

1 Einleitung

1.1 Organtransplantation

Der Verlust von Gewebe oder der Ausfall eines Organs sind schwerwiegende Probleme in der modernen Medizin und verursachen jährlich immense Kosten für das Gesundheitswesen. Im Laufe der Medizingeschichte wurden verschiedene chirurgische Herangehensweisen entwickelt, um diese Probleme zu lösen. Zu den wichtigsten zählt die Organtransplantation. Seit der ersten erfolgreichen Transplantation einer Niere am 23.12.1954 von Murray, Merrill und Harrison gefolgt von der ersten Lebertransplantation von Starzl et al. und der ersten Herztransplantation von Barnard et al. in den 60er Jahren wurde die Organtransplantation zu einem etablierten Therapieverfahren in der heutigen Medizin weiterentwickelt¹⁻³. Mit der Verbesserung der Immunsuppression zur Vermeidung einer Transplantatabstoßung werden heute zahlreiche Organe, wie Niere, Leber, Herz, Lunge, Pankreas und Dünndarm, aber auch Gewebe, wie Kornea, Herzklappen und Knochengewebe erfolgreich orthotop transplantiert⁴.

1.1.1 Lungentransplantation

Bei der Mehrzahl der chronischen Lungenerkrankungen handelt es sich um progressive Erkrankungen. Dabei kommt es meist zur irreversiblen Schädigung von Lungengewebe und im Verlauf droht ein Versagen der Lungenfunktion. In vielen Fällen stellt die Lungentransplantation (im Folgenden LTx) die derzeit einzige Therapieoption für ein terminales Lungenversagen dar. Mit weit über 30 % aller Lungentransplantationen ist die fortgeschrittene chronisch obstruktive Lungenerkrankung die mit Abstand häufigste

Indikation für die Transplantation. Andere häufige Indikationen sind die idiopathische Lungenfibrose, die zystische Fibrose, der hereditäre alpha1-Antitrypsin Mangel, die primäre pulmonale Hypertonie und das Eisenmengersyndrom bei Shuntvitien. Obwohl ein Karzinom traditionell eine Kontraindikation für die LTx darstellte, wurden zuletzt auch vereinzelte Fälle von erfolgreicher LTx bei umschriebenem bronchoalveolärem Karzinom veröffentlicht ⁵. Bei der LTx werden je nach Indikation beide Lungenflügel (bilaterale LTx), ein Lungenflügel (unilaterale LTx) oder auch nur ein Lungenlappen transplantiert. Letzteres Verfahren wird weltweit nur in einigen spezialisierten Zentren durchgeführt und kommt vor allem bei der zystischen Fibrose zur Anwendung. Hierzu wurden in den letzten 15 Jahren auch erste Erfahrungen mit der Lebendspende gesammelt ⁶. Bei fortgeschrittener Schädigung des Lungenkreislaufs mit irreversibler Beeinträchtigung der Herzfunktion (Cor pulmonale) ist häufig auch eine Herz-Lungentransplantation (im Folgenden HLTx) *en bloc* nötig ^{7,8}.

Die erste LTx am Menschen wurde 1963 von Dr. James Hardy an der Universität von Mississippi durchgeführt. Der Patient hatte einen isolierten Lungentumor und überlebte die Operation 18 Tage ⁹. Auch in den darauf folgenden zwanzig Jahren wurden weltweit Transplantationen der Lunge nur vereinzelt als letzte „Rettungsversuche“ mit eher schlechten Resultaten durchgeführt. Durch die Einführung von Cyclosporin in den frühen 80er Jahren erfolgte 1981 in Stanford die erste erfolgreiche HLTx und ebnete den Weg für die LTx ¹⁰. Zwei Jahre darauf gelang Dr. Joel Cooper am Toronto General Hospital die erste LTx mit einem deutlich längeren postoperativen Überleben. Sein Patient mit einer idiopathischen Lungenfibrose überlebte die Transplantation der rechten Lunge insgesamt 6 ½ Jahre ¹¹.

Seither wurde die Lebenserwartung nach LTx durch verbesserte chirurgische Technik und Weiterentwicklung der immunsuppressiven Therapie stetig verbessert. Die 1-

