

**Abstract: From Cell Culture to Tissue Engineering**

An enormous demand for human body organ and tissue transplants motivates tissue engineering research and requires 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 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 cultured cells. The prerequisite for all of the projects is the tissue specific deve-

lopment and maintenance of differentiation features within the tissue under *in vitro* conditions. Since experiments in conventional culture dishes failed, innovative tissue engineering tools have been developed which are based upon tissue carriers with specific biomatrices for the development of three-dimensional growth. Perfusion culture containers guarantee optimal nutrition of the differentiating tissue and prevent an accumulation of harmful metabolic products. Long-term culture experiments have resulted in cultured tissues of so far unreached quality.

## Von der Zellkultur zum Tissue engineering

Will W. Minuth, Raimund Strehl, Pat Steiner, Sabine Kloth

Die enorme Nachfrage an Organen und Gewebetransplantaten für den Körper motiviert zur Forschung in dem neuen Bereich des Tissue engineering. Am weitesten fortgeschritten ist die Herstellung von Hautkulturen für Patienten mit schwersten Brandverletzungen und die Generierung von künstlich hergestelltem Knorpel zur Implantation in Gelenkdefekte. Zukünftige Herausforderungen sind die Herstellungen von Leberorganoiden und die Generierung einer künstlichen Niere auf der Basis von kultivierten Zellen. Voraussetzung für alle diese Projekte ist die Entwicklung und Aufrechterhaltung von spezifischen Gewebeeigenschaften unter *in vitro* Bedingungen. Benötigt werden dazu innovative Kulturtechniken.

Innerhalb der Biomedizin, Biomaterialforschung und bei den Alternativen zu Experimenten an Tieren entwickelt sich ein neues Wissenschaftsfeld. Es handelt sich um das Tissue engineering, bei dem eine Vielzahl von Geweben und Organoiden auf der Basis von lebenden Zellen, mit Hilfe einer geeigneten Biomatrix und neuartigen Kulturmethoden hergestellt werden. Das Spektrum reicht von künstlichen Knorpel- oder Knochenanteilen [1,2,3] über Gefäße [4,5] bis hin zu funktionellem Leber- [6,7], Pankreas- [8], oder Nierengewebe [9,10]. Teils sollen diese Konstrukte implantiert werden, teils möchte man bioartifizielle Module

bauen, die außerhalb eines Körpers genutzt werden können. Sehr weit fortgeschritten ist die Herstellung von Hautkulturen, die zur Behandlung von Patienten mit großflächigen Brandwunden Verwendung findet [11,12]. Künstliche Knorpelgewebe sollen als Implantate im Hals-, Nasen- und Ohrenbereich, bei Verletzungen von Gelenkoberflächen in der Unfallchirurgie und bei rheumatoiden Erkrankungen angewandt werden [13,14,15].

Künstlich hergestellte Gewebe dürfen keine Entzündungs- oder Abstoßungsreaktionen nach der Implantation oder bei Blutkontakt in einem extrakorporalem Modul hervorrufen. Deshalb müssen die hergestellten Gewebe einen Differenzierungsgrad aufweisen, wie er innerhalb unseres Körpers vorgefunden wird. Auf keinen Fall sollte das Gewebe eine atypische Proteinexpression zeigen, wie dies z.B. durch Dedifferenzierung unter suboptimalen Kulturbedingungen verursacht wird. Aus diesem Grund gerät die Qualitätskontrolle, d.h. die Überprüfung einer gewebetypischen Differenzierung und die kontinuierliche Überwachung von künstlich hergestellten Geweben immer mehr in den Fokus der wissenschaftlichen Arbeiten. Nicht nur bei der Herstellung von medizinischen Implantaten, sondern auch in der Biomaterialforschung gewinnt die gewebetypische Differenzierung eine immer größere Bedeutung. Wenn es um die Optimierung von

bioverträglichen Metall- oder Kunststoffoberflächen geht, können künstlich hergestellte humane Gewebe als realistische Testsysteme unter *in vitro* Bedingungen verwendet werden. Die Versuche mit humanen Zellen liefern ohne einen Umweg über ein Versuchstier direkt übertragbare Ergebnisse von der *in vitro* Situation auf den Menschen. Dies wird zukünftig eine zentrale Rolle bei der Beurteilung von Implantaten aus Metall oder Kunststoff spielen. Da sich die künstlich hergestellten Gewebe zudem über extrem lange Zeiträume und in differenzierter Form aufrechterhalten lassen, können damit erstmalig realitätsnahe Untersuchungen zur Materialeignung, zur chronischen Intoxikation und zur Entzündungsentstehung durchgeführt werden [14, 16].

### Die experimentellen Voraussetzungen - Steuerung der dreidimensionalen Gewebestruktur:

Seit Jahrzehnten können Zellen aus den verschiedensten Geweben isoliert und in Kulturen genommen werden [17]. Die gewonnenen Zellen werden dabei in Kulturschalen oder Flaschen pipettiert und mit einem geeigneten Medium am Leben erhalten. Da in kurzer Zeit eine möglichst große Menge an Zellen geerntet werden soll, werden dem Medium Wachstumsfaktoren beigegeben. Künstliche Gewebe werden in der Startphase ebenfalls in herkömmlichen Kulturgefä-

1. Schritt	2. Schritt	3. Schritt
<b>Zellvermehrung</b>	<b>Einleitung der Zelldifferenzierung</b>	<b>Aufrechterhaltung der Zelldifferenzierung</b>
Konventionelle Kulturgefäße Serumhaltiges Kulturmedium Wachstumsfaktoren		
	Auswahl einer optimalen Biomatrix, Verwendung von Gewebeträgern Keine Verwendung von fötalem Serum oder Wachstumsfaktoren im Medium	
		Gewebeträger in Perfusionskulturcontainern Konstante Ernährung Differenzierungsfaktoren Anpassung der Elektrolyte des Kulturmediums
Mitosezyklus schnell, dann Differenzierung niedrig	Mitosezyklus reduziert, dann Differenzierung beginnend	Postmitose, dann Differenzierung spezifisch

**Tabelle 1:** Differenzierung von kultivierten Geweben ist abhängig vom Teilungszyklus der Zellen

sen hergestellt (Tabelle 1). Zuerst werden die benötigten Zellen isoliert, mit einem geeigneten Kulturmedium und mit Hilfe von Wachstumsfaktoren in einem geeigneten Kulturgefäß in der benötigten Menge vermehrt. Da Gewebe nicht nur flach wie ein Kulturschalenboden, sondern dreidimensional aufgebaut sind, benötigt man für das weitere Vorgehen zur Ansiedlung der Zellen eine spezielle Biomatrix, die den Zellen als dreidimensionale Gerüststruktur dient. Eine Vielzahl von Materialien kann dafür verwendet werden. Das Spektrum reicht von planen Filterunterlagen bis hin zu dreidimensionalen Strukturen aus Polyester, schwammartigen Materialien aus Silikonen und extrazellulären Matrixproteinen bis hin zu bioabbaubaren Polymervliesen [18,19]. Die Herstellung von qualitativ hochwertigem, d.h. differenziertem künstlichem Gewebe wird nur dann gelingen, wenn die jeweiligen Gewebezellen die angebotene Biomatrix als optimal empfinden und sich dort verankern. Dies bedeutet, daß allein die aufpipettierte Zellen zeigen, ob die Biomatrix prinzipiell geeignet ist oder nicht. Eine Anheftung der Zellen auf einer geeigneten Biomatrix kann z.B. durch Beschichtung mit Polylysin beschleunigt werden. Zudem kann die Biomatrix mit Wachstumsfaktoren imprägniert werden, um ein zielgerichtetes, dreidimensionales und zeitlich begrenztes Ausbreiten der Zellen zu steuern.

### Mitose, anschließend Postmitose zur Gewebedifferenzierung

In der Mehrzahl unserer Gewebe durchlaufen die Zellen nicht in schneller Folge den Teilungszyklus, sondern bleiben oft jahrelang in der funktionsausübenden Interphase. Deshalb versuchen wir beim Tissue engineering das Gleichgewicht zwischen Proliferation und Differenzierung von Zellen *in vitro* dem jeweiligen Proliferationszyklus der Gewebezellen im Organismus anzupassen. Experimentell geschieht dies durch Entzug oder Zugabe von mitogenen Stimuli. Damit ist der zweite experimentelle Schritt eingeleitet (Tabelle 1). Durch den Entzug von mitogenen Stimuli im Kulturmedium wird die Zellteilungsaktivität reduziert und dadurch die Interphase des jeweiligen Zelltyps verlängert. Da Zellteilung und Differenzierung nacheinander und nicht parallel ablaufende Vorgänge sind, wird jetzt die gewebetypische Zelldifferenzierung einsetzen und über lange Zeiträume aufrechterhalten bleiben [20]. Durch den Entzug von fötalem Kälberserum oder durch Weglassen von Wachstumsfaktoren aus dem Medium wird die permanente Initiation der Mitose beendet. Dagegen findet jetzt serumfreies Kulturmedium Verwendung. Kann dennoch auf Serumbeimengung im Kulturmedium nicht verzichtet werden, so wird Serum adulter Spezies in geringer Konzentration zugegeben, da dieses weniger mitogene Faktoren als das fötale Serum enthält.

### Aufrechterhaltung der Differenzierung

Im zweiten und dritten experimentellen Schritt müssen die reifenden Gewebe für Wochen optimal versorgt werden, um die begonnene Differenzierung über einen langen Zeitraum aufrecht zu erhalten (Tabelle 1). Unsere bisherigen Forschungsarbeiten haben gezeigt, daß in konventionellen Kulturgefäßen dies nicht gelingt. Aus diesem Grund kommen in den weiteren entscheidenden experimentellen Schritten spezielle Gewebeträger und Perfusionskulturcontainern zur Anwendung (Abb. 1). Hierbei sorgt die permanente Erneuerung des Kulturmediums für eine konstante und optimale Versorgung des Gewebes und damit auch für eine kontinuierliche Entfernung von stoffwechselschädigenden Metaboliten. Die Anwendung von Perfusionskulturcontainern zeigt sich besonders zwingend, wenn z.B. Polylaktidvliese als Biomatrix verwendet werden [21]. Da diese Vliese bioabbaubar sind, wird im Laufe der Kultur Laktat freigesetzt, welches im statischen Milieu einer Kulturschale zu einer unphysiologischen Ansäuerung des Kulturmediums führt. Durch die kontinuierliche Erneuerung des Mediums im Container wird jedoch dieser stoffwechselschädigende Metabolit entfernt und kann damit keinen Schaden am kultivierten Gewebe anrichten.

### Klinische Aspekte

Biomedizinischer Anwendungsbereich für das Tissue engineering ist u.a. die Herstellung von künstlichen Bindegeweben [1,2,15,22]. Zukünftige Verwendung findet lockeres Bindegewebe, welches z.B. nach Tumorentfernungen zur Ausfüllung von Wundhöhlen benötigt wird. In der Unfallchirurgie und Orthopädie sind künstlich hergestellte Sehnen, Bänder, Menisken, Knorpel oder Knochenteile von Interesse, wobei letztere bei Splitterbrüchen als



**Abb. 1:** Künstlich hergestellte Gewebe werden optimal in Perfusionskulturcontainern generiert.

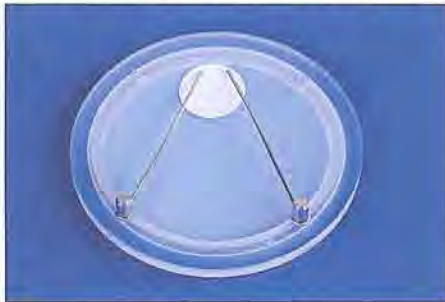


**Abb. 2:** Die Zuführung von frischem Kulturmedium in einen Perfusionskulturcontainer erfolgt über dünne Silikonschläuche und Mithilfe einer Peristaltikpumpe. Eine Thermoplatte mit einer speziellen Abdeckhaube sorgt für die Temperierung der Kulturen.

Wachstumsbrücken eingesetzt werden können [18,19]. Am weitesten experimentell fortgeschritten in diesem Bereich ist derzeit die Herstellung von artifiziellem Knorpelgewebe, welches im Hals-, Nasen- und Ohrenbereich, sowie bei Gelenkknorpeldefekten implantiert werden soll.

Strategie für solche operativen Eingriffe ist es, dem jeweiligen Patienten eine Kleinst-

ferenzierung der Zellen bilden [3,23]. Dies hätte fatale Folgen für den Patienten, da die Vorteile eines autologen Implantates durch die Nachteile einer atypischen Proteinexpression überdeckt würden. Das Immunsystem würde sich verhalten als ob ein heterologes Implantat verwendet würde und dementsprechend Entzündungs- und Abstoßungsreaktionen zeigen.



**Abb. 3:** Herstellung eines dreidimensionalen Gewebes (weißer Kreis, 13 mm) auf einem speziellen Gewebeträger mit Halterungen.

menge an benötigten Zellen zu entnehmen und aus ihnen unter optimierten Kulturbedingungen funktionelle Gewebe zu generieren. Solche autologen Explantate haben den Vorteil, daß die zur Gewebeherstellung verwendeten Zellen vom Patienten selbst stammen und sich damit mögliche Entzündungs- und Abstoßungsreaktionen nach einer Implantation minimieren. Besonders wichtig ist, daß die generierten Gewebe eine für sie typische Proteinexpression zeigen und keine atypischen Proteine durch Dedif-



**Abb. 4:** Der Gewebeträger wird in einen speziell konstruierten Perfusionskulturcontainer eingesetzt. Medium wird an der Bodenseite eingeleitet und am Deckelteil abgeführt.

Der zentrale Punkt bei der künstlichen Gewebeherstellung ist deshalb die Steuerung der zellulären Differenzierung und damit die Entwicklung sowie die Aufrechterhaltung von gewebetypischen Eigenschaften (Tabelle 1). Bei der Herstellung autologer Knorpelimplantate für die Abdeckung eines Gelenkdefektes wird experimentell folgendermaßen vorgegangen [3,22,15]. Dem Patienten kann an einer geeigneten Stelle ein kleines Stück Knorpel entnommen werden. Die Chondrozyten werden isoliert und mit wachstumsfaktorhaltigem Medium in konventionellen Kulturgefäßen gehalten, um eine möglichst schnelle Vermehrung der Chondrozyten zu erreichen. Danach werden die Zellen auf eine geeignete dreidimensionale Biomatrix, z.B. ein Polylaktidvlies aufgebracht. In diesem entscheidenden experimentellen Schritt müssen die auf das Vlies aufbrachten Zellen eine mechanisch belastbare Knorpelgrundsubstanz bilden und dabei u.a. das gewebetypische Kollagen Typ II exprimieren. Um das Gewebe manuell gut handhaben zu können und um es für die Differenzierungsphase unter optimierten Bedingungen zu halten, ist es notwendig das Polylaktidvlies in einen Gewebeträger und in einen Perfusionskulturcontainer einzusetzen. Mit einer Peristaltikpumpe wird den Kulturen permanent frisches Medium zugeführt (Abb. 2). Eine Wärmeplatte mit einer speziellen Abdeckung sorgt für die notwendige Temperierung.



**Abb. 5:** Der neu konstruierte Perfusionskulturcontainer ermöglicht eine optische Kontrolle durch die im Deckel eingelassene Glasabdeckung. Über einen speziellen Port an der Bodenseite des Containers erfolgt die physiologische Kontrolle des Mediums.

### Konzeption für das dreidimensionale Implantat

Knorpelflächen und Knochenteile haben meist keine plane, sondern eine konvex oder konkav geformte Oberfläche. Da die dreidimensionale Ausbreitung und Oberfläche eines künstlich hergestellten Implantates al-

mMol/l	Serum	IMDM
Ca <sup>2+</sup>	1.66 +/- 0.46	1.15 +/- 0.27
K <sup>+</sup>	6.04 +/- 1.7	4.25 +/- 0.1
Cl <sup>-</sup>	99 +/- 5.8	85.1 +/- 1.0
Na <sup>+</sup>	137 +/- 5.7	112.3 +/- 1.6
	n = 17	n = 40

Tabelle 2: Vergleich von gemessenen Serum- und Medienparametern

lein durch dessen Biomatrix bestimmt wird, muß zuerst deren Durchmesser, die Dicke und die Oberflächengeometrie definiert werden. Speziell für diese Anwendungen haben wir einen neuen Gewebeträger (Abb. 3) und einen neuen Perfusionkulturcontainer entwickelt (Abb. 4,5). Um ein räumlich definiertes Gewebe herzustellen, wird zuerst ein Gewebeträger benötigt, in den z.B. ein Nylongitter mit einem Durchmesser von 47 mm eingesetzt werden kann. Das Nylongitter ist in diesem Fall nicht plan, sondern es besitzt die später benötigte dreidimensionale Oberflächenstruktur des Gewebes. Muß das Implantat später z.B. in eine konvex geformte Gelenkoberfläche eingesetzt werden, so muß auch von Anfang an die Biomatrix des zukünftigen Implantates in der benötigten Geometrie hergestellt werden. Dazu wird eine Schablone angefertigt. Mit einem Werkzeug wird in ein feines Metallgewebe diejenige dreidimensionale Form eingearbeitet, die der später benötigten Gelenkoberfläche entspricht. Dann wird das oben erwähnte Nylongitter aufgelegt. Metallgewebe und Nylongitter werden erwärmt. Bedingt durch die Erwärmung legt sich das Nylongitter dem dreidimensionalen Verlauf der bearbeiteten Metallgewebeoberfläche an und bildet somit die räumliche Struktur des späteren benötigten Implantates.

### Zellulärer Aufbau des Implantates

Das Nylongitter mit der eingearbeiteten dreidimensionalen Oberflächenstruktur wird dann in den Gewebeträger eingesetzt. Die vorgefertigte Vertiefung wird mit einer biologischen abbaubaren Matrix, z. B. einem Polylaktidvlies ausgekleidet (Abb. 3, weißer Kreis). Dadurch ist die Oberflächengeometrie, der Durchmesser und die Dicke des späteren Implantates festgelegt. Mit dünnen Halteklammern wird die geformte Biomatrix in Position gehalten. Dann werden die Zellen auf die Biomatrix aufpipettiert und bei Bedarf z.B. noch mit Fibrin überschichtet [22].

### Gewebetypische Differenzierung des Implantates

Voraussetzung für die Bildung einer festen Interzellularsubstanz mit Ihren gewebetypischen Kollagenen, Proteoglycanen und Chondroitinsulfaten ist, daß das reifende Gewebe unter optimierten Kulturbedingungen gehalten wird. Zahlreiche Experimente haben gezeigt, daß eine gewebetypische Differenzierung nur dann erreicht wird,

um ein, auf der Deckelseite verläßt das verbrauchte Kulturmedium den Container. Durch eine Glasabdeckung im Container läßt sich der Zustand des reifenden Gewebes verfolgen. Eine Kontrolle der Stoffwechselmetabolite erfolgt durch einen speziellen Port am Containerboden oder durch einen der zu- und abführenden Silikon-schläuche.

### Qualitätsmanagement für artifizielles Gewebe

Die Herstellung von künstlichen Geweben benötigt nicht Tage, sondern Wochen. Während dieser Zeit muß die Gewebedifferenzierung eingeleitet und aufrecht erhalten werden (Tabelle 1), da man schließlich ein möglichst typisches Gewebe generieren möchte. Dies bedeutet, daß während der gesamten Zeit ein optimales

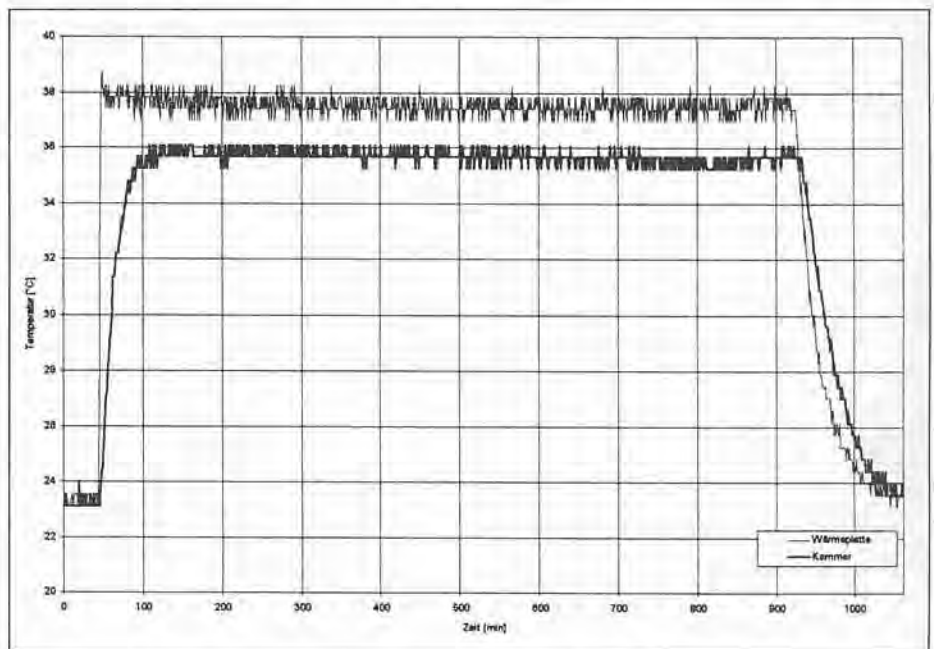


Diagramm 1: Temperaturkontrolle während der Perfusionkultur

wenn die Kulturen optimalen Ernährungsbedingungen ausgesetzt sind [2,3]. Dazu gehören eine kontinuierliche Zufuhr von frischem Kulturmedium und eine permanente Entfernung von stoffwechselschädigenden Metaboliten. Diese optimierten Kulturbedingungen werden in einem eigens dafür konstruierten Perfusionkulturcontainer erreicht (Abb. 4,5), in welchen die neu entwickelten Gewebeträger eingesetzt werden (Abb. 3). An der Bodenplatte des Containers strömt permanent frisches Kulturmedi-

um ein, auf der Deckelseite verläßt das verbrauchte Kulturmedium den Container. Durch eine Glasabdeckung im Container läßt sich der Zustand des reifenden Gewebes verfolgen. Eine Kontrolle der Stoffwechselmetabolite erfolgt durch einen speziellen Port am Containerboden oder durch einen der zu- und abführenden Silikon-schläuche.

Environment für die Kulturen aufrecht erhalten werden muß. Unerlässlich ist deshalb ein möglichst lückenloses Qualitätsmanagement [21]. Sollten sich z.B. unerwünschte Veränderungen am Gewebe einstellen oder Minderversorgungen ergeben, so können diese Mängel sofort erkannt und beseitigt werden. Erforderlich sind deshalb u.a. eine Kontrolle über die kontinuierliche Erneuerung des Kulturmediums, eine Konstanz der Umgebungstemperatur und eine Erfassung der wesentli-

chen Stoffwechselmetabolite (Diagramm 1,2; Tabelle 2). Wesentliches Ziel bei unseren gesamten Arbeiten ist, daß mit möglichst übersichtlichen, einfachen und damit störungsunempfindlichen Geräten gearbeitet wird. Benötigt werden dazu Perfusionskulturcontainer, die über Silikonschläuche mit einer Peristaltikpumpe verbunden sind und damit immer frisches Kulturmedium zugeführt bekommen (Abb. 2). Eine Wärmeplatte mit einer speziellen Abdeckhaube sorgt für die notwendige Temperierung der Kulturen.

### Temperaturerfassung

Eine kontinuierliche Temperaturkontrolle kann durchgeführt werden, indem entweder ein Temperaturlogger oder ein Temperaturfühler in einen eigens dafür vorgesehenen Port im Perfusionscontainer eingesetzt wird (Diagramm 1). Die Darstellung zeigt über

### Perfusionskontrolle

Artifizielle Gewebe können sich nur dann optimal entwickeln, wenn sie kontinuierlich mit immer frischem Medium versorgt werden. Bei unseren Arbeiten transportiert eine Peristaltikpumpe über dünnwandige Silikonschläuche kontinuierlich frisches Kulturmedium aus einer Vorratsflasche in den Perfusionskulturcontainer, während das verbrauchte Medium in eine Abfallflasche fließt. Die Oxygenierung des Mediums findet per Diffusion an den Wänden der relativ langen Silikonschläuche statt. Da CO<sub>2</sub>-unabhängiges Kulturmedium verwendet wird, kann die Perfusionskultur außerhalb eines Inkubators auf jedem Labortisch für Wochen und Monate durchgeführt werden. Wichtig zu wissen ist dabei, ob kontinuierlich frisches Medium das reife Gewebe erreicht hat. Gearbeitet wird bei den von uns hergestellten Geweben mit Perfusi-

(Diagramm 2). Wenn zusätzlich eine RS 232 Schnittstelle genutzt wird, können die Wiegedaten auf einen Personal Computer per Kabel oder Telemetrie übertragen und gespeichert werden.

### Physiologische Parameter

Physiologisch wichtige Daten des Kulturmediums lassen sich sehr leicht mit dem Blutgasanalysator Stat Profile 9 Plus (Nova Biomedical, Rödermark) durchführen (Tabelle 2). Dazu wird aus einem speziellen Port des Perfusionskulturcontainers eine Probe mit einer sterilen 1 ml Spritze entnommen. Zusätzlich können auch T-Stücke in den zu- oder abführenden Schlauch des Perfusionskulturcontainers eingesetzt werden, um die Probe zu entnehmen. Aus einer unverdünnten 200 µl Probe lassen sich innerhalb von zwei Minuten neben Elektrolytwerten (Tabelle 2) zusätzlich wichtige Parameter wie Glukosegehalt, Laktatkonzentration, pH, pO<sub>2</sub>, pCO<sub>2</sub> und die Osmolarität bestimmen. Mit dieser Methode werden überraschend große Unterschiede in der Elektrolytzusammensetzung z.B. zwischen dem Serum von Kaninchen und kommerziell erhältlichem Kulturmedium (IMDM) festgestellt.

Die bisherigen experimentellen Daten zeigen, daß bei der Herstellung von künstlichen Geweben in drei Schritten vorgegangen werden muß. Für die Zellvermehrung dienen konventionelle Kulturgefäße, während für die Differenzierungsphase optimierte Kulturverfahren angewendet werden müssen (Tabelle 1). Benötigt werden eine von den Zellen akzeptierte Biomatrix, spezielle Gewebeträger und Perfusionskulturcontainer. Unerlässlich wird in Zukunft bei der Herstellung von künstlichen Geweben zudem ein Qualitätsmanagement sein, mit dem nachgewiesen werden kann, ob die Kulturen unter optimalen Bedingungen hergestellt wurden.

Anmerkung: Die Untersuchungen wurden z.T. unterstützt von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Mi 331/4-2). Besonderer Dank gilt der technischen Mitarbeit von Frau E. Eckert. Informationen zum Tissue engineering und dessen technische Möglichkeiten sind kostenlos zu beziehen über MINUCELLS and MINUTISUE Vertriebs GmbH, Starenstraße 2, D-93077 Bad Abbach, FAX: 49 (0) 9405 962441 oder E-mail: minucells.minutisue@t-online.de

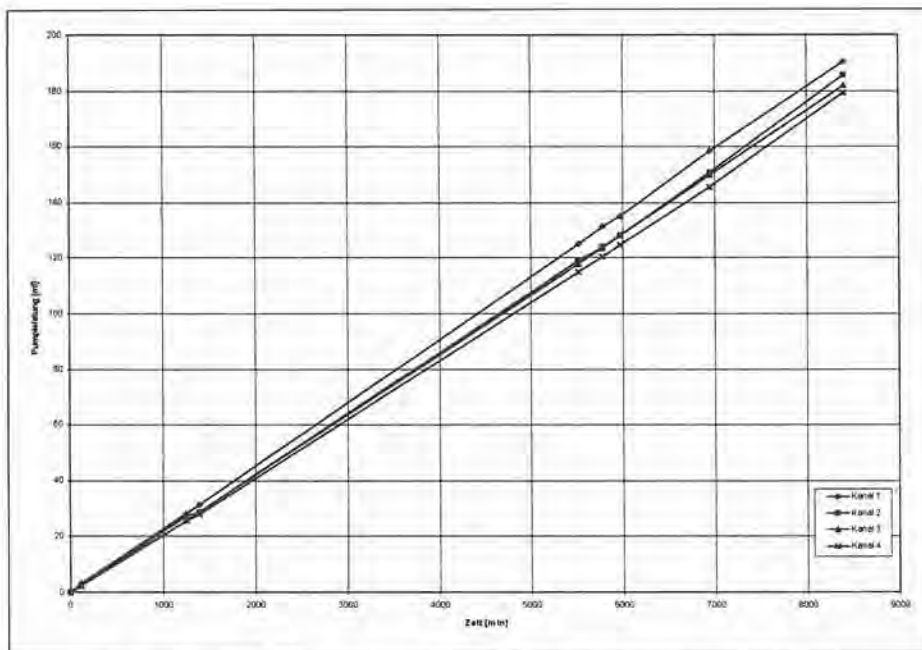


Diagramm 2: Kontrolle der Pumprate während der Perfusionskultur

einen Zeitraum von 1000 Minuten die registrierte Temperatur. Nach dem Einschalten der Wärmeplatte steigt die Temperatur innerhalb des Perfusionskulturcontainers auf den gewünschten Wert an und wird dann über den definierten Zeitraum konstant gehalten. Die mit einer Abweichung von +/- 0.5 °C innerhalb des Kulturcontainers registrierten Daten können über eine Telemetrieeinrichtung kabellos auf einen Personal Computer überspielt und kontinuierlich aufgezeichnet werden.

onsraten zwischen 0.5 und 5 ml/h. Mit elektronischen Durchflusssensoren können diese relativ kleinen Durchflußmengen unserer Erfahrung nach nur unbefriedigend registriert werden. Aus diesem Grunde haben wir die Flaschen mit dem verbrauchten Kulturmedium auf eine elektronische Laborwaage gestellt. Damit kann exakt, preiswert und sehr einfach über beliebige Zeiträume die linear zunehmende Flüssigkeitsmenge von z.B. vier Pumpkanälen registriert werden

## Literatur:

- [1] Brittberg M., Lindahl A., Nilsson A., Ohlsson C., Isaksson O., Peterson L.: Treatment of Deep Cartilage Defects in the Knee With Autologous Chondrocyte Transplantation. *N. Engl. J. Med* 331:889-895 (1994)
- [2] Sittering M., Bujia J., Hammer C., Minuth W. W., Burmester G. R.: Engineering of Cartilage Tissue Using Bioresorbable Polymer Carriers in Perfusion Culture. *Biomaterials* 15:451-456 (1994)
- [3] Sittering M., Bujia J., Rotter N., Reitzel D., Minuth W. W., Burmester G. R.: Tissue Engineering and Autologous Transplant Formation: Practical Approaches With Resorbable Biomaterials and New Cell Culture Techniques. *Biomaterials* 17:237-242 (1996)
- [4] Stoclet J. C., Andriantsitohaina, R., L'heureux, N., Germain, L., Auger F.: Use of Human Vessels and Human Vascular Smooth Muscle Cells in Pharmacology. *Cell. Biol. Tox.* 12: 223-225 (1996)
- [5] Kloth S., Ebenbeck C., Kubitzka M., Schmidbauer A., Röckl W., Minuth W. W.: Stimulation of Renal Microvascular Development Under Organotypic Culture Conditions. *FASEB J.* 9:963-967 (1995)
- [6] Dixit, V., Gitnick, G.: Artificial Liver Support: State of the Art. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.* 220: 101-114 (1996)
- [7] Jauregui H. O., Chowdhury N. R., Chowdhury J. R.: Use Of Mammalian Liver Cells For Artificial Liver Support. *Cell Transplantation* 5(3):353-367 (1996)
- [8] Deng S., Ketchum R. J., Levy M. M., Perloff J. R., White D. J. G., Naji A., Brayman K.L.: Long-Term Culture or Complement Inhibition Improves Early Islet Function in Dog to Rat Islet Xenotransplantation. *Proceedings* 28(2):805-806 (1996)
- [9] Humes H.D.: Application of Gene and Cell Therapies in the Tissue Engineering of a Bioartificial Kidney. *The International Journal of Artificial Organs* 19(4):215-217 (1996)
- [10] Cieslinski D. A., Humes H. D., Deborah A.: Tissue Engineering of a Bioartificial Kidney. *Biotechnology and Bioengineering* 43:678-681 (1993)
- [11] Boyce S. T., Goretsky M. J., Greenhalgh D. G., Kagan R. J., Rieman M. T., Warden G.D.: Comparative Assessment of Cultured Skin Substitutes and Native Skin Autograft for Treatment of Full-Thickness Burns. *Annals of Surgery* 222(6):743-752 (1995)
- [12] von Donnersmarck G. H., Mühlbauer W., Höfter E., Hartinger A.: Die Verwendung von Keratinozytenkulturen in der Schwerbrandverletztenbehandlung-bisherige Erfahrungen, Ausblicke zur weiteren Entwicklung. *Unfallchirurg* 98:229-232 (1995)
- [13] Sittering M., Schulz O., Golla J., Keyßer G., Burmester G. R.: Artificial Cartilage: *in vitro* Model for Destructive Joint Diseases. XXII Congress European Society for Artificial Organs, Berlin, *J. Art. Org.* 18:470 (1995)
- [14] Schulz O., Keyszer G., Sittering M., Burmester G. R.: Development of *in vitro* Model Systems for Destructive Joint Diseases. Novel Strategies to Establish Inflammatory Pannus. *Arthritis and Rheumatism*, in press (1997)
- [15] Bujia J., Sittering M., Minuth W. W., Hammer C., Burmester G., Kastenbauer E.: Engineering of Cartilage Tissue Using Bioresorbable Polymer Fleeces and Perfusion Culture. *Acta Otolaryngol.* 115:307-310 (1995)
- [16] Minuth W. W., Aigner J., Kubat B., Kloth S.: Improved Differentiation of Renal Tubular Epithelium *in vitro*: Potential for Tissue Engineering. *Exp Nephrol* 5:10-17 (1997)
- [17] Doyle A. et al. *Cell & Tissue Culture. Laboratory Procedures* John Wiley & Sons, Chichester (1993)
- [18] Rivard, C. H., Chaput, C., Rhalmi, S., Selmani, A.: Bio-Absorbable Synthetic Polyesters and Tissue Regeneration. A Study of Three-Dimensional Proliferation of Ovine Chondrocytes and Osteoblasts. *Ann Chir* 50,8: 651-658 (1996)
- [19] Reddi A. H.: Symbiosis of Biotechnology and Biomaterials: Applications in Tissue Engineering of Bone and Cartilage. *J. Cell. Biochem.* 56(2):192-5 (1994)
- [20] Minuth, W. W., Sittering M., Kloth, S.: Tissue Engineering - Generation of Differentiated Artificial Tissues for Biomedical Applications. *Cell. Tissue Res.* in press (1997)
- [21] Sittering, M., Schultz, O., Keyszer G., Minuth, W. W., Burmester, G. R.: Artificial Tissues in Perfusion Culture. *Int. J. Artif. Org.* 20,1: 57-62 (1997)
- [22] Perka C., Lindenhayn K., Heilmann H. H., Sittering M., Muschik M.: Experimentelle Untersuchungen mechanisch induzierter Gelenkknorpeldefekte nach Implantation allogener embryonaler Chondrozyten in einem Kollagen-Fibrin-Gel beim Huhn. *Zeitschrift für Orthopädie* 134:562-571 (1996)
- [23] Bujia J., Alsalameh S., Naumann A., Wilmes E., Sittering M., Burmester G. R.: Humoral Immune Response Against Minor Collagens Type IX and XI in Patients Suffering From Cartilage Graft Resorption After Reconstructive Surgery. *Ann. Rheum. Dis.* 53:229-234 (1994)

## Tools for Tissue engineering

BIOTECHNICA Halle 002, Stand B45 vom 21.-23.10.1997 in Hannover.

MINUCELLS and MINUTISSUE Vertriebs GmbH

Starenstraße 2, D-93077 Bad Abbach  
FAX: 49 (0) 9405 962441; E-mail: minucells.minutissue@t-online.de

## Korrespondenz:

Prof. Dr. Will W. Minuth, Universität Regensburg, Institut für Anatomie, Universitätsstraße 31, D-93053 Regensburg, FAX: 0941 / 9 43 28 68, E -mail: will.minuth.@vkl.uni-regensburg.de