

Redaktion

A. Stenzl, Tübingen
 H. Rübber, Essen

S. Maurer · G. Feil · A. Stenzl

Labor für Tissue Engineering, Klinik für Urologie, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen

In vitro stratifiziertes Urothelium und seine Bedeutung für die rekonstruktive Urologie

Regenerative Therapien gewinnen in nahezu allen Fachgebieten der Medizin zunehmend an Bedeutung. Der Teilbereich „tissue engineering“ hat die Bereitstellung kompatibler und funktioneller Zellen und Gewebe zur Rekonstruktion und zum vollständigen Ersatz erkrankter oder funktionsunfähiger Organe zum Ziel. „Tissue engineering“ ist eine etablierte, allerdings noch in weiten Bereichen experimentelle Forschungsrichtung mit dem Potenzial, die chirurgisch-rekonstruktiven Möglichkeiten der Urologie zu erweitern. Diese bestehen aktuell in der direkten Verwendung von körpereigenem Ersatzgewebe wie beispielsweise Magen- oder Darm-schleimhautanteilen, Mundschleimhaut und freien bzw. gestielten Hauttransplantaten. Nachteilig hierbei sind jedoch das Auftreten einer Vielzahl von Nebenwirkungen wie metabolische Störungen, Schleimbildung und Urolithiasis sowie das Risiko einer Malignomentstehung und die begrenzte Verfügbarkeit der erforderlichen Gewebe [1, 2]. Im Vergleich hierzu bietet autologes Gewebe, mit den Methoden des „tissue

engineering“ expandiert und modifiziert, den großen Vorteil der physiologischen und immunologischen Kompatibilität.

Feinstruktur des Urothels

Das Urothel, das Übergangsepithel der ableitenden Harnwege, weist eine Zonierung in basale, intermediäre und superfizielle Zellen auf (▣ **Abb. 1**). Basale Zellen stehen in direktem Kontakt mit der Basalmembran. Die daran anschließende Zone der intermediären Zellen weist je nach Kontraktionszustand des Gewebes eine variable Anzahl von Zelllagen auf. Den luminalen Abschluss des humanen Urothels bilden die superfiziellen Zellen. Diese großen, häufig mehrkernigen, terminal differenzierten Schirmzellen (umbrella cells) weisen morphologisch und ultrastrukturell einzigartige Zeichen terminaler Differenzierung auf, die für die Barrierefunktion des Urothels wesentlich sind. Hierzu gehören die parallele Orientierung der Zellen zur Basalmembran, gut entwickelte Verschlusskontakte (tight junctions), di-

cke Plaques der „asymmetric unit membrane“ in der apikalen Zellmembran und die Ausbildung fusiformer Vesikel [3].

Urothelzellkultur und „tissue engineering“

Die zellbiologischen Erkenntnisse bezüglich des Urotheliums führten zur routinemäßigen Primärkultur humaner urothelialer Zellen aus Biopsiematerial und Blasen-spülflüssigkeit [4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11]. Direkt nach Isolierung oder nach erfolgreich etablierter Primärkultur der Zellen bietet sich die Möglichkeit der direkten Applikation in einen Empfängerorganismus. Hierzu werden die isolierten Zellen enzymatisch vereinzelt und in geeigneten Trägermedien, z. B. Zellkulturmedium oder Fibrinkleber, suspendiert [12, 13].

Mit dem langfristigen Ziel der Konstruktion kompletter Ersatzgewebe im Labor werden azelluläre Trägermaterialien (matrices oder scaffolds) mit in vitro expandierten, enzymatisch vereinzelt urothelialen Zellen besiedelt. Bei diesen Trägerstrukturen handelt es sich um natürliche oder synthetische, biodegradierbare Materialien. Gute Ergebnisse in vitro und im Tiermodell zeigten die synthetischen, biodegradierbaren Polymere Polyglycolsäure (PGA), Polylactidcopolyglycolid (PLGA), Polylactid (PLA) und natürliche, biodegradierbare Kollagenmatrices wie z. B. deepithelialisierte Blasen-submukosa oder porcine SIS (small intestine submucosa) [14].

