als dynamisches und gut vaskularisiertes Gewebe unterliegt ein Leben lang einem Umbauprozess, sodass Läsionen wie Frakturen gerade bei jüngeren Patienten ohne größere Interventionen heilen können. Trotzdem treten beispielsweise aufgrund von ausgedehnten Tumorresektionen, Infekten oder Pseudarthrosen große Defekte auf, die eine chirurgische Intervention erforderlich machen.

Die Knochendefekte können als kritisch angesehen werden, wenn ihre Länge, abhängig von dem betroffenen Skelettabschnitt, eine bestimmte Größe überschreitet: 3 cm für den Unterarm, 5 cm für Femur und Tibia und 6 cm für den Humerus (Calori, Mazza et al. 2011). Neben bekannten Techniken wie Kallusdistraction, Autografts, Arthrodesen oder Endoprothesen kann hier die Anwendung von biotechnologischen Therapien nützlich sein.

Als Voraussetzung für die Regeneration von Knochengewebe sind primär drei Grundelemente notwendig: i) ein strukturelles Gerüst (Scaffold/Matrix), ii) Zellen und iii) chemische (z.B. durch Wachstumsfaktoren) oder alternativ mechanische Stimulation. Die Kombination dieser drei Elemente wird als das trianguläre Konzept des Tissue Engineerings bezeichnet (Martin, Wendt et al. 2004, Soucacos, Johnson et al. 2008, O'Brien 2011). Dieses trianguläre Konzept ist im Rahmen des Diamond-Konzeptes durch den Faktor der mechanischen Umgebung erweitert worden (Giannoudis, Einhorn et al. 2007).

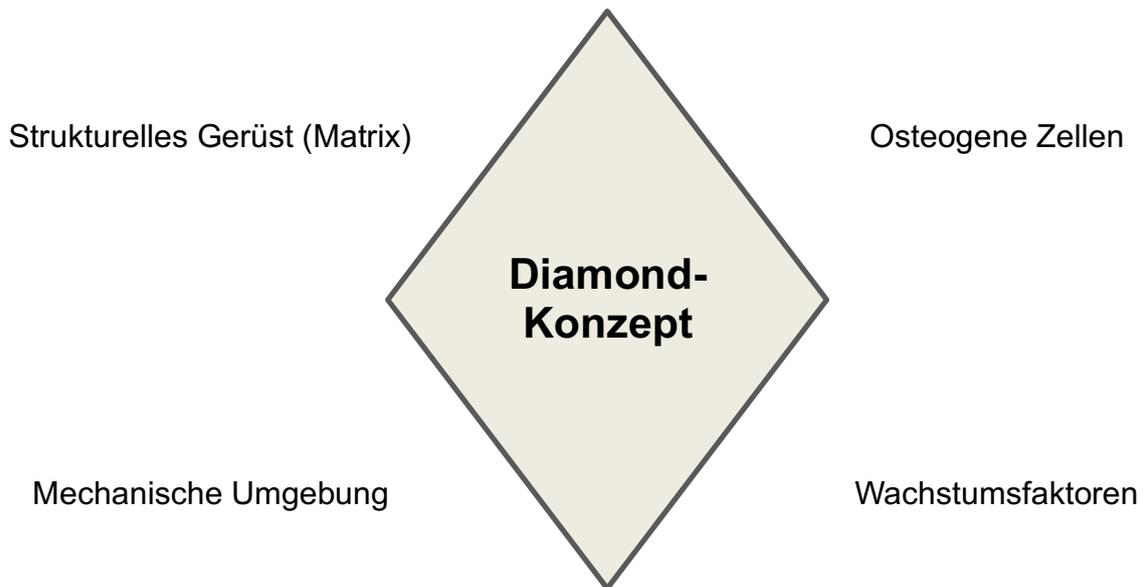


Abb. 1: Modell des Diamond-Konzeptes für die Regeneration von Knochengewebe modifiziert nach (Giannoudis, Einhorn et al. 2007)

### 1.3 Scaffolds im Tissue Engineering

Als obligater Bestandteil des Tissue Engineerings spielen dreidimensionale Scaffolds eine entscheidende Rolle. Ihre Aufgabe ist es, eine gewebespezifische Umgebung zu schaffen (Kneser, Schaefer et al. 2002), die eine Adhäsion, Proliferation und Differenzierung von Stamm- und Progenitorzellen ermöglicht und fördert (Langer and Vacanti 1993, Laurencin, Ambrosio et al. 1999, Hutmacher 2000). Idealerweise dienen die Scaffolds zudem der Vaskularisierung des Neugewebes (Deporter, Komori et al. 1988, Murata, Huang et al. 1999).

Als Materialien für Scaffolds zur Züchtung von Knochengewebe werden biologische Polymere (z.B. Kollagen, Hyaluron, Fibrin), synthetische Polymere (wasserunlösliche Polymere, verschiedene Kopolymere, synthetische gel-ähnliche Polymere), Matrices auf Mineralbasis (z.B. Trikalziumphosphat, Hydroxyapatit, Kalziumsulfat), Metalle (z.B. Titan, Tantal), Allografts oder Kombinationen aus mehreren Materialien verwendet (Griffith and Grodzinsky 2001).

Unabhängig von dem Design und den verwendeten Materialien finden azelluläre Scaffolds oder Matrices, die zuvor mit Zellen des Patienten besät wurden, Verwendung (Lichte, Pape et al. 2011).

### **1.3.1 Eigenschaften eines idealen Scaffolds im Tissue Engineering von Knochengewebe**

Um die oben genannten Aufgaben erfüllen zu können, sollte ein ideales Scaffold für das Tissue Engineering von (Knochen-) Gewebe neben der dreidimensionalen Struktur folgende Eigenschaften besitzen:

- Als vorrangiges Kriterium muss das Scaffold biokompatibel sein. Sowohl die Zelladhäsion (Osteokonduktion) als auch die Zellaktivität (Osteoinduktion) und die Integration in das umgebende Knochengewebe (Osseointegration) sollten angeregt werden (Stevens 2008, Lichte, Pape et al. 2011, O'Brien 2011). Die Implantation des Scaffolds darf keine erhebliche Immunreaktion zur Folge haben, da diese eine Kompromittierung der Heilung bis hin zur Abstoßung des Transplantates zur Folge haben kann (O'Brien 2011).
- Scaffolds im Tissue Engineering sind nicht als permanente Implantate vorgesehen und sollen den körpereigenen Zellen im Verlauf ermöglichen, ihre eigene Extrazellulärmatrix zu produzieren und das implantierte Konstrukt zu ersetzen. Hierzu müssen Scaffolds biologisch abbaubar sein (Babensee, Anderson et al. 1998). Die Resorptionskinetik des Scaffolds sollte der Knochenreparaturrate ähnlich sein, um einen optimalen Transfer der Last auf den neu gebildeten Knochen zu gewährleisten und ein „stress-shielding“ zu verhindern. Sowohl die Abbau- als auch die Nebenprodukte dürfen nicht zelltoxisch sein und sollten schnell aus dem Körper ausgeschieden werden (Lichte, Pape et al. 2011).
- Wichtig sind zudem mechanische Eigenschaften, die vergleichbar mit nativem Knochengewebe sind. Die mechanische Integrität sollte von der Implantation bis zum Abschluss des Remodeling-Prozesses gegeben sein (Hutmacher 2000). Problematisch kann hierbei die Balance zwischen ausreichender mechanischer Stabilität und der für die Vaskularisierung erforderlichen porösen Struktur sein. Die Architektur des Scaffolds muss grundsätzlich eine vernetzte Porenstruktur enthalten, die das Eindringen von Zellen, die adäquate Diffusion von Nährstoffen und Sauerstoff und den Abtransport der Abbauprodukte erlaubt (O'Brien 2011).
- Des Weiteren muss das Scaffold eine Sterilisation nach dem erforderlichen internationalen Standard tolerieren.

- Optimaler Weise sollte das Scaffold je nach Größe und Form des Knochendefekts patientenindividualisiert hergestellt werden können und in ausreichender Menge kostengünstig verfügbar sein (Griffith and Grodzinsky 2001).

### **1.3.2 Biologische Scaffolds**

Für dreidimensionale Scaffolds für die Knochenregeneration stehen vorrangig drei verschiedene Materialgruppen zur Verfügung: Keramik, synthetische Polymere und biologische Polymere (O'Brien 2011). Im Hinblick auf die in den Experimenten dieser Dissertation verwendeten Materialien beschränken sich die folgenden Ausführungen auf die biologischen Scaffolds.

Biologische Materialien wie Kollagen, verschiedene Proteoglykane, Trägermaterialien auf Alginatbasis und Chitosan wurden bereits in der Produktion von Scaffolds eingesetzt. Sie sind biologisch aktiv und gewährleisten eine sehr gute Zelladhäsion und ein exzellentes Zellwachstum. Als biologisch abbaubare Materialien ermöglichen sie den Wirtszellen die Produktion einer eigenen Extrazellulärmatrix (O'Brien 2011). Sie sind jedoch aufgrund ihrer schwachen mechanischen Eigenschaften zur Regeneration lasttragender Gewebe weniger geeignet. Eine Herausforderung stellt zudem die Herstellung von homogenen und reproduzierbaren Scaffolds aus biologischem Material dar (Stevens 2008, O'Brien 2011).

#### **1.3.2.1 Die Extrazellulärmatrix als Bioscaffold**

Biologische Scaffolds aus der natürlich vorkommenden Extrazellulärmatrix (EZM) haben aufgrund ihrer bioinduktiven Eigenschaften in letzter Zeit zunehmend an Beachtung gewonnen (Badylak 2007). Die EZM wird durch die für ein bestimmtes Gewebe charakteristischen Zellen gebildet. Die Zusammensetzung und Mikrostruktur unterscheidet sich deshalb in Abhängigkeit der beherbergten Zellart, um die idealen chemischen und mechanischen Anforderungen des jeweiligen Gewebetyps zu erfüllen. Die EZM steht in einem dynamischen Gleichgewicht mit ihrer Mikroumgebung (Bissell and Aggeler 1987). Einflussfaktoren auf die EZM sind neben den ansässigen Zellen die mechanische Belastung, das biochemische Milieu, die Sauerstoffversorgung, der pH-Wert und die inhärenten Genexpressionsmuster.

Umgekehrt beeinflusst die EZM ebenfalls die ansässigen Zellen und fungiert als Informationsstraße oder Medium zwischen den Zellen (Bissell, Hall et al. 1982, Ingber 1991, Boudreau, Myers et al. 1995).

Das Ziel bei der Herstellung eines EZM-Scaffolds ist es, die Bestandteile und dreidimensionale Struktur, und damit die Funktionalität der natürlichen Matrix, weitgehend zu bewahren. Bereits in der klinischen Anwendung befinden sich EZM-Scaffolds aus Teilen der Dermis, des Perikards oder der Dünndarmmukosa (Badylak 2007).

### **1.3.2.2 Zusammensetzung der Extrazellulärmatrix**

Die wichtigsten Bestandteile der Extrazellulärmatrix konnten bereits beschrieben werden, wobei die komplexe dreidimensionale Organisation der strukturellen und funktionellen Moleküle derzeit noch nicht vollständig charakterisiert ist (Badylak 2007).

Das am häufigsten vorkommende Protein in der Extrazellulärmatrix ist Kollagen. Es macht über 90% des Trockengewichts der EZM der meisten Organe oder Gewebe aus (van der Rest and Garrone 1991). Unter den Kollagenen ist der Typ I als wesentliches Strukturprotein ubiquitär vorhanden und bietet die notwendige mechanische Festigkeit, um uni- und multiaxialen Belastungen standzuhalten (Badylak 2004). Andere Kollagene enthält die EZM in wesentlich geringerer Menge und unterschiedlicher Zusammensetzung in Abhängigkeit der gewebespezifischen mechanischen und physikalischen Eigenschaften. Beispielsweise findet sich Kollagen Typ III vor allem im Bereich der Submukosa der Harnblase, die eine gewisse Flexibilität benötigt. Kollagen vom Typ VI ist ein sehr kleines Molekül und funktioniert als verbindendes Molekül zwischen Glykosaminoglykanen und beispielsweise Kollagen I. Des Weiteren verleiht Kollagen Typ VI der EZM eine gelartige Konsistenz. Typ IV Kollagen ist vor allem in der Basalmembran der meisten vaskulären Strukturen und Geweben vorhanden, die eine epitheliale Zellkomponente enthalten (Badylak 2004). Als zweithäufigstes Protein der Extrazellulärmatrix ist Fibronectin nachzuweisen. Das dimere Molekül besitzt Liganden für viele Zelltypen und ist daher ein wichtiger Bestandteil der Zell-Matrix-Kommunikation (Schwarzbauer 1991, Miyamoto, Katz et al. 1998, Schwarzbauer 1999).

Ein weiterer wichtiger Bestandteil der EZM ist das trimere Adhäsionsprotein Laminin, das überwiegend im Bereich der Basalmembran vorhanden ist

(Schwarzbauer 1999). Vor allem bei der Bildung und dem Erhalt von vaskulären Strukturen spielt Laminin eine entscheidende Rolle und sollte im Hinblick auf die Verwendung der EZM als Scaffold insofern besonders berücksichtigt werden (Ponce, Nomizu et al. 1999, Werb, Vu et al. 1999).

Außerdem sind in der EZM zahlreiche Glykosaminoglykane (GAGs) vorhanden, die je nach Gewebelokalisation, Alter und Mikroumgebung variieren. Sie binden Wachstumsfaktoren und Zytokine, fördern die Wasserretention und tragen zu den gelartigen Eigenschaften der EZM bei. In der EZM vorhandene GAGs umfassen Chondroitinsulfat A und B, Heparin, Heparansulfat und Hyaluronsäure (Entwistle, Zhang et al. 1995, Hodde, Badylak et al. 1996).

Zudem können in der EZM in Abhängigkeit der Prozessierungsmodalität in geringer Konzentration bioaktive Moleküle wie Wachstumsfaktoren enthalten bleiben. Dies unterscheidet die intakte Extrazellulärmatrix von anderen Scaffolds. In der Extrazellulärmatrix konnten unter anderem der vascular endothelial growth factor (VEGF), der epithelial growth factor (EGF), der transforming growth factor beta (TGF-beta), der platelet derived growth factor (PDGF) und das bone morphogenic protein (BMP) nachgewiesen werden (Roberts, Gallagher et al. 1988, Kagami, Kondo et al. 1998, Bonewald 1999).

### **1.3.2.3 Herstellung eines EZM-Scaffolds durch Dezellularisierung**

Die Herstellung eines EZM-Scaffolds kann durch die Dezellularisierung verschiedenster Gewebe erfolgen. Ziel der Dezellularisierung ist der Erhalt einer zellfreien, jedoch strukturell und funktionell weitgehend erhaltenen Extrazellulärmatrix. Die Art der Dezellularisierung, sowie die des Gewebes haben einen entscheidenden Einfluss auf die biochemische Zusammensetzung, die Ultrastruktur und konsekutiv auf die mechanischen Eigenschaften der erhaltenen Extrazellulärmatrix (Gilbert, Sellaro et al. 2006).

Zur Dezellularisierung können physikalische, chemische und enzymatische Verfahren genutzt werden. Oft ist auch eine Kombination dieser Methoden sinnvoll oder notwendig, um Zellen effektiv zu entfernen.

### **1.3.2.3.1 Physikalische Methoden**

Zur Dezellularisierung können die Ausgangsgewebe verschiedenen physikalischen Faktoren (wie beispielsweise Druck, Kälte, etc.) ausgesetzt werden. Hierdurch werden die Zellmembranen lysiert. Die freigesetzten Zellbestandteile müssen jedoch im Anschluss mit Hilfe chemischer und enzymatischer Methoden entfernt werden (Gilbert, Sellaro et al. 2006).

Für die Dezellularisierung von Sehnen und Bändern (Jackson, Grood et al. 1987, Jackson, Grood et al. 1991), sowie Nervengewebe wird beispielsweise wiederholtes Einfrieren und Auftauen angewendet (Gulati 1988). Die Zellmembranen werden hierbei durch die intrazelluläre Bildung von Eiskristallen geschädigt. Um eine zusätzliche Lyse der Extrazellulärmatrix zu verhindern, muss jedoch auf eine kontrollierte Temperaturänderung geachtet werden (Gilbert, Sellaro et al. 2006).

Durch direkte Druckeinwirkung kann die Zellyse nur in Geweben mit weniger dichter Extrazellulärmatrix ausgelöst werden. So konnten beispielweise porcine Korneas oder Blutgefäße durch hydrostatischen Druck vollständig dezellularisiert werden. Bei dieser Methode ist ebenfalls zu beachten, dass es durch die Bildung von Eiskristallen zu einer Schädigung der Ultrastruktur der EZM kommen kann (Sasaki, Funamoto et al. 2009, Funamoto, Nam et al. 2010).

### **1.3.2.3.2 Chemische Methoden**

Die chemische Dezellularisierung basiert vor allem auf der Verwendung saurer und alkalischer Lösungen und Detergentien. Je nach verwendeter Lösung kann die Struktur und Zusammensetzung der EZM unterschiedlich stark beeinflusst beziehungsweise geschädigt werden.

Saure und alkalische Lösungen können die zytoplasmatischen Bestandteile der Zellen auflösen und Nukleinsäuren wie RNA und DNA entfernen. Hierzu gehören unter anderem Essigsäure (Probst, Dahiya et al. 1997), Peressigsäure (peracetic acid, PAA) (Freytes, Badylak et al. 2004), Salzsäure, Schwefelsäure und Ammoniumhydroxid (De Filippo, Yoo et al. 2002, Falke, Yoo et al. 2003).

Peressigsäure - als bewährtes Desinfektionsmittel und vor allem zur Dezellularisierung von Schweinedünndarmmukosa vielgenutztes Dezellularisierungsmittel - weist einen vergleichsweise geringen Effekt auf die

Zusammensetzung und Mikrostruktur der EZM auf. Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene Glykosaminoglykane wie Hyaluronsäure, Heparin und Chondroitinsulfat A (Hodde, Badylak et al. 1996), sowie die wichtigen Proteine Fibronectin und Laminin (Hodde, Record et al. 2002, Brown, Lindberg et al. 2006) nach Dezellularisierung mit PAA in der EZM erhalten bleiben. Ebenso konnten funktionstüchtige Wachstumsfaktoren, wie TGF- $\beta$  oder VEGF nachgewiesen werden (Voytik-Harbin, Brightman et al. 1997, Hodde, Record et al. 2001).

Bei der Anwendung von Essigsäure zur Dezellularisierung muss beachtet werden, dass hierdurch Kollagene aus der Extrazellulärmatrix herausgelöst werden können und dies mit einer verminderten Festigkeit der Scaffolds einhergeht (Dong, Wei et al. 2009).

Basen, wie beispielsweise Calciumhydroxid oder Natriumsulfid werden vor allem zur Entfernung von Haaren der Dermis verwendet. Auch Basen sind aggressiv genug, um Wachstumsfaktoren vollständig zu eliminieren und die mechanischen Eigenschaften der Scaffolds durch Spaltung der Kollagenfibrillen und Destruktion der Kollagen-Querverbindungen nachhaltig zu schwächen (Gorschewsky, Puetz et al. 2005, Prasertsung, Kanokpanont et al. 2008, Reing, Brown et al. 2010).

Nicht-ionische Detergentien greifen Lipid-Lipid- und Lipid-Protein-Verbindungen an, wobei Protein-Protein-Verbindungen intakt bleiben sollen (Seddon, Curnow et al. 2004).

Triton X-100 wurde als nicht-ionisches Detergens bereits in vielen Studien zur Dezellularisierung verwendet und zeigt insgesamt unterschiedliche Ergebnisse hinsichtlich der Effektivität der Dezellularisierung und der unerwünschten Nebeneffekte auf die Struktur der EZM. Beispielsweise konnte nach Anwendung an porcinen Herzklappen schon nach 24 Stunden eine vollständige Entfernung der Zellkerne nachgewiesen werden, während sich dagegen im Myokard und der Aortenwand noch zelluläres Material befand. Zudem kam es zu einer fast vollständigen Elimination der GAGs und zu einer Reduktion des Laminin- und Fibronektin Gehalts in der Herzklappe (Grauss, Hazekamp et al. 2005).

Ionische Detergentien können sowohl nukleäre als auch zytoplasmatische Zellmembranen solubilisieren, greifen jedoch auch Protein-Protein-Verbindungen an (Seddon, Curnow et al. 2004). Am häufigsten werden SDS (Sodium dodecyl Sulfate / Natriumdodecylsulfat), Natriumdeoxychololat oder Triton X-200 verwendet.

Vorteil der Dezellularisierung mit SDS gegenüber anderer Detergentien ist eine effektivere Entfernung von Zellresten und zytoplasmatischen Proteinen, wie z.B. Vimentin auch aus dichtem Gewebe (Woods and Gratzner 2005). Hierbei kann es jedoch ebenfalls zu einer Reduktion der Konzentration von GAGs und Wachstumsfaktoren kommen (Reing, Brown et al. 2010). Natriumdeoxycholat zeigt bei ähnlicher Effektivität bei der Dezellularisierung eine größere Beeinträchtigung der Gewebearchitektur als SDS (Gilbert, Sellaro et al. 2006).

Das zwitterionische Detergens CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate) wurde erfolgreich zur Dezellularisierung dünner Gewebe, wie beispielsweise der Lunge genutzt (Petersen, Calle et al. 2010). Es tendiert zu einer stärkeren Denaturierung von Proteinen als nicht-ionische Detergentien. Nach Anwendung an arteriellem Gewebe zeigte sich eine Verringerung des Berstdrucks, sowie der maximalen Belastbarkeit ohne Reduktion des Kollagengehaltes und der –morphologie (Dahl, Koh et al. 2003).

Hyper- und hypotone Lösungen, wie deionisiertes Wasser oder Lösungen mit niedriger Ionenstärke werden vor allem im Wechsel verwendet, um durch maximale osmotische Effekte Zellen zu lysieren (Goissis, Suzigan et al. 2000, Gilbert, Sellaro et al. 2006, Xu, Chan et al. 2007).

Bei der Anwendung chemischer Substanzen zur Dezellularisierung eines Gewebes muss insbesondere darauf geachtet werden, dass die Chemikalien nach der Dezellularisierung wieder vollständig aus dem Scaffold ausgewaschen werden und somit eine Zelltoxizität des Scaffolds vermieden wird (Feil, Christ-Adler et al. 2006, Cebotari, Tudorache et al. 2010).

### **1.3.2.3.3 Enzymatische Methoden**

Im Rahmen der enzymatischen Dezellularisierung von Geweben werden vor allem Proteasen, Kalziumkomplexbildner und Nukleasen eingesetzt (Bader, Schilling et al. 1998, Teebken, Bader et al. 2000, Gamba, Conconi et al. 2002, McFetridge, Daniel et al. 2004).

Proteasen, wie das hochspezifische proteolytische Enzym Trypsin werden häufig zur Dezellularisierung benutzt. Im Vergleich zu den Detergentien greift Trypsin vermehrt das in der EZM enthaltene Elastin und Kollagen an. Gleichzeitig ist es langsamer und ineffektiver in der Zellentfernung. Vorteil ist jedoch die Erhaltung eines

höheren Anteils an GAGs in der Extrazellulärmatrix (Kasimir, Rieder et al. 2003, Rieder, Kasimir et al. 2004, Grauss, Hazekamp et al. 2005, Yang, Chen et al. 2009). Die Beeinträchtigung der EZM korreliert hierbei mit den mechanischen Eigenschaften der Matrix (Yang, Chen et al. 2009).

Nukleasen wie DNasen und RNasen werden häufig eingesetzt, um restliche Nucleinsäuren aus der Matrix zu eliminieren. Sie können DNA in sehr kleine Fragmente spalten und so nach der Zellyse bei der Entfernung von verbliebenen Nucleotiden hilfreich sein (Petersen, Calle et al. 2010, Yang, Zhang et al. 2010).

#### **1.3.2.4 EZM-Bioscaffolds und Remodeling**

Da Scaffolds im Tissue Engineering nicht als permanente Implantate vorgesehen sind, müssen körpereigene Zellen im Verlauf das implantierte Konstrukt abbauen und ersetzen. Der Umbau (Remodeling) des Gewebes wird durch die EZM-Scaffolds aufgrund ihrer bioinduktiven und mechanischen Eigenschaften wesentlich unterstützt (Badylak 2007).

Zum Remodeling gehören unter anderem das Einwandern von Wirtszellen in das Scaffold, die Zelldifferenzierung, die Angiogenese, der Abbau des Scaffolds, sowie die Ablagerung und Organisation neuer Extrazellulärmatrix. Vor allem die Angiogenese und Zelldifferenzierung werden durch die während des Abbaus der EZM-Scaffolds freigesetzten und aktivierten Wachstumsfaktoren, wie VEGF oder TGF- $\beta$ , unterstützt (Voytik-Harbin, Brightman et al. 1997, Hodde, Record et al. 2001, Hodde, Record et al. 2002, McDevitt, Wildey et al. 2003).

In der Verwendung von EZM-Scaffolds aus Schweinedünndarmmukosa (small intestinal submucosa extracellular matrix, SIS-ECM) als Gefäßtransplantat im Hundemodell konnte beispielsweise schon vor über 20 Jahren ein extensives Remodeling dieser Scaffolds nachgewiesen werden (Badylak, Lantz et al. 1989). Das ursprünglich implantierte EZM-Material wurde vollständig resorbiert und durch Wirtsgewebe ersetzt. In der neu gebildeten Gefäßwand konnten die Intimastruktur, charakteristisch organisierte glatte Muskelbündel und eine vollständige Auskleidung des Gefäßlumens mit Endothelzellen nachgewiesen werden (Badylak, Coffey et al. , Badylak, Lantz et al. 1989).

## **1.4 Sauerstoff- und Nährstoffversorgung des Gewebes im Tissue Engineering**

Eines der führenden Probleme, das die klinische Anwendung des Tissue Engineerings zur Regeneration von Gewebe in größerem Umfang verhindert, ist die fehlende Vaskularisierung des gezüchteten Gewebes. Deshalb stellen Forschungen hierzu derzeit eine der Hauptaufgaben im Bereich des Tissue Engineerings dar (Rouwkema and Khademhosseini 2016).

Ohne vorhandenes suffizientes Gefäßsystem muss die Versorgung des gezüchteten Gewebes zunächst durch Diffusion erfolgen. In stoffwechselaktivem Gewebe wie Knochenmark oder trabekulärem Knochen beträgt die Diffusionsstrecke zwischen Kapillargefäß und Zellmembran physiologischerweise nie mehr als 40 bis 200  $\mu\text{m}$  (Chow, Wenning et al. 2001, Chow, Wenning et al. 2001). Die Strecke bis zur Mitte eines Scaffolds in der klinischen Anwendung beträgt jedoch meist mindestens 5 mm. Dies entspricht fast dem fünfzigfachen der physiologischen Diffusionsstrecke. Folglich kann nur ein Bruchteil der Zellen ausreichend mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt werden. Es kommt je nach Konzentration und Verteilung der Zellen, des Zelltyps und weiteren Variablen, wie der Sauerstoffausschöpfung der Zellen und der Konzentration von Sauerstoff auf der Oberfläche des Scaffolds zu einer mehr oder weniger ausgeprägten Nekrose im Zentrum des Scaffolds (Muschler, Nakamoto et al. 2004).

### **1.4.1 Lösungsansätze zur Verbesserung der Sauerstoff- und Nährstoffversorgung im Tissue Engineering**

Zur Verbesserung der Sauerstoff- und Nährstoffversorgung wurden bereits viele Lösungsansätze entwickelt (Rouwkema, Rivron et al. 2008). Beispielsweise kann während der Kultivierung *in vitro* die Verteilung der Nährstoffe über einen Perfusionsbioreaktor erfolgen (Salter, Goh et al. 2012). Nach Transplantation des Gewebes *in vivo* ist die suffiziente Versorgung aller Zellen jedoch wiederum auf ein Gefäßsystem angewiesen. Zwar kommt es innerhalb von Tagen bis Wochen nach der Transplantation des Gewebes *in vivo* zu einem Einsprossen von Gefäßen, bis dahin sind jedoch wiederum vor allem die Zellen in der Mitte des Transplantats mit Sauerstoff und Nährstoffen unterversorgt (Butt, Carruth et al. 2007). Um die Zeit der Unterversorgung zu verkürzen, wurde versucht, ein Gefäßsystem *in vitro* zu generieren und dieses anschließend direkt mit den Blutgefäßen des Patienten zu

verbinden (Levenberg, Rouwkema et al. 2005). Einige Studien zeigten, dass Endothelzellen ein Gefäßsystem in gezüchtetem Gewebe bilden können (Koike, Fukumura et al. 2004, Levenberg, Rouwkema et al. 2005, Rouwkema, Westerweel et al. 2009, Chen, Lin et al. 2012). Die Anordnung der Gefäße war jedoch aufgrund der unkontrollierten Angiogenese zufällig. Vor dem Remodeling durch die Wirtszellen überstieg auch der Abstand zwischen den vaskulären Strukturen die Grenze der Diffusionsstrecke von 200  $\mu\text{m}$ , sodass eine vollständige Versorgung aller Zellen initial nach Implantation des Gewebes nicht gewährleistet war. Aufgrund des geringen Durchmessers der gezüchteten Blutgefäße stellte die fehlende Möglichkeit einer chirurgischen Anastomosierung ein weiteres Problem dieses Verfahrens dar (Rouwkema and Khademhosseini 2016).

