

A. Ruhparwar

Zukunftsperspektiven: Embryonale Stammzellen, Tissue Engineering und Nanotechnologie

Bislang haben Behandlungsperspektiven wie embryonale Stammzellen, Tissue Engineering und Nanotechnologie noch keinen Eingang in die klinische Versorgung der Patienten gefunden haben und sie werden es auch noch nicht so schnell tun. Nichtsdestotrotz sind es drei Themen, die man zumindest im Hinterkopf behalten sollte und die vielleicht noch während unserer Tätigkeit in dem einen oder anderen Fall eine Rolle spielen könnten.

Abbildung 1 zeigt die erste erfolgreiche Zelltransplantation in das Myokard, die von einer Gruppe um Loren J. Field (Soonpaa et al., Science 1994) durchgeführt wurde. Damals wurden noch fötale Kardiomyozyten verwendet, die einen bestimmten Farbstoff exprimierten. Seitdem hat sich im Bereich der Zelltransplantation und Zelltherapie einiges getan. Die idealen Zellen müssen folgende Voraussetzungen erfüllen (Abb. 2):

- Sie müssen in großer Zahl verfügbar sein.
- Sie müssen in der Lage sein, sofern es sich um Herzmuskelzellen handelt, mit dem umgebenden Myokard sog. gap junctions zu bilden, d.h. sie müssen sich nicht nur morphologisch, sondern auch funktionell integrieren.
- Für wissenschaftliche Zwecke müsste man Spender- und Empfängerzellen auseinanderhalten können.
- Die Zellen sollten natürlich im Idealfall autolog sein, um keine Immunantwort des Körpers hervorzurufen.

In der abgebildeten Arbeit von Frau Dimmler et al. aus Frankfurt (J. Clin. Invest., 2005) sind die zurzeit gängigen Stammzellgruppen zusammengestellt, die im Zusammenhang mit der Therapie verschiedener Erkrankungen diskutiert werden (Abb. 3). Der vorliegende Beitrag wird sich nur auf die embryonalen Stammzellen beziehen.

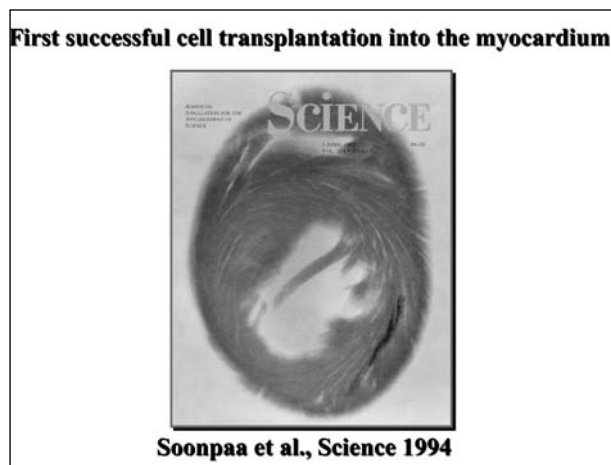


Abbildung 1

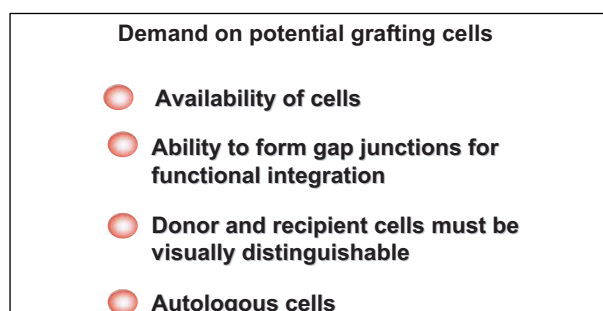


Abbildung 2

Klinik für Herzchirurgie, Universitätsklinikum Heidelberg

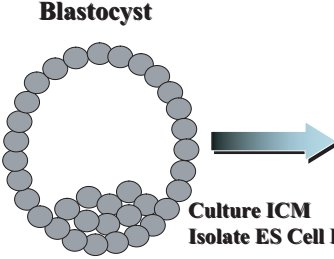
Ruhparwar A (2010) Zukunftsperspektiven: Embryonale Stammzellen, Tissue Engineering und Nanotechnologie. Tx Med 22: 75-82

Potential donor cells for cardiac engraftment

- Skeletal myoblasts**
 - (+) easy to isolate and genetically modify, autologous grafts, Platform to deliver cardioprotective proteins
 - (-) do not couple to cardiomyocytes, potential Arrhythmogenesis
- Fetal cardiomyocytes**
 - (+) engrafted cells couple (ultrastructural level)
 - (-) limited supply of donor cells
- ES-derived cardiomyocytes**
 - (+) ex-vivo preparation, available in unlimited supply
 - (-) teratogenic potential
- Bone marrow pluripotent stem cells**
 - (+) easy to isolate and genetically modify, autologous grafts, Platform to deliver cardioprotective proteins
 - (-) do not couple to cardiomyocytes, potential Arrhythmogenesis

Abbildung 3

EMBRYONIC STEM (ES) CELLS



Blastocyst

**Culture ICM
Isolate ES Cell Line**

Pluripotent ES Cell Lines:

- Contribute to germ line when injected into host blastocysts**
- Develop teratomas when transplanted in vivo**
- Differentiate into endo-, ecto-, and meso-dermal lineages when differentiated in vitro**

Abbildung 4

Mode of engraftment (hESC): random/chaotic...but they differentiate!

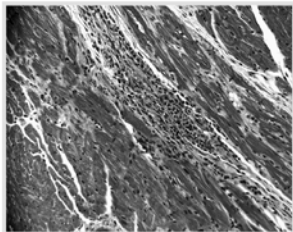
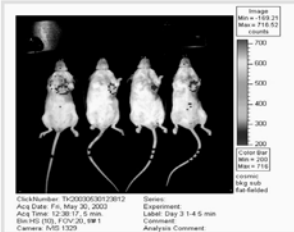

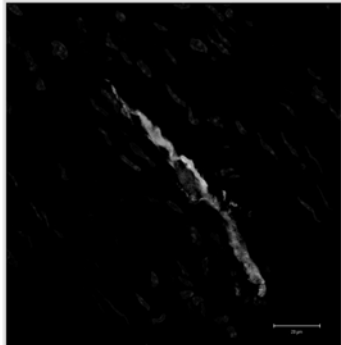





Abbildung 5

Diese embryonalen Stammzellen sind aus folgenden Gründen ethisch nicht ganz unumstritten: Erstens wird zur Gewinnung einer embryonalen Stammzelle ein Embryo zerstört, zweitens haben die embryonalen Stammzellen auch den Nachteil, dass sie nach Transplantation oder Implantation Tumoren ausbilden können, was deren klinischen Einsatz nach wie vor hemmt.