Vorteil der azellulären Matrices ist die gute immunologische Verträglichkeit, von Nachteil sind die im Tiermodell teilweise

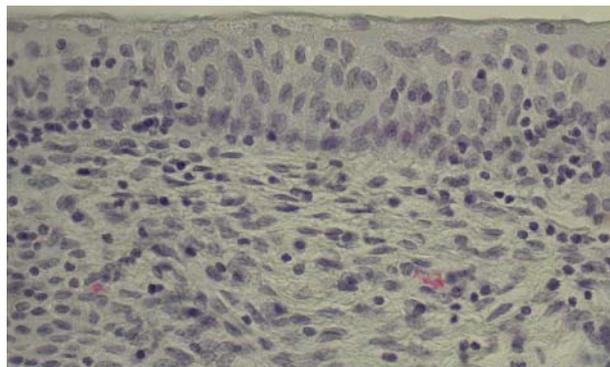


Abb. 1 ◀ **Im Paraffinschnitt: Urothel aus Harnleiter, Färbung nach Papanicolaou (Vergr. 1:40). Das Epithel erscheint 3-lagig, mit großen superfiziellen Zellen über den intermediären und basalen Zelllagen; darunter liegend: zelluläres Stroma**

auftretenden Fibrose- und Entzündungsprozesse [2, 15]. Als weitere Komplikation kann es bei einem zu langsamen Aufbau des Neopithels zur Schrumpfung der Konstrukte kommen. Hierdurch ist deren einwandfreie Funktion nicht mehr gewährleistet [16]. Klinisch dokumentierte Ergebnisse aus Studien mit humanen Urothelzell-Matrix-Implantaten liegen bislang nicht vor.

In-vitro-Stratifizierung von Urothelzellen

Einfluss von Kalzium

Eine viel versprechende Alternative zur Verwendung urothelialer Zellen in Einzelsuspensionen ist der methodische Ansatz, Zellen nach erfolgreicher Primärkultur in vitro zu stratifizieren und dadurch flächige, mehrlagige Urothelstrukturen zu gewinnen. Dies ist beispielsweise durch die Veränderung des Kalziumgehalts im Kulturmedium möglich. Nach Ablösen der mehrlagigen Strukturen von den Kul-

turgefäßen können diese auf geeignete Matrices übertragen werden.

Der Einfluss der Kalziumkonzentration im Zellkulturmedium auf die epitheliale Stratifizierung wurde erstmals an Kulturen epidermaler Keratinozyten gezeigt [17]. Niedrige Kalziumgehalte (0,05–0,1 mM) in Kulturmedien resultierten in einschichtigen Zellkulturen mit hoher Proliferationsrate ohne Anzeichen einer Stratifizierung. Ultrastrukturell sind Zellen solcher Monolayer u. a. durch das Auftreten großer Interzellularräume und das Fehlen von speziellen zellulären Haftkontakten (Desmosomen) gekennzeichnet. Eine Erhöhung des Kalziumgehalts auf 1,2 mM hatte die rasche Ausbildung von Desmosomen zur Folge und nach 10–15 h ein Absinken der DNA-Syntheserate. Als Ergebnis zeigte sich eine Stratifizierung mit terminaler Differenzierung [17]. Auch bei der Kultivierung urothelialer Zellen bewirkte die Erhöhung des Kalziumgehalts eine Induktion der Stratifizierung (■ **Abb. 2**) mit denselben morphologischen, ultrastruktu-

rellen und auch physiologischen Veränderungen [8, 9].

Immunhistologisch wurde jedoch in kalziumstratifizierten Konstrukten die terminale „asymmetric unit membrane“ als Zeichen terminaler Differenzierung der superfiziellen Zellen nicht nachgewiesen. Der Nachweis von Zytokeratin 20 (CK20), dem Zytokeratin der superfiziellen Zellen, war negativ [8, 9]. Hingegen zeigten eigene immunzytochemische Untersuchungen an nativen mehrlagigen Zellkulturen eine deutliche Expression dieses Zytokeratinmoleküls (■ **Abb. 3**).

Einfluss von FGF-7

Die Bedeutung stromal gebildeter Faktoren auf die Stratifizierung und Differenzierung in situ ist in ihrer Komplexität nicht vollständig geklärt [18]. Der Einfluss des Wachstumsfaktors FGF-7 (fibroblast growth factor, syn. keratinocyte growth factor) auf die Ausbildung eines mehrlagigen Urothels wurde von Tash et al. 2001 im Maus-

Hier steht eine Anzeige.

