

Tissue engineering – Schwierigkeiten und Chancen bei der Herstellung künstlicher Gewebe

WILL W. MINUTH • KARL SCHUMACHER

Institut für Molekulare und Zelluläre Anatomie, Universität Regensburg

Zusammenfassung

Eine der großen Herausforderungen in der Biomedizin ist die Herstellung von therapeutisch nutzbaren Geweben und Organanteilen aus kultivierten Zellen. Der derzeitige experimentelle Status zeigt, daß es Fortschritte bei der Generierung von artifiziellen Geweben gibt. Tatsache ist aber auch, daß in Gewebekonstrukten bedeutende funktionelle Eigenschaften häufig nicht genügend entwickelt sind. Bindegewebezellen z.B. bilden keine wirklich mechanisch belastbare extrazelluläre Matrix, kultivierte Leberparenchymzellen zeigen eine ungenügende Entgiftungsleistung, pankreatische Inselzellen verlieren mit der Zeit die Fähigkeit zur Insulinproduktion, Epithelien der Niere haben zu wenig Exkretionsfunktionen. Wissenschaftliche Aufgabe ist deshalb, verlässliche Methoden zur Herstellung von funktionellen Gewebekonstrukten zu entwickeln. Besonders wichtig ist dabei die Konstruktion von Mikroreaktoren, in denen Gewebe in Verbindung mit einem Scaffold optimal reifen können. Nicht weniger bedeutend ist der kritische Blick auf die Qualität der Gewebe, die unter in vitro Bedingungen hergestellt werden. Artifiizielle Gewebe werden nur dann nutzen, wenn sie risikofrei angewendet werden können.

Einleitung

Die Generierung von künstlichen Geweben und Organanteilen ist eine der großen künftigen Herausforderungen in der Biomedizin. Dabei soll verloren gegangene Regenerationsfähigkeit mit Hilfe artifiizieller Implantate oder Biomodule wieder gewonnen werden. Vorzugsweise werden dazu Zellen des Patienten aus intakten Gewebereichen isoliert oder unterschiedliche Arten von Stammzellen verwendet, um unter Kulturbedingungen regenerationsfähiges Gewebe herzustellen. Dazu müssen die verwendeten Zellen in einem ersten Schritt in genügender Menge vermehrt werden, um

dann in einem zweiten Schritt Gewebekonstrukte daraus herzustellen. Weil die vier Grundgewebe ganz unterschiedlich aufgebaut sind, müssen für Epithel-, Binde-, Muskel- und Nervengewebe auch ganz verschiedene Kulturstrategien angewendet werden. Jedes dieser Grundgewebe mit seinen zahlreichen Facetten hat seine speziellen Bedürfnisse, die bei der Generierung berücksichtigt werden müssen.

Die Therapieformen und Strategievorstellungen beim Tissue engineering sind vielfältig (Abb. 1). Bei der Zelltherapie z.B. werden isoliert vorliegende Zellen verwendet, die in einem geeigneten Umgebungsmilieu vermehrt und mit einer Pipette, Sprayer oder Spritze appliziert werden. Ganz anders geht man bei der Gewebeimplantation vor. Dazu werden die jeweiligen Zellen auf einer extrazellulären Matrix (Scaffold) angesiedelt. Je nach Kulturbedingungen entwickeln sich daraus mehr oder weniger gereifte Gewebe. Mit einer Pinzette können die Gewebekonstrukte dann in den jeweiligen Defekt eingelegt werden. Komplexer gestaltet sich die Herstellung von Organoiden. Dabei handelt es sich um Kompositkonstrukte, die aus mehreren Geweben aufgebaut sind. Bei der Herstellung von einem Blutgefäß z.B. muß zuerst eine Tunica media mit glatten Muskelzellen angelegt werden, die zum Lumen hin von einem Endothel

begrenzt wird und nach außen von der Adventitia bedeckt ist. Nicht weniger schwierig ist die Generierung von künstlichen Organstrukturen. Dazu werden Parenchymzellen mit einem künstlichen Stroma in Modulen angesiedelt, die dann als Implantate oder als Bioreaktoren mit hohem technischen Aufwand am Krankenbett das Überleben von Patienten sichern (1).

Zelle und Scaffold

Funktionelle Gewebe, Organoide und artifiizielle Organe können nur dann entstehen, wenn die jeweiligen Zellen auf einer geeigneten extrazellulären Matrix angesiedelt werden (Abb. 2). Ob dabei natürlich vorkommende Kollagene oder synthetische Polymere verwendet werden, hängt vom Zelltyp und der jeweiligen Anwendung ab. Spannend wird der Moment, wenn die Zellen den primären Kontakt mit einem Scaffold haben. Allein die Zellen entscheiden, ob sie anhaften, wandern, ob sie eine homogene Verteilung zeigen oder ob sie Gruppen bilden und damit Teile des Scaffold nicht besiedeln. Mit zunehmender Kulturdauer zeigt sich dann, inwieweit gewebetypische Eigenschaften entstehen und ob atypische Proteine ausgebildet werden. Häufig kommt es zu Veränderungen des Proteinexpressionsmusters durch einen Genswitch. Ein typisches Beispiel ist die Umschaltung der Syn-

Art der Therapie:			
Zelltherapie	Gewebeimplantation	Organoide	Artifiizielle Organe
Beispiele:			
Keratinozyten	Knorpel	Haut	Pankreas
Chondrozyten	Knochen	Herzklappen	Leber
Stammzellen	Sehne	Blutgefäße	Niere
	Muskel	Ösophagus	
	Epithel	Harnblase	
	Nervengewebe		
Komplexität:			
Einzelzelle	Grundgewebe	Kompositgewebe	Parenchym/Stroma

Abb. 1: Unterschiedliche Arten des Tissue engineering.

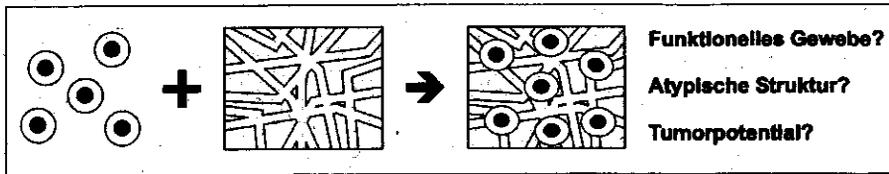


Abb. 2: Bedeutung eines Scaffolds für die Entstehung von Gewebekonstrukten.

these von typischem Kollagen Typ II in atypisches Kollagen Typ I bei Knorpelkonstrukten, wodurch wenig belastbare extrazelluläre Matrix entsteht. Garantiert ist in keinem Fall, daß die Zellen in einem Scaffold ein gleichartiges Differenzierungsprofil entwickeln. Potentielle Gefahr ist, daß ein Teil der Zellen sich nicht gewebetypisch entwickelt, sondern aus dem implantierten Konstrukt auswandert und Tumore oder ekto- pische Gewebe bildet (2).

Komplexe Gewebeentwicklung

Die Entwicklung von reifenden Geweben geschieht nicht automatisch, sondern muß experimentell gesteuert werden (Abb. 3). Nicht ein einzelner Wachstumsfaktor, sondern eine Vielzahl von Einflüssen steuern die Entwicklung von Geweben. Dazu gehören die Steuerung der Entwicklungsrichtung durch ein Morphogen oder die Zellvermehrung durch Wachstumsfaktoren, der positive Einfluß der extrazellulären Matrix und die Interaktion der Zellen untereinander. Definiert wird in dieser Phase z.B. eine besonders enge Nachbarschaftsbeziehung der Zellen bei Epithelien oder die Separatlage von Chondronen im hyalinen Knorpel. Werden die Kulturbedingungen optimal gewählt, so entwickeln sich erste Ansätze von Geweben. Aus diesen unreifen Vorstufen müssen sich im folgenden jedoch Konstrukte mit funktionellen Eigenschaften entwickeln. Dazu werden die Kulturen in optimalen Nährmedien und einer ge-

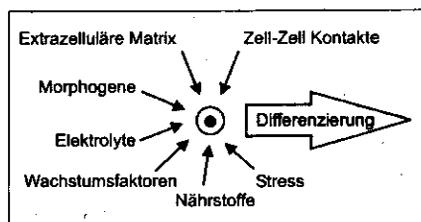


Abb. 3: Steuerung der Gewebeentwicklung durch eine Vielzahl an Faktoren.

webespezifischen Sauerstoffversorgung gehalten. Große Bedeutung für die Entwicklung hat die Stimulierung durch natürlich vorkommenden rheologischen und hydrostatischen Stress. Erst im Zusammenwirken all dieser Faktoren wird sich wirklich funktionelles Gewebe entwickeln (2).

Gewebeträger und Mikroreaktoren

In dem statischen Milieu einer Kulturschale können in keinem Fall die notwendigen Bedingungen zur Generierung von optimalen Gewebekonstrukten simuliert werden. Aus diesem Grund arbeiten wir mit innovativen Kulturmethoden, mit denen individuell die Kulturparameter den Bedürfnissen der Gewebekonstrukte angepaßt werden können (Abb. 4). Je nach Gewebe wird zuerst ein optimaler Scaffold ausgewählt (Abb. 4a). Um Mikroverletzungen zu vermeiden, wird der mit Zellen besiedelte Scaffold dann in einen Gewebeträger eingelegt (Abb. 4b). Danach werden die Gewebeträger in Mikroreaktoren überführt, die permanent mit immer frischem Kulturmedium versorgt werden (Abb. 4c). Im einfachsten Fall umspült das Kulturmedium das Gewebekonstrukt. Epithelien können in Gradientencontainern gehalten werden, die wie unter natürlichen Bedingungen luminal und basal mit unterschiedlichen Medien durchströmt werden. Rheologischer und hydrostatischer Stress werden erzeugt, indem eine Wand des Containers aus elastischem Material konstruiert ist. Ein rotierender Excenter führt zu elastischen Deformierung dieser Wandung, wodurch im Innern des Containers Stress mit unterschiedlicher Intensität aufgebaut werden kann. Eine Wärmeplatte mit Abdeckung liefert die richtige Temperatur und eine Peristaltikpumpe transportiert kontinuierlich das Kulturmedium mit 1 ml/h zum Container. Eventuell entstehende Luftblasen werden in einem Gasexpandermodul elimi-

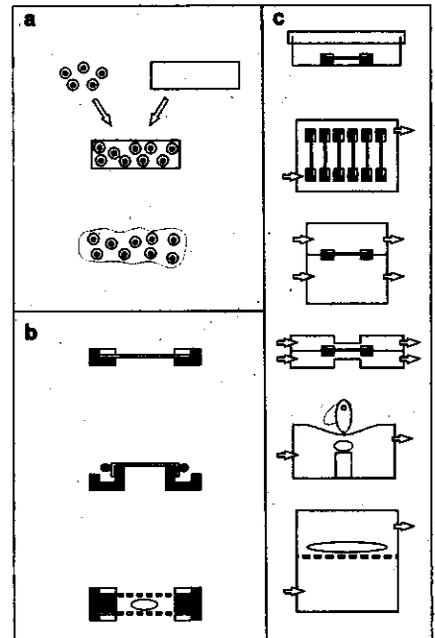


Abb. 4: Gewebegenerierung mit innovativen Kulturmethoden. Geeigneter Scaffold (a), geeigneter Gewebeträger (b), unterschiedliche Konstruktionsprinzipien eines Kulturcontainers (c).

niert, bevor das Medium den Kulturcontainer erreicht. Gaspermeable Silikon-schläuche ermöglichen den notwendigen Gasaustausch bei der Durchleitung des Kulturmediums. Nach Justierung des pH im Medium gegen atmosphärische Luft arbeitet das System auf einem Labortisch über mehrere Wochen bis zur gewünschten Reifung der Gewebekonstrukte.

Stammzellnische

Im Fokus unserer wissenschaftlichen Arbeiten stehen die Stammzellen der Niere. Um ihre Entwicklungspotenz therapeutisch evaluieren zu können, benötigen wir exakte Kenntnisse zum Environment ihres Lebensraumes. Experimentell erarbeiten wir eine Technik, um unter in-vitro Bedingungen renale Tubuli zu generieren. Die Besonderheit der Nierenentwicklung ist darin zu sehen, daß dieses komplexe Organ aus zwei ganz unterschiedlichen Stammzellpopulationen entsteht. Dazu gehören einerseits die epithelialen Stammzellen der Sammelrohrampulle und andererseits die nephrogenen mesenchymalen Stammzellen (3). Vor kurzem konnten wir zei-

gen, daß beide Stammzellpopulationen eine unerwartet enge strukturelle Beziehung zueinander haben.

Histochemische Makierungsexperimente mit dem Lektin Soybean Agglutinin (SBA) zeigen, daß Mikrofasern am basalen Aspekt der Sammelrohrampulle ihren Ursprung haben, durch die mesenchymale Stammzellpopulation ziehen und an der Organkapsel enden (Abb. 5a)

wenige Zellen des Epithels Reaktion mit einem Antikörper, der die Hauptzellen (Principal Cells) erkennt. Wird dagegen dem luminalen IMDM 12 mmol/l NaCl zugegeben, so verändert sich das Differenzierungsprofil drastisch. Fast alle Zellen werden jetzt von dem Antikörper markiert. Wird am 15. Tag NaCl wieder reduziert, so ist zu erkennen, daß einzelne Eigenschaften erhalten bleiben, wäh-

lassen sich zudem inhibitorische und wachstumsfördernde Effekte auf das benachbart wachsende Gewebe ausüben. Kulturexperimente mit renalen Stammzellpopulationen zeigen erstmals, daß sich mit dieser Methode Tubulusstrukturen generieren lassen (Abb. 5c). Das Differenzierungsprofil der Tubuli kann mit Antikörpern oder Lektinen analysiert werden. Funktionelle Zellen können mit PNA, SBA, Cox-2 und TROMA-1 nachgewiesen werden. Markierung mit PCD Amp1 dagegen zeigt, daß neben adulten auch noch embryonale Eigenschaften in den Konstrukten enthalten sind (6).

Wir stehen erst am Anfang unserer Untersuchungen. Zukünftig wollen wir erarbeiten, wie die Entwicklung von halb gereiften Strukturen zu funktionellen Tubuli experimentell eindeutig gesteuert werden kann. Einen großen Forschungsbedarf gibt es hier nicht nur für die renalen Stammzellen, sondern auch für alle anderen Arten von Stammzellen.

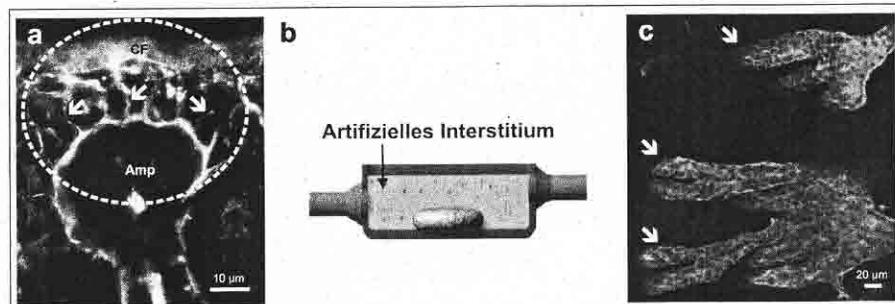


Abb. 5: Von der renalen Stammzellnische (a) mit innovativer Kulturtechnik (b) zum Tubulus (c).

(4). Immunhistochemische Markierungsexperimente beweisen, daß die Mikrofasern nicht identisch mit bisher bekannten Strukturelementen oder Proteinen der extrazellulären Matrix sind. Deutlich wird, daß die epithelialen und mesenchymalen Stammzellen der Niere in einer dreidimensionalen und damit speziell strukturierten Nische vorkommen.

Von der Stammzelle zum Epithel

Das Ziel unserer Arbeit ist die Generierung von Tubulusstrukturen aus renalen Stammzellen, die wir aus der Niere von neugeborenen Kaninchen gewinnen. Im Vergleich zu anderen Spezies hat dies den Vorteil, daß für Gewebekulturen sowie für zellbiologische und biochemische Experimente Zellmaterial in genügender Menge gewonnen werden kann. Dazu wird die Organkapsel mit anhaftendem embryonalen Gewebe mikrochirurgisch isoliert (5). Das Häutchenpräparat wird dann auf einen Gewebeträger mit einem Durchmesser von 6 mm aufgespannt. Auf der Oberfläche des Präparates entwickelt sich ein flaches Sammelrohrethel. Völlig neu war die Erfahrung, wie sensitiv embryonale Sammelrohrethelien auf Umgebungsveränderungen reagieren. Werden die Epithelien für 14 Tage auf beiden Seiten mit serumfreiem IMDM in einem Gradientencontainer gehalten, so zeigen nur

rend andere im Laufe von Tagen verloren gehen. Die Resultate zeigen, daß das Elektrolytmilieu einerseits einzelne Differenzierungseigenschaften zu induzieren vermag und andererseits spezielle Eigenschaften aufrecht erhält.

Renale Tubuli

Das Parenchym der Niere besteht nicht aus einem flachen Epithelien, sondern aus dreidimensionalen Tubulusstrukturen. Deshalb müssen die renalen Stammzellen experimentell zur Bildung von Tubulusstrukturen veranlaßt werden. Dies versuchen wir durch Anpassung des extrazellulären Milieus. Dabei soll das Mikromilieu zwischen dem reifendem Gewebe und dem vorbei strömenden Medium entscheidend verbessert werden. Normalerweise umgibt ein Gewebekonstrukt in einer Kulturschale oder in einem Perfusionscontainer viel Medium, d.h. es ist ein großes Totraumvolumen vorhanden. Durch Reduktion der Kammergeometrie läßt sich das Totraumvolumen verkleinern, aber nicht minimalisieren. Aus diesem Grund werden von uns z.B. Polyesterfliese als künstliches Interstitium in das Totraumvolumen eines Kulturcontainers eingelegt (Abb. 5b). Damit können die Flußeigenschaften des Mediums entscheidend verbessert werden. Durch die Auswahl von unterschiedlichen Vliesen

Literatur

- (1) GERLACH, J.C., MUTIG, K., SAUER, I.M. et al.: Use of primary human liver cells originating from discarded grafts in a bioreactor for liver support therapy and the prospects of culturing adult liver stem cells in bioreactors: a morphologic study. *Transplantation* 76, 781 (2003)
- (2) MINUTH, W.W., STREHL, R., SCHUMACHER, K.: *Zukunftstechnologie Tissue Engineering - Von der Zellbiologie zum künstlichen Gewebe*. Weinheim WILEY-VCH Verlag (2003)
- (3) AL-AWQATI, Q., OLIVER, J.A.: Stem cells in the kidney. *Kidney Int.* 61, 387 (2002)
- (4) SCHUMACHER, K., STREHL, R., DE VRIES, U. et al.: SBA-positive fibers between the CD ampulla, mesenchyme, and renal capsule. *J. Am. Soc. Nephrol.* 13, 2446 (2002)
- (5) MINUTH, W.W.: Neonatal rabbit kidney cortex in culture as tool for the study of collecting duct formation and nephron differentiation. *Differentiation* 36, 12 (1987)
- (6) STREHL, R., KLOTH, S., AIGNER, J. et al.: PCD Amp1, a new antigen at the interface of the embryonic collecting duct epithelium and the nephrogenic mesenchyme. *Kidney Int.* 52, 1469 (1997)

Anmerkung: Informationen zum Kultursystem sind erhältlich unter www.minucells.de

Korrespondenzanschrift:

Prof. Dr. Will W. Minuth
 Institut für Molekulare und Zelluläre
 Anatomie, Universität Regensburg
 Universitätsstraße 31, 93053 Regensburg
 e-mail: will.minuth@vkl.uni-regensburg.de