

Abstract: A new field in the biomedical science has been established. Cell biologists, engineers and surgeons work within a team. The experiments focus on tissue engineering. Artificial connective, epithelial or neuronal tissues are constructed using living cells and different kinds of biomatrices. Numerous companies and laboratories show a starting dynamic of development in this field. Prognoses tell that at the begin of the coming century the industry of tissue engineering will reach the importance of the present gen technology. An enormous demand on organ and tissue transplants for the body motivates for research and acquires innovative techniques and creative solutions. At the front of this development is the creation of artificial skin for severely burned patients and the generation of artificial cartilage for implantation in articular joint diseases. Future challenges are the construction of liver organoids and the development of an artificial kidney on the basis of cul-

tured cells. We present needs, tools and equipment for tissue engineering. The base are tissue holder sets. For optimal adherence and differentiation of engineered tissues an individual support is selected and placed between a holder ring and a span ring. After autoclaving the tissue holder sets are transferred to different kinds of containers, which are permanently perfused with fresh culture media. It guarantees a constant nutrition of the developing tissue and prevents the accumulation of harmful metabolic products. An organo-typical environment for epithelial cells is obtained in newly developed gradient containers, which are permanently perfused at the apical and basal sides with different media. The system runs with a simple peristaltic pump and a warming plate with pH-stabilized media outside the atmosphere of an CO₂-incubator for weeks and months. The long term experiments result in an up to now unknown quality of cultured tissues.

Tissue engineering – Herstellung von künstlichen Geweben für die Biomedizin

Will W. Minuth, Michael Sittinger*, Sabine Kloth
Institut für Anatomie, Universität Regensburg

* Universitätsklinikum Charité, Zentrum für Innere Medizin, Humboldt Universität Berlin

Ein neues Wissenschaftsfeld etabliert sich innerhalb der Biomedizin. Zellbiologen, Bioingenieure und Chirurgen arbeiten in einem Team. Im Focus steht das *Tissue engineering*, bei dem künstliche Binde- und Epithelgewebe, sowie neuronale Organoiden auf der Basis von kultivierten Zellen und mit Hilfe verschiedenster Biomatrizes hergestellt werden. Eine Reihe von Firmen und zahlreiche Forschungslaboratorien sorgen für eine überraschende Dynamik bei der Forschung und im Anwendungsbereich. Wirtschaftsprognosen sagen voraus, daß bereits am Anfang des kommenden Jahrhunderts das *Tissue engineering* eine vergleichbare kommerzielle Bedeutung wie die heutige Gentechnologie erreichen wird. Ein riesiger Bedarf an „Ersatzteilen“ für den menschlichen Körper motiviert zur Forschung. Innovative Techniken und kreative Lösungen werden verlangt. Am weitesten fortgeschritten ist die Herstellung von vitalem Hautersatz für Patienten mit schweren Verbrennungen. Es folgt die Generierung von patienteneigenen Knorpel-

transplantaten bei Verletzungen bzw. Veränderungen der Gelenkoberflächen oder bei notwendigen Operationen im Hals-, Nasen- und Ohrenbereich. Zukünftige Herausforderungen sind artifizielle Leberorganoiden zur Überbrückung von Komazuständen oder die Entwicklung einer künstlichen Niere auf der Basis kultivierter Tubuluszellen für eine optimierte Dialysebehandlung. Interagierende Gewebesysteme als eine optimale Alternative zu Experimenten an Tieren sind bereits praktische Realität. Vorgestellt wird die experimentelle Durchführung einer Auswahl an aktuellen *Tissue engineering*-Experimenten. Neuartige Gewebeträger und Kulturtechniken bieten beste Voraussetzungen zur Entwicklung von komplexen Gewebe- und Organstrukturen. Dadurch eröffneten sich völlig neue Perspektiven in der Grundlagenforschung. Möglich werden dadurch auch erstmalig Langzeituntersuchungen in der Biomaterialforschung und Untersuchungen zur chronischen Intoxikation unter *in vitro* Bedingungen.

In den USA entstehen ca. 400 Mrd \$ jährliche Kosten durch Organ- und Gewebeschäden, außerdem werden etwa 30 000 Fälle an Leberversagen diagnostiziert [1]. Etwa 10 Mio Einwohner der USA leben heute schon mit Implantaten, wobei jährlich weitere ca. 140 000 Hüftprothesen eingesetzt werden. Die jährlichen Kosten für Implantate aller chirurgischen Fachrichtungen belaufen sich auf 30 Mrd \$. Für Deutschland liegen nur inoffizielle Zahlen vor. Pro Jahr werden ca. 20 000 Knieprothesen eingesetzt und mehr als 100 000 re-

levante Knorpelschäden an Gelenken sind pro Jahr karteikundig. Bei Knorpelschäden des Hüftgelenkes werden Prothesen aus Metall verwendet. Für Blutgefäße und harnableitende Strukturen dienen Implantate aus verschiedensten Kunststoffen [2]. Da es sich dabei um körperfremde Materialien handelt, sind Entzündungserscheinungen und Abstoßungsreaktionen, sowie Komplikationen bei der Blutgerinnung immer wieder zu beobachten. Naheliegend ist deshalb, Implantate aus kultivierten Zellen außerhalb des Körpers herzustellen und sie dann zu im-

plantieren. Diese neue Möglichkeit eröffnet das *Tissue engineering*. Es basiert auf der Idee, patienteneigene Zellen auf geeignete Matrizes aufzubringen, ihre Vermehrung zu steuern und ihre dreidimensionale Ausbreitung zu lenken. Mit dieser Technik lassen sich somit räumlich definierte Gewebe und organoide Strukturen für die Implantation aufbauen. Solche vitalen Konstrukte entstehen in der interdisziplinären Zusammenarbeit zwischen der Biomaterialentwicklung, der Zellbiologie und der Zellkulturtechnik.

Von der Zellkultur zum Tissue engineering

Schon seit über 50 Jahren gibt es Methoden, Zellen aus tierischen oder menschlichen Gewebe- und Organteilen zu isolieren und unter Kulturbedingungen am Leben zu erhalten [3]. Meist werden die Zellen mit wachstums- oder serumhaltigen Medien in einer Kulturschale gefüttert, um eine möglichst schnelle Zellvermehrung zu erhalten. Auf diese Weise lassen sich Zellen in beliebiger Menge gewinnen. Beim Arbeiten stellt man jedoch häufig fest, daß sich die Zellen in der Kulturschale zwar vermehrt haben, viele Eigenschaften aber durch Dedifferenzierung verloren haben [4]. Isolierte Knorpelzellen bilden z.B. keine oder nur noch eine atypische Knorpelgrundsubstanz. Kultivierte Leberparenchymzellen zeigen nach ihrer Isolierung nur noch einen Bruchteil ihrer ursprünglichen Entgiftungsleistung, Darmepithel- oder Nierentubuluszellen können nicht mehr in der bekannten Weise Stoffe aufnehmen und haben wesentliche Transport- sowie Abdichtungsfunktionen verloren. Dadurch wird deutlich, daß mit der bisherigen angewandten Technik in den konventionellen Kulturgefäßen keine funktionellen Gewebe hergestellt werden können.

Strategie für das Tissue engineering

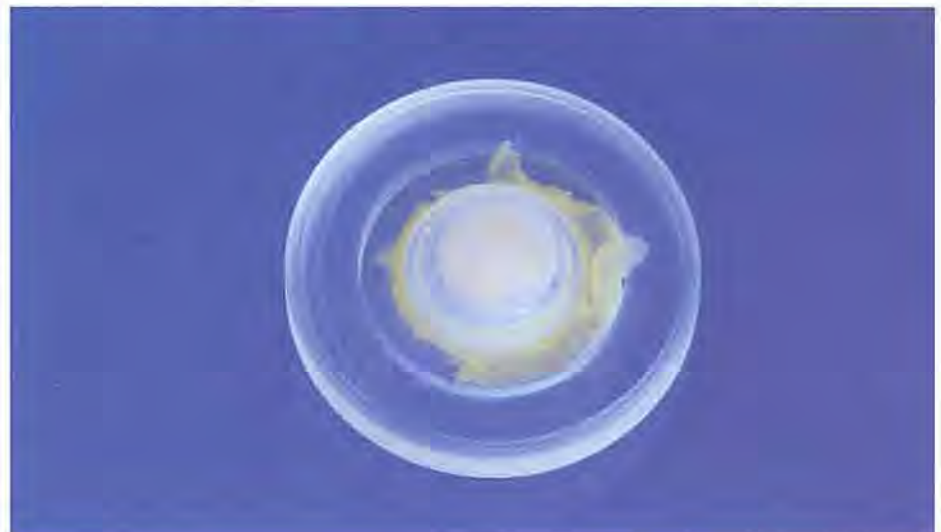
Bei der Herstellung von funktionellen Geweben muß nach unseren experimentellen Erfahrungen in drei Schritten vorgegangen werden (Tabelle 1). Im ersten Schritt erfolgt in konventionellen Kulturgefäßen eine Vermehrung der jeweils benötigten Zellen. In einem zweiten Schritt werden die amplifizierten Zellen auf eine optimalen Gewebeunterlage aufgebracht. Für eine gewebetypische Differenzierung ist eine optimale Zellverankerung die wesentliche Voraussetzung [5]. Um das Gewebe gut handhaben zu können werden die Unterlagen in einen Träger montiert (Abb. 1). Danach werden die Gewebeträger in Perfusionscontainer eingesetzt und permanent mit frischem Kulturmedium durchströmt (Abb. 2, 3). In diesen Containern läßt sich auf beliebige Weise gewebetypisches Environment simulieren.

Steuerung der Differenzierung

Das Tissue engineering für biomedizinische Anwendungen verlangt die Herstellung von Implantaten mit speziellen Eigenschaften, die im Körper wie selbstverständlich vorkommen, unter in vitro Bedingungen aber



Abb. 1 (a,b): Gewebeträger gibt es in ganz unterschiedlichen Formen und Funktionen. (a) MINUSHEET-Gewebeträger (oben) bestehen aus einem schwarzen Haltering und einem weißen Spannring. Dazwischen wird eine individuell ausgesuchte Zellunterlage mit einem Durchmesser von 13 oder 47 mm eingelegt. Durch die Wahl der Unterlage kann entschieden werden, ob die Kulturen plan oder dreidimensional expandieren sollen. Die Gewebeträger werden autoklaviert, danach die Zellen aufpipettiert. (b) Spezieller Gewebeträger, auf dem ein kleines Stück Nierengewebe aufgespannt ist (unten).



	1. Schritt	2. Schritt	3. Schritt
	Zellvermehrung	Einleitung der Differenzierung	Aufrechterhaltung der Differenzierung
Methode	Kulturschale [4]	Optimierung der Matrix [5]	Kontinuität in Perfusionscontainer [8,11,13]

Tabelle 1: Tissue engineering – in drei Schritten zur Differenzierung von kultivierten Geweben.

nur unvollständig ausgebildet werden. Der zentrale Punkt beim Tissue engineering ist deshalb die Steuerung der Differenzierung in kultiviertem Gewebe (Tabelle 2). Die Expression und der Erhalt von gewebetypischen Eigenschaften kann entscheidend durch die Zellverankerung und damit durch die Gewebeunterlage beeinflusst werden [5,6,7]. Besonders gute Erfolge erzielten wir mit einer optimalen Verankerung der Zellen auf individuell ausgesuchten Filterunterlagen, Vliesen, bioabbaubaren Polymeren oder schwammartigen Matrices [2,8,9]. Die Zellen nutzen die Filteroberfläche als zweidimensionale Wachstumsfläche, während Mikrofasern eine dreidimensionale Ausbreitung ermöglichen. Somit kann einem entstehenden Gewebe eine definierte Wachstums- und Ausbreitungsrichtung vorgegeben werden.

Eine weitergehende Verbesserung der Zellverankerung findet statt, wenn die verschiedenen Unterlagematerialien mit Proteinen der extrazellulären Matrix beschichtet werden [10]. Um die Supporte mit den kultivierten Gewebe problemlos handhaben zu können, haben wir spezielle Träger entwickelt [5]. Um während der Kultur stoffwechselschädigende Metaboliten zu entfernen, können die Gewebeträger in Kulturcontainer überführt werden, die permanent mit frischem Kulturmedium durchströmt werden (Abb. 2, 3) [11]. Durch die permanente Erneuerung des Kulturmediums wird zudem das Angebot an Nährstoffen kontrollierbar und die Anhäufung von parakrin gebildeten Faktoren auf gleichmäßig niedrigem Niveau gehalten. Primärkulturen können in den Perfusionscontainer mit dieser Methode in der für sie typischen Kontaktinhibierung über Wochen und Monate ohne eine Subkultivation gehalten werden.

Eine weitergehende Differenzierungssteuerung erreichen wir durch Zugabe von löslichen Differenzierungsfaktoren und Hormonen ins Kulturmedium [12,13]. Wachstumsfaktoren oder Serumzusätze zum Kulturmedium werden von uns nur verwendet, wenn eine Proliferation der Zellen zur Vermehrung von Biomasse gewünscht ist. Um Mitosestress und damit eine Downregulierung der Differenzierung zu vermeiden, wird deshalb serumarmes oder serumfreies Medium in der Perfusionskultur verwendet. Entscheidend für die Generierung von funktionellen Geweben war die Erfahrung, daß nicht ein einzelner Faktor, sondern nur eine konsequente Verbesserung der gesamten Kulturtechnik auch zu einer verbesserten Gewebedifferenzierung führt. Grundlage dafür ist die Erkenntnis, daß die Steue-



Abb. 2: Perfusionscontainer für die Herstellung von künstlichen Geweben. Nach dem Anwachsen der Zellen auf einer geeigneten Unterlage können die Gewebeträger in Kulturcontainer eingesetzt und permanent mit frischem Medium durchströmt werden. Dadurch lassen sich beliebige organtypische Situationen während der Kultur simulieren. In Mikroskopkammern lässt sich die Entwicklung der Gewebe beobachten.

Tissue engineering: Steuerung der gewebetypischen Differenzierung

Zellkultur	Notwendigkeiten	Realisierung	Literatur
	Optimale Zellverankerung für Differenzierung	Filter, Vliese, Matrices	[5,8,9]
	Optimierung der extrazellulären Matrix	Coating mit extrazellulären Proteinen	[3,7,10]
	Mechanischer Zell- und Gewebezusammenhalt	MINUSHEET für optimales Handling	[5]
	Eliminierung von Metaboliten	Perfusionscontainer	[8,9,11]
	Wachstumsfaktoren	Additive ins Medium	[12,13,19]
	Proliferation versus Kontaktinhibierung	Vermeidung von Mitosestress mit serumfreiem Medium	[15,16]
	Langzeitkultur	Optimierung der Elektrolyte im Medium für humane Zellen	[14]

Tabelle 2: Differenzierung von kultivierten Zellen und Geweben kann auf ganz unterschiedlichen Ebenen erfolgen.

nung und Aufrechterhaltung der Differenzierung auf ganz unterschiedlichen zellulären Ebenen stattfindet.

Anpassung des Kulturmediums

Zudem streben wir insbesondere bei Langzeitkulturen eine Optimierung der Elektrolyte im Kulturmedium an. Wir haben festgestellt, daß die Elektrolytwerte der verschiedenen Kulturmedien bisher in keinem Fall mit den Elektrolytwerten im Serum der jeweiligen Spezies übereinstimmen [14]. Die Elektrolytzusammensetzung des Kulturmediums für den jeweiligen Zelltyp läßt sich sehr leicht mit dem Blutgasanalysator Stat Profile 9 Plus (Nova Biomedical, Rödermark) durchführen. Da Nierenzellen aus neugeborenen Kaninchen für viele unserer aktuellen Versuche verwendet werden, liefert das Serum dieser Tiere die Orientierungswerte für die Zusammensetzung des Kulturmediums. Aus der Literatur bekannte Medien für die Kultivierung von Nierenzellen sind MEM, DMEM und IMDM. Bei der Messung von kommerziell erhältlichem IMDM stellten wir jedoch fest, daß für Na^+ 112 mMol/l gemessen wurden, während im Serum 137 mMol/l vorhanden waren. Nachgewiesen ist, daß die Erhöhung des Na^+ - bzw. Erniedrigung des K^+ -Gehaltes [15] oder eine Veränderung der Osmolarität [16] Zellen im Vergleich zu Kontrollen ähnlich gut proliferieren läßt, wie dies mit Wachstumsfaktoren zu erreichen ist [10]. Aus diesem Grund versuchen wir jetzt, einzelne Elektrolytparameter z.B. durch Zugabe von NaCl oder Na^+ -Gluconat den jeweiligen Elektrolyt-Serumwerten anzupassen. Dabei kommt es außerdem zu einer Angleichung des Osmolaritätswertes vom Kulturmedium an die Serumwerte des Kaninchens.

Beim Tissue engineering muß entschieden werden, ob sich die Zellen dauernd teilen, oder in der natürlichen Kontaktinhibierung der Interphase verweilen sollen. Denn nur in dieser Interphase werden viele typischen Gewebefunktionen exprimiert und aufrechterhalten. Deshalb versuchen wir das Gleichgewicht zwischen Proliferation und Differenzierung von Zellen in vitro dem jeweiligen Proliferationszyklus der Gewebezellen durch Entzug oder Zugabe von mitogenen Stimuli anzupassen.

Praktische Durchführung

Für die Herstellung von künstlichen Geweben wird zuerst eine Unterlage mit einem Durchmesser von 13 mm ausgesucht. Dieser Support muß den Zellen eine optimale Verankerung ermöglichen. Die Unterlage

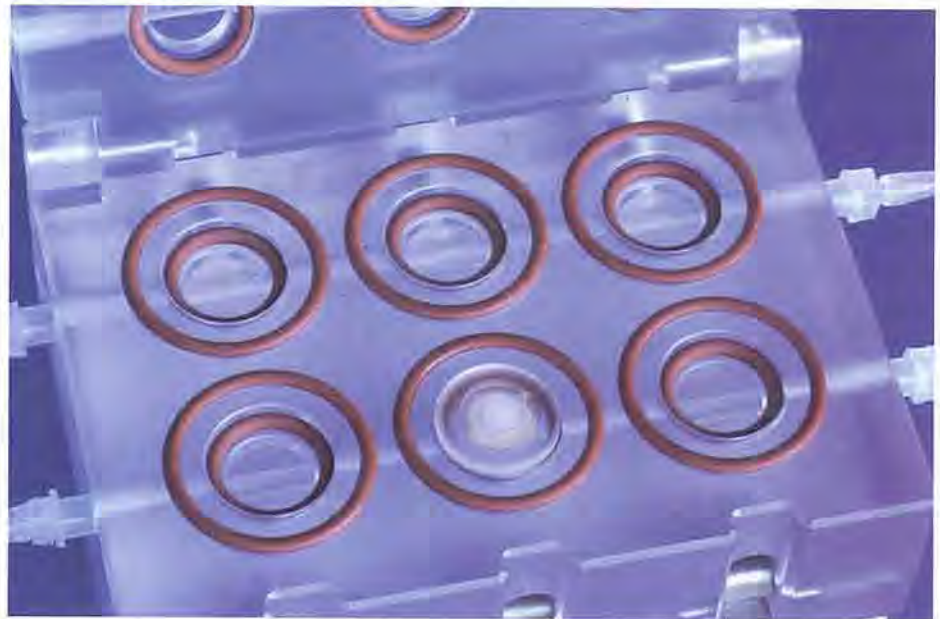
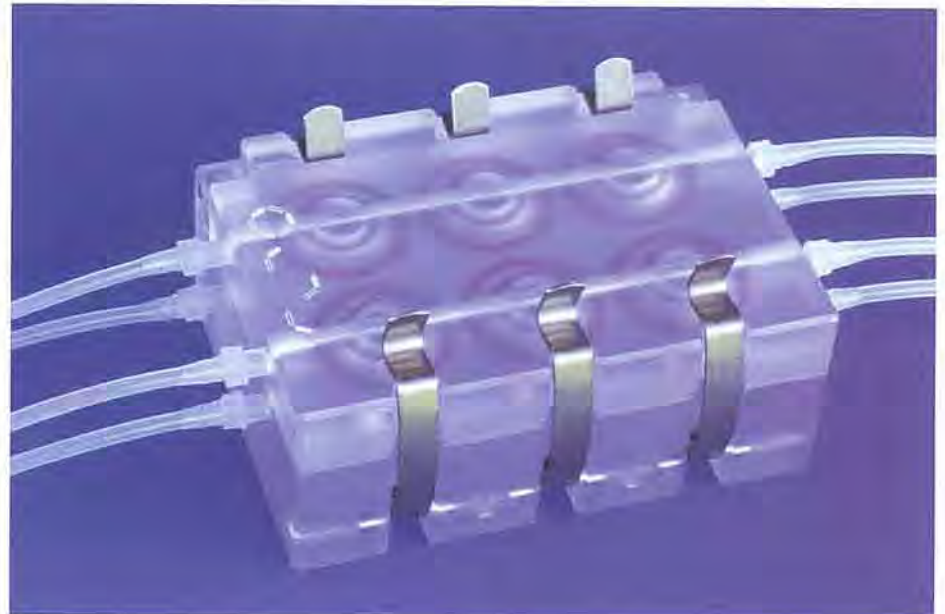


Abb. 3 (a,b): Gradientenkulturcontainer für 6 Gewebeträger. a) Der Gewebeträger wird mit einer Pinzette in die geöffnete Kammer eingelegt (oben). b) Nach dem Verschluss der Kammer wird das eingelegte Epithelgewebe wie unter natürlichen Bedingungen von oben und unten mit ganz unterschiedlichen Kulturmedien versorgt (unten).



wird dann in einen Gewebeträger (Abb. 1) eingelegt und sterilisiert. Anschließend werden die Zellen aufpipettiert. Nach dem Anheften der Zellen werden die Gewebeträger in Perfusionscontainer eingesetzt (Abb. 2). Statt isolierter Zellen können genauso gut Gewebeschnitte oder Explantate auf eine Nylongaze aufgelegt werden, die sich in der Gewebeträgerhalterung befindet (Abb. 1). Mit einer zweiten Gaze wird dann das Gewebe abgedeckt und wie in einem Sandwich in der Halterung fixiert. Die Ge-

webeträger werden dann ebenfalls in einen Perfusionscontainer eingesetzt (Abb. 2, 3). Eine Wärmeplatte bringt die Kulturen auf 37 °C. Eine Peristaltikpumpe transportiert kontinuierlich frisches Kulturmedium aus einer Vorratsflasche in den Container, während das verbrauchte Medium in eine Abfallflasche fließt. Da CO_2 -unabhängiges Kulturmedium verwendet wird, kann die Perfusionskultur außerhalb eines Inkubators auf jedem Labortisch für Wochen und Monate durchgeführt werden.

Epithelzellen können wie unter natürlichen Bedingungen zwischen zwei unterschiedlichen Kompartimenten angesiedelt werden. Dazu wurde ein Gradientencontainer mit 6 Gewebepläten entwickelt (Abb. 3). Mit einer Pinzette werden die Gewebeträger in die Gradientenkammer eingelegt (Abb. 3a), dann wird der Deckel geschlossen. Die Kammer wird durch den Gewebeträger in ein oberes und unteres Kompartiment geteilt. Luminal und basal können ganz unterschiedliche Kulturmedien perfundiert und somit individuelle organspezifische Bedingungen für die eingelegten Epithelien simuliert werden (Abb. 3b).

Generierung von Binde- und Stützgeweben

Mit der vorgestellten Methode gelang es erstmalig, gewebetypischen Knorpel herzustellen, um ihn für chirurgische Implantationszwecke zu nutzen [8,9,17]. In einem ersten Schritt wird von einem Patienten ein kleines Stück Knorpelgewebe isoliert und die Zellen in konventionellen Kulturgefäßen vermehrt. In einem zweiten Schritt werden dann die Knorpelzellen auf einem bioabbaubaren Vlies ausgesät. Das Vlies wurde vorher so geformt, daß es später problemlos in eine Gelenkoberfläche, in eine Nasen- oder Ohrverletzung eingesetzt werden kann. In einem dritten Schritt werden die Gewebeträger dann in einen Perfusioncontainer eingesetzt. Während der Perfusionkultur bildet sich typisches und mechanisch belastbares Knorpelgewebe.

Da es sich bei diesem Verfahren um patienteneigene Zellen handelt, sind zu erwartende Abstoßungs- und Entzündungsreaktionen nach Implantation auf ein Minimum reduziert. Auf ähnliche Weise lassen sich in Zukunft sicherlich auch körpereigene Knochenimplantate herstellen, die z.B. bei Splitterbrüchen als Heilungshilfen eingesetzt werden könnten. Realisierbar erscheinen außerdem künstlich hergestellte Sehnen und Bänder.

Generierung von funktionellen Epithelien

Neben den Binde- und Stützgeweben sind die Epithelien von großer Bedeutung für unsere Körperfunktionen. Epithelien sind immer an Stellen zu finden, wo Austausch- und Schutzfunktionen in unseren Körper ablaufen. Als Beispiele dienen die schützende Haut, das gasaustauschende Alveolarepithel der Lunge, die resorbierende Zellschicht in der Innenauskleidung des Darm-

traktes und die urinausscheidenden Epithelien in der Niere. Das luminal und basale Environment aller Epithelien unterscheidet sich deutlich. Beispielsweise sind die Zellen in der Niere luminal einem urin- und basal einem serumartigen Umgebungsmilieu ausgesetzt. Genau diese Bedingungen lassen sich mit einem neu entwickelten Gradientencontainer simulieren (Fig.3) [11]. Dazu wird ein Gewebeträger mit einem Nierenepithel in die Gradientenkammer eingelegt. Wie unter natürlichen Bedingungen wird an den Zellen von oben ein urin- und von unten ein serumartiges Kulturmedium vorbeigeströmt. Mit dieser Methode gelang es, ein eindeutig definiertes Epithel aus embryonalen Zellen des Sammelrohr der Säugerniere mit seinen unterschiedlichen Zelltypen herzustellen und über Wochen und Monate in seiner typischen Form zu erhalten [18].

Bei immer knapper werdenden Nierentransplantaten muß an die Herstellung eines künstlichen Dialysemoduls auf der Basis von patienteneigenen und kultivierten Zellen gedacht werden. Die bisher angewendete Dialysetechnik basiert auf einem physikalischen Filter, bei dem harnpflichtige Substanzen durch die Poren abgeschieden werden. Ein Teil dieser Substanzen gelangt aber durch Rückdiffusion, also auf dem gleichen Weg wieder zurück in den Körper. Bei einem Dialysemodul mit kultivierten Nierenzellen würde das nicht geschehen. Ein Molekül wie z.B. Harnstoff würde in einer Ventulfunktion durch die Epithelbarriere transportiert und könnte nicht wieder zurückgelangen. Ein solches Modul mit Zellen des Patienten könnte zur Verkürzung und damit zur Effizienzsteigerung zum bisherigen Dialysemodul zugeschaltet werden.

Generierung von Gefäßen

Größere Organstrukturen können nur dann entwickelt werden, wenn alle Zellen optimal mit Sauerstoff und Nahrung versorgt werden. Über die Entstehung und Wachstumssteuerung solcher Gefäßnetze, speziell in der Niere ist nur sehr wenig bekannt. Versuche zur Entstehung des Gefäßnetzes der Niere gelingen zudem in der konventionellen Kulturschale nicht. Um dennoch solche Vorgänge untersuchen zu können, wurde embryonales Nierengewebe in Gewebeträger und Perfusioncontainer eingesetzt [13,19]. Die Versuche ergaben, dass erstmalig ein sprossendes Gefäßnetz der Niere unter diesen verbesserten Kulturbedingungen generiert werden konnte. Mit

Wachstumsfaktoren wie z.B. VEGF (vascular endothelial growth factor) kann zudem die Ausbreitung des sprossenden Gefäßnetzes stimuliert oder aber mit spezifischen Antikörpern blockiert werden. Damit konnten völlig neue Einblicke in die Entstehung der embryonalen Niere gewonnen werden.

Es konnten zudem erste praktische Erfahrungen erarbeitet werden, wie später einmal experimentell ein artifizielles Gefäßsystem in Interaktion mit einem Organparenchym entwickelt werden könnte. Bei der Entwicklung einer künstlichen Niere, Leber oder Bauchspeicheldrüse wird dieser Vorgang eine wesentliche Rolle spielen.

Interagierende Gewebesysteme

Die Mehrzahl der bisherigen Versuche mit kultivierten Zellen in einer Kulturschale lieferte keine direkte Übertragung von der in vitro auf die in vivo Situation. Einen wesentlichen Fortschritt bei der Entwicklung von in vitro Modellen als eine Alternative zu Experimenten an Tieren werden zukünftig interagierende künstliche Gewebe aus humanen Zellen liefern [20].

Darunter versteht man verschiedenartige Gewebe, deren Zellen über eine intakte extrazelluläre Matrix miteinander kommunizieren. Damit kann unter besonders realistischen Bedingungen besonders gut die Entstehung von Krankheitsprozessen untersucht werden. Es ist z.B. gelungen, interagierende dreidimensionale Kulturen aus Synovial- und Knorpelzellen herzustellen. Entlang einer histologisch klar erkennbaren Gewebekontaktzone können jetzt bei der Entstehung von rheumatoïden Erkrankungen lokale Veränderungen wie z.B. der Phänotyp von Zellen, die Degradation der extrazellulären Matrix, die Zytokinsekretion oder die Zellinvasion untersucht werden.

Ein anderes Beispiel kommt aus dem Bereich der Biomaterialforschung und Zahnmedizin. In der Gradientenkammer (Abb. 3) sind Langzeituntersuchungen zur Verträglichkeit von Medikamenten und Füllmaterialien bei der Zahnbehandlung möglich geworden [21]. Dazu verwendet man isolierte Dentinscheiben in Gradientencontainern (Abb. 3) und läßt auf der einen Seite Mesenchymzellen wachsen. Auf der anderen Seite der Dentinscheibe können jetzt beliebige Behandlungs- und Füllmaterialien aufgetragen werden. Sterben die Mesenchymzellen im Laufe einer definierten Zeit in der artifiziiellen Pulpahöhle ab, so hat die jeweilige Testsubstanz die Bioverträglich-

lichkeitsprüfung unter diesen realistischen Bedingungen nicht bestanden.

Lebendkonservierung von Geweben

Bei Operationen im Kiefer- und Mundhöhlenbereich ist zur Abdeckung von Wundfeldern Bindegewebe und Gingiva Mangelware. Für größere Eingriffe kann lebend konserviertes Patientengewebe hierzu eine Lösung bieten. Dazu wird Mundschleimhaut vor einer geplanten großflächigen Operation chirurgisch z.B. von der Wangeninnenseite entnommen. Das Epithel wird in einen Gewebehalter eingespannt und kann für Wochen in einem Perfusionscontainer konserviert werden [22]. Inzwischen kann die Entnahmestelle in der Mundhöhle verheilen. Zum eigentlichen operativen Eingriff kann dann die in Perfusionskultur konservierte Gingiva verwertet und zur zusätzlichen Abdeckung von Wundflächen implantiert werden.

Vorteile bietet die neue Methode auch bei der Generierung von künstlichen Hirnhäuten oder bei verschiedensten genterapeutischen Verfahren. Neue Märkte eröffnet das Tissue engineering für spezielle Institute in Kliniknähe, wo zukünftig patienteneigene Zellaufarbeitung und Tissue engineering professionell durchgeführt werden. Voraussetzung dafür sind innovative Verfahren und Produkte für die Gewebezucht, sowie eine große Auswahl an körperversägliches Matrices, mit denen sich artifizielle und funktionsfähige Gewebe optimal herstellen lassen.

Anmerkung

Die Untersuchungen wurden unterstützt von der deutschen Forschungsgemeinschaft (Mi 331/4-1).

Besonderer Dank gilt der technischen Mitarbeit von Frau E. Eckert.

1992 wurde das Projekt mit dem Philip Morris Forschungspreis „Herausforderung Zukunft“ ausgezeichnet.

Informationen zum *Tissue engineering* und dessen technische Möglichkeiten sind kostenlos zu beziehen über:

MINUCELLS and MINUTISSUE Vertriebs GmbH, Starenstraße 2, D-93077 Bad Abbach, Fax: (09405) 4427 oder im Internet über die TISSUE ENGINEERING PAGES <http://www2.rz.hu-berlin.de/inside/rheuma/tissue/minucells.html>.

Korrespondenz:

Will. W. Minuth, Universität Regensburg, Institut für Anatomie, Universitätsstr. 31, D - 93053 Regensburg, Fax: (0941) 9432868 oder im Internet: TISSUE ENGINEERING PAGES <http://www2.rz.hu-berlin.de/inside/rheuma/tissue/sittinger/html>

Literatur

- [1] Nerem R.M., A. Sambanis: Tissue engineering: From Biology to Biological Substitutes. *Tissue Engineering* 1:3-11 (1995).
- [2] Gebelein, C.G.; in *Biotechnological Polymers - medical, pharmaceutical and industrial applications*. Technomic Publishing Company, Basel (1993).
- [3] Doyle, A. et al.; in *Cell & Tissue Culture. Laboratory Procedures*. John Wiley & Sons, Chichester (1993).
- [4] Koechlin, N.; M. Pisam, P. Poujeol, M. Tauc, A. Rambourg: Conversion of a rabbit proximal convoluted tubule (PCT) into a cell monolayer: ultrastructural study of cell dedifferentiation and redifferentiation. *Eur. J. Cell. Biol.* 54: 224-236 (1991).
- [5] Minuth, W.W.; V. Majer, S. Kloth, R. Dermietzel: Growth of MDCK cells on non-transparent supports. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 30A: 12-14 (1994).
- [6] Zuk, A.; K.S. Matlin, E.D. Hay: Type I collagen gel induces Madin-Darby canine kidney cells to become fusiform in shape and lose apical-basal polarity. *J. Cell Biol.* 108, 903-919 (1989).
- [7] Butor, C.; J. Davoust: Apical to Basolateral Surface Area Ratio and Polarity of MDCK Cells Grown on Different Supports. *J. Exp. Cell. Res.* 203: 115-127 (1992).
- [8] Sittinger, M.; J. Bujia, W.W. Minuth, C. Hammer, G. R. Burmester: Engineering of cartilage tissue using bioresorbable polymer carriers in perfusion culture. *Biomaterials*; 15,6: 451-456 (1994).
- [9] Bujia, J.; M. Sittinger, W.W. Minuth, C. Hammer, G. Burmester, E. Kastenbauer: Engineering of cartilage tissue using bioresorbable polymer fleeces and perfusion culture. *Acta Otolaryngol.* 115: 307-310 (1995).
- [10] Taub, M.; Y. Wang, T.M. Szczesny, H.K. Kleinmann: Epidermal growth factor or transforming growth factor (is required for kidney tubulogenesis in matrigel cultures in serum-free medium. *Natl. Acad. Sci.* 87: 4002-4006 (1990).
- [11] Minuth, W.W.; R. Dermietzel, S. Kloth, B. Hennerkes: A new method culturing renal cells under permanent superfu-

sion and producing a luminal-basal medium gradient. *Kidney Int.* 41: 215-219 (1992).

[12] Minuth, W.W.; W. Fietzek, S. Kloth, J. Aigner, P. Herter, W. Röckl, M. Kubitza, G. Stöckel, R. Dermietzel: Aldosterone modulates PNA binding cell isoforms within renal collecting duct epithelium. *Kidney Int.* 44: 537-544 (1993).

[13] Kloth S.; C. Ebenbeck, M. Kubitza, A. Schmidbauer, W. Röckl, W.W. Minuth: Stimulation of renal microvascular development under organotypic culture conditions. *The FASEB Journal* 9: 963-967 (1995).

[14] Minuth, W.W., S.Kloth, J.Aigner, P. Steiner: MINUSHEET-Perfusionskultur: Simulierung eines gewebetypischen Milieus. *BIOSCOPE* 4: 20-25 (1995).

[15] Walsh-Reitz M.M.; H.N. Aithal, F.G. Toback: Na regulates growth of kidney epithelial cells induced by lowering extracellular K concentrations. *Am. J. Physiol.* 247: C321-C326 (1984).

[16] Itoh T.; A. Yamauchi, A. Miyai, K. Yokoyama, T. Kamada, N. Keda, Y. Fujiwara: Mitogen-activated protein kinase and its activator are regulated by hypertonic stress in Madin-Darby Canine Kidney cells. *J. Clin. Invest.* 93: 2387-2392 (1994).

[17] Sittinger, M., J. Bujia, N. Rotter, D. Reitzel, W.W. Minuth, G.R. Burmester: Tissue engineering and autologous transplant formation: practical approaches with resorbable biomaterials and new cell culture techniques. *Biomaterials* 17: 237-242 (1996).

[18] Aigner J.; S. Kloth, M. Kubitza, M. Kashgarian, R. Dermietzel, W.W. Minuth: Maturation of renal collecting duct cells in vivo and under perfusion culture. *Epith. Cell Biol.* 3: 70-78 (1994).

[19] Kloth, S.; A. Schmidbauer, M. Kubitza, H.A. Weich, W.W. Minuth: Developing renal microvasculature can be maintained under perfusion culture conditions. *Eur. J. Cell. Biol.* 63: 84-95 (1994).

[20] Schulz, O.; G. Keyszer, M. Sittinger, G.R. Burmester: Development of in vitro model systems for destructive joint diseases. Novel strategies to establish inflammatory pannus. *Arthritis and Rheumatism*, submitted (1996).

[21] Schmalz, G.; P. Garhammer, H. Schweiki: A commercially available cell culture device modified for dentin barrier tests. *J. Endodontics* 21: 249-252 (1996).

[22] Lehmann, P., S. Kloth, J. Aigner, R. Dammer, Minuth, Will W.: Lebende Langzeitkonservierung von humaner Gingiva in der Perfusionskultur. *Zeitschrift Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie*, in press (1996). □