

Bio-materialien

Lasergestützte Hochleistungsmikroskopie in der Regenerativen Medizin

Die demografische Entwicklung stellt weltweit enorme

Herausforderungen an die Gesundheitsforschung.

Das bedeutet, dass zukünftig immer mehr und

vor allem ältere Menschen auf Hilfe angewiesen sind,

die u. a. die Medizintechnik erbringen muss.

Um diesen Anforderungen auch in Zukunft gerecht werden zu können, wird insbesondere in diesem Technologiebereich sehr intensiv an weiteren Fortschritten gearbeitet, um für einen immer größeren Kreis von Behandlungsbedürftigen nach Unfall, Krankheit oder altersbedingter Funktionseinschränkung immer bessere Lösungen bereitzustellen. Da es für lebensrettende Organtransplantationen immer häufiger an menschlichen Ersatzorganen fehlt, kommt den Bemühungen um die Entwicklung künstlicher Organe und Gewebe ebenso eine vorrangige Bedeutung zu. Zell-, Gewebe- und Organkulturen sind heute für die biomedizinische und klinische Forschung unverzichtbar geworden. Diese Entwicklung geht einher mit der Feststellung, dass verloren gegangene oder unfall- bzw. krankheitsbedingt eingeschränkte Körper- oder Organfunktionen in Zukunft nicht mehr durch alloplastische Materialien allein substituiert werden, sondern dass man mehr und mehr versucht, auf der Basis von körpereigenen Zellen funktionelle Gewebestrukturen ex vivo zu kultivieren, um diese dann im Sinne eines Implantates oder Regenerationsgewebes als neue Therapieform einzusetzen.

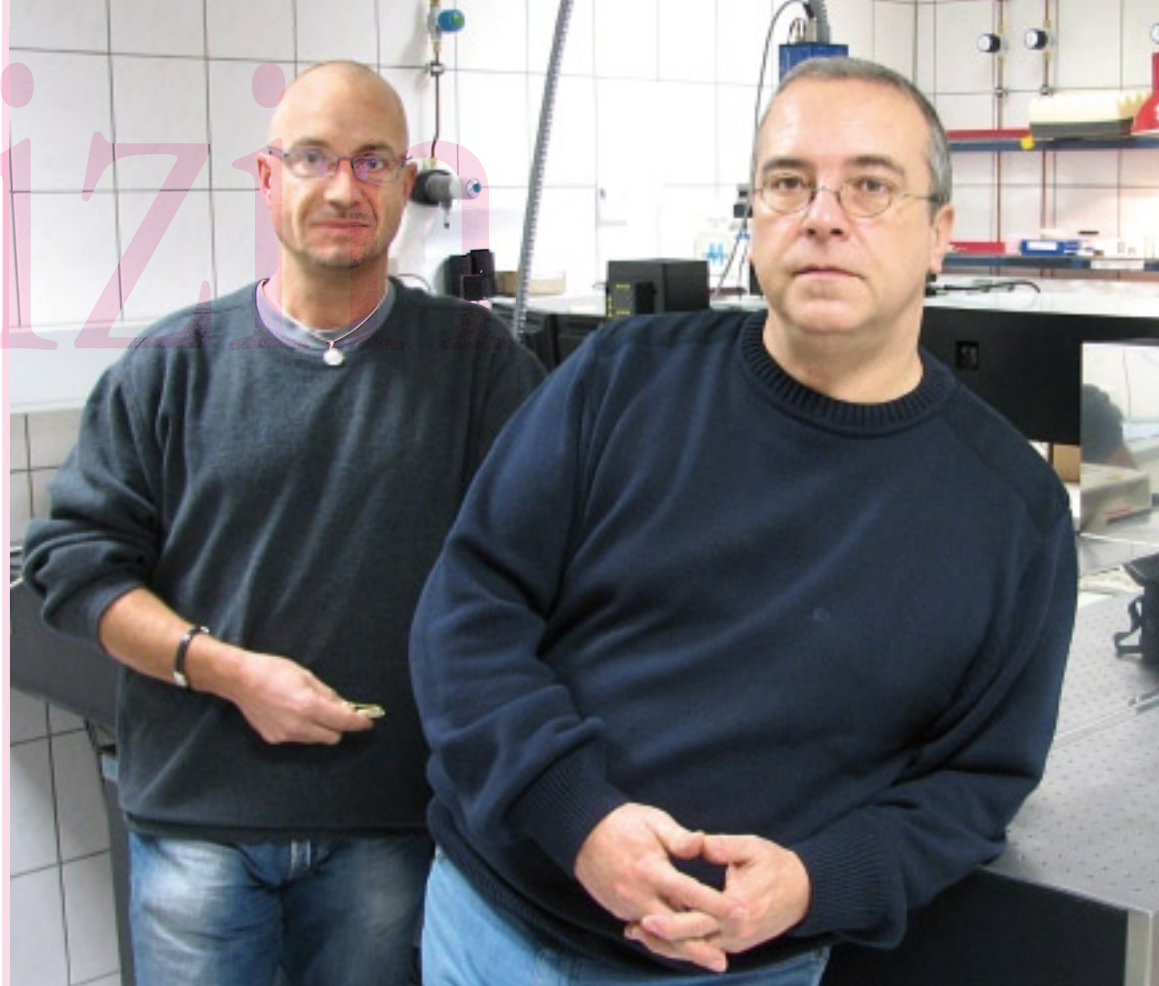
Dem gegenwärtigen Stand der Wissenschaft entsprechend ist jedoch davon auszugehen, dass in vitro hergestellte, künstliche Gewebe noch nicht die erforderliche gewebespezifische Qualität aufweisen oder aber funktionelle Eigenschaften derartiger Gewebe mit der Zeit wieder verloren gehen. Ein Grund für diese Probleme ist der Umstand, dass relativ wenig über die Entwicklungsmechanismen in den verschiedenen funktionellen Geweben bekannt ist. In jüngster Zeit wird versucht, molekularbiologische und biomechanische Ansätze zu formulieren, um die spezifische Entwicklungsphysiologie der funktionellen Gewebe einschließlich des Prozesses der Zelldifferenzierung besser zu verstehen. So werden jedes Jahr in Deutschland etwa 170.000 Knieschädi-

gungen festgestellt und 130.000 Arthroskopien durchgeführt. Ein wesentlicher Grund hierfür sind Gelenkknorpeldefekte, die oftmals zur Entstehung von Osteoarthrosen führen. Für die Therapie von Knorpelschäden werden in zunehmendem Maße Produkte des Tissue Engineerings eingesetzt. Das Verfahren der Matrix-gekoppelten Autologen Chondrozyten Implantation (MACI[®]) stützt sich dabei auf die präimplantative Kultivierung von Chondrozyten auf Kollagen I/III-Trägern mit anschließender Implantation der zellbewachsenen Kollagenträger in den Knorpeldefekt.

Unter den heute verfügbaren Techniken, mit denen man zelluläre und supra- bzw. subzelluläre Strukturen und Wechselwirkungen zwischen Zellen oder Zellen und potenziellen Scaffoldwerkstoffen verfolgen kann, haben die optischen Technologien das größte Potenzial die Tiefe einer lebenden Zelle mit Sub-Mikrometer-Auflösung analysieren zu können, ohne deren Vitalität nachhaltig einzuschränken.

Vor allem ist hier die Multiphotonen-Mikroskopie exemplarisch zu nennen, die aufgrund der zunehmenden Verbreitung des modengekoppelten Titan-Saphir-Lasers in die Lasermikroskopie Eingang gefunden hat. Aufgrund des nicht-linearen Multiphotonen-Effektes, bei dem ein räumlich eng begrenzter Fokus wie eine 3D-Sonde durch die Probe hindurchgerastert wird, um ein 3D-Bild zu erstellen, wird eine sehr hohe Ortsauflösung erzielt, d. h. die generierten 3D-Bilder haben eine größere Informationstiefe und mehr Details der lebenden, biologischen Proben werden sichtbar. Von besonderer Bedeutung ist das z. B. für die nicht-invasive Kontrolle des präimplantativen Kultivierungsprozesses bei der MACI[®]-Technik hinsichtlich Zellzahl, Zellwachstum und Zellverteilung, die anders nicht bzw. nur sehr eingeschränkt möglich ist.

Durch die laserrasternde Mikroskopie können dreidimensionale Strukturinformationen in nativen, ungefärbten MACI[®]-



Dr. Klaus Liefeth (rechts) und Dr. Ronald Schade

Dr. Klaus Liefeth studierte Mechanik und Materialwissenschaften an der Friedrich-Schiller-Universität Jena. Er ist seit 1992 als verantwortlicher Leiter des Fachbereiches für Biomaterialforschung am Institut für Bioprozess- und Analysenmesstechnik e.V. in Heiligenstadt tätig.

Herr Dr. Ronald Schade ist Mikrobiologe und arbeitet als Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Fachbereich für Biowerkstoffe am iba, wo er für das Themengebiet Lasermikroskopie verantwortlich ist.

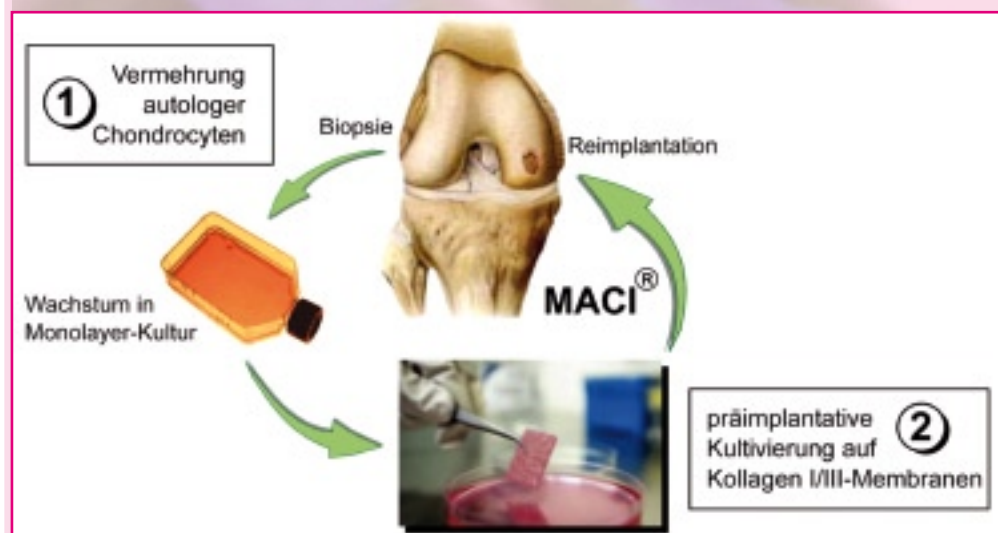


Abb. 1: Schema der Matrix-gekoppelten Autologen Chondrozyten Implantation (MACI[®])



Abb. 2: TPLSM-Setup im iba Heiligenstadt e.V.

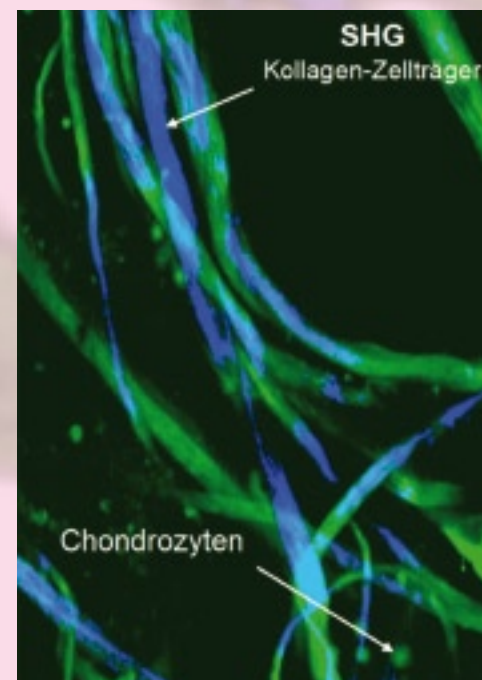


Abb. 3: Autofluoreszenz grün und SHG blau von Chondrozyten und Vlies-Kollagen-Zellträgern nach 2P-Anregung

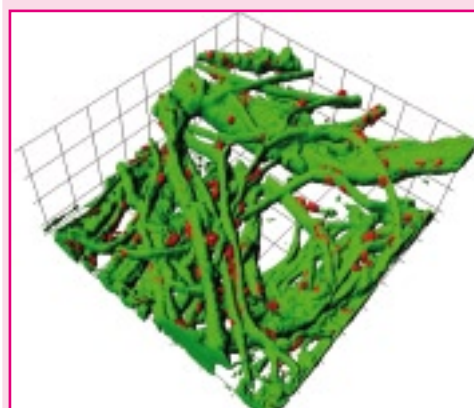


Abb. 4: Chondrozyten auf Schwamm-Kollagen-Zellträgern [spectral unmixed Autofluoreszenz-Signale nach 2P-Anregung, Falschfarben-Zuweisung: grün: Zellträger, rot Chondrozyten; Universität Bielefeld]

Über das Institut

Das Institut für Bioprocess- und Analysenmesstechnik e.V. (iba) wurde 1992 als außeruniversitäre Forschungseinrichtung des Freistaates Thüringen gegründet. Das wissenschaftliche Profil wird mit „Biotechniques at Interfaces“ definiert. Es macht deutlich, dass das iba anwendungsorientiert vorrangig solche Forschungsthemen bearbeitet, die auf technische Systeme abzielen, mit deren Hilfe eine Anwendung von Ergebnissen der Grundlagenforschung der Naturwissenschaften in den Life Sciences auf der Basis der Untersuchung und Veränderung von biologischen Funktionsflächen zwischen biologischer und technischer Komponente dieser Systeme möglich ist.

Die Bearbeitung der Forschungsaufgaben erfolgt in den drei Fachbereichen Analysenmesstechnik, Bioprosesstechnik und Biowerkstoffe. Diese Expertise wird unterstützt durch langjährige Erfahrungen bei der Entwicklung von in vitro-Testsystemen und der Applikation numerischer Simulationsverfahren sowie biologischer Designoptimierungsroutinen.

Wie funktioniert die Zweiphotonenmikroskopie?

Die Zweiphotonen – oder Multiphotonenmikroskopie (engl. Two-Photon Laser Scanning Microscopy – TPLSM) ermöglicht ähnlich der konfokalen Mikroskopie Schichtaufnahmen biologischer Präparate. Es handelt sich dabei um ein Rastermikroskopieverfahren, bei dem die emittierte Fluoreszenz spezifischer Zielmoleküle (Fluorochrome) durch mehrere gleichzeitig einfallende Lichtquanten erzeugt wird. Das Besondere dabei ist, dass die zu detektierende Fluoreszenz bei deutlich kleineren Wellenlängen (UV-Bereich) liegt als die anregende, deutlich größere Wellenlänge (NIR-Bereich). Bei der Zwei-Photonen-Mikroskopie wird dementsprechend eine Anregungswellenlänge verwendet, die in etwa doppelt so groß ist, wie die emittierte Fluoreszenzwellenlänge. Dieser Zweiphotoneneffekt tritt nur innerhalb eines sehr kleinen Volumens (Laserfokus) auf und ermöglicht so eine hohe Ortsauflösung unter Verzicht auf einen Pinhole. Die langwellige Anregungsstrahlung erlaubt darüber hinaus die Nutzung größerer Eindringtiefen und eine deutliche Reduzierung von unerwünschten, photochemisch-induzierten Schäden an den zu untersuchenden Präparaten.

Konstrukten gewonnen werden. Durch die Anwendung von Femtosekunden-Laserpulsen im NIR-Bereich zur Zweiphotonenanregung und Second Harmonic Generation (SHG) ist die mikroskopische Darstellung von stark streuenden zellbewachsenen Kollagen-Membranen mit einer hohen Tiefenauflösung möglich. Die selektive Darstellung von Chondrozyten und Kollagen I/III-Zellträgermaterialien kann anhand a) der nativen Fluoreszenz-Emissionsspektren und b) der SHG-Signale der Kollagen-Träger erfolgen.

Derartige Ergebnisse zeigen eindrucksvoll, dass der Biomedizin und Biotechnologie mit der Multiphotonenanregung durch fs-Laserpulse neue methodische Möglichkeiten zur Verfügung stehen, die gegenwärtig von keinem anderen Detektionsverfahren erreicht werden können. Im Bereich des Knorpelgewebe-Tissue-Engineerings stellen diese Detektionsmöglichkeiten die Ausgangsbasis für die Online-Kontrolle der Zellkultivierung dar und können gleichfalls zur nicht-invasiven Bestimmung der Zahl an Chondro-

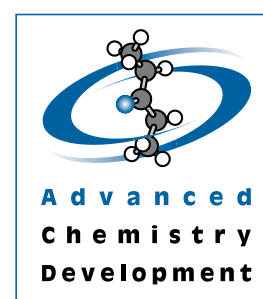
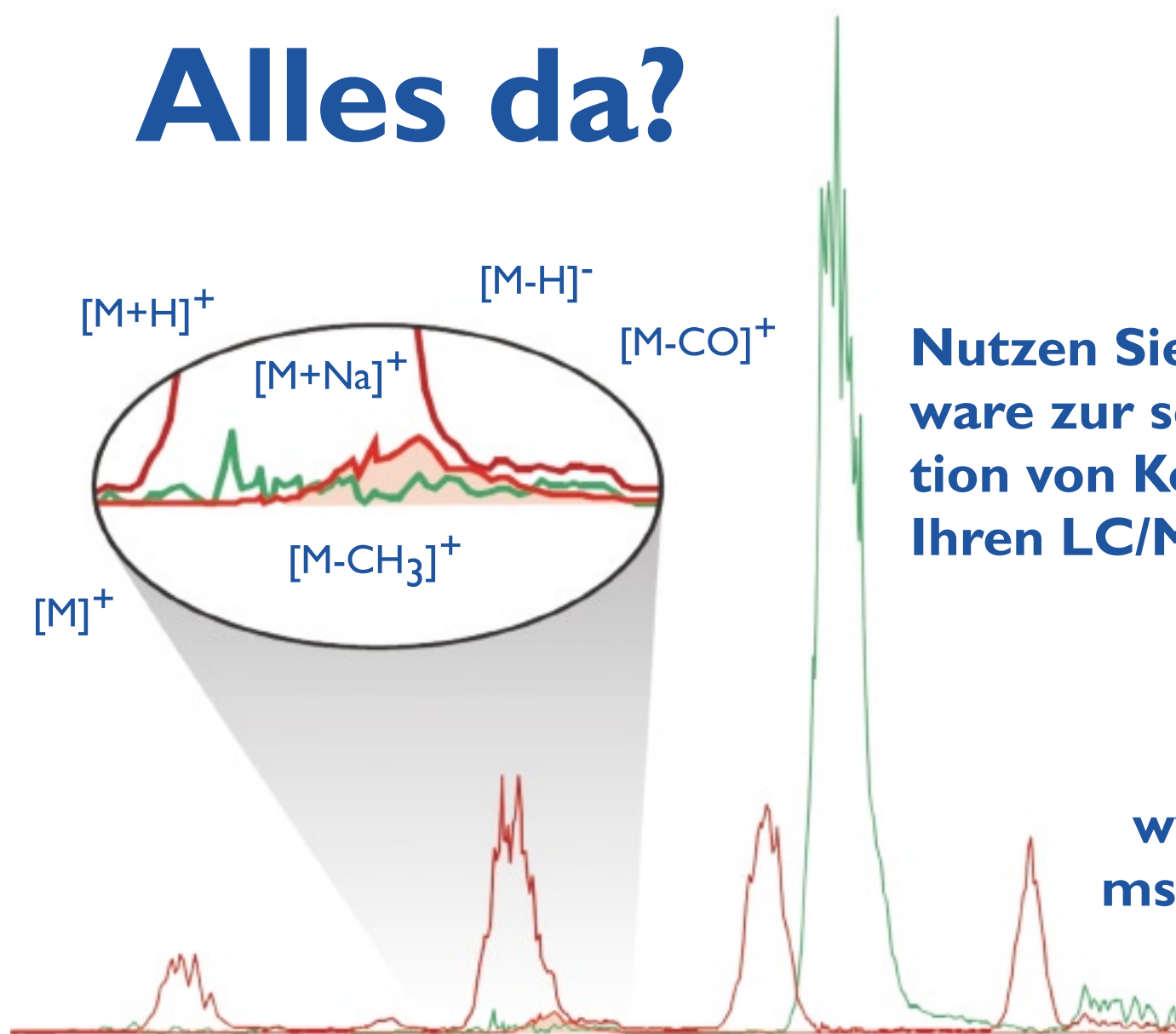
zyten in Knorpelbiopsien im Sinne einer Qualitätskontrolle für das Tissue Engineering eingesetzt werden.

Die Multiphotonentechnik besitzt somit als ein nicht-invasives optisches Verfahren ein hohes Potenzial für Anwendungen in der Biotechnologie, Zellbiologie und in der Medizin.

Diese Forschungsarbeiten werden im Rahmen der BMBF-Forschungsinitiative „Biophotonik I“ (FKZ 13N8432, 13N8434, 13N8435) gefördert.

→ Klaus.Liefeith@iba-heiligenstadt.de

Alles da?



Nutzen Sie intelligente Software zur schnellen Extraktion von Komponenten aus Ihren LC/MS Spektren!

**Neugierig?
Testen Sie uns!
www.intellixtract.de
ms@scienceserve.com**

Besuchen Sie uns auf einer der folgenden Tagungen/Messen:

