

Aus der Orthopädischen Klinik und Poliklinik
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Jochen Eulert

**Osteogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen in Kollagen
I Hydrogelen und Herstellung eines stammzellbasierten Polycaprolacton-
Hydrogel Konstrukts für die Rekonstruktion segmentaler Knochendefekte**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Johannes Christian Reichert
aus Würzburg

Würzburg, Mai 2007

Referent: Prof. Dr. med. Jochen Eulert

Koreferent: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Norbert Schütze

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Juni 2007

Der Promovend ist Arzt

Meiner Familie gewidmet

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AGN	Aggrekan
ALP	Alkalische Leukozytenphosphatase
Aq. dest.	Aqua destilata
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BSP	Bone Sialo Protein
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Col	Kollagen
CO ₂	Kohlendioxid
DMEM/HAM'S F-12	Dulbeccoes Modified Eagels Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EF1 α	Elongationsfaktor 1 α
FBS	Foetal Bovine Serum
FDM	Fused Deposition Modelling
GAG	Glykosaminoglykan
HA	Hydroxylapatit
H/E	Hämatoxylin-Eosin
H ₂ O	Wasser
MDB	Membrane Desalting Buffer
MSZ	Mesenchymale Stammzelle
OC	Osteokalzin
ON	Osteonektin
OP	Osteopontin
O ₂	Sauerstoff
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCL	Polycaprolacton
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PLA	Polylaktidsäure
PGA	Polyglykolid

PHA	Polyhydroxyalkanoat
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase Ketten Reaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RP	Rapid Prototyping
SZM	Stammzellmedium
TCP	Trikalziumphosphat
TEP	Totalendoprothese

Inhaltsverzeichnis

1.	<u>Einleitung</u>	1
1.1	Segmentale Knochendefekte – ein klinisches Problem.....	1
1.2	Tissue Engineering.....	2
1.2.1	Definition.....	2
1.2.2	Zellen.....	3
1.2.3	Trägermaterialien.....	4
1.2.4	Wachstumsfaktoren und Stimuli.....	7
1.3	Tissue Engineering Ansätze für die Knochenrekonstruktion.....	8
1.4	Fragestellung.....	10
2.	<u>Material und Methoden</u>	11
2.1	Isolierung humaner mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochenmark.....	11
2.2	Herstellung von Polycaprolacton-Scaffolds.....	13
2.3	Herstellung von Kollagen I Hydrogelen.....	13
2.4	Histologie.....	14
2.4.1	Histologie von Zellen in Monolayerkulturen.....	14
2.4.2	Histologie von Stammzell-Kollagen Hydrogelen.....	15
2.4.3	Histologie von stammzellbasierten Polycaprolacton-Hydrogel Konstrukten.....	17
2.5	RT-PCR Analysen.....	19
2.5.1	Aufbereitung der Zellen und Konstrukte.....	19
2.5.2	cDNA Synthese.....	21
2.5.3	Polymerase Ketten Reaktion (PCR) und Gelelektrophorese.....	21

3.	<u>Ergebnisse</u>	24
3.1	Isolierung und Kultivierung mesenchymaler Stammzellen.....	24
3.2	Osteogene Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen in Monolayer-Zellkultur	24
3.2.1	Histologie.....	25
3.2.2	RT-PCR Analyse osteogen differenzierter MSZ in Monolayerkultur.....	25
3.3	Verhalten von Kollagen Hydrogelen unterschiedlicher Zellkonzentrationen.....	26
3.4	Osteogene Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen in Kollagen Hydrogelen.....	28
3.4.1	Makroskopischer Aspekt – Kontraktion der Kollagen Hydrogele.....	28
3.4.2	Histologie.....	28
3.4.3	RT-PCR Analyse der Stammzell-Kollagen Hydrogele nach 6 Wochen.....	37
3.5	Herstellung eines segmentalen stammzellbasierten Polycaprolacton-Hydrogel Konstruktes für die Knochenrekonstruktion.....	38
4.	<u>Diskussion</u>	41
4.1	Methodische Überlegungen.....	41
4.2	Osteogene Differenzierung in Monolayerkultur.....	46
4.3	Osteogene Differenzierung in Kollagen Hydrogelen.....	47
4.4	Konstruktherstellung	48
5.	<u>Zusammenfassung</u>	52
6.	<u>Literaturverzeichnis</u>	54

1. Einleitung

1.1 Segmentale Knochendefekte – ein klinisches Problem

Eine Vielzahl verschiedener Pathomechanismen kann einen ausgeprägten Verlust von Knochengewebe zur Folge haben, wie zum Beispiel traumatische Ereignisse, inflammatorische Vorgänge, wie eine chronische Osteomyelitis, aber auch neoplasiebedingte, ausgedehnte, chirurgische Knochenresektionen.

Die Rekonstruktion so entstandener, großer, segmentaler Knochendefekte ist auch heute noch ein klinisches Problem, da die bisher zur Verfügung stehenden, therapeutischen Mittel einen limitierenden Faktor darstellen.

Die Standardtherapie der chronischen Osteomyelitis besteht aus der Anlage einer Saug-Spül-Drainage sowie dem Einbringen von Gentamycin-Ketten bzw. der operativen Ausräumung des infizierten, nekrotischen Gewebes, gegebenenfalls mit nachfolgender Stabilisierung des betroffenen Knochens durch einen Fixateur externe. Benigne Knochentumore werden primär ausgeräumt und der entstehende Defekt mit autologer Spongiosa oder Knochenersatzmaterial aufgefüllt, wohingegen bei malignen Tumoren nach erfolgter Resektion des karzinomatösen Gewebes in der Regel die Implantation einer Tumorprothese mit begleitender Chemotherapie erfolgt.

Nach stattgehabter Fraktur sind die wichtigsten Voraussetzungen für eine suffiziente Heilung, nach Reposition der Frakturfragmente und Ruhigstellung, eine ausreichende Durchblutung des betroffenen Areals. Sind Ruhigstellung und Stabilität nicht gewährleistet, kann es zu einer verzögerten Frakturheilung oder aber zur Ausbildung von Pseudarthrosen kommen. Von einer Pseudarthrose spricht man per definitionem dann, wenn nach einem Zeitraum von 8 Monaten keine knöcherne Konsolidierung eines bestehenden Knochenbruches erfolgt ist (Jürgens et al., 1994). Therapeutisch bleiben im Falle der Pseudarthrosenbildung, je nach vorliegender Situation, oft dann nur die Resektion mit anschließender Anlagerung von Eigenspongiosa, die Knochentransplantation mit Anlage mikrochirurgischer, vaskulärer Anastomosen oder der Segmenttransport (Dell et al., 1985; Taylor et al., 1975).

1.2 Tissue Engineering

Die eingangs aufgeführten Gewebe- und Organschäden durch Unfälle oder Krankheiten bedeuten häufig eine schwerwiegende Einschränkung der Gesundheit und stellen zudem einen hohen Kostenfaktor im Gesundheitswesen dar. Für viele dieser Verletzungen und Erkrankungen gibt es bis heute keine adäquate Behandlungsmöglichkeit, um eine Restitutio ad integrum zu erreichen. Das innovative Gebiet des Tissue Engineering bietet ein großes therapeutisches Potential für den Ersatz oder die Regeneration von defektem oder erkranktem Gewebe des muskuloskelettalen Systems (Marler et al., 1998; Laurencin et al., 1999; Huard et al., 2003), speziell auch für Knochen (Derubeis et al., 2004; Arinze et al., 2003; Bruder et al., 1998).

1.2.1 Definition

Tissue Engineering ist ein Ende der achtziger Jahre erstelltes und von Langer und Vacanti erstmals vorgestelltes, interdisziplinäres Forschungskonzept, das die Prinzipien und Methoden sowohl der Ingenieurwissenschaften als auch der Lebenswissenschaften dahingehend vereint, Möglichkeiten zu erschließen, die Funktion verschiedenster Gewebe wiederherzustellen, zu erhalten oder zu verbessern (Langer und Vacanti, 1993).

Das Konzept des Tissue Engineering setzt sich aus drei Grundprinzipien der Geweberekonstruktion zusammen:

- 1) dem Einsatz von Zellen, die das zu regenerierende Gewebe ersetzen sollen,
- 2) dem Einsatz von Zell-Trägermaterialien (Scaffolds) und
- 3) dem Einsatz von gewebespezifischen Wachstumsfaktoren und Biomolekülen oder anderer, wie zum Beispiel mechanischer Stimuli.

1.2.2 Zellen

Eine Herausforderung bei der mesenchymalen Geweberegeneration stellt das Einbringen einer großen Zahl multipotenter Vorläuferzellen in das Regenerationsareal dar. Für diese multipotenten, mesenchymalen Vorläuferzellen bietet der menschliche Körper verschiedene Reservoirs, wobei Knochenmark und Periost am leichtesten zugänglich sind (Haynesworth et al., 1992).

Seit langem ist bekannt, dass vaskuläre Kontinuität, funktionelles Knochenmark in ausreichender Menge und ein intaktes Periost wesentliche Grundvoraussetzungen einer schnellen und suffizienten Knochenregeneration sind (Hamm 1930; Brighton 1984). Das Knochenmark, seine Bestandteile und Funktionen waren und sind auch heute noch Gegenstand vieler Forschungsprojekte, sowohl in Tier- als auch in menschlichen Modellen. Es konnte gezeigt werden, dass im Knochenmark isolierbare, expandierbare, osteochondrale Vorläuferzellen vorhanden sind. Diese Zellen werden allgemein als mesenchymale Stammzellen (MSZ) bezeichnet (Haynesworth et al., 1992; Caplan, 1991, 1994). Prinzipiell können diese Stammzellen unter dem Einfluss entsprechender Wachstumsfaktoren in eine Vielzahl verschiedener, mesenchymaler Phänotypen, einschließlich knochenbildender Zellen, differenzieren (Abb. 1).

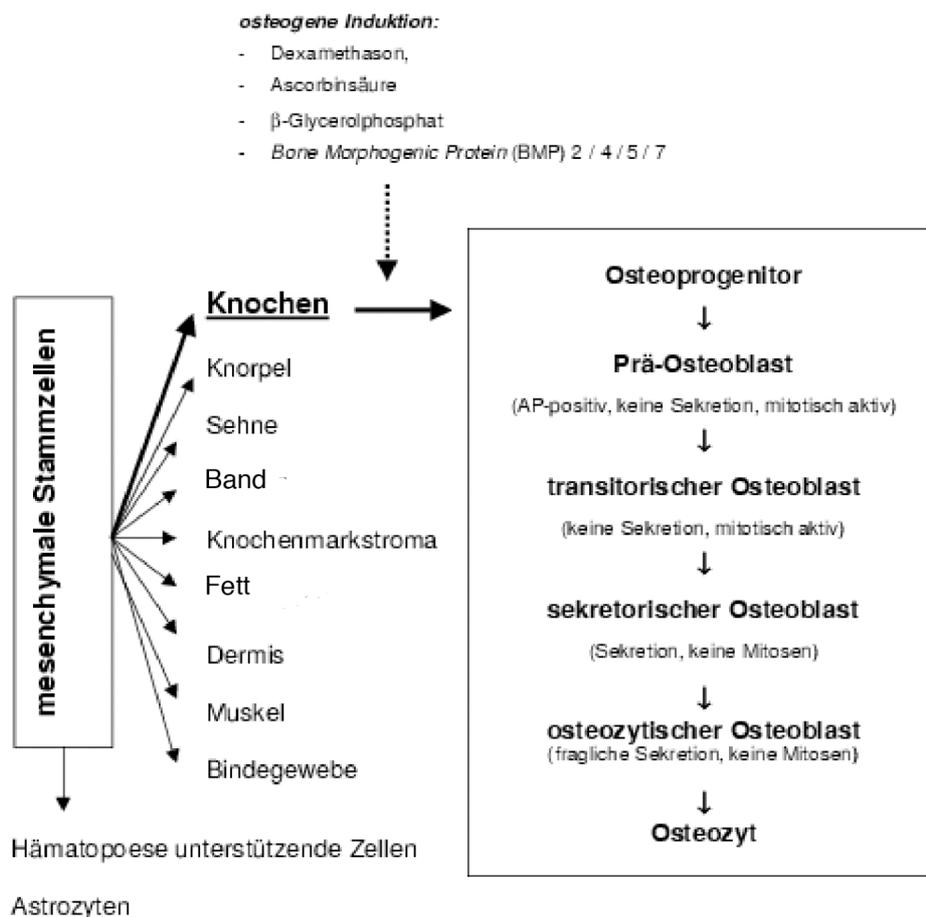


Abb. 1: Die Differenzierung von MSZ über Osteoprogenitor-Zellen zum knochenbildenden Osteoblast im Rahmen des mesengenetischen Prozess.

1.2.3 Trägermaterialien

Der Auswahl geeigneter Trägermaterialien (Scaffolds) für die zellbasierte Geweberegeneration kommt beim Tissue Engineering eine weitere Schlüsselrolle zu (Hutmacher, 2000).

Während man früher passive, inerte Materialien zur Knochenrekonstruktion bevorzugte, wird heute die Auffassung vertreten, dass jede Art von Material nach Implantation eine zelluläre Reaktion hervorruft (Peppas und Langer, 1994). Diese Tatsache versucht man sich dahingehend zunutze zu machen, dass Biomaterialien entwickelt werden, die mit dem jeweiligen Gewebe interagieren und so die Regeneration zusätzlich anregen anstatt nur als statische, stabilisierende Komponente zu dienen.

Idealerweise sollten Scaffolds folgende Charakteristika aufweisen, um optimale Bedingungen zum Einbringen von Zellen in Gewebedefekte und somit zur Geweberegeneration zu bieten (Pachence und Kohn, 2000):

1. Sie sollten von hoher Porosität sein und eine große Oberfläche aufweisen, um Raum für das Einbringen von Zellen zu bieten.
2. Eine große mechanische Stabilität sollte gegeben sein und sie sollten leicht an die erforderliche Form anpassbar sein, zum Beispiel durch Rapid Prototyping Verfahren.
3. Die Scaffolds sollten biokompatibel sein, also keine oder nur geringe immunologische Reaktionen hervorrufen, und sie sollten Zelladhäsion, Zellproliferation und Differenzierung anregen, bezogen auf die Knochenregeneration, also osteokonduktive und osteoinduktive Wirkung entfalten.
4. Zudem sollten die Materialien biodegradierbar und im Körper resorbierbar sein, die Abbauprodukte sollten idealerweise keine Toxizität aufweisen.

