

CellChip-basierte Bioreaktoren für die extrakorporale Organunterstützung

E. Gottwald, S. Giselbrecht, B. Lahni, B. Hiebl, K.-F. Weibezahn, IBG

Einleitung

Der Mangel an geeigneten Spenderorganen macht die Entwicklung organunterstützender Systeme erforderlich. Für einige Zielorgane, wie die Niere, gibt es seit Jahrzehnten zuverlässig arbeitende Systeme, die den damit behandelten Menschen das Überleben mit einer akzeptablen Lebensqualität ermöglichen. Ein Grund für den frühen Erfolg der Hämodialyse stellt der relativ einfache Aufbau und die Funktion der Niere dar, die, bis auf wenige synthetische Funktionen, hauptsächlich als Filter arbeitet. Diese Filterfunktion lässt sich durch die Verwendung halbdurchlässiger Membranen relativ leicht mit einem rein technischen System gut nachbilden. Sollen aber auch synthetische Funktionen abgebildet werden, müssen die Systeme lebendes Gewebe enthalten – man spricht von hybriden Systemen [1]. Hybride Systeme sind aber komplizierter im Aufbau, da die optimale Versorgung des im Bioreaktor enthaltenden Gewebes oberste Priorität besitzt.

Bioreaktoren, die insbesondere für die Kultur von Leberzellen (Hepatozyten) kreiert worden sind, befinden sich erst in der klinischen Erprobung. Einer der erfolgversprechendsten Ansätze stellt dabei die Kultivierung von Hepatozyten in Hohlfasermembranen dar. Hohlfasern erlauben die dreidimensionale Kultivierung von Zellen entweder im inneren Hohlraum der Fasern oder im interkapillären Raum. Die Nährstoff- und Gasversorgung erfolgt dann entweder über den interkapillären Raum, das Faserlumen oder über separate Fasern. Allen

Systemen gemein ist jedoch der den Hohlfasersystemen inhärente Nachteil: Das Einströmen des Nährmediums und der Versorgungsgase erfolgt zwangsweise an einem Ende der Hohlfaser. Während des Durchtritts durch die Faser verstoffwechseln die Zellen das Nährmedium und den Sauerstoff. Es kommt also zur Gradientenbildung zwischen Anfang und Ende der Kapillare. Es muss deshalb immer ein Kompromiss zwischen Faserlänge und Zellzahl gefunden werden, um eine Unterversorgung der am Faserende liegenden Zellen auszuschließen. Idealerweise wären also alle Zellen eines Kultursystems an allen Positionen im Bioreaktor gleich gut mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt. Darüberhinaus sollten insbesondere Hepatozyten dreidimensional definiert kultiviert werden, da die Dreidimensionalität zu einem deutlichen längeren Erhalt der organotypischen Funktionen der Zellen führt. Werden die Zellen im interkapillären Raum kultiviert, bilden sich undefinierte Gewebsschichten aus, die nur durch die Größe des interkapillären Raumes beschränkt sind und unter Umständen die für eine Versorgung über Diffusion begrenzte mittlere freie Weglänge überschreiten.

Der CellChip

Der am Institut für Biologische Grenzflächen (IBG) entwickelte, mittlerweile als CellChip bekannte Ansatz soll die Nachteile von Hohlfasersystemen umgehen und wurde als Mikrosystem realisiert, das durch seinen Aufbau (Abb. 1) einige deutliche Vorteile gegenüber anderen Systemen in sich vereint, die im folgenden erläutert werden

sollen. Der CellChip ist als Einwegartikel konzipiert, der aus gut im Mikrospritzguss verarbeitbaren Materialien, wie Polycarbonat oder Polymethylmethacrylat, hergestellt werden kann. Der aus diesem Prozess resultierende cp-Chip (Abb. 1, oberes Schema) ist durch ein Gitter charakterisiert, das bis zu 900 Mikrocontainer auf einer Grundfläche von 1 cm² enthalten kann. Jeder Mikrocontainer mit den Maßen 300 × 300 × 300 µm kann 5 bis 10000 Zellen aufnehmen, dies entspricht ca. 4,5 bis 9 Mio. Zellen pro Chip (Abb. 2). Die damit erreichte Zelldichte beträgt ca. 50 % der Zelldichte einer intakten Leber [2].