Jahres-Überlebensrate liegt derzeit bei 77 % (Stand 2005). In Deutschland hat die Zahl der jährlich durchgeführten LTx seit den späten 80er Jahren nahezu kontinuierlich auf aktuell 262 (Stand 2005) zugenommen. Insgesamt wurden in Deutschland bislang mehr als 2100 LTx vorgenommen^{12, 13}. Während auf dem Gebiet der Transplantationsmedizin in den letzten Jahrzehnten große Fortschritte erreicht werden konnten, ist die Verfügbarkeit an geeigneten Spenderorganen nach wie vor stark eingeschränkt: Wie bei der Transplantation anderer Organe ist die Anzahl der verfügbaren Spenderorgane für die LTx weit geringer als die Anzahl der Patienten mit einer Indikation zur LTx. Die Warteliste für eine LTx ist zwischen 1993 und 2005 in Deutschland nahezu stetig angewachsen. Sie umfasst aktuell 471 Patienten (Stand April 2007), die für eine LTx, und zusätzlich 48 Patienten, die für eine HLTx vorgesehen sind¹⁴. Dies bedeutet einen Zuwachs auf das Zweieinhalbfache innerhalb der letzten 10 Jahre. Auch die Zahl der durchgeführten Lungentransplantationen hat sich in Deutschland in diesem Zeitraum zwar mehr als verdoppelt, reicht aber nach wie vor nicht an die Neuregistrierungen in die Warteliste pro Jahr heran. So wurden im Einzugsbereich der *Eurotransplant International Foundation* im Jahr 2005 471 Transplantationen (LTx und HLTx) durchgeführt, während in der selben Zeit 683 Neuregistrierungen getätigt wurden¹⁵. Auch in den USA zeichnen die Statistiken ein ähnliches Bild: Seit 1993 ist die Warteliste für eine LTx auf das Dreifache angewachsen und umfasst aktuell 2816 Patienten, zuzüglich 123 Patienten für eine HLTx (Stand April 2007). Seit 2005 reicht die Zahl der durchgeführten LTx (2006: 1405) zwar an die Zahl der Neuregistrierungen (2006: 1757) heran, in den zurückliegenden Jahren überstieg die Zahl der Neuregistrierungen die durchgeführten LTx allerdings um nahezu das Doppelte. So ist derzeit auch in den USA nicht von einer Entspannung der Situation auszugehen¹⁶. Das Problem ständig

wachsender Wartelisten und langer Wartezeiten ist globale Realität und Ausdruck dafür, dass der Bedarf an Spenderorganen das Angebot bei weitem übersteigt.

Neben diesem Mangel an verfügbaren Organen, der für die Patienten eine erhebliche psychische Belastung und für die behandelnden Ärzte eine große Einschränkung der therapeutischen Möglichkeiten bedeutet, birgt die insbesondere nach LTx nötige lebenslange Immunsuppression, die Gefahr fataler Komplikationen. So ist die Inzidenz einer postoperativen Lungenentzündung nach LTx deutlich höher als nach anderen Transplantationen, und Todesfälle nach LTx sind maßgeblich auf Infektionen zurückzuführen. Die Collaborative Transplant Study (CTS) verdeutlichte zudem das Risiko maligner Tumoren nach LTx: Gegenüber der Normalbevölkerung steigt das Risiko von Lymphomen nach LTx 58fach und nach HLTx sogar 239fach¹⁷.

1.2 Tissue Engineering

Das Konzept des *tissue engineering* (im Folgenden TE) wurde Mitte der 80er Jahre entwickelt, um bei dem wachsenden Mangel an Spenderorganen für die Transplantation eine neue therapeutische Möglichkeit zu schaffen. Es handelt sich um einen interdisziplinären Ansatz, durch Imitation der Natur einen lebenden Gewebersatz aus autologen Zellen und biologischen oder synthetischen Polymeren herzustellen, der in den Organismus des Patienten integriert wird und die Funktion des ausgefallenen Gewebes ersetzt^{18, 19}.

Beim ersten Schritt des TE werden autologe Zellen gewonnen. Dabei reichen oft kleinste Gewebsbiopsien aus, selbst solche, aus denen nur wenige Zellen isoliert werden können. Diese Zellen werden *in vitro* kultiviert und auf ein geeignetes Polymergerüst besiedelt. Das Polymergerüst erfüllt dabei mehrere Aufgaben. Es dient

zum einen als Vehikel für die Transplantation einer großen Zahl von Zellen in den Empfängerorganismus. Zudem dient es als dreidimensionale biomechanische Matrix für die Zellen bis diese ihre eigene extrazelluläre Matrix (im Folgenden EZM) synthetisiert haben und kann mittels seiner Eigenschaften die Gewebsentwicklung steuern. Die Konditionierung des Polymerkonstruktes erfolgt vor der Reimplantation ebenfalls *in vitro* und beeinflusst die Ausrichtung der Zellen auf dem Polymer. Dabei wird die Entwicklung der physiologischen Zellfunktionen im Gewebsverband unterstützt.