Wie wird eine embryonale Stammzelle gewonnen? Ein sehr frühes Embryonalstadium ist der sog. Blastozyst. Aus seiner inneren Schicht wird eine Zelle isoliert, die pluri-, aber nicht totipotent ist und die sich in verschiedene Gewebsarten differenzieren kann. Aus Abbildung 4 ist ersichtlich, dass der Embryo durch die Gewinnung der Zellen mit großer Wahrscheinlichkeit zerstört wird, was ja der Grund dafür war, warum bislang die Forschung an dieser möglichen Therapie so restriktiv gehandhabt wurde.

Die Arbeitsgruppe von Loren J. Field (Klug MG et al., J. Clin. Invest., 1996) konnte mit den embryonalen Stammzellen auch zeigen, dass Kardiomyozyten durch genetische Selektion gewonnen und auch intramyokardial transplantiert werden können.

Diese Kardiomyozyten bilden gap junctions. In einer Arbeit aus Stanford (siehe Abb. 5) waren die Kardiomyozyten aus embryonalen Stammzellen noch mit dem Gen Luziferase transfiziert. Dieses Gen ermöglicht eine Bio-Illuminanz, man kann somit, ohne das Tier zu öffnen, in der PET-Untersuchung erkennen, ob die Zellen, die ins Herz injiziert wurden, noch am Leben sind. Es gilt als gesichert, dass sich durch von embryonalen Stammzellen abgeleitete Herzmuskelzellen die Zahl der gesunden Zellen im Herzmuskel erhöhen lässt, um möglicherweise auf diese Weise die Herzinsuffizienz zu therapieren.

Wie wir wissen, sterben Zellen, die wir transplantieren, nach wenigen Wochen bzw. Monate ab. Ein ehemaliger Mitarbeiter in Hannover untersuchte daher, ob es nicht möglich wäre, die Lebenszeit dieser Zellen zu erhöhen. Er prägte den Begriff Liquid Myocardium, indem er von humanen embryonalen und murinen Stammzellen abgeleitete Kardiomyozyten mit Kollagen und Wachstumsfaktoren, die in diesem Matrigel vorhanden sind, mischte und dann nach Induktion eines Infarktes in einem Mausmodell ins Myokard injizierte (Abb. 6). Diese

