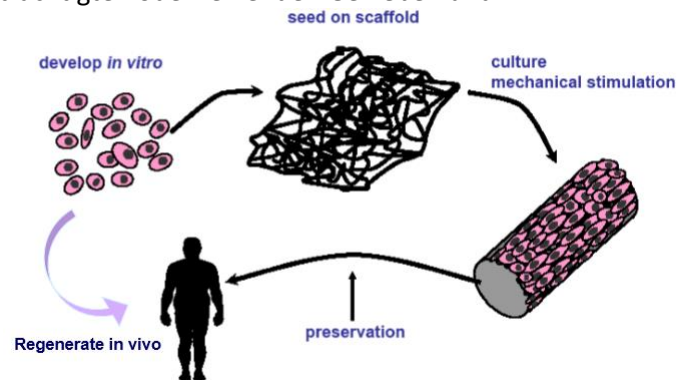


Abkürzungen:

- TE: Tissue Engineering
 RM: Regenerative Medizin
 GMP: gute Herstellungspraxis
 ESC: Embryonale Stammzellen
 FSC: Fetale Stammzellen
 ASC: Adulte Stammzellen
 iPS: induzierte Pluripotente Stammzellen
 IVF: in-vitro Fertilisation
 SNCT: somatic cell nuclear transfer

Definition:

- Ziel des Tissue Engineering ist die in vitro und in vivo Rekonstruktion, Stabilisierung und Verbesserung von beschädigten, funktionell beeinträchtigten oder fehlenden Geweben und Organen durch
 - körpereigene (autologe) Zellen (keine immunologische Abstoßungsreaktion)
 - körperfremde (allogene) Zellen (von einem menschlichen Spender)
 - artfremde (xenogene) Zellen (z.B. vom Schwein, da sehr ähnlich in der Physiologie)
- In vitro wird eine Trägermatrix benötigt (bioinert oder abbaubar)
- **Design, Spezifikation und Herstellung von Zellen, Biomaterialien oder Verfahren um die biologische Funktion von Geweben wiederherzustellen oder zu modifizieren . (Verfahrenstechnische Definition)**

**Prothetik vs. Regeneration**

- Oft ist es einfacher und geeigneter Prothesen/ Implantate/Chips zu nutzen
- Prothetik schon deutlich weiter als TE, es gibt:
 - Retina Implantate
 - Hörschneckenimplantate
 - Tiefe Hirnstimulation („Hirnschrittmacher“)
 - Hand-/ Fußprothesen mit sensorischem Feedback
 - Blasenstimulation
 - Stimulation des Vagus (Respirationszentrum)
- Ziel ist es aber einen biologischen Ersatz zu schaffen

Regeneration bei WirbeltierenZebrafische

- Die Knochenstrahlen der Schwanzflosse regenerieren sich vollständig nach Amputation
- Ein herausgeschnittenes Stück Herzmuskel ist nach ca. 60 Tagen vollständig nachgewachsen
- In der Zelldifferenzierung gibt es verschiedene Signalwege
- Die Zellen wirken komplex zusammen

Salamander (Axolotl)

- Rekonstruktion von Extremitäten, Linse und Schwanz

- Die entfernte Linse wird aus Stammzellen, die an der Iris sitzen neu gebildet. Menschen haben diese Stammzellen an der gleiche Stelle auch, bilden aber keine neue Linse
- ➔ Der Mensch als Wirbeltier konnte sich im Laufe der Evolution auch teilweise regenerieren
- ➔ Genetische Informationen gehen nie verloren, sind zur abgeschaltet (Bsp. Atavismen)
- ➔ Heute erfolgt die Reparatur beim Menschen/bei Säugetieren über Narbengewebe, was eine Funktionseinschränkung zur Folge hat
- ➔ Regeneration statt Reparatur angestrebt

„Natürliches“ Tissue Engineering

Tiermodelle mit natürlichem Regenerationspotential sind Modellsysteme für das Aufspüren entwicklungs- und regenerationsrelevanter Gene und Proteine:

- Vergleiche zwischen sich entwickelnden, regenerierenden und nicht regenerierender Gewebe erlauben Rückschlüsse auf Gene und Proteine, die bei der Regeneration eine Rolle spielen.
- Methoden => Mutagenese, Gen-Silencing und anschließende Analyse der Mutanten
- Untersuchungen von regenerationsfördernden bzw. –hemmenden Faktoren / Substanzen
- Analysen über Mikroarrays und High-Throughput Verfahren

Interdisziplinarität

Für TE und RM sind Kenntnisse aus vielen Beriechen notwendig:

Biowissenschaften	Ingenieurwissenschaften
- Zell- und Molekularbiologie - Entwicklungsbiologie - Stammzellbiologie - Biochemie - Genetik - Molekulare Medizin - Immunologie - Biophysik und –informatik	- Materialforschung - Polymerchemie - Oberflächenstrukturierung - Biotechnologie - Molekulare Bildgebung - Verfahrenstechnik - Medizintechnik

Hoffnungsträger TE/RM

- In der Medizin kommt man immer wieder ans Limit an Gewebe- und Organbedarf
- TE bietet die Möglichkeit heute unheilbare Krankheiten wie Parkinson, Diabetes,... zu heilen statt die Symptome zu therapieren
 - 2 Millionen leiden an fehlenden Stützgeweben (Knochen, Knorpel, Zwischenwirbelscheiben, Sehnen).
 - An Diabetes leiden in Deutschland 12 Millionen Patienten, in Europa 50 Mio. und weltweit 246 Mio.
 - 12.000 Brustimplantate werden pro Jahr in Deutschland eingesetzt, 75% davon zur Brustrekonstruktion
 - Aus der zunehmenden Lebenserwartung folgt eine Zunahme von Degenerationserkrankungen

Welche Organe kann man ersetzen?

- | | |
|------------|-------------------|
| - Knochen | - Herz und Gefäße |
| - Haut | - Speicheldrüse |
| - Pankreas | - Blase |

- Knorpel
- Zähne
- Brust
- Leber
- Spinalnerven (Neurodegenerative Erkrankungen behandeln)

Segmentierung der Regenerationstechnologien

- Das Tissue Engineering ist Teil der regenerativen Medizin, kein Arzneimittel und kein Medizinprodukt
- Die Herstellung erfolgt nach GMP individuell und oft im Reistraum (sehr teuer)
- GMP steht für gute Herstellungspraxis. Darunter versteht man Richtlinien zur Qualitätssicherung der Produktionsabläufe und -umgebung in der Produktion von Arzneimitteln und Wirkstoffen

Individualisierte Medizin

- Medikamente sind in der Regel nicht Patientengruppenspezifisch getestet
 - Medikamente sind unspezifisch während Patienten sehr unterschiedliche Bedürfnisse haben
 - In ca. 30% der Fälle wirken Medikamente nicht
- ➔ Durch TE gezieltes Eingehen auf Patientengruppen

Von der Zellbiologie zum Tissue Engineering

- Tierische Organismen entwickeln sich aus einer einzelnen (Ei-)Zelle.
- Organismen sind aus einer Vielzahl von Zellen aufgebaut (Mensch circa 60 Billionen Zellen).
- Zellen bilden unterschiedliche Typen (Mensch circa 220) aus,
 - die sich in Aussehen und Funktion unterscheiden und
 - zu komplexen und vielschichtigen Geweben und Organen zusammenlagern.

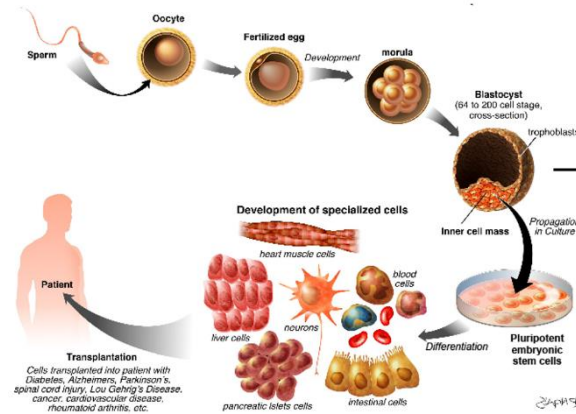
Stammzellen

- Stammzellen sind Vorläuferzellen von hoch differenzierten Zellen.
- Nach einer Teilung der Stammzellen können die Tochterzellen entweder wieder zu Stammzellen werden (self-renewal) oder sich gewebespezifisch, z.B. zu Herz-, Nerven-, Haut- oder Muskelzellen, differenzieren.

Es gibt verschiedene Stammzelltypen:

- **Embryonale Stammzellen (ESC):** Stammzellen aus dem Embryo bis zum Stadium der Blastozyste (3-4 Tag nach der Befruchtung).
 - ESC bis längstens zum 16-Zell Stadium sind **totipotent / omnipotent** => Entwicklung in einen vollständigen Organismus ist möglich.
 - ESC bis zur Blastozyste (etwa 150 Zellen) sind **pluripotent** => Differenzierung in Zellen aller drei Keimblätter (Entoderm, Ektoderm; Mesoderm) sowie in Zellen der Keimbahn möglich.
- **Fetale Stammzellen (FSC):** Aus verschiedenen fetalen Geweben (z.B. Keimdrüsen, Haut; nach Schwangerschaftsabbruch) => **pluri- bis multipotent**.
- **Adulte Stammzellen (ASC):** Stammzellen aus dem adulten Organismus können **multipotent** sein => Differenzierung in verschiedene spezielle Zelltypen (Bsp.: hämatopoietische SZ+ mesenchymale SZ aus Blut und Knochenmark).
- **Progenitor- und Precursor-Zellen:** Stammzellen in einzelnen Organen, die sich nur in für diese Organe spezifische Zellen differenzieren können.
- Werden Zellen vor dem 16-Zell-Stadium getrennt, können sich zwei vollständige Organismen bilden (-> omnipotente Stammzellen)

- Pluripotente Stammzellen können jeden Gewebetyp bilden-> sind besonders wichtig für TE. Sie können aus Blastozysten gewonnen werden (Zellstadium am 5. Tag nach der Befruchtung) -> Ethische Frage
 - Pluri- bis Multipotente Stammzellen können auch aus Aborten gewonnen werden -> Ethische Frage
 - Adulte Stammzellen sind ethisch unproblematisch, heute schon in Form von Knochenmarkspende
- ➔ In Europa ist die Gewinnung und Nutzung von embryonalen Stammzellen verboten

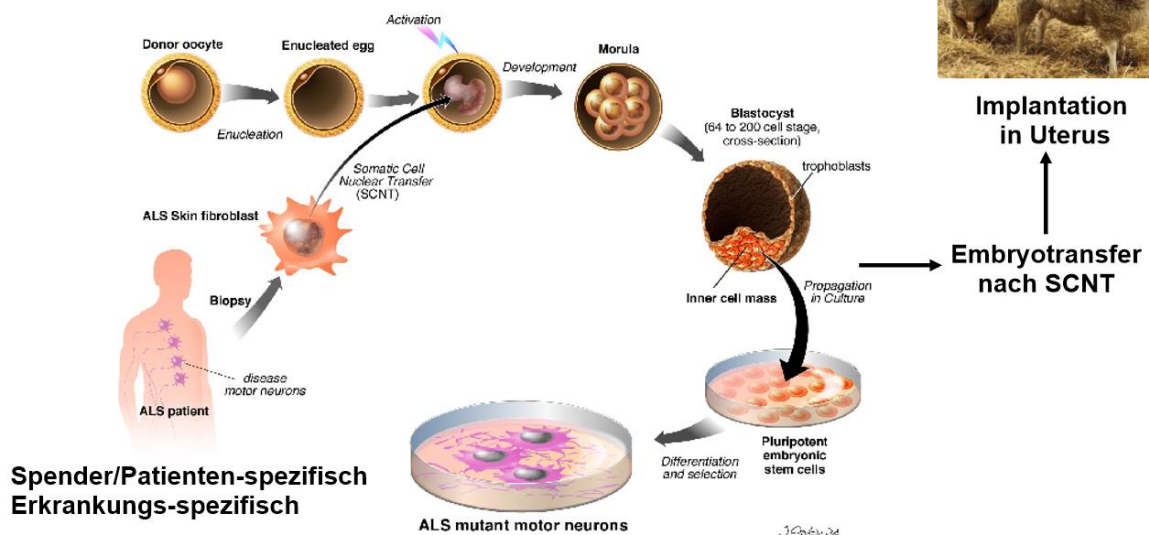


Therapeutisches Potential von Stammzellen

- Stammzellen können implantiert werden um Gewebe nach Beschädigung oder Verlust zu ersetzen
- Genetisch veränderte Stammzelllinien können implantiert werden um als lokale Fabriken therapeutische Stoffe zu produzieren
- Stammzelllinien können aus körpereigenem Gewebe gewonnen werden um eine Immunreaktion zu vermeiden (Patientenspezifische Stammzellen)
- Stammzelllinien mit einem Krankheits-Phänotyp können in vitro genutzt werden um die Pathogenese zu untersuchen oder Medikamente zu entwickeln (Krankheitsspezifische Stammzellen)

Therapeutisches und Reproduktives Klonen

Somatic Cell Nuclear Transfer (SCNT)

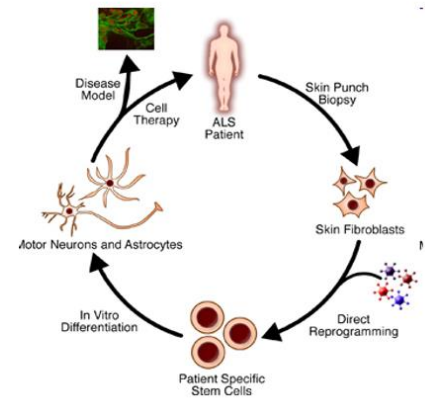


Präimplantationsdiagnostik

- Ein Embryo wird nach einer künstlichen Befruchtung im Achtzell-Stadium auf Erbkrankheiten untersucht und dann erst in die Gebärmutter eingepflanzt (wenn er „gesund“ ist)
- In Deutschland erlaubt, ca. 5000 künstliche Befruchtungen jährlich

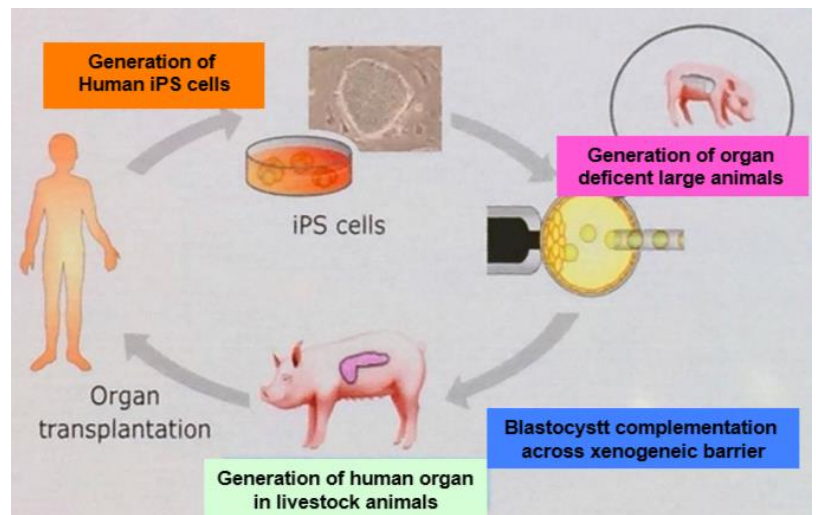
Induzierte Pluripotente Stammzellen

- Gewebe aus einer Hautbiopsie dient als Ausgangsmaterial
- Mit Hilfe eines veränderten Virus werden vier Gene in die Zelle eingeschleust
- Die Gene programmieren einige wenige Hautzellen um -> induzierte pluripotente Stammzellen (iPS) entstehen
- Die iPS werden im Labor vermehrt und könne zur Zelltherapie genutzt werden

Besteht die Gefahr von Tier-Mensch Chimären mit iPS?

Chimäre = Organismus, der aus genetisch unterschiedlichen Zellen bzw. Geweben aufgebaut ist aber ein einheitliches Individuum bildet.

z.B.: Gentechnischer Eingriff zur Eliminierung des pdx1-Gens, verantwortlich für die Ausbildung eines funktionsfähigen Pankreas

Patentierbarkeit humaner ES

- Die Entnahme von Zellmasse aus dem inneren einer Blastozyste (Embryo wird dabei zerstört) und die gezielte Umwandlung dieser Stammzellen zu spezifischen Gewebearten dürfen nicht patentiert werden.
- Urteil vom 18. Oktober 2011: Ausschluss der „Verwendung von menschlichen Embryonen zu industriellen oder kommerziellen Zwecken“
- Problem:
 - es gibt mehrere Patente auf fetale humane Zelllinien
 - rechtliche Grundlage von Schwangerschaftsabbrüchen
 - Wer ist der ursprüngliche Eigentümer der Zellen?

Ethische Probleme mit ESC

- Dissoziation der inneren Zellmasse der Blastozyste bedeutet die Zerstörung des Embryos .
- Hat ein Embryo im Stadium der Blastozyste den moralisch-ethischen Wert eines menschlichen Individuums?
- SNCT ist die gleiche Technik, die zum Klonen von Tieren benutzt wird, i.e. reproduktive vs. therapeutisches Klonen

Adulte Stammzellen

Quellen für adulte Stammzellen:

- | | |
|---|-------------------------------|
| - Hauptquellen sind Blut und Knochemark | - Leber |
| - Gehirn | - Pulpa junger Weisheitszähne |
| - Haut/Haarbalg | - Hoden |
| - Muskeln | - Darm |
| - Fett | - Herz |

Alterung

Mit zunehmendem Alter sinkt die Anzahl der eigenen Stammzellen (mit 10 Jahren nur noch ca. 50%, mit 60 ca. 10%). Gleichzeitig steigt die Anzahl der Stoffwechselleiden, degenerativer Skelettschäden, Demenz, Krebs und Herz-Kreislauf-erkrankungen

TE mit ausdifferenzierten aber teilungsfähigen somatischen Zellen

- Oft wird Knorpel für TE genutzt, da dieser sehr anspruchslos ist
- Luftröhrenbildung beim Schaf:
 - Ein Stück Knorpel aus der Nase schneiden
 - In Kultur anlegen mit Chondrozyten und Fibroblasten
 - Kultur auf ein Trägermaterial geben
 - Fertige Luftröhre kann implantiert werden

Trägermaterialien

Nicht-degradable Träger:

- Gewebe aus Kunstfaser: Polymere wie Polyurethan, Polyethylen, ...
- Mineralische Träger: Hydroxylapatite, Keramik, Koralle

Degradable Träger

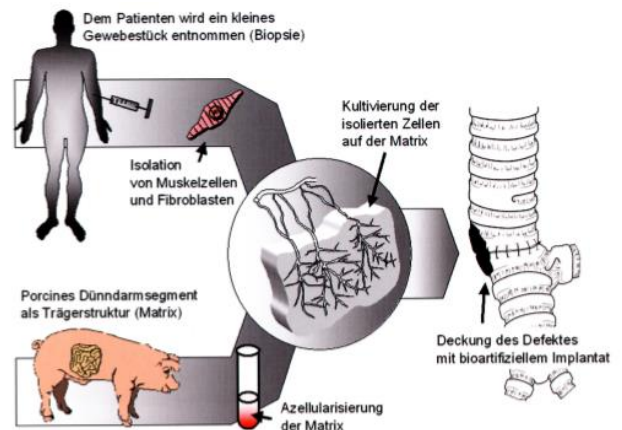
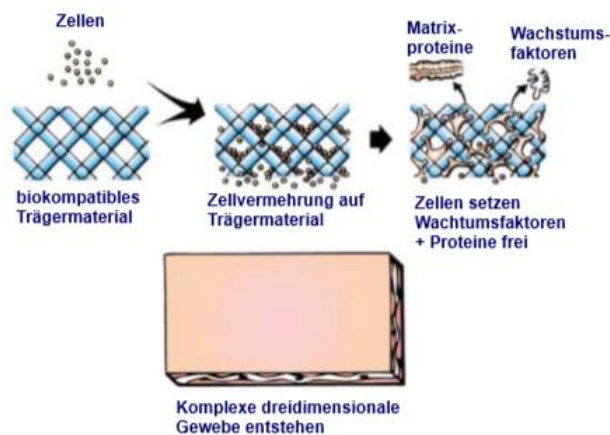
- Biologische Träger, Gewebe, Gele: Fibrin, Thrombin, Kollagene, Hyaluronsäure, Polylaktide, Polyglykolate...
- Zellfreie dreidimensionale Matrices humaner (allogen) oder tierischer (xenogen) Herkunft

Spezielle Biomaterialien und funktionelle Oberflächen

- Synthetische degradable Polymere
- Steuerbarkeit und Plastizität von Materialeigenschaften
- Hydrogele
- Funktionalisierung von Oberflächen für die Interaktionen mit Zellen und Geweben (Simulation der ECM)
- Stimuli-sensitive Polymere
- Freisetzungsmechanismen (drug delivery)
- In vitro Konditionierungsmodelle (Imitation des Kompartments)

Herstellungsverfahren

- 3D Druck aus CAD Entwurf
- Electrospinning (Einzelfaser mit primären humanen Fibroblasten)

Zellbesiedlung**Warum Luftröhren Tissue Engineering?**

- Resektion nur limitiert möglich (bei Erwachsenen 50%, bei Kindern 30% der Länge)
- Transplantation nicht möglich, da keine eigene Gefäßversorgung und Kollaterale bei der Transplantation zerstört werden
- Kein geeignetes Ersatzgewebe, da die biomechanischen Eigenschaften sehr speziell sind
- Keine synthetischen Implantate wegen der mikrobiellen Besiedlung

Gewebezüchtung und Bioreaktoren

Zur erfolgreichen Gewebezüchtung ist es notwendig, dass die Zellen:

- proliferieren,
- den erforderlichen Phänotyp entwickeln,
- auf die Kulturbedingungen ansprechen (Wachstumsfaktoren, mechanischer Stress),
- eine extrazelluläre Matrix abscheiden.

Geeignet für die Gewebezüchtung ist eine Perfusionskammer

Beispiele für Extrakorporale bioartifizielle / biohybride Organe

1. **Molecular Adsorbents Recirculation System (MARS)**, die sogenannte Leberdialyse reinigt bei Leberversagen das Blut außerhalb des Körpers. Es werden hauptsächlich proteingebundene Toxine gefiltert. Entfernbare proteingebundene und wasserlösliche Substanzen sind:

- Ammoniak	- Tryptophan
- Bilirubin	- Kupfer
- Gallensäuren	- Kreatinin
- Aromatische Aminosäuren	- Harnstoff
- Mittel- und kurzkettige Fettsäuren	- Diazepam
2. **Hohlfaser Bioreaktor für eine bioartifizielle Leber**

TE-Produkte in der klinischen PraxisKlinische Bedürfnisse

- Langfristige Zuverlässigkeit
- Biokompatibilität
- Adaptionsfähigkeit
- Miniaturisierung

- „Mitwachsen“

Haut

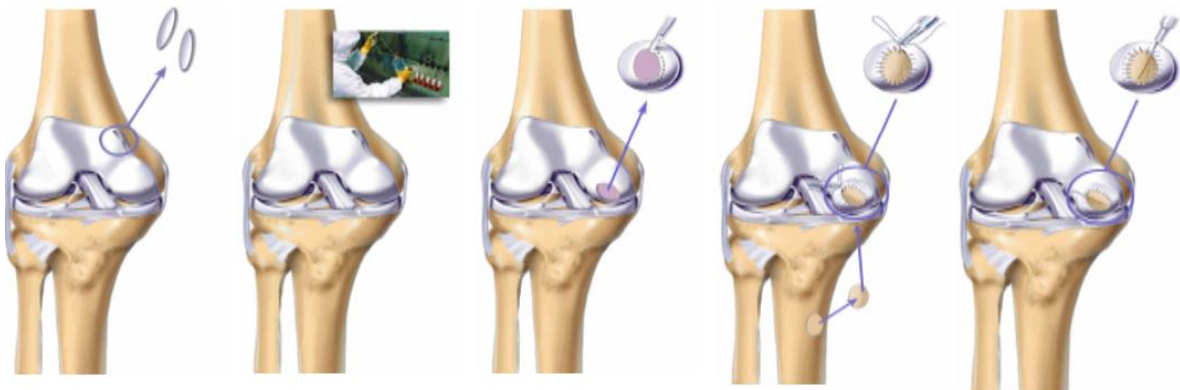
- Abdeckung akuter Wunden mit autologer Haut oder künstlicher Haut
- Autologer vitaler Hautersatz für die Behandlung chronischer Wunden
 - Entwicklung eines 3-D Trägersystems unter Verwendung autologer Fibroblasten (Feeder-Zellen)
 - Untersuchungen zur Differenzierung von Fibroblasten unter dem Einfluss von Keratinozyten in vitro
 - Analysen zu dem Einfluss verschiedener Differenzierungsstufen der Fibroblasten auf die Reepithelisierung in vitro und in vivo
 - Zellbiologische Analyse zur dermalen Regeneration und Reparatur in vivo

Knorpel

- autologer Knorpel aus TE-Produktion wird von verschiedenen Firmen kommerziell angeboten
- Verwendung z.B. im Kniegelenk oder zur Rekonstruktion einer Ohrmuschel

Knorpelersatz im Knie:

Das Problem bei Knorpelersatz ist, dass Knorpel allein sich nicht transplantieren lässt, weil er ohne festen biologischen Kontakt (festgewachsen über Collagenfasern) nicht den Beanspruchungen standhält, sondern bei Bewegung einfach abschwimmt. Die Lösung ist eine Knorpel-Knochen-Transplantation:



1. Gesundes Knorpelgewebe wird aus dem betroffenen Knorpel entnommen
2. Knorpelgewebe wird in vitro vermehrt
3. Die Defektstelle im Knorpel wird vorbereitet (nekrotisches Gewebe wird abgetragen)
4. Aus dem Knochen wird ein Teil des Periosts (Knochenhaut) herausgeschnitten und im Knorpeldefekt vernäht
5. In diesen Bereich werden die gezüchteten autologen Chondrozyten (Knorpelzellen) implantiert

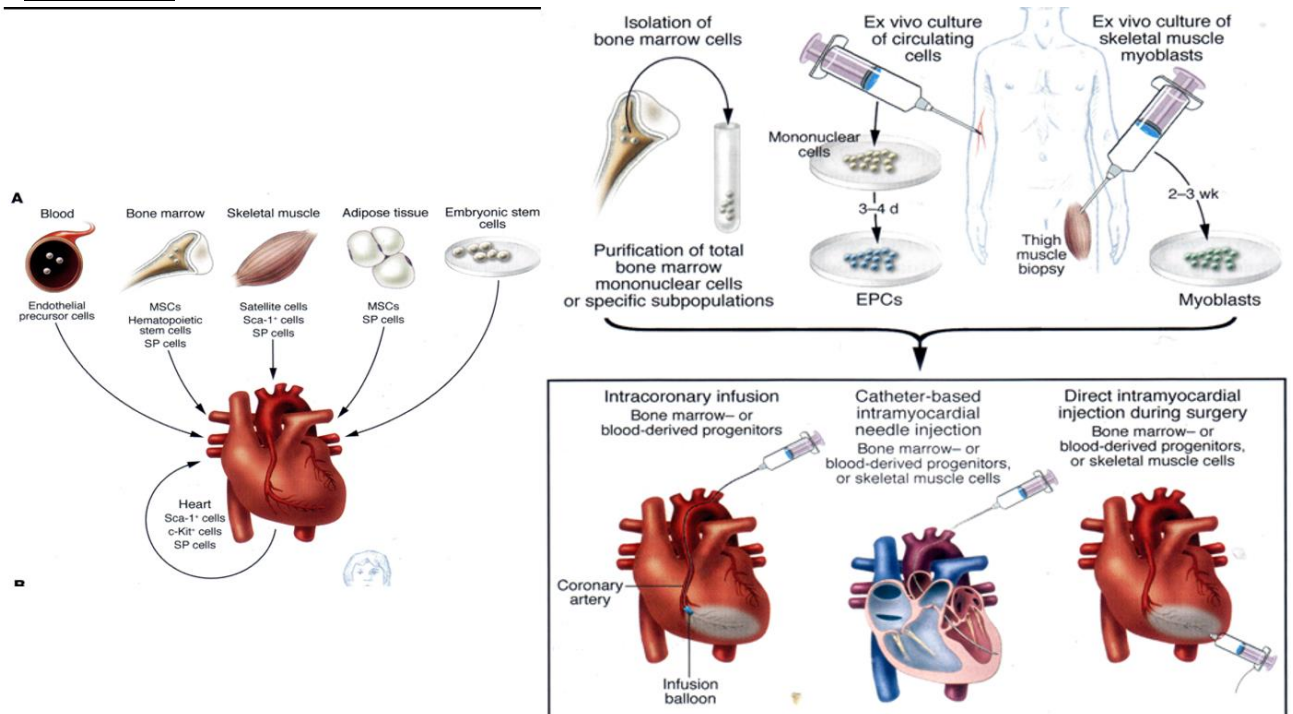
Knorpelersatz zur Rekonstruktion der Ohrmuschel:



TE-Produkte in der klinische Erprobung

Herzklappen

- Pulmonalklappen aus bioabbaubaren Polymeren

HerzmuskelGefäße

- Mit autologen Endothelzellen besiedelte allogene Venen oder Teflontubes
- Für die operative Behandlung der Arteriosklerose benötigt man:
 - eine implantierbare technische Prothese
 - ein Werkzeug um die Prothese möglichst minimalinvasiv zu implantieren
 - ein in vitro Bio-coating um die Oberfläche der Prothese für die in vivo / in situ Regeneration zu optimieren