Eine Vielzahl unterschiedlichster Scaffolds wurde bis heute für die verschiedensten Anwendungsbereiche entwickelt:

Glykosaminoglykane (GAGs) fanden Anwendung bei Augenoperationen, Arthritis (Weiss und Balazs, 1987) und der Prävention postoperativer Adhäsionen (Urmann et al., 1991; Holzman et al., 1994). Chitosan, ein Chitinderivat, fand Anwendung als Gel, Puder, Film oder Faser bei der Herstellung membranöser Barrieren, bei der Herstellung von Kontaktlinsen, in der Zellkultur und als Antikoagulans (Hirano, 1989; Sandford, 1989; Byrom, 1991; East et al., 1989). Polyhydroxyalkanoate (PHA) wurden und werden als Nahtmaterial und künstliche Haut verwendet (Yasin et al., 1989; Doi et al., 1990). Auch synthetische Polymere wie Poly- α -Hydroxy-Säuren, die bereits bei verschiedenen chirurgischen Standardprozeduren eingesetzt werden (Helmus und Hubbell, 1993; Shalaby und Johnson, 1994; Hubbell, 1995), Polyglykolsäure (PGA) sowie Polylaktid (PLA) (Brekke und Toth, 1998; Nöth et al., 2002) und ihre Polymere, gleichfalls Polydiaxone, in Anwendung als Naht-Clip und Knochen-Pin (Ethipin®) (Ray et al., 1981; Greisler et al., 1989; Mäkelä

et al., 1989), wurden zur Herstellung von Scaffolds herangezogen. Speziell für Zwecke der Knochenrekonstruktion fanden bisher neben Polylaktid-vorwiegend Hydroxylapatit- und β -Trikalziumphosphat-Konstrukte Verwendung (Gerber et al., 2001). Aufgrund seiner vergleichsweise langen Halbwertszeit im Organismus und hohen Permeabilität bei gegebener mechanischer Stabilität, zugeschriebener osteokonduktiver und osteoinduktiver Wirkung (Schantz et al., 2002) sowie der Verfügbarkeit eines computergesteuerten Rapid Prototyping Verfahrens zur Produktion und Formanpassung (Hutmacher et al., 2000) stellt der semikristalline, aliphatische Polyester ϵ -Polycaprolacton ein überaus geeignetes Material zur Prozessierung von individuell angepassten Scaffold-Prototypen für den rekonstruktiven Knochenersatz dar (Schantz et al., 2003).

Ein weiteres, viel versprechendes und in großen Mengen verfügbares Biomaterial ist Kollagen. Bisher wurden 14 verschiedene Kollagentypen identifiziert (van der Rest et al., 1990), wobei Kollagen I mengenmäßig den größten, natürlich vorkommenden Anteil im menschlichen Körper bildet.

Aufgrund der Verfügbarkeit in großen Mengen und wegen seiner spezifischen physikalischen, chemischen und biologischen Eigenschaften (Piez, 1984; Tanzer und Kimura, 1988), wurde Kollagen I bevorzugt zur Herstellung biomedizinischer Materialien herangezogen (Pachence et al., 1987; Pachence, 1996).

Bereits im Jahre 1962 beschrieben Grillo und Gross die Präparation von Kollagen Gelen aus neutralisierten, sauren Kollagenlösungen und zogen ihre klinische Applikation in Erwägung. Sie fanden, dass Gele, Membranen, rohrförmige Gebilde und viele weitere Strukturen damit hergestellt werden konnten. Darüber hinaus konnten sie in Studien zur immunologischen Reaktivität von bovinem Kollagen in Vertebraten nachweisen, dass Kollagen-Implantate eine hohe Sicherheit aufgrund sehr geringer antigener Wirkung aufweisen. Der Einsatz von Kollagen Gelen in der Zellkultur war bald weit verbreitet (Elsdale und Bard, 1972; Taira et al., 2003). Stopak et al. konnten zeigen, dass Kollagen Gele, die in embryonale Extremitätenanlagen beim Huhn injiziert wurden, sich rearrangierten, dem umliegenden Gewebe anpassten und Teile von Sehnen, Perichondrium, Perineurium und anderen Strukturen

bildeten (Stopak et al., 1985). Neben dem Einsatz in der Zellkultur fanden Kollagen Gele zunehmend Verwendung beim Einbringen von Zellen und Wachstumsfaktoren in Gewebe (drug delivery) (Wallace und Rosenblatt, 2003). Auch zur Knochenrekonstruktion, vor allem auf dem Gebiet der kraniofazialen Chirurgie, wurden Kollagen Gele in Kombination mit stabilisierenden Scaffolds verwendet (Ripamonti et al., 2000; Wiesmann et al., 2003).

1.2.4 Wachstumsfaktoren und Stimuli

Eine Vielzahl von Faktoren beeinflussen Proliferation und Differenzierung von Zellen und sind für die Herstellung eines funktionellen Gewebe- oder Organkonstruktes hilfreich oder sogar essentiell. Die Möglichkeiten reichen von gewebespezifischen Wachstumsfaktoren, die zahlreiche Zellprozesse induzieren und Gewebe modellieren, bis hin zu physikalischen Stimuli wie Dehnung, Druck oder Änderung des O₂-Partialdrucks (Ignatius et al., 2004).

Bisher konnten Ascorbat, Dexamethason, β -Glycerophosphat und die Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) 2, 4, 5 und 7 (OP-1) als sichere Faktoren, die eine osteogene Differenzierung anregen, identifiziert werden (Saito et al., 2005; Vaccaro et al., 2004; Mbalaviele et al., 2005; Soballe et al., 2004; Rai et al., 2004; Bertone et al., 2004; Sampath et al., 1990; Wozney et al., 1998). Allerdings scheint zusätzlich zu den genannten Differenzierungsfaktoren und mechanischen Stimuli eine Vielzahl weiterer Faktoren an der Osteoinduktion sowie der Regulation osteoblastärer Matrixbildung beteiligt zu sein. Diese Faktoren sind teilweise noch nicht identifiziert, beziehungsweise ihre Rolle ist noch nicht vollkommen aufgeklärt. Hierzu gehören unter anderem auch die Proteine der CCN-Familie, die Mitose, Adhäsion, Apoptose, Synthese extrazellulärer Matrix und vieles mehr zu modulieren scheinen (Lechner et al., 2000; Schütze et al., 2001; Brickstock, 2003).

1.3 Tissue Engineering Ansätze für die Knochenrekonstruktion

Bis heute ist die Verwendung von autologen Knochentransplantaten erste Wahl bei der Rekonstruktion von Knochendefekten (Damien und Parsons, 1991). Patienteneigener Knochen ist nicht immunogen und enthält matrixbildende Zellen, die direkt in das Defektareal eingebracht werden können.

Die Morbidität an der Entnahmestelle kann persistierende postoperative Schmerzsyndrome (Arrington et al., 1996), Hypersensitivität, Instabilität des Beckens (Coventry und Tapper, 1972) und Infektionen nach sich ziehen. Zudem ist die Menge an Knochen, die gewonnen werden kann, limitiert.

Allografts hingegen sind im Vergleich von einer bedeutend niedrigeren Zellularität. Sie besitzen eine geringere Revaskularisierungsrate sowie eine höhere Resorptionsrate. Dies resultiert in einer bedeutend niedrigeren Knochenformationsrate (Lane et al., 1999). Darüber hinaus besteht bei der Verwendung von Allografts die Gefahr einer Abstoßungsreaktion durch den Körper sowie eine Infektionsgefahr.

Das Tissue Engineering von Knochen mithilfe von MSZ stellt eine viel versprechende Technik zur Knochenrekonstruktion dar. Eine Reihe tierexperimenteller Studien konnten das Potential dieser Vorgehensweise unterlegen. Sowohl die ektope Knochenformation in nichtknöchernem Gewebe der Maus oder Ratte (Krebsbach et al., 1997) als auch die orthotope Knochenneubildung innerhalb eines knöchernen Defekts in Ratten oder Kaninchen konnte induziert werden (Bruder et al., 1998). Bisher wurden allerdings die meisten ektopen Tiermodelle, wie auch die segmentalen Defektmodelle, hauptsächlich in Nagetieren durchgeführt (Meijyer et al., 2007). In der Literatur finden sich nur wenige Studien, die belegen, dass die orthotope Applikation von MSZ in segmentalen Defekten auch bei Großtieren, wie zum Beispiel Hunden oder Schafen, erfolgreich angewendet werden kann (Bruder et al., 1998). Eine effektive Knochenneubildung konnte beispielsweise im Bereich der Schädelkalotte sowie in mandibulären Defekten bei Schafen, Ziegen oder Minipigs beobachtet werden (Shang et al., 2001; Schliephake et al., 2001; Kruyt et al., 2004). Bisläng sind nur zwei klinische Studien publiziert worden, die eine Rekonstruktion von Knochendefekten mit Tissue Engineering

Methoden im Menschen beschreiben (Cancedda et al., 2003; Schimming et al., 2004). Cancedda und Kollegen behandelten drei Patienten mit unterschiedlichen segmentalen Knochendefekten im Bereich von Tibia, Ulna und Humerus von 4 bis 7 cm Größe. Ex vivo expandierte MSZ wurden auf ein dreidimensionales, dem Defekt angepasstes Scaffold gebracht und in den segmentalen Knochendefekt implantiert. Die Frakturenden wurden mithilfe eines Fixateur externs stabilisiert. Nach 6 beziehungsweise 13 Monaten war bei allen drei Patienten eine Heilung des Defekts aufgetreten, die Implantate zeigten sich gut in den neu gebildeten Knochen integriert. Die zweite Studie beschreibt die Augmentation der posterioren Maxilla in 27 Patienten mithilfe von periostalen, mandibulären Zellen sowie einem Polymer-Fleece (Ethisorb). Zwölf Patienten wurden lediglich radiologisch und klinisch nachuntersucht. Bei den übrigen 15 Patienten wurde nach drei Monaten vor dem Einbringen dentaler Implantate eine Biopsie entnommen. Die histologische Untersuchung ergab, dass in acht der 15 Fälle unerwünschte Resorptionsvorgängen im Bereich der rekonstruierten Maxilla stattgefunden hatten, bei den restlichen sieben war es allerdings zur Neuf ormation von Knochengewebe gekommen.

1.4 Fragestellung

Die Verwendung von MSZ für die Rekonstruktion von defektem oder erkranktem Gewebe des muskuloskelettalen Systems hat neue, zukunftssträngige Perspektiven eröffnet.

Ziel der vorliegenden Arbeit war erstens die histologische und molekularbiologische Untersuchung von MSZ sowohl im Monolayer als auch in Kollagen Gelen unter dem Einfluss verschiedener osteogener Wachstumsfaktoren *in vitro*. Zweitens die Herstellung eines für den segmentalen Knochenersatz geeigneten, individuell anpassbaren, stammzellbasierten Polycaprolacton-Hydrogel Konstruktes.

Zunächst wurden humane MSZ aus dem Knochenmark von Patienten mit einer Koxarthrose isoliert, in Monolayern kultiviert und immunhistochemisch und mittels RT-PCR verglichen, um eine osteoinduktive Wirkung spezifischer Wachstumsfaktoren nachzuweisen. Im Anschluss wurden Versuche durchgeführt, um zu ermitteln, bei welcher Zellkonzentration am effektivsten eine osteogene Differenzierung in mit MSZ besiedelten Kollagen Gelen induziert werden kann. Es folgten Experimente zur osteogenen Differenzierung von MSZ in Kollagen Gelen mit histologischer Aufarbeitung und RT-PCR Analyse und zur homogenen Zellbesiedelung von Polycaprolacton-Scaffolds mit nachfolgender histologischer Beurteilung.

Abschließend erfolgte *in vitro* die Herstellung und histologische Untersuchung eines Konstruktes zum segmentalen Knochenersatz, bestehend aus MSZ, Kollagen Gel und einem mittels Rapid Prototyping hergestellten ϵ -Polycaprolacton-Scaffold.

Die Untersuchungen sollen zeigen, ob es möglich ist, eine osteogene Differenzierung von MSZ in Kollagen Gelen zu induzieren. Zudem war es Ziel, aus humanen MSZ, die mit Hilfe eines Kollagen Gels in ein geeignetes Trägermaterial eingebracht werden, *in vitro* ein Konstrukt herzustellen, welches sich zur Behandlung segmentaler Knochendefekte eignet.

2. Material und Methoden

2.1 Isolierung humaner mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochenmark

Humane mesenchymale Stammzellen (MSZ) wurden aus dem Hüftkopf von Patienten mit Koxarthrose, denen eine Hüft-Totalendoprothese (Hüft-TEP) implantiert wurde, nach einem modifizierten Protokoll von Haynesworth et al. (1992) isoliert.

Mit Hilfe einer dampfsterilisierten Kürette wurde spongiöser Knochen auf einem sterilen Edelstahltablett unter der Sicherheitswerkbank (Sicherheitswerkbank HERA safe Klasse 1, Heraeus, Hanau) aus dem Hüftkopf gewonnen. Es wurden 5 bis 10 ml Gewebe in ein aus Polypropylen bestehendes, 50 ml Volumen umfassendes Zentrifugenröhrchen (Falcon, BD Biosciences, Heidelberg) mit 20 ml DMEM/HAM'S F12 (PAA Laboratories GmbH Pasching, Austria) gegeben, um die Knochenmarkzellen aus den Knochen trabekeln herauszulösen, gevortext (Vortex-Genie 2 G560, Scientific Industries, New York USA) und anschließend bei 1200 U/min für 5 min zentrifugiert (Labofuge 400R, Heraeus, Hanau).

Nach Zentrifugation erhielt man ein aus Zellen und kleinen Knochenfragmenten bestehendes Pellet und einen hauptsächlich aus Fett bestehenden Überstand. Dieser wurde mit einer Pasteurpipette (Hartenstein, Würzburg) abgesaugt. Das Pellet wurde in 10 ml Stammzellkulturmedium bestehend aus DMEM/HAM'S F12 mit Zusatz von 10% FBS (Foetal Bovine Serum, GIBCO Invitrogen, Karlsruhe), 1% Penicillin/Streptomycin (Penicillin/Streptomycin 100x, PAA Laboratories, Pasching, Austria) und 0,1% Ascorbat-2-Phosphat (L-Ascorbat-2-phosphat, Sigma-Aldrich, Steinheim) aufgenommen und gevortext.

Die sich vom Knochen gelösten, in der Suspension befindlichen Zellen wurden mit einer 10 ml Spritze (Einmalspritzen Ecoject 10 ml, Dispomed, Gelnhausen) und einer 20 G Nadel (Nadel Sterican 20G, Braun, Melsungen) in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt.

Dieser Vorgang wurde insgesamt fünfmal wiederholt, bis die Zellen größtenteils aus den Knochentrabekeln gelöst waren und diese gelblich-weiß erschienen.

Die gewonnenen Zellen wurden bei 1200 U/min für 5 min zu einem Pellet zentrifugiert und dieses in Stammzellmedium resuspendiert.

Die Zellen wurden auf acht bis zehn 150 cm² Zellkulturflaschen (Biochrom, Berlin) verteilt, mit Stammzellmedium auf 20 ml Inhalt aufgefüllt und im Brutschrank (Wärmeschrank BB 5060, Heraeus, Hanau) bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Zwei Tage nach Isolierung der MSZ wurden die nicht adhärenen Zellen abgesaugt und die adhärenen Stammzellen dreimal mit PBS gewaschen. Die Flaschen wurden mit 20 ml Stammzellmedium aufgefüllt und dieses in der Folgezeit alle zwei bis drei Tage gewechselt.

Für die Subkultivierung der Zellen wurden diese kurz vor Erreichen eines konfluenten Stadiums mit Trypsin abgelöst, das Medium abgesaugt und die präkonfluenten Zellen mit 7 ml Trypsin/EDTA (Trypsin/EDTA, PAA Laboratories, Pasching, Austria) für 5 min bei 37°C inkubiert. Das Trypsin wurde im Anschluss mit 14 ml Stammzellmedium inaktiviert und die aus Zellen, Trypsin und Stammzellmedium bestehende Suspension in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zentrifugation bei 1200 U/min für 5 min wurde das gewonnene Pellet in 20 ml Stammzellmedium resuspendiert und die Zellen in 150 cm² Zellkulturflaschen ausgesät.

Zur Induktion der osteogenen Differenzierung wurde dem Stammzellmedium sowohl bei Differenzierung im Monolayer als auch bei Differenzierung im Kollagen Gel 10 mM β -Glycerophosphat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) und 10⁻⁸ M Dexamethason (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) bzw. 30 ng/ml BMP-2 (Prof. Sebald, Universität Würzburg) zugefügt.

2.1.1 Herstellung von Polycaprolacton-Scaffolds

Bei Polycaprolacton (PCL) handelt es sich um ein semikristallines, bioresorbierbares Polymer aus der Gruppe der aliphatischen Polyesterfamilie. Es weist ein durchschnittliches Molekulargewicht von 80.000, einen Schmelzungsindex von 1,0 g/10 min und eine Schmelztemperatur von 60°C auf. Aufgrund dieser Eigenschaften ist PCL zur thermoplastischen Prozessierung zum Beispiel im Rahmen des Fused Deposition Modelling (FDM) in besonderem Maße geeignet.

Beim Fused Deposition Modelling handelt es sich um eine Rapid Prototyping (RP) Technologie, die die Möglichkeit bietet, schnell reproduzierbare, bioresorbierbare 3D-Scaffolds mit einem voll interkonnektierten, porösen Netzwerk herzustellen. Hierbei erfolgt die Extrusion feiner PCL-Filamente über eine in ihrer Bewegung computergesteuerte, erhitzte Düse. Die thermoplastischen Filamente können so Schicht für Schicht in der gewünschten Form angeordnet werden (Hutmacher et al., 2000).

Die Scaffolds wurden aus PCL Filamenten mithilfe eines FDM 3D Modellierer RP Systems der Firma Stratasys Inc. (Eden, Prairie, MN, USA) hergestellt. Die Filamente von 1,63 mm Durchmesser waren zuvor mit einer sogenannten Fiber-Spinning-Machine (Alex James & Associates Inc., Greenville, SC, USA) hergestellt worden. Die Form der Scaffolds, Filamentabstände und Rasterwinkel wurden direkt in der Stratasys QuickSlice (QS) Software programmiert und im SLC (Slice) Dateiformat gespeichert. Die zweidimensionalen Schichtdaten wurden in das QS SML (Stratasys Machine Language) Dateiformat konvertiert, welches automatisch die Ausrichtung der Filamente basierend auf den eingegebenen Parametern für jede Schicht generierte. Die SML Daten wurden zur FDM Maschine gesendet und so die Scaffolds Schicht für Schicht hergestellt (Abb. 2).

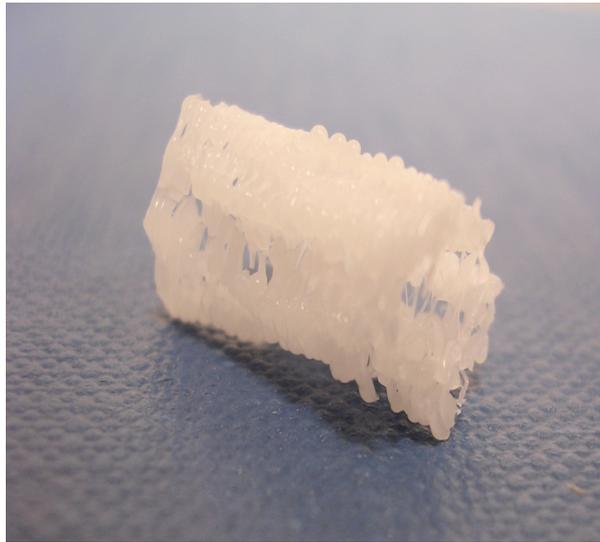


Abb. 2: Ein mittels FDM hergestelltes ϵ -Polycaprolacton-Scaffold für die Rekonstruktion segmentaler Femurdefekte im Kaninchen.

2.2 Herstellung von Kollagen I Hydrogelen

Das Kollagen Gel wurde freundlicherweise von der Firma Arthro Kinetics aus Esslingen zur Verfügung gestellt.

Zur Herstellung des Kollagen Gels wurden zwei Lösungen verwendet. Zum einen eine Kollagen Lösung für die Kollagen aus Rattenschwanzsehnen isoliert und in 0,1% Essigsäure gelöst wurde. Nach Beseitigung unlöslicher und nicht kollagenöser Bestandteile wurde die Kollagenkonzentration auf 6 mg/ml angepasst. Die so entstandene hochvisköse Stammlösung mit einem pH-Wert von 4 wurde bei -20°C gelagert. Zur Verarbeitung wurde die Lösung aufgetaut, zum Entfernen etwaiger Luftblasen kurz abzentrifugiert und bis zur Verwendung auf Eis gelagert.

Zum andern die Gelneutralisationslösung, die aus einem speziellen Zellkulturmedium mit starker Pufferkapazität besteht, um den sauren pH-Wert der Kollagenlösung abpuffern zu können.

Die Neutralisationslösung wurde ebenfalls bis zu ihrer Verwendung auf Eis gelagert.

Die Zellen wurden wie oben beschrieben abtrypsiniert, in Medium resuspendiert, gezählt (Neubauer-Zellzählkammer, Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen) in Neutralisationslösung resuspendiert und anschließend die Kollagen Lösung und die Gelneutralisationslösung zu gleichen Teilen vorsichtig gemischt und für 30 min zum Gelieren in den Brutschrank gegeben. Die so hergestellten Gele wiesen eine Zellkonzentration von $7,25 \times 10^5$ /ml Gel auf. Sie wurden über sechs Wochen in drei verschiedenen Gruppen mit Stammzellmedium, osteogenem Differenzierungsmedium mit β -Glycerophosphat und Dexamethason oder Stammzellmedium mit 30 ng/ml BMP-2 kultiviert.

2.4 Histologie

2.4.1 Histologie von Zellen in Monolayerkulturen

Die im Monolayer kultivierten Zellen wurden nach Absaugen des jeweiligen Mediums mit PBS gewaschen und anschließend je nach Färbung bei Raumtemperatur fixiert.

Alizarin Rot Färbung (Osyczka et al., 1998).

Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 10 min in Methanol fixiert und anschließend mit destilliertem Wasser gewaschen. Danach wurden die Well-Platten mit 1% Alizarin Rot S in 1:100 verdünntem Ammoniak für zwei min inkubiert, erneut mit Aq. dest. gewaschen und luftgetrocknet.

Alkalische Leukozyten Phosphatase Nachweis (Kit 86C, Sigma-Aldrich, St.Louis, USA):

Nach einmaligem Spülen mit TBS erfolgte für 30 sek die Inkubation mit Fixationslösung (Ansatz für 2 ml Lösung: 40 ml FBB + 40 μ l Natrium Nitrit + 1800 μ l H₂O + 40 μ l Naphthol AS Substrat). Nach Spülung mit Aq. dest. wurde mit der Färbelösung (500 μ l pro Well: 10 μ l FBB + 10 ml Natrium Nitrit + 450 μ l H₂O + 10 μ l Naphthol AS Substrat) für einen Zeitraum von 15 min inkubiert. Nach

abschließendem, dreimaligem Waschen mit H₂O wurden die Wells luftgetrocknet.

2.4.2 Histologie von Stammzell-Kollagen Hydrogelen

Zur histomorphologischen und histochemischen Beurteilung der stammzellbesiedelten Kollagen Gele wurden an den Tagen 1, 7, 14, 28 und 42 Paraffinschnitte angefertigt.

Nach Absaugen des Mediums wurden die MSZ-Kollagen Gele zweimal kurz mit PBS (PBS DULBECCO pH-Wert 7, Biochrom, Berlin) gewaschen, anschließend für zwei Stunden in 4% Paraformaldehyd (Sigma-Aldrich, Steinheim) bei Raumtemperatur fixiert. Mithilfe einer aufsteigenden Ethanol-Alkoholreihe von 70, 95 und 100% (jeweils eine Stunde; Ethanol, Merck, Darmstadt) wurden die Pellets dehydriert.

Anschließend wurden diese in 1% Eosin (Sigma-Aldrich, Steinheim) angefärbt und unter dem Abzug (Abzug 1500, Waldner, Wangen) dreimal mit 100% Ethanol gewaschen, anschließend für 30 min in einem Gemisch von Ethanol und n-Amylacetat im Verhältnis 1:1 (n-Amylacetat, Merck, Hohenbrunn), jeweils bei Raumtemperatur. Danach wurden die Pellets in 100% n-Amylacetat für 60 min bei 56 - 60°C, daraufhin über Nacht bei 60°C in flüssigem Paraffin (Sigma, Steinheim) inkubiert. Am Folgetag wurden die Pellets in Paraffinblöcke gegossen. Nach Aushärten im kalten Wasserbad und Gefrierschrank bei -20°C (Kühlgefrierkombination economy, Bosch, Stuttgart) wurden mithilfe eines Microtoms (Leica SM2400, Wetzlar) 8 µm dicke Schnitte angefertigt und diese nach Strecken im Wasserbad auf SuperFrost-Objektträger (Microm International, Walldorf) aufgezogen. Die Schnitte wurden bei Raumtemperatur über Nacht getrocknet.

Für die Färbungen wurden die Schnitte über zweimal 5 min in Xylol (AppliChem, Darmstadt) entparaffiniert und mithilfe einer absteigenden Ethanol-Alkoholreihe (100, 70 und 50%, jeweils 2 Minuten) einschließlic Aq. dest. rehydriert. Es folgten Färbungen für Hämatoxylin Eosin, Alzian Blau, Alizarin Rot und von Kossa. Nach Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe (96 und

100%) und Xylol wurden die Schnitte mit DPX-Einschlussmittel (Fluka BioChemika, Neu-Ulm) konserviert.

H/E Färbung

Die entparaffinierten Schnitte wurden zunächst 10 min mit Hämalaun nach Mayer gefärbt und 10 min mit fließendem Leitungswasser gewässert. Anschließend wurden sie 10 sek mit 1% Eosin gegengefärbt, wie oben beschrieben dehydriert und eingedeckt. Die Zellkerne stellen sich in dieser Übersichtsfärbung blau-violett, das Zytoplasma rot dar.

Alzian Blau Färbung

Zum Nachweis negativ geladener, sulfatierter Proteoglykane wurden die Schnitte nach erfolgter Entparaffinierung und Rehydrierung für drei min in 3% Essigsäure (Merck, Darmstadt) inkubiert. Danach wurden die Schnitte in 1% Alzian Blau 8 GX pH-Wert 1,0 (Sigma, St. Louis, USA) für 30 min gefärbt, anschließend mit Aq. dest. gespült. Es folgte die Gegenfärbung zur Darstellung der Zellkerne mit Kernecht Rot (Chroma, Stuttgart-Untertürkheim) über 5 min und ein erneutes Spülen mit Aq. dest., gefolgt von einem Differenzierungsschritt in 70% Ethanol für 3 sek und der Entwässerung in 95% Ethanol für 3 sek, jeweils zweimal 5 min in 100% Isopropanol (Carl Roth, Karlsruhe) und Xylol. Schließlich wurden die gefärbten Schnitte mit DPX-Einschlussmittel eingedeckt. Die Zellkerne stellen sich in dieser Färbung rot dar, sulfatierte Proteoglykane blau.

Alizarin Rot Färbung

Wie vorbeschrieben wurden die Schnitte entparaffiniert, rehydriert und anschließend zum Nachweis stattgehabter Mineralisierung für 5 min in Alizarin Rot Färbelösung (0,5% Alizarin Rot S, Chroma, Stuttgart-Untertürkheim) in Aq. dest., pH-Wert 4,0) inkubiert, mit Aq. dest. gespült, rasch entwässert und eingedeckt. Mineralisierte, Kalzium enthaltende Areale werden in dieser Färbung intensiv rot-bräunlich angefärbt.

Von Kossa Färbung

Nach erfolgter Entparaffinierung und Rehydrierung wurden die Schnitte bei Raumtemperatur luftgetrocknet und anschließend mit 5% Silbernitratlösung (Silbernitrat, Merck, Darmstadt) für 1 h unter Lichtausschluss inkubiert. Die AgNO₃-Lösung wurde abpipettiert, es folgte das Spülen der Schnitte mit Aq. dest.. Zur Entwicklung wurden für 2 min die Schnitte mit Reduktionslösung bedeckt (5 g Natriumbikarbonat in 75 ml Aq. dest gelöst unter Zusatz von 25 ml Formol 36%). Nach erneutem Spülen und zweiminütiger Fixierung in 5% Natriumthiosulfatlösung (Fluka Chemie AG, Buch, Switzerland) erfolgte nach der Dehydrierung das Eindecken der Schnitte.

In der von Kossa Färbung stellen sich mineralisierte, zweiwertige Ionen enthaltende Bereiche je nach Mineralgehalt bräunlich-schwarz dar.

2.4.3 Histologie von stammzellbasierten Polycaprolacton-Hydrogel

Konstrukten

Einbettung in Technovit 8100 (Kulzer Histotechnik, Wehrheim)

Die Fixation der Konstrukte erfolgte in 2% Paraformaldehyd über 3-4 h bei 4°C. Anschließend wurden die fixierten Konstrukte über Nacht in PBS mit 6,8% Saccharosezusatz bei 4°C gewaschen, danach bei gleicher Temperatur 60 min mit 100% Aceton entwässert. Es folgte die Infiltration mit Vorbereitungslösung (100 ml Basisflüssigkeit T8100 + 0,6 g Härter I) über einen Zeitraum von 6-8 h. Danach wurden die Konstrukte für 5 min in 15 ml Vorbereitungslösung mit 0,5 ml Härter II-Zusatz (Lösung 2) bei 4°C bewegt und anschließend zur Polymerisation in die auf Kunsteis vorgekühlte, mit Lösung 2 gefüllte Histoform gegeben. Nach sofortiger, luftdichter Verpackung mithilfe einer Folie wurde die Histoform mit dem Konstrukt für mindestens 3 h auf Kunsteis in den Kühlschrank zur Auspolymerisation des Kunststoffes gestellt.

Die polymerisierten Kunststoffblöcke wurden, nach Aufbringen auf einen Histobloc mit Technovit 3040 (Pulver:Flüssigkeit = 2:1), mit einem Hartmetallmesser mit d-Schliff (Leica Mikrosysteme, Bensheim) 5 µm dicke Schnitte angefertigt, im Wasserbad gestreckt und auf SuperFrost-Objektträger aufgezogen, luftgetrocknet und mit H/E gefärbt.

H/E Färbung

Nach Rehydrierung in Aq. dest. folgte die Inkubation mit Hämalaun nach Meyer für 20 min, danach ein zehnmütiger Spülschritt mit fließendem Leitungswasser. Nach erneutem Spülen mit Aq. dest. schloss sich die Gegenfärbung mit 1% Eosin, gefolgt von erneutem Spülen mit Aq. dest. und einer aufsteigenden Alkoholreihe (96 und 100%) an. Die Schnitte wurden dann wie vorbeschrieben eingedeckt.

2.5 RT-PCR Analysen

2.5.1 Aufbereitung der Zellen und Konstrukte

Zellen im Monolayer

Bei Versuche wurden die Zellen im Monolayer nach Absaugen des Mediums wie oben beschrieben zweimal mit PBS gewaschen und abtrypsiniert, in ein Zentrifugenröhrchen gegeben und bei 1200 U/min zentrifugiert, anschließend die RNA nach Protokoll 4.5 NucleoSpin® RNA II (Macherey-Nagel, Düren) isoliert und aufgereinigt.

Nach Zentrifugation wurde das überstehende Medium abgesaugt und das entstandene Pellet in 350 µl RA1-Puffer plus 3,5 µl β-Mercaptoethanol (2-Mercaptoethanol, Merck, Darmstadt) lysiert und bei -80°C bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt.

Zur Homogenisierung des Lysats wurde dieses auf einen NucleoSpin Filter gegeben und 1 min bei 11,000 G zentrifugiert. Anschließend wurden dem Filtrat 350 µl 70% Ethanol zugegeben und gevortext. Im nächsten Schritt wurde der Lysat-Ethanol-Mix auf eine NucleoSpin RNA II Säule gegeben und 30 sek bei 8,000 G zentrifugiert, erneut nach Zugabe von 350 µl Membrane Desalting Buffer (MDB).

Nach Zugabe von 95 µl DNase Reaktionsmix (10 µl DNase I + 90 µl DNase Reaction Buffer) folgte eine 15-minütige Inkubation bei Raumtemperatur.

Es schloss sich die Inaktivierung der DNase und ein erster Waschschriff an, bei dem zunächst 200 µl RA2 Puffer auf die Silica-Membran gegeben wurde und

dann 30 sek bei 8,000 G zentrifugiert wurde. Bei einem weiteren Waschgang wurden 600 µl RA3 Puffer hinzugegeben und 30 sek bei 8,000 G zentrifugiert. Beim dritten und letzten Waschgang wurden erneut 250 µl RA3 hinzugegeben und 2 min bei 11,000 G zentrifugiert.

Im letzten Schritt wurde nach Zugabe von 60 µl RNase-freiem H₂O und Zentrifugieren über 1 min bei 11,000 G die aufgereinigte RNA eluiert. Diese wurde bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C aufbewahrt.

Konstrukte

Nach 6 Wochen Kultivierung wurden die Konstrukte nach Absaugen des Mediums zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend die RNA nach Protokoll 4.5 NucleoSpin® RNA L (Macherey-Nagel, Düren) isoliert und aufgereinigt.

Zu diesem Zweck wurden die stammzellbesiedelten Kollagen Gele mit einer sterilen Schere manuell zerkleinert und im Anschluss in 1,8 ml RA1-Puffer plus 18 µl β-Mercaptoethanol (2-Mercaptoethanol, Merck, Darmstadt) lysiert und so bei -80°C bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt.

Zur Homogenisierung des Lysats wurde dieses auf einen NucleoSpin Filter L gegeben und 10 min bei 4,500 G zentrifugiert. Anschließend wurden dem Filtrat 1,8 ml 70% Ethanol zugegeben und gevortext. Im nächsten Schritt wurden maximal 3,8 ml Lysat-Ethanol-Mix auf eine NucleoSpin RNA L Säule gegeben und 3 min bei 4,500 G zentrifugiert, erneut nach Zugabe von 2,2 ml Membrane Desalting Buffer (MDB).

Nach Zugabe von 250 µl DNase Reaktionsmix (25 µl DNase I + 235 µl DNase reaction buffer) folgte eine 15-minütige Inkubation bei Raumtemperatur.

Es schloss sich die Inaktivierung der DNase und ein erster Waschschrift an, bei dem zunächst 2,6 ml RA2 Puffer auf die Silica-Membran gegeben wurde und dann 3 min bei 4,500 G zentrifugiert wurde. Bei einem weiteren Waschgang wurden 2,6 ml RA3 Puffer hinzugegeben und 3 min bei 4,500 G zentrifugiert. Beim dritten und letzten Waschgang wurden erneut 2,6 ml RA3 hinzugegeben und 5 min bei 4,500 G zentrifugiert. Im letzten Schritt wurde nach Zugabe von 500 µl RNase-freiem H₂O, Inkubation für 2 min bei Raumtemperatur und Zentrifugieren über 3 min bei 4,500 G die aufgereinigte RNA eluiert. Diese

wurde bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C aufbewahrt. Im Biophotometer (Eppendorf, Hamburg, Germany) wurde anschließend der RNA-Gehalt der jeweiligen Proben bestimmt.

2.5.2 cDNA Synthese

Für die cDNA Synthese wurde 1 µg RNA eingesetzt. Zu dieser wurde 1 µl Oligo(dt)Primer (Oligo(dt)Primer, Promega, Madison, USA) gegeben, bei 70°C 10 min erhitzt und anschließend 5 min auf Eis abgekühlt. Nach kurzem Anzentrifugieren, Zugabe von 1 µl PCR Nucleotid-Mix (PCR Nucleotide Mix (10 pmol/each), Promega, Madison, USA; 10pmol/each), 4 µl M-MLV RT 5x Puffer (M-MLV RT 5x Buffer, Promega, Madison, USA), 1 µl Reverse Transcriptase (M-MLV Reverse Transcriptase, Promega, Madison, USA) und Auffüllen mit HPLC-Wasser (HPLC-Wasser, Carl Roth, Karlsruhe) auf 20 µl wurde die Mischung 50 min bei 42°C inkubiert. Zum Inaktivieren der Reversen Transkriptase wurde die geschriebene cDNA für 10 min auf 70°C erhitzt und anschließend mit HPLC-Wasser auf 50 µl aufgefüllt.

2.5.3 Polymerase Ketten Reaktion (PCR) und Gelelektrophorese

Mithilfe einer PCR können spezifische Abschnitte des Genoms unter Verwendung selektiver Primer exponentiell amplifiziert werden. Durch die Wahl der eingesetzten Primer (Tabelle 1) kann der zu vervielfältigende Abschnitt genau festgelegt werden. Das Housekeeping-Gen EF1α diente zur Überprüfung einer suffizienten cDNA Synthese.

22,5 µl HPLC-Wasser, 3 µl PCR Reaktionspuffer (10x) (PCR Reaction Buffer (10x), Amersham, Piscataway, USA), 1 µl PCR Nucleotide Mix (10pmol/each) und 0,5 µl Taq DNA Polymerase (Taq DNA Polymerase, Amersham, Piscataway, USA) wurden mit 2 µl des jeweiligen Primers und 1µl cDNA in ein PCR-Tube (PCR Tubes und Deckel, Hartenstein, Würzburg) pipettiert. Zur Denaturierung der DNA wurde der Mix im Thermocycler (Multicycler PTC 200, Biozym Diagnostik, Hess. Oldendorf) initial 3 min auf 94°C erhitzt, um nach Abkühlen ein Anlagern der Primer zu ermöglichen. Hierauf folgte eine für den jeweiligen Primer spezifische Anzahl an Reaktionszyklen, die aus

Denaturierung über 1 min bei 94°C, 1 min Annealing bei primerspezifischer Annealingtemperatur und 1 min Elongation bei 72°C zusammengesetzt waren. Abschließend folgte noch eine Vervollständigung der cDNA über 5 min bei 72°C. Bis zur Weiterverwendung wurden die Proben bei -20° gelagert.

Tabelle 1: RT-PCR Primer-Sequenzen und ihre Produktgröße in Basenpaaren

<i>Gene</i>	RT-PCR Primer-Sequenzen (5'-3')	Zykluszahl	Annealing Temp (°C)	Produktgröße (bp)
<i>AGN</i>	Fw: GCCTTGAGCAGTTCACCTTC Rv: CTCTTCTACGGGACAGCAG	35	54	391
<i>ALP</i>	Fw: TGGAGCTTCAGAAGCTCAACACCA Rv: ATCTCGTTGTCTGAGTACCAGTCC	33	51	454
<i>BSP</i>	Fw: AATGAAAACGAAGAAAGCGAA Rv: ATCATAGCCATCGTAGCCTTGT	32	50	310
<i>Cbfa1</i>	Fw: ACAGATGATGACACTGCCACC Rv: CATAGTAGAGATATGGAGTGCTGC	34	55	307
<i>Col I A2</i>	Fw: GGACACAATGGATTGCAAGG Rv: TAACCACTGCTCCACTCTGG	32	54	461
<i>Col II A2</i>	Fw: TTTCCCAGGTCAAGATGGTC Rv: CTTCAGCACCTGTCTCACCA	35	58	374
<i>Col X A1</i>	Fw: CCCTTTTTGCTGCTAGTATCC Rv: CTGTTGTCCAGGTTTTCTGGCAC	35	58	467
<i>EF1α</i>	Fw: AGGTGATTATCCTGAACCATC C Rv: AAAGGTGGATAGTCTGAGAAG C	30	62	234
<i>OC</i>	Fw: ATGAGAGCCCTCACACTCCTC Rv: GCCGTAGAAGCGCCGATAGGC	32	56	288
<i>ON</i>	Fw: GATCTTCTTTCTCCTTTGCCTGG Rv: TGTTTGACAGTGGTGGTTCTGGCA	34	57	224
<i>OP</i>	Fw: ACGCCGACCAAGGAAAACCTC Rv: GTCCATAAACCACACTATCACCTCG	32	51	483
<i>SOX-9</i>	Fw: GGAGTGGAAGTTACTGACTGATG Rv: AGGCGTTTTGCTTCGTCAATG	36	55	263

Fw = Forward, Rv = Reverse

Zum Nachweis der PCR-Produkte wurde das Amplifikat in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (Gelelektrophoreseeinheiten B2, Owl, Portsmouth, USA). Die negativ geladene DNA wandert hierbei im Gel von der Kathode zur Anode. Die Geschwindigkeit dieses Vorgangs ist abhängig von der

Größe der jeweiligen DNA-Fragmente. Durch Interkalation des Farbstoffs Ethidiumbromid (GIBCO BRL, Darmstadt) in die DNA kann diese unter Einwirkung von UV-Licht sichtbar gemacht werden.

1,5 g Agarosepulver (Roth, Karlsruhe) wurden mit 100 ml 0,5% TBE-Puffer (TBE 10x: 10,8 g Tris-base (TRIS (hydroxymethyl)–aminomethan, Merck, Darmstadt, Germany) + 5,5 g Borsäure (Borsäure, Merck, Darmstadt) + 4 ml EDTA (EDTA, Fluka Chemie, Buch, Switzerland) ad 100 ml Aqua dest.) und 5 µl Ethidiumbromid in einer Mikrowelle zum Kochen gebracht und in eine Elektrophoresekammer mit aufgesetztem Rechen gegossen. Nach Aushärtung des Agarosegels und Auffüllen der Elektrophoresekammer mit TBE-Puffer wurden je 15 µl des Amplifikats mit 1,5 µl DNA-Ladepuffer (30% Glycerol (Glycerol, Merck, Darmstadt) + 0,1 M EDTA + 1% SDS (SDS ultra pure, Carl Roth, Karlsruhe) + 0,25% Bromphenolblau (Bromphenolblau, Sigma-Aldrich, Steinheim) + 0,25% Xylene Cyanol (Xylene Cyanol, Sigma-Aldrich, Steinheim) ad Aqua dest) vorsichtig in eine durch den Kamm im Gel gebildete Tasche gefüllt und bei 140 Volt über 30 bis 45 min im Gel aufgetrennt. Um die jeweilige Basenpaarlänge der einzelnen DNA-Fragmente ermitteln zu können, wurde in eine der Geltaschen eine 100 bp DNA-Leiter (DNA Leiter Plus 100 bp, PeQLab, Erlangen) gegeben und ebenfalls im Gel aufgetrennt. Die entstandenen DNA-Banden konnten schließlich mithilfe von UV-Licht im UV-Densitometer (UV-Densitometer, Ltf-Labortechnik, Wasserburg) sichtbar gemacht werden.

3. Ergebnisse

3.1 Isolierung und Kultivierung mesenchymaler Stammzellen

Mesenchymale Stammzellen wurden durch Adhärenz selektiert und zeigten ein typisches Wachstum in Kolonien. In der Kultur waren nach 3 Tagen rundlich-ovaläre, nicht-konfluente Zellen sowie vereinzelt spindelförmige Zellen zu erkennen (Abb. 3A). Im weiteren Verlauf zeigten sich zunehmend fibroblastäre Zellen mit hoher mitotischer Aktivität. Nach zwei Wochen fand sich lichtmikroskopisch ein konfluenter Zellrasen, bestehend aus spindelförmigen, Fibroblasten-ähnlichen Zellen (Abb. 3B).

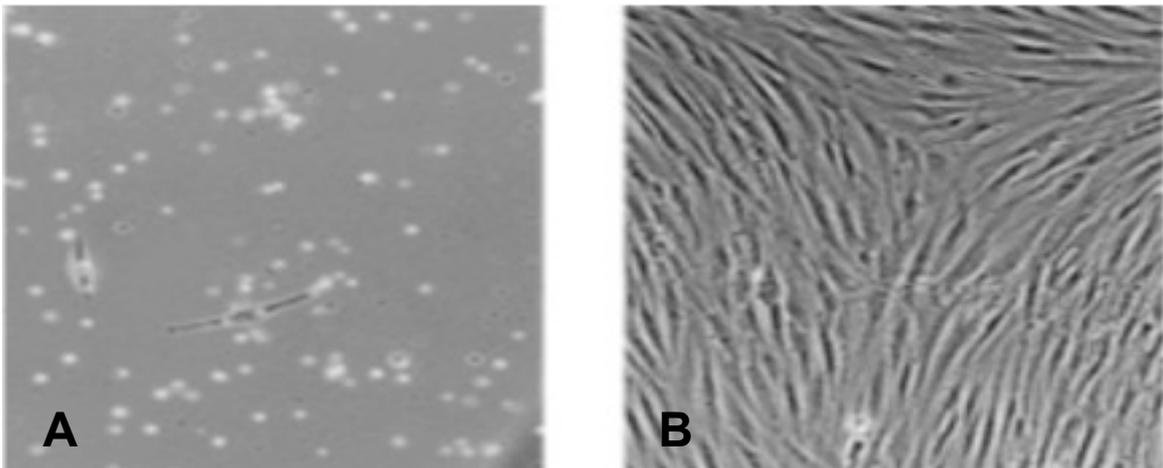


Abb. 3: Mononukleäre, mesenchymale Stammzellen (MSZ) nach 3 Tagen (A) und 14 Tagen (B) in Zellkultur.

3.2 Osteogene Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen in Monolayerkultur

Konfluente Monolayerkulturen wurden für 28 Tage mit osteogenem Medium zur Differenzierung stimuliert und histologisch sowie mittels RT-PCR analysiert. Als Kontrollpopulation dienten für 28 Tage in SZM kultivierte MSZ.

3.2.1 Histologie

Der histochemische Färbenachweis für ALP, einen frühen Marker der osteogenen Differenzierung, zeigte nach vier Wochen Differenzierung eine deutliche Mehrexpression des Enzyms bei den mit osteogenem Medium differenzierten MSZ. In der mit SZM kultivierten Kontrollgruppe fiel der Färbenachweis nur bei einzelnen Zellen positiv aus. In der Alizarin Rot Färbung fand sich eine deutliche Färbung in der osteogen differenzierten Zellkultur, einem Nachweis mineralisierter, extrazellulärer Matrix entsprechend. In der Kontrollgruppe konnte keine mineralisierte, extrazelluläre Matrix nachgewiesen werden. Die Ergebnisse entsprachen den bereits in der Literatur publizierten Daten (Pittenger et al., 1999).

3.2.2 RT-PCR Analyse osteogen differenzierter MSZ in Monolayerkultur

Die RT-PCR Analyse für die osteogenen Markergene ALP, Col I, OP, OC, ON, Bone Sialo Protein (BSP) und den osteogenen Transkriptionsfaktor Cbfa1 zeigte eine in beiden Versuchsgruppen gleich stark ausgeprägte Expression des frühen osteogenen Markerproteins ALP. Auch bezüglich des unspezifischen Markers Col I war zwischen Kontrollgruppe und der osteogen differenzierten Zellkulturgruppe (OST) kein Unterschied nachzuweisen. Während der osteogene Marker ON ebenfalls in beiden Versuchsgruppen ähnlich stark exprimiert war, konnte in der mit osteogenem Medium kultivierten Gruppe eine deutliche Mehrexpression von OP und OC, einem späten Marker osteogener Differenzierung, nachgewiesen werden. Auch das osteogene, integrinbindende Matrixprotein BSP war in der osteogen differenzierten Versuchsgruppe deutlich stärker exprimiert. Neben BSP konnte auch für den spezifischen, osteogenen Transkriptionsfaktor Cbfa1 eine starke Expression in der mit osteogenem Medium kultivierten Gruppe nachgewiesen werden, nicht jedoch in der mit SZM kultivierten Kontrollgruppe.

Gen	Kontrolle	OST
EF1α		
ALP		
Col I		
OP		
OC		
ON		
BSP		
Cbfa1		

Tab. 2: RT-PCR der osteogenen Markergene ALP, Col I, OP, OC, ON, BSP und Cbfa1 nach 28 Tagen osteogener Differenzierung (OST) bzw. Kultivierung in SZM (Kontrolle). Als Housekeeping-Gen wurde EF1α verwendet.

3.2 Verhalten von Kollagen Hydrogelen unterschiedlicher Zellkonzentrationen

In Abhängigkeit von der Zellzahl war in der H/E Übersichtsfärbung eine unterschiedlich starke Kontraktion der Gele nach 3 Tagen Kultivierung in SZM zu erkennen. Gele mit einer Zellkonzentration von $2,5 \times 10^5$ (4A und B) wiesen eine sehr lockere, wabige Struktur mit geringer Zelldichte auf. Bei einer Zellkonzentration von 5×10^5 Zellen/ml (4C und D) zeigten sich die Gele stärker kontrahiert, die Zellen waren homogen innerhalb des Gels verteilt. Gele mit einer Zelldichte von $7,5 \times 10^5$ MSZ pro ml Gel hingegen zeigten sich stark kontrahiert, mit dicht gelagerten, gleichmäßig im Gel verteilten Zellen. Die Zellen wiesen den für humane MSZ typischen, länglich-fibroblastären Phänotyp

auf. Randständig war eine mehrschichtige Anreicherung der Zellen aufgrund der Kontraktion des Gels zu erkennen. Um die für osteogene Differenzierungsvorgänge wichtigen, interzellulären Kontakte möglichst zu gewährleisten, wurden für die weiteren Versuche Gele mit einer Zellzahl von $7,5 \times 10^5$ MSZ/ml Gel verwendet.

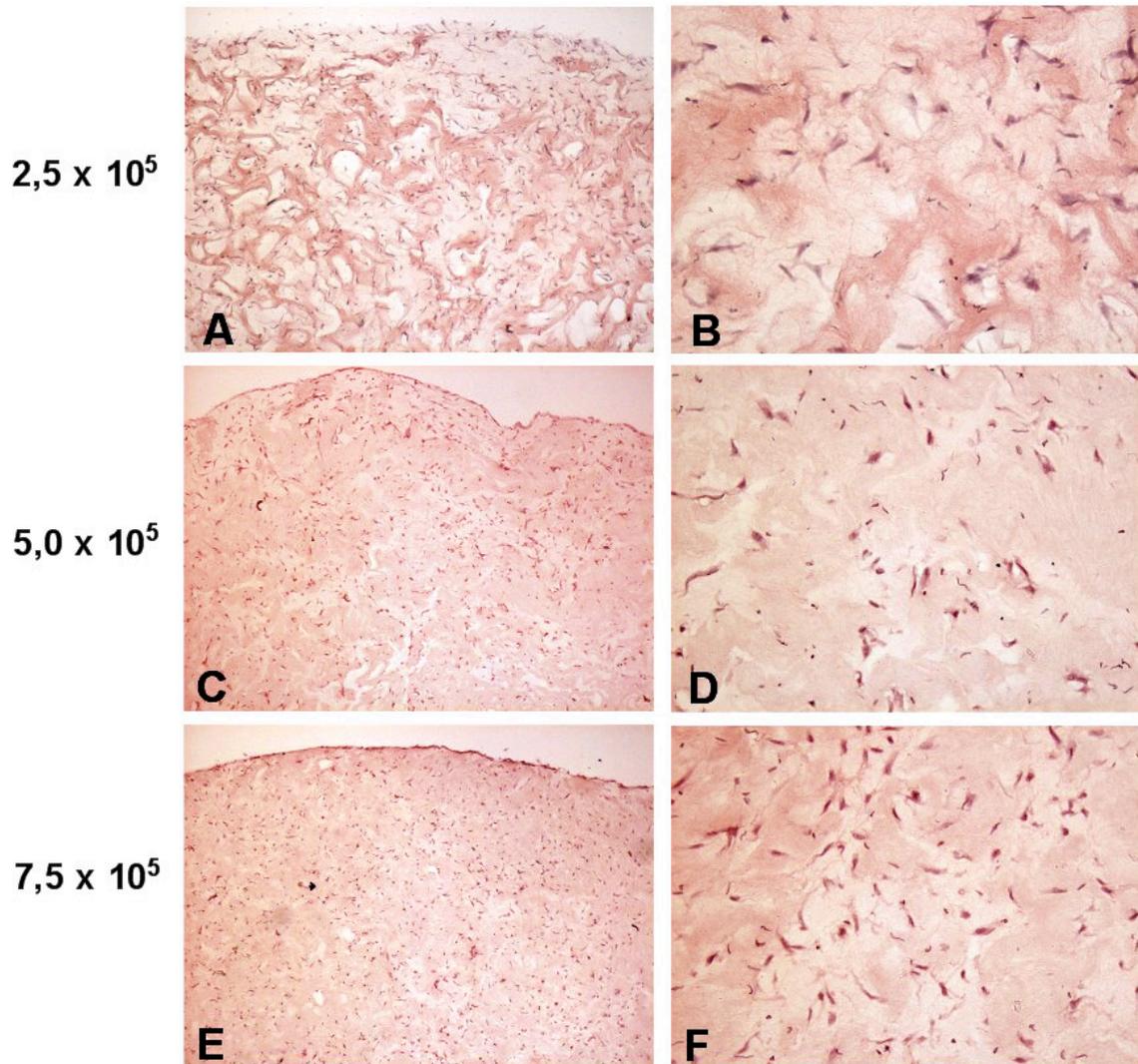


Abb. 4: H/E-gefärbte Paraffinschnitte von Kollagen Gelen bei unterschiedlicher Zelldichte pro ml Gel nach 3 Tagen Kultivierung in SZM bei 50- (A, C und E) und 200-facher (B, D und F) Vergrößerung.

3.4 Osteogene Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen in Kollagen Hydrogelen

3.4.1 Makroskopischer Aspekt – Kontraktion der Kollagen Hydrogele

Die mit osteogenem Medium differenzierten Konstrukte zeigten nach sechs Wochen eine deutlich stärkere Kontraktion als die mit Stammzellmedium kultivierte Kontrollgruppe. Die Volumina der kontrahierten Hydrogele wurden näherungsweise nach der Formel $V = 1/3 \pi r^3$ berechnet. Diesen Berechnungen zufolge präsentierten sich die osteogen differenzierten Gele (OST) um etwa 22% stärker kontrahiert als die der Kontrollgruppe (SZM). Die mit BMP-2 kultivierten Gele allerdings wiesen die vergleichsweise geringste Kontraktion auf. Die mit BMP-2 differenzierten Gele zeigen im Vergleich mit der Referenzgruppe ein um 25% höheres Volumen.

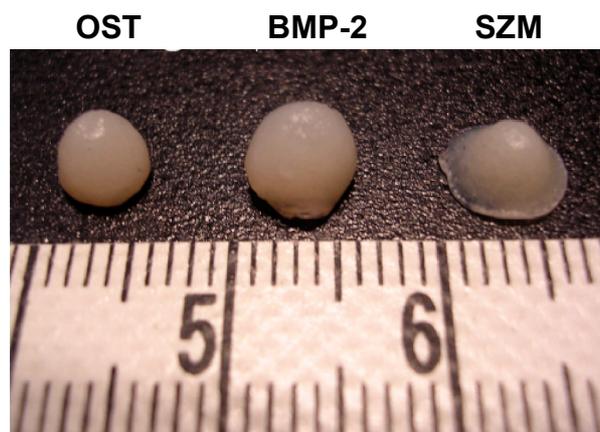


Abb. 5: Kontraktion der Gele nach 42 Tagen in Abhängigkeit vom verwendeten Medium bei Kultivierung der Gele mit osteogenem Medium (OST), SZM und BMP-2.

3.4.2 Histologie

Die Beurteilung der Zellmorphologie in der H/E Färbung (Abb. 6A, C und E) zeigte, dass die in SZM kultivierten Zellen einen gemischt rundlich-ovalären und länglich Fibroblasten-ähnliche Zelltyp aufwiesen. Die mit osteogenem Standardmedium kultivierten Zellen zeigten einen länglichen Zelltyp. Bei den mit BMP-2 kultivierten Zellen hingegen war vermehrt eine rundlich-ovaläre, chondrozytenähnliche Zellmorphologie nachzuweisen, zum Teil mit

angedeuteten, perizellulären Lakunen. In der Alzian Blau Färbung (Abb. 6B, D und E) zeigte sich nach 7 Tagen in der BMP-2 Gruppe keine, perizelluläre Mehranfärbung im Sinne einer Deposition einer proteoglykanreichen, sulfatierten, extrazellulären Matrix.

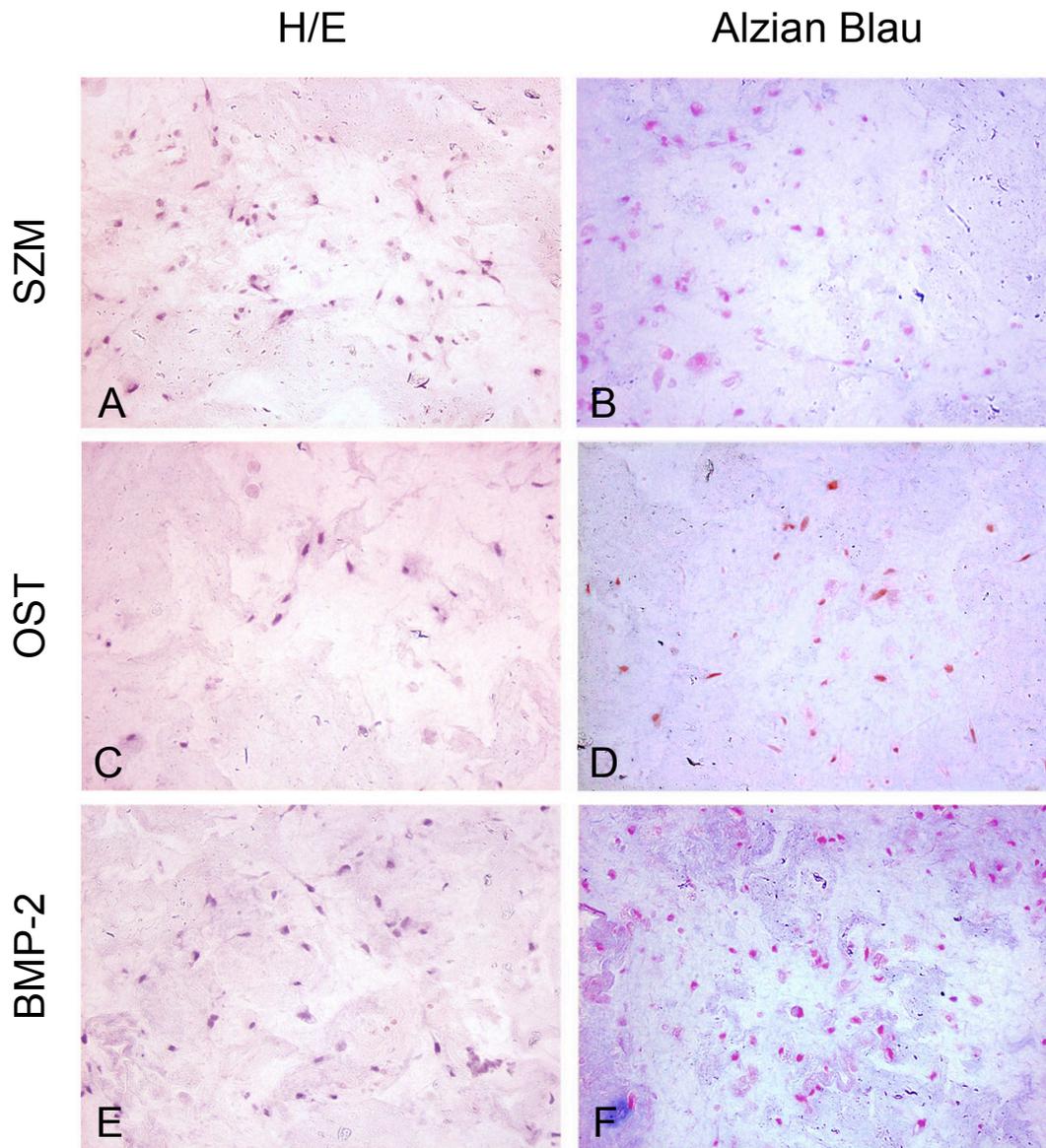


Abb. 6: H/E und Alzian Blau Färbung der für 7 Tage mit Stammzellmedium (SZM), osteogenem Medium (OST) und 30 ng/ml BMP-2 kultivierten Gele. 100-fache Vergrößerung.

An Tag 7 ließ sich weder in der Alizarin Rot Färbung (Abb. 7A, C und E) noch in der Versilberung nach v. Kossa (Abb. 7B, D und F) eine mineralisierte, extrazelluläre Matrix nachweisen.