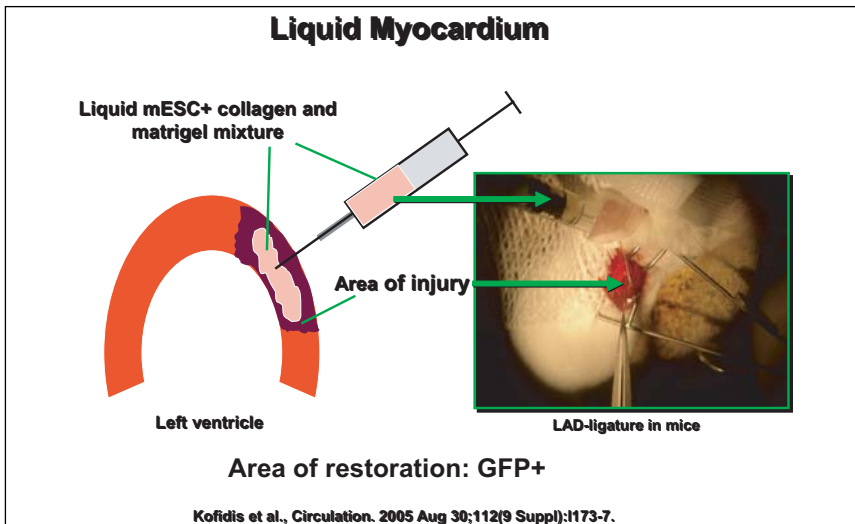


Abbildung 6

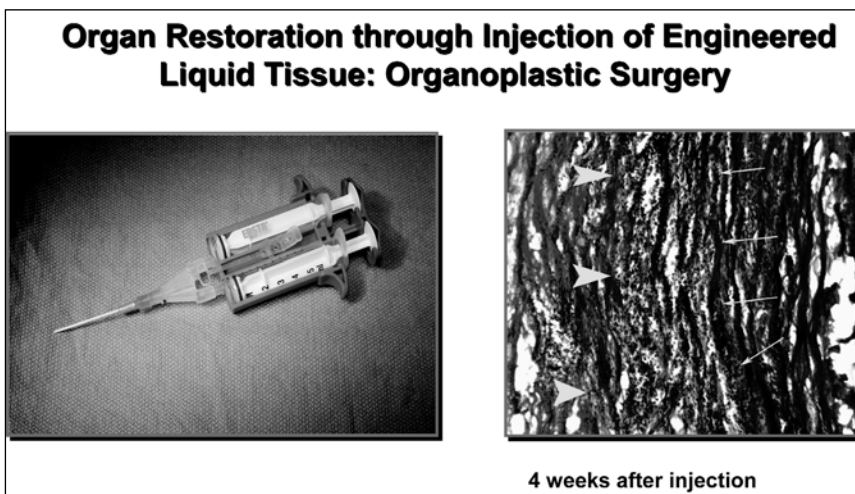


Abbildung 7

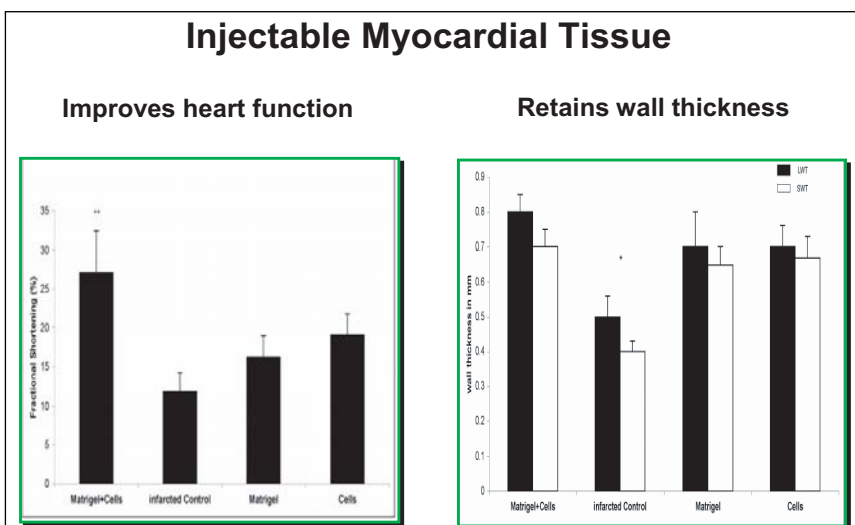


Abbildung 8

Studien wurden nicht in Deutschland durchgeführt.

Bei diesen Versuchen konnte er sehen, dass sich vier Wochen nach Transplantation eine eigenständige Schicht dieser Muskelzellen mit dem Gel im Myokard gebildet hatte (Abb. 7), und es zeigte sich, dass es in den Fällen, in denen die Zellen mit Matrigel, also mit Wachstumsfaktoren zusammen transplantiert wurden, zu einer deutlichen Verbesserung der Pumpfunktion kam im Vergleich zur Kontrollgruppe, bei der nur ein Myokardinfarkt durchgeführt worden war. Zusätzlich hatte der Ventrikel seine Geometrie, die Wandstärke, weitgehend beibehalten – ein kritischer Punkt im Rahmen des Remodeling-Vorgangs nach Herzinfarkt (Abb. 8). Wenn sich diese Zellen in klinischen Phase-I- oder -II-Studien befinden, d.h. wenn sie keine Tumoren mehr bilden und das Problem der Embryozerstörung gelöst werden konnte, eröffnen sie durchaus viel versprechende Perspektiven.

In den letzten Monaten wurde in der Presse auch von sog. Induced pluripotent stem cells (IPS) berichtet. Dabei handelt es sich um embryonale Stammzellen oder Zellen, die den embryonalen Zellen sehr ähnlich sind. Sie wurden aus normalen Hautzellen gewonnen, indem die Zellen mit Gentherapie oder auch mit Wachstumsfaktoren behandelt wurden, sie sich daraufhin zurückprogrammiert haben und dann wie embryonale Stammzellen behandelt werden konnten. Aus diesen Zellen konnte dann ebenfalls wieder die Gruppe aus Hannover funktionierende Herzmuskelzellen gewinnen, die tatsächlich auch schlagen und sogar einen Calciumstrom haben, so dass wir zumindest das Problem der Embryozerstörung gelöst haben (Abb. 9). Wenn sich dieser Trend fortsetzt und es sich tatsächlich um ähnliche Zellen handelt, die man unbegrenzt vermehren kann, dann handelt es sich hier um eine tatsächliche Alternative. Es bleibt als Hemmschuh aber immer noch die mögliche Produktion von Tumoren nach Transplantation.

Eine andere mögliche Therapieoption bei der Behandlung der Herzinsuffizienz ist das sog. Tissue Engineering. Dabei handelt es sich um ein Konzept, bei dem z. B. versucht wird, einen Herzmuskel außerhalb des Körpers zu bilden, um diesen Herzmuskel dem Patienten dann zurückzupflanzen. Das wäre zumindest die Idealvorstellung. Dass das nicht so einfach ist, ist klar,

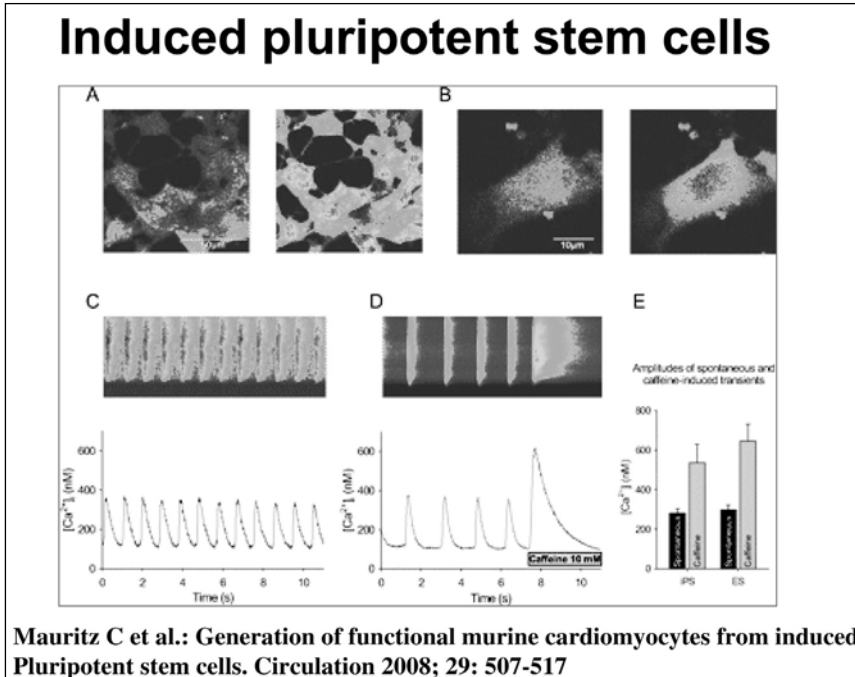


Abbildung 9

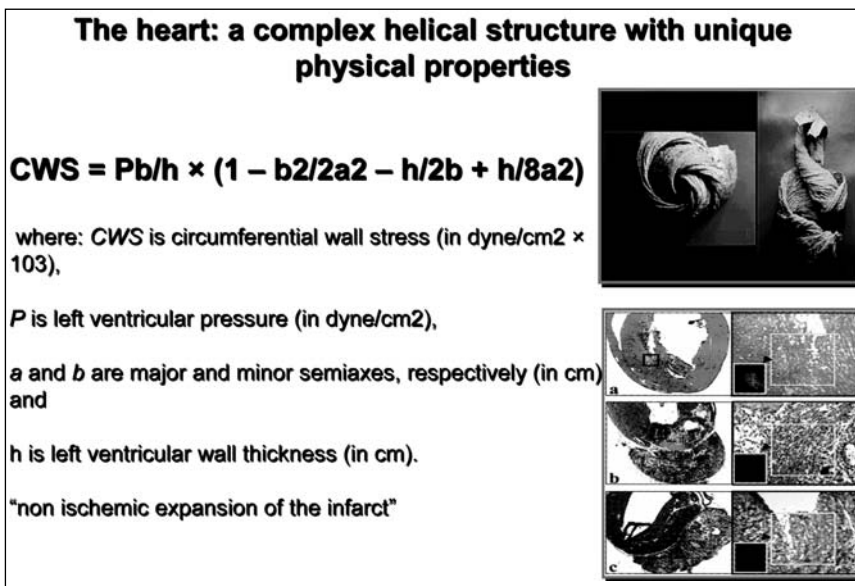


Abbildung 10

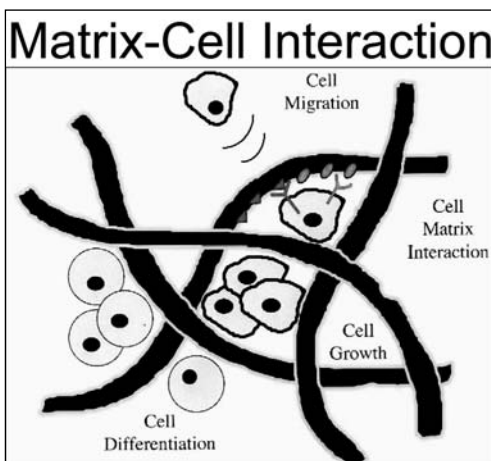


Abbildung 11

zumal das Herz kein einfaches Organ ist. Es spielen sehr viele Faktoren eine Rolle. Es ist nicht möglich, einfach an irgendeiner Stelle Zellen zu injizieren oder etwas zu ersetzen. Das Herz hat eine dreidimensionale Struktur (Abb. 10). Die Muskelfaserverläufe allein innerhalb des linken Ventrikels sind unterschiedlich, auch müssen die verschiedenen Schichten beachtet werden. Alle diese Punkte wurden bei der Zelltransplantation bislang noch nicht diskutiert.

Wenn von Tissue Engineering gesprochen wird, geht es um die Interaktion zwischen Zellen, wobei wir hier im Falle des Herzens ideale Zelltypen gewinnen müssen, zwischen einer Matrix (Scaffold) und den biologischen Signalen, z. B. die Wachstumsfaktoren.

Die Matrix-Zell-Interaktion ist von sehr großer Bedeutung gerade im Bereich des Herzens, wenn wir über die Restauration des linken Ventrikels sprechen (Abb. 11). Da in diesem Ventrikel sehr viele Drücke herrschen, müssen wir natürlich sehr starke Verbindungen zwischen den Herzmuskelzellen, der Matrix und dem Gerüst, an dem die Zellen anhaften, aufbauen. Die ersten Erfolge werden vermutlich zuerst im Bereich des Niederdrucksystems kommen, d. h. im Bereich der Vorhöfe, später dann im rechten Ventrikel und vielleicht einmal auch im Bereich des linken Ventrikels.

Tissue Engineering ist bislang in vielen Fachgebieten angewandt worden – erstmals wurde Haut von Dermatologen und plastischen Chirurgen kultiviert (Abb. 12). In unserem Fachbereich wurden bislang die meisten Erfolge mit der Produktion von Herzklappen sowie mit der Produktion von Blutgefäßen erzielt. In der Behandlung von Herzerkrankungen stellt sich die Frage, wie wir es schaffen können, einen künstlichen Herzmuskel zu bilden, den wir dann dem Patienten transplantieren können?

Beim Tissue Engineering des Herzens stoßen wir auf verschiedene Schwierigkeiten. Das Herz besteht aus mehreren Suborganen bzw. Organsystemen, beherbergt viele Blutgefäße, Elektrizität spielt eine Rolle, es sind verschiedene mechanische Eigenschaften zu beachten, der Metabolismus des Herzens ist kompliziert und es handelt sich um ein asymmetrisches Organ (Abb. 13). Alle diese Dinge müssen natürlich berücksichtigt werden, wenn wir versuchen, etwas, was die Natur oder Gott geschaffen hat, nachzubilden.

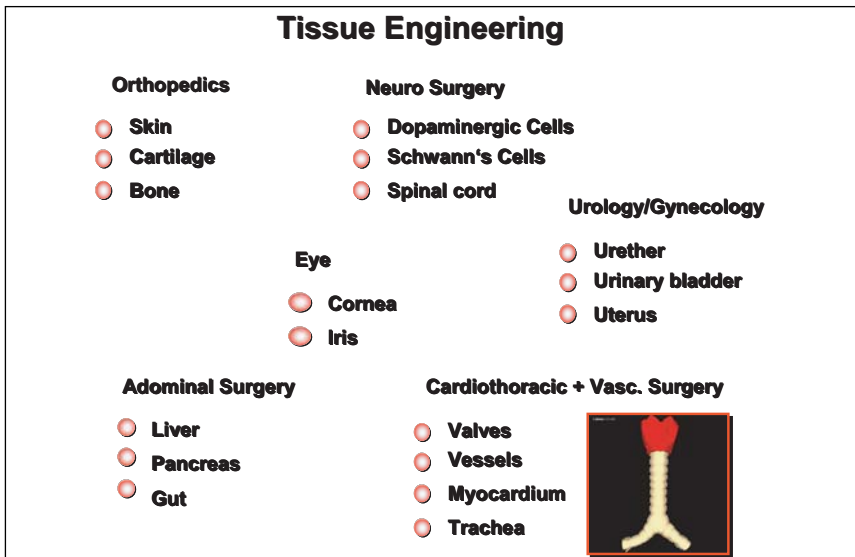


Abbildung 12

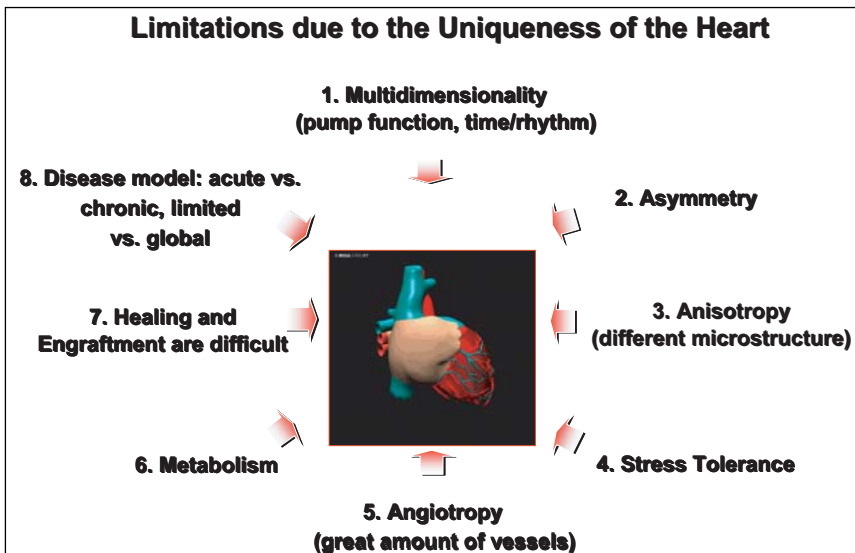


Abbildung 13

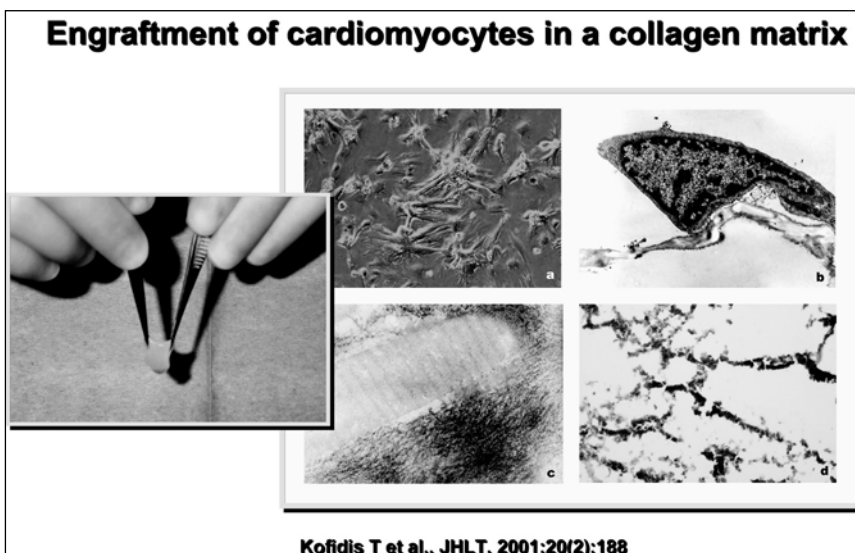


Abbildung 14

Die ersten erfolgreichen ansatzweisen Versuche der Wiederherstellung eines Herzmuskels außerhalb des Körpers sind zunächst der Gruppe um Eschenhart in Hamburg gelungen. Wir haben in Hannover das Modell modifiziert, eine Kollagenmatrix genommen und mit Hilfe von neonatalen oder fötalen Rattenherzmuskelzellen ein Gebilde hergestellt (Abb. 14). Es handelt sich um ein gelartiges, galertartiges, aber schon etwas festeres Gebilde, das spontan schlagen kann und sich auch mit Schrittmacherkabeln stimulieren lässt. Dieses Gebilde wird aber nur durch Diffusion ernährt. Es hat keinerlei eigene Blutversorgung, was natürlich auch die Größe limitiert, die man damit herstellen kann.

Was wir damit auch zeigen konnten, war ansatzweise ein Frank-Starling-Mechanismus. Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass durch Vordehnen dieser Muskeln die resultierende Kraft, die diese Muskeln generieren können, auch größer wird. Wir konnten auch nachweisen, dass durch Zugabe von Calcium oder Epinephrin die Kontraktionskraft gesteigert wird (Abb. 15). Diese Gebilde weisen allerdings einige Nachteile auf, nämlich dass sie entweder zu weich oder zu hart werden. Sie können sich im Medium auch auflösen, sie können natürlich einem Druck im rechten oder linken Ventrikel nicht standhalten und haben auch keine eigene Durchblutung. Daher haben wir uns überlegt, ob wir eventuell eine vaskularisierte 3-D-myokardiale Matrix bilden könnten.

Für diese Versuche haben wir ein Blutgefäß in einem Bioreaktor aufgespannt (Abb. 16) und dieses AMT (artificial myocardial tissue) um das Blutgefäß gegossen und gewartet, bis es fest wird. Anschließend haben wir Wachstumsfaktoren dazugegeben und gehofft, dass aus dem zentralen Gefäß neue Gefäße aussprossen, die dann den Muskel durchbluten. Diese Versuche waren leider nicht erfolgreich, sodass wir in Hannover, vor allem unser ehemaliger Chef, auf die Idee kamen, eine Matrix zu verwenden, die schon von vorneherein über Blutgefäße verfügt. Dazu hatten wir uns den Dünndarm ausgesucht, der bekanntlich über das Mesenterium mit Blutgefäßen versorgt wird. Wir konnten dann die Zellen des Darmes entfernen, den Darm dezellarisieren, bis nur noch ein Collagengerüst ohne Zellen übrig blieb, und wir haben dann

