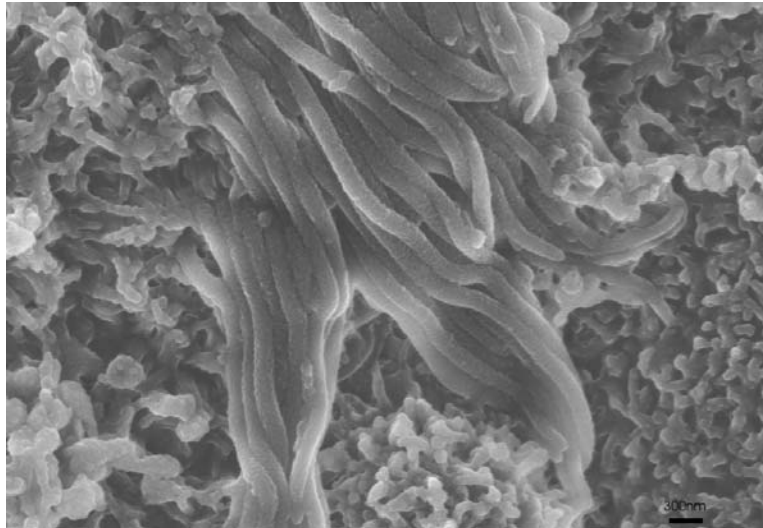


Humanes Trachea-Gewebemodell zur Optimierung von Health-Care- und Medizin-Produkten

Abschlussbericht 2847



REM-Aufnahme einer zilientragenden Zelle des respiratorischen Epithels

Antragsteller: Prof. Dr. Thomas Hirth, Universität Stuttgart, Institut für
Grenzflächenverfahrenstechnik
Doktorandin: Diplom Biologin Iris Dally

Projektbeschreibung

1. Hintergrund

Die Luftröhre stellt im Respirationstrakt eine wichtige Barriere gegen unterschiedlichste Krankheitserreger und Umwelteinflüsse dar. Neben der Aufrechterhaltung des Lumens für die Passage der Atemluft und deren Anfeuchtung sowie Erwärmung, stellt eine weitere wichtige Funktion die mukoziliäre Clearance dar, ein Reinigungsmechanismus der auf der Schleimproduktion und dem metachronen Zilienschlag trachealer Epithelzellen beruht. Dabei werden eingeatmete Partikel an einen oberflächlichen Schleimfilm in der Luftröhre zunächst gebunden und anschließend durch einen metachronen Zilienschlag Richtung Pharynx abtransportiert.

Welche wichtige Rolle die Luftröhre dabei spielt, wird vor allem deutlich, wenn durch eine Erkrankung oder ein Trauma der Trachea eine Resektion der Luftröhre notwendig wird. Nur Stenosen bis 4cm Länge können durch eine End-zu-End-Anastomose versorgt werden.

Seit 50 Jahren gibt es bereits die verschiedensten Ansätze zur Entwicklung eines Trachea Ersatzes [1]. Limitiert werden diese Entwicklungen allerdings durch nicht optimale Materialien und der Notwendigkeit zur Vaskularisation langstreckiger Gewebeimplantate. Zudem gibt es bis heute keine Möglichkeit, neue Implantate oder die Resorption neuer inhalativ zu verabreichender Medikamente bzw. deren Darreichungsformen an einem funktionellen humanen Gewebemodell zu testen, welches auch über die charakteristischen Zellfunktionen der mukoziliären Clearance, also Schleimproduktion und Zilienschlag verfügt.

Mit den Methoden des Tissue Engineering eröffnet sich die Möglichkeit, autologe Transplantate herzustellen, die anders als allogene Organtransplantate vom Körper nicht abgestoßen werden, mitwachsen können und möglichst lebenslang die Funktion geschädigter Organe im Körper ersetzen [2]. Anders als bei gegenwärtig verwendeten synthetischen Implantaten bestehen diese aus lebenden Zellen, wodurch das Implantat in den Körper einheilen kann.

