

Wege zu einer neuen Haut: Von den zellbiologischen Grundlagen über Tissue Engineering zu einem neuen Hautsubstitut

Sophie Böttcher-Haberzeth, Thomas Biedermann, Ernst Reichmann
Tissue Biology Research Unit, Chirurgische Klinik, Universitäts-Kinderkliniken, Zürich

Tissue Engineering hat das Ziel, Gewebe und Organe für den klinisch-therapeutischen Einsatz herzustellen. Seit etwa 30 Jahren wird so auch versucht, menschliche Haut im Labor (*in vitro*) nachzubilden. Die bei weitem aussichtsreichste Lösung scheint uns die Herstellung eines Hautsubstituts, das funktionell und strukturell einer Vollhaut sehr nahe kommt. Die «Tissue Biology Research Unit» (TBRU) der Chirurgischen Klinik der Universitäts-Kinderkliniken in Zürich hat sich zum Ziel gesetzt, in sehr enger Zusammenarbeit mit dem «Zentrum für brandverletzte Kinder, Plastische und Rekonstruktive Chirurgie» (ebenfalls eine Abteilung der Chirurgischen Klinik des KISPI in Zürich) ein neuartiges Vollhautsubstitut herzustellen. Mit Hilfe dieses Hautsubstituts soll es möglich werden, grossflächige, dermo-epidermale Hautläsionen nach Verbrennungen, Unfällen, Infektionen oder auch kongenitalen Malformationen, zuverlässig und mit ausgezeichnetem funktionellem und kosmetischem Erfolg zu decken. Wir geben hier eine Übersicht über unsere diesbezüglichen Bemühungen und Fortschritte.

Wann braucht es Hautersatz?

Der Verlust grosser Hautflächen, und somit der Verlust der äusseren Schutzhülle eines Menschen, kann gravierende oder sogar fatale Folgen haben. Eine Hautrekonstruktion wird zurzeit mit Spalt- oder Vollhauttransplantaten, mit autologen Keratinozytenlagen (Keratinozyten-Sheets), oder mit Dermisäquivalenten (z. B. Integra®, Matriderm®) und anschliessender Deckung mit einer Spalthaut erreicht^{1), 2)}. Trotz signifikanter Fortschritte während der letzten 30 Jahre, bleiben oftmals funktionell, kosmetisch und psychisch einschränkende Narben³⁾ (Abb. 1a). Dies ist ein unzureichendes Ergebnis, wird heute doch eine narbenfreie, der Defektumgebung gleichende Haut angestrebt. Zusätzliche Belastungen entstehen beim pädiatrischen Patienten durch multiple Korrekturoperationen bis ins Erwachsenenalter, die immer wieder durch das Entfernen von funktionell einschränkendem Narbengewebe notwendig werden. Diese Altersgruppe würde somit besonders von einer einzeitigen Transplantation eines Vollhaut-ähnlichen

autologen, dermo-epidermalen Substituts, profitieren.

Dermo-epidermale Substitute

Ein Meilenstein bei der Herstellung eines Epidermis-Substituts war die Expansion menschlicher Keratinozyten *in vitro*, mittels wachstumsgehemmter muriner mesenchymaler Bindegewebszellen⁴⁾. Die Co-Kultivierung epidermaler Keratinozyten mit mesenchymalen Fibroblasten war ein entscheidender Schritt, der auf die essentielle Bedeutung der Interaktion zwischen Epidermis und Dermis hinweist. Ausgehend von diesen Fortschritten konnten erstmals autologe, epidermale Äquivalente auf menschliche Patienten transplantiert werden⁵⁾. Obwohl auch heute noch brandverletzte Patienten mit solchen epidermalen Äquivalenten (auch «Cultured Epidermal Autografts» (CEA) genannt), behandelt werden, weisen diese doch einige Limitierungen auf. Die Handhabung der sehr fragilen Keratinozyten-Sheets ist anspruchsvoll, die Methodik birgt ein hohes Infektionsrisiko, es fehlt ein dermaler Anteil im Transplantat und die Rate eines erfolgreichen Angehens (Take) liegt bei 60%⁶⁾.

Vielfach wird heute die Herstellung komplexer, dermo-epidermalen Substitute angestrebt. Als Ausgangsmaterial dient hierbei eine biodegradierbare, azelluläre Matrix. Diese kann aus einem netz- oder schwammartigem Gerüst (z. B. Integra®, Matriderm®) bestehen. Es kann sich dabei aber auch um ein Hydrogel handeln, welches aus Kollagen Typ I, einem

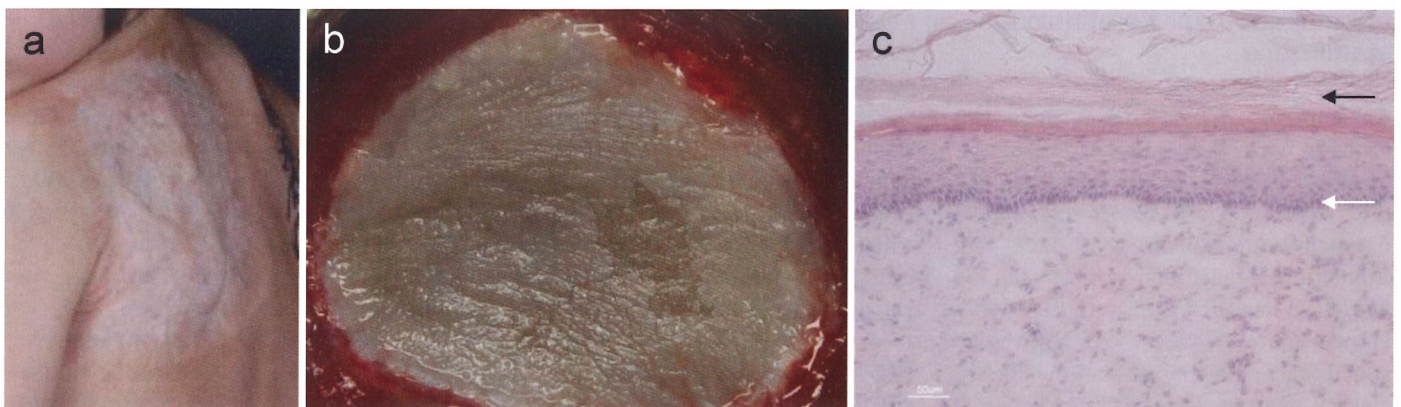


Abbildung 1: Neuartige Hautsubstitute zur Verhinderung der Narbenbildung. **a)** Narbengewebe nach Anwendung von Integra Artificial Skin®. Die rekonstituierte Haut hebt sich noch deutlich von der nicht verletzten Haut ab. **b)** Ein menschliches dermo-epidermales Substitut auf der immun-inkompetenten Nacktrate. **c)** Ein histologischer Schnitt durch die in 1b dargestellte menschliche Haut zeigt, dass sich eine effiziente Barriere (Epidermis) mit einem Stratum basale (weisser Pfeil) und einem Stratum corneum (rote Zellschicht) entwickelt hat. Die toten Keratinozyten des Stratum corneum werden als Hautschuppen abgestossen (schwarzer Pfeil).

wesentlichen Bestandteil der dermalen extrazellulären Matrix, besteht. In ein solches Kollagen-Hydrogel werden autologe, dermale Fibroblasten eingebracht, die sich im Gel vermehren (proliferieren) und es besiedeln. In einem zweiten Schritt werden autologe epidermale Keratinozyten auf das Hydrogel aufgebracht, wo diese ebenfalls massiv proliferieren und zunächst eine einzellige, zusammenhängende Zellschicht (einen Monolayer) bilden. Wesentlich ist hierbei die Kommunikation zwischen Keratinozyten und Fibroblasten durch «Botenstoffe» wie etwa Wachstumsfaktoren, Cytokine, Morphogene und Komponenten der extrazellulären Matrix (wie etwa Bestandteile der Basalmembran). Durch diese dermo-epidermale Interaktion proliferieren und differenzieren die Keratinozyten. Sie formieren sich schliesslich zu einem mehrschichtigen, stratifizierten und verhornten (kornifizierten) Epithel und somit zu einer effizienten Barriere gegenüber der Aussenwelt (*Abb. 1b u. c*). Aber auch oben genannte Hydrogele weisen gewisse Limitierungen auf. Ihre fehlende mechanische Stabilität muss durch stützende Massnahmen kompensiert werden. Ein fehlendes dermales Kapillarsystem begrenzt die Dicke eines solchen Hautersatzes, da die Keratinozytenschicht(en) ausschliesslich durch Diffusion aus dem darunterliegenden Rezipientengewebe versorgt werden muss/müssen. Ferner hängt die Regeneration der Epidermis in einem solchen Substitut entscheidend von dem Vorhandensein selbsterneuernder Keratinozyten (Keratinozytenstammzellen) ab.

Identifikation der Keratinozytenstammzelle

Stammzellen regenerieren Gewebe und erhalten ihre Authentizität. Als undifferenzierte Zellen liefern sie neue, sich differenzierende (eine bestimmte Aufgabe übernehmende) Zellen, ohne dabei ihre Stammzeleigenschaften zu verlieren. Die Epidermis der Haut regeneriert sich vollständig in etwa 4 Wochen. Dabei werden schlussendlich die am stärksten differenzierten, toten Keratinozyten der äusseren Oberhaut als Hautschuppen abgestossen (*Abb. 1c, schwarzer Pfeil*). Die Stammzellen befinden sich dagegen in der untersten (basalen) Schicht der Epidermis (*Abb. 1c, weisser Pfeil und Abb. 2a, rote Zellen*),

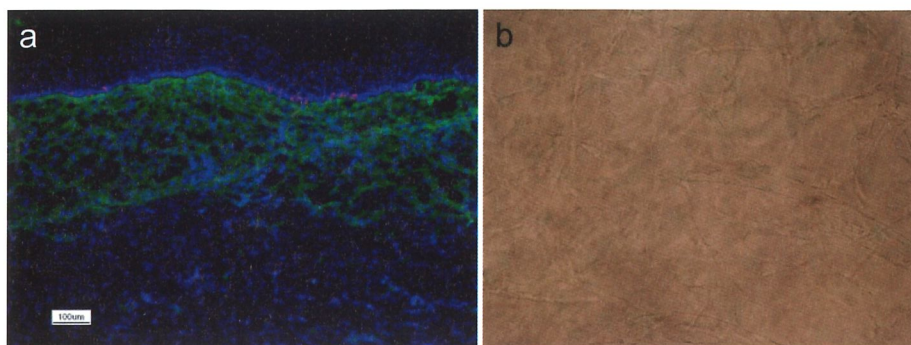


Abbildung 2: Eine besondere basale Keratinozytenpopulation und ein im Labor hergestelltes Netzwerk aus Kapillaren. **a)** K19-spezifische Antikörper erkennen einen speziellen Keratinozytentyp im Stratum basale eines im Labor hergestellten, menschlichen Hautsubstituts. K19-positive, basale Keratinozyten zeigen eine intakte, sich gerade etablierende Epidermis an. **b)** Menschliche, mikrovaskuläre Endothelzellen haben sich zu einem dreidimensionalen Netzwerk echter Kapillaren organisiert.

teilen sich und liefern Tochterzellen, die sich ebenfalls noch rege teilen. So kann eine ständige Hautregeneration gewährleistet werden.

Die Suche nach geeigneten «Anzeigerproteinen» (Markern), zur Erkennung von Keratinozytenstammzellen, ist in zahlreichen Forschungsgruppen weltweit im Gange. Wir sind bei unseren Untersuchungen auf einen Marker gestossen, der ein strukturelles Protein (Cytokeratin 19) im Zytoplasma von Keratinozyten nachweist (*Abb. 2a*). Cytokeratin 19 kann dabei nur in der Haut sehr junger Kinder (< 2 Jahre) nachgewiesen werden⁷⁾. Ausserdem wird es häufiger exprimiert in Keratinozyten, die aus ihrem Gewebsverband genommen wurden und als Einzelzellen oder in jungen dermo-epidermalen Substituten kultiviert werden. Bei transplantierten Substituten beschränken sich die Cytokeratin 19 positiven Zellen zeitabhängig mehr und mehr auf die basale Zellschicht der Epidermis⁸⁾. Möglicherweise ist dieser Marker auch Ausdruck eines lateralen Wachstums der Epidermis, d. h. die Epidermis nimmt an Fläche zu, da sie mit dem Kind mitwächst. In jedem Fall ist K19 aber ein Marker, der eine intakte, sich gerade etablierende epidermale Struktur anzeigt. Als solcher ist K19 ein wertvoller Indikator für ein gelungenes Hautsubstitut.

Prävascularisierung des Hautersatzes

Epidermale Substitute (Cultured Epidermal Autografts) können nach ihrer Transplantation auf Grund ihrer geringen Dicke von dem vaskularisierten Wundbett

problemlos durch Diffusion mit Nährstoffen, Wachstumsfaktoren und Sauerstoff versorgt werden. Im Gegensatz hierzu können >1mm dicke, im Labor hergestellte, dermo-epidermale Substitute nicht rasch genug vaskularisiert werden, um die Versorgung der epidermalen Komponente zu gewährleisten⁹⁾. Dies erklärt die Wichtigkeit der schnellen und effizienten Blutversorgung eines transplantierten Hautersatzes.

Einen Lösungsansatz bietet die Herstellung eines im Labor vor-vaskularisierten Gewebesubstituts. Es war unser Ziel, dies durch die Anwendung humaner, mikrovaskulärer Endothelzellen zu erreichen. Im Gegensatz zu bisherigen wissenschaftlichen Erfolgen, bei denen meist Endothelzellen tierischer Herkunft oder humane umbilikale Endothelzellen verwendet wurden, ist die Gewinnung humaner dermalen Endothelzellen zur Verwendung im Hautersatz ein Novum. Nach der Isolation aus Hautbiopsien und der Expansion in der Kulturschale, konnte eine nahezu reine Kultur mikrovaskulärer Endothelzellen gewonnen werden¹⁰⁾. Wir konnten Bedingungen erarbeiten, die es erlauben, dass sich die Endothelzellen in einem biodegradablen Hydrogel, zu einem dreidimensionalen Netzwerk echter Kapillaren organisierten (*Abb. 2b*). Wir konnten ferner zeigen, dass ein solches vor-vaskularisiertes Substitut nach seiner Transplantation durch murale Zellen (Perizyten, glatte Muskelzellen) des Empfängers stabilisiert wird. Das geschilderte Vorgehen stellt einen äusserst attraktiven Ansatz zur Herstellung neuartiger, dermo-epidermaler Hautsubstitute dar.

Zusammenfassung und Zukunft

Mit der Charakterisierung eines Stammzell- und Homöostasemarkers sowie durch die Entwicklung eines Kapillarnetzwerks in einer dermalen Matrix, wurden weitere Schritte zur Etablierung eines neuartigen Hautersatzes erreicht.

Zur Produktion eines klinisch anwendbaren Hautsubstituts, erhältlich in sinnvollen Grössen, vom Chirurgen problemlos handhabbar, medizinisch unbedenklich und für die klinische Therapie von Bund und Kassen zugelassen, bedarf es allerdings noch weiterer Anstrengungen^{11), 12)}.

Referenzen

- 1) Stiefel D., Schiestl C., Meuli M. Integra Artificial Skin® for burn scar revision in adolescents and children. *Burns* 2009 [Epub ahead of print].
- 2) Schneider J., Biedermann T., Widmer D., Montano I., Meuli M., Reichmann E., Schiestl C. Matriderm versus Integra: a comparative experimental study. *Burns* 2009;35:51–57.
- 3) Landolt M.A., Buehlmann C., Maag T., Schiestl C. Brief report: quality of life is impaired in pediatric burn survivors with posttraumatic stress disorder. *J Pediatr Psychol* 2009;34:14–21.
- 4) Rheinwald J.G., Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 1975;6:331–344.
- 5) O'Connor N., Mulliken J.B., Banks-Schlegel S., Kehinde O., Green H. Grafting of burns with cultured epithelium prepared from autologous epidermal cells. *Lancet* 1981;1:75–78.
- 6) Pandya A.N., Woodward B., Parkhouse N. The use of cultured autologous keratinocytes with Integra® in the resurfacing of acute burns. *Plast Reconstr Surg* 1998;102:825–828.
- 7) Pontiggia L., Biedermann T., Meuli M., Widmer D., Böttcher-Haberzeth S., Schiestl C., Schneider J., Braziulis E., Montano I., Meuli-Simmen C., Reichmann E. Markers to evaluate the quality and self-renewing potential of engineered human skin substitutes in vitro and after transplantation. *J Invest Dermatol* 2009;129:480–490.
- 8) Biedermann T., Pontiggia L., Böttcher-Haberzeth S., Tharakan S., Braziulis E., Schiestl C., Meuli M., Reichmann E. Human eccrine sweat gland cells can reconstitute a stratified epidermis. Submitted, under review.
- 9) Sahota P.S., Burn J.L., Heaton M., Freedlander E., Suvana S.K., Brown N.J., Mac Neil S. Development of a reconstructed human skin model for angiogenesis. *Wound Repair Regen* 2003;11:275–284.
- 10) Montano I., Schiestl C., Schneider J., Pontiggia L., Luginbühl J., Böttcher-Haberzeth S., Biedermann T., Braziulis E., Meuli M., Reichmann E. Formation of human capillaries in vitro: The engineering of pre-vascularized matrices. *Tissue Engineering*, in press.
- 11) MacNeil S. Progress and opportunities for tissue-engineered skin. *Nature* 2007;445:874–880.
- 12) Böttcher-Haberzeth S., Biedermann T., Reichmann E. Tissue engineering of skin. *Burns*, in press.

Korrespondenzadresse

PD Dr. Ernst Reichmann
Tissue Biology Research Unit
Department of Surgery
University Children's Hospital
Steinwiesstrasse 75
CH-8032 Zurich, Switzerland
Tel. +41 44 266 7493
Fax +41 44 266 7170
ernst.reichmann@kispi.uzh.ch