

# Komplexe Kollagenscaffolds für das Züchten dreidimensionaler Gewebestrukturen *in vitro*

## Einleitung

Die dreidimensionale Kultivierung von Zellen in Bioreaktoren bietet die Möglichkeit physiologische Bedingungen besser zu imitieren und die organotypischen Zellfunktionen auch außerhalb des Organismus zu erhalten. Durch diese Art der Kultivierung können in der versuchstierfreien Substanztestung aussagekräftigere Ergebnisse erzielt und mögliche Nebenwirkungen bereits in frühen Phasen besser erkannt werden. Voraussetzung für die Zellkultivierung in 3D ist die Schaffung von Zellmatrices, die die natürliche Umgebung im Gewebeverband simulieren. Ziel der Studie war daher die Entwicklung von komplexen Matrices, die in Abhängigkeit vom Zielgewebe mit spezifischen Strukturen ausgestattet werden können.



Abbildung 1: Gefriergetrocknetes 3D Kollagenscaffold für die Besiedlung mit Zellen.

## Material und Methoden

Ausgangsmaterial für die Herstellung der 3D Scaffolds war nicht-lösliches, porcines Kollagen, das mittels Gefrierdrying zu Schäumen verarbeitet wurde. Durch die Variation des pH-Wertes (pH = 3 und 5), des Trockensubstanzgehaltes (TS = 1,5 und 2,5) und der Einfriertemperatur (-196°C bis -5°C) wurde ein interkonnektierendes Porensystem erzeugt. Um das Überleben der Zellen im Scaffold zu gewährleisten wurden Versorgungskanäle aus Kollagen integriert, die durch Extrusion einer hochviskosen Kollagensuspension gewonnen wurden.

## Ergebnisse

### SCAFFOLDS

Tabelle 1: Porengrößen der gefriergetrockneten 3D Scaffolds

Einfriertemperatur in °C	Trockensubstanzgehalt in %	pH-Wert	Median Breite der Poren in µm; N=50	SD
-196	7	3	<50	31
-196	2,5	3	67,5	48
-80	7	3	151,5	59
-80	2,5	3	129,8	68
-30	7	3	268,5	126
-30	2,5	3	200,8	59
-30	2,5	5	178,2	66
-30	1,5	5	194,8	65

In Abhängigkeit der Herstellungsparameter zeigten die Scaffolds ein homogenes Porensystem mit Porengrößen von durchschnittlich 120 – 270 µm (Abb. 2). Niedrige Einfriertemperaturen resultierten in einer faserartigen Matrix und sehr kleinen Poren (< 50 µm), die für die homogene Besiedlung mit Zellen ungeeignet waren. Einfriertemperaturen von

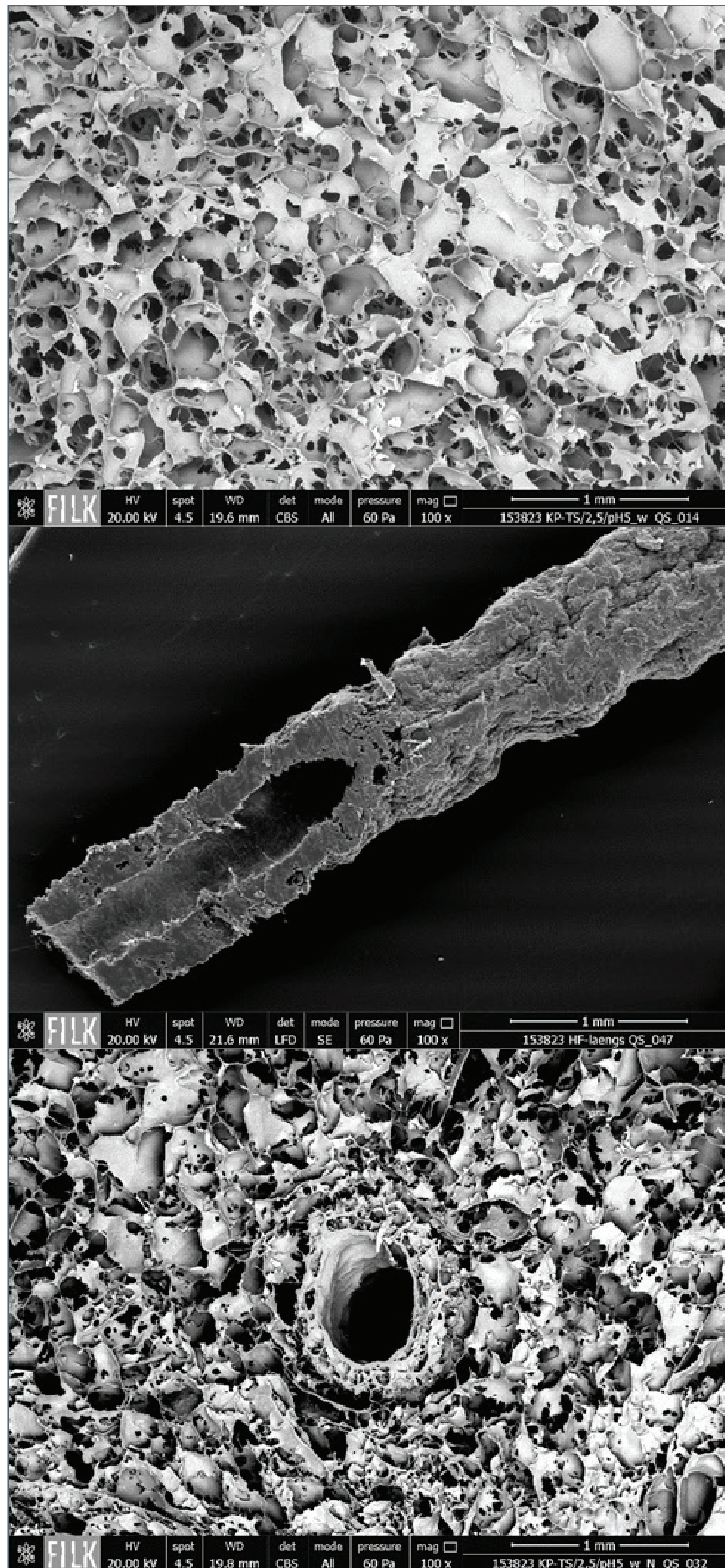


Abbildung 2: REM-Aufnahmen der Kollagengerüste. Oben: Porenstruktur eines 3D Scaffolds. Mitte: Kollagenhohlfaden. Unten: Kollagenhohlfaden integriert in 3D Scaffold.

-30°C und -80°C ergab interkonnektierende Poren. Im Rasterelektronenmikroskop zeigte sich, dass die Versorgungskanäle vollständig von der porösen Matrix umschlossen waren und eine glatte innere Oberfläche aufwiesen (Abb. 2).

### ZELLKOMPATIBILITÄT

Die 3D Scaffolds wurden zur Langzeitkultivierung mit 5 % EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid) vernetzt und  $\gamma$ -sterilisiert. Die Biokompatibilität wurde im Zytotoxizitätstest gemäß EN ISO 10993-5 geprüft, welcher für die Evaluierung medizinischer Produkte genutzt wird. Die Zellen zeigten keine zytotoxischen Effekte.

### ZELLKULTUR

Die Kollagenhohlfäden dienten als künstliches Blutgefäß und wurden mit Endothelzellen ausgekleidet. Die Scaffolds wurden mittels Zentrifugation besiedelt. In Kryoschnitten zeigte sich eine homogene Verteilung der Zellen im gesamten 3D Konstrukt.

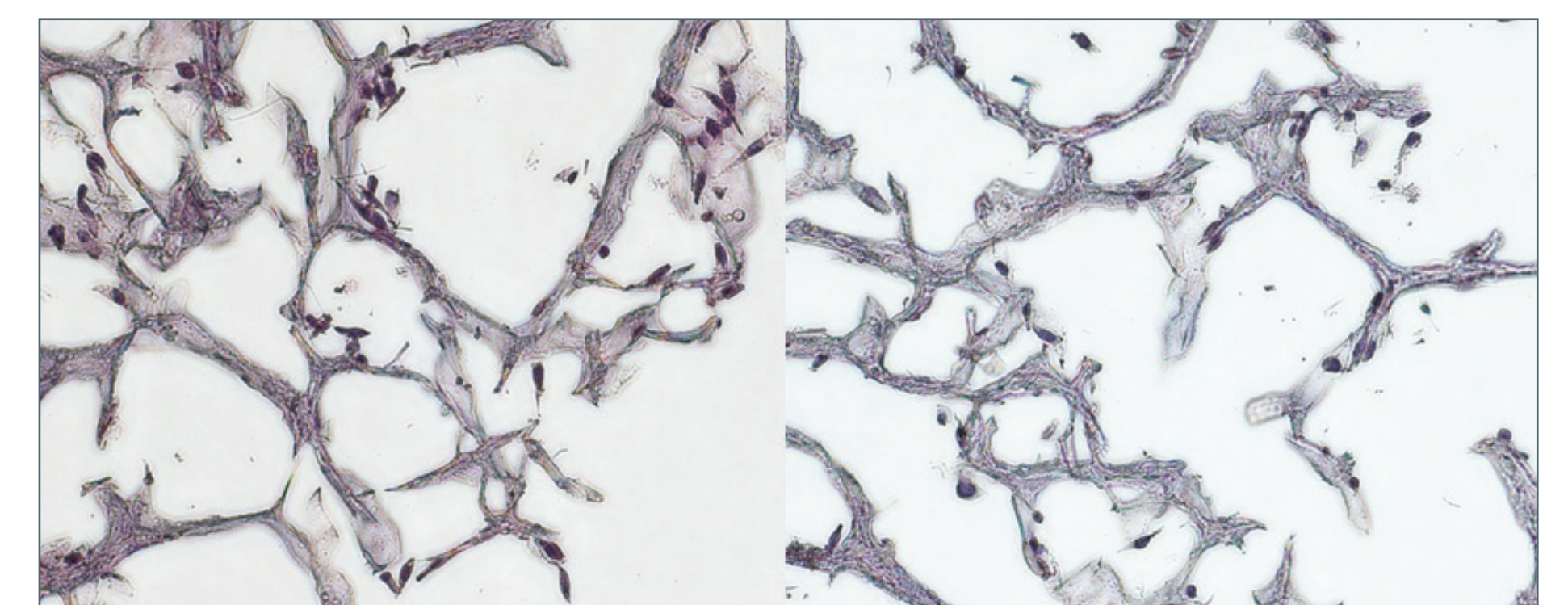


Abbildung 3: Sagittaler Kryoschnitt eines mit L929 besiedelten 3D Scaffolds nach einer Fixierung mit 3 % PFA. Zellkerne gefärbt mit Hämatoxylin. Links: Schnitt 1,7 mm vom Rand entfernt, Rechts: 1,2 mm. Vergrößerung: 200x.

Das Besiedeln der Kollagenhohlfäden mit Endothelzellen konnte über das Injizieren der Zellsuspension durch eine Kanüle realisiert werden. Immunhistochemische Untersuchungen der besiedelten Hohlfäden ergaben auch hier eine gleichmäßige Zellverteilung (Abb. 4).

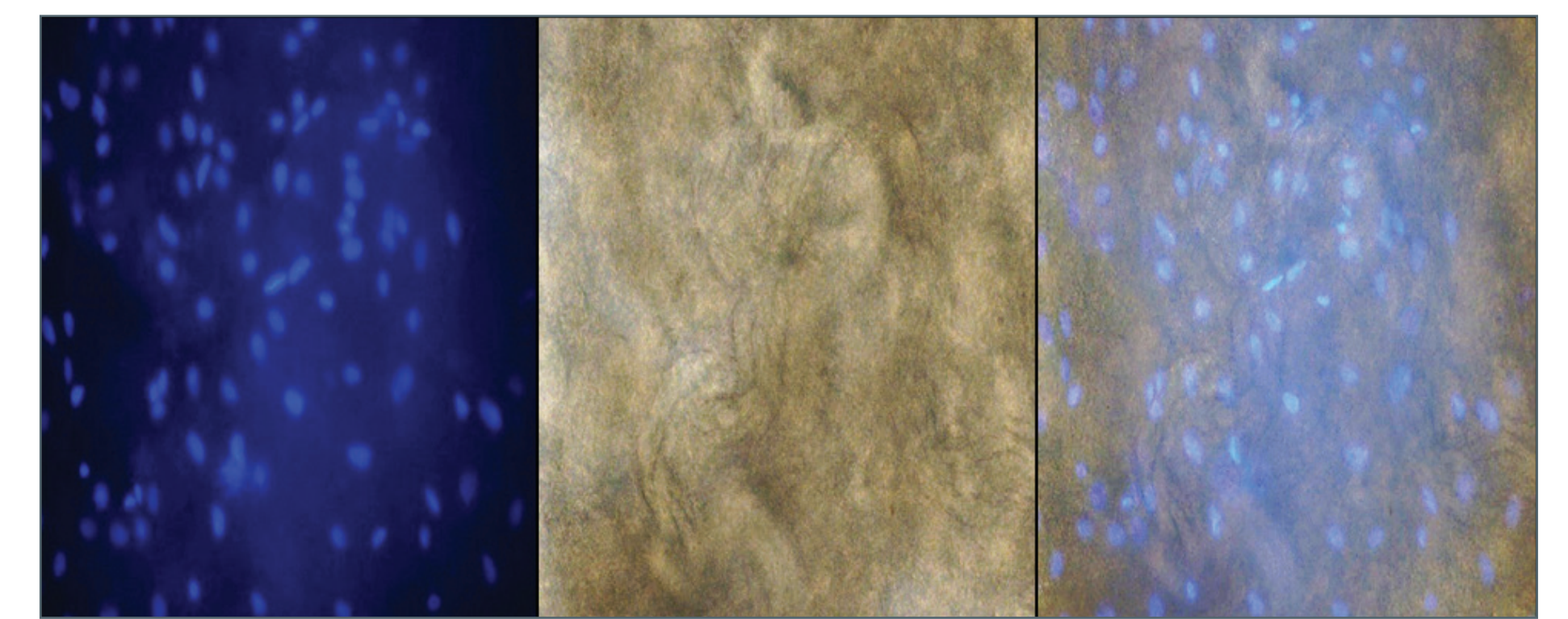


Abbildung 4: Mit Endothelzellen (HUVECs) besiedelter Kollagenhohlfaden (KHF) kultiviert über 8 Tage. links: DAPI-Färbung, Mitte: Lichtbild des KHF; rechts: kombiniertes Bild, Vergrößerung: 200x.

## Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass mit den komplexen, dreidimensionalen Kollagenscaffolds lebende, gewebe-ähnliche Strukturen erzeugt werden können. Die Scaffolds eignen sich für das Kultivieren von Zellen im Gewebeverbund. Die Scaffolds sollen jetzt in einen Bioreaktor eingesetzt und mit Hilfe der Versorgungskanäle perfundiert werden (Abb. 5). Das Kollagenmaterial ist resorbierbar und könnte somit auch den Umbau sowie die Vaskularisierung der Gerüststruktur ermöglichen.

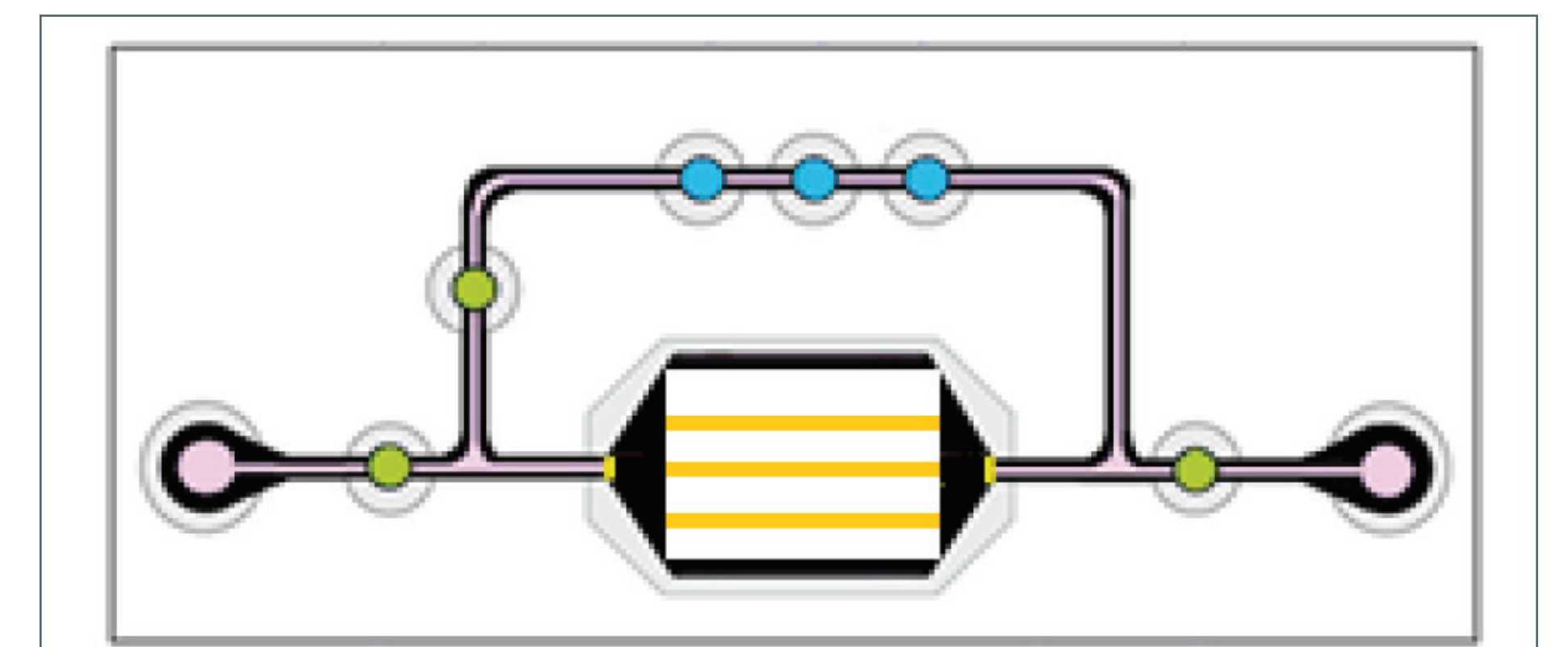


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Perfusions-Mikro-Bioreaktors mit integriertem Blutgefäßsystem.