Da diese Variante des CellChips, der hinterher noch gelasert werden musste, um Poren für die Mediumversorgung einzubringen, sehr aufwändig zu fertigen war, wurde der Herstellungsprozess derart vereinfacht, dass der Boden durch eine vorkonfektionierte Membran ersetzt wurde. Der so entstandene cf-Chip (Abb. 1, mittleres Schema) unterschied sich nicht von den Mikrocontainermaßen. Jedoch wurde die Anzahl der Mikrocontainer auf bis zu 1156 erhöht. Die maximal kultivierbare Zellzahl stieg damit auf bis zu knapp 12 Mio. Zellen an, was für die spätere Anwendung im Bioreaktor für ein extrakorporales Organunterstützungssystem ein wichtiger Schritt war. Es muss auf möglichst kleine Volumina des Reaktorkreislaufs hingearbeitet werden, um einerseits auf den Einsatz von Plasmaexpandern verzichten zu können und andererseits das Kreislaufvolumen klein bleibt, um die von den Zellen in den Kreislauf abgegebenen Proteine nicht zu stark zu verdünnen.

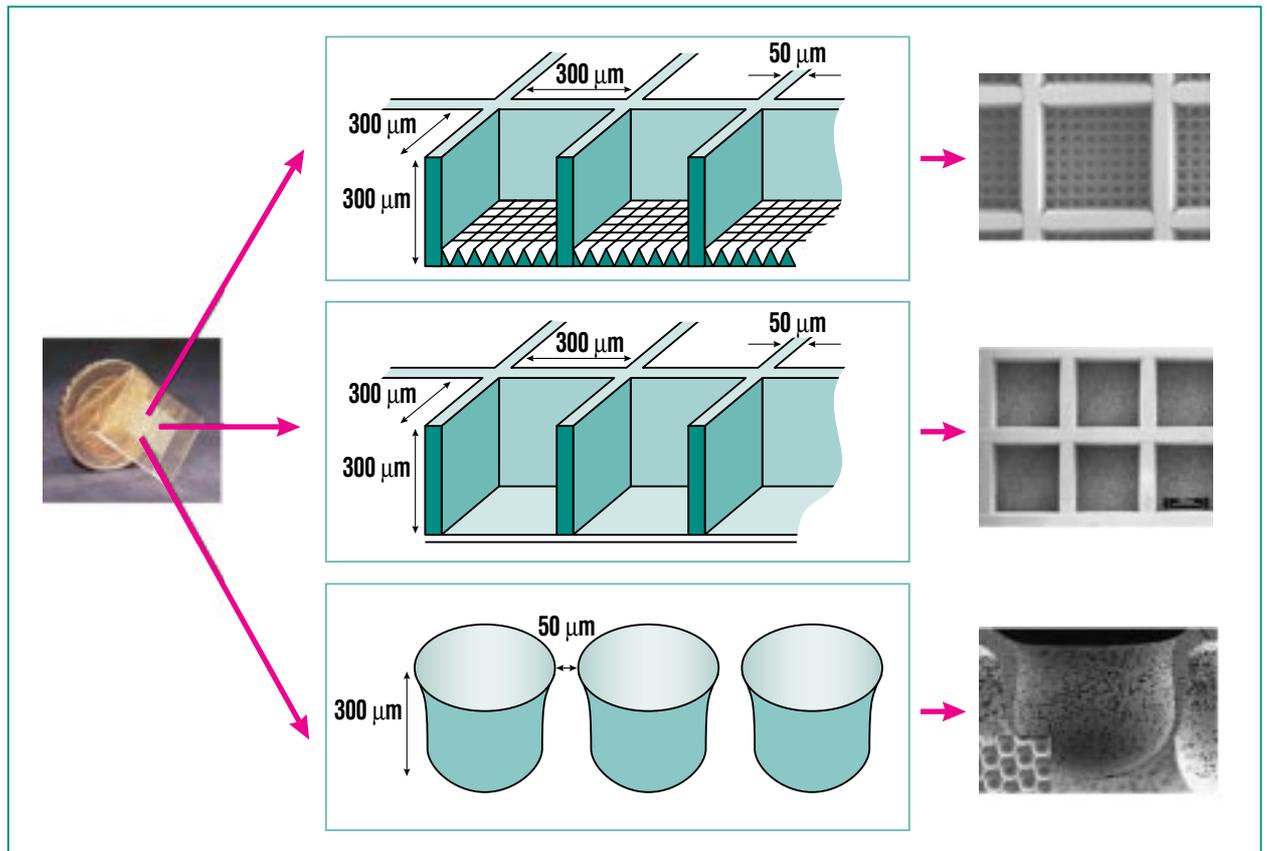


Abb. 1: CellChip-Varianten. Das obere Schema zeigt den sog. cp-Chip, der durch seine pyramidalen Vertiefungen charakterisiert ist. In der mittleren Variante, dem cf-Chip, wurde der pyramidenförmig ausgestaltete Boden durch einen flachen Boden ersetzt, der durch eine poröse Membran gebildet wird. Die untere Variante, der r-Chip, ist durch seine runden Kavitäten charakterisiert. Durch den SMART-Prozess ist die Herstellung des Chips wesentlich vereinfacht worden.

