

4 Diskussion

Der zunehmende Mangel an Organen für eine Transplantation verdeutlicht den Bedarf neuer Therapieansätze bei Verlust oder Versagen des menschlichen Organsystems. TE ist ein noch junges und interdisziplinäres Forschungsfeld, das entwickelt wurde um dem Mangel an Spendeorganen entgegenzuwirken. Darüber hinaus hat es eine Reihe von potentiellen Vorteilen gegenüber den traditionellen Therapieansätzen. Beim TE werden Methoden aus der Technik mit denen der Medizin kombiniert, um einen biologischen Gewebersatz herzustellen, der die Funktion des Gewebes ersetzen, unterhalten oder verbessern kann ²⁴. Durch die Verwendung autologer Zellen in Kombination mit biologischen oder synthetischen Polymeren, die entweder biokompatibel oder bioresorbierbar sind, wird ein semibiologisches System hergestellt, das nach Implantation in den Empfängerorganismus in der Lage ist, sich den biologischen Anforderungen anzupassen und sich zu regenerieren. Im Gegensatz zur Organtransplantation oder der Verwendung künstlicher Implantate kann für den Patienten durch TE ein individueller und funktionaler Gewebersatz hergestellt werden, der für den Empfängerorganismus kein Fremdmaterial darstellt. Eine immunsuppressive Therapie mit den damit verbundenen Risiken für den Patienten wäre damit überflüssig. Bei der Behandlung von pädiatrischen Patienten hätte ein TE-Implantat außerdem den Vorteil, mit dem Patienten mit zu wachsen. Wiederholte Nachoperationen wären nicht mehr notwendig. Die visionäre Idee, durch TE einen funktionalen, implantierbaren Ersatz für ein vollständiges Organ herzustellen, wurde bislang allerdings noch nicht erreicht.

Auch beim TE von Lungengewebe gibt es bislang nur wenige erfolgreiche Ansätze. Die Schwierigkeiten des pulmonalen TE bestehen unter anderem in der komplexen

Anatomie der Lunge. Neben der Integration eines funktionalen Perfusionssystems innerhalb des konstruierten Gewebes ist der differenzierte Aufbau des Organs mit dem engen Zusammenspiel unterschiedlicher Zelltypen eine große Herausforderung.

In der vorliegenden Arbeit wird die erfolgreiche Besiedelung eines neuartigen synthetischen Polymerkonstruktes mit MLE-12 Zellen als Modell für Alveolarzellen beschrieben. Es ist möglich die Zellen durch kontinuierliche Perfusion einer in das Polymer integrierten Gefäßversorgung mit Kulturmedium für mindestens 7 Tage in Kultur zu halten und innerhalb des Polymers zu konditionieren. Die 1. und 2. Hypothese dieser Arbeit kann damit bestätigt werden.

Bei dem Versuch, die Kapillarsysteme des vaskulären Kompartimentes der Polymerkonstrukte dauerhaft mit einem funktionsfähigen Endothel auszukleiden, konnten bisherige erfolgreiche Ergebnisse bei der Zellkultur von Endothelzellen auf synthetischen Polymeren in den verwendeten Zweikammersystemen nicht bestätigt werden. Die letzte der Hypothesen dieser Arbeit muss daher zunächst verworfen werden.

Ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit befasst sich mit der Entwicklung des neuen biokompatiblen Polymerkonstruktes aus PDMS mit einem integrierten Netzwerk sich fein verzweigender Kapillaren. Das Gefäßsystem innerhalb des Polymerkonstruktes dient der Versorgung der parenchymalen Zellen in einer angrenzenden Kulturkammer mit Nährstoffen und Sauerstoff.

Bei der Erklärung des Designs für das in das Polymerkonstrukt integrierte Gefäßsystem wird ein speziell für dieses Forschungsvorhaben entwickelter Computeralgorithmus vorgestellt. Er ermöglicht Aussagen über den Effekt verschiedener räumlicher

Konfigurationen des Gefäßsystems auf dynamische Parameter wie Flussgeschwindigkeit, Druck, Scherspannung und die Verteilung des Blutflusses innerhalb des Gefäßsystems. Durch Implementierung der nicht-linearen Fließeigenschaften und der Zusammensetzung aus flüssigen und korpuskulären Bestandteilen des Blutes, erlaubt der Algorithmus zudem eine exakte Simulation der Situation nach späterer Implantation des Konstruktes in den Empfängerorganismus. Ab diesem Moment erfolgt die Perfusion des Gefäßsystems nicht mehr mit Kulturmedium, sondern mit Blut. Damit stellt diese Methode ein hilfreiches Werkzeug für die Entwicklung eines Perfusionssystems in Polymeren für TE dar. Das für diese Arbeit entwickelte Design des Gefäßsystems in den Polymerkonstrukten besteht aus einem Stammgefäß mit einem Durchmesser von 2 mm, das sich über insgesamt 6 - 9 Generationen in feine Kapillaren mit einem minimalen Durchmesser von 35 μm aufzweigt. Dabei bewirkt das Design des Gefäßsystems eine gleichmäßige Verteilung des Blutflusses über das Netzwerk. Flussgeschwindigkeit, Druck und Scherspannung in den einzelnen Segmenten des Gefäßsystems liegen in der Größenordnung der physiologischen Parameter in Kapillarstromgebieten menschlicher Organe.

Die Herstellung eines Gefäßsystems innerhalb des PDMS nach diesem Design erfolgt unter Verwendung verschiedener Techniken aus dem Bereich der Mikrosystemtechnik. Durch Softlithographie ist es möglich, das Design in einer hohen Abbildungsauflösung innerhalb des PDMS umzusetzen^{100, 129}.

Das Potential der Mikrosystemtechnik liegt in der exakten Kontrolle von geometrischen Formen mit einer Auflösung von 0,1 μm und stellt eine neue Dimension der Präzision bei der Herstellung von Polymeren für das TE dar. Durch die exakte Steuerung der Feinstruktur des Polymers in der Größenordnung einer einzelnen Zelle, ist die

Beeinflussung von Zell- und Gewebeeigenschaften über die Polymerstruktur möglich⁹⁹,¹⁰². Die Möglichkeiten durch dieses neue Steuerelement sind noch nicht bis ins Detail verstanden und werden wohl in den nächsten Jahren interessante Entwicklungen ermöglichen.

Trotz der hohen Präzision der Softlithographie sind einzelne Arbeitsschritte, die bei der Herstellung der Polymerkonstrukte in dieser Arbeit zur Anwendung kommen, nicht standardisierbar. Durch manuelle Arbeitsschritte bei der Herstellung der parenchymalen Kammer und beim Zusammensetzen der einzelnen Bestandteile der Polymerkonstrukte ist von geringfügigen Unterschieden der einzelnen Polymerkonstrukte auszugehen. Durch mikroskopische Untersuchungen der fertiggestellten Polymerkonstrukte und Perfusion des Gefäßsystems mit Fluoreszein kann zwar die Durchgängigkeit und gleichförmige Durchströmung der Kapillaren geprüft werden, doch lassen sich die mittels des Computeralgorithmus errechneten haemodynamischen Parameter für das Gefäßsystem bei simulierter Perfusion mit Blut nur als Näherungswerte verwenden. Durch Optimierung der manuellen Arbeitsschritte und Automatisierung des Herstellungsprozesses der Polymerkonstrukte können diese methodischen Einschränkungen vermutlich reduziert werden.

Das für die vorliegende Arbeit entworfene Polymerkonstrukt ist ein Zweikammersystem, bei der ein parenchymales Kompartiment durch ein zweidimensionales Gefäßsystem mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt wird. Das Gewebe, das durch TE hergestellt werden soll – in diesem Fall Lungengewebe – ist hingegen ein komplexes dreidimensionales System mit einem dreidimensionalen Netzwerk von Gefäßen und Kapillaren. Um ein vollständiges dreidimensionales Gefäßsystem innerhalb eines

synthetischen Polymers herzustellen, müssen die beschriebenen Techniken weiterentwickelt werden.

Ein Ansatz für die Herstellung eines Organsystems mit einer dreidimensionalen Gefäßversorgung wäre beispielsweise eine Parallelschaltung mehrerer zweidimensionaler Systeme durch Stapelung. Dadurch sind virtuell unbegrenzt große Polymerkonstrukte realisierbar. Ogawa et al. konnten zeigen, dass dreidimensionale Gefäßsysteme durch Faltung und Aufrollen zweidimensionaler Systeme hergestellt werden können ³⁶. Daneben lassen sich auch mittels neuer Methoden der Mikrosystemtechnik komplexe dreidimensionale Strukturen in synthetische Polymere übertragen ^{130, 131}.

Bei dem in dieser Arbeit für die Herstellung der Polymerkonstrukte verwendeten Polymeren handelt es sich um biokompatibles PDMS und PC. Diese werden nicht resorbiert und bleiben nach einer Implantation im Empfängerorganismus bestehen. Die Übertragung des Herstellungsprozesses in bioresorbierbare Materialien ist eine notwendige Weiterentwicklung der bisherigen Arbeit, vor allem im Hinblick auf zukünftige *in vivo* Experimente. Materialien wie PLGA und PGA werden nach einer charakteristischen Resorptionskinetik vom Empfängerorganismus abgebaut und durch körpereigene Strukturen ersetzt. Nach Implantation werden die besiedelten Zellen dabei initial durch das Polymer „getragen“, im Laufe der Zeit entsteht allerdings aus dem TE-Konstrukt ein körpereigenes Gewebe ohne körperfremde Bestandteile, das den biologischen Steuermechanismen im Empfängerorganismus unterliegt. Das Risiko einer Abstoßungsreaktion durch das Immunsystem des Empfängerorganismus wird dadurch reduziert. Durch neue Entwicklungen der Polymerforschung stehen heute synthetische Polymere zur Verfügung, in die mit den beschriebenen Methoden feine

Perfusionssysteme integriert werden können. Erste erfolgreiche Experimente wurden unter anderem mit PLGA und *polyglycerol sebacate* (PGS) durchgeführt^{100, 115, 128}. King et al. beschreiben im Herbst 2004 die Herstellung eines mehrschichtigen Gefäßsystems in PLGA mittels softlithographischer Verfahren¹²⁷.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zellen werden nicht durch Primärkultur aus Gewebsbiopsien gewonnen, sondern stammen aus etablierten Zelllinien. Die Verwendung einer Zelllinie als Zellquelle ist wegen der nahezu unbegrenzten Verfügbarkeit der Zellen und der Vermeidung einer Mischkultur mit anderen Zellarten für das TE von großem Vorteil, kann aber nur modellhafte Funktionen erfüllen. Als parenchymale Zellen werden MLE-12 Zellen verwendet. Dabei handelt es sich um eine epitheliale Zelllinie, die 1992 aus pulmonalen Tumoren von Mäusen etabliert wurde^{132, 133}. Durch Transfektion mit SV40 wurden die Zellen immortalisiert, um sie unbegrenzt vermehren zu können. Wegen ähnlicher zellulärer Eigenschaften und gleicher Zellprodukte werden MLE-12 häufig als Modell für Alveolarepithelzellen vom Typ II verwendet und zur Untersuchung der Synthese von Surfactant herangezogen^{134, 135}. Ihren Phänotyp betreffend, sind die Zellarten allerdings keinesfalls identisch, was bei der Interpretation der Ergebnisse beachtet werden muss. Insbesondere durch den Ursprung der Zelllinie aus pathologisch veränderten Zellen und die Transfektion mit dem T-Antigen von SV40 kann nicht mit Sicherheit davon ausgegangen werden, dass durch die Zelllinie die Zellphysiologie nativer Alveolarepithelzellen vom Typ II reflektiert wird¹³⁶. Auch bei den für die Endothelialisierung der Gefäßsysteme verwendeten HMECs handelt es sich um immortalisierte Zellen. Da die Endothelzellen dieser Zelllinie aus dermalen Gewebsbiopsien isoliert und ebenfalls durch Transfektion mit dem T-

Antigen von SV40 verändert wurden haben die Ergebnisse dieser experimentellen Arbeit zunächst nur modellhaften Charakter.

Zur verbesserten Visualisierung in den Polymerkonstrukten werden die verwendeten Zellen für die Experimente zusätzlich durch einen retroviralen Vektor mit GFP markiert. Ein zusätzlicher Vorteil dieser Methode besteht darin, dass nach Implantation eines TE-Konstruktes in den Empfängerorganismus die Integration des Implantats überprüft werden kann. In Verlaufsuntersuchung nach Implantation ist dadurch die Identifikation der implantierten Zellen möglich und es kann beurteilt werden inwieweit sie durch Zellen des Empfängerorganismus ersetzt worden sind ¹³⁷.

Um das Konzept des TE mit der Verwendung autologer Zellen zur Herstellung von implantierbarem Lungengewebe zu realisieren, müssen die Experimente auf pulmonale Primärzellen ausgeweitet werden. In der Fortführung der beschriebenen Arbeit liegt daher ein Schwerpunkt auf der Primärkultur von zunächst tierischen, im Anschluss aber auch menschlichen Alveolarepithelzellen und mikrovaskulären Epithelzellen aus Gewebsbiopsien. Die Isolierung und Kultur von funktionalen alveolären Epithelzellen aus Organbiopsien gelten allerdings als schwierig. Frisch isolierte Alveolarepithelzellen vom Typ II können zwar *in vitro* kultiviert werden, verlieren aber innerhalb von Tagen ihre Fähigkeit, Surfactant zu synthetisieren und zu sezernieren. Durch Verbesserung der Primärkultur lässt sich diese Funktion der Zellen zwar für einen längeren Zeitraum erhalten, doch können bislang primäre Alveolarepithelzellen maximal 2 - 4 Wochen in Kultur gehalten werden bevor ihre Differenzierung verloren geht ^{138 - 143}. Diese Einschränkungen in der Zellkultur limitieren derzeit noch die Verwendung primärer Alveolarepithelzellen für das TE von Lungengewebe.

Mit neuen Erkenntnissen auf dem Gebiet der Stammzellbiologie gewinnen zunehmend auch embryonale und adulte Stammzellen als Zellquelle für das TE von verschiedenen

Gewebe und Organen an Bedeutung^{144 - 146}. Stammzellen haben die Fähigkeit, in unterschiedliche Zellarten differenzieren zu können und stehen theoretisch unbegrenzt zur Verfügung^{147, 148}. In zahlreichen Veröffentlichungen berichten Bishop et al. über die Differenzierung von pluripotenten Stammzellen zu Alveolarepithelzellen vom Typ II. Für das TE von Lungengewebe stehen embryonale aber auch zirkulierende adulte und pulmonale epitheliale Stammzellen zur Verfügung^{149 - 152}. Aus embryonalen Stammzellen gelang es Coraux et al., ein funktionales bronchioalveoläres Epithel aus Flimmer-, Basal-, Intermediär- und Clarazellen zu entwickeln¹⁵³. Neben der Primärkultur von autologen Zellen aus Gewebsbiopsien stellen somit auch Stammzellen eine potentielle Zellquelle für das TE von Lungengewebe dar.

Für die Besiedelung der MLE-12 Zellen in die Polymerkonstrukte wird in der vorliegenden Arbeit eine neuartige Besiedelungstechnik beschrieben. Mit der üblichen Methode, einer Besiedelung des Polymers mit Zellen in einer Einzelzellsuspension, kann keine Proliferation der Zellen in der parenchymalen Kammer erreicht werden. Die Zellen bleiben in Suspension ohne auf dem Polymer anzuwachsen und sind nach wenigen Tagen nicht mehr nachweisbar.

Eine ausreichende Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff und vor allem auch der Abtransport anfallender toxischer Stoffwechselprodukte ist für die Proliferation von Zellen notwendig. Eine mögliche Erklärung für die negativen Ergebnisse bei der üblichen Besiedelungsmethode liegt daher in der Akkumulation von toxischen Stoffwechselprodukten innerhalb der parenchymalen Kammer bei der Besiedelung. Beim Passagieren der Zellen mit Trypsin kommt es erfahrungsgemäß zum Untergang von einem geringen Anteil der Zellen, die bei der Besiedelung mit in das Polymerkonstrukt gegeben werden. Durch den Zerfall der avitalen Zellen gelangen

toxische Substanzen in das Kulturmedium. Durch die hohe Zellkonzentration der Suspension bei der Besiedelung und dem sehr begrenzten Raum innerhalb der parenchymalen Kammer der Polymerkonstrukte ist ein schneller Wechsel des Kulturmediums notwendig. Dies soll in den Polymerkonstrukten durch kontinuierliche Perfusion des angrenzenden kapillären Gefäßsystems bereits zum Zeitpunkt der Besiedelung erreicht werden. Inwieweit allerdings diese dynamischen Kulturbedingungen ein schnelles Anwachsen der in Suspension befindlichen MLE-12 Zellen innerhalb der Polymerkonstrukte verhindern, oder ob die toxischen Stoffwechselmetabolite durch eine kontinuierliche Perfusion nur unzureichend eliminiert werden können bleibt spekulativ.

Die für diese Arbeit entwickelte Besiedelungsmethode auf Biosilon Mikroträger als Vehikel für den Zelltransfer in die Zweikammersysteme bietet entscheidende Vorteile gegenüber der Besiedelung der Zellen als Einzelzellsuspension: Die Kultur von MLE-12 Zellen auf Mikroträgern und der anschließende Transfer einer konfluenten Population adhärent wachsender Zellen ermöglicht es, bereits in Proliferation befindliche, organisierte Zellpopulationen zu transportieren, ohne die Zellen vorher mit Trypsin von der Zellkulturfläche ablösen zu müssen. Diese Transfermethode ist bislang noch nicht als Besiedelungstechnik für das TE beschrieben. Die Ergebnisse dieser Arbeit und insbesondere die REM verdeutlichen das Potential dieser Methode als alternative Besiedelungstechnik für TE und spezielle Zellkulturen. In der vorliegenden Arbeit werden Mikroträger mit einem Durchmesser von etwa 270µm verwendet. Sie liegen damit in der Größenordnung von menschlichen Alveolen und geben eine kugelige Form vor, auf deren Oberfläche die MLE-12 Zellen einen dichten Zellrasen ausbilden können. In zukünftigen Experimenten könnte durch Verwendung bioresorbierbarer Mikroträger

ein Gerüst vorgegeben werden, das nach vollständiger Resorption im TE-Konstrukt eine Struktur wie in Alveolarsäckchen der menschlichen Lunge bildet.

Die Experimente der vorliegenden Arbeit sind mit 5 Polymerkonstrukten mit perfundierten Gefäßsystemen und 3 Polymerkonstrukten mit statischen Kulturbedingungen als Negativkontrolle mit einer kleinen Stückzahl angelegt. Das Studiendesign ist bewusst in dieser Form gewählt, da durch diese Arbeit zunächst einmal die Entwicklung eines neuartigen Polymerkonstruktes und die Umsetzbarkeit des Konzepts des TE innerhalb dieser Polymerkonstrukte geprüft werden soll.

Bei der Beurteilung der Ergebnisse dieser Arbeit muss diese Einschränkung berücksichtigt werden. Durch Erweiterung der Experimente mit einem größeren Probenumfang und längerer Laufzeit müssen die Erkenntnisse zukünftig bestätigt werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit stützen sich in großen Anteilen auf Zellzählungen, Vitalitätsfärbungen und Funktionsuntersuchungen der verwendeten Zellen und der entstandenen Gewebekonstrukte. Diese Methoden hängen teilweise unmittelbar mit der Anzahl der untersuchten Zellen zusammen. So werden beispielsweise avitale Zellen, die bei Waschschritten im Rahmen der einzelnen Zellfärbungen (Vitalitätstest bzw. funktionelle Färbungen) abgelöst werden, in der Auswertung nicht berücksichtigt und entziehen sich bei der anschließenden Zellzählung bzw. der DNS Messung der Beurteilbarkeit. Im konkreten Fall bedeutet dies am Beispiel der Polymerversuche (siehe Kap. 2.3), dass bei der Vitalitätsfärbung vermutlich zahlreiche schlecht adhärente Zellen oder avitale Zellen von den Polymerproben gelöst werden und die Vitalitätsbeurteilung verfälschen, bzw. bei der Zellzählung nicht gezählt werden. Dies kommt besonders bei den Negativkontrollen (nicht beschichtete Polymerproben) zum

Tragen, da hier der Anteil der ablösbaren Zellen bzw. der avitalen Zellen erwartungsgemäß höher sein dürfte, als bei den Positivkontrollen. So muss hier von einer Verstärkung der Ergebnisse ausgegangen werden.

Bei der Beurteilung der Vitalitätstests mittels des *Live/Dead assay* muss zudem bedacht werden, dass es sich bei der untersuchten Zellpopulation um Zellen handelt, die zur besseren Visualisierung innerhalb des Polymerkonstruktes mit GFP markiert sind. Da die grüne Fluoreszenz einer Zelle durch Interaktion mit Calcein AM als Indikator für Vitalität der Zellen gewertet wird, sind Interferenzen der Farbsignale nicht auszuschließen. Im Gegensatz zur GFP Markierung wird durch die Vitalitätsfärbung allerdings ein sehr intensives Fluoreszenzsignal hervorgerufen. Außerdem ist anzunehmen, dass die GFP Markierung in avitalen Zellen durch eine defekte Zellmembran ohnehin schnell verloren gehen dürfte. Somit ist durch die Fluoreszenzmarkierung nicht von einer größeren Verfälschung der Ergebnisse auszugehen.

Die Ursachen der negativen Ergebnisse einer dauerhaften Endothelialisierung der Gefäßsysteme innerhalb der Polymerkonstrukte durch Besiedelung und Konditionierung von HMECs bleiben spekulativ. So könnte einer Verstopfung von Kapillaren des Gefäßsystems durch Luftblasen im Laufe der Konditionierungsphase eine suffiziente Nährstoffversorgung der HMECs in den abhängigen Gefäßabschnitten unterbrechen. Dies hätte außerdem eine unkalkulierbare Veränderung der Flusscharakteristika (Fließgeschwindigkeit, Druck und Scherkräfte) in den noch perfundierten Kapillaren zur Folge, was auch in diesen Abschnitten zu einem Untergang der HMECs führen könnte. Als Indiz für diesen Mechanismus müssen die teilweise sehr ausgeprägten Lufteinschlüsse in den Gefäßsystemen der Polymerkonstrukte nach einigen Tagen der

kontinuierlichen Perfusion gewertet werden (siehe Pfeil in Abbildung 50). Eine weitere Vermutung wäre, dass die Verbindung der HMECs zu der Oberfläche des verwendeten Polymers nicht stark genug ist und die Zellen durch die zunehmenden Scherkräfte innerhalb der Kapillaren abgelöst werden. Da es sich bei den HMECs um strikt adhärent wachsende Zellen handelt, würde das wiederum zu einem Untergang der Zellen führen. In Anbetracht der zahlreichen erfolgreichen Ansätze für die Zellkultur von Endothelzellen auf unterschiedlichen synthetischen Polymeren in der Literatur sollten diese Probleme durch Veränderung des Besiedelungs- und Konditionierungsprotokolls und Anpassung der Polymercharakteristika zu lösen sein. Eine genaue Messung der Flussgeschwindigkeit innerhalb der endothelialisierten Kapillaren bzw. des intravaskulären Druckes könnte ausgeprägte Abweichungen von den errechneten Flusscharakteristika aufzeigen und eine Optimierung des Gefäßsystems ermöglichen. Ergebnisse weiterer Versuchsserien zu diesem Vorhaben werden in zukünftigen Veröffentlichungen der Arbeitsgruppe von Dr. Joseph P. Vacanti am *Laboratory of Tissue Engineering and Organ Fabrication* am *Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston MA, USA* vorgestellt werden.

Der funktionelle Aufbau der verwendeten Zweikammersysteme ist als Annäherung an die Mikrostruktur einer nativen Lunge zu verstehen. Die physiologische Alveolarwand wird von Alveolarepithelzellen, einem feinen Bindegewebsgerüst und den zugehörigen Alveolarkapillaren gebildet. Der Gasaustausch erfolgt über die funktionale Einheit, bestehend aus dem einschichtigen alveolären Epithel und dem ebenfalls einschichtigen Kapillarendothel eines direkt angrenzenden Blutgefäßes des Lungenkreislaufes. Die Basalmembran der beiden Zelllagen verschmilzt dabei zu einer gemeinsamen Basalmembran. Als Fortführung der vorliegenden Arbeit ist daher Kultur der zwei

unterschiedlichen Zellarten in einem gemeinsamen Polymerkonstrukt vorgesehen. Damit könnte eine von der parenchymalen Seite epithelialisierte und von der vaskulären Seite endothelialisierte Gasaustauschfläche analog der Wand einer Alveole geschaffen werden. Durch Endothelialisierung der Oberflächen, die nach einer Implantation mit dem Blut des Empfängerorganismus in Kontakt kommen, ließe sich der thrombogene Effekt der Fremdfächen vermindern.

In der Lunge des Menschen enden die Luftwege blind in den Alveolen. Eine Ventilation der Alveolen geschieht durch die Atembewegungen der Thoraxwand bzw. des Zwerchfells. Dadurch kommt es zu intrathorakalen Volumen- und Druckveränderungen, die eine In- und Expiration bewirken. Im Gegensatz dazu handelt es sich bei der parenchymalen Kammer der verwendeten Polymerkonstrukte nicht um ein blind verschlossenes Kanalsystem. Das parenchymale Kompartiment der Polymerkonstrukte hat einen separaten Zulauf und Ablauf und kann, wie auch das integrierte Gefäßsystem, kontinuierlich perfundiert werden. Nach einer Implantation des Polymerkonstruktes und Perfusion des Gefäßsystems mit Blut des Empfängerorganismus könnte der Gasaustausch durch gegenläufige Perfusion des parenchymalen Kompartimentes mit einem Gasgemisch erreicht werden. Dieses Prinzip der kontinuierlichen Oxygenierung im Gegenstrom wird beispielsweise in den Kiemen von Fischen, aber auch in der Lunge von Vögeln genutzt ¹⁵⁴.

Die Entwicklung einer künstlichen Lunge als Alternative zur mechanischen Ventilation oder Überbrückung bis zur Transplantation (*bridge to transplantation*) ist ein spannendes Forschungsfeld, das sich mit dem TE pulmonaler Gewebe einige Ansätze teilt. Mit der extrakorporalen Membranoxygenierung (im Folgenden ECMO) existiert zwar eine Methode zum vollständigen Gasaustausch, doch ist die ECMO zeitlich begrenzt,

laborintensiv, infektionsanfällig, teuer und nicht ambulant durchführbar^{155, 156}. Zur Verbesserung dieser Methode wurden Möglichkeiten einer intrakorporalen künstlichen Lunge entwickelt. Bei einer künstlichen Lunge handelt es sich um ein synthetisches Medizinprodukt zum provisorischen Lungenersatz, mit dem die Atmung eines Patienten vom Zeitpunkt des Lungenversagens bis zur Transplantation unterstützt oder ersetzt werden kann, bis das geeignete Spenderorgan zur Verfügung steht. Eine künstliche Lunge besteht aus synthetischen Membranen und Hohlfasern und soll derart in den Bauchraum oder Brustkorb des Patienten implantiert werden, dass die Perfusion über das rechte Herz und den kleinen Kreislauf erfolgt. Dabei soll der vollständige Austausch von Sauerstoff und Kohlendioxid im Blut des Patienten erreicht werden^{157, 158}. In Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass diese Anforderungen an eine künstliche Lunge realisierbar sind^{159 - 161}. Erste klinische Anwendungen am Menschen befinden sich aktuell in Vorbereitung^{162, 163}. Die Fortschritte beim TE von alveolärem Gewebe könnten auch bei der Entwicklung einer künstlichen Lunge einen wichtigen Beitrag leisten. Eine Membran aus Alveolarepithelzellen und Endothelzellen hätte gegenüber einer synthetischen Membran entscheidende Vorzüge. Durch Endothelialisierung der Seite der Membran, die mit dem Blut des Patienten in Kontakt kommt, lassen sich die thrombogenen Eigenschaften des körperfremden Materials reduzieren. Die gleichzeitige Besiedelung der gegenüberliegenden Seite der Membran mit Alveolarepithelzellen könnte außerdem einige metabolische Funktionen bewirken, die in einer künstlichen Lunge bislang nicht imitiert werden. Zusätzlich könnte eine solche TE-Membran helfen, einen Plasmaverlust zu reduzieren, der bei der Verwendung synthetischer Membranen in der künstlichen Lunge beschrieben ist^{157, 164}. Damit könnte die Anwendung einer künstlichen Lunge möglicherweise über einen längeren Zeitraum erfolgen, als es bei der ausschließlich synthetischen künstlichen Lunge oder der ECMO möglich ist. Auf der

anderen Seite ist die Modifikation einer künstlichen Lunge mittels TE mit einem höheren Zeitaufwand verbunden, und birgt ein zusätzliches Infektionsrisiko, als es bei der Verwendung einer ausschließlich synthetischen künstlichen Lunge der Fall wäre. Bislang fehlen für diese Überlegungen noch die ersten experimentellen Ansätze.

Mit der Herstellung von funktionalem, menschlichen Lungengewebe durch TE stehen auch für die Erforschung physiologischer Gewebefunktionen *in vitro* neue Möglichkeiten zur Verfügung. Eine Alveolarwand, die im Labor hergestellt werden kann, wäre ein nützliches Werkzeug für die Untersuchung zellulärer Eigenschaften und molekularer Mechanismen des Alveolarepithels. Durch Experimente an alveolärem TE-Gewebe könnten Erkenntnisse über Transportvorgänge in pathologisch verändertem Gewebe und deren Veränderungen während einer Therapie gewonnen werden. Paquette et al. beschreiben in ihrer Veröffentlichung vom März 2004 die Entwicklung einer funktionalen Bronchialschleimhaut durch TE als Modell zur Untersuchungen molekularerer Mechanismen von Asthma bronchiale ¹⁶⁵. Dieses Modell ließe sich auch bei der Entwicklung neuer Medikamente nutzen. In einer Arbeit von Griffith et al. wird die Simulation physiologischer Gewebe- und Organfunktionen durch TE für die Entwicklung und Testung neuer therapeutischer Substanzen *in vitro* diskutiert ¹⁶⁶. Durch ein *in vitro* System von funktionalem menschlichem Lungengewebe ergeben sich für die Testung der Resorption und Wirkung neuer Wirkstoffe zahlreiche denkbaren Anwendungen. Dieser Ansatz der pharmakologischen Nutzung von TE stellt eine mögliche kostengünstige und ethisch vertretbare Ergänzung oder gar Alternative zur bisherigen Form der Wirkstofftestung durch Tierversuche dar.

5 Schlussfolgerung

TE ist ein interdisziplinärer Ansatz, durch Kombination von Methoden aus der Technik und der Medizin einen lebenden Gewebersatz aus autologen Zellen und biologischen oder synthetischen Polymeren herzustellen, der in den Organismus des Patienten integriert wird und die Funktion des ausgefallenen Gewebes ersetzt. Das TE von dicken Geweben und komplexen Organen wird durch die fehlende Nährstoffversorgung im Inneren des Konstruktes limitiert. Die Entwicklung eines integrierten Perfusionssystems in das Polymer für TE, gilt daher als die wichtigste Herausforderung für das TE komplexer Gewebe.

Durch die vorliegende Arbeit kann unter Verwendung von Methoden der Mikrosystemtechnik ein biokompatibles Polymer mit integriertem Gefäßsystem hergestellt werden. Durch Perfusion der kapillarähnlichen Kanäle mit Kulturmedium gelingt es, Alveolarepithelzellen innerhalb der Polymerkonstrukte in Kultur zu halten und zu konditionieren. Die Beschichtung des Gefäßsystems innerhalb des Polymerkonstruktes durch Besiedelung mit mikrovaskulären Endothelzellen kann bislang nur kurzzeitig erreicht werden. Eine dauerhafte Endothelialisierung der Kapillaren in den beschriebenen Versuchsserien nicht erfolgreich. Trotz dieser Einschränkung liefern die Ergebnisse dieser Arbeit wichtige Erkenntnisse für das TE von pulmonalem Gewebe und anderer komplexer Organe.

Durch weitere Optimierung der Kulturbedingungen für vaskuläre und parenchymale Zellen innerhalb des Polymers, strukturelle Weiterentwicklung des Polymersystems und Verwendung bioresorbierbarer Materialien ist die Herstellung von implantierbarem, funktionalem Lungengewebe *in vitro* durch TE ein ambitioniertes, aber realisierbares Ziel.