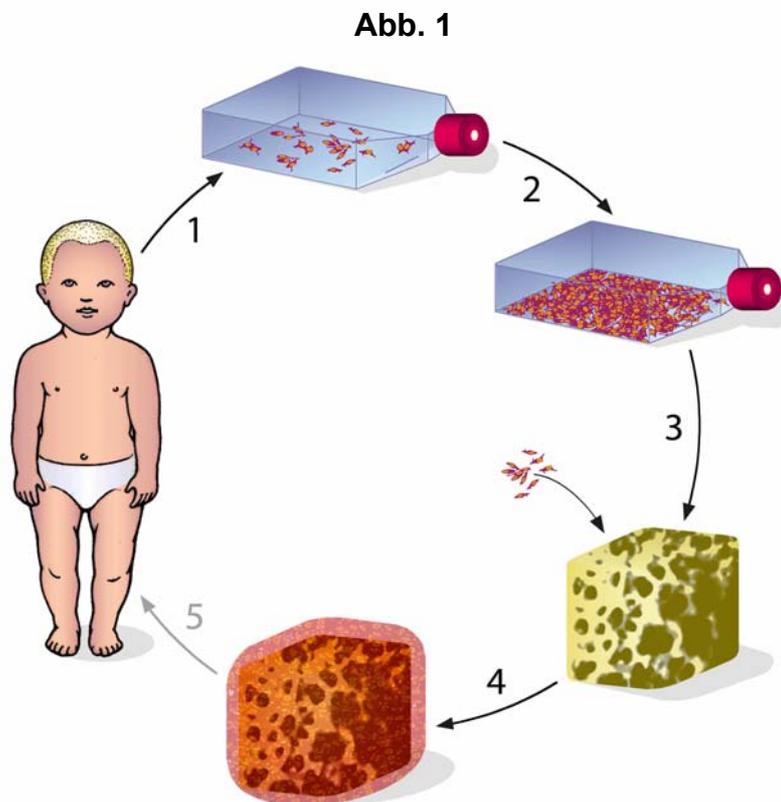


Abbildung 1 – Tissue Engineering

Prinzip des TE mit Isolierung autologer Zellen (1), Kultivierung der Zellen (2), Besiedelung eines Polymers (3), Konditionierung des Polymerkonstruktes *in vitro* (4) und Implantation (5).

Modifiziert nach Langer R. und Vacanti J. P.; Science 260 (1993); 920 – 926 ¹⁸

Im Gegensatz zur herkömmlichen Transplantation handelt es sich bei den zu implantierenden TE-Konstrukten um Systeme aus autologen Zellen und biokompatiblen

Polymeren, die vom Immunsystem des Empfängers nicht als Fremdgewebe abgestoßen werden, sondern in den Organismus integriert werden. Dort unterliegen sie dann der physiologischen Steuerung und wachsen mit dem Organismus des Empfängers. Eine immunsuppressive Therapie oder wiederholte Korrekturoperationen bei pädiatrischen Patienten werden somit überflüssig. Seit seiner Einführung hat sich das noch junge Forschungsfeld des TE weltweit sehr erfolgreich entwickelt und eine Vielzahl internationaler Publikationen zeugt vom stetigen Fortschritt auf diesem Gebiet^{20, 21}. Bereits 1981 veröffentlichten Bell et al. die *in vitro* Herstellung von lebenden Hautimplantaten²². Eine wichtige Neuerung im TE war 1988 die Verwendung eines dreidimensionalen Polymers für die Besiedelung mit gewebespezifischen Zellen vor der Implantation. Das Polymer gibt dem entstehenden Gewebe seine Form und unterstützt durch seine Eigenschaften die Entwicklung der Einzelzellen zum Gewebsverband²³. Nahezu jedes humane Gewebe liegt heute im Interesse der Wissenschaftler, die sich mit TE befassen^{24, 25}. Vor allem beim TE von Stütz- und Strukturgeweben wurden große Erfolge erzielt^{26 - 33}, aber auch bei Nervengewebe^{34, 35}, Lebergewebe³⁶, gastrointestinalem^{37 - 39} und urogenitalem Gewebe^{40 - 42} sind bedeutende Fortschritte zu verzeichnen. Beim TE von kardiovaskulären Geweben konnten in den letzten Jahren ebenfalls wichtige Erkenntnisse gewonnen werden. So wurden funktionale Herzklappen, Gefäßprothesen und Patches für die kardiovaskuläre Chirurgie hergestellt und in Tierversuchen auf Haltbarkeit und ihre Integration in den Empfängerorganismus untersucht^{43 - 49}. Neue Entwicklungen auf dem Gebiet der Zellbiologie und der Polymerforschung haben dazu beigetragen, dass mittlerweile erste Produkte für die klinische Anwendung des TE verfügbar sind. Für die Therapie von Verbrennungspatienten mit ausgedehnten Hautdefekten sind durch TE hergestellte Medizinprodukte erhältlich⁵⁰. Die Arbeitsgruppe von Toshiharu Shin'oka berichtet von Ihren Erfahrungen