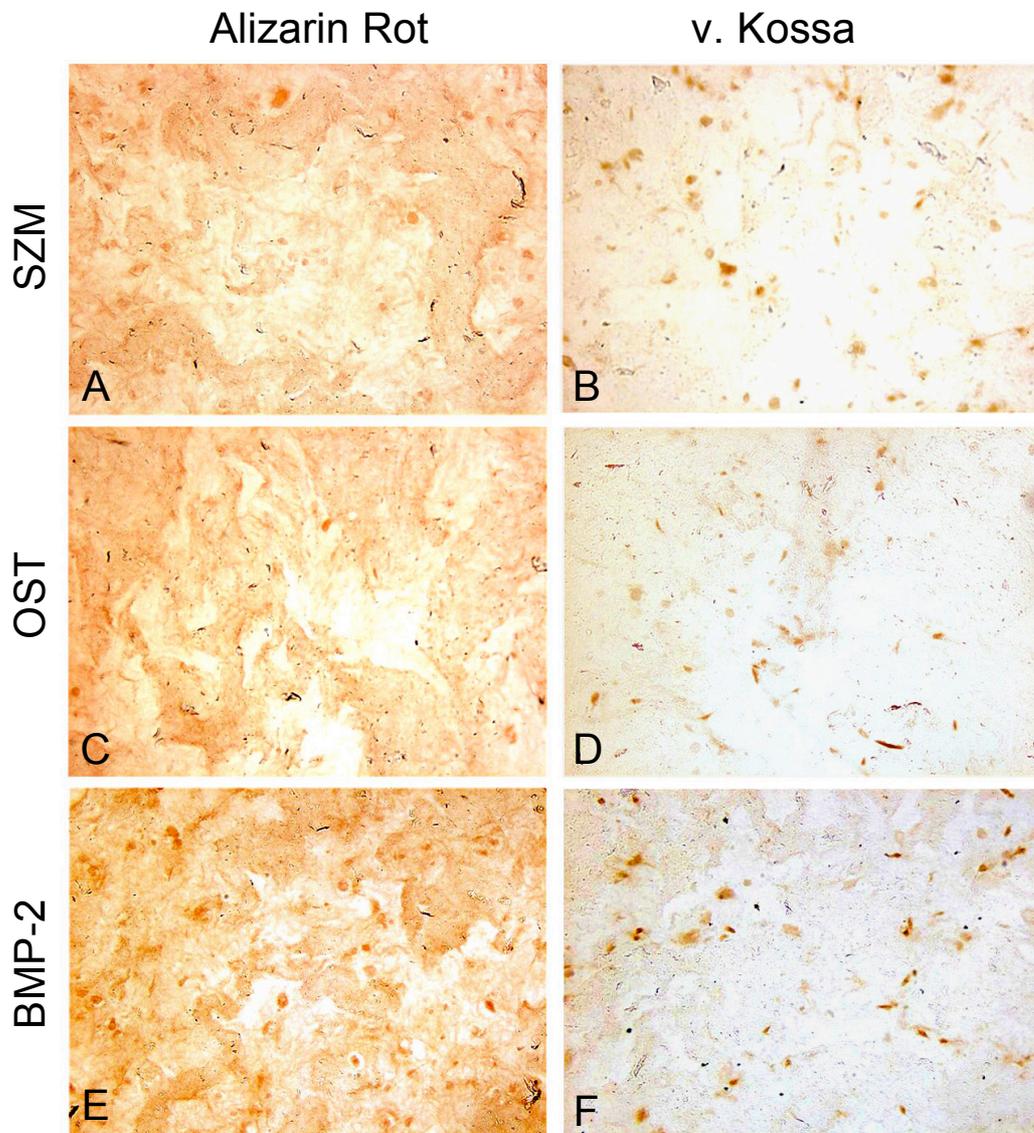


Abb. 7: Alizarin Rot Färbung und Versilberung nach v. Kossa an Tag 7. Die Gele wurden mit SZM, osteogenem Medium (OST) und 30 ng/ml BMP-2 kultiviert. 100-fache Vergrößerung.

An Tag 14 waren ähnliche zellmorphologische Verhältnisse wie an Tag 7 in den einzelnen Versuchsgruppen zu erkennen. Die Zellkerne in der mit SZM kultivierten Gruppe waren teils länglich, Fibroblasten-ähnlich, vermehrt auch rundlich-ovalärer Morphologie (Abb. 8A). In der mit osteogenem Medium kultivierten Versuchsgruppe hingegen waren sie phänotypisch unverändert

länglich-fibroblastär (Abb. 8C). In der BMP-2 Gruppe stellten sich die Zellkerne weiterhin überwiegend rundlich-chondrozytenähnlich dar. In der knorpelspezifischen Alzian Blau Färbung zeigten sich in den mit BMP-2 kultivierten Gelen perizelluläre, intensiver blaue Areale als Hinweis auf das Vorhandensein sulfatierter Proteoglykane.

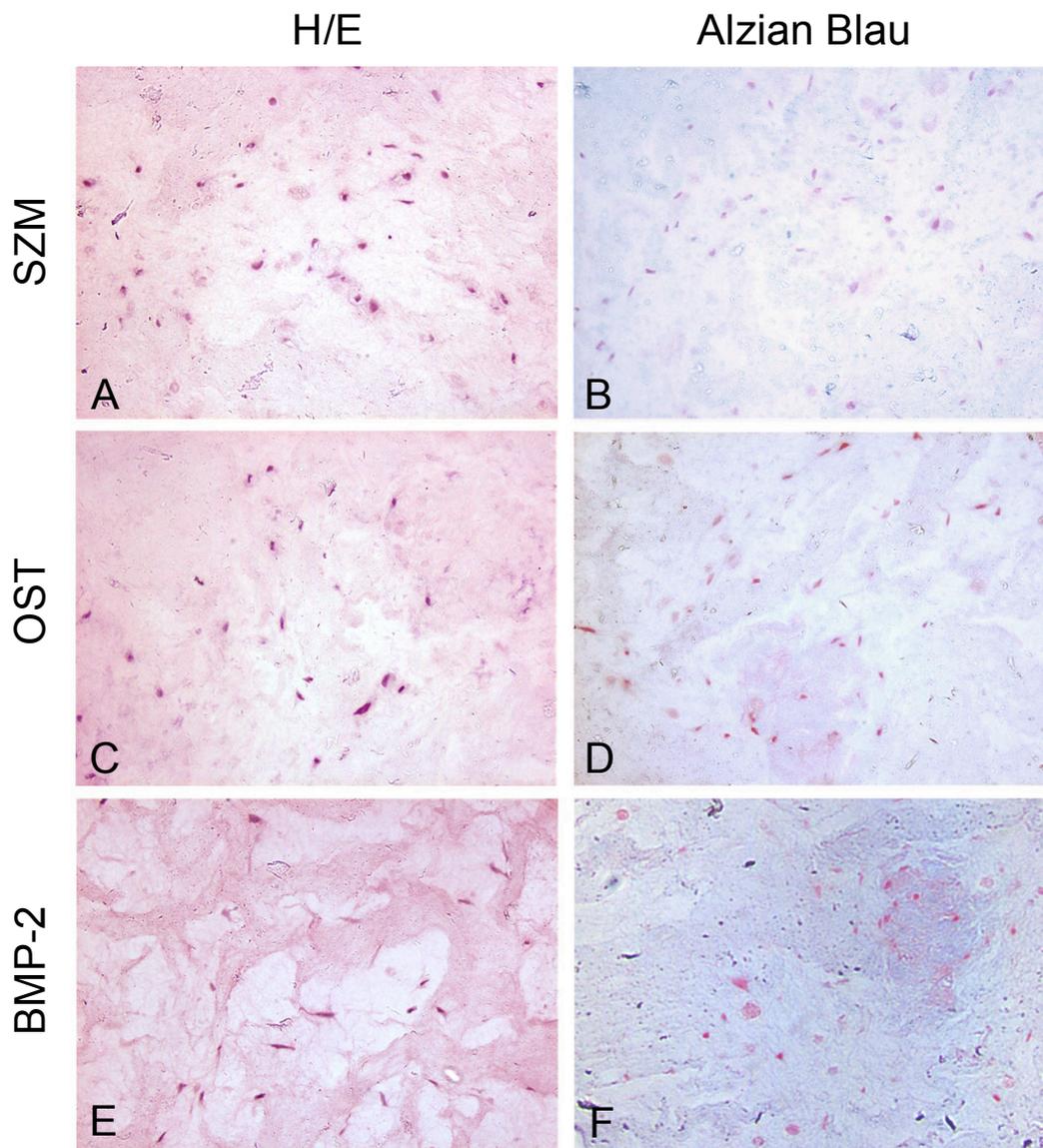


Abb. 8: H/E sowie Alzian Blau Färbung der für 14 Tage mit SZM (A und B), osteogenem Medium (OST) (C und D) und BMP-2 (E und F) kultivierten Gelen. Es konnten sulfatierter Proteoglykane in der mit 30 ng/ml BMP-2 kultivierten Gruppe (F) nachgewiesen werden. 100-fache Vergrößerung.

In den zum Nachweis von extrazellulärer Mineralisierung angewandten Färbungen für Alizarin Rot (Abb. 9A, C und E) und v. Kossa (Abb. 9B, D und F) fanden sich an Tag 14 keine Hinweise auf eine extrazelluläre Matrixbildung.

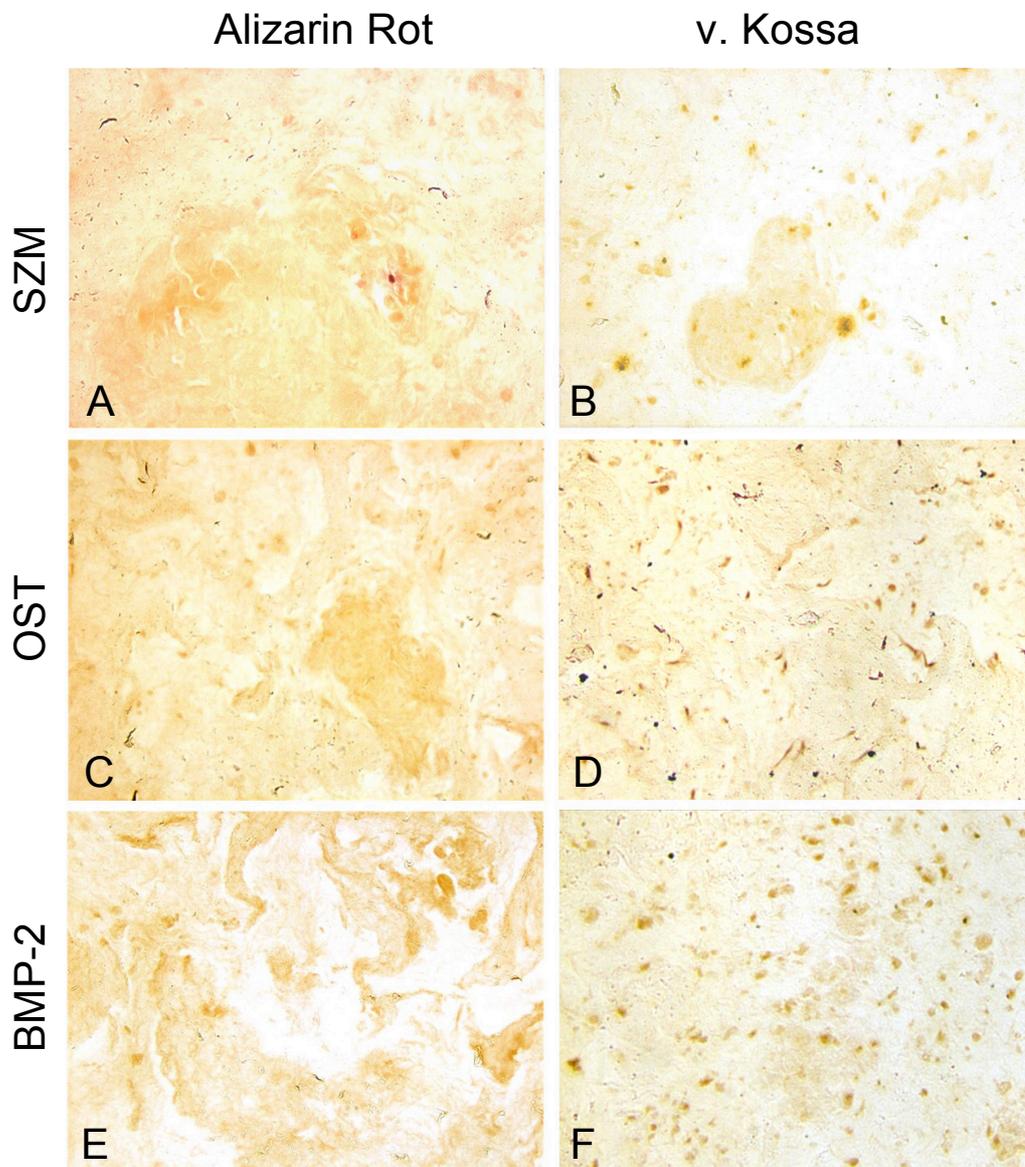


Abb. 9: Färbungen mit Alizarin Rot (A, C und E) und v. Kossa (B, D und F) nach 14 Tagen, 100-fache Vergrößerung.

Nach 28 Tagen Differenzierung fanden sich in der H/E Übersichtsfärbung der jeweiligen Versuchsgruppen Gele mit homogener Zellverteilung und neu aufgetretener mehrschichtiger Anreicherung der Zellen im Randbereich durch Kontraktion der Gele. Es fanden sich zellmorphologisch wiederum eher

rundlich-ovaläre, chondrozytenähnliche Zellen mit angedeuteten perizellulären Lakunen in der mit SZM (Abb. 10A) und vor allem in der mit BMP-2 (Abb. 10E) kultivierten Versuchsgruppe. In der mit osteogenem Differenzierungsmedium kultivierten Gruppe hingegen überwogen weiterhin länglich-fibroblastenähnliche Zellmorphologien (Abb. 10C). Sowohl bei den mit BMP-2 kultivierten Gelen (Abb. 10F) als auch jetzt bei der mit Stammzellmedium kultivierten Versuchsgruppe (Abb. 10B) ließ sich in der Alzian Blau Färbung eine perizelluläre Farbanreicherung erkennen.

