

Ringvorlesung „Tissue Engineering – Regenerative Medizin“
im
Studiengang Mediziningenieurwesen (Master)
Technische Universität Hamburg

Dozenten: Univ. Prof. Dr. habil. Michael Morlock, PhD
Prof. Dr.-Ing. Ralf Pörtner

**In Zusammenarbeit mit dem Forschungszentrum Medizin-
technik Hamburg (FMTHH)**

Vorwort

Tissue Engineering und regenerative Medizin, ein noch sehr junges Gebiet mit rasch wachsender Bedeutung, hat die Entwicklung bioartifizieller Konstrukte oder Gewebe (Haut, Blutgefäße, Knochen- und Knorpelersatz, Muskel, Nerven, Leberersatzsystem etc.) aus lebenden Zellen bzw. Zellmatrix und Biomaterialien zum Ziel. Es beruht auf einer interdisziplinären Zusammenarbeit der Bereiche Zellbiologie, Biomaterialentwicklung, Zellkulturtechnik und Bioverfahrenstechnik und eröffnet vielfältige neue Einsatzgebiete in der Klinik oder der Diagnostik. Gewebedefekte können z. B. mit gezüchteten autologen Zellen repariert bzw. gefüllt werden, ohne langfristig auf künstliche Materialien angewiesen zu sein. Das Tissue Engineering ermöglicht aber auch neue Ansätze für die Entwicklung von *in-vitro*-Testsystemen in der Diagnostik und zum Testen oder Einstellen von Medikamenten.

Im Rahmen der jährlich stattfindenden Ringvorlesung werden durch namhafte Rednerinnen und Redner wesentliche Aspekte dieser spannenden Entwicklung diskutiert Vermehrung von Stammzellen

- Elektronische Implantate
- Cosmetic substance testing
- Abbaubare Magnesiumimplantate
- Vaskularisierungsstrategien für Tissue Engineering *in vitro/in vivo*
- Kiefer-TE
- Image Guidance, Robotics and Navigation
- Krebsstammzellen
- Magnetic-Particle-Imaging
- Knochenqualität
- Mikrosystemtechnik in der Medizin

Die Ringvorlesung wird von der TUHH in Zusammenarbeit mit dem „Forschungszentrum für Medizintechnik Hamburg“ (FMTHH) organisiert.

Die Textbeiträge wurden repräsentativ aus den studentischen Arbeiten für das Wintersemester 2016/17 ausgewählt.

Hamburg, September 2017

Michael Morlock

Ralf Pörtner

Neue Strategien zur Vermehrung von Stammzellen für Zelltherapien

Niklas Rüder, Nils Bade, Kim Kuchemüller, Moritz Boehme¹

Master Medizingenieurwesen, Technische Universität Hamburg (TUHH), Hamburg, Deutschland

Abstract

A promising and seminal technology for therapies of certain diseases as well as for cultivation of artificial organs is the application of therapeutically useful mesenchymal stem cells (MSCs). Specific cultivation conditions (e.g. shear stress), cell media (e.g. growth factors) and the matrix (e.g. microcarriers or perfused surfaces) significantly influence the morphology, cell growth as well as the proliferation and differentiation potential of the cells. The successful expansion of stem cells into clinically relevant numbers and quality is strictly dependent on the bioreactor system (static/dynamic & reusable/single-use bioreactors) and its selected biotechnological parameters. Dynamic, single-use bioreactors equipped with sensors are currently the focus of the research because of the increasing process flexibility and reliability. The supply as well as the harvesting of the stem cells by possible unintentional cell clusters must always be ensured. However, an optimal strategy or technology is not foreseeable, because variable conditions allow many new perspectives for new or further studies.

Zusammenfassung

Eine erfolversprechende und zukunftssträchtige Methode zur Therapie bestimmter Krankheiten sowie zur Züchtung künstlicher Organe ist die Verwendung von mesenchymalen Stammzellen (MSZ). Derzeit wird verstärkt an der Übertragung von traditioneller Zellkultur zur Expansionskultur im industriellen Maßstab gearbeitet. Der Bedarf an Stammzellen ist immens (Gewinnung), die Spenderanzahl dagegen überschaubar (Expansion), die geltenden Regularien strikt (Qualität) und die Herausforderungen an die Industrie gewaltig (Bioreaktoren). Die Wahl spezifischer Kultivierungsbedingungen wie Serum, Sauerstoffversorgung oder Wachstumsfaktoren beeinflussen die Morphologie, sowie das Proliferations- und Differenzierungspotential der Zellen. Zusätzlich muss der große Einfluss des Scherstress auf Zellwachstum und Differenzierung beachtet werden, wobei geringe Beanspruchung als förderlich für die Expansion gilt. Die zur Verfügung stehenden Wachstumsoberflächen, wie Microcarrier oder perfundierende Oberflächen, benötigen eine optimierte Oberflächenchemie und Topographie für die Unterstützung der Zelladhäsion und Proliferation. Die Versorgung sowie das Ernten der Stammzellen muss trotz möglicher Probleme wie ungewollter Zellagglomeraten gewährleistet werden. Die erfolgreiche Expansion von Stammzellen zu klinisch relevanter Anzahl und Qualität ist zudem abhängig vom Bioreaktortyp (statisch/dynamisch & einmal/wiederverwendbar) und seinen gewählten biotechnischen Parametern. Dynamische, einmal verwendbare (single-use) mit Sensorik ausgestattete Bioreaktoren sind auf Grund der hohen Prozessflexibilität und Sicherheit derzeit Schwerpunkt der Forschung. Eine optimale Strategie bzw. Methode ist noch nicht abzusehen, da durch die variablen Bedingungen viele neue Perspektiven für neue bzw. weiterführende Studien möglich sind.

Schlagwörter: Mesenchymale Stammzellen, Stammzelltherapie, Zellkultur, Bioreaktoren

I EINLEITUNG

In der Zelltherapie sind Stammzellen eine vielversprechende Methode zur Behandlung bisher nicht zufriedenstellend therapierbarer Krankheiten. Dies führt zu einer großen Anzahl klinischer Entwicklungen für neue Stammzelltherapien. [1] Darüber hinaus können Stammzellen für die Züchtung von künstlichen Organen verwendet werden [2].

Der Bedarf an Stammzellen ist groß und wird im Laufe der Jahre rapide ansteigen. Dies wird in den Schätzungen für den kommerziellen Verkauf in der globalen Industrie deutlich. Dieser lag im Jahre 2011 bei 1 Millionen US-\$ und wird bis zum Jahre 2025 voraussichtlich auf 20 Millionen US-\$ jährlich ansteigen. [1] Dies stellt Herausforderungen an die Industrie.

Zum einen muss das Kultivierungssystem skalierbar sein und zum anderen können nur wenige tausend Stammzellen bei Spenden entnommen werden. Benötigt werden bei einer Stammzelltherapie mehr als hundert Millionen Stammzellen. Deswegen müssen diese in einem Maß vermehrt werden, welches über die Kapazitäten eines Labors hinausgeht. Durch die Skalierbarkeit entstehen neue Herausforderungen wie Scherstress, Mediumvolumen, Kosten und die Bereitstellung an Oberfläche für das adhärenzte Zellwachstum. Darüber hinaus dürfen kritische Aspekte wie die Art des verwendeten Mediums, die begrenzte Passagenzahl und die Anforderungen an ein steriles Endprodukt nicht vernachlässigt werden. [3] Ein weiterer Aspekt ist die ethische Diskussion über die Art der Gewinnung embryonaler Stammzellen. Daher ist es Aufgabe

¹ Schreibauftrag zum Vortrag von Prof. Dr.-Ing. Ralf Pörtner, TU Hamburg, gehalten im Rahmen der Ringvorlesung "Tissue Engineering – Regenerative Medizin" im WiSe 16/17
Kontakt: poertner@tuhh.de

der Forschung, die Entwicklung im Hinblick auf die Verwendung von adulten Stammzellen voranzutreiben. [1]

Der Fokus dieses Papers liegt bei den Strategien zur Vermehrung von Stammzellen (Fokus MSZ) für Zelltherapien. Dafür werden die Vor- und Nachteile verschiedener Bioreaktoren gegenübergestellt, um den aktuellen Stand der Technik zu zeigen und die noch zu bewältigenden Herausforderungen darzulegen.

II WAS SIND STAMMZELLEN?

Im Gegensatz zu normalen Körperzellen wie zum Beispiel Leber-, Herz- oder Gehirnzellen, die bereits ihre endgültige Funktion besitzen, sind Stammzellen in der Lage sich zu differenzieren. Durch dieses hohe Entwicklungspotential können sie sich zu spezifischen Körperzellen entwickeln.

Generell werden drei Arten von Stammzellen (siehe Abbildung 1) unterschieden: die totipotente Stammzelle (die befruchtete Eizelle), aus der sich der Mensch entwickelt, die pluripotenten embryonalen Stammzellen, die sich in jedes Gewebe differenzieren können und die multipotenten Stammzellen, welche sich nur zu vorbestimmten Gewebetypen oder Organen entwickeln können. [4]

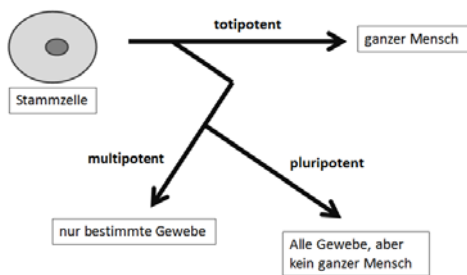


Abbildung 1: Arten von Stammzellen [4]

Stammzellen teilen sich symmetrisch oder asymmetrisch. Durch die symmetrische Teilung entstehen zwei zur Mutterzelle identische Stammzellen. Bei der asymmetrischen Teilung hingegen entsteht aus der Mutterzelle nur eine Stammzelle sowie eine zweite Stammzelle mit verminderter Funktion oder eine Gewebezelle. Dies ermöglicht die Reparatur und den Aufbau von Organen. [4]

III FORMEN DER STAMMZELLTHERAPIEN

Die Stammzelltherapie ist eine Behandlung, bei der Stammzellen in den menschlichen Körper eingesetzt werden, um dort beschädigtes Gewebe zu ersetzen oder den Regenerationsprozess der körpereigenen Zellen anzuregen. Schon seit vielen Jahren werden solche Therapien insbesondere bei Krebserkrankungen, zum Beispiel bei Leukämie, eingesetzt. [5] Neuere Therapien ermöglichen die Behandlung von Makuladegenerationen, Herzversagen oder Rückenmarksverletzungen [1].

Der grundsätzliche Ablauf einer solchen Therapie ist dabei immer gleich: Zunächst müssen Stammzellen aus dem menschlichen Körper entnommen, aufgereinigt, formuliert und

kultiviert, kontrolliert und abschließend eingesetzt werden. Hauptsächlich wird bei Stammzelltherapien unterschieden, ob die entnommenen Zellen körpereigen (autolog) oder körperfremd sind (allogen). [5]

A. Autolog

Bei der autologen Therapie sind Spender und Patient ein und dieselbe Person. Dies hat den Vorteil, dass nach der Injektion mit keiner Immunreaktion zu rechnen ist. Bei den verwendeten Zellen handelt es sich meist um Vorläufer der CD34⁺-hämatopoetischen Stammzellen, dendritische Zellen, T-Zellen oder natürliche Killerzellen. [3] Ebenso können mesenchymale Stammzellen (MSZ) verwendet werden, die hauptsächlich aus dem Knochenmark, aber auch aus adipösem Gewebe, der Plazenta oder peripherem Blut gewonnen werden (siehe Abbildung 2). MSZ haben das Potential, sich in adipogenetische, chondrogene oder osteogene Zellen zu differenzieren. Ein weiteres Merkmal ist, dass MSZ adherent wachsen. [2]

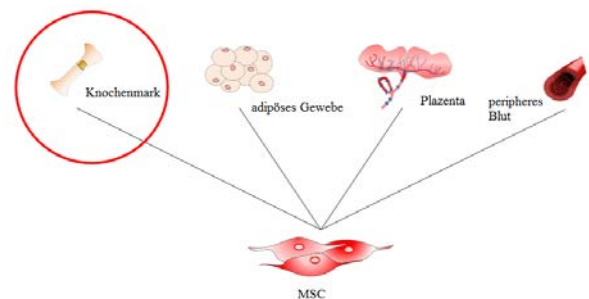


Abbildung 2: Quellen von MSZ, nach [2], mit freundlicher Genehmigung

Bei einer Stammzelltherapie können sowohl gesunde als auch krebsartige Zellen verwendet werden. Eine Therapieform, die besonders bei Krebs angewandt wird, basiert auf der Gewinnung von Zellen aus einer Patientenbiopsie und einer anschließenden Zellvermehrung. Diese Zellen sollen zu einer Anregung des Immunsystems führen, sodass der Krebs bekämpft wird. Häufiger angewendet und weiter erforscht ist der Einsatz von gesunden Zellen. Diese sollen zu einer Wiederherstellung der Systemfunktionalität führen. [3]

Aus wirtschaftlicher Sicht ist eine autologe Therapie sehr kostenintensiv, da für jeden Patienten eine individuelle Kultivierung angelegt werden muss. Medizinisch ist zu beachten, dass pro Patient hunderte Millionen Zellen benötigt werden (unabhängig von der Therapieform) und bei der Biopsie nur ein paar tausend Zellen gewonnen werden können. Daher liegt viel Zeit zwischen der Entnahme und der Transplantation der kultivierten Zellen. Dieses Problem gibt es bei der allogenen Zelltherapie nicht. [3]

B. Allogen

Bei der allogenen Zelltherapie sind Spender und Patient nicht dieselbe Person. Dies hat den Vorteil, dass die kultivierten Zellen eingefroren werden können und somit für den Patienten praktisch sofort zur Verfügung stehen. Weiter kann eine Spende für mehrere Patienten eingesetzt werden. Um eine Immunreaktion des Körpers auf die fremden Zellen zu vermeiden, werden überwiegend MSZ's verwendet. [3]

Bei der allogenen Zelltherapie entfallen die Kosten, die durch die individuelle Kultivierung bei der autologen Kultivierung entstehen. Die Kosten, die durch die erhöhten Kontrollen während des Kultivierungsprozesses entstehen, werden auf mehrere Patienten umgelegt. Dadurch sind die Kosten insgesamt geringer. [3]

IV REGULARIEN

Die Regularien für die Stammzelltherapie sind sehr komplex, da die Stammzellen selber das Produkt und nicht nur Teil des Prozesses sind. Eine Herausforderung ist hierbei die Sterilität. Stammzellen sind als Endprodukt nicht sterilisierbar, sodass der Prozess selbst hohen Maßstäben in Bezug auf Sterilität genügen muss. Dabei beinhaltet die therapeutisch attraktive Selbsterneuerung und Differenzierung Risiken wie unkontrollierte Zellproliferation, Tumorbildung und unerwünschte Differenzierung. Diese stehen im Konflikt mit den Zielen: Sicherheit, Qualität und Wirksamkeit. Die Regularien müssen diesen Anforderungen genügen. Grundsätzlich sind stammzellbasierte Therapien auf individueller Produktbasis zu bewerten und unterliegen in der Regel klinischen Beurteilungen für die Marktzulassung. [1, 3]

V KULTIVIERUNG UND DEREN PROBLEME

A. Gewinnung

Die Gewinnung von adulten Stammzellen kann beispielsweise aus dem Knochenmark oder der Nabelschnur erfolgen [6]. Wie in Kapitel II (A. Autolog) beschrieben, ist die Hauptquelle der MSZ-Gewinnung das Knochenmark (KM-MSZ). Dabei ist zu beachten, dass die aus verschiedenen Geweben gewonnenen MSZ signifikante Unterschiede in ihrer Proliferation, Differenzierung und ihrem Phänotyp aufzeigen können [7]. Die Gewinnung von MSZ aus dem Knochenmark weist einige Einschränkungen auf. Der Eingriff ist invasiv und dementsprechend eine Belastung für den Spender. Durch die Biopsie werden nur geringe Anzahlen von MSZ aus dem Knochenmark gewonnen, welche zudem ein geringes Expansionspotential besitzen. [6] Demgegenüber steht die Gewinnung aus der Nabelschnur (UC-MSZ). Diese Zellen besitzen ein höheres Expansionspotential und darüber hinaus ist die Gewinnung der Zellen deutlich einfacher, wenn auch durch die Anzahl der Geburten begrenzt. [8, 9]

Da allerdings für die KM-MSZ bereits festgelegte Protokolle zur Isolierung, Konservierung und Kultivierung vorliegen, ist dies weiterhin die Hauptquelle für klinische Anwendungen [10, 11].

B. Isolation und Konservierung

Allgemein erweist sich die Isolation von spezifischen Stammzellen als kritisch, da diese nur in kleinen Mengen auftreten [9, 12]. Dennoch sind zur Isolation von MSZ zahlreiche Methoden vorhanden, die entweder mit oder ohne die Verwendung von Enzymen betrieben werden. [12, 13] Eine enzymatische Isolation weist große Herausforderungen auf, da diese kostspielig und zeitaufwendig sowie durch eine heterogene Zellpopulation gekennzeichnet ist. Weiter können Zellschädigungen durch die Entfernung der extrazellulären

Matrix auftreten. Darüber hinaus kann die Proliferation und Differenzierung der Zellen durch die enzymatische Behandlung beeinträchtigt werden. [2, 12, 14] Allerdings wird in [15] von einer höheren Ausbeute bei festem Gewebe berichtet. Eine Isolation ohne enzymatische Behandlung hat hohe Isolationserträge, bietet homogene isolierte Zellen und ist wirtschaftlich rentabel. Ebenfalls wird die Proliferationsphase verlängert und der Expansionsfaktor erhöht. [12] Durch [16] konnte eine erhöhte MSZ-Ausbeute und Lebensfähigkeit von Explantatkulturen im Vergleich zur enzymatischen Isolierung bestätigt werden.

Nach [17] kann es bei der Konservierung von Stammzellen zu morphologischen Veränderungen der gefrorenen Gewebefragmente kommen, wodurch die Lebensfähigkeit der zurückgewonnenen Stammzellen erniedrigt ist. Andere Studien zeigten keinen Verlust der Multipotenz [18]. Ein festgelegtes Protokoll für das Einfrieren und Auftauen der Zellen ist erforderlich. [17, 18]

C. Zellkulturmedium

Das Zellkulturmedium spielt eine wesentliche Rolle beim Wachstum und der Vermehrung von Stammzellen. Adhäsion, Proliferation, Migration und Differenzierung der Stammzellen werden zudem durch die Oberflächeneigenschaften der umgebenden Matrix beeinflusst. [19]

Bei der Zusammensetzung des Zellkulturmediums ist das verwendete Serum ein maßgeblicher Faktor. Meist wird Fötales Kälberserum (FCS) verwendet, welches nur eingeschränkt verfügbar ist. Des Weiteren ist FCS ein tierisches Produkt, das bei Kontakt zum Menschen zu einer viralen Kontamination führen kann. Darüber hinaus ist die Zusammensetzung undefiniert, sodass es zu Unterschieden zwischen den Chargen kommt. [5] Dies steht im Konflikt zu der in den Regularien geforderten Sterilität. Optimal wäre humanes Serum. Die Verfügbarkeit des humanen Serums ist begrenzt und für Kultivierung im großen Maßstab nicht einsetzbar. Unter Verwendung von serumfreien Medium konnten bisher keine vergleichbaren Resultate in Bezug auf die Ausbeute erzielt werden. [2, 5] Die Ergänzung zusätzlicher Bestandteile, die die serumfreie Isolierung und serielle Expansion von MSZ unterstützen, zeigt eine verbesserte Ausbeute [20]. Ein weiterer kritischer Bestandteil des Mediums sind die Wachstumsfaktoren, bei denen ein korrektes Gleichgewicht erreicht werden muss, um den spezifischen zellulären Phänotyp zu erhalten [2, 5].

D. Kultivierungsbedingungen

Bei der Kultivierung spielt das Alter des Spenders und die Passagenzahl eine grundlegende Rolle, da diese die Fähigkeit der Selbsterneuerung und das Differenzierungspotential beeinflussen. Die MSZ verlieren bei zunehmender Passagenzahl (ca. sechs) ihre Multipotenz. Weiter kommt es in der Regel nach etwa 30 bis 40 Verdopplungen zu einem Verlust der therapeutischen Eigenschaften. Meist reichen 10 bis 20 Verdopplungen, um die gewünschte Zellzahl zu erreichen. [21, 22, 23] Ein weiterer Punkt, der eine große Rolle bei der Wahl des Kultivierungssystems spielt, ist der Einfluss von Scherstress auf die Zellen. Obwohl es viele widersprüchliche Studien gibt, herrscht Einigkeit darüber, dass sich die Eigenschaften wie Morphologie, Proliferations- und

Differenzierungspotential und das Zellwachstum verändern, wenn der Scherstress sich erhöht. [24-27] Somit ist Scherspannung nutzbar, um Stammzellen gezielt zu differenzieren [28, 29].

Allerdings sollte während der Expansion der Scherstress minimiert werden, damit es zu keiner unkontrollierten Differenzierung kommt. Da die Zellexpansion und Ernte bei Zelltherapieprodukten essentiell ist, sollte die Scherbelastung dahingehend minimiert werden. [5] Nach [30] führen hypoxische Bedingungen (Sauerstoffgehalt unter 5%), zur Aktivierung von bestimmten Molekülen (HIF-1), die das Wachstum, die Vermehrung, die Differenzierung und die Genexpression von MSZ verändern. Nach [31] kann ein geringer Sauerstoffgehalt (1-5%) zur Verlängerung der exponentiellen Phase führen. Weniger Inhibitoren werden gebildet und die Proliferation dadurch verstärkt. Die hier angegebenen Sauerstoffwerte müssen immer in Relation zum Kulturmedium stehen. [30, 31]

Die meisten Studien bezüglich der Eigenschaften der MSZ beziehen sich auf *in-vitro*-Systeme [32]. Erst wenige Studien [33, 34] zeigen das Potential für chondroge Reparaturen (*in-vivo*-Systeme) bei implantierten Zellen, die aus MSZ gewonnen werden. Die hauptsächlichen Herausforderungen der *in-vitro*-Systeme sind das endliche Wachstum und die nicht vollständig gerichtete Differenzierung. Denn sowohl bei der Isolation und Konservierung, als auch bei der Kultivierung und Expansion sollte darauf geachtet werden, dass der Phänotyp, das Proliferations- und das Differenzierungspotential aufrechterhalten werden. MSZ in ihrer ursprünglichen Form weisen einen stabilen, undifferenzierbaren Phänotyp auf. Durch zahlreiches Aufreinigen und Passagieren können sich die Eigenschaften ändern und dies kann zu einer unkontrollierten Differenzierung während der Kultivierung führen. [35]

E. Expansion

Die Expansion von MSZ ist an bestimmte Bedingungen geknüpft. Die Oberflächenchemie und Topographie muss optimiert werden, damit die Zelladhäsion und die Proliferation unterstützt wird. [2, 5] Als Herausforderung der Expansion in der Stammzelltherapie ergibt sich die hohe Anzahl der zu erzeugenden Zellen, da mindestens hundert Millionen Zellen pro Therapie benötigt werden [3]. Daher müssen skalierbare Prozesse entwickelt werden, wobei die Multipotenz der Zellen erhalten bleiben muss [5]. Gleichzeitig müssen die Anwendungen praktisch und kostengünstig gehalten werden [3].

VI BIOREAKTOREN FÜR ZELLTHERAPEUTIKA

Ein Bioreaktor ist ein geschlossenes System, in dem Produktionsorganismen das gewünschte Endprodukt exprimieren, während kontrollierte Prozessbedingungen aufrechterhalten werden [36]. Bei Bioreaktoren wird zunächst zwischen statischen und dynamischen Bioreaktoren unterschieden. Der Standard bei der Kultivierung von Zellen im Labor sind statische Systeme wie zum Beispiel Petrischalen oder T-Zellkulturflaschen. Da die Zellen sowohl ausreichend Wachstumsfläche, als auch genug Medium benötigen und für eine Stammzelltherapie mehrere Millionen Zellen benötigt

werden, werden eine nicht handhabbare Menge an T-Zellkulturflaschen benötigt, um diese Menge zu kultivieren. Bei Produktionsprozessen werden derzeit häufig Plattenstapelsysteme eingesetzt. Allerdings treten in diesen häufig Inhomogenitäten auf, wodurch die Zellausbeute und die Qualität beeinträchtigt werden. Darüber hinaus besteht bei solchen Systemen ein erhöhtes Kontaminationsrisiko. [3, 37] Daher werden alternative Lösungen zur statischen Kultivierung benötigt. Hierbei bieten sich dynamische Bioreaktoren, die in Abbildung 3 dargestellt sind, an. Die dynamischen Bioreaktoren können in mechanische und hydraulische Systeme unterteilt werden.

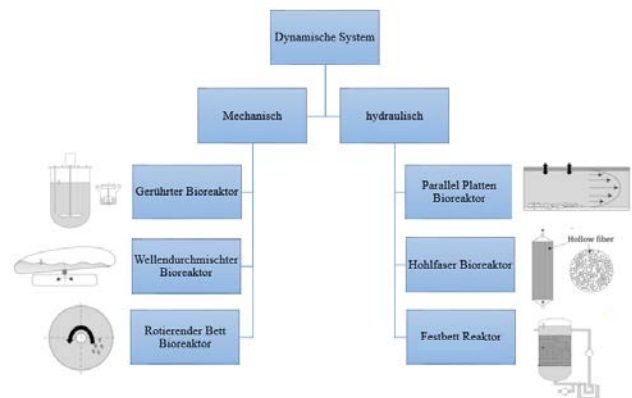


Abbildung 3: Dynamische Bioreaktoren nach [2]

Trotz Versuchen, Robotik, Automatisierung und Kontrolle bei den statischen Bioreaktoren zu installieren, sind die dynamischen Bioreaktoren den statischen in Bezug auf 2D und 3D-Zellwachstum überlegen. [38, 39] Die Mehrzahl dynamischer Bioreaktoren ist allerdings für die Herstellung von Antikörpern und Impfstoffen und nicht für die Kultivierung von Stammzellen ausgelegt, sodass neue Herausforderungen entstehen. Um genug Oberfläche für das Wachstum der Stammzellen zu schaffen, werden zum Beispiel sogenannte Microcarrier benötigt. Ein wesentliches Problem der Microcarrier ist, dass bei zu hoher Zelldichte auf dem Microcarrier die Versorgung aller Zellen nicht gewährleistet werden kann. Weiter kann es zu Verklumpungen und Zellhäufungen kommen. Darüber hinaus ist die Ernte der Zellen wesentlich komplexer, da die Zellen vom Microcarrier gelöst werden müssen. [2]

Neben statischen und dynamischen Bioreaktoren gibt es eine weitere Klassifizierung von Bioreaktoren: Einmal- und wiederverwendbare Bioreaktoren. Die Verwendung von Einmalbioreaktoren (Single-use-Bioreaktoren) bringt zum einen eine hohe Prozessflexibilität und zum anderen eine größere Sicherheit mit sich, da Verunreinigungen durch vorherige Prozesse ausgeschlossen werden können. Dies ist insbesondere bei solchen Produkten wichtig, die anschließend im Menschen eingesetzt werden. Deswegen ist es nicht verwunderlich, dass der Einsatz solcher Bioreaktoren in der Industrie weiter wächst, zumal die regulatorischen Anforderungen an solche Prozesse immer weiter steigen. [40]

A. Gerührter Bioreaktor

Ein gerührter Bioreaktor besteht aus einem Rührwerk und einem Behälter, wobei die Durchmischung über einen mechanisch angetriebenen Rührer erfolgt [2]. Üblicherweise werden die adhären Zellen auf Microcarriern kultiviert. Im kleinen Maßstab werden häufig sogenannte „Spinner“ eingesetzt [41]. Die geringe Drehzahl (ca. 60 Umdrehungen pro Minute) verringert den Scherstress und den negativen Einfluss auf die Stammzellen. Die erreichbare Zelldichte liegt bei diesem System zwischen $6 \cdot 10^5$ und $1 \cdot 10^6$ Zellen/mL, mit einem Vermehrungsfaktor zwischen 30 und 50, sofern das Medium mit Serum angereichert ist und eine zyklische Perfusion erreicht wird. Demonstriert wurde dies für hADSCs- und hKM-MSZ-Wachstum auf Microcarriern. [2]

Eine MSZ-Expansion wurde erfolgreich in einem Mobius® Cell Ready 3L Bioreaktor (Merck Millipore) und in einem BIOSTAT® UniVesel 2L SU (Satorius Stedim Biotech) durchgeführt. Die Schlüsselemente in beiden Bioreaktoren sind ein starrer Kessel aus Polycarbonat, ein oder zwei rotierende Rührer und eine Belüftungseinheit. [2] Die Ergebnisse für den Mobius® Cell Ready 3L Bioreaktor zeigen, dass durch eine angepasste Drehzahl eine homogene Kultur ohne Sedimentation der Microcarrier ermöglicht wird und dass Zelldifferenzierung und Zellschädigung, als Resultate hohen Scherstress, vermieden werden können. Dies ist durch [42, 43] für hKM-MSZ demonstriert und belegt. Mit dem BIOSTAT® UniVesel 2L SU, charakterisiert in [44], lag die erreichte Zelldichte bei $1,8 \cdot 10^5$ Zellen/mL hKM-MSZ [41, 45].

B. Wellendurchmischer Bioreaktor

Der wellendurchmischte Bioreaktor („wave“-Bioreaktor) ist ein kissenähnliches Kultivierungsgefäß, das, auf einer Wippe fixiert, eindimensionale oszillierende Bewegungen ausführt. Dieses führt zu einer kontinuierlichen Durchmischung des Mediums und einer blasenfreien Sauerstoffzugabe. Die Scherstressverteilung in diesem Bioreaktor ist relativ homogen. Daher ist er prinzipiell gut geeignet für die Produktion von stressempfindlichen Zellen. Ein weiterer Vorteil ist die zu vernachlässigende Schaumbildung. [2]

Einer der ersten Versuche, MSZ in einem wellendurchmischten Bioreaktor zu kultivieren ist in [46] beschrieben: Über eine Kultivierung von 18 Tagen wurde ein Vermehrungsfaktor von 6 erreicht. Bei einem weiteren Versuch [47] konnte sogar ein Faktor von 16 (Kultivierungszeit von 7 Tagen) erreicht werden. Dabei handelte es sich um eine MSZ-Expansion von der Plazenta bei reduzierter Sauerstoffkonzentration (5%). [47]

C. Drehbett-Bioreaktor

Ein Drehbett-Bioreaktor besteht aus einem zylindrischen Kessel, in dem Platten, auf denen die Zellen angewachsen sind, rotieren. Die Durchmischung erfolgt durch die Perfusion des Reaktors mit Medium und die Rotation der Platten. [2]

In [48] wurde bei einer Kultivierung von UC-MSZ in einem wiederverwendbaren Bioreaktor (Z®RP 2000H, Zellwerk) ein 8-facher Anstieg der Zellzahlen binnen fünf Tagen gezeigt. Weiter wurde sichergestellt, dass spezifische Oberflächenmerkmale der MSZ sowie das Differenzierungspotential erhalten bleiben. Ebenfalls konnte

keine frühzeitige Zellseneszenz beobachtet werden. Für die MSZ-Expansion sind ein komplett gefüllter Bioreaktor und eine geringe Rührgeschwindigkeit optimal, um eine scherstressreduzierte Kultivierung zu ermöglichen. Dieser Bioreaktor hat vergleichbare Durchmischungseigenschaften wie ein idealer kontinuierlich gerührter Bioreaktor und bietet eine ausreichende Nährstoffversorgung. Die Studie demonstriert, dass dieses System geeignet ist, um UC-MSZ derart zu kultivieren, dass die Morphologie der Zellen, das Differenzierungspotential, sowie die Mitoseaktivität erhalten bleiben. Es scheint, dass dieser Prozess großes Potential hat, um MSZ für klinische Anwendungen zu kultivieren. [48]

D. Parallelplatten-Bioreaktor

Ein Parallelplatten-Bioreaktor basiert auf einem modularen Design, welches aus mehreren Polystyrolplatten besteht. Die Platten setzen sich jeweils aus zwei Kammern zusammen, wobei diese durch eine gasdurchlässige Membran getrennt sind. Die obere Kammer ist mit Luft gefüllt, während in der unteren die Zellen als einlagige Schicht (Monolayer) wachsen. In der unteren Kammer wird eine kontinuierliche Versorgung mit Kulturmedium gewährleistet. [2]

Die für die Stammzellen entscheidende Scherbelastung ist gering, sodass aus dem Knochenmark gewonnene Zellen erfolgreich ohne ungewünschte Differenzierung expandiert werden können. Generell erlaubt ein Parallelplatten-Bioreaktor eine Produktion von bis zu einer Milliarde Zellen pro Charge. [49]

E. Hohlfaser Bioreaktor

Ein Hohlfaser-Bioreaktor setzt sich aus einem Bündel paralleler Hohlfasern zusammen, die aus Zellulose, Polysulfon, Polypropylen oder Polyethylen bestehen. Durch die teildurchlässige Struktur der Hohlfasern gelangen die benötigten Nährstoffe in den Wachstumsraum und stehen den Zellen zur Verfügung. Die Hohlfasern sind in eine Kartusche eingebettet, die durch verschiedene Anschlüsse eine Umspülung der Hohlfasern ermöglicht. [2]

Hohlfasern bieten den Vorteil einer sehr geringen Scherbelastung für die Zellen. Das Verhältnis zwischen Oberfläche und Volumen ist sehr hoch, welches die 3D-Zellentwicklung fördert. Die Zellen wachsen auf der äußeren Oberfläche der Hohlfasern, durch die ein kontinuierlicher Austausch von Sauerstoff, Medium und Abfallprodukten erfolgt. Limitiert wird dieses System durch die Komplexität der Zellernte und durch die Länge der Hohlfasern, welche durch Nähr- und Sauerstoffgradienten begrenzt ist. [2]

Die Verwendung von Hohlfaser-Bioreaktoren für die Produktion von klinisch relevanten Mengen an MSZ (Zellausbeute von 10^8 und 10^9) wurde in zahlreichen Studien untersucht. [50] Die erreichten Zellmengen waren ausreichend für autologe und ausgewählte allogene Therapien. Eine spezielle Untersuchung [51] vergleicht die MSZ Expansion eines Hohlfaserreaktors mit einem Einweg-Fluid-System (Kultivierung in Zellkulturflaschen). Das Resultat dieser Studie ist, dass die Zellen im Bioreaktor schneller wachsen als in den Zellkulturflaschen. Darüber hinaus wurden mit der zweiten Passage Zellzahlen erreicht, welche für ein bis zwei Patienten ausreichen, und zudem die Kriterien an MSZ (Morphologie, Differenzierungspotential etc.) erfüllen. Für die Studie standen

zwei solcher Bioreaktoren zur Verfügung. Dieses führte dazu, dass die Zellen zwischen den Passagen eingefroren werden mussten, da die Kapazität des Bioreaktors limitiert war und die Bioreaktoren über Nacht für die neue Kultivierung vorbereitet werden mussten. Das Einfrieren von Zellen verlangsamt die Proliferation.

Dadurch wird bei einer durchgängigen Verwendung von frischen Zellen mit einem besseren Ertrag gerechnet. Eine Möglichkeit der Hochskalierung, um das Einfrieren zu vermeiden, scheint durch die Verwendung weiterer Bioreaktoren realisierbar zu sein. Die verwendete Strategie verursachte allerdings bis zu achtmal höhere Kosten als bei der Kultivierung in Zellkulturflaschen. Zusammenfassend ist die Kultivierung im Bioreaktor insgesamt zwar erfolgreicher als mit Zellkulturflaschen, erzeugt aber zu hohe Kosten, um sich zu rentieren. Neue Entwicklungen (zum Beispiel die Reduzierung der Über-Nacht-Vorbereitungen auf ca. 4 Stunden) in diesem Bereich könnten zu einem rentablen System führen. [50, 51]

F. Festbett-Bioreaktoren

Festbett-Bioreaktoren sind kompakte Systeme, die aus einem Außengefäß und einem Festbett bestehen. Die Zellkultivierung erfolgt im Festbett auf einem Trägermaterial. Makroporöse Mikroträger, poröse Keramikugeln oder poröse Glaskugeln dienen beispielsweise als Trägermaterial. Das Kulturmedium durchströmt das Festbett, wodurch die Zellen mit Nährstoffen versorgt und unerwünschte Metabolite entfernt werden. [2]

Die Skalierbarkeit ist begrenzt, da die Nähr- und Sauerstoffgradienten die Höhe des Bioreaktors bestimmen. Ebenfalls kritisch zu sehen ist die erschwerte Zellernte [2].

VII SCHLUSSFOLGERUNG

Speziell bei der Therapie von spezifischen Krankheiten ist die Verwendung mesenchymaler Stammzellen (MSZ) in der Zelltherapie eine gewinnbringende und aussichtsreiche Strategie. Laufende Studien bzw. Ansätze befinden sich derzeit in einem grundlegenden Umbruch von traditioneller Zellkultur im Labormaßstab hin zur Expansionskultur im industriellen Maßstab mit skalierbaren Bioreaktorprozessen. Mittlerweile gibt es viele erfolgversprechende Studien sowie erste Marktzulassungen, die zeigen, dass Stammzelltherapien nachweislich langanhaltende positive Effekte auf die Patienten haben. Auch wenn die Ursachen, Abläufe und Funktionen noch nicht eindeutig und vollständig verstanden wurden. Da immer mehr finanzielle Möglichkeiten zur Verfügung gestellt werden und das enthaltende Potential noch lange nicht ausgeschöpft ist, kann in diesem Bereich mit einem kontinuierlichen Fortschritt gerechnet werden.

Die Voraussetzungen sind umfangreich und die Ansprüche an den Prozess hoch. Der Grundbedarf an Stammzellen ist und bleibt groß, sodass die Gewinnung, Isolierung und Konservierung für eine optimale Ausbeute an festgelegte und validierte Protokolle geknüpft sein muss. Außerdem ist die Spenderanzahl zu gering, um den Bedarf annähernd zu decken. Sehr strikt sind zusätzlich die geltenden Regularien in Bezug auf die Zulassung. Hauptziel der Therapien ist die therapeutisch attraktive Selbsterneuerung und Differenzierung.

Demgegenüber stehen die Risiken der unkontrollierten Zellproliferation, Tumorbildung und unerwünschten Differenzierung.

Besonders herausfordernd ist die Expansion der MSZ, was die Auswahl eines geeigneten Bioreaktorsystems erschwert. Eine Vielzahl von Möglichkeiten für die *in-vitro* Kultivierung steht bereits zur Verfügung, wohingegen für die *in-vivo* Kultivierung bisher nur wenige Studien bekannt sind, sodass an dieser Stelle noch viel Zeit und Kapital investiert werden muss, um klare Aussagen über das womöglich große Potential zu tätigen. In den *in-vitro* Systemen spielen die spezifischen Kultivierungsbedingungen sowie die Zusammensetzung des Zellkulturmediums eine wesentliche Rolle bei Wachstum und Entwicklung von den Stammzellen. Diese variablen Faktoren müssen exakt aufeinander angepasst werden, da sie die Morphologie sowie das Proliferations- und Differenzierungspotential der Zellen essentiell beeinflussen. Eine geringe Beanspruchung der Stammzellen, zum Beispiel durch Scherstress, ist notwendig für eine erfolgreiche Zellexpansion und deren Ausbeute. Für die Unterstützung der Zelladhäsion und Proliferation benötigen die begrenzt zur Verfügung stehenden Wachstumsflächen eine optimierte und angepasste Oberflächenchemie und Topographie. Außerdem muss sichergestellt werden, dass die Versorgung der Stammzellen, trotz möglicher ungewollter Zellagglomerate, kontinuierlich gewährleistet wird. Ein weiteres Hindernis ist die Ernte der Stammzellen mit möglichst hoher Zellviabilität. Außerdem ist die erfolgreiche Expansion von MSZ zu klinisch relevanter Anzahl und Qualität streng abhängig vom ausgewählten Bioreaktortyp und seinen spezifischen biotechnischen Parametern. Mit statischen Systemen ist dies nur mit massiver Automatisierung und parallel laufenden Prozessen realisierbar. Des Weiteren folgt die Skalierung der Bioreaktorprozesse oftmals der „Trial-and-Error“ Methode. Deswegen sind derzeit, durch steigende Prozessflexibilität und Sicherheit, dynamische einmalverwendbare mit Sensorik ausgestattete Bioreaktoren Schwerpunkt der Entwicklung und Forschung. Allerdings ist eine optimale und rentable Strategie bzgl. der Vermehrung von Stammzellen für Zelltherapien noch nicht abzusehen, da durch die Vielzahl an variablen Bedingungen sowie dem noch unentdeckten Potential viele neue Perspektiven für zukünftige Studien möglich sind.

LITERATUR

- [1] Ratcliffe E., Glen K.E., Naing, M.W., Williams, D.J.: Current Status and perspectives on stem cell-based therapies undergoing clinical trials for regenerative medicine: case studies. *British Medical Bulletin* 2013; 108: 73–94
- [2] Jossen V., Pörtner R., Kaiser S. C., Kraume M., Eibl D., Eibl R.: Mass Production of Mesenchymal Stem Cells — Impact of Bioreactor Design and Flow Conditions on Proliferation and Differentiation, *Cells and Biomaterials in Regenerative Medicine*, Dr. Daniel Eberli (Ed.), InTech, 2014, DOI: 10.5772/59385. Available from: <http://www.intechopen.com/books/cells-and-biomaterials-in-regenerative-medicine/mass-production-of-mesenchymal-stem-cells-impact-of-bioreactor-design-and-flow-conditions-on-proliferation>
- [3] Van den Bos C., Keefe R., Schirmaier C., McCaman M.: Therapeutic human cells: Manufacture for Cell Therapy/ Regenerative Medicine. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2014; 138:61–97.
- [4] Henn V. (2008) Wissenschaft Homepage. [Online]. Verfügbar unter: <http://www.wissenschaft.de/stammzellen/stammzellen.php>
- [5] Schnitzler A. C., Verma A., Kehoe D.E., Jing D., Murrell J.R., Der K. A., Aysola M., Rapiejko P. J., Punreddy S., Rook M.S.: Bioprocessing

- of human mesenchymal stem/stromal cells for therapeutic use: Current technologies and challenges. *Biochem Eng J*, 2016, Vol. 108: 3–13
- [6] Choi J.-S., Lee B.-J., Park H.-Y., Song J.-S., Shin S.-C., Lee J.-C., Wang S.-G., Jung J.S.: Effects of Donor Age, Long-Term Passage Culture, and Cryopreservation on Tonsil-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Cell Physiol Biochem*. 2015; 36:85-99
- [7] Al-Nhaheen M., Vishnubalaji R., Ali D., Bouslimi A., Al-Jassir F., Megges M., Prigione A., Adjaye J., Kassem M., Aldahmash A.: Human stromal (mesenchymal) stem cells from bone marrow, adipose tissue and skin exhibit differences in molecular phenotype and differentiation potential. *Stem Cell Rev*. 2013 Feb;9(1):32-43
- [8] Weiss L., Deryl L.: Stem Cells in the Umbilical Cord. *Stem Cell Rev*. 2006; 2(2): 155–162.
- [9] Cardoso T. C., Ferrari H.F., Garcia A.F., Novais J.B., Silva-Frade C., Ferrarezi M.C., Andrade A.L., Gameiro R.: Isolation and characterization of Wharton's jelly-derived multipotent mesenchymal stromal cells obtained from bovine umbilical cord and maintained in a defined serum-free three-dimensional system. *BMC Biotechnology*, 2012
- [10] Kern S., Eichler H., Stoeve J., Klüter H., Bieback K.: Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*. 2006 May;24(5):1294-301.
- [11] Nakamizo A., Marini F., Amano T., Khan A., Studeny M., Gumin J., Chen J., Hentschel S., Vecil G., Dembinski J., Andreeff M., Lang F. F.: Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Cancer Res*. 2005 Apr 15;65(8):3307-18.
- [12] DeBruyn C., Najar M., Raicevic G., Meuleman N., Pieters K., Stamatopoulos B., Delforge A., Bron D., Lagneaux L.: A Rapid, Simple, and Reproducible Method for the Isolation of Mesenchymal Stromal Cells from Wharton's Jelly Without Enzymatic Treatment. *Stem Cells Dev*. 2010
- [13] Lee YS. PH., Lim YS., Lee JC., Wang SG., Jung JS., Lee BJ.: Can the palatine tonsil be a source of mesenchymal stem cells with immunomodulatory property? *Clinical Otolaryngol* 2012; 23:90-100.
- [14] Yoon JH, Roh EY, Shin S, et al. Comparison of explant-derived and enzymatic digestion-derived MSZs and the growth factors from Wharton's jelly. *Biomed Res Int* 2013
- [15] Gittel C., Brehm W., Burk J., Juelke H., Staszky C., Ribitsch I.: Isolation of equine multipotent mesenchymal stromal cells by enzymatic tissue digestion or explant technique: comparison of cellular properties. *BMC Vet Res*. 2013 Oct 29;9:221.
- [16] Ghorbani A., Jalali S.A., Varedi M.: Isolation of adipose tissue mesenchymal stem cells without tissue destruction: a non-enzymatic method. *Tissue Cell*. 2014 Feb;46(1):54-8
- [17] Chatzistamatiou TK., Papassavas AC., Michalopoulos E., Gamaloutsos C., Mallis P., Gontika I., Panagouli E., Koussoulakos SL., Stavropoulos-Giokas C.: Optimizing isolation culture and freezing methods to preserve Wharton's jelly's mesenchymal stem cell (MSZ) properties: an MSZ banking protocol validation for the Hellenic Cord Blood Bank. *Transfusion*. 2014;54(12):3108-20.
- [18] Li DR., Cai JH.: Methods of isolation, expansion, differentiating induction and preservation of human umbilical cord mesenchymal stem cells. *Chin Med J (Engl)*. 2012 Dec;125(24):4504-10
- [19] Chen G., Lv Y., Guo P., Lin C., Zhang X. Yang L., Xu Z.: Matrix mechanics and fluid shear stress control stem cells fate in three dimensional microenvironment. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2013 Jul;8(4):313-23.
- [20] Jung S., Sen A., Rosenberg L., Behie L.A.: Identification of growth and attachment factors for the serum-free isolation and expansion of human mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*. 2010 Sep;12(5):637-57.
- [21] Vidal M.A., Walker J., Napoli E., Borjesson D.L.: Evaluation of senescence in mesenchymal stem cells isolated from equine bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord tissue. *Stem Cells Dev*. 21 (2012) 273–283.
- [22] Zaim M., Karaman S., Cetin G., Isik S.: Donor age and long-term culture affect differentiation and proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Ann Hematol*. 2012 Aug;91(8):1175-86.
- [23] Choi J.-S.a, Lee B.-J.a, Park H.-Y.a, Song J.-S.a, Shin S.-C.a, Lee J.-C.b, Wang S.-G.a, Jung J.S.c: Effects of Donor Age, Long-Term Passage Culture, and Cryopreservation on Tonsil-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Cell Physiol Biochem* 2015; 36:85-99
- [24] Rehfeldt F., Engler A. J., Eckhardt A., Ahmed F., Discher D.E.: Cell responses to the mechanochemical microenvironment—implications for regenerative medicine and drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2007 Nov 10; 59(13):1329-39.
- [25] Luo W, Xiong W, Zhou J, Fang Z, Chen W, Fan Y, Feng L.: Laminar shear stress delivers cell cycle arrest and anti-apoptosis to mesenchymal stem cells. *Acta Biochim Biophys Sin*. 2011; 43:210–6.
- [26] Higuera GA, vanBoxtel A, van Blitterswijk CA, Moronim L.: The physics of tissue formation with mesenchymal stem cells. *Trends in Biotechnol*. 2012; 30(11):583–90.
- [27] Yeatts AB, Chouquette DT, Fisher JP.: Bioreactors to influence stem cell fate: augmentation of mesenchymal stem cell signaling pathways via dynamic culture systems. *Biochim. Biophys. Acta*. 2013; 1830(2):2470–80.
- [28] Dan P., Velot É., Decot V., Menu P.: The role of mechanical stimuli in the vascular differentiation of mesenchymal stem cells. *J Cell Sci* 2015 128: 2415-2422
- [29] Yourek G., McCormick S.M., Mao J.J., Reilly G.C.: Shear stress induces osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Regen Med*. 2010 Sep;5(5):713-24
- [30] EjtehadiFar M., Shamsasenjan K., Movassaghour A., AkbarzadehLaleh P., Dehdilani N., Abbasi P., Molaeipour Z., Saleh M.: The Effect of Hypoxia on Mesenchymal Stem Cell Biology. *Adv Pharm Bull* 2015 Jun, 2015 Jun; 5(2): 141–149
- [31] Dos Santos F, Andrade PZ, Boura JS, Al. E.: Ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells: a more effective cell proliferation kinetics and metabolism under hypoxia. *J Cell Physiol*. 2010; 223(1):27–35.
- [32] Augello A., Kurth T. B., Bari C. D.: Mesenchymal stem cells: A perspective from in vitro cultures to in vivo migration and niches. *Eur Cell Mater*. 2010 Sep; 20:121-33.
- [33] Fortier L.A., Nixon A.J., Williams J., Cable C.S.: Isolation and chondrocytic differentiation of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Am J Vet Res*, 59 (1998), p. 1182
- [34] Young R. H., Butler D. L., Weber W., Caplan A. I., Gordon S. L., Fink D. J.: Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. *J Orthop Res*, 6 (1998), p. 406
- [35] Artmann G. M. , Minger S., Hescheler J.: *Stem Cell Engineering: Principles and Applications*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2011
- [36] Eibl R, Kaiser S, Lombriser R, Eibl D.: Disposable bioreactors: the current state-of-the art and recommended applications in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010;86:41–9.
- [37] Rowley J, Abraham E, Campbell A, Brandwein H, Oh S.: Meeting lot-size challenges of manufacturing adherent cells for therapy. *BioProcess Int*. 2012;10:16–22.
- [38] Aunins JG, Bader B, Caola A.: Fluid mechanics, cell distribution and environment in CellCube Bioreactors. *Biotechnol Prog*. 2003;19:2–8.
- [39] Goltry KL, Hampson BS, Venturi NA, Batel RL.: Adult stem cell therapies for tissue regeneration: Ex vivo expansion in an automated system. In: Yanhong S, Clegg DO, editors. *Stem Cell research and Therapeutics*. Springer; 2008. p. 251–74.
- [40] Eibl R, Eibl D, editors. *Single Use Technology in Biopharmaceutical Manufacture*. Wiley VCH; 2011. p. 33–51.
- [41] Ott A.: *Kultivierung und Zellrückgewinnung von humanen mesenchymalen Stammzellen in einem modifizierten Bioreaktor*. Zurich University of Applied Science, Switzerland, Master's Thesis; 2014.
- [42] Cierpka K., Elseberg C. L., Niss K., Kassem M., Salzig D., Czermak P.: hMSC Production in Disposable Bioreactors with Regards to GMP and PAT. *Chemie Ing Tech*. 2013 Feb 19;85(1-2):67–75.
- [43] Jing D., Sunil N., Punreddy S., Aysola M.: Growth Kinetics of Human Mesenchymal Stem Cells in a 3-L Single-Use, Stirred-Tank Bioreactor. *BioPharm Int*. 2013;26:28–38.
- [44] Kaiser S., Löffelholz C., Werner S., Eibl D.: CFD for characterizing standard and single-use stirred cell culture bioreactors. *Computational Fluid Dynamics*. InTech; 2011. DOI:10.5572/23496
- [45] Schirmaier C., Jossen V., Kaiser S.C., Jüngerkes F., Brill S., Safavi-Nab A., Siehoff A., van den Bos C., Eibl D., Eibl R.: Scale-up of adipose tissue-derived mesenchymal stem cell production in stirred single-use bioreactors under low-serum conditions. *Eng Life Sci*. 2014;14(3):292–303.
- [46] Carrancio S, Lopez-Holgado N, Sanchez-Guijo FM, A.E.: Optimization of mesenchymal stem cell expansion procedures by cell separation and culture conditions modification. *Exp Hematol*. 2008;36(8):1014–21
- [47] Akerström.: *Expansion of adherent cells for cell therapy*. Uppsala University, Sweden; 2009.
- [48] Neumann A., Lavrentieva A., Heikenbrinker A., Loenne M., Kasper C.: *Characterization and Application of a Disposable Rotating Bed*

- Bioreactor for Mesenchymal Stem Cell Expansion. *Bioengineering* 2014, 1, 231-245
- [49] Shyu Y., Stratheam K.E., Eglen R.M.: Large-scale expansion of stem cells for therapy and screening. *Drug Discov World Winter*. 2013, 35–9.
- [50] Hambor J.: Bioreactor design and bioprocess controls for industrialized cell process- ing. *BioProcess Int.* 2012;10(6):22–33.
- [51] Lechanteur C., Baila S., Janssen M., Giet O., Briquet A., Baudoux E., Beguin Y.: Large Scale Clinical Expansion of Mesenchymal Stem Cells in the GMP-Compliant, Closed Automated Quantum® Cell Expansion System: Comparison with Expansion in Traditional T-Flasks. *J Stem Cell Res Ther* 2014, 4:8

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr.Ing. Ralf Pörtner (TUHH Hamburg) danken wir für die Durchsicht des Manuskriptes und die wertvollen Kommentare.