Die dritte Variante des CellChips, als r-Chip bezeichnet, unterscheidet sich nicht nur durch den Herstellungsprozess, sondern auch im Design der Mikrokontainer. Der Herstellungsprozess wurde durch die Einführung eines am IBG, IMT und GSI (Gesellschaft für Schwerionenforschung) entwickelten und auf Mikrothermoformen basierenden Prozesses zur SMART-Technologie (Surface Modification And Replication by Thermoforming) weiterentwickelt. In diesem Prozess werden Membranen nahe ihrer Glasübergangstemperatur verstreckt. Der Vorteil dieses Pro-

zesses ist nicht nur die wenige Schritte umfassende Prozesskette, sondern auch die Möglichkeit der Oberflächen- und Vollmaterial-Modifikation des Materials vor dem Verstrecken der Folien. Damit sind nun hochaufgelöste Polymermodifikationen in 3D-Strukturen realisierbar, sogar in solchen mit echten Hinterschnitten. Ein weiterer Vorteil des SMART-Prozesses besteht in der Möglichkeit die Größe der Poren sehr genau einstellen zu können, da die Ätzbedingungen der latenten Spuren nach dem Schwerionenbeschuss die Porengröße definieren. Damit sind

geeignete Porenanzahlen und -größen für alle möglichen Zellen einstellbar [3] (für weitere Einzelheiten siehe auch Artikel von S. Giselbrecht in dieser Ausgabe der „Nachrichten“).

Bioreaktoren

Für eine definierte Versorgung der Zellen mit Nährmedium und Sauerstoff werden die CellChips in eigens dafür konstruierte Bioreaktoren eingebaut [4]. Je nach Anwendungszweck lassen sich ein oder mehrere CellChips in einem Bioreaktor unterbringen. Für eine

