Aus der Klinik für Kinderchirurgie
der Universität zu Lübeck
Komm. Direktor: PD Dr. med. L. Wünsch

Urotheliale Meshpräparate, eine neue Technik für das Tissue Engineering

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
-Aus der Sektion Medizin-

vorgelegt von

Jana Hobbiesiefken

aus Hagenow

Lübeck 2012

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dott. Dr. med. (U.C.MI.) Lutz Wünsch

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Andreas Böhle

Tag der mündlichen Prüfung: 03.12.2012

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 03.12.2012

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

Inhaltsverzeichnis

Seite

Abkürzungsverzeichnis 4

Einleitung und Fragestellung
Funktion und Funktionsverlust der Harnblase 5
Organersatzstrategien 6
Tissue Engineering 8
Biomaterialien 8
Zellisolierung und Zellkultur 10
Fragenstellung und eigene Methode 13

Material und Methoden
Literaturrechereche 16
Experimenteller Teil 17
Materialgewinnung und Präparation der Harnblase 17
Meshgraftpräparation und -kultur 18
Einzelzellschichtkulturen 20
Kultur und mikroskopische Untersuchungen 21
Mechanische Untersuchung 22

Ergebnisse
Literaturergebnisse 24
Beobachtungen an Meshgraftkulturen 27
Makroskopische Beobachtungen 27
Mikroskopische Beobachtungen 28
Ergebnisse mechanischer Untersuchungen 32
Beobachtungen an Einzellzellkulturen 35
Vergleich der Kulturtechniken 38

Diskussion
Literaturrecherche 39
Biomaterialien 40
Zellkulturtechnik 41
Urotheliales Meshgraft 44

Zusammenfassung 48

Literaturverzeichnis 49

Anhang
Abbildungsverzeichnis 62

Danksagung 63

Lebenslauf 64

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Aqua dest.	Aqua destillata
BAMG	Bladder Acellular Matrix Graft
BHE	Bovine Pituitary Extrakt
CK	Cytokeratin
EGF	Epidermal Growth Factor
FCS	Fetales Kälberserum (Fetal Calf Serum)
HE	Hämatoxilin-Eosin
HEPES	4-2-Hydroxyethyl-1-Piperazinethansulfonsäure
KCM	Keratinozytenmedium
LM	Lichtmikroskopie
N	Newton
OP	Operation
PBS	mit Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (Phosphate Buffered Saline Solution)
PGA	Polyglycolazid
REACh	Registration, Evaluation und Autorisation von Chemikalien
SEM	Scanningelektronenmikroskop
SIS	Small Intestine Submucosa
Tab.	Tabelle
TE	Tissue Engineering
Vergr.	Vergrößerung
z.B.	zum Beispiel

Einleitung und Fragestellung

Funktion und Funktionsverlust der Harnblase

Die gesunde Harnblase erlaubt die Speicherung von Urin bei niedrigem Druck und die kontrollierte Entleerung. Wesentlich für die Funktion der Blase ist zudem ihre äußerste lumenseitige Epithelschicht. Die Urothelzellen bilden die so genannte Crusta. Sie verhindert die Resorption toxischer Harnbestandteile und schützt vor der direkten Gewebetoxizität des Harnes. Bei der Crusta handelt es sich um eine asymmetrisch aufgebaute Zellmembran der obersten urothelialen Deckschicht, die aus Uroplakinen aufgebaut ist. Die Uroplakine Ia, Ib, und III konnten im Blasenepithel bei zahlreichen Säugetieren nachgewiesen werden und sind im Laufe der Stammesgeschichte hochgradig konserviert (Wu, 1994). Diese Schicht vereinigt mechanische Flexibilität, Resistenz gegen hyperosmolare Flüssigkeiten sowie die Inhibition von Krusten- und Steinbildung.

Die harnableitenden Organe können durch Erkrankungen, Verletzungen oder angeborene Fehlbildungen geschädigt oder in ihrer Funktion beeinträchtigt werden. Ungefähr 400 Millionen Menschen leiden weltweit an Erkrankungen des Urogenitaltraktes (Oberpenning et al., 1999). In Deutschland erkranken jährlich ca. 19.000 Menschen an Urothelkarzinomen (Batzler et al., 1997; Becker und Wahrendorf, 1998). Kinder sind vor allem durch kongenitale Fehlbildungen, wie Blasenekstrophie, neurogene Blasenentleerungsstörungen sowie Genitalfehlbildungen betroffen (Langer und Vacanti, 1993). Jedes Jahr kommen in Deutschland etwa 280 Kinder mit einer gravierenden Form urogenitaler Fehlbildung zur Welt, entsprechend einer Häufung von 1 auf 2.500 Lebendgeburten (Schmiedeke, 2010). Seltener sind Tumore des Urogenitaltraktes oder Verletzungen.

Zum Ersatz von Organfunktionen stehen generell unterschiedliche Ansätze zur Verfügung. Der Ersatz mit autologem Gewebe, die Transplantation und der Einsatz von Prothesen sind etablierte Strategien. Darüber hinaus ergeben sich neue Perspektiven durch das Tissue Engineering.

Organersatztstrategien

Harnwegsrekonstruktion mit autologem Gewebe

Für die Rekonstruktion des unteren Harntraktes mit autologem Gewebe wurden diverse chirurgische Techniken entwickelt. Von historischer Bedeutung ist die Verwendung von Faszien für den Blasenersatz (Neuhof, 1917). Seit diesem ersten wissenschaftlichem Bericht wurden viele andere Gewebematerialien experimentell und klinisch zu Rekonstruktionszwecken genutzt, wie zum Beispiel Blasensubmucosa, Omentum, Dura, Peritoneum, Placenta, Perikard und Dünndarmsubmukosa (Tsuji, 1961; Kelami, 1970; Gleeson, 1992; Kropp, 1996). Bei Verlust der Blase, beispielsweise nach Zystektomie bei einem fortgeschrittenen Urothelkarzinom, kann der Urin über eine kontinente oder inkontinente Harnableitung abgeleitete werden. Kontinente Harnableitungen werden durch katheterisierbare Stomata oder über den Darm entleert. Dazu wird typischerweise ein Reservoir aus gastrointestinalem Gewebe gebildet (Atala, Hendren et al., 1993). Bei inkontinenten Harnableitungen wird ebenfalls häufig Dünn- oder Dickdarmgewebe eingesetzt (Berchtold et al., 1999).

Die Rekonstruktion des Urogenitaltraktes mit Haut, Magen oder Darm führt immer zu definitiven Veränderungen in der Physiologie der Harnspeicherung und Entleerung. Die gastrointestinalen Gewebe haben die Aufgabe der Resorption und Schleimbildung. Bei Urinkontakt führt dies zu metabolischen Veränderungen und erhöhter Schleimbildung. Diese begünstigen Infektionen und das auftreten einer Urolithiasis. Weitere Komplikationsmöglichkeiten sind Fistelbildung und Stenosen (McDougal, 1992; Atala, 1993; Atala, Hendren et al., 1993 und 1994; Kaefer, 1998). Die Verwendung gastrointestinaler Gewebe im Harntrakt birgt außerdem ein nicht sicher quantifizierbares Risiko der malignen Entartung (Kim et al., 2000). Dieses Risiko nimmt mit der Zeit zu und ist somit für Kinder besonders relevant.

Hinzu kommt die Morbidität durch die Entfernung der benötigten Gewebe aus dem Gastrointestinaltrakt. Hierbei ist der Verlust der Ileozökalklappe, das Komplikationsrisiko von Darmanastomosen sowie die Bildung von Adhäsionen zu nennen.

Diese Probleme wiegen schwerer, wenn ein großer rekonstruktiver Eingriff zu Beginn des Lebens nötig wird. Dabei wird im Idealfall eine vollständig funktionsfähige Korrektur angestrebt, die mit dem Organismus wächst. Dieser Eigenschaft werden die etablierten Techniken nicht gerecht. Ebenfalls wichtig ist der psychologische Aspekt bei der Therapie

von Erkrankungen im Kindesalter. Für viele der Erkrankungen und Fehlbildungen erfolgt die Behandlung in mehreren operativen Schritten. Wiederholte Krankenhausaufenthalte, die Notwendigkeit zur Katheterisierung oder die Notwendigkeit zur Verwendung von Hilfsmitteln beeinträchtigen die psychosoziale Entwicklung der Kinder. Trotz dieser teilweise gravierenden Einschränkungen haben die Möglichkeiten zur kontinenten Harnableitung die Lebensqualität vieler Betroffener deutlich verbessert.

Prothesen

Die Funktionen der Harnspeicherung und Entleerung erscheinen zunächst durch einen prothetischen Ersatz gut geeignet. Trotz zahlreicher Versuche mit einem prothetischen Harnblasenersatz gibt es aber noch kein Modell, das sich im langfristigen Gebrauch bewährt hat. Die hyperosmolare Konzentration des Harns schränkt die Verwendung von Prothesen und Fremdmaterialien im Harntrakt ein. Fremdmaterialien im Harntrakt werden innerhalb von Stunden mit einem Biofilm überzogen, in dem sich Proteine aus dem Harn und anschließend ureasebildende Bakterien ansiedeln. Durch Mineralisierung des Biofilms kommt es zu Inkrustation, die wiederum therapieresistente Infektionen und Steinbildung nach sich ziehen können (Claes et al., 2003; Atala, Kim et al., 1994).

Transplantation

Bislang wurden zur Transplantation der Harnblase keine Untersuchungen veröffentlicht. Allgemeine Nachteile sind die Notwendigkeit zur Immunsuppression und der Mangel an Spendern. Da es im Fall der Blase chirurgische Alternativen gibt, sind diese zunächst weiter verfolgt worden.

Die erste Strategie hat sich als medizinischer Standard etabliert. Da aber Kinder nach Blasenersatz oder Augmentation lebenslang kontrollbedüftig bleiben und viele Konsequenzen dieser Operationen noch nicht absehbar sind, ist die Entwicklung neuer Techniken ein wichtiges Ziel.

Tissue Engineering

Das Tissue Engineering basiert auf dem Einsatz von in vitro hergestellten Geweben und profiliert sich als mögliche Lösungsstrategie an der Schwelle vom experimentellen zum klinischen Einsatz. Tissue Engineering ist ein interdisziplinäres Feld, welches die Prinzipien der Biologie und der Ingenieurwissenschaften anwendet, um einen dauerhaften Ersatz eines natürlichen Gewebes herzustellen. Dieser Ersatz soll die Funktion des menschlichen, geschädigten Gewebes wiederherstellen, aufrechterhalten oder verbessern (Langer und Vacanti, 1993).
Beim Tissue Engineering sind natürliche Prozesse der Zellproliferation, Differenzierung und Zell-Matrix-Interaktion von großer Bedeutung. Dabei werden unterschiedliche Methoden angewendet (Strobel, 1997). Wesentliche Bestandteile des Tissue Engineerings sind Biomaterialien, Zellen und Bioreaktoren.

Biomaterialien

Beim Tissue Engineering dient das Biomaterial als strukturelles Gerüst und Matrix, das die Regeneration des Gewebes unterstützt. Beim Tissue Engineering urothelialer Organe wurden Biomaterialien ohne Zellen für kleinere Defekte des Ureters oder der Urethra oder im Kleintiermodell zum Blasenersatz verwendet. Dabei werden definierte Anforderungen an ein Biomaterial gestellt.

Tab.1: Anforderungen an Biomaterialien (modifiziert nach Kim et al., 2000)
biokompatibel = keine Fremdköperreaktion
resorbierbar = nur solang vorhanden bis körpereigene Matrix gebildet ist
organtypische Form und -mechanische Eigenschaften
Unterstützung von Zellwachstum und Differenzierung
sterilisierbar
nicht kanzerogen
nicht allergen

Es werden synthetische oder biogene Biomaterialien implantiert (Tab.2). Nach Implantation wachsen Zellen dort ein (Mooney und Mikos, 1999; Falke et al., 2000).

Synthetische Biomaterialien haben den Vorteil, dass ihre Herstellung vollständig kontrollierbar ist. Inhaltstoffe, mechanische und Oberflächeneigenschaften könnten gezielt beeinflusst werden. Sie können in den benötigten Größen und auf Vorrat hergestellt werden. Ihre Qualität und Quantität ist somit leichter kontrollierbar. Allerdings ist die Herstellung von biosynthetischem Kollagen bislang nur in kleinen Mengen möglich. Mechanisch stabile membranöse oder fibrilläre Strukturen sind durch den Produktionsprozess bislang nicht reproduzierbar.
Deshalb werden häufig Milchsäure-Polymere verwendet, die bereits als Nahtmaterialien verwendet werden. Synthetische Materialien unterscheiden sich bislang in ihren biologischen und mechanischen Eigenschaften von biogenen Biomaterialien (Gleeson, 1992; Kim, 2000).
Biomaterialien organischen Ursprungs sind aus azellularisierten Geweben oder chemisch gelöstem Kollagen hergestellt. Häufig werden Dura mater, Faszien, Bänder oder das Pericard verwendet. Ihre Qualität variiert mit dem Spenderorganismus, und die Materialien sind zumeist nicht in jeder benötigten Größe verfügbar. Zusätzlich besteht ein schwer kalkulierbares Risiko für die Übertragung tierischer DNA oder von Proteinen.
Aufgrund ihrer Oberflächenstruktur und Ladungsverteilung zeigen biogene Biomaterialien häufig bessere Ergebnisse als synthetischen Biomaterialien.
Azellularisierte Dünndarmmukosa und Harnblasenmatrix (Bladder Acellular Matrix Graft = BAMG) bewiesen in experimentellen Studien eine geringe Antigenität (Falke et al., 2000; Dahms, Piechota, Nunes et al., 1997; Piechota, Dahms, Probst et al., 1998; Chen et al., 1999; Kim et al., 2000; Falke et al., 2000; Friedrich, 2000).
Das BAMG zeigte Epithelisation und Gefäßeinsprossung, Rezeptoren für Neurotransmitter, annähernd normale Blasenkapazitäten und Compliance und eine gute mechanische Stabilität (Piechota HJ, Dahms SE, Nunes et al., 1998; Dahms SE et al.,1998; Sievert et al., 2000).
Es existieren aber auch andere Studien, die diese positiven Ergebnisse in Frage stellen. Es wird dabei von entzündlichen Veränderungen, Fibrosierung und Schrumpfung der Gewebe berichtet (Probst, 1997; Reddy, 2000). Durch den Herstellungsprozess wird das Ausgangsmaterial zudem noch stark modifiziert und unterliegt starken Qualitätsschwankungen (Cross, 2003).
Außerdem besteht ein hohes Risiko für Abstoßungsreaktionen.

Viele Untersuchungen zeigten, dass ein „ideales“ Biomaterial noch nicht gefunden ist (Wünsch, 2005; Hodde, 2002). Sowohl mit synthetischen als auch natürlichen Materialien bestehen zahlreiche Probleme. Entweder zeigten sie keine ausreichende Stabilität für die Implantation, oder sie schrumpften im Versuchsverlauf. Auch über Funktionsverluste, Abstoßungsreaktionen, starke Narbenbildung, maligne Entartung
und Infektionsrisiko wurde berichtet (Gleeson, 1992; Atala, Freeman, 1993; Atala, Hendren, et al., 1994).

Eine Auswahl von Biomaterialien ist in der Tabelle 2 angegeben.

Tab. 2: Auswahl von Biomaterialien für das Tissue Engineering

Resorbierbar, synthetisch	**Resorbierbar, biogen**	**Nicht resorbierbar, synthetisch**	**Nicht resorbierbar, biogen,**
Polylactin (Vicryl®)	Kollagen (Biogide®)	Silikon	Alginat
Polydioxanon (Ethisorb®)	Blasensubmukosa = BAMG	Polytetrafluorethylen (Teflon®)	Chitin
Polyurethan	Dura	Latex	Hydroxylapatit
	Dünndarmsubmukosa = SIS (Surgisis®)	Polyethylen	

Zellisolierung und Zellkultur

Die Regeneration der epithelialen Oberfläche ist für die Funktion des Harntraktes essentiell. Analog zur Wundheilung können Defekte ab einer gewissen Größe nur noch langsam durch Zellmigration vom Urothel der Defektrandzone besiedelt werden. Grundlage des urothelialen Tissue Engineerings ist die Züchtung von Urothel. Die Kultur von Urothelzellen aus frischem, nicht alterierten Übergangsepithel stellt im Gegensatz zur Kultivierung von Tumorzelllinien, die entdifferenziert sind und über eine unbegrenzte Lebensdauer verfügen, besondere Ansprüche an die Kulturbedingungen (Booth et al., 1997).
In den Literaturen zeigten Studien, dass normales Uroepithel in vitro effizient aus chirurgisch entnommenem Gewebe gezüchtet werden konnte. Dabei wurden Differenzierung, Wachstumsvorraussetzungen und andere biologische Eigenschaften in vitro untersucht (Petzoldt et al., 1994; Southgate et al., 1994).

Das initial benötigte Gewebe wird durch eine Biopsie entnommen. Diese können aber nur in begrenzten kleinen Mengen, z.B. bei urologischen Eingriffen oder Organtransplantationen, entnommen werden. Deshalb wurde auch die Isolierung von Urothel aus Blasenspülungen versucht (Herz et al., 1980 und 1985; Felix et al., 1980; Lindner et al., 1976; Feil, 2008).
Das Urothel weist viele zellbiologische Ähnlichkeiten zu den Keratinozyten auf. Keratinozyten werden zur Behandlung von Verbrennungspatienten bereits seit Jahren klinisch eingesetzt. Die Kulturmedien und Techniken, die beim Urothel zum Einsatz kommen, wurden ursprünglich für die Keratinozyten entwickelt.
Das Urothel ist das Epithel mit der niedrigsten Proliferationsrate im menschlichen Körper. Die Lebensdauer einer Urothelzelle beträgt in vivo ca. 200 Tage, die Regeneration der Deckzellschicht aus den basalen Zellen ca. 11 Wochen (Leonhardt, 1984). Allerdings heilen experimentelle Schleimhautdefekte schnell und auch in vitro kann die Proliferation durch Zugabe von Rinderepiphysenextrakt, epidermalem Wachstumsfaktor oder fetalem Kälberserum stimuliert werden (Atala, Freeman et al., 1993). Diese Zusätze bergen jedoch die Gefahr der Infektionsübertragung, insbesondere der Übertragung von Viren und Prionen (Eder, 2000; Paradis, 1999; Patience 1997).

In Vergleichsstudien wurde nach Alternativen für stimulierende Zusätze geforscht. Dabei zeigte Kollagen als Matrix gute Eigenschaften (Fujiyama, 1995; Wolf, 1996). Eine epitheliale Differenzierung konnte durch Kollagen I, Matrigel® (Basalmembranextrakt) und durch den Zusatz von fetalem Kälberserum (FCS), aber nicht durch Plastik, Laminin oder Fibronektin induziert werden (Tobin et al., 1994).

Mit der Expansion von Zellpopulationen in vitro verbinden sich viele ungelöste Probleme hinsichtlich bleibender genetischer und epigenetischer Veränderungen. Diese sind durch die Verwendung verschiedener Stammzellpopulationen noch größer geworden, da nicht nur die Vermehrung der Zellpopulation sondern auch ihre zielgerichtete Differenzierung kontrolliert werden muss.
Vor diesem Hintergrund ist die Entwicklung möglichst einfacher Systeme zur Zellkultur ein wichtiger Schritt zur klinischen Anwendbarkeit.

Bioreaktoren

Unter Bioreaktoren versteht man die Apparate und Behältnisse, in denen Zell-Matrix-Konstrukte aufgebaut werden. In der Literatur werden auch In-vivo-Systeme teilweise als

Bioreaktoren bezeichnet. In vitro können Zell-Matrix-Konstrukte unter statischen oder dynamischen Kulturbedingungen hergestellt werden. Als statisch werden klassische Zellkultursysteme in der Flasche oder in der Petrischale bezeichnet. In dynamischen Sytemen wird entweder die Basis des Kulturgefäßes mechanisch verändert, oder das Kulturmedium wird in kontinuierlichem Fluss gehalten. In vergleichenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass dynamische Kulturbedingungen, insbesondere die mechanische Stimulation, einen positiven Einfluss auf Proliferation und Differenzierung der Zellen haben (Ingber, 2003; Minuth et al., 1992). Allerdings ist die mechanische Belastung von üblichen Zellkulturen durch den fehlenden Gewebeverband kaum möglich. Kultursysteme, die direkt mechanisch belastet werden können, bieten deshalb bessere Vorraussetzungen für klinisch verwendbare Implantate.

Fragenstellung und eigene Methode

Das Tissue Engineering eröffnet viel versprechende Perspektiven und es liegen bereits sehr viele Publikationen vor. Dabei werden immer neue Biomaterialien und neue Techniken eingeführt. Es fehlt aber bislang eine kritische und fokussierte Problemanalyse der Zell-Matrix-Konstrukte für die Anwendung im Harntrakt. Deshalb haben wir eine Darstellung und kritische Bewertung der bis Ende 2010 publizierten Ergebnisse zum urothelialen Tissue Engineering unternommen. Wir untersuchten, welche Strategien zur Anwendung gekommen sind und wie diese in Hinblick auf eine mögliche klinische Anwendung zu bewerten sind. Der Fokus lag auf Untersuchungen, die sich mit dem Aufbau von Blasengewebe durch Zell-Matrix-Konstrukte beschäftigen. Diese ist die bislang am besten etablierte Strategie zur Behandlung von Defekten, die mehr als wenige Quadratzentimeter groß sind.

Der experimentelle Teil der Arbeit evaluiert urotheliale Meshgrafts als mögliche Ressource für das Tissue Engineering. Basierend auf den biologischen Gemeinsamkeiten von Urothel und Keratinozyten wird eine bewährte Strategie zur Hauttransplantation erstmals auf urotheliale Gewebe angewendet. Ziel dieser Untersuchungen war die Beschreibung urothelialer Meshgraftpräparate für das Tissue Engineering. Dabei haben wir untersucht, ob sich das urotheliale Mesh als Quelle für Urothelkulturen eignet. Es wurden Zellkulturen aus Meshpräparaten mit traditionell hergestellten Urothelkulturen angesetzt und verglichen.

Dazu wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

1. Können Urothelzellkulturen aus urothelialen Meshgrafts hergestellt werden?
2. Wie effektiv sind urotheliale Meshgraftpräparate im Vergleich zur konventionellen Zellkulturtechnik?
3. Bleibt der mehrschichtige Aufbau und die Differenzierung des Urothels in der Langzeitkultur erhalten?

Es wurden Zellkulturen mit beiden Techniken angelegt, immunhistochemisch charakterisiert und die Zeit bis zur ersten Passage verglichen. Der Versuchsablauf ist in Abbildung 1 dargestellt.

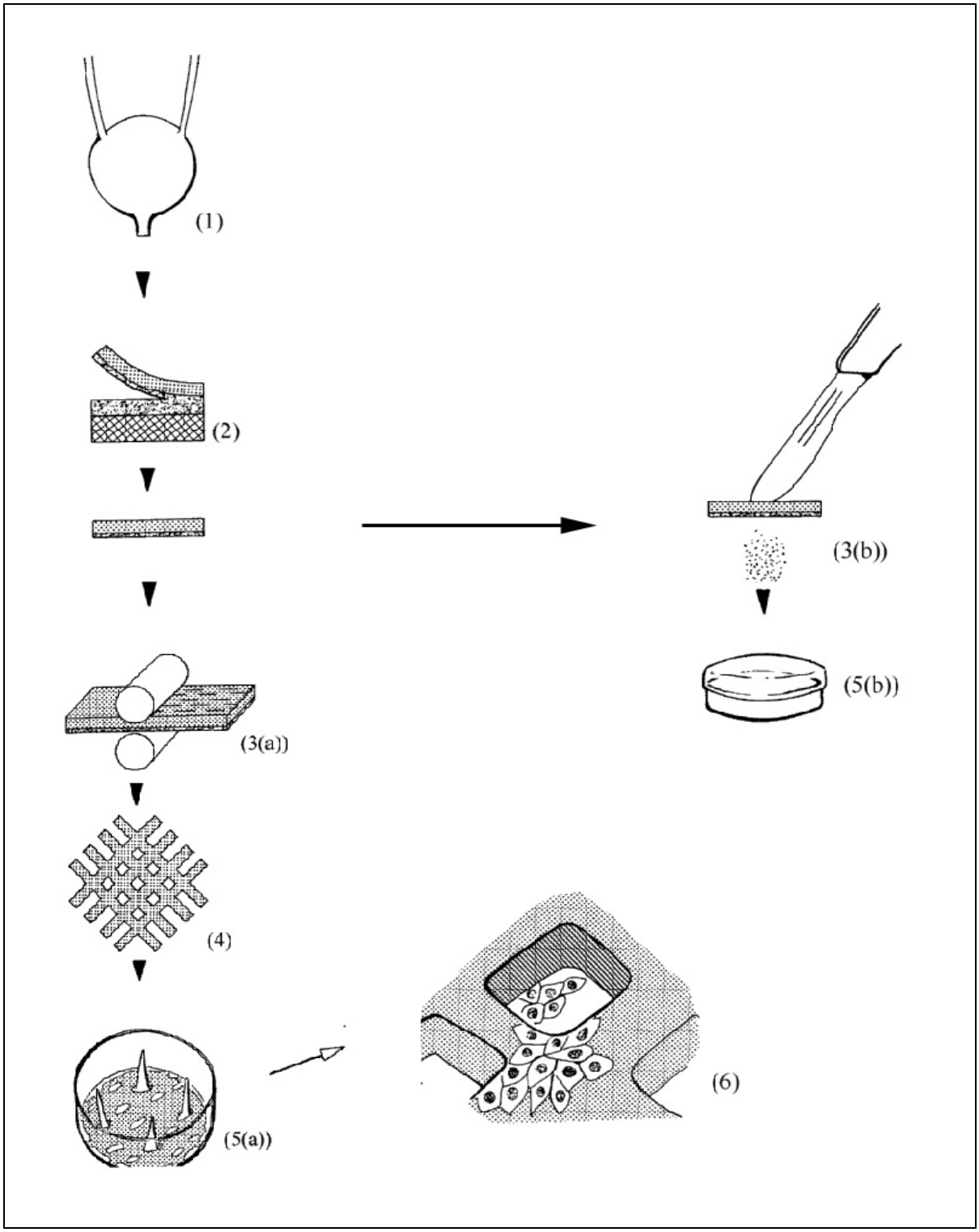

Abb.1 Versuchsablauf 1: 1) Harnblase 2) Präparation der Mukosaschicht 3a) Zuschneiden des Harnblasenpräparates 4) Erhalten eines Urothelnetzes 5a) Meshgraftkultur 6) lichtmikroskopische Beobachtung der Meshkultur 3b) Abschaben von Urothelzellen 5b) Kontrollkultur von Urothelzellen [gezeichnet von Peekel, Institut für Anatomie der Universität Lübeck]

Im Hinblick auf eine klinische Anwendung wurde untersucht, ob sich ein urotheliales Meshgraftpräparat möglicherweise zum Transfer von Urothel in eine urotheliale Defektzone oder in andere Gewebe eignet. Mit einer solchen Technik könnten neue Strategien der Blasenaugmentation entwickelt werden.

Als Transportvehikel wurde dazu ein Ballonkatheter aus Silikon gewählt. Über ein solches System kann ein urotheliales Meshgraft minimalinvasiv in die gewünschte Körperregion eingebracht werden. Voraussetzungen dafür sind der Nachweis, das ausgehend von einem Katheter-Mesh-Konstrukt ein Zellwachstum ausgehen kann und das eine ausreichende mechanische Stabilität des Netzes für das chirurgische Handling besteht. Deshalb untersuchten wir:

4. Sind urotheliale Meshgraftpräparate ein mechanisch belastbares Kultursystem?
5. Können urotheliale Meshgraftpräparate auf Silikonkatheter ein Wachstum von Urothelzellen induzieren?

Dieser Versuchsablauf ist in Abbildung 2 dargestellt.

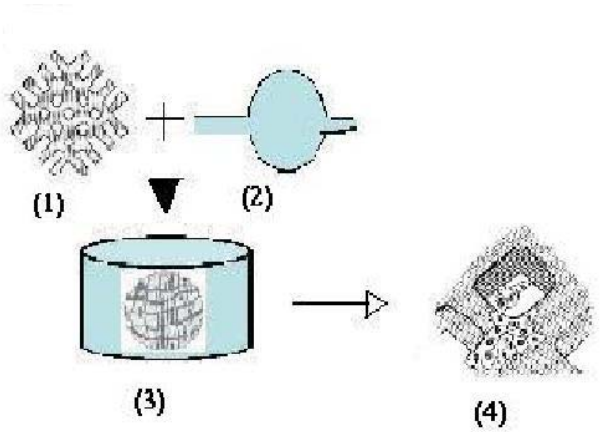

Abb. 2 Versuchsablauf 2: (1) hergestelltes Urothelnetz (nach siehe Abb.1) (2) Ballonkatheter (3) Meshgraft auf Ballonkatheter in Kultur (4) Lichtmikroskopische Beobachtung des Zellwachstums nach mechanische Belastung des Meshgrafts auf dem Ballon

Material und Methoden

Literaturrecherche

Es wurden in Pubmed und im Web of Science Artikel unter den Stichworten „urothelial tissue engineering“, „artificial bladder“, und „biomaterials for urogenital reconstruction“ gesucht. Die Suche wurde auf den Zeitraum von 1998 bis 2010 beschränkt. Für die weitere Untersuchung selektierten wir ausschließlich experimentelle Arbeiten, die Zell-Matrix-Konstrukte in vitro oder in vivo beschrieben. Erfasst wurden die Fragestellung der Arbeit, der verwendete Zelltyp, das verwendetete Biomaterial und ob es sich um in vivo oder in vitro Versuche handelte. Besonderes Augenmerk wurde den berichteten Ergebnissen und den in der Diskussion genannten Problemen zugewandt.

Experimenteller Teil

Materialgewinnung und Präparation der Harnblasen

Die Harnblasen von gesunden Hausschweinen bezogen wir aus 2 Quellen:

Quelle 1:

Es wurden zum Ende eines Operationskurses der Universität zu Lübeck aus gesunden ein- bis drei-jährigen Schweinen, die mit Isofluran narkotisiert und anschließend getötet wurden, durch die Verfasserin Harnblasen unter sterilen Bedingungen entnommen.
Nach sterilem Abwaschen und Abdecken des OP-Feldes wurde die Blase durch eine Unterbauchlaparotomie aufgesucht und entfernt. Diese wurde in 2 Hälften geschnitten, im Transportmedium in das Labor transportiert, bei 4°C asserviert und innerhalb von 24 Stunden weiterverarbeitet. Das Transportmedium bestand aus 500ml mit Phosphat gepufferter Kochsalzlösung (PBS) mit 100ml 50%ige Glucose, 0,8ml 8,4%iges Natriumhydrogencarbonat, 10ml 1M 4-2-Hydroxyethyl-1-piperazinethansulfonsäure (HEPES) und 2,5ml Trasylol®(Aprotinin).

Quelle 2:

Es wurden Harnblasen von Schweinen der „Norddeutschen Fleischzentrale Lübeck“(NFZ), einem Schlachthof, für die Experimente verwendet. Dort erfolgte direkt nach Tötung die Eröffnung des Bauchraumes und saubere Entnahme der Harnblase. In sterilen mit dem oben beschriebenem Transportmedium gefüllten Gefäßen wurden die Blasen in das Labor transportiert, dort bei 4° C gelagert und weiterverarbeitet.

Im Labor präparierten wir die Blasen unter der Lamina-Flow-Werkbank innerhalb von 24 Stunden. Die Mukosa wurde vom Muskelgewebe der Blase separiert.
Diese kultivierten wir dann in Kulturgefäßen als zuvor präparierte Gewebekultur oder Zellkultur bei 37°C in einer 5% CO^2 enthaltenden wassergesättigten Atmosphäre.
Die Kulturen wurden alle zwei Tage kontrolliert und das Kulturmedium gewechselt.

Tab. 3: Angaben zu den verwendeten Kulturgefäßen		
Kulturgefäß	**Kulturfläche**	**Menge Kulturmedium**
Zellkulturflasche	75 cm^2	15 ml
Zellkulturflasche	150 cm^2	30 ml
Kulturplatte mit 6 Vertiefungen	9,6 cm^2	3 ml
Kulturplatte mit 12 Vertiefungen	3,5 cm^2	2 ml

Meshgraftpräparation und -kultur

Für die Kultur der Netzpräparate muss eine Schrumpfung bzw. ein Aufschwimmen verhindert werden, da Epithelzellen eine Verankerung zum Wachstum benötigen. Zunächst präparierten wir die Kulturgefäße wie folgt: Es wurden vier 2,5 cm lange abgeschnittene Polyurethanpipettenspitzen (Sigma, Taufkirchen) in jede Mulde einer Kulturplatte (6-well) mit Histoacrylkleber aufgeklebt und diese sterilisiert.

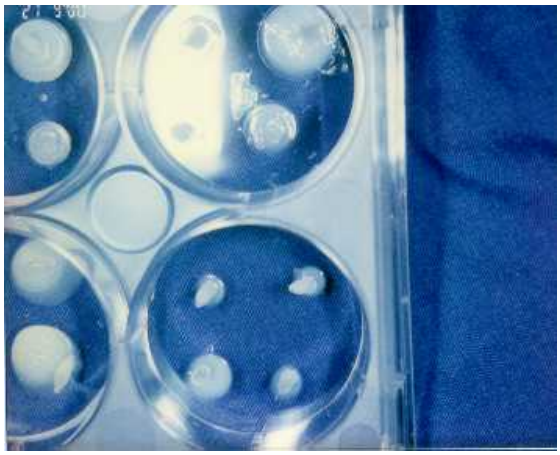

Abb.3 Kulturplatte mit Polyurethanspitzen

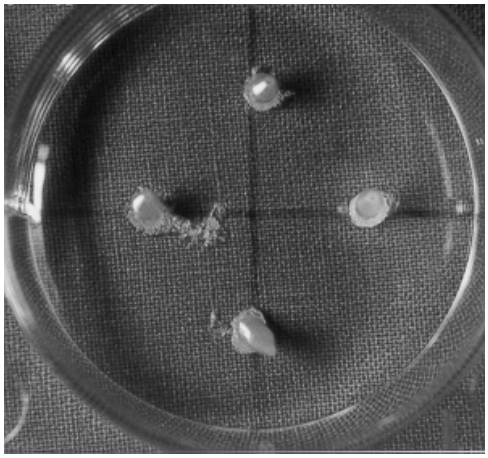

Abb.4 Kulturmulde mit Spitzen zum Aufspannen des Netzes

Darin kultivierten wir die Meshgrafts.

Aus den Harnblasenmukosen stellten wir Meshgrafts wie folgt her: Von der Harnblase entfernten wir die Tunica muskularis mit dem adventitialem Gewebe. Die Schleimhaut schnitten wir in 2x2 cm große Stücke. Die Schichtdicke betrug ca. 1mm, darin enthalten: die Urothelschicht mit Basalmembran und ein Saum aus der Submukosa. Die Exemplare

lagerten wir in gekühlter PBS-Lösung bei 4°C für 3 bis 24 Stunden. Diese Stücke schnitten wir anschließend mit einem Schneidegerät für Hauttransplantate (Meshgraftgerät, Vergrößerungsfaktor 1:3) in ein regelmäßiges Netz.

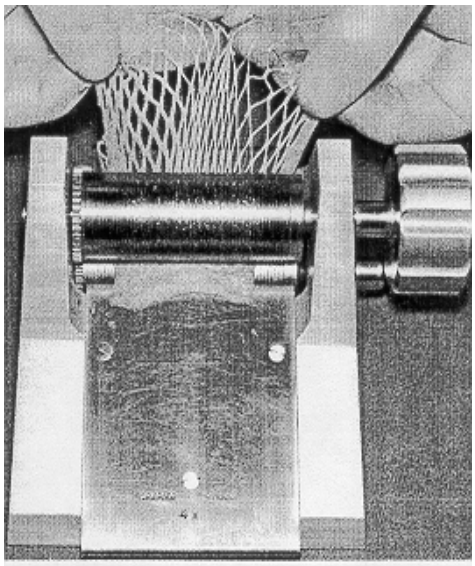

Abb.5: Herstellung eines Hauttransplantats mithilfe eines Netzschneidegerätes [aus McGregor(1992) Abb. 3.22, Seite 80]

Abb.6: Schweinemukosa vor dem Schneiden

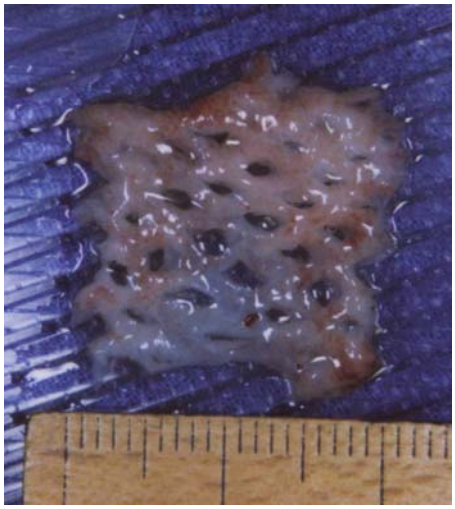

Abb.7 Nach dem Schneiden = Meshgraft

Diese Meshgrafts wurden auf die Haltedornen der Kulturplatte (6-well) gebracht und mit Keratinozytenmedium (KCM) bis zu 3 Monate lang kultiviert. Das Keratinozytenmedium enthielt 5 µl/ml Penicillin+Streptomycin (Biochrom KG A2213), 5 µl/ml Glutamin

(Biochrom KG K0363), 5 ng/ml epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), 20 g/ml boviner Hypophysenextrakt (BHE) und 500 ml KCM (GIBCO BRL® products).
Die Mukosaseite wies stets nach oben.
Die Haltedornen benutzten wir, um eine Retraktion des Netzes zu verhindern und um eine bessere Adhäsion des Netzes auf dem Untergrund zu bewirken.
Die Netze entfernten wir nach 7 Tagen aus der Primärkultur und setzten sie in andere Kulturplatten um. Aus den verbliebenen Zellen in den Kulturgefäßen züchteten wir Zellkulturen.
Diese Meshgrafts und deren Subkulturen wurden täglich makroskopisch und/oder lichtmikroskopisch auf Wachstum und Vitalität kontrolliert und das Medium gewechselt.
Die Gewebe entnahmen wir nach einer, vier und 12 Wochen zur histologischen Untersuchung. Wir fixierten diese dafür in Bouin´s Lösung und betteten sie in Paraffin ein.
Die Exemplare wurden für die Rasterelektronenmikroskopie in Monti Graciano D Lösung fixiert.

Einzelzellschichtkulturen

Zum Vergleich haben wir Primärkulturen nach einer modifizierten Methode nach Atala durchgeführt, wobei ein optimales Wachstum mit Rinderhypophysenextrakt (BPE) und epidermalem Wachstumsfaktor (EGF) erreicht wurde (Atala, Freeman et al., 1993; Tobin et al., 1995).
Dazu schabten wir von der Mukosa die Urothelzellen mit Hilfe eines Skalpells ab. Mit Phosphat gepufferter Kochsalzlösung (PBS) spülten wir zweimal die Zellen ab und brachten diese in Lösung.
Dann wurden sie ca. fünf Minuten in Trypsin (Biochrom®) inkubiert, um sie voneinander zu lösen.
Die Reaktion stoppten wir mit Trypsin-Inhibitor (6,7mg Trypsin-Inhibitor [Sigma®] in 20 ml Medium) und zentrifugierten die Zellsuspension in der Zentrifuge 5 Minuten bei 1000U/min. Den Überstand saugten wir ab. Das verbleibende Sediment lösten wir mit serumfreiem Keratinozytenmedium (KCM). Die so erhaltene Zellsuspension wurde in Zellkulturflaschen mit KCM gegeben. Das Keratinozytenmedium enthielt 5 µl/ml Penicillin+Streptomycin (Biochrom KG A2213), 5 µl/ml Glutamin (Biochrom KG K0363), 5 ng/ml EGF (Epidermal Growth Factor), 20 g/ml BPE (Bovine Pituitary Extrakt) und KCM (Gibco BRL® products).

Die Zellen wurden im Inkubator „Hera cell“ von Heraeus bei 37°C in einer 5% CO^2 enthaltenden wasserdampfgesättigten Atmosphäre kultiviert, bis sie ca. 80% der Fläche bedeckten. Dann passagierten wir sie in eine größere Flasche. Zweimal in der Woche wechselten wir das Medium und die Kulturen wurden täglich mikroskopisch kontrolliert. Kulturflaschen, die eine mikrobielle Kontamination aufwiesen, verwarfen wir.

Kultur und mikroskopische Untersuchungen

Passagieren

Zur Passage saugten wir das Medium ab und spülten die Kulturflasche oder -platte mit PBS aus. Dann inkubierten wir die Zellen je nach Volumen des Kulturgefäßes mit 3 bis 6 ml Trypsin im Brutschrank für 5 bis 10 Minuten. Danach wurde die Reaktion mit Trypsin-Inhibitorlösung gestoppt, die restlichen Zellen durch leichtes Beklopfen des Kulturgefäßes gelöst, die Lösung in ein Röhrchen pipettiert und bei 1500U/min für 5 Minuten zentrifugiert. Den Überstand saugten wir ab und die Zellen wurden in Keratinozytenmedium suspendiert und in ein größeres oder in entsprechend mehrere kleinere Kulturgefäße pipettiert.

Inversionslichtmikroskopie

Um das Wachstum und die Vitalität der Zellkultur- und der Gewebekulturreihen zu beurteilen, kontrollierten wir sie unter dem Inversionslichtmikroskop und fotografierten diese.

Für die histologische Beurteilung wurden die Zellen mit Bouin´s Fixaktionslösung fixiert, durch Ethanol dehydriert und mit Mayer´s Haematoxylin-Eosin-Lösung gefärbt. Die Ergebnisse wurden ebenfalls fotografisch dokumentiert.

Immunefloreszensmikroskopie urotheltypischer Intermediärfilamente

Die abgeschabten Zellen passagierten wir bei konfluentem Wachstum und kultivierten sie für die Immunhistochemie in Chamber-Slides (Objektträger mit Zellkulturkammern). Nachgewiesen wurden die Intermediärfilamente Panzytokeratin, als Nachweis für epitheliale Zellen. Für die standardisierten Immuneffloreszensessays wurde eine kommerzielle Mixtur von monoklonalen Anti-Cytokeratin-Antikörper eingesetzt (Cytokeratin 1, 4, 5, 6, 8, 10, 13, 18, 19).

Vorgegangen wurde dabei wie folgt: Die Zellen wurden mit Hilfe eines Puffers gelöst, der 2%iges Paraformaldehyd, 0,1M Hydroxyethyl-piperazinyl-ethansulfonsäure (HEPES),

1mM Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure (EGTA), 1mM MgSO4 und Triton X-100 (Octoxinol 9, Sigma®), in aqua dest gelöst, enthielt.
Dann wurden sie dreimal für jeweils 5 Minuten mit 1mg BSA/ml PBS plus 0,1% Triton X-100 gewaschen, danach einmal für 5 Minuten nur mit 1 mg BSA/ml PBS.
Die Zellen wurden dann mit dem ersten Antikörper, monoklonales Anti-Pancytokeratin [SIGMA C2562] 1:100), in 1 mg BSA/ml PBS für eine Stunde inkubiert und erneut drei mal wie oben beschrieben gewaschen. Danach wurden die Zellen mit dem zweiten Antikörper, FITC(Fluoreszin Isothiozyanat)-markierte Ziegen-anti-Maus-Antikörper ([SIGMA F 2012] 1:50), für eine Stunde inkubiert und nachfolgend wie oben beschrieben gewaschen. Dann wurden die Zellen mit Poly-D-Lysin, 1mg/ml PBS für 10 Minuten inkubiert, einmal mit PBS gewaschen und zum Abschluss wurden 25 mg DABCO/ml Glycergel [SIGMA D2522, DAKO C 0563] hinzugefügt.
Die Lichtmikroskopie und die Immunefluorescenzmikroskopie wurden mit dem Axiomat (Zeiss®) durchgeführt.

Rasterelektronenmikroskopie

Für die Rasterelektronenmikroskopie spülten wir die Präparate mit warmer PBS und fixierten sie dann mit 2% Glutaraldehyde und 0,6% Paraformaldehyde in einem 0,06M Sodium Cacodylate Puffer (pH 7,35) über 24 Stunden bei 4°C. Dann wurden sie in Aceton dehydriert, in einem critical-point Trockner getrocknet und mit Gold-Paladium ummantelt und anschließend in einem Philips SEM505 Raster-Elektronen-Mikroskop bei 30 kV untersucht. Die Ergebnisse dokumentierten wir auf APX100 Filmen.

Mechanische Untersuchung

Extensionstest

Um die mechanische Stabilität der Meshgrafts zu testen, spannten wir diese in ein mechanisches Messgerät (Extensionsgerät Zwick®). Das Gerät zog das eingespannte Material (2 cm x 4 cm) mit einer Geschwindigkeit von 12 mm/min um 50% der Ausgangslänge auseinander. In der zweiten Versuchsreihe wurde das Mesh bis zu dessen Ruptur gezogen. Dabei stellten wir die dafür nötige Kraft (Fmax) gegenüber der dabei auftretenden Längenzunahme graphisch dar.

Kultur auf Ballonkatheter

Um die Formbarkeit der Meshes zu untersuchen, versuchten wir diese auf einer sphärischen Oberfläche zu kultivieren. Wir fixierten die Meshgrafts mit Hilfe von Fibrinkleber (Tissuecol®, Baxter) auf Silikonkatheter (Barton®) und überschichteten die Katheterspitze in einer 6-Mikrotiterplatte mit Keratinozytenmedium. Diese wurden im Inkubator (Hera cell®, Heraeus) für 7 Tage kultiviert und histologisch und elektronenmikroskopisch untersucht.

Ergebnisse

Literaturergebnisse

Im ersten Teil der Arbeit wird der gegenwärtige Stand beim Tissue Engineering urothelialer Organe analysiert. Dazu wurden 15 Arbeiten ausgewählt.

Eine inhaltliche Übersicht über die Verwendung von Zell-Matrix-Konstrukten gibt die folgende Tabelle:

Tab. 4: Literaturergebnisse von 1998-2010

Jahr	Autor	Fragestellung	Methode	Ergebnis	Problem
1998	Yoo	besiedelte vs unbesiedelte Matrix zur Blasenaugmentation	Urothel und Myofibroblasten auf BAMG, Hund	besiedelte Implantate führen zu höherer Blasenkapazität	avaskulär
2001	Schoeller	Matrixinduktion durch Silikonblock, vaskularisiert	Urothel in neuformierte Kapsel zur Blasenaugmentation, Ratte	Urothel auf Muskel nachweisbar	mechanische Eigenschaft unbekannt
2004	Schultheiss	biologisch vaskularisierte Matrix	Zellen auf SIS, Schwein	Anastomosierung durchführbar	Überlebenszeit nur für Stunden beurteilt
2004	Shiroyanagi	Urothel auf mukosektomiertem Magengewebe	Hund	Urothel wächst auf mukosektomiertem Magengewebe	avaskulär
2004	Zhang	Einfluss der Zellbesiedlung subcutaner Implantation	SIS und Urothel und Fibroblasten, Maus	Zellen verbessern die Einheilung	avaskulär
2005	Chung	SIS mit und ohne Stammzellen (Knochenmark)	Blasenaugmentation, Ratte	Stammzellen reduzieren Matrixfibrose	Defekt sehr klein
2005	Lu	Beeinflussung Matrix durch Myofibroblasten	SIS und Muskelzellen, Maus	Beeinflussung Biomechanik von SIS wenig	In vitro und Biomechanik
2005	Wünsch	Vergleich zugelassener Biomaterialien und Urothel	Schwein, Mensch	Erhebliche materialbedingte Unterschiede	In vitro

2006	Atala	Phase II Blasenaugmentation	PGA und Urothel, Mensch	Erste klinische Studie	Teilweise nur geringgradige Verbesserung des Blasenvolumens
2006	Drewa	Vergleich PGA mit und ohne Fibroblasten	PGA-Matrix und Fibroblasten, Ratte	Fibroblasten verbessern Epithelialisierung	Heterogene Besiedlung des Patches
2006	Farhat	Zelladhäsion durch Fibrinspray auf der Matrix	BAMG mit Urothel und Muskelzellen, Schwein	Fibrinkleber fördert Gewebeorganisation	Zentrale Fibroseareale
2006	Zhang	Vergleich besiedelte vs unbesiedelte Matrix	SIS mit und ohne Urothel, Hund	weitestgehende Schrumpfung in beiden Gruppen	Avaskulär, in keiner Gruppe histologisch oder zystometrisch gutes Ergebnis
2007	Baumert	Vaskularisierter Blasenersatz	SIS (kugelförmig) mit Urothel und Muskelzellen, Implantation in Omentum, Schwein	Gute Vaskularisierung, blasenähnlicher Wandaufbau	Keine Einschaltung in den Harntrakt
2007	Han	Avaskulärer Blasenersatz	Urothel auf BAMG, Hase	Mehrschichtiges Epithel nachweisbar	Herstellung der Matrix kompliziert
2010	Bouhout	Herstellung eines wasserdichten Blasenäquivalents	Urothel auf Fibroblastenmatrix, Schwein	Wasserdichtes, strukturiertes Gewebe mit adäquaten biomechanischen Eigenschaften	avaskulär
BAMG= Bladder Acellular Matrix Graft **PGA=**Polyglycolacid **SIS=**Small Intestine Submucosa					

Die Arbeiten unterscheiden sich erheblich in der Größe der rekonstruierten Defekte, der verwendeten Biomaterialien und der Zellkulturtechnik. Alle werden von den Autoren als erfolgversprechende erste Schritte gewertet.

In vergleichenden Untersuchungen führt die Verwendung von Zell-Matrix-Komponenten bei größeren Defekten zu besseren Regenerationsergenissen als die alleinige Verwendung von Biomaterialien ohne Zellen. Dabei sind die Regeneration eines geschlossenen Epithels

sowie das Vorhandensein einer Muskelschicht als Kriterium gewählt. Zuvor azellularisierte Harnblasensubmukosa, die in vitro mit Muskelzellen und Urothelzellen besiedelt wurden, zeigten in vivo im Verlauf eine höhere Kapazität im Gegensatz zu den Blasen aus der Kontrollgruppe mit unbesiedelter Submukosa (Yoo, Meng et al. 1998). Sie hatten eine normale Compliance und einen normalen urothelialen Aufbau mit Einsprossung von Nervenfasern in das Gewebe.

Polyglycol-Polylactid (PGA), ein synthetisches Polymer, wurde häufig als Matrix für Urothelgewebe verwendet (Atala, Freeman et al., 1993; Mooney et al. 1997; Atala et al., 1999). Mit diesem Material wurden zunächst in vitro und Kleintieruntersuchungen durchgeführt. PGA wurde reepithelialisiert und absorbiert (Cilento, Retik et al., 1995; Yoo, Satar et al. , 1995). Es konnte ein subtotalen Blasenersatz mit gutem funktionellen Ergebnis und nahezu normalem histologischen Wandaufbau erreicht werden (Fauza et al. , 1998). Die wünschenswerten Charaktereigenschaften dieses Polyesters konnten in mehreren Studien bestätigt werden (Cilento, 1994; Fauza, 1998). Im Anschluss folgte ein Großtierversuch in Hunden sowie eine erste klinische Studie (Oberpenning et al., 1999). In den USA wurden bereits bei Patienten mit Myelomeningocele und schweren Blasenfunktionsstörungen eine Augmentation mit in vitro hergestelltem Blasengewebe durchgeführt (Atala, Bauer, 2006). Aktuell wurde die Folgestudie jedoch abgebrochen, Details sind noch nicht publiziert.
Auffällig ist jedoch auch in dieser Publikation, dass keine serumfreien Kulturmedien verwendet wurden. Auch das Biomaterial wurde im Verlauf der klinischen Studie gewechselt, begonnen wurde mit PGA, später wurde auf SIS gewechselt.
Insgesamt wurde trotz der anerkannten Bedeutung der Biomaterialien nur eine vergleichende Untersuchung in vitro durchgeführt (Wünsch 2005). Bei der Vielzahl der verwendeten Materialien fällt das Fehlen vergleichender Untersuchungen von Biomaterialien in Klein- und Großtierversuchen auf. Viele Autoren weisen auf das Fehlen eines idealen Biomaterials hin (Hodde 2002).

Bei allen oben beschriebenen Methoden ist zum Aufbau einer ausreichend großen Zellmenge ein zweizeitiges Vorgehen notwendig. Zum Erreichen einer ausreichend großen Zellmenge sind proliferationsfördernde Zusätze zur Zellkultur nötig. In keiner der Untersuchungen konnte dabei vollständig auf undefinierte Kultursätze wie Rinderhypophysenextrakt oder fötales Kälberserum verzichtet werden.

Beobachtungen an Meshgraftkulturen

Es wurden Präparate aus der Mukosa von Blasengewebe präpariert und urotheliale Meshpräparate hergestellt. Diese wurden kultiviert und untersucht. Dabei wurden Oberflächenstruktur, mechanische Stabilität und Wachstumsverhalten beurteilt.

Makroskopische Beobachtungen

Bei der Präparation des Blasengewebes erwies es sich als schwierig, eine gleichmäßige Schnitttiefe zu erreichen. Zu dick präpariertes Gewebe wurde von dem Schneidegerät nicht vollständig geschnitten. Die Bearbeitung von dünneren Präparaten bis zu einem Millimeter war hingegen komplikationslos. Es resultierten gut expandierbare Netze.
Wenn Netze in einem üblichen Zellkulturgefäß mit Kulturmedium überschichtet werden, kommt es zur Retraktion des Gewebes in der Kultur und zur Gewebsnekrose.
Das Zusammenfallen konnte durch die von uns entwickelte Fixationstechnik verhindert werden, das Netz blieb aufgespannt und das Kulturmedium konnte die Gewebebrücken gut erreichen. Eine Adhäsion zum Gefäßboden war damit ebenfalls gegeben.

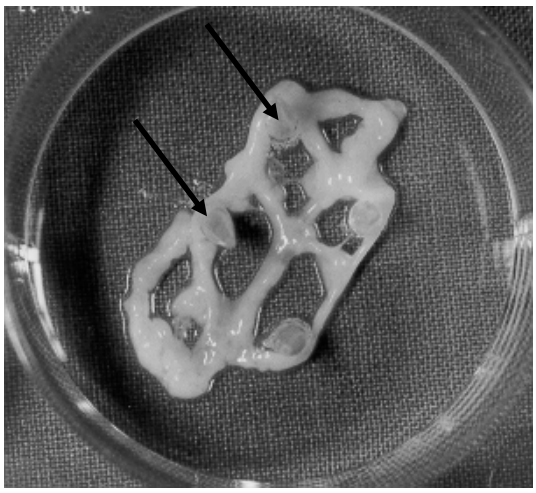

Abb.8 Mesh in einer (6-well) Kulturplatte: Aufgeklebte Pipettenspitzen (Pfeile) halfen bei der Fixierung des Mesh in die Vertiefung einer Kulturplatte.

In den Meshgraftkulturen konnten bereits nach 24 Stunden die ersten Zellkolonien zwischen den Gewebebrücken am Gefäßboden beobachtet werden. In unserem Versuchssystem vermehrten sich die Zellkolonien in 66,6 % der Fälle (16 von 24) bis zu konfluenten Bedeckung des Gefäßbodens. 8 Kulturen waren aufgrund von Gewebsnekrosen oder Kontamination mit Sprosspilzen nicht erfolgreich.

Die Netze zeigten Gewebebrücken von im Durchschnitt einem Millimeter Dicke. Einige Teile des Netzes wuchsen im Kontakt zum Untergrund, während andere frei im Medium schwebten. An Stellen mit festem Kontakt des Netzes zum Gefäßgrund zeigte sich ein deutlich besseres Zellwachstum.
Die Lücken des Meshgrafts, die komplett mit einer Einzelzellschicht geschlossen waren, eröffneten sich beim Herausnehmen der Netze, da die Zellen adhärent zum Gefäßgrund wuchsen.
Meshgrafts, die vital blieben, konnten aus den Kulturplatten herausgenommen und in andere passagiert werden. Dabei behielten sie ihre ursprüngliche Form und Struktur bei. So konnte das gleiche Meshgraft zum Ansetzen mehrerer Kulturen benutzt werden.
Unterschiede fanden sich im Wachstum innerhalb einer Mikrotiterplatte. In den einzelnen Vertiefungen wuchsen die Zellen unterschiedlich schnell.

Mikroskopische Beobachtungen

Lichtmikroskopische Beobachtungen

Meshgrafts konnten aufgrund ihrer Stärke nur am lichtdurchlässigen Rand und in den Zwischenräumen des Netzes lichtmikroskopisch beurteilt werden. So erlaubte die Netzstruktur eine gleichzeitige Beurteilung von Gewebestrukturen und den am Boden der Kulturgefäße wachsenden Zellen.
Das Ablösen der Zellen vom Meshgraft konnte schon nach wenigen Stunden beobachtet werden. Viele dieser Zellen wuchsen adhärent zum Untergrund und bildeten polygonale Zellhaufen. Diese Zellen teilten sich im Verlauf auf den Boden des Kulturgefäßes und konnten wiederholt passagiert werden. Dadurch konnten mehrere Subkulturen aus einem Netz hergestellt werden. Diese Zellen wiesen weiterhin eine polygonale Form auf, wie es für Urothelzellen typisch ist.

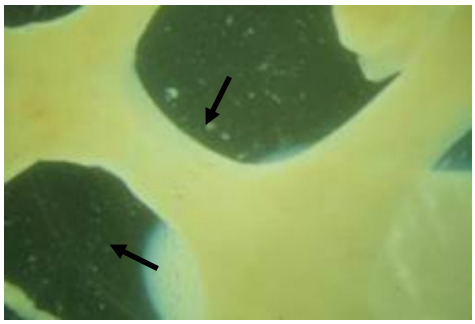

Abb. 9 Lichtmikroskopie des Meshgraft: In den Zwischenräumen des Netzes konnte das Wachstum der Zellen auf den Boden der Kulturplatte beobachtet werden (x10)

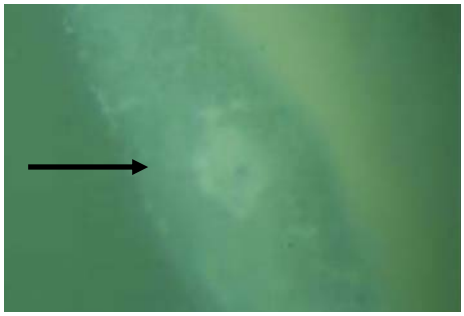

Abb. 10 Zellkolonien am Rand des Netzes (x40)

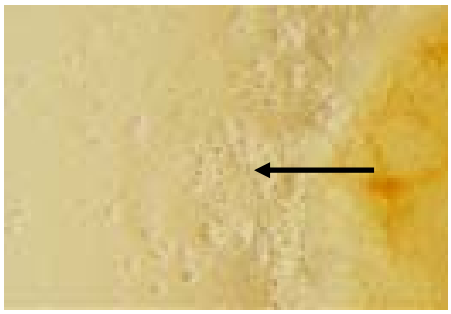

Abb.11 Lichtmikroskopie eines Mesh im Netzzwischenraum (x100): Einzelne Zellen wachsen ausgehend vom Netz in den Zwischenraum.

Abb.12 Lichtmikroskopie eines Mesh im Netzzwischenraum (x100): Proliferation der Urothelzellen, die ausgehend vom Netz wachsen.

Die Proliferation von Urothelzellen konnte bis zu zwölf Wochen lang beobachtet werden. Nach zirka sechs Wochen war der Bereich in den Netzzwischenräumen fast vollständig mit Zellen bedeckt.

Dabei war die vorherrschende Form des Wachstums die Bildung von Zellkolonien um einzelne adhärente Zellen, obwohl auch direktes Auswachsen aus dem Netz zu sehen war.

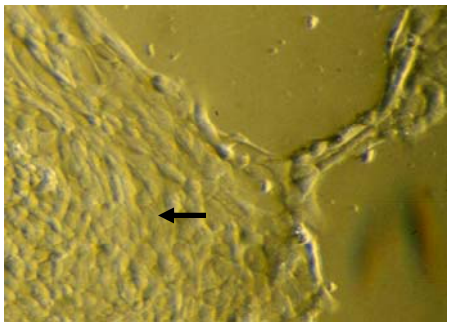

Abb.13 Lichtmikroskopie der Urothelzell-kolonie (x 100): Das pflastersteinartige Muster der Zellen ist gut erkennbar.

Typisch waren die flache polygonale Form der Urothelzellen und die Ausbildung eines geschlossenen Zellrasens.

Eine komplette Deckung der Lücken in den Netzgeweben mit neu gebildetem mehrschichtigen Gewebe in gleicher Stärke konnte in dieser Studie nicht erreicht werden.

Histologische Beobachtungen des Meshgrafts

In der Haematoxilin-Eosin (HE) Färbung zeigte das Meshgraft unmittelbar nach Entnahme den Erhalt des typischen Aufbaus der Tunica mucosa und Submukosa einer Blasenwand. Es waren iso- bis hochprismatische Zellen über einer Basalmembran zu sehen. Die zum Medium gerichtete Schicht wies Zellen mit einer längsgerichteten, flachen Form auf.

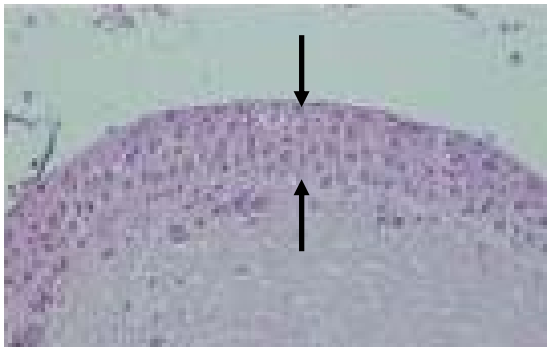

Abb.14 Histologie (x200) eines mit HE gefärbten Mesh: mehrschichtiger Aufbau des Urothel (Pfeile) und ein subepithelialer breiter Saum an Submukosa

Im Verlauf der Kultur zeigte sich in der HE-Färbung ein gradueller Verlust der epithelialen Differenzierung. Wenn die Kultur über zwölf Wochen fortgesetzt wurde, war kein mehrschichtiges sondern lediglich ein einschichtiges Urothel nachweisbar, das entsprechend einer Keimschicht direkt der Basalmembran anlag während die Submukosa keine morphologischen Veränderungen aufzeigte. Die Entstehung neuer Zellkolonien in der Umgebung blieb davon unbeeinflusst.

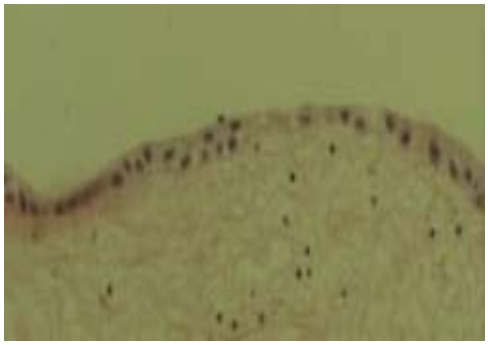

Abb.15 Nach vier Wochen hat sich die Stärke des Urothels bereits deutlich reduziert. (HE x200)

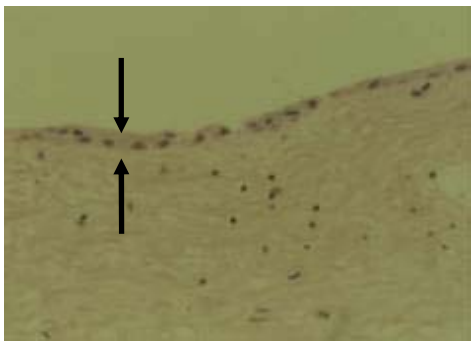

Abb.16 Nach zwölf Wochen hat sich die Urothelschicht auf eine Zellschicht reduziert (Pfeile). (HE x200)

Rasterelektronenmikroskopische Ergebnisse

Die Rasterelektronenmikroskopie des kultivierten Meshgraft zeigte nach sieben Tagen unterschiedliche Urothelzellmorphologien. Im Zentrum der Gewebebrücken fanden sich flache Zellen mit geschlossenen interzellulären Kontakten. Dieses haben wir als normale urotheliale Oberflächenstruktur gewertet. Die Zellen lagen dicht aneinander und bildeten ein dreidimensionales Konstrukt. Die Oberflächen waren meist glatt. Zum Randbereich hin fanden sich abgerundete Zellformen mit Zytoplasmaausläufern. Dies könnte ein Hinweis auf Proliferation und Migration sein, da diese Veränderungen parallel zum Nachweis von Urothelzellkolonien im Kulturgefäßboden und zum Auswachsen von Zellen aus dem Netz auftraten.

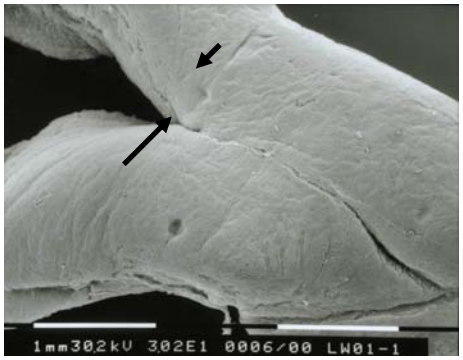

Abb.17 Dreidimensionale Struktur des Mesh in der Rasterelektronenmikroskopischen Aufnahme: Epithel und Submukosa [Pfeile] (1mm 30,0kV)

Abb.18 Verband aus Urothelzellen mit abgerundeter Form und Zell-kontakten (0,1mm 30,0kV)

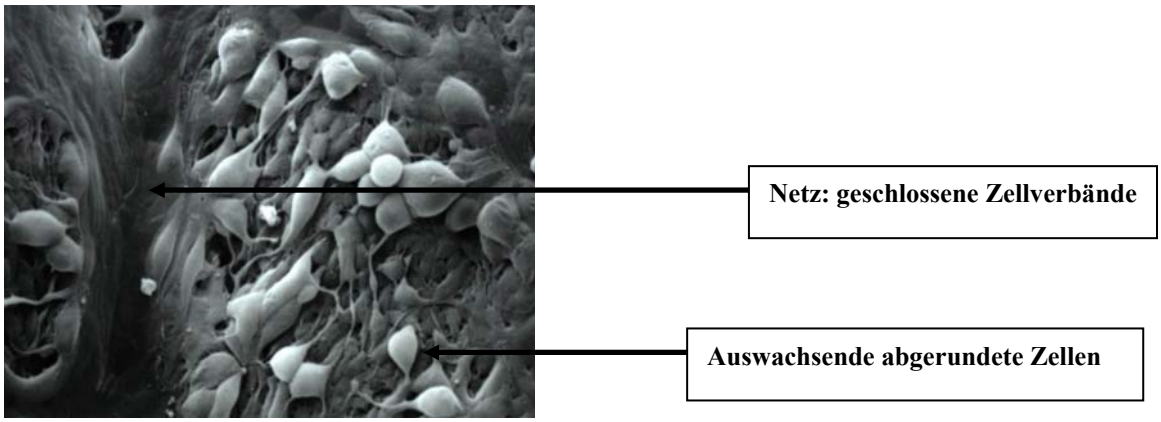

Abb.19 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des Mesh(10µm 30,0kV): Zell-zu-Zell-Verbindungen bilden ein mehrschichtiges Gerüst.

Ergebnisse mechanischer Untersuchungen

Für die mechanischen Untersuchungen waren die Meshgrafts ausreichend stabil, um mit Pinzetten gefasst und manipuliert zu werden.

Extensionsversuche:

Es wurde eine Dehnung um über 100% der Ausgangslänge erreicht, ohne dass das Mesh riss. Es brauchte eine Kraft von 0,86 N, um das Mesh um 50% seiner Ausgangslänge zu ziehen, und 2,6 N um es zu zerreißen. In allen Serien der biomechanischen Testung erhielten wir ähnliche Resultate. Die Versuchsreihe zeigte eindeutig, das urotheliale Meshgraftpräparate ausreichend stabil sind, um mechanisch belastet zu werden.

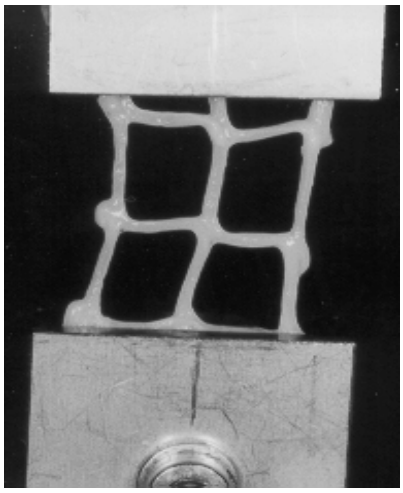

Abb.20 Meshdehnung mit paralleler Kraftaufwandmessung

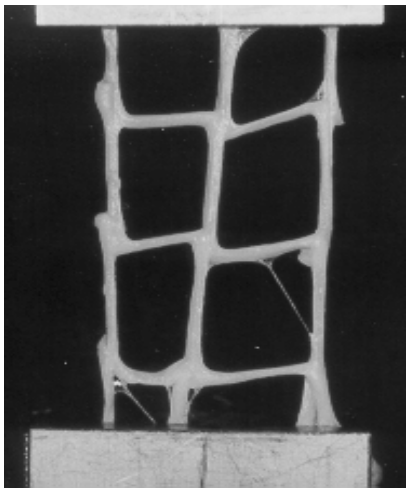

Abb.21 Das native Mesh ließ sich um mehr als das Doppelte dehnen.

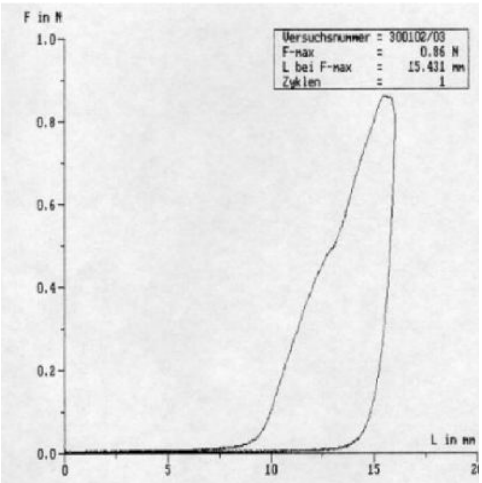

Abb.22 Kurve nach Dehnung des Mesh um 50%.

Meshkultur auf Katheterballon:

Das Meshgraft konnte problemlos auf einen Silikonballon fixiert werden und passte sich der Form des Katheters nach Füllen des Katheterballons an. Das Meshgraft wurde auf dem Ballon in nicht gefülltem Zustand in Keratinozytenmedium kultiviert und rasterelektronenmikroskopisch untersucht.

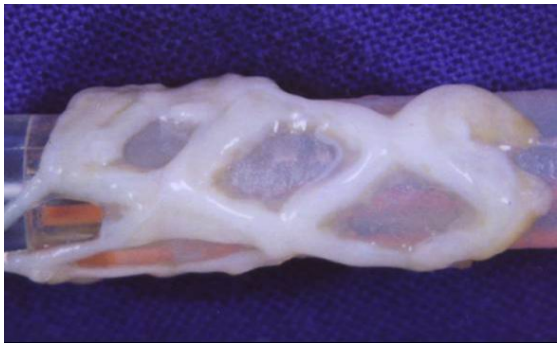

Abb.23 Mesh auf Silikonkatheter vor Aufpumpen des Ballons

Abb.24 Mesh auf Silikonkatheter nach Aufpumpen des Ballons

Nach sieben Tagen zeigte sich eine konfluente Besiedlung mit Urothelzellen, die adhärend auf dem Katheter wuchsen. In der Beurteilung der Zellmorphologie in der Rasterelektronenmikroskopie ergaben sich abgeflachte, polygonale Zellen mit Zellkontakten. Diese Ergebnisse zeigen, dass Urothelnetze auf Silikonballon in Kultur vital bleiben und Zellwachstum induziert wird.

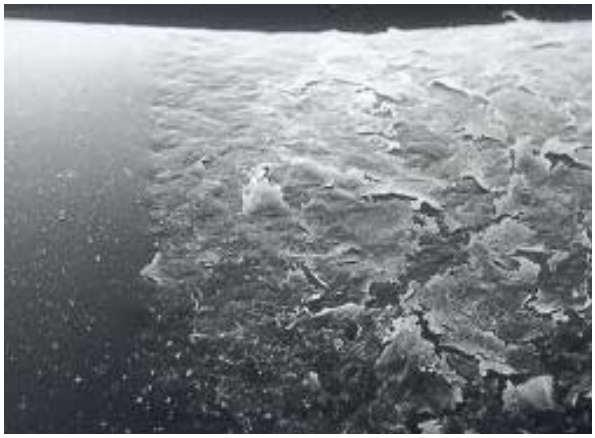

Abb.25 Rasterelektronenmikroskopie(1mm 30,0kV): Ausgehend vom Meshgraft wachsen Zellen auf Silikonkatheter.

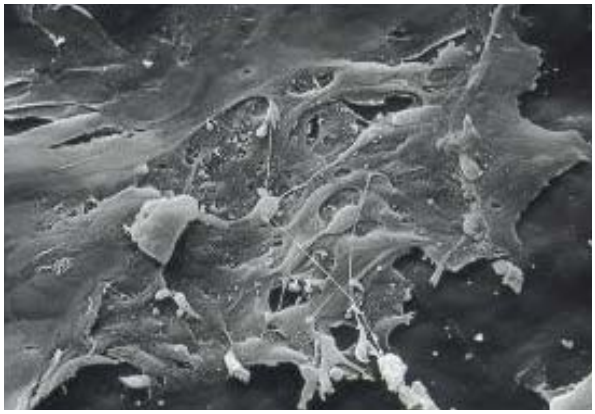

Abb.26 Rasterelektronenmikroskopie(0,1mm 30,0kV): Meshgraft auf Silikonkatheter wachsend

Abb.27 Rasterelektronenmikroskopie(0,1mm 30,0kV): Mesh auf Silikonkatheter: Flache Zellen mit Zellkontakten.

Beobachtungen an Einzelzellschichtkulturen

Makroskopische Beobachtung

Es wurden 24 Zellkulturen nach der im vorangegangenem Teil beschriebenen Methode von Atala und Freeman et al. (1993) angefertigt und untersucht.
Es waren Langzeitkulturen in 70,8 % der Fälle erfolgreich.
Es bildeten sich adhärente Zellgruppen und Einzelzellen am Untergrund der Kulturgefäße. Dabei konnten Zellkolonien ab dem zweiten Tag und konfluent bedeckte Flächen ab dem zehnten Tag beobachtet werden. Die Urothelzellen stellten sich als flache, polygonale Zellen dar, die von Anfang an in zusammenhängenden Zellverbänden mit einer klar erkennbaren Abgrenzung zu den unbesiedelten Flächen wuchsen.

Lichtmikroskopische Beobachtungen

In der lichtmikroskopischen Untersuchung zeigten sich dichte, dünne Einzelzellschichten von spinozellulären, runden oder polygonalen, abgeflachten Zellen mit einem ovalen oder runden Kern. Es wurden zahlreiche Zellkontakte beobachtet.
Zellmorphologie und Wachstumsmuster wiesen daher keine Unterschiede zu Kulturen, die aus Meshgraft stammten, auf.

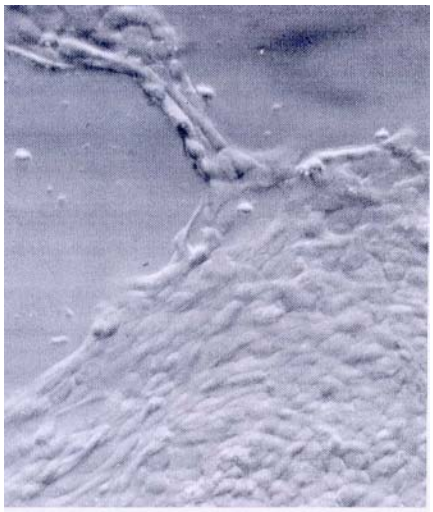

Abb.28 Lichtmikroskopie(x100) einer Zellkultur. Zusammenhängendes flaches Wachstum der Urothelzellen vom Schwein mit vielen Zellkontakten und durchgehender Randbegrenzung.

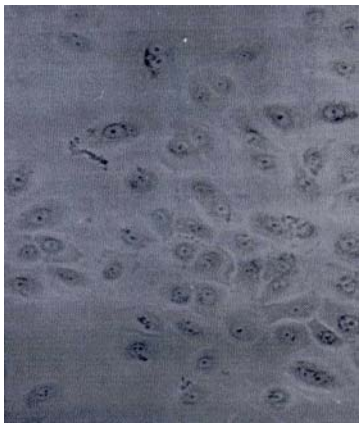

Abb.29 (A) Lichtmikroskopie(x200) einer Zellkultur aus Schweineurothelzellen: Die Zellen haben eine polygonale Form und wachsen im Zellverband.

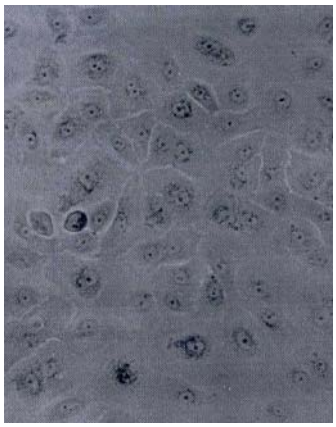

Abb.30 (B) Lichtmikroskopie(x200): Proliferation der Urothelzellen im Kulturverlauf.

Immunhistochemische Ergebnisse

In den Zellkulturen und Meshgraftkulturen mit Keratinozytenmedium zeigte sich, daß morphologisch epitheliale Zellen vorhanden waren. Nach Züchtung der Zellen auf „chamber slides“ und Färbung mit Panzytokeratin (Isoformen CK 1,4,5,6,8,10,13,18, 19) zeigten sich wabige Struktur gleichmäßig verteilt im Zytoplasma dar. Eine Aussparung in der Zellkernregion war zu erkennen. Dieses entsprcht dem typischen Verteilungsmuster von Intermediärfilamenten.

Damit wurden die Zellen sowohl aus der Meshgraftkultur als auch aus der zum Vergleich angelegten Einzelzellschichtkultur zweifelsfrei als Urothelzellen charakterisiert.

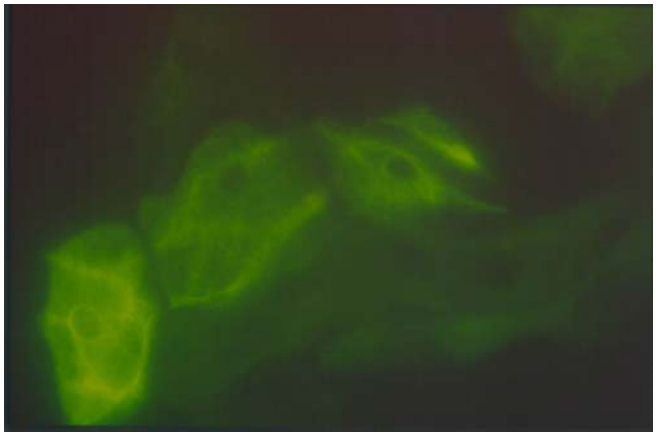

Abb. 31: Fluoreszenzmikroskopie(x250) von immunhistochemisch gefärbten Urothelzellen aus der Zellkultur (mit Pancytokeratin: grün): typisches Verteilungsmuster für epitheliale Zellen.

Nachweis der urothelialen Herkunft und Differenzierung in der Kultur

Zu den Bestandteilen des Cytoskeletts gehören die Intermediärfilamente mit einem mittleren Durchmesser von 8 bis 25 nm. Es handelt sich um polymere Proteine, die jeweils für einen gegebenen Zelltyp spezifisch sind und für dessen Stabilität verantwortlich ist.
In Zellkulturen erlaubt der positive Cytokeratinnachweis eine Unterscheidung epithelialer Zellen gegenüber Zellen mesenchymalen Ursprungs und ermöglicht eine Einschätzung des Differenzierungsgrades der Zellen. Dieser Nachweis wird in dieser Arbeit verwendet. Es wurden bislang 20 verschiedene Isotypen von Cytokeratinen (CK) beschrieben. In gesundem Urothel werden die Cytokeratine 7, 8, 13, 17, 18, 19 und 20 exprimiert (Hutton, 1993; Southgate, 1994; Petzoldt, 1994). Im Vergleich zum Urothel in vivo werden diese

Cytokeratine auch in vitro exprimiert, wobei CK 13, ein Marker für Intermedial- und Basalschicht (Scriven et al., 1997), in vitro nur in geringeren Mengen vorhanden ist. (Petzoldt, 1994; Rebel, 1994; Southgate, 1994). Nach Scriven et al. sind CK 8 und 18 Marker für die Superfizialschicht (Scriven et al., 1997). Nach Ludwikowski et al. ist das Cytokeratinexpressionsmuster von Schweineurothel gleich dem von humanem Urothel (Ludwikowski et al., 1999).

Vergleich der Kulturtechniken

Beim morphologischen Vergleich der Kulturen mit Meshgraft und der Zellkulturen aus der mechanischen Zelldissoziation fanden sich keine morphologischen Unterschiede. Bei beiden Kulturtechniken bildeten sich zunächst Zellkolonien, die sich im Verlauf vergrößerten. .

Die Proliferation der Kulturen ohne Mesh war durchschnittlich schneller als die der Kulturen mit Mesh. Die Zeit bis zum Erreichen eines konfluenten Wachstums in der Primärkultur betrug für Netzpräparate im Durchschnitt 25 Tage, die zum Vergleich angelegten Monolayerkulturen benötigten im Durchschnitt zehn Tage.

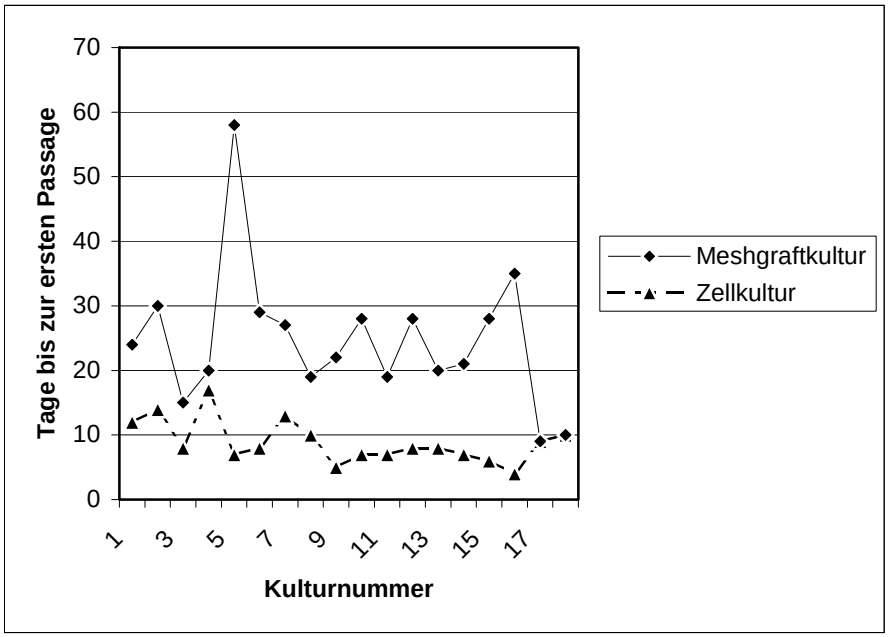

Abb.32: Vergleich Mono- und Gewebekultur: Die Zellkulturen nach Atala und Freeman et al. (1993) brauchten im Durchschnitt weniger Zeit bis zum konfluentem Wachstum (bis zur ersten Passage).

Diskussion

Literaturrecherche

Beim Tissue Engineering urothelialer Organe können generell 3 Strategien unterschieden werden (Abb. 33). Die erste Strategie besteht im alleinigen Einsatz von Biomaterialien. Die matrixinduzierte Geweberegeneration ist wesentlich von den Eigenschaften des Biomaterials und der Defektgröße abhängig.

Die zweite, sehr häufig verwendete Strategie, beruht auf Zell-Matrix-Konstrukten. Dazu werden Implantate aus Biomaterialien, die mit autologen Zellen beschichtet sind, entwickelt. Diese Methode beinhaltet die Isolation von autologen Zellen durch Biopsie, die Expansion dieser Zellen in vitro, Beschichtung einer geeigneten Matrix und die Implantation des neuen Systems in den Körper (Abb.33b) oder die Untersuchung in vitro. Diese Konstrukte sind avaskulär und müssen anfänglich durch Diffusion ernährt werden.

Eine dritte Methode ist die Kombination von Biomaterial und Zellen und mit körpereigenen Geweben und einem erhaltenem oder hergestelltem Gefäßanschluss (Abb.33c). Dazu kann ein gestielter Lappen aus Haut mit Omentum oder Muskelgewebe gebildet werden.

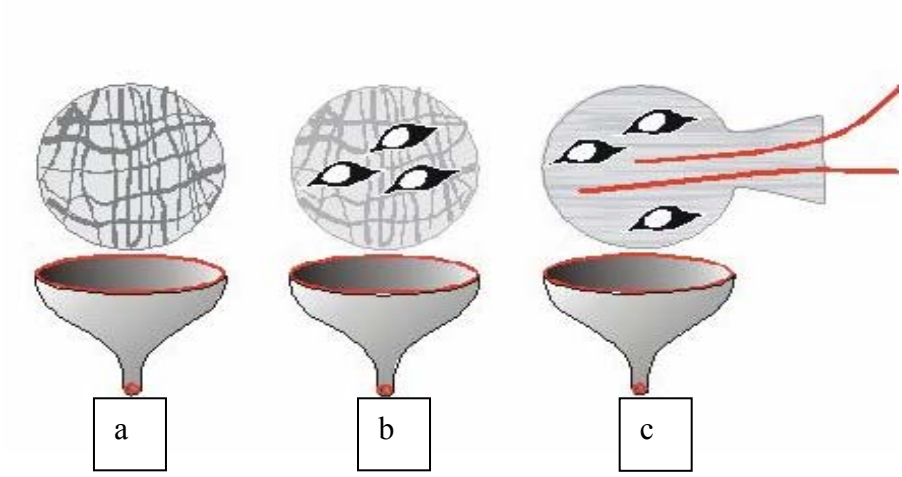

Abb.33

Die Abbildung zeigt schematisch eine Blasenaugmentation und 3 Strategien. Bei (a) wird ein Biomaterial direkt als Matrix zur Blasenrekonstruktion eingesetzt. (b) zeigt die Kombination von Zellen und einem Biomaterial. Bei (c) ist ein Gewebe mit arteriellem und venösem Gefäß in Kombination mit Urothelzellen dargestellt.

Die Herstellung einer Gefäßversorgung ist ein limitierendes Problem aller vorbeschriebenen Ansätze. Ohne eigene Gefäßversorgung kann nur ein dünnes Konstrukt überleben, da nur Strecken bis zu 1 mm durch Diffusion überbrückt werden können.
Zur Herstellung einer Gefäßversorgung wurden unterschiedliche Strategien erprobt. Eine Strategie besteht darin, die Zell-Matrix-Konstrukte mit einem Teil des Omentums zu überdecken, um eine Gefäßeinsprossung zu induzieren
Der Versuch, größere azellularisierte Organe mit Zellen zu besiedeln und in die Zirkulation einzuschalten, war für Herz- und Lungengewebe erfolgreich, für Blase oder Darm aber bislang nicht. Dabei sichern Gefäßanastomosen zunächst die Versorgung. Allerdings kam es im Verlauf von Stunden zu Gefäßverschlüssen und zum Untergang der Konstrukte. (Schoeller, 2001; Schultheiss, 2004).

Da Zell-Matrix-Konstrukte die wichtigste Strategie im urothelialen Tissue Engineering darstellt, haben wir sie in den Mittelpunkt unerer Literauranalyse gestellt.
In dieser Arbeit haben wir die Publikationslage zu den drei Kerntechniken des urothelialen Tissue Engineerings (Biomaterialien, Zellkulturtechnik und Bioreaktortechnik) sondiert. Darüber hinaus haben wir mit dem urothelialem Meshpräparat eine neue Technik beschrieben, die diverse experimentelle und potenziell auch klinische Anwendungsmöglichkeiten eröffnet.

Biomaterialien

Die Analyse der Literatur weist zunächst eine Vielzahl verwendeter Biomaterialien aus. Dies lässt noch immer den Schluss zu, dass noch kein ideales Biomaterial für das urotheliale Tissue Engineering zur Verfügung steht. Zwar bleiben bei Materialien wie dem „bladder acellular matrix graft“ (BAMG) die natürlichen Matrixeigenschaften weitestgehend erhalten. Dennoch bleiben das Problem der begrenzten Verfügbarkeit und die chargenabhängige Qualitätsschwankungen für diese Materialien ungelöst.
Auch zu synthetischen Biomaterialien finden sich wenig neue Publikationen. Zukünftig ist eine Verbesserung am ehesten durch biosynthetische fibrilläre und membranöse Kollagene zu erwarten. Der Versuch, trotz erkennbarer Mängel der verfügbaren Biomaterialien mit Zell-Matrix-Produkten eine klinische Studie zu beginnen, hat zu unbefriedigenden Ergebnissen geführt (Atala, 2006). Dabei erschienen die Probleme mit der Matrix entscheidend. Die Einführung neuer Biomaterialien kann somit als zentrale Aufgabe für die Weiterentwicklung des urothelialen Tissue Engineerings formuliert werden. Da unsere

Analyse zeigt, dass vergleichende Untersuchungen von Biomaterialien in Klein -und Großtiermodellen fehlen, wären diese ein sinnvoller weiterer Schritt. So könnten Materialien mit besonders günstigen Eigenschaften identifiziert werden. Biochemisch und mechanisch günstige Materialeigenschaften könnten exakt definiert werden. Darauf basierend könnte eine gezielte Entwicklung synthetischer Biomaterialien erfolgen.

Zellkulturtechnik

In der Zellkulturtechnik lassen sich eine Phase der Zellvermehrung zum Aufbau einer ausreichend großen Zellmasse und eine nachgeschaltete Differenzierungphase unterscheiden. Die Differenzierung erfolgt entweder in vitro unter speziellen Kulturbedingungen oder zumeist in vivo (Minuth et al., 1992).
Die Mehrzahl der Autoren arbeitet weiterhin mit serumhaltigen Medien. Somit bleibt ein Restrisiko für die Übertragung pathogener Mikroorganismen, Nukleinsäuren oder Proteinen. Die langfristigen Auswirkungen der Zellkultur auf die spätere Funktion der Zell-Matrix- Konstrukte sind ebenfalls noch unbekannt. Verlaufsbeobachtungen über mehrere Jahre fehlen weitgehend, und es ist unklar, wie lange die Zellen auf den Konstrukten regenerationsfähig bleiben.
Ein prinzipieller Nachteil von Zell-Matrix-Konstrukten ist die Notwendigkeit, autologe Zellen durch eine Biopsie zu entnehmen. Der Vorteil der bereits beschriebenen Zellgewinnung aus Spontanurin ist die geringe Invasivität, der Nachteil die geringe Zellausbeute. Über die genaue anatomische Herkunft kultivierter Zellen aus dem Spontanurin konnte in anderen Untersuchungen keine sichere Aussage gemacht werden (Herz et al., 1980 und 1985; Felix et al., 1980; Lindner et al., 1976). Die Zellen des Spontanurins könnten neben Zellen renaler und urothelialer Herkunft ebenso Plattenepithelzellen der distalen Urethra sowie mit Epithelzellen aus der Prostata bzw. Vagina kontaminiert sein.

Der Einsatz adulter induzierter Stammzellen aus leichter erreichbaren Geweben, z.B Fett oder peripherem Blut, würde das Tissue Engineering für urotheliale Organe leichter durchführbar machen, da eine direkte Traumatisierung des Harntraktes zur Gewebeentnahme unterbleiben könnte. Erste experimentelle Untersuchungen dazu liegen vor (Conrad, 2008). Nachteilig ist die Notwendigkeit der genetischen Manipulation dieser Zellen, die neue Unsicherheitsfaktoren beinhaltet. Die Strategien zur stabilen Induktion

von Stammzelleigenschaften in adulten Zellen machen schnelle Fortschritte, ein klinischer Einsatz für die hier behandelten Probleme ist allerdings noch nicht abzusehen.

Unter definierten Kulturbedingungen konnte gezeigt werden, dass Urothelzellen bestimmte differenzierte Zellfunktionen beibehalten. Guhe et al. konnten zeigen, dass die Aktivitäten der Prostaglandin-H-Synthase, N-Acetyltransferase und Gluthathion-S-Transferase in Primärkulturen von Harnblasenepithelzellen des Schweines unter serumfreien Kulturbedingungen weitgehend erhalten bleiben (Guhe und Föllmann, 1994; Guhe et al., 1996).
Frederickson et al. wiesen die metabolische Aktivierung von N-hydroxy-4-Aminobiphenyl in vitro in menschlichen Urothelzellkulturen nach. In einer weiteren Studie zeigten sie Aktivitäten von N-Acetyltransferase und O-Acetyltransferase im Cytosol von kultivierten humanen Urothelzellen (Frederickson et al. 1992, 1994). Das dabei verwendete Kulturmedium enthielt einen Zusatz von 7 bzw. 1% fetalem Kälberserum (Reznikoff et al., 1983).
Prinzipiell kommt es während der Phase der Zellvermehrung aber zu einem Verlust der Differenzierung, da nur teilungsfähige, wenig differenzierte Zellen überleben (Singhvi et al., 1994; Koechlin et al., 1991). Der Erhalt von organtypischen Eigenschaften kann durch Cokulturen, Zytokine oder mechanische Stimulation erfolgen.
Zukünftige Untersuchungen an urothelialen Meshgrafts sollen klären, ob in diesem Kultursystem auf undefinierte Zusätze verzichtet werden kann.
Mehrere Untersuchungen zeigen, dass Blasenepithelzellen extensiv kultiviert werden können, ohne ihre normale Form und zytogenetischen Eigenschaften zu verlieren (Oberpenning et al., 1999). Diese Zellen, die unter definierten Bedingungen vermehrt wurden, bilden auch Wachstumsfaktor-ähnliche Faktoren. (Cilento et al., 1994)

Atala et al. beschrieb die Abhängigkeit urothelialer Zellkulturen von Wachstumsfaktoren. Es zeigte sich, dass der Zusatz eines zweiten EGF-ähnlichen Faktors (HB-EGF=heparin binding EGF-like growth factor) zu einer gesteigerten dosisabhängigen Zellproliferation führte. Rinderhypophysenextrakt ist ein wichtiger Wachstumsfaktor für Urothel. Der Effekt des Hypophysenextraktes beruht wesentlich auf basic fibroblast growth factor (bFGF). Diese Untersuchungen zeigte auch, dass Urothelzellen kaum EGF produzieren, dafür aber viel EGF-ähnliche Faktoren wie transforming growth factor α (TGFα), heparin binding EGF-like growth factor (HB-EGF) und Amphiregulin (AR) (Tobin et al., 1995).

Sterle et al. schloss aus seinen Untersuchungen, dass transforming growth factor β (TGF β) aus dem stromalem Gewebe für die Differenzierung von Blasenepithel wesentlich ist (Sterle, 1997).
In der Literatur werden interessante Hypothesen über die Stromafunktion dargestellt. Insbesondere scheinen parakrine Prozesse zur Signaltransduktion bedeutsam zu sein. Auf die große Bedeutung dieser Interaktion zwischen Fibroblasten und Urothel haben verschiedene Autoren hingewiesen. Im Gegensatz zu Einzelzellschichtkulturen konnte eine Proliferation der Urothelzellen in Kulturen mit stromalem Zellanteil auch ohne Zusatz von Wachstumsfaktoren nachgewiesen werden (Wolf, 1996; Southgate, 1994; Sterle, 1997).
Eine Studie von Kreft zeigte, dass Zellen, die ohne Lamina propria kultiviert wurden gegenüber Kulturen mit einer Lamina propria kürzere Überlebenszeiten und eine geringere Differenzierung aufwiesen. Ohne Matrix blieben die Zellen Zytokeratin-negativ, wiesen nur spärliche Tight-Junctions auf und zeigten keine asymmetrische Membran (Kreft, 2000).
Die Migrationsgeschwindigkeit von humanen Stammzellen konnte durch eine Co-Kultur mit reifen Urothelzellen und Harnblasenmuskelzellen erhöht werden und zeigte ein gezielte Migration in Richtung auf die reifen Zellen (Frimberger et al., 2006)
Bei einer Verletzung des Urothels werden durch die Epithelzellen der Keimschicht auf der Basallamina vermehrt Rezeptoren für epidermale Wachstumsfaktoren exprimiert. In urothelialen Zellen wurde vermehrt mRNA für zwei Liganden des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor nachgewiesen, ein abgewandelter Wachstumsfaktor α und Amphiregulin (Cilento, 1994). Dies unterstreicht die Wichtigkeit der Zell-Zell-Kommunikation für die Regeneration und Proliferation urothelialen Gewebes.
Es liegt inzwischen eine umfangreiche Literatur über in vitro Untersuchungen von Urothelzellen vor. Die zentralen Probleme einer möglichst minimalinvasiven Gewinnung von Urothel und einer sicheren Zellkulturtechnik ohne infektiologische oder mutagene Risiken sind aber zurzeit noch nicht gelöst.

Bioreaktortechnik

Zur speziellen Bioreaktortechnik für das urotheliale Tissue Engineering finden sich wenige Publikationen. Strategien beruhen auf der Beschichtung von Zellkulturgefäßen mit Proteinen der extrazellulären Matrix oder Proteinen der Basalmembran (Taub et al., 1990; Butor et al, 1992) Eine weitere Modifikation beruht auf der permanenten Durchströmung der Kultur mit frischem Medium (Jauregui et al., 1993).

Urotheliales Meshgraft

Meshgrafts auf der Grundlage von Spalthaut sind eine fest etablierte Form der Hauttransplantation, die zu guten klinischen Erfolgen führt. Die Ausdehnung dieses Prinzips auf andere epitheliale Oberflächen erscheint deshalb erfolgversprechend. Deshalb haben wir in der hier vorgestellten Studie das urotheliale Meshgraft-Modell entwickelt und getestet. Dazu wurden aus porcinen Harnblasen die Mukosa präpariert, Meshgrafts hergestellt und erfolgreich kultiviert. Dabei war es für lange Zeiträume möglich, vitale Zellen in vitro zu beobachten. Zumeist werden zur Zellisolierung mechanische oder enzymatische Methoden beschrieben (Atala, Freeman et al., 1993; Southgate, 1994),

Größere Gewebepräparate können wegen der langen Diffusionswege nicht kultiviert werden. Folkman beschrieb schon 1973, dass sich eine lange Diffusionsstrecke ungünstig auf die Gewebevitalität auswirkt (Folkman und Hochberg, 1973). Durch die schmalen Gewebebrücken im Mesh entstehen kurze Diffusionswege, welche die gute langfristige Kultivierbarkeit erklären. Die vorliegende Arbeit ist die erste Beschreibung von urothelialen Meshpräparaten. Die Kultur von urothelialen Meshgraft stellt somit eine vollständig neue Methode dar und erlaubt eine Reihe neuer Anwendungsmöglichkeiten.

Besondere Vorteile des Meshgraft-Modells

Unsere Untersuchungen zeigen, dass urotheliale Meshgraftpräparate in vitro vital bleiben und zum Aufbau von Urothelkulturen verwendet werden können.
Eine wesentliche Besonderheit unseres Modells liegt im Erhalt der Gewebearchitektur und Orientierung der Zellschichten. Es kann deshalb als Modellsystem einer urothelialen Wunde betrachtet und für experimentelle Untersuchungen genutzt werden. Gegenstand solcher Untersuchungen können Wundheilungsprozesse des Urothels, oder die Zellproliferation und –differenzierung sein. In einem solchen Modell könnten auch vollständig definierte Zellkulturmedien ohne risikobehaftete Zusätze erprobt werden. Im Vergleich zu Monolayer-Zellkulturen erlaubt das Meshmodell die Untersuchung von Struktur-Funktions-Beziehungen, wobei normale Gewebe oder solche mit relevanten Erkrankungen untersucht werden können. An Präparaten von Patienten mit urothelialen Karzinomen , können pathogenetische Faktoren dieser Erkrankungen unter in vitro

Bedingungen besser charakterisiert werden. Nach Standardisierung des Modellsystems könnten auch potenzielle Schadstoffe und Pharmazeutika getestet und die Zahl von Tierversuchen reduziert werden.

Die Kultur von Meshgrafts ist ein neuartiges System für die Herstellung von Zellkulturen. Chakteristisch ist die Präsenz von Faktoren aus der subepithelialen Schicht des Mesh.
Ein Kultursystem mit Kollagengel als Matrix zeigte eine positive Wirkung auf die Differenzierung epithelialer Zellen (Fujiyama, 1995). Die Kultur epithelialer Zellen gelingt außerdem leichter in Anwesenheit von Fibroblasten und Matrixproteinen (Fujiyama et al., 1995). Bei den zu Tissue Engineering verwendeten Techniken wurden meist Epithel und Stromazellen getrennt kultiviert und dann erneut kombiniert.
Charakteristisch für das Meshgraft ist außerdem der Erhalt der Gewebearchitektur mit der physiologischen Anordnung der verschiedenen Zelltypen und extrazellulären Matrix. Durch den Erhalt verschiedener Zelltypen in diesem Modell können parakrine Prozesse ähnlich wie in vivo ablaufen und so möglicherweise der Einsatz undefinierter Zellkulturkomponenten reduziert werden.
Das Meshgraft könnte als Organkulturmodell zur Untersuchung des Einflusses der Topographie auf Differenzierung und Proliferation von Basallamina-enthaltendem Gewebe dienen. Ähnliche Modelle wurden bereits am Beispiel der Haut beschrieben (Pins, 2000; Kratz, 1998).
Southgate beschrieb das fehlen von Differenzierungsmarkern in urothelialen Einzelzellschichtkulturen. Da ein mehrschichtiger Aufbau und die nötige mechanische Festigkeit in vitro nicht erreicht werden, ist eine direkte Implantation, anders als bei Keratinozyten-Sheets, nicht möglich. (Southgate, 1994). Die Zell-Matrix-Interaktion hat eine entscheidende Bedeutung in der Differenzierung. Dies zeigt eine Studie von Scriven. Dabei wurde vorher deepithelialisiertes Gewebe mit Zellen besiedelt. Dies führte nun zu einer Ausbildung eines Gewebes mit einem geschichteten Epithel und morphologischen und immunhistochemischen Differenzierungsmarkern (Scriven, 1997).

Im Meshmodell blieb in unseren Untersuchungen die Differenzierung des Urothels nicht langfristig erhalten. Zum Erhalt des differenzierten Phänotyps müssen deshalb weitere Faktoren erforderlich sein. Die Differenzierung des Urothels ist von großer funktioneller Bedeutung. Sie nimmt von basal nach apikal zu. Eine Deckzelle breitet sich über einen Durchmesser von 100 µm aus und bedeckt so mehrere intermediäre Zellen, weshalb sie

auch als Schirmzelle („umbrella cell“) bezeichnet wird. Charakteristisch für das Urothel ist die verdickte apikale Membran (Crusta), die aus gegeneinander verschieblichen Membranverdickungen besteht, welche eine Anpassung an die schwankenden Volumenverhältnisse in den ableitenden Harnwegen erlauben (Kreft, 2000). Es wurde die wichtige Schutzfunktion der Deckzellschicht im Modell nachgewiesen (Junqueira, 1996; Truschel, 1999). Langzeitkulturen des Mesh zeigten in der histologischen Untersuchung keine Crusta.
Im Meshpräparat konnte aber weiterhin eine Proliferation von Urothelzellen in die Umgebung beobachtet werden. Hier sind noch weitere Versuchsreihen notwendig, um zu ergründen, ob in einer Langzeitkultur in dreidimensionaler Form, z.B. durch eine Kombination von einem Mesh und einem Biomaterial, die Differenzierung der Zellen erhalten werden kann.

In der Einzelzellschichtkultur wird die Bildung eines mehrschichtigen Epithels durch die so genannte Kontaktinhibition verhindert. Darunter versteht man eine Einschränkung der Beweglichkeit der Zellen bei gegenseitiger Berührung, welche bewirkt, dass keine Fortbewegung in Richtung auf die Nachbarzelle und damit über diese hinweg erfolgt (Buchner, 1997). Nach Southgate haben fetale, undifferenzierte Urothelzellen einen schnellen Umbau, während postnatale, bereits differenzierte Zellen langsamer proliferieren. Bei der Monolayerkultur kommt es zu einer Selektion von wenig differenzierten Zellen mit hoher Teilungsrate.(Southgate et al., 1994). Das langsamere Wachstum von Zellen aus Meshgrafts könnte somit ein Hinweis sein, dass trotz des Verlustes der Schichtung noch wachstumshemmende Faktoren aktiv sind.

Viele Untersuchungen weisen auf die Bedeutung mechanischer Faktoren für zelluläre Funktionen hin. Wir konnten zeigen, dass Meshpräparate ausreichend stabil zur Applikation von mechanischen Reizen sind. Der Vorzug des Meshmodells besteht somit darin, dass in vitro Prozesse der Mechanotrasduktion untersucht werden können. Die fehlende mechanische Stimulierbarkeit ist ein Nachteil vieler aktueller Zell- und Gewebekultursysteme. In unserer Studie konnten Meshgraft auf Katheter fixiert und kultiviert werden. Diese Methode kann einerseits als mechanisches Modell genutzt werden. Dabei kann die Organkultur mechanischen Reizen ausgesetzt werden, indem der Ballon des Katheters auf- und abgelassen wird. Die Bedeutung der mechanischen Stimulation auf intrazelluläre Prozesse wurde insbesondere von Ingber hervorgehoben (Ingber, 2003).

Urothelzellen in statischer Kultur unterscheiden sich also vom Urothel in vivo, das Druckbelastungen und Scherbelastungen ausgesetzt ist. Das Meshmodell erlaubt somit die Simulation von mechanischen Reizen auf das Urothel

Ein weiteres wichtiges Ziel des Tissue Engineering ist es, experimentelle Modelle zur Reduktion von Tierversuchen, z. B. für Biokompatibilitätsuntersuchungen, zu liefern. Besonders günstig ist, dass dazu auch humane Gewebe verwendet werden können. Das Meshmodell vergrößert durch seine besonderen Eigenschaften die Zahl der verfügbaren Systeme.

Im Hinblick auf eine mögliche klinische Anwendung kann eine urotheliales Mesh wie bei Spalthauttransplantaten große Flächen abdecken und epithelialisieren. Wir konnten nachweisen, dass auch nach Fixierung auf einem Silikonkatheter weiter Zellen auswachsen. Ziel dieses Versuchs war es, zu klären, ob ein Mesh nach Implantation auf einen Katheter vital bleibt und ein solches Konstrukt für den Transfer von Urothel auf Faszien oder in Muskeln genutzt werden könnte. So könnten neue Techniken zur Blasenaugmentation entwickelt werden, die den Einsatz von Gewebe aus dem Gastrointestinaltrakt überflüssig machen. Dieses Potenzial sollte zunächst in Tierversuchen weiter ausgelotet werden Für den klinischen Einsatz ergäbe sich außerdem der Vorteil, dass auf komplizierte Zellkulturtechniken und ihre noch unkontrollierbaren Risken verzichtet werden könnte.

Ausgehend von den ursprünglichen Betrachtungen ist die Rekonstruktion des unteren Harntraktes mit autologem Gewebe noch immer als klinischer Standard zu betrachten. Zwar sind zahlreiche und beträchtliche Komplikationen bekannt, Behandlungsalternativen auf der Grundlage des Tissue Engineerings sind für eine breitere Anwendung noch nicht ausreichend entwickelt. Dennoch ist das Tissue Engineering eine erfolgversprechende Strategie, die mit Nachdruck weiter entwickelt werden sollte.

Zusammenfassung

Wenn die Blase funktionell ersetzt oder vergrößert werden muss, geschieht dies in der Regel mit Gewebe aus dem Gastrointestinaltrakt. Dabei können Elektrolytstörungen, Steinbildung, narbige Schrumpfung und ein erhöhtes Tumorrisiko auftreten.

Das Tissue Engineering urothelialer Organe profiliert sich als alternative Strategie und zahlreiche experimentelle und wenige klinische Untersuchungen liegen vor.

Wir untersuchten im ersten Teil der Arbeit durch Literaturrecherche, welche Strategien zur Anwendung gekommen sind und wie diese in Hinblick auf eine mögliche klinische Anwendung zu bewerten sind.

Der experimentelle Teil der Arbeit evaluiert urotheliale Meshgrafts als mögliche Ressource für das Tissue Engineering. Dazu wurden Zellkulturen aus Meshpräparaten und traditionell hergestellte Urothelkulturen angesetzt und verglichen. Zusätzlich wurde das Meshgraft auf mechanische Belastbarkeit geprüft.

Zell-Matrix-Konstrukte wurden erfolgreich zur Harnwegsrekonstruktion im Klein- und Großtierexperiment verwendet. Schwachpunkte bleiben die fehlende Vaskularisation, die Ineffizienz serumfreier Urothelkulturen und das Fehlen eines leicht verfügbaren und geeigneten Biomaterials.

Die experimentellen Ergebnisse zeigten erstmals, dass auch ausgehend von urothelialen Meshgrafts Urothel kultiviert werden kann und es somit als neue Technik für das Tissue Engineering verfügbar ist. Der Erhalt des Gewebeverbandes und die mechanische Stabilität des Meshgrafts erlauben neue experimentelle Ansätze. Die Implantation urothelialer Meshgrafts erlaubt im Folgendem experimentelle Studien, in denen Urothel in vivo auf Faszien, Peritoneum oder anderem Gewebe angesiedelt und in einem zweiten Schritt zur Harnwegsrekonstruktion verwendet werden kann.

Zell-Matrix-Konstrukte sind die wichtigste Strategie im urothelialen Tissue Engineering. Die drei Kerntechniken Biomaterialien, Zellkulturtechnik und Bioreaktortechnik beeinflussen sich gegenseitig und können somit als zentrale Aufgabe für die Weiterentwicklung des urothelialen Tissue Engineerings formuliert werden.

Unter Anwendung des urothelialen Meshgraft-Modells mit dessen besonderen Vorteilen, könnten neue Strategien der Blasenaugmentation entwickelt werden.

Literaturverzeichnis

A

Amiel GE, Atala A (1999) Current and future modalities for functional renal replacement. Urol Clin North Am 26:235-246

Atala A (1999) Future perspectives in reconstructive surgery using tissue engineerig. Urol Clin North Am 26:235-246

Atala A, Bauer SB, Soker S, Yoo JJ, Retik AB (2006) Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. Lancet 367:1241-1246

Atala A, Freeman MR, Vacanti JP, Shepard J, Retik AB (1993) Implantation in vivo and retrival of artificial structures consisting of rabbit and human urothelium and human bladder muscle. J Urol 150:608-612

Atala A, Hendren WH (1994) Reconstruction with bowel segments. Dialogues in Pediatric Urology 17:7

Atala A, Hendren WH, Bauer S, Retik A (1993) The effect of gastrocystoplasty on bladder function. J Urol 149:1099

Atala A, Kim W, Paige KT, Vacanti CA, Retik AB (1994) Endoscopic treatment of vesicouretral reflux with a chondrocyte-alginate suspension. J Urol 152: 641-643

B

Batzler WU, Baumgarten-Elms C, Eisinger B, Lehnert M, Schön D, Schüz J, Stegmaier C (1997) Krebs in Deutschland - Häufigkeiten und Trends. Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland (Hrsg.), Saarbrücken

Baumert H, Simon P, Hekmati M, Fromont G, Levy M, Balaton A, Molinie V, Malavaud B (2007) Development of a seeded scaffold in the great omentum:

feasibility of an in vivo bioreactor for bladder tissue engineering. Eur Urol 52:884-890

Becker N, Wahrendorf J (1998) Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland: 1981 – 1990 Berlin, Heidelberg

Berchtold R, Hamelman H, Peiper HJ, Trentz O (1999) Chirurgie. Urban & Fischer 929-954

Booth C, Harnden P, Trejdosiewicz LK, Scriven S, Selby PJ, Southgate J (1997) Stromal and vascular invasion in an human in vitro bladder cancer model. Lab Invest 76:843- 857

Bouhout S, Perron E, Gauvin R, Bernard G, Ouellet G, Cattan V, Bolduc S (2010) In vitro reconstruction of an autologous, watertight and resistant vesical equivalent. Tissue Engineering 16(5):1539-1548

Bucher O, Wartenberg H (1997) Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. Verlag Hans Huber, Bern 52

Burg KJL, Holder WD, Culberson CR, Beiler RJ, Greene KG, Loebsack AB, Roland WD, Eiselt P, Mooney DJ, Halberstadt CR (2000) Comparative study of seeding methods for three-dimensional polymeric scaffolds. JBMR 51(4): 642-649

Butor C, Davoust J (1992) Apical to basolateral surface area ratio and polarity of MDCK cells grown on different supports. J Exp Cell Res 203:115-127

C

Chen F, Yoo JJ, Atala A (1999) Acellular collagen matrix as a possible „off the shelf“ biomaterial for urethral repair. Urology 54(3): 407-410

Chung SY, Krivorov NP, Rausen V, Thomas I, Frantzen M, Landsittel D, Kang YM, Chon CM, Fuchs GJ (2005) Bladder reconstruction with bone marrow derived stem cells seeded on small intestinal submucosa improves morphological and molecular composition. J Urol 174:353-359

Cilento BG, Freeman MR, Schneck FX, Retik AB, Atala A (1994) Phenotypic and cytogenetic characterization of human bladder urothelia expanded in vitro. J Urol 152:665-670

Cilento BG, Retik AB, Atala A (1995) Urethral reconstruction using a polymer mesh. Presentation by Atala, J Urol Suplement 153:4, 571

Claes H, Stroobants D et al. (1989) Pulmonary migration following periurethral polytetrafluorethylene injection for urinary incontinence. J Urol 142:821-822

Conrad S, Renninger M, Hennenlotter J (2008) Generation of pluripotent stem cells from adult human testis. Nature 456:344-349

Cross WR, Thomas DF, Southgate J (2003) Tissue engineering and stem cell research in urology. BJU Int 92(2): 165-71

D

Dahms SE, Piechota HJ, Dahiya R, Lue TF, Tanagho (1998) Composition and biomechanical properties of the bladder acellular matrix graft: comparative analysis in rat, pig and human. BJ Urol 82:411- 419

Dahms SE, Piechota HJ, Nunes L, Dahiya R; Lue TF, Tanagho EA (1997) Free ureteral replacement in rats: regeneration of ureteral wall components in the acellular matrix graft. Urology 50(5): 818- 825

De Boer WI, Vermej M, Diez de Medina SG, Bindels E, Radvanyi F, Van Der Kwast T, Chopin D (1996) Functions of fibroblast and transforming growth factors in primary organoid-like cultures of normal human urothelium. Lab Invest 75:147-156

Denstedt J, Atala A (2009) Biomaterials and tissue engineering in urology. Verlag Crc Pr Inc, Auflage1, 302-303

Drewa T, Czajkowski B, Wozniak A (2006) Scaffold seeded with cells is essential in urothelium regeneration and tissue remodelling in vivo after bladder augmentation using in vitro engineered graft. Transplant Proc 38:133-135

E

Eder IE, Corvin S, Maneschg C, Cronauer MV, Bartsch G Jr, Zhang J, Stenzl A, Bartsch G, Klocker H (2000) Selective culture conditions for different types of primary human bladder cells. World J Urol 18(5): 371-5

F

Falke G, Caffaratti J, Atala A (2000) Tissue engineering of the bladder. World J Urol 18: 36-43

Farhat WA, Chen J, Sherman C, Cartwright L, Bahoric A, Yeger H (2006) Impact of fibrin glue and urinary bladder cell spraying on the in vivo acellular matrix cellularization: a porcin pilot study. Can J Urol 13:3000-3008

Fauza DO, Fishman SJ, Mehegan K, Atala A (1998) Videofetoscopically assisted fetal tissue engineering: bladder augmentation. J Pediatr Surg 33:7-12

Feil G, Maurer S, Nagele U, Sievert KD, Stenzl A (2008) Bioartifizielles autologes Urothel etabliert aus Spülungen der Harnblase. Eine zukünftige Therapieoption für die rekonstruktive Urologie. Der Urologe A 47(9):1091-2

Felix JS, Sun TT, Littlefield JW (1980) Human epithelial cells cultured from urine: Growth properties and keratin staging. In Vitro 16:866- 873

Flieger AH (2000) Etablierung eines Zellkultursystems auf der Grundlage primärer humaner Urothelzellen und seine praktische Anwendung bei der Untersuchung der Genotoxizität des Mykotoxins Ochratoxin A. Med. Diss. Bochum

Folkman J, Hochberg MM (1973) Self regulation of growth in three dimensions. J Exp Med 138:745-753

Friedrich MJ (2000) Tissue Engineering in the Genitourinary System. JAMA, May 17, 283:19

Frederickson SM ,Hatcher JF, Reznikoff CA, Swaminathan S (1992) Acetyl transferase-mediated metabolic activation of N-hydroxy-4-aminobiphenyl by human uroepithelial cells. Carcinogenesis 13:955- 961

Frederickson SM, Messing EM, Reznikoff CA, Swaminathan S (1994) Relationship between in vivo acetylator phenotypes and cytosolic N-acetyltransferase and O-acetyltransferase activities in human uroepithelial cells. Cancer Epimiol Biomarkers Prevention 3:25- 32

Frimberger D, Morales N, Gaerhart JD, Gaerhart JP, Lakshmanan Y (2006) Human embryoid body-derived stem cells in tissue engineering – enhanced migration in co-culture with bladder smoth muscle and urothelium. Urology 67(6):1298-1303

Fujiyama C, Masaki Z, Sugihara H (1995) Reconstruction of the urinary bladder mucosa in threedimensional collagen gel culture: fibroblast-extracellular matrix interactions on the differentiation of transitional epithelial cells. J Urol 153:2060-2067

G

Gleeson MJ, Griffith DP (1992) The use of alloplastic biomaterials in bladder substitution. J Urol 148:1377-1382

Guhe C, Föllman W (1994) Growth and characterization of porcine urinary bladder epithelial cells in vitro. Am J Physiol 266:F298- F308

Guhe C, Degen G, Schumacher U, Kiefer F, Föllman W (1996) Drug metabolizing enzyme activities in porcine urinary bladder epithelial cell cultures (PUBEC). Arch Toxicol 70:599- 606

H

Han P, Song C, Yang YI, Wang KJ, Wei Q, Li H (2007) Construction of tissue-engineered urothelial tissue in vitro and in vivo with bladder acellular matrix as scaffold. Zhong Nan Da Xue Bao Yi Xue Ban 32:1058-1063

Haverich A, Graf H (2002) Stem cell transplantation and tissue engineering. Springer Verlag Berlin Heidelberg, 34

Herz F (1980) Culture of urinary cells. In: Danes BS (Hrsg.) In vitro epithelia and birth defects, New York, 85- 93

Herz F, Gazivoda P, Papenhausen PR, Katsuyama J, Koss LG (1985) Normal human urothelal cells in culture, subculture procedure, flow cytometric and chromosomal analysis. Lab Invest 53:571- 574

Hodde J (2002) Naturally occurring scaffolds for soft tissue repair and regeneration. Tissue Eng 8(2):295-308

Hubbell JA, Massia SP, Desai NP et al. (1991) Endothelial cell-selective materials for tissue engineering in the vascular graft via a new receptor. Bio Tech 9:568-572

Hutton KAR, Trejdosiewicz LK, Thomas DFM, Southgate J (1993) Urothelial tissue culture for bladder reconstruction: an experimental study. J Urol 150:721- 725

I

Ingber DE (2003) Mechanosensation through integrins: cells act locally but think globally. Proc Natl Acad Sci USA 100(4):1472-1474

J

Jauregui HO, Hayner NT, Driscoll JL, Williams-Holland R, Lipsky MH, Galletti PM (1981) Trypan blue dye uptake and lactate dehydrogenase in adult rat hepatocytes - freshly isolated cells, cell suspensions, and primary monolayer cultures. In vitro 17:1100-1110

Jauregui HO, Naik S, Santangini H, Pan J, Trenkler D, Mullon C (1993) Primary cultures of rat hepatocytes in hollow fiber chambers. Vitro Cell Dev Biol 30A: 23-29

Junqueira LC, Carneiro J (1996) Histologie. Springer 117

K

Kaefer M, Hendren WH, Bauer S, Goldenblatt P, Peters C, Atala A, Retik A (1998) Reservoir calculi: a comparison of reservoirs constructed from stomach and other enteric segments. J Urol 160:2187

Kelami A, Ludtke-Handjery A, Korb G, Roll J, Schnell J, Danigel KH (1970) Alloplastic replacement of the urinary bladder wall with lyophilized human dura. Eur Surg Res 2:195-202

Kim BS, Baez CE, Atala (2000) Biomaterials for tissue engineering. World J Urol 18:2-9

Koechlin N, Pisam M, Poujeol P, Tauc M, Rambourg A (1991) Conversion of a rabbitt proximal convoluted tubule into a cell monolayer: ultrastructural study of cell dedifferentiation and redifferentiation. Eur J Cell Biol 54: 224-236

Kratz G (1998) Modeling of wound healing processes in human skin using tissue culture. Microsc Res Tech 42(5):345-50.

Kreft ME, Sterle M (2000) The effect of lamina propria on the growth and differentiation of urothelial cells in vitro. Eur J Physiol 440(Suppl): R181-182

Kropp BP, Sawyer BD, Shannon HE, Rippy MK, Badylak SF, Adams MC et al. (1996) Characterization of small intestinal submucosa regenerated canine detrusor: assessment of reinnervation, in vitro compliance and contractility. J Urol 156:599-607

L

Langer R, Vacanti JP (1993) Tissue engineering. Science 260: 920-926

Leonhardt H (1984) Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen. 7. überarbeitete Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart

Lindner D (1976) Culture of cells from the urine and bladder washings of adults. Somatic Cell Genet 2:281- 283

Lu SH, Sacks MS, Chung SY, Gloeckner DC, Pruchtic R, Huard J, De Groat WC, Chencelor MB (2005) Biaxial mechanical properties of muscle derived cell-seeded small intestinal submucosa for bladder wall reconstruction. Biomaterials 26:443-449

Ludwikowski B, Zhang YY, Frey P (1999) The long-term culture of porcine urothelial cells and induction of urothelial stratification. BJU International 84:507-514

M

McDougal WS (1992) Metabolic complications of urinary intestinal diversion. J Urol 147:1199

McGregor IA (1992) Plastische Chirurgie. Grundlagen und klinische Anwendung. 2.Auflage, Springer-Verlag, Berlin

Minuth WW, Dermietzel R, Kloth S, Hennerkes B (1992) A new method culturing renal cells under permanent superfusion and producing a luminal-basal medium gradient. Kidney Int 41:215-219

Mooney DJ, Kim BS, Vacanti JP, Langer R, Atala A (1997) Tissue engineering: genitourinary system. Principles of tissue emgineering 36:591-600

Mooney DJ, Mikos AG (1999) Growing new organs.Scientific American, April

N

Neuhof H (1917) Fascial transplantation into visceral defects: an experimental and clinical study. Surg Gynaecol and Obst. 25:383-387

O

Oberpennig F, Meng J, Yoo JJ, Atala A (1999) De novo reconstitution of a functional mammalian urinary bladder by tissue engineering. Nat Biotechnol 17:149-155

Ogawa S; Tagawa Y; Kamiyoshi A; Suzuki A; Nakayama J; Hashikura Y; Miyagawa S (2005) Crucial roles of mesodermal cell lineages in a murine embryonic stem cell-derived in vitro liver organogenesis system. Stem cells 23, 7: 903-913

P

Paradis K, Langford G, Long Z, Heneine W, Sandstrom P, Switzer WM, Chapman LE, Lockey C, Onions D, Otto E (1999) Search for cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus in
patients treated with living pig tissue. The XEN 111 Study Group Science 20; 285(5431): 1236-41

Patience C, Takeuchi Y, Weiss RA (1997) Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs. Nat Med 3(3):282-6

Petzoldt JL, Leigh IM, Duffy PG, Masters JR (1994) Culture and characterisation of human urothelium in vivo and in vitro. Urol Res 22:67- 74

Piechota HJ, Dahms SE, Nunes LS, Dahiya R, Lue TF, Tanagho EA (1998) In vitro functinal properties of the rat bladder regenerated by the bladder acellular matrix graft. J Urol 159:1717- 1724

Piechota HJ, Dahms SE, Prost M, Gleason CA, Nunes LS, Dahiya R, Lue TF, Tanagho EA (1998) Functional rat bladder regeneration through xenotransplantation of the bladder acellular matrix graft. BJ Urol 81: 548- 559

Pins GD, Toner M, Morgan J (2000) Microfabrication of an analog of the basal lamina: biocompatible membranes with complex topographies. FASEB J 14:493-602

Probst M, Dahiya R, Carrier S, Tanagho EA (1997) Reproduction of functional smooth muscle tissue and partial bladder replacement. B J Urol 79:505- 515

R

Rebel JM, De Boer WI, Thijssen CD, Vermey M, Zwarthoff EC, Van Der Kwast TH (1994) An in vitro model of urothelial regeneration: effects of growth factors and extrazellular matrix proteins. J Pathol 173:283- 291

Reddy PP, Barrieras DJ, Wilson G, Bagli DJ, McLorie GA, Khoury AE, Merguerian PA (2000)

Regeneration of functional bladder substitutes using large segment acellular matrix allografts in a porcine model. J Urol 164 (3 Pt 2) : 936-41

Reznikoff CA, Johnson MD, Norback DH, Bryan GT (1983) Growth and characterization of normal human urothelium in vitro. In Vitro 19:326- 343

Rheinwald JG, O´Connell TM (1985) Intermediate filament proteins as distinguishing markers of cell type and differentiated state in cultured human urinary tract epithelia. Ann NY Acad Sci 455:259- 267

S

Schmiedeke E, Reutter H, Jenetzky E, Schwarzer N, Grasshoff S, Hosie S, Holland-Cunz S, Reifferscheid P, Märzheuser S (2010) Systematische Erforschung der Ursachen sowie operativen und psychosozialen Langzeitergebnisse uro-rektaler Fehlbildungen. Z G&N 1: 31

Schoeller T, Lille S, Bauer T, Piza-Katzer H, Wechselberger G (2001) Gracilis muscle flap with a tissue-engineered lining for experimental bladder wall reconstruction. BJU Int ;88(1) :104-9

Schoeller T, Lille S, Stenzl A, Ninkovic M, Fiza H, Otto A, Russel RC, Wechselberger G (2001) Bladder reconstruction using a prevascularized capsular tissue seeded with urothelial cells. J Urol 165:980-985

Schultheiss D, Gabouev AI, Kaufmann PM, Schlote N, Mertsching H, Haverich A, Stief CG, Jonas U

(2004) Biological vascularized matrix (BioVaM): a new method for solving the perfusion problems in tissue engineering. Urologe A 43(10) :1223-8

Scriven SD, Booth C, Thomas DFM, Trejdosiewicz LK, Southgate J (1997) Reconstruction of human urothelium from monolayer cultures. J Urol 158: 1147-1152

Shiroyanagi Y, Yamato M, Yamazaki Y, Toma H, Okano T. (2004) Urothelium regeneration using viable cultured urothelial cell sheets grafted on demucosalized gastric flaps. BJU Int 93(7):1069-1075

Sievert K, Tanagho EA (2000) Organ-specific acellular matrix for reconstruction of the urinary tract. World J Urol 18:19- 25

Singhvi R, Kumar A, Lopez GP, Stephanopoulos GN, Wang DIC, Whitesides GM, Ingber DE (1994) Engineering cell shape and function. Science 264: 696- 698

Southgate J, Hutton KAR, Thomas DFM, Trejdosiewicz LK (1994) Methods in laboratory investigation, normal human urothelial cells in vitro: proliferation and induction of stratification. Lab Inv 71(4): 583-594

Sterle M, Kreft ME, Batista U (1997) The effect of epidermal growth factor and transforming growth factor β1 on proliferation and differentiation of urothelial cells in urinary bladder explant culture. Biol Cell 89:263-271

Strobel G (july 18, 1997) Mending tiny tissues with their own cells. In: Focus – news from Harvard medical, dental and public health schools. [Online] 1-3 URL: www.pittsburgh-tissue.net

T

Taub M, Wang Y, Szczesny TM, Kleinmann HK (1990) Epidermal growth factor or transforming growth factor is required for kidney tubulogenesis in matigel cultures in serun.free medium. Natl Acad Sci 87:4002-4006

Tobin MS, Freeman MR, Atala A (1994) Maturational response of normal human urothelial cells in culture is dependent on extracellular matrix and serum additives. Surgical Forum 45:786-789

Tobin MS, Freeman MR, Schneck FX, Klagsbrun M, Atala A (1995) Growth factor biology of human uroepithelial cells grown under serum-free conditions. Presentation by Tobin, J Urol Suplement 153: 4, 712

Truschel ST, Ruiz WG, Shulman T, Pilewski J, Sun TT, Zeidel ML, Apodaca G (1999) Primary uroephithelial cultures. J Biol Chem 274(21):15020-15029

Tsuji I, Ishida H, Fujieda J (1961) Experimental cystoplasty using preserved bladder graft. J Urol 85:42-44

W

Wolf JS, Soble JJ, Ratliff TL, Clayman RV (1996) Ureteral cell cultures.I. characterization and cellular interactions. J Urol 156: 1198-1203

Wu XR, Lin JH, Walz T, Häner M, Yu J, Aebi U, Sun TT (1994) Mammalian uroplakins. J Biol Chem 269(18)13716-13724

Wünsch L, Ehlers EM; Russlies M (2005) Matrix testing for urothelial tissue engineering. European journal of pediatric surgery 15 (3):164-9

Y

Yoo JJ, Meng J, Oberpenning F, Atala A (1998) Bladder augmentation using allogenetic bladder submucosa seeded with cells. Urology 51(2):221-225

Yoo JJ, Satar N, Retik AB, Atala A (1995) Uretral Replacement using biodegradable polymer scaffolds seeded with urothelial and smooth muscle cells. Presentation by Yoo, J Urol Suplement 153: 4, 585

Z

Zhang Y, Kropp BP, Lin HK, Cowan R, Chen HY (2004) Bladder regeneration with cell-seeded small intestinal submucosa. Tissue Eng 10:181-187

Zhang Y, Frimberger D, Chen HY, Lin HK, Kropp BP (2006) Challenges in a larger bladder replacement with cell-seeded and unseeded small intestinal submucosa grafts in a subtotal cystectomy model. BJU Int. 98:1100-1105

Anhang

Abbildungen und Tabellen

Abbildung **Seite**

1 Versuchsablauf 1 14
2 Versuchsablauf 2 15
3 Kulturplatte mit Polyurethanspitzen 18
4 Kulturmulde mit Spitzen zum Aufspannen des Netzes 18
5 Herstellung eines Hauttransplantates 19
6 Schweinemukosa vor dem Schneiden 19
7 Nach dem Schneiden = Meshgraft 16
8 Mesh in einer (6-well) Kulturplatte 27
9 Lichtmikroskopie in den Zwischenräumen des Netzes 29
10 Zellkolonien am Rand des Netzes 29
11 Einzelne Zellen wachsen aus dem Netz 29
12 Proliferation der Urothelzellen aus dem Netz 29
13 Pflastersteinartiges Muster der Zellen 29
14 Mehrschichtiger Aufbau des Urothels 30
15 Nach vier Wochen: Reduktion der Zellschichten 30
16 Nach zwölf Wochen: Schichtverlust 30
17 Dreidimensionale Struktur des Mesh 31
18 Verband aus Urothelzellen mit abgerundeter Form 31
19 Zell-zu-Zell-Verbindungen bilden ein mehrschichtiges Gerüst 31
20 Meshdehnung mit paralleler Kraftaufwandmessung 32
21 Mehr als die doppelte Dehnung 32
22 Kurve nach Dehnung des Mesh um 50% 32
23 Mesh auf Silikonkatheter vor Aufpumpen des Ballons 33
24 Mesh auf Silikonkatheter nach Aufpumpen des Ballons 33
25 Ausgehend vom Meshgraft wachsen Zellen auf Silikonkatheter 34
26 Meshgraft auf Silikonkatheter wachsend 34
27 Mesh auf Silikonkatheter 34
28 Zusammenhängendes flaches Wachstum der Urothelzellen 35
29 Zellkultur aus Schweineurothelzellen 36
30 Proliferation der Urothelzellen 36
31 Immunhistochemisch gefärbte Urothelzellen 37
32 Vergleich Mono- und Gewebekultur 38

Tabelle

1 Anforderungen an Biomaterialien 8
2 Auswahl von Biomaterialien für das Tissue Engineering 10
3 Kulturgefäße 18
4 Literaturergebnisse 25

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei den Personen bedanken, die mir bei der Erarbeitung dieser Dissertationsarbeit geholfen haben.
Besonderen Dank schulde ich für die Themavergabe und praktische Anleitung PD Dott. (UCMI) Dr. med. Lutz Wünsch, der mich durch seine engagierte Betreuung, Geduld und das kritische Korrekturlesen der Arbeit und seinen konstruktiven Vorschlägen bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt hat.
Des Weiteren danke ich Margie Limberg (Laborassistentin im Anatomischen Institut) für die Einarbeitung in die Zellkulturtechniken und ihre vielen Hinweise und Hilfen während meines Aufenthaltes im Labor.
Bedanken möchte ich mich auch bei den Mitarbeitern des Institutes für Anatomie der Universität zu Lübeck für die freundliche Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der Materialien im Labor.
Insbesondere danke ich Frau PD Dr. med. E.-M. Ehlers für die Durchführung der immunhistochemischen Färbungen und die Rasterelektronenmikroskopie und Herrn Peekel für die professionelle Zeichnung unseres Versuchablaufs.
Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Institutes für Biomechanik für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, der Geräte und die Unterstützung bei den mechanischen Testversuchen.
Bei den Leitern und Teilnehmern des Chirurgiekurses der Universität zu Lübeck bedanke ich mich für die freundliche Kooperation während der Materialgewinnung. Ebenso bedanke ich mich bei den Mitarbeitern der Norddeutschen Fleischzentrale Lübeck für die Überlassung der Materialien.
Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie danken, die mir durch ihre fortwährende Unterstützung diese Arbeit ermöglichten und sie mit Anteilnahme verfolgt haben.

Lebenslauf

Jana Hobbiesiefken, 34 Jahre alt

Universitäre Ausbildung: Medizinische Universität zu Lübeck

1996 –1998	Vorklinik mit Physikum
1999 / 2001 / 2003	Erstes / Zweites / Drittes Staatsexamen

Famulaturen:

1999	Klinik für Kinderchirurgie, Universitätsklinikum Lübeck
1999	Klinik für Allgemeine Chirurgie, Universitätsklinikum Tartu, Estland
2000	Klinik für Neuropädiatrie, Universitätsklinikum Lübeck
2000	Klinik für Tropenmedizin und Infektionskrankheiten, Universitätsklinikum Rostock
2000	Praxis für Kinderheilkunde

Dissertation:

2000-2001	Literaturrecherche Experimenteller Teil im anatomischen Institut und Biotechnik der Orthopädie Poster: „Isolierung urothelialer Zellen in-vitro durch Kultur urothelialer Meshgrafts“ Poster: „Differenzierung urothelialer Zellen in-vitro durch Kultur urothelialer Meshgrafts“ Biomedizinische Technik 2000, 45(1):458-459

Praktisches Jahr:

2002	Innere Medizin/Rheumatologie, Universitätsklinikum Lübeck, Bad Bramstedt
2002	Pädiatrie, Universitätsklinikum Lübeck
2002/2003	Chirurgie, Universitätsklinikum Leuven, Belgien

Dissertation:

2003	Artikel: „Urothelial Mesh – a New Technique of Cell Culture On Biomaterials” Europ J Ped Surg 2003, 13:1-6

ÄiP/Assistenzärztin in Weiterbildung Pädiatrie:

2003 –2006	Kinderklinik des Städtischen Klinikum
2007 -2008	Neonatologie (Level I) und Pädiatrische Intensivmedizin des Klinikum
2008	Kinderklinik des Städtischen Klinikum
2010-2011	Kinderarztpraxis

Dissertation

2011-2012	Literaturrecherche und Abschluss
2012	Facharztprüfung zur Kinder- und Jugendheilkunde