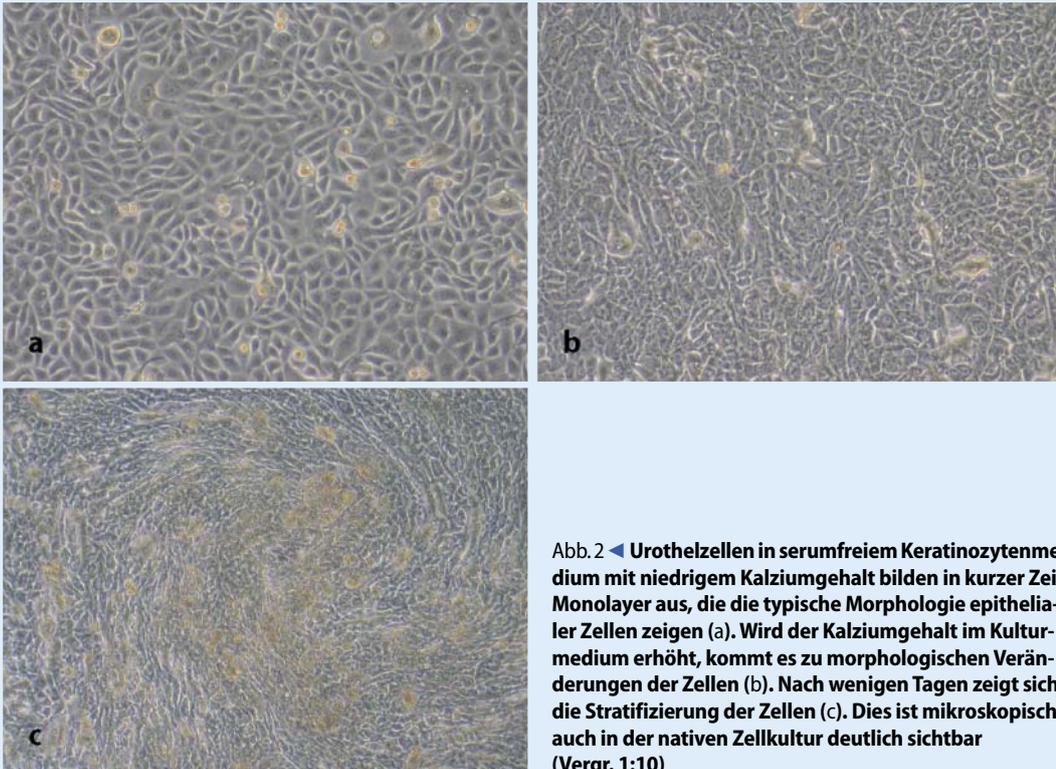


Abb.2 ◀ Urothelzellen in serumfreiem Keratinozytenmedium mit niedrigem Kalziumgehalt bilden in kurzer Zeit Monolayer aus, die die typische Morphologie epithelialer Zellen zeigen (a). Wird der Kalziumgehalt im Kulturmedium erhöht, kommt es zu morphologischen Veränderungen der Zellen (b). Nach wenigen Tagen zeigt sich die Stratifizierung der Zellen (c). Dies ist mikroskopisch auch in der nativen Zellkultur deutlich sichtbar (Vergr. 1:10)

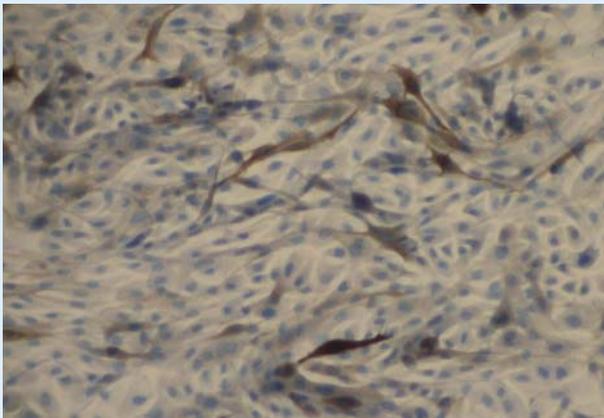


Abb.3 ▲ Immunzytochemische Untersuchung von in vitro stratifiziertem Urothel. Die Zellen wurden zehn Tage nach Induktion der Stratifizierung fixiert, mit monoklonalem Antikörper gegen CK20 markiert und mit DAB detektiert. CK20-positive Zellen zeigen einen braunen Farbniederschlag (Vergr. 1:10)

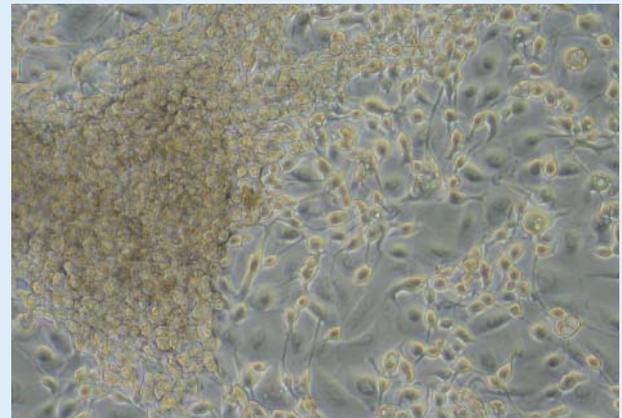


Abb.4 ▲ Explantkultur zum Nachweis der Vitalität eines enzymatisch abgelösten Urothelhäutchens. Aus dem Teilstück eines Häutchens auswachsende Urothelzellen am Tag neun nach Anlage der Explantkultur (Vergr. 1:16)

modell gezeigt [19]. FGF-7-Knock-out-Mäuse (FGF-7 $-/-$) bildeten Urothelien mit deutlich weniger Zelllagen als Kontrolltiere des Wildtyps. Ohne den Einfluss von FGF-7 wurden die intermediären Zelllagen in vivo nicht gebildet. In vitro konnte durch Zugabe von FGF-7 zu primären murinen Urothelkulturen die Bildung eines stellenweise mehrlagig stratifizierten Urothels induziert werden. Auch in primären Urothelkulturen von Hunden wurde durch Zusatz von FGF-7 zum Zellkulturmedium eine Stratifizierung erreicht [20].

Kokultivierungskonstrukte

Im Gegensatz zur Induktion der Stratifizierung durch Zugabe einzelner Faktoren werden auch Konstrukte angestrebt, die eine schichtweise Kombination aus den die Blasenwand aufbauenden Zelltypen darstellt. Hierzu wurden von Fossum et al. 2004 humane Urothelzellen, glatte Muskelzellen und Fibroblasten kokultiviert [21]. Die Aussaat erfolgte in mehreren Lagen als Sandwichmodell. Das entstandene mechanisch stabile Gewebekonstrukt wies ei-

ne Verbindung der verschiedenen Gewebe ohne eine Durchmischung der beteiligten Zelltypen auf.

Vitalität und Funktionalität der Urothelkonstrukte

Die Bereitstellung mehrlagiger Urothelien erfordert nach erfolgreich etablierter Primärkultur und Induktion der Stratifizierung in vitro die Ablösung der entstandenen Urothelhäutchen von den Kulturgefäßen. Diese Ablösung kann enzymatisch

erfolgen [8, 9, 21] oder durch die Verwendung temperatur-sensitiver Kulturgefäße [15].

Die Frage nach der Vitalität der abgelösten Urothelhäutchen wurde in eigenen Untersuchungen über die Anlage von Explantkulturen beantwortet. Hierzu wurden kleine Stücke dieser abgelösten Häutchen am Boden von Zellkulturgefäßen adhärert und vorsichtig mit Kulturmedium überschichtet. Nach wenigen Tagen wuchsen aus diesen Explantstücken wieder Zellen aus. Die abgelösten Urothelkonstrukte weisen eine gewisse mechanische Stabilität auf, bedürfen aber vorsichtiger Handhabung (■ **Abb. 4, 5**).

Die herausragende funktionelle Eigenschaft des Urothels, die Aufrechterhaltung einer Permeabilitätsbarriere zwischen Urin und Blut, wurde in physiologischen Experimenten an stratifizierten Urothelkonstrukten und an nativem Urothel von Sugasi et al. [9] untersucht. Es wurde gezeigt, dass die Durchlässigkeit für Protonen signifikant niedriger war als im nativen Gewebe. Die Permeabilitätseigenschaften der Konstrukte für Wasser, Harnstoff und Ammoniak unterschieden sich nicht vom nativen Gewebe.