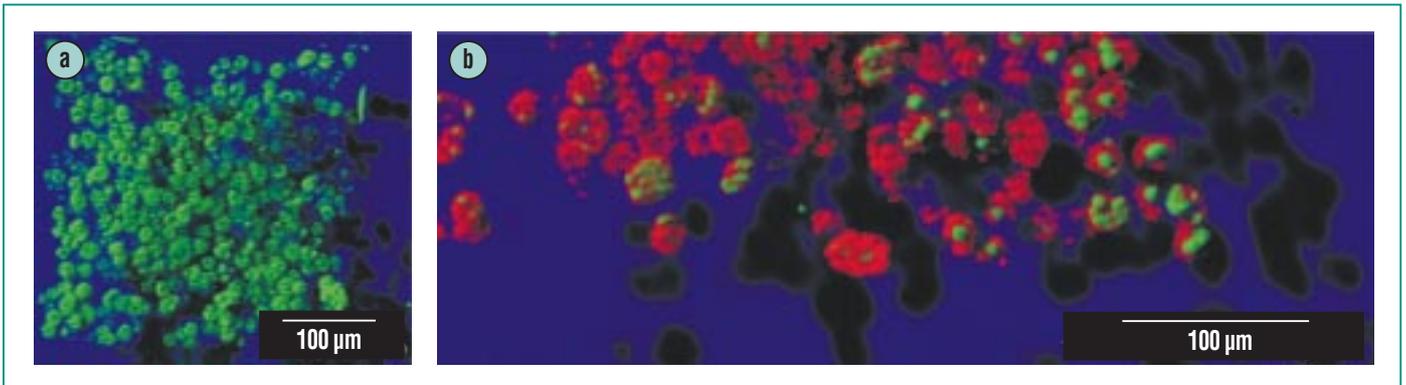


Abb. 2: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (Aufsicht) von Hepatozyten (Hep G2) in einem Mikrocontainer eines cf-Chips. a) Färbung der Zellkerne mit einem grün fluoreszierenden Farbstoff, der die Zelldichte im Chip widerspiegelt. b) Darstellung des Cytoplasmas durch Nachweis eines cytoplasmatischen Proteins, das mit einem roten Fluoreszenzfarbstoff gelabelt wurde (Querschnitt).

Anwendung als extrakorporales Organunterstützungssystem geht man im Falle der Leber von einer erforderlichen Zellmasse von mindestens 10 % des Lebergewichts aus. Die Leber eines 75 kg schweren Menschen wiegt ca. 1,5 kg und besteht aus $2,5 \times 10^{11}$ Zellen. Für einen Bioreaktor wäre demnach eine Leberzellmasse von

150 g, entsprechend $2,5 \times 10^{10}$ Zellen erforderlich. Mit dem derzeitigen CellChip-Design wären also gut 2000 CellChips erforderlich, um eine ausreichende Zellmasse für humane therapeutische Anwendungen zu erreichen.

Um die Realisierbarkeit zu testen, wurden zunächst Bioreaktoren ent-

wickelt, die eine ausreichende Zellzahl für eine Anwendung am Kleintier aufnehmen können (Abb. 3). Der 32 CellChips fassende Bioreaktor beherbergt knapp 400 Mio. Zellen. Dies entspricht der Gesamtzellzahl einer jugendlichen Rattenleber. Der Bioreaktor ist segmentiert, d. h. er fasst jeweils vier CellChips in acht Gruppen zu-

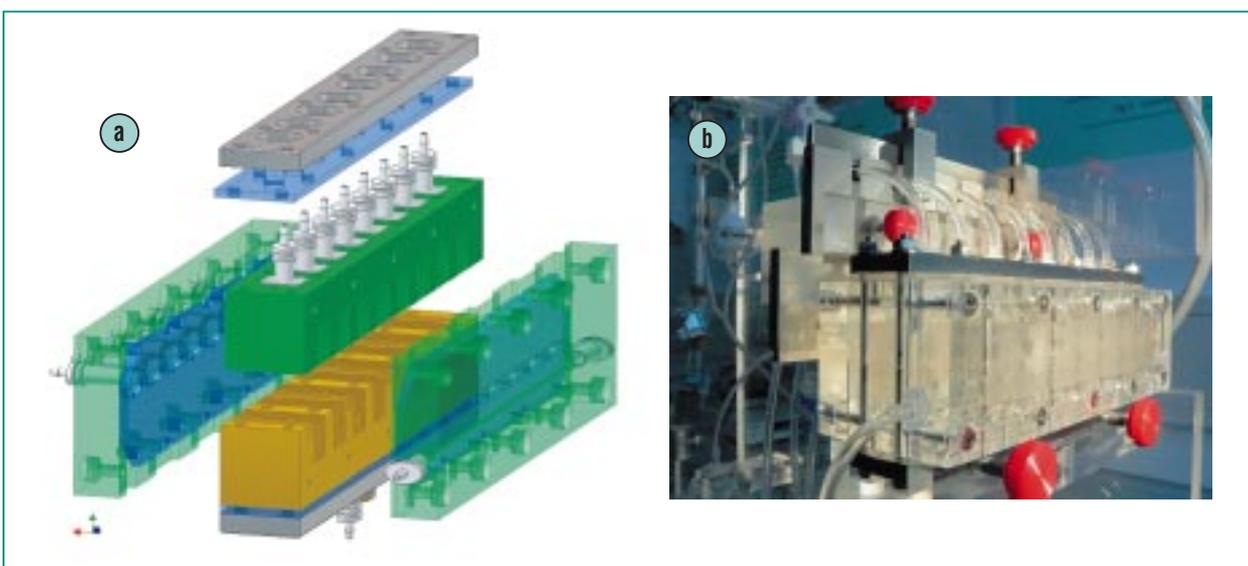


Abb. 3: Bioreaktor für die Anwendung am Kleintier, wie beispielsweise der Ratte. a) Explosionszeichnung des Bioreaktors. Der Bioreaktor kann 32 CellChips aufnehmen (acht Segmente à vier CellChips), entsprechend knapp 400 Mio. Zellen, der Zellzahl einer kompletten Rattenleber. b) Bioreaktor in zusammengesetztem und verschlauchtem Zustand.

