

# Tissue Engineering: Gewebe aus der Retorte



*Defekte Körpergewebe oder Organe durch natürliche Äquivalente zu ersetzen ist das Ziel einer noch jungen Forschungsrichtung: Beim Tissue Engineering arbeiten Mediziner und Zellbiologen mit Materialforschern und Ingenieuren zusammen, um aus therapeutischen Visionen marktfähige Produkte zu machen.*

**I** Durch Gewebe und Organe, die im Labor aus körpereigenen Zellen gezüchtet werden, bieten sich phantastische therapeutische und kommerzielle Perspektiven für die Medizin. Doch erst wenige Firmen in Deutschland wagen sich mit eigenen Produktentwicklungen in das schwierige Gebiet des Tissue Engineering vor.

HELMUT BRUCKNER\*

Von manchen Organismen sind erstaunliche Regenerationsleistungen bekannt: Werden beispielsweise Strudelwürmer (*Turbellaria*) mit einem glatten Schnitt quer zerteilt, bildet sich aus dem vorderen und dem hinteren Körperabschnitt wieder je ein vollständiges Tier. Weniger spektakuläre, doch prinzipiell ähnliche Fähigkeiten schlummern auch im Menschen, wie an der Reparatur von Verletzungen durch Wundheilung oder am Zusammenwachsen gebrochener Knochen zu sehen ist. Diesen regenerativen Kräften der Natur ist die Wissenschaft auf der Spur, seit mit Beginn des 20. Jahrhunderts an isolierten Zellen experimentiert wird. Doch erst 1975 gelang es, menschliche Hautzellen außerhalb des Körpers zu vermehren. Die erste klinische Tissue-Engineering-Anwendung fand im Jahr 1981 statt, als gezüchtete patienteneigene Hautzellen zur Ersetzung verbrannter Hautareale verwendet wurden. Der Begriff Tissue Engineering (TE) wurde

erstmalig 1987 von der US-amerikanischen National Science Foundation geprägt. Gemeint ist damit die Konstruktion von Gewebe durch Vermehrung und Kultivierung lebender Zellen außerhalb des Organismus. Zum Spektrum der TE-Verfahren gehört es, die körpereigene Regenerationsfähigkeit durch Implantation lebender Zellen anzuregen sowie geschädigte oder verloren gegangene Gewebe durch biologische Konstrukte aus dem Labor zu ersetzen. Eines der längerfristigen Ziele ist es, technische Biomodule zu bauen, die in der Lage sind, sogar Organfunktionen zu übernehmen.

Um die zahlreichen Vorhaben im Bereich des Tissue Engineering zu realisieren, müssen noch viele Wissenslücken über die natürlichen Potenzen des biologischen „Rohmaterials“ geschlossen werden.

## Zurück zu den Ursprüngen

Ein starker Impuls, das Tissue Engineering als eigenständigen Forschungszweig zu forcieren, ergibt sich aus den Schranken, mit denen sich die bisherige Transplantationsmedizin herumschlagen muss:

Bei der Verpflanzung von Fremdgewebe lassen sich in allzu vielen Fällen die vom Immunsystem des Empfängers ausgelösten Abstoßungsreaktionen medikamentös nicht ausreichend beherrschen. So gibt es einen ständigen Mangel an immunologisch geeigneten Ersatzgeweben und Spenderorganen. Ein eleganter Ausweg wären TE-Konstrukte, die aus autologen, das heißt vom Patienten selbst stammenden Zellen hergestellt werden.

Doch so bestechend die Idee auch klingt, so schwierig ist ihre Umsetzung. Die artifiziellen Gebilde aus den Tissue Engineering-Laboren müssen nicht nur gewebeverträglich sein sowie die gewünschte Form und Masse liefern, sondern auch in vollem Umfang die Funktionen des spezialisierten Gewebes erbringen, das sie ersetzen sollen. Wie also kann die Natur möglichst genau kopiert werden? Bei der Entstehung jedes Individuums entwickeln sich die gewebetypischen Zellen mit Beginn der frühembryonalen Phase nach und nach aus zunächst undifferenzierten Zellen. Beim erwachsenen Menschen ist der Differenzierungsprozess, in dessen Verlauf mehr als 200 verschiedene Zelltypen entstehen, abgeschlossen und wird normalerweise nicht mehr rückgängig gemacht.

## Problematische Hoffnungsträger

Als Ausgangspunkt für TE-Projekte bieten sich Stammzellen an: Sie sind noch

\*Dr. H. Bruckner, Redaktionsbüro Bioscript, 81925 München

nicht spezialisierte Zellen, lassen sich beliebig vermehren und durch den Einsatz von Wachstumsfaktoren und Hormonen prinzipiell zu allen Gewebezelltypen entwickeln. Diese Fähigkeiten der Stammzellen, als Pluripotenz bezeichnet, macht sie also rein wissenschaftlich gesehen zum idealen Ausgangspunkt für artifizielle Implantate. Werden die Stammzellen aus dem eigenen Körper oder Nabelschnurblut entnommen, sind sie immunologisch „unproblematisch“ – nicht jedoch wenn sie aus körperfremdem Gewebe gewonnen werden. Seit es Ende der 1990er Jahre gelang, Stammzellen aus menschlichen Embryonen zu isolieren, wird mit ihnen in vielen Forschungslabors weltweit gearbeitet. In Deutschland ist die Gewinnung embryonaler Stammzellen allerdings aus ethischen Erwägungen verboten.

Stammzellen finden sich jedoch nicht nur in Embryonen und Foeten, sie lassen sich auch in zahlreichen Organen von Erwachsenen nachgewiesen. Diese sogenannten adulten Stammzellen fungieren im Körper als „stille Reserve“ zur Regeneration von Zellen, etwa der Haut, des Blutes oder des Darmepithels, die kontinuierlich erneuert werden müssen.

Aus mesenchymalen Stammzellen (MSC) des adulten Organismus, die aus dem Knochenmark genommen werden, konnten im Labor bereits Zellen der vier Grundgewebe Nerven-, Binde-, Epithel- und Muskelgewebe entwickelt werden. Ob sich daraus jedoch letztlich funktionelle Gewebe herstellen lassen, ist noch ungeklärt.

### Kultur- und Versorgungsprobleme

Die Zellkulturtechnik ist bereits weit entwickelt und bietet eine breite Palette an innovativen Geräten, mit denen sich die gewünschten Zellen schnell vermehren lassen. Die Zellen werden entweder adhären, also in Kontakt mit dem Boden eines Kulturgefäßes gezüchtet oder frei im Kulturmedium schwimmend. Bei einer Kombination beider Methoden haften die Zellen an kleinen porösen Perlen, die durch Rührbewegungen in einer permanenten Schwimmrotation gehalten werden. Gewebe sind allerdings mehr als ein Konglomerat aus vielen Einzelzellen. Es sind komplexe Verbände, in denen diverse Zellen mit unterschiedlichen funktionellen Aufgaben zusammenspielen. Ihre Form und Funktion über einen längeren Zeitraum unter in-vitro-Bedingungen aufrecht zu erhalten, ist daher nicht einfach: Ein heterogen zusammengesetztes Gewebeexplantat in serumhaltiges Kulturmedium gebracht, verändert in kurzer Zeit seine äußere und innere Struktur. Viele Zellen des kultivierten Gewebes verlassen

das Explantat und beginnen auf der Oberfläche oder dem Boden der Kulturschale zu wandern. Ein Vorteil dieses für die Gewebezucht unerwünschten Verhaltens: Durch die Ausgewanderung lassen sich einzelne Zellen ohne den sonst nötigen enzymatischen Aufschluss des Gewebes gewinnen. Die emigrierten Zellen hinterlassen Lücken, die wieder „gefüllt“ werden. Bei dieser Umstrukturierung gehen typische Eigenschaften der funktionellen Gewebe verloren – je nach Gewebetyp in unterschiedlichem Ausmaß. Gründe für diese zelluläre Dedifferenzierung der isolierten Gewebeexplantate sind der Verlust des Gefäßsystems und der neuronalen Steuerung, sowie Defizite bei der Entsorgung von Metaboliten.

Zur Kultivierungstechnik von Gewebekonstrukten gibt es verschiedene Konzepte und Materialien. Statische Milieubedingungen sind bei wachsenden Geweben ungünstig, weil tief gelegene Zellschichten nicht ausreichend mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt werden. Gegenüber Spinner bottles und Rotating bioreactors haben als Kulturgefäße für die Generierung von Geweben daher Hohlfasermodule einen entscheidenden Vorteil: In ihnen kann eine Art Kapillarnetz für das kultivierte Gewebe simuliert werden. Für die Ausführung der Hohlfasern eignen sich Stoffe wie Polysulfon, Acrylpolymer oder Celluloseacetat. Perfusioncontainers bieten sich für die Gewebezüchtung an, da sie gleichmäßig mit frischem Medium durchströmt werden und so ein konstantes Milieu aufrecht erhalten werden kann. Die Qualität des wachsenden Konstruktes lässt sich kontinuierlich über Sensoren kontrollieren. Gradientencontainer simulieren Epithelgewebe, die im Organismus als funktionelle Barrieren wirken, und zwar mit unterschiedlichen Milieus auf ihrer luminalen und basalen Seite. Ein modular aufgebautes System zur Gewebekultivierung mit dem Namen „Tissue Factory“ wurde von der Regensburger Arbeitsgruppe um Professor Minuth aufgebaut.

### Material- und Haftungsfragen

Im Körper sind die Zellen eines Gewebes in die extrazelluläre Matrix (ECM) eingebettet. Diese besteht aus Proteinen und Glykosaminoglykanen, die der mechanischen Stabilität dienen und bei biologischen Interaktionen eine Rolle spielen. Bei der Herstellung von artifiziellen Geweben aus Zellen wird ein Ersatz für diese ECM benötigt. Solche Form und Festigkeit gebenden Matrices werden hergestellt aus tierischen oder menschlichen Geweben, aus chemischen Polymeren oder aus biologisch-chemischen Kompositmaterialien.

Sie können als Membranen, Folien oder Faserstrukturen ausgebildet sein.

Zellen haften gut auf synthetischen Polymeren, wenn die Oberflächen mit Serum benetzt wurden und mit positiv geladenen Gruppen versehen sind. Zur Verbesserung der Adhäsion und der Ausbreitung (Spreading) der Zellen kann die Oberfläche mit extrazellulären Matrixproteinen wie Fibronectin und Vitronectin beschichtet werden. Das Spreading lässt sich auch fördern, indem in die Polymermaterialien biofunktionelle Gruppen eingebaut werden, wie Glykolipide, Oligopeptide und Oligosaccharide. Die Wanderungsrichtung der Zellen lässt sich durch das Guiding, die Einführung von Mikropfaden in den Scaffolds, beeinflussen. Die Zugabe von Substanzen wie Kollagen, Laminin, Tenascin, Vitronectin und Thrombospondin zu den Kulturen wirkt wachstumsfördernd auf die Zellen.

Zur Herstellung von Scaffolds, dreidimensionalen Zellträgergerüsten, werden Polymere mit hoher struktureller Festigkeit, besonderer Oberflächenbeschaffenheit und definierter Porosität benötigt. Als Scaffoldmaterialien für Knorpel- und Knochenkonstruktionen werden meist Hyaluronsäure und ihre Derivate eingesetzt. Generell sind Komposite für Scaffolds besser geeignet als einzelne Substanzen. Bei der Materialauswahl ist man jeweils noch auf experimentelle Vorarbeiten angewiesen, da die Eigenschaften von Biomaterialien noch nicht theoretisch vorher-

zusagen sind. Für eine optimale Gewebeerzeugung muss das Polymermaterial biokompatibel sein. Es gibt auch Scaffoldmaterialien, die mit der Zeit abgebaut und durch neu gebildete, gewebespezifische ECM ersetzt werden. Solche bioabbaubare Substanzen für Scaffolds sind z.B. Homo- und Heteropolymere aus Poly(L-lactat) (PLA), Poly (glycolat) (PGA) und Poly(lac-

tat-co-glycolat) (PLGA). Zu den erwünschten Eigenschaften der Polymere gehört es, dass deren Abbauprodukte in den biologischen Kreislauf des menschlichen Körpers aufgenommen werden. Werden Zellen in Polymermaterial, wie Alginate, Agarose und synthetische Polymere auf der Basis von Polyacryl und Polyphosphaten eingekapselt, dann schützt die Hülle vor immunologischen Reaktionen. Als semipermeable Membran kann die Ummantelung den selektiven Austausch von Stoffen ermöglichen.

### Erste Erfolge...

Tissue Engineering gilt als eine der künftigen Wachstumsbranchen, da schon heute die Nachfrage nach menschlichen „Ersatzteilen“ mit den bisherigen Mitteln nicht ausreichend befriedigt werden kann. Zur Versorgung Schwerstkranker würde gegenwärtig mehr als die doppelte Zahl der verfügbaren Spenderorgane wie Herzen, Nieren oder Lebern benötigt. Die Operationstechniken für Transplantationen und die postoperative Nachsorge sind hochentwickelt, es fehlen gewissermaßen nur noch die TE-Produkte, die nach der Implantation problemlos funktionieren. Interesse an passenden Gewebekonstrukten haben zahlreiche medizinische Disziplinen, wie Orthopädie, Neurologie, Dermatologie oder die plastische Chirurgie.

Relativ weit entwickelt ist bereits der Haut-, Knorpel- und Knochenersatz. Im Labor gezüchtete Hautzellen können zur Behandlung von Verbrennungen, und Knorpelgewebe kann zur Reparatur abgenutzter Gelenkoberflächen eingesetzt werden. Die ersten Produkte sind schon auf dem Markt oder weit fortgeschritten in ihrer klinischen Erprobung. So hat die Freiburger Firma BioTissue Technologies unter dem Namen BioSeed-S „Haut aus der Tube“ entwickelt. Weitere Produkte sind der Ersatz für Mund-

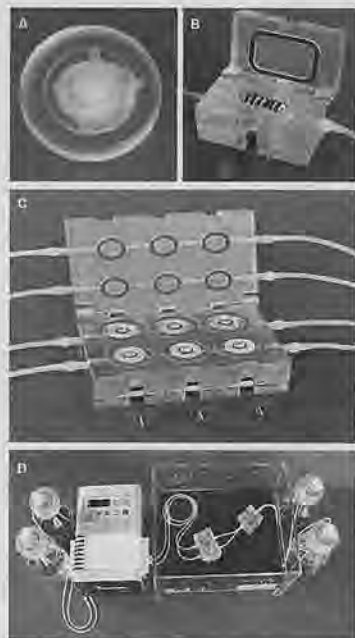
schleimhaut (BioSeed-M), Pigmentzellen (MelanoSeed), Knorpelgewebe (BioSeed-C), Kieferknochen (BioSeed-Oral Bone). Die Firma co.don in Teltow bei Berlin beschäftigt sich mit der Regeneration von Knorpel-, Knochen- und Bandscheibengewebe. Seit 1997 wurden schon über 800 Patienten erfolgreich behandelt: Dazu hat man gesunde Knorpelzellen explantiert, im Labor kultiviert und anschließend wieder ins Knie eingepflanzt.

Zu vielen Tissue Engineering-Projekten gibt es intensive Grundlagenforschung und eine Reihe vielversprechender klinischer Tests: Dazu gehören biologische Herzklappen, Augenhornhaut-Implantate, Herzmuskelzellen zum Einsatz bei Gewebeverlusten nach Herzinfarkt, Skelettmuskelzellen zur Behandlung von Muskeldystrophie, der Aufbau von Nervenverbindungen, um Läsionen des Rückenmarks zu reparieren, die Kultur von Knochenmarkszellen für eine Leukämie-Therapie sowie insulinproduzierende Zellen, die Diabetikern eingepflanzt werden könnten. Die Firma Bioncor in Tübingen erprobt ein Verfahren, bei dem Herzklappen von Schweinen das Ausgangsmaterial sind. Die Herzzellen des Schweins werden vom Kollagen-Stützgerüst der Klappe entfernt und anschließend durch menschliche Herzzellen ersetzt. Erste erfolgreiche Ansätze gibt es beim Versuch, Ersatz-Blutgefäße im Labor zu züchten. Dazu werden Kulturen aus Fibroblasten, glatten Muskelzellen und Endothelzellen angelegt und mit Wachstumsfaktoren stimuliert. Aus den Fibroblasten werden dann kleine Röhrchen geformt, an die außen Muskelzellen, innen Endothelzellen aufgebracht werden. Solche Konstrukte halten bereits einem hohen hydrostatischen Druck stand und werden in absehbarer Zeit etwa als Implantate für Bypass-Operationen Verwendung finden.

### ...und viel Zukunftsmusik

Eines funktionierenden Kapillarsystems bedarf es in allen größeren Gewebekonstrukten, um die Zellen in tieferen Schichten mit Sauerstoff und Nährstoffen zu versorgen. Für solche artifiziellen Gewebe gäbe es zahlreiche Einsatzgebiete, insbesondere nach Unfällen, degenerativen Krankheitsprozessen (wie Parkinson) oder dem Befall mit malignen Tumoren, bei denen ganze Gewebepartien verloren gegangen sind. Mit gezüchteten Geweben ließen sich ausgedehnte Hohlbereiche auffüllen, wie sie beispielsweise nach der Totaloperation eines Mammakarzinoms entstehen.

Zu den sicher erst längerfristig realisierbaren TE-Projekten gehören Bioreaktoren, die lebende Zellen enthalten und



Bilder: Prof. Minuth, Universität Regensburg

### 2 Bildtafel zur Perfusionskultur:

A) Gewebeträger. B) In dem Kulturcontainer mit eingelegten Gewebeträgern wird das Medium permanent erneuert. C) Kultur von Gewebe in einem Gradientencontainer. D) Bei der Gradientenkultur sorgt die Peristaltikpumpe (links) für Zuführung des Mediums, ein Gasexpandermodul eliminiert Luftblasen, verbrauchtes Medium wird in Abfallflaschen (rechts) gesammelt.

die – zumindest vorübergehend – die Funktionen von erkrankten Organen übernehmen. Mit solchen extrakorporalen Organmodulen ließen sich, beispielsweise bei chronischem Nieren- oder Leberversagen, die Wartezeiten auf geeignete Spenderorgane überbrücken.

Es ist bereits gelungen, isolierte menschliche Hepatozyten und Leberparenchymzellen vom Schwein in-vitro über einen längeren Zeitraum am Leben zu erhalten. Auch eingebettet in Module aus Hohlfasern überleben die Leberzellen, doch verrichten sie ihre Entgiftungsarbeit nur für relativ kurze Zeit. Dieselben Probleme treten auch beim sogenannten Sandwichverfahren auf, einem alternativen Ansatz, bei dem die Leberparenchymzellen zwischen zwei permeablen Membranen gehalten werden. Als Alternative zu physikalisch arbeitenden Nieren-Dialysegeräten wird an einem Reaktormodul gearbeitet, das aus einem globulären und einem tubulären Abschnitt besteht. Noch wird nach optimalen Materialien für Membranen gesucht, an die Nierenzellen gut haften. Es gibt also einige hoffnungsvolle Ansätze und jede Menge Bedarf für inno-

vative Produkte aus den Werkstätten der „Gewebe-Konstrukteure“. Doch bisher weiß man noch sehr wenig über die natürlichen Entwicklungsvorgänge bei der Bildung eines spezifischen Gewebes: Welche Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen Zelltypen auftreten und wie sie zusammenspielen mit der extrazellulären Matrix, den Wachstumsfaktoren, Hormonen und biophysikalischen Einflüssen, wie Druck und Sauerstoffgehalt. Da für die Generierung funktionellen Gewebes alle Faktoren und Interaktionen von Bedeutung sind, müssen die entsprechenden in-vitro-Bedingungen erst noch auf experimentellem

Wege optimiert werden. Für jeden einzelnen Anwendungsfall sind eigene Kulturmethoden, Medien und Scaffolds zu erarbeiten. Phänomene wie Zellmigration, Umstrukturierungen und Dedifferenzierung müssen beherrscht werden. Wenn schon für die Herstellung von „einfachen“ Gewebekonstrukten noch etliche kulturtechnische Hürden zu überwinden sind, so gilt das natürlich erst recht für den Bau artifizierlicher Organe. Bei allen hoffnungsvollen Perspektiven und ungeklärten Problemen, die von den Fachleuten sehr unterschiedlich beurteilt werden, bleibt als Fazit festzuhalten: Tissue Engineering ist im Moment eine Branche im Aufbruch.

### Weitere Informationen:

[www.laborpraxis.de](http://www.laborpraxis.de)



InfoClick

104090

- Online zur Arbeitsgruppe von Prof. Minuth
- Das TE-Produktspektrum von BioTissue Technologies
- Schneller Kontakt zu co.don
- 435 Links zum Thema Tissue Engineering der NSF
- Hier geht's zur Website der Tissue Engineering Society International
- Mehr zum Thema Stammzellen
- E-Mail an den Autor



Fax-Info:

BioTissue: +49 (0 7 61) 76 76 - 1 80  
co.don: +49 (0 33 28) 43 46 43