Krebsstammzellen: Gibt es sie und welche Bedeutung haben sie in der Onkologie?

Finn Brose, David Esau, Caroline Scholl, Shirin Vardag¹

Master Medizingenieurwesen, Technische Universität Hamburg (TUHH), Hamburg, Deutschland

Zusammenfassung. Der folgende wissenschaftliche Artikel umfasst die wichtigsten Standpunkte aus dem Vortrag von Prof. Dr. med. Udo Schumacher zum Thema der Krebsstammzellenforschung. Diese befasst sich mit dem Aufbau und der Charakterisierung der Tumorstammzellen sowie deren Identifizierung im Gewebe. Des Weiteren werden ihre vielfältigen Eigenschaften und Mechanismen im Zusammenspiel zwischen ihrer Mikroumgebung und dem Immunsystem dargelegt und näher erläutert. Durch komplexe Prozesse beeinflussen Tumorstammzellen das Immunsystem und begünstigen so auch die Metastasierung. Unterschiedliche Methoden ermöglichen die Identifizierung der Zellen im Gewebe. Trotz des medizinischen Fortschrittes ist ein gezieltes Eingreifen und Behandeln der malignen Zellen für die klinische Anwendung noch nicht ausgereift. So zeigten Tierversuche extreme Schwankungen in Bezug auf Tumorausbreitung und -bekämpfung. Daher sollte die Forschung bezüglich der Detektion und Bekämpfung der Tumorstammzellen intensiviert werden.

Schlagwörter: Stammzellkonzept, Myelome, Biomarker, Heterogenität, Nischen, Immunsystem, Tumormetastasierung, epithelial-mesenchymale Transition, mesenchymal-epitheliale Transition

EINLEITUNG

Trotz jahrelanger intensiver Forschung in der Onkologie sind bösartige Tumore noch immer wesentliche Ursachen der weltweiten Sterblichkeit [1]. Ihnen wird somit auch in der Regenerativen Medizin eine hohe Bedeutung zuteil. Um Behandlungen weiter entwickeln und eine höhere Überlebensrate von Krebspatienten erreichen zu können, wird derzeit besonderes Augenmerk auf das Modell der Tumorstammzellen (CSCs) und ihre Bedeutung in der Onkologie gelegt [1,2]. Da diese als tumorinitiierend gelten, spielen sie eine signifikante Rolle in der Tumorforschung und Zellbiologie [1]. Die Tumorentstehung wird hierbei basierend auf expandierenden Tumorzellen, die eine Stammzellcharakteristik besitzen, begründet [1]. Tumorstammzellen können *in vivo* eine Metastase mit der gleichen Heterogenität wie der des Primärtumors bilden, denn sie sind gegenüber derzeitigen Behandlungen, wie beispielsweise der Chemoradiotherapie, relativ resistent [1,2]. Da es besonders die Problematik der Metastasierung und des erneuten Auftretens eines Tumors zu beeinflussen gilt, wird der Fokus momentaner Therapien vom Großteil der Tumorzellen auf CSCs spezifiziert [3,1]. Da diese nur in geringer Anzahl im Tumorgewebe vorliegen, gestaltet sich ihre Isolation und Analyse als ein komplexes Problem [1]. Um Therapiemöglichkeiten effizienter zu gestalten, ist das Verständnis der Karzinogenese sowie der Charakterisierung und Identifikation der CSCs jedoch von großer Bedeutung [1,3].

CHARAKTERISIERUNG VON TUMORSTAMMZELLEN

Um das Verständnis im Bereich der Karzinogenese und Eigenschaften der CSCs zu intensivieren, wird im Folgenden auf das Konzept der Stammzellen eingegangen. Da diese eine hohe Zellvariabilität, eine angepasste Plastizität und eine hohe Heterogenität besitzen, sind sie durch Tumorthérapien besonders schwer zu treffen [3]. Es besteht eine Auswahl an Ansätzen, um diese Problematik zu umgehen. So erlaubt die Erkennung spezifischer Marker von Zelloberflächen für Stammzellen, die Identifikation von CSCs in solidem menschlichem Tumorgewebe [1]. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Erkennung von tumor-assoziierten Fibroblasten (CAFs) in der Mikroumgebung von CSCs [3]. In den Mikroumgebungen des Tumors finden komplexe immunologische Reaktionen statt, die diesem sowohl inhibierend als auch fördernd gegenüber treten können [2]. Diese Immunreaktion ist von besonderer Wichtigkeit, da die Wahrscheinlichkeit, dass der Prozess der regulatorischen Metastasenbildung einsetzt, mit fortschreitender Tumorbildung immer höher wird. Während dieser durchläuft die aus dem Verband des Tumorgewebes ausgebrochene Zelle eine epithelial-mesenchymale Transition (EMT), auf die in der Erläuterung der Tumormetastasierung näher eingegangen wird [2].

¹ Schreibauftrag zum Vortrag von Prof. Dr. med. Udo Schumacher, UKE Hamburg, gehalten im Rahmen der Ringvorlesung "Tissue Engineering – Regenerative Medizin" im WiSe 16/17
Kontakt: poertner@tuhh.de

Konzept der Stammzellen und maligne Myelome als Stammzellerkrankung

Funktionell werden Stammzellen durch ihre Fähigkeit als Vorläuferzelle, sich selbst zu erneuern und zu differenzieren, charakterisiert [4]. Während einer sehr differenzierten Regulation können sich hämatopoetische Stammzellen des Gewebes im Knochenmark zu Progenitorzellen, Lymphozyten, Monozyten und weiteren Blutzellen entwickeln [5]. Ihre Selbsterneuerung wird durch die Proliferation von Blutstammzellen ermöglicht, bei der sie eine symmetrische oder asymmetrische Zellteilung durchführen können. Die symmetrische Teilung beschreibt die Entstehung zweier identischer Stammzellen, während bei der asymmetrischen Teilung eine Stammzelle (parent) und eine weiter differenzierte Zelle mit erhöhter Proliferationsrate, jedoch verminderter Fähigkeit zur Selbsterneuerung (daughter), entstehen. Die Proliferationsrate von Stammzellen ist geringer, da auf diesem Wege weniger absolute Synthesefehler entstehen können. Um die enthaltene DNS hinreichend zu schützen, ist sie mit einer Doppellipidmembran umgeben, die eine hohe Anzahl an ABC-Transportern mit aktiven Pumpfunktionen besitzt. Durch die Bindung von ATP an die Transporter wird Energie freigesetzt und die potentiell schädigende Substanz kann aus dem Zellinneren über die Doppellipidschicht gepumpt werden. Das Stammzellkonzept lässt sich auf den Großteil der CSCs übertragen, da diese auf den gleichen Signalwegen beruhen, einen ähnlichen Metabolismus besitzen und ähnliche Oberflächenmarker tragen [1]. Sie befinden sich meist im Ruhestadium G0 des Zellzyklus und werden somit nicht von Zytostatika angegriffen, die nur gegenüber Zellen im aktiven Zellzyklus wirken. Zudem sind CSCs durch die Transporter in der Lage, Arzneiwirkstoffe aus der Zelle zu pumpen. Weitere wesentliche Eigenschaften von CSCs sind auch eine lange Lebensdauer und die Nischenabhängigkeit, welche nachfolgend im Zusammenhang mit der Erläuterung der Identifizierung von CSCs näher behandelt wird [3,6-9]. Es wird vermutet, dass daraufhin ein Tumor aus einer malignen Transformation einer Stamm- oder Progenitorzelle wächst [1].

Das Konzept zur Entstehung von Malignität über CSCs kann besonders gut am Multiplen Myelom illustriert werden. Dies ist eine hämatologische Tumorerkrankung der Plasmazellen, die einen wichtigen Teil des Immunsystems definieren [5]. Plasmazellen bilden sich aus B-Lymphozyten, wenn Antigene in den menschlichen Körper eindringen und produzieren daraufhin Immunglobuline [5]. Die Initiation des Multiplen Myeloms beginnt mit Subpopulationen von positiv-onkogenen Zellen. Wie in [5] dargestellt, können sie zu prämaligen Plasmazellen differenziert werden und eine Neoplasie beginnen (MGUS). Hieraus können Myelom-initiiierende maligne Plasmazellen entstehen, die die medulare Neoplasie an mehreren Positionen fortführt, was klinisch als Multiples Myelom bekannt ist.

Heterogenität der Tumorstammzellen

Die eingehende Analyse und das Verständnis der Heterogenität der Population um die CSCs sind für die spätere Identifikation und Therapieentwicklung maßgeblich. Sie lässt sich durch drei verschiedene Modelle darstellen, die zu der entsprechenden Situation beitragen können. Welches Konzept jedoch am besten zu der entsprechenden Situation passt, kann nicht pauschal festgelegt werden [3].

Das Hierarchische Modell beschreibt die Eigenschaft, dass nur bestimmte Subpopulationen der CSCs die Fähigkeit besitzen, die Entwicklung des Tumors weiterzuführen. Aus Langzeit-CSCs entstehen Kurzzeit-CSCs und anschließend Progenitorzellen, die differenzierte Zelltypen des Tumorsystems darstellen. Aus Progenitorzellen können terminal-differenzierte Zellen entwickelt werden. Während des Differenzierungsvorgangs von Langzeit-CSC zu Progenitorzelle sinkt das Stammzellpotential. Terminal-differenzierte Zellen besitzen kein Stammzellpotential [3].

Das Koevolutionsmodell hingegen besagt, dass verschiedene unabhängige CSC-Populationen koexistieren und aus spezifischen Initiationen von Gewebestammzellen (TSCs) entstehen. Die CSC-Populationen besitzen dabei alle ein ähnliches Stammzellpotential. Da eine Verteilung einer Koevolution aufgrund der geringen Initiationsfrequenz und der niedrigen Zahl an TSCs verhindert wird, wird dieses Modell auch aus Wahrscheinlichkeitsgründen weniger als alternative Modelle angewandt [3].

Das Plastizitätsmodell beschreibt eine spontane und stochastische Transition infolge derer CSCs zwischen verschiedenen Zellstadien, das Nicht-Stammzellstadium eingeschlossen, wechseln können. Hierbei können CSCs aus normalem Tumorgewebe entstehen. Sie sind somit in der Mikroumgebung des Tumors dynamisch reguliert. Dieses Modell scheint in der Tumorerhaltung und Entwicklung eine große Rolle zu spielen [3].

Klinisch wirkt die Heterogenität der CSCs Therapien durch eine Medikamentenresistenz und privilegierte Immunreaktionen der Stammzellen entgegen. Ein Überleben verschiedener CSC-Populationen der Medikamentengabe und die darauffolgende Neubildung mit erhöhter CSC-Rate des Tumorgewebes sind somit möglich (dargestellt in [3]).

Identifizierung der Tumorstammzellen

Um neue onkologische Ziele und Therapien angepasst auf den Typ der CSC entwickeln zu können, besteht eine besondere Relevanz, diese zu charakterisieren. Da der Prozess der malignen Transformation in CSCs in verschiedenen Stadien einer sehr gering vorhandenen Subpopulation abläuft, ist ihre Identifikation von erhöhter Schwierigkeit [1]. So werden hauptsächlich fünf verschiedene Methoden für die komplexe Analyse von Primärtumoren (in vivo) und Tumorzelllinien (in vitro) herangezogen. Eine Möglichkeit der Analyse besteht in

der Neukodierung in ein pluripotentes (mit Stammzeleigenschaften versehenes) Stadium von in vitro Modellen der Tumorzellen eines Patienten [1]. Somit kann die Entwicklung und das Fortschreiten von Tumorerkrankungen aus pluripotenten Zellen entschlüsselt werden [1]. Eine weitere Anwendung besteht in der Erkennung von Biomarkern, die die Oberfläche der spezifischen Tumorzellen je nach Typ aufzeigt. Biomarker können aus DNA, RNA, Mikro-RNA (miRNA) oder weiteren Molekülen bestehen [10]. Durch ein weites Spektrum an Stammzell- und EMT-Markern in menschlichem Tumorgewebe oder Flüssigkeiten können gutartige und maligne Tumore erkannt und zwischen ihnen unterschieden werden, die Reaktion auf Therapien untersucht sowie weitere Anwendungen unterstützt werden [11]. Zusätzlich kann die Nebenpopulation der CSCs durch die Analyse ihrer Mikroumgebung detektiert werden [1]. Die durch die Mikroumgebung definierte Nische der CSCs besteht primär aus tumorassoziierten Fibroblasten (CAFs), Tumorassoziierten Makrophagen (TAMs), Tumor-Endothelzellen und Wachstumsfaktoren, sowie Zytokinen [12]. Diese Umgebung beschreibt ein Netzwerk, das höchstgradig darauf spezialisiert ist, das Bestehen des Tumors und Stammzeleigenschaften während der Differentiation zu unterstützen. So steht die Mikroumgebung des Tumors (TME) in ständiger Wechselwirkung mit dem Immunsystem, welches supprimierend, aber auch fördernd genutzt werden kann [3]. Neben den genannten Anwendungen bestehen zusätzlich die Prinzipien, die den Widerstand gegen den Zelltod oder die Reaktion auf weitere spezifische Kulturkonditionen beschreiben.

Zusammenspiel zwischen Immunsystem und Mikroumgebung der Tumorstammzellen

Die grundlegende Aufgabe der Immunzellen ist es, mutierte oder abnormale Zellen zu zerstören. Eine wichtige Eigenschaft der CSCs ist jedoch die Immuntoleranz innerhalb des TME. Die Mikroumgebung kann das Immunsystem je nach Bedarf onkogen unterstützend oder anti-onkogen nutzen [13].

Dabei werden der Erhalt, das Wachstum, die Differentiation und Chemotherapieresistenz durch mehrere Mechanismen gefördert (dargestellt in [13]). Die TAMs produzieren Proteine und Signalsubstanzen, die Signalwege der CSCs aktivieren und ihre Medikamentenresistenz fördern. Zusätzlich erzeugen sie Wachstumsfaktoren, die die EMT in Lebertumoren begünstigen. Myeloidabgeleitete Suppressorzellen (MDSCs) sorgen außerdem für eine erhöhte Tumorraten in den Eierstöcken, indem sie miRNA in Tumorzellen induzieren. Eine weitere interagierende Struktur bilden die folliculären Dendritischen Zellen (folliculären DC). Sie sind für die Kommunikation der Immunzellen und die Antigenpräsentation entscheidend. Auf diesem Wege ist es ihnen möglich, die Signalwege von Lymph-CSCs zu nutzen, um die Tumorgenese zu fördern. Regulatorische T-Zellen (T_{Regs}) hingegen sind für die Regulierung

der Funktion und Aktivierung von Immunzellen zuständig. Sie beugen Autoimmunität vor, da sie eine Toleranz gegenüber Selbst-Antigenen induzieren und die Immunzellaktivierung dämpfen. Als Schlüsselstruktur der immunsuppressiven Mikroumgebung gilt STAT3. Dieses führt zur Produktion von Zytokinen wie IL6, die einen Anstieg immunsuppressiver Zellen wie MDSCs und T_{Regs} und eine Verringerung der Reifung von Dendritischen Zellen zufolge haben [13].

CSCs besitzen außerdem verschiedene Möglichkeiten, ihre Detektion zu umgehen. Sie greifen während der Antigenpräsentation und des kostimulierenden Signals durch die Regulierung von MHC-I/II oder TAP1/2 ein, um die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen zu verringern [14,13]. Zusätzlich ist es CSCs möglich, die Regulation weiterer Proteine (PDL1 und CD80) zu beeinflussen, so dass eine Anergie der T-Zellen entsteht. So werden T-Zellen ohne kostimulatorisches Signal aktiviert, woraufhin sie nicht erneut aktiviert werden können [13].

Ein weiterer Aspekt des Zusammenspiels zwischen Immunsystem und CSCs beruht auf der Eigenschaft, dass CSCs die Vermehrung protumoriger Phänotypen fördert und antitumorische Zellen eliminiert. Um dies zu erreichen, erzeugen sie stimulierende und inhibierende Faktoren. Somit werden die Makrophagenrekrutierung, die Polarisation zum M2-Phänotyp und die Hemmung der Phagozytenaktivität von Makrophagen gefördert [13].

Es ist darüber hinaus zu beachten, dass CSCs besonders anfällig für die Lyse durch aktive zytotoxisch wirkende Natürliche Killerzellen (NK) sind. Da NKs den Differentiationsprozess eines Tumors beeinflussen, regulieren manche CSCs (bei Brustkrebs und bestimmten Hirntumoren) entsprechende Aktivierungssignale herunter, um der Eliminierung zu entgehen [13].

Konzept der Tumormetastasierung

Ist der Tumor bereits fortgeschritten, steigt die Wahrscheinlichkeit, dass dieser von CSCs ausgelöste Metastasen bildet. CSCs besitzen eine erhöhte Resistenz gegenüber den limitierenden Abläufen der metastatischen Kaskade, die Extravasation (Austritt von Blut oder Lymphflüssigkeit aus Gefäß in umliegendes Gewebe), Anoikis (Zelltod) und Überleben in nicht natürlichem Gewebe beinhalten [3]. Die Resistenz lässt sich in der Eigenschaft der CSCs begründen, Mesenchymale Zelladhäsionsmoleküle (Mesenchymale CAMs) und Epitheliale CAMs herauf- und herabzuregulieren. Die Schritte der Kaskade werden dabei genau eingehalten, wobei sich eine geringe Menge der CSCs schlussendlich im Fremdgewebe integriert [2].

Hierbei besteht eine Malignität, die eine EMT durchläuft, um in den Blutstrom zu gelangen. Während der EMT wird, wie auf der linken Seite der Abbildung 4 zu erkennen, grundsätzlich eine Epithelzelle in eine Zelle transformiert, die mesenchymale Eigenschaften und Funktionen besitzt. CSCs nutzen diesen Vorgang, um

die Anzahl der Proteine, die von mesenchymalen Zellen präsentiert werden, zu erhöhen und eine Leukozyte nachzuahmen. Dabei wechseln CSCs in eine Spindel-form, senken die Anzahl epithelialer CAMs und verringern Proteine, die von Epithelzellen präsentiert werden um die Endothelbarriere zu überwinden [2].

Haben die vom festen Tumorgewebe gelösten Zellen den Blutstrom erreicht, werden diese durch den Blutkreislauf gepumpt. Da der Blutfluss dabei die gelösten CSCs mit mesenchymalen Eigenschaften daran hindert, sich wieder am Endothel festzusetzen, können sich nur wenige in fremdes Gewebe integrieren. Dann müssen Tumorzellen über Zelladhäsionsmoleküle an das Endothel anheften, die den Scherkräften widerstehen. Hat die Zelle nach Anheftung am Endothel und Transmigration das Zielgewebe erreicht, so initiiert sie eine mesenchymale-epitheliale Transition, während dieser die Vorgänge der EMT rückwärts ablaufen (dargestellt in [15]). Somit entsteht eine Zelle mit epithelialen Eigenschaften, die durch Proliferation einen neuen Tumor bilden kann [2].

DISKUSSION UND FAZIT

CSCs bilden eine Struktur auf der die heutige Forschung aufbaut, um nicht-chirurgische Behandlungen gegen Tumore zu entwickeln. Basierend auf ihren Eigenschaften stellen sie ein effektives Ziel zur Elimination der heterogenen CSC-Population, der Tumoregeneration und der Blockierung der Metastasenbildung dar. Da bisherige Anwendungen, wie beispielsweise die Chemotherapie, nicht gegen CSCs wirken, ist eine Kombination mit neuen Ansätzen, die ihre Komplexität erfassen, von Vorteil [1].

Darüber hinaus bilden die aus mesenchymalen TMEs und CAFs bestehenden Mikroumgebungen der CSCs eine weitere Möglichkeit, in die Tumorentwicklung einzugreifen. Zu beachten ist bei einer auf CAFs ausgerichteten Therapie, dass Medikamente speziell auf bestimmte Populationen mit klar nachgewiesener tumorunterstützenden Aktivität angepasst werden [1,3]. Die Manipulation der Nischen kann durch eine Suppression mesenchymaler Arten von Wachstumsfaktoren für Fibroblasten, Antikörper gegen Proteine, Inhibitoren der Differentiation von Bindegewebszellen zu aktivierten CAFs, sowie Inhibitoren der Differentiation von hepatischen Zellen zu Myofibroblasten ausgeführt werden [1,2,3].

Die sich aus den Mikroumgebungen herausbildende Immuntoleranz ergibt eine zusätzliche Option auf das Überleben, die Migration und die Steigerung der Stammzeleigenschaften einzuwirken [1,13]. So kann die Anergie der T-Zellen durch eine inhibierende Therapie verhindert und ihre normale Aktivität gegen das Tumorgewebe ermöglicht werden [13].

Da die Tumormetastasierung neben dem Wiederauftreten eines Tumors als Hauptproblematik für Patienten mit fortgeschrittenem Tumor besteht, offenbart sich auch in dieser Thematik Potential für Therapieansätze.

Um diese wirkungsvoll zu gestalten, muss der bisher vernachlässigte regulatorische Prozess der Metastasenbildung berücksichtigt werden. In diesen Vorgang kann bereits durch eine erhöhte Anzahl verbindender regulatorischer Epithelproteine während der EMT in Mäusen eingegriffen werden [2].

Zusammenfassend lässt sich die leitende Fragestellung „Krebsstammzellen: gibt es sie und welche Bedeutung haben sie in der Onkologie?“ in Hinblick auf die Existenz der Krebsstammzellen zu einer hohen Wahrscheinlichkeit positiv beantworten. Sie besitzen mit ihrem Stammzellpotential die Eigenschaft, einen Tumor zu initiieren, das Immunsystem zu beeinflussen und Metastasen zu entwickeln. Da die zugrunde liegenden Prozesse sehr komplex sind, bedarf es eines hohen analytischen Aufwandes, sie hinreichend genau zu erfassen. So bestehen schon für die Darstellung der Heterogenität von CSCs im Wesentlichen drei verschiedene Modelle, die nach Wahrscheinlichkeit bewertet und abgewogen werden müssen [3]. Nachfolgende Prozesse basieren auf diesen Modellen.

Um die Frage nach der Bedeutung der Krebsstammzellen in der Onkologie zu beantworten, müssen bisherige Therapiemethoden und neue Ansätze betrachtet werden. So könnte die Therapie der Krebsstammzellen eine neue Chance auf die Heilung der Tumorerkrankung geben, da nach der Entwicklung neuer Methoden in die Prozesse der Tumorentstehung, des Tumorstadiums und der Metastasierung eingegriffen werden könnte [1]. Somit steigt die Bedeutung der Krebsstammzellen in der Onkologie immer weiter. Um die Forschung in diesem Gebiet auszuweiten, ist das grundlegende Verständnis der zugrundeliegenden Konzepte eine Voraussetzung. Aufbauend auf bereits gewonnenen Fragmenten des Verständnisses können jetzt Therapieansätze erweitert und neu entwickelt werden.

AUSBLICK

Um die gewonnene Chance der Entwicklung neuer CSC-Therapien aufzugreifen, gilt es auch in Zukunft die Analyse der Tumorgenese und Stammzeleigenschaften zu intensivieren. In der Folge können Behandlungsverfahren in Hinblick auf die Heilung der Tumorerkrankung stetig verbessert und neu erarbeitet werden. So könnten CSCs Hinweise zu der Identifizierung von aktiven Signalwegen einer Stammzelle während der Tumorentwicklung geben [1]. Als ein weiterer Therapieansatz wird die Detektion von zum Angriff besonders häufig präsentierten Markern der CSCs angesehen. Das Inhibieren von Nestin könnte diesbezüglich ein neues therapeutisches Ziel darstellen, da dieses eine reduzierte Aggressivität des Tumors bewirkt [2]. Zusätzlich bestehen Forschungsansätze, die sich auf weitere Prinzipien des Tumorstadiums, wie beispielsweise den Gewebedruck um den Tumor oder die Gabe antiadhäsiver Medikamente im Zeitraum der Operation, beziehen.

LITERATUR

- [1] Franco S. et al, In vitro models of cancer stem cells and clinical applications, 3rd International Genomic Medicine Conference, 2015.
- [2] Toshiyuki I., Cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition: Novel therapeutic targets for cancer, Pathology International 2016,66,601-608, 2016.
- [3] Boesch M. et al, Heterogeneity of Cancer Stem Cells: Rationale for Targeting the Stem Cell Niche, Biochimica et Biophysica Acta, 276-289, 2016.
- [4] Weissmann I.L., Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution, Cell100, 157-168, 2000.
- [5] Johnsen H.E. et al, The myeloma stem cell concept, revisited: from phenomenology to operational terms, Haematologica, 2016.
- [6] Borovski T. et al, Cancer stem cell niche: the place to be, Cancer Res. 71, 634-639, 2011.
- [7] Clevers H., The cancer stem cell: premises, promises and challenges, Nat. Med. 17, 313-319, 2011.
- [8] Pattabiraman D.R. et al, Tackling the cancer stem cells - what challenges do they pose?, Nat.Rev. Drug Discov. 13, 497-512, 2014.
- [9] Visvader J.E. et al, Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions, Nat. REV. Cancer 8, 755-768, 2008.
- [10] Langan R.C. et al, Colorectal cancer biomarkers and the potential role of cancer stem cells, J cancer 4(3), 241-50, 2013.
- [11] Henry N.L. et al, Cancer biomarkers, Mol Oncol. 6(2), 140-6, 2012.
- [12] Lander A.D. et al, What does the concept of the stem cell niche really mean today?, BMC Biol., 2012.
- [13] Sultan M. et al, Hide-and-seek: the interplay between cancer stem cells and the immune system, Carcinogenesis, 1-12, 2016.
- [14] Chikamatsu K. et al, Immunoregulatory properties of CD44+ cancer stem-like cells in squamous cell carcinoma of the head and neck, Head Neck 33, 208-215, 2011.
- [15] Kalluri R. et al, The basics of epithelial-mesenchymal transition, J Clin Invest., 119(6), 1420-1428, 2009.

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Udo Schumacher (UKE Hamburg) und Herrn Prof. Dr.-Ing. Ralf Pörtner (TUHH) danken wir für die Durchsicht des Manuskriptes und die wertvollen Kommentare.

Vaskularisierungsstrategien für Tissue Engineering *in vitro/in vivo*

Laura Rieger, Marie Fleur Elisabeth Wegner, Marcel Sigman, Volker Rudat, Hauke Claas Heller¹

Master Medizingenieurwesen, Technische Universität Hamburg (TUHH), Hamburg, Deutschland

Zusammenfassung. Zur Wundheilung ist die Versorgung durch ein intaktes Gefäßsystem von großer Bedeutung. Häufig sind nach schweren Gewebeerkrankungen auch darunterliegende Blut- und Lymphgefäße geschädigt. Dadurch wird der Heilungsprozess erschwert oder sogar ganz verhindert. Diese Hausarbeit beschäftigt sich mit Möglichkeiten zur reparativen und regenerativen Vaskularisierung. Neben bereits etablierten Methoden wie Angioplastie oder Transplantation von eigenem oder fremdem Gewebe, sollen im Folgenden neue Strategien und Forschungsansätze vorgestellt werden. In der Forschung werden hierzu oft sogenannte Scaffolds eingesetzt. Diese resorbierbaren extrazellulären Grundgerüste werden mit Zellen besiedelt, die die Neovaskularisierung und somit die vollständige Heilung des Gewebes fördern. Eine andere Art, um Vaskularisierung bzw. Neovaskularisierung zu fördern, liegt in der Behandlung von Stammzellen unter Sauerstoffarmut, der Hypoxie. In einer weiteren alternativen Methode, genannt "EmaCure", werden patienteneigene Blutzellen anstelle von Stammzellen behandelt. EmaCure erzielt dabei in ersten Versuchen bereits sehr gute Ergebnisse und erscheint deshalb sehr vielversprechend für das Forschungsgebiet.

HINTERGRUND

Herz und Gefäßsystem transportieren Blut in einem geschlossenen Kreislauf zu sämtlichen Körperzellen. Das Gefäßsystem untergliedert sich in Arterien, Kapillaren und Lymphgefäße. Das menschliche Gefäßsystem ist dabei hierarchisch aufgebaut: Beginnend mit der Aorta (Durchmesser von ca. 2,5 bis 3,5 cm) über Arterien und Arteriolen bis hin zu Kapillaren (Durchmesser zwischen 2 und 10µm); gleiches gilt für Lymphgefäße. Blut besteht zu 55% aus dem flüssigen Blutplasma (90% Wasser, 10% gelöste Stoffe) und zu 45% aus den Blutzellen (Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten) [1]. Humane Erythrozyten haben einen Durchmesser von ca. 7, 5µm. Folglich sind Kapillaren meist kleiner als Erythrozyten, die verformbar sind, um dennoch durch die Kapillaren transportiert werden zu können. Wegen der hohen mechanischen Beanspruchung werden sie ca. alle 100 Tage neu gebildet. Aufgabe der Erythrozyten ist der Transport von Atemgasen. Sie bestehen fast ausschließlich aus Hämoglobin. Dieses bindet Sauerstoff reversibel und verleiht Blut die typische Färbung: Blut erscheint heller und rötlich, je mehr Sauerstoff geladen wurde, sowie dunkler und bläulich, wenn geringere Mengen zirkulieren [1]. Bei weniger als 5g/100ml entwickelt sich eine Zyanose mit den typischen Anzeichen bläulicher Lippen, Haut und Ohrfläppchen [2]. Lui et al. stellten fest, dass Diffusion nur über eine bestimmte Distanz möglich ist und der Abstand zwischen Kapillaren 200µm nicht überschreiten darf,

um Zelltod zu verhindern [3]. Allerdings sind Kapillaren als feinste Haargefäße sehr empfindlich und können zum Beispiel durch Verbrennungen (ca. ab dritten Grades) zerstört werden, es verbleibt vernarbt Gewebe. Zur Heilung beschädigter Kapillargefäße, zum Beispiel infolge einer durch Herzinfarkt oder Cerebralparese bedingter Zyanose, ist die Versorgung mit Energie und Blutfluss besonders wichtig. Die im Folgenden vorgestellten Vaskularisierungsstrategien stellen diesbezüglich Behandlungsmöglichkeiten dar.

VASKULARISIERUNGSSTRATEGIEN

Vaskularisierungsstrategien können reparativ oder regenerativ erfolgen. **Reparative Strategien** lassen sich dabei in drei Teilbereiche untergliedern: **1.** vorhandene Gefäße erweitern, **2.** intakte Gefäße transplantieren und **3.** ganze Gewebe transplantieren.

1. Vorhandene Gefäße können zunächst, zum Beispiel durch Perkutane Transluminale Coronare Angioplastie (PTCA) bzw. Ballonangioplastie/-dilatation der Koronararterien, erweitert werden. Dabei wird unter Röntgenkontrolle ein Katheter eingeführt, über den ein Kontrastmittel gespritzt und die Position des Ballons kontrolliert wird. Zur Aufdehnung der Engstelle wird der Ballon (meist mehrfach) aufgeblasen, was verengende Kalkablagerungen in die Gefäßwand presst. In ca. 90% kann dadurch wieder eine weitgehend normale Durchblutung erreicht werden. Da sich das Gefäß aber erneut verengen kann, wird die PTCA oftmals mit der

¹ Schreibauftrag zum Vortrag von Prof. Dr. med. Arndt F. Schilling, Universitätsmedizin Göttingen, gehalten im Rahmen der Ringvorlesung "Tissue Engineering – Regenerative Medizin" im WiSe 16/17
Kontakt: poertner@tuhh.de

Implantation eines Stents kombiniert, der mit dem Ballon in das Gefäß eingeführt und durch das Aufblasen an die Gefäßinnenwand dilatiert wird (siehe [4]). Die Anzahl implantierbarer Stents ist allerdings begrenzt, da sonst die Beweglichkeit des Gefäßes zu stark eingeschränkt wird [4,5].

2. Daneben können intakte Gefäße als natürliche oder künstliche Umgehung einer Engstelle mit körpereigenen oder synthetischen Gefäßimplantaten (Bypass) operativ implantiert werden. Hierfür eignen sich vorwiegend Venen, die weitulmiger und dünnwandiger sind und sich besser zur Entnahme eignen als Arterien. Durch die Entnahme von Venen kann es allerdings zu Abflussstörungen und Wundbildung an der Entnahmestelle kommen [6-8].

3. Außerdem können ganze Gewebe, zum Beispiel Niere oder Leber, transplantiert werden. Damit das körperfremde transplantierte Gewebe angenommen wird, muss das körpereigene Immunsystem mit sehr teuren und schwer verträglichen Immunsuppressiva unterdrückt werden. Ein Hauptproblem besteht allerdings in der begrenzten Anzahl an Organpenden.

REGENERATIVE STRATEGIEN

Regenerative Strategien lassen sich ebenfalls in drei Teilbereiche untergliedern: **1.** neues Gewebe engineeren, **2.** neue Gefäße wachsen lassen oder **3.** ganze neue Gewebe wachsen lassen, wobei die erste Strategie – neues Gewebe engineeren – die Schnittstelle zwischen reparativen und regenerativen Strategien darstellt.

1. Im Bereich des Engineerings neuen Gewebes ist künstliche Haut, die die Wunde bedeckt, einwächst und alle Funktionen des ursprünglichen Gewebes übernimmt, besonders interessant. Es gibt bereits sogenannte "skin equivalents", die anatomische, metabolische und funktionelle Aspekte humaner Haut nachahmen können. Sie können zur Abdeckung von offenen Wunden oder als *in vitro*-System für Medikamententests eingesetzt werden, für die bisher Tierversuche nötig waren. Limitiert werden solche künstlichen Gewebe durch fehlende Vaskularisierung, die wichtig für den Stoffwechsel ist, das Zusammenwachsen (Anastomose) der Wunde begünstigt sowie zur Bekämpfung verschiedener Krankheiten (z. B. Tumorerkrankungen) notwendig ist.

a. In einem Forschungsprojekt am Uniklinikum Würzburg wurde von Groeber et. al. ein neues Verfahren zum Engineering von künstlichem Gewebe entwickelt, das ein voll funktionsfähiges Gefäßsystem besitzt [9]. Das erzeugte künstliche Gewebe wird durch vaskularisierte Scaffolds (BioVaSc) gezüchtet. Scaffold bezeichnet dabei ein mikrostrukturiertes, dreidimensionales Gerüst, das Zellen als extrazelluläre Matrix günstige Bedingungen zur Anlagerung bietet. Ein solches Gerüst kann aus einem Segment eines Schweine-Jejunum (Teil des Dünndarms) gewonnen werden, das ausschließlich

durch ein Arterien-/Venen-Paar versorgt wird. Es besteht nach Dezellularisierung mit Natrium-Desoxycholate hauptsächlich aus Kollagen Typ I und III und weißt noch Strukturen seines natürlichen Gefäßsystems auf. Es ist ungefähr 2-4 cm dick und wurde vor weiterer Nutzung durch Gammastrahlung sterilisiert. Wird dieses Gerüst mit menschlichen Endothelzellen durchwachsen, kann ein Gewebe mit funktionsfähigem Gefäßsystem gezüchtet werden. Human dermal microvascular endothelial cells (hDMEC), Human dermal fibroblasts (hDF) und Human epidermal keratinocytes (hEK) werden dabei zunächst aus Vorhäuten von beschnittenen Ein- bis Dreijährigen isoliert. Die Zellen werden verschiedenartig behandelt und kultiviert. Das aufgeschnittene Scaffold wird in einem Polycarbonat-Rahmen fixiert und durch Arterie und Vene wird eine hDMEC-Lösung gespült. Die Oberfläche des Scaffolds wird anschließend mit einer hDF-Lösung behandelt. Dann wird der Polycarbonat-Rahmen mit dem Scaffold in einem Bioreaktor platziert. Darin lässt sich das Gerüst mit einem physiologischen Medium durchströmen. Dieser Reaktor ermöglicht die Behandlung des Gerüsts komplett im Medium. Außerdem wird auch eine Ebene zwischen Luft und Flüssigkeit definiert, die nötig ist, um die Bildung einer künstlichen Haut zu forcieren. Die beiden Gefäße des mit den Zellen behandelten Scaffolds werden an einen Kreislauf angeschlossen, in dem ein bestimmtes Medium fließt. Der Druck dieses Kreislaufs wird dem menschlichen Blutkreislauf entsprechend nachempfunden und pulsiert zwischen 80 und 120 mmHg. Zwei weitere Kreisläufe versorgen Ober- und Unterseite des Scaffolds. Nach sechs Tagen wird das Medium durch hEK und FBS (fötales Kälberserum) ersetzt. Eine Woche später wird die Behandlung mit Zellen komplett ausgesetzt; stattdessen wird der Gefäßkreislauf sowie der die Unterseite versorgende Kreislauf mit KGM (keratinozyten Growth Medium) betrieben. Auf die Oberseite wird nun sterile Luft appliziert. Die gesamte Oberfläche von 8 cm² ist anschließend mit einer vaskularisierten, anatomisch korrekten Epidermis überzogen, die alle natürlichen Schichten beinhaltet und durch differenzierte hEK gebildet werden kann. Es können leichte anatomische Unterschiede zu natürlicher Haut festgestellt werden, die jedoch nicht die Funktion beeinträchtigen. Zukünftig kann mit diesem Verfahren ein erheblicher Fortschritt in der Behandlung von Patienten mit chronischen Wunden oder Brandwunden erzielt werden: So könnte eine Zellprobe des Patienten entnommen werden, aus der dann die benötigten Zelltypen (hDMEC, hDF und hEK) isoliert und mit der vorstehend dargestellten Methodik zum Engineering von neuem Gewebe genutzt werden. Das neu erstellte Gewebe würde dann keine Antigenität besitzen, worin ein erheblicher Vorteil im Vergleich zu Fremdimplantaten bestünde.

b. Alternativ können anstelle von Teilen eines Schweinedünndarms auch andere, nicht-tierische Materialien als Gerüst für engineeretes Gewebe genutzt werden. Eine

Möglichkeit, die Liu et al. im Jahr 2015 [3] beschrieben haben, besteht aus der Nutzung von biokompatiblen Hydro-Gelen. Mit diesen ist es ebenfalls möglich, auch in größeren Gerüstmodellen eine ausreichende Vaskularität zu erreichen. Sie stellten fest, dass der Abstand zwischen den Gefäßen 200 μm nicht überschreiten darf. Das ist der maximale Abstand, der noch eine ausreichende Versorgung der Zellen mit Sauerstoff und anderen Nährstoffen zulässt. Diese Hydro-Gele können natürlichen oder synthetischen Ursprungs sein: Natürliche Gele bestehen aus Proteinen, Polysacchariden und Hybridpolymeren. Die drei wichtigsten Proteine sind Collagen, Gelatin und Fibrin. Allerdings weisen Gele dieser Klasse typische Nachteile wie erhöhte Immunogenität und geringe mechanische Belastbarkeit auf. Synthetische Gele sind einfacher herzustellen und besitzen bessere mechanische und chemische Eigenschaften. Die Hauptbestandteile synthetischer Gele sind synthetische Polymere wie Polydimethylsiloxane (PDMS), Polyethylenglycol (PEG), Poly(lactid-co-glycolid) (PLGA) oder Polyglycerol Sebacate (PGS). Außer diesen beiden Klassen natürlicher oder synthetischer Hydro-Gele gibt es außerdem Hybrid-Gele, die aus natürlichen Gelen in Kombination mit synthetischen Polymeren bestehen. Der Einsatz von Hydro-Gelen ist aufgrund ihrer mechanischen Eigenschaften allerdings begrenzt: Das E-Modul in menschlichem Gewebe weist eine große Spannweite auf und bisher ist es lediglich möglich, ein Gerüst aus Gelen mit ähnlichem E-Modul wie der menschlicher Haut zu konstruieren. Ein Gerüst aus Hydro-Gelen kann zum Beispiel durch einfaches Formen erreicht werden. Dabei wird das Hydro-Gel in eine Kammer eingebracht, in der vorab zur Nachbildung des Gefäßsystems Nadeln oder Fasern integriert wurden. Das Hydro-Gel härtet daraufhin aus und kann mit Zellen, wie zuvor beschrieben, behandelt werden. Weitere Methoden zur Fertigung sind Lithographie oder Photopatterning: Bei ersterer Technik wird eine Form aus Silikon hergestellt, die als Negativform für ein aufgetragenes Hydro-Gel dient. Beim Photopatterning wird ein Scaffold durch Photopolymerisation geschaffen. Ein Photosensitives Hydro-Gel wird mit UV-Licht bestrahlt und härtet so unter einer Photolithographymaske aus. Das 3D Bioprinting (oder organisches Drucken) ist ebenfalls eine vielversprechende Methode und kann mit industriellem 3D Druck verglichen werden: Ein gelatinreiches Hydro-Gel wird dabei schichtweise auf einen Layer aufgetragen. Das Hydro-Gel härtet schnell aus und ermöglicht dadurch das Erstellen von mehrschichtigen, von Gefäßen durchzogenen Strukturen. Bei den beschriebenen Methoden, künstlich Gewebe aus Gelen und eigenen Zellen zu erstellen, sind jedoch noch einige Probleme ungeklärt. Das entstehende Material ist nicht vergleichbar mit menschlichem Gewebe und die Verwendung von UV-Licht und Zusätzen zum Cross-Linking von Collagen schädigen die Zellen.

2. In der Forschung wird sich derzeit deshalb auch wieder vermehrt auf körpereigene Heilungsmechanismen fokussiert. Wenn diese ausreichend verstanden sind, kann in den Prozess unterstützend eingegriffen werden. Die Neubildung von Blutgefäßen (Angiogenesis) ist jedoch zu komplex, um sie mit einzelnen isolierten Wachstumsfaktoren zu ersetzen und vergleichbare Ergebnisse zu liefern. Aktuell wird daher versucht, die Angiogenesis auf Basis ihres Hauptstimulus, der Sauerstoffarmut, zu unterstützen. Eine geringe Sauerstoffkonzentration (unter 6%) im Gewebe bewirkt die Ausschüttung des Transkriptionsfaktors HIF1- α , der eine Kaskade anderer an der Angiogenesis beteiligter Wachstumsfaktoren auslöst und dadurch die Migration von Keratinozyten und somit die aktive Wundheilung durch Vaskularisierung im Gewebe fördert. In chronisch unter Hypoxie leidendem Gewebe kann dieser Transkriptionsfaktor jedoch nicht mehr ausreichend bereitgestellt werden. Hieraus leiten sich einige Ansätze zur Versorgung ab, wie zum Beispiel die Vorbehandlung von mesenchymalen Stammzellen. Ausgelöst durch diese Hypoxie konnten in Versuchen die HIF1- α -Faktoren stabilisiert werden.

in vitro. Da eine künstlich erzeugte Hypoxie sich in der Realität als unpraktikabel herausgestellt hat, verglichen Wahl et. al. im Jahr 2016 [10] die Wirkung mit der von deferoxamine mesylate (DFO). DFO kann den sonst hypoxieinduzierten Transkriptionsfaktor HIF1- α auch unter Normalbedingungen stabilisieren und wurde bereits in der Wundheilung erfolgreich eingesetzt. DFO-vorbehandelte mesenchymale Stammzellen aus dem Fettgewebe (AdMSC) fördern den Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) *in vitro* und zeigen eine erhöhte Neuvaskularisation in Wundheilungsmodellen. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine Dosierung von 120 μM eine ähnlich hohe Konzentration von HIF1- α im untersuchten Gewebe *in vitro* erzeugte, wie die Behandlung mit 1% Sauerstoff. Bei der *in vitro* Untersuchung der Auswirkungen auf den human VEGF zeigten sich ähnliche Ergebnisse. In diesem Fall trat bei einer Konzentration von 120 μM DFO ein wesentlicher Unterschied des Wachstumsfaktors erst nach sieben Tagen auf, während sich bei geringeren Konzentrationen keine nennenswerten Verbesserungen zur Hypoxiebehandlung (1% Sauerstoff) zeigten.

in vivo. In *in vivo*-Versuchen wurde, wie in [10] gezeigt, Mäusen künstliches Hautgewebe auf eine Wunde appliziert. Vergleichbar zu den *in vitro*-Versuchen, zeigte sich ein höherer VEGF-Wert beiden Wunden die mit vorbehandelten (120 μM DFO) behandelt wurden im Vergleich zu den Vergleichsgruppen mit 1% Sauerstoff, 21% Sauerstoff oder leerem Scaffold. Im Kontrast dazu stehen die Werte der SDF-1 α -Analyse. Dieser Wundheilungsfaktor ist zur Aktivierung der MSCs und deren Wachstumsanregung nötig und zeigte keine wesentlichen Unterschiede. Auffällig waren zudem die

Entzündungswerte der induzierten Wunden bei Behandlung mit DFO-behandeltem Gewebe. Es zeigte sich eine geringere Anzahl an Entzündungszellen und Granulozyten und eine verbesserte homogene Vaskularität im Wundgewebe. Als optimale Zelldichte der ADMSCs zur Aussaat wurde eine 6.4×10^5 Zellen je cm^2 für ein schnelles und stabiles Zellwachstum bestimmt. Die beschriebenen Methoden sind vielversprechend, müssen jedoch noch die klinische Testphase durchlaufen. Außerdem wird für dieses Verfahren ein Hypoxie-Inkubator benötigt, welcher in vielen Krankenhäusern nicht vorhanden ist.

Der Ansatz der zuvor beschriebenen Studie von Wahl et. al. [10] wurde nun von Prof. Dr. Schilling im Projekt EmaCure [11] in Zusammenarbeit mit einer interdisziplinären Forschungsgruppe weiterverfolgt und für klinische Anwendungen vereinfacht. Der entscheidende Unterschied ist dabei, dass anstelle von Stammzellen Blutzellen verwendet werden. Die Idee ist weiterhin, den Heilungsprozess von chronischen und schwer heilenden Wunden (z. B. Ulcera bei Diabetes und Verbrennungen) zu beschleunigen. Dabei wird patienteneigenes Blut entnommen, Proteine isoliert und *in vitro* unter Hypoxie gesetzt. Dies stimuliert Angiogenese-Faktoren und somit das erhöhte Wachstum von Blutgefäßen. Die kultivierte Mixtur kann dann *in vivo* auf die Wunde des Patienten aufgetragen werden. Durch "EmaCure" werden somit mehr Gefäße in durchblutungsgestörtem Gewebe (Ischämie) gebildet. Dies wurde bereits bei fünf Patienten erfolgreich getestet. Um diese Verfahren im Krankenhaus direkt umzusetzen wurde zuerst ein Bioreaktor für die EXtraCorporale Simulation (EXCOW) entwickelt. Aktuell wird das Konzept auf ein Spritzensystem für eine einfache Anwendung in der Praxis optimiert.

3. Der dritte regenerative Ansatz zur Vaskularisierung ist, ganzes Gewebe wachsen zu lassen. Dieser Ansatz ist allerdings mit großen Hürden und Schwierigkeiten bei einer späteren Realisierung verbunden, sodass aktuell kein großes Forschungsinteresse besteht.

a. Zunächst ist dabei der komplexe gesetzliche Regulierungsrahmen mit den hieraus erwachsenen Folgen hervorzuheben: Bis zum Jahr 2007 fielen derartige Techniken unter den Regelungsrahmen des Medizinproduktegesetzes (MPG); seit 2007 unterliegen sie zum stärkeren Schutz des Patienten allerdings den strengeren gesetzlichen Bestimmungen für Arzneimittel für neuartige Therapien (Advanced Therapy Medicinal Products, ATMP). Damit einher geht eine extreme Kostensteigerung: Während die Investitions-, Markteinführungs- und Lizenzkosten für ein Medizinprodukt bei ca. 1 Mio. Euro liegen, betragen diese bei einem Arzneimittel rund 1 Mrd. Euro; eine für die vorwiegend mittelständischen Medizinproduktehersteller nicht, für Pharmakonzerne aber eher zu tragende Investition.

b. Ein weiteres Risiko besteht darin, dass etwaig vorbestehende Patente in diesem Bereich überwiegend nur sehr aufwändig und kostenintensiv zu ermitteln sind

und daneben der Schutzzumfang möglicher eigener Patente, die ebenfalls nur mit sehr hohem Aufwand überhaupt zur Anmeldung gebracht werden können, sehr eng auf den konkreten Schutzzumfang des Patentes und auf eine maximale Patentlaufzeit von 20 Jahren beschränkt sind.

c. Darüber hinaus ist die Gemenge- und Interessenslage (Multistakeholder-System) der Beteiligten undurchsichtig: Während die finanziellen Rentabilitätsmöglichkeiten bei Wundzentren in Deutschland überwiegend vom Umfang an eingesetztem Verbandsmaterial abhängig ist, kann über Direktverträge zwischen Herstellern und Krankenkassen eine Nische zur Etablierung dieses dritten Ansatzes entstehen.

AUSBLICK

Grundsätzlich sind die dargestellten regenerativen Vaskularisierungsstrategien erfolgsversprechend. Während sich die reparativen Ansätze bereits im klinischen Einsatz befinden, besteht allerdings bei den regenerativen Lösungen noch ein hoher Forschungsbedarf. Aufgrund der hohen Investitions-, Markteinführungs- und Lizenz- sowie Patentsicherungs- und -verfahrenskosten sowie den strengen gesetzlichen Anforderungen ist bei keinem der beschriebenen regenerativen Verfahren mit einer schnellen Markteinführung zu rechnen. In einer komplexen Gemenge- und Interessenslage können allenfalls Nischen zur Etablierung regenerativen Lösungen besetzt werden. Dennoch bleibt zu hoffen, dass innovative Vaskularisierungsstrategien wie EmaCure ihren Einzug sowie Ihre Berechtigung in den klinischen Behandlungsalltag erhalten.

LITERATUR

- [1] Faller, A.; Schünke, M.: Der Körper des Menschen. Bd. 1999/13. Thieme Stuttgart New York, 1984
- [2] netdoktor: Zyanose. Version: Dezember 2016, Abruf: 01.12.2016
- [3] Liu, J.; Zheng, H. ; Poh, P.S. ; Machens, H.-G.; Schilling, A.F.: Hydrogels for engineering of perfusable vascular networks. In: International journal of molecular sciences 16 (2015), Nr. 7, S. 15997–16016
- [4] Perkutane transluminale Koronarangioplastie. Version: Dezember 2016, Abruf: 01.12.2016
- [5] PTCA2. Version: Dezember 2016, Abruf: 01.12.2016
- [6] [https://de.wikipedia.org/wiki/Bypass_\(Medizin\)](https://de.wikipedia.org/wiki/Bypass_(Medizin)) Version: Dezember 2016, Abruf: 01.12.2016
- [7] <http://flexikon.doccheck.com/de/Bypass>. Version: Dezember 2016, Abruf: 01.12.2016
- [8] www.netdoktor.de/therapien/bypass/. Version: Dezember 2016, Abruf: 01.12.2016
- [9] Groeber, F.; Engelhardt, L.; Lange, J.; Kurdyn, S.; Schmid, F.F. ; Rücker, C.; Mielke, S.; Walles, H.; Hansmann, J.: A first vascularized skin equivalent for as an alternative to animal experimentation. In: ALTEX (2016)
- [10] Wahl, E.A.; Schenck, T.L.; Machens, H.-G.; Balmayor, E.R.: VEGF released by deferoxamine preconditioned

mesenchymal stem cells seeded on collagen-GAG substrates enhances neovascularization. In: Scientific Reports 6 (2016)

[11] <http://www.emacure.org/wound-therapy/>. Version: Dezember 2016, Abruf: 01.12.2016

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr.-Ing. Ralf Pörtner (TUHH) danken wir für die Durchsicht des Manuskriptes und die wertvollen Kommentare.