

Aus der Klinik für Allgemein-, Visceral- und Transplantationschirurgie
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

„Entwicklung einer Kulturmethode zur lichtmikroskopischen
Untersuchung lebender Zellen in Hohlfaser-Bioreaktoren“

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –
Universitätsmedizin Berlin

von

Ruth Schwartländer

aus Hamburg

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. P. Neuhaus
2. PD Dr. med. U. Teichgräber
3. Prof. Dr. K. Motthagy

Datum der Promotion: 19.01.2007

Inhaltsverzeichnis

Abstract	1
Einleitung, Zielstellung	2
Methodik, Ergebnisse, Diskussion	3
Originalarbeiten	10
Erklärung	11

Abstract

In der Arbeitsgruppe Experimentelle Chirurgie der Klinik für Allgemein-, Visceral- und Transplantationschirurgie wird seit 1987 kontinuierlich an der Entwicklung von auf Hohlfaserkapillaren basierenden Leberzellbioreaktoren gearbeitet. Verschiedengroße Systeme ermöglichen sowohl den Einsatz am Patienten als auch im Forschungslabor. Die Charakterisierung der Zellen erfolgt ausschließlich anhand von biochemischen Parametern. Eine lichtmikroskopische Beurteilung der Zellen unter diesen speziellen Kulturbedingungen ist aufgrund des komplexen Kapillarnetzwerkes der Bioreaktoren nur nach Beendigung der Kulturphase möglich, da eine Probennahme die Integrität des Systems zerstören würde. Für bestimmte Fragestellungen ist eine unmittelbare histo- und zytologische Beurteilung der Kultur von großem Interesse. Ziel dieser Arbeiten war daher die Entwicklung eines definiert perfundierbaren, auf Hohlfaserkapillaren beruhenden Bioreaktorsystems, welches eine (zeitraffervideo-)mikroskopische Beurteilung der inokulierten Zellen während der Kulturphase ermöglicht: der *SlideReactor*. Nebst Bioreaktorsystem sollte ein Perfusionssystem entwickelt werden, um die Kultur von Zellen unter festgelegten Parametern zu ermöglichen. Hierfür musste eine Betriebsumgebung geschaffen werden, die neben der Aufrechterhaltung der zuvor definierten Kulturbedingungen auch die Möglichkeit der programmierten Veränderung bietet.

Die Ziele wurden entsprechend der Planung erreicht. Es wurde ein miniaturisiertes Bioreaktorsystem für die kontinuierliche Beobachtung kultivierter Zellen etabliert. Das eigens für den *SlideReactor* entwickelte Betriebskonzept wurde mit der für die mikroskopische und zeitraffervideomikroskopische Begutachtung notwendigen Technik kombiniert. Das Perfusionssystem ermöglicht die zeitgleiche Messung relevanter Prozessparameter sowie die sofortige Dokumentation und Auswertung der gemessenen Werte durch einen entsprechenden Analog-Digitalwandler. Der *SlideReactor* ist ein wesentlicher Bestandteil eines vom BMBF geförderten Projekts.

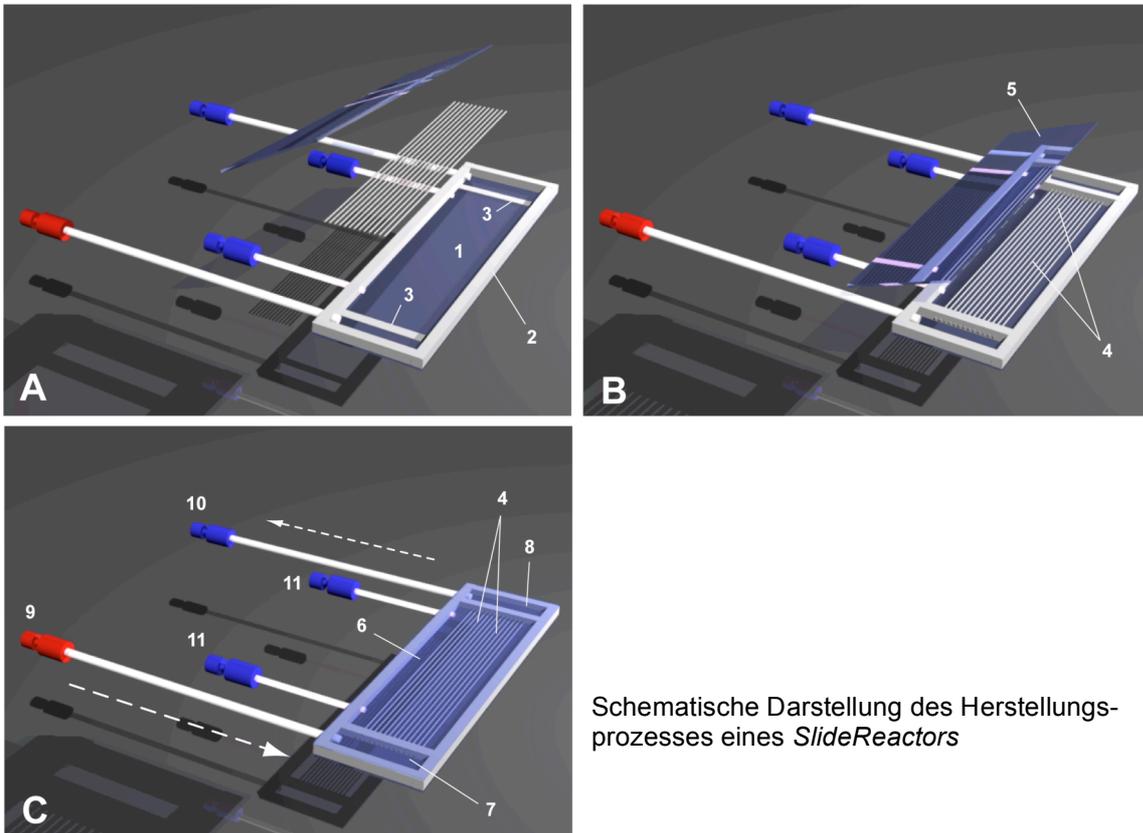
Einleitung, Zielstellung

Seit 1987 wird in der AG Experimentelle Chirurgie der Klinik für Allgemein-, Visceral- und Transplantationschirurgie kontinuierlich an der Entwicklung von Leberzellbioreaktoren sowohl für klinische Anwendungen im Leberversagen als auch für Laboranwendungen gearbeitet. Es sollen *in vitro* Kulturbedingungen für primäre Leberzellen geschaffen werden, die so weit wie möglich der natürlichen Situation der Zellen im Organ entsprechen: Grundbausteine des Systems sind Kapillarsysteme mit unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften, die in einem Gehäuse vergossen werden. Diese Kapillarbündel ermöglichen eine kontinuierliche Nährstoffver- und Metabolitenentsorgung, variierbare Perfusionsarten und einen dezentralen Austausch von Sauerstoff und Kohlendioxid mit niedrigen Gradienten. Die im extrakapillären Raum angesiedelten Leberzellen ordnen sich zu Aggregaten an und besiedeln die äußere Oberfläche der Kapillaren. Seit 1999 werden Studien zur Kultur humaner Leberzellen in Bioreaktorsystemen durchgeführt. Als Zellquelle dienen für die Transplantation abgelehnte Spenderorgane sowie im Rahmen von medizinisch indizierten Leberteilresektionen entnommenes Gewebe. Um Zellen in ausreichender Anzahl und Qualität zu gewinnen, wurde eine für die Ganzorganperfusion entwickelte Perfusionsmethode an die Anforderungen vorgeschädigter humaner Lebern adaptiert. In für den Labormaßstab angepassten Bioreaktorsystemen wird die Auswirkung verschiedener Umgebungsbedingungen auf die Kultur von Leberzellen untersucht. Die Charakterisierung erfolgt ausschließlich anhand biochemischer Parameter. Eine lichtmikroskopische Beurteilung der Zellen unter Kulturbedingungen ist aufgrund der Gestaltung der Bioreaktoren nur nach Beendigung der Kulturphase möglich, da eine Probennahme die Integrität des Systems zerstören würde. Für bestimmte Fragestellungen jedoch ist eine unmittelbare histo- und zytologische Beurteilung der Kultur wünschenswert. Ziel der in diesen Arbeiten dargestellten Entwicklung ist ein definiert perfundierbares, auf Hohlfaserkapillaren beruhendes Bioreaktorsystem, das eine zeitraffervideomikroskopische Beurteilung der inokulierten Zellen während der Kulturphase ermöglicht: der *SlideReactor*. In weiteren Schritten soll für dieses Bioreaktorsystem erstens ein Perfusionssystem entwickelt werden, welches die Kultur von Zellen unter zuvor festgelegten Kulturbedingungen ermöglicht sowie zweitens eine Betriebsumgebung realisiert werden, welche neben der Aufrechterhaltung definierter Kulturbedingungen auch die programmierte Veränderung dieser Bedingungen (Mediumzusätze, Sauerstoffgehalt, Temperatur) zulässt.

Methodik, Ergebnisse, Diskussion

Das *SlideReactor*-Konzept beruht - vergleichbar mit den bereits klinisch als extrakorporale Leberunterstützungssysteme eingesetzten Bioreaktoren - auf Hohlfaserkapillaren. Kapillaren durchziehen das Zellkompartiment, in welchem die Zellen adhärent kultiviert werden. Anders als bei den bisher verwendeten Hohlfaserbioreaktoren ermöglicht der Aufbau dieses Systems die mikroskopische Beurteilung der Zellen während der gesamten Kulturperiode und somit beispielsweise eine zeitraffervideomikroskopische Charakterisierung unter Studienbedingungen.

Im Rahmen der Herstellung wird die aus Polystyrene bestehende Bodenplatte mit Silikon (2) umrandet (Abbildung). Die der Perfusion dienenden zu- und abführenden Schläuche (9, 10) sowie die Zugangsschläuche zum Zellkompartiment (11) werden eingesetzt. Das Zellkompartiment (6) wird durch zwei zusätzliche Barrieren aus Silikon (3) von den Medienkompartimenten (7, 8) getrennt. Die Hohlfaserkapillaren (4) werden in diese Wände eingelassen. Die aus Glas bestehende Deckplatte (handelsüblicher Objektträger, 5) wird aufgesetzt und schließt das System aus drei Kompartimenten ab. Die Mediumzulaufkammer (7), die Hohlfaserkapillaren und die Medienablaufkammer (8) werden durch die längeren Schläuche (9, 10) perfundiert. Die kurzen Schläuche (11) ermöglichen den Zugang zum Zellkompartiment. Durch diese Zugangsschläuche kann das Gewebe bestimmten Substanzen ausgesetzt, fixiert und gefärbt werden. Die nach oben abschließende Abdeckung besteht aus extraweißem Kalknatronglas, um ein optimales lichtmikroskopisches Einsehen zu ermöglichen.



Grundlegender Unterschied des *SlideReactors* zu den in der Arbeitsgruppe bisher eingesetzten Bioreaktoren ist neben seiner Größe die Art der Oxygenierung. Bei den größeren Systemen werden die Zellen dezentral im Zellkompartiment über spezielle hydrophobe Hohlfaserkapillaren mit Sauerstoff versorgt. Die Oxygenierung der Zellen im *SlideReactor* erfolgt über die direkte Oxygenierung des in den Hohlfaserkapillaren zirkulierenden Nährmediums. Eigens hierfür wurde ein Oxygenator entwickelt, der aus einer abgeschlossenen Gasaustauschkammer besteht, durch welche ein helikal gewundener Silikonschlauch geführt wird. Während das Medium durch die Gasaustauschkammer geleitet wird, erfolgt eine zunehmende Anreicherung von Sauerstoff im Nährmedium. Durch die Windung erhöht man die Länge des in der Oxygenierungskammer befindlichen Silikonschlauchs und damit die Oberfläche, die dem Gasaustausch zur Verfügung steht.

Um wichtige Kenngrößen wie den Sauerstoffpartialdruck, den pH-Wert und die Temperatur kontinuierlich beobachten zu können, wurde eigens für diesen Aufbau ein Mediumreservoir entworfen, das zugleich das Einbringen dreier Sonden, den Zu- und Ablauf von Medium und den erforderlichen Druckausgleich ermöglicht. Gemessen an der Größe des Reaktors darf das eingesetzte Flüssigkeitsvolumen nicht zu groß sein. Durch die Form dieses Reservoirs reicht eine relativ kleine Menge des Mediums aus, um den gesamten Kreislauf zu perfundieren, die Zellen mit

Frischmedium zu versorgen und die Sondenköpfe in Flüssigkeit zu halten. Alle Öffnungen besitzen Normgewinde, wodurch handelsübliche Deckel und Dichtungen verwendet werden können. Die gemessenen Werte werden in einen Analog-Digitalwandler (Sensor Module pH/pO₂, DasGip, Jülich, Deutschland) zur Bestimmung von pH, pO₂ und der Temperatur eingespeist.

Eine entsprechend angepasste Software ermöglicht eine unmittelbare Darstellung dieser Werte in graphischer Form und das Abspeichern der Daten zur weiteren Verarbeitung mit Tabellenkalkulations-, Statistik- und Visualisierungs-Software. Die einzelnen Komponenten (Mediumreservoir, Oxygenator, *SlideReactor*) werden durch geeignete Schläuche miteinander verbunden und bilden – angetrieben durch eine elektronisch gesteuerte Pumpe (12-Kanalpumpe IPC12, Ismatec, Wertheim-Mondfeld, Deutschland) - ein Kreislaufsystem: das Medium fließt vom Mediumreservoir in den Reaktor, welcher auf dem Mikroskop-Objektisch liegt, vom Reaktor in den Oxygenator und anschließend zurück in das Mediumreservoir. Da humane Zellen eine Umgebungstemperatur von 37°C benötigen, wird der gesamte Aufbau in einem Wärmeschrank betrieben.

Die technische Charakterisierung des *SlideReactors* wurde am nicht-zellgefüllten System vorgenommen. Zunächst wurde die Abhängigkeit der Oxygenierung des Mediums von der Flussrate bestimmt. Hierfür wurde die Pumprate variiert, der Sauerstoffpartialdruck im Medium kontinuierlich alle 30 Sekunden gemessen und graphisch ausgewertet. Es wurden insgesamt 5 Pumpraten zwischen 0,2 und 1 ml/min getestet. Die kleinste Pumprate von 0,2 ml/min führte zu einer sehr langsamen Sauerstoffsättigung des Mediums mit unstetem Kurvenverlauf. Bei 1 ml/min stieg der Sauerstoffgehalt des Mediums exponentiell an und näherte sich asymptotisch dem Maximalwert. Allerdings war bereits makroskopisch eine relativ starke Pulsation des Mediums innerhalb des Zellkompartiments zu erkennen. Als höchstmögliche Pumprate, die keine Pulsation mehr zeigte und einen exponentiell ansteigenden Sauerstoffpartialdruck aufwies, wurde 0,4 ml/min bestimmt. Für alle weiteren Untersuchungen wurde diese Pumprate als Betriebsparameter festgesetzt. Für die Bestimmung der Austauschrate über die Hohlfaserkapillaren sowie die Detektion potentieller Toträume wurde ein Farbstoff in das Mediumreservoir gegeben und die Verteilung im System über die Zeit untersucht (Simulation eines Stoffeintrages entlang eines Gradienten). Nachdem der *SlideReactor* komplett mit dem mit Farbstoff angereicherten Medium gefüllt war, wurde das Medium gegen frisches, ungefärbtes Medium ausgetauscht und die Dauer bestimmt, bis das

komplette System wieder entfärbt war (Simulation eines Stoffabtransportes). In beide Richtungen dauerte der Transport bis zur vollständigen Anreicherung/ Eliminierung 75 Minuten. Es konnte kein Totraum im System festgestellt werden. Nachdem durch die technische Charakterisierung die Betriebsparameter des *SlideReactor*-Systems festgelegt wurden und auf eine ausreichende Versorgung der Zellen hinwies, wurde das System hinsichtlich der biologischen Funktionalität analysiert. Zur Evaluierung wurden verschiedene Zelltypen in das System inokuliert und kultiviert. Jeder Versuchsansatz wurde fünfmal wiederholt. In insgesamt 40 Läufen wurden die optimalen Kulturparameter für primäre humane Zellen (Leberzellen, zwei Hautzelltypen) und Zelllinien (HepG2, HuH7, C3A, WiDr, SkHep1) im *SlideReactor* bestimmt.

Die Verwendung von im Rahmen einer medizinisch indizierten Leberteileresektion entnommenem humanem Gewebe für Forschungszwecke ist von der zuständigen Ethikkommission der Charité genehmigt. Die durch Perfusion des Resektats mit Kollagenase gewonnen Leberzellen wurden zunächst durch eine Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt und dann in das System inokuliert. Die Zellen wurden für 7 Tage ohne äußeres Eingreifen kultiviert. Zur Kontrolle wurden parallel Zellen der gleichen Isolierung in herkömmliche 6-Loch-Platten ausgesät. Diese eignen sich als Kontrollkulturgefäße, da sie eine annähernd gleiche Grundfläche besitzen (Well 9,6 cm², *SlideReactor* ≈ 10 cm²) und aus demselben Zellkulturkunststoff bestehen. Die Zellen wurden sowohl während der Kultur (morphologisch) als auch nach Beendigung der Kultur (immunhistologisch) analysiert. Die lichtmikroskopischen Untersuchungen der Zellen im *SlideReactor* zeigten keine morphologischen Unterschiede zu den Zellen in den 6-Loch-Platten. Für die immunhistologische Untersuchung wurden die Zellen nach Beendigung der Kultur zunächst mit Paraformaldehyd fixiert und dann gefärbt. Die Untersuchung mittels Fluoreszenzmikroskopie zeigte ebenfalls keinerlei Aberrationen im Vergleich zu den Kontrollkulturen. Dargestellt wurden Zytoplasmaproteine (Cytokeratin 18, Cytokeratin 19, Albumin), Aktinfilamente (Phalloidin) und die Zellkerne (Dapi), welche zusammengenommen den Rückschluss auf einen intakten Metabolismus der Zelle zulassen. Um potentiell vorhandene apoptotische Prozesse zu detektieren, wurden verschiedene kits eingesetzt. Diese kits färben Proteinfragmente an, welche beim während des gesteuerten Zelltods (Apoptose) im Zytoplasma auftreten (TUNEL-kit, M30 CytoDeath).

Fibroblasten und Keratinozyten wurden aus Hautbiopsien isoliert, die im Rahmen von Eingriffen in der plastischen Chirurgie entnommen werden. Die schriftliche Einverständniserklärung hinsichtlich der Verwendung des Materials für Forschungszwecke wurde von den Patienten eingeholt. Zur Gewinnung der Zellen wurden die Hautschichten Dermis und Epidermis durch einen sechzehnstündigen Dispaseverdau voneinander getrennt. Aus der Dermis wurden durch einen sich anschließenden Kollagenaseverdau die Fibroblasten, aus der Epidermis durch Trypsinierung die Keratinozyten gewonnen. Als Kontrollkulturen wurden parallel Zellen der gleichen Isolierung in herkömmlichen 6-Loch-Platten kultiviert. Die lichtmikroskopischen Untersuchungen der Zellen im *SlideReactor* zeigten keine morphologischen Unterschiede zu den Zellen in den 6-Loch-Platten. Für die immunhistologische Analyse intrazellulärer Proteinstrukturen wurden die Zellen nach Beendigung der Kultur mittels Paraformaldehyd fixiert und mit den entsprechenden Fluoreszenzfarbstoffen gefärbt. Dargestellt wurden die respektiven Proteine des Zytoskeletts (Cytokeratin 14), Aktinfilamente (Phalloidin) und die Zellkerne (Dapi). Die Untersuchung mittels Fluoreszenzmikroskopie zeigte ebenfalls keinerlei Aberrationen im Vergleich zu den Kontrollen.

Für die Aufnahmen wurde eine digitale Videokamera an das Mikroskop angeschlossen. Anhand von Kulturen stark proliferierender Zelllinien zeigte sich die Möglichkeit, (zeitraffer-) mikroskopische Aufnahmen bewegter Prozesse der im *SlideReactor* wachsenden Zellen zu realisieren. Die gewonnenen mikroskopischen Bilder werden direkt über die Kamera in einen Rechner eingespeist. Durch eine geeignete Software kann die Zeitrafferfunktion aktiviert und das aufgenommene Video in digitaler Form gespeichert werden. Sowohl das Wachstum der Kultur, die Kolonieentstehung und das Auswachsen einzelner Zellen, als auch Einzelzellteilungen und Einflüsse sich ändernder Kulturbedingungen können aufgezeichnet und später anhand der Videosequenzen analysiert werden.

Nach erfolgreicher Evaluation des Konzepts wurde der *SlideReactor* in verschiedene Studien zur Untersuchung von primären humanen Leberzellen integriert. Ein vom BMBF gefördertes Projekt zur Untersuchung des Einflusses hypothermer Bedingungen auf die Kultur primärer humaner Hepatozyten für die Entwicklung eines Langzeitkulturmodells mit entsprechenden Protektivmedien greift unter anderem auf den *SlideReactor* als Kultursystem zurück. Erste Versuche mit der Hepatozytenzelllinie HuH7 zeigten den Verlauf der auftretenden Zellschädigung. Zunächst wurden die Zellen für einen Zeitraum von 24 Stunden unter

Standardkulturbedingungen gehalten, um die Adhäsion und die gleichmäßige Verteilung zu ermöglichen. Nach dieser Phase wurde unter kontrollierten Bedingungen die Temperatur auf 4°C abgesenkt. Bereits nach einer Kältephase von 24 Stunden konnten durch entsprechende Fluoreszenzfärbungen apoptotische Prozesse nachgewiesen werden. Nach 35 Stunden waren auftretende Membrandisruptionen bereits makroskopisch sichtbar, mittels zeitfraggermikroskopischer Aufnahmen konnte das Auslaufen von Plasma detektiert werden. Nach 48 Stunden waren die meisten Zellen bereits vom Boden abgelöst. In weiteren Versuchsreihen sollen nun verschiedene Medien mit Zytoprotektiva gegen Kälteschädigung entwickelt und an primären humanen Leberzellen getestet werden. Der *SlideReactor* und die dadurch ermöglichte morphologische Auswertung der Kultur stellen eine optimale Ergänzung zu den Plattenkulturen (biochemische Auswertung) dar.

Die Konstruktion des *SlideReactors* sowie erste Versuche wurden im Jahr 2005 im „*Journal for Artificial Organs*“ (I.M. Sauer, R. Schwartlander, J. Schmid, E. Efimova, F.W.R. Vondran, D. Kehr, G. Pless, A. Spinelli, B. Brandenburg, E. Hildt, P. Neuhaus: The *SlideReactor* – a simple hollow-fiber based bioreactor suitable for light microscopy. *Artificial Organs*; 2005, 29: 264-267) sowie auf der 21. Jahrestagung der „German Association for the Study of the Liver“ (GASL) in Ulm (R. Schwartlander, J. Schmid, B. Brandenburg, E. Efimova, F.W.R. Vondran, C. Johnen, G. Pless, E. Hildt, P. Neuhaus, I.M. Sauer: The *SlideReactor* – a simple hollow fiber based bioreactor suitable for light and time-lapse microscopic observation) veröffentlicht. Die Evaluation des *SlideReactor*-Konzeptes mit verschiedenen Zellpopulationen sowie ersten anwendenden Experimenten wurde bei der Jahrestagung der „*European Society for Artificial Organs*“ (ESAO) in Bologna 2005 (R. Schwartlander, J. Schmid, E. Katenz, X. Cheng, G. Pless, X. Gong, F. Vondran, P. Neuhaus, I.M. Sauer: The *SlideReactor*-Evaluation of a hollow fiber based bioreactor suitable for light microscopy) und der ESAO in Umeå 2006 (R. Schwartlander, J. Schmid, E. Katenz, X. Cheng, G. Pless, D. Modest, F. Vondran, P. Neuhaus, I.M. Sauer: The *SlideReactor* – Proof of concept) vorgestellt. Der diesbezügliche Artikel ist zur Veröffentlichung in *Tissue Engineering* akzeptiert (Schwartlander R, Schmid J, Brandenburg B, Katenz E, Vondran FWR, Pless G, Cheng X, Pascher A, Neuhaus P, Sauer IM: Continuously microscopically observed and process controlled cell culture within the *SlideReactor* – proof of a new concept for cell characterization).

Die Ziele der Arbeiten wurden entsprechend der Planung erreicht. Es wurde ein miniaturisiertes Bioreaktorsystem für die kontinuierliche Beobachtung kultivierter Zellen etabliert. Ein Betriebskonzept inklusive der notwendigen Oxygenierungseinheit wurde entwickelt und mit der für die mikroskopische und zeitraffervideo-mikroskopische Begutachtung notwendigen Technik kombiniert. Das auf den *SlideReactor* zugeschnittene Perfusionssystem ermöglicht die zeitgleiche Messung relevanter Prozessparameter sowie die sofortige Dokumentation und Auswertung der gemessenen Werte durch einen entsprechenden Analog-Digitalwandler. Der *SlideReactor* ist ein wesentlicher Bestandteil eines vom BMBF geförderten Projekts.

Originalarbeiten

Schwartlander R, Schmid J, Brandenburg B, Katenz E, Vondran FWR, Pless G, Cheng X, Pascher A, Neuhaus P, Sauer IM

Continuously microscopically observed and process controlled cell culture within the SlideReactor– proof of a new concept for cell characterization

Tissue Engineering, 2007, 13(1): 197-205.

I.M. Sauer, R. Schwartlander, J. Schmid, E. Efimova, F.W.R. Vondran, D. Kehr, G. Pless, A. Spinelli, B. Brandenburg, E. Hildt, P. Neuhaus

The SlideReactor – A Simple Hollow Fiber Based Bioreactor Suitable for Light Microscopy

Artificial Organs, Thoughts and Progress 2005; 29(3): 264-267

I.M. Sauer, R. Schwartlander, O. van der Jagt, I. Steffen, E. Efimova, G. Pless, D.C. Kehr, D. Kardassis, J.H. Fruhauf, J.C. Gerlach, P. Neuhaus

***In vitro* evaluation of the transportability of viable primary human liver cells originating from discarded donor organs in bioreactors.**

Artificial Organs. 2005 (2):144-151

Erklärung

„Ich, Ruth Schwartländer, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Entwicklung einer Kulturmethode zur lichtmikroskopischen Untersuchung lebender Zellen in Hohlfaser-Bioreaktoren“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift