

Jürgen Schlabe  
Dr. med.

## **Isolierung und Kultivierung epidermaler und dermaler Zellen der Kopfhaut zur Entwicklung eines Hautersatzes in Sprühtechnik**

Geboren am: 05. 09. 1978 in Wilhelmshaven  
Staatsexamen am: 02.11.2007 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Chirurgie  
Doktorvater: Professor Dr. med. Markus V. Kuntscher

Für die Rekonstruktion ausgedehnter Brandverletzungen stellt der Einsatz kultivierter autologer Hautzellen seit mehr als zwei Jahrzehnten ein Standardverfahren dar. Neuere Entwicklungen sehen die autologe Transplantation praekonfluenter Hautzellen mittels Sprühtechnik vor, die durch schnellere Kultivierung sowie im Hinblick auf Handhabung, Differenzierung, Hautqualität und Kosten deutliche Vorteile gegenüber einer mehrschichtigen Kulturhaut bringen.

Aus behaarter Kopfhaut kann zusätzlich zu Keratinozyten eine große Zahl epidermaler Haarfollikelzellen zum Wundverschluss gewonnen werden. Die Bulge-Region des Haarfollikels enthält ein Reservoir multipotenter adulter Stammzellen, die sich als potent gezeigt haben, neue Haarfollikel und Talgdrüsen zu bilden.

Im Rahmen des Projektes "Hybride Gewebetechniken in der Transplantationsmedizin" des Berliner Hautprojektes wurde die in der Arbeitsgruppe bereits etablierte Methode zur Kultivierung und klinischen Applikation praekonfluenter Keratinozyten in Sprühtechnik auf die epidermalen und dermalen Zellen des Haarfollikels erweitert und beides erstmals zusammengeführt.

Mit der vorliegenden Arbeit wurde ein neues Protokoll entwickelt, welches erlaubt, effizient und kostengünstig fünf verschiedene dermale und epidermale Zelltypen aus einer einzigen Hautbiopsie zu isolieren und separat unter den jeweils erforderlichen Bedingungen zu kultivieren.

Die Isolation der Haarfollikel aus dem Gewebe erfolgte in mehreren Schritten, zunächst durch enzymatische Digestion mit Dispase und Collagenase. Nach Mikropräparation der Haarfollikel und Abtrennung der dermalen Papille unter dem Operationsmikroskop folgte eine weitere enzymatische Digestion mit Trypsin.

Haarfollikelzellen zeigten gegenüber Keratinozyten eine höhere spezifische Wachstumsrate. Auf einer Collagen I Matrix ließ sich eine Population kleiner Zellen

darstellen, die ein klonales Wachstum zeigten und die positiv für das als Stammzellmarker diskutierte Cytokeratin 19 waren, und die sich durch ein hohes Level  $\alpha 6$ -Integrin und ein niedriges Level CD71 auszeichneten, welches ebenfalls als Nachweis epidermaler Stammzellen diskutiert wird.

Dermal Sheath Zellen zeigten im Vergleich zu dermalen Fibroblasten unbehaarter Hautbereiche eine starke Expression von  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin. Ihnen wird eine wichtige Rolle für die Wundheilung und -modulation zugeschrieben und ein günstiger Einfluss auf die Verhinderung hypertropher Narbenbildung. Dermal Papilla Zellen konnten aus den isolierten Dermalen Papillae kultiviert werden. Sie zeigten sich positiv für Alkalische Phosphatase. Sie spielen eine zentrale Rolle in der Interaktion epidermaler und dermalen Zellen bei der Neubildung von Haarfollikeln und Talgdrüsen. Sie enthalten darüber hinaus ein mesenchymales Stammzellreservoir. Wir wiesen in den diesen Kulturen die mesenchymalen Stammzellmarker CD73 und CD105 nach.

Mit dem Protokoll ist es weiterhin möglich, aus einer Hautbiopsie sowohl Keratinozyten als auch Melanozyten desselben Spenders zu isolieren und getrennt in Kultur zu nehmen. Dabei wurde die Eigenschaft der schnell adhätierenden Keratinozyten auf einer Collagen I Matrix genutzt, beide Fraktionen zu trennen.

Alle fünf Zelltypen wurden mit dem in der Arbeitsgruppe entwickelten Sprühgerät gesprüht, weiter kultiviert und mit nicht gesprühten Zellen desselben Spenders verglichen. Es zeigte sich, dass alle Zelltypen für die Sprühapplikation geeignet sind, sich danach anzüchten lassen und sich in wichtigen Kriterien, wie Stoffwechselaktivität, Zellmorphologie, Zellzahl sowie hinsichtlich der Expression von Struktur- und Oberflächenproteinen von nicht gesprühten Zellen nicht signifikant unterscheiden.

Die vorliegende Arbeit kann als Grundlage für die Entwicklung eines Hautersatzes aus dem humanen Haarfollikel in Sprühtechnik herangezogen werden. Die untersuchten Zelltypen sind wichtige Teilnehmer im Wundheilungsprozess, es konnten Hinweise auf ein mesenchymales und epidermales Reservoir an Progenitorzellen gefunden werden, die nach dem Sprühvorgang nachweisbar blieben und kultiviert wurden. Der Haarfollikel bietet bei geringer Entnahmemorbidität die Möglichkeit für weitere Entwicklungen, möglicherweise eine mit Progenitorzellen angereicherte Zellsuspension, bei der sich die einzelnen Zellfraktionen individuell an die Erfordernisse der zu therapierenden Wunde zusammenstellen lassen.