

**Aus der Klinik und Poliklinik für
Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten
der Universität Würzburg**

**Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe
der Medizin und Zahnmedizin**

**Etablierung eines dynamischen
Kultursystems auf Calciumphosphat-
Scaffolds unter Verwendung zweier
verschiedener Zelllinien**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von
Sonja Wenzel
aus Aschaffenburg**

Würzburg, April 2010

Referent: Priv.-Doz. Dr. Uwe Gbureck

Korreferent: Prof. Dr. Bernd Klaiber

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Juni 2010

Die Promovendin ist Zahnärztin.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
2 Tissue Engineering von Knochen	4
2.1 Zellen.....	4
2.1.1 Quellen osteogener Zellen	4
2.1.2 Zellen und Gewebe in Kultur	6
2.2 Scaffolds.....	9
2.2.1 Aufgaben der Scaffolds	9
2.2.2 Natürliche und synthetische Polymere, Keramiken	13
2.2.3 Calciumphosphat-Scaffolds.....	15
2.2.4 Monetit-Scaffolds.....	16
2.3 Stimulation.....	17
2.3.1 Biologische Stimulation	17
2.3.2 Mechanische Stimulation.....	18
2.3.3 Perfusionskultur.....	21
3 Material und Methoden	24
3.1 Verbrauchsmaterialien und Laborgeräte.....	24
3.2 Herstellung der Calciumphosphat-Scaffolds	25
3.3 Nährmedien, Zusätze, Puffer	25
3.4 Verwendete Zelllinien	27
3.4.1 Osteosarkomzelllinie MG63.....	27
3.4.2 Fibroblastenzelllinie L-929.....	27
3.5 Zellkultivierung.....	28
3.5.1 Beimpfen der Scaffolds und Kontrolle	28
3.5.2 Die Kontrolle aus Polystrol	29
3.5.3 Das dynamische Kultursystem	29
3.5.4 Das statische Kultursystem	31
3.6 Bestimmung von Wachstumsparametern	31
3.6.1 Zellviabilitätsbestimmung.....	31
3.6.2 Zellzahlbestimmung	32
3.6.3 Präparatherstellung für das Rasterelektronenmikroskop.....	33
3.7 Versuchsreihen.....	34
3.8 Statistik.....	35
4 Ergebnisse	36
4.1 Analyse und Vergleich zellbesiedelter CaP-Scaffolds unter dem Rasterelektronenmikroskop	37
4.1.1 Die Struktur der CaP-Scaffolds	37

4.1.2	Vergleich der Morphologie und räumlichen Verteilung der Zellen auf CaP-Scaffolds in statischer zu dynamischer Kultur	38
4.2	Vergleich von Zellzahl und Zellviabilität auf CaP-Scaffolds in dynamischen zu statischen Kultursystemen	43
4.2.1	Vergleich unter Verwendung der Osteosarkomzelllinie MG63	44
4.2.2	Vergleich unter Verwendung der Fibroblastenzelllinie L-929.....	45
4.2.3	Vergleich von MG63-Zellen und L-929-Zellen	46
4.2.4	Vergleich der MG63-Zellen im Langzeitversuch.....	47
4.3	Einfluss der Fließgeschwindigkeit im dynamischen Kultursystem	48
4.3.1	Vergleich von Zellzahl und Zellviabilität unter Verwendung der Osteosarkomzelllinie MG63.....	48
4.3.2	Vergleich von Zellzahl und Zellviabilität unter Verwendung der Fibroblastenzelllinie L-929.....	50
5	Diskussion.....	52
6	Zusammenfassung	60
7	Literaturverzeichnis.....	62

1 Einleitung

Verloren gegangenes oder fehlendes Knochengewebe zu ersetzen ist eine schwierige, häufig vorkommende und kostenintensive Aufgabe in der Medizin. Gesundes Knochengewebe kann sich zwar in einem gewissen Maße selbst regenerieren, überschreitet jedoch ein Defekt ein kritisches Ausmaß von ca. 5 mm kann die knöcherne Selbstheilung eingeschränkt sein. Indikationen zum Ersatz von Teilen des Skeletts und damit der Wiederherstellung von Form und Funktion treten in vielen Bereichen auf, z. B. in der Tumorchirurgie, in der Traumatologie, in der Fehlbildungschirurgie, bei Knocheninfektionen sowie in der plastisch-rekonstruktiven Chirurgie. Die konventionellen Therapieformen setzen Knochenersatzmaterialien ein, die autogenen (vom Individuum selbst abstammenden), allogenen (von einem anderen Organismus der gleichen Spezies abstammenden), xenogenen (von einem artfremden Organismus abstammenden) oder alloplastischen (aus Fremdmaterial bestehenden) Ursprungs sind. Autogener Knochenersatz wird z.B. vom Beckenkamm gewonnen und gilt heute immer noch als „Goldstandard“ (Thorwarth, et al., 2004), da unter Verwendung autogenen Materials die Einheilungschancen am größten sind. Jedoch muss ein zusätzlicher Eingriff vorgenommen werden und das Knochenangebot ist limitiert. Allogene und xenogene Ersatzmaterialien bergen die Risiken immunologischer Abstoßungsreaktionen und Infektionsübertragungen in sich. Alloplastische Ersatzmaterialien haben zwar den Vorteil nahezu uneingeschränkt verfügbar zu sein, zeigen aber Unzulänglichkeiten hinsichtlich der Integration in das umliegende Gewebe, der Degradation und der Materialermüdung. Obwohl diese konventionellen Therapieformen ständig verbessert werden, sind sie durch Einschränkungen und Risiken limitiert.

Daher wird nach einer alternativen Methode zu den konventionellen Therapieformen gesucht. Dazu liefert das Tissue Engineering viel versprechende Ansätze. Der Begriff „Tissue Engineering“ wurde 1988 auf einer von der US-amerikanischen National Science Foundation veranstalteten Konferenz in Lake Tahoe, Kalifornien mit dieser Definition geprägt: „Tissue Engineering ist die

Anwendung der Prinzipien und Methoden der Ingenieur- und Lebenswissenschaften für das grundlegende Verständnis der Wechselwirkung von Struktur und Funktion normalen und kranken Gewebes sowie zur Entwicklung von biologischem Gewebeersatz zur Rekonstruktion, dem Erhalt oder der Verbesserung der Gewebefunktionen.“ (Dettmeyer, 2006)

Bereits seit Mitte der 80er Jahre befindet sich Tissue Engineering von Knochen in Entwicklung. Damals wurden von einigen klinisch und wissenschaftlich orientierten Forschungsgruppen humane Osteoblasten reproduzierbar isoliert und kultiviert. Die Anwendung dieser Osteoblasten beschränkte sich zunächst auf die Biokompatibilitätstestung von keramischen Knochenersatzmaterialien und metallischen Implantatoberflächen. In den 90er Jahren wurde dann verstärkt an der biotechnologischen Herstellung von Hartgewebe geforscht (Ewers, et al., 2003). Dabei ist der generelle Ansatz, osteogene Zellen, die im günstigsten Fall vom Patienten selbst stammen, auf einer Trägerstruktur unter Kulturbedingungen anzusiedeln und zu Gewebekonstrukten reifen zu lassen, um sie dann zu implantieren. Beispielsweise kann folgendermaßen vorgegangen werden: Im Rahmen einer Biopsie wird einem Patienten Gewebe entnommen, welches osteogene Zellen enthält, wie differenziertes Knochengewebe oder mesenchymales Stammzellgewebe. Die Zellen werden aus dem Gewebe und damit auch aus ihrer spezifischen extrazellulären Matrix isoliert und anschließend in-vitro vermehrt. Nach Erreichen einer ausreichenden Zellmasse werden die Zellen auf ein geeignetes Scaffold aufgebracht und unter geeigneten Kulturbedingungen spezifischen biologischen und mechanischen Stimuli ausgesetzt. Hieraus soll sich ein funktionelles Knochenkonstrukt entwickeln, was dann auf eine defektangepasste Größe zugeschnitten und implantiert werden kann. Da bereits von vornherein ein zumindest teilweise gereiftes Konstrukt implantiert wird, muss im Körper nicht erst eine Besiedlung eines fremden Ersatzmaterials erfolgen, was die Integration in das umliegende Gewebe erleichtert und den Heilungsprozess entscheidend verkürzt (Minuth, et al., 2002).

Zu betonen ist, dass sich das Tissue Engineering von Knochen derzeit noch vorwiegend in einem experimentellen Stadium befindet. Bisher vorliegende Erfahrungsberichte zeigen, dass ein Knochengenerat nur verminderte Kno-

chenqualität im Vergleich zu der Verwendung von autogenen Knochentransplantaten aufweist (Ewers, et al., 2003). Gründe dafür sind, dass man generell nur wenig über die Entwicklung von funktionellen Geweben weiß und bisher technisch nicht einmal beherrscht, ein Stück isolierten Knochen unter Kulturbedingungen für längere Zeit am Leben zu erhalten (Minuth, et al., 2003). Während die Osteogenese im Körper wie selbstverständlich durch eine Vielzahl von ganz unterschiedlichen Mechanismen gesteuert wird, lässt sich unter in-vitro-Bedingungen funktionelles Knochengewebe nur herstellen, wenn optimale Kulturbedingungen für eine Differenzierung von Zellen geschaffen werden. Diese werden auf dem Gebiet des Tissue Engineerings erforscht. Schwerpunkte sind auf die Herstellung von geeigneten Scaffolds, die Steuerung der Mitose- und Interphaseperiode und die optimalen biophysikalischen, hormonellen und nutritiven Einflüsse gerichtet.

Um Differenzierungsvorgänge unter in-vitro-Bedingungen zu optimieren, eignen sich Studien an Modellsystemen. Als ein solches Modell kann z. B. ein dynamisches Kultursystem auf Calciumphosphat-Scaffolds dienen. In einem solchen dynamischen Kultursystem zirkuliert Medium und bietet gegenüber einem statischen Kultursystem veränderte Bedingungen bezüglich Nährstoffversorgung und Stimulation durch Flüssigkeitsscherstress.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Einflüsse der veränderten Bedingungen zu analysieren. Dazu wird ein dynamisches Kultursystem auf CaP-Scaffolds etabliert, in dem Versuchsreihen bei unterschiedlichen Fließgeschwindigkeiten und unter Verwendung zweier verschiedener Zelllinien durchgeführt werden. Dabei soll neben einem 6-tägigen auch ein 30-tägiger Kultivierungszeitraum betrachtet werden. Anhand von Wachstumsparametern sowie durch Analyse und Vergleich der Morphologie und räumlichen Verteilung der Zellen auf den Scaffolds sollen die Qualitäten von dynamischen Kultursystemen untersucht und mit statischen Kultursystemen verglichen werden. Die so gewonnen Erkenntnisse können dazu beitragen, die Kulturmethode mit dem dazugehörigen spezifischen Scaffold zu verbessern und so zellbiologische Probleme bei der Entstehung von Knochenkonstrukten zu lösen.

2 Tissue Engineering von Knochen

Die wesentlichen Komponenten zur in-vitro Generierung von mechanisch belastbaren Knochenkonstrukten sind eine ausreichende Zahl an osteogenen Zellen, ein geeignetes dreidimensionales Trägermaterial als Wachstumsunterlage, sowie die Anwesenheit von spezifischen biologischen und mechanischen Stimuli in einem geeigneten Kultursystem.

2.1 Zellen

2.1.1 Quellen osteogener Zellen

Zum Herstellen artifizieller Gewebekonstrukte benötigt man entwicklungsfähige Zellen. Die Zellen sollten eher undifferenziert sein und damit sehr sensitiv reagieren. Um immunologische Abstoßungsreaktion und Infektionsübertragung zu vermeiden, wird eine autologe Zellquelle bevorzugt (Sittinger, et al., 1996).

Zur artifiziellen Generierung von Knochen müssen osteogene Zellen verwendet werden. Als osteogene Zellen werden alle knochenbildenden Zellen bezeichnet: Osteoblasten und die, die sich zu solchen differenzieren. Man kann sie aus zwei verschiedenen Quellen gewinnen, nämlich aus differenziertem Knochengewebe oder aus Gewebe, welches mesenchymale Stammzellen enthält. Mesenchymale Stammzellen erhält man aus Knochenmark und aus anderen Geweben, wie z. B. Fett, Periost, Muskel, Blut, Dermis oder Synovialmembran (Tuan, et al., 2003).

Die terminal differenzierten Zellen, die aus Spendergewebe isoliert wurden, haben häufig nur eine verminderte Proliferationsfähigkeit (Baksh, et al., 2004). Eine Expansion solcher Zellen bis zu gewebeähnlichen Zelldichten in-vitro ist deshalb schwierig.

Große Bedeutung für das Tissue Engineering von Knochen haben mesenchymale Stammzellen. Dies sind bindegewebige Vorläuferzellen, die im Organismus in der Lage sind, sich durch Teilung selbst zu erhalten und verschiedenartig differenzierte Tochterzellen hervorzubringen, darunter zum Beispiel Osteozyten, Chondrozyten, Myozyten, Fibrozyten und Adipozyten. In-vitro las-

sen sie sich im undifferenzierten Zustand über nur ca. 3 Passagen proliferieren. Im Anschluss können sie durch Stimulation, angepasst an das jeweils zu bildende Gewebe, differenziert werden (Pittenger, et al., 1999). So konnten bereits zielgerecht spezifische Zellen nahezu aller Gewebe mesenchymalen Ursprungs, wie Knochen, Knorpel, Sehne, Muskel, Fett oder die Hämatopoese unterstützendes Stroma gewonnen werden (Baksh, et al., 2004).

Aus dem Knochenmark isolierte mesenchymalen Stammzellen (bone marrow stromal cells, BMSCs) besitzen ein besonders hohes therapeutisches Potential für die Rekonstruktion von Knochengewebe (Caplan, Bruder, 2001). Die knochenbildenden Eigenschaften der BMSCs wurden in vivo bereits mehrfach erprobt. Obwohl unterschiedliche Tiermodelle (Hund, Schaf, Ziege) und Knochen (Femur, Tibia, Mandibel) verwendet wurden, konnte die Heilung eines segmentalen Knochendefektes kritischer Größe unter Verwendung von BMSCs auf Scaffolds in allen Fällen im Vergleich zur Kontrollgruppe verbessert werden (Cancedda, et al., 2007). Ermutigende Resultate in Tierversuchen führten zu klinischen Studien (Quarto, et al., 2001) an Menschen.

Dabei wurde 16-41 Jahre alten Patienten mit 4-7 cm großen segmentalen Defekten an Langknochen, bei denen alle konventionellen Therapieansätze versagten, Knochenmark entnommen, aus welchem BMSCs isoliert wurden. Ein dreidimensionales Hydroxylapatit-Scaffold der Größe und Gestalt des jeweils fehlenden Knochenfragmentes wurde mit den ex vivo expandierten Zellen besiedelt und in den Defekt implantiert. Eine externe Fixation sorgte anfangs für eine mechanische Stabilisation. Bei allen Patienten zeigte sich eine gute Integration der Implantate. Postoperativ traten keine Komplikationen auf. Die Genesung trat deutlich früher ein als bei Patienten, die mit Standardmethoden behandelt wurden. In Nachfolgeuntersuchungen (Marcacci, et al., 2007) sechs bis sieben Jahre nach der Implantation zeigten die Implantate eine gute Integration in das benachbarte Gewebe und es traten keine Sekundärfrakturen auf. Dies belegt die Stabilität eines solchen Konstrukts über einen langen Zeitraum. Mesenchymale Stammzellen sind eine der wenigen Stammzellpopulationen, die bereits klinisch eingesetzt werden (Diederichs, 2008).

Um direkt aus einem Spenderorganismus entnommenes Gewebe in einem Labor zu kultivieren (Primärkultur), muss unter bestimmten Sicherheitsmaßnahmen gearbeitet werden (Lindl, Gstraunthaler, 2008). Experimentelle Erfahrungen zeigen, dass der Arbeitsaufwand bei einer Primärkultur deutlich mehr Zeit in Anspruch nimmt als die tägliche Überwachung einer adhärenen Zelllinie. Zur Etablierung von Versuchsaufbauten wie dem dynamischen Kultursystem auf Calciumphosphat-Scaffolds werden daher Zelllinien, wie z. B. die Osteosarkomzelllinie MG63 oder die Fibroblastenzelllinie L-929, als Modell verwendet.

2.1.2 Zellen und Gewebe in Kultur

Bei Zelllinien können primäre von kontinuierlichen Zelllinien unterschieden werden. Alle in-vitro-Züchtungen von aus Geweben oder Organen isolierten Zellen, die direkt aus dem Organismus entnommen wurden, bezeichnet man als Primärkultur. Wachsen solche Zellen ungestört und teilen sich, müssen sie nach einiger Zeit subkultiviert werden. Dabei werden die Zellen von der Oberfläche abgelöst, in Suspension gebracht und nach entsprechender Verdünnung in neue Kulturgefäße überführt. Vom Zeitpunkt dieser ersten Passage an spricht man von einer primären Zelllinie. Eine aus einer Primärkultur entstandene Zelllinie lässt sich nur über eine begrenzte Zahl an Passagen weiterführen. Die Zellen durchlaufen in-vitro ihre Differenzierungsschritte und sterben danach ab (Lindl, Gstraunthaler, 2008).

Durch spontane Zellveränderungen kann sich eine kontinuierliche Zelllinie entwickeln. Per definitionem bezeichnet man eine Zelllinie als kontinuierlich, wenn sie sich mehr als 70-mal nach der Primärisolation ohne Einschränkung passagieren lässt (Minuth, et al., 2002). Während der Kultivierung einer Zelllinie über längere Zeit müssen die Zelleigenschaften kritisch beobachtet werden. Oft bleiben sie nicht konstant, denn typische Charakteristika können verloren gehen oder atypische angenommen werden (Minuth, et al., 2002). Dementsprechend müssen die Zellen dann verworfen werden.

Kontinuierliche Zelllinien müssen nicht notwendigerweise transformiert sein, wie die in dieser Arbeit verwendete Zelllinie L-929 muriner Fibroblasten. Eine genetische Veränderung, die zur Immortalität einer Zelllinie führt, kann auch eine

Aberration im Chromosomensatz der Zellen sein, eine sogenannte Ploidie (Lindl, Gstraunthaler, 2008), welche die in dieser Arbeit verwendete Zelllinie MG63 humaner Osteosarkomzellen aufweist. Diese Zelllinie ist hypotriploid. Osteosarkomzellkulturen differenzieren in-vitro (Ikeda, et al., 1992).

Transformationsstrategien bezwecken einmal angelegte Primärkulturen zu immortalisieren und nicht diese maligne zu transformieren bzw. neoplastische Eigenschaften zu induzieren. Eine viel verwendete Methode ist z. B. die virale Transformation, bei der virale Onkogene eingeschleust werden, oder die Transfektion von Zellen mit humaner Telomerase. Telomere versiegeln die Chromosomenenden, schützen diese vor enzymatischem Abbau und gewährleisten die Replikation der terminalen DNA-Abschnitte. Eine schrittweise Verkürzung der Telomere tritt aufgrund von Problemen bei der Replikation linearer DNA auf, welche in eukaryotischen Chromosomen vorliegt. Wird eine kritische Telomerenlänge unterschritten, stellt sich die Zellteilungsaktivität ein. Diese replikative Seneszenz kann durch die Transfektion mit humaner Telomerase verzögert werden (Cech, 2000). Die Telomerase ist eine reverse Transkriptase, welche in den meisten somatischen Zellen inaktiv ist. Daher werden die Telomerenenden nach einer Replikation nicht mehr vollständig ergänzt, was zu Zellalterung führt. Nach Transfektion können Telomerase exprimierende Zellen durch Stabilisierung der Telomerenlänge immortalisiert werden (Bodnar, et al., 1998).

Die Expression von transformierenden Genen kann wesentlichen Einfluss auf den Differenzierungsgrad der kultivierten Zellen nehmen. Während die Kapazität der Zellen sich nahezu unbegrenzt teilen zu können zunimmt, kann es jedoch zu einem Verlust der Differenzierungseigenschaften der Zellen kommen (Lindl, Gstraunthaler, 2008).

Auch kann die Stimulierbarkeit von normalen und transformierten Zellen unterschiedlich sein. In einem Experiment (Habel, 2004) wurden verschiedene Zelltypen durch Stimulation angeregt. Humane Osteosarkomzellen, wie die in dieser Arbeit verwendeten MG63-Zellen, wurden durch die Stimulation stärker beeinflusst als primäre Osteoblasten. Dieses scheinbar unterschiedliche Verhalten von normalen und transformierten Knochenzellen könnte mit der Fähigkeit

transformierter Zellen zusammenhängen, dass sie unter Stimulation vermehrt Wachstumsfaktoren produzieren.

In der Zellkulturtechnologie gibt es zwei verschiedene Konzepte Zellen zu züchten. Die Zellen können entweder im Kulturmedium suspendiert sein. Solche nicht adhären Zellen sind zum Beispiel Leukozyten oder verschiedene Tumorzellen. Andere Zellkulturen wachsen adhärent und haften an einem Kulturgefäßboden an (Minuth, et al., 2002). Sie benötigen eine geeignete feste Substratunterlage. Zu diesen adhäsionsabhängigen Zellen gehören auch diejenigen der osteoblastären Differenzierungsreihe. Haben die kultivierten Zellen die gesamte Oberfläche geschlossen bedeckt (konfluenter Monolayer), so wachsen strikt adhären Zellen in der Regel nicht mehr weiter, da sie eine Kontakthemmung bei Erreichen der Konfluenz haben. Diese Kontakthemmung können Tumorzellen oder transformierte Zellen verloren haben. Sie wachsen solange, auch übereinander, weiter bis ihre Versorgung nicht mehr gewährleistet ist.

Bei zu hoher Zelldichte nimmt die Proliferationsrate stark ab, was zum Absterben einer statischen Kultur führt. Daher müssen statische Zellkulturen nach erreichter Maximaldichte passagiert werden. Bei einer dynamischen Kultur, bei welcher das Kulturmedium zirkuliert und so die abgestorbenen Zellen abtransportiert, ist passagieren nicht nötig. Daher können Zellkulturen in einer dynamischen Kultur in der für sie typischen Kontaktinhibierung über Wochen und Monate ohne eine Subkultivation erhalten werden (Minuth, et al., 1995). Sowohl bei der statischen Kultur als auch bei der dynamischen Kultur muss unabhängig von der Fließgeschwindigkeit zur Vitalitätserhaltung das Medium regelmäßig gewechselt werden, da bestimmte Bestandteile des Kulturmediums einschließlich aller Zusätze unter Kulturbedingungen zerfallen (Lindl, Gstraunthaler, 2008).

Zellen und Gewebe in Kultur verlieren häufig nach kurzer Zeit für sie typische Eigenschaften (Minuth, et al., 1995). Die Veränderungen von morphologischen, biochemischen und physiologischen Eigenschaften in einer Kultur werden als zelluläre Dedifferenzierung bezeichnet. Bisher wurde kein kultiviertes Gewebe gefunden, das während einer längerfristigen Kultur keine Veränderungen durch

zelluläre Dedifferenzierung aufzeigt (Minuth, et al., 2002). Um eine Entwicklung zu nicht spezialisierten Zellen zu verhindern und möglichst viele Eigenschaften von funktionellen Zellen aufrecht zu erhalten, müssen die Kulturbedingungen optimal angepasst werden. Dabei haben Zellen jeden Gewebes ihre speziellen Anforderungen. Die zelluläre Dedifferenzierung unter Kulturbedingungen hat verschiedene Ursachen. Sie beginnt schon während der Isolierung von Zellen aus einem Gewebeverband. Bei der Isolierung geht die typische Struktur und Beziehung der Zellen zur extrazellulären Matrix verloren. Daher runden sich die Zellen ab, wenn sie aus einem Gewebe herausgelöst werden. Nimmt man die Zellen in Kultur, so haften sie sich an den Boden der Kulturschale an. Dabei flachen sie im Vergleich zur ursprünglichen Gestalt im Gewebe untypisch ab. Die einzelnen Zellen verschiedener Gewebearten gleichen sich dann sehr und sind mikroskopisch kaum noch voneinander zu unterscheiden (Minuth, et al., 2003). Die sichtbare morphologische Dedifferenzierung ist mit vielfältigen funktionellen Änderungen an der Zelle verbunden. Um eine Differenzierung von isolierten Zellen in-vitro zu erreichen, muss ein natürliches Umfeld nachgeahmt werden, welches dem Gewebe entspricht, aus welchem die Zellen isoliert wurden. Funktionelle Aufgaben der natürlichen Extrazellulärmatrix, wie gewebespezifische Verankerung oder gewebespezifische räumliche Organisation der Zellen, müssen beim Tissue Engineering z. B. durch ein geeignetes Zellträgermaterial ersetzt werden (Minuth, et al., 2002).

2.2 Scaffolds

Im Folgenden wird auf die Aufgaben der Scaffolds eingegangen und Scaffoldmaterialien beschrieben, die aus Polymeren oder aus Keramiken auf Calciumphosphat-Basis, speziell Monetit, bestehen.

2.2.1 Aufgaben der Scaffolds

Ein dreidimensionales Zellträgermaterial wird als Scaffold bezeichnet. Die Auswahl eines Scaffolds hängt zunächst einmal vom Gewebe ab, welches generiert werden soll (Minuth, et al., 2002). Sowohl die Mikro- als auch die Makroarchitektur beeinflussen Eigenschaften der Scaffolds, wie mechanische Stabilität oder Porosität, und damit die Gewebegenerierung (Ewers, et al., 2003). Weitere

wichtige Charakteristika von Biomaterialien sind die Abbaubarkeit, die chemischen Eigenschaften der Oberfläche (Roach, et al., 2006) oder die Biokompatibilität.

Gewebe sind Verbände gleichartig differenzierter Zellen und ihrer sezernierten extrazellulären Matrix. Die Extrazellulärmatrix ist ein Netzwerk bestehend aus Kollagenen, Glykoproteinen und Proteoglykanen. Zellen und Extrazellulärmatrix sind in allen Gewebearten in qualitativ und quantitativ unterschiedlicher Weise zusammengesetzt. Im Binde- und Stützgewebe hat die extrazelluläre Matrix den größten relativen Anteil am Volumen und ihre mechanischen Funktionen sind hier besonders offensichtlich. Aber die Extrazellulärmatrix dient nicht nur als reine dreidimensionale Gerüstsubstanz, sondern fungiert auch als gewebespezifische Umgebung. Sie transportiert Nährstoffe und Abbauprodukte und steuert Zellverankerung und Zellfunktionen (Minuth, et al., 2002). Dies wird durch verschiedene Mechanismen bewirkt. Zwischen der Extrazellulärmatrix und den einzelnen Gewebezellen, speziell dem Zytoskelett und dem Zellkern, besteht eine enge strukturell-funktionelle Beziehung. Die Extrazellulärmatrix steht in Kontakt mit verschiedenen Zelloberflächenrezeptoren, z. B. den Cadherinen und den Integrinen (Anselme, 2000). Integrine sind transmembranöse Proteine, die aus zwei nicht-kovalent gebundenen heterodimeren Glycoproteinketten, einer α - und einer β -Untereinheit, bestehen. Beim Menschen wurden mittlerweile 16 α - und 8 β -Untereinheiten identifiziert, aber nicht alle Integrinkombinationen treten in der Natur auf (Benninghoff, Drenckhahn, 2002). Für zahlreiche Kombinationen konnten inzwischen hochspezifische Funktionen gefunden werden. Integrine binden spezifisch an bestimmte Proteine der Extrazellulärmatrix, wobei als Liganden eines Integrins verschiedene Arten von Extrazellulärmatrixproteinen fungieren können. Sie vermitteln zum einen Signale von der Extrazellulärmatrix über die Zellmembran ins Zellinnere („outside-in signaling“), welche über Signalkaskaden im Inneren der Zelle Regulationssysteme aktivieren oder inhibieren und so die Genexpression im Zellkern beeinflussen (Minuth, et al., 2003). Zum anderen vermitteln sie auch Rückkopplungsprozesse des Zellinneren an die Extrazellulärmatrix („inside-out signaling“) (Giancotti, Ruoslahti, 1999). Im Wesentlichen sind alle Funktionen der Integrine an der Steuerung

von Zellwachstum und Differenzierung beteiligt und sie haben somit eine enorme Bedeutung für das Tissue Engineering.

Als Beispiel für einen Einfluss der Integrine an der Steuerung von Zellwachstum und Differenzierung sei ihre Beteiligung am Migrationsverhalten von Zellen genannt (Daum, 2004). Um Migration und homogene Zellbesiedlung zu erreichen, sind viele eukaryotische Zellen, wie zum Beispiel bestimmte Zelltypen der Bindegewebe, zur amöboiden Bewegung befähigt (Schäfer, et al., 2009). Dabei schieben die an der Unterlage angehefteten Zellen einen zungenförmigen Ausläufer, genannt Lamellopodium, vor, aus dem rostral noch spitze Fortsätze, genannt Filopodien, hervorragen. Lamello- und Filopodien enthalten dichte Gerüste aus Aktinnetzen bzw. -bündeln. Filopodien sondieren durch wachsende Aktinfilamente vorangetrieben an der Front die Umgebung nach geeigneten Voraussetzungen für eine Anheftung an Extrazellulärmatrix und Substrat. Hat ein Filopodium eine geeignete Bindungsstelle gefunden, werden durch eine Signaltransduktion innerhalb der Zelle vermittelt in dieser Region der Zelle mehr Integrinrezeptoren exprimiert (Roach, et al., 2006), welche mit der Wachstumsunterlage in Kontakt treten. Durch koordiniertes Anhaften und Lösen von Kontaktpunkten bewegt sich die Zelle auf der Matrix fort. In einer Zellkultur finden Migration und homogene Zellbesiedelung auf Scaffolds nur statt, wenn sich die Oberfläche der Scaffolds dafür eignet. Dabei sind sowohl keine Adhesion als auch eine zu starke Bindung an die Oberfläche ungünstig. Eine Situation zwischen diesen beiden Extremen ist die beste Voraussetzung für eine gesunde Zellkultur (Roach, et al., 2006).

Bei einer optimalen Gewebeentwicklung im Organismus findet eine intensive Interaktion mit der natürlichen Extrazellulärmatrix statt (Minuth, et al. 2003). Um eine Entwicklung funktioneller Gewebe unter in-vitro Bedingungen zu erhalten, müssen Aufgaben der natürlichen Extrazellulärmatrix durch die Auswahl eines geeigneten Trägermaterials als Wachstumsunterlage übernommen werden (Ewers, et al., 2003).

Da die Zellen auf dem Scaffold zuerst anhaften und dann damit interagieren, muss die Oberfläche so beschaffen sein, dass sie optimale Anheftungsplätze

bietet. Dies wird von chemischen und physikalischen Eigenschaften der Oberflächen bestimmt, welche für jedes Biomaterial spezifischer Natur sind (Roach, et al., 2006). Kommt ein Scaffold mit Gewebeflüssigkeit oder einer Zellsuspension in Kontakt, so findet innerhalb von Nanosekunden bis Minuten eine Proteinadsorption statt, welche von den chemischen und physikalischen Eigenschaften des Scaffolds und dessen Oberflächentopographie abhängt. Während der nächsten Stunden bis Tage können dann oberflächengebundene Proteine Zelladhäsion vermitteln, falls sie eine passende Orientierung und Konformation aufweisen, um mit Zellrezeptoren zu interagieren (Roach, et al., 2006). Nur diese spezifische Verankerung ermöglicht die für die Differenzierung notwendigen Informationen ins Zellinnere zu übertragen. Trägermaterialien mit benetzbaren, hydrophilen Oberflächen sind geeigneter als solche mit hydrophoben (Minuth, et al., 2003).

Die Interaktion von Zelle und Biomaterial hängt auch von der Porosität in Kombination mit einem großen Oberflächen/Volumen Verhältnis ab (Hunziker, 2002). Die Architektur innerhalb des Scaffolds muss so beschaffen sein, dass eine Zellmigration und eine homogene Zellbesiedelung sowie Diffusionsvorgänge für Nährstoffe und Abbauprodukte ermöglicht werden. Nach einer Transplantation muss eine schnelle Einsprossung von Gefäßen erfolgen können (Ewers, et al., 2003). Um eine differenzierte Funktion von Osteoblasten aufrecht zu erhalten, sollte eine O₂-Diffusionsstrecke weniger als 200 bis 300 µm aufweisen (Borden, 2003).

Für die Generierung von Bindegeweben müssen Innenräume des Scaffolds besiedelt werden können, so dass sich eine natürliche dreidimensionale Anordnung der Zellen entwickeln kann. Nur bei homogener Verteilung der Zellen kann auch eine mechanisch belastbare Extrazellulärmatrix aufgebaut werden (Minuth, et al. 2003).

Außerdem sollte das Scaffold zur Generierung von Hartgewebe ein stabiles Gerüst darstellen, das den mechanischen Belastungen des jeweils zu ersetzenden Knochens standhält und den Defekt optimal ausfüllt. Zudem muss es biokompatibel sein und darf nach der Implantation im umgebenden Empfänger-

gewebe keine toxischen Auswirkungen haben oder übermäßige Immunreaktionen hervorrufen (Hunziker, 2002).

Wird ein bioabbaubares Zellträgermaterial verwendet, hat es nur eine temporäre Gerüstfunktion. Die implantierten Zellen bilden zunehmend ihre eigene und vor allem gewebespezifische extrazelluläre Matrix, während die artifizielle Matrix abgebaut wird. Nach vollständiger Resorption der Scaffolds verbleibt ausschließlich das von den Zellen selbst synthetisierte Gewebe zurück. Die Degradations- und Resorptionskinetik muss jedoch auf das zu regenerierende Gewebe abgestimmt werden (Ewers, et al., 2003). Ein zu rascher Abbau würde die Regeneration behindern und zu einer Akkumulation von Abbauprodukten des Konstruktes führen. Für die Versorgung von großvolumigen und biomechanisch belasteten Knochendefekten sollten Zellträgerstrukturen eingesetzt werden, die mindestens sechs Monate ihre mechanischen Eigenschaften beibehalten (Ewers, et al., 2003). Dabei muss jedoch bedacht werden, dass die Resorptionsraten von individuellen Faktoren wie dem Gesundheitszustand und Alter des Patienten, aber auch vom Implantationsort und dessen Durchblutung abhängen. Solange die Biodegradation nicht punktuell und individuell gesteuert werden kann, werden auch weiterhin nicht oder nur sehr langsam abbaubare Biomaterialien verwendet (Diederichs, 2008).

Um ein optimales Scaffoldmaterial für die jeweilige Gewebeherstellung zu finden, müssen zahlreiche Testserien zuerst mit Zelllinien und dann mit Primärkulturen durchgeführt werden (Minuth, et al., 2003).

2.2.2 Natürliche und synthetische Polymere, Keramiken

Eine große Anzahl an Materialien wurde in vergangenen Jahren für das Tissue Engineering von Knochen experimentell erprobt. Hauptsächlich verwendet werden natürliche Polymere – wie z. B. Kollagen, Fibrin oder Gelatine – oder synthetische Polymere – wie z. B. Polylactat oder Polyglycolat – und Keramiken auf Calciumphosphat-Basis. Bei den Keramiken auf Calciumphosphat-Basis unterscheidet man z. B. Hydroxylapatit, β -Tricalciumphosphat, Bruschit oder Monetit. Hydroxylapatit kann sowohl synthetisch hergestellt werden als auch

aus Naturprodukten, wie aus den Kalkskeletten von Korallenpolypen, gewonnen werden (Le Geros, 1988).

Polymere Werkstoffe können nach der Besiedelung mit Zellen innerhalb kurzer Zeit oft noch während der Zellkulturphase oder aber im Körper degradiert werden. Bei Verwendung dieser Materialien hat das Trägergerüst nur die Funktion, den Zellen und der extrazellulären Matrix als dreidimensionale Schablone zu dienen, bis sie zu einem zusammenhängenden Verbund gewachsen sind. Zu diesem Zeitpunkt besitzt das nur gering ausgebildete Gewebe eine eingeschränkte Funktion und Struktur. Erst nach längerfristiger Interaktion und Umbau nach Transplantation können die Aufgaben körpereigenen Gewebes übernommen werden. Solche Trägergerüste sind bei der Züchtung von Hautersatz und von spongiosaähnlichen Knochenfragmenten klinisch erfolgreich angewandt worden (Ewers, et al., 2003).

Natürliche Polymere auf kollagener Basis sind eine ideale Unterstützung für die Regenerierung von Gewebe (Lee, Singla, Lee, 2001). Eine Zugabe von auf Calcium-Phosphat basierender Keramik kann die mechanischen Eigenschaften von Kollagen-Scaffolds verbessern und erhöht die Bioaktivität des Materials. Die Wiederherstellung der mechanischen Eigenschaften und der komplexen strukturellen Organisation von Knochen wurden jedoch bis jetzt noch nicht erreicht (Roach, et al., 2006). Außerdem ist reines Kollagen Typ I, welches eine sehr attraktive Oberfläche für osteoblastäre Zellen bietet (Ripamonti, et al., 1993; Sampath, Reddi, 1981), sehr teuer und mit den Risiken von extrahiertem Kollagen, wie z. B. Übertragung von BSE (bovine spongiforme Enzephalopathie), behaftet (Lee, Singla, Lee, 2001).

Breite Anwendung finden synthetische Polymere aus Poly(α -hydroxy)säuren wie Poly(ϵ -caprolacton-co-D,L-lactid)-Seide und Homo- oder Heteropolymere aus Polylactat (PLA), Polyglycolat (PGA) und Polylactat-co-glycolat (PLGA). Diese aliphatischen Polyester lassen sich bakteriell herstellen, wobei bei der Herstellung von PGA/PLA-Copolymeren die physikalischen und chemischen Eigenschaften durch Variation von Lactid- und Glycolidanteilen verändert werden können (Minuth, et al., 2003). Poly(α -hydroxy)säuren sind biodegradierbare

Polymere, die defektangepasst zurechtgeschnitten und so bearbeitet werden können, dass ihr Degradationsverhalten und die physikalischen Eigenschaften kontrolliert werden können. Aber ihnen fehlen die bioaktiven Eigenschaften, welche sie zu hervorragenden Materialien zum Implantieren in Hartgewebe machen würden (Roach, et al., 2006).

Keramiken können resorbierbar und nicht resorbierbar sein. Als nicht resorbierbar wird beispielsweise Hydroxylapatit, als resorbierbar beispielsweise Tricalciumphosphat bezeichnet (Barralet, et al., 2001). Keramische Materialien sind dafür bekannt, die osteogene Differenzierung von Osteoblasten und ihren Vorläuferzellen zu beschleunigen (Marten, et al., 2008).

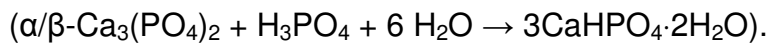
2.2.3 Calciumphosphat-Scaffolds

Knochen enthält einen hohen Anteil an Calciumphosphat. Die Mineralsubstanz des Knochens besteht zu 60-70% aus nanokristallinem Hydroxylapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). Neben Hydroxylapatit lassen sich auch noch Bruschit und Calciumpyrophosphat, die ebenfalls Stoffe auf Calciumphosphat-Basis sind, in der mineralisierten Knochenmatrix nachweisen. Wegen dieser, der mineralischen Phase des Knochens ähnlichen, chemischen Zusammensetzung werden Scaffolds aus Calciumphosphat-Keramiken entwickelt.

Die meisten Scaffolds aus Keramiken basieren auf Calciumsalzen aus Orthophosphorsäure, wie z. B. Hydroxylapatit, β -Tricalciumphosphat, Bruschit oder Monetit (Gbureck, et al., 2008). Variationen bei der Herstellung von Calciumphosphat-Scaffolds führen zu unterschiedlichen Löslichkeits- und Präzipitationsverhalten sowie zu unterschiedlichen mechanischen Eigenschaften und Oberflächentopographien, was die Gewebegenerierung beeinflusst.

Eine Möglichkeit Calciumphosphat-Scaffolds für das Tissue Engineering herzustellen ist sie mit dem 3D Powder Printing System zu drucken. So erhält man Scaffolds mit einer definierten chemischen Zusammensetzung und Architektur, einschließlich präziser Mikrostruktur. Die Scaffolds können computerunterstützt zumindest teilweise in einer gewünschten Form gefertigt werden (Klammert, et al., 2008). Während des Druckens reagiert biphasisches α/β -Tricalciumphosphat ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) mit einer Phosphorsäurelösung und bildet

Dicalciumphosphatdihydrat ($\text{CaHPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, DCPD, Bruschit) und unreaktiertes Tricalciumphosphat



Die anschließende Nachbehandlung der gedruckten Scaffolds in Phosphorsäure verringert den Anteil an unreaktiertem Tricalciumphosphat, was die Härte der Scaffolds erhöht. Da Bruschit Kristallwasser abgibt, wenn es über 50 °C erhitzt wird, bildet sich nach thermischer Behandlung, z. B. auch während eines Autoklaviervorgangs, Dicalciumphosphatanhydrat (CaHPO_4 , DCPH, Monetit) (Klammert, et al., 2008).

2.2.4 Monetit-Scaffolds

Monetit-Scaffolds, wie sie in dieser Arbeit verwendet werden, unterscheiden sich von anderen Calciumphosphat-Scaffolds hinsichtlich Eigenschaften wie Resorption, Porosität und mechanischer Stabilität.

Die Resorption von implantiertem Calciumphosphat kann auf zwei verschiedene Weisen erfolgen. Osteoklasten resorbieren implantiertes Calciumphosphat aktiv, indem sie den pH-Wert in Resorptionslakunen durch Protonenpumpen stark absenken und so auch das niedrig lösliche Hydroxylapatit (Rosen, Ackermann, 1991) abbauen können. Bei der passiven Resorption dagegen wird Calciumphosphat durch chemische Hydrolyse vermittelt durch Körperflüssigkeiten abgebaut (Gbureck, et al., 2007). Unter physiologischen Bedingungen ist dies aufgrund der höheren Löslichkeit nur bei Bruschit und Monetit zu beobachten, nicht aber bei Hydroxylapatit. Hydroxylapatit wird daher als nicht degradierbar bezeichnet (Gbureck, et al., 2007).

Die passive Resorptionsrate von Monetit ist in-vivo gegenüber der von Bruschit erhöht, obwohl die chemische Löslichkeit von Monetit geringer ist. Dies wurde in einer 56-wöchigen intramuskulären Implantation gezeigt (Gbureck, et al., 2007). Ein Grund für die schnellere Degradation von Monetit gegenüber Bruschit in-vivo könnte sein, dass Bruschit manchmal mit einer Hydroxylapatitphase innerhalb des Materials verbunden ist. Dieses Verhalten wird auf einen geringeren Flüssigkeitsaustausch innerhalb der porösen keramischen Struktur

zurückgeführt. Wegen der höheren Löslichkeit von Brushit wird die Flüssigkeit in den Poren innerhalb des Implantats übersättigt, so dass Hydroxylapatit als kristalline Phase präzipitiert. Daher reduziert sich wegen der geringeren Löslichkeit von Hydroxylapatit die Degradationsgeschwindigkeit von Brushit. Diese schwerlösliche Hydroxylapatitphase kommt jedoch nicht in Monetitimplantaten vor (Klammert, et al., 2008).

Die Porosität von Monetit erhöht sich durch die hydrothermale Konversion bei der Herstellung um ungefähr 13% auf 43,8% und die Härte vermindert sich auf 15 MPa (Klammert, et al., 2008). Daraus resultiert eine veränderte Oberflächentopografie der gedruckten Scaffolds, was Adhäsion, Proliferation und Differenzierung der Osteoblasten in-vitro beeinflusst (Rea, et al., 2004; Dos Santos, et al., 2009). Vergleicht man Monetit-Scaffolds und Brushit-Scaffolds bezüglich Adhäsions-, Proliferations- und Differenzierungsverhalten der Osteoblasten in-vitro, so erzielt Monetit leicht schwächere Ergebnisse (Klammert, et al., 2009).

2.3 Stimulation

Um die Verteilung, Proliferation und Differenzierung von Zellen unter Kulturbedingungen zu steuern, werden biologische Stimuli, wie z. B. Differenzierungs- und Wachstumsfaktoren, und mechanische Stimuli, wie z. B. durch Flüssigkeit induzierter Scherstress, eingesetzt.

2.3.1 Biologische Stimulation

Eine Vielzahl unterschiedlicher bioaktiver Moleküle werden beim Tissue Engineering von Knochen eingesetzt, z. B. Knochenmorphogenese-Proteine (bone morphogenetic proteins, BMPs). BMPs sind Mitglieder der TGF- β (transforming growth factor- β) Superfamilie und sind unter anderem für die Skelettentwicklung wichtig. BMP-2,-4,-6 und -7 liegen in der Knochenmatrix gebunden vor und können eine ektopische Knochenbildung induzieren (Benninghoff, Drenckhahn, 2002). BMP-2,-4,-6 und -7 sind diejenigen mit der stärksten osteoinduktiven Wirkung (Yoon, Boden, 2002). Der osteogene Differenzierungsfaktor BMP-7 wurde bereits in kontrollierten klinischen Studien getestet (Kanayama et al., 2006).

Bioaktive Moleküle können bei Herstellung von Scaffolds durch Druck mit dem 3D Powder Printing System unter niedriger Temperatur als Mischungsbestandteil zugefügt werden (Gburek, et al., 2007). Sie können auch an der Oberfläche der Scaffolds immobilisiert bzw. in die poröse Struktur eingebacht werden, um kontrolliert freigesetzt zu werden (Kuboki, et al., 1998; Liu, Degroot, Hunziker, 2005).

Eine biologische Stimulation mit Dexamethason, einem synthetischen Glucocorticoid, welches einen starken osteoinduktiven Effekt ausübt, kann auch synergistisch zu einer mechanischen Stimulation wirken. In einer Studie (Holtorf, et al., 2005) wurden BMSCs mit und ohne Dexamethason unter statischen und dynamischen Bedingungen kultiviert. Das Applizieren von Flüssigkeitsscherstress alleine war ausreichend, um eine erhöhte Alkalische Phosphatase Aktivität zu induzieren. Allerdings wurden die höchsten Werte erreicht, wenn sowohl Flüssigkeitsscherstress als auch Dexamethason vorhanden waren. Auch der Mineralisationsgrad der von den Zellen abgeschiedenen Extrazellulärmatrix war im dynamischen Kultursystem mit Dexamethason am höchsten, aber auch in der reinen Perfusionskultur signifikant erhöht. Der Osteopontinspiegel in der reinen Perfusionskultur war lediglich gegenüber der statischen Kontrollkultur ohne Dexamethason erhöht.

2.3.2 Mechanische Stimulation

Neben biologischen Stimuli werden auch mechanische Stimuli während der in-vitro Kultivierung eingesetzt. Verschiedene mechanische Stimulationsverfahren, wie z. B. Dehnung (Nöth, et al., 2005; Vunjak-Novakovic, et al., 2004) oder Kompression (Mauck, et al., 2007; Valhmua, et al., 1998), niederenergetisch gepulster Ultraschall (Schumann, et al., 2006), Flüssigkeitsscherstress aber auch der O₂-Partialdruck (Kurz, et al., 2004) können auf die Entwicklung artifizierlicher Gewebekonstrukte Einfluss nehmen.

Die Wahl des Stimulationsverfahrens wird dabei von dem jeweils zu generierenden Gewebe bedingt und an die in-vivo vorherrschenden Kräfte angepasst. Zum Beispiel wird zur Generierung von Endothelgewebe ein Flüssigkeitsscherstress (Ratcliffe, 2000) induziert. Dehnung wird z. B. zur Herstellung von Seh-

nen und Bändern verwendet. Zur Generierung von Knorpelkonstrukten bedient man sich dagegen der Kompression. In-vitro kultivierte Knochenzellen reagieren auf eine Vielzahl verschiedener mechanischer Stimuli.

Osteozyten sind inaktive Osteoblasten und werden von mineralisierter Knochenmatrix umschlossen, welche sich ringförmig in Lamellen um ein ernährendes Blutgefäß anordnet. Zwischen den Lamellen liegen linsenförmige Lakunen, von denen zahlreiche Knochenkanälchen, die Canaliculi abgehen. In den Lakunen liegen die Zellkörper der Osteozyten, über die Canaliculi stehen die Zellen untereinander in Verbindung. Die Hohlräume werden allerdings nicht vollständig von den Zellen ausgefüllt, sondern eine schmale Zone, die interstitielle Flüssigkeit enthält, bleibt frei. Dieses Hohlräumlabirinth durchzieht die ganze mineralisierte Matrix. In-vivo werden die Umbauprozesse des Knochens durch belastungsinduzierte Flüssigkeitsströme modifiziert. Bei mechanischer Belastung des Knochens entsteht innerhalb der Lakunen und Canaliculi ein Druckgradient, der die interstitielle Flüssigkeit durch das Kanalsystem pumpt. Diese erzeugte Strömung stimuliert die Osteozyten. Die Osteozyten sind die Zellen, welche die mechanische Belastung des Knochens wahrnehmen, verarbeiten und weiterleiten und somit die Rolle von Mechanosensoren übernehmen (Burger, Klein-Nulend, 1999; Duncan, Turner, 1995).

Knochen wird ständig nach den Anforderungen der mechanischen Belastung umgebaut. Wird z. B. die Muskulatur durch Training verstärkt, so reagiert der Knochen als Muskelansatz mit Dickenwachstum. Inaktivität wie Bettlägerigkeit hingegen führt rasch zu einem Verlust an Knochenmasse. Auch die Belastungsminderung bei Astronauten durch den Wegfall der Schwerkraft führt zu diesem Resultat (Buckwalter, et al., 1996; Sikavitsas, et al., 2001).

Um kultivierte Knochenzellen zu stimulieren, können verschiedene Verfahren angewandt werden. Flüssigkeitsscherstress imitiert die Flüssigkeitsströme in den Canaliculi. Kompression oder Dehnung bewirkt den Effekt von durch die Muskulatur ausgeübten Kräften. Aktuelle Studien zeigen, dass Flüssigkeitsströmung einen potentiell stärkeren Stimulus für die Differenzierung von Kno-

chenzellen darstellt als Kompression (Klein-Nulend, et al., 1995) oder Dehnung (Owan, et al., 1997; Smalt, et al., 1997).

Verschiedene Mechanismen wurden diskutiert auf welche Weise Knochenzellen durch Flüssigkeitsströme stimuliert werden können. Beispielsweise wurde der Einfluss von Strömungspotentialen (Pienkowski, Pollack, 1983; Pollack, et al., 1984), von Scherstress an der Zellmembran (Reich, Gay, Frangos, 1990) und von Chemotransporteffekten (Jacobs, et al., 1998) untersucht. Aktuelle Studien (Sikavitsas, et al., 2003; Bakker, et al., 2001) zeigen, dass Scherstress an der Zellmembran den signifikantesten stimulierenden Einfluss der mechanischen Stimulation durch Flüssigkeitsströmung hat. Dies wurde in Experimenten bewiesen, die unter Verwendung von mit Dextran modifizierten Kulturmedien durchgeführt wurden. Dextran im Kulturmedium erhöht dessen Viskosität, was einen erhöhten Scherstress erzeugt, aber die Strömungspotentiale oder den Chemotransport nicht beeinflusst.

Die Mechanotransduktion, also die Art, wie die physikalischen Kräfte von den Knochenzellen wahrgenommen und weitergeleitet werden und letztendlich zu einer zellulären Antwort führen, sind noch nicht hinreichend geklärt. Vermutlich gelangt der Reiz über mechanosensitive Ionenkanäle ins Innere der Zelle, wo Signaltransduktionskaskaden die Genexpression im Zellkern beeinflussen. Dies führt zu vermehrter Synthese osteoblastenspezifischer Wachstums- und Differenzierungsfaktoren. Über autokrin und parakrin wirkende Mechanismen werden benachbarte und weiter entfernte Zellen beeinflusst. Über Gap junctions sind eine Vielzahl von Osteozyten chemisch und elektrisch gekoppelt, was die Sensitivität und Selektivität im Vergleich zu isolierten Zellen erhöht (Zhang, Cowin, Weinbaum, 1997).

Um eine Zellkultur einer Flüssigkeitsströmung auszusetzen, kann eine Perfusionskultur etabliert werden.

2.3.3 Perfusionskultur

Die Generierung von differenzierten Zellen und ihre Erhaltung für längere Zeit stellen eine experimentelle Herausforderung dar. Während statische Zellkulturen ein Wachstum in Monolayern für eine relativ kurze Dauer mit regelmäßigem, aber intermittierendem Mediumwechsel ermöglichen, muss beim Tissue Engineering erreicht werden, dass Zellen in-vitro in komplexen dreidimensionalen Strukturen über ausgedehnte Zeiträume kultiviert werden können. Dafür eignet sich eine Perfusionskultur. In einer Perfusionskultur wird ein Perfusionscontainer, welcher dreidimensionale offenporige mit Zellen besiedelte Scaffolds enthält, mit Kulturmedium durchströmt.

Das statische Milieu einer Kulturschale bietet den Zellen auf einem dreidimensionalen Scaffold nur unzulängliche Bedingungen. Die Stimulation durch Flüssigkeitsscherstress, eine homogene Verteilung der Zellen, die Nähr- und Sauerstoffversorgung und der Abtransport von Metaboliten sind in statischen Kulturen limitiert. Die Nähr- und Sauerstoffversorgung und der Abtransport von den Stoffwechsel schädigenden Metaboliten erfolgen nur durch Diffusion (Diederichs, 2008). Mit dieser Einschränkung kann Gewebe nur bis zu einer Schichtdicke von ca. 1 mm ernährt werden (Minuth, et al., 2003). Dicht und mehrschichtig bewachsene Konstrukte können sich nicht bilden, weil Zellen im Inneren unterversorgt bleiben und absterben. Nur auf der Oberfläche der Scaffolds überlebt eine Zellschicht in der von ihr abgesonderten Extrazellulärmatrix (Diederichs, 2008). So wird keine gleichmäßige dreidimensionale Besiedelung der Scaffolds erreicht, was die Eigenschaften des Konstruktes nicht an die von nativem Gewebe heranreichen lässt.

Eine dynamische Kultur bietet verbesserte Kulturbedingungen. Unter anderem wird die Versorgung durch Diffusion um konvektive Prozesse ergänzt. So können sowohl das Nährstoffangebot als auch der Abtransport von den Stoffwechsel schädigenden Metaboliten, die zellulären Ursprungs sein können oder durch Biodegradation der Scaffolds entstehen, optimiert werden. Die Metaboliten können nicht akkumulieren und werden durch das zirkulierende Medium auf einem gleichmäßigen Niveau gehalten. Daher bleiben auch die Zellen im Inne-

ren des Scaffolds vital und durch die Dynamik ist die Verteilung der Zellen und der extrazellulären Matrix im Konstrukt homogener als in einer statischen Kultur (Li, et al. 2001; Bancroft, et al., 2002). So konnten erstmals Gewebekonstrukte generiert werden, die dicker als einen Millimeter waren (Diederichs, 2008).

Für das Tissue Engineering von funktionellem Knochengewebe eignen sich Perfusionskulturen (Jansen, et al., 2006; Freshney, et al., 2007; Bancroft, et al., 2002). Dabei spielt auch die Höhe der Fließgeschwindigkeit des Kulturmediums eine Rolle. In einer Studie (Bancroft, et al., 2002) wurden BMSCs auf 3D Scaffolds von unterschiedlichen Fließgeschwindigkeiten zwischen 64 $\mu\text{m/s}$ und 640 $\mu\text{m/s}$ durchströmt und über einen 16-tägigen Zeitraum kultiviert. Nach 16 Tagen konnten Eigenschaften von reifen Osteoblasten in Abhängigkeit von der Perfusionsrate beobachtet werden. Es bestand eine direkte Korrelation zwischen der Höhe der Fließgeschwindigkeit und den Calciumablagerungen innerhalb der Scaffolds. Alkalische Phosphatase wurde in der Perfusionskultur gegenüber der statischen Kultur vermehrt synthetisiert, wobei die Enzymaktivität unabhängig von der Perfusionsrate war. Osteopontin, welches ein Marker im Frühstadium der Osteogenese ist, indizierte beschleunigte osteogene Prozesse in der Perfusionskultur. Die Osteopontinspitzen wurden bei höherer Fließgeschwindigkeit früher erreicht.

In einer weiteren Studie (Sharp, et al., 2008) wird gezeigt, dass in dynamischen Kultursystemen nicht nur die Fließgeschwindigkeit, sondern auch die Pulsierung des Mediums eine Auswirkung auf das Zellwachstum hat. Dabei wurde der Einfluss von pulsierender Perfusion durch die Quantifizierung von mRNA (für Kollagen 1 α 1, Osteopontin, Osteocalcin und Bone Sialoprotein) ermittelt: BMSCs wurden nach 6-tägiger Expandierung unter osteogenen Bedingungen statischen Kulturbedingungen, kontinuierlicher Perfusion oder pulsierender Perfusion mit Frequenzen von 0.015, 0.044 oder 0.074 Hz ausgesetzt. Nach 24-stündiger Stimulierung wurden die Zellen für weitere 13 Tage in einem statischen Kultursystem kultiviert und anschließend die Kollagen 1 α 1, Osteopontin, Osteocalcin und Bone Sialoprotein exprimierende mRNA analysiert. Alle mRNA-Spiegel waren durch Perfusion erhöht, die Osteocalcin und Bone Sia-

loprotein exprimierende mRNA-Werte waren durch pulsierende Perfusion noch höher als bei kontinuierlicher Perfusion.

Innerhalb eines Kulturcontainers herrschen für die einzelnen Scaffolds unterschiedliche Wachstumsbedingungen. Um die für das Zellwachstum optimale Position der Scaffolds innerhalb eines Kulturcontainers zu ermitteln, könnte ein Strömungsmodell in einem virtuellen dynamischen Kultursystem verwendet werden. Solche Strömungsmodelle wurden beispielsweise auch in einer Studie (Xu, et al., 2008) verwendet, um den optimalen Scherstress für Zellen zu ermitteln, unabhängig von der den Scherstress beeinflussenden Makro- und Mikroarchitektur der Scaffolds: Man untersuchte zellbesiedelte Scaffolds, die in dynamischen Systemen kultiviert wurden, histologisch. Aufgrund der unterschiedlichen biophysikalischen Bedingungen innerhalb eines Scaffolds wiesen sie inhomogene Zellbesiedlungen auf. Gleichzeitig simulierte man in einem virtuellen dynamischen Kultursystem Strömungsmodelle, ermittelte den erzeugten Scherstress innerhalb der Scaffolds und verglich das Scherstressprofil mit den histologischen Ergebnissen. So konnte der Scherstress herausgefunden werden, der zu optimalen Wachstumsbedingungen führt.

In einer weiteren Studie (Jungreuthmayer, et al., 2009) wurden die optimalen Fließgeschwindigkeiten unter Verwendung von Scaffolds unterschiedlicher Materialien, nämlich CaP-Scaffolds und Kollagenglycosaminoglycan-Scaffolds (CG-Scaffolds) durch ein Strömungsmodell ermittelt. Das Experiment zeigte, dass bei gleicher Fließgeschwindigkeit der induzierte Scherstress innerhalb der beiden Scaffolds sehr unterschiedlich ist. So war er in den CG-Scaffolds 2,8-mal höher als in den CaP-Scaffolds, was auf unterschiedliche Makro- und Mikroarchitektur der Scaffolds zurückzuführen ist. Um die Mehrheit der Zellen mit einem physiologisch relevanten Scherstress zu versorgen, muss die Fließgeschwindigkeit dem Scaffoldmaterial angepasst werden, wozu eine Strömungssimulation in einem virtuellen dynamischen Kultursystem sehr geeignet ist.

3 Material und Methoden

3.1 Verbrauchsmaterialien und Laborgeräte

Die verwendeten Verbrauchsmaterialien werden in Tabelle 1, die verwendeten Laborgeräte Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 1: Verwendete Verbrauchsmaterialien

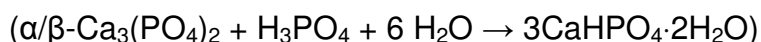
Verbrauchsmaterial	Herkunft
6-Well-Multischalen	Fa. Nunc, Wiesbaden
24-Well-Multischalen	Fa. Nunc, Wiesbaden
Autoklaventüten	Fa. Wipak Medical, Walsrode
Gewebekulturschalen	Fa. Nunc, Wiesbaden
Ilford Schwarz Weiß Film	Fa. Le Bon Image, Kriffel
Mikrowellplatten, 96-Well-Format	Fa. Nunc, Wiesbaden
Pasteurpipetten	Fa. Scherf, Meiningen
Pipettenspitzen	Fa. Hartenstein
Zählröhrchen, Polystrol	Fa. Hartenstein
Zellkulturflaschen	Fa. Falcon, Heidelberg

Tabelle 2: Verwendete Laborgeräte

Geräte	Herkunft
3D Powder Printing System	Fa. Z-Corporation, Burlington, USA
Analysenwaage	Fa. Scaltec Instruments, Heiligenstadt
Autoklav Tuttnauer 3870 ELV	Fa. Systec, Wettenberg
Baltec Critical Point Dryer CPD 030	Fa. BAL-TEC, Schalksmühle
Bechergläser	Fa. Schott, Mainz
Brutschrank	Fa. Jouan, Unterhaching
Emitech K550 Sputter Coater	Fa. Emitech, Kent, UK
Eppendorfpipetten	Fa. Eppendorf, Hamburg
Folienschweißgerät	Fa. Dürr Dental, Bietigheim-Bissingen
Glasschalen	Fa. Hartenstein, Würzburg
Kühl-Gefrierkombination	Fa. Bosch, Stuttgart
Labormikroskop	Fa. Leitz, Wetzlar
Peristaltische Pumpe Gilson Minipuls 3	Fa. Gilson SAS, Villiers-le-Bel, Frankreich
Photometer Spectrafluor Plus	Fa. Tecan, Crailsheim
Pinzetten	Fa. Hartenstein, Würzburg
Pipettierhilfe	Fa. Brand, Wertheim
Rasterelektronenmikroskop DSM 940	Fa. Zeiss, Oberkochen
Reinstwasseranlage Purelab Ultra	Fa. USF Deutschland, Ransbach
Sterilarbeitsbank LaminAir HB 2472	Fa. Heraeus, Hanau
Wasserbad	Fa. Memmert, Schwabach
Wippschüttler	Fa. Hartenstein, Würzburg
Zellzähler CASY 1 Modell TTC	Fa. Schärfe System, Reutlingen

3.2 Herstellung der Calciumphosphat-Scaffolds

Die Calciumphosphat-Scaffolds werden bei Raumtemperatur von einem 3D Powder Printing System gedruckt. Dabei wird der Binder Phosphorsäure (20%ig, autoklaviert) in das Pulver α/β -Tricalciumphosphat (4 h bei 200 °C trocken sterilisiert) gestrahlt, wobei Brushit nach der folgenden Formel entsteht:



Die Lagendicke wird auf 125 μm , das Binder/Volumenverhältnis auf 0,32 eingestellt. Die Ausmaße der Scaffolds werden auf 14,3 x 13 x 2 mm (passend für den Kulturcontainer) mit 9 x 7 Poren und einem Porendurchmesser von 1,06 mm eingestellt. Nach dem Drucken werden die Scaffolds mit Druckluft abgeblasen, zur Nachhärtung 15 s in 20%ige, autoklavierte Phosphorsäure gelegt und getrocknet. Anschließend werden sie für zwei Tage mit bidestilliertem Wasser und für weitere zwei Tage mit PBS auf dem Wippschüttler gewaschen, um die unreaktierte Phosphorsäure zu entfernen und die Scaffolds isoosmolar zu machen. Bidestilliertes Wasser und PBS werden je ca. achtmal gewechselt. Der folgende Autoklaviervorgang bei 121 °C für 20 min wandelt das Brushit in Monetit um. Die Scaffolds werden in sterilen Glasschalen aufbewahrt.

3.3 Nährmedien, Zusätze, Puffer

Bei der Durchführung der Versuche wird Reinstwasser verwendet, das von der laboreigenen Wasseranlage Purelab Ultra zubereitet wird. Es ist praktisch frei von anorganischen und organischen Verunreinigungen.

Der Farbstoff WST-1 (4-3-(4-Iodophenyl)-2-(4-Nitrophenyl)-2H-5-Tetrazolium-1,3-Benzendi-sulfonat; Fa. Roche Diagnostics, Mannheim) wird zur Zellviabilitätsbestimmung verwendet.

Für die Herstellung der Präparate für die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen wird Aceton in 30%iger, 50%iger, 75%iger, 90%iger und 100%iger Konzentration verwendet (Fa. Merck, Darmstadt).

Eine 70%ige Ethanollösung der Fa. Brüggemann, Heilbronn, wird zur Reinigung des dynamischen Kultursystems verwendet.

Zur Fixierung der zellbesiedelten Scaffolds wird eine 25%ige Glutaraldehydlösung für die Elektronenmikroskopie von der Fa. Merck, Darmstadt, verwendet.

Accutase (Fa. PAA Laboratories, Cölbe) ist eine Mischung aus proteolytischen und kollagenolytischen Enzymen Wirbelloser. Es löst schonend Zellen von Kulturoberflächen.

Der PBS-Puffer (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) wird zum Waschen der Zellen im Rahmen des Passagierens verwendet. Er wurde 20 min bei 121 °C autoklaviert und besitzt folgende Zusammensetzung:

- 137 mM Natriumchlorid NaCl (Fa. Merck, Darmstadt)
- 2,7 mM Kaliumdihydrogenphosphat KH_2PO_4 (Fa. Merck, Darmstadt)
- 7,9 mM Dinatriumhydrogenphosphat $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ (Fa. Merck, Darmstadt)
- 1,5 mM Kaliumchlorid KCL (Fa. Merck, Darmstadt)

Die Isoton-Pufferlösung (Fa. Beckman Coulter, Krefeld) wird zur Bestimmung der Zellkonzentration im CASY 1 Cell-Counter and Analyzer System benötigt. Die Isoton-Pufferlösung wird vor Gebrauch steril filtriert und besitzt folgende Zusammensetzung:

- 9,72 g/l Natriumsulfat, wasserfrei
- 4,00 g/l Natriumchlorid
- 1,00 g/l Dimethylolharnstoff
- 0,11 g/l Procainhydrochlorid

Als Kulturmedium kommt Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) zum Einsatz, das ein Standardmedium für ein breites Spektrum an Säugerzellen ist. Es ist eine Variante von Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM), enthält aber mehr Nährstoffe. Die Grundzusammensetzung besteht aus Aminosäuren, Vitaminen, anorganischen Salzen und anderen Komponenten. Verwendet wird

DMEM mit GlutaMAX™-I, 4500 mg/l Glukose und 110 mg/l Natriumpyruvat (Fa. Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe). Dazu werden gegeben:

- 1% Penicillin-Streptomycin (Fa. Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe)
- 1% HEPES Buffer (Solution 1M, Fa. Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe)
- 10% Fetal Calf Serum (FCS, Fa. Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe)

Penicillin-Streptomycin wird zur Bekämpfung bakterieller Kontamination in der Zellkultur eingesetzt. Es ist ziemlich instabil und muss rechtzeitig nachdosiert werden, um die antimikrobielle Wirkung aufrechtzuerhalten.

HEPES Buffer ist ein stabiler, organischer Puffer mit sehr guter Kapazität im physiologischen Bereich zwischen pH 7,2 und pH 7,6. Er eignet sich daher gut für Zellen mit hohen Proliferationsraten.

FCS wird durch Herzpunktion aus Rinderfeten gewonnen. Serum ist eine komplexe und sehr heterogene Mischung aus Proteinen, Hormonen, Wachstumsfaktoren, Elektrolyten und anderen Bestandteilen und wirkt vielfältig auf den Metabolismus der Zellen ein.

3.4 Verwendete Zelllinien

3.4.1 Osteosarkomzelllinie MG63

Die humanen Osteosarkomzellen der Zelllinie MG63 (Zellbank „American Type Culture Collection“, Rockville, MD, USA) stammen aus dem Knochen eines 14-jährigen männlichen Patienten. In Kultur gebracht wachsen die Zellen adhärent und zeigen fibroblastenartige Morphologie. Die fungierenden Rezeptoren sind RI und RII für TGF- β . Genetisch liegt bei diesen Tumorzellen eine Abweichung vom normalen Chromosomensatz vor.

3.4.2 Fibroblastenzelllinie L-929

Die Fibroblasten der Zelllinie L-929 (Mausfibroblasten, Gibco Ltd. Paisley, Scotland) stammen aus normalem, subkutanem aerolarem und adipotischem Gewebe einer 100 Tage alten männlichen Maus. L-929 Zellen sind einfach zu

kultivieren und werden z. B. für Zytotoxizitätstests routinemäßig verwendet. Die Zelllinie wurde erstmals im März 1948 isoliert und war eine der ersten Zelllinien, von welcher fortlaufende Kulturen erstellt wurden und auch die erste geklonte Zelllinie.

3.5 Zellkultivierung

Die Zellkultivierung beider Zelllinien erfolgt in Zellkulturflaschen (75 cm²) im Inkubator (5% CO₂, 37 °C, gesättigte Wasserdampfatosphäre) in DMEM.

3.5.1 Beimpfen der Scaffolds und Kontrolle

Für die nachfolgenden Versuchsreihen werden Zellsuspensionen von ca. 50000 Zellen/ml benötigt. Hierzu wird unter der Sterilbank das Medium aus einer konfluent bewachsenen Zellkulturflasche mit einer sterilen Pasteurpipette abgezogen und die adhärenen Zellen zweimal mit je 10 ml PBS gewaschen. Anschließend werden die Zellen durch eine 7-minütige Inkubation mit 1 ml Accutase abgelöst. Nach Abklopfen der gelösten Zellen wird die Enzymwirkung durch Zugabe von 5 ml DMEM aufgehoben. Die gewonnene Zellsuspension wird durch Auf- und Abpipettieren homogenisiert und eine Zellzählung durchgeführt. Um die gewünschten 50000 Zellen/ml zu erhalten, wird eine Verdünnung mit DMEM vorgenommen.

Pro Versuchsreihe werden 20 zellbesiedelte Scaffolds verwendet, wovon 10 in einem Perfusionscontainer (dynamisch) und 10 in herkömmlichen Wellschalen (statisch) kultiviert werden. Um 20 zellbesiedelte Scaffolds zu erhalten, werden am Vortag in zwei Gewebekulturschalen Ø 10 cm mit einer sterilen Pinzette je 10 autoklavierte Scaffolds gelegt, mit je 30 ml der Zellsuspension von 50000 Zellen/ml beimpft und 24 h im Inkubator inkubiert. Diese statischen Kulturbedingungen ermöglichen den Zellen auf den Scaffolds zu adhären, so dass ein Abspülen der Zellen durch den Flüssigkeitsstrom des Mediums vermieden wird. Im Anschluss an die 24-stündige Inkubation werden die Scaffolds in das dynamische bzw. in das statische Kultursystem eingesetzt (Tag 0). Auch eine Kontrollkultur wird angelegt. Am Vortag werden 9 Wells einer 24-Well-Multischale

mit je 1 ml Zellsuspension von 50000 Zellen/ml beimpft und im Inkubator inkubiert.

3.5.2 Die Kontrolle aus Polystrol

Durch die parallel zu dynamischer und statischer Kultur angelegte Kontrollkultur können eventuell auftretende Veränderungen im Wachstumsverhalten der Zellen erkannt werden.

Als Kontrollmaterial werden Multischalen aus Polystrol verwendet. Sie sind Einwegartikel, die gebrauchsfertig sterilisiert und oberflächenbehandelt sind. Die effektive Wachstumsfläche pro Well beträgt 2,00 cm². Von der Kontrollkultur werden ebenfalls an den Messtagen Zellviabilität und Zellzahl bestimmt. Die zupipettierten Mengen von verdünntem WST-1 Reagenz, Accutase und DMEM betragen 0,5 ml. Zur genaueren Durchführung siehe Kapitel 3.6.

3.5.3 Das dynamische Kultursystem

Im dynamischen Kultursystem zirkuliert Medium, siehe Abbildung 1. Das System besteht aus einem Kulturcontainer 24 x 13 mm (Abbildung 2), einer peristaltischen Pumpe Gilson Minipuls 3, platinbeschichteten Silikonschläuchen mit Adaptern (ein peristaltischer Schlauch mit zwei retaining Stopps: 1 mm Innendurchmesser, 3 mm Außendurchmesser, 1 mm Wandstärke; zwei Verbindungsschläuche ohne retaining Stopps mit Adaptern: 2 mm Innendurchmesser, 4 mm Außendurchmesser, 1 mm Wandstärke; zwei Verbindungsschläuche ohne retaining Stopps mit Anschlussstück an Kulturcontainer: 1 mm Innendurchmesser, 3 mm Außendurchmesser, 1 mm Wandstärke), sowie einer 250 ml Vorratsflasche aus Polypropylen mit Schraubverschlussdeckel. Der Schraubverschlussdeckel weist zwei Perforationen mit Ø 4 mm auf, durch welche die Versorgungsschläuche geführt werden. Zur Ermöglichung des Gasaustausches wird der Schraubverschlussdeckel nur locker auf die Vorratsflasche aufgesetzt.

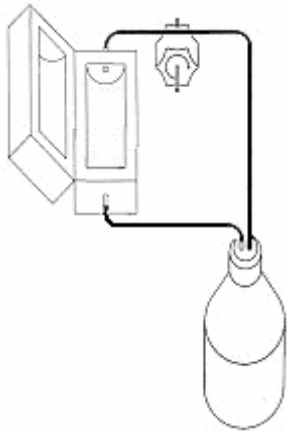


Abbildung 1: Versuchsaufbau (nach Minucells und Minutissue, Vertriebs-GmbH, D-Bad Abbach)



Abbildung 2: Kulturcontainer (Quelle: Minucells und Minutissue, Vertriebs-GmbH, D-Bad Abbach)

Am Tag 0 einer jeden Versuchsreihe wird das dynamische Kultursystem zur Aufnahme der mit Zellen besiedelten CaP-Scaffolds vorbereitet. Kulturcontainer, Schlauchsystem und Vorratsflasche mit Deckel werden vor jeder Versuchsreihe sorgfältig mit Reinstwasser und Ethanol gereinigt, getrocknet, zusammengesetzt und autoklaviert.

Unter der Sterilbank wird das im Wasserbad erwärmte Medium vorgelegt, die Vorratsflasche wird mit 100 ml, der Kulturcontainer mit 17 ml Medium befüllt. Der peristaltische Schlauch mit den zwei retaining Stopps wird in den Pumpkopf eingelegt, der Kompressionskamm geschlossen und die Adjustierungsschraube leicht angezogen.

Die peristaltische Pumpe wird auf maximale Geschwindigkeit (48 rpm) geschaltet, um das Schlauchsystem zu befüllen. Dabei wird das Medium aus der Vorratsflasche angesaugt, durch den zuführenden Schlauch in den Kulturcontainer befördert, durchströmt diesen und wird durch den abführenden Schlauch wieder zur Vorratsflasche gepumpt.

Ist das System blasenfrei gefüllt, wird der Kulturcontainer unter der Sterilbank geöffnet und 10 der am Vortag beimpten CaP-Scaffolds mit einer sterilen Pinzette senkrecht zur Flussrichtung hineingestellt. Dabei wird die mit Zellen besiedelte Oberfläche zum einfließenden Pol des Containers ausgerichtet. Anschließend wird der Kulturcontainer geschlossen und nochmals auf Lufteinschlüsse untersucht, die gegebenenfalls noch beseitigt werden. Diese

Kontrolle findet auch nach jedem Mediumwechsel statt. Im Anschluss wird die Geschwindigkeit eingestellt. In den Versuchsreihen, bei denen sich die Pumpe 5 x pro Minute (5 rpm) dreht, werden 0,4 ml/min transportiert, bei denen sich die Pumpe 2,5 x pro Minute (2,5 rpm) dreht, werden 0,2 ml/min transportiert. Die peristaltische Pumpe Gilson Minipuls 3 arbeitet mit geringer Pulsation und einer großen Geschwindigkeitskonstanz.

Der Kulturcontainer und die Vorratsflasche werden in einen Inkubator (5% CO₂, 37 °C, gesättigte Wasserdampfatosphäre) gestellt und sind durch die Verbindungsschläuche mit der peristaltischen Pumpe außerhalb verbunden. Bei den Versuchsreihen über einen 6-tägigen Zeitraum werden am Tag 3 die Hälfte des Mediums in der Vorratsflasche und das Medium im Kulturcontainer durch frisches Medium ersetzt. Beim Langzeitversuch werden an Tagen 3, 7 und 10 jeweils 50 ml, an Tagen 14, 17, 21, 24 und 28 jeweils 75 ml Medium aus der Vorratsflasche entnommen und durch frisches Medium ersetzt.

3.5.4 Das statische Kultursystem

Für das statische Kultursystem wird eine 6-Well Multischale verwendet. An Tag 0 werden 5 Wells mit je 6 ml DMEM befüllt und je zwei mit Zellen besiedelte Scaffolds eingelegt. Die statische Kultur wird im Inkubator (5% CO₂, 37 °C, gesättigte Wasserdampfatosphäre) inkubiert. Bei den Versuchsreihen über einen 6-tägigen Zeitraum wird an Tagen 1 und 3 ein Mediumwechsel durchgeführt, beim Langzeitversuch an Tagen 3, 7, 10, 14, 17, 21, 24 und 28. Die 6-Well Multischalen sind Einwegartikel, die gebrauchsfertig sterilisiert und oberflächenbehandelt sind.

3.6 Bestimmung von Wachstumsparametern

3.6.1 Zellviabilitätsbestimmung

Unter Zellviabilität versteht man die Aktivität einer Zellpopulation. Sie wird mit dem WST-1 Assay ermittelt. Das WST-1 Cell Proliferation Reagent dient zum Nachweis einer intakten Atmungskette in Zellen. Das schwach rot gefärbte Tetrazoliumsalz WST-1 wird mittels der mitochondrialen Succinatdehydrogenase zum gelben Formazan metabolisiert. Dieser Farbumschlag kann in einem

Spektralphotometer photometrisch gemessen werden. Dabei wird der Referenzwert bei $\lambda = 690$ nm vom Remissionswert bei $\lambda = 450$ nm subtrahiert. Diese Differenz ist proportional zur Aktivität der Zellpopulation.

Zur Durchführung wird WST-1 Reagenz mit DMEM im Verhältnis von 1:10 verdünnt und davon je 1,5 ml in 6 (im Langzeitversuch 4) 10 ml Bechergläsern vorgelegt. Anschließend werden je 3 Scaffolds (im Langzeitversuch je 2 Scaffolds) mit der zellbesiedelten Seite nach oben aus der dynamischen und der statischen Kultur unter der Sterilbank mit einer sterilen Pinzette in die Bechergläser überführt und zusammen mit dem Leerwert (WST-1 Reagenz in DMEM) eine Stunde inkubiert. Anschließend werden 1 x 200 μ l als Leerwert und je 4 x 200 μ l des Überstandes aus den Bechergläsern zur Vierfachbestimmung in Wells einer Mikrowellplatte im 96-Well-Format überpipettiert und im Photometer Spectrafluor Plus gemessen, welches mit der Bedienungssoftware Magellan 3 angesteuert wird.

3.6.2 Zellzahlbestimmung

Die Zellkonzentrationen von Suspensionen werden mit dem CASY 1 Cell-Counter and Analyzer System, Modell TTC bestimmt, das nach dem Prinzip der elektronischen Pulsflächenanalyse arbeitet. Die Zellen werden in einer isotonen Elektrolytlösung verdünnt und durch eine Messkapillare gesaugt. Dabei wird das elektrische Signal, das beim Durchtritt einer Zelle durch die Messkapillare entsteht, über ein gepulstes Niederspannungsfeld und ein hoch standardisiertes digitales Puls Processing ausgewertet. Durch dieses Verfahrensprinzip können Zellkonzentrationen aber auch Volumen, Größenverteilung, Aggregation und Vitalität der Zellen mit großer Genauigkeit gemessen werden. Die Zellkonzentrationen werden im direkten Anschluss an die Zellviabilitätsbestimmung gemessen.

Zur Durchführung wird in den Bechergläsern der restliche Überstand des WST-1 Reagenz in DMEM abgesaugt und die Zellschicht dreimal mit PBS-Puffer gewaschen. Durch Zugabe von je 1,5 ml Accutase werden die Zellen während einer 7-minütigen Inkubation enzymatisch abgelöst. Anschließend wird die Enzymwirkung mit je 1,5 ml DMEM gestoppt. Durch je 20-maliges Auf- und

Abpipettieren mit der 1,0 ml Eppendorfpipette wird die Zellsuspension homogenisiert. 100 µl Zellsuspension werden in je 10 ml vorgelegter isotoner Elektrolytlösung verdünnt und sofort im Zellzähler gemessen. Am Zellzähler wird ein Messbereich zwischen 0 und 30 µm vorgewählt und das Messfenster für Osteoblasten zwischen 10 und 30 µm und für Fibroblasten zwischen 12 und 30 µm, entsprechend der Normalverteilung der Zellgrößen, festgelegt. Jede in Elektrolytlösung verdünnte Probe wird automatisch viermal einzeln mit Volumina von je 200 µl gemessen und anschließend der Mittelwert gebildet, wobei von jedem Becherglas je 2 Proben (im Langzeitversuch je 3 Proben) entnommen werden. Die Auswertungssoftware CASYstat (Schärfe Systeme, Reutlingen) rechnet den Verdünnungsfaktor ein und gibt die Zellzahl pro 1 ml unverdünnter Suspension an. Durch Hochrechnung auf 3 ml unverdünnte Suspension, wird die Zellzahl pro Scaffold bestimmt.

3.6.3 Präparatherstellung für das Rasterelektronenmikroskop

Für die rasterelektronenmikroskopische Analyse werden an Tag 6 je ein CaP-Scaffold aus der statischen und der dynamischen Kultur in PBS gewaschen und anschließend für 15 min in 6%igem Glutaraldehyd in PBS auf Eis fixiert. Das Fixativ wird mit PBS (5 x 5 min auf Eis) ausgewaschen. Anschließend werden die Präparate bei Raumtemperatur über eine aufsteigende Acetonreihe entwässert (Überschichtung von 30%igem Aceton für 15 min, 50%igem Aceton für 20 min, 75%igem Aceton für 30 min, 90%igem Aceton für 45 min und 5-mal 100%igem Aceton für 30 min). Die entwässerten Präparate werden mit einem Baltec Critical Point Dryer mit CO₂ getrocknet, auf Aluminiumteller mit Leit-C aufgeklebt und mit einem Emitech Sputter Coater mit Gold beschichtet. Zur Analyse der Präparate wird ein Rasterelektronenmikroskop verwendet. Dieses tastet die Oberfläche der Präparate mit einem gebündelten Elektronenstrahl ab. Die in die Präparate eindringenden Elektronen lösen aus dem Anregungsgebiet Sekundärelektronen heraus, die mit Hilfe eines Detektors aufgefangen werden. Während des Abrasterns wird in Abhängigkeit von der Topographie der Oberfläche aus dem Detektorsignal ein plastisches Abbild der Oberfläche erzeugt. Die Präparate werden anschließend mit variabler Vergrößerung zwischen 7-

und 1000-fach gescannt. Die Morphologie und räumliche Verteilung der Zellen werden photographisch dokumentiert.

3.7 Versuchsreihen

Zur Etablierung des dynamischen Kultursystems werden insgesamt 17 Versuchsreihen angesetzt. Sie sind in Tabelle 3 aufgelistet. Zellviabilität und Zellzahl werden in Versuchsreihen 1-14 je nach 1, 3 und 6 Tagen Kultivierung im Inkubator bestimmt, die photographische Dokumentation der Morphologie und räumlichen Verteilung der Zellen durch das Rasterelektronenmikroskop erfolgt nach 6 Tagen. Im Langzeitversuch werden Zellzahl und Zellviabilität nach 9, 20 und 30 Tagen bestimmt.

Tabelle 3: Durchgeführte Versuchsreihen

Versuchsreihe	Osteoblasten	Fibroblasten	Fließgeschwindigkeit (ml/min)	Biokompatible Schläuche	autoklavierte Scaffolds
01	-	x	0,03	-	-
02	x	-	0,24	-	-
03	x	-	0,08	-	-
04	-	x	0,03	-	x
05	-	x	0,08	-	x
06	-	x	0,41	-	x
07	x	-	0,21	-	x
08	x	-	0,24	-	x
09	x	-	0,21	-	x
10	x	-	0,21	x	x
11	x	-	0,41	x	x
12	-	x	0,21	x	x
13	-	x	0,41	x	x
14	x	-	0,41	x	x
15	x	-	0,41	x	x
16	x	-	0,41	x	x
17	x	-	0,21/0,41	x	x

3.8 Statistik

Für alle Messwerte, die unter Verwendung beider Zelllinien MG63 und L-929 erhoben werden, werden die Mittelwerte berechnet und die Standardabweichung durch Fehlerbalken dargestellt.

Als Signifikanztest wird der zweiseitige t-Test durchgeführt und die Signifikanz p berechnet. Der jeweilige Wert für p wird an den entsprechenden Stellen im Ergebnisteil angegeben.

4 Ergebnisse

In dieser Arbeit wird ein dynamisches Kultursystem auf Calciumphosphat-Scaffolds unter Verwendung der Osteosarkomzelllinie MG63 und der Fibroblastenzelllinie L-929 etabliert.

Von den 17 angesetzten Versuchsreihen müssen die ersten 3 vorzeitig abgebrochen werden, da die Kulturen kontaminiert sind. Die hier verwendeten in bidestilliertem Wasser und PBS gewaschenen Scaffolds sind nicht autoklaviert, sondern lediglich für 2 h in 70%igem Ethanol gewippt und anschließend unter der Sterilbank getrocknet. Dies reicht nicht aus, die porösen Strukturen zu sterilisieren. Deshalb werden für die nachfolgenden Versuche autoklavierte Scaffolds verwendet, was eine Umwandlung der Scaffolds von Bruschi in Monetit bedeutet.

In den nächsten 6 Versuchsreihen können an keinem Tag eine Zellviabilität auf den Scaffolds in der dynamischen Kultur festgestellt werden. Bei der Suche nach der Ursache des im Lichtmikroskop erkennbaren Zelltodes wird der Einfluss des Materials der Vorratsflasche getestet und die Reinigung des Schlauchsystems auf milde Mittel, wie Ethanol und Reinstwasser, beschränkt. Es stellt sich heraus, dass eine Vorratsflasche aus Polypropylen einer aus Glas vorzuziehen ist und die bisher verwendeten Schläuche nicht biokompatibel sind.

Erst platinbeschichtete Silikonschläuche führen zum Erfolg und ermöglichen Zellwachstum im dynamischen Kultursystem. Während der folgenden 5 Versuchsreihen werden dynamische Kulturen bei Fließgeschwindigkeiten von 0,2 ml/min und 0,4 ml/min angesetzt. Anhand von Zellzahl und Zellviabilität sowie durch Analyse und Vergleich der Morphologie und räumlichen Verteilung der Zellen auf den Scaffolds unter dem Rasterelektronenmikroskop werden die Qualitäten der dynamischen Kultursysteme untersucht und mit statischen Kultursystemen verglichen.

Versuchsreihe 17 ist ein Langzeitversuch und erstreckt sich über 30 Tage. Dabei werden Zellviabilitäts- und Zellzahlbestimmungen nach 9, 20 und 30 Tagen durchgeführt und die Werte von dynamischem und statischem Kultursys-

tem miteinander verglichen. In dieser Versuchsreihe wird im dynamischen Kultursystem die Fließgeschwindigkeit nach den ersten drei Tagen von 0,2 ml/min auf 0,4 ml/min erhöht.

4.1 Analyse und Vergleich zellbesiedelter CaP-Scaffolds unter dem Rasterelektronenmikroskop

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen zellbesiedelter CaP-Scaffolds werden im Folgenden zunächst strukturell analysiert und dann bezüglich der Morphologie und räumlichen Verteilung von Zellen verglichen.

4.1.1 Die Struktur der CaP-Scaffolds

Mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie kann die Struktur der in dieser Arbeit verwendeten CaP-Scaffolds aus Monetit (CaHPO_4 , DCPH, Dicalciumphosphatanhydrat) analysiert werden. Abbildung 3 zeigt die Oberfläche eines mit Gold besputterten Präparates in (a) 7-facher und (b) 500-facher Vergrößerung: man erkennt die großen Porenräume des Materials, welche eine natürliche dreidimensionale Anordnung der Zellen ermöglichen. Außerdem wird deutlich, dass die nanokristalline Mineralphase sehr gleichmäßig verteilt ist und die Mikrostruktur homogen wirkt. Die Oberflächentopographie ermöglicht eine gute Versorgung und Anheftungsplätze für die Zellen.

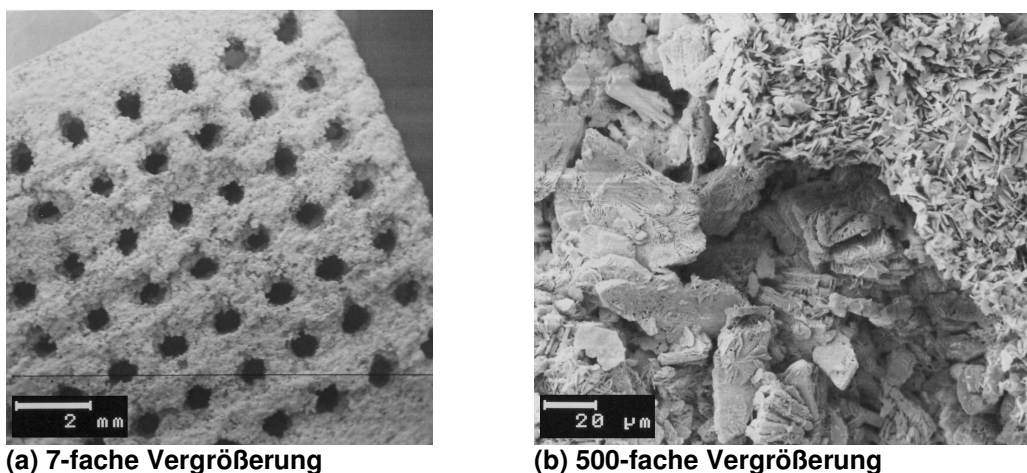


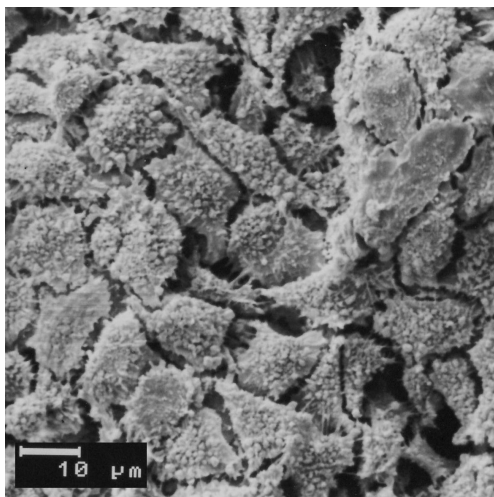
Abbildung 3: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der CaP-Scaffolds bei unterschiedlichen Vergrößerungen, Beschleunigungsspannung (a) 5 kV und (b) 10 kV

4.1.2 Vergleich der Morphologie und räumlichen Verteilung der Zellen auf CaP-Scaffolds in statischer zu dynamischer Kultur

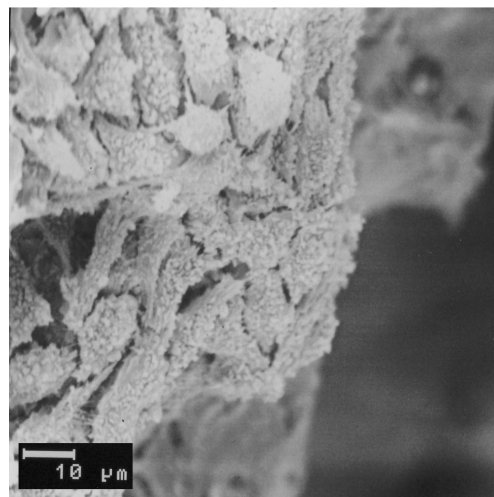
Im Folgenden werden Morphologie und räumliche Verteilung von MG63- und L-929-Zellen auf CaP-Scaffolds in statischer zu dynamischer Kultur bei unterschiedlichen Fließgeschwindigkeiten (0,2 ml/min und 0,4 ml/min) verglichen.

4.1.2.1 Vergleich unter Verwendung von MG63-Zellen in statischer zu dynamischer Kultur (Fließgeschwindigkeit 0,2 ml/min)

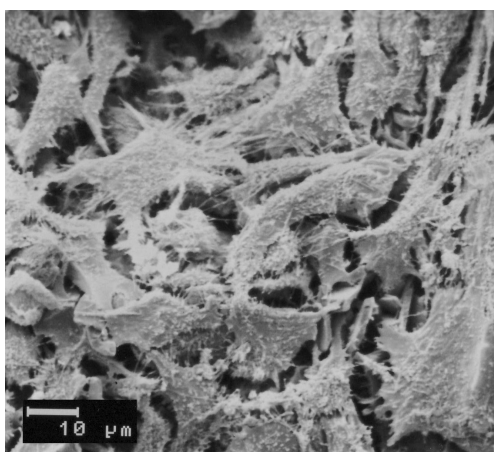
Nach 6-tägiger Kultivierung der mit MG63-Zellen besiedelten CaP-Scaffolds in statischer oder dynamischer Kultur bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,2



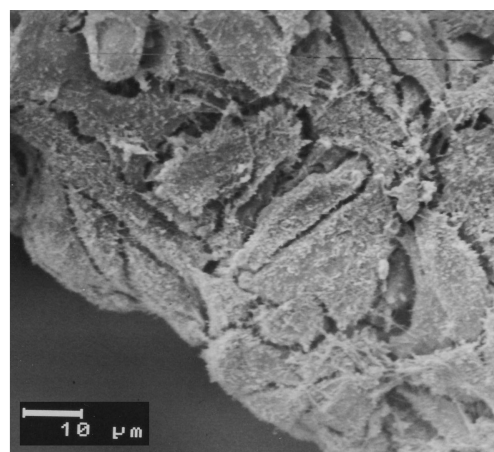
(a) Statische Kultivierung, mittig



(b) Statische Kultivierung, randständig



(c) Dynamische Kultivierung, mittig



(d) Dynamische Kultivierung, randständig

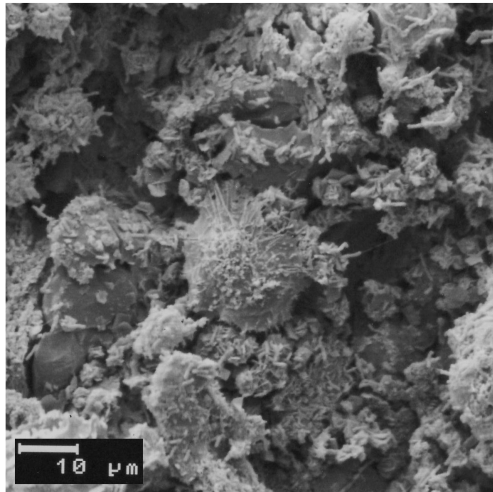
Abbildung 4: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der mit MG63-Zellen besiedelten CaP-Scaffolds nach 6-tägiger Kultivierung in (a)/(b) statischer oder (c)/(d) dynamischer Kultur (Fließgeschwindigkeit 0,2 ml/min) bei 1000-facher Vergrößerung, Beschleunigungsspannung 10 kV

ml/min werden Aufnahmen (Abbildung 4) der mit Gold besputterten Präparate zur Analyse unter dem Rasterelektronenmikroskop hergestellt. Abbildungen (a)/(b) entstammen Scaffolds der statischen, Abbildungen (c)/(d) der dynamischen Kultur. Bei Abbildungen (a)/(c) wird ein Bildausschnitt mittig zwischen Poren, in (b)/(d) am Porenrand ausgewählt. Im Vergleich der Abbildungen der statisch kultivierten zu denen der dynamisch kultivierten Präparate kann man Unterschiede bei der Morphologie und der räumlichen Verteilung der Zellen auf den Scaffolds erkennen. Auf beiden Scaffolds sieht man eine reichliche Zellbesiedelung. In (a)/(b) zeigen die statisch kultivierten MG63-Zellen eine gedrungene Form. Die dynamisch kultivierten Zellen in (c)/(d) bilden mehr Lamello- und Filopodien aus als die statisch kultivierten, was ihnen eine homogene Zellbesiedelung ermöglicht. In (d) erkennt man, dass die Zellen auch in das Porensystem hineinwachsen und eine dreidimensionale Anordnung bilden.

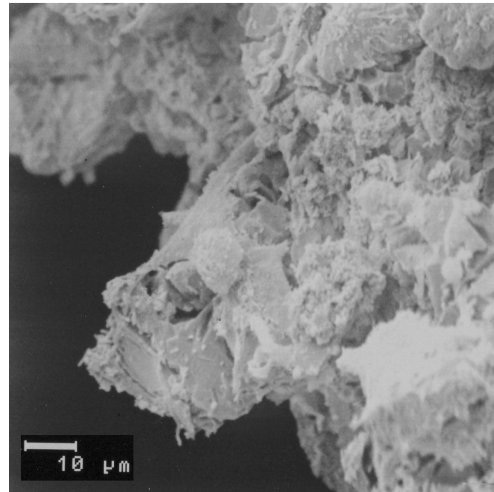
4.1.2.2 Vergleich unter Verwendung von MG63-Zellen in statischer zu dynamischer Kultur (Fließgeschwindigkeit 0,4 ml/min)

Nach 6-tägiger Kultivierung der mit MG63-Zellen besiedelten CaP-Scaffolds in statischer oder dynamischer Kultur bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,4 ml/min werden Aufnahmen (Abbildung 5) der mit Gold besputterten Präparate zur Analyse unter dem Rasterelektronenmikroskop hergestellt. Abbildungen (a)/(b) entstammen Scaffolds der statischen, Abbildungen (c)/(d) der dynamischen Kultur. Bei Abbildungen (a)/(c) wird ein Bildausschnitt mittig zwischen Poren, in (b)/(d) am Porenrand ausgewählt. Im Vergleich der Abbildungen der statisch kultivierten zu denen der dynamisch kultivierten Präparate kann man Unterschiede bei der Morphologie und der räumlichen Verteilung der Zellen auf den Scaffolds erkennen. Während man eine reichliche Zellbesiedelung auf dem dynamisch kultivierten Scaffolds erkennt (c)/(d), ist die Anzahl an Zellen, die man auf dem statisch kultivierten Scaffold erkennt, gering (a)/(b).

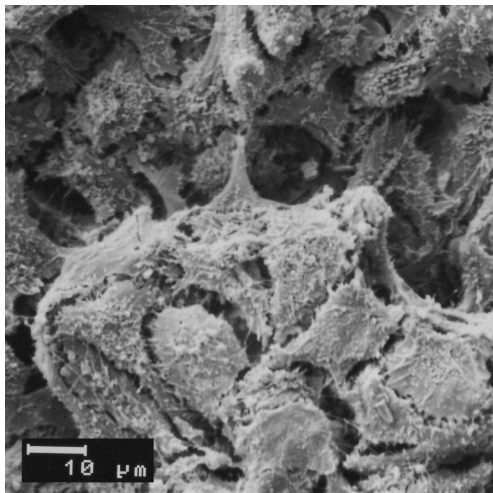
Die dynamisch kultivierten Zellen in (c)/(d) bilden viele Lamello- und Filopodien aus, was ihnen eine homogene Zellbesiedelung ermöglicht. In (d) sieht die Zellbesiedelung schollenartig aus und durchspannt dreidimensional das Porensystem.



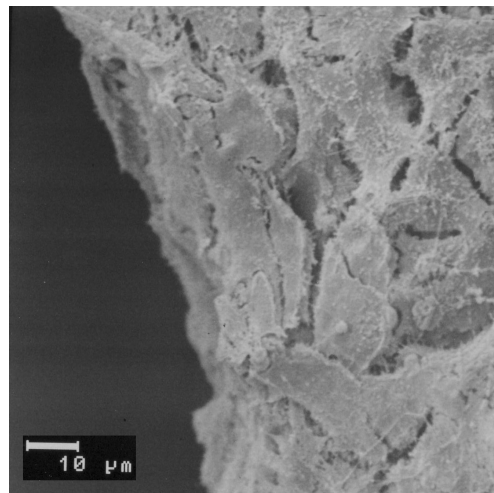
(a) Statische Kultivierung, mittig



(b) Statische Kultivierung, randständig



(c) Dynamische Kultivierung, mittig



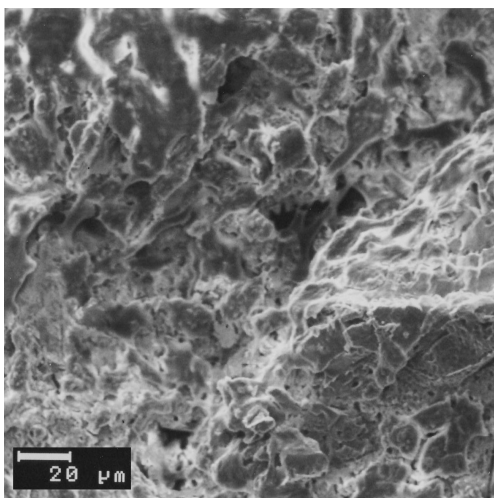
(d) Dynamische Kultivierung, randständig

Abbildung 5: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der mit MG63-Zellen besiedelten CaP-Scaffolds nach 6-tägiger Kultivierung in (a)/(b) statischer oder (c)/(d) dynamischer Kultur (Fließgeschwindigkeit 0,4 ml/min) bei 1000-facher Vergrößerung, Beschleunigungsspannung 10 kV

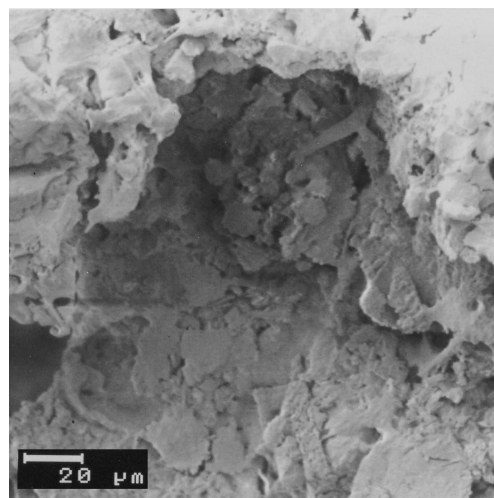
4.1.2.3 Vergleich unter Verwendung von L-929-Zellen in statischer zu dynamischer Kultur (Fließgeschwindigkeit 0,2 ml/min)

Nach 6-tägiger Kultivierung der mit L-929-Zellen besiedelten CaP-Scaffolds in statischer oder dynamischer Kultur bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,2 ml/min werden Aufnahmen (Abbildung 6) der mit Gold besputterten Präparate zur Analyse unter dem Elektronenmikroskop hergestellt. Abbildungen (a)/(b) entstammen Scaffolds der statischen, Abbildungen (c)/(d) der dynamischen Kultur. Bei Abbildungen (a)/(c) wird ein Bildausschnitt mittig zwischen Poren, in (b)/(d) am Porenrand ausgewählt.

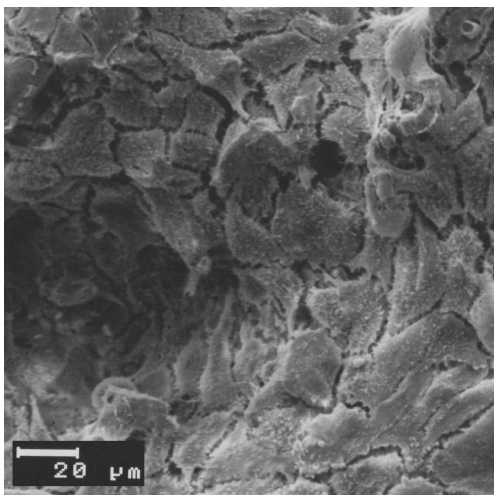
Im Vergleich der Abbildungen der statisch kultivierten zu denen der dynamisch kultivierten Präparate kann man Unterschiede bei der Morphologie und der räumlichen Verteilung der Zellen auf den Scaffolds erkennen. In (a)/(b) zeigen die statisch kultivierten L-929-Zellen ein schollenartiges Wachstum in gedrungener Form. Die dynamisch kultivierten Zellen in (c)/(d) sehen flacher aus und man erkennt, dass Zellen in das Porensystem einwachsen. Auf beiden Scaffolds sieht man eine reichliche Zellbesiedelung.



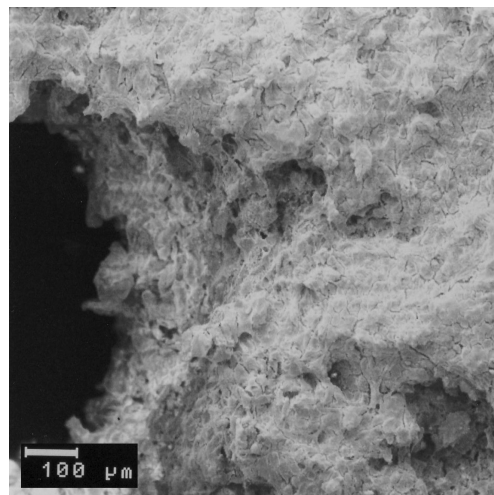
(a) Statische Kultivierung, mittig



(b) Statische Kultivierung, randständig



(c) Dynamische Kultivierung, mittig

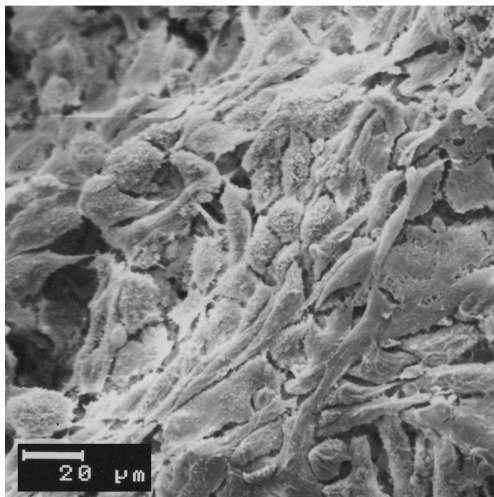


(d) Dynamische Kultivierung, randständig

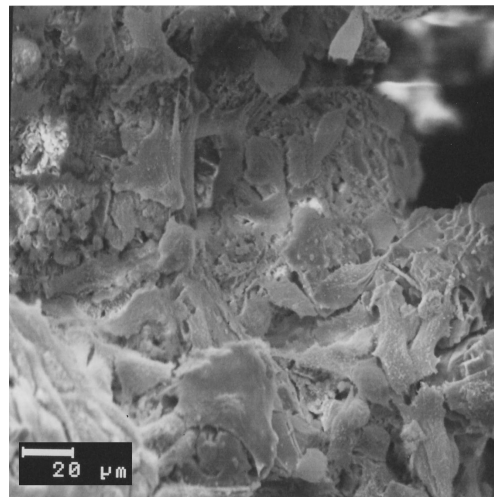
Abbildung 6: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der mit L-929-Zellen besiedelten CaP-Scaffolds nach 6-tägiger Kultivierung in (a)/(b) statischer oder (c)/(d) dynamischer Kultur (Fließgeschwindigkeit 0,2 ml/min) bei 500-facher Vergrößerung (a),(b),(c) oder 100-facher Vergrößerung (d), Beschleunigungsspannung 10 kV.

4.1.2.4 Vergleich unter Verwendung von L-929-Zellen in statischer zu dynamischer Kultur (Fließgeschwindigkeit 0,4 ml/min)

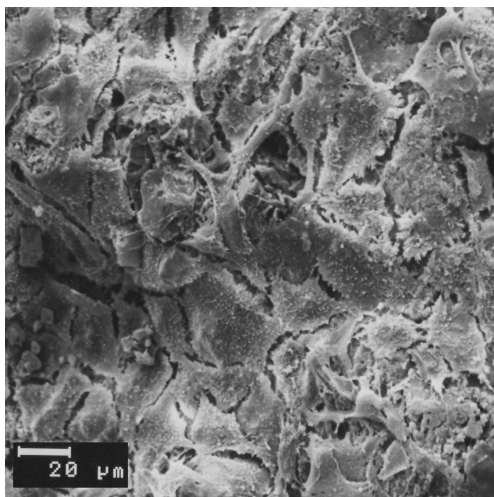
Nach 6-tägiger Kultivierung der mit L-929-Zellen besiedelten CaP-Scaffolds in statischer oder dynamischer Kultur bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,4 ml/min werden Aufnahmen (Abbildung 7) der mit Gold besputterten Präparate zur Analyse unter dem Rasterelektronenmikroskop hergestellt. Abbildungen (a)/(b) entstammen Scaffolds der statischen, Abbildungen (c)/(d) der dynamischen Kultur. Bei Abbildungen (a)/(c) wird ein Bildausschnitt mittig zwischen Poren, in (b)/(d) am Porenrand ausgewählt. Im Vergleich der Abbildungen der



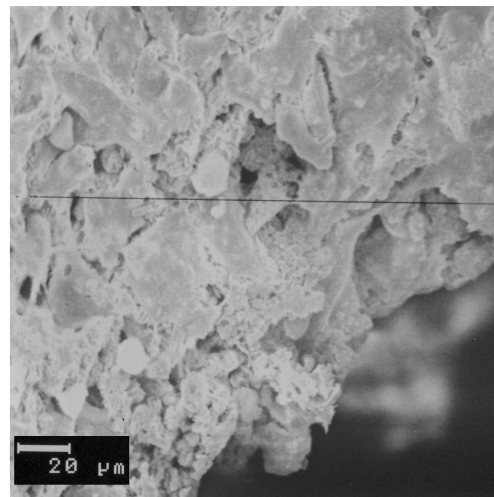
(a) Statische Kultivierung, mittig



(b) Statische Kultivierung, randständig



(c) Dynamische Kultivierung, mittig



(d) Dynamische Kultivierung, randständig

Abbildung 7: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der mit L-929-Zellen besiedelten CaP-Scaffolds nach 6-tägiger Kultivierung in (a)/(b) statischer oder (c)/(d) dynamischer Kultur (Fließgeschwindigkeit 0,2 ml/min) bei 500-facher Vergrößerung, Beschleunigungsspannung 10 kV. In (a)/(c) wird ein Bildausschnitt mittig zwischen Poren, in (b)/(d) am Porenrand ausgewählt.

statisch kultivierten zu denen der dynamisch kultivierten Präparate kann man Unterschiede bei der Morphologie und der räumlichen Verteilung der Zellen auf den Scaffolds erkennen. In (a) zeigen die statisch kultivierten L-929-Zellen eine längliche, in (c) zeigen die dynamisch kultivierten L-929-Zellen eine eher ausgestreckte Form mit typisch fibroblastenartiger Morphologie. Die Bildausschnitte am Porenrand lassen ein dreidimensionales Einwachsen in das Porensystem erkennen. Auf beiden Scaffolds sieht man eine reichliche Zellbesiedelung.

4.2 Vergleich von Zellzahl und Zellviabilität auf CaP-Scaffolds in dynamischen zu statischen Kultursystemen

Im Folgenden werden Zellzahl und Zellviabilität von MG63- und L-929-Zellen auf CaP-Scaffolds in dynamischen zu statischen Kultursystemen bei unterschiedlichen Fließgeschwindigkeiten (0,2 ml/min und 0,4 ml/min) und über unterschiedliche Versuchszeiträume (6 Tage und 30 Tage) verglichen.

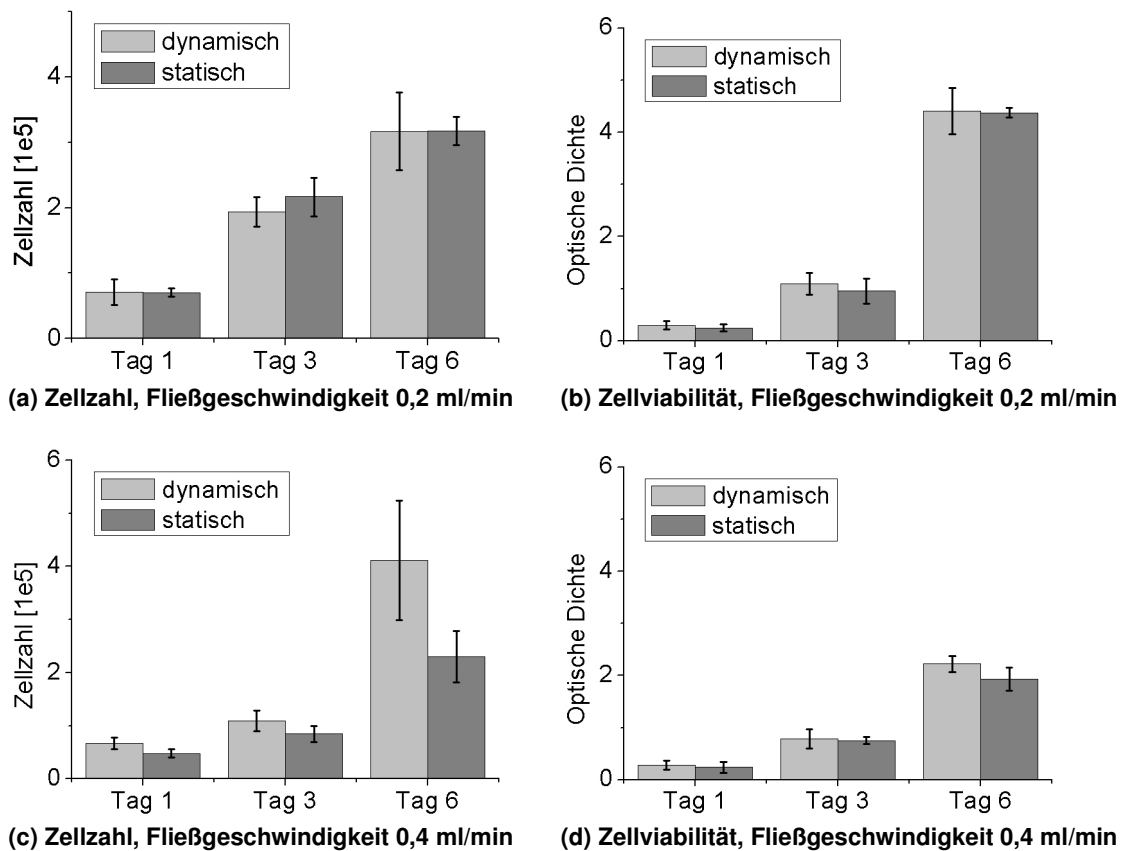


Abbildung 8: Säulendiagramme zu Zellzahl und Zellviabilität der MG63-Zellen während 6-tägiger Kultivierung auf CaP-Scaffolds in statischem bzw. dynamischem Kultursystem bei unterschiedlichen Fließgeschwindigkeiten.

4.2.1 Vergleich unter Verwendung der Osteosarkomzelllinie MG63

Während der Versuchsreihen werden Zellzahl und Zellviabilität der MG63-Zellen nach 1-, 3- und 6-tägiger Kultivierung auf CaP-Scaffolds im statischen bzw. dynamischen Kultursystem bei Fließgeschwindigkeiten von 0,2 ml/min oder 0,4 ml/min bestimmt (Abbildung 8): Sowohl im statischen als auch im dynamischen Kultursystem nehmen Zellzahl und Zellviabilität über den 6-tägigen Kultivierungszeitraum stetig zu (a)/(b)/(c)/(d). Außer der Zellzahl an Tag 3 der Versuchsreihe mit der Fließgeschwindigkeit von 0,2 ml/min im dynamischen Kultursystem (a) sind die Zellzahlen und Zellviabilitäten auf den CaP-Scaffolds aus dem dynamischen Kultursystem höher oder gleich denen aus dem statischen Kultursystem (a)/(b)/(c)/(d). Während sich die Werte der statischen Kultur gegenüber denen der dynamischen Kultur bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,2 ml/min über den 6-tägigen Versuchszeitraum (a)/(b) und bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,4 ml/min über die ersten 3 Tage (c)/(d) nur geringfügig unterscheiden, kann nach 6-tägiger Kultivierung im dynamischen Kultursystem bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,4 ml/min eine signifikant höhere Zellzahl gegenüber der statischen Kultur gemessen werden ($p=0,0089$) (c). Die Standardabweichungen der Zellzahlen sind im dynamischen Kultursystem (a)/(c) an Tag 6 am größten.

Die Aktivität pro Zelle (Abbildung 9) wird aus dem Quotient des Mittelwertes der Zellviabilität und des Mittelwertes der Zellzahl errechnet. Die Werte waren an

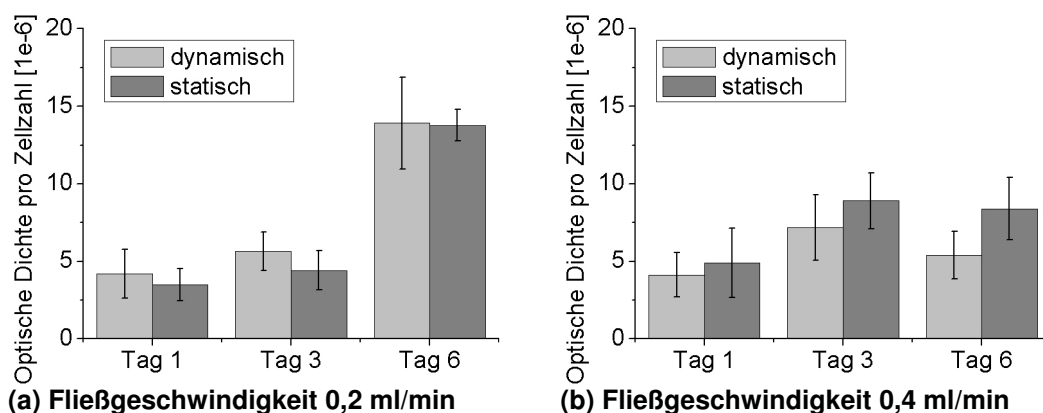


Abbildung 9: Säulendiagramme zur Aktivität pro Zelle der MG63-Zellen während 6-tägiger Kultivierung auf CaP-Scaffolds in statischem bzw. dynamischem Kultursystem bei unterschiedlichen Fließgeschwindigkeiten.

allen Messtagen bei den MG63-Zellen auf CaP-Scaffolds aus dem dynamischen Kultursystem bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,2 ml/min gegenüber denen aus dem statischen Kultursystem leicht erhöht (a), bei den Wertepaaren der Versuchsreihe mit statischem Kultursystem und dynamischem Kultursystem bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,4 ml/min (b) war es umgekehrt, wobei diese Unterschiede nicht signifikant waren ($p > 0,05$).

4.2.2 Vergleich unter Verwendung der Fibroblastenzelllinie L-929

Während der Versuchsreihen werden Zellzahl und Zellviabilität der L-929-Zellen nach 1-, 3- und 6- tägiger Kultivierung auf CaP-Scaffolds im statischen bzw. dynamischen Kultursystem bei Fließgeschwindigkeiten von 0,2 ml/min oder 0,4 ml/min bestimmt (Abbildung 10): In beiden Kultursystemen nehmen Zellzahl und Zellviabilität über den 6-tägigen Kultivierungszeitraum stetig zu (a)/(b)/(c)/(d). Außer der Zellzahl an Tag 3 der Versuchsreihe mit der Fließge-

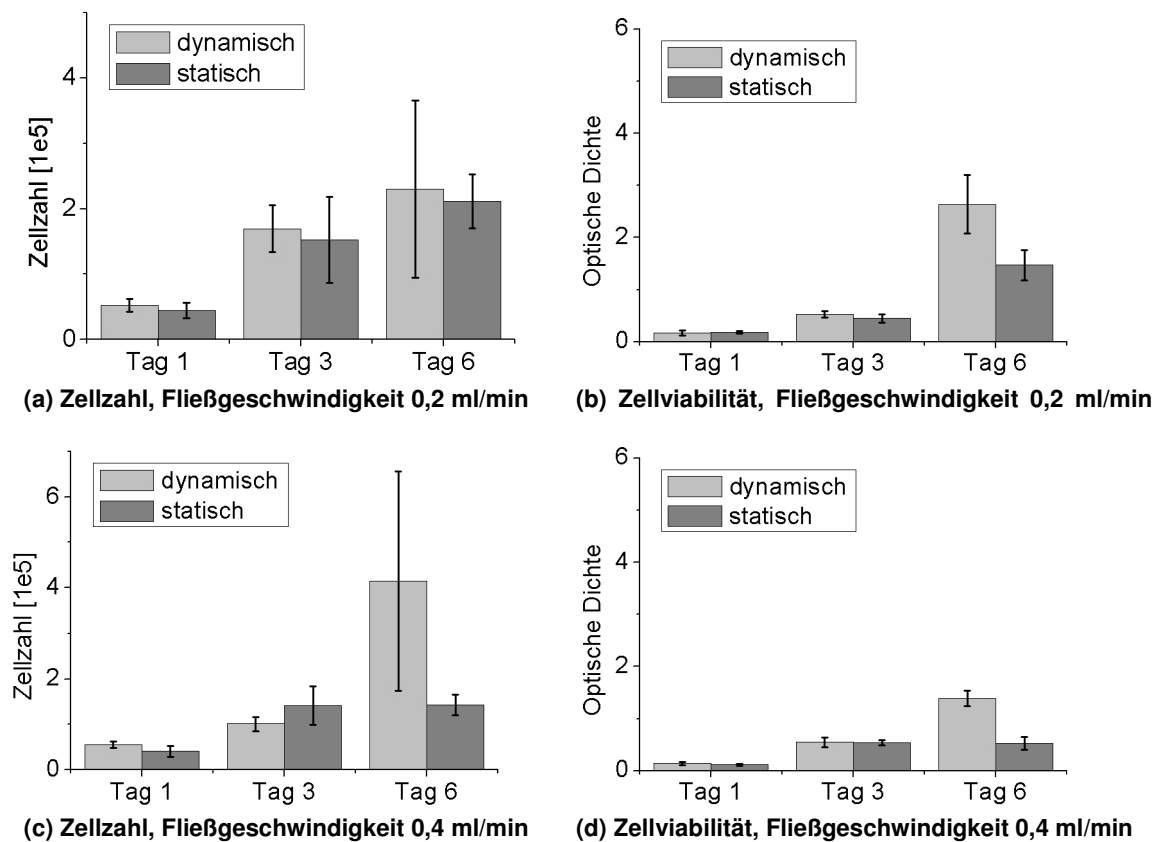


Abbildung 10: Säulendiagramme zu Zellzahl und Zellviabilität der L-929-Zellen während 6-tägiger Kultivierung auf CaP-Scaffolds in statischem bzw. dynamischem Kultursystem bei unterschiedlichen Fließgeschwindigkeiten.

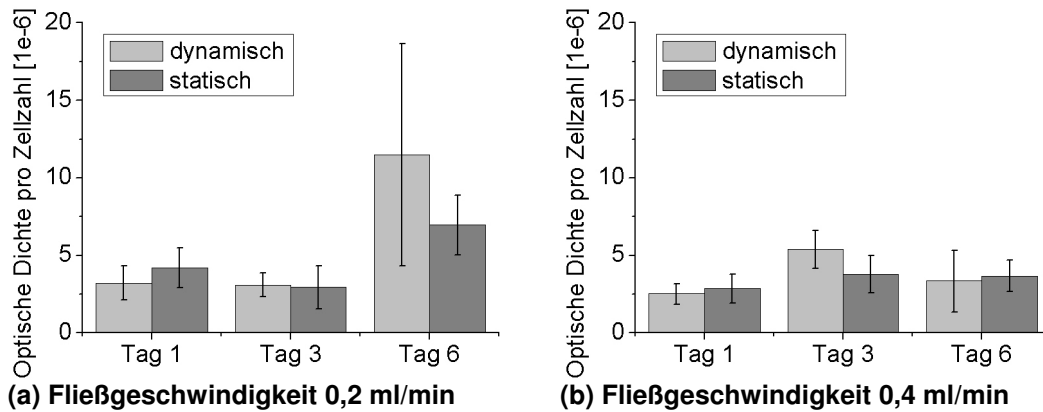


Abbildung 11: Säulendiagramme zur Aktivität pro Zelle der L-929-Zellen während 6-tägiger Kultivierung auf CaP-Scaffolds in statischem bzw. dynamischem Kultursystem bei unterschiedlichen Fließgeschwindigkeiten.

schwindigkeit von 0,4 ml/min im dynamischen Kultursystem (c) sind die Zellzahlen und Zellviabilitäten auf den CaP-Scaffolds aus dem dynamischen Kultursystem höher oder gleich denen aus dem statischen Kultursystem (a)/(b)/(c)/(d). Während sich die Zellzahlen der statischen Kultur gegenüber denen der dynamischen Kultur bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,2 ml/min (a)/(b) nur geringfügig unterscheiden, können nach 6-tägiger Kultivierung im dynamischen Kultursystem bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,4 ml/min eine deutlich erhöhte Zellzahl gegenüber der statischen Kultur gemessen werden ($p = 0,040$) (c). An Tag 6 sind die Zellviabilitäten in den dynamischen Kultursystemen sowohl bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,2 ml/min als auch bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,4 ml/min gegenüber den statischen Kultursystemen deutlich erhöht ($p = 7,7 \cdot 10^{-6}$ und $p = 5,3 \cdot 10^{-13}$) (b)/(d). Die Standardabweichungen der Zellzahlen sind im dynamischen Kultursystem (a)/(c) an Tag 6 am größten.

Die Aktivität pro Zelle (Abbildung 11) im Vergleich von statischer zu dynamischer Kultur bleibt an allen Tagen weitgehend gleich (a)/(b) und ist nur an Tag 6 im dynamischen Kultursystem bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,2 ml/min tendenziell höher (a).

4.2.3 Vergleich von MG63-Zellen und L-929-Zellen

Obwohl bei beiden Zelllinien die gleiche Ausgangszellzahl von 50000/ml verwendet wird und sie unter denselben Bedingungen kultiviert werden, fällt auf, dass die Werte der MG63-Zellen tendenziell höher sind als die der L-929-

Zellen. Dies macht sich vor allem in der Aktivität pro Zelle bemerkbar. Vermutlich sind die transformierten MG63-Zellen insgesamt stimulierbarer als die L-929-Zellen.

4.2.4 Vergleich der MG63-Zellen im Langzeitversuch

Im Langzeitversuch werden Zellzahl und Zellviabilität der MG63-Zellen nach 9-, 20- und 30-tägiger Kultivierung auf CaP-Scaffolds im statischen bzw. dynamischen Kultursystem bei einer Fließgeschwindigkeit von anfänglich 0,2 ml/min (Tag 1-3), später 0,4 ml/min bestimmt (Abbildung 12): In beiden Kultursystemen können die Zellkulturen während des 30-tägigen Versuchszeitraums am Leben erhalten werden (a)/(b). Jedoch nehmen Zellzahl und Zellviabilität zwischen Tag 9 und Tag 30 in beiden Kultursystemen nicht mehr wie über einen 6-tägigen Kultivierungszeitraum stetig zu. Sowohl im statischen als auch im dynamischen Kultursystem erreicht die Zellzahl an Tag 30 ihren niedrigsten oder tendenziell niedrigsten Wert (a). Besonders stark reduziert sich die Zellzahl im dynamischen Kultursystem zwischen Tag 9 und Tag 20. Bei der Zellviabilität wird im dynamischen Kultursystem der höchste Wert an Tag 30, im statischen Kultursystem der niedrigste Wert an Tag 9 erreicht (b). Im Vergleich zwischen statischem und dynamischem Kultursystem ist die Zellzahl im dynamischen Kultursystem an Tag 9 höher ($p=0,0263$) (a), die Zellviabilität ist im statischen Kultursystem an Tag 20 höher ($p=4,35 \cdot 10^{-12}$) (b). Die Standardabweichungen der Messwerte der Zellzahlen (a) sind im dynamischen Kultursystem an Tag 9 und Tag 30 am größten.

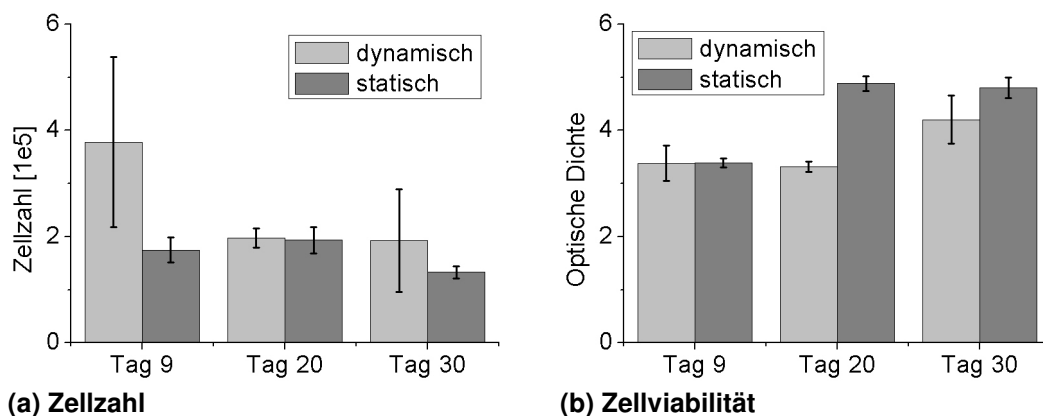


Abbildung 12: Säulendiagramme zu Zellzahl und Zellviabilität der MG63-Zellen während 30-tägiger Kultivierung auf CaP-Scaffolds in statischem bzw. dynamischen Kultursystem

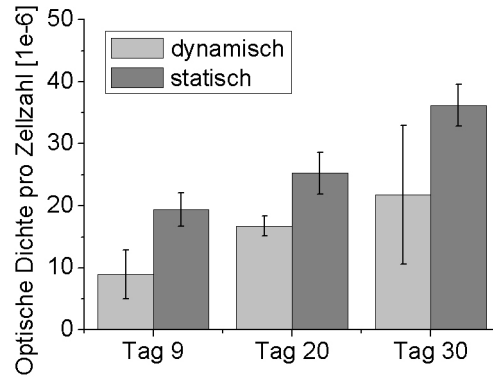


Abbildung 13: Säulendiagramm zur Aktivität pro Zelle der MG63-Zellen während 30-tägiger Kultivierung auf CaP-Scaffolds in statischem bzw. dynamischen Kultursystem

Die Zellzahlen sinken tendenziell, die Zellviabilitäten steigen tendenziell, was zu einer stetigen Zunahme der Aktivitäten pro Zelle (Abbildung 13) in beiden Kultursystemen führt. Die Aktivitäten pro Zelle sind im statischen Kultursystem an Tag 9 und Tag 20 höher ($p=4,14 \cdot 10^{-4}$; $p=1,08 \cdot 10^{-3}$) und an Tag 30 tendenziell höher als im dynamischen Kultursystem.

4.3 Einfluss der Fließgeschwindigkeit im dynamischen Kultursystem

4.3.1 Vergleich von Zellzahl und Zellviabilität unter Verwendung der Osteosarkomzelllinie MG63

Während der Versuchsreihen werden Zellzahl und Zellviabilität der MG63-Zellen nach 1-, 3- und 6-tägiger Kultivierung auf CaP-Scaffolds in dynamischen Kultursystemen bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,2 ml/min bzw. 0,4 ml/min

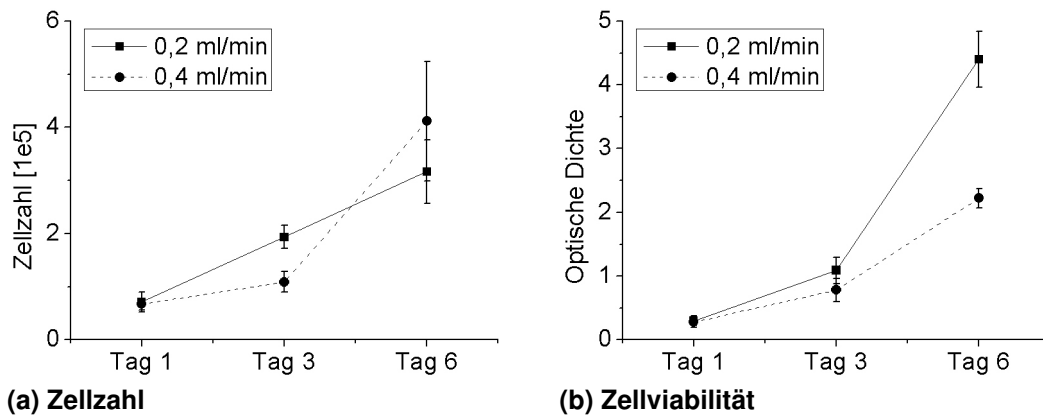


Abbildung 14: Punkt-Linien-Diagramme zu Zellzahl und Zellviabilität der MG63-Zellen während 6-tägiger Kultivierung auf CaP-Scaffolds in dynamischen Kultursystemen bei Fließgeschwindigkeiten von 0,2 ml/min (Rechteck) bzw. 0,4 ml/min (Kreis).

bestimmt (Abbildung 14): Zellzahl (a) und Zellviabilität (b) der MG63-Zellen sind bei beiden Fließgeschwindigkeiten nach einem Tag am niedrigsten und unterscheiden sich am geringsten, nach 6 Tagen sind die Werte am höchsten und der Unterschied ist am deutlichsten ausgeprägt. Die Zellzahl nach 3-tägiger Kultivierung im dynamischen Kultursystem bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,2 ml/min ist höher als die bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,4 ml/min, während sie nach 6-tägiger Kultivierung tendenziell niedriger ist (a). Dabei ist der Proliferationsschub bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,4 ml/min zwischen Tag 3 und Tag 6 besonders stark. Die Zellzahl steigt bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,2 ml/min linear an, bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,4 ml/min eher exponentiell (a). Die Zellviabilität steigt bei beiden Fließgeschwindigkeiten zwischen Tag 1 und Tag 3 leicht an, zwischen Tag 3 und Tag 6 steigt die Zellviabilität der MG63-Zellen auf den CaP-Scaffolds, die in einem dynamischen Kultursystem bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,2 ml/min kultiviert werden stärker an, als die, die bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,4 ml/min kultiviert werden (b). Beide Kurven verlaufen exponentiell.

Die Aktivität pro Zelle (Abbildung 15) wird aus dem Quotient des Mittelwertes der Zellviabilität und des Mittelwertes der Zellzahl errechnet. Während des 6-tägigen Kultivierungszeitraums zeigt der Vergleich der Aktivität pro Zelle der MG63-Zellen auf CaP-Scaffolds im dynamischen Kultursystem bei Fließgeschwindigkeiten von 0,2 ml/min bzw. 0,4 ml/min, dass der höchste Wert nach 6 Tagen bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,2 ml/min erreicht wird, bei einer

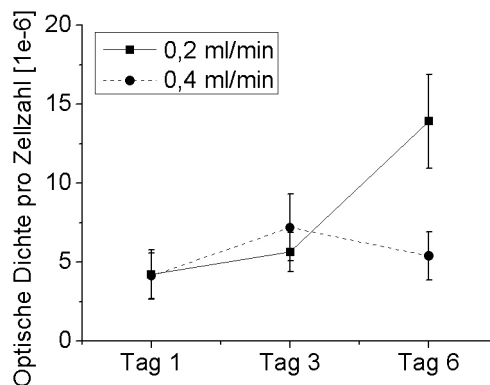


Abbildung 15: Punkt-Linien-Diagramm zur Aktivität pro Zelle der MG63-Zellen im dynamischen Kultursystem bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,2 ml/min (Rechteck) bzw. 0,4 ml/min (Kreis)

Fließgeschwindigkeit von 0,4 ml/min ist kein Anstieg der Aktivität pro Zelle festzustellen.

4.3.2 Vergleich von Zellzahl und Zellviabilität unter Verwendung der Fibroblastenzelllinie L-929

Während der Versuchsreihen werden Zellzahl und Zellviabilität der L-929-Zellen nach 1-, 3- und 6-tägiger Kultivierung auf CaP-Scaffolds in dynamischen Kultursystemen bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,2 ml/min bzw. 0,4 ml/min bestimmt (Abbildung 16): Zellzahl (a) und Zellviabilität (b) der L-929-Zellen sind bei beiden Fließgeschwindigkeiten nach einem Tag am niedrigsten und unterscheiden sich am geringsten, nach 6 Tagen sind die Werte am höchsten und der Unterschied ist am deutlichsten ausgeprägt. Die Zellzahl nach 3-tägiger Kultivierung im dynamischen Kultursystem bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,2 ml/min steigt schneller an, stagniert dann aber, während die Zellzahl bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,4 ml/min zwischen Tag 3 und Tag 6 nahezu exponentiell ansteigt (a). Die Zellviabilität steigt bei beiden Fließgeschwindigkeiten zwischen Tag 1 und Tag 3 leicht an, zwischen Tag 3 und Tag 6 steigt die Zellviabilität der L-929-Zellen auf den CaP-Scaffolds, die in einem dynamischen Kultursystem bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,2 ml/min kultiviert werden stärker an, als die, die bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,4 ml/min kultiviert werden (b).

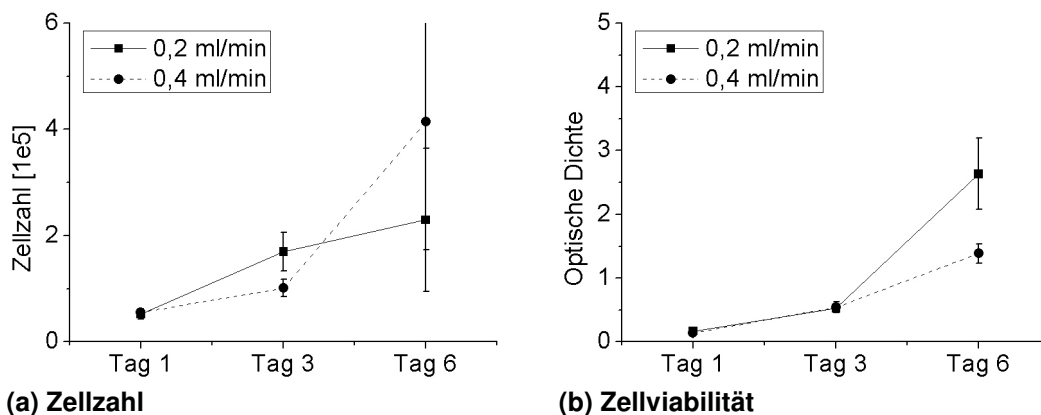


Abbildung 16: Punkt-Linien-Diagramme zu Zellzahl und Zellviabilität der L-929-Zellen im dynamischen Kultursystem bei Fließgeschwindigkeiten von 0,2 ml/min (Rechteck) bzw. 0,4 ml/min (Kreis).

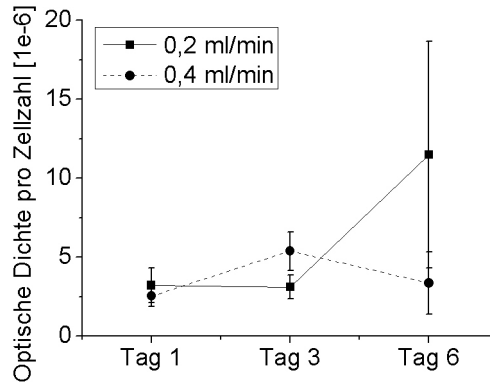


Abbildung 17: Punkt-Linien-Diagramm zur Aktivität pro Zelle der L-929-Zellen im dynamischen Kultursystemen bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,2 ml/min (Rechteck) bzw. 0,4 ml/min (Kreis).

Bei der Aktivität pro Zelle (Abbildung 17) zeigt der Vergleich der L-929-Zellen auf CaP-Scaffolds im dynamischen Kultursystem bei Fließgeschwindigkeiten von 0,2 ml/min bzw. 0,4 ml/min während des 6-tägigen Kultivierungszeitraums, dass der höchste Wert tendenziell nach 6 Tagen bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,2 ml/min erreicht wird. Bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,4 ml/min bleibt die Aktivität pro Zelle weitgehend konstant.

5 Diskussion

Um bisherige Kulturbedingungen zu verbessern, müssen geeignete Kulturmethoden und ihre dazugehörigen Scaffolds ausgewählt werden.

Die mit dem 3D Powder Printing System gedruckten CaP-Scaffolds eignen sich als Trägermaterial für das Tissue Engineering von Knochen. Dies belegt die reichliche, homogene Besiedelung der Scaffolds mit morphologisch gesunden Zellen, welche in das Porensystem hineinwachsen. Die Oberflächenbeschaffenheit ermöglicht den Zellen am Scaffold zu adhären, damit zu interagieren und eine natürliche dreidimensionale Anordnung zu bilden. Ihre Herstellung erfordert eine Dampfsterilisation im Autoklaven, denn eine Sterilisation in 70%igem Ethanol ist aufgrund der Porosität nicht möglich. Unter Verwendung dieser Monetit-Scaffolds nehmen bei beiden Zelllinien in beiden Kultursystemen Zellzahl und Zellviabilität über einen 6-tägigen Kultivierungszeitraum stetig zu und im Langzeitversuch über 30 Tage kann die Zellkultur in beiden Kultursystemen am Leben erhalten werden.

Zur Optimierung einer Kulturmethode muss ein geeignetes Stimulationsverfahren gewählt werden, was von dem jeweils zu generierenden Gewebe bedingt wird. Zirkulierendes Medium in einem dynamischen Kultursystem bietet gegenüber einem statischen Kultursystem verbesserte Bedingungen bezüglich Nährstoffversorgung und Stimulation durch Flüssigkeitsscherstress. Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuchsreihen zeigen, dass sich Zellzahlen und Zellviabilitäten von statischen zu dynamischen Kulturen unterscheiden.

Bei den MG63-Zellen unterscheiden sich die bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,2 ml/min im dynamischen Kultursystem über einen 6-tägigen Versuchszeitraum und die bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,4 ml/min im dynamischen Kultursystem über die ersten 3 Tage gemessenen Werte gegenüber denen im statischen Kultursystem gemessenen nur geringfügig. Da nach 6-tägiger Kultivierung im dynamischen Kultursystem bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,4 ml/min eine signifikant höhere Zellzahl gegenüber dem statischen Kultursystem gemessen wird ($p = 0,0089$), kann man vermuten, dass die Durchflussmenge

des Mediums und die damit veränderte mechanische Stimulierung und verbesserte nutritive Versorgung erst bei einer Fließgeschwindigkeit von über 0,2 ml/min und nach mehr als 3-tägiger Kultivierung eine erhöhte Proliferation im dynamischen Kultursystem gegenüber dem statischen Kultursystem induziert.

Unter Verwendung der L-929-Zellen sind an Tag 6 die Zellviabilitäten in den dynamischen Kultursystemen und die Zellzahl im dynamischen Kultursystem bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,4 ml/min signifikant höher als im statischen Kultursystem ($p=7,7 \cdot 10^{-6}$; $p=5,3 \cdot 10^{-13}$; $p=0,040$). Daran erkennt man, dass die Zellen im dynamischen Kultursystem besser wachsen.

In einer weiteren Studie (Leukers, et al., 2005) wurde eine mittels 3D Powder Printing System hergestellte Struktur auf der Basis von Hydroxylapatit mit osteoblastenähnlichen MC3T3-E1-Zellen besiedelt und über 7 Tage statisch und dynamisch bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,018 ml/min kultiviert. Nach Tag 1 und Tag 7 wurden eine histologische Analyse und ein Zellviabilitätstest durchgeführt. Innerhalb einer Woche stieg die Zellviabilität bei den statisch kultivierten Zellen um das 13-fache, bei den dynamisch kultivierten Zellen um das 16-fache an. Die histologische Analyse an Tag 7 zeigte, dass alle getesteten Hydroxylapatit-Strukturen mit einem vielschichtigen Zelllayer bedeckt waren. Es zeigten sich jedoch Unterschiede im Wachstumsverhalten zwischen dynamisch und statisch kultivierten Zellen: Während die Zellen auf statisch kultivierten Scaffolds hauptsächlich nur an der Oberfläche lokalisiert waren, tendierten die Zellen auf dynamisch kultivierten Scaffolds auch dazu in das Porensystem hineinzuwachsen.

Die Studie von Leukers bestätigt, dass dynamische Kultursysteme bessere Kulturbedingungen als statische Kultursysteme für Zellen auf mittels 3D Powder Printing System gedruckten Scaffolds bieten. Bei Leukers wie in dieser Arbeit steigen die Zellviabilitäten innerhalb einer Woche im dynamischen Kultursystem stärker an als im statischen (Leukers: Faktor 1,23; in dieser Arbeit: durchschnittlich Faktor 1,26). Ebenso zeigen die histologischen Analysen vielschichtigen Zelllayer, die dazu tendieren in das Porensystem hineinzuwachsen.

In einer weiteren Studie (Holtorf, et al., 2005) wird bestätigt, dass dynamische Kultursysteme bessere Bedingungen für zellbesiedelte Calciumphosphat-Scaffolds bieten als statische Kultursysteme, was an Hand von Zellzahl (Quantifizierung der DNA-Menge), osteogener Differenzierung (Bestimmung der osteogenen Marker Alkalische Phosphatase und Osteopontin) und der räumliche Verteilung der Zellen auf den Scaffolds (Betrachtung von mit Methylenblau und basischem Fuchsin gefärbten Präparaten unter dem Lichtmikroskop) ermittelt wurde: Man entnahm hierbei einer Ratte aus dem Knochenmark mesenchymale Stammzellen, welche nach 6-tägiger Expandierung in osteogenem Medium auf CaP-Scaffolds angesiedelt wurden. Diese zellbesiedelten Konstrukte wurden für 4, 8 oder 16 Tage in dynamischen oder statischen Kultursystemen kultiviert. Im dynamischen Kultursystem wurde am ersten Tag eine Fließgeschwindigkeit von 0,3 ml/min eingestellt, um eine gute Anhaftung der Zellen an die Scaffolds zu erhalten, an den folgenden Tagen wurde die Fließgeschwindigkeit auf 1 ml/min erhöht. Während der ersten 4 Tage konnte in beiden Kultursystemen ein Proliferationsschub festgestellt werden, der jedoch unter dynamischen Kulturbedingungen viel größer war als unter statischen. Unter statischen Kulturbedingungen blieb die Zellzahl auf den Scaffolds über den gesamten Versuchszeitraum weitgehend konstant. Unter dynamischen Kulturbedingungen waren signifikant weniger Zellen am 8. und 16. Tag verglichen mit dem 4. Tag, was darauf zurückgeführt werden kann, dass die zunehmend sezernierte extrazelluläre Matrix das Extrahieren von DNA aus dem Scaffoldinneren verhindert. Das heißt, dass die tatsächliche Zellzahl größer ist als die gemessene. An allen Messtagen wurde je ein Scaffold aus beiden Kultursystemen entnommen und für eine histologische Untersuchung präpariert. In der statischen Kultur blieben die Zellen in der Peripherie der Scaffolds, sie wuchsen nicht in das Porensystem der Scaffolds hinein und man konnte zwischen den unterschiedlichen Messtagen keine Unterschiede bei der Zellbesiedelung erkennen. Im Gegensatz dazu waren im dynamischen Kultursystem große Unterschiede bei der Zellbesiedelung an den unterschiedlichen Messtagen zu erkennen. Nach 4 Tagen siedelten die Zellen eher oberflächlich und penetrierten das Porensystem zu ungefähr einem Drittel. Nach 8 Tagen war das Porensystem durchpenetriert, wies aber noch unbesie-

deltete Stellen auf. Nach 16 Tagen war das ganze Scaffold besiedelt und die sezernierte Extrazellulärmatrix bildete Brücken über die Porenöffnungen.

Die in der Studie von Holtorf gewonnenen Erkenntnisse über die räumliche Verteilung von Zellen auf den Scaffolds nach mehrtägiger Kultivierung in statischer oder dynamischer Kultur (Holtorf: Fließgeschwindigkeit 1 ml/min; in dieser Arbeit: Fließgeschwindigkeit 0,2 ml/min und 0,4 ml/min) lassen sich auf die in dieser Arbeit mit der Rasterelektronenmikroskopie gewonnenen übertragen. Bei beiden Experimenten wachsen die dynamisch kultivierten Zellen in das Porensystem der Scaffolds hinein. Auch beim Vergleich der Zellzahlen wird bei beiden Experimenten während der ersten Tage (Holtorf: 4 Tage; in dieser Arbeit: 6 Tage) ein Proliferationsschub festgestellt, welcher unter dynamischen Kulturbedingungen größer war als unter statischen. Dies bestätigt, dass ein dynamisches Kultursystem bessere Voraussetzungen für Zellwachstum bietet als ein statisches.

Eine geeignete Kulturmethode für das Tissue Engineering muss unter anderem ermöglichen, dass in-vitro verschiedenartige Zelltypen in komplexen dreidimensionalen organartigen Strukturen über ausgedehnte Zeiträume kultiviert werden können. Jedoch stellt die Generierung von differenzierten Zellen und ihre Erhaltung für längere Zeit experimentelle Schwierigkeit dar. Während statische Kulturen nur für einen relativ kurzen Zeitraum mit regelmäßigem, aber intermittierendem Mediumwechsel erhalten werden können, soll ein dynamisches Kultursystem eine in-vitro Unterhaltung von Zellen in optimaler Qualität über einen ausgedehnten Zeitraum ermöglichen. Um die Unterschiede von statischer und dynamischer Kultivierung über einen längeren Versuchszeitraum herauszufinden, wird in dieser Arbeit neben den Versuchsreihen über einen 6-tägigen Kultivierungszeitraum auch ein Langzeitversuch über 30 Tage angesetzt.

Darin fällt auf, dass in beiden Kultursystemen die Zellkulturen während des 30-tägigen Versuchszeitraums am Leben erhalten werden können, jedoch Zellzahl und Zellviabilität nicht mehr wie über einen 6-tägigen Kultivierungszeitraum stetig zunehmen. Die Zellzahlen sinken tendenziell, was sich besonders im dynamischen Kultursystem zwischen Tag 9 und Tag 20 bemerkbar macht. Im

Vergleich zwischen dynamischem und statischem Kultursystem ist im dynamischen Kultursystem die Zellzahl an Tag 9 höher ($p=0,0263$), die Zellviabilität an Tag 20 niedriger ($p=4,35 \cdot 10^{-12}$) und die Aktivitäten pro Zelle an Tag 9 und Tag 20 niedriger ($p=4,14 \cdot 10^{-4}$; $p=1,08 \cdot 10^{-3}$) als im statischen Kultursystem.

In einer weiteren Studie (Strehl, et al., 2005) wurden statisch und dynamisch kultivierte gesunde humane Gelenkknorpelimplantate über einen Zeitraum von 56 Tagen miteinander verglichen. Die statischen Kulturen waren mit und ohne Zusatz von Serum, der dynamischen Kultur war kein Serum zugesetzt. Die Experimente zeigten, dass eine kurzzeitige Kultivierung in differenzierten Stadien über 14 Tage unter allen getesteten Kulturbedingungen möglich war, die Unterschiede zwischen dynamischem und statischem Kultursystem waren nur geringfügig. Nach 28 und nach 42 Tagen erwiesen sich die statischen Kulturen mit und ohne Serum zunehmend als inakzeptabel für eine Langzeitkultur. Die besten Ergebnisse einer Langzeitkultur über 56 Tage erreichte das dynamische Kultursystem unter serumfreien Bedingungen.

Die Studie von Strehl bestätigt, dass für eine Langzeitkultur ein dynamisches Kultursystem geeignet ist. Dass die statische Kultur nach über 28 Tagen zunehmend inakzeptabel wird, kann durch diese Arbeit wegen eines zu kurzen Versuchszeitraumes nicht herausgefunden werden (in dieser Arbeit: 30-tägiger Versuchszeitraum; Strehl: 56-tägiger Versuchszeitraum).

Der Effekt, dass die Zellzahlen im Langzeitversuch, besonders im dynamischen Kultursystem, tendenziell sinken, fällt auch in der Studie von Holtorf auf (Holtorf: an Tag 8 und Tag 16 weniger Zellen als an Tag 4; in dieser Arbeit: an Tag 20 weniger Zellen als an Tag 9). Möglicherweise erhält man bei der Zellzahlmessung nur ein annähernd exaktes Ergebnis. Denkbar wäre, dass die gemessenen Zellzahlen niedriger sind als die tatsächlich auf den Scaffolds vorhandenen, denn beim Ablösevorgang der Zellen von den Scaffolds könnten einige in den porösen Strukturen verbleiben und nicht mit in die Messung einbezogen werden.

Obwohl ein dynamisches Kultursystem im Allgemeinen bessere Kulturbedingungen bietet als ein statisches Kultursystem, sind im Langzeitversuch die gemessenen Werte für die Zellviabilität an Tag 20 und die Aktivitäten pro Zelle an Tag 9 und an Tag 20 im statischen Kultursystem höher. Dabei ist zu bedenken, dass der WST-1 Assay zur Zellviabilitätsbestimmung sehr empfindlich ist: Eine veränderte Sauerstoffversorgung führt zu einer erhöhten Menge an Superoxiden, welche durch Sauerstoffreduktion entstehen und für eine WST-1 Reduktion verantwortlich sind. Möglicherweise lässt sich der verringerte WST-1 Assay des dynamischen Kultursystems im Langzeitversuch dieser Arbeit damit erklären, dass die Sauerstoffversorgung über den nur locker auf die Vorratsflasche aufgesetzten Schraubverschlussdeckel im dynamischen Kultursystem gegenüber der Sauerstoffversorgung in der 6-Well Multischale verändert ist.

Bei der Optimierung eines dynamischen Kultursystems ist zu beachten, dass durch geeignete Dynamik des Kulturmediums eine verbesserte Nährstoffversorgung und Stimulation durch Flüssigkeitsscherstress innerhalb der Scaffolds erreicht wird. Unter Verwendung der peristaltischen Pumpe Gilson Minipuls 3 wird mit geringer Pulsation und einer großen Geschwindigkeitskonstanz gearbeitet. Die optimale Höhe der Fließgeschwindigkeit hängt dabei sowohl von der Stimulierbarkeit der Zellen als auch von den Materialeigenschaften der Scaffolds ab. In dieser Arbeit werden MG63-Zellen und L-929-Zellen auf CaP-Scaffolds kontinuierlich bei Fließgeschwindigkeiten von 0,2 ml/min und 0,4 ml/min stimuliert und miteinander im Hinblick auf Zellzahl und Zellviabilität verglichen.

Man erkennt, dass bei beiden Zelllinien die Zellzahl zwischen Tag 3 und 6 im dynamischen Kultursystem bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,4 ml/min nahezu exponentiell ansteigt, während der Proliferationsschub bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,2 ml/min geringer ausfällt. Die Zellviabilität sowie die Aktivität pro Zelle sind nach 6-tägiger Kultivierung im dynamischen Kultursystem bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,2 ml/min höher oder tendenziell höher als im dynamischen Kultursystem bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,4 ml/min.

In einer weiteren Studie (Cartmell, et al., 2003) wird der Einfluss der Perfusionsrate auf Zellviabilität, Proliferation und Genexpression von osteoblastenähnlichen MC3T3-E1 Zellen auf Scaffolds aus humanem Trabekelknochen untersucht. Die Konstrukte wurden eine Woche lang neben einer statischen Kontrolle bei Fließgeschwindigkeiten von 0,01 ml/min, 0,1 ml/min, 0,2 ml/min oder 1 ml/min perfundiert. An Tag 7 zeigte sich, dass eine Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min zum Zelltod über die gesamte Scaffoldoberfläche führte, während niedrigere Fließgeschwindigkeiten zu höheren Zellzahlen besonders im Zentrum der Scaffolds führten. Dabei wurde der höchste Wert bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,01 ml/min, der zweithöchste bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,1 ml/min, der dritthöchste in der statischen Kultur und der niedrigste bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,2 ml/min erreicht.

Die in der Studie von Cartmell gewonnene Erkenntnis, dass die niedrigeren Fließgeschwindigkeiten (in dieser Arbeit: 0,2 ml/min; Cartmell: 0,01 ml/min) zu höheren Zellzahlen führen, können in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Dies mag an den unterschiedlichen Stimulierbarkeiten der Zellarten (in dieser Arbeit: MG-63 und L-929; Cartmell: MC3T-E1) liegen. Außerdem können die absoluten Fließgeschwindigkeiten aus unterschiedlichen Studien nur eingeschränkt miteinander verglichen werden, da z.B. eine unterschiedliche Architektur oder Porosität der Scaffolds bei gleichen Fließgeschwindigkeiten unterschiedlichen Scherstress auf die Zellen innerhalb der Scaffolds ausüben.

Ein Problem bei der Auswertung in dieser Arbeit stellen die im dynamischen Kultursystem unterschiedlichen Positionen der Scaffolds innerhalb des Kulturcontainers (randständig, mittelständig) dar. Die nutritiven und biophysikalischen Bedingungen sind daher nicht in allen Bereichen des Kulturcontainers gleich und hängen von dessen Strömungsprofil ab. Diese unterschiedlichen Kulturbedingungen der einzelnen für die Bestimmung des Mittelwertes verwendeten Scaffolds spielen nach 6-tägiger Kultivierung auf das Wachstum der Zellen die größte Rolle. Daher sind die Standardabweichungen der Messwerte der Zellzahlen im dynamischen Kultursystem ab Tag 6 am größten.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass zur Optimierung von Kulturmethoden neben der Wahl geeigneter Scaffoldmaterialien auch auf eine passende Dynamik des Kulturmediums geachtet werden muss. MG63-Zellen und L-929-Zellen können auf den mit dem 3D Powder Printing System gedruckten CaP-Scaffolds über einen 30-tägigen Kultivierungszeitraum am Leben erhalten werden. Im Vergleich über einen 6-tägigen Kultivierungszeitraum wachsen sie in einem dynamischen Kultursystem besser als in einem statischen. Dabei spielt die Höhe der Fließgeschwindigkeit im dynamischen Kultursystem auf das Zellwachstum eine Rolle. Außerdem ist zu beachten, dass der applizierte Scherstress auf die einzelnen Scaffolds innerhalb des Kulturcontainers unterschiedlich ist und von der Position innerhalb des Containers abhängt.

6 Zusammenfassung

Der Ersatz von Knochengewebe durch die Methode des Tissue Engineerings stellt eine viel versprechende Alternative zu konventionellen Therapieformen dar. Jedoch müssen die bisherigen Kulturbedingungen verbessert werden, um das Differenzierungsverhalten von Zellen optimal steuern zu können. Dabei spielt nicht nur die Wahl eines geeigneten Scaffolds und der zu verwendenden Zellen, sondern auch die des Kultursystems eine entscheidende Rolle. In einem dynamischen Kultursystem zirkuliert Medium und bietet gegenüber einem statischen Kultursystem veränderte Bedingungen bezüglich Nährstoffversorgung und Stimulation durch Flüssigkeitsscherstress. Um die Einflüsse der veränderten Bedingungen zu analysieren, wird in dieser Arbeit ein dynamisches Kultursystem etabliert. Dazu werden CaP-Scaffolds mit dem 3D Powder Printing System gedruckt und mit Zellen der Osteosarkomzelllinie MG63 oder der Fibroblastenzelllinie L-929 besiedelt. In 17 Versuchsreihen werden die zellbesiedelten Scaffolds bei unterschiedlichen Fließgeschwindigkeiten und über unterschiedliche Kultivierungszeiträume kontinuierlich perfundiert. Anhand der Wachstumsparameter Zellzahl und Zellviabilität, sowie der Morphologie und räumlichen Verteilung der Zellen werden die Qualitäten der Kultursysteme untersucht und mit statischen Kultursystemen verglichen.

Die mit dem 3D Powder Printing System gedruckten Scaffolds erweisen sich als geeignet: Nach 6-tägiger Kultur können unter dem Rasterelektronenmikroskop auf den CaP-Scaffolds eine reichliche Zellbesiedelung mit morphologisch gesunden Zellen, die in das Porensystem hineinwachsen, beobachtet werden. Bei beiden Zelllinien nehmen in beiden Kultursystemen die Wachstumsparameter über einen 6-tägigen Kultivierungszeitraum stetig zu und eine Langzeitkultur über 30 Tage kann in beiden Kultursystemen am Leben erhalten werden.

Die kontinuierliche Perfusion in einem dynamischen Kultursystem wirkt sich auf das Zellwachstum günstig aus. Im Vergleich von dynamischen zu statischem Kultursystem über einen 6-tägigen Kultivierungszeitraum wachsen beide Zelllinien im dynamischen Kultursystem besser. Dabei spielt die Fließgeschwindig-

keit im dynamischen Kultursystem auf die verbesserte Nährstoffversorgung und Stimulation durch Flüssigkeitsscherstress eine Rolle. Außerdem ist zu beachten, dass der Einfluss der Fließgeschwindigkeit des Mediums auf die einzelnen Scaffolds innerhalb des Kulturcontainers unterschiedlich ist. Dies hängt vom Strömungsprofil im Container ab und macht sich durch eine erhöhte Standardabweichung der Messwerte gegenüber der statischen Kultur bemerkbar.

In weiteren Arbeiten auf dem Gebiet der qualitativen Untersuchung von dynamischen Kultursystemen können Ergänzungen vorgenommen werden. Der in dieser Arbeit gegebene Überblick beschränkt sich auf 6- und 30-tägige Versuchszeiträume. Um die Überlegenheit des dynamischen Kultursystems über lange Zeit zu prüfen, ist dieser Zeitraum zu kurz und müsste verlängert werden. Auch wäre es interessant, den Einfluss der Dynamik des Kulturmediums genauer zu untersuchen. Dazu könnten die Fließgeschwindigkeiten stärker variiert werden und neben kontinuierlicher Perfusion auch Pulsation eingesetzt werden. Um die Mehrheit der Zellen mit einem physiologisch relevanten Scherstress zu versorgen, wäre auch ein Scherstressprofil des Kulturcontainers hilfreich. Dieses kann man z. B. durch eine Strömungssimulation in einem virtuellen dynamischen Kultursystem erhalten. Möglich wäre auch andere Zellquellen anzuzapfen, verschiedene Scaffoldmaterialien auszuprobieren oder unterschiedliche Kulturmedien zu verwenden. Die Kulturmedien könnten z. B. ohne Zusatz von Seren sein oder aber mit knorpelgewebespezifischen Morphogenen, Hormonen oder Wachstumsfaktoren versetzt sein. Zudem erlaubt die Untersuchung anderer Parameter, wie z. B. der spezifischen Aktivität der Alkalischen Phosphatase, der Osteocalcin-Freisetzung oder der Osteopontinspiegel, eine Aussage über die Differenzierung der Zellen. Auch würde eine höhere Anzahl an Proben und Messwerten die Ergebnisse genauer machen. Diese Ergänzungen der Versuche würden das Wissen über zellbiologische Vorgänge in dynamischen Kultursystemen auf CaP-Scaffolds erweitern.

7 Literaturverzeichnis

- Anselme K., 2000. Osteoblast adhesion and biomaterials. *Biomaterials* 21(7): 667-681
- Bakker A., Soejima K., Klein-Nulend J., Burger E., 2001. The production of nitric oxide and prostaglandin E(2) by primary bone cells is shear stress dependent. *J Biomech.* 34(5): 671–677
- Baksh D., Song L., Tuan R., 2004. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med.* 8(3): 301-316
- Bancroft G., Sikavitsas V., van den Dolder J., Sheffield T., Ambrose C., Jansen J., Mikos A, 2002. Fluid flow increases mineralized matrix deposition in 3D perfusion culture of marrow stromal osteoblasts in a dose-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99(20): 12600–12605
- Barralet J., Grover L., Gaunt T., Wright A., Gibson I., 2001. Preparation of macroporous calcium phosphate cement tissue engineering scaffold. *Biomaterials* 23: 3063–3072
- Benninghoff, Drenckhahn, 2002. *Anatomie* 16. Aufl.; Urban & Fischer, München, Jena
- Bodnar A., Ouellette M., Frolkis M., Holt S., Chiu C.-P., Morin G., Harley C., Shay J., Lichtsteiner S., Wright W., 1998. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279(5349): 349-352
- Borden M., El-Amin S., Attawia M., Laurencin C. 2003. Structural and human cellular assessment of a novel microsphere-based tissue engineered scaffold for bone repair. *Biomaterials* 24(4): 597-609
- Buckwalter J., Glimcher M., Cooper R., Recker R., 1996. Bone biology II: Formation, form, modeling, remodeling and regulation of cell function. *Instr Course Lect.* 45: 387-399
- Burger E., Klein-Nulend J., 1999. Mechanotransduction in bone--role of the lacuno-canalicular network. *Faseb J.* 13 (Suppl): 101-112
- Cancedda R., Giannoni P., Mastrogiacomo M., 2007. A tissue engineering approach to bone repair in large animal models and in clinical practice. *Biomaterials* 28(29): 4240-4250
- Caplan A., Bruder S., 2001. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol Med.* 7(6): 259-264
- Cartmell S., Porter B., Garcia A., Guldberg R., 2003. Effects of Medium Perfusion Rate on Cell-Seeded Three-Dimensional Bone Constructs in Vitro. *Tissue Engineering* 9(6): 1197-1203

- Cech T., 2000. Leben am Ende der Chromosomen: Telomere und Telomerase. *Angew. Chem.* 112: 34-44
- Daum N., 2004. Integrin $\alpha 6\beta 4$ und Proteinkinase C in epidermaler Differenzierung und Haut-Carcinogenese. Kaiserslautern
- Dettmeyer R., 2006. *Medizin & Recht - Rechtliche Sicherheit für den Arzt*, 2. Aufl.; Springer Medizinverlag, Heidelberg
- Diederichs S., 2008. *Dynamische Kultivierungsmethoden für das Tissue Engineering von Knochen*. Hannover
- Dos Santos E., Farina M., Soares G., Anselme K., 2009. Chemical and topographical influence of hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate surfaces on human osteoblastic cell behaviour. *J Biomed Mater Res A*. 89(2): 510-520
- Duncan R., Turner C., 1995. Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain. *Calif Tissue Int.* 57(5): 344-358
- Ewers R., Turhani D., Item C., Kapral D., Thurnher D., Cvinkl B., Weissenböck M., Erovic B., Lauer G., 2003. „Bioengineered Knochen-Produktion“ – Aktuelle Anwendungen des Tissue Engineering in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie. *Z Zahnärztl Impl*;19(4): 216-220
- Freshney R., Obradovic B., Grayson W., Cannizzaro C., Vunjak-Novakovic G., 2007. Principles of Tissue Culture and Bioreaktor Design, in *Principles of Tissue Engineering*, edited by Lanza, Langer, Vacanti; pp 155-184
- Gbureck U., Hölzel T., Biermann I., Barralet J., Grover L., 2008. Preparation of tricalcium phosphate/calcium pyrophosphate structures via rapid prototyping. *J Mater Sci: Mater Med* 19: 1559-1563
- Gbureck U., Hölzel T., Klammert U., Würzler K., Müller F., Barralet J., 2007. Resorbable Dicalcium Phosphate Bone Substitutes Prepared by 3D Powder Printing. *Adv. Funct. Mater.* 17: 3940-3945
- Giancotti F., Ruoslahti E., 1999. Integrin signalling. *Science*. 285(5430): 1028-32.
- Habel B., 2004. *Elektrische Stimulation von Zellen und Geweben am besonderen Beispiel von Knochenzellen*. Berlin
- Holtorf H., Jansen J., Mikos A., 2005. Flow perfusion cultures induces the osteoblastic differentiation of marrow stromal cell-scaffold constructs in the absence of dexamethasone. *Wiley Periodicals, Inc. J Biomed Mater Res* 72A: 326-334
- Holtorf H., Sheffield T., Ambrose C., Jansen J., Mikos A., 2005. Flow Perfusion Culture of Marrow Stromal Cells seeded on Porous Biphasic Calcium Phosphate Ceramics. *Annals of Biomedical Engineering*, 33(9): 1238-1248

- Hunziker E., 2002. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage*. 10(6): 432-463
- Ikeda T., Futaesaku Y., Tsuchida N., 1992. In vitro differentiation of the human osteosarcoma cell lines, HOS and KHOS. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*. 62(3): 199-206
- Jacobs C., Yellowley C., Davis B., Zhou Z., Cimbala J., Donahue H. 1998. Differential effect of steady versus oscillating flow on bone cells. *J Biomech*. 31(11): 969–976
- Janssen F., Oostra J., van Oorschot A., van Blitterswijk C., 2006. A perfusion bioreactor system capable of producing clinically relevant volumes of tissue-engineered bone: In vivo bone formation showing proof of concept. *Biomaterials* 27 (3): 315-323
- Jungreuthmayer C., Donahue S., Jaasma M., Al-Munajjed A., Zanghellini J., Kelly D., O'Brien F., 2009. A Comparative Study of Shear Stresses in Collagen-Glycosaminoglycan and Calcium Phosphate Scaffolds in Bone Tissue-Engineering Bioreactors; *Tissue Engineering: Part A* 15 (5): 1141-1149
- Kanayama M., Hashimoto T., Shigenobu K., Yamane S., Bauer T. W., Togawa D., 2006. A prospective randomized study of posterolateral lumbar fusion using osteogenic protein-1 (OP-1) versus local autograft with ceramic bone substitute: emphasis of surgical exploration and histologic assessment. *Spine (Phila Pa 1976)*. 31(10):1067-1074
- Klammert U., Reuther T., Jahn C., Kraski B., Kübler A., Gburek U., 2009. Cytocompatibility of brushite and monetite cell culture scaffolds made by three-dimensional powder printing, *Acta Biomaterialia* 5: 727-734
- Klein-Nulend, J., van der Plas, A., Semeins, C., Ajubi, N., Frangos, J., Nijweide, P., Burger, E., 1995. Sensitivity of osteocytes to biomechanical stress in vitro. *FASEB J*. 9(5): 441–445.
- Kuboki Y., Takita H., Kobayashi D., Tsuruga E., Inoue M., Murata M., Nagai N., Dohi Y., Ohgushi H., 1998. BMP-induced osteogenesis on the surface of hydroxyapatite with geometrically feasible and nonfeasible structures: topology of osteogenesis. *J Biomed Mater Res*. 39(2): 190-199
- Kurz B., Domm C., Jin M., Sellckau R., Schünke M., 2004. Tissue engineering of articular cartilage under the influence of collagen I/III membranes and low oxygen tension; *Tissue Eng* 10(7-8): 1277-1286
- Lee C., Singla A., Lee Y., 2001. Biomedical applications of collagen. *Int J Pharm*. 221(1-2): 1-22
- Le Geros R., 1988. Calcium phosphate materials in restorative dentistry. *Adv Dent Res* 2(1):164-180

- Leukers B., Gülkan H., Irsen S. H., Milz S., Tille C., Seitz H., Schieker M., 2005. Biocompatibility of ceramic scaffolds for bone replacement made by 3D printing. *Mat.-wiss. U. Werkstofftech.* 36(12): 781-787
- Li Y., Ma T., Kniss D. A., Lasky L. C., Yang S. T., 2001. Effects of filtration seeding on cell density, spatial distribution, and proliferation in non-woven fibrous matrices. *Biotechnol Prog* 17(5): 935-944
- Lindl T., Gstraunthaler G., 2008. *Zell- und Gewebekultur – Von den Grundlagen zur Laborbank.* 6. Aufl.; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Liu Y., De Groot K., Hunziker E., 2005. BMP-2 liberated from biomimetic implant coatings induces and sustains direct ossification in an ectopic rat model. *Bone.* 36(5): 745-757
- Marcacci M., Kon E., Moukhachev V., Lavroukov A., Kutepov S., Quarto R., Mastrogiacomo M., Cancedda R., 2007. Stem Cells Associated with Macroporous Bioceramics for Long Bone Repair: 6- to 7-Year Outcome of a Pilot Clinical Study. *Tissue Engineering* 13(5): 947-955
- Marten D., Suck K., Diederichs S., Röker S., van Griensven M., Leschke C., Hoffmeister H., Kasper C., 2008. 3D-Zellkultivierung im Z® RP-System. *Chemie Ingenieur Technik – CIT* 80(12): 1803-1808
- Mauck R., Byers B., Yuan X., Tuan R., 2007. Regulation of cartilaginous ECM gene transcription by chondrocytes and MSCs in 3D culture in response to dynamic loading. *Biomech Model Mechanobiol.* 6(1-2): 113-125
- Minuth W., Kloth S., Aigner J., Steiner P., 1995. Minusheet- Perfusionskultur: Simulierung eines gewebetypischen Milieus. *Bioscope* 4/95: 20-25
- Minuth W., Strehl R., Schumacher K., 2002. *Von der Zellkultur zum Tissue Engineering;* Pabst Science Publishers, Lengerich
- Minuth W. W., Strehl R., Schumacher K., 2003. *Zukunftstechnologie Tissue Engineering;* Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim
- Nöth U., Schupp K., Heymer A., Kall S., Jakob F., Schütze N., Baumann B., Barthel T., Eulert J., Hendrich C., 2005. Anterior cruciate ligament constructs fabricated from human mesenchymal stem cells in a collagen type I hydrogel. *Cytotherapy* 7(5): 447-55
- Owan I., Burr D., Turner C., Qiu J., Tu Y., Onyia J., Duncan R., 1997. Mechanotransduction in bone: osteoblasts are more responsive to fluid forces than mechanical strain. *Am J Physiol.* 273(3 Pt 1): C810–C815
- Pienkowski D., Pollack S. R., 1983. The origin of stress-generated potentials in fluid-saturated bone. *J Orthop Res.* 1(1): 30-41.
- Pittenger M., Mackay A., Beck S. C., Jaiswal R. K., Douglas R., Mosca J. D., Moorman M. A., Simonetti D. W., Craig S., Marshak D. R., 1999. Mul-

- tilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 284(5411): 143-147
- Pollack S., Petrov N., Salzstein R., Brankov G., Blagoeva, R., 1984. An anatomical model for streaming potentials in osteons. *J Biomech.* 17(8): 627–636
 - Quarto R., Mastrogiacomo M., Cancedda R., Kutepov S. M., Mukhachev V., Lavroukov A., Kon E., Marcacci M., 2001. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med* 344(5): 385-386
 - Ratcliffe A., 2000. Tissue engineering of vascular grafts. *Matrix Biology* 19(4): 353-357
 - Rea S., Brooks R., Schneider A., Best S., Bonfield W., 2004. Osteoblast-like cell response to bioactive composites-surface-topography and composition effects; *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*; 70(2): 250-261
 - Reich K., Gay C., Frangos J. 1990. Fluid shear stress as a mediator of osteoblast cyclic adenosine monophosphate production. *J Cell Physiol.* 143(1): 100–104
 - Ripamonti U., Ma S., Cunningham N., Yeates L., Reddi A., 1993. Reconstruction of the bone-marrow organ by osteogenin, a bone morphogenetic protein, and demineralized bone matrix in calvarial defects of adult primates. *Plast Reconstr Surg.* 91(1): 27-36
 - Roach P., Eglin D., Rohde K., Perry C., 2006. Modern biomaterials: a review – bulk properties and implications of surface modifications. *J Mater Sci: Mater Med*; Springer Science+Business Media
 - Rosen H., Ackermann J., 1991. Porous block hydroxyapatite in orthognathic surgery. *Angle Orthod* 61(3): 185-91
 - Sampath T., Reddi A., 1981. Dissociative extraction and reconstitution of extracellular matrix components involved in local bone differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 78(12): 7599-7603
 - Schäfer C., Borm B., Born S., Möhl C., Eibl E.-M., Hoffmann B., 2009. One step ahead: role of filopodia in adhesion formation during cell migration of keratinocytes. *Exp Cell Res.* 315(7): 1212–1224
 - Schumann D., Kujat R., Nerlich M., Angele P., 2006. Mechanobiological conditioning of stem cells for cartilage tissue engineering. *Biomed Mater Eng.* 16(4 Suppl): 37-52
 - Sharp L., Lee Y., Goldstein A., 2008. Effect of Low-Frequency Pulsatile Flow on Expression of Osteoblastic Genes by Bone Marrow Stromal Cells. *Annals of Biomedical Engineering* 37(3): 445-453
 - Sikavitsas V., Bancroft G., Holtorf H., Jansen J., Mikos A., 2003. Mineralized matrix deposition by marrow stromal osteoblasts in 3D perfusion culture increases with increasing fluid shear forces. *PNAS* 100(25): 14683-14688

- Sikavitsas V., Temenoff J., Mikos A., 2001. Biomaterials and bone mechnotransduction. *Biomaterials* 22(19): 2581-2593
- Sittinger M., Bujia J., Rotter N., Reitzel D., Minuth W., Burmester G., 1996. Tissue Engineering and autologous transplant formation: practical approaches with resorbable biomaterials and new cell culture techniques. *Biomaterials*.17(3): 237-242
- Smalt R., Mitchell F., Howard R., Chambers T., 1997. Induction of NO and prostaglandin E2 in osteoblasts by wall-shear stress but not mechanical strain. *Am. J. Physiol.* 273 (Endocrinol. Metab. 36): E751–E758
- Strehl R., Tallheden T., Sjögren-Jansson E., Minuth W., Lindahl A., 2005. Long-term maintenance of human articular cartilage in culture for biomaterial testing. *Biomaterials* 26: 4540-4549
- Thorwarth W., Schlegel K., Srour S., Schultze-Mosgau S., Wiltfang J., 2004. Untersuchung zur knöchernen Regeneration ossärer Defekte unter Anwendung eines nanopartikulären Hydroxylapatits (Ostim). *Implantologie* 2004, 12/1: 21-32
- Tuan R., Boland G., Tuli R., 2003. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Res Ther.* 5(1): 32-45
- Valhmua W., Stazzonea E., Bachracha N., Saed-Nejada F., Fischerb S., Mowa V., Ratcliffea A., 1998. Load-Controlled Compression of Articular Cartilage Induces a Transient Stimulation of Aggrecan Gene Expression. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 353(1): 29-36
- Vunjak-Novakovic G., Altman G., Horan R., Kaplan D., 2004. Tissue Engineering of Ligaments. *Annual Review of Biomedical Engineering* 6: 131-156
- Xu S., Du P., Xie Y., Yue Y., 2008. Cell Distribution in a Scaffold with Random Architectures under the Influence of Fluid Dynamics. *J Biomater Appl* 23: 229-245
- Xu S., Li D., Xie Y., Lu J., Dai K., 2008. The growth of stem cells within β -TCP scaffolds in a fluid-dynamic environment. *Material Science and Engineering C* 28: 164-170
- Yoon S. T., Boden S. D., 2002. Osteoinductive molecules in orthopaedics: basic science and preclinical studies, *Clin Orthop Relat Res.* (395): 33-43
- Zhang D., Cowin S., Weinbaum S., 1997. Electrical signal transmission and gap junction regulation in a bone cell network: a cable model for an osteon. *Ann Biomed Eng* 25(2): 357-374

Danksagung

Mein herzlicher Dank geht an Herrn Priv.-Doz. Dr. Uwe Gbureck für die Überlassung des interessanten Promotionsthemas und die Betreuung der Arbeit sowie an Herrn Prof. Dr. Bernd Klaiber für die freundliche Übernahme des Korreferates und die damit verbundenen Mühen. Besonders danke ich meiner wissenschaftlichen Betreuerin Frau Dr. Andrea Ewald, die mich stets rat- und tatkräftig unterstützte, für die nette Zusammenarbeit. Ihrem Wissen und ihrer Erfahrung verdanke ich viel.

Frau Ursula Rummel und Frau Rita Schmid möchte ich für ihre unerlässliche Hilfe im Labor und die freundliche und humorvolle Atmosphäre danken. Sie standen mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite. Dankbar bin ich auch Frau Judith Friedlein für die Unterstützung bei der Präparatherstellung für das Rasterelektronenmikroskop. Auch allen weiteren, hier nicht namentlich genannten Personen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich meinen herzlichen Dank aussprechen.