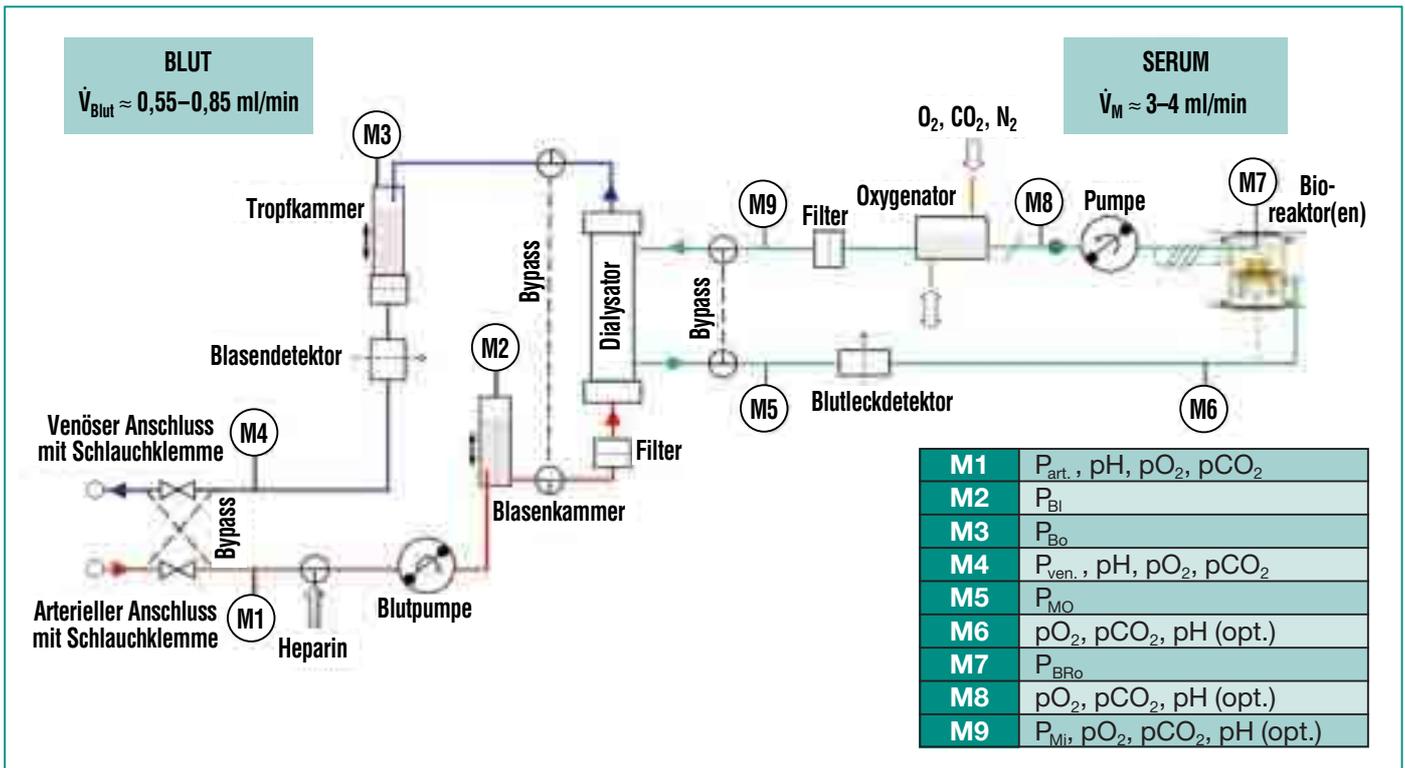


Abb. 4: Extrakorporalkreislauf für die Anwendung am Kleintier.

