

Künstliche Gewebekonstrukte

Bioreaktoren für vaskularisiertes Knochen-Tissue-Engineering

KAI O. BÖKER, SAMUEL SIEGK, LUIS A. PARDO JR., MIGUEL BRAVO, JANNE HAHNE, WOLFGANG LEHMANN, ARNDT F. SCHILLING
KLINIK FÜR UNFALLCHIRURGIE, ORTHOPÄDIE UND PLASTISCHE CHIRURGIE,
UNIVERSITÄTSMEDIZIN GÖTTINGEN

Tissue engineering (TE) has the potential to revolutionize human healthcare through creation of artificial tissue for medical applications. The vascular supply plays an important role in this process. To realize such vascularized tissues in the future, we developed a vascularized bioreactor system. The goal in the near future is to standardize the systems to enable to mimic existing *in vivo* systems. The long-term goal is the production of vascularized bone tissue for treatment of large bone defects in injured patients.

DOI: 10.1007/s12268-022-1833-3
© Die Autoren 2022

■ Tissue Engineering (TE) hat das Potenzial, die menschliche Gesundheitsversorgung zu revolutionieren. Das Ziel beim TE ist die Erzeugung von künstlichen Organen oder Organteilen für medizinische Anwendungen [1-4]. Gerade in der Unfallchirurgie, in der häufig große Knochendefekte aufgefüllt werden müssen, könnte diese Methode weitreichende Fortschritte bringen. Wesentlich für den Erfolg des Tissue Engineerings ist die Entwicklung geeigneter Bioreaktoren. Dank

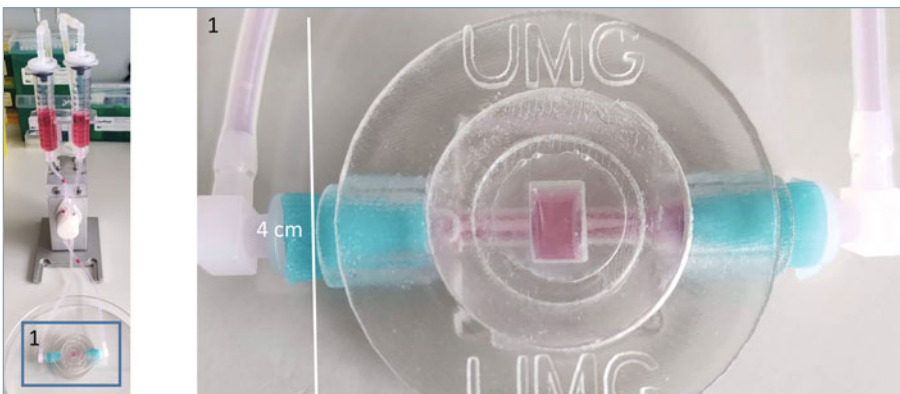
ihrer enormen Vielseitigkeit werden Bioreaktoren bereits in vielen Branchen eingesetzt, darunter in der biologischen, biomedizinischen, pharmazeutischen, Lebensmittel-, Abwasserbehandlungs-, Chemie- und Fermentationsindustrie [5]. Für die Entwicklung von Bioreaktoren für die Herstellung von Knochen müssen die Besonderheiten des Gewebes beachtet werden: hohe mechanische Stabilität bei gleichzeitiger Elastizität, starke Durchblutung, hoher interner Umbau

zur Anpassung an Belastungen und Regeneration [6, 7].

Die Erzeugung von lebendigem Gewebe ist in konventionellen Bioreaktoren in ihrer Größe begrenzt, da der Transport von Nährstoffen und Sauerstoff zu den Zellen sowie der Abtransport von zellulären Stoffwechselprodukten hauptsächlich über passive Diffusion geregelt wird. Die Größenbeschränkung ergibt sich aus den Stoffwechselbedürfnissen der eingebetteten Zellen [8]. Das Überleben dieser Zellen ist auf einen begrenzten Bereich von 150–200 µm von der nächsten Kapillare oder Gefäß beschränkt [7]. Nur in diesem Bereich werden die Zellen ausreichend mit Sauerstoff, Nährstoffen und Wachstumsfaktoren versorgt [9].

In voluminösen Konstrukten, denen ein Gefäßnetzwerk fehlt, tritt in tieferen Bereichen aufgrund der fehlenden Nährstoffversorgung der Zelltod ein und das Gewebe nekrotisiert [10]. Darüber hinaus stellen die Blutgefäße nicht nur die Versorgung des Gewebes mit Nährstoffen sicher, sondern ermöglichen auch die Entsorgung der Abfallprodukte des Zellstoffwechsels, die sich sonst bis zu toxischen Konzentrationen anreichern können [9, 11].

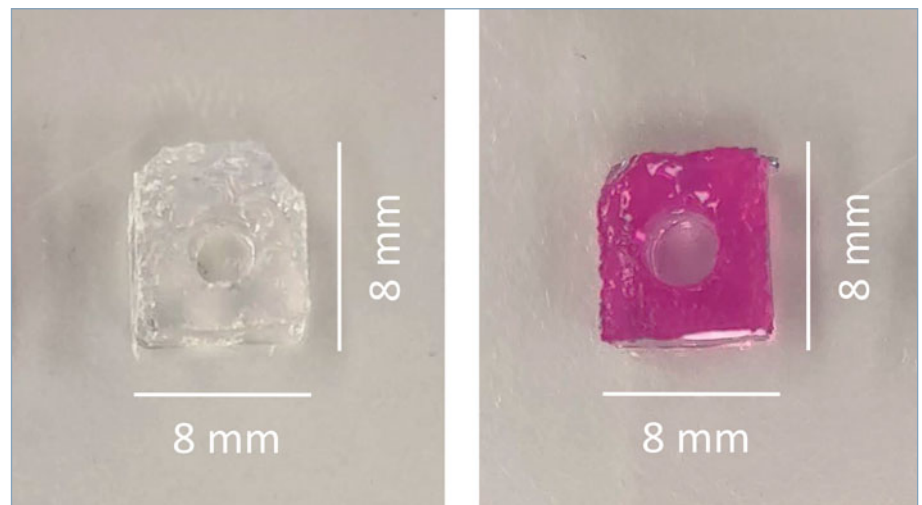
Daher ist für die Generierung funktioneller Gewebe in klinisch relevanten Größen (mehrere cm³) die Einbeziehung eines funktionellen Gefäßsystems zwingend erforderlich. Es wurden bereits verschiedene Ansätze verfolgt, um Gefäßstrukturen in konstruierte Gewebekonstrukte zu integrieren [12]. Die vorgeschlagenen Methoden umfassen die Induktion der Vaskularisierung in biokompatiblen Hydrogelen wie Fibrin, Kollagen und Gelatine [13, 14], die Integration angiogener Faktoren zur Bildung von Kapillarnetzwerken in heterotypischen Gewebekonstrukten [15, 16] oder die Schaffung von Gefäßstrukturen durch Adhäsion von Endothelzellen an der Oberfläche von Kanälen in Hydrogelen [17, 18]. Im menschlichen Körper bestehen Gewebe aus einer Vielzahl verschiedener Zellen, die normalerweise in Schichten angeordnet sind und von einer gemeinsamen mehrschichtigen Gefäßstruk-



▲ **Abb. 1:** Aufbau des Bioreaktorsystems. Der Bioreaktor wird im 3D-Druckverfahren erstellt und an das gewünschte Gewebevolumen angepasst. Anschließend wird der Reaktor über Silikonverbindungen (blau) an einen künstlichen Kreislauf angeschlossen. Das Hydrogel wird durch den Silikondeckel injiziert und ausgehärtet. Die erhaltenen TE-Konstrukte werden im Anschluss mit Zellkulturmedium „durchblutet“, bis der gewünschte Gewebereifegrad erreicht ist.

tur versorgt werden, die verschiedene Arten spezialisierter Zellen umfasst (z. B. Endothelzellen, Fibroblasten, glatte Muskelzellen (*smooth muscle cells*, SMCs)) [19–21]. Um solche Gefäßstrukturen in Zukunft zu verwirklichen, haben wir eine neuartige Strategie unter Verwendung von 3D-Druckverfahren entwickelt, um mehrschichtige vaskularisierte Hydrogelkonstrukte in transparenten Bioreaktoren herzustellen [7] und für die Züchtung von Knochengewebe zu optimieren (**Abb. 1**).

Unser Bioreaktor ist etwa 4×4 cm groß und wird im 3D-Druckverfahren hergestellt. Zunächst wurde das Modell mit einem FDM-Drucker (*fused deposition modeling*) aus einem auf Polymilchsäure basierenden Material (PLA) gedruckt. Dieses Material wies angemessene mechanische Eigenschaften auf und erwies sich während unserer Tests als unbedenklich für unsere Proben. Um unseren Bioreaktor weiterzuentwickeln, wurde die Drucktechnik auf die PolyJet-Technologie umgestellt, die die Möglichkeit bietet, mehrere Materialien gleichzeitig zu drucken, und zwar mit einem breiten Spektrum an Eigenschaften und mit einer wesentlich höheren geometrischen Auflösung. Unsere derzeitige Version wird aus zwei Materialien gedruckt: Auf der einen Seite wird die Hauptgeometrie aus starrem, transparentem Harz (MED620, Stratasys, Israel) hergestellt, auf der anderen Seite wird die scheibenförmige Struktur, die den Hohlraum verschließt, aus flexiblem, transparentem Harz (MED625FLEX, Stratasys, Israel) gedruckt. Die Transparenz, die diese Materialien bieten, ermöglicht es, den inneren Hohlraum auf einfache Art und Weise zu beobachten. Außerdem dient die scheibenförmige Struktur als Fenster zum Bioreaktorkanal, der die Injektion von Substanzen in den Hohlraum ermöglicht. Die Flexibilität des verwendeten Materials sorgt dafür, dass die Punktion anschließend nicht undicht wird. Diese spezielle Struktur wurde entwickelt, um die Rolle des Siliziums in unserer vorherigen Version zu erfüllen, wobei sie jedoch komplett an Ort und Stelle hergestellt wird, was die Vorbereitungszeit und die Möglichkeit der Erzeugung von Defekten drastisch reduziert. Unsere Bioreaktoren sind einfach zu handhaben und können ohne komplizierten Aufbau direkt an kontinuierliche Perfusionssysteme oder Zellkulturpumpen angeschlossen werden. Um die Zellen in 3D kultivieren zu können werden Scaffold-Materialien verwendet, die am Anfang eine 3D-Struktur vorgeben, in



▲ **Abb. 2:** Darstellung der verwendeten Hydrogele. PEGDA wurde im Reaktor ausgehärtet und bildet ein klares Hydrogel (in diesem Fall $8 \times 8 \times 5$ mm). Zwei Stunden nach Durchströmung ist erkennbar, dass das PEGDA-Hydrogel das Medium (DMEM, rote Einfärbung) aufgenommen hat.

der sich die Zellen einbetten können und einen 3D-Verbund bilden. Wir haben biologisch basierte Hydrogelsysteme (z. B. Fibrin) und chemisch modifizierte Polymere (z. B. Polyethylenglykol-Diacrylat, PEGDA; Chondroitinsulfat-Methacrylat, CSMA und Hyaluronsäure-Methacrylat, HAMA) als Gerüst für humane MSCs analysiert und ihre Handhabungserfahrung, chemischen Eigenschaften und biologischen Wirkungen (z. B. Zellmorphologie) verglichen. PEGDA hat sich dabei durch seine einfache Handhabung, schnelle Aushärtezeit sowie gute Biokompatibilität als sehr geeignet erwiesen. Im Zusammenspiel mit unserem Bioreaktorsystem können durchströmte Knochengewebekonstrukte bis zu einer Größe von mindestens $1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$ erstellt werden. Dafür werden geeignete humane Zellen mit dem flüssigen Hydrogel vermischt, in den Bioreaktor injiziert und dort polymerisiert. An das Perfusionssystem angeschlossen, kann das Gewebe mit einer Durchflussrate von 0,5–35 Milliliter pro Minute je nach gewünschtem Reifegrad

des Gewebes für mehrere Tage/Wochen kultiviert werden. Das Hydrogel nimmt dabei kontinuierlich das Medium durch den Perfusionskanal auf und versorgt so die Zellen mit Nährstoffen (**Abb. 2**). Gleichzeitig nimmt es die Stoffwechselprodukte der Zellen auf und gibt sie über das künstliche Gefäßsystem ab.

Dies ermöglicht eine schnelle und kostengünstige Herstellung maßgeschneiderter 3D-Konstrukte mit enthaltenem Gefäßmodell. Eine Anpassung von diversen Parametern wie Länge, Breite, Dicke der Hydrogelkonstrukte sowie Durchmesser der vaskulären Struktur sind möglich, ohne dass komplizierte Fähigkeiten oder spezielle Geräte erforderlich sind. Die Durchflussrate und Kulturzeit können je nach Bedürfnis angepasst werden. Die Eigenschaften unseres Hydrogelsystems sind in **Tabelle 1** zusammengefasst.

Aktuell werden diese Bioreaktoren noch hauptsächlich für die Bearbeitung grundlagenwissenschaftlicher und anwendungsbezogener Fragestellungen zur Biologie des

Tab. 1: Eigenschaften des Bioreaktorsystems.

Informationen Bioreaktorsystem	
Größe	Beliebig (z. B. $1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$)
Durchflussrate	0,5–35 ml/min
Sterilisation	UV oder alkoholische Desinfektion
Mögliche Hydrogele	Alle Hydrogele, die flüssig appliziert werden können wie: – 2-Komponenten-Hydrogele (z. B. Fibrin/Thrombin) – Methacrylate (z. B. PEGDA, HEMA, CoIMA)
Kulturzeiten	Minuten (Diffusionstests) bis mehrere Wochen (osteogene Differenzierung)

vaskularisierten Knochens genutzt. Auf diese Weise können Artefakte vermieden werden, die durch die gewebeuntypische Kultivierung auf zweidimensionalen Plastikschaalen entstehen können. Das Ziel in der nahen Zukunft ist es, die Systeme soweit zu standardisieren, dass sie es ermöglichen, *in vivo*-Systeme besser abzubilden und damit manche Tierversuche ersetzen können. Das Fernziel ist die MDR (Medical Device Regulation)-konforme Herstellung von vaskularisiertem Knochengewebe für die Reparatur großer Knochendefekte von Verletzten und Tumorpatienten. ■

Literatur

- [1] Biondi M, Ungaro F, Quaglia F et al. (2008) Controlled drug delivery in tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev* 60: 229–242
- [2] Khademhosseini A, Vacanti J, Langer R (2009) Progress in tissue engineering. *Sci Am* 300: 64–71
- [3] Atala A, Kasper FK, Mikos AG (2012) Engineering complex tissues. *Sci Transl Med* 4: 160r12
- [4] Abaci HE, Guo Z, Coffman A et al. (2016) Human skin constructs with spatially controlled vasculature using primary and iPSC-derived endothelial cells. *Adv Healthc Mater* 5: 1800–1807
- [5] Timur S (2021) A review on 3D-printed bioreactors. *Pharm Bioprocess* 9: 40–41
- [6] Rauh J, Milan F, Günther KP et al. (2011) Bioreactor systems for bone tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev* 17: 263–280
- [7] Liu J, Zheng H, Dai X et al. (2020) Transparent PDMS bioreactors for the fabrication and analysis of multi-layer pre-vascularized hydrogels under continuous perfusion. *Front Bioeng Biotechnol* 8: 568934
- [8] Novosel EC, Kleinans C, Kluger PJ (2011) Vascularization is the key challenge in tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev* 63: 300–311
- [9] Kannan RY, Salacinski HJ, Sales K et al. (2005) The roles of tissue engineering and vascularisation in the development of micro-vascular networks: a review. *Biomaterials* 26: 1857–1875
- [10] Carmeliet P, Jain RK (2000) Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407: 249–257
- [11] Oh S, Ryu H, Tahk D et al. (2017) “Open-top” microfluidic device for in vitro three-dimensional capillary beds. *Lab Chip* 17: 3405–3414
- [12] Liu J, Zheng HY, Poh PS et al. (2015) Hydrogels for engineering of perfusable vascular networks. *Int J Mol Sci* 16: 15997–16016
- [13] Moya ML, Hsu YH, Lee AP et al. (2013) In vitro perfused human capillary networks. *Tissue Eng Part C Methods* 19: 730–737
- [14] Kim C, Kasuya J, Jeon J et al. (2015) A quantitative microfluidic angiogenesis screen for studying anti-angiogenic therapeutic drugs. *Lab Chip* 15: 301–310
- [15] Chiu LL, Montgomery M, Liang Y et al. (2012) Perfusable branching microvessel bed for vascularization of engineered tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: E3414–E3423
- [16] Sekine H, Shimizu T, Sakaguchi K et al. (2013) In vitro fabrication of functional three-dimensional tissues with perfusable blood vessels. *Nat Commun* 4: 1399
- [17] Miller JS, Stevens KR, Yang MT et al. (2012) Rapid casting of patterned vascular networks for perfusable engineered three-dimensional tissues. *Nat Mater* 11: 768–774
- [18] Kageyama T, Kakegawa T, Osaki T et al. (2014) Rapid engineering of endothelial cell-lined vascular-like structures in situ crosslinkable hydrogels. *Biofabrication* 6: 025006
- [19] Takebe T, Koike N, Sekine K et al. (2012) Generation of functional human vascular network. *Transplant Proc* 44: 1130–1133
- [20] Peloso A, Dhal A, Zambon J et al. (2015) Current achievements and future perspectives in whole-organ bioengineering. *Stem Cell Res Ther* 6: 107
- [21] Zakharova IS, Zhiven MK, Saaya SB et al. (2017) Endothelial and smooth muscle cells derived from human cardiac explants demonstrate angiogenic potential and suitable for design of cell-containing vascular grafts. *J Transl Med* 15: 54

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende

nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.



K. O. Böker, S. Siegl, L. A. Pardo Jr., M. Bravo, J. Hahne, W. Lehmann und A. F. Schilling (v. l. n. r.)

Korrespondenzadresse:

Dr. Kai Böker
 Klinik für Unfallchirurgie, Orthopädie und
 plastische Chirurgie
 Universitätsmedizin Göttingen
 Robert-Koch-Straße 40
 D-37075 Göttingen
kai.boeker@med.uni-goettingen.de
<http://cuop-umg.de/forschung>