bei der klinischen Anwendung von TE-Implantaten in der Herz- und Gefäßchirurgie⁵¹ -⁵³. In einer 2005 erschienenen Publikation wurden die Daten von 42 Patienten vorgestellt, die seit 2001 unter Verwendung von TE-Conduits und -Patches an angeborenen Herzfehlern operiert wurden. Dabei wurden autologe Knochenmarkszellen auf ein Co-Polymer aus *polyglycolic acid* (im Folgenden PGA) und *poly-L-lactide acid* (PLLA) besiedelt und nach 2 – 4 Stunden implantiert. Bei Nachuntersuchungen nach 1,3 – 31,6 Monaten zeigten sich keine Anzeichen auf Thrombosierung, Stenose oder Aneurysma im Bereich der Implantate⁵⁴.

1.2.1 Organzüchtung

Die Lunge des Menschen ist ein großes parenchymatöses Organ. Es besteht aus einer linken Lunge und einer rechten Lunge, die durch Fissuren in 2 (linke Lunge) bzw. 3 (rechte Lunge) Lungenlappen unterteilt werden. Die Lungen haben beim Erwachsenen je nach Geschlecht, Alter und Körperbau ein Volumen von 2 – 3 L (Expiration) bis 5 – 8 L (Inspiration). Innerhalb der Lungen stehen ein luftleitendes System mit einem blutleitenden Gefäßsystem in enger funktioneller Verbindung. Über einen fein verzweigten Bronchialbaum (*Trachea*, *Bronchi principales*, - *lobaris*, - *segmentalis* und *Bronchioli*, *Bronchioli terminalis* und - *respiratorii*, sowie *Ductus alveolares* und *Sacculi alveolares*) teilen sich die Luftwege über 18 – 25 Generationen in 300 – 400 Millionen kleine Lungenbläschen, die Alveolen. Die einzelnen Alveolen haben einen Durchmesser von 250 µm und sind von einem feinen Netzwerk an Kapillaren des kleinen Körperkreislaufs eingefasst. Über eine Fläche von insgesamt 70 – 140 m² kommt es zwischen den gasgefüllten Alveolen und den feinen Alveolarkapillaren zu einem Gasaustausch von Sauerstoff und Kohlendioxid⁵⁵.

Die Erfolge des TE von sehr dünnem Gewebe wie Haut oder von Gewebe mit geringen metabolischen Anforderungen oder ohne eine eigene Gefäßversorgung, wie beispielsweise Knorpelgewebe, sind auf das TE von großen dreidimensionalen Geweben und Organen nicht einfach übertragbar. Dies beruht unter anderem darauf, dass in dünnen Geweben, die aus wenigen Zellschichten bestehen, eine ausreichende Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff über Diffusion erfolgen kann⁵⁶. Dies ist in vitalem Gewebe allerdings nur innerhalb eines Radius von etwa 150 – 200 µm möglich⁵⁷. Darüber hinaus kann die Versorgung in Geweben mit höheren metabolischen Anforderungen durch Diffusion alleine nicht mehr erreicht werden, sondern erfordert ein Gefäßsystem zum Transport von Nährstoffen und Sauerstoff⁵⁸. Zum anderen ist dreidimensionales Gewebe nicht einfach ein Konglomerat aus einzelnen Zellen, in dem sich die Zellen ausschließlich untereinander berühren. Es ist vielmehr ein komplexer Verbund aus Zellen und EZM, bestehend aus Matrixproteinen, die dem Gewebe seine geometrische Struktur und mechanischen Eigenschaften verleihen und für die Zell-Zell-Interaktion von großer Bedeutung sind. Durch die Verbindung von Zellen zur EZM und den benachbarten Zellen über Rezeptoren und anderen Membranproteinen werden die Eigenschaften und Funktionen des Gewebes festgelegt^{59, 60}. Das Fehlen einer physiologischen Matrix und einer intrinsischen Gefäßversorgung stellen bedeutende Einschränkungen für das TE von dreidimensionalen Geweben oder komplexen Organen dar. Die Entwicklung eines Polymers nach physiologischem Vorbild mit integriertem Gefäßsystem, über das der Austausch von Sauerstoff, Nährstoffen und der Abtransport von Stoffwechselmetaboliten erreicht werden kann, gilt daher bis heute als die wichtigste Herausforderung für das TE^{61, 62}.