Erprobung in Tiermodellen

Die mit den Methoden des „tissue engineering“ hergestellten Urothelkonstrukte und natives Urothel sind in ihren morphologischen und physiologischen Eigenschaften vergleichbar. Daher bietet sich die Erprobung im Tiermodell und auch die klinische Anwendung der Konstrukte an. Im Minipig-Tiermodell wurde an Urothelkulturen durch Erhöhung des Kalziumgehalts im Medium stratifiziertes Urothel gewonnen und mit Hilfe eines Polyglactin-Carriers auf autologe deepithelialisierte Kolon- oder Uterussegmente übertragen und zur Blasenaugmentation verwendet. Hierbei zeigten sich bei Verwendung der Trägermatrix aus Uterussegmenten deutliche Vorteile im Vergleich zu Kolonsegmenten: Makroskopisch war bei der Verwendung von Uterussegmenten nach Entnahme der Harnblase keine Schrumpfung des Gewebes festzustellen, sowohl in den nativen als auch in den augmentierten Blasenanteilen. Histologisch war ein stratifiziertes Urothelium nachweisbar. Dieses war

Urologe [A] 2005 · 44:738–742
DOI 10.1007/s00120-005-0847-z
© Springer Medizin Verlag 2005

S. Maurer · G. Feil · A. Stenzl

In vitro stratifiziertes Urothelium und seine Bedeutung für die rekonstruktive Urologie

Zusammenfassung

Im Bereich „tissue engineering“ innerhalb der rekonstruktiven Urologie stehen zwei Ziele im Vordergrund: Die Bereitstellung geeigneten Ersatzgewebes für die rekonstruktive Chirurgie und die damit verbundenen grundlegenden Forschungsarbeiten zum Verständnis der Komplexität und physiologischen Funktionalität der beteiligten Gewebe. Die langjährigen experimentellen Annäherungen an das Übergangsepithel des Harntraktes führten zur routinemäßigen Primärkultur humaner urothelialer Zellen und zur Möglichkeit, diese Zellen zur Besiedlung von biodegradierbaren Trägermaterialien zu verwenden.

In den jüngsten Forschungsarbeiten steht nicht mehr nur die Anwendung von Urothelzellen in Form von Einzelzellsuspensionen im Vordergrund. Vielmehr werden

die isolierten und propagierten Zellen in vitro stratifiziert, um dadurch mehrlagige Konstrukte zur Übertragung auf geeignete Trägermatrices zur Verfügung stellen zu können und den Aufbau eines funktionellen Urothelgewebes zu beschleunigen. Dieser Ansatz führte in Tiermodellen zu vielversprechenden Ergebnissen. Die klinische Anwendung der in vitro etablierten Urothelkonstrukte steht bislang noch aus. Dieser Beitrag gibt eine Übersicht über die aktuellen Strategien zur Entwicklung von Urothelkonstrukten.

Schlüsselwörter

Tissue engineering · Ersatzgewebe · Urothelzellkultur · Urothelkonstrukte · In-vitro-Stratifizierung

Tissue-engineered stratified urothelium and its relevance in reconstructive urology

Abstract

There are two main objectives regarding tissue engineering in reconstructive urology: (1) to provide the surgeon with autologous tissue for urogenital reconstructive purposes and (2) to create the framework for experimental investigations to better understand the structure and function of the tissues involved.

In the last years urothelial cell culture has become a routine laboratory technique. There is sufficient cellular output after isolation and propagation to seed cells as single cell suspensions on biodegradable matrices for the construction of cell-matrix implants. In recent publications attention was directed toward using estab-

lished primary cell cultures for in vitro stratification of multilayered urothelial sheets. Urothelial sheets have been used quite successfully for covering acellular matrices for bladder augmentation in dog and minipig models. However, up to now there has been no clinical application in humans of urothelial sheets generated in vitro. Here we review facts about the different strategies for generating multilayered urothelial sheets.