Als Lösungsansatz wurde das Patterning von Endothelzellen entwickelt. Hiermit sollte die Herstellung von Gefäßsystemen mit größerem Durchmesser ermöglicht werden. Innerhalb der Scaffolds wurden zunächst Hohlräume präpariert, die in der Folge mit Endothelzellen besät werden, um ein vorgefertigtes Muster für die vaskulären Strukturen zu schaffen. Zudem kann ein direktes Patterning der Gefäßzellen beispielsweise durch die Verwendung der Bioprint-Technologie (Hoch, Tovar et al. 2014) oder des photopatternings (Nikkhah, Eshak et al. 2012, Chaturvedi, Stevens et al. 2015) erfolgen. Chaturvedi et al. zeigten, dass durch Patterning hergestellte Gefäße mit einem Durchmesser zwischen 25 und 250  $\mu\text{m}$  im Rattenmodell anastomosiert und zu funktionellen, perfundierten Gefäßen werden können. Durch das Remodeling wurden jedoch die Durchmesser wieder auf 10-15  $\mu\text{m}$  reduziert (Chaturvedi, Stevens et al. 2015). Diese Studie zeigt, dass obwohl die initiale Organisation und der Durchmesser der Gefäße kontrolliert werden kann, das vaskuläre Remodeling diese Anordnung sowohl *in vivo* als auch *in vitro* wieder verändern wird.

Grundsätzlich stellt die ausreichende Perfusion von gezüchteten Gefäßsystemen und die korrekte Verteilung des Blutes im Gewebe weiterhin eine große Herausforderung dar. Ein optimales Gefäßsystem sollte bis hin zu den Venolen, Kapillaren und Arteriolen speziell organisiert sein. Außerdem sollten die Gefäße funktionell intakt sein, um beispielsweise auch die natürliche Barrierefunktion von vaskulären Strukturen zu erhalten. Erstrebenswert wären zudem makrovaskuläre Strukturen, die eine mikrochirurgische Anastomose mit dem Gefäßsystem des Patienten und somit eine direkte Perfusion nach Implantation, ermöglichen. Zu

berücksichtigen ist außerdem das Remodeling der Gefäßsysteme, das sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nach Implantation des vaskularisierten Gewebes, stattfindet. Falls hierbei keine zusätzlichen Signale vorhanden sind, die den Remodelingprozess lenken, ist es wahrscheinlich, dass der Umbau in zufällig organisierten vaskulären Strukturen resultiert (Rouwkema and Khademhosseini 2016).

#### **1.4.2 Benutzen ganzer Organe mit vorhandenem Gefäßsystem**

2004 präsentierten Jagodzinski et al. eine vielversprechende Idee als Lösungsansatz für die fehlende Vaskularisierung im Bereich des Tissue Engineerings, indem sie Dünndarmmarkaden mit dem dazugehörigen Gefäßsystem dezellularisierten. Nach Entfernung der Endothelzellen konnte das Gefäßsystem anschließend mit humanen Stromazellen erfolgreich rezellularisiert werden und somit ein proof of principle erbracht werden (Jagodzinski, Cebotari et al. 2004). Anschließend wurde die Perfusionsdezellularisierung über das vorhandene Gefäßsystem zu einer effizienten Methode entwickelt, um Dezellularisierungsagentien in dreidimensionalem Gewebe oder ganzen Organen zu verteilen und zelluläres Material zu entfernen. Über das erhaltene Gefäßsystem kann im Anschluss an die Dezellularisierung eine Rezellularisierung des Organes sowie die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen erfolgen (He and Callanan 2013) (siehe Abb. 2).

In den letzten Jahren konnten verschiedene solide Organe, unter anderem das Herz (Ott, Matthiesen et al. 2008), die Leber (Uygun, Soto-Gutierrez et al. 2010) oder die Lunge (Ott, Clippinger et al. 2010, Petersen, Calle et al. 2010) erfolgreich dezellularisiert, rezellularisiert und bereits im Rattenmodell reimplantiert werden. Die Rezellularisierung erfolgte in den meisten Forschungsgruppen mit einer Mischpopulation an organspezifischen neonatalen oder fetalen Zellen. Einige Gruppen verwendeten zur Rezellularisierung auch embryonale Stammzellen oder humane Zellpopulationen. Unabhängig von der für die Rezellularisierung verwendeten Zellart, war das vorrangige Ziel, das Ursprungsorgan zu regenerieren (Ott, Matthiesen et al. 2008, Ott, Clippinger et al. 2010, Petersen, Calle et al. 2010, Uygun, Soto-Gutierrez et al. 2010, Song, Guyette et al. 2013).

In vorangegangenen Experimenten wurde in unserer Arbeitsgruppe bereits ein standardisiertes, zeiteffektives Protokoll zur Perfusionsdezellularisierung von Rattennieren entwickelt (Burgkart, Tron et al. 2014). Diese Bioscaffolds sollten jedoch

nicht zur Regeneration des ursprünglichen Gewebes eingesetzt werden, sondern als Biomatrizes im Knochen Tissue Engineering dienen. Das Endziel ist es, ein universell einsetzbares Bioscaffold zu schaffen, das zudem das Problem der Vaskularisierung im Tissue Engineering adressiert.

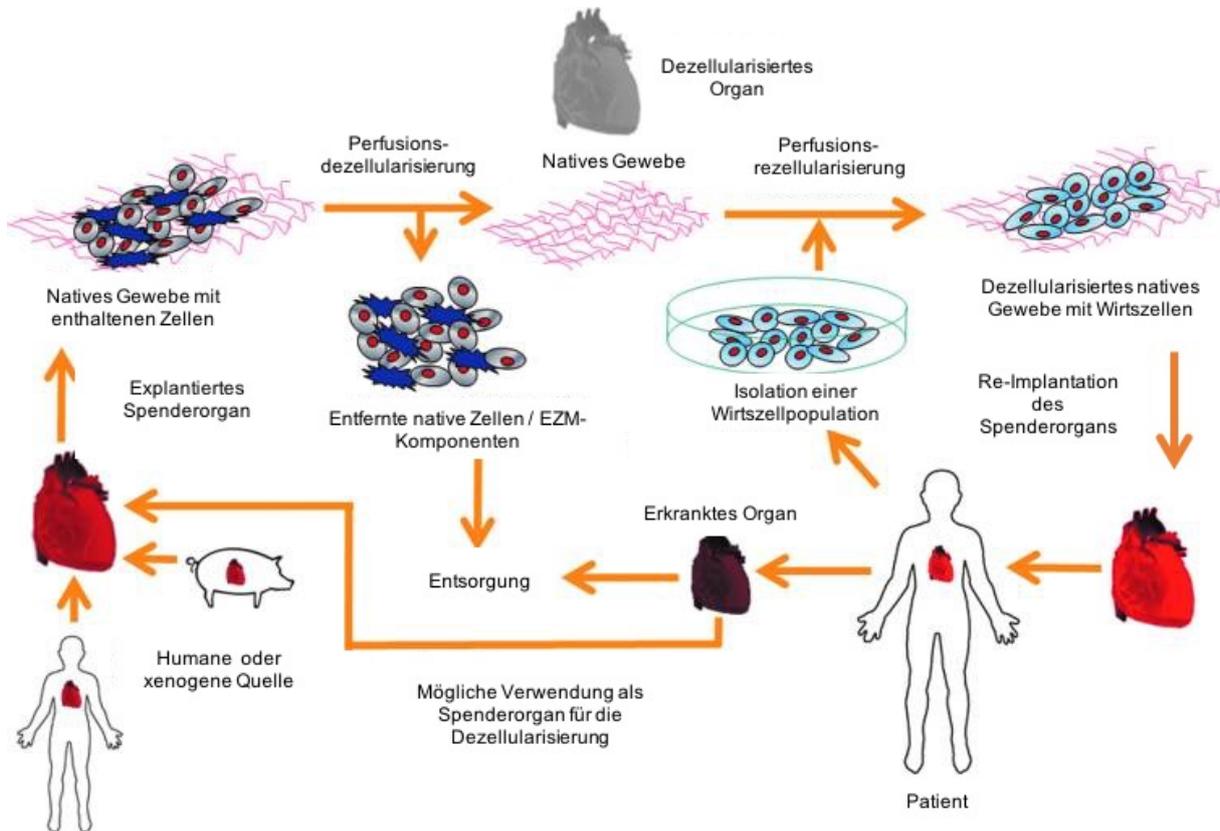


Abb. 2: Schematisches Diagramm der Dezellularisierung ganzer Organe und ihrer klinischen Anwendungen modifiziert nach (He and Callanan 2013); EZM=Extrazellulärmatrix

## 1.5 Immunreaktion im Tissue Engineering

Wie bereits unter Punkt 1.3.1 dargelegt, ist die Biokompatibilität eines der vorrangigen Kriterien, das ein biologisches Scaffold im Tissue Engineering erfüllen muss (Stevens 2008, Lichte, Pape et al. 2011, O'Brien 2011). Eine erhebliche Immunreaktion des Empfängerorganismus würde letztendlich zur Narbenbildung und Abstoßung des Scaffolds führen (O'Brien 2011) und somit das Ziel des Tissue Engineerings im Sinne der Regeneration neuen funktionellen Gewebes verhindern.

### **1.5.1 Immunreaktion bei xenogener Organtransplantation**

Die Immunantwort auf xenogene Organtransplantationen ist hinreichend erforscht worden und macht die derzeitigen Limitationen von Zell-, Gewebe- und Organtransplantationen deutlich (Badylak 2004). Diese Immunantwort führt zu einer hyperakuten oder akuten Abstoßung des Transplantates, weswegen Xenografts (Gewebe- oder Organtransplantationen zwischen unterschiedlichen Spezies) klinisch keine Anwendung finden (Keane and Badylak 2015).

Die Zerstörung des transplantierten Gewebes resultiert aus verschiedenen Mechanismen der Immunreaktion. Es kann zu einer Aktivierung des Komplementsystems mit konsekutiver Lyse der Zellen, einer direkt durch T-Zellen vermittelten Zelllyse, einer Aktivierung von T-Helferzellen und/oder der Produktion von Allo-Antikörpern kommen (Ingulli 2010).

Als dominante Mediatoren einer Abstoßungsreaktion bei Xenotransplantationen konnten vor allem Antikörper gegen das terminale Galactose-alpha-1,3-Galactose Epitop (gal-Epitop) identifiziert werden. Diese Epitope befinden sich auf der Oberfläche fast aller Zellen von Nicht-Primaten und Neuweltaffen, nicht jedoch auf menschlichen Zellen (Galili 2001, Yang and Sykes 2007). Aufgrund einer ständigen Exposition gegenüber  $\alpha$ -gal-Epitop-tragenden Darmbakterien (Naso, Gandaglia et al. 2012) werden im menschlichen Organismus anti-Gal-Antikörper gebildet, die bis zu 1-8% der Immunglobuline M und 1-2,4% der Immunglobuline G ausmachen (McMorrow, Comrack et al. 1997). Nach xenogener Transplantation kommt es durch die Anwesenheit der  $\alpha$ -gal-Epitope auf den Spenderzellen zu einer Komplementbindung (Good, Cooper et al. 1992, Koren, Kujundzic et al. 1994, Goldberg, Lee et al. 1996, Schussler, Shen et al. 2001, Farivar, Filsoufi et al. 2003) und einer antikörperabhängigen zell-vermittelten Zytotoxizität (Galili 1993, Koren, Kujundzic et al. 1994, Schussler, Shen et al. 2001) und somit zu einer hyperakuten oder verzögerten Abstoßung der Xenotransplantate.

### **1.5.2 Anwendung xenogener EZM-Scaffolds im Tissue Engineering**

Xenogene EZM-Scaffolds wurden bereits in Bereichen wie der Urologie (Harnröhrenplastik) (Mantovani, Tondelli et al. 2011) oder der Hernienchirurgie (Ansaloni, Cambrini et al. 2007) erfolgreich klinisch angewendet.

Die Präparation von EZM-Biomaterialien für den therapeutischen Gebrauch beinhaltet die Dezellularisierung eines Gewebes. Aufgrund der daraus resultierenden Abwesenheit zellulären Materials und der zellassoziierten Epitope wird dem Empfängerorganismus nun eine andere Art des Gewebetransplantats präsentiert als es bei der Transplantation von xenogenen Organen der Fall ist. Ein EZM-Scaffold ohne Zellen enthält als potentielle Antigene oder Stimulatoren einer Entzündungsreaktion nur die Proteine der EZM und ihre Abbauprodukte (Badylak 2004). Da die Extrazellulärmatrix in der Entwicklung und der Physiologie von Säugetieren eine zentrale Rolle spielt, ist die Sequenz der Aminosäuren und die Quartärstruktur vieler Bestandteile der EZM auch über die Artgrenzen hinaus hoch konserviert (van der Rest and Garrone 1991). Aufgrund dieser Übereinstimmung der Sequenzen könnte die xenogene Anwendung von EZM-Scaffolds sinnvoll sein.

### **1.5.3 Immunreaktion auf xenogene EZM-Scaffolds im Tissue Engineering**

Im Gegensatz zu der gut erforschten angeborenen und erworbenen Immunantwort auf Organtransplantationen, ist die Immunantwort auf azelluläre xenogene (oder allogene) biologische Scaffoldmaterialien bisher nur unzureichend erforscht und verstanden. Die erfolgreiche Anwendung eines EZM-Scaffolds ist jedoch abhängig von der auf die Transplantation folgenden Wirtsreaktion.

Neben einigen erfolgreichen klinischen Anwendungen von EZM-Bioscaffolds (Ansaloni, Cambrini et al. 2007, Mantovani, Tondelli et al. 2011) zeigten sich in anderen Fällen niedrige Level einer Immunantwort des Empfängers, die an kritischen Stellen des Körpers wie beispielsweise an Herzklappen zu einem Funktionsverlust und/oder der Destruktion der Transplantate führen können (Human and Zilla 2001, Manji, Zhu et al. 2006, Sandor, Xu et al. 2008). An dieser Immunreaktion des Empfängerorganismus sind sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem beteiligt. Da die EZM-Scaffolds per definitionem frei von Zellen sein sollen, spielen hier weitere Variablen eine Rolle. Zu diesen immunmodulierenden Variablen gehören die Implantationsstelle, der Ursprung des EZM-Scaffolds und die Prozessierungsschritte bei der Herstellung der Scaffolds (Keane and Badylak 2015).

Zunächst geht die Implantation des Scaffolds mit einer Gewebeverletzung einher. Hierdurch wird die standardisierte Reaktion des Empfängerorganismus auf eine Gewebeschädigung ausgelöst. Diese umfasst die Hämostase, eine Inflammation

sowie die Proliferation von Zellen und schließlich das Remodeling des Gewebes. Letzteres kann hierbei in der Bildung eines dichten fibrotischen Gewebes im Sinne einer Narbenbildung resultieren (Guo and Dipietro 2010). Der klinische Erfolg bei der Verwendung eines EZM-Bioscaffolds ist weitgehend auch davon abhängig, ob diese standardisierte Wundheilungsreaktion in Richtung der Neubildung von spezifischem funktionellem Gewebe (konstruktives Remodeling) und weg von der Bildung des Narbengewebes moduliert werden kann (Badylak and Gilbert 2008). Die Mechanismen dieses konstruktiven Remodelings sind jedoch bisher nur partiell verstanden.

## 2 Hintergrund und Zielsetzung der Arbeit

Die fehlende Vaskularisierung ist eines der Probleme, das die klinische Anwendung des Tissue Engineerings derzeit nur bedingt möglich macht. Neben einigen anderen Methoden gilt die Dezellularisierung ganzer Organe mit dem Ziel, eine Biomatrix mit natürlicher Gefäßstruktur zu erhalten, als vielversprechender Lösungsansatz dieses Problems. In unserer Arbeitsgruppe konnte bereits eine standardisierte und zeiteffektive Methode zur Perfusionsdezellularisierung solider Organe entwickelt werden (Burgkart, Tron et al. 2014). Die Möglichkeit, die auf diese Weise erhaltenen dreidimensionalen Bioscaffolds über Art- und Gewebegrenzen hinaus zu verwenden, sollte nun im Rahmen dieser Dissertation evaluiert werden.

Die Herstellung der Bioscaffolds erfolgte durch Dezellularisierung von Rattennieren mit unterschiedlich konzentrierter SDS-Lösung. Anschließend wurden die Matrices mit humanen mononukleären Zellen des peripheren Blutes (hPBMCs), primären humanen Osteoblasten oder Rattenosteoblasten besät. Hierbei wurden im ersten Teil der Versuche Marker untersucht, die die Immunreaktion der hPBMCs auf das xenogene Material aufzeigen. Im zweiten Teil der Experimente wurden die Viabilität und Funktionalität sowohl der humanen als auch der Rattenosteoblasten während verschiedener Zeitpunkte der *in vitro* Kultur analysiert. Die Experimente sollten folgende Fragen klären:

1. Ist eine Biomatrix aus dezellularisierten Rattennieren immunogen für humane Zellen?
2. Lässt sich die Immunogenität durch Benutzung unterschiedlich hoher SDS Konzentration reduzieren?
3. Welchen Einfluss hat das Bioscaffold aus dezellularisierten Rattennieren auf die Proliferation und Funktion von differenzierten Zellen eines anderen Gewebetyps?
4. Welchen Einfluss hat das Bioscaffold aus dezellularisierten Rattennieren auf die Proliferation und Funktion von differenzierten Zellen einer anderen Spezies?

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Geräte

Die verwendeten Geräte werden in Tab. 1 aufgelistet.

Name	Firma	Modell
Analysenwaage	KERN & SOHN GmbH, Deutschland	ABS 220-4
Arthroskopiepumpe	Arthrex Medizinische Instrumente GmbH, Deutschland	AR-6450
Einkanal-Pipette 0,5 ml, 10 ml, 100 ml, 1000 ml	Eppendorf AG, Deutschland	Research plus
Fluoreszenzmikroskop	Keyence GmbH, Deutschland	BZ 9000
Hohlmeißelzange nach Luer	Aesculap AG, Deutschland	
Inkubator	Thermo Fisher Scientific BV & Co KG, Deutschland	Heracell 150
Kryostat	Microm, Deutschland	Cryo-Star HM 560
Sicherheitswerkbank Klasse II	Weiss Pharmatechnik GmbH, Deutschland	BDK-1200
Laminar-flow Werkbank	Kendro, Germany	Herasafe HS12
Lichtmikroskop	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Deutschland	Axiovert 40 CFL
Mikroplatten-Reader	BMG LABTECH GmbH, Deutschland	FLUOstar Omega
Pipettierhilfe, akku- betrieben	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Deutschland	Pipetus

Stickstofftank	Air Liquide GmbH, Deutschland	
Wasserbad	Memmert GmbH + Co.KG, Deutschland	WNB 14
Zentrifuge	Eppendorf AG, Deutschland	5804

Tab. 1: Geräte

### 3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Materialien sind in Tab. 2 dargestellt.

Name	Firma
Pumpenschlauch AR-6420	Arthrex Medizinische Instrumente GmbH, Deutschland
Pumpenschlauch AR-6425	
Chirurgisches Nahtmaterial Prolene 5-0	Ethicon LLC, USA
Einmal-Skalpell Nr. 21	Feather Safety Razor Co., Ltd., Japan
Mikrotom-Klinge Nr. 35	
Glasflaschen 500 ml, 1000 ml	Schott AG, Germany
Mikrotiterplatte: Nunc Immuno Plates Maxi Sorp Nr. 439454	Nunc GmbH & Co. KG, Deutschland
Deckgläser für Zählkammer 22 x 22 mm	Carl Roth GmbH und Co. KG, Deutschland
Pasteurpipetten, ohne Wattestopfen 230mm	
Zählkammer Neubauer improved	
Pipettenspitzen	Eppendorf AG, Deutschland
Röhrchen 50 ml	Greiner Bio-one GmbH, Deutschland
Serologische Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	
Filtropur S 0,2 µm Spritzenvorsatzfilter	
Röhrchen 15 ml	
S-Monovette 9 ml, Lithium-Heparin	

SafeSeal-Reagiergefäß 0,5 ml, 1 ml, 1,5 ml	Sarstedt AG und Co., Deutschland
Safety-Multifly-Kanüle 21G mit langem Schlauch und montiertem Multi-Adapter	
Zellkulturflaschen 175 cm <sup>2</sup>	
Zellkulturschalen 10 cm <sup>2</sup>	
Schere steril	Aesculap AG, Deutschland
Discofix® 3-Wege-Hahn	B.Braun Melsungen AG, Deutschland
Injekt® Einmalspritzen 2, 20 ml	
Original-Perfusor®-Leitungen PVC	
Vasofix® Venenverweilkanüle 20 G	
Pinzette stumpf gerade	OMNILAB-LABORZENTRUM GmbH & Co. KG, Deutschland
Zellkulturflaschen 75 cm <sup>2</sup>	BD Bioscience, Deutschland
Zellkultur Multiwellplatten	SPL Life Sciences, Korea

Tab. 2: Verbrauchsmaterialien

### 3.1.3 Chemikalien

Tab. 3 zeigt die verwendeten Chemikalien.

Substanz	Firma
ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid))	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Albumin, from bovine serum (BSA)	
Calcein AM	
Dimethylformamid 99,9%	
Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS)	
Echtblau-Salz	
Hoechst 33342 (bisBenzimide H 33342 trihydrochloride)	
Lipopolysaccharid (LPS) aus E.coli 0127:B8	
MgCl <sub>2</sub>	

Naphtol-AS-MX-Phosphat	
4-Nitrophenylphosphat-Dinatriumsalz-Hexahydrat	
4-Nitrophenollösung	
Tris-Base	
Tween-20	
Alamar Blue	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Deutschland
Aqua ad iniectabilia	B.Braun Melsungen AG, Deutschland
Aqua Ecotainer® 1.000 ml	
Ethanol 70%	MRI Apotheke
Formaldehyd 3,7%	
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH und Co. KG, Deutschland
Glycin	
NaOH	
SDS ultra pure	
Lymphozyten Separationsmedium 1077 (LSM)	PAA Laboratories / GE Healthcare Europe GmbH, Deutschland
Octeniderm farblos, Hautantiseptikum	Schülke & Mayr GmbH, Deutschland
Tissue-Tek O.C.T. Compound	Sakura Finetek GmbH, Germany
Trypanblau 0,5%	Biochrom GmbH, Deutschland

Tab. 3: Chemikalien

### 3.1.4 Zellkulturmedien, Puffer und Zusätze

Eine Übersicht über die Zellkulturmedien, Puffer und Zusätze gibt Tab. 4.

Substanz	Firma
CaCl <sub>2</sub>	Carl Roth GmbH und Co. KG, Deutschland
HEPES	
Minimum Essential Medium Eagle Alpha Modification ( $\alpha$ -MEM)	

Dulbecco's Modified Eagle's Medium, low glucose (DMEM)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Fetal bovine serum (FBS)	
Dexamethason	
Penicillin/Streptomycin	
RPMI-1640 Medium	
Trypsin-EDTA 10 X (5.0 g/l porcine trypsin and 2.0 g/l EDTA)	
$\beta$ -Glycerolphosphat-Dinatriumsalz-Hydrat	AppliChem GmbH, Deutschland
Primocin	Invivogen, USA

Tab. 4: Zellkulturmedien, Puffer und Zusätze.

### 3.1.5 Zusammensetzung der Zellkulturmedien und Puffer

Die Zusammensetzung der Zellkulturmedien und Puffer ist in Tab. 5 abgebildet.

<b>Kulturmedium für humane Osteoblasten</b>	
Dulbecco's Modified Eagle's Medium, low glucose (DMEM) (mit 1000 mg/L Glucose, L-Glutamin, Natriumbikarbonat und Phenolrot)	500 ml
FBS	50 ml
Penicillin/Streptomycin	5 ml
L-Ascorbat-2-phosphat 0,05 M	125 $\mu$ l
<b>Differenzierungsmedium für humane Osteoblasten</b>	
Dulbecco's Modified Eagle's Medium, low glucose (DMEM) (mit 1000 mg/L Glucose, L-Glutamin, Natriumbikarbonat und Phenolrot)	500 ml
FBS	25 ml
Penicillin/Streptomycin	5 ml
L-Ascorbat-2-phosphat 0,2 mM	500 $\mu$ l
Dexamethason 100 nM	500 $\mu$ l
HEPES 0,025 M	12,5 ml

CaCl <sub>2</sub> 1,56 mM	152 mg
β-Glycerolphosphat 10 mM	1,18 g
<b>Kulturmedium für Rattenosteoblasten</b>	
α-MEM mit Phenolrot	500 ml
FBS	75 ml
L-Ascorbat-2-phosphat 2,8 μM	2500 μl
Dexamethason 10 nM	100 μl
L-Glutamin 2 mM	5 ml
Primocin 100 mg/l	1 ml
MEM Vitamine	5 ml
<b>Tris-Puffer 0,1 M pH 8,5</b>	
Tris-Base	6,05 g
ddH <sub>2</sub> O	450 ml
NaOH	Zum Einstellen des pH 8,5
Aqua (ddH <sub>2</sub> O)	Bis 500 ml Gesamtvolumen
<b>Alkalische Phosphatase (AP) Färbepuffer pH 8,5</b>	
Dimethylformamid 99,9%	2,5 ml
MgCl <sub>2</sub>	203,5 mg
Tris-Puffer 0,1 M pH 8,5	500 ml
<b>Alkalische Phosphatase (AP) Puffer 0,1 M pH 10,5</b>	
Glycine	3,75 g
Tris-Base	12,11 g
MgCl <sub>2</sub>	203 mg
ddH <sub>2</sub> O	Bis 900 ml
NaOH	Bis pH 10,5
Aqua (ddH <sub>2</sub> O)	Bis 1 l Gesamtvolumen

Tab. 5: Zusammensetzung der Zellkulturmedien und Puffer

### 3.1.6 Perfusionslösungen zur Dezellularisierung

Die Zusammensetzung der Perfusionslösungen zur Dezellularisierung ist in Tab. 6 dargestellt.

<b>Sodium dodecyl sulfate (SDS) Lösungen (Natriumdodecylsulfat)</b>				
SDS	5 g	6,6 g	10 g	30 g
Aqua	1000 ml	1000 ml	1000 ml	1000 ml
Konzentration	0,5%	0,66%	1%	3%
<b>Phosphate buffered saline Lösung (Phosphatgepufferte Salzlösung)</b>				
Phosphate buffered saline, pH 7,4		1 Päckchen		
Aqua		1000 ml		

Tab. 6: Perfusionslösungen zur Dezellularisierung

### 3.1.7 Färbelösungen

Tab. 7 zeigt die Zusammensetzung der benutzten Färbelösungen.

<b>Alkalische Phosphatase (AP) Färbelösung</b>	
Echtblau Salz	6 mg
Naphthol-AS-MX-Phosphate	1 mg
AP Färbepuffer	10 ml
<b>Hoechst Fluoreszenz Stammlösung</b>	
Hoechst 33342	100 mg
DMSO	100 ml
<b>Hoechst Fluoreszenz Färbelösung</b>	
Hoechst Stammlösung	2,5 µl
DPBS	7,5 µl
<b>Alkalische Phosphatase Substratlösung</b>	
4-Nitrophenylphosphat-Dinatriumsalz-Hexahydrat	1,3 mg
AP Puffer 0,1 M pH 10,5	1 ml
<b>Calcein AM Stammlösung 4 mM</b>	
Calcein AM	1 mg
DMSO	250 µl
<b>Calcein AM Färbelösung</b>	

Calcein AM Stammlösung 4 mM	5 µl
DPBS	10 ml

Tab. 7: Färbelösungen

### 3.1.8 ELISA-Sets

In Tab. 8 werden die für die ELISAs verwendeten Sets und Lösungen dargelegt.

<b>Human IL-10 Mini ELISA Development PeproTech, Deutschland</b>	
<b>Kit 900 M21</b>	
<b>Capture-Antikörper (Endkonzentration 100 µg/ml)</b>	
Anti-hIL-10	21 µg
D-Mannitol	0,5 mg
Aqua ad iniectabilia	210 µl
<b>Detection-Antikörper (Nachweis-Antikörper) (Endkonzentration 100 µg/ml)</b>	
Anti-hIL-10	11 µg
D-Mannitol	0,5 mg
Aqua ad iniectabilia	110 µl
<b>Standard (Endkonzentration 1 µg/ml)</b>	
Rekombinantes hIL-10	1 µg
BSA	2,2 mg
D-Mannitol	11,0 mg
Aqua ad iniectabilia	1 ml
<b>Waschpuffer</b>	
Tween-20	0,05% in DPBS
<b>Blocking-Puffer</b>	
BSA	1% in DPBS
<b>Verdünnungsmittel (Diluent)</b>	
Tween-20	0,05%
BSA	0,1% in DPBS
<b>Avidin-HRP-Konjugat Lösung</b>	
Avidin-HRP-Konjugat	5,5 µl
Diluent	11 ml

<b>Human TNF-<math>\alpha</math> ELISA Development Kit PeproTech, Deutschland 900-K25</b>	
<b>Capture-Antikörper (Endkonzentration 100 <math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	
Anti-hTNF- $\alpha$	21 $\mu\text{g}$
D-Mannitol	0,5 mg
Aqua ad iniectabilia	210 $\mu\text{l}$
<b>Detection-Antikörper (Nachweis-Antikörper) (Endkonzentration 100 <math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	
Anti-hTNF- $\alpha$	11 $\mu\text{g}$
D-Mannitol	0,5 mg
Aqua ad iniectabilia	110 $\mu\text{l}$
<b>Standard (Endkonzentration 1 <math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	
Rekombinantes hTNF- $\alpha$	1 $\mu\text{g}$
BSA	2,2 mg
D-Mannitol	11,0 mg
Aqua ad iniectabilia	1 ml
<b>Avidin-HRP-Konjugat Lösung</b>	
Avidin-HRP-Konjugat	6 $\mu\text{l}$
Verdünnungsmittel	12 ml

Tab. 8: ELISA Sets und Lösungen

### 3.1.9 Software

Die verwendete Software wird in Tab. 9 genannt.

<b>Software</b>	<b>Firma</b>
EndNote X6	Japone / Team LnDL, Thomson Reuters, San Francisco, CA, USA
Microsoft Excel 2010	Microsoft Corporation, Redmond, USA
OMEGA Software für FLUOstar V1.10	BMG Labtech, Deutschland
SPSS 24	IBM GmbH, Deutschland

Tab. 9: Software

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Isolation von humanen mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs)**

Das Blut der humanen Spender (2x männlich (33 Jahre, 26 Jahre), 1x weiblich (24 Jahre), westeuropäisch, immunkompetent) wurde durch venöse Punktion mittels einer Safety-Multifly-Kanüle am Unterarm gewonnen. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Technischen Universität München genehmigt. Die Einverständniserklärungen der Spender zur Probenentnahme liegen vor.

Aus den heparinisierten Monovetten wurde das abgenommene Blut vorsichtig in ein mit Lymphozyten-Separationsmedium (LSM) gefülltes 50 ml Röhrchen (15 ml LSM/ 35 ml Blut) pipettiert. Nach 20-minütiger Zentrifugation bei 1000 g und 22 °C konnten die PBMCs als mittlere Schicht zwischen dem Blutplasma und der Lymphozyten-LSM-Lösung abpipettiert und in einem neuen 50 ml Röhrchen gesammelt werden. Die Röhrchen wurden mit steriler DPBS-Lösung aufgefüllt und es folgte die Zentrifugation für 10 Minuten bei 630 g und 22°C. Nach Absaugen des Überstandes folgte die erneute Resuspension in DPBS und Zentrifugation für 10 Minuten (630 g, 22°C). Der Überstand wurde erneut vorsichtig entfernt und die PBMCs wurden in 10 ml im Wasserbad vorgewärmtem DMEM low glucose mit 0,2% Primocin resuspendiert (Islam and Wilkinson 1989). Die Quantifizierung der Zellen erfolgte mit Hilfe der Neubauer Zählkammer (3.2.4.1 Quantifizierung der Zellen).

### **3.2.2 Isolation von primären humanen Osteoblasten**

Die Isolation der primären humanen Osteoblasten erfolgte aus humanen Femurköpfen, die bei endoprothetischer Versorgung des Hüftgelenks (HTEP) in der Abteilung für Unfallchirurgie im Klinikum rechts der Isar entnommen wurden. Die Femurköpfe wurden unter sterilen Bedingungen entfernt, verpackt und in das Labor überführt. Die Einverständniserklärungen der Patienten zur Probenentnahme sowie ein durch die Ethikkommission der Technischen Universität München genehmigter Ethikantrag liegen vor.

Mit Hilfe einer sterilen Hohlmeißelzange nach Luer konnten unter der sterilen Werkbank kleine Spongiosastückchen (Durchmesser 3-5 mm) gewonnen werden. Diese wurden in einem 50 ml Röhrchen mit DPBS mehrmals gewaschen bis sie eine

elfenbeinähnliche Farbe erhielten. Anschließend wurden die Spongiosastückchen in einer 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche verteilt (Explant-Methode) (Jonsson, Frost et al. 1999). Als Nährmedium verwendeten wir Dulbecco's Modified Eagle's Medium (mit 1000 mg/L Glucose, L-Glutamin und Natriumbikarbonat), versetzt mit 10% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin (bestehend aus 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin) und 12,5 mg L-Ascorbat-2-phosphat pro 500 ml. Die ersten beiden Medienwechsel erfolgten jeweils nach einer Woche, dabei sollten die Spongiosastückchen innerhalb der Zellkulturflasche möglichst wenig bewegt werden, um ein Auswachsen von Zellen aus den Knochenstückchen zu ermöglichen. Nach Erreichen der Konfluenz der ausgewachsenen Zellen wurden die Spongiosastückchen entfernt. Die adhärennten Zellen wurden mit Hilfe von Trypsin/EDTA (siehe 3.2.4.3 Subkultivierung der humanen und Rattenosteoblasten) von dem Boden der Kulturflasche gelöst, quantifiziert (siehe 3.2.4.1 Quantifizierung der Zellen) und zur weiteren Kultur und Proliferation in mehrere 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen gesät. Ab der dritten Woche erfolgte der Mediumwechsel zweimal pro Woche.

### **3.2.3 Isolation von Rattenosteoblasten**

Die Isolation der Rattenosteoblasten erfolgte ebenfalls mittels Explant-Methode (siehe 3.2.2 Isolation von primären humanen Osteoblasten) (Jonsson, Frost et al. 1999) aus Femura von Wildtyp-Wistar-Ratten aus anderen Experimenten. Die Knochenstückchen wurden auf 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen verteilt und analog zu den humanen Osteoblasten kultiviert. Als Nährmedium für die Kultivierung der Rattenosteoblasten benutzten wir  $\alpha$ -MEM versetzt mit FBS, Glutamin, MEM-Vitaminen, L-Ascorbat-2-phosphat, Dexamethason und Primocin.

### **3.2.4 Zellkultur**

#### **3.2.4.1 Quantifizierung der Zellen**

Die Quantifizierung der Zellen wurde mit Hilfe einer verbesserten Neubauer Zählkammer durchgeführt. Diese besteht aus einer 4 mm dicken rechteckigen (30 x 70 mm) Grundplatte aus Glas und einem dünnen Deckglas. In der Mitte der Grundplatte befindet sich eine H-förmige Einkerbung, die die zwei Zählbereiche voneinander trennt. Jeder Zählbereich ist in neun 1 mm<sup>2</sup> große Quadrate unterteilt. Die

vier äußeren Quadrate sind nochmals in 16 kleinere Quadrate mit jeweils 0,0625 mm<sup>2</sup> unterteilt. Die Grund- und Deckplatte wurden zunächst mit 70% Ethanol gereinigt. Nach Anhauchen der beiden Platten wurde die Deckplatte 0,1 mm über den Zählbereichen platziert. Die Newton Ringe mussten zu sehen sein. Nach enzymatischer Ablösung der Zellen mit Trypsin/ EDTA (siehe 3.2.4.3 Subkultivierung der humanen und Rattenosteoblasten) oder Gewinnung der PBMCs (siehe 3.2.1 Isolation von humanen mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs)) wurden 50 µl Zellsuspension mit 50 µl Trypanblau-Lösung (Trypan-Blau 0,5% : DPBS = 1:3) in einem SafeSeal-Reagiergefäß gemischt. Davon wurden 10 µl in jede Zählkammer pipettiert und unter dem Lichtmikroskop die Zellen in den vier äußeren Quadraten gezählt. Die Quantifizierung der vitalen Zellen 1 ml Zellsuspension erfolgte nach Anleitung des Herstellers nach folgender Formel:

$$\text{Anzahl vitaler Zellen / ml} = \frac{\text{Anzahl}}{8} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

### 3.2.4.2 Kultivierung der primären humanen und Rattenosteoblasten

Nach Isolation der primären humanen und Rattenosteoblasten wurden die Zellen in Zellkulturflaschen (175 cm<sup>2</sup>/75 cm<sup>2</sup>) im Inkubator bei 37°C und einer CO<sub>2</sub>-Konzentration von 5% kultiviert. Die unterschiedliche Zusammensetzung der Zellkultur- bzw. Differenzierungsmedien ist unter Punkt 3.1.5 Zusammensetzung der Zellkulturmedien und Puffer aufgelistet. Die Nährmedien wurden zunächst einmal pro Woche und ab der dritten Woche der Kultivierung alle drei bis vier Tage gewechselt. Dies geschah durch steriles Absaugen und Auffüllen der Zellkulturflaschen mit der entsprechenden Menge an Medium unter der sterilen Werkbank. Das Ascorbat wurde vor jedem Mediumwechsel frisch hinzugefügt. Bei der Herstellung des Differenzierungsmediums wurden das CaCl<sub>2</sub> und das β-Glycerolphosphat in DMEM aufgelöst, steril filtriert und anschließend dem Medium hinzugefügt. Nach Erreichen von ca. 80% der Konfluenz wurden die Zellen entweder für die Versuche benutzt oder subkultiviert.

### **3.2.4.3 Subkultivierung der humanen und Rattenosteoblasten**

Die Subkultivierung der humanen und Rattenosteoblasten erfolgte nach Erreichen einer ausreichenden Zelldichte (ca. 80% Konfluenz) in den Zellkulturflaschen (175 cm<sup>2</sup> / 75 cm<sup>2</sup>). Um die Zellen weiter zu kultivieren bzw. zu passagieren wurde zunächst das Nährmedium unter der sterilen Werkbank abgesaugt und die Zellen mit sterilem DPBS gewaschen, um eine Aktivitätshemmung des Trypsins durch Bestandteile des Mediums zu verhindern. Nach Absaugen des DPBS gaben wir Trypsin/EDTA hinzu und inkubierten die Zellen 5-10 Minuten bei 37°C, um die Zellen von dem Boden der Zellkulturflaschen ab zu lösen. Nach leichtem Beklopfen des Randes der Kulturflaschen lösten sich die restlichen Zellen, was unter dem Lichtmikroskop kontrolliert werden konnte. Das Trypsin wurde anschließend durch Zugabe von Medium inaktiviert und die Zellsuspension in ein 50 ml Röhrchen pipettiert. Nach Zentrifugation für 10 Minuten mit 650 g bei 22°C konnte der Überstand abgesaugt und das sich am Boden der Röhrchen befindliche Zellpellet in frischem Medium resuspendiert werden, bis eine homogene Zellsuspension entstand. Die Zellen in der Suspension wurden anschließend mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer quantifiziert (siehe 3.2.4.1 Quantifizierung der Zellen) und die gewünschte Anzahl von Zellen entweder auf neue Zellkulturflaschen verteilt oder direkt für die Experimente verwendet (El-Amin, Botchwey et al. 2006).

### **3.2.5 Gewinnung der Rattennieren**

Die Rattennieren wurden aus 16 männlichen Wildtyp-Wistar-Ratten mit einem Gewicht zwischen 300 und 600 g gewonnen. Die Ratten wurden nach den üblichen Richtlinien für Labortiere gehalten und im Rahmen anderer Versuche schließlich in Allgemeinanästhesie mittels intrakardialer Injektion einer Überdosis Pentobarbital (80 mg/kg) euthanisiert. Die Bauchregion der Ratten wurde zunächst mit 70% Ethanol desinfiziert, die Bauchhöhle anschließend mit einer Längsinzision eröffnet. Die Nieren konnten mittels stumpfer Präparation dargestellt und mit intakter Gefäßversorgung proximal sowie distal an der Aorta abdominalis abgesetzt werden. Die Aufbewahrung der Nieren erfolgte in einem mit DPBS gefüllten 50 ml Röhrchen bei -80° C.

## **3.2.6 Dezellularisierung**

### **3.2.6.1 Präparation der Rattenniere**

Nach langsamem Auftauen der Rattennieren bei Raumtemperatur wurden diese in einer mit PBS gefüllten Zellkulturschale präpariert. Das umgebende Fettgewebe und die Kapsel wurden vorsichtig entfernt ohne das Nierengewebe oder die Gefäße zu verletzen. Die A. und V. renalis sowie der Ureter wurden dargestellt. In der A. renalis wurde eine Venenverweilkanüle G20 platziert und mit Prolene 5-0 fixiert. Die korrekte Platzierung der Venenverweilkanüle und die Durchgängigkeit der Nierengefäße wurden durch manuelle Spülung mit PBS kontrolliert.

### **3.2.6.2 Perfusionssystem und Dezellularisierung der Rattennieren**

Als Perfusionssystem diente die Arthroskopiepumpe AR 6450 der Firma Arthrex sowie das dazu gehörige sterile Standardschlauchsystem bestehend aus zwei zusammengesetzten Teilschläuchen. Um das Gefäßsystem der Niere mit der Arthroskopiepumpe verbinden zu können, wurde die in der A. renalis befestigte Venenverweilkanüle an eine Perfusorleitung angeschlossen und diese über einen Drei-Wege-Hahn mit dem Arthroskopieschlauchsystem verbunden. Als Reservoir für die Spülflüssigkeiten dienten sterilisierte 1000 ml bzw. 500 ml Glasflaschen.

Nach der Vorbereitung und Entlüftung des Schlauchsystems der Arthroskopiepumpe wurde die Niere über die Venenverweilkanüle und die Perfusorleitung an das Perfusionssystem angeschlossen. Mit einem Druck von 100 mmHg und einem Flow von 10% wurde die Niere mit den Dezellularisierungslösungen gespült.

Der Ablauf eines Dezellularisierungsprogramms ist in Tab. 10 dargestellt.

Schritt	Lösung	Dauer
1	Aqua	10 Minuten
2	SDS-Lösung	30 Minuten
3	Aqua	10 Minuten
4	SDS-Lösung	30 Minuten
5	Aqua	60 Minuten
6 *	Aqua mit 5% Pen/Strep	60 Minuten

Tab. 10: Dezellularisierungsprotokoll Pen/Strep: Penicillin und Streptomycin, SDS: Sodium dodecyl Sulfate (Natriumdodecylsulfat)

\*Schritt 6 wurde unter der Sterilwerkbank mit steriler Spüllösung durchgeführt.

Für die Untersuchung der Immunantwort von humanen PBMCs im ersten Teilversuch benutzen wir 0,5%-, 0,66%-, 1%- und 3%-SDS-Lösungen. Da sich bezüglich der Immunantwort der humanen Zellen kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Konzentrationen der SDS-Lösungen gezeigt hatte, wurden die Rattennieren für die weiteren Versuche mit 0,66%- oder 3%-SDS-Lösung dezellularisiert.

Nach Abschluss des Dezellularisierungsvorgangs wurde die A. renalis der dezellularisierten Niere unter sterilen Kautelen durchtrennt und die Niere in einem sterilen 50 ml Röhrchen bei -80° C aufbewahrt (Burgkart, Tron et al. 2014).

### 3.2.7 Untersuchung der Immunantwort auf die Bioscaffolds

#### 3.2.7.1 Inkubation der Bioscaffolds mit humanen mononukleären Zellen des peripheren Blutes (hPBMCs)

Für diesen Teilversuch wurden Rattennieren, die mit 0,5%-, 0,66%-, 1%- und 3%iger SDS-Lösung dezellularisiert worden sind, verwendet (vgl. 3.2.6.2 Perfusionssystem und Dezellularisierung der Rattennieren). Die Nieren wurden zunächst unter sterilen Kautelen längs halbiert und die Hälften in den Wells einer 48 Well-Zellkulturplatte platziert. Ebenso wurden native Rattennieren unter der sterilen Werkbank von Bindegewebe und Kapsel frei präpariert, halbiert und auf die Wells verteilt. Nach Isolation der hPBMCs, wurden die Nierenscaffolds und die nativen Nierenhälften mit  $3 \times 10^6$  humanen mononukleären Zellen pro Well besät und die Wells mit DMEM low

glucose und 0,2% Primocin bis auf 550 µl aufgefüllt. Zum Vergleich wurden dezellularisierte und native Nieren ohne PBMCs und die mononukleären Zellen alleine inkubiert. Als Positivkontrolle dienten PBMCs, die mit 5,5 µl LPS pro Well zu einer Immunantwort stimuliert wurden. Die Inkubationszeit betrug 6 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Danach wurde der Überstand der Wells abpipettiert und in 0,5 ml Reaktionsgefäßen bei -80°C bis zur Durchführung des ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) aufbewahrt.

### **3.2.7.2 ELISA: TNF- $\alpha$ , Interleukin-10**

Um die Immunogenität der dezellularisierten Rattennieren zu untersuchen, wurden die von humanen PBMCs gebildeten Konzentrationen von TNF- $\alpha$  und Interleukin-10 (IL-10) mittels ELISA quantifiziert. Die bei der Inkubation der Nieren mit humanen PBMCs gewonnenen Proben (vgl.3.2.7.1 Inkubation der Bioscaffolds mit humanen mononukleären Zellen des peripheren Blutes (hPBMCs)) wurden nach dem Auftauen zunächst 1:1 mit DMEM low glucose und 0,2% Primocin verdünnt. Beide Immunassays (TNF- $\alpha$ , IL-10) wurden anschließend in Dreifachbestimmung nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

## **3.2.8 Evaluierung der Viabilität und Funktionalität der Osteoblasten**

### **3.2.8.1 Anfertigung von Gefrierschnitten**

Die Anfertigung von Gefrierschnitten der Nieren war notwendig, um möglichst dünne Gewebeproben für die Färbungen zu erhalten. In Vorversuchen hatte sich gezeigt, dass dickere Schnitte des Nierengewebes die Darstellung beispielsweise der alkalischen Phosphatase fast unmöglich machten, da die Anfärbung in dem dichten Gewebe unter dem Mikroskop nicht zu erkennen war.

Für diesen zweiten Teilversuch benutzten wir Rattennieren, die mit 0,66% und 3% SDS-Lösung dezellularisiert wurden. Die dezellularisierten und nativen Rattennieren wurden bei Raumtemperatur angetaut und mit einem sterilen Skalpell quer halbiert. Anschließend wurden die Hälften einmalig in flüssigen Stickstoff getaucht und mit O.C.T.-Compound Klebstoff auf der Probenplatte fixiert. Nach Platzierung der Probe in der vorgesehenen Fassung des Kryostats, konnten dünne

Gefrierschnitte hergestellt werden. Die Temperatur des Objektes betrug  $-14^{\circ}\text{C}$ , die des Messers  $-16^{\circ}\text{C}$ . Die Schnitte hatten eine Dicke von  $60\ \mu\text{m}$  und wurden mosaikartig auf dem Boden der Wells einer bei  $-80^{\circ}\text{C}$  vorgekühlten 48 Well-Zellkulturplatte verteilt. Zur Vermeidung einer Kontamination wurden sterile Pinzetten benutzt und die restlichen Arbeitsutensilien wiederholt mit 70% Ethanol desinfiziert. Außerdem wurden die Multiwellplatten anschließend für 15 Stunden unter UV-Licht in der sterilen Werkbank belassen, bevor sie versiegelt und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert wurden.

### **3.2.8.2 Besäen der Gefrierschnitte mit Osteoblasten**

Die Herstellung der Gefrierschnitte und ihre Verteilung auf die 48 Well-Zellkulturplatten wurden in Abschnitt 3.2.8.1 **Anfertigung von Gefrierschnitten** beschrieben. Die auf diese Weise vorbereiteten Zellkulturplatten wurden zunächst bei Raumtemperatur wieder aufgetaut und nochmals für 5 Stunden unter UV-Licht in der sterilen Werkbank belassen. Anschließend wurde in jedes Well  $100\ \mu\text{l}$  Osteoblastenkulturmedium (siehe 3.1.4 **Zellkulturmedien, Puffer und Zusätze**) mit 0,2% Primocin gegeben und bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert.

Die Ratten- und humanen Osteoblasten Passage 3-4 wurden von dem Boden der Zellkulturflasche abgelöst (siehe Punkt 3.2.4.3 **Subkultivierung der humanen und Rattenosteoblasten**), zentrifugiert und in Osteoblastenkulturmedium mit 0,2% Primocin resuspendiert. Nach Quantifizierung der Zellen wurde die entsprechende Menge Zellsuspension auf die bereits inkubierten 48 Well-Platten verteilt und gegebenenfalls mit Osteoblastenkulturmedium / Primocin auf  $500\ \mu\text{l}$  Gesamtvolumen pro Well aufgefüllt. Im Folgenden wird die Kultur der Zellen mit Gefrierschnitten als 3D-Zellkultur bezeichnet, die Zellkultur in den Wells ohne Gefrierschnitte als 2D-Kontrollkultur.

Für die Bestimmung der Zellviabilität mittels Alamar Blue Assay wurden  $5,0 \times 10^3$  Zellen pro Well gesät und zweimal wöchentlich ein Wechsel des Kulturmediums durchgeführt. Für die Färbungen benutzten wir  $1,0 \times 10^4$  Zellen pro Well. Hierbei erfolgte der Wechsel des Osteoblastenkulturmediums auf das Osteoblastendifferenzierungsmedium bereits an Tag 1. Anschließend wurde ebenfalls zwei Mal wöchentlich das Differenzierungsmedium gewechselt.

### **3.2.8.3 Histologie / Histochemie**

#### **3.2.8.3.1 Alamar Blue Assay**

Um die Zellzahl und die Viabilität der Zellen zu evaluieren, wurde das Alamar Blue Assay verwendet. Das in dem Reagenz enthaltene blaue, nicht-fluoreszierende Resazurin wird im Zytosol von lebenden Zellen zu Resorufin reduziert. Dabei kommt es zu einem Farbumschlag und zur Emission von Fluoreszenz (Ahmed, Gogal et al. 1994, Dienstknecht, Eehalt et al. 2010). Die Redoxreaktion kann sowohl quantitativ durch kolorimetrische oder fluorometrische Messungen und qualitativ durch den Farbumschlag detektiert werden, wobei die Messung der Fluoreszenz die genaueste Methode darstellt (Rampersad 2012).

Zu den in 48 Well-Platten ausplattierten Zellen / Gefrierschnitten der Nieren (vgl. 3.2.8.2 Besäen der Gefrierschnitte mit Osteoblasten) wurde unter sterilen Kautelen jeweils 40 µl Alamar Blue-Reagenz, entsprechend 1/10 des Mediumvolumens, gegeben. Die Multiwellplatten wurden sofort für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde unter der sterilen Werkbank der Überstand abpipettiert und die Fluoreszenzmessung in dreifacher Bestimmung (3 x 100 µl des Überstandes) mit einer Anregungswellenlänge von 544 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm durchgeführt. Die Zellen / Nierenschnitte wurden anschließend wieder mit Kulturmedium / Primocin inkubiert und bis Tag 14 weiter kultiviert.

#### **3.2.8.3.2 Alkalische Phosphatase-Färbung**

Die alkalische Phosphatase (AP) ist ein in der Leber, in Knochen und der Plazenta produziertes Enzym, das in hohen Konzentrationen vor allem in proliferierenden Osteoblasten nachzuweisen ist und als wichtiger Osteoblastenmarker gilt (Harris 1990, Lian and Stein 1995). Deshalb benutzten wir die Anfärbung der alkalischen Phosphatase zur Charakterisierung und Untersuchung der Funktion der humanen und Rattenosteoblasten.

Die Anfärbung der alkalischen Phosphatase erfolgte an Tag 1 und 14 der Kultur der humanen und Rattenosteoblasten mit den Gefrierschnitten aus Rattennieren (vgl. 3.2.8.2 Besäen der Gefrierschnitte mit Osteoblasten). Zunächst wurde das Differenzierungsmedium abgesaugt und die Wells mit PBS gewaschen. Daraufhin

erfolgte die Fixierung der Zellen / Gefrierschnitte in den Wells mit 250 µl Formaldehyd 3,7% pro Well. Nach 15-minütiger Einwirkzeit bei Raumtemperatur konnte das Formaldehyd abgesaugt und jedes Well mit 250 µl der alkalische Phosphatase-Färbelösung versehen werden. Die Färbelösung wurde direkt vor der Benutzung aus 6 mg Echtblau Salz, 1 mg Naphtol-AS-MX-Phosphat und 10 ml AP-Färbepuffer hergestellt (siehe 3.1.7 Färbelösungen). Nach 30-minütiger Inkubation mit der Färbelösung bei 37°C wurden die Wells erneut mit PBS gewaschen. Mit Hilfe der Hellfeldmikroskopie wurde anschließend das Vorhandensein der alkalischen Phosphatase detektiert und dokumentiert.

#### **3.2.8.3.3 Alkalische Phosphatase-Aktivität**

Ebenso wie die Färbung der alkalischen Phosphatase kann die Bestimmung der alkalischen Phosphatase-Aktivität (AP-Aktivität) als Marker für Osteoblasten herangezogen werden. Als Substrat wurde Para-Nitrophenylphosphat benutzt, welches durch die katalytische Aktivität der alkalischen Phosphatase zu Paranitrophenol umgesetzt wird (Wildemann, Burkhardt et al. 2007).

Nach Absaugen des Zellkulturmediums und Waschen der Zellen bzw. Gefrierschnitte mit PBS wurden 350 µl der Substratlösung aus 4-Nitrophenylphosphat-Dinatriumsalz-Hexahydrat und AP-Puffer (siehe 3.1.7 Färbelösungen) pro Well hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte anschließend für 30 Minuten bei 37°C. Danach wurde der Überstand in eine 96 Well-Zellkulturplatte übertragen und es folgte die Absorptionsmessung der Proben in Dreifachbestimmung bei einer Wellenlänge von 405 nm. Die durch die alkalische Phosphatase enzymatisch umgesetzte Menge an Para-Nitrophenol konnte mit Hilfe der Anfertigung einer Standardkurve (4-Nitrophenol mit AP-Puffer) kalkuliert werden (Wildemann, Burkhardt et al. 2007).

#### **3.2.8.3.4 DNA-Fluoreszenzfärbung**

Die Darstellung der DNA in den Zellkernen erfolgte mittels Fluoreszenzfärbung nach Hoechst (Lydon, Keeler et al. 1980). Die mit DMSO und DPBS verdünnte Hoechst 33342-Reagenz wurde in einer Konzentration von 0,5 µg/ml zu den Zellen und Gefrierschnitten der Nieren (vgl. 3.2.8.2 Besäen der Gefrierschnitte mit Osteoblasten)

gegeben und 15 Minuten inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit DPBS konnten die Zellkerne unter dem Fluoreszenzmikroskop detektiert und dokumentiert werden.

#### **3.2.8.3.5 Fluoreszenzfärbung vitaler Zellen**

Calcein AM ist ein zellpermeabler Farbstoff, der zum Nachweis der Zellviabilität verwendet wird. In den vitalen Osteoblasten wird das nicht-fluoreszierende Substrat von unspezifischen Esterasen durch Hydrolyse zum grün-fluoreszierenden Calcein umgewandelt. Außerdem kann die Integrität der Zellmembran beurteilt werden. Bei defekter Zellmembran in toten oder geschädigten Zellen, die noch eine Restaktivität der Esterasen aufweisen, würde das fluoreszierende Calcein nicht intrazellulär gehalten werden können und aus den Zellen austreten.

In 48 Well-Platten, welche mit Osteoblasten und Gefrierschnitten der Rattennieren) versehen waren, wurde die Fluoreszenzfärbung mit 0,5 µl Calcein AM-Färbelösung pro Well nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach Inkubation und Spülung mit PBS konnten die fluoreszierenden Zellkörper unter dem Fluoreszenzmikroskop identifiziert und fotografiert werden.

#### **3.2.9 Statistik**

Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben. Für die statistische Analyse wurde SPSS 24 verwendet. Für die Beurteilung der Datenverteilung (normal verteilt/nicht normal verteilt) wurde der Shapiro-Wilk-Test verwendet. Da die Daten nicht normal verteilt waren, wurden bei Vergleichen zwischen zwei Gruppen für unverbundene Stichproben ein nicht-parametrischer Mann-Whitney-U-Test, für verbundene Stichproben ein Wilcoxon-Test durchgeführt. Zur Korrektur bei Mehrfachvergleichen erfolgte die statistische Auswertung mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) gefolgt von post-hoc-Sidak multiplum Vergleichstest. Als statistisch ausreichendes Signifikanzniveau wurde  $p < 0,05$  festgelegt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Feststellung der Dezellularisierung anhand der makroskopischen Erscheinung

Nach der Dezellularisierung mit SDS-Lösung zeigten die Rattennieren eine weißlich-durchsichtige makroskopische Erscheinung (vgl. Abb. 3). Die äußere Form veränderte sich nicht. Makroskopisch und funktionell blieb das Gefäßsystem während der Dezellularisierung intakt. Dies konnte durch den kontinuierlichen Abfluss der Spülflüssigkeiten durch die Vena renalis kontrolliert werden.

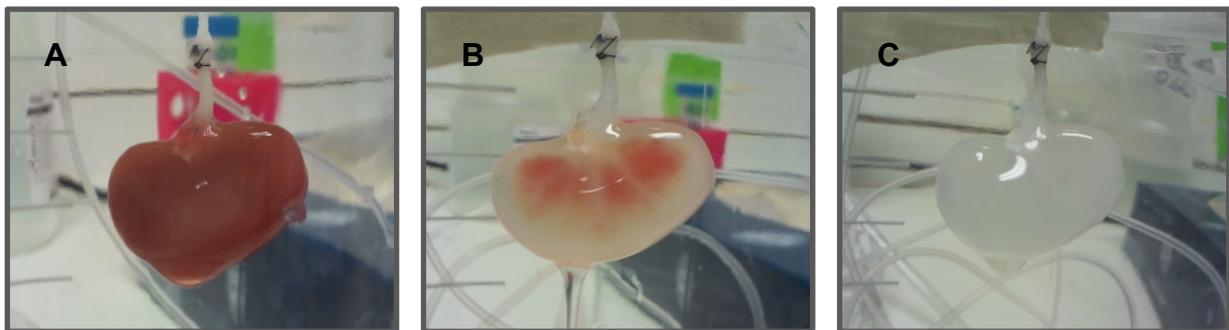


Abb. 3: Dezellularisierung einer Rattenniere. Native Rattenniere (A), Rattenniere nach 25 min. Dezellularisierung mit 0,5%iger SDS-Lösung (B), Rattenniere nach 60 min. Dezellularisierung mit 0,5%iger SDS-Lösung (C).

### 4.2 Immunogenität der Bioscaffolds

Hierfür wurden Rattennieren, die mit 0,5%-, 0,66%-, 1%- und 3%iger SDS-Lösung dezellularisiert worden sind, verwendet. Die dezellularisierten und nativen Rattennieren wurden halbiert, mit humanen mononukleären Zellen des peripheren Blutes (hPBMCs) von 3 verschiedenen Spendern besät und 6 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der Menge an TNF- $\alpha$  und Interleukin-10, die als Reaktion auf die xenogenen Bioscaffolds aus Rattennieren von den humanen Zellen gebildet wurde.

#### 4.2.1 TNF- $\alpha$

Die Ergebnisse des ELISA für TNF- $\alpha$  sind in Abb. 4 bzw.

Abb. 5 dargestellt. Die hier gezeigten Ergebnisse wurden jeweils auf die Werte der mononukleären Zellen, die mit Lipopolysacchariden (LPS) aktiviert worden sind, normiert. Als Positivkontrolle wurden hPBMCs mit LPS verwendet.

Im direkten Vergleich zu der Kontrollgruppe der hPBMCs ohne Zugabe von LPS oder Zellen konnte hierbei eine hochsignifikant ( $p \leq 0,001$ ) erhöhte Ausschüttung von TNF- $\alpha$  nachgewiesen werden. Eine hochsignifikante Zunahme der TNF- $\alpha$  Konzentration zeigte sich zudem nach Exposition der hPBMCs gegenüber nativen Rattennieren ( $p \leq 0,001$ ).

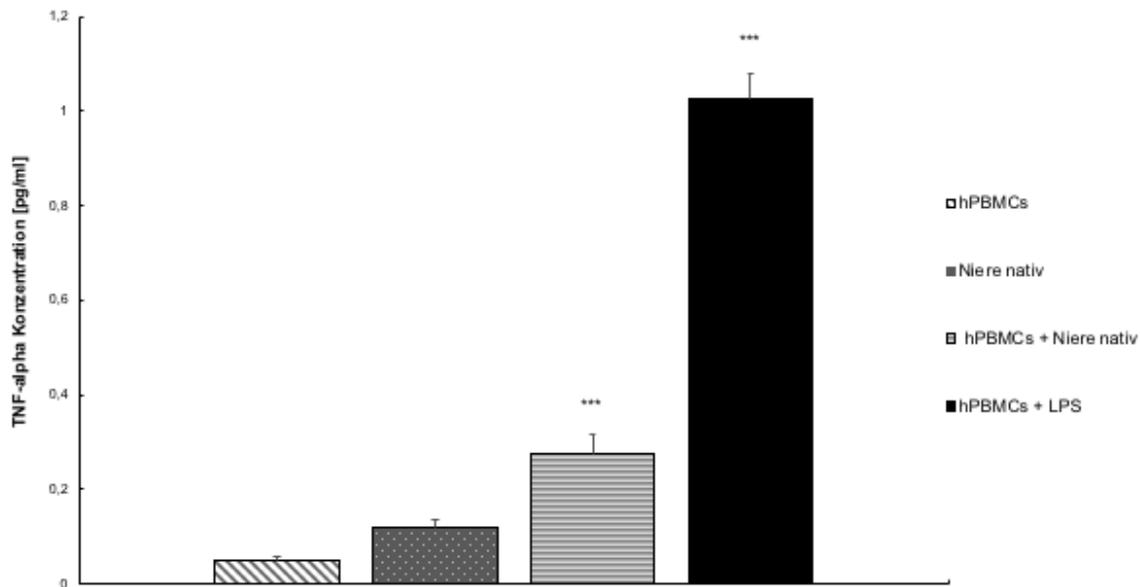


Abb. 4: Relative TNF- $\alpha$  Konzentration normiert auf hPBMCs + LPS nach 6h Inkubation. Hochsignifikant höhere TNF- $\alpha$  Ausschüttung der hPBMCs nach Exposition gegenüber nativen Rattennieren sowie Stimulation mit LPS im Vergleich zur Kontrollgruppe (hPBMCs); hPBMCs=humane mononukleäre Zellen des peripheren Blutes, LPS=Lipopolysaccharide; N=3, n=3; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

Bei Exposition der hPBMCs gegenüber den dezellularisierten Rattennieren konnte, im Vergleich zur Kontrollgruppe der hPBMCs ohne Rattennieren, keine signifikante Erhöhung der TNF- $\alpha$  Konzentrationen detektiert werden. Dies zeigte sich unabhängig von der bei der Dezellularisierung benutzten SDS Konzentration (0,5% / 0,66% / 1% / 3%).

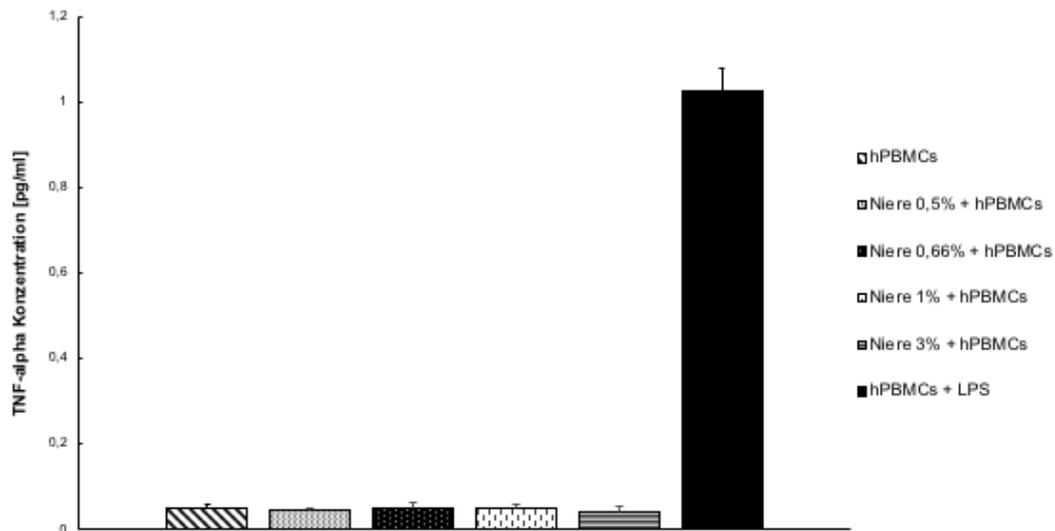


Abb. 5: Relative TNF- $\alpha$  Konzentration dezellularisierte Rattennieren normiert auf hPBMCs + LPS nach 6h Inkubation. Kein Signifikanter Unterschied der TNF- $\alpha$  Ausschüttung nach Exposition der hPBMCs mit den dezellularisierten Rattennieren im Vergleich zur Kontrollgruppe (hPBMCs) unabhängig von der Intensität der Dezellularisierung (0,5% / 0,66% / 1% / 3% SDS); hPBMCs=humane mononukleäre Zellen des peripheren Blutes, LPS=Lipopolysaccharide; N=3, n=3.

#### 4.2.2 Interleukin-10

Die Ergebnisse des ELISA für IL-10 sind in Abb. 6 und Abb. 7 dargestellt. Die hier gezeigten Ergebnisse wurden ebenfalls jeweils auf die Werte der mononukleären Zellen, die mit LPS aktiviert worden sind, normiert.

Nach 6h Inkubation der hPBMCs mit LPS zeigte sich kein signifikanter Anstieg der IL-10 Konzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe (hPBMCs). Es zeigte sich jedoch eine hochsignifikant ( $p \leq 0,001$ ) höhere Ausschüttung von IL-10 durch die humanen Zellen bei Exposition mit nativen Rattennieren gegenüber der Kontrollgruppe (hPBMCs). Signifikant ( $p \leq 0,05$ ) höhere IL-10 Konzentrationen wurden im Vergleich zur Kontrollgruppe auch in der Kultur der nativen Rattennieren ohne Zellen gemessen.

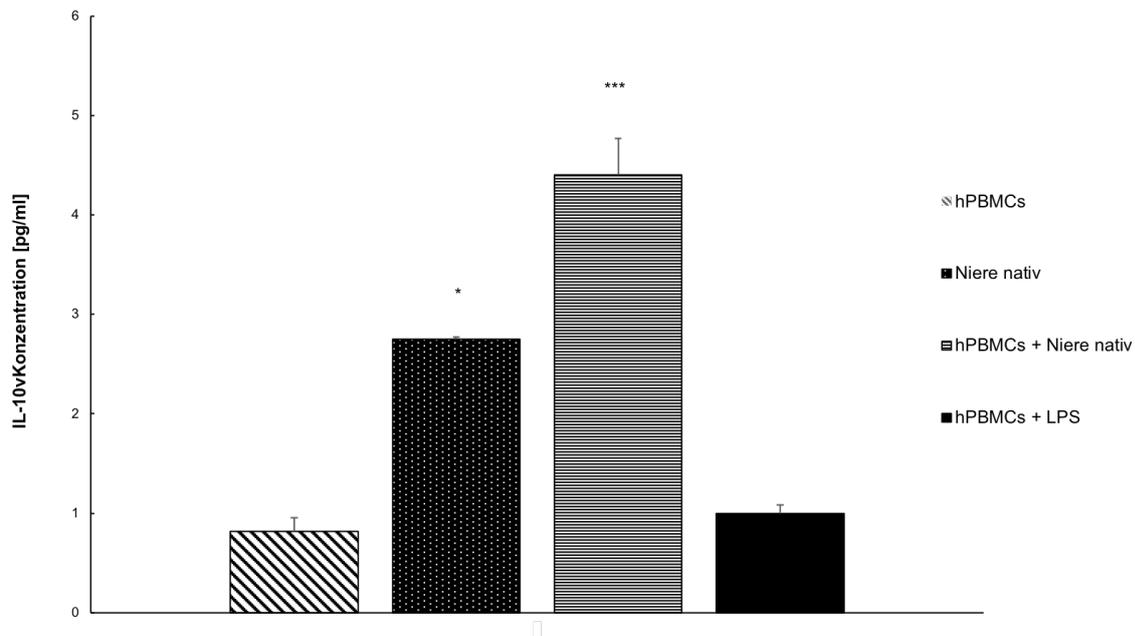


Abb. 6: Relative IL-10 Konzentration normiert auf hPBMCs + LPS nach 6h Inkubation. Im Vergleich zu der Kontrollgruppe (hPBMCs) hochsignifikant höhere Ausschüttung von IL-10 bei Exposition der hPBMCs mit nativen Rattennieren. Signifikant erhöhte IL-10 Konzentration in der Gruppe der nativen Rattennieren ohne Zellen; hPBMCs=humane mononukleäre Zellen des peripheren Blutes, LPS=Lipopolysaccharide; N=3, n=3; \*\*\*  $p \leq 0,001$ , \*  $p \leq 0,05$ .

Die Exposition der hPBMCs gegenüber dezellularisierten Rattennieren führte zu keiner signifikanten Erhöhung der IL-10 Konzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe (hPBMCs). Innerhalb der Gruppe der dezellularisierten Rattennieren konnte zwischen den unterschiedlich hohen SDS Konzentrationen (0,5% / 0,66% / 1% / 3%) ebenfalls kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Ausschüttung von IL-10 durch die hPBMCs gemessen werden.

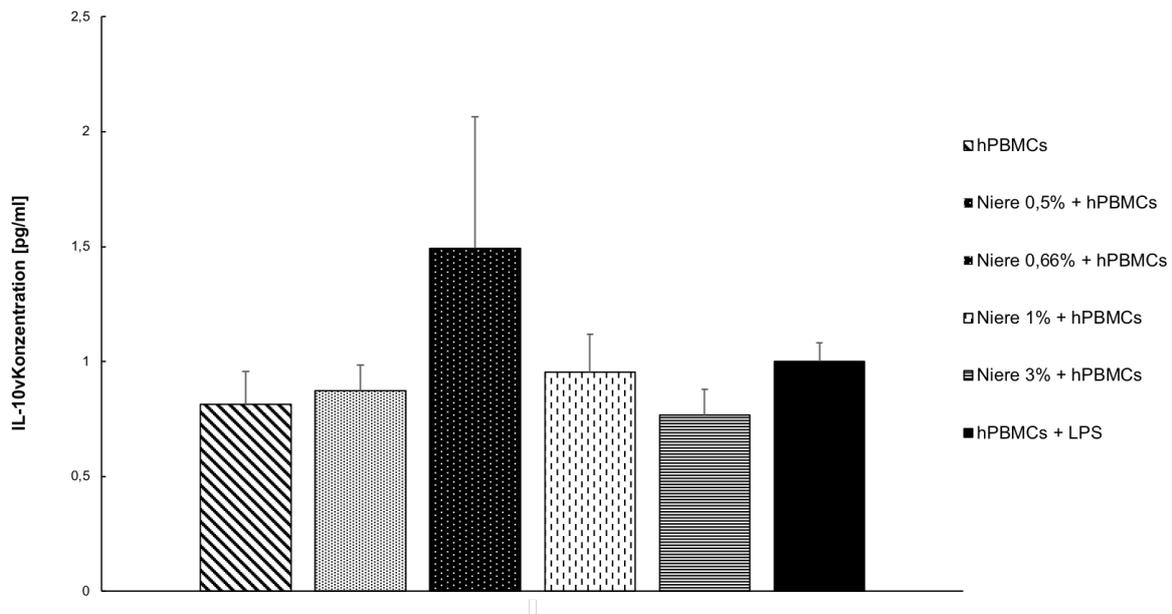


Abb. 7: Relative IL-10 Konzentration dezellularisierte Rattennieren normiert auf hPBMCs + LPS nach 6h Inkubation. Kein signifikanter Unterschied in der IL-10 Konzentration bei Exposition der hPBMCs mit den dez. Rattennieren im Vergleich zu der Kontrollgruppe (hPBMCs); hPBMCs=humane mononukleäre Zellen des peripheren Blutes, LPS=Lipopolysaccharide; N=3, n=3.

### 4.3 Einfluss der Bioscaffolds auf die Proliferation und Funktion differenzierter Zellen eines anderen Gewebetyps

Um den Einfluss der Bioscaffolds aus dezellularisierten Rattennieren auf die Proliferation und Funktion differenzierter Zellen eines anderen Gewebetyps zu untersuchen, wurden 60 µm dicke Gefrierschnitte von nativen und dezellularisierten Nieren für 14 Tage mit Rattenosteoblasten kultiviert. Die Zellzahl und Viabilität wurden mittels Alamar Blue Assay, Calcein AM- und Hoechst-Färbung analysiert. Die Funktion bzw. Differenzierung der Osteoblasten wurde mittels alkalische Phosphatase-Aktivitätsmessung und -Färbung untersucht.

#### 4.3.1 Messung der Zellzahl und -viabilität mittels Alamar Blue Assay

Die Messung der Zellzahl und Viabilität der Rattenosteoblasten (rOBs) mittels Alamar Blue Assay erfolgte an Tag 1, 4, 7 und 14.

Die Rattenosteoblasten in der konventionellen Zellkultur ohne Rattennieren als Biomatrix (2D-Zellkultur) zeigten eine kontinuierliche, signifikante Proliferation ( $p \leq 0,05$ ) zwischen Tag 1 und Tag 14 (vgl. Abb. 8). In der 3D-Kultur mit den dezellularisierten Rattennierenscaffolds (0,66% / 3% SDS) konnte ebenfalls eine

signifikante Proliferation der Zellen ( $p=0,008$ ) zwischen Tag 1 und Tag 14 nachgewiesen werden (vgl. Abb. 9, Abb. 10). Im Gegensatz dazu konnten sich Rattenosteoblasten in 3D-Kultur mit nativen Rattennieren nicht vermehren (vgl. Abb. 11).

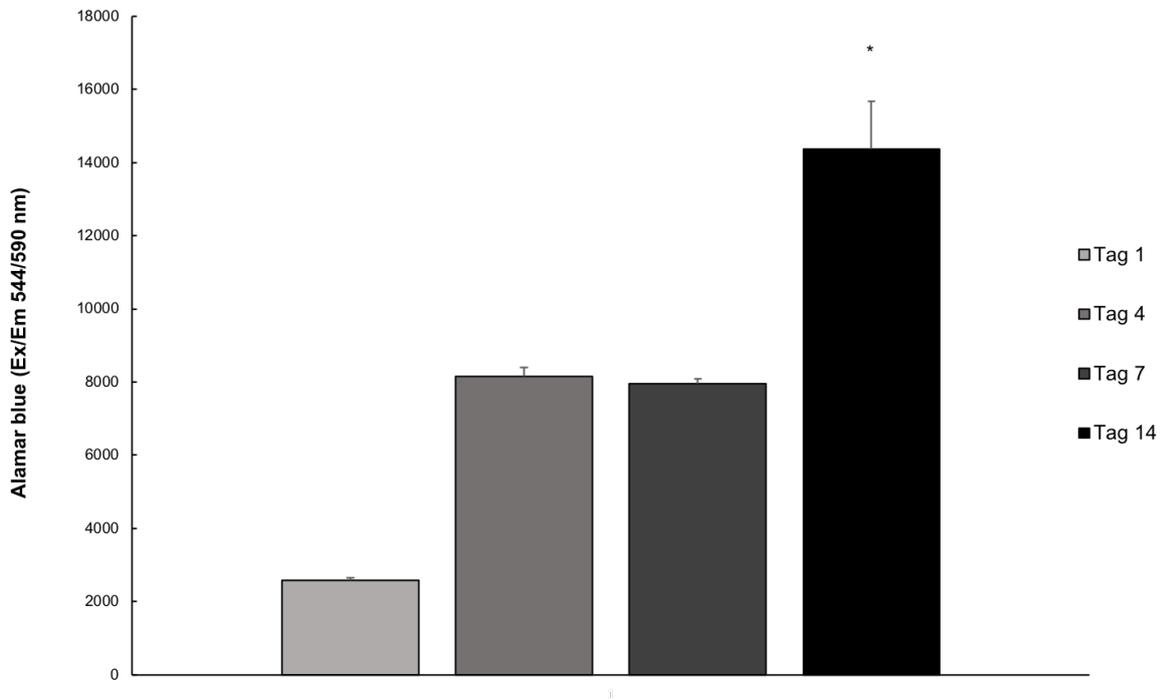


Abb. 8: Alamar Blue Assay Rattenosteoblasten: Signifikante Proliferation der Rattenosteoblasten in der 2D-Kultur über 14 Tage. N=3, n=3; \*  $p \leq 0,05$ .

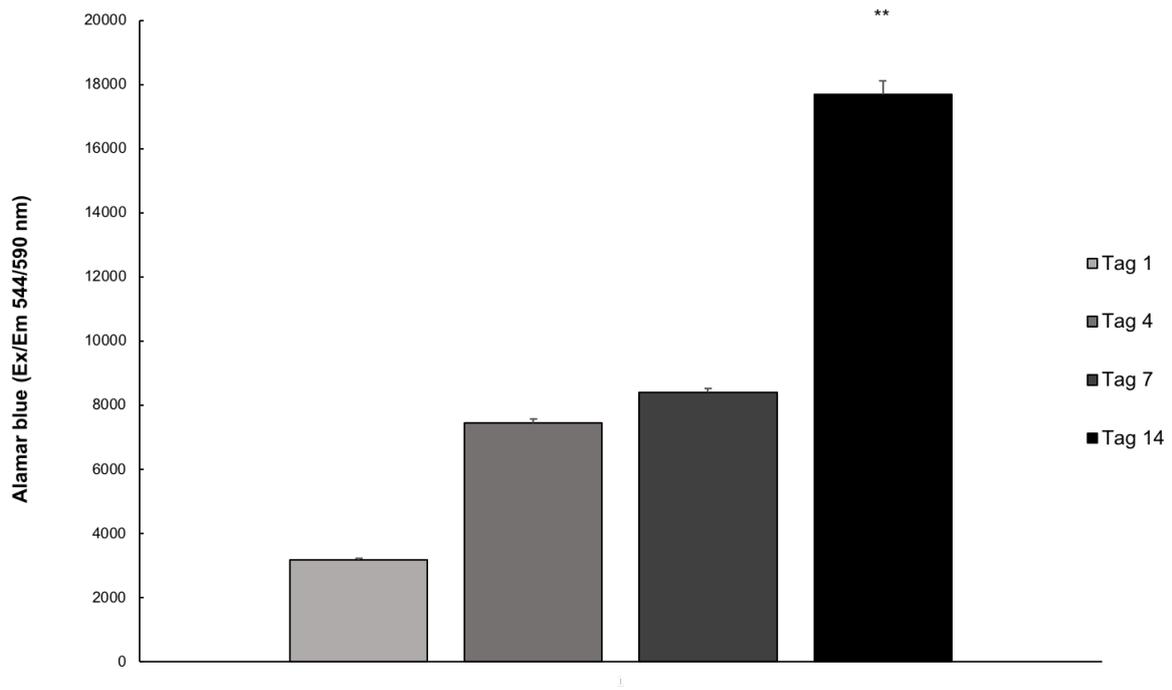


Abb. 9: Alamar Blue Assay Rattenosteoblasten und dezellularisierte Rattennieren 0,66% SDS: Signifikante Proliferation der Rattenosteoblasten in der 3D-Kultur mit 0,66% SDS-dezellularisierten Rattennieren über 14 Tage. N=3, n=3; \*\*  $p \leq 0,01$ .

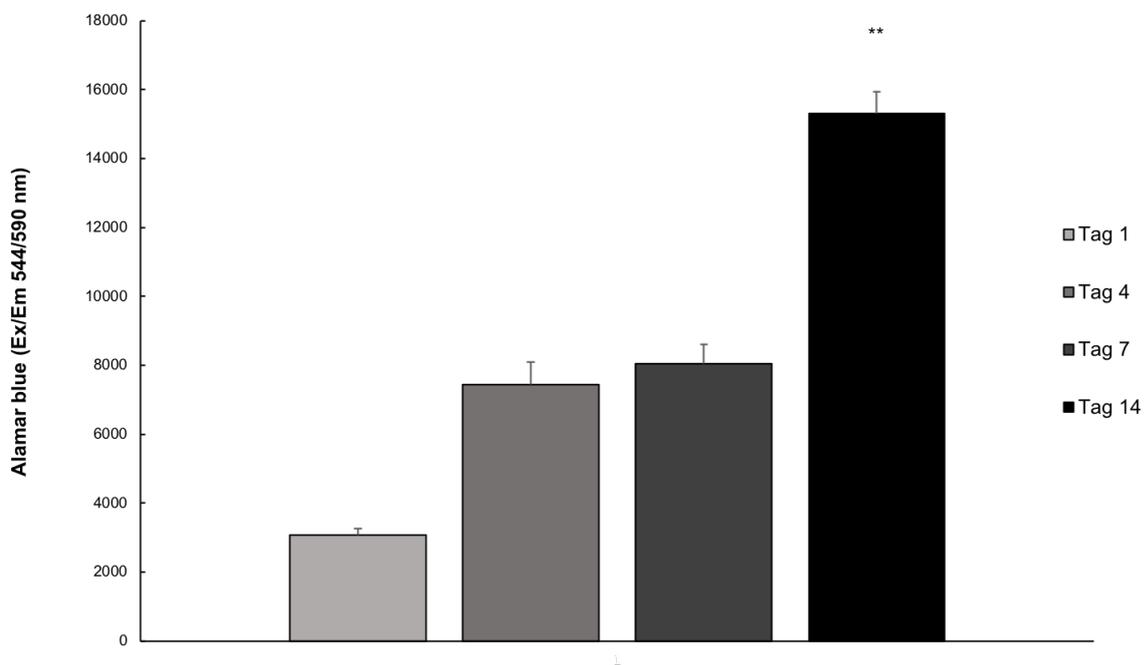


Abb. 10: Alamar Blue Assay Rattenosteoblasten und dezellularisierte Rattennieren 3% SDS: Signifikante Proliferation der Rattenosteoblasten in der 3D-Kultur mit 3% SDS-dezellularisierten Rattennieren über 14 Tage. N=3, n=3; \*\*  $p \leq 0,01$ .

Im Vergleich der beiden Dezellularisierungsprotokolle mit 0,66%iger und 3%iger SDS-Lösung konnten bezüglich der Ergebnisse des Alamar Blue Assays zu keinem Zeitpunkt der Messungen signifikante Unterschiede festgestellt werden.

Im Vergleich der 2D- gegenüber der 3D-Kultur zeigte sich an Tag 14 eine signifikant höhere Proliferation ( $p=0,014$ ) der Rattenosteoblasten auf der mit 0,66% SDS Konzentration dezellularisierten Niere im Vergleich zur 2D-Kultur. Eine hochsignifikant größere Proliferation der rOBs in Kultur mit den dezellularisierten Rattennieren konnte auch im Vergleich zur Kultur mit den nativen Nieren gemessen werden (vgl. Abb. 11). Kein signifikanter Unterschied bestand zwischen der 3D-Kultur mit dezellularisierten Rattennieren durch 3%ige SDS-Lösung und der 2D-Kultur der Rattenosteoblasten ( $p=0.933$ ).

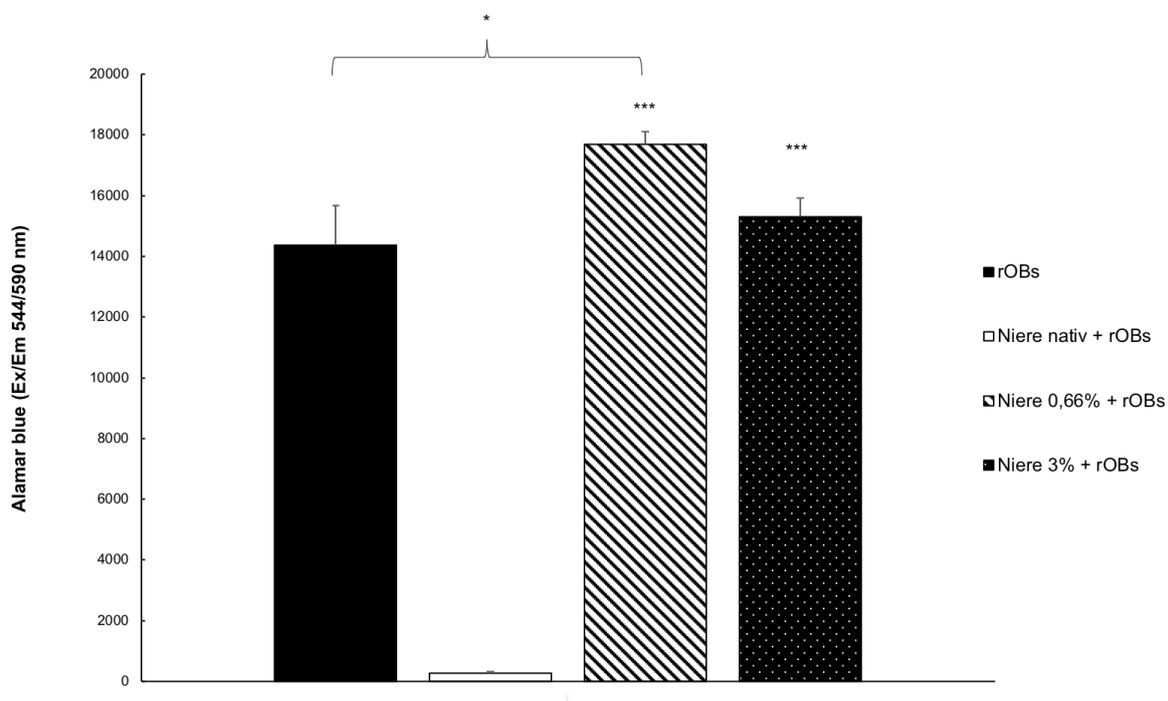


Abb. 11: Alamar Blue Assay Rattenosteoblasten und dez. Rattennieren Tag 14: Signifikant höhere Proliferation der Rattenosteoblasten (rOBs) in der 3D-Kultur mit 0,66% SDS dezellularisierten Rattennieren an Tag 14 im Vergleich zu der 2D-Kultur. Hochsignifikant höhere Proliferation der rOBs in der Kultur mit den dezellularisierten Rattennieren im Vergleich zu nativen Rattennieren; N=3, n=3; \*\*\*  $p \leq 0,001$ , \*  $p \leq 0,05$ .

#### 4.3.2 Evaluierung der Zellviabilität mittels Hoechst- und Calcein AM-Fluoreszenzfärbung

Der Nachweis der Zellviabilität mittels Hoechst- und Calcein AM-Färbung wurde an Tag 1 und 14 durchgeführt.

In der Fluoreszenzfärbung nach Hoechst konnten nach 14 Tagen vitale Rattenosteoblasten in allen Kulturen mit dezellularisierten Rattennieren (0,66% / 3% SDS) nachgewiesen werden. Es war keine Hintergrundfärbung im Sinne freier DNA erkennbar. In der Calcein AM-Färbung zeigte sich weder eine Fragmentierung der Zellen noch ein Austritt der Färbelösung im Sinne einer Integritätsstörung der Zellmembran (vgl. Abb. 12).

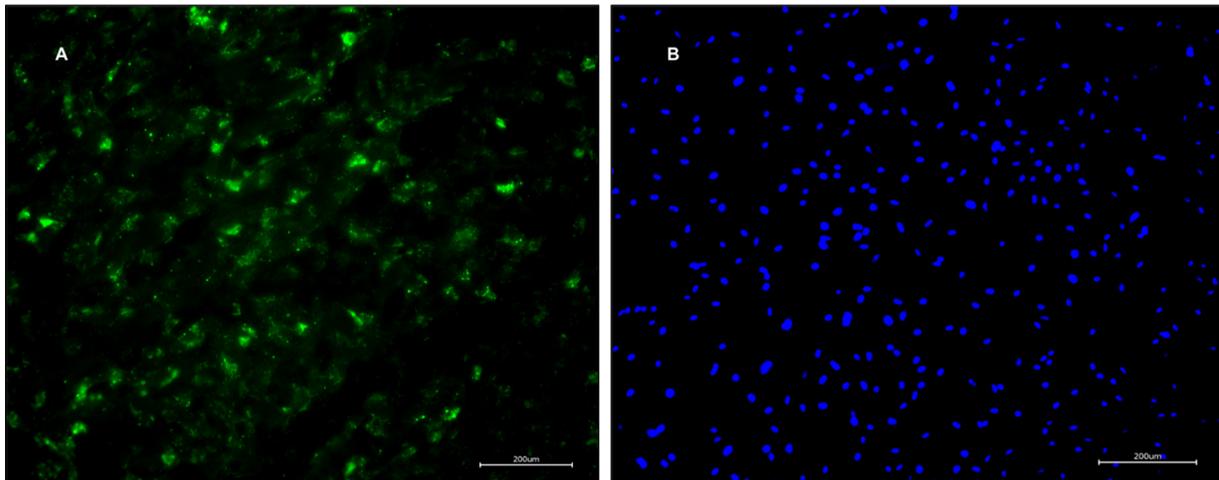


Abb. 12: Calcein AM- und Hoechst-Färbung Rattenosteoblasten und dezellularisierte Rattenniere: Repräsentative Abbildung Calcein AM- (grün, A) und Hoechst- (blau, B) Färbung Rattenosteoblasten (rOBs) mit dezellularisierter Rattenniere (3% SDS) Tag 14, n=3, 10-fach Vergrößerung: Es zeigen sich lebendige Zellen; keine Fragmentierung der Zellen; keine Hintergrundfärbung im Sinne freier DNA.

### 4.3.3 Funktionsnachweis der Rattenosteoblasten

#### 4.3.3.1 Alkalische Phosphatase-Aktivität

Die Evaluierung der Osteoblastenfunktion und -differenzierung erfolgte durch die Quantifizierung der alkalischen Phosphatase (AP)-Aktivität an Tag 1 und 14 der *in vitro* Zellkultur. Die gemessenen Werte der AP-Aktivität wurden jeweils auf die Alamar Blue Werte der entsprechenden Gruppen normiert.

Es zeigte sich eine signifikante Aktivitätszunahme der alkalischen Phosphatase von Tag 1 bis Tag 14 der Zellkultur, sowohl der Rattenosteoblasten in der 2D- als auch jener in der 3D-Kultur mit den dezellularisierten Rattennieren ( $p=0,05$ ) (vgl. Abb. 13).

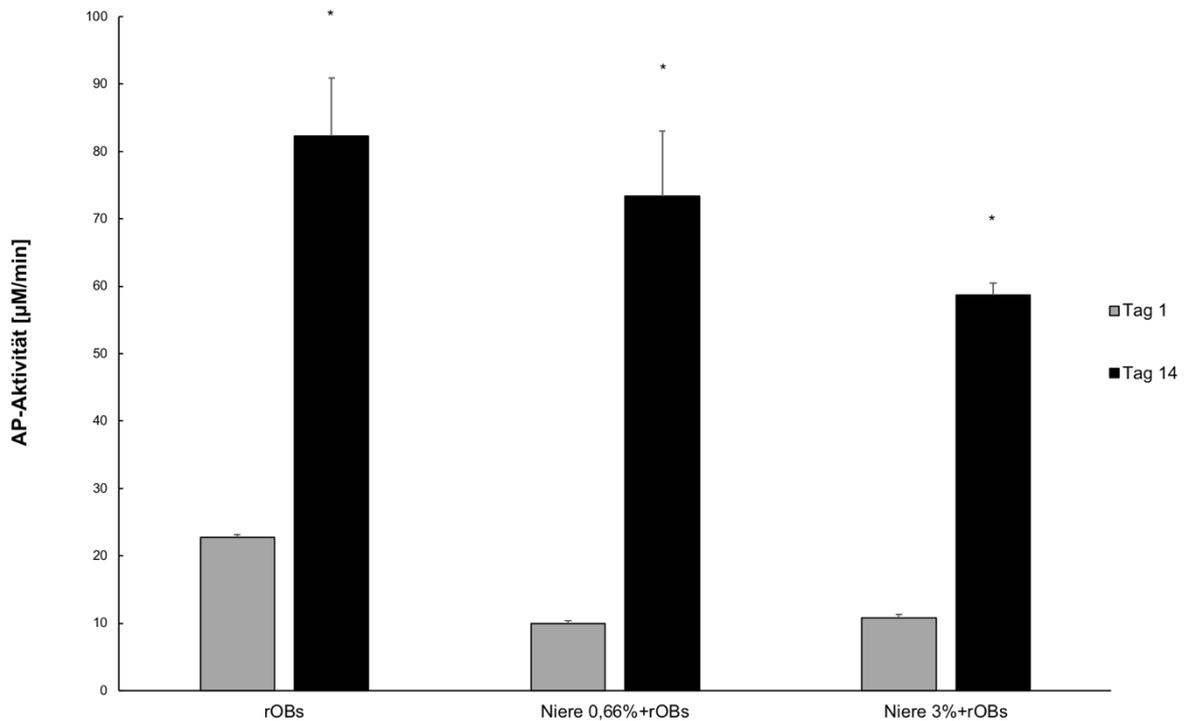


Abb. 13: Alkalische Phosphatase-Aktivität (AP-Aktivität) Rattenosteoblasten und dezellularisierte Rattennieren normiert auf die entsprechenden Alamar Blue Werte: Signifikante Zunahme der AP-Aktivität der Rattenosteoblasten von Tag 1 bis Tag 14. N=3, n=3; \*  $p \leq 0,05$ .

An Tag 14 zeigten die rOBs in 3D-Kultur im Vergleich zu der Kontrollgruppe (2D-Kultur der rOBs) keinen signifikanten Unterschied in der AP-Aktivität (vgl. Abb. 14). Im Vergleich der beiden Dezellularisierungsprotokolle konnte nach zweiwöchiger Kultur ebenfalls kein signifikanter Unterschied der AP-Aktivität der rOBs festgestellt werden.

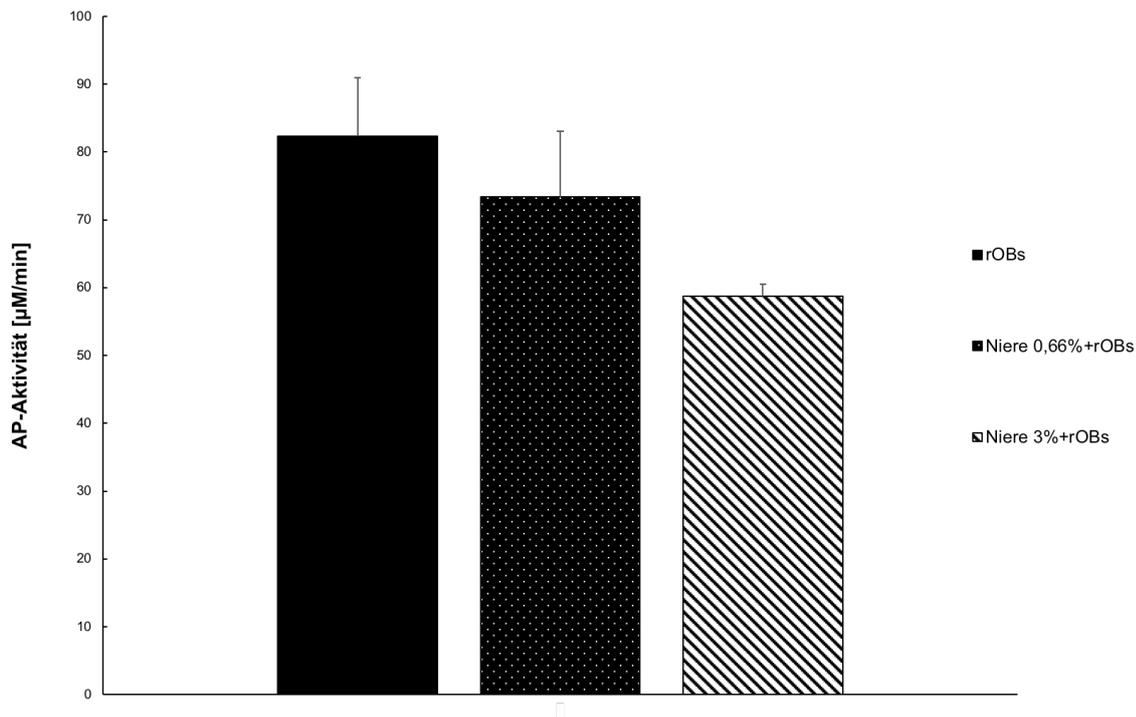


Abb. 14: Alkalische Phosphatase-Aktivität (AP-Aktivität) Rattenosteoblasten und dezellularisierte Rattennieren Tag 14 normiert auf die entsprechenden Alamar Blue Werte: Kein statistisch signifikanter Unterschied der AP-Aktivität der Rattenosteoblasten (rOBs) in der 3D-Kultur (0,66% und 3% SDS) an Tag 14 im Vergleich zu der 2D-Kontrollkultur. N=3, n=3.

#### 4.3.3.2 Alkalische Phosphatase-Färbung

Die Darstellung der osteoblastären Differenzierung bzw. Funktion der Rattenosteoblasten erfolgte mittels AP-Färbung an Tag 1 und 14.

Nach Anfärben der Rattenosteoblasten konnte in der Hellfeldmikroskopie an Tag 1 und 14 der Zellkultur mit den dezellularisierten Rattennieren (0,66% SDS / 3% SDS) die Expression der alkalischen Phosphatase nachgewiesen werden (vgl. Abb. 15). Diese zeigte sich intrazellulär ohne Hintergrundfärbung im Gewebe der Nierenscaffolds.



Abb. 15: Alkalische Phosphatase-Färbung (AP-Färbung) Rattenosteoblasten und dezellularisierte Rattenniere: Repräsentative Abbildung AP-Färbung Rattenosteoblasten mit dezellularisierter Rattenniere (0,66% SDS) Tag 14, n=3, 4-fach Vergrößerung: Nachweis von intrazellulärer AP-Aktivität (lila).

#### **4.4 Einfluss der Bioscaffolds auf die Proliferation und Funktion differenzierter Zellen einer anderen Spezies**

Um den Einfluss der Bioscaffolds aus dezellularisierten Rattennieren auf die Proliferation und Funktion differenzierter Zellen einer anderen Spezies zu untersuchen wurden die Gefrierschnitte von nativen und dezellularisierten Rattennieren für 14 Tage mit humanen Osteoblasten (hOBs) kultiviert. Die Zellzahl und Viabilität wurden mittels Alamar Blue Assay, Calcein AM- und Hoechst-Färbung analysiert. Die Funktion der Osteoblasten wurde mittels alkalische Phosphatase-Aktivitätsmessung und -Färbung untersucht.

#### 4.4.1 Messung der Zellzahl und –viabilität mittels Alamar Blue Assay

Die Messung der Zellzahl und Viabilität der humanen Osteoblasten erfolgte an Tag 1, 4, 7 und 14.

Die humanen Osteoblasten zeigten sowohl in der 2D-Kultur als auch in der 3D-Kultur mit den dezellularisierten Rattennieren (3% SDS) eine kontinuierliche, hochsignifikante Proliferation ( $p \leq 0,001$ ) zwischen Tag 1 und Tag 14 (vgl. Abb. 16, Abb. 17). In der Kultur der hOBs mit den weniger aggressiv dezellularisierten Rattennieren (0,66% SDS) zeigte sich eine signifikante Proliferation zwischen Tag 1 und 7 der *in vitro* Zellkultur (vgl. Abb. 18).

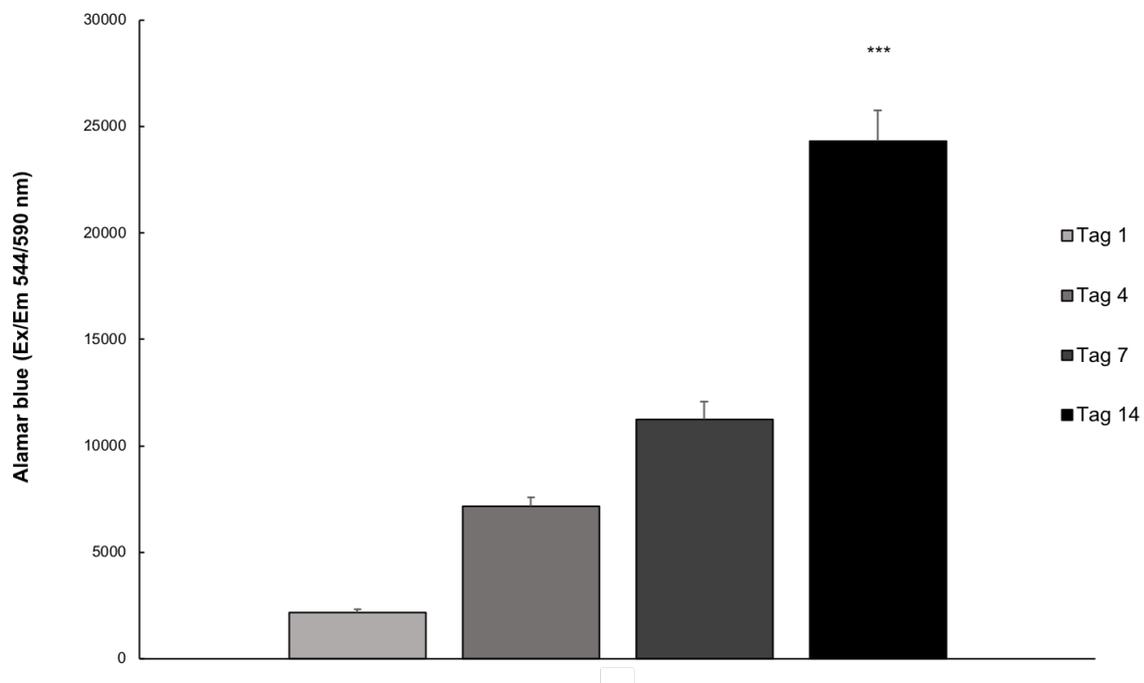


Abb. 16: Alamar Blue Assay humane Osteoblasten: Hochsignifikante kontinuierliche Proliferation der humanen Osteoblasten in der 2D-Kultur über 14 Tage. N=3, n=3; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

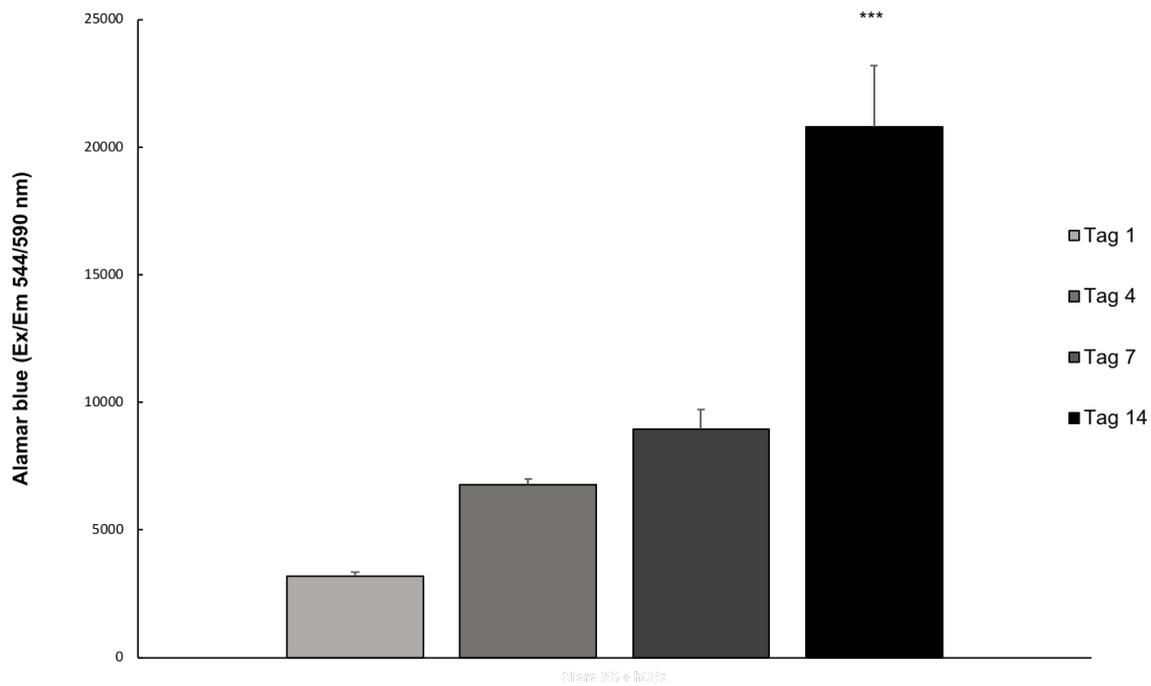


Abb. 17: Alamar Blue Assay humane Osteoblasten und dezellularisierte Rattennieren 3% SDS: Hochsignifikante kontinuierliche Proliferation der humanen Osteoblasten in der 3D-Kultur mit dezellularisierten Rattennieren (3% SDS) über 14 Tage. N=3, n=3; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

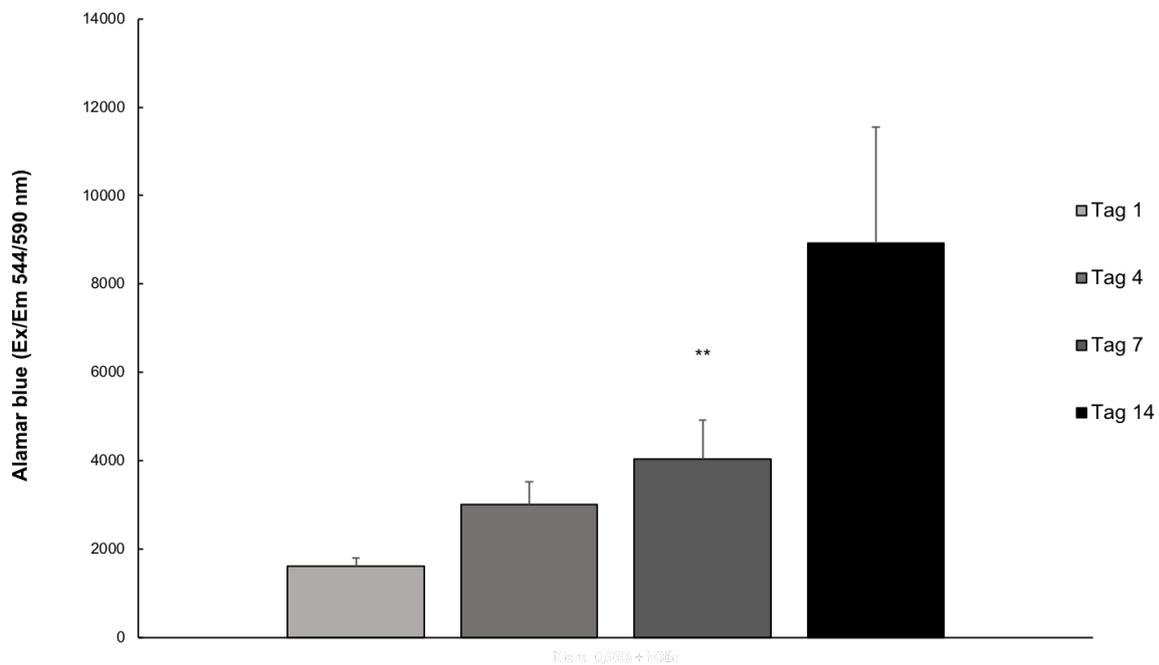


Abb. 18: Alamar Blue Assay humane Osteoblasten und dezellularisierte Rattennieren 0,66% SDS: Signifikante Proliferation der humanen Osteoblasten in der 3D-Kultur mit dezellularisierten Rattennieren (0,66% SDS) zwischen Tag 1 und Tag 7. N=3, n=3; \*\*  $p \leq 0,01$ .

In der 3D-Kultur mit den dezellularisierten Rattennieren konnte im Vergleich zu der 3D-Kultur mit den nativen Rattennieren eine hochsignifikant (3% SDS;  $p \leq 0,001$ ) bzw.

signifikant (0,66% SDS;  $p \leq 0,05$ ) erhöhte Proliferation der hOBs gemessen werden. Im Vergleich der beiden Dezellularisierungsprotokolle (3% SDS vs. 0,66% SDS) zeigte sich eine hochsignifikant höhere Proliferation ( $p \leq 0,001$ ) der hOBs in Kultur mit den aggressiver dezellularisierten Rattennieren (3% SDS) (vgl. Abb. 19).

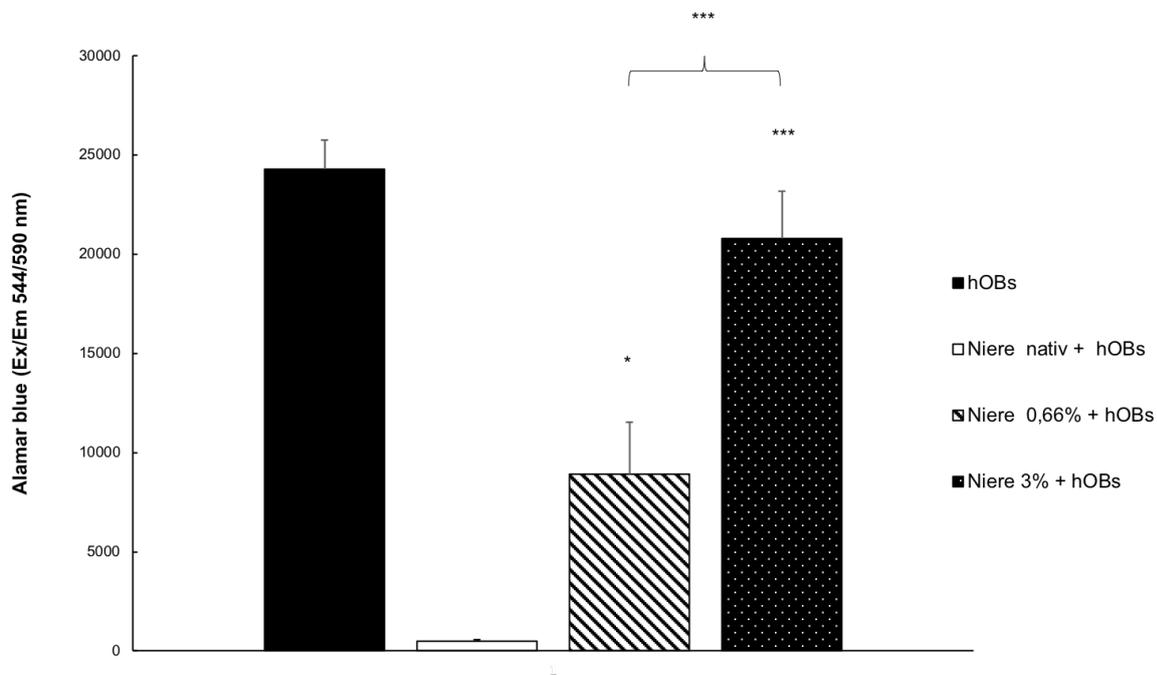


Abb. 19: Alamar Blue Assay humane Osteoblasten und Rattennieren Tag 14: Hochsignifikante (3% SDS) bzw. signifikant (0,66% SDS) höhere Proliferation der humanen Osteoblasten (hOBs) in der 3D-Kultur mit den dezellularisierten Rattennieren im Vergleich zu der Kultur mit den nativen Rattennieren. Hochsignifikant höhere Proliferation der hOBs in Kultur mit den aggressiver dezellularisierten Rattennieren (3% SDS vs. 0,66% SDS). N=3, n=3; \*\*\*  $p \leq 0,001$ , \*  $p \leq 0,05$ .

#### 4.4.2 Evaluierung der Zellviabilität mittels Hoechst- und Calcein AM-Fluoreszenzfärbung

Der Nachweis der Zellviabilität mittels Hoechst- und Calcein AM-Färbung wurde an Tag 1 und 14 durchgeführt.

In der Fluoreszenzfärbung nach Hoechst konnten nach 14 Tagen vitale humane Osteoblasten in allen Kulturen mit dezellularisierten Rattennieren (0,66% / 3% SDS) nachgewiesen werden. Es war keine Hintergrundfärbung im Sinne freier DNA erkennbar. In der Calcein AM-Färbung zeigte sich weder eine Fragmentierung der Zellen noch ein Austritt der Färbelösung im Sinne einer Integritätsstörung der Zellmembran (vgl. Abb. 20).

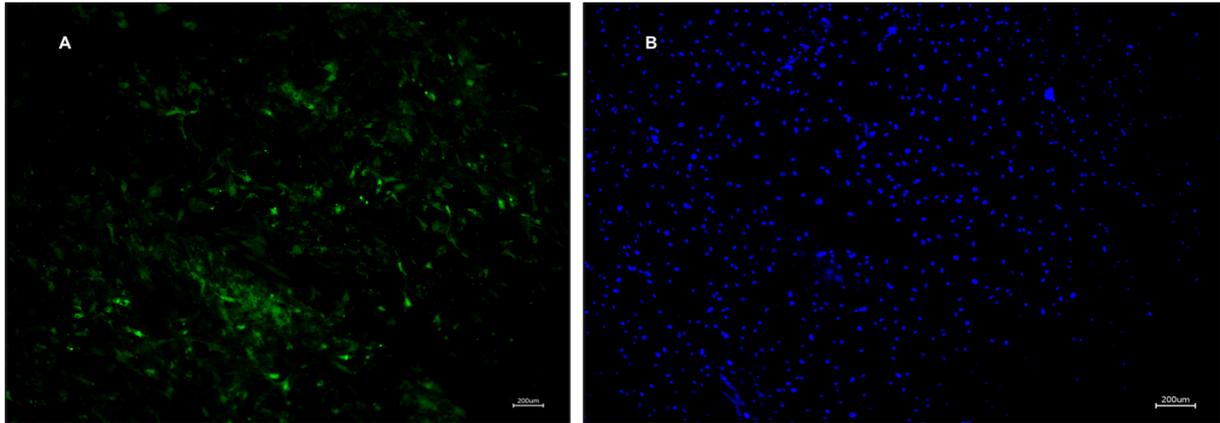


Abb. 20: Calcein AM- und Hoechst-Färbung humane Osteoblasten und dezellularisierte Rattenniere: Repräsentative Abbildung Calcein AM- (grün, A) und Hoechst- (blau, B) Färbung humane Osteoblasten mit dezellularisierter Rattenniere (0,66% SDS) Tag 14, n=3, 4-fach Vergrößerung: Es zeigen sich lebendige Zellen; keine Fragmentierung der Zellen; keine Hintergrundfärbung im Sinne freier DNA.

#### 4.4.4 Funktionsnachweis der humanen Osteoblasten

##### 4.4.4.1 Alkalische Phosphatase-Aktivität

Die Evaluierung der Osteoblastenfunktion und -differenzierung erfolgte durch die Quantifizierung der AP-Aktivität an Tag 1 und 14 der *in vitro* Zellkultur. Die Werte der AP-Aktivität wurden auf die entsprechenden Werte des Alamar Blue Assays normiert.

Es zeigte sich eine signifikante Aktivitätszunahme der alkalischen Phosphatase von Tag 1 bis Tag 14, sowohl der humanen Osteoblasten in der 2D- als auch jener in der 3D-Kultur ( $p=0,05$ ) (vgl. Abb. 21).

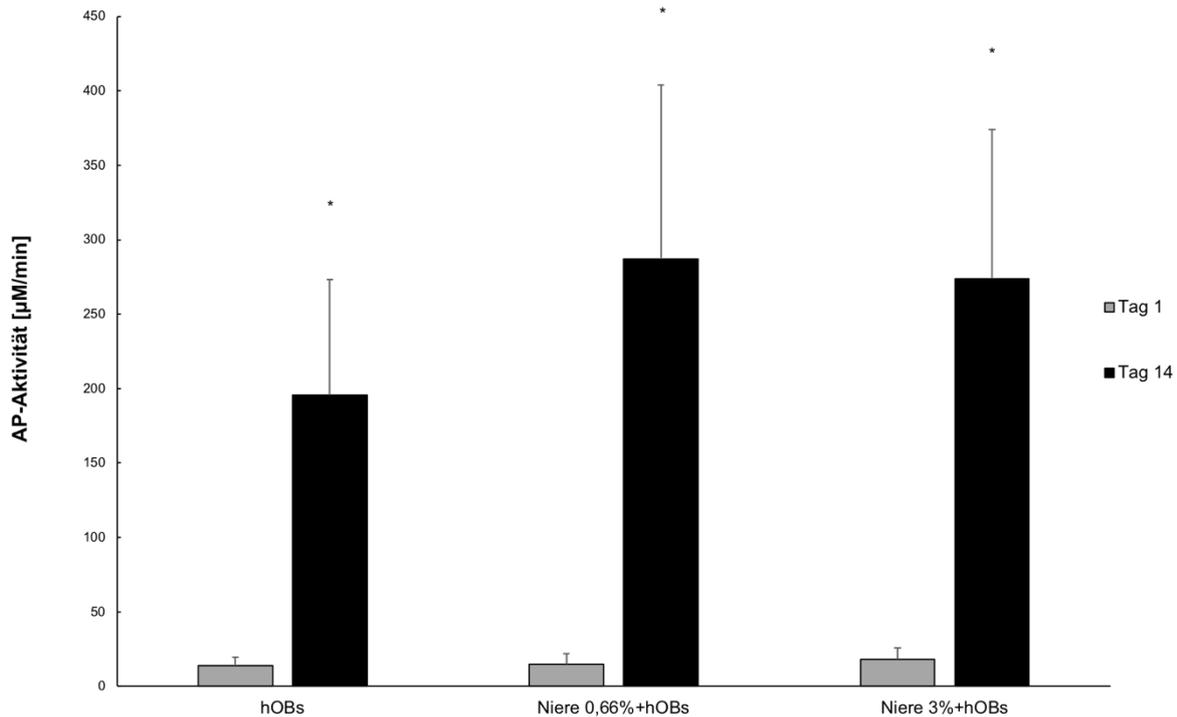


Abb. 21: Alkalische Phosphatase-Aktivität (AP-Aktivität) humane Osteoblasten und dezellularisierte Rattennieren normiert auf die entsprechenden Alamar Blue Werte: Signifikante Zunahme der AP-Aktivität der humanen Osteoblasten (hOBs) in der 2D- und 3D-Kultur von Tag 1 bis Tag 14. N=3, n=3; \*  $p \leq 0,05$ .

Im Vergleich zu der 2D-Kultur konnte in der Kultur der hOBs mit den dezellularisierten Rattennieren an Tag 14 unabhängig von der SDS Konzentration der Dezellularisierungslösung kein signifikanter Unterschied der AP-Aktivität gemessen werden (vgl.

Abb. 22).

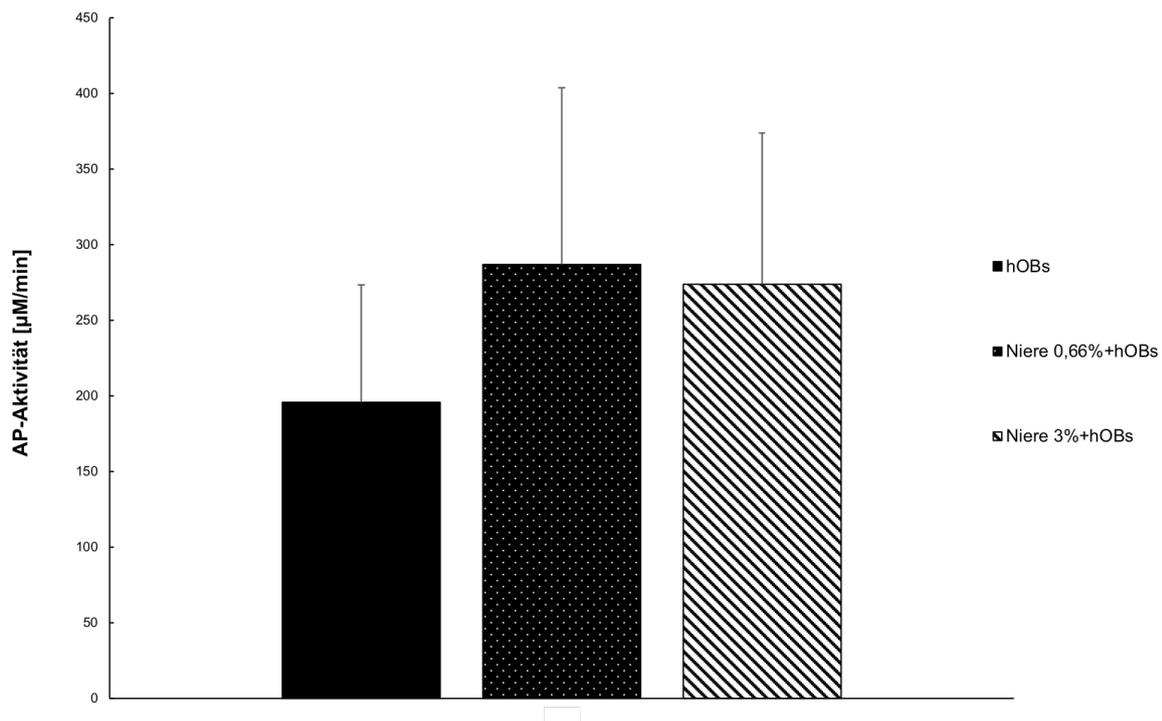


Abb. 22: Alkalische Phosphatase-Aktivität (AP-Aktivität) humane Osteoblasten und dezellularisierte Rattennieren Tag 14 normiert auf die entsprechenden Alamar Blue Werte: Es zeigt sich kein statistischer Unterschied in der AP-Aktivität der humanen Osteoblasten (hOBs) in der 3D-Kultur (0,66% und 3% SDS) an Tag 14 im Vergleich zu der 2D-Kontrollkultur. Kein statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich der beiden Dezellularisierungsprotokolle (0,66% vs. 3% SDS); N=3, n=3.

#### 4.4.4.2 Alkalische Phosphatase-Färbung

Die Färbung der alkalischen Phosphatase der humanen Osteoblasten an Tag 1 und 14 wurde benutzt, um die Funktion der Zellen darzustellen.

Nach Anfärben der humanen Osteoblasten konnte in der Hellfeldmikroskopie an Tag 1 und 14 der Zellkultur mit den dezellularisierten Rattennieren (0,66% SDS / 3% SDS) die Expression der alkalischen Phosphatase nachgewiesen werden (vgl. Abb. 23). Diese zeigte sich intrazellulär ohne Hintergrundfärbung im Gewebe der Nierenscaffolds.



Abb. 23: Alkalische Phosphatase-Färbung (AP-Färbung) humane Osteoblasten und dezellularisierte Rattenniere: Repräsentative Abbildung AP-Färbung humane Osteoblasten (hOBs) mit dezellularisierter Rattenniere (0,66% SDS) Tag 14, n=3, 10-fach Vergrößerung: Nachweis von intrazellulärer AP-Aktivität (lila).

## **5 Diskussion**

Mit dieser Arbeit konnten neue Erkenntnisse zur Anwendung dezellularisierter Gewebe als Biomatrices im Tissue Engineering gewonnen werden. Hintergrund der Arbeit ist die potentielle Anwendung von biologischen Scaffolds im Bereich der Knochenregeneration über Art- und Gewebegrenzen hinaus. In diesem Kontext sollte der Einfluss von unterschiedlich aggressiv dezellularisierten Rattennieren als Bioscaffolds auf Ratten- und humane Osteoblasten, sowie die Immunreaktion artfremder Immunzellen (hPBMCs) auf die Bioscaffolds untersucht werden. Unsere Ergebnisse weisen darauf hin, dass die dezellularisierten Rattennieren als universelle Scaffolds für das Tissue Engineering von gewebe- und artfremden Geweben einsetzbar sein können.

Im Nachfolgenden werden die Ergebnisse dieser Dissertation diskutiert. Zunächst erfolgt die kritische Auseinandersetzung mit der verwendeten Dezellularisierungstechnik. Anschließend folgt die Interpretation der Ergebnisse zur Untersuchung der Immunreaktion von humanen PBMCs auf die Nierenscaffolds. Des Weiteren werden die Ergebnisse bezüglich des Einflusses der Bioscaffolds auf art- und gewebefremde Osteoblasten diskutiert. Abschließend soll der Wert der hier vorgestellten Ergebnisse im Gesamtkontext des Tissue Engineerings beurteilt werden.

### **5.1 Dezellularisierung ganzer Organe**

Das Ziel der Dezellularisierung ganzer Organe über ihr Gefäßsystem ist es, ein Bioscaffold zu generieren, das zwei wichtige Eigenschaften eines idealen Scaffolds für das Tissue Engineering vereint. Einerseits wird ein Bioscaffold geschaffen, das aus der natürlichen Extrazellulärmatrix besteht und deren Mikrostruktur, Zusammensetzung und biomechanische Eigenschaften besitzt. Andererseits soll das Problem der fehlenden Vaskularisierung neu gezüchteter Gewebe adressiert werden, indem das vorhandene natürliche Gefäßsystem des Organs weiter benutzt wird. Jagodzinski et al. erbrachten 2004 mit der erfolgreichen Perfusionsdezellularisierung von Dünndarmarkaden über das dazugehörige Gefäßsystem den proof of principle dieses Verfahrens (Jagodzinski, Cebotari et al. 2004). Seither entwickelte sich die Perfusionsdezellularisierung ganzer Organe mit Erhalt des ursprünglichen Gefäßsystems zu einem vielgenutzten Ansatz im Tissue Engineering. Vielfach wird dieser in der aktuellen Literatur für solide Organe wie Leber, Lunge, Herz und Nieren

beschrieben (Ott, Matthiesen et al. 2008, Ross, Williams et al. 2009, Ott, Clippinger et al. 2010, Uygun, Soto-Gutierrez et al. 2010, Song, Guyette et al. 2013).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Rattennieren durch Perfusionsdezellularisierung mit vier unterschiedlich aggressiven SDS-Lösungen (0,5% / 0,66% / 1% / 3% SDS) dezellularisiert. Als erstes Kriterium für die vollständige Dezellularisierung eines Organes oder Gewebes gilt die Transluzenz (Ott, Matthiesen et al. 2008, Ross, Williams et al. 2009, Nakayama, Batchelder et al. 2010, Uygun, Soto-Gutierrez et al. 2010). Unabhängig von der verwendeten SDS Konzentration zeigten sich die Rattennieren nach Abschluss der Dezellularisierung vollständig transluzent. Die makroskopische Form und Beschaffenheit der Rattennieren veränderte sich im Vergleich zum nativen Organ nicht. Makroskopisch konnte während der Perfusionsdezellularisierung zudem die Funktionalität des Gefäßsystems durch den kontinuierlichen Abfluss der Spülflüssigkeiten über die V. renalis überprüft werden. Um das Gefäßsystem genauer darzustellen und dessen Funktionalität bis in die Kapillaren zu überprüfen, ist aufgrund der Transluzenz dezellularisierter Organe die Injektion von Farbstoff über den arteriellen Gefäßzugang möglich und in der Literatur mehrfach beschrieben (Uygun, Soto-Gutierrez et al. 2010, Hellstrom, El-Akouri et al. 2014). Darauf wurde im Rahmen dieser Dissertation verzichtet, da in vorangegangenen Versuchen unserer Arbeitsgruppe nach der Dezellularisierung mit dem hier verwendeten Protokoll das intakte Gefäßsystem mittels Injektion von Allura Red Gel bereits bestätigt werden konnte (Burgkart, Tron et al. 2014).

Trotz intensiver Forschung zur Perfusionsdezellularisierung ganzer Organe in den letzten Jahren gibt es vor allem aufgrund der Heterogenität der Gewebe bisher kein Standardverfahren. Wie bereits erläutert, stehen für die Dezellularisierung von Geweben grundsätzlich verschiedenste Methoden (chemisch, physikalisch, enzymatisch), sowie deren Kombinationen, zur Verfügung. Die Art der Dezellularisierungsmethode muss in Abhängigkeit der Gewebeart gewählt werden, da Eigenschaften wie die unterschiedliche Zell- und Matrixdichte eines Gewebes berücksichtigt werden müssen (Keane, Swinehart et al. 2015).

Im Bereich der chemischen Zellentfernung sind SDS und Triton X-100 die meistgenutzten Agentien. Triton X-100 als nicht-ionisches Detergens kann Lipid-Lipid- und Lipid-Protein-Verbindungen solubilisieren, wohingegen das ionische Detergens SDS auch Protein-Protein-Verbindungen aufbrechen kann (Gilbert, Sellaro et al. 2006,

Crapo, Gilbert et al. 2011). SDS kann deshalb die Biomatrices stärker denaturieren und gilt als vergleichsweise aggressives Dezellularisierungsagent.

Rezente Studien zur Perfusionsdezellularisierung unterschiedlicher Organe konnten die effektive Zellentfernung durch SDS bestätigen. Ott et al. verglichen beispielsweise die Perfusionsdezellularisierung von Rattenherzen mit SDS, PEG (Polyethylenglycol) und Triton X-100. Hinsichtlich der Entfernung von DNA und intrazellulären Strukturproteinen zeigte sich das ionische Detergens SDS gegenüber PEG und dem nicht-ionischen Detergens Triton X-100 überlegen (Ott, Matthiesen et al. 2008). Bei der Dezellularisierung von Lebergewebe konnte ebenfalls die Überlegenheit von SDS gegenüber Triton X-100 hinsichtlich der vollständigeren Entfernung zytoplasmatischer und nukleärer Reste gezeigt werden (Ren, Shi et al. 2013). Die Relevanz einer effektiven Dezellularisierung für die erfolgreiche Anwendung von Bioscaffolds im Tissue Engineering wurde bereits in vielen Studien verdeutlicht. Verbliebene DNA und Zellreste in Bioscaffolds führten regelhaft zu einer Stimulierung der Immunantwort des Empfängerorganismus und schließlich zu der nicht erwünschten inflammatorischen Reaktion (Zheng, Chen et al. 2005, Choi, Choi et al. 2012, Keane, Swinehart et al. 2015, Hussein, Park et al. 2016).

Das hier verwendete Dezellularisierungsprotokoll für Rattennieren wurde zuvor in unserer Arbeitsgruppe entwickelt und standardisiert. Burgkart et al. konnten in rezenten Untersuchungen bereits zeigen, dass nach der Perfusionsdezellularisierung der Rattennieren mit einer Mindestkonzentration von 0,66% SDS und einer Mindestperfusionszeit von einer Stunde weder in der Hämatoxylin-Eosin (HE-) noch in der SybrGreen-Färbung Zellkerne nachgewiesen werden konnten. Die direkte Messung des DNA-Gehaltes in den dezellularisierten Bioscaffolds lag unterhalb der Nachweisgrenze von 2 ng/ $\mu$ l (Burgkart, Tron et al. 2014). Deshalb wurde im Rahmen dieser Dissertation auf eine ausführlichere, histologische Untersuchung der Bioscaffolds verzichtet.

Ein weiteres essentielles Kriterium, das bei der Herstellung eines Bioscaffolds durch Dezellularisierung berücksichtigt werden sollte, ist der Erhalt der Architektur und Struktur der Extrazellulärmatrix. Die bereits zuvor in unserer Arbeitsgruppe durchgeführte histologische Evaluierung zeigte, dass nach Verwendung unseres standardisierten Dezellularisierungsprotokolls die Architektur der Nieren mit ihren Glomeruli und Gefäßstrukturen erhalten bleibt. Das Weiterbestehen der Basalmembran wurde durch den immunhistochemischen Nachweis von Laminin und

Fibronektin bestätigt (Burgkart, Tron et al. 2014). Beispiele erfolgreicher Perfusionsdezellularisierung von Ratten-, Schweine- und sogar humanen Nieren mit SDS sind in der Literatur inzwischen vielfach beschrieben. Diese Studien zeigten ebenfalls eine effektive Entfernung von Zellen und Zellresten ohne Zerstörung der vaskulären, glomerulären oder tubulären Strukturen (Ross, Williams et al. 2009, Song, Guyette et al. 2013, Bonandrini, Figliuzzi et al. 2014, Guan, Liu et al. 2015, He, Callanan et al. 2016).

## **5.2 Immunogenität der Bioscaffolds aus dezellularisierten Rattennieren**

Über das letzte Jahrzehnt entwickelte sich die Dezellularisierung nativer Gewebe zu einem weit verbreiteten und vielfach angewandten Verfahren, um Scaffolds für das Tissue Engineering herzustellen (Crapo, Gilbert et al. 2011). Ziel der Dezellularisierung eines Gewebes ist es, eine intakte Extrazellulärmatrix ohne Zellen zu erhalten, die auch als xenogenes Scaffold verwendet werden kann, ohne eine Immunreaktion des Empfängerorganismus hervorzurufen. Diese Methode, das immunologische Potential eines Gewebes zu reduzieren, gründet auf der Annahme, dass erstens die zelluläre Komponente eines Gewebes die Hauptkomponente für das Auslösen einer immunologischen Reaktion darstellt und zweitens die Abwesenheit der Zellen mit der Entfernung der antigenen Komponenten korreliert (Wong and Griffiths 2014). Viele dezellularisierte Matrices unterschiedlicher Herkunft gelten als gut verträglich hinsichtlich der Biokompatibilität und etwaiger Immunreaktionen. Es konnten frühe Erfolge in der klinischen Anwendung von EZM-Scaffolds, wie beispielsweise die Harnröhrenplastik aus Schweinedünndarmmukosa (Mantovani, Trinchieri et al. 2003), erzielt werden. Des Weiteren sind dezellularisierte Herzklappen, Blutgefäße, sowie EZM-Scaffolds der Haut, Harnblase oder des Perikards bereits klinisch evaluiert worden (Cebotari, Tudorache et al. 2010, Crapo, Gilbert et al. 2011, Dohmen 2012, Moroni and Mirabella 2014). Jedoch ist ebenfalls gezeigt worden, dass auch eine weniger starke Immunantwort auf die Scaffolds zu einem Funktionsverlust oder einer Destruktion des Gewebes führen können (Sandor, Xu et al. 2008). Es wird von lokalen inflammatorischen Prozessen berichtet, die zu degenerativen Veränderungen und Gewebeverkalkungen und somit letztendlich zur einer Beeinträchtigung der Transplantatfunktion führen (Simon, Kasimir et al. 2003, Ruffer, Purbojo et al. 2010, Cicha, Ruffer et al. 2011).

Gerade bei der Verwendung xenogener Biomaterialien stellt die hervorgerufene Immunantwort des Empfängers und die daraus resultierenden Effekte auf die Form und Funktion der Biomaterialien die kritische Barriere für die translationale Anwendung in der klinischen Medizin dar (Platt, DiSesa et al. 2002, Badylak 2014). Es muss gewährleistet werden, dass das angeborene Immunsystem des Empfängers auf eine nicht-destruktive, vorzugsweise konstruktive Art und Weise auf das Biomaterial reagiert (Badylak 2014).

Ein Ziel dieser Arbeit war deshalb die Immunreaktion humaner Zellen auf die xenogenen Bioscaffolds aus dezellularisierten Rattennieren zu untersuchen. Hierzu wurden humane mononukleäre Zellen des peripheren Blutes verschiedener Spender für sechs Stunden mit dezellularisierten und nativen Rattennieren inkubiert und anschließend die Konzentration der Zytokine TNF- $\alpha$  und Interleukin-10 quantifiziert. Das proinflammatorische Zytokin TNF- $\alpha$  wird von Makrophagen und Monozyten während einer akuten Entzündungsreaktion produziert und führt über diverse Signalwege innerhalb der Zellen zu einer Nekrose oder Apoptose der Zellen (Idriss and Naismith 2000). Im Rahmen unserer Versuche zeigte sich bei Exposition der hPBMCs gegenüber nativen Rattennieren eine hochsignifikant höhere Konzentration von TNF- $\alpha$  im Vergleich zu der Negativkontrolle (hPBMCs ohne Scaffold). Die erhöhte TNF- $\alpha$  Ausschüttung der humanen Immunzellen zeigt die inflammatorische Reaktion der Zellen auf die xenogenen Epitope der Rattennierenzellen, welche ebenfalls bei einer akuten Transplantatabstoßung (Maury and Teppo 1987, Imagawa, Millis et al. 1990, Imagawa, Millis et al. 1990, Pizarro, Malinowska et al. 1993) nachzuweisen ist.

Durch die Perfusionsdezellularisierung der Rattennieren mit SDS-Lösung (0,5% / 0,66% / 1% / 3%) sollten die ansässigen Zellen und Zellreste mitsamt der xenogenen Epitope aus den Rattennieren entfernt und somit die Immunogenität der Rattennieren effektiv reduziert werden. Es konnte nach Inkubation der Rattennierenhälften aus dezellularisierten Rattennieren mit den hPBMCs eine hochsignifikante Reduktion der TNF- $\alpha$  Ausschüttung im Vergleich zu der Gruppe mit den nativen Rattennieren erreicht werden. Die durch die hPBMCs ausgeschütteten TNF- $\alpha$  Konzentrationen lagen nach Dezellularisierung der Rattennieren im Bereich der Negativkontrolle (alleinige Kultur der hPBMCs). Durch die Verwendung unterschiedlich aggressiver Dezellularisierungsprotokolle sollte zusätzlich untersucht werden, ob eine stärkere Denaturierung der Bioscaffolds zu einer weiteren Reduzierung der Immunogenität führt. Zwischen den vier unterschiedlich aggressiven

Dezellularisierungsprotokollen (0,5% / 0,66% / 1% / 3% SDS) konnte jedoch kein signifikanter Unterschied in der TNF- $\alpha$  Ausschüttung festgestellt werden. Dies kann dadurch erklärbar sein, dass SDS als aggressives ionisches Detergens bereits in niedriger Konzentration (0,5% / 0,66%) die xenogenen Epitope effektiv entfernt.

Nach Inkubation der hPBMCs mit den Rattennieren, wurde neben der Messung der TNF- $\alpha$  Konzentration auch die Ausschüttung von IL-10 quantifiziert. IL-10 ist ein wichtiges antiinflammatorisches und regulierendes Zytokin. Es kann die Synthese verschiedener anderer Zytokine, wie beispielsweise der proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$ , hemmen und dadurch der Entzündungsreaktion entgegenwirken (de Waal Malefyt, Abrams et al. 1991, Siegmund, Eigler et al. 1997, Conti, Kempuraj et al. 2003). Über einen negativen Feedback-Mechanismus schützt IL-10 außerdem vor einer überschießenden antiinflammatorischen Wirkung (Platzer, Meisel et al. 1995, Wajant, Pfizenmaier et al. 2003, Sandor, Xu et al. 2008). Umgekehrt wird die Ausschüttung von IL-10 durch das proinflammatorische TNF- $\alpha$  gefördert. Die gegenseitige Regulierung zwischen TNF- $\alpha$  und IL-10 trägt somit zur wichtigen Balance zwischen pro- und antiinflammatorischen Mediatoren bei (Siegmund, Eigler et al. 1997, Conti, Kempuraj et al. 2003).

In unserem Setting zeigten die hPBMCs ebenfalls eine veränderte Expression des immunmodulatorischen IL-10 auf native Rattennieren, nicht aber auf die dezellularisierten Rattennieren. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Ausschüttung von IL-10 durch das pro-inflammatorische TNF- $\alpha$  gefördert wird (Siegmund, Eigler et al. 1997, Conti, Kempuraj et al. 2003). Diese gegenseitige Regulierung kann die erhöhte IL-10 Ausschüttung als Reaktion auf die erhöhte TNF- $\alpha$  Konzentration bei Inkubation der hPBMCs mit den nativen Rattennieren erklären und zeigt eine Aktivierung des Immunsystems durch das xenogene Gewebe. Diese Aktivierung des Immunsystems wurde durch die dezellularisierten Rattennieren nicht ausgelöst.

Zur Kontrolle der Immunkompetenz der hPBMCs wurden die Zellen mit Lipopolysacchariden stimuliert. Lipopolysaccharide als Bestandteile der äußeren Zellwand in gramnegativen Bakterien sind potente Stimulatoren von Monozyten und Makrophagen (Idriss and Naismith 2000, Wajant, Pfizenmaier et al. 2003, Chanteux, Guisset et al. 2007). Es ist bestätigt, dass LPS über intrazelluläre Signalwege pro- und antiinflammatorische Gene, unter anderem TNF- $\alpha$  und IL-10, aktiviert (Chanteux, Guisset et al. 2007). Dies geschieht über die Bindung an das LPS-bindende Protein und den Transport zum Oberflächenrezeptor CD14. Über den Toll-like-Rezeptor 4

(TLR4) und das akzessorischen Protein MD2 (Bochud and Calandra 2003) aktiviert LPS auf diese Art und Weise mehrere intrazelluläre Signaltransduktionswege inklusive der drei Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kaskade (MAPK) Signalwege. Diese Signalwege wiederum aktivieren eine Reihe von Transkriptionsfaktoren, die die Induktion von Genen, die für pro- und antiinflammatorische Zytokine kodieren, hervorruft (Chanteux, Guisset et al. 2007). In unserem Versuch konnte nach Stimulation der hPBMCs mit LPS eine signifikant erhöhte Ausschüttung von TNF- $\alpha$  im Vergleich zu den nicht-stimulierten hPBMCs nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurde nach sechs Stunden Inkubation der hPBMCs mit LPS kein signifikanter Anstieg der IL-10 Konzentration im Vergleich zu der IL-10 Ausschüttung der nicht stimulierten hPBMCs detektiert. Aus der Literatur wird ersichtlich, dass der fehlende Anstieg der IL-10 Konzentration durch die kurze Inkubationsdauer von sechs Stunden erklärbar sein kann. Chanteux et al. untersuchten die IL-10-Freisetzung von Alveolarmakrophagen nach Stimulation mit LPS. Hier zeigte sich eine verzögerte Freisetzung von IL-10 erst sechs Stunden nach Inkubation mit einer maximalen Konzentration nach 24 Stunden. Zudem konnte hier eine lineare Abhängigkeit von der verwendeten LPS Konzentration gezeigt werden (Chanteux, Guisset et al. 2007). De Waal Malefyt et al. aktivierten ebenfalls humane Monozyten mit LPS. Erhöhte IL-10 Konzentrationen konnten auch hier erst verzögert sieben Stunden nach Aktivierung der Monozyten gemessen werden. Die Maximalwerte der IL-10 Konzentration zeigten sich erst nach 24-48 Stunden (de Waal Malefyt, Abrams et al. 1991). Diese Beobachtungen unterstützen die Annahme, dass eine mögliche Erhöhung der IL-10 Konzentration erst zeitverzögert nach Ende unserer Inkubation auftreten hätte können. Deshalb sind die hier gewonnenen Ergebnisse hinsichtlich der Ausschüttung von IL-10 kritisch zu betrachten. Aufgrund der Ausschüttung von TNF- $\alpha$  kann jedoch davon ausgegangen werden, dass die humanen PBMCs immunkompetent waren.

Zusammenfassend konnte weder eine erhöhte Konzentration des pro-inflammatorischen TNF- $\alpha$ , noch des antiinflammatorischen und immunmodulatorischen IL-10 als Reaktion der humanen Immunzellen auf die dezellularisierten Rattennieren gemessen werden. Diese Ergebnisse unterstützen die Idee, dass die Immunogenität von xenogenen Bioscaffolds durch eine aggressive Dezellularisierung soweit reduziert werden kann, dass es im kurzfristigen Verlauf nicht zu der unerwünschten inflammatorischen Immunreaktion des Empfängerorganismus kommt.

Eine Vielzahl von *in vitro* Tests wird derzeit in der Literatur beschrieben, um die Immunogenität von Scaffolds gegenüber verschiedenen Zellen zu untersuchen. Unter diesen zahlreichen Evaluierungsmöglichkeiten finden sich in der Literatur auch mit unseren Versuchen vergleichbare Ansätze zur Untersuchung der Immunogenität dezellularisierter Tissue Engineering-Konstrukte. Seyler et al. inkubierten xenogene Bioscaffolds aus dezellularisierten Schweinepatellarsehnen mit einer humanen monozytären Zelllinie (THP-1-Zellen). In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen zeigte sich hier eine Reduzierung der gemessenen TNF- $\alpha$  Ausschüttung der humanen Zellen bei Exposition mit den dezellularisierten Sehnen im Vergleich zu der nativen Sehne und LPS-Kontrollgruppe (Seyler, Bracey et al. 2017). Ähnliche Versuchsansätze sind auch für die Evaluierung der Immunogenität xenogener Leberscaffolds beschrieben (Hussein, Park et al. 2013). Vorteil dieser *in vitro* Untersuchungen ist die einfache und kostengünstige Durchführung. Aufgrund der Simplizität der Tests im Vergleich zu den komplexen Interaktionen, die *in vivo* stattfinden, ergeben sich jedoch Limitationen in der Interpretation der Ergebnisse (Seyler, Bracey et al. 2017).

Zusammenfassend konnte in unserem *in vitro*-Setting gezeigt werden, dass durch die Kombination von physikalischer und chemischer Perfusionsdezellularisierung mit SDS eine deutliche Reduktion der proinflammatorischen Antwort humaner PBMCs auf die xenogenen Bioscaffolds aus Rattennieren erreicht wird. Eine Erhöhung der SDS Konzentration konnte die Immunogenität der Scaffolds jedoch nicht weiter reduzieren. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass SDS als aggressives ionisches Detergens xenogene Epitope auch in geringerer Konzentration effektiv entfernen kann.

### **5.3 Einfluss der Bioscaffolds auf die Proliferation und Funktion differenzierter Zellen eines anderen Gewebetyps und einer anderen Spezies**

Zu den wichtigen Eigenschaften von Scaffolds im Tissue Engineering gehören neben der Biokompatibilität auch bioinduktive Eigenschaften wie die Unterstützung der Zelladhäsion, der Zellproliferation sowie der Aktivität und Differenzierung verschiedener Zelltypen (Stevens 2008, Lichte, Pape et al. 2011, O'Brien 2011, Badylak 2014). Hinsichtlich dieser Eigenschaften zeigten sich biologische Scaffolds aus der natürlich vorkommenden Extrazellulärmatrix gegenüber anderen

Trägermaterialien überlegen (Badylak 2007). Als eines der führenden Probleme zur Regeneration von Gewebe in größerem Umfang kristallisierte sich jedoch die fehlende Vaskularisierung des gezüchteten Gewebes heraus (Rouwkema and Khademhosseini 2016). Als Lösungsansatz wurde die Dezellularisierung ganzer Organe mit Erhalt des ursprünglichen Gefäßsystems entwickelt. Spätestens seit der entscheidenden Publikation von Ott et al. 2008 (Ott, Matthiesen et al. 2008) zur erfolgreichen De- und Rezellularisierung von Rattenherzen ist das „whole organ engineering“ ein vielversprechender Ansatz zur Regeneration patientenspezifischer Organe bzw. Gewebe größeren Umfangs. Im Tiermodell konnten erste Erfolge bei der Reimplantation von Organen verzeichnet werden, die zunächst dezellularisiert und mit gewebespezifischen Zellen rezellularisiert wurden. Für die Rezellularisierung wurden bisher jedoch vorrangig organ- bzw. gewebespezifische Zellen verwendet (Kardiomyozyten (Ott, Matthiesen et al. 2008), Hepatozyten (Uygun, Soto-Gutierrez et al. 2010), Alveolarzellen (Ott, Clippinger et al. 2010, Petersen, Calle et al. 2010), neonatale Nierenzellen (Song, Guyette et al. 2013)), mit dem Ziel das Ursprungsorgan zu regenerieren. In Anlehnung an die rezenten Erfolge im „whole organ engineering“ sollte nun das Potential einer art- und gewebeüberschreitenden Anwendung der EZM-Scaffolds aus dezellularisierten Rattennieren evaluiert werden.

Da im ersten Versuchsteil hinsichtlich der Aktivierung der angeborenen Immunabwehr kein signifikanter Unterschied zwischen den Nieren mit verschiedenen aggressiven Dezellularisierungsprotokollen (0,5% / 0,66% / 1% / 3% SDS) festgestellt werden konnte, wurden im Anschluss lediglich zwei verschiedene Dezellularisierungslösungen (0,66% / 3% SDS) verwendet. In unserem Setting konnte über den gesamten Zeitraum von 14 Tagen eine kontinuierliche Proliferation der gewebefremden Osteoblasten (Human und Ratte) in der Kultur mit den dezellularisierten Nierenscaffolds (0,66% / 3% SDS) nachgewiesen werden. Nach 14 Tagen zeigten sich die Zellen vital. Morphologisch war keine Fragmentierung der Zellen zu beobachten, die Zellmembran blieb intakt.

Die gewebefremden, aber artgleichen Rattenosteoblasten wiesen insgesamt eine größere Proliferation in der 3D-Kultur im Vergleich zu der 2D-Kultur auf. Eine aggressivere Dezellularisierung führte bei den rOBs jedoch zu keiner vermehrten Proliferation. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Bioscaffolds aus dezellularisierten Rattennieren die Proliferation der Rattenosteoblasten fördern können und somit auch für gewebefremde Zellen bioinduktive Eigenschaften besitzen.

In der Kultur der humanen Osteoblasten zeigte sich im Gegensatz dazu eine signifikant höhere Proliferation der Zellen in Kultur mit den aggressiver dezellularisierten Bioscaffolds (3% vs. 0,66% SDS). Wie bereits beschrieben gilt SDS als ein aggressives Detergens zur Dezellularisierung von solidem Gewebe und kann als ionisches Detergens auch Protein-Protein-Verbindungen angreifen. Dies resultiert in Abhängigkeit der verwendeten SDS Konzentration und Expositionsdauer in einer Reduktion des DNA- und Proteingehaltes und einer verstärkten Denaturierung der EZM (Seddon, Curnow et al. 2004, Woods and Gratzer 2005, Boer, Buettner et al. 2014). Gerade für die universelle Anwendung einer Biomatrix ist eine partielle Denaturierung wünschenswert, um gewebespezifische Signale aus der EZM, welche potentiell immunogen wirken können, zu eliminieren (Burgkart, Tron et al. 2014). Die signifikant bessere Proliferation der art- und gewebefremden humanen Osteoblasten in Kultur mit den stärker denaturierten Bioscaffolds weist darauf hin, dass für die erfolgreiche xenogene Anwendung der Biomatrix eine stärkere Denaturierung der EZM vorteilhaft ist bzw. eine zusätzliche Eliminierung von Antigenen notwendig sein kann.

Zu den wichtigen bioinduktiven Eigenschaften eines Scaffolds im Tissue Engineering gehört neben der Förderung der Zelladhäsion und -proliferation auch die Unterstützung der Zellaktivität und -differenzierung (Stevens 2008, Lichte, Pape et al. 2011, O'Brien 2011, Badylak 2014). Es ist bekannt, dass hierfür Zell-Matrix-Interaktionen eine kritische Rolle spielen (Garcia and Reyes 2005, Ross, Williams et al. 2009). Die Kommunikation zwischen den Zellen und der EZM wird dabei vor allem durch spezifische auf den Zellen exprimierte Integrine vermittelt (Garcia and Reyes 2005). Die native EZM enthält zudem eine Vielzahl an Signalen, die, vermittelt durch Integrine, die Differenzierung und Proliferation der ansässigen Zellen regulieren (Danen 2001). Jedoch bestehen in Abhängigkeit des Gewebeursprungs und der ansässigen Zellen Unterschiede in der Zusammensetzung und Mikrostruktur der EZM und somit auch der gewebespezifischen Signale (Brown, Lindberg et al. 2006). In der Literatur wurde beschrieben, dass auch die EZM dezellularisierter Gewebe Signale des ursprünglichen Gewebes enthalten kann, die zu einer Dedifferenzierung neu gesäter Zellen führen können (Ross, Williams et al. 2009). Gerade hinsichtlich der gewebeüberschreitenden Anwendung von EZM-Bioscaffolds ist deshalb nicht nur die Untersuchung der Zellproliferation, sondern vor allem die der Zelldifferenzierung von besonderer Bedeutung. Dazu erfolgte im Rahmen der 14-tägigen *in vitro*-Kultur der humanen und Rattenosteoblasten mit den Gefrierschnitten der dezellularisierten

Rattennieren (0,66% / 3% SDS) die quantitative Messung der AP-Aktivität, sowie die mikroskopische Darstellung mittels Anfärben der alkalischen Phosphatase. Über den Zeitraum von 14 Tagen zeigte sich sowohl in den 2D-Zellkulturen der Ratten- und humanen Osteoblasten als auch in den 3D-Kulturen der Zellen mit den dezellularisierten Rattennieren eine kontinuierliche Expression der alkalischen Phosphatase. Zwischen den Dezellularisierungsprotokollen (0,66% / 3% SDS) zeigte sich bei beiden Zellarten kein statistischer Unterschied. Die Ergebnisse der quantitativen Evaluierung der AP-Aktivität konnten in der Hellfeldmikroskopie nach Anfärben der alkalischen Phosphatase an Tag 1 und 14 bestätigt werden. Somit konnte gezeigt werden, dass es in unserem Setting über einen Zeitraum von 14 Tagen zu keiner Dedifferenzierung der Osteoblasten durch Interaktionen mit der EZM der dezellularisierten Rattennieren kommt. Ein Zusammenhang mit der Aggressivität der Dezellularisierung konnte hier im Gegensatz zu der Proliferation der Osteoblasten nicht festgestellt werden. Dies kann dadurch erklärbar sein, dass SDS als aggressives ionisches Detergens gewebespezifische Signale bereits in niedrigerer Konzentration ausreichend reduzieren kann (Gilbert, Sellaro et al. 2006).

## 5.4 Konklusion

Die Arbeit präsentiert eine Methode, Bioscaffolds aus Rattennieren herzustellen, die für die art- und gewebeübergreifende Anwendung im Tissue Engineering geeignet sind, ohne eine Aktivierung der angeborenen Immunantwort hervorzurufen. Die Rattennieren wurden zunächst physikalisch sowie anschließend chemisch mittels Perfusion des ionischen Detergens SDS über das erhaltene Gefäßsystem dezellularisiert. Hinsichtlich der Biokompatibilität zeigte sich in der Kultur mit humanen PBMCs keine Aktivierung des angeborenen Immunsystems im Sinne einer vermehrten Ausschüttung des proinflammatorischen Zytokins TNF- $\alpha$  oder des immunmodulierenden Interleukin-10. Zudem konnten gewebefremde Rattenosteoblasten sowie art- und gewebefremde humane Osteoblasten für 14 Tage in der *in vitro*-Kultur mit den Bioscaffolds überleben und kontinuierlich proliferieren. Eine aggressivere Dezellularisierung mit einer vermehrten Denaturierung der EZM hat sich in der Kultur mit den humanen Osteoblasten, also der xenogenen Anwendung, als vorteilhaft gezeigt. Des Weiteren zeigten histochemische Untersuchungen, dass es zu keiner Dedifferenzierung der Osteoblasten durch die EZM-Bioscaffolds aus dezellulierten Rattennieren kommt. Es konnte über 14 Tage eine kontinuierliche Expression der alkalischen Phosphatase als Osteoblastenmarker nachgewiesen werden. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Bioscaffolds aus dezellulierten Rattennieren das Potential zur Anwendung im Tissue Engineering über Art- und Gewebegrenzen hinaus besitzen. Unsere *in vitro* Untersuchungen deuten hierbei darauf hin, dass sie womöglich keine wesentliche Reaktion der angeborenen Immunantwort hervorrufen. Sie schaffen eine Mikroumgebung, in der art- und gewebefremde Zellen proliferieren können und die zellspezifische Aktivität nicht gehemmt wird. Die Arbeit untermauert, dass diese Dezellularisierungstechnik das Potential hat, eine Plattformtechnologie für das Tissue Engineering zu werden. Sie kann eine potentiell universell anwendbare, einfach herzustellende Matrix schaffen, die zudem das bisher ungelöste Problem der Vaskularisierung adressiert.

## 5.5 Limitationen und Ausblick

Die Arbeit präsentiert, über Art- und Gewebegrenzen hinaus, erste vielversprechende Ergebnisse zur Anwendung von dezellularisierten Organen für das Tissue Engineering. Allerdings stellen die im Rahmen der Dissertation durchgeführten Versuche ein erstes Modell dar, sodass die Ergebnisse aufgrund folgender Limitationen kritisch zu betrachten sind: Die Untersuchungen wurden über einen relativ kurzen Zeitraum von 14 Tagen in einer *in vitro*-Kultur durchgeführt. Langzeituntersuchungen gefolgt von Reimplantationsversuchen *in vivo* sind deshalb notwendig. Das hier verwendete zeiteffektive Protokoll zur Dezellularisierung zeigte bereits in vorangegangenen Studien vielversprechende Ergebnisse hinsichtlich der zuverlässigen und reproduzierbaren Entfernung von Zellen und Zellbestandteilen sowie dem Erhalt wichtiger Strukturproteine (Burgkart, Tron et al. 2014) und wurde für die Dezellularisierung von Rattennieren optimiert. Es ist jedoch anzunehmen, dass die Dezellularisierungskinetik in anderem bzw. umfangreichem Gewebe unterschiedlich ist und eine Anpassung des Protokolls notwendig macht. Dies ist vor allem hinsichtlich des Ziels der klinischen Anwendung der Bioscaffolds von großer Bedeutung, da für den Ersatz und die Regeneration, beispielsweise größerer Knochendefekte, umfangreichere Tissue Engineering Konstrukte benötigt werden.

Als proof of principle für die Anwendung der Bioscaffolds über Art- und Gewebegrenzen hinaus, wurde im Rahmen dieser Arbeit lediglich eine Zellart (Osteoblasten) getestet. Da Knochengewebe ein vergleichbar einfach konfiguriertes Gewebe des menschlichen Organismus darstellt, sind weitere Studien mit komplexeren Geweben und der Kombination aus verschiedenen Zellarten erforderlich.

Das Endziel des Tissue Engineering, geschädigtes Gewebe durch Entwicklung und Transplantation biologischer Ersatzgewebe in größerem Umfang zu regenerieren, ist vor allem durch die Vaskularisierung der Tissue Engineering-Konstrukte sowie bei xenogener Anwendung durch die Immunreaktion des Empfängerorganismus limitiert. Die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Versuche adressieren diese beiden Hauptprobleme, sodass die Ergebnisse im Rahmen der Grundlagenforschung im Tissue Engineering als relevant anzusehen sind und Ansatzpunkte für zukünftige Forschung und Weiterentwicklung im „whole organ engineering“ liefern.

## 6 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die Immunogenität bzw. Biokompatibilität dreidimensionaler dezellularisierter Bioscaffolds aus Rattennieren in der art- und gewebeüberschreitenden Tissue Engineering-Anwendung zu untersuchen. Im Rahmen der Versuche konnte gezeigt werden, dass die Perfusionsdezellularisierung mit SDS-Lösung zu einer deutlichen Reduktion der Immunogenität der Rattennieren führte. Die verminderte Immunogenität konnte durch Inkubation mit humanen mononukleären Zellen des peripheren Blutes (hPBMCs) nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu unbehandeltem Nierengewebe führte die Inkubation mit dezellularisiertem Gewebe zu keiner nachweisbaren Aktivierung der Ausschüttung des proinflammatorischen Zytokins TNF- $\alpha$ , oder zu einer veränderten Expression des immunmodulatorischen Interleukin-10. Durch eine aggressivere Dezellularisierung mit höheren SDS Konzentrationen konnte keine weitere Reduktion der Immunogenität erreicht werden.

In den weiteren Versuchen konnte gezeigt werden, dass Zellen eines anderen Gewebetyps und gleicher Spezies sowie eines anderen Gewebetyps und anderer Spezies in der Kultur mit den dezellularisierten Rattennieren über einen Zeitraum von 14 Tagen überleben und proliferieren können. Bei den artfremden Zellen zeigte sich hierbei eine ausgeprägte Korrelation zwischen der Aggressivität der Dezellularisierung der Rattennieren (verwendete SDS Konzentration) und des Proliferationsvermögens. In der Kultur mit den artgleichen Rattenosteoblasten konnte diese Abhängigkeit nicht nachgewiesen werden. Dies kann auf eine erhöhte Immunogenität der Bioscaffolds bei milder Dezellularisierung zurück zu führen sein. Die Ergebnisse zeigen, dass insbesondere für die art- und gewebefremde Anwendung eine aggressivere Dezellularisierung mit stärkerer Denaturierung der Matrix notwendig ist.

Des Weiteren konnte sowohl in den kultivierten Rattenosteoblasten als auch in den humanen Osteoblasten eine kontinuierliche Aktivität von alkalischer Phosphatase, einem wichtigen Osteoblastenmarker, nachgewiesen werden. Die kontinuierliche Expression der alkalischen Phosphatase belegt, dass sowohl die art- als auch gewebefremden Zellen nicht nur in den dezellularisierten Nieren proliferieren, sondern dabei auch ihre osteoblastäre Differenzierung beibehalten können.

Die Arbeit untermauert, dass die Perfusionsdezellularisierungstechnik mit SDS-Lösung das Potential hat, eine Plattformtechnologie für das Tissue Engineering zu werden. Sie kann eine potentiell universell auch über Artgrenzen hinaus

anwendbare, einfach herzustellende Matrix mit erhaltenem Gefäßbaum schaffen. Diese kann dazu beitragen, das bisher ungelöste Problem der Vaskularisierung im Tissue Engineering solider Gewebe zu lösen. Eine entscheidende Rolle spielt hierbei vermutlich die Aggressivität der Dezellularisierung und somit der Grad der Denaturierung der Matrix, da sich in unseren Versuchen das stark denaturierende Dezellularisierungsprotokoll mit 3% SDS hinsichtlich der Biokompatibilität überlegen zeigte.

## 7 Literatur

Ahmed, S. A., R. M. Gogal, Jr. and J. E. Walsh (1994). "A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay." J Immunol Methods **170**(2): 211-224.

Ansaloni, L., P. Cambrini, F. Catena, S. Di Saverio, S. Gagliardi, F. Gazzotti, J. P. Hodde, D. W. Metzger, L. D'Alessandro and A. D. Pinna (2007). "Immune response to small intestinal submucosa (surgisis) implant in humans: preliminary observations." J Invest Surg **20**(4): 237-241.

Atala, A. (2004). "Tissue engineering and regenerative medicine: concepts for clinical application." Rejuvenation Res **7**(1): 15-31.

Babensee, J. E., J. M. Anderson, L. V. McIntire and A. G. Mikos (1998). "Host response to tissue engineered devices." Advanced Drug Delivery Reviews **33**(1-2): 111-139.

Bader, A., T. Schilling, O. E. Teebken, G. Brandes, T. Herden, G. Steinhoff and A. Haverich (1998). "Tissue engineering of heart valves--human endothelial cell seeding of detergent acellularized porcine valves." Eur J Cardiothorac Surg **14**(3): 279-284.

Badylak, S. F. (2004). "Xenogeneic extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction." Transpl Immunol **12**(3-4): 367-377.

Badylak, S. F. (2007). "The extracellular matrix as a biologic scaffold material." Biomaterials **28**(25): 3587-3593.

Badylak, S. F. (2014). "Decellularized allogeneic and xenogeneic tissue as a bioscaffold for regenerative medicine: factors that influence the host response." Ann Biomed Eng **42**(7): 1517-1527.

Badylak, S. F., A. C. Coffey, G. C. Lantz, W. A. Tacker and L. A. Geddes "Comparison of the resistance to infection of intestinal submucosa arterial autografts versus polytetrafluoroethylene arterial prostheses in a dog model." Journal of Vascular Surgery **19**(3): 465-472.

Badylak, S. F. and T. W. Gilbert (2008). "Immune response to biologic scaffold materials." Semin Immunol **20**(2): 109-116.

Badylak, S. F., G. C. Lantz, A. Coffey and L. A. Geddes (1989). "Small intestinal submucosa as a large diameter vascular graft in the dog." J Surg Res **47**(1): 74-80.

Bissell, M. J. and J. Aggeler (1987). "Dynamic reciprocity: how do extracellular matrix and hormones direct gene expression?" Prog Clin Biol Res **249**: 251-262.

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

Black, C. R. M., V. Goriainov, D. Gibbs, J. Kanczler, R. S. Tare and R. O. C. Oreffo (2015). "Bone Tissue Engineering." Curr Mol Biol Rep **1**(3): 132-140.

Bochud, P. Y. and T. Calandra (2003). "Pathogenesis of sepsis: new concepts and implications for future treatment." BMJ **326**(7383): 262-266.

Boer, U., F. F. Buettner, M. Klingenberg, G. C. Antonopoulos, H. Meyer, A. Haverich and M. Wilhelmi (2014). "Immunogenicity of intensively decellularized equine carotid arteries is conferred by the extracellular matrix protein collagen type VI." PLoS One **9**(8): e105964.

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

Bonewald, L. F. (1999). "Regulation and regulatory activities of transforming growth factor beta." Crit Rev Eukaryot Gene Expr **9**(1): 33-44.

Boudreau, N., C. Myers and M. J. Bissell (1995). "From laminin to lamin: regulation of tissue-specific gene expression by the ECM." Trends Cell Biol **5**(1): 1-4.

Brown, B., K. Lindberg, J. Reing, D. B. Stolz and S. F. Badylak (2006). "The basement membrane component of biologic scaffolds derived from extracellular matrix." Tissue Eng **12**(3): 519-526.

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

Butt, O. I., R. Carruth, V. K. Kutala, P. Kuppusamy and N. I. Moldovan (2007). "Stimulation of peri-implant vascularization with bone marrow-derived progenitor cells: monitoring by in vivo EPR oximetry." Tissue Eng **13**(8): 2053-2061.

Calori, G. M., E. Mazza, M. Colombo and C. Ripamonti (2011). "The use of bone-graft substitutes in large bone defects: any specific needs?" Injury **42 Suppl 2**: S56-63.

Cebotari, S., I. Tudorache, T. Jaekel, A. Hilfiker, S. Dorfman, W. Ternes, A. Haverich and A. Lichtenberg (2010). "Detergent decellularization of heart valves for tissue engineering: toxicological effects of residual detergents on human endothelial cells." Artif Organs **34**(3): 206-210.

Chanteux, H., A. C. Guisset, C. Pilette and Y. Sibille (2007). "LPS induces IL-10 production by human alveolar macrophages via MAPKs- and Sp1-dependent mechanisms." Respir Res **8**: 71.

Chaturvedi, R. R., K. R. Stevens, R. D. Solorzano, R. E. Schwartz, J. Eyckmans, J. D. Baranski, S. C. Stapleton, S. N. Bhatia and C. S. Chen (2015). "Patterning vascular networks in vivo for tissue engineering applications." Tissue Eng Part C Methods **21**(5): 509-517.

Chen, Y. C., R. Z. Lin, H. Qi, Y. Yang, H. Bae, J. M. Melero-Martin and A. Khademhosseini (2012). "Functional Human Vascular Network Generated in Photocrosslinkable Gelatin Methacrylate Hydrogels." Adv Funct Mater **22**(10): 2027-2039.

Choi, Y. C., J. S. Choi, B. S. Kim, J. D. Kim, H. I. Yoon and Y. W. Cho (2012). "Decellularized extracellular matrix derived from porcine adipose tissue as a xenogeneic biomaterial for tissue engineering." Tissue Eng Part C Methods **18**(11): 866-876.

Chow, D. C., L. A. Wenning, W. M. Miller and E. T. Papoutsakis (2001). "Modeling pO<sub>2</sub> distributions in the bone marrow hematopoietic compartment. I. Krogh's model." Biophys J **81**(2): 675-684.

Chow, D. C., L. A. Wenning, W. M. Miller and E. T. Papoutsakis (2001). "Modeling pO<sub>2</sub> distributions in the bone marrow hematopoietic compartment. II. Modified Kroghian models." Biophys J **81**(2): 685-696.

Cicha, I., A. Ruffer, R. Cesnjevar, M. Glöckler, A. Agaimy, W. G. Daniel, C. D. Garlichs and S. Dittrich (2011). "Early obstruction of decellularized xenogenic valves in pediatric patients: involvement of inflammatory and fibroproliferative processes." Cardiovascular Pathology **20**(4): 222-231.

Conti, P., D. Kempuraj, K. Kandere, M. Di Gioacchino, R. C. Barbacane, M. L. Castellani, M. Felaco, W. Boucher, R. Letourneau and T. C. Theoharides (2003). "IL-10, an inflammatory/inhibitory cytokine, but not always." Immunol Lett **86**(2): 123-129.

Crapo, P. M., T. W. Gilbert and S. F. Badylak (2011). "An overview of tissue and whole organ decellularization processes." Biomaterials **32**(12): 3233-3243.

Dahl, S. L., J. Koh, V. Prabhakar and L. E. Niklason (2003). "Decellularized native and engineered arterial scaffolds for transplantation." Cell Transplant **12**(6): 659-666.

Danen, E. H. (2001). "Fibronectin, integrins, and growth control

."

De Filippo, R. E., J. J. Yoo and A. Atala (2002). "Urethral replacement using cell seeded tubularized collagen matrices." J Urol **168**(4 Pt 2): 1789-1792; discussion 1792-1783.

de Waal Malefyt, R., J. Abrams, B. Bennett, C. G. Figdor and J. E. de Vries (1991). "Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes." J Exp Med **174**(5): 1209-1220.

Deporter, D. A., N. Komori, T. P. Howley, A. Shiga, A. Ghent, P. Hansel and K. Parisien (1988). "Reconstituted bovine skin collagen enhances healing of bone wounds in the rat calvaria." Calcif Tissue Int **42**(5): 321-325.

Dienstknecht, T., K. Eehalt, Z. Jenei-Lanzl, J. Zellner, M. Muller, A. Berner, M. Nerlich and P. Angele (2010). "Resazurin dye as a reliable tool for determination of cell number and viability in mesenchymal stem cell culture." Bull Exp Biol Med **150**(1): 157-159.

Dohmen, P. M. (2012). "Clinical results of implanted tissue engineered heart valves." HSR Proc Intensive Care Cardiovasc Anesth **4**(4): 225-231.

Dong, X., X. Wei, W. Yi, C. Gu, X. Kang, Y. Liu, Q. Li and D. Yi (2009). "RGD-modified acellular bovine pericardium as a bioprosthetic scaffold for tissue engineering." J Mater Sci Mater Med **20**(11): 2327-2336.

El-Amin, S. F., E. Botchwey, R. Tuli, M. D. Kofron, A. Mesfin, S. Sethuraman, R. S. Tuan and C. T. Laurencin (2006). "Human osteoblast cells: isolation, characterization, and growth on polymers for musculoskeletal tissue engineering." J Biomed Mater Res A **76**(3): 439-449.

Entwistle, J., S. Zhang, B. Yang, C. Wong, Q. Li, C. L. Hall, J. A. Mowat, A. H. Greenberg and E. A. Turley (1995). "Characterization of the murine gene encoding the hyaluronan receptor RHAMM." Gene **163**(2): 233-238.

Falke, G., J. J. Yoo, T. G. Kwon, R. Moreland and A. Atala (2003). "Formation of corporal tissue architecture in vivo using human cavernosal muscle and endothelial cells seeded on collagen matrices." Tissue Eng **9**(5): 871-879.

Farivar, R. S., F. Filsoufi and D. H. Adams (2003). "Mechanisms of Gal(alpha)1-3Gal(beta)1-4GlcNAc-R (alphaGal) expression on porcine valve endothelial cells." J Thorac Cardiovasc Surg **125**(2): 306-314.

Feil, G., M. Christ-Adler, S. Maurer, S. Corvin, H. O. Rennekampff, J. Krug, J. Hennenlotter, U. Kuehs, A. Stenzl and K. D. Sievert (2006). "Investigations of urothelial cells seeded on commercially available small intestine submucosa." Eur Urol **50**(6): 1330-1337.

Freytes, D. O., S. F. Badylak, T. J. Webster, L. A. Geddes and A. E. Rundell (2004). "Biaxial strength of multilaminated extracellular matrix scaffolds." Biomaterials **25**(12): 2353-2361.

Funamoto, S., K. Nam, T. Kimura, A. Murakoshi, Y. Hashimoto, K. Niwaya, S. Kitamura, T. Fujisato and A. Kishida (2010). "The use of high-hydrostatic pressure treatment to decellularize blood vessels." Biomaterials **31**(13): 3590-3595.

Galili, U. (1993). "Interaction of the natural anti-Gal antibody with  $\alpha$ -galactosyl epitopes: a major obstacle for xenotransplantation in humans." Immunology Today **14**(10): 480-482.

Galili, U. (2001). "The alpha-Gal epitope (Galalpha1-3Galbeta1-4GlcNAc-R) in xenotransplantation." Biochimie **83**(7): 557-563.

Gamba, P., M. Conconi, R. Lo Piccolo, G. Zara, R. Spinazzi and P. Parnigotto (2002). "Experimental abdominal wall defect repaired with acellular matrix." Pediatric Surgery International **18**(5): 327-331.

Garcia, A. J. and C. D. Reyes (2005). "Bio-adhesive surfaces to promote osteoblast differentiation and bone formation." J Dent Res **84**(5): 407-413.

Giannoudis, P. V., T. A. Einhorn and D. Marsh (2007). "Fracture healing: the diamond concept." Injury **38 Suppl 4**: S3-6.

Gilbert, T. W., T. L. Sellaro and S. F. Badylak (2006). "Decellularization of tissues and organs." Biomaterials **27**(19): 3675-3683.

Goissis, G., S. Suzigan, D. R. Parreira, J. V. Maniglia, D. M. Braile and S. Raymundo (2000). "Preparation and characterization of collagen-elastin matrices from blood vessels intended as small diameter vascular grafts." Artif Organs **24**(3): 217-223.

Goldberg, L. C., J. Lee, T. Cairns, A. Weymouth-Wilson, P. Simpson, C. Lawson, A. Hacking, R. Nilsson, N. Hakim and D. Taube (1996). "Polymorphism within the human anti-pig repertoire." Transplant Proc **28**(2): 549-550.

Good, A. H., D. K. Cooper, A. J. Malcolm, R. M. Ippolito, E. Koren, F. A. Neethling, Y. Ye, N. Zuhdi and L. R. Lamontagne (1992). "Identification of carbohydrate structures that bind human antiporcine antibodies: implications for discordant xenografting in humans." Transplantation proceedings **24**(2): 559-562.

Gorschewsky, O., A. Puetz, K. Riechert, A. Klakow and R. Becker (2005). "Quantitative analysis of biochemical characteristics of bone-patellar tendon-bone allografts." Biomed Mater Eng **15**(6): 403-411.

Grauss, R. W., M. G. Hazekamp, F. Oppenhuizen, C. J. van Munsteren, A. C. Gittenberger-de Groot and M. C. DeRuiter (2005). "Histological evaluation of decellularised porcine aortic valves: matrix changes due to different decellularisation methods." Eur J Cardiothorac Surg **27**(4): 566-571.

Griffith, L. G. and A. J. Grodzinsky (2001). "Advances in biomedical engineering." JAMA **285**(5): 556-561.

Guan, Y., S. Liu, C. Sun, G. Cheng, F. Kong, Y. Luan, X. Xie, S. Zhao, D. Zhang, J. Wang, K. Li and Y. Liu (2015). "The effective bioengineering method of implantation decellularized renal extracellular matrix scaffolds." Oncotarget **6**(34): 36126-36138.

Gulati, A. K. (1988). "Evaluation of acellular and cellular nerve grafts in repair of rat peripheral nerve." J Neurosurg **68**(1): 117-123.

Guo, S. and L. A. Dipietro (2010). "Factors affecting wound healing." J Dent Res **89**(3): 219-229.

Harris, H. (1990). "The human alkaline phosphatases: what we know and what we don't know." Clin Chim Acta **186**(2): 133-150.

He, M. and A. Callanan (2013). "Comparison of Methods for Whole-Organ Decellularization in Tissue Engineering of Bioartificial Organs." Tissue Engineering. Part B, Reviews **19**(3): 194-208.

He, M., A. Callanan, K. Lagaras, J. A. Steele and M. M. Stevens (2016). "Optimization of SDS exposure on preservation of ECM characteristics in whole organ decellularization of rat kidneys." J Biomed Mater Res B Appl Biomater.

Hellstrom, M., R. R. El-Akouri, C. Sihlbom, B. M. Olsson, J. Lengqvist, H. Backdahl, B. R. Johansson, M. Olausson, S. Sumitran-Holgersson and M. Brannstrom (2014). "Towards the development of a bioengineered uterus: comparison of different protocols for rat uterus decellularization." Acta Biomater **10**(12): 5034-5042.

Hoch, E., G. E. Tovar and K. Borchers (2014). "Bioprinting of artificial blood vessels: current approaches towards a demanding goal." Eur J Cardiothorac Surg **46**(5): 767-778.

Hodde, J., R. Record, R. Tullius and S. Badylak (2002). "Fibronectin peptides mediate HMEC adhesion to porcine-derived extracellular matrix." Biomaterials **23**(8): 1841-1848.

Hodde, J. P., S. F. Badylak, A. O. Brightman and S. L. Voytik-Harbin (1996). "Glycosaminoglycan content of small intestinal submucosa: a bioscaffold for tissue replacement." Tissue Eng **2**(3): 209-217.

Hodde, J. P., R. D. Record, H. A. Liang and S. F. Badylak (2001). "Vascular endothelial growth factor in porcine-derived extracellular matrix." Endothelium **8**(1): 11-24.

Human, P. and P. Zilla (2001). "Characterization of the immune response to valve bioprostheses and its role in primary tissue failure." Ann Thorac Surg **71**(5 Suppl): S385-388.

Hussein, K. H., K. M. Park, K. S. Kang and H. M. Woo (2016). "Biocompatibility evaluation of tissue-engineered decellularized scaffolds for biomedical application." Mater Sci Eng C Mater Biol Appl **67**: 766-778.

Hussein, K. H., K. M. Park, P. K. Teotia, J. W. Yang, H. M. Kim, S. H. Hong, S. R. Yang, I. C. Park, S. M. Park and H. M. Woo (2013). "Fabrication of a biodegradable xenoantigen-free rat liver scaffold for potential drug screening applications." Transplant Proc **45**(8): 3092-3096.

Hutmacher, D. W. (2000). "Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage." Biomaterials **21**(24): 2529-2543.

Idriss, H. T. and J. H. Naismith (2000). "TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s)." Microsc Res Tech **50**(3): 184-195.

Imagawa, D. K., J. M. Millis, K. M. Olthoff, L. J. Derus, D. Chia, L. R. Sugich, M. Ozawa, R. A. Dempsey, Y. Iwaki, P. J. Levy and et al. (1990). "The role of tumor necrosis factor in allograft rejection. I. Evidence that elevated levels of tumor necrosis factor-alpha predict rejection following orthotopic liver transplantation." Transplantation **50**(2): 219-225.

Imagawa, D. K., J. M. Millis, K. M. Olthoff, P. Seu, R. A. Dempsey, J. Hart, P. I. Terasaki, E. M. Wasef and R. W. Busuttill (1990). "The role of tumor necrosis factor in allograft rejection. II. Evidence that antibody therapy against tumor necrosis factor-alpha and lymphotoxin enhances cardiac allograft survival in rats." Transplantation **50**(2): 189-193.

Ingber, D. (1991). "Extracellular matrix and cell shape: potential control points for inhibition of angiogenesis." J Cell Biochem **47**(3): 236-241.

Ingulli, E. (2010). "Mechanism of cellular rejection in transplantation." Pediatr Nephrol **25**(1): 61-74.

Islam, L. N. and P. C. Wilkinson (1989). "Evaluation of methods for isolating human peripheral blood monocytes. Studies on chemotactic locomotion and other functional characteristics." J Immunol Methods **121**(1): 75-84.

Jackson, D. W., E. S. Grood, S. P. Arnoczky, D. L. Butler and T. M. Simon (1987). "Freeze dried anterior cruciate ligament allografts. Preliminary studies in a goat model." Am J Sports Med **15**(4): 295-303.

Jackson, D. W., E. S. Grood, B. T. Cohn, S. P. Arnoczky, T. M. Simon and J. F. Cummings (1991). "The effects of in situ freezing on the anterior cruciate ligament. An experimental study in goats." J Bone Joint Surg Am **73**(2): 201-213.

Jagodzinski, M., S. Cebotari, I. Tudorache, J. Zeichen, S. Hankermeier, C. Krettek, M. van Griensven and H. Mertisching (2004). "[Tissue engineering of long bones with a vascular matrix in a bioreactor]." Orthopade **33**(12): 1394-1400.

Jonsson, K. B., A. Frost, O. Nilsson, S. Ljunghall and O. Ljunggren (1999). "Three isolation techniques for primary culture of human osteoblast-like cells: a comparison." Acta Orthop Scand **70**(4): 365-373.

Kagami, S., S. Kondo, K. Loster, W. Reutter, M. Urushihara, A. Kitamura, S. Kobayashi and Y. Kuroda (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**(3): 728-732.

Kasimir, M. T., E. Rieder, G. Seebacher, G. Silberhumer, E. Wolner, G. Weigel and P. Simon (2003). "Comparison of different decellularization procedures of porcine heart valves." Int J Artif Organs **26**(5): 421-427.

Keane, T. J. and S. F. Badylak (2015). "The host response to allogeneic and xenogeneic biological scaffold materials." J Tissue Eng Regen Med **9**(5): 504-511.

Keane, T. J., I. T. Swinehart and S. F. Badylak (2015). "Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance." Methods **84**: 25-34.

Kneser, U., D. J. Schaefer, B. Munder, C. Klemt, C. Andree and G. B. Stark (2002). "Tissue engineering of bone." Minimally Invasive Therapy & Allied Technologies **11**(3): 107-116.

Koike, N., D. Fukumura, O. Gralla, P. Au, J. S. Schechner and R. K. Jain (2004). "Tissue engineering: creation of long-lasting blood vessels." Nature **428**(6979): 138-139.

Koren, E., M. Kujundzic, M. Koscec, F. A. Neethling, S. V. Richards, Y. Ye, N. Zuhdi and D. K. Cooper (1994). "Cytotoxic effects of human preformed anti-Gal IgG and complement on cultured pig cells." Transplant Proc **26**(3): 1336-1339.

Langer, R. (2000). "Biomaterials in drug delivery and tissue engineering: one laboratory's experience." Acc Chem Res **33**(2): 94-101.

Langer, R. and J. P. Vacanti (1993). "Tissue engineering." Science **260**(5110): 920-926.

Laurencin, C. T., A. M. Ambrosio, M. D. Borden and J. A. Cooper, Jr. (1999). "Tissue engineering: orthopedic applications." Annu Rev Biomed Eng **1**: 19-46.

Levenberg, S., J. Rouwkema, M. Macdonald, E. S. Garfein, D. S. Kohane, D. C. Darland, R. Marini, C. A. van Blitterswijk, R. C. Mulligan, P. A. D'Amore and R. Langer (2005). "Engineering vascularized skeletal muscle tissue." Nat Biotechnol **23**(7): 879-884.

Lian, J. B. and G. S. Stein (1995). "Development of the osteoblast phenotype: molecular mechanisms mediating osteoblast growth and differentiation." Iowa Orthop J **15**: 118-140.

Lichte, P., H. C. Pape, T. Pufe, P. Kobbe and H. Fischer (2011). "Scaffolds for bone healing: concepts, materials and evidence." Injury **42**(6): 569-573.

Lydon, M. J., K. D. Keeler and D. B. Thomas (1980). "Vital DNA staining and cell sorting by flow microfluorometry." J Cell Physiol **102**(2): 175-181.

Manji, R. A., L. F. Zhu, N. K. Nijjar, D. C. Rayner, G. S. Korbitt, T. A. Churchill, R. V. Rajotte, A. Koshal and D. B. Ross (2006). "Glutaraldehyde-fixed bioprosthetic heart valve conduits calcify and fail from xenograft rejection." Circulation **114**(4): 318-327.

Mantovani, F., E. Tondelli, G. Cozzi, D. Abed El Rahman, M. G. Spinelli, I. Oliva, E. Finkelberg, M. Talso, D. Varisco, A. Maggioni and F. Rocco (2011). "[Reconstructive urethroplasty using porcine acellular matrix (SIS): evolution of the grafting technique and results of 10-year experience]." Urologia **78**(2): 92-97.

Mantovani, F., A. Trinchieri, C. Castelnuovo, A. L. Romano and E. Pisani (2003). "Reconstructive urethroplasty using porcine acellular matrix." Eur Urol **44**(5): 600-602.

Martin, I., D. Wendt and M. Heberer (2004). "The role of bioreactors in tissue engineering." Trends in Biotechnology **22**(2): 80-86.

- Maury, C. P. and A. M. Teppo (1987). "Raised serum levels of cachectin/tumor necrosis factor alpha in renal allograft rejection." J Exp Med **166**(4): 1132-1137.
- McDevitt, C. A., G. M. Wildey and R. M. Cutrone (2003). "Transforming growth factor-beta1 in a sterilized tissue derived from the pig small intestine submucosa." J Biomed Mater Res A **67**(2): 637-640.
- McFetridge, P. S., J. W. Daniel, T. Bodamyali, M. Horrocks and J. B. Chaudhuri (2004). "Preparation of porcine carotid arteries for vascular tissue engineering applications." J Biomed Mater Res A **70**(2): 224-234.
- McMorrow, I. M., C. A. Comrack, D. H. Sachs and H. DerSimonian (1997). "Heterogeneity of human anti-pig natural antibodies cross-reactive with the Gal(alpha1,3)Galactose epitope." Transplantation **64**(3): 501-510.
- Miyamoto, S., B. Z. Katz, R. M. Lafrenie and K. M. Yamada (1998). "Fibronectin and integrins in cell adhesion, signaling, and morphogenesis." Ann N Y Acad Sci **857**: 119-129.
- Moroni, F. and T. Mirabella (2014). "Decellularized matrices for cardiovascular tissue engineering." Am J Stem Cells **3**(1): 1-20.
- Murata, M., B. Z. Huang, T. Shibata, S. Imai, N. Nagai and M. Arisue (1999). "Bone augmentation by recombinant human BMP-2 and collagen on adult rat parietal bone." Int J Oral Maxillofac Surg **28**(3): 232-237.
- Muschler, G. F., C. Nakamoto and L. G. Griffith (2004). "Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering." J Bone Joint Surg Am **86-A**(7): 1541-1558.
- Nakayama, K. H., C. A. Batchelder, C. I. Lee and A. F. Tarantal (2010). "Decellularized rhesus monkey kidney as a three-dimensional scaffold for renal tissue engineering." Tissue Eng Part A **16**(7): 2207-2216.
- Naso, F., A. Gandaglia, L. Iop, M. Spina and G. Gerosa (2012). "Alpha-Gal detectors in xenotransplantation research: a word of caution." Xenotransplantation **19**(4): 215-220.
- Nikkhah, M., N. Eshak, P. Zorlutuna, N. Annabi, M. Castello, K. Kim, A. Dolatshahi-Pirouz, F. Edalat, H. Bae, Y. Yang and A. Khademhosseini (2012). "Directed endothelial cell morphogenesis in micropatterned gelatin methacrylate hydrogels." Biomaterials **33**(35): 9009-9018.
- O'Brien, F. J. (2011). "Biomaterials & scaffolds for tissue engineering." Materials Today **14**(3): 88-95.
- Ott, H. C., B. Clippinger, C. Conrad, C. Schuetz, I. Pomerantseva, L. Ikonou, D. Kotton and J. P. Vacanti (2010). "Regeneration and orthotopic transplantation of a bioartificial lung." Nat Med **16**(8): 927-933.
- Ott, H. C., T. S. Matthiesen, S. K. Goh, L. D. Black, S. M. Kren, T. I. Netoff and D. A. Taylor (2008). "Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart." Nat Med **14**(2): 213-221.
- Petersen, T. H., E. A. Calle, L. Zhao, E. J. Lee, L. Gui, M. B. Raredon, K. Gavrilov, T. Yi, Z. W. Zhuang, C. Breuer, E. Herzog and L. E. Niklason (2010). "Tissue-engineered lungs for in vivo implantation." Science **329**(5991): 538-541.

Pizarro, T. T., K. Malinowska, E. J. Kovacs, J. Clancy, Jr., J. A. Robinson and L. A. Piccinini (1993). "Induction of TNF alpha and TNF beta gene expression in rat cardiac transplants during allograft rejection." Transplantation **56**(2): 399-404.

Platt, J., V. DiSesa, D. Gail and J. Massicot-Fisher (2002). "Recommendations of the National Heart, Lung, and Blood Institute Heart and Lung Xenotransplantation Working Group." Circulation **106**(9): 1043-1047.

Platzer, C., C. Meisel, K. Vogt, M. Platzer and H. D. Volk (1995). "Up-regulation of monocytic IL-10 by tumor necrosis factor-alpha and cAMP elevating drugs." Int Immunol **7**(4): 517-523.

Ponce, M. L., M. Nomizu, M. C. Delgado, Y. Kuratomi, M. P. Hoffman, S. Powell, Y. Yamada, H. K. Kleinman and K. M. Malinda (1999). "Identification of endothelial cell binding sites on the laminin gamma 1 chain." Circ Res **84**(6): 688-694.

Prasertsung, I., S. Kanokpanont, T. Bunaprasert, V. Thanakit and S. Damrongsakkul (2008). "Development of acellular dermis from porcine skin using periodic pressurized technique." J Biomed Mater Res B Appl Biomater **85**(1): 210-219.

Probst, M., R. Dahiya, S. Carrier and E. A. Tanagho (1997). "Reproduction of functional smooth muscle tissue and partial bladder replacement." Br J Urol **79**(4): 505-515.

Rampersad, S. N. (2012). "Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays." Sensors (Basel) **12**(9): 12347-12360.

Reing, J. E., B. N. Brown, K. A. Daly, J. M. Freund, T. W. Gilbert, S. X. Hsiong, A. Huber, K. E. Kullas, S. Tottey, M. T. Wolf and S. F. Badylak (2010). "The effects of processing methods upon mechanical and biologic properties of porcine dermal extracellular matrix scaffolds." Biomaterials **31**(33): 8626-8633.

Ren, H., X. Shi, L. Tao, J. Xiao, B. Han, Y. Zhang, X. Yuan and Y. Ding (2013). "Evaluation of two decellularization methods in the development of a whole-organ decellularized rat liver scaffold." Liver Int **33**(3): 448-458.

Rieder, E., M. T. Kasimir, G. Silberhumer, G. Seebacher, E. Wolner, P. Simon and G. Weigel (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**(2): 399-405.

Roberts, R., J. Gallagher, E. Spooncer, T. D. Allen, F. Bloomfield and T. M. Dexter (1988). "Heparan sulphate bound growth factors: a mechanism for stromal cell mediated haemopoiesis." Nature **332**(6162): 376-378.

Ross, E. A., M. J. Williams, T. Hamazaki, N. Terada, W. L. Clapp, C. Adin, G. W. Ellison, M. Jorgensen and C. D. Batich (2009). "Embryonic stem cells proliferate and differentiate when seeded into kidney scaffolds." J Am Soc Nephrol **20**(11): 2338-2347.

Rouwkema, J. and A. Khademhosseini (2016). "Vascularization and Angiogenesis in Tissue Engineering: Beyond Creating Static Networks." Trends Biotechnol **34**(9): 733-745.

Rouwkema, J., N. C. Rivron and C. A. van Blitterswijk (2008). "Vascularization in tissue engineering." Trends Biotechnol **26**(8): 434-441.

Rouwkema, J., P. E. Westerweel, J. de Boer, M. C. Verhaar and C. A. van Blitterswijk (2009). "The use of endothelial progenitor cells for prevascularized bone tissue engineering." Tissue Eng Part A **15**(8): 2015-2027.

Ruffer, A., A. Purbojo, I. Cicha, M. Glockler, S. Potapov, S. Dittrich and R. A. Cesnjevar (2010). "Early failure of xenogenous de-cellularised pulmonary valve conduits--a word of caution!" Eur J Cardiothorac Surg **38**(1): 78-85.

Salter, E., B. Goh, B. Hung, D. Hutton, N. Ghone and W. L. Grayson (2012). "Bone tissue engineering bioreactors: a role in the clinic?" Tissue Eng Part B Rev **18**(1): 62-75.

Sandor, M., H. Xu, J. Connor, J. Lombardi, J. R. Harper, R. P. Silverman and D. J. McQuillan (2008). "Host response to implanted porcine-derived biologic materials in a primate model of abdominal wall repair." Tissue Eng Part A **14**(12): 2021-2031.

Sasaki, S., S. Funamoto, Y. Hashimoto, T. Kimura, T. Honda, S. Hattori, H. Kobayashi, A. Kishida and M. Mochizuki (2009). "In vivo evaluation of a novel scaffold for artificial corneas prepared by using ultrahigh hydrostatic pressure to decellularize porcine corneas." Molecular Vision **15**: 2022-2028.

Schussler, O., M. Shen, L. Shen, S. M. Carpentier, S. Kaveri and A. Carpentier (2001). "Effect of human immunoglobulins on the immunogenicity of porcine bioprostheses." Ann Thorac Surg **71**(5 Suppl): S396-400.

Schwarzbauer, J. (1999). "Basement membrane: Putting up the barriers." Current Biology **9**(7): R242-R244.

Schwarzbauer, J. E. (1991). "Fibronectin: from gene to protein." Curr Opin Cell Biol **3**(5): 786-791.

Seddon, A. M., P. Curnow and P. J. Booth (2004). "Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera." Biochim Biophys Acta **1666**(1-2): 105-117.

Seyler, T. M., D. N. Bracey, J. F. Plate, M. O. Lively, S. Mannava, T. L. Smith, J. M. Saul, G. G. Poehling, M. E. Van Dyke and P. W. Whitlock (2017). "The Development of a Xenograft-Derived Scaffold for Tendon and Ligament Reconstruction Using a Decellularization and Oxidation Protocol." Arthroscopy **33**(2): 374-386.

Siegmund, B., A. Eigler, J. Moeller, T. F. Greten, G. Hartmann and S. Endres (1997). "Suppression of tumor necrosis factor-alpha production by interleukin-10 is enhanced by cAMP-elevating agents." Eur J Pharmacol **321**(2): 231-239.

Simon, P., M. T. Kasimir, G. Seebacher, G. Weigel, R. Ullrich, U. Salzer-Muhar, E. Rieder and E. Wolner (2003). "Early failure of the tissue engineered porcine heart valve SYNERGRAFT in pediatric patients." Eur J Cardiothorac Surg **23**(6): 1002-1006; discussion 1006.

Song, J. J., J. P. Guyette, S. E. Gilpin, G. Gonzalez, J. P. Vacanti and H. C. Ott (2013). "Regeneration and experimental orthotopic transplantation of a bioengineered kidney." Nat Med **19**(5): 646-651.

Soucacos, P. N., E. O. Johnson and G. Babis (2008). "5th European Symposium on Tissue Engineering: Bone Biology Congress 2008An update on recent advances in bone regeneration." Injury **39**: S1-S4.

Stevens, M. M. (2008). "Biomaterials for bone tissue engineering." Materials Today **11**(5): 18-25.

Teebken, O. E., A. Bader, G. Steinhoff and A. Haverich (2000). "Tissue engineering of vascular grafts: human cell seeding of decellularised porcine matrix." Eur J Vasc Endovasc Surg **19**(4): 381-386.

Uygun, B. E., A. Soto-Gutierrez, H. Yagi, M. L. Izamis, M. A. Guzzardi, C. Shulman, J. Milwid, N. Kobayashi, A. Tilles, F. Berthiaume, M. Hertl, Y. Nahmias, M. L. Yarmush and K. Uygun (2010). "Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix." Nat Med **16**(7): 814-820.

van der Rest, M. and R. Garrone (1991). "Collagen family of proteins." FASEB J **5**(13): 2814-2823.

Voytik-Harbin, S. L., A. O. Brightman, M. R. Kraine, B. Waisner and S. F. Badylak (1997). "Identification of extractable growth factors from small intestinal submucosa." J Cell Biochem **67**(4): 478-491.

Wajant, H., K. Pfizenmaier and P. Scheurich (2003). "Tumor necrosis factor signaling." Cell Death Differ **10**(1): 45-65.

Werb, Z., T. H. Vu, J. L. Rinkenberger and L. M. Coussens (1999). "Matrix-degrading proteases and angiogenesis during development and tumor formation." APMIS **107**(1): 11-18.

Wildemann, B., N. Burkhardt, M. Luebberstedt, T. Vordemvenne and G. Schmidmaier (2007). "Proliferating and differentiating effects of three different growth factors on pluripotent mesenchymal cells and osteoblast like cells." J Orthop Surg Res **2**: 27.

Wong, M. L. and L. G. Griffiths (2014). "Immunogenicity in xenogeneic scaffold generation: antigen removal vs. decellularization." Acta Biomater **10**(5): 1806-1816.

Woods, T. and P. F. Gratzer (2005). "Effectiveness of three extraction techniques in the development of a decellularized bone-anterior cruciate ligament-bone graft." Biomaterials **26**(35): 7339-7349.

Xu, C. C., R. W. Chan and N. Tirunagari (2007). "A biodegradable, acellular xenogeneic scaffold for regeneration of the vocal fold lamina propria." Tissue Eng **13**(3): 551-566.

Yang, B., Y. Zhang, L. Zhou, Z. Sun, J. Zheng, Y. Chen and Y. Dai (2010). "Development of a porcine bladder acellular matrix with well-preserved extracellular bioactive factors for tissue engineering." Tissue Eng Part C Methods **16**(5): 1201-1211.

Yang, M., C. Z. Chen, X. N. Wang, Y. B. Zhu and Y. J. Gu (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**(1): 354-361.

Yang, Y. G. and M. Sykes (2007). "Xenotransplantation: current status and a perspective on the future." Nat Rev Immunol **7**(7): 519-531.

Zheng, M. H., J. Chen, Y. Kirilak, C. Willers, J. Xu and D. Wood (2005). "Porcine small intestine submucosa (SIS) is not an acellular collagenous matrix and contains porcine DNA: Possible implications in human implantation." Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials **73B**(1): 61-67.

## 8 Abstract

The lack of vascularization in critical size tissue is one of the major issues that needs to be solved to widen the clinical application of tissue engineering. Therefore, whole organ decellularization to get a biomatrix including the vascular network is promising. After establishing a safe and reproducible protocol for decellularization of rat kidneys, the present study aims to evaluate aspects of biocompatibility of decellularized rat kidneys as biomatrices for cells from different type of tissue and species.

The study was performed in rat kidneys (n=16) that were decellularized using a combination of physical (freezing and thawing) and chemical techniques (perfusion decellularization with SDS). The solution's concentration of SDS ranged from 0.5 – 3% (mild to intensive). For investigation of immune reaction, the biomatrices (decellularized 1/2 kidneys) were seeded with human peripheral blood mononuclear cells (n=3). After 6h of incubation time, concentrations of TNF- $\alpha$  and Interleukin-10 were measured. Next, human primary osteoblasts (n=3) and rat primary osteoblasts (n=3) were statically cultured with slices of decellularized kidneys for 14 days. For investigation of cell proliferation and viability, we used Alamar blue Assay as well as fluorescence staining of the cells (Calcein AM, Hoechst). For investigation of osteoblast function and differentiation, quantitative measuring of alkaline phosphatase (AP) activity as well as AP staining was performed.

First, we investigated the immune reaction of the human peripheral blood mononuclear cells after seeding them onto decellularized rat kidneys. Regardless of the SDS concentration that was used in the decellularization process, the results showed no activation of the innate immune system. Second, we investigated the capability of the biomatrix to culture cells from different tissue and even species sources. As a model for this, we tested viability and function of human and rat primary osteoblasts in culture with the biomatrices. Both human and rat cells showed proliferation during 2 weeks of cell culture. In contrast to rat osteoblasts, cells from human sources proliferated significantly better in the culture with more aggressively decellularized biomatrices. Also, function and differentiation of the human and rat osteoblasts were kept during the whole time of the experiment.

These findings support our goal that the decellularization method may develop into a platform technology for tissue engineering even for cells of different type of tissue and species. Especially in a xenotransplantation setting, intensive decellularization improved biocompatibility of the biomatrix.

## **9 Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe angefertigt zu haben. Es wurden keine anderen Quellen benutzt, als jene, die im Literaturverzeichnis angeführt sind. Sämtliche Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder unveröffentlichten Schriften entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht. Ferner sind alle von anderen Personen bereitgestellten Materialien und Dienstleistungen als solche gekennzeichnet. Ich versichere, nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen zu haben. Zudem hat keine Person von mir geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit der hier vorgelegten Dissertation stehen. Diese Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer Prüfungsbehörde zum Zwecke der Promotion vorgelegt. Ich habe keine früheren erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

München, den

---

Kira Florian

## 10 Danksagung

An erster Stelle danke ich meinem Doktorvater, Herrn apl. Prof. Dr. Martijn van Griensven, der mir die vorliegende Arbeit erst ermöglicht hat. Mit viel Geduld und Verständnis trug er durch konstruktive Kritik sowie Anregungen einen wesentlichen Teil zur Erstellung dieser Arbeit bei.

Weiter gilt mein besonderer Dank meinem Betreuer und Mentor, Herrn PD Dr. Andreas Schmitt, der bei Fragen und Problemen jederzeit ein offenes Ohr hatte und mir aktiv bei deren Lösung beistand. Auch wenn im laufenden Arbeitsprozess auf den ersten Blick unüberwindbare Hürden vor mir standen, bewahrte er die Ruhe. Sowohl auf menschlicher als auch auf fachlicher Ebene wusste er mich stets zu motivieren und zu unterstützen.

Auch wäre die Verwirklichung der Arbeit, insbesondere des experimentellen Forschungsteils, nicht ohne die Hilfe und Unterstützung der Teams der experimentellen Unfallchirurgie und der Orthopädie möglich gewesen. Vor allem danke ich Frau Marina Unger und Frau Jutta Tübel, die mich schon bei den ersten Schritten der Laborarbeit unterstützt haben und auch im weiteren Verlauf jederzeit bereit waren, ihr Wissen und ihre Erfahrung mit mir zu teilen.

Herr Prof. Dr. med. Burgkart konnte mir durch hilfreiche Hinweise, Anregungen und Verbesserungsvorschläge in vielen Gesprächen helfen, die vorliegende Arbeit zu bewältigen. Auch ihm gilt mein ausdrücklicher Dank.

Herr Fritz Seidl stand mir jederzeit durch organisatorischen Rat mit viel Geduld zur Seite; dadurch hat auch er einen entscheidenden Beitrag geleistet - auch ihm gebührt mein Dank.

Ebenfalls bedanke ich mich bei Herrn Dr. med. Elmar Herbst, dessen Hilfe ich jederzeit – vor allem in IT-Fragen – in Anspruch nehmen konnte.

Schließlich danke ich meiner Familie, die mich auch in arbeitsintensiven Phasen stets unterstützt und entlastet hat. Besonders meine Schwester Sofia wurde nie müde, mich zur Fertigstellung der Arbeit zu motivieren. Darüber hinaus ist ihre Hilfe bei technischen Fragen nicht hoch genug einzuschätzen.

Für die immer konstruktive und liebevolle Unterstützung - nicht nur in sprachlicher Hinsicht - danke ich meinem Freund Joschi.