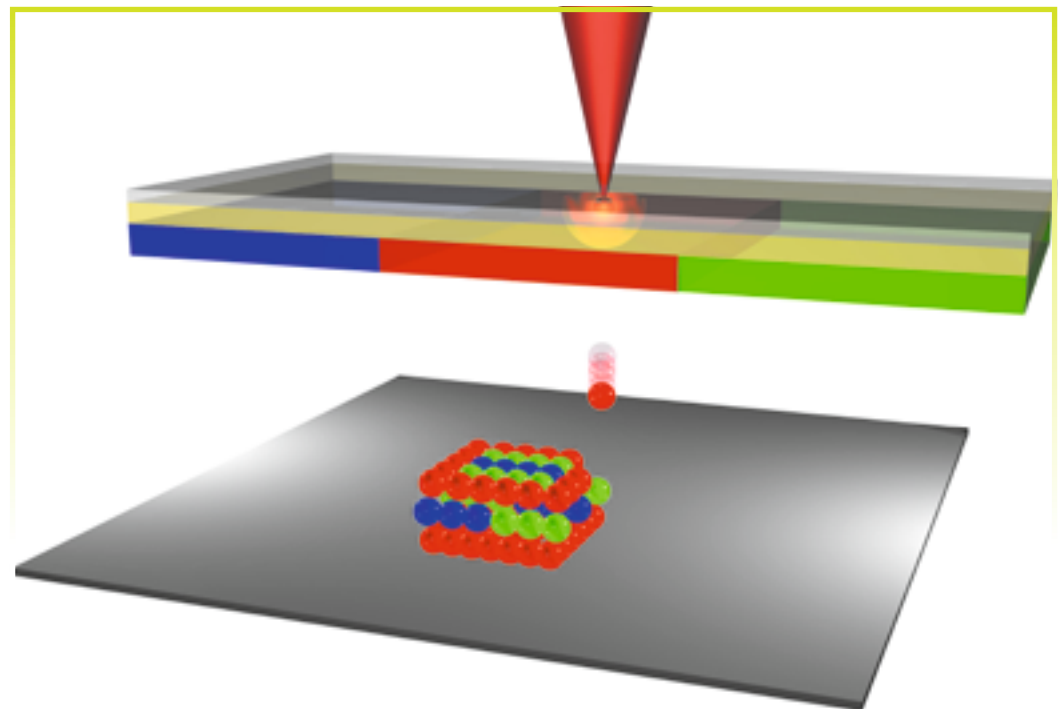


Spenderorgane aus körpereigenen Zellen

SPEZIELLE GERÜSTSTRUKTUREN OPTIMIEREN

DIE HERSTELLUNG VON ERSATZORGANEN

Spenderorgane sind rar. Im Tissue Engineering arbeiten Forscher daran, Organe aus körpereigenen Zellen des Patienten »nachzubauen«. Dreidimensionale Gerüststrukturen, so genannte 3D-Scaffolds, können Zellen bei der Gewebebildung unterstützen und damit dem Gewebe eine gewünschte Struktur vorgeben. Eine Wissenschaftlerin vom Institut für Mehrphasenprozesse und ein Wissenschaftler vom Institut für Quantenoptik erklären, wie Scaffolds hergestellt und lebende Zellen mit Laserpulsen in diese Gerüststruktur platziert werden können.



Weltweit besteht ein erheblicher Mangel an Spenderorganen, etwa bei Niere, Herz, Lunge oder Leber. Allein in Niedersachsen haben 2009 1090 Menschen auf eine lebensrettende Organspende gewartet. Die demographischen Veränderungen führen zu einer größeren Zahl älterer Menschen mit zunehmenden Erkrankungen. Die höhere Lebenserwartung erfordert verbesserte Therapieverfahren. Statistisch gesehen sterben allein in Deutschland monatlich etwa 100 Patienten, da nicht rechtzeitig ein Spenderorgan verfügbar ist. Nach der Transplantation ist in der Regel eine

lebenslange medikamentöse Behandlung nötig, um Abstoßungsreaktionen des Immunsystems zu unterdrücken, was teilweise starke Nebenwirkungen mit sich bringt.

Um diese Problematik – Spenderorganmangel und Abstoßungsreaktionen – zu umgehen, wird im Rahmen der Regenerativen Medizin das Ziel verfolgt, aus körpereigenen (autologen) Zellen des betroffenen Patienten das benötigte Organ »nachzubauen« und ihm dann zu implantieren. Da Spender und Empfänger nun identisch sind, sollte es keine Abstoßungsre-

aktion geben. Von besonderem Interesse sind in diesem Zusammenhang adulte Stammzellen, da sie in verschiedene, organspezifische Zellarten differenzieren können. Sie können zum Beispiel aus Knochenmark oder Fettgewebe gewonnen werden.

Doch nicht nur die Gewinnung und Vermehrung der Zellen ist anspruchsvoll, auch das »Nachbauen von Organen«, im Allgemeinen komplexe Strukturen aus verschiedenen Zellarten, ist bisher eine ungelöste Herausforderung. Ein Ansatz ist die Verwendung einer biologisch abbaubaren

Stützstruktur (englisch: *scaffold*), in der die Zellen wie im natürlichen Organ angeordnet werden. Dort sollen die Zellen dann zu einem Gewebe wachsen, während der Scaffold langsam resorbiert wird. Die Porosität des Scaffolds sowie Anordnung und Größe der Poren beeinflussen dabei die Zellmigration und spielen eine wichtige Rolle in seiner Resorptionskinetik, Nährstoffdiffusion und mechanischen Stabilität. Um das Zellverhal-

ten steuern zu können, werden daher definierte 3D-Strukturen benötigt.

Zur Realisierung multizellulärer Systeme müssen verschiedene Zellarten in dieselbe Struktur kontrolliert eingebracht werden. So stellt die Wand eines natürlichen Blutgefäßes eine komplexe 3D-Struktur dar, die Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Fibroblasten enthält. Hierfür wurde am Laser Zent-

rum Hannover e.V. (LZH) eine Technik zum Transfer von Zellen mit einem gepulsten Laser entwickelt, das so genannte Laser BioPrinting, – kurz LaBP – basierend auf Laser-Induced Forward Transfer (LIFT). In Abbildung 1 ist eine schematische Darstellung dieser LaBP-Technik zu sehen. Auf ein Glasplättchen wird zuerst eine Schicht aufgetragen, die die Laserstrahlung absorbiert (bei den hier beschriebenen Experimenten wurde eine 60 Nanometer dünne Goldschicht verwendet), und darauf ein Hydrogel, das die Zellen enthält. Die Laserpulse werden durch das Glas in die Absorptionsschicht fokussiert, die lokal verdampft wird. Durch den Dampfdruck wird eine kleine Menge Gel mit Zellen senkrecht von dem Glasplättchen wegbeschleunigt und trifft auf ein zweites Glasplättchen auf. Durch relative Bewegung von Laser und Glasplättchen kann ein beliebiges Muster aus Zellen geschrieben werden, durch Austauschen des ersten Glasplättchens kann dabei die Zellsorte variiert werden.

Am Institut für Mehrphasenprozesse werden Scaffolds aus verschiedenen Biopolymeren wie zum Beispiel Kollagen Typ I oder Chitosan durch gezielte Erstarrung hergestellt. Dabei wird eine wässrige Polymerlösung gezielt von einer Seite im so genannten Power-Down-Verfahren eingefroren, so dass fingerförmige Eiskristalle gerichtet durch die Probe wachsen (Abbildung 2). Durch Variation der Einfrierparameter und gezielte Nukleation kann der Durchmesser der Eisfinger eingestellt werden. Da bei der Eiskristallbildung nur das Wasser erstarrt, werden die suspendierten Partikel in die Eiszwischenräume verdrängt und bilden auf diese Weise eine Gitterstruktur mit gleichmäßiger Porengröße. In einem anschließenden Gefrier-trocknungsprozess

Abbildung 1 (gegenüber) **LaBP: Schematische Darstellung des Laser-basierten Zell-Transfers**

Die verschiedenen Zelltypen sind rot, blau und grün dargestellt. Auf der Unterseite der oberen Glasscheibe befindet sich eine dünne, Laserstrahlung absorbierende Schicht (zum Beispiel 60 Nanometer Gold) und darunter eine Gelschicht, die verschiedene Zelltypen (rot, grün, blau dargestellt) enthält. Die Laserpulse werden durch die Glasplatte in die Absorptionsschicht fokussiert, diese wird lokal im Fokus verdampft. Der Dampfdruck beschleunigt das Gel darunter zur unteren Glasplatte, auf der sich ein Scaffold befinden kann.

Quelle: LZH

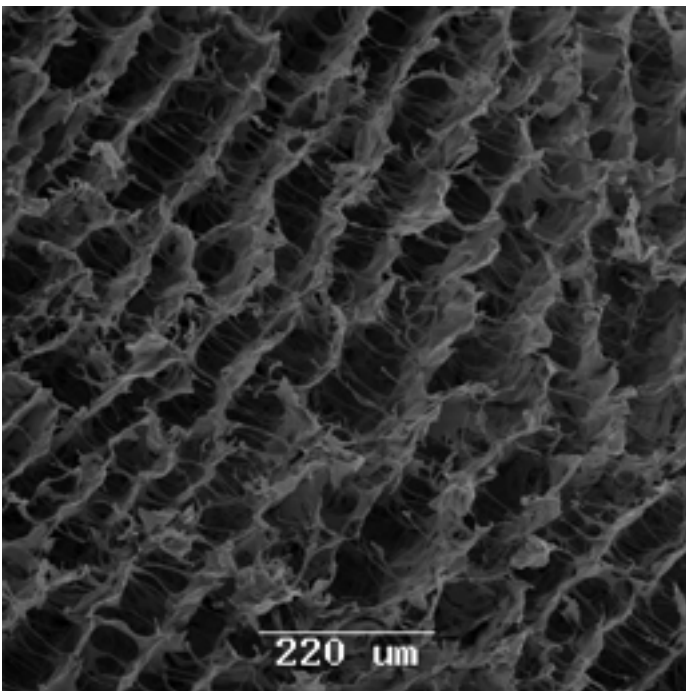
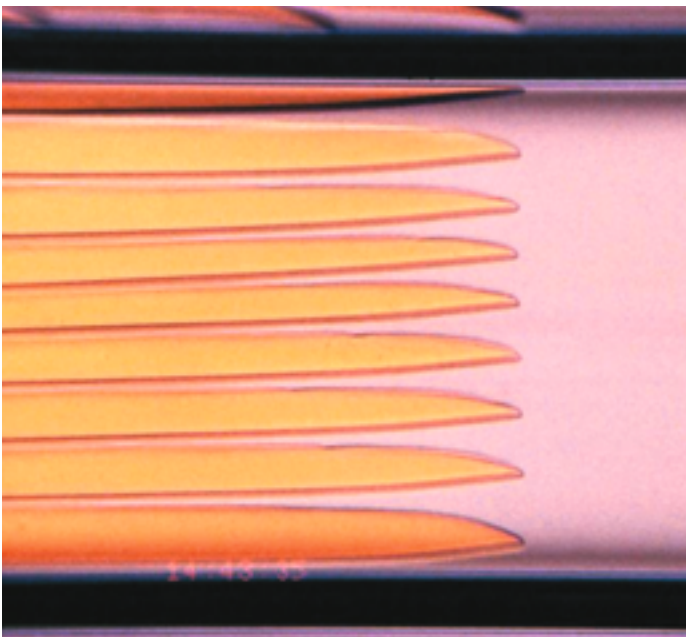


Abbildung 2

Oben: Herstellung von Kollagen-Scaffolds durch gerichtete Erstarrung

Durch gezielte Temperaturführung bildet sich in einer wässrigen Kollagenlösung eine dendritische Erstarrungsstruktur; das Eis wächst fingerförmig durch die Suspension. Da nur das Wasser gefriert, werden alle anderen Bestandteile der Suspension in die Räume zwischen die Eisdendriten gedrückt. Anschließend wird das Eis aus den Proben sublimiert. Auf diese Weise entsteht eine poröse Kollagenstruktur.

Unten: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Querschnittsfläche eines Kollagen-Scaffolds

Gut zu erkennen ist die gleichmäßige Porengröße von circa 65 bis 100 Mikrometern.

Quelle: Institut für Mehrphasenprozesse, Leibniz Universität Hannover

Abbildung 3
Lebend-/Totfärbung von Zellen (Fibroblasten), die mit LaBP auf und in den Kollagen-Scaffold transferiert wurden

Oben sind die Linien zu sehen, in denen die Zellen aufgetragen wurden. In der unteren Vergrößerung sieht man, dass ein Teil der Zellen unscharf abgebildet ist. Diese befinden sich außerhalb der Fokusebene des Mikroskops. Das beweist, dass die Zellen in den Scaffold eingedrungen sind und nicht nur auf dessen Oberfläche liegen. Durch die Lebend-/Totfärbung werden die vitalen Zellen nach dem Transfer grün und die toten Zellen rot gefärbt. Es sind nur sehr vereinzelt »rote« Zellen zu finden, die Zellen haben den LaBP-Transfer in den Scaffold unbeschadet überstanden.

Quelle: Institut für Mehrphasenprozesse, Leibniz Universität Hannover

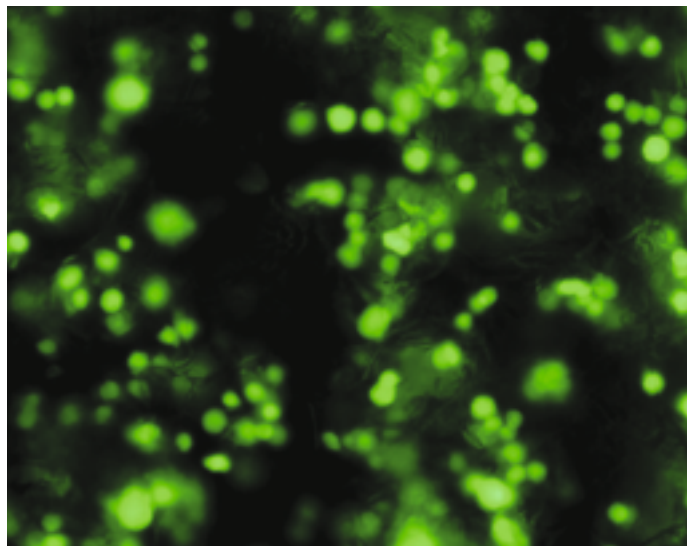
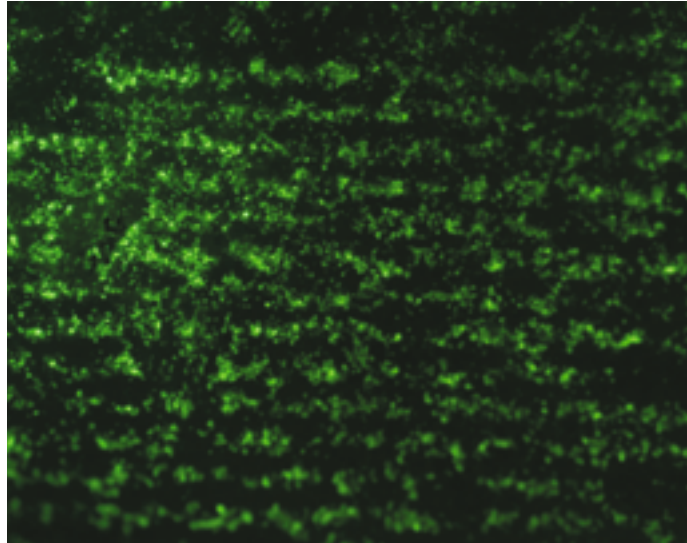


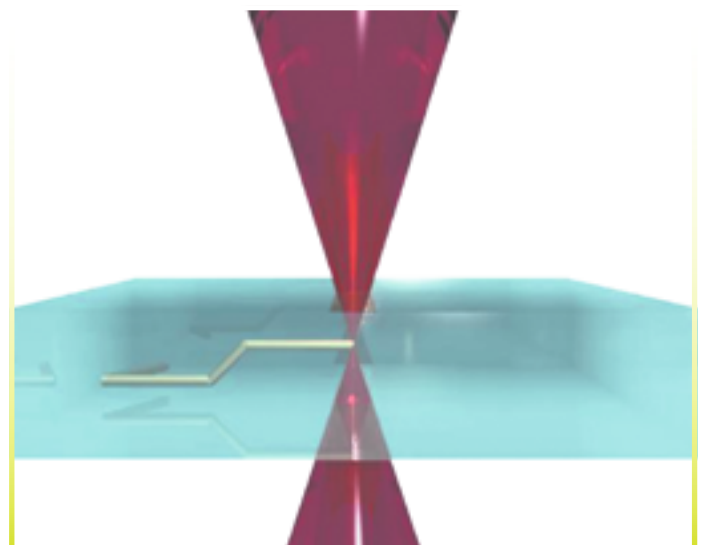
Abbildung 4
Das Verfahren der Zwei-Photonen-Polymerisation (2PP)

Mit der Zwei-Photonen-Polymerisation (2PP) kann direkt im Volumen des flüssigen photosensitiven Materials geschrieben werden. Verwendet wird ein Femtosekunden-Infrarotlaser (circa 800 Nanometer Wellenlänge), der in das Material fokussiert wird. Durch gleichzeitige Absorption zweier Photonen (entspricht der Energie eines Photons mit 400 Nanometer Wellenlänge) wird das Material polymerisiert. Nur direkt im Laserfokus ist die Photonendichte so hoch, dass eine Zweiphotonenabsorption effektiv stattfindet. Somit lässt sich eine Auflösung im Submikrometerbereich erreichen. Der gesamte Scaffold kann in einem Durchgang ins Volumen geschrieben werden, danach wird das nicht polymerisierte Restmaterial ausgewaschen. Quelle: LZH

wird das Eis aus den Proben sublimiert. Auf diese Weise entstehen überall dort, wo Eisfinger waren, Poren. So entstehen beispielsweise poröse Kollagenstrukturen, die anschließend mit Zellen besiedelt werden können. Abbildung 2 zeigt einen derart hergestellten Kollagen-Scaffold mit einer homogenen Porengröße von etwa 65 bis 80 Mikrometern.

Auf und in diesen Kollagen-Scaffold wurden mittels LaBP Zellen transferiert. In Abbildung 3 sind die Zellen zu sehen, wobei die vitalen grün und die toten Zellen rot eingefärbt wurden. Man erkennt, dass fast alle Zellen LaBP überlebt haben und unter-

schiedlich tief in den Scaffold eingedrungen sind.



Am LZH werden außerdem Scaffolds durch Zwei-Photonen-Polymerisation (2PP) mit einem so genannten Femtosekundenlaser hergestellt. Dabei wird durch gleichzeitige Absorption zweier Photonen ein photosensitives flüssiges Material polymerisiert. Dies geschieht ausschließlich im Laserfokus, da nur dort eine ausreichend hohe Photonendichte herrscht, wodurch sehr kleine Strukturen mit Submikrometereauflösung dreidimensional in das Volumen des Materials geschrieben werden können (Abbildung 4). Das nicht polymerisierte Material kann dann ausgewaschen werden. Diese Technik wurde zur Herstellung von hochporösen 3D-Scaffolds aus acryliertem Polyethylenglykol verwendet. Das CAD-Design und eine Rasterelektronenmikroskopaufnahme eines hexagonalen Scaffolds mit einem Freiraum in der Mitte als Abschnitt einer röhrenförmigen Struktur sind in Abbildung 5 dargestellt.

In Zusammenarbeit mit der Medizinischen Hochschule Hannover (Abteilung für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie) wurden in die Poren dieses Scaffolds mittels LaBP Endothelzellen im inneren Bereich und glatte Muskelzellen im äußeren Bereich eingebracht (Abbildung 6). Dies



entspricht der grundsätzlichen Anordnung solcher Zellen in der Wand eines Blutgefäßes. Dabei werden die Zellen durch die Poren bis zur Unterseite des Scaffolds transferiert und die Poren so schichtweise gefüllt. Abbildung 6 zeigt die Scaffold-Besiedlung in einer fluoreszenzlichtmikroskopischen Aufnahme mit diesen beiden verschiedenen Zelltypen unmittelbar nebeneinander.

Die Kombination der Herstellung definierter Scaffolds mit LaBP zur Zellbesiedelung ermöglicht das flexible und präzise Erzeugen multizellulärer 3D-Konstrukte. Sie bietet

großes Potenzial zur *in vitro*-Herstellung von künstlichen Modellen der Extrazellulärmatrix und zur Untersuchung fundamentaler Aspekte der Zell-Zell- und der Zell-Scaffold-Interaktionen und in Zukunft kann diese Technologie zur Herstellung von Ersatzorganen angewendet werden.

Die vorgestellten Arbeiten werden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) teilweise im Exzellenzcluster REBIRTH (EXC 62/1) und im Sonderforschungsbereich Transregio TR 37 finanziell gefördert.

Prof. Dr. Boris N. Chichkov

Jahrgang 1955, ist seit 2009 Inhaber des Lehrstuhls »Nanoeengineering« am Institut für Quantenoptik an der Leibniz Universität Hannover und Abteilungsleiter am Laser Zentrum Hannover e.V. Seine Forschungsschwerpunkte liegen in den Bereichen Laserphysik und Laseranwendungen, Quanten- und Nichtlineare Optik, Nano- und Biophotonik, Biomedizinische Implantate, Tissue Engineering und regenerative Medizin. Kontakt: b.chichkov@lzh.de

Prof. Dr.-Ing. Birgit Glasmacher

Jahrgang 1958, leitet seit 2006 das Institut für Mehrphasenprozesse an der Leibniz Universität Hannover und ist Sprecherin des Vorstands des Zentrums für Biomedizintechnik (zbm) der Fakultät für Maschinenbau. Sie ist Generalsekretärin der European Society for Artificial Organs sowie Vorstandsmitglied der International Federation for Artificial Organs. Ihre Forschungsschwerpunkte liegen den Bereichen mehrphasiger Strömungen, Visualisierung und Simulation sowie Verfahrenstechnik in der Medizin (Tissue Engineering, Kryo-, Bioreaktor- und Scaffoldtechnik). Kontakt: glasmacher@imp.uni-hannover.de

Abbildung 5
Scaffold, mittels 2PP-Technik hergestellt: Aufsicht (a) und Seitenansicht (b) des zugrunde liegenden CAD-Modells

Vergrößert ist als Ausschnitt in (a) die Struktur der aufeinander liegenden Schichten farblich dargestellt. (c) zeigt die Rasterelektronenmikroskop-Aufnahme der Struktur aus Polyethylenglykol-Diacrylat (PEGda).

Quelle: LZH

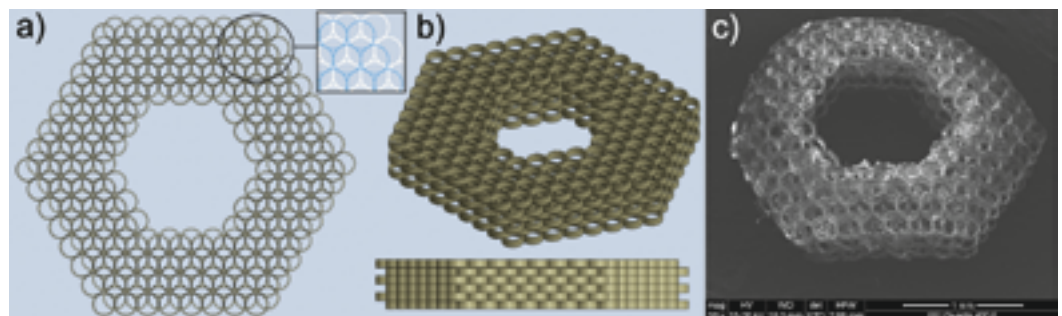


Abbildung 6
Dunkelfeld- (a) und Fluoreszenzlicht-Aufnahmen (b, c) des Scaffolds, der mittels LaBP mit Zellen besiedelt wurde

Das weiße Hexagon markiert die Grenze zwischen den zwei Scaffoldbereichen, die mit grün gefärbten glatten Muskelzellen (A) beziehungsweise orange gefärbten Endothelzellen (B) besiedelt wurden.

Quelle: LZH