Keywords

Tissue engineering · Replacement tissue · Urothelial cell culture · Urothelial construct · In vitro stratification



Abb. 5 ▲ Makroskopische Ansicht eines enzymatisch abgelösten Urothelhäutchens. Die Induktion der Stratifizierung erfolgte durch Zugabe von 2 mM CaCl₂ zum Zellkulturmedium einer konfluenten Urothelzellkultur. Die enzymatische Ablösung des Konstrukts erfolgte nach 16 Tagen

allerdings lückenhaft ausgebildet. Bei der Verwendung von Kolonsegmenten trat eine signifikante Schrumpfung des Harnblasengewebes bei unzureichend ausgebildetem Urothelium auf [22].

In einem anderen Tiermodell wurden bei Beagle-Hunden Anteile der Mukosa des Magens entfernt und durch in vitro stratifiziertes Urothel ersetzt. Die Kultivierung der Urothelien erfolgte hier in temperatursensitiven Kulturgefäßen, bei denen eine Absenkung der Temperatur die Ablösung der Zellen zur Folge hatte. Auch hier wurde histologisch ein stratifiziertes Urothelium in vivo nachgewiesen [20]. Die Ergebnisse aus den beiden genannten Tiermodellen zeigen vielversprechend die Verbindung von geeigneten autologen, azellulären Matrices mit den in vitro kultivierten und stratifizierten Urothelkonstrukten zur Blasenaugmentation.

Ausblick

Die aktuell wichtigen Strategien zur Entwicklung von Ersatzgeweben im Bereich der rekonstruktiven Urologie sind einerseits die Bereitstellung reiner, mehrlagiger Urothelkonstrukte und andererseits die Verbindung verschiedener Zelltypen des unteren Harntraktes zu Gewebekonstrukten.

Reine Urothelkonstrukte wurden bereits im Tiermodell in Kombination mit autologen azellulären Matrices erprobt. Die bisherigen Ergebnisse zu optimieren, d. h. die vollständige Funktionalität eines

in vitro stratifizierten Urothels in vivo zu erreichen, muss das Ziel weiterer Experimente sein. Hierbei ist das Augenmerk auch auf die qualitative Verbesserung der Urothelkonstrukte hinsichtlich einer terminalen Differenzierung der luminalen Zellen zu richten. Weiterhin muss die physiologische Funktionalität der aus der Kultivierung verschiedener Zelltypen entstandenen Konstrukte in Tiermodellen geprüft werden.

Hinsichtlich der Verfügbarkeit des erforderlichen Zellmaterials sollte die Isolierung von Urothelzellen aus Blasenspülflüssigkeit als weniger invasive Methode im Gegensatz zur Zellisolierung aus Biopsiematerial im Sinne der Patienten nicht unterschätzt werden. Doch gilt grundsätzlich: Die Voraussetzung für jedes funktionale Urothelkonstrukt ist eine qualitativ optimale Primärkultur, ob aus Biopsiematerial oder aus Blasenspülflüssigkeit etabliert. Alle Versuche aus Zellkulturen mit suboptimaler Morphologie und unzureichendem Proliferationsverhalten eine Stratifizierung zu induzieren sind zum Scheitern verurteilt. Deshalb bleiben auch weiterhin Optimierungen in der Zellkulturtechnik wichtige Aufgaben und Herausforderungen.

Korrespondierender Autor

S. Maurer

Labor für Tissue Engineering,
Klinik für Urologie, Eberhard-Karls-Universität,
Ob dem Himmelreich 9, 72074 Tübingen
E-Mail: sabine.maurer@med.uni-tuebingen.de

Interessenkonflikt: Der korrespondierende Autor versichert, dass keine Verbindungen mit einer Firma, deren Produkt in dem Artikel genannt ist, oder einer Firma, die ein Konkurrenzprodukt vertreibt, bestehen.