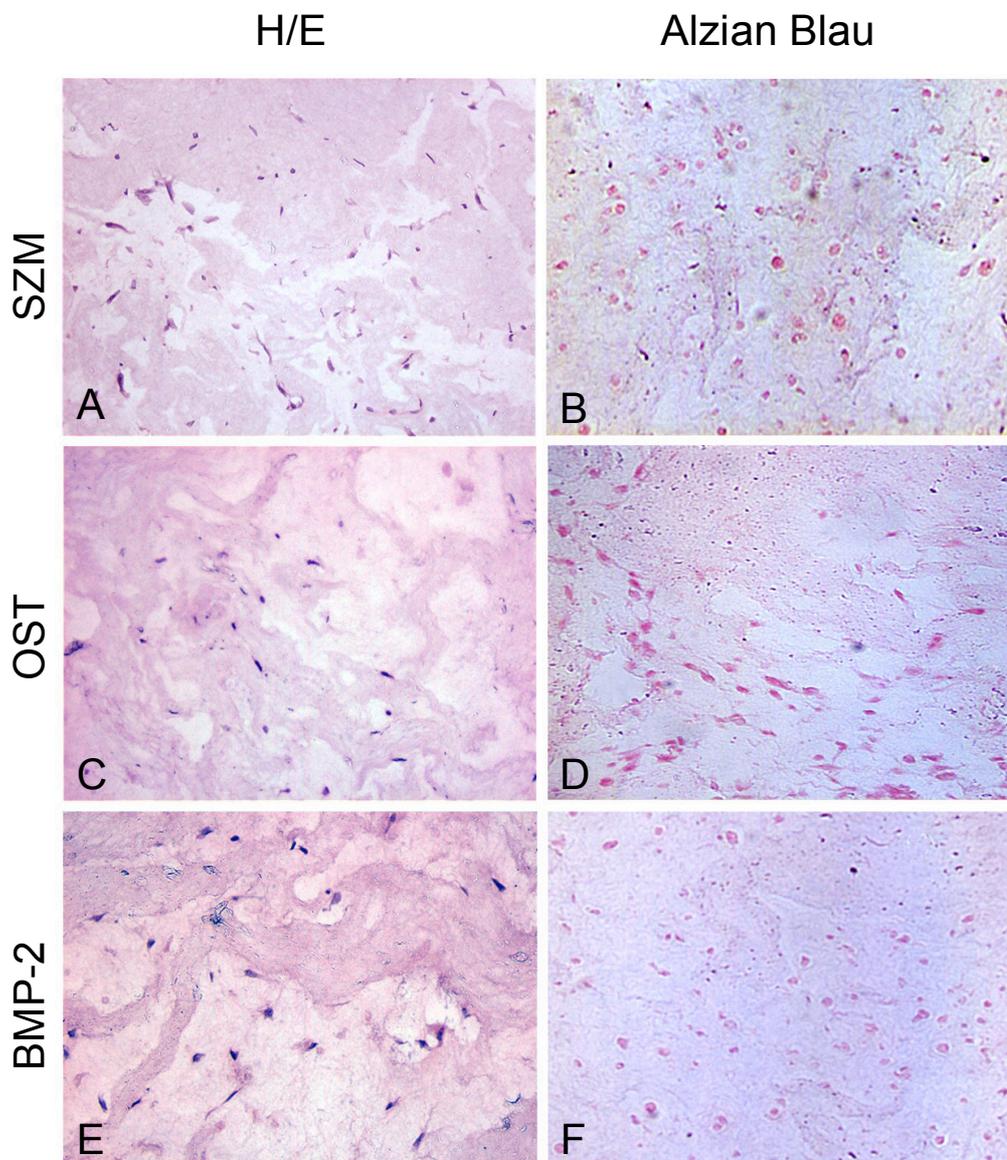


Abb. 10: Färbungen mit H/E und Alzian Blau an Tag 28. Es konnten sulfatierte Proteoglykane in der mit SZM (B) und der mit 30 ng/ml BMP-2 kultivierten Versuchsgruppe (F) nachgewiesen werden. 100-fache Vergrößerung.

Die osteogenen Färbungen an Tag 28 für Alizarin Rot und v. Kossa zeigten eine schwache, fleckförmig im Gel auftretende, interzelluläre Mineralisierung in den mit SZM (Abb. 11A und B) sowie in den mit osteogenem Medium (Abb. 11 C und D) kultivierten MSZ-Kollagen Gele in Form von gelb-bräunlichen bis schwarzen Farbniederschlägen. Bei den mit BMP-2 differenzierten Konstrukten waren solche Anreicherungen nicht nachzuweisen.

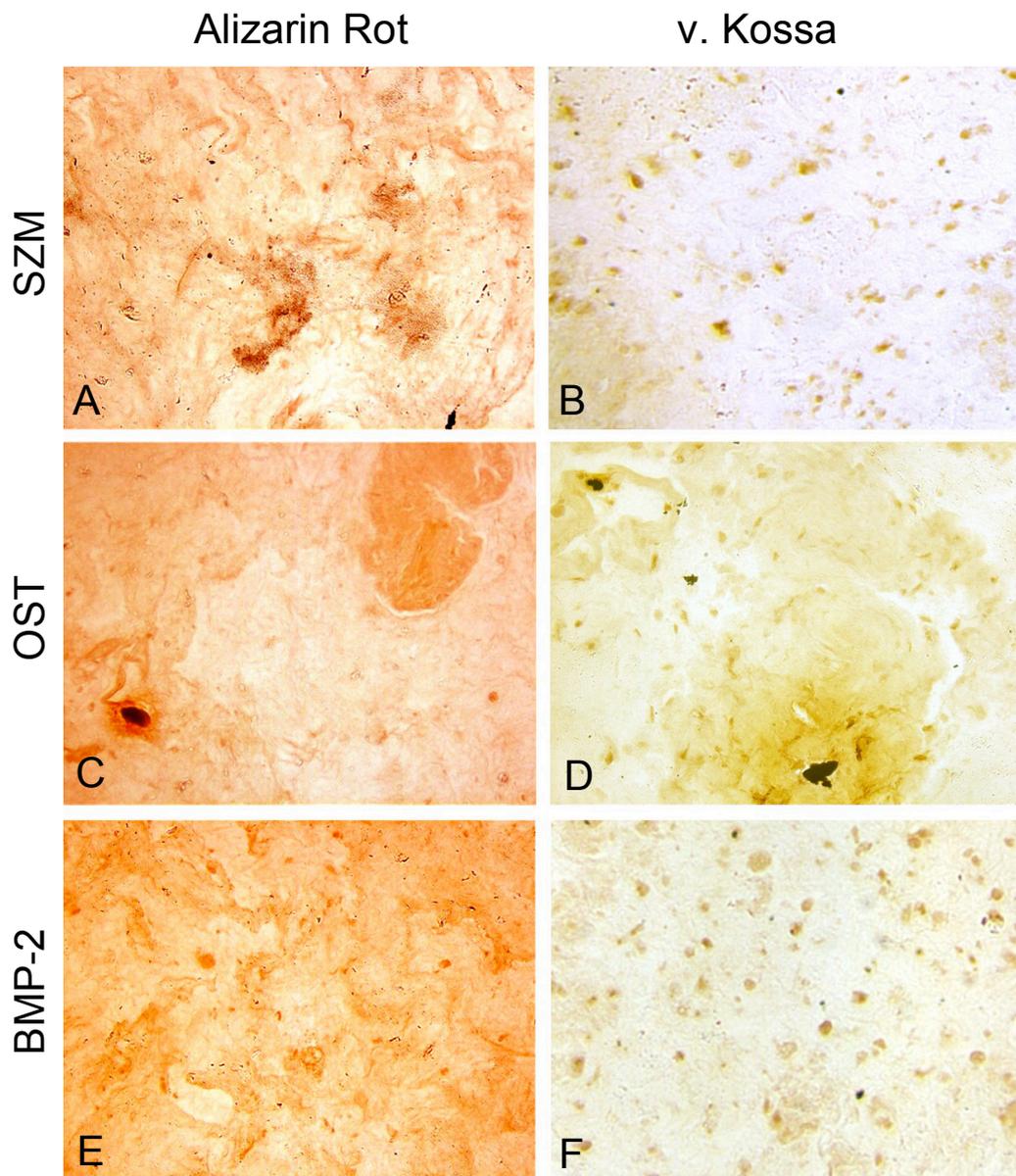


Abb. 11: Alizarin Rot und v. Kossa Färbung an Tag 28. Es konnte eine extrazelluläre, mineralisierte Matrix in der mit SZM (A und B) und osteogenem Medium kultivierten Gruppe (OST) (C und D) nachgewiesen werden. 100-fache Vergrößerung.

Nach 42 Tagen Differenzierung fanden sich in der H/E Übersichtsfärbung in der mit SZM (Abb. 12A) und vor allem in der mit BMP-2 (Abb. 12E) kultivierten Gruppe im Hinblick auf die Zellmorphologie ballonierte, rundlich-ovaläre, chondrozytenähnliche Zellen. In der mit osteogenem Differenzierungsmedium kultivierten Gruppe hingegen waren überwiegend morphologisch länglich-fibroblastäre Zellen vorzufinden (Abb. 12C). Die Alzian Blau Färbung zeigte peri- und interzellulär deutlich positive Anreicherungen sowohl in der SZM-Gruppe (Abb. 12B) als auch in der mit BMP-2 kultivierten Gruppe (Abb. 12F), nicht jedoch bei den mit osteogenem Medium kultivierten Gelen.

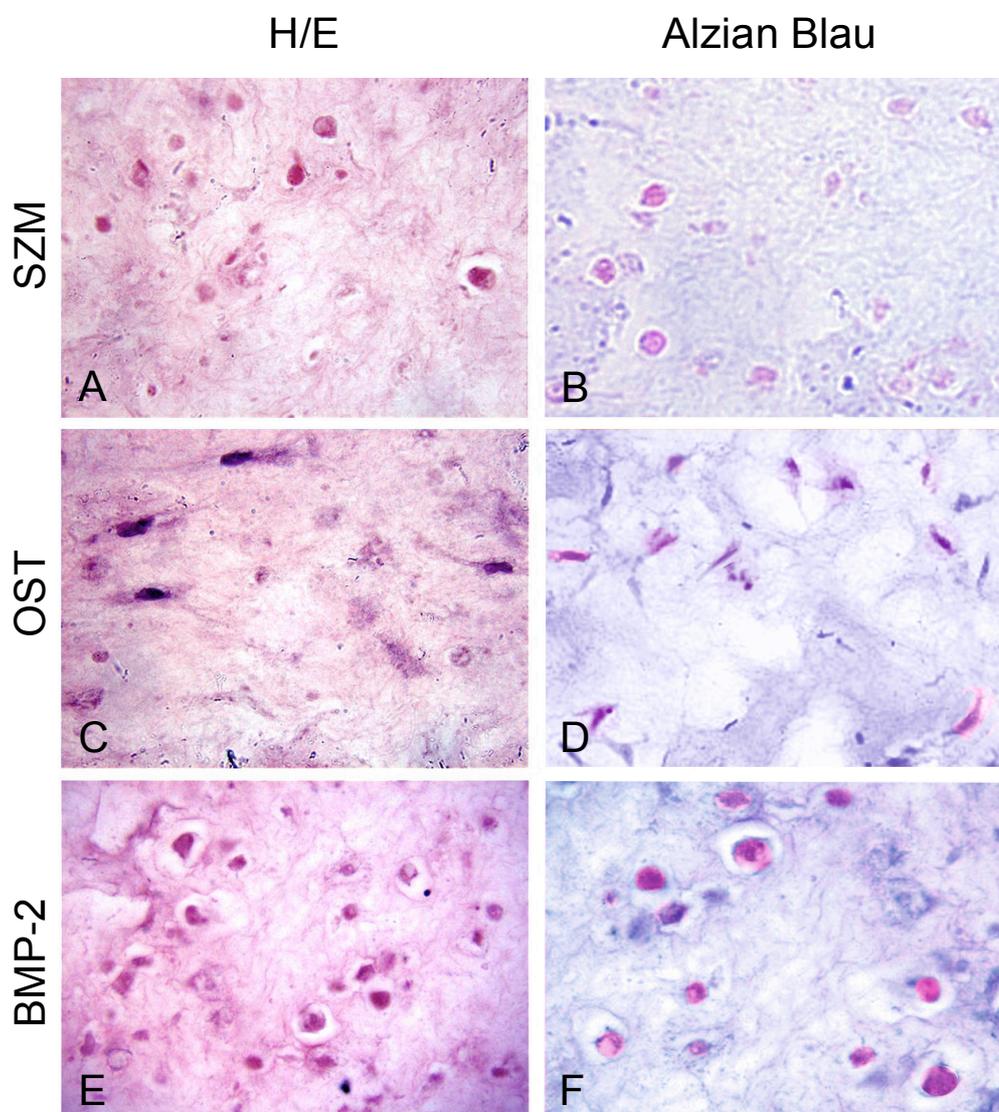


Abb. 12: Färbungen mit H/E und Alzian Blau an Tag 42. Es zeigte sich ein positiver Nachweis sulfatierter Glykosaminoklykane in der SZM (A und B) und BMP-2 Gruppe (E und F). 100-fache Vergrößerung.

Die osteogenen Färbungen an Tag 42 für Alizarin Rot und v. Kossa lieferten in den mit SZM (Abb. 13A und B) sowie in den mit osteogenem Standardmedium (Abb. 13C und D) kultivierten Kollagen Gelen diskrete Hinweise für eine schwache, fleckförmig im Gel auftretende, interzelluläre Mineralisierung in Form von gelb-bräunlichen sowie bräunlich-schwarzen Mehranfärbungen. Diese waren bei den mit BMP-2 differenzierten Hydrogelen nicht nachzuweisen. In der Alizarin Rot Färbung erkannte man wiederum vor allem in der BMP-2 Gruppe, weniger deutlich in der SZM-Gruppe, die runde, chondrozytenhafte Zellmorphologie.

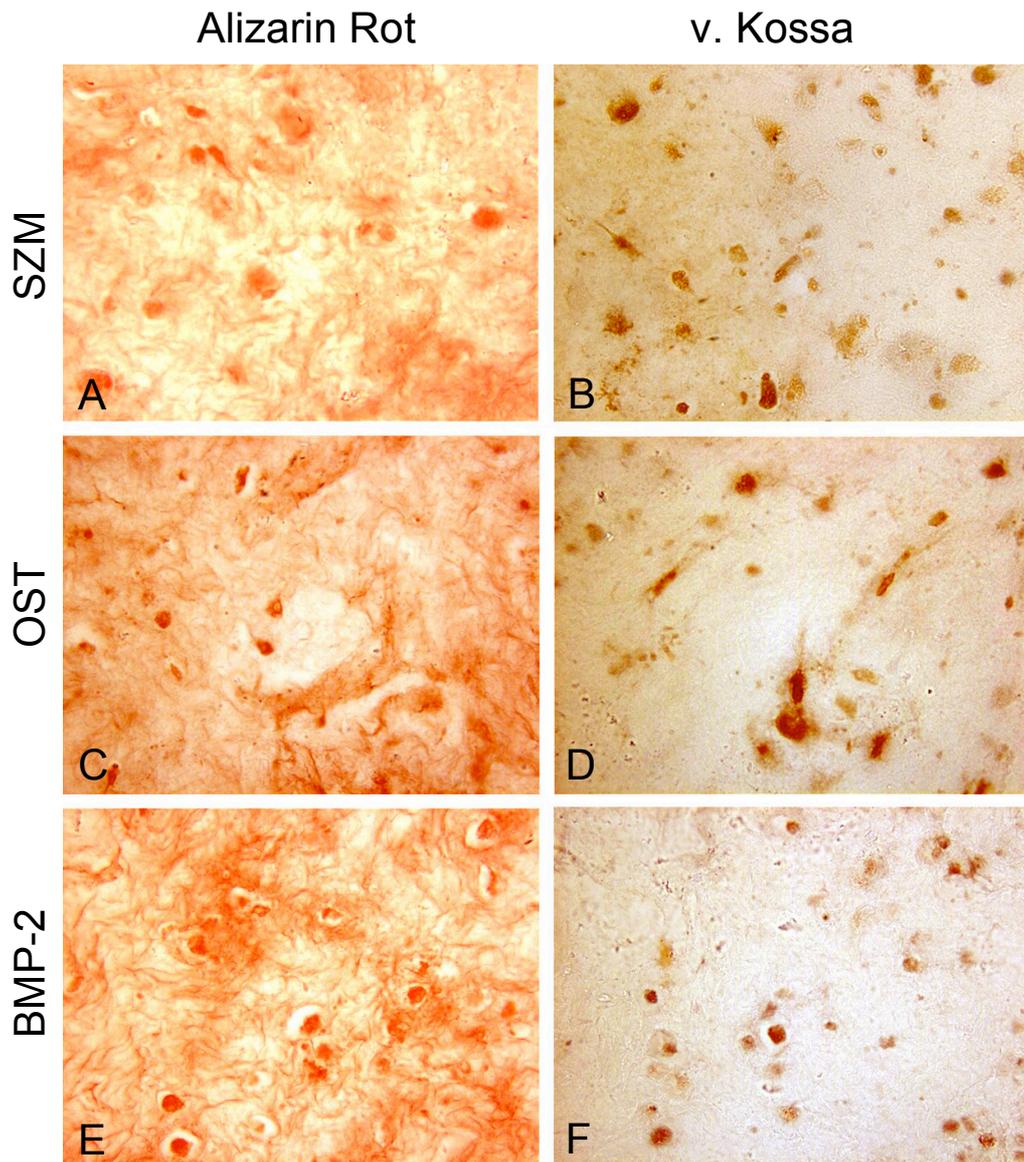


Abb. 13: Alizarin Rot Färbung und Versilberung nach v. Kossa an Tag 42. Es findet sich ein positiver Nachweis mineralisierter extrazellulärer Matrix in der SZM (A und B) sowie in der osteogen differenzierten Gruppe (C und D). 100-fache Vergrößerung.

3.4.3 RT-PCR Analyse der Stammzell-Kollagen Hydrogele nach 6 Wochen

An Tag 42 wurde aus den Gelen der verschiedenen Versuchsgruppen RNA isoliert und aufgereinigt. Es folgte die molekularbiologische Untersuchung für osteogene und chondrogene Differenzierungsmarker mittels RT-PCR Analyse. Als Vergleich im Sinne einer nicht differenzierten Kontrollgruppe diente RNA der im Versuch verwendeten Zellen vor Einbringen in die Kollagen Gele an Tag 0 (siehe Tabelle 3).

Gen	d0	SZM	OST	BMP-2
EF1 α				
AGN				
ALP				
Cbfa1				
Col I				
Col II				
Col X				
OC				
SOX-9				

Tabelle 3: RT-PCR Analyse für osteogene und chondrogene Markergene an Tag 42 der mit BMP-2, Stammzellmedium (SZM) und osteogenem Medium (OST) kultivierten Gruppen im Vergleich zu undifferenzierten Stammzell-Kollagen Hydrogelen (d0).

In der RT-PCR Analyse zeigte sich nach 42 Tagen Kultur in SZM sowohl eine Expression osteogener Markergene als auch eine chondrogene Differenzierung. Im Vergleich mit undifferenzierten Zellen (d0) konnte eine deutliche Mehrexpression von AGN, Col II und SOX-9, gleichfalls der osteogenen Marker ALP und Cbfa1 gezeigt werden, bei gleich starker Expression von Col I, Col X und OC.

In der mit BMP-2 differenzierten Gruppe hingegen zeigte sich eine deutliche Zunahme der Expression der chondrogenen Markergene AGN, Col II und SOX-9 sowie Col X. Auch die osteogenen Marker ALP, Cbfa1 und OC waren deutlich stärker exprimiert als in der Kontrollgruppe von Tag 0. Keine Änderung konnte in der Expression des unspezifischen Markers Col I festgestellt werden.

In der RT-PCR Analyse der mit osteogenem Medium differenzieren Gruppe konnte im Vergleich zur Kontrolle an Tag 0 eine deutliche Mehrexpression aller osteogenen Marker, ALP, Cbfa1 und OC bei gleicher Expression von Col I nachgewiesen werden. Allerdings zeigte sich bei den chondrogenen Markergenen AGN, Col II und SOX-9 eine leichte Zunahme der Markergenexpression.

3.5 Herstellung eines segmentalen, stammzellbasierten Polycaprolacton Hydrogel Konstruktes für die Knochenrekonstruktion

Unter Zuhilfenahme von aus humanem Knochenmark isolierten MSZ, eines Kollagen Hydrogels (Arthro Kinetics, Esslingen) und eines anhand von computertomographischen Daten eines Kaninchenfemur mittels Fused-Deposition-Modelling produzierten Polycaprolacton-Scaffolds (Prof. Schantz, Singapur) wurde ein Prototyp zur Rekonstruktion segmentaler Knochendefekte hergestellt. Das Scaffold war 1 x 1 cm groß, wobei es sich um ein schnell reproduzierbares, bioresorbierbares, dreidimensionales ϵ -Polycaprolacton Scaffold mit einem voll interkonnektierten, porösen Netzwerk handelte. Die Porosität des Scaffolds betrug 60%. Der Durchmesser der einzelnen Filamente war 1,63 mm. Zur Besiedelung des Scaffolds mit MSZ wurde das Kollagen Gel verwendet (Abb. 14A und B). In der H/E Übersichtsfärbung ließ sich nach 42 Tagen Kultivierung in SZM ein gutes Bonding an der Grenzfläche zwischen Kollagen Gel und PCL-Scaffold feststellen (Abb. 15A). Trotz kontraktorischer Vorgänge innerhalb des Gels war es zu keiner Ablösung des Gels vom Scaffold gekommen. Das Kollagen Gel war in alle Bereiche des Scaffolds eingedrungen und hatte somit die makroporösen und mikroporösen Freiräume des Scaffolds komplett ausgefüllt. Dadurch konnte eine homogene Verteilung der MSZ innerhalb des Gels erreicht werden. Das Gel präsentierte sich histologisch von kompakter Struktur und war in seiner Kontinuität nicht unterbrochen. Die Zellen im Konstrukt waren von länglicher, spindelförmiger, fibroblastärer Morphologie (Abb. 15B). Durch die Einbettung mit Technovit 8100, einem kaltpolymerisierendem Kunststoff, konnte die Struktur des Scaffolds bei der histologischen Aufarbeitung komplett erhalten werden (Abb. 15A).

Der Einsatz dieses Konstrukts im Tierversuch mit sich anschließenden radiologischen Untersuchungen, histochemischer und immunhistochemischer Aufarbeitung, mechanischer Testung sowie gegebenenfalls Kombination mit unterschiedlichen Wachstumsfaktoren wie zum Beispiel BMP-2 oder hCyr61 ist Gegenstand weiterer, fortführender Projekte.

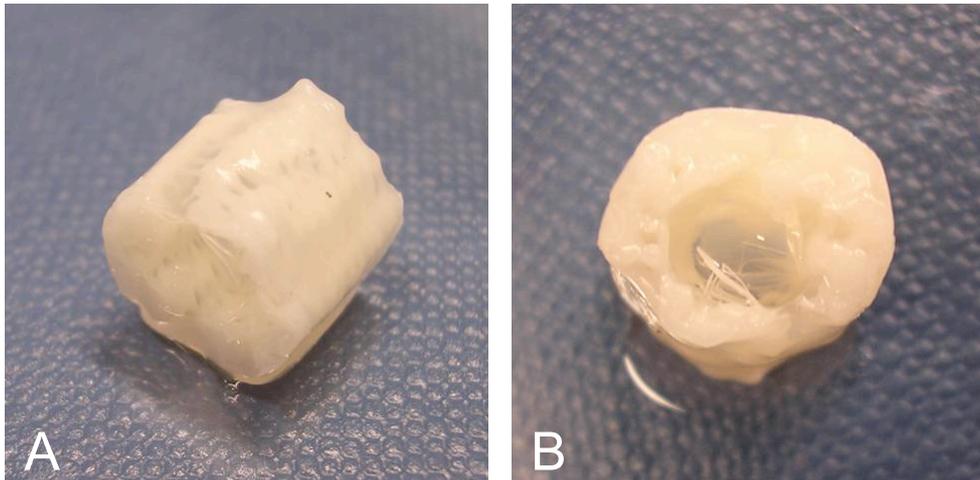


Abb. 14 Stammzellbasiertes Polycaprolacton-Hydrogel Konstrukt für die Rekonstruktion segmentaler Knochendefekte (A und B).

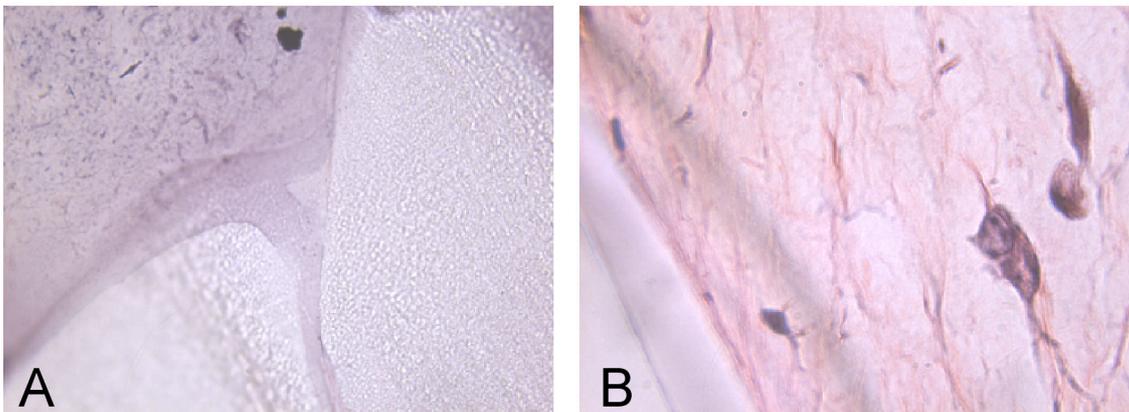


Abb. 15 Stammzellbasiertes Polycaprolacton-Hydrogel Konstrukt eingebettet in Technovit 8100 und mit H/E gefärbt bei 200- (A) und 400-facher Vergrößerung (B).

4. Diskussion

4.1 Methodische Überlegungen

Eine Vielzahl potentieller Quellen steht zur Verfügung, um Stammzellen zum Zweck der Geweberegeneration und -reparation zu isolieren. Somatische, adulte Stammzellen können in spezifischen Gewebekompartimenten des menschlichen Körpers detektiert werden und spielen eine wichtige Rolle bei der Erhaltung der Integrität verschiedenster Gewebetypen wie zum Beispiel Haut, Knochen und Blut (Robey, 2000; Watt und Hogan, 2000). Zu diesen Zellen werden neben neuronalen Stammzellen und Keratinozyten unter anderem auch die aus dem Knochenmark stammenden, stromalen MSZ gerechnet (Bianco und Robey, 2001). In vitro kultivierte MSZ besitzen über viele Passagen hinweg die Fähigkeit zur mitotischen Multiplikation ohne signifikanten Verlust spezifischer, molekularbiologischer Charakteristika (Vats et al., 2004). Sie sind in der Lage in unterschiedliche, mesenchymale Phänotypen zu differenzieren, einschließlich Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten (Pittenger, 1999; De Bari et al., 2001) und gelten als multipotent. Da die MSZ aus dem Knochenmark relativ leicht zu isolieren sind und ihre Eigenschaften bisher besser charakterisiert sind als die von MSZ aus dem Fettgewebe oder Periost, wurden in der vorliegenden Arbeit ausschließlich MSZ aus dem Knochenmark verwendet.

Für die Induktion der osteogenen Differenzierung in vitro spielen verschiedene Faktoren, vor allem Ascorbat, Dexamethason und β -Glycerophosphat, wie auch die Bone Morphogenetic Proteins aus der Superfamilie der Transforming Growth Factors (TGF) eine entscheidende Rolle (Pittenger, 1999; Luu et al., 2007). Die Differenzierung von MSZ wird in bedeutendem Maße auch von ihrer Umgebung und lokalen Faktoren beeinflusst. Dementsprechend differenzieren MSZ im Knochenmark nicht zu neuronalen Zellen oder Hepatozyten. Sobald sie aber ins Gehirn oder in die Leber transplantiert werden, können sie auf die dort herrschenden lokalen Gegebenheiten reagieren und sich funktionell an kranial-neurale oder hepatische Bedürfnisse anpassen. Es konnte nachgewiesen

werden, dass nach Einbringen von MSZ aus dem Knochenmark in lebende Organismen, eine Tendenz zur spontanen Mineralisierung und Ossifikation des Gewebes besteht (Minas und Nehr, 1997). Die in den Geweben Einfluss nehmenden, die Migration und Differenzierung induzierenden und Proliferation stimulierenden Faktoren sind bisher nur unzulänglich bekannt (Wiesmann et al., 2003).

MSZ eignen sich aufgrund ihrer charakteristischen Eigenschaften in besonderem Maße als zelluläre Ressource für Tissue Engineering Zwecke und lassen die Notwendigkeit, Alternativen wie embryonale Stammzellen zu erforschen, zunächst weniger dringlich erscheinen (Vogel, 2001). Neuere Studien allerdings stellen eine in diesem Ausmaß vorhandene Plastizität von MSZ in Frage. Sie diskutieren auch, ob die Fähigkeit neurale oder hepatische Zelltypen zu generieren, tatsächlich Differenzierungsprozesse im eigentlichen Sinne sind oder durch Zellfusion und Hybridisierung zustande kommende Ereignisse (Medvinsky und Smith, 2003). Noch ist der Einsatz von MSZ dadurch limitiert, dass zu wenig Wissen über die Langzeitstabilität der regenerierten Gewebe und ihre Tendenz, in andere nicht gewünschte Gewebetypen zu differenzieren, verfügbar ist. Bedingt durch das multilineare Differenzierungspotential könnten pluripotente Zellen bei Migration im Körper zu einer heterotopen Gewebeformation, zur Induktion tumoröser, neoplastischer Gewebsproliferation und somit zu Beeinträchtigungen des funktionellen Gewebe führen (Serakinci et al., 2004).

Etwa 30% der Proteinmasse im menschlichen Körper wird durch Kollagen gebildet. Es kann in jeglicher Art von Gewebe angetroffen werden, das Festigkeit und Flexibilität aufweist, wie zum Beispiel Haut und Knochen. Bisher konnten 14 verschiedene Kollagen Typen identifiziert werden, wobei der weitaus größte Anteil im menschlichen Körper von Kollagen I gebildet wird (van der Rest et al., 1990). Aufgrund seines reichhaltigen Vorkommens – Kollagen I macht über 90% aller fibrillären Proteine aus – und seiner spezifischen physikalischen und biologischen Eigenschaften wurde Kollagen I jeher zur Herstellung biomedizinischer Materialien verwendet (Pachence et al., 1987; Pachence, 1996). Kