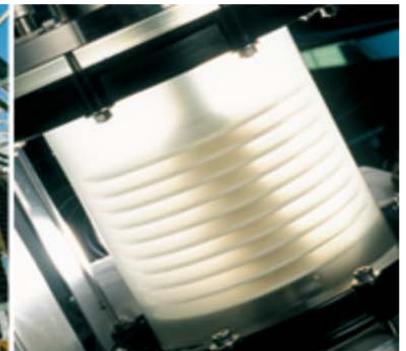
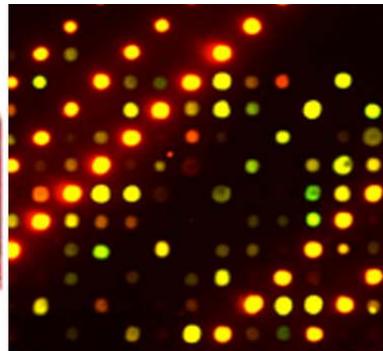
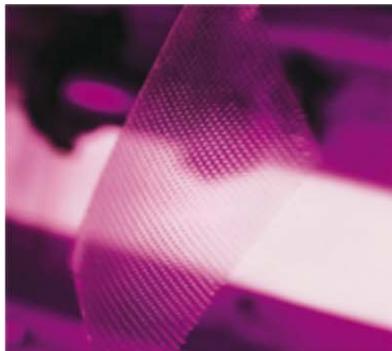

Entwicklung eines vaskularisierten Lebermodells

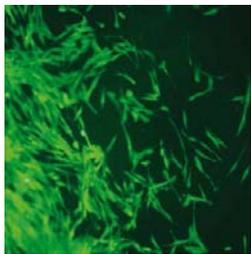
Dr. Johanna Schanz
Fraunhofer IGB
26. Oktober 2009

Symposium October 2009:

*20th Anniversary of
ZEBET at BfR*

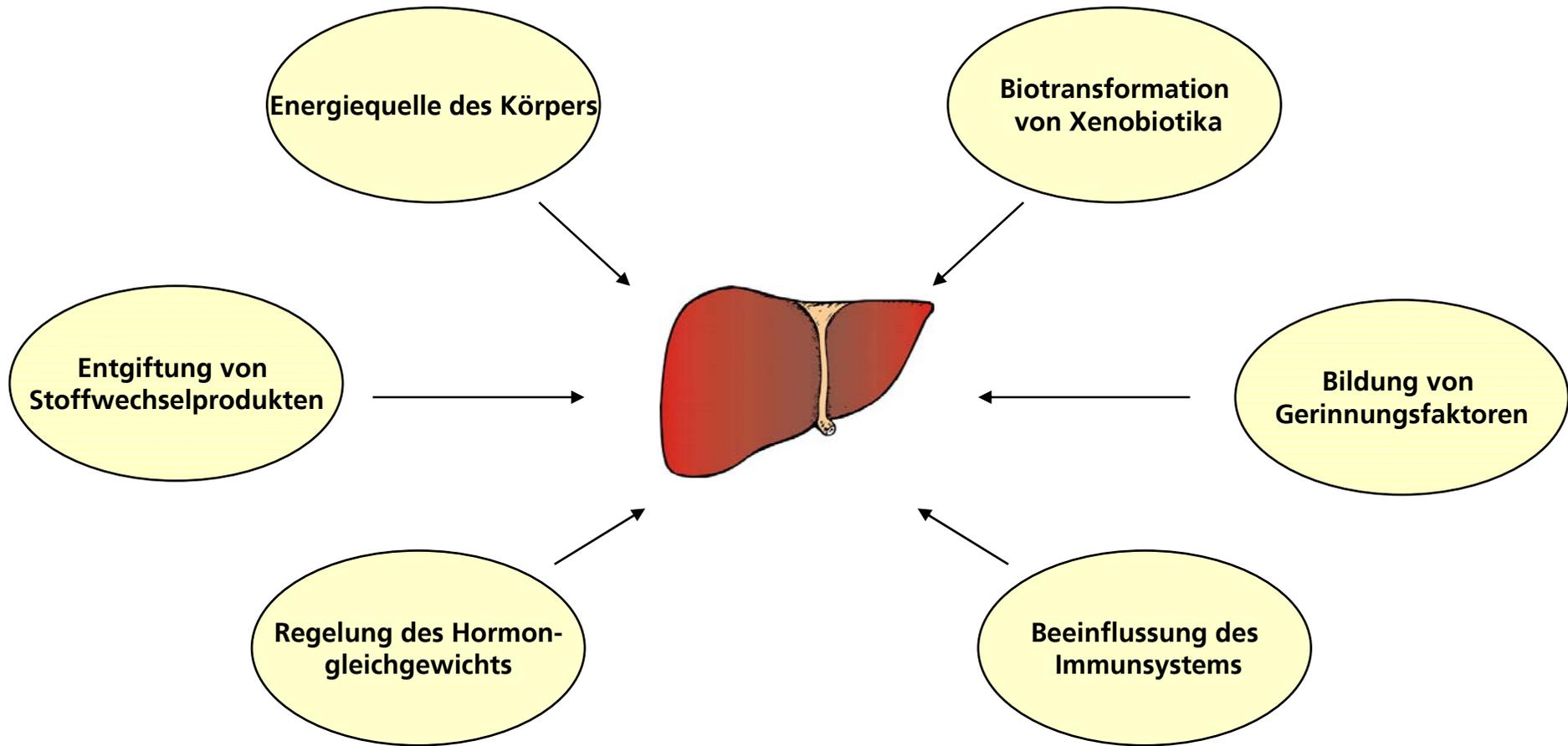


Zellsysteme und Tissue Engineering



- Biomaterialien
- Bioreaktorentwicklung
- Avaskuläre Gewebemodelle
- Vaskularisierte Gewebemodelle
- GMP Produktion von Advanced Therapeutical Medicinal Products (ATMP)

Funktionen der Leber



Ausgangssituation

- Durch die Metabolisierung von Medikamenten in der Leber können Abbauprodukte entstehen, die andere Eigenschaften als der Ursprungstoff haben
- Hepatotoxizität ist der häufigste Grund dafür, dass Medikamente vom Markt genommen werden oder in den klinischen Studien versagen

Probleme in präklinischen Bewertung von Medikamenten:

- Ergebnisse von Tierversuchen nicht uneingeschränkt auf den Menschen übertragbar
- Bisherige humane *in vitro* Testsysteme meist nur über Stunden oder Tage einsetzbar

Humane *in vitro* Lebermodelle/Testsysteme

Humane CYP und UGT Supersomen

Humane Lebermikrosomen

Humanes Leber Cytosol

Humane Leber S9 Fraktion

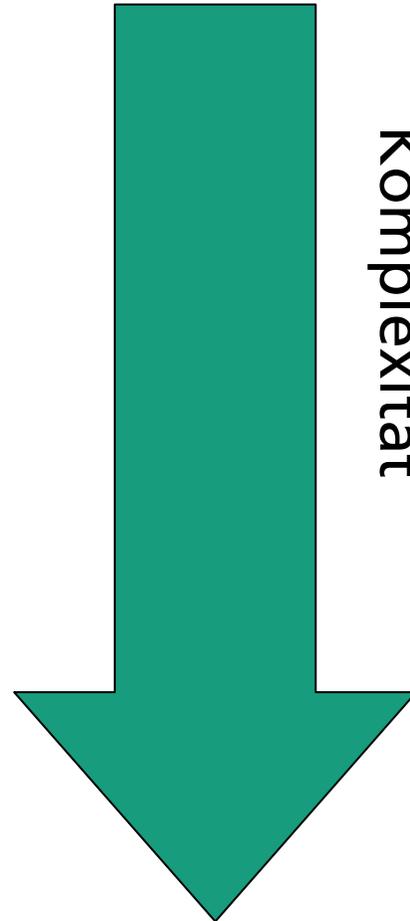
Humane Leberzelllinien

Transgene Zelllinien

Primäre Hepatozyten

Leberschnitte

Isolierte perfundierte Leber



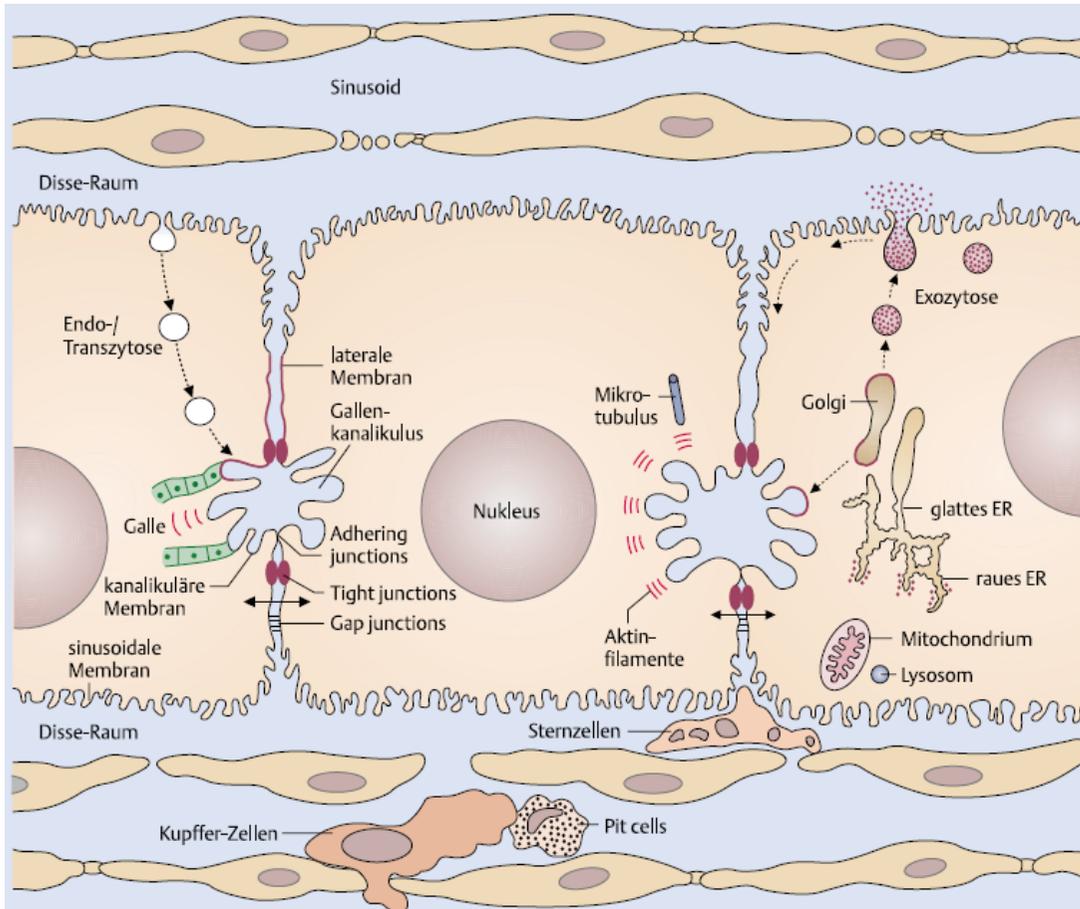
Gut für Studien von
Metabolismus-
mechanismen

Schneller Vitalitäts-
und Funktionsverlust
der Hepatozyten

Aber:

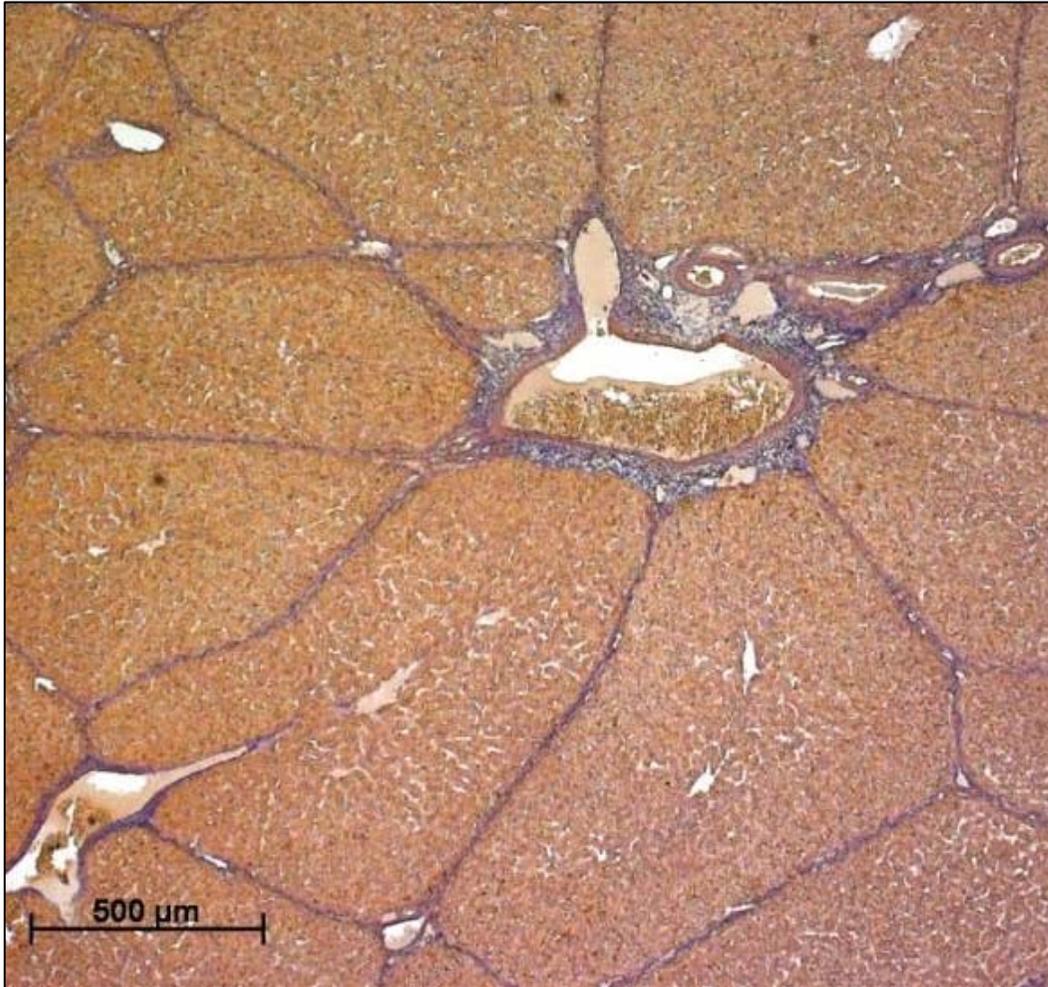
Kein komplexes
organoides
Testsystem für
Langzeitstudien

Mikroumgebung der Hepatozyten *in vivo*



- Optimale Versorgung durch direkte Assoziation mit Sinusoiden
- Co-Kultur mit nicht-parenchymalen Zellen der Leber
- Extrazelluläre Matrix Komponenten
- Polarisierung/ 3D Kultur
- Mechanische Stimuli

Mikroumgebung der Hepatozyten *in vivo*

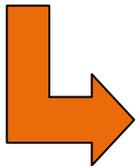


- Optimale Versorgung durch direkte Assoziation mit Sinusoiden
- Co-Kultur mit nicht-parenchymalen Zellen der Leber
- Extrazelluläre Matrix Komponenten
- Polarisierung/ 3D Kultur
- Mechanische Stimuli

Ladewigfärbung- Zellkerne braun, Plasma rosa, Bindegewebe blau

Perfusionsbioreaktoren

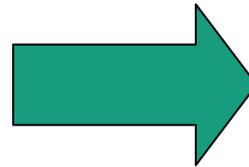
- Hohlfaserreaktoren (z.B. Modular Extracorporeal Liver Support MELS von der Charité Berlin)
- Membranreaktoren
- Perfundierte Trägerstrukturen
- Suspensionskulturen eingekapselter Zellen



Optimierte Zellversorgung
Verlängerung der Kultivierungszeit

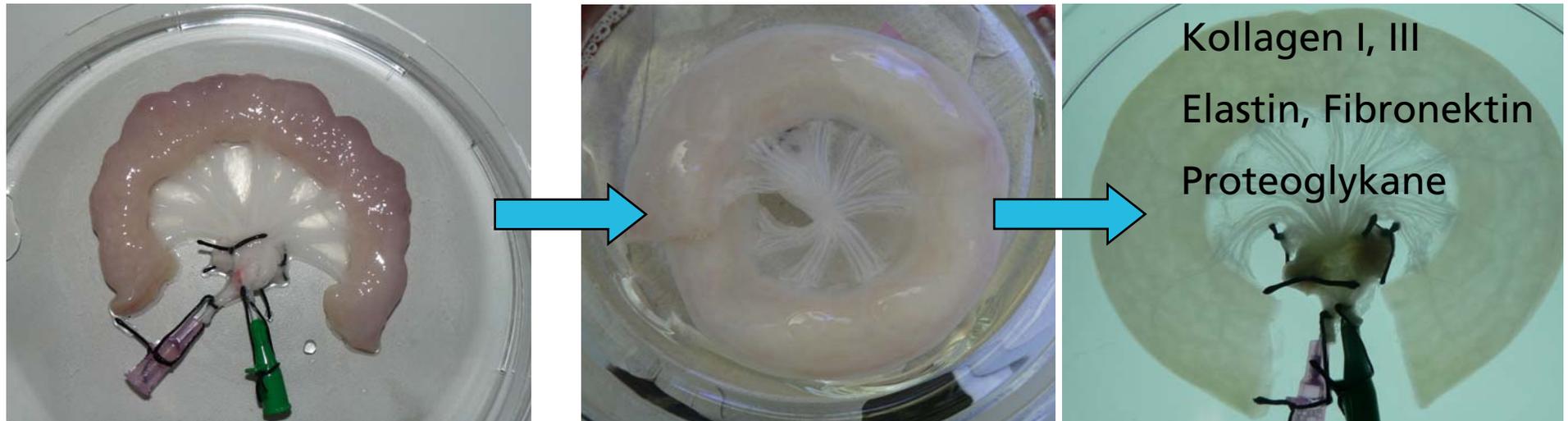
Weniger komplex als
Blutgefäßsystem

Idee der Biologischen Vaskularisierten Trägerstruktur (BioVaSc)



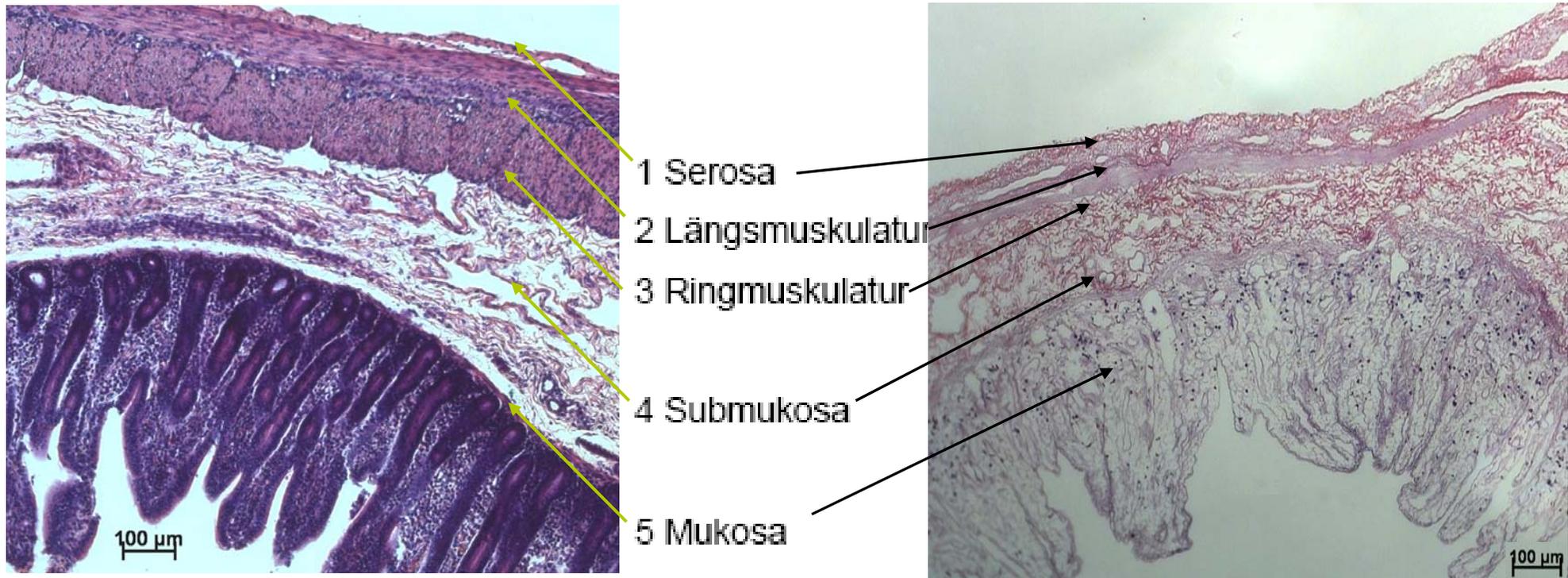
Verwendung einer natürlichen Matrix mit Blutgefäßsystem aus porcinen Jejunum für den Aufbau von vaskularisierten Gewebemodellen

Herstellung der BioVaSc (Biological Vascularised Scaffold)



- Perfusion mit Tensidlösung über das Gefäßsystem und durch das Darmlumen
- Behandlung mit DNase
- Spülung mit Kochsalzlösung
- γ - Bestrahlung

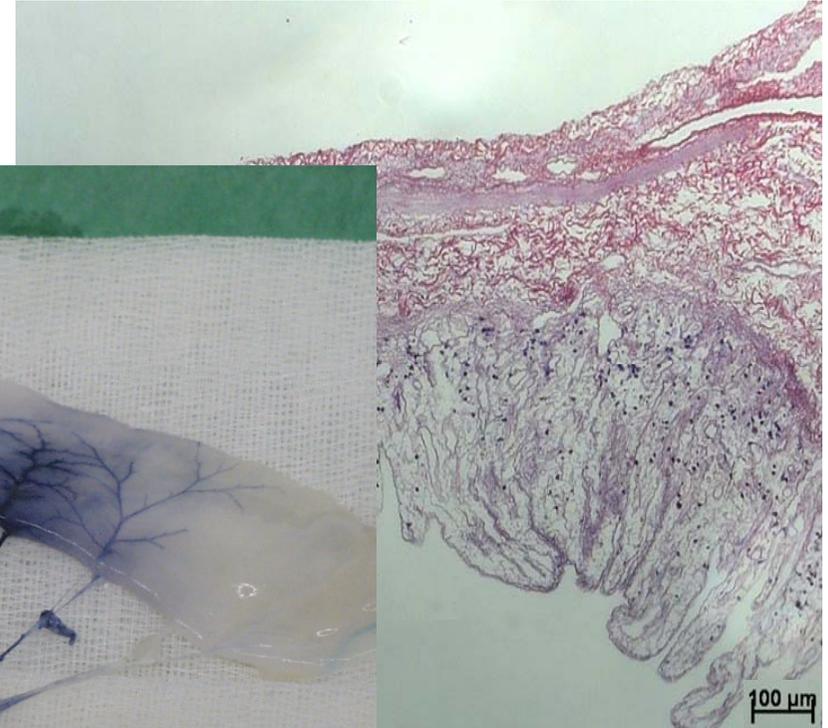
Histologische Überprüfung der Azellularisierung



Histologische Analyse Hämalaun-Eosin und
Feulgen Färbung

Verifikation durch Bestimmung der Rest-DNS

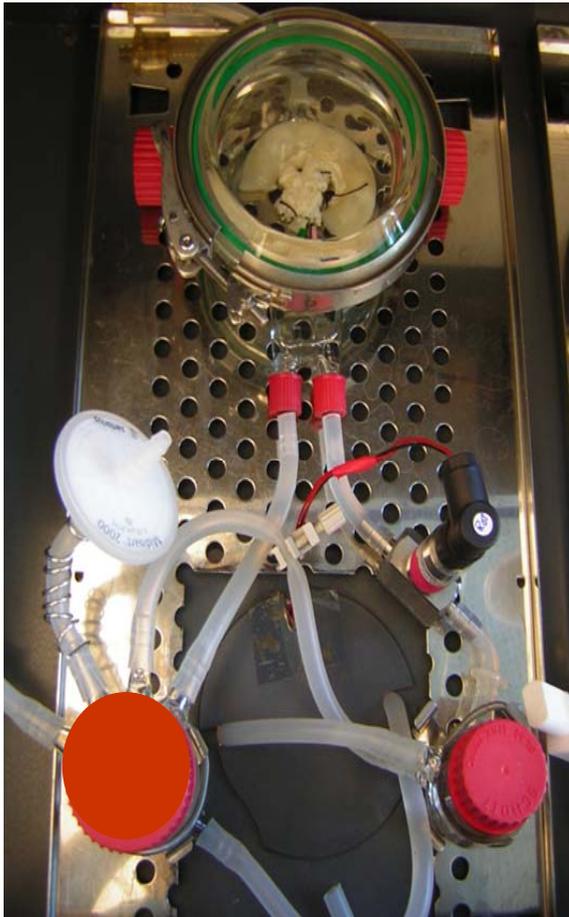
Histologische Überprüfung der Azellularisierung



Histologische Analyse Hä
Feulgen Färbung

Verifikation durch Bestimmung der Rest-DNS

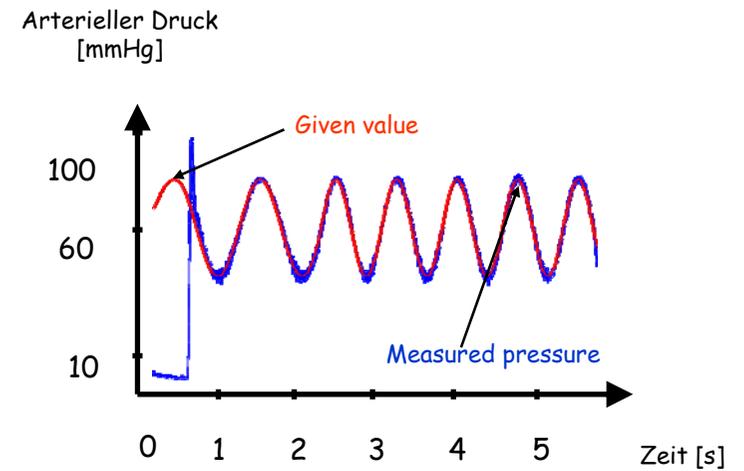
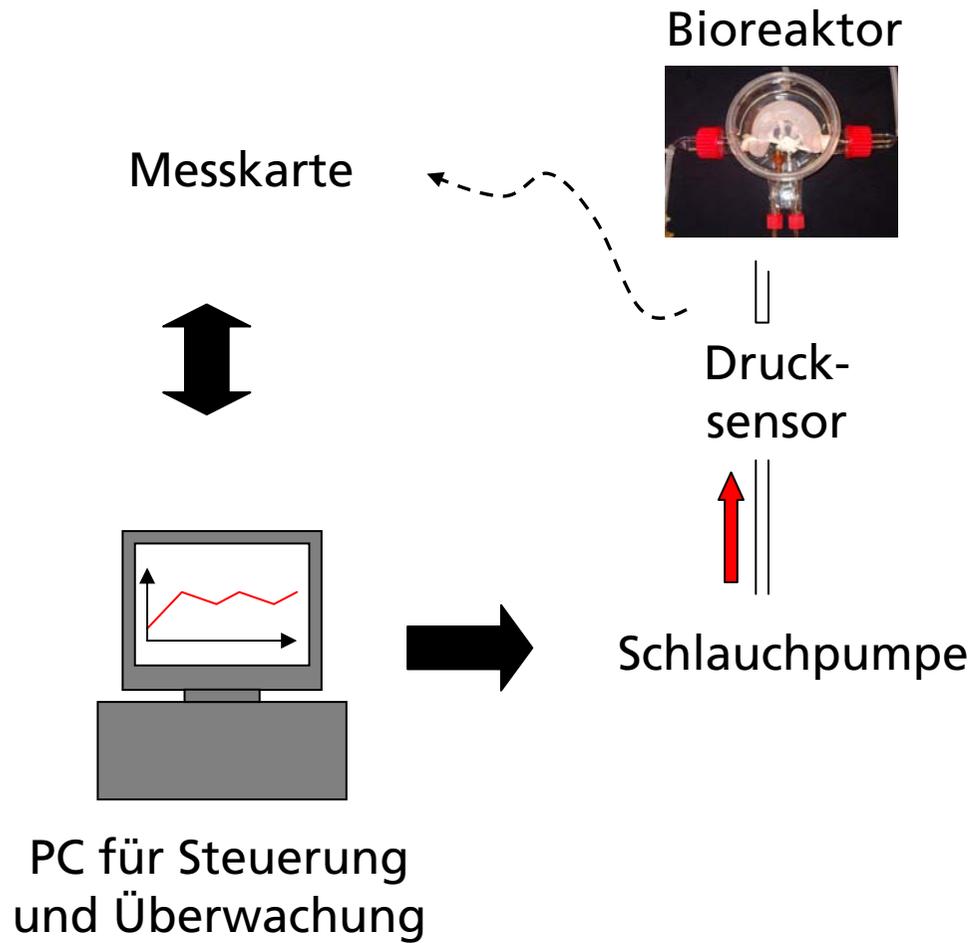
Bioreaktorsystem für die Kultivierung vaskularisierter Gewebe



Jan Hansmann
Hugo Geiger Preis 2006
Lewa Preis 2006

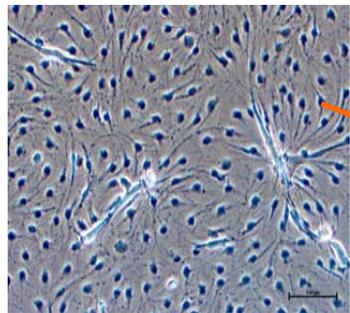
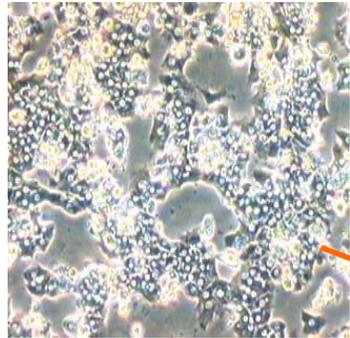


Regelung Bioreaktorsystem



Aufbau des Lebermodell mit Blutgefäßsystem

Primäre Zellen



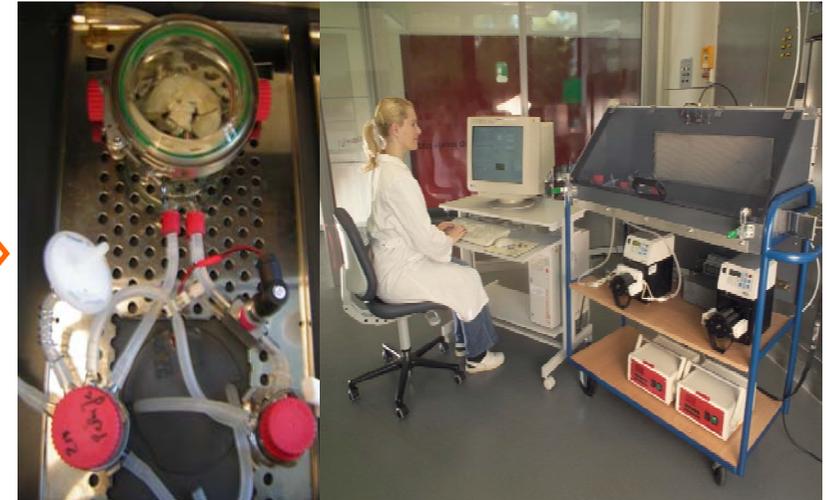
Isolation + 2 D Kultur

Biologische vaskularisierte Trägerstruktur



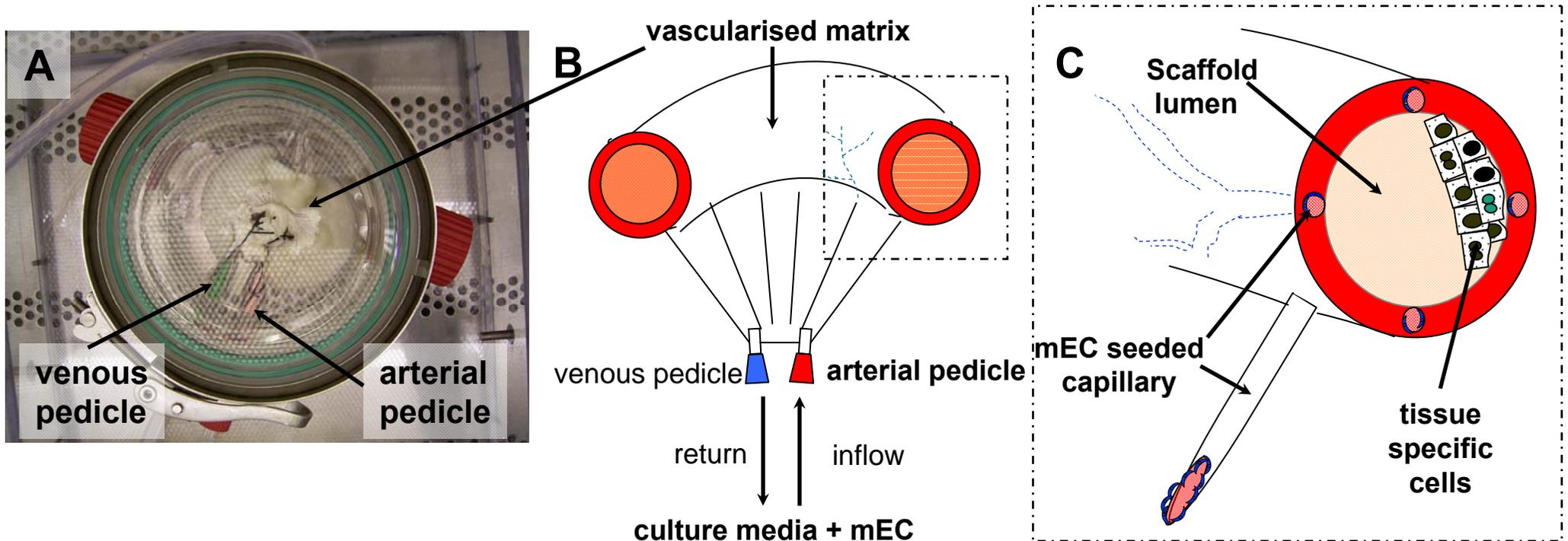
Besiedelung

PC-gesteuertes Bioreaktorsystem



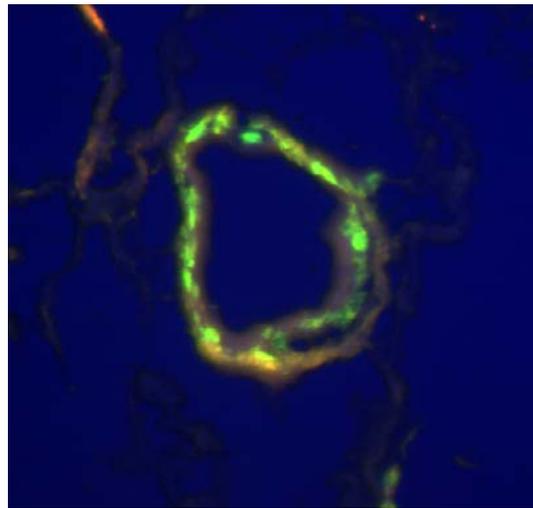
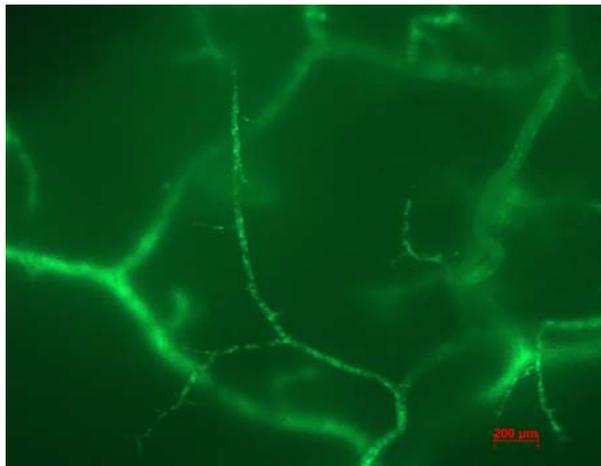
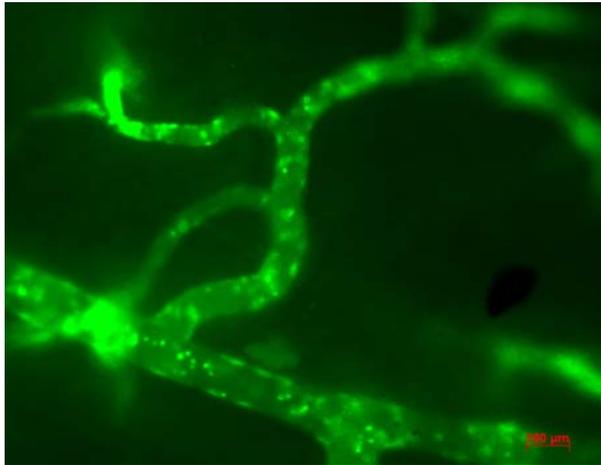
Dynamische 3 D Co-Kultur

Prinzip der vaskularisierten 3D Gewebemodelle



Fraunhofer „Technik für den Menschen“ Preis 2009

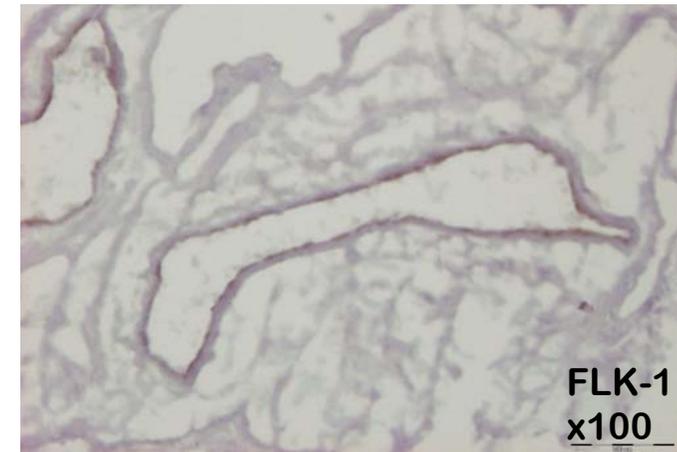
Besiedelung der vaskulären Strukturen



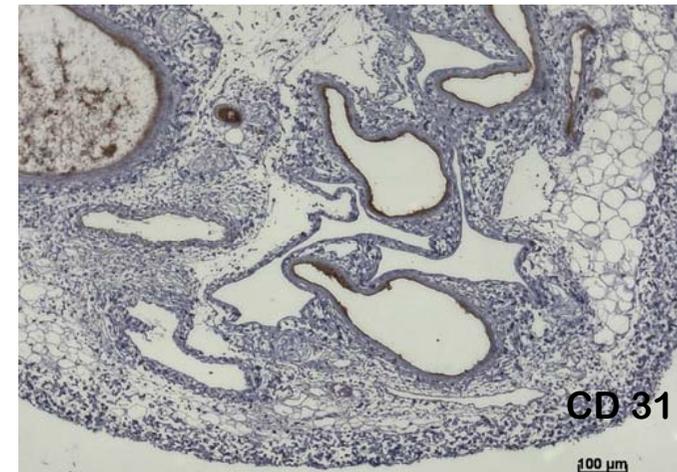
Life-dead Färbung eines Blutgefäßquerschnittes

Verifikation

- RT-PCR
- Western Blot
- FDG PET



FLK-1
x100

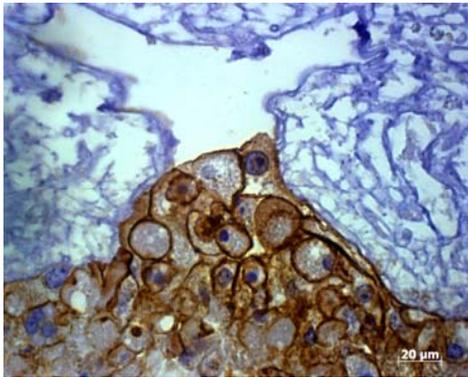


CD 31
100 μm

■ Biomaterials 2005; 26: 6610-6617

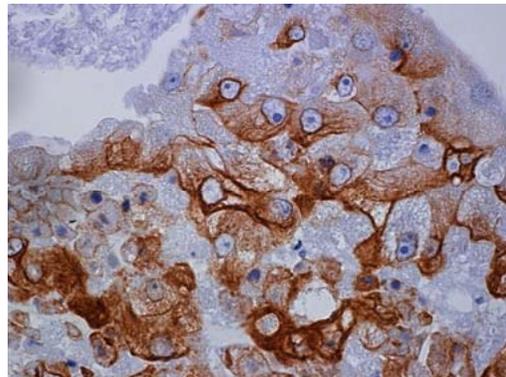
Besiedelung des Darmlumens

Pan Cadherin



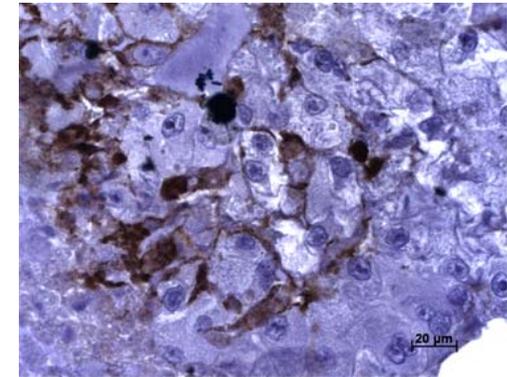
X630 Amplification

Anti-CKLP34



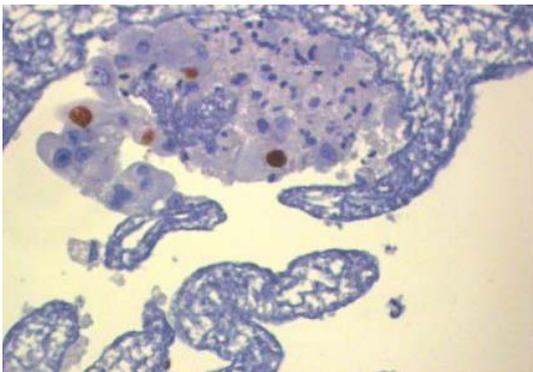
X 630 Amplification

Anti VEGF



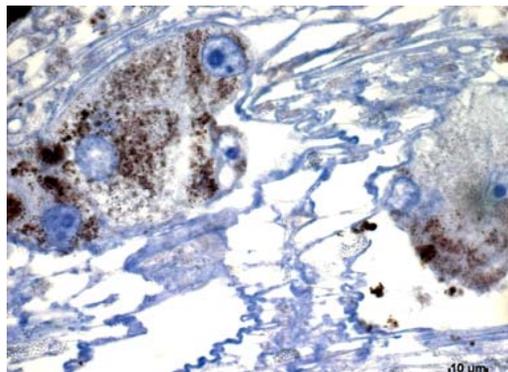
X 630 Amplification

Anti-Ki67 (MIB-1)



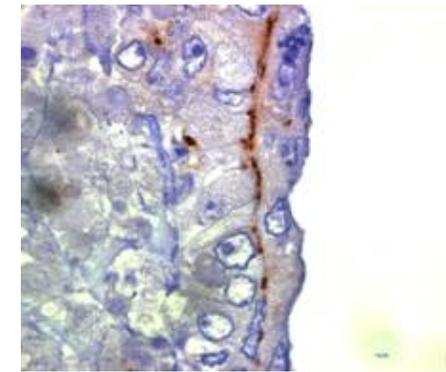
X400 Amplification

Anti-Hepatozyte



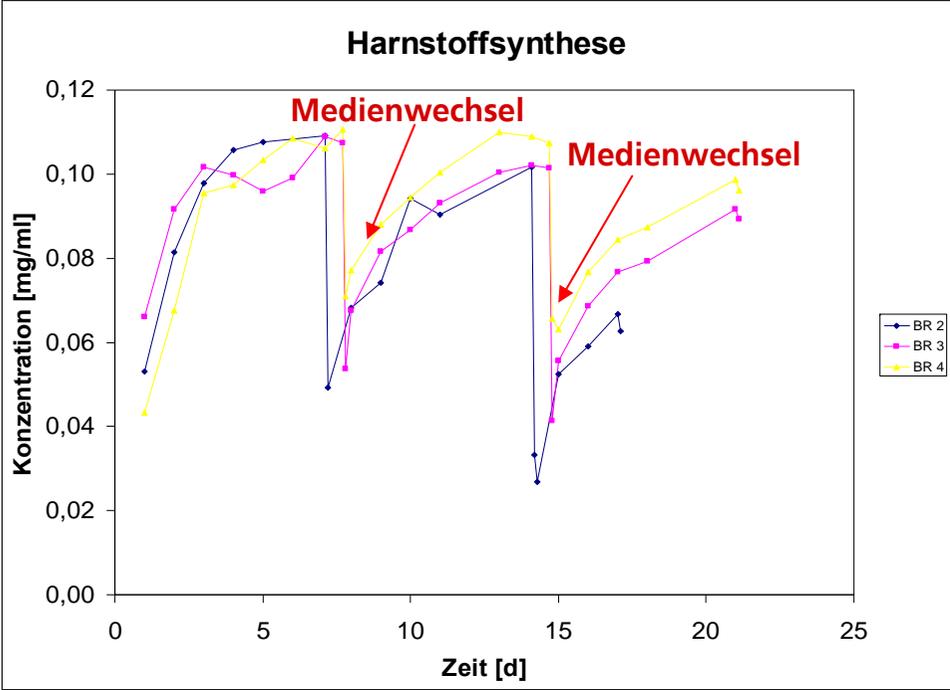
X1000 Amplification

Anti-ZO-1

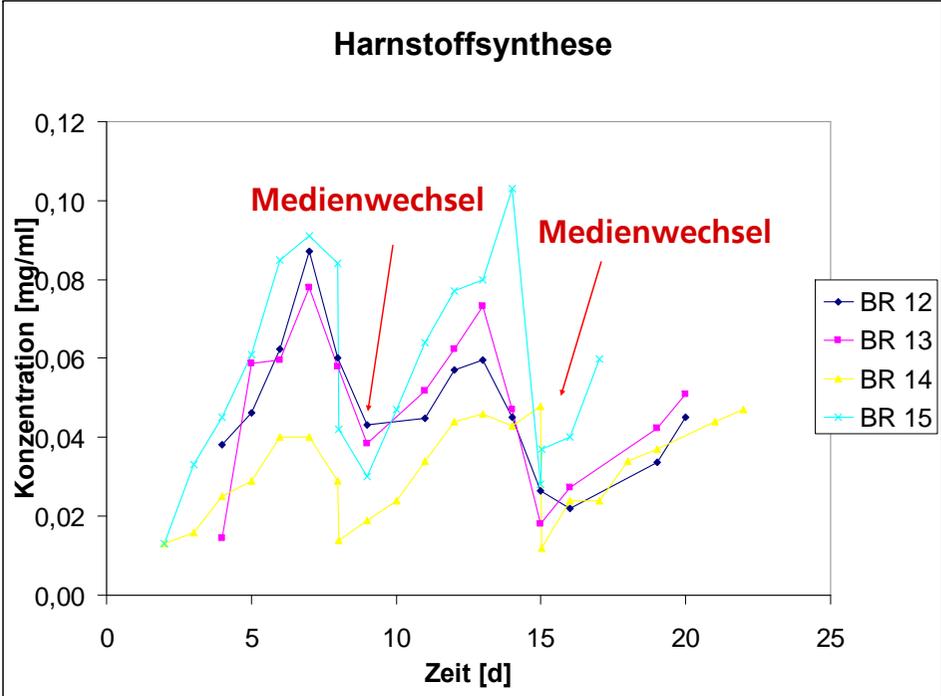


X630 Amplification

Funktionsnachweise

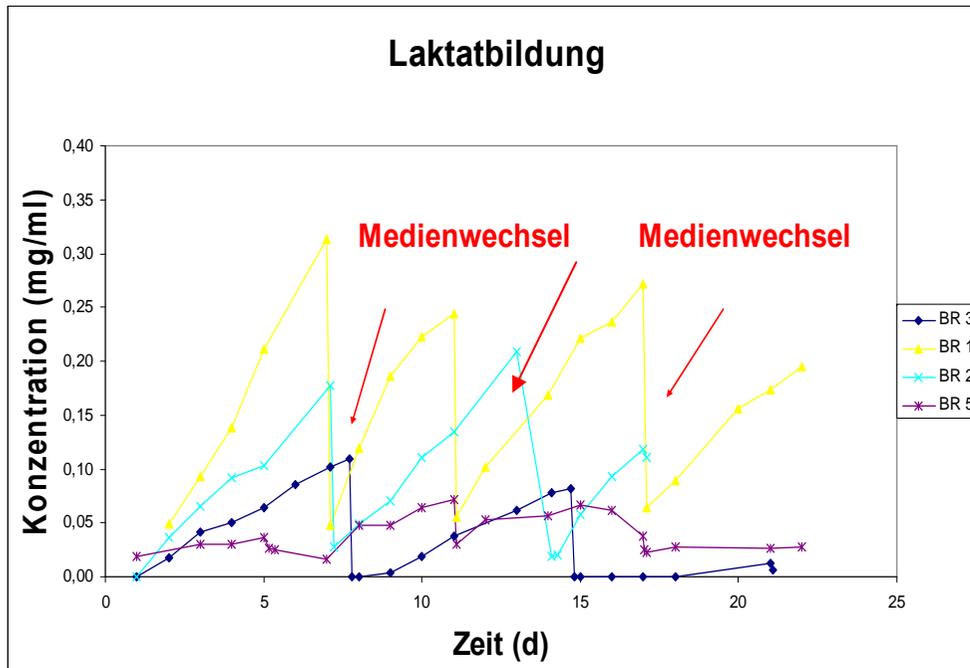


Schweinmodell

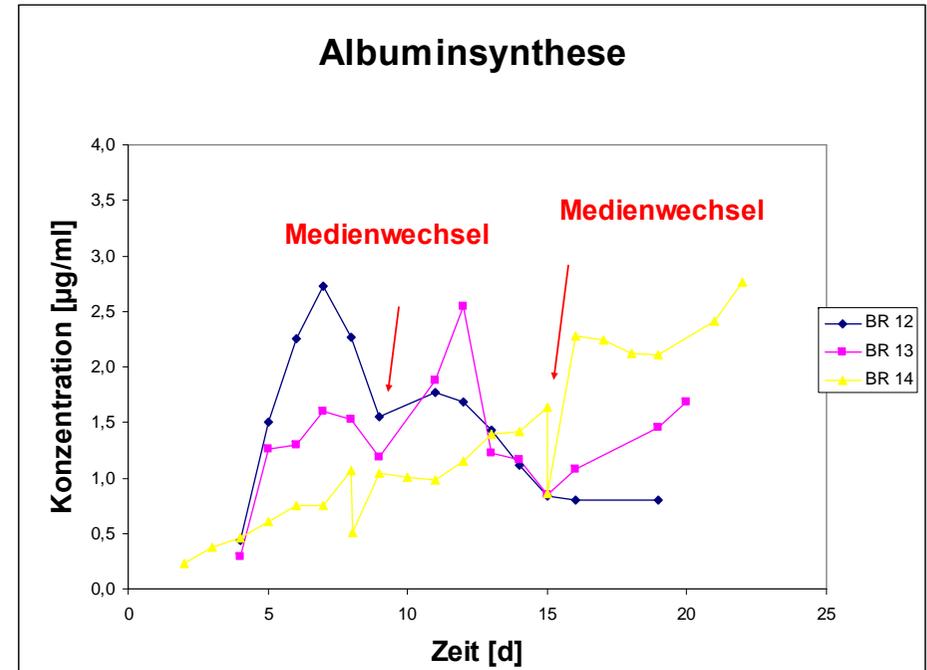


Humanmodell

Funktionsnachweise



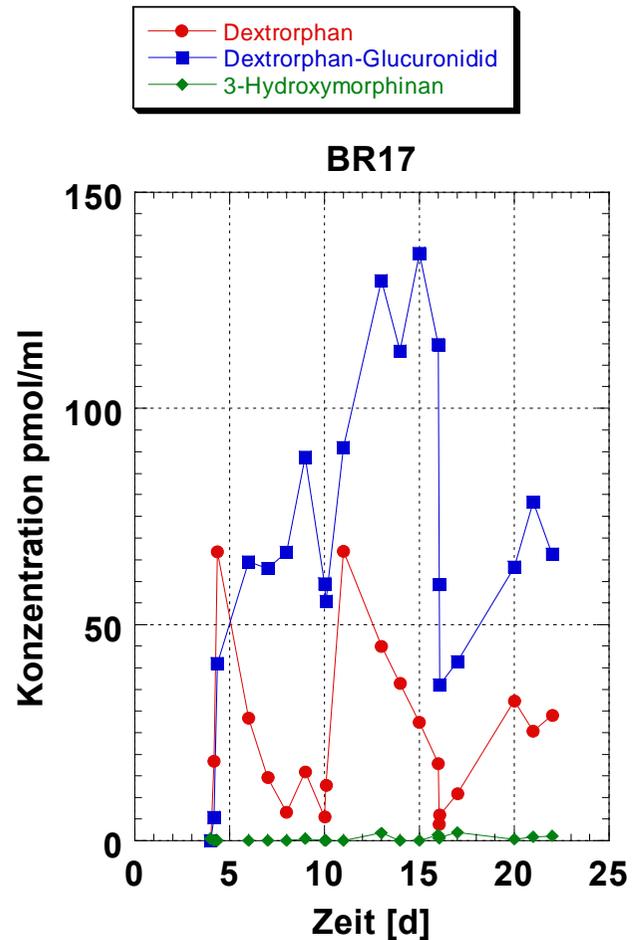
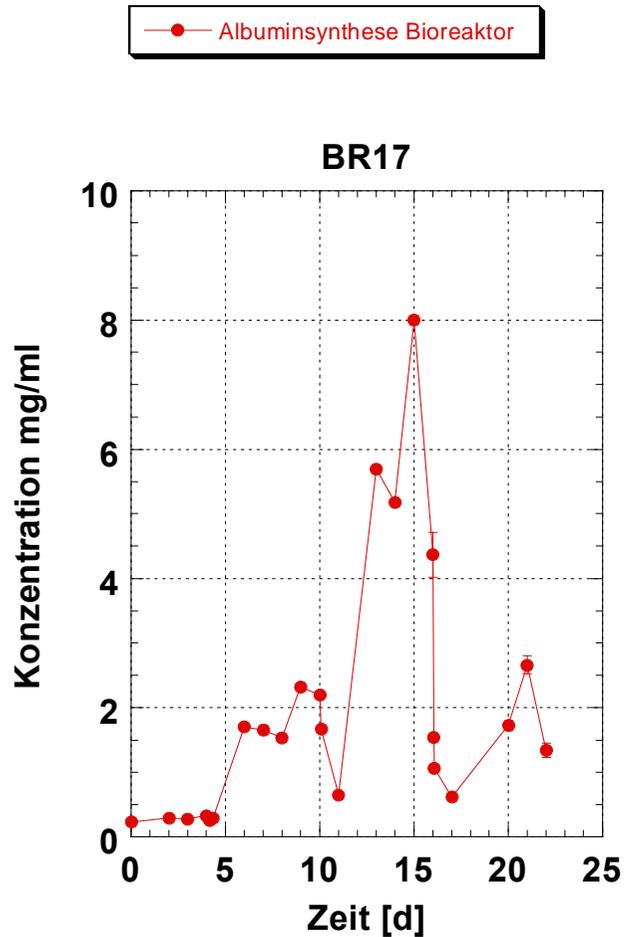
Schweinemodell



Humanmodell

Linke K, Schanz J, Hansmann J, Walles T, Brunner H, Mertsching H: Engineered liver-like tissue on a capillarized matrix for applied research" - Tissue Engineering 2007; 13, 1-9

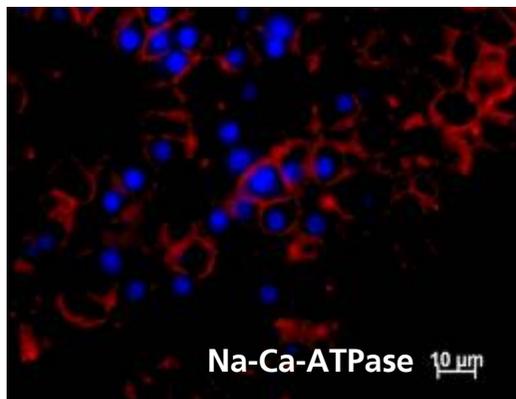
Stoffwechselaktivität des Lebermodells



Getestete Parameter:

- Laktatdehydrogenase
- AST/ALT
- Laktatbildung
- Harnstoffsynthese
- Albuminsynthese
- Gallensäureproduktion
- VEGF Expression
- Dextrometorphan Metabolismus

Lebermodell



Vaskularisierung

- mit Endothel ausgekleidete Blutgefäße

Physiologische Kultur

- Simulation des natürlichen Blutflusses

Funktionalität

- Harnstoff, Albumin, Gallensäuren und Laktat Synthese über drei Wochen
- Phase I und II Metabolismus von Dextrometorphan über drei Wochen

Potential

- Substanzapplikation über das Gefäßsystem
- Mehrfachapplikationen
- Langzeitstudien

Ausblick

- Testung verschiedener relevanter Arzneimittel (z.B. Cyclosporin, Valproinsäure, Acetaminophen, Troglitazon) und Vergleich mit Tiermodell
- Verlängerung der Kulturzeit
- Testung kryokonservierter Hepatozyten



Danksagung



dem ZS Team

Prof. Dr. Heike Walles

Dipl. Ing. (FH) Kirstin Linke

Prof. Dr. Thomas Hirth

Prof. Dr. Herwig Brunner

**Prof. Dr. Andreas Nüssler und AG
Technische Universität München**

**Dr. Martin Schenk
Eberhard Karls Universität Tübingen**

Prof. Dr. Armin Wolf

**Prof. Dr. Peter End
Novartis Pharma AG**