Literatur

1. Bartsch G Jr, Frimberger D (2004) Embryonale und adulte Stammzellen für Tissue Engineering in der Urologie. *Urologe A* 43: 1229–1236
2. Corvin S, Feil G, Stenzl A (2004) Tissue engineering der Harnröhre und des Harnleiters. *Urologe A* 43: 1213–1216
3. Southgate J, Masters JRW, Trejdosiewicz LK (2002) Culture of epithelial cells. In: Freshney I, MG Freshney (eds) *Culture of epithelial cells*, 2nd edn. Wiley-Liss, New York, pp 381–399
4. Atala A, Freeman MR, Vacanti JP, Shepard J, Retik AB (1993) Implantation in vivo and retrieval of artificial structures consisting of rabbit and human urothelium and human bladder muscle. *J Urol* 150: 608–612

5. Hutton KAR, Trejdosiewicz LK, Thomas DFM, Southgate J (1993) Urothelial tissue culture for bladder reconstruction: an experimental study. *J Urol* 150: 721–725
6. Cileto BG, Freeman MR, Schneck FX, Retik AB, Atala A (1994) Phenotypic and cytogenetic characterization of human bladder urothelia expanded in vitro. *J Urol* 152: 655–670
7. Petzoldt JL, Leigh IM, Duffy PG, Masters JRW (1994) Culture and characterisation of human urothelium in vivo and in vitro. *Urol Res* 22: 67–74
8. Southgate J, Hutton KAR, Thomas DFM, Trejdosiewicz LK (1994) Normal human urothelial cells in vitro: proliferation and induction of stratification. *Lab Invest* 71(4): 583–594
9. Sugasi S, Lesbros Y, Bisson I, Zhang YY, Kucera P, Frey P (2000) In vitro engineering of human stratified urothelium: analysis of its morphology and function. *J Urol* 164: 951–957
10. Feil G, Maurer S, Christ-Adler M, Hennenlotter J, Corvin S, Gallmetzer M, Stenzl A (2003) Cell culture technique and characterisation of urothelial cells obtained from ureteral specimens. *Tissue Engineering* 4: 839
11. Fossum M, Gustafson CJ, Nordenskjöld A, Kratz G (2003) Isolation and in vitro cultivation of human urothelial cells from bladder washings of adult patients and children. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 37: 41–45
12. Schoeller T, Wechselberger G, Lyons S, Otto A, Russell RC (1998) Urothelial cell culture behavior in fibrin glue compared to conventional culture medium. In: Stark GB, Horch R, Tanczos (eds) *Biological matrices and tissue reconstruction*. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 119–124
13. Wechselberger G, Schoeller T, Stenzl A, Ninkovic M, Lille S, Russell RC (1998) Fibrin glue as a delivery vehicle for autologous urothelial cell transplantation onto a prefabricated pouch. *J Urol* 160(2): 583–586
14. Stenzl A, Ninkovic M, Ashammakhi N, Eder IE, Bartsch G (2001) Rekonstruktion des unteren Harntraktes. *Urologe A* 40: 368–375
15. Yamato M, Okano T (2004) Cell sheet engineering. *Materials Today* 2004: 42–47
16. Schaefer BM, Back W, Kramer MD, Schober C, Waag KL, Lorenz C (1998) Autologous transplantation of urothelium into demucosalized gastrointestinal segments. In: Stark GB, Horch R, Tanczos (eds) *Biological matrices and tissue reconstruction*. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 125–134
17. Hennings H, Michael D, Cheng C, Steinert P, Holbrook K, Yuspa SH (1980) Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture. *Cell* 19(1): 245–254
18. Southgate J, Harnden P, Selby PJ, Thomas DFM, Trejdosiewicz LK (1999) Urothelial tissue regulation. Unraveling the role of the stroma. *Adv Exp Med Biol* 462: 19–30
19. Tash JA, Scott GD, Darracott Vaughan E Jr, Herzlinger DA (2001) Fibroblast growth factor-7 regulates stratification of the bladder urothelium. *J Urol* 166: 2536–2541
20. Shiroyanagi Y, Yamato M, Yamazaki Y, Toma H, Okano T (2004) Urothelium regeneration using viable cultured urothelial cell sheets grafted on demucosalized gastric flaps. *BJU Int* 93: 1069–1075
21. Fossum M, Nordenskjöld A, Kratz G (2004) Engineering of multilayered tissue in vitro. *Tissue Engineering* 10(1/2): 175–180
22. Fraser M, Thomas DFM, Pitt E, Harnden P, Trejdosiewicz LK, Southgate J (2003) A surgical model of composite cystoplasty with cultured urothelial cells: a controlled study of gross outcome and urothelial phenotype. *BJU Int* 93: 609–616