Bei der physiologischen Entwicklung von Blutgefäßen in Säugetieren sind zwei Mechanismen bekannt. Die Angiogenese beschreibt das Aussprossen von Kapillaren

aus bereits bestehenden Blutgefäßen und wird durch Signalstoffe aus dem umgebenden Gewebe ausgelöst. Dagegen handelt es sich bei der Vaskulogenese um eine *de novo* Synthese von Blutgefäßen ausgehend von Endothelzellen und deren Vorläuferzellen. Die Vaskulogenese vollzieht sich meist während der Embryonalzeit wohingegen die Modulation des Gefäßsystems während der Wundheilung beim Erwachsenen hauptsächlich durch Angiogenese geschieht^{63, 64}. In Anlehnung an diese biologischen Vorgänge werden zur Entwicklung einer ausreichenden Gefäßversorgung in TE-Geweben heute verschiedene Ansätze verfolgt: Die Verwendung angiogenetischer Faktoren zur Stimulation der intrinsischen Angiogenese im Empfängerorganismus, die Besiedelung mit Endothelzellen und ihren Vorläuferzellen zur Induktion einer extrinsischen Vaskulogenese innerhalb des Polymers und die Integration eines vollständigen Gefäßsystems in das verwendete Polymerkonstrukt bereits vor der Besiedelung^{65, 66}.

1.2.1.1 Angiogenetische Wachstumsfaktoren

Nach der Implantation kommt es physiologischer Weise zum Einsprossen von Blutgefäßen aus dem Kreislaufsystem des Empfängerorganismus in das Implantat⁶⁷. Dieser Prozess vollzieht sich langsam über Tage und Wochen. Die Stimulation der endogenen Angiogenese nach erfolgter Implantation durch angiogenetische Wachstumsfaktoren ist somit ein Ansatz, an den große Erwartungen geknüpft werden. Eine Applikation von rekombinanten Wachstumsfaktoren bei Implantation als Bolus ist wegen der kurzen Halbwertszeit der Wachstumsfaktoren *in vivo* und der möglichen systemischen Wirkung allerdings nicht praktikabel. Mehrere Forschergruppen beschäftigen sich daher mit der Entwicklung neuer Polymere, aus denen örtlich und

zeitlich definiert Wachstumsfaktoren freigesetzt werden. Zwei wichtige und intensiv untersuchte angiogenetische Moleküle sind der Fibroblasten Wachstumsfaktor bFGF und der Gefäßendothel Wachstumsfaktor VEGF⁶⁸. Eiselt et al. beschreiben die Integration von VEGF in Alginat Mikrosphären zur Freisetzung des aktiven Faktors, der ansonsten schnell inaktiviert wird⁶⁹. In einem Tierexperiment erreichen Tabata et al. durch kontrollierte Freisetzung von VEGF aus subkutan implantierten Kollagengels in Mäusen eine vermehrte Angiogenese im Umfeld der Implantate⁷⁰. Perets et al. berichten über den Transfer von bFGF mittels Mikrosphären aus *polylactic-co-glycolic acid* (im Folgenden PLGA) und die induzierte Angiogenese in dreidimensionalen Alginat Polymeren nach Implantation in das Mesenterium von Ratten⁷¹. Die Arbeitsgruppe von David J. Mooney beschreibt die Herstellung von biokompatiblen PLGA in das Wachstumsfaktoren einzeln oder kombiniert integriert werden können und nach Implantation kontrolliert abgegeben werden können⁷²⁻⁷⁴. Eine weitere Methodik, angiogenetische Wachstumsfaktoren am Ort der Implantation zu konzentrieren, stellt die Verwendung genetisch modifizierter Zellen dar, die diese Faktoren sezernieren⁶⁶.

Bei dem Konzept der extrinsischen Angiogenese wird die Problematik einer unkontrollierten Neovaskularisation durch ein Missverhältnis angiogenetischer und angiainhibitorischer Signalstoffe im Empfängerorganismus diskutiert. Durch die Arbeit von Folkman et al. wurde das Konzept der Tumorentstehung in Zusammenhang mit einer Dysregulation der Angiogenese entwickelt^{75, 76}. Auch bei der Pathogenese anderer Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis und der diabetischen Retinopathie spielt eine gestörte Angiogenese eine wichtige Rolle^{77, 78}. Mazue et al. berichten vom Auftreten morphologischer und funktioneller Veränderungen im Nierengewebe von Ratten und Affen nach wenigen Tagen intravenöser Anwendung von bFGF⁷⁹.

