

Wege zur versuchstierfreien Substanztestung

Einleitung

Die Zellen des menschlichen Körpers sind permanent einer Vielzahl mechanischer Kräfte ausgesetzt, einschließlich Kompression, Schub- und Zugspannung¹. Die Erkenntnisse über die Bedeutung dieser biomechanischen Umgebung im Körper haben dazu beigetragen, dass Zellen *in vitro* zunehmend in speziellen Vorrichtungen unter mechanischer Belastung kultiviert werden². Derzeit verfügbare Zellträger sind allerdings kostenintensiv und nur unzureichend *in vivo*-nah. Das Projekt beschäftigt sich daher mit der Entwicklung einer elastischen, mikroporösen Zellträgermembran, die als Alternative zum Tierversuch, mechanisch belastbar ist und preiswert produziert werden kann.

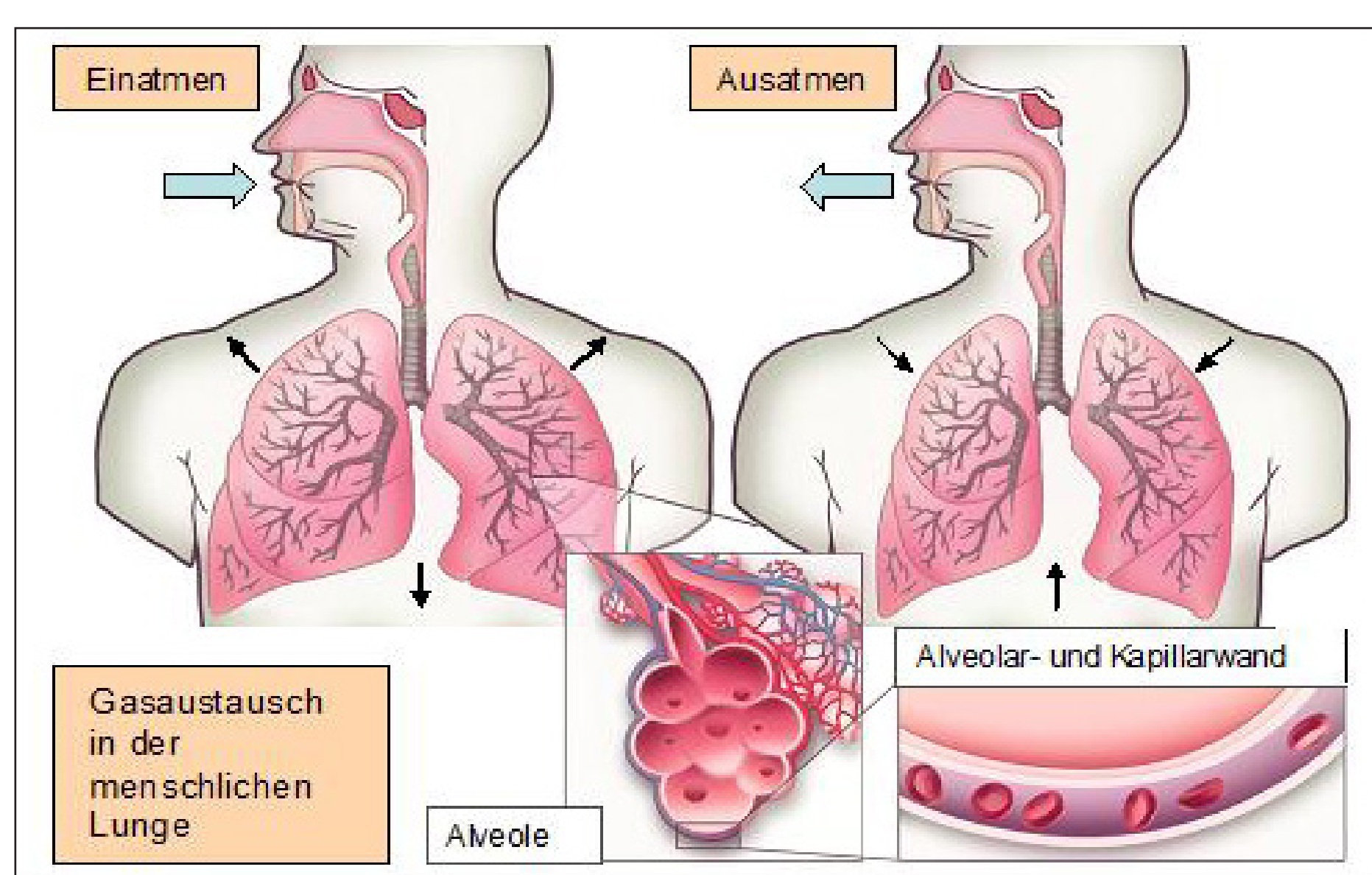


Abbildung 1: Die Entwicklung von Modellsystemen zur Untersuchung von Medikamenten *in vitro* erfordert die Bereitstellung neuartiger Zellkultursysteme mit variablen mechanischen Eigenschaften. Eine dynamische, mechanische Dehnung von Zellen findet man insbesondere während der Atmung in den Lungenbläschen, in den Arterien des Blutgefäßsystems und der aufgelagerten glatten Muskelzellen sowie in Geweben, die durch die Peristaltik des Darms regelmäßig verformt werden.

Methoden

Ziel des Projektes war die Herstellung einer transparenten Membran, die optimal an die Kultivierung adhärent wachsender Zellen angepasst ist und eine zyklische mechanische Dehnung ermöglicht. Idealerweise sollte die Membran porös sein, um eine gleichmäßige Versorgung der Zellschicht mit Sauerstoff und Nährstoffen zu gewährleisten. Sie sollte zudem eine Barriere zwischen Flüssigkeit/Flüssigkeit und Gas/Flüssigkeit darstellen und eine beidseitige Besiedlung mit unterschiedlichen Zelltypen erlauben.

HERSTELLEN EINER ELASTISCHEN, MIKROPORÖSEN ZELLTRÄGERMEMBRAN

Zur Herstellung der elastischen Membran wurden medical-grade Flüssigsilicone ohne Zusatz von Lösemitteln verwendet. Aus diesen Siliconen wurden geeignete Pastenrezepturen erarbeitet und Membranen an einem Mathis-Labcoater im Streichverfahren in einer Dicke von ca. 100 µm hergestellt. Für die Vulkanisation der Siliconmassen waren 4 min bei 180 °C ausreichend. Um ein durchgängiges Porensystem zu erzeugen, wurde PTFE in die Polymerpaste eingemischt und die Membran nach dem Vulkanisieren verstreckt. PTFE ist ein inerte Füllstoff, der keine chemische oder physikalische Bindung mit der Matrix eingeht. Durch die Dehnung der Membran wird ein Abreißen des Polymers vom Füllstoff bewirkt und es entstehen Poren mit variablen Durchmesser. Der Anteil an Füllstoff betrug zwischen 20 % und 40 %. Um die Adhäsion der Zellen zu fördern, wurde die Membran mit löslichem Kollagen beschichtet.

ZYKLISCHE DEHNUNG DER ZELLTRÄGERMEMBRAN

Um die Zellen in einer mechanischen Umgebung kultivieren zu können, wurde die Membran in das Strexacell Dehnungsgerät eingespannt, das zusammen mit der Fa. Fortech GmbH entwickelt wurde. Ähnlich den pulsierenden Bewegungen im Organismus kann die Membran zyklischen Dehn- und Entspannungsprozessen ausgesetzt werden. Die Dauer und

Stärke der Dehnung kann dabei über einen Computer variabel eingestellt werden. Als vorteilhaft zeigten sich neben der dauerhaften Flexibilität der Membran auch die 100 %ige Rückstellung nach jedem Dehnprozess.

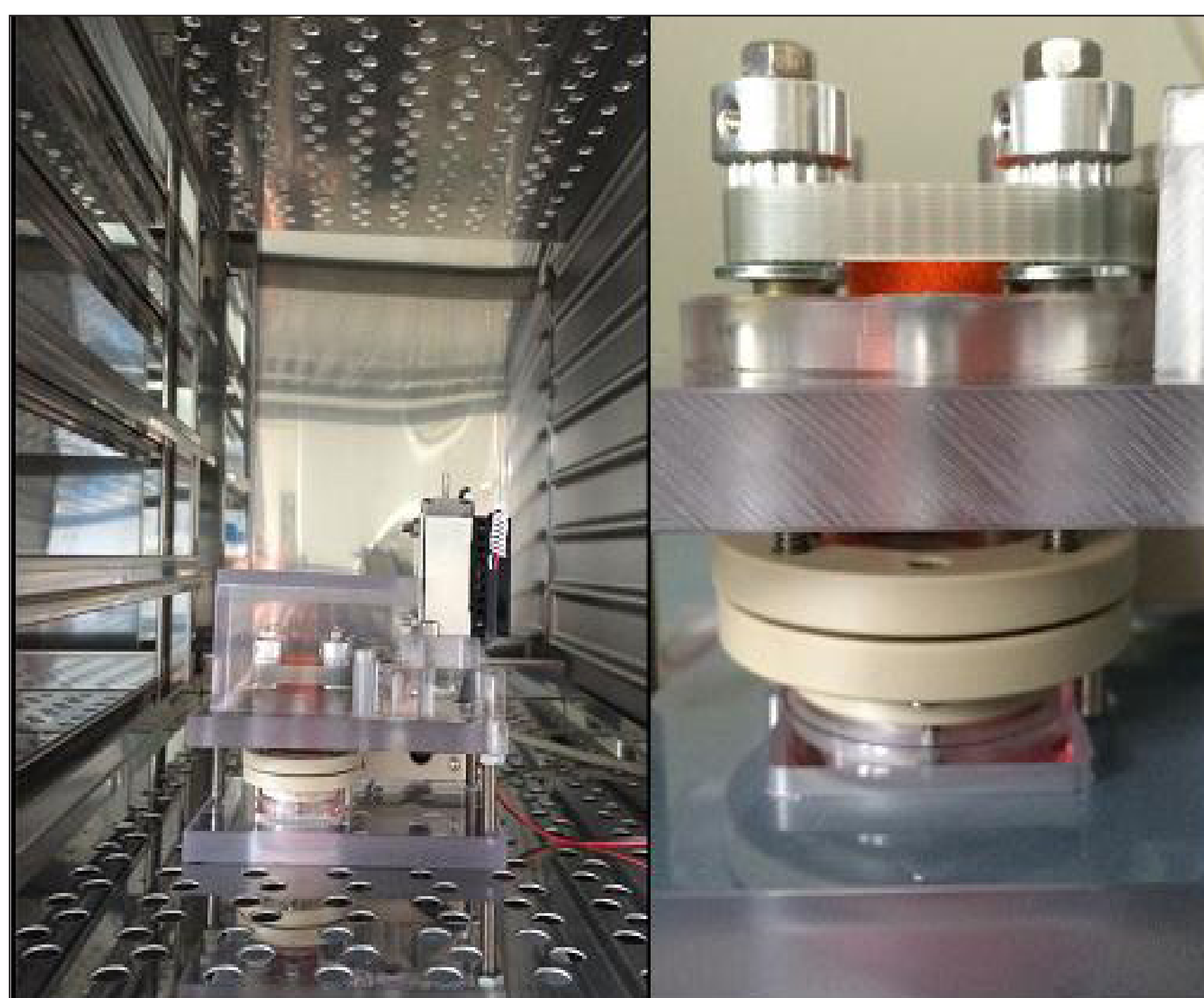


Abbildung 2: Das Strexacell Dehnungsgerät ermöglicht die rhythmische Dehnung und Entdehnung der porösen Siliconmembran und ist auf die beidseitige Besiedlung der Membran mit Zellen ausgelegt.

Ergebnisse

MECHANISCHE EIGENSCHAFTEN

Im Hinblick auf die mechanischen Eigenschaften sind Membranen aus medical-grade Silicon im Vergleich zu Standardsilicon für technische Produkte besonders geeignet. Sie weisen neben einer hohen Dehnbarkeit von > 600 % auch die höchste Weiterreißfestigkeit auf (> 1,5 N).

Silicone	Füllstoffgehalt [%]	Dicke [µm]	Zugfestigkeit [N]	Bruchdehnung [%]	Weiterreißfestigkeit [N]
Technische Qualität	0	95	3,3	342	0,3
Technische Qualität	40	90	2,5	324	0,4
Medical Grade	0	103	3,2	573	1,45
Medical Grade	20	85	4,0	634	1,6
Medical Grade	33	93	3,5	622	2,1

Tabelle 1: Zusammensetzung und Eigenschaften der Siliconmembranen

ZELLVERTRÄGLICHKEIT

Zur Bestimmung der Verträglichkeit wurden *in vitro*-Zytotoxizitätstests gemäß EN ISO 10993-5 angewendet, die zur Beurteilung von Medizinprodukten herangezogen werden. Erwartungsgemäß zeigten medical-grade Silicone keine zytotoxischen Effekte.

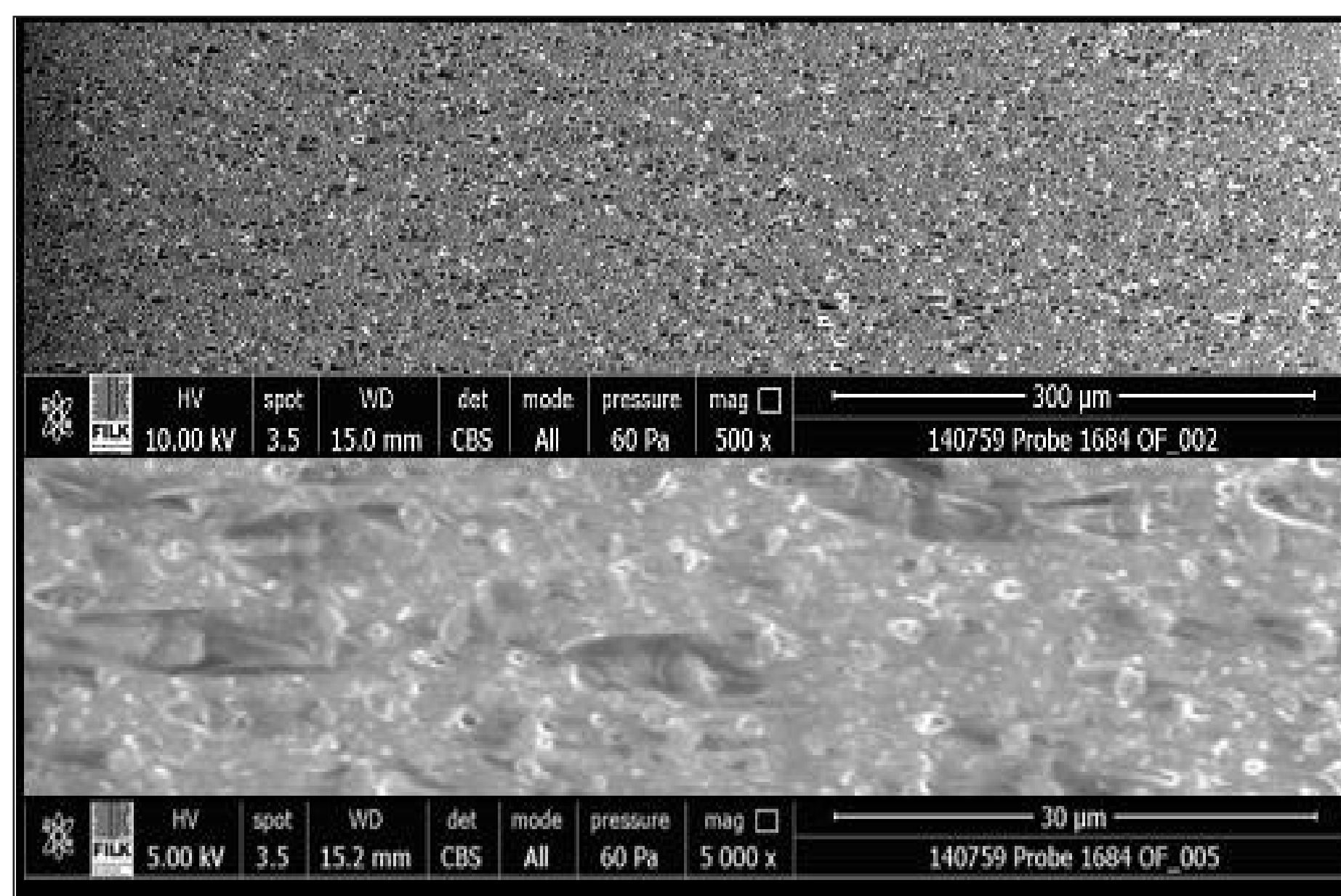


Abbildung 3: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Porenstruktur mit einer Vorspannung von 1:2,5

PORENGRÖSSE

Die Poren in der Zellträgermembran variieren zwischen <math><0,5 \mu\text{m}</math> bis 15 µm, wobei Partikel des Füllstoffes in der Mitte der Pore sitzen. Ein Durchdringen der Membran von wandernde Zellen wird somit verhindert. Ein vollständiges Entspannen der Membran führt zum Verschließen der Poren. Die Membran wird daher im Dehnungsgerät mit einer Vordehnung von 1:2,5 eingespannt.

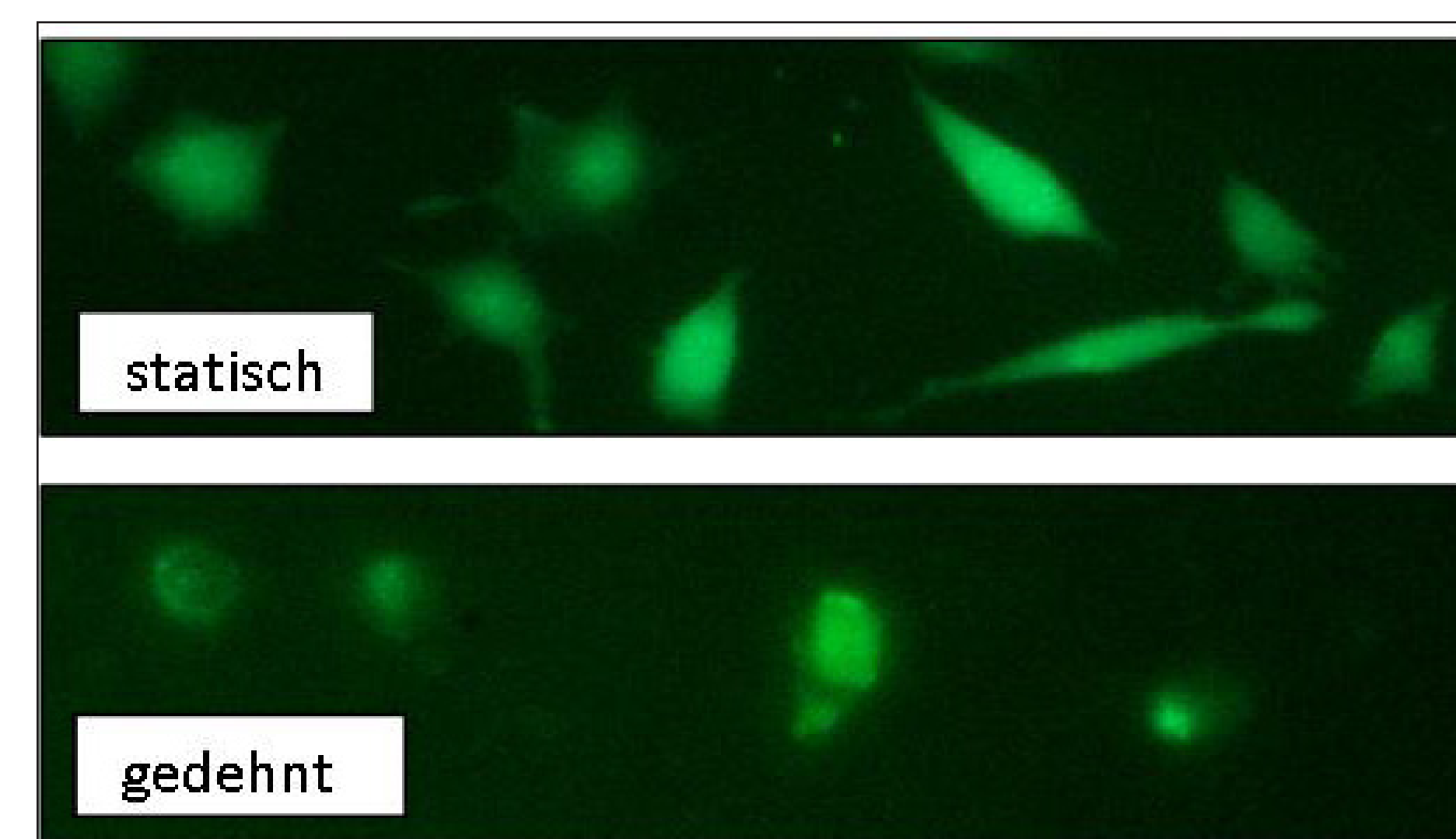


Abbildung 4: Im mikroskopischen Bild sind Veränderungen in der Zellgröße und -form nach einer 2 stündigen Dehnung sichtbar.

Die Auswirkungen einer mechanischen Dehnung wurde mit Hilfe von Bindegewebszellen untersucht. Dazu wurde die Siliconmembran in das Dehnungsgerät eingespannt, mit Kollagen beschichtet und mit Zellen besiedelt. Nach einer Inkubationszeit von ca. 16 Stunden unter statischen Bedingungen wurden eine pulsatile Dehnung mit einer Frequenz von 1 Hz angelegt. Die Membran wurde dabei um 1 mm gedehnt.

Schlussfolgerungen

Die erfolgreiche Kultivierung von Gewebezellen auf der Zellträgermembran verdeutlicht die Eignung solche fortschrittlichen Kulturtechniken. In diesem biologisch inspirierten Modell einer atmenden Lunge können auf beiden Seiten verschiedene Zelltypen aufgebracht werden. So kann die Dehnung der Alveoli mit der Streckung der Alveolar-Kapillar-Grenzfläche nachgeahmt werden.

Dieses mechanisch aktive Zellkulturmodell ist eine kostengünstige Alternative zum Tierversuch. Die Eignung solcher Systeme zur Durchführung von Wirkstoff-Screenings oder ähnlichen toxikologischen Anwendungen wurde bereits vielfach gezeigt³.

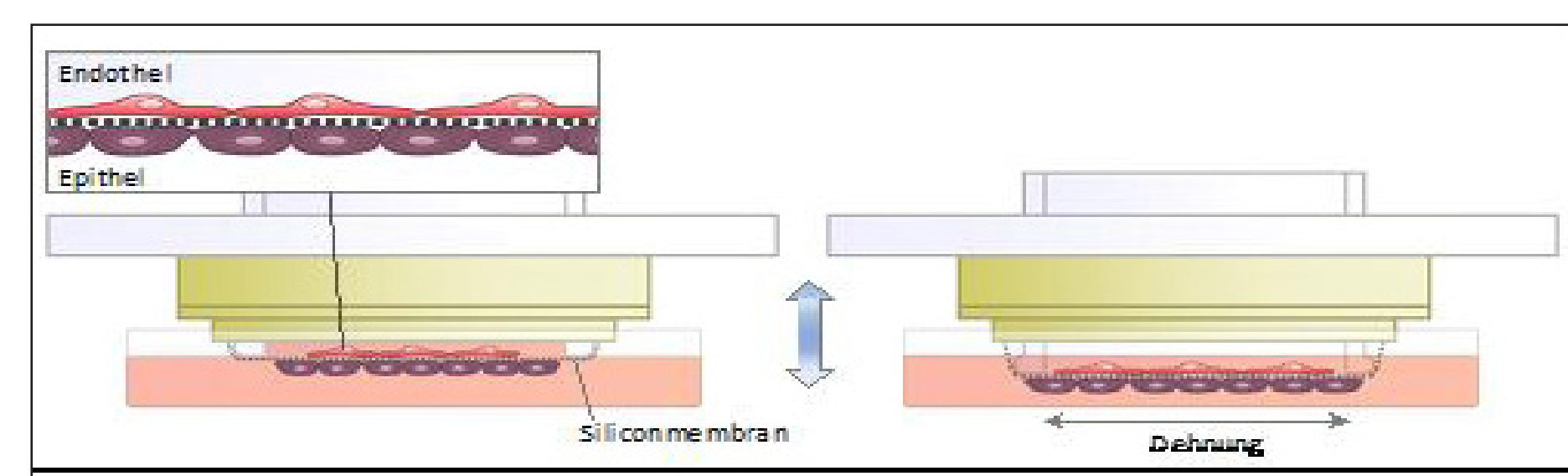


Abbildung 5: Schematische Darstellung der mechanischen Dehnung einer Alveolar-Kapillar-Grenzfläche im Zellkulturmodell.

Quellen

- (1) Janmey PA, Weitz DA (2004) Dealing with mechanics: mechanisms of force transduction in cells. Trends Biochem Sci 29(7): 364-370
- (2) Baner AJ, Link GW Jr, Gilbert JW, Tran Son Tay R, Monbureau O (1990) Culturing cells in a mechanically active environment. Am Biotechnol Lab 8(7): 12-22
- (3) Huh D, Matthews BD, Mammoto A, Montoya-Zavala M, Hsin HY, Ingber DE (2010) Reconstituting organ-level lung functions on a chip. Science 328(5986): 1662-1668