

Technische Aspekte des Tissue Engineerings

Wie Bioreaktoren und 3D-Biodrucker in der Gefäßkultivierung eingesetzt werden

Bei der Behandlung verengter oder verstopfter Gefäße müssen diese häufig ersetzt werden. Bisher eingesetzte Implantate beinhalten eine Reihe von Risiken für die Patient*innen.

Daher forschen Wissenschaftler am Institut für Mikroelektronische Systeme (IMS) an Systemen zur Kultivierung bioartifizieller Gefäßprothesen, die aus Gefäßzellen *in vitro* gezüchtet werden sollen.

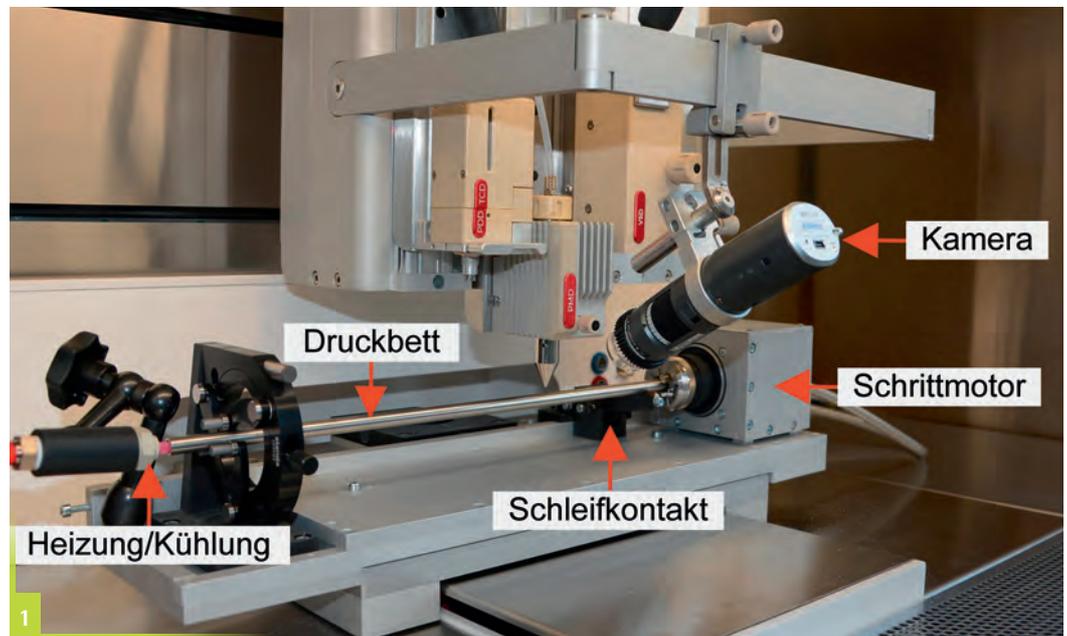


Abbildung 1
Bio-3D-Drucker im
MEW-Modus mit zylindrischem
Druckbett.
Quelle: ims

Herz-Kreislauf-Erkrankungen, die wesentlich auf Atherosklerose zurückzuführen sind, werden von der WHO als eine der häufigsten Todesursachen in der Welt aufgeführt. Der Ersatz von Blutgefäßen ist erforderlich, wenn diese verengt oder verstopft sind. In Deutschland werden pro Jahr etwa 70.000 Gefäßbypässe gelegt. Häufig werden synthetische Gefäßersatzmaterialien eingesetzt, welche eine Behandlung mit gerinnungshemmenden Medikamenten erfordert, um eine erneute Verengung zu verhindern. Alternativ werden Venenersatzstücke oft von Patient*innen selbst entnommen, wobei jedoch nicht alle der betroffenen Personen noch geeignete Ei-

genvenen zur Verfügung haben. Körperfremde Transplantate können aus immunologischen Gründen nur unter abstoßungshemmender Therapie eingesetzt werden. Da diese Verfahren keine idealen Lösungen darstellen, werden dringend bioartifizielle Gefäßimplantate benötigt. Ein möglicher Lösungsansatz ist das vaskuläre *Tissue Engineering* (TE), welches auf der Kultivierung von Gefäßzellen in speziellen Bioreaktoren auf geeigneten Gerüsten (*Scaffolds*) beruht.