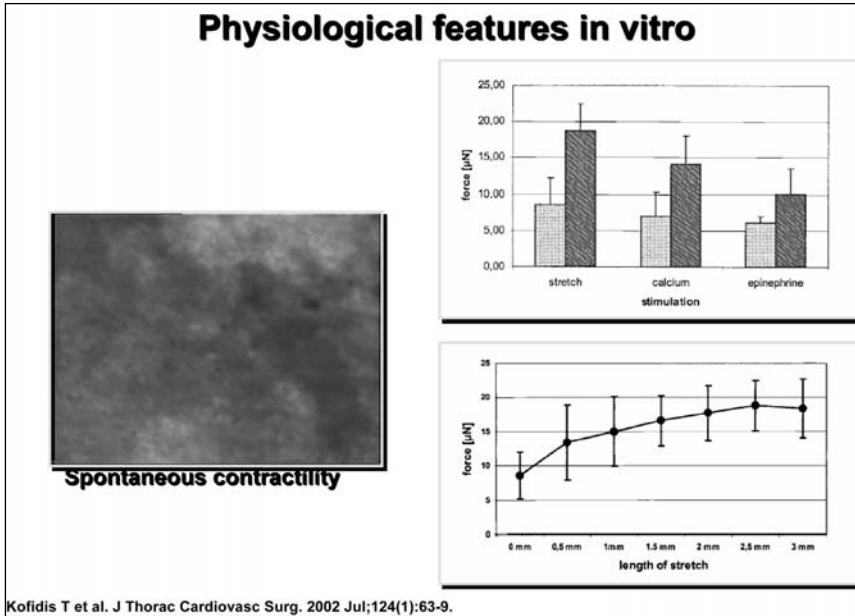


Abbildung 15

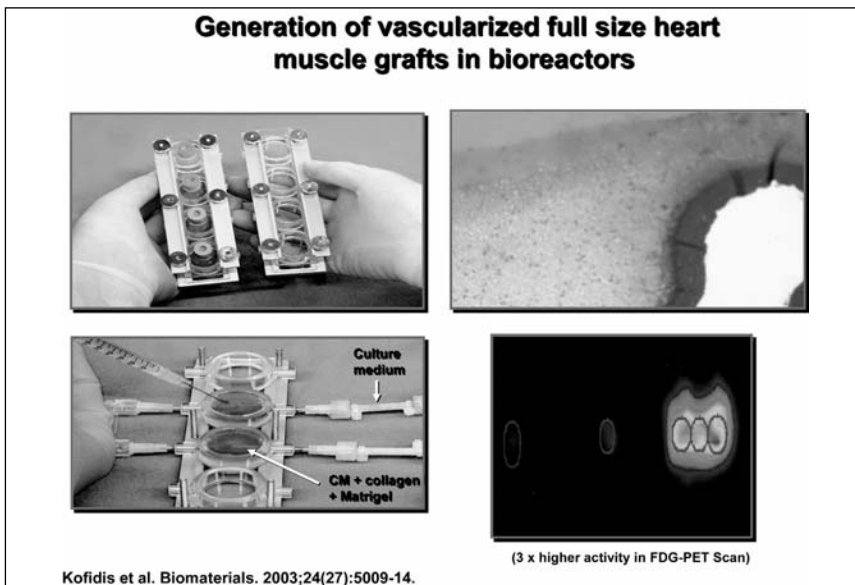


Abbildung 16

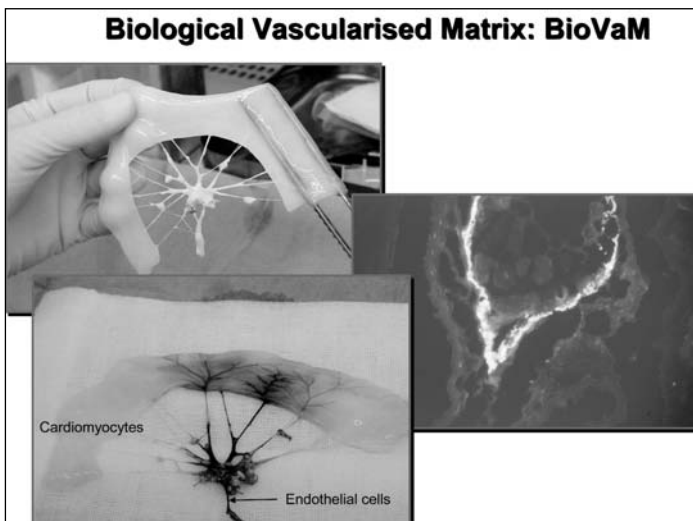


Abbildung 17

untersucht, ob die Gefäße noch halbwegs durchgängig sind, und es gelang, die Gefäßstrombahn nochmals darzustellen. Unser Ziel war es dann, dieses Gerüst für alle möglichen Organsysteme mit den jeweiligen Zellen zu re-besiedeln und dann eine vaskularisierte Matrix zu haben (Abb. 17).

Um dieses Konzept zu verwirklichen, wollten wir zunächst am rechten Herzen, im Bereich des Niederdrucksystems beginnen. Darmgefäße verfügen über eine eigene Blutversorgung, eine arterielle und eine venöse, und wenn Defekte vorhanden waren, versuchten wir, dieses Matrixgebilde aufzunähen (siehe Abb. 18) und die Gefäße mit den jeweiligen Arterien oder Venen zu anastomosieren. Diese Versuche wurden erst einmal in einem Kleintierversuch nachgemacht. Die Gefäße füllten sich dabei allmählich mit Blut. Auf dem Kleintier-Gebiet stellten sich mit diesem Vorgehen bereits die ersten Erfolge ein. Wir haben dann versucht, dieses Konzept auf Großtiere, dann aber auch auf Patienten zu übertragen, denn dieses Material eignet sich auch als Deckungsmaterial bei Patienten mit Tumoren.

In der Abbildung 19 wird die Kernspintomographie-Aufnahme einer jungen Patientin dargestellt, die einen großen Tumor im Bereich des rechten Vorhofs aufwies. Dieser Tumor griff sogar auf Teile des rechten Ventrikels über und musste entfernt werden. Wir hatten dabei die Wahl, entweder ein Stück Gore-tex zu nehmen, um diesen Defekt am Ventrikel abzudecken, oder eventuell die oben erläuterte BioVaM zu verwenden, allerdings ohne Besiedelung mit Kardiomyozyten, die für den Patienteneinsatz noch nicht verfügbar sind. Professor Karck hatte dann diese Patientin erfolgreich operiert. Bei einer Nachuntersuchung konnten wir dann in der Angiographie die Gefäße dieses BioVaM einschließlich der Verästelung der Gefäße innerhalb dieses BioVaM darstellen. Zu diesem Zeitpunkt waren diese Gefäße noch intakt und weitere Forschungsarbeiten sollten uns irgendwann einmal in der Lage versetzen, die idealen Zellen zur Besiedelung dieser BioVaM zu finden.

Mittlerweise konnten experimentell, u. a. von den Urologen in Hannover, auch Urinblasen und andere Strukturen mit dieser BioVaM hergestellt werden. Das ist zumindest ein gutes Konzept, das jedoch davon abhängt, dass man die rich-

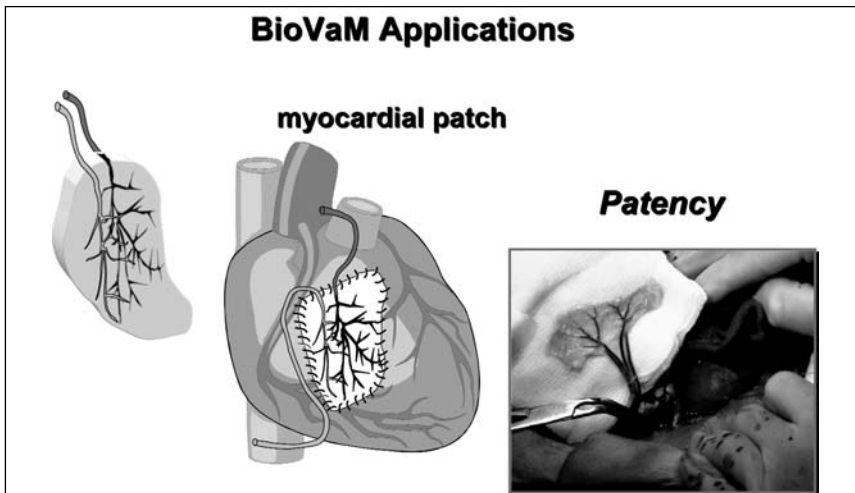


Abbildung 18

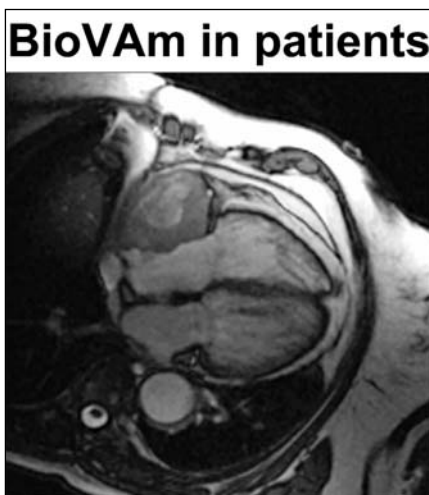


Abbildung 19

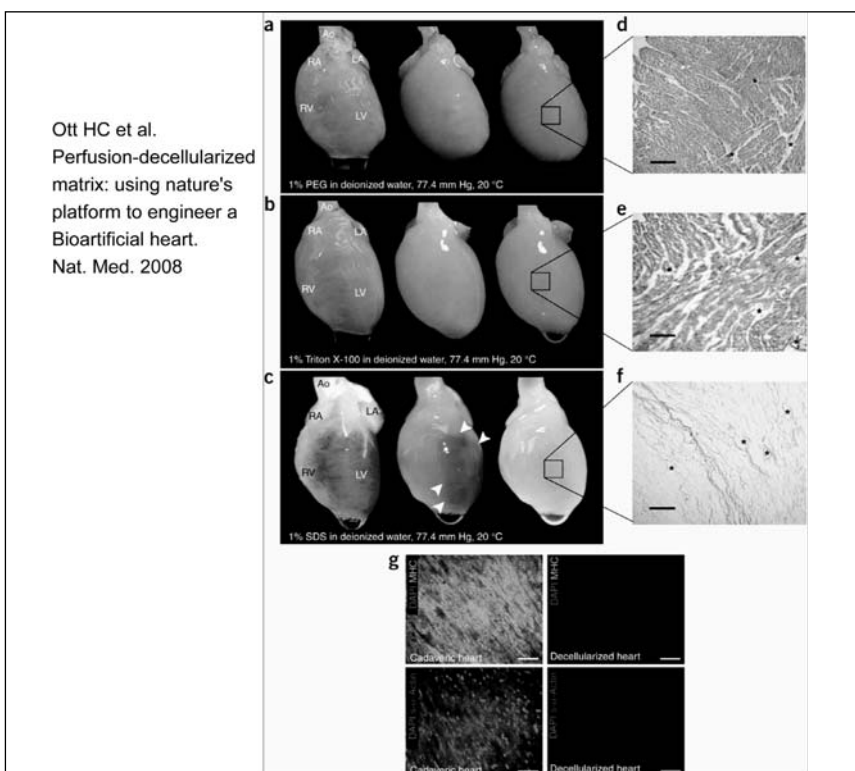


Abbildung 20

tigen Zellen hat, um es letztendlich auch umsetzen zu können.

Frau Doris Taylor aus Minneapolis ist ein Stück weiter gegangen, indem sie zwei Dinge kombinierte, nämlich einmal das Konzept der Dezellularisierung des Herzens und der Re-Besiedelung, wie wir es beim AMT ebenfalls gemacht hatten, allerdings auch wieder in Ermangelung einer idealen Zellquelle, der fötalen oder embryonalen Kardiomyozyten. Aus Veröffentlichungen ist bekannt, dass sie für ihre Versuche zunächst ein normales Mausherz genommen hatte, dieses dann mit Detergentien perfundierte, so dass allmählich die Zellen aus dem Herzen ausgewaschen wurden. Abbildung 20 zeigt, dass die Dichte der Zellen mit zunehmender Detergentienbehandlung abnimmt, so dass am Ende nur noch einen dezellularisiertes Herz vorlag, das lediglich aus einer Matrix bestand.

Aus Abbildung 21 und 22 kann der Versuchsablauf weiter nachvollzogen werden. Doris Taler konnte die Blutgefäße, ähnlich wie wir beim BioVaM gesehen haben, ebenfalls darstellen und danach diese Herzen mit neonatalen und fötalen Kardiomyozyten der Ratte und der Maus re-besiedeln. Diese Herzen sehen genauso aus wie die Herzen, bevor sie dezellularisiert wurden. Dass die Herzen nicht nur gut aussehen, sondern dass sie auch funktionieren, ließ sich an den EKG-Signalen erkennen, aber auch an den Drucksignalen, die man durch die Langendorf-Präparation gewinnen konnte. Auch bei diesem interessanten Konzept gilt, dass die ideale Zellquelle gefunden werden muss – und für adulte Patienten haben wir diese leider noch nicht.

Um die mögliche Rolle der Nanotechnologie zu klären, muss berücksichtigt werden, dass, während wir in den letzten 10 bis 15 Jahren am Tissue Engineering gearbeitet haben, die Industrie nicht tatenlos geblieben war und versucht hatte, künstliche Muskeln nachzubilden mit Hilfe von intelligenten Polymeren, wobei diese Versuche natürlich noch in ihren Anfangsstadien sind. Zu nennen sind hier unsere Kooperationspartner aus Korea, die allein für dieses Projekt 9 Mio Dollar erhalten haben, weil diese Technologie in Korea wie überhaupt in allen fernöstlichen Ländern als die Zukunftstechnologie angesehen wird. Es ist ihnen gelungen, elektroaktive Polymere herzustellen, die erst kontrahieren, wenn sie elek-

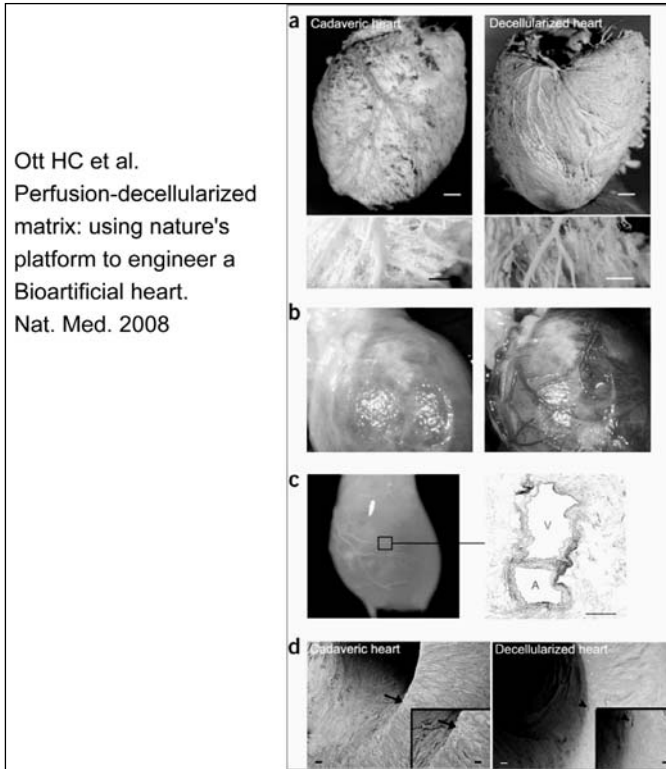


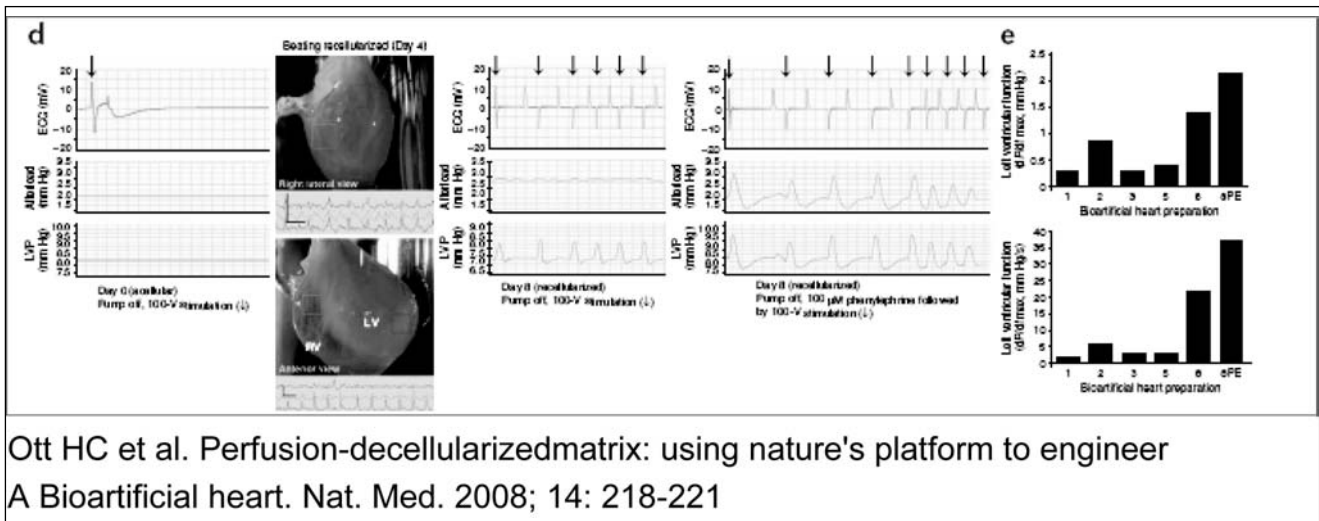
Abbildung 21

Ott HC et al.
Perfusion-decellularized
matrix: using nature's
platform to engineer a
Bioartificial heart.
Nat. Med. 2008

trisch stimuliert werden, wie wir es vom Herzen oder von einer Schrittmacherstimulation kennen. Sie konnten darüber hinaus diese Nanofasern, die auch wirklich Nanogröße haben, zu einem Teppich zusammenzuweben in einer Art, dass tatsächlich ein makroskopisch sichtbares größeres Gewebestück entsteht, welches auch kontrahieren kann.

Die Entwicklung eines künstlichen Herzmuskels wird ebenfalls von einigen Gruppen, vor allem aus der Biochemie-Industrie, verfolgt und ich denke, dass es irgendwann auch Zeit sein wird, dass diese Disziplinen im Rahmen von Kleintierexperimenten, wie wir sie auch gerade durchführen, zusammenarbeiten und gemeinsame Forschung betreiben werden.

PD Dr. Arjang Ruhparwar
Klinik für Herzchirurgie
Universitätsklinikum Heidelberg
Im Neuenheimer Feld 672
69120 Heidelberg
arjang.ruhparwar@med.uni-
heidelberg.de



Ott HC et al. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a Bioartificial heart. Nat. Med. 2008; 14: 218-221

Abbildung 22