Fontaine et al. beschreiben 1995 eine alternative Herangehensweise, die physiologische Angiogenese des Empfängerorganismus für die Herstellung eines Gefäßsystems innerhalb von bioengineertem Gewebe zu nutzen. Durch Implantation eines unbesiedelten Polymergerüsts in das Mesenterium von athymischen Ratten kann durch Einwachsen feiner Kapillaren aus dem umgebenden Gewebe eine Prevascularisation des Polymers erreicht werden. Die Besiedelung erfolgt im Anschluss durch Injektion einer Zellsuspension humaner Hepatozyten in das Polymer und nach 9 Tagen kann die Entwicklung von organisiertem Leberparenchym beobachtet werden⁸⁰.

1.2.1.2 Endothelzellen

Bei der Anwendung angiogenetischer Wachstumsfaktoren ist die Bildung einer ausreichenden Gefäßversorgung ausschließlich von der Fähigkeit des Empfängerorganismus zur Gefäßmodulation abhängig. Diese kann aber durch pathologisch verändertes Gewebe im Gebiet der Implantation oder durch eine medikamentöse Therapie eingeschränkt sein. Ein alternativer Ansatz nutzt daher die Besiedelung des Implantats mit Endothelzellen zur Induktion der Vaskulogenese innerhalb des Polymers. Endothelzellen bilden innerhalb von Gelen aus Bestandteilen der EZM kapillarähnliche Gefäße *in vitro* und werden als dreidimensionale Modelle für Angiogenese verwendet^{81 - 83}. In einer Reihe von Tierversuchen konnte die Bildung tubulärer Strukturen und die Differenzierung zu komplexen Gefäßsystemen innerhalb des Empfängerorganismus 10 – 14 Tagen nach Implantation in immundefiziente Mäuse gezeigt werden^{84 - 86}. Die Gefäße in den Polymerkonstrukten anastomosieren mit dem Kreislaufsystem des Empfängerorganismus und werden mit Blut perfundiert⁸⁷. Neben Endothelzellen finden bei der Förderung einer Neovaskularisation immer häufiger auch

endotheliale Vorläuferzellen Verwendung⁸⁸. Allerdings beinhaltet diese Methode wiederum die Gefahr einer potentiell onkogenen Wirkung der transplantierten endothelialen Vorläuferzellen auf den Empfängerorganismus.

Als Fortführung dieser Ansätze berichten Peters et al. von der Kombination einer lokalen Vaskulogenese durch Besiedelung mit Endothelzellen und der Stimulation der Neovaskularisation durch Freisetzung von VEGF aus dem PLGA/Alginat Co-Polymer. Hierdurch konnte ein signifikanter Anstieg der Gefäßdichte innerhalb des Polymers erreicht werden⁸⁹. Griffith et al. beschreiben die Bildung komplexer Gefäßsysteme in einem Fibringel *in vitro* ausgehend von mit Endothelzellen besiedelten Mikrosphären durch Stimulation mit VEGF. Nach 14 Tagen in Kultur bilden die Gefäße ausgedehnte Anastomosen untereinander⁹⁰.

Die Bildung neuer Gefäße kann außerdem durch parakrine Interaktion mit anderen Zelltypen gefördert werden. Mittels Mischkultur von Endothelzellen und Fibroblasten in einem TE-Hauttransplantat lässt sich ein tubuläres Gefäßsystem herstellen, das Verbindungen zum Gefäßsystem des Transplantatempfängers eingeht⁹¹. Die Erkenntnisse von Koike et al. bestätigen diese Beobachtungen. Der Arbeitsgruppe gelang die Bildung eines stabilen Gefäßsystems in einem Mausmodell durch kombinierte Besiedelung eines Fibronectin – Kollagen 1 Gels mit Endothelzellen und mesenchymalen Vorläuferzellen. Ein Jahr nach Implantation der Polymerkonstrukte sind die Gefäße durchgängig und weisen einen Aufbau ähnlich physiologischer Kapillaren auf⁹².

1.2.1.3 Mikrosystemtechnik

Trotz dieser viel versprechenden Ansätze ist die Bildung einer suffizienten Gefäßversorgung in großen TE-Konstrukten ein verhältnismäßig langsamer Prozess. Die parenchymalen Zellen im Inneren des Konstruktes erleiden während dieser Zeit innerhalb von Stunden nach der Implantation einen kritischen Mangel an Nährstoffen und Sauerstoff^{93, 94}. Ein weiterer Ansatz besteht deshalb darin, das verwendete Polymer bereits vor der Besiedelung *in vitro* mit einem vollständigen Gefäßsystem zu versehen und dieses bei der Implantation an das körpereigene Gefäßsystem des Empfängers anzuschließen. Weinberg und Bell entwickelten bereits 1986 einen ersten Blutgefäßersatz, indem sie Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Fibroblasten in vorgeformte Kollagengels besiedelten⁹⁵. Bei der Entwicklung einer kompletten Gefäßversorgung für ein TE-Konstrukt wird eine besondere Bedeutung dem geometrischen Aufbau und den feinen Dimensionen des Gefäßsystems beigemessen. Das physiologische Kapillarnetz eines menschlichen Organs besteht aus einem dichten Netzwerk feiner Kapillaren mit einem Durchmesser von wenigen Mikrometern. Neben der Ausgestaltung der makroskopischen Struktur des Polymers⁹⁶ gewinnt so zunehmend auch die mikroskopische Detailstruktur des Konstruktes an Bedeutung. Bei der Herstellung eines Polymerkonstruktes für TE, bei dem die physiologische Gewebsarchitektur imitiert wird, kann die benötigte Detailauflösung mit den bisherigen Techniken der Polymerherstellung allerdings nicht erreicht werden. Die Feinstruktur der Polymere wird bei diesen Methoden nicht durch ein definiertes Design, sondern durch den Fertigungsprozess bestimmt und ist auf die Steuerung von Eigenschaften wie Porosität und die mittlere Porengröße beschränkt. Die Mikrosystemtechnik beschreibt eine Technologie, die ursprünglich für die Fertigung integraler Halbleitersysteme

entwickelt wurde. George M. Whitesides et al. wenden diese Technologie erstmals auf biologische Systeme an und führen den Begriff der Softlithographie ein. Softlithographie ist eine kollektive Bezeichnung einer Reihe von lithographischen Methoden für die präzise Herstellung feinsten dreidimensionaler Strukturen auf Siliziumbasis. Hierbei wird eine strukturierte Silikonoberfläche als Abgussvorlage oder Stempel verwendet, um eine gewünschte Struktur auf eine Polymeroberfläche zu übertragen^{97, 98}. Diese Technologie ermöglicht die Entwicklung von dreidimensionalen Strukturen mit der Abmessung von Organen, die gleichzeitig eine räumliche Detailauflösung in der Größenordnung einer einzelnen Zelle haben und stellt so ein neues Instrument für TE von komplexen Organsystemen dar^{99 - 101}. Dabei können Detailauflösungen von weniger als 0,1 µm über einen Bereich bis zu 10 cm erreicht werden. Dies kann unter anderem für die Herstellung von Polymersystemen genutzt werden, in der eine physiologische Gewebsarchitektur mit großer Detailgenauigkeit nachgebildet und ein Kapillarsystem nach physiologischem Vorbild integriert ist. Darüber hinaus kann durch die Kontrolle der molekularen Struktur des Polymers die Anordnung der einzelnen Zellen gesteuert und die Zellfunktion manipuliert werden^{102, 103}.

In einer Arbeit von Shin et al. wird die Herstellung eines zweidimensionalen Gefäßsystems nach physiologischem Vorbild in *polydimethylsiloxan* (im Folgenden PDMS) unter Verwendung softlithographischer Methoden beschrieben. Diese wurden mit humanen Endothelzellen besiedelt und konditioniert. Hierbei konnte innerhalb von zwei Wochen eine nahezu vollständige Auskleidung der Kapillaren mit funktionalen mikrovaskulären Endothelzellen erreicht werden¹⁰⁴. Kaihara et al. integrierten ein Gefäßsystem direkt in ein Gewebekonstrukt aus Hepatozyten, indem die Zellen auf einer Silikon-Schablone des Gefäßsystems kultiviert wurden. Durch Abheben des Zellrasens von der Schablone und anschließendes Falten entstand ein

dreidimensionales Gewebekonstrukt aus Hepatozyten mit einem Kanalsystem nach dem Abbild der Silikon-Schablone¹⁰⁵.

1.3 Fragestellung

Trotz des deutlichen Mangels an Spenderorganen und der Entwicklung des TE als mögliche Lösung dieses Problems gibt es bislang nur wenige Ansätze, das Konzept des TE auf das Organsystem der Lunge anzuwenden. In einigen wenigen Veröffentlichungen wird die Kultur von Alveolarepithelzellen auf synthetischen Polymeren beschrieben^{106 - 108}. Im Jahr 2005 wurde erstmals von der Herstellung Alveolar-ähnlicher Strukturen *in vitro* berichtet^{109 - 111}. Die Schwierigkeiten des pulmonalen TE bestehen unter anderem im komplexen Aufbau des Lungengewebes mit dem Zusammenspiel unterschiedlicher Zelltypen mit verschiedenen Zellfunktionen. Daneben ist das Fehlen eines Perfusionssystems innerhalb des konstruierten dreidimensionalen Gewebes eine bedeutende Limitation.