Das Institut für Mikroelektronische Systeme (IMS) ist Mitglied des eNIFE, einem dem NIFE assoziierten Forschungszentrum innerhalb der Fakultät für Elektrotechnik und In-

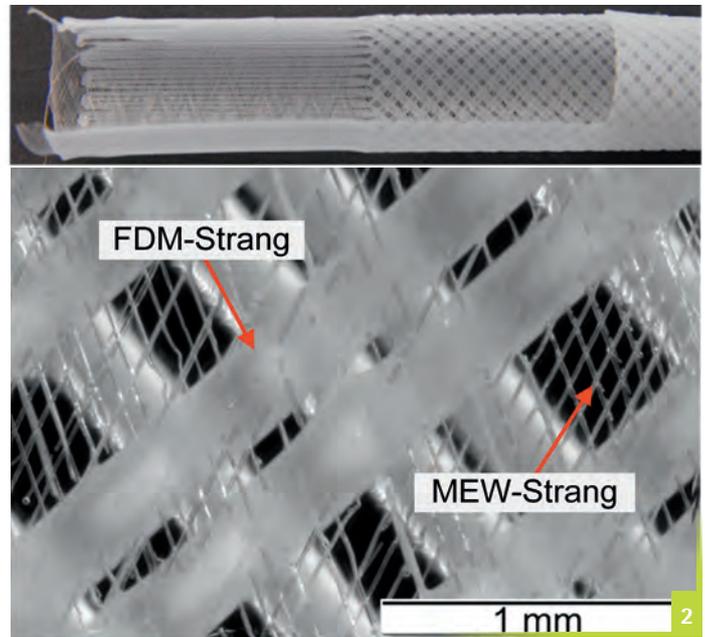
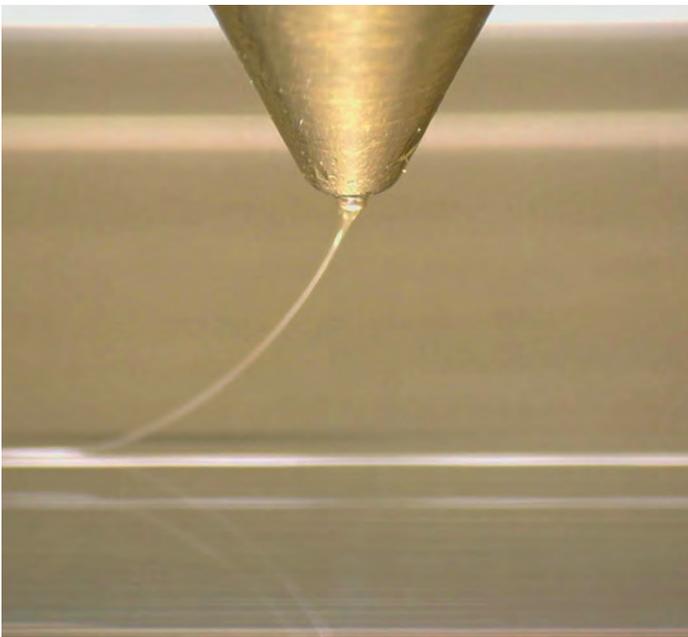
formatik der Leibniz Universität Hannover, welches sich dem Thema Biomedizintechnik aus Sicht der Elektrotechnik und Informatik widmet. In diversen Verbundprojekten wird mit verschiedenen NIFE Arbeitsgruppen kooperiert und unter anderem an 3D-Druckverfahren und Bioreaktoren für TE gearbeitet (siehe den Artikel „Gefäße drucken und kultivieren: Auf dem Weg zum Gefäßimplantat aus der Retorte!“). Diese Systeme sollen es ermöglichen, bioartifizielle Gefäßprothesen aus Gefäßzellen *in vitro* zu züchten. Der Erfolg derartig komplexer Vorhaben muss zunächst grundsätzlich erforscht werden und ist dabei von vielen verschiedenen Prozessschrit-

ten und Parametereinstellungen abhängig.

Als Besiedelungsgrundlage für die Gefäßzellen werden hochporöse, tubuläre Scaffolds benötigt, welche die Zellen fixieren und der Gefäßprothese ihre Form geben. Scaffolds beeinflussen zudem unter anderem die Zellvermehrung, die Zellausrichtung und die Zelldifferenzierung während des Kultivierungsprozesses. Ein

spezielle Bio-3D-Druckverfahren bewerkstelligt werden. Mit klassischen 3D-Druckverfahren wie Fused Deposition Modeling (FDM) kann die benötigte Mikrostrukturierung häufig nicht zufriedenstellend gelöst werden. Die Herstellung von Schichtdicken und Strangbreiten in der erforderlichen Größenordnung von wenigen Mikrometern wird durch die eingesetzten Düsen FDM-basierter Systeme und

Scaffolds mittels MEW, da ein Lagenaufbau entlang der Hochachse über mehrere Zentimeter an überhängenden Strukturen scheitert. Am IMS wurde zur Fertigung tubulärer Scaffolds mittels MEW ein eigener Aufbau entwickelt, welcher eine zusätzliche rotatorische Achse in einen MEW-Drucker integriert (siehe *Abbildung 1*). Dieser Aufbau erlaubt die Ablage der Polymer-Fasern auf einem



wichtiger Aspekt für eine erfolgreiche Gefäßkultivierung ist dabei die Mikrostrukturierung der Scaffolds. Ziel ist eine möglichst exakte biomechanische Nachbildung der nativen extrazellulären Matrix, welche zum Großteil aus Fasern mit wenigen Mikrometern Durchmesser besteht. Um geeignete Strukturen herzustellen, sind Fertigungsverfahren mit Präzision im Zellmaßstab und hoher geometrischer Freiheit notwendig. Mikroelektronischen Komponenten kommen vielfältige Aufgaben zur Überwachung und Steuerung der Prozessschritte beim 3D-Druck zu.

Die Bereitstellung der benötigten Scaffolds kann durch

dem Fließverhalten der Polymere erschwert. Einen möglichen Lösungsansatz stellt das sogenannte *Melt Electrowriting* (MEW) dar. Durch den Einsatz hoher Potentialdifferenzen (>3 kV) zwischen der MEW Düse und dem Druckbett kann eine kontinuierliche Polymer-Faser mit einem Durchmesser zwischen $0,8 - 40 \mu\text{m}$ auf der zu bedruckenden Oberfläche deponiert werden. Das Druckergebnis ähnelt dem Aufbau der nativen extrazellulären Matrix, wodurch MEW-Strukturen eine hohe biomechanische Eignung als Grundlage für die Zellkultivierung aufweisen. Technologische Herausforderungen ergeben sich bei der Herstellung poröser tubulärer

zylinderförmigen Druckbett, welche eine Reduzierung der zu druckenden Schichtdicke und damit überhängende Strukturen erlaubt.

Die geordnete Strangablage beim MEW ist von einer Vielzahl an Prozessparametern und Umgebungsvariablen abhängig. Insbesondere die Materialelektion, die Geschwindigkeit des Druckkopfes und der Abstand zwischen Düse und Druckbett beeinflussen das Druckergebnis. Zur Kontrolle der Prozessparameter eignet sich eine kamerabasierte Erfassung des Druckstrangs. Die optische Überwachung und die Regelung des Druckprozesses müssen dabei in Echtzeit erfolgen.

Abbildung 2
MEW-Druckstrang mit Durchmesser von ca. $10 \mu\text{m}$ (links); MEW- und FDM-Hybridmodell einer nahtlosen tubulären Scaffold-Teststruktur (rechts).

Quelle: ims

Das IMS beschäftigt sich mit den notwendigen Algorithmen und deren Integration in 3D-Druckprozesse. Diese technischen Erweiterungen sollen die präzise Fertigung tubulärer Scaffolds sicherstellen.

Die mit Gefäßzellen besiedelten Scaffolds müssen für einen Zeitraum von mehreren Wochen kultiviert werden, um durchgehende Zellschichten auszubilden. Unter ande-

wachstum erforderlichen Bedingungen bereitstellen (zum Beispiel Temperatur, Druck, mechanische Stimuli, Sauerstoff- und Kohlendioxidsättigung, pH-Wert). Eine kontinuierliche Erfassung verschiedener Messwerte liefert Daten über den Wachstumsprozess, die innere Umgebung sowie die geometrische Struktur des Gefäßimplantats innerhalb des Bioreaktors. Die für die Erfassung und Kontrolle der Kultivierungsbedingungen

toren und Sensoren, welche in Kontakt mit dem eingesetzten Nährmedium kommen, sowohl biokompatibel sein als auch die durch eine hohe Umgebungsfeuchtigkeit und Temperatur geprägten Sterilisationsvorgänge unbeschadet überstehen. Damit während der langen Kultivierungsperiode keine Flüssigkeit aus den Nährmedienkreisläufen verdunstet, werden viele Komponenten des Aufbaus in einem Brutschrank mit einer relati-

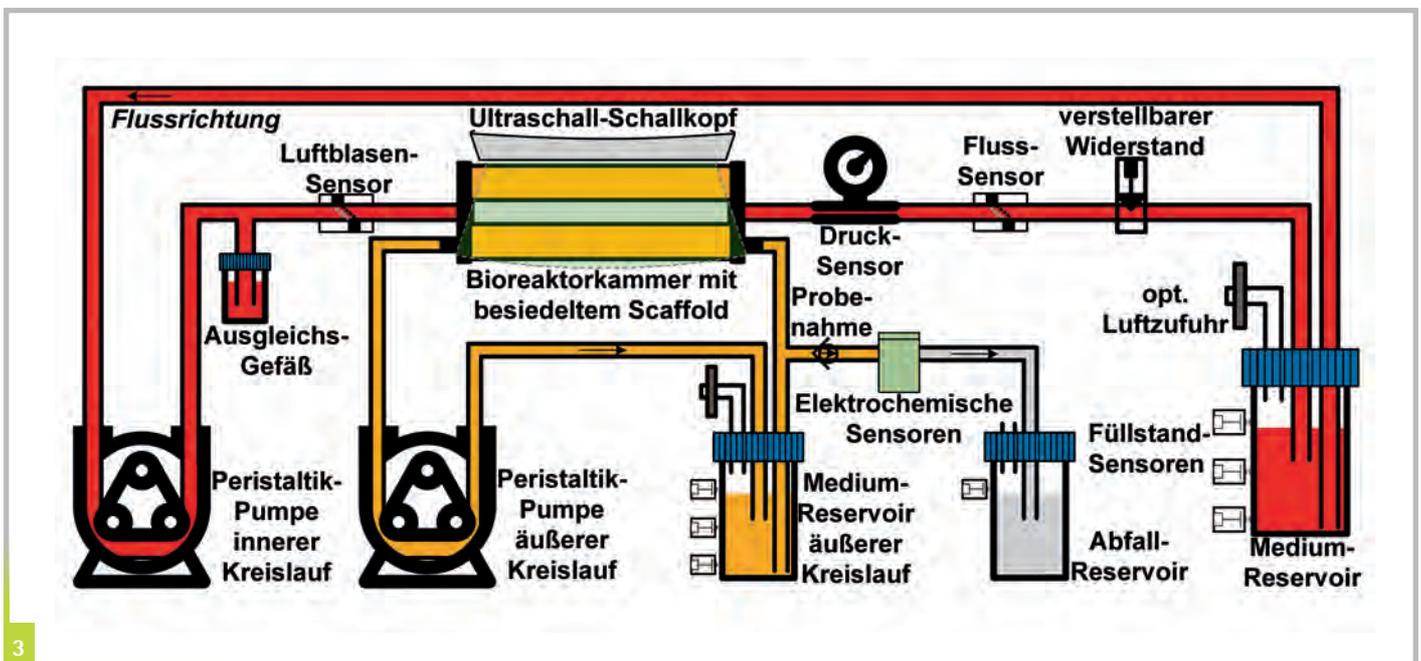


Abbildung 3 Vereinfachter Aufbau des entwickelten TE Bioreaktors. Das mit Zellen besiedelte Scaffold wird in der Bioreaktorkammer befestigt, welche an zwei Kreisläufe mit Nährmedium angeschlossen ist. Der innere Kreislauf (rot) führt durch das Gefäßimplantat und simuliert den Blutfluss. Der äußere Kreislauf (orange) simuliert den Gewebezweischenraum. Beide Kreisläufe werden mit einer Vielzahl verschiedener Sensoren überwacht, die auch als Rückkopplung für die eingesetzten Aktoren dienen.

Quelle: ims

rem durch mechanische Stimuli (wie zum Beispiel Druckpulse und Flussratenänderung des eingesetzten Nährmediums), ähnlich den Bedingungen im menschlichen Blutkreislauf, werden die Zellen bei der Reifung unterstützt und auf die spätere Belastung im Körper vorbereitet. Speziell für die Gefäßzüchtung entwickelte Bioreaktoren stellen daher eine Schlüsseltechnologie für die *in vitro* Kultivierung von biologischen Gefäßprothesen dar. Sie unterstützen die Herstellung funktionaler Implantate, indem sie einen effizienten Stofftransport gewährleisten und gleichzeitig die für das Zell-

erforderlichen Sensoren und Aktoren basieren auf speziell für den Einsatz in Bioreaktorsystemen entwickelten mikroelektronischen Komponenten.

Das IMS konzeptioniert und implementiert in Kooperation mit den NIFE-Projektpartnern ein vollständiges Bioreaktorsystem für die Kultivierung von Gefäßprothesen. Im Rahmen dieser Arbeiten werden insbesondere eigene Sensoren und Aktoren sowie die benötigten elektronischen Schaltungen zur Ansteuerung entwickelt. Die Anwendung in einem Bioreaktor stellt dabei hohe Anforderungen an alle Komponenten. So müssen Ak-

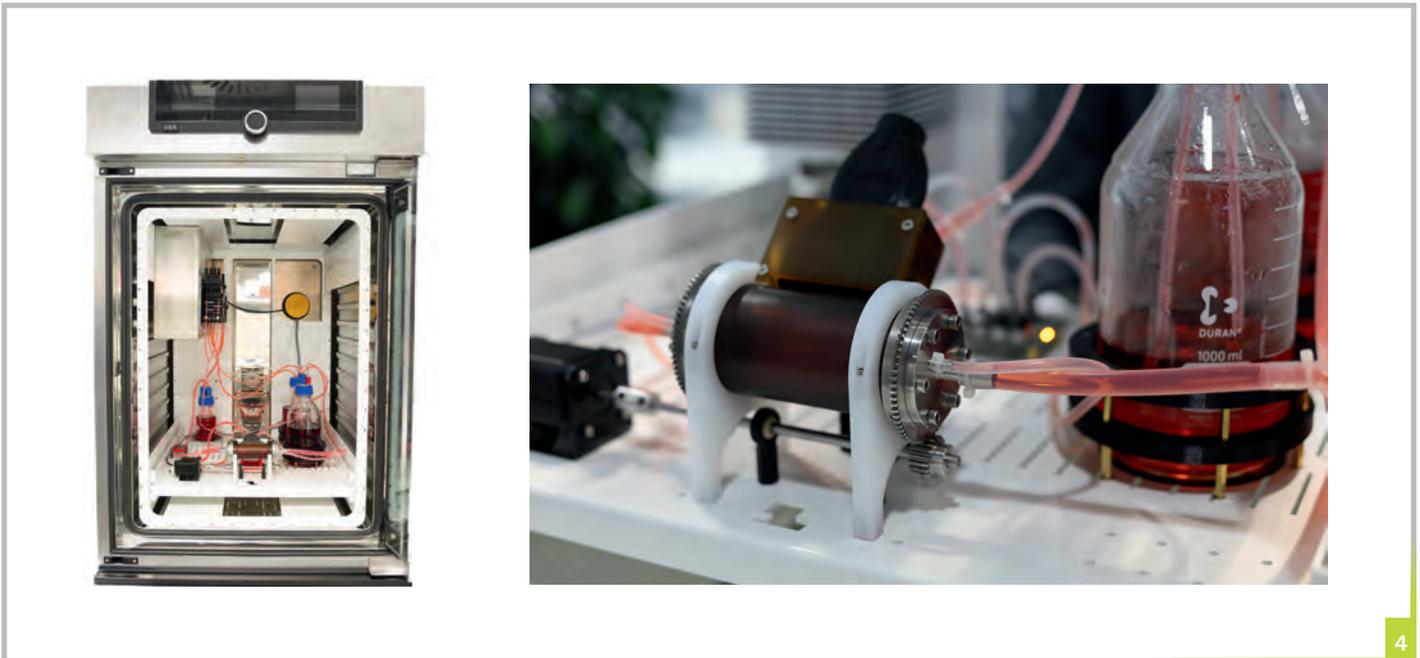
ten Luftfeuchte von 95 Prozent platziert. Die im Brutschrank platzierten elektronischen Komponenten müssen entsprechend durch eine Verkapselung geschützt werden. Auf Grund des wärmeisolierenden Aufbaus von Brutschränken wird bei der Implementierung von elektronischen Komponenten auf eine geringe Verlustleistung Wert gelegt, um eine Überhitzung – und damit Zerstörung – der Zellen zu verhindern.

Die Überwachung und Kontrolle verschiedener physiologischer Parameter erfordert den Einsatz unterschiedlichster Sensorprinzipien. Elektro-

chemische Sensoren werden zur Messung der Konzentration von kleinen Molekülen wie zum Beispiel Glukose eingesetzt. Optische Fluoreszenz-Sensoren messen den pH-Wert des Nährmediums. Sensoren, welche die Widerstandsänderung von Halbleitern bei mechanischer Belastung messen („piezoresistiv“), erfassen den Druck in den Kreisläufen, während thermische Sensoren die Temperatur überwachen, welche für die Aufrechterhal-

kann sie zur Optimierung der Kulturbedingungen für optimales Gewebewachstum und -entwicklung genutzt werden.

Mit den bisher am IMS abgeschlossenen Arbeiten wurden mehrere Versuchsträger entwickelt, die die Anforderungen klinischer und biologischer Forschungsanwendungen im TE Bereich erfüllen. Im weiteren Projektverlauf sollen die Verlässlichkeit und



4

tung optimaler Kulturbedingungen für die Zellen wichtig ist. Darüber hinaus werden Ultraschallsensoren verwendet, um die Fließgeschwindigkeit des Mediums aufzuzeichnen und unerwünschte Luftblasen zu detektieren. Auch die geometrische Struktur des heranwachsenden Gefäßes wird durch die nicht-invasive Aufnahme von Ultraschall-Schnittbildern und einer anschließenden 3D-Rekonstruktion erfasst. Die Integration dieser verschiedenen Sensorprinzipien in Bioreaktoren für TE ermöglicht ein umfassenderes Verständnis der Physiologie des kultivierten Gewebes. Darüber hinaus

Reproduzierbarkeit der erreichten Ergebnisse überprüft werden. Die Entwicklung der entsprechenden Versuchsprotokolle findet dabei in enger Abstimmung mit den NIFE-Projektpartnern statt.

Auf Literaturangaben musste in diesem Artikel verzichtet werden. Interessierte Leser*innen finden im LUH-Forschungsinformationssystem Verweise auf die zugrundeliegenden Publikationen: <http://go.lu-h.de/tNict>

Nils Stanislawski
Henrik Heymann
Holger Blume

Abbildung 4
Bioreaktor-Aufbau im Brutschrank (links) und Bioreaktorkammer mit Ultraschall-Schallkopf (rechts).
Quelle: ims



→ Weitere Informationen siehe Autor*innenseiten.