2. Zielsetzung

Entwicklung eines humanen funktionellen Trachea-Gewebemodells mit primären Zellen auf einer vaskularisierten Matrix [3]. Diese Matrix und die Kultivierung in einem speziellen Bioreaktorsystem, sollen dabei die Funktionalität der Zellen gewährleisten. Eingesetzt werden kann das 3D humane Trachea-Gewebemodell für:

- (I) Untersuchungen zur Biokompatibilität und Einheilungsversuchen neuer synthetischer Materialien für die Rekonstruktion der Trachea oder als Stent.
- (II) Untersuchungen zur Penetration und Resorption von Wirkstoffen, Nanopartikeln oder sonstigen Chemikalien

3. Ergebnisse

3.1 Zellisolation

Zur Isolation der humanen primären Trachea-Epithelzellen (hTEZ) aus humanem Biopsiematerial hat sich die Auswachsmethode als geeignet erwiesen. Dabei wird das respiratorische Epithel des Biopsats in kleine Stücke zerteilt und diese auf zuvor mit Kollagen Typ I beschichtete Gewebekulturplatten ausgesetzt (Abbildung 1A). Anschließend wurden die Gewebestücke mit Airway Epithelium Cell Growth Medium (AECG-Medium, PromoCell) überschichtet und kultiviert. Bei der Verwendung dieses Zellkulturmediums zeigten die humanen Trachea Epithelzellen eine gute Proliferation und die für Epithelzellen typische kubische Zellmorphologie (Abbildung 1B).

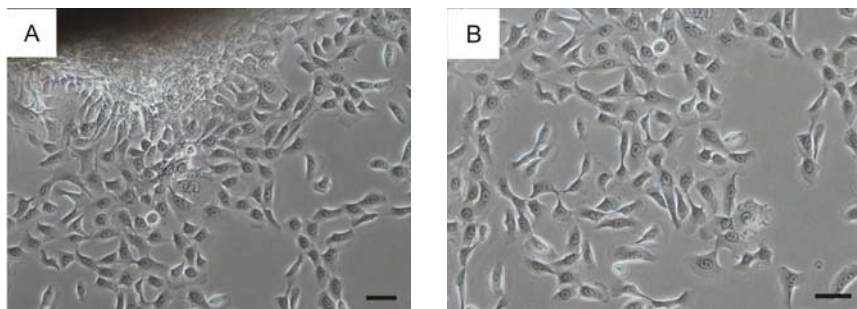


Abbildung 1: Zur Isolation der Zellen wurden kleine Gewebestücke auf einer mit Kollagen Typ 1 beschichteten Zellkulturplatte ausgesetzt (A). Bei Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen subkultiviert (B). Größenbalken jeweils 50 µm.

Da aufgrund des Mangels an Spendermaterial nur wenige Zellen für die Versuche isoliert werden konnten, wurden neben den primären hTEZ auch zwei Zelllinien zum Aufbau der 3D Zellkulturen eingesetzt. Die Lungenkarzinom-Zelllinie Calu-3 und die immortalisierten humanen fötalen Trachea-Epithelzellen (FHTE).

3.2 Aufbau der statischen Kulturen

Zum Aufbau eines dreidimensionalen (3D) Tracheamodells wurden zunächst statische Kulturen auf einer biologischen Trägerstruktur aufgebaut. Als biologische Matrix wurde azellularisierter Schweinedünndarm verwendet, der mittels Säurebehandlung von allen porcinen Zellen befreit wurde. Nach dieser Behandlung bleibt lediglich das Kollagengerüst übrig, welches den Zellen als Trägerstruktur dient.

Zur Kultivierung wurde zunächst das Airlift-Kultivierungsverfahren ausgewählt. Die gewonnene Trägerstruktur wird dazu in 24-Zell Kronen (Scaffdex) mit der Darmaußenseite nach innen eingespannt und die Zellen apikal (500 000 Zellen pro cm²) aufgesiedelt. Damit die

Zellen auch adhären können, wurde die Serosa zuvor manuell entfernt. Die Zellkronen wurden anschließend in 24-Well Gewebekulturplatten eingesetzt und erhalten so eine apikale Luft- und basale Medienzufuhr.

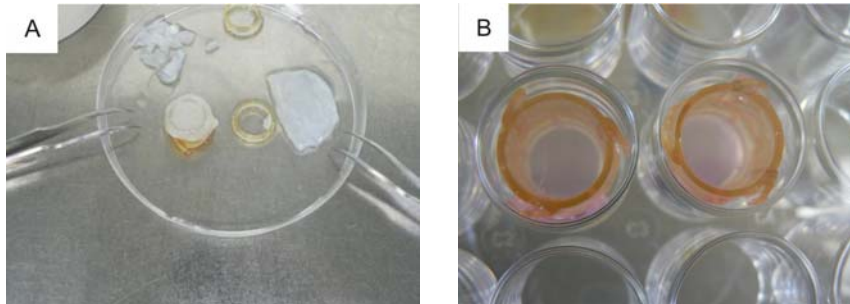


Abbildung 2: Zur statischen Kultivierung der Zellen wird die biologische Matrix in Zellkronen eingespannt (A), die anschließend in 24-Well Platten zur Airlift-Kultivierung eingesetzt werden (B).

Die statischen Besiedelungsversuche wurden sowohl mit primären hTEZ, als auch mit den Zelllinien Calu-3 und FHTE durchgeführt.

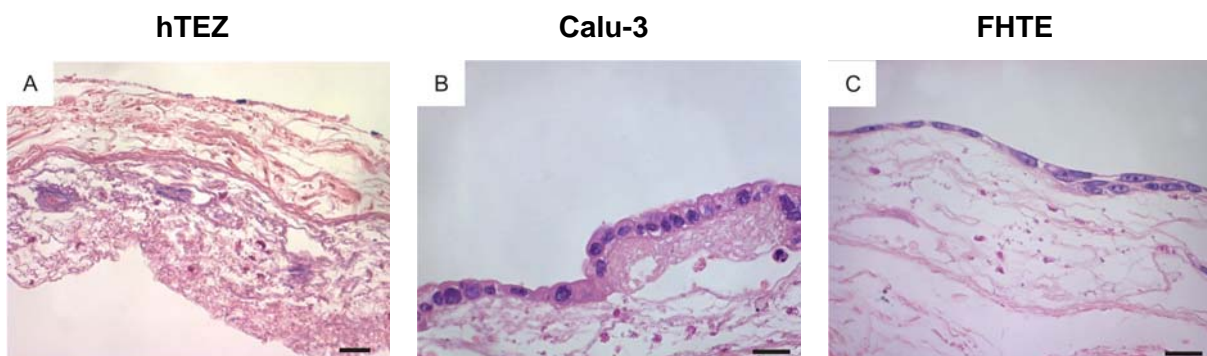


Abbildung 3: Statische Kultivierung der primären hTEZ (A), der Lungenkarzinomzelllinie Calu-3 (B) und der immortalisierten Zellen FHTE (C) auf der biologischen Trägerstruktur. Die Kultivierungsdauer betrug jeweils 3 Wochen. Größenbalken jeweils 20 µm.

Die Zelllinien Calu-3 und FHTE zeigten in der statischen Kultur auf der biologischen Matrix jeweils einen geschlossenen Monolayer und ein gutes Wachstum (Abbildung 3 B und C), während die primären hTEZ auf der Matrix weder adhären, noch proliferieren konnten (Abbildung 3 A).

In einem weiteren statischen Versuch mit einem Kollagen Typ 1 beschichteten PET-Insert wurde daher nochmals untersucht, ob eine Adhäsion und Proliferation der primären hTEZ in einer statischen Kultur generell möglich ist. Diese Kultivierungsart zeigte ein positives Ergebnis, die Zellen waren in der Lage zu adhären, zu proliferieren und bildeten außerdem Zilien aus (Abbildung 4).

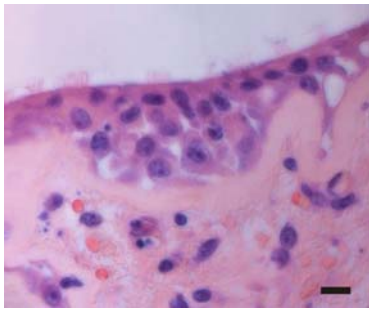
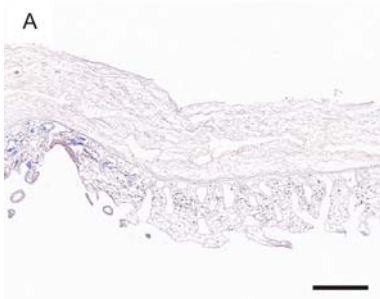


Abbildung 4: Primäre humane Trachea-Epithelzellen, kultiviert auf einem Kollagen Typ 1 beschichteten PET-Insert. Größenbalken entspricht 10 μm .

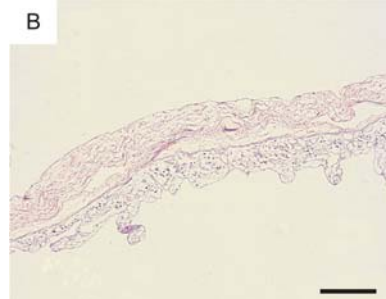
Im nächsten Versuchsansatz wurde die biologische Matrix daher mit zwei verschiedenen Proteinen vorbehandelt, um die Adhäsion der primären humanen Zellen auf der biologischen Matrix zu unterstützen. Eingesetzt wurden zur Beschichtung bovines Fibronectin (5 $\mu\text{g/ml}$) und Kollagen Typ 1 aus dem Rattenschwanz (500 $\mu\text{g/ml}$).

Nach 3 wöchiger Airlift-Kultivierung wurden die Trägerstrukturen mit den aufgesiedelten Zellen mit Histofix (Roth) fixiert und in Paraffin eingebettet. Zur Auswertung wurden Hämalaun-Eosin-gefärbte Dünnschnitte angefertigt. Die hTEZ konnten trotz zusätzlicher Proteinbeschichtung der biologischen Matrix weder adhären, noch proliferieren (Abbildung 5).

Biol. Matrix ohne Proteinbeschichtung



Biol. Matrix mit Fibronectin-Beschichtung



Biol. Matrix mit Kollagen Typ 1-Beschichtung

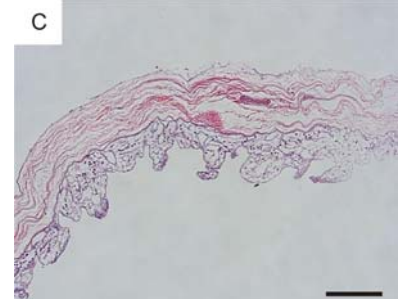


Abbildung 5: Primäre hTEZ wurden auf die biologische Matrix aufgesiedelt und 3 Wochen unter Airlift Bedingungen kultiviert (A). Parallel wurden Stücke der biologischen Matrix mit Fibronectin (B) und Kollagen Typ 1 (C) beschichtet und anschließend eine Airlift Kultivierung der hTEZ vorgenommen. Größenbalken jeweils 200 μm .

Da sich die biologische Matrix aus dem Schweinedünndarm nicht zur statischen Kultivierung der primären hTEZ eignete wurde anschließend in einem Vorversuch ein biokompatibler „Collagen Cell Carrier“ (CCC) der Firma Naturin Viscofan GmbH eingesetzt. Dieser lässt sich entsprechend der zuvor verwendeten biologischen Matrix in die Zellkronen einspannen und ermöglicht damit ebenfalls die statische Airlift-Kultivierung der hTEZ.

Nach einem Kultivierungszeitraum von 1 Woche konnten die primären Zellen auf dieser Matrix sowohl adhären als auch proliferieren (Abbildung 6).



Abbildung 6: HE-Färbung der primären hTEZ auf einem Kollagen Typ I Cell Carrier der Firma Naturin Viscofan GmbH. Die Zellen wurden für 1 Woche statisch kultiviert. Der Größenbalken entspricht 50 μm .

Da sich diese Trägerstruktur zur Kultivierung der hTEZ besser eignet, sollen noch weitere Untersuchungen zur Adhäsion und Proliferation in längeren Zeiträumen durchgeführt werden.

3.3 Aufbau der dynamischen Kulturen

Für ein funktionelles Luftröhren-Gewebemodell ist es wichtig, dass die Zellen ihre natürliche Funktion beibehalten. In diesem Zusammenhang sollten die Kulturbedingungen optimiert und den Bedingungen *in vivo* angepasst werden. Die Zellen wurden daher parallel zur statischen Kultur in einem speziellen Bioreaktorsystem kultiviert, in dem die Zellen durch einen konstanten Medienfluss und die Simulation der Atmung (Inspiration und Expiration) zusätzlich mechanisch stimuliert wurden.

Der zur dynamischen Kultivierung der Zellen entwickelte Bioreaktor besteht aus zwei Kammereinheiten, mit einer effektiven Besiedelungsfläche von 1cm^2 . Die beiden Kammersysteme werden durch das Einspannen der biologischen Matrix räumlich voneinander getrennt. Der obere Teil des Reaktors sorgt für die mechanische Stimulation der Zellen, indem durch ein zuführendes Schlauchsystem Luft über die Epithelzellen geleitet wird. Die untere Kammer dient der Versorgung der Zellen mit Zellkulturmedium.

Zur dynamischen Kultivierung wurde die Zelllinie Calu-3 und die immortalisierten FHTE eingesetzt, die bereits in der statischen Kultur eine gute Adhäsion und Proliferation auf der biologischen Matrix gezeigt hatten (Abbildung 7).

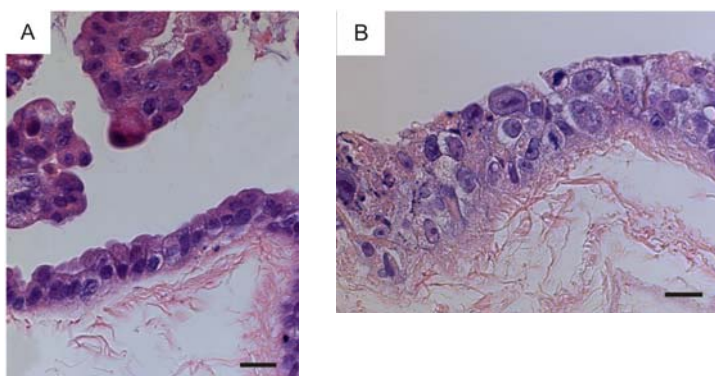


Abbildung 7: Im Bioreaktor wurden die Zellen auf die Biologische Trägerstruktur aufgesiedelt und anschließend dynamisch kultiviert. Zellen der Lungencarcinom Zelllinie, Calu-3 (A) und immortalisierte fötale Trachea-Epithelzellen, FHTE (B). Der Größenbalken entspricht jeweils 20 μm .

Die Calu-3 Zellen (Abbildung 7, A) zeigten eine sehr starke Proliferation und müssen daher in weiteren Untersuchungen in einer geringeren Zelldichte ausgesät werden, um das Zellwachstum nicht negativ zu beeinflussen. Gleichzeitig weisen sie ein ansatzweise hochprismatisches Wachstum auf, welches den nativen Zellen der Epithelzellen in der menschlichen Luftröhre entspricht. Die FHTE (Abbildung 7, B) zeigten ebenfalls eine sehr gute Proliferation, weisen jedoch ein mehrschichtiges und nicht hochprismatisches Wachstum auf.

In weiteren Untersuchungen soll geklärt werden, welche Faktoren zur Ausbildung der hochprismatischen Zellen notwendig sind. Außerdem ist die Entwicklung neuer Trägerstrukturen für den Einsatz im Bioreaktor hinsichtlich der Verwendung primärer humaner Trachea-Epithelzellen notwendig, da diese sich nicht auf der bislang eingesetzten biologischen Trägerstruktur kultivieren lassen.

4. Literatur

1. Grillo HC. Tracheal replacement. *J Thorac Cardiovasc Surg* 125:975-976, 2003.
2. Fuchs JR, Nasser BA, Vacanti JP: Tissue engineering: A 21st century solution to surgical reconstruction. *Ann Thorac Surg* 2001; 72: 577-591.
3. Mertsching H, Walles T, Hofmann M, Schanz J, Knapp WH. Engineering of a vascularized scaffold for artificial tissue and organ generation. *Biomaterials* 2005;26(33):6610-6617.
4. Macchiarini P, Walles T, Biancosino C, Mertsching H. First human transplantation of a bioengineered airway tissue. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2004;128(4):638-641.
5. Mertsching H, Hansmann J, Schanz J, Linke K, Brenner M, Michaelis J, Walles T. Vaskularisierte Trägersysteme für in vitro Testsysteme. In: D. Beckmann, M. Meister. 13. Heiligenstädter Kolloquium. Technische Systeme für Biotechnologie und Umwelt. Heiligenstadt. Inst. F. Bioprprozess- und Analysentechnik; 2006; ISBN-10: 3-00-018621-2; 47 - 55.
6. Linke K, Schanz J, Hannsman J, Brunner H, Mertsching H. Engineered liver-like tissue on a capillarized matrix for applied research. *Tissue Engineering* 2007; 13(11):2699-707.