

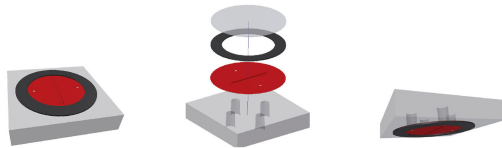


Darja Ivannikov (Autor)

In vitro Rekonstruktion verschiedener vaskulärer Barrieren

Darja Ivannikov

***In vitro* Rekonstruktion verschiedener vaskulärer Barrieren**



Cuvillier Verlag Göttingen
Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag

<https://cuvillier.de/de/shop/publications/7192>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen,
Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>



INHALTSVERZEICHNIS

1. ZUSAMMENFASSUNG	1
2. EINLEITUNG	3
2.1 Alternativmethoden zum Tierversuch.....	3
2.2 Biologische Barrieren	5
2.2.1 Blut-Hirn-Schranke	6
2.2.1.1 Aufbau und Funktion der Blut-Hirn-Schranke.....	6
2.2.1.2 Hirnendothel.....	7
2.2.1.3 Astrozyten.....	9
2.2.1.4 Perizyten	9
2.2.1.5 Efflux-Pumpen	10
2.2.1.6 Scherkräfte.....	12
2.2.1.7 <i>In vitro</i> Rekonstruktion der BBB.....	13
2.2.2 Darm	14
2.2.3 Leber	16
2.2.3.1 Stammzellen der Leber	17
3. ZIEL DER ARBEIT	17
4. ERGEBNISSE.....	18
4.1 Aufbau des μ3DVasc Biorektors.....	18
4.2 SMART-Technologie	19
4.3 Herstellung des μ3DVasc Bioreaktors	20
4.4 Biologische Validierung des endothelialen Zelllayers	23
4.4.1 Langzeitkultivierung	23
4.4.2 Konfluenztest.....	23
4.4.3 Proliferationstest	25
4.4.4 Funktionstests	29
4.4.4.1 Transmigration von Blutzellen	29
4.4.4.2 Permeabilitätsmessungen	32
4.4.5 Versorgung des unteren Kompartiments	44
4.5 Blut-Hirn-Schranke	46
4.5.1 Bestimmung geeigneter Nährmedien	46
4.5.1.1 Konditioniertes Nährmedium	46
4.5.1.2 Wachstumskurven	47
4.5.2 Kokultur aus Endothelzellen und Perizyten.....	49
4.5.3 Kokultur aus Endothelzellen, Perizyten und Astrozyten	50
4.5.3.1 Kokultur aus Perizyten und Astrozyten in 2D	50



4.5.3.2	Kokultur aus Endothelzellen, Perizyten und Astrozyten im $\mu 3DVasc$ Bioreaktor.....	51
4.5.4	Nachweis zellspezifischer Marker	53
4.5.5	Proliferationstest.....	56
4.5.6	Test der metabolischen Zellaktivität	59
4.5.7	Lebend/tot-Nachweis.....	61
4.5.8	Untersuchung der Hypoxie.....	62
4.5.9	Etablierung mikrovaskulärer Endothelzellen	66
4.5.10	P-gp Transport Assay	69
4.6	Darm.....	72
4.6.1	Nachweis der Schleimbildung	73
4.6.2	Nachweis von Tight Junctions	74
4.6.3	Nachweis der Zotten-ähnlichen Strukturen	75
4.7	Leber.....	76
4.7.1	Isolation von fetalen, murinen Leber-Vorläuferzellen	77
4.7.2	Ausdifferenzierung zu Hepatozyten-ähnlichen Zellen	77
4.7.3	Generierung von HPPL-Zellen	82
4.7.4	Ausdifferenzierung von HPPL-Zellen zu Hepatozyten-ähnlichen Zellen	83
4.7.5	Ausdifferenzierung zu Cholangiozyten.....	84
4.7.6	Ausdifferenzierung im $\mu 3DVasc$ Bioreaktor	87
4.7.7	Ausdifferenzierung von Oval Cells zu Cholangiozyten	88
5.	DISKUSSION	90
6.	MATERIAL UND METHODEN	102
6.1	Material	102
6.2	Methoden	112
6.2.1	Herstellung von $\mu 3DVasc$ Bioreaktoren	112
6.2.2	Zellkultivierung.....	113
6.2.2.1	Beschichtung der Kultivierungsmaterialien.....	113
6.2.2.2	Passagieren der Zellen.....	113
6.2.3	Handhabung des mikrofluidischen $\mu 3DVasc$ Bioreaktors	114
6.2.3.1	Beschichtung des PC-Mikrokanals.....	114
6.2.3.2	Beschichtung des unteren Kompartiments	114
6.2.3.3	Einbringen der Endothelzellen in den PC-Mikrokanal.....	115
6.2.3.4	Einbringen der Zellen in das untere Kompartiment	116
6.2.4	Visualisierung von Zellen.....	116
6.2.4.1	Vitale Zellen	116
6.2.4.2	Fixierte Zellen	117
6.2.5	EdU Nachweis.....	117
6.2.6	Adhäsion und Migration von Blutzellen	118
6.2.7	Permeabilitätsassay	118
6.2.7.1	Standardkurven	118
6.2.7.2	Widerstandseinheiten	118
6.2.7.3	Permeabilitätsassay in Transwell-Systemen.....	119



6.2.7.4	Einfluss der Beschichtung	119
6.2.7.5	Permeabilitätsassay im $\mu 3DVasc$ Bioreaktor	119
6.2.8	Versorgung des unteren Kompartiments	120
6.2.9	Etablierung der Kokultur aus Perizyten und Astrozyten.....	120
6.2.10	Präparation des Astrozyten-konditionierten Mediums	120
6.2.10.1	Untersuchung der Expression von Tight Junctions	120
6.2.10.2	Wachstumskurven	121
6.2.11	XTT Nachweis	121
6.2.12	Lebend/tot-Nachweis.....	121
6.2.13	Nachweis der Hypoxie.....	122
6.2.14	P-gp Transport Assay.....	122
6.2.15	REM	122
6.2.16	Isolierung der fetalen, murinen Leberzellen.....	122
6.2.16.1	Isolierung der DLK ⁺ Hepatoblasten	124
6.2.16.2	Generierung von HPPL-Zellen aus DLK ⁺ Hepatoblasten.....	124
6.2.16.3	Ausdifferenzierung von DLK ⁺ Hepatoblasten zu HLC	124
6.2.16.4	Ausdifferenzierung von HPPL-Zellen zu HLC.....	126
6.2.16.5	Ausdifferenzierung von HPPL-Zellen zu Cholangiozyten	127
6.2.16.6	Ausdifferenzierung von Oval Cells zu Cholangiozyten	128
6.2.17	Statistische Auswertung.....	129
7.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	130
8.	LITERATUR	134
9.	ANHANG	145
10.	LEBENS LAUF	157
11.	DANKSAGUNG	161