Die zu prüfende Hypothesen der vorliegenden Arbeit lauten daher: Die Besiedelung von biokompatiblen Polymerkonstrukten mit parenchymalen Alveolarepithelzellen ist möglich. Eine Kultivierung der parenchymalen Alveolarepithelzellen lässt sich durch Perfusion einer in das Polymer implementierten Gefäßversorgung erreichen. Durch Besiedelung des Gefäßsystems innerhalb der Polymerkonstrukte mit Endothelzellen kann eine physiologische Gefäßanatomie approximiert werden. Dies wären wichtige Schritte auf dem Weg zur *in vitro* Züchtung von funktionsfähigem, implantierbarem Lungengewebe.

Ein erster Teil der Arbeit befasst sich daher mit der Entwicklung eines biokompatiblen Polymerkonstruktes mit integriertem funktionsfähigem Gefäßsystem für pulmonales TE.

Dieser erste Abschnitt der Arbeit baut dabei auf den Ergebnissen der Arbeitsgruppe von Dr. Joseph P. Vacanti beim TE von hepatischen Geweben auf ¹¹². Ein vorgefertigtes Gefäßsystem innerhalb des dreidimensionalen Polymers soll die ausreichende Versorgung komplexer Gewebe oder Organe mit Nährstoffen bereits *in vitro* ermöglichen. Dies hätte den entscheidenden Vorteil, dass das Überleben des TE-Gewebes nach der Implantation nicht von einsprossenden Gefäßen aus dem Gefäßsystem des Empfängerorganismus abhinge, sondern umgehend durch Anschluss an das Kreislaufsystem des Empfängers erreicht werden könnte. Um eine Perfusion des TE-Konstruktes nach physiologischem Vorbild zu erreichen sind das Design und die mikroskopische Feinstruktur des Gefäßsystems nach physikalischen und biologischen Maßgaben eines natürlichen Kapillarsystems von großer Bedeutung. Dadurch könnte eine Gerinnung des Blutes oder Hämolyse innerhalb des Gefäßsystems, verursacht durch einen unphysiologischen Blutfluss nach Anschluss an das arterio-venöse Gefäßsystem des Empfängerorganismus, verhindert werden. Bei der Herstellung der Polymerkonstrukte kommt daher der Mikrosystemtechnik eine besondere Bedeutung bei.

In einem zweiten Teil der Arbeit soll die Kultur von parenchymalen Alveolarepithelzellen innerhalb der Polymerkonstrukte überprüft werden. Hierfür werden murine MLE-12 Zellen als Modell für Alveolarepithelzellen vom Typ II in die Polymerkonstrukte besiedelt. Die Versorgung der Zellen mit Nährstoffen und Sauerstoff und der Abtransport von Stoffwechselmetaboliten soll dabei ausschließlich durch Perfusion des Gefäßsystems innerhalb der Polymerkonstrukte erfolgen. Als negative Kontrollgruppe werden statische Polymerkonstrukte (ohne Perfusion des Gefäßsystems) mitgeführt. Nach Abschluss der Konditionierung werden die Konstrukte bezüglich der Proliferation und Vitalität der besiedelten Zellen untersucht. Zur weiteren Evaluierung werden

Funktionalitätstests der Zellen innerhalb der Polymerkonstrukte durchgeführt und elektronenmikroskopische Aufnahmen ausgewertet.

In den abschließenden Experimenten der Arbeit soll die Auskleidung des Gefäßsystems mit einem funktionalen Gefäßendothel erreicht werden. Hierfür werden Endothelzellen in die Kapillaren der Polymerkonstrukte besiedelt und mittels Perfusion von Kulturmedium konditioniert.

Die Wand einer Alveole in der Lunge eines Säugetiers wird von Alveolarepithelzellen, einem feinen Bindegewebsgerüst und den Alveolarkapillaren gebildet. Der Gasaustausch erfolgt über ihren dünnsten, effektiven Anteil, bestehend aus dem einschichtigen alveolären Epithel und dem ebenfalls einschichtigen Kapillarendothel der direkt angrenzenden Blutgefäße des Lungenkreislaufes. In einer Weiterführung der experimentellen Arbeit ist die Kombination der Kultivierung der parenchymalen Alveolarepithelzellen und der vaskulären Endothelzellen in einem gemeinsamen Polymerkonstrukt geplant. Dadurch soll die mikroanatomische Struktur der Wand einer Alveole *in vitro* approximiert werden. Diese Zusammenführung der zwei Teilaspekte ist nicht mehr Gegenstand der vorliegenden Arbeit und soll unabhängig von dieser Promotionsarbeit publiziert werden.

Den experimentellen Teil dieser wissenschaftlichen Arbeit habe ich im Rahmen eines Forschungsaustausches am *Laboratory of Tissue Engineering and Organ Fabrication* am *Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston MA, USA* unter der Leitung von Dr. Joseph P. Vacanti durchgeführt.