sammen, die unabhängig voneinander durchströmt werden können. Der Bioreaktor stellt zwar den zentralen Teil eines Extrakorporalkreislaufs dar, ist aber nur ein Bestandteil des Gesamtsystems. Eine weitere wichtige Komponente stellt das Dialysatormodul bzw. der Plasmaseparator (Abb. 4) dar, der

das für den Sekundärkreislauf notwendige Fluid aus dem Vollblut separiert. Es stellt darüberhinaus die Schnittstelle zwischen dem Primärkreislauf (Blut) und Sekundärkreislauf (Plasma) dar. Um das gereinigte Plasma dem Tier unbeschadet zuführen zu können, sind ferner Module wie Pumpen, Blutleckdetektoren, Blaskammern, Sensoren für Druck, Sauerstoff usw. notwendig, die an verschiedenen Stellen des Kreislaufs integriert sind.

Da am Kleintier kein Anschluss des Extrakorporalkreislaufs analog zur humanen Situation erfolgen kann, nämlich über einen sogenannten arterio-venösen Shunt (Verbindung einer Vene mit einer Arterie) im Unterarm, mussten zunächst Operationstechniken für die Blutentnahme sowie dessen Rückführung ent-

wickelt werden. Erfolgreich verliefen Versuche zur Entnahme und Rückführung des Blutes über geeignete Gefäße im Kopfbereich des Tieres. Dazu wird den Tieren zunächst eine Hilfskonstruktion in das Schädeldach implantiert, die den Anschluss der notwendigen Schläuche ermöglicht (Abb. 5). Nach dem Wiedererwachen kann sich das Tier damit sogar frei bewegen, da störende Schläuche über eine Halterung nach oben geführt werden. Die Methoden zur Charakterisierung der zellulären Funktionen im Bioreaktor sind bereits seit Jahren etabliert und orientieren sich sowohl an klinischen Tests als auch an pharmakologisch relevanten Tests zur Stoffwechselfähigkeit.



Abb. 5: Schädelimplantat für die Entnahme und Rückführung des Blutes aus bzw. in den Körperkreislauf des Versuchstieres.

Ausblick

Erste Tierversuche sollen zunächst zeigen, ob Tiere, denen lediglich ein Teil der Leber (ca. 75 %) entfernt worden ist, sogenannte teilhepatektomierte Tiere, nach Anschluss an das System überleben können. Weitere Evaluierungen sehen dann Versuche an total hepatektomierten Tieren vor, also solchen, denen die Leber komplett entfernt wurde. Da solche Tiere auch ohne Leber

drei bis fünf Tage überleben können, werden diese Versuche über mindestens sieben Tage laufen.

Das CellChip-System eignet sich darüberhinaus auch für die Kultur anderer Zellen, wie wir in zahlreichen Experimenten zeigen konnten [5]. Beabsichtigt ist ferner der Einsatz als Stammzellplattform. Autologe Stammzellen könnten zunächst expandiert und anschließend differenziert werden, um sie schließlich transplantieren zu kön-

nen. Da der CellChip auch aus bioresorbierbaren Materialien hergestellt und in seinem Design sehr variabel gestaltet werden kann, könnten im CellChip in vitro differenzierte autologe Stammzellen nach Expansion und Differenzierung direkt, also ohne Entnahme aus dem CellChip transplantiert werden.

Literatur

- [1] E. Gottwald, *Spektrum der Wissenschaft* 2002, 1: 44–51
- [2] G. Knedlitschek, F. Schneider, E. Gottwald, TH. Schaller, E. Eschbach, K.-F. Weibezahn, *Journal of Biomechanical Engineering*, 121(1999) S. 35–39
- [3] S. Giselbrecht, T. Gietzelt, E. Gottwald, C. Trautmann, R. Truckenmüller, K.-F. Weibezahn, A. Welle, *Biomed. Microdev.* 2006, 8: 191–199
- [4] E. Eschbach, S.S Chatterjee, M. Nöldner, E. Gottwald, H. Dertinger, K.-F. Weibezahn, G. Knedlitschek, *J. Cell. Biochem.* 2005, 95: 243–255 (2.946)
- [5] E. Gottwald, S. Giselbrecht, C. Augspurger, N. Dambrowsky, R. Truckenmüller, V. Piotter, T. Gietzelt, O. Wendt, W. Pflöging, A. Welle, A. Rolletschek, A.M. Wobus, K.-F. Weibezahn, *Lab Chip* 2007, 7, 777–785 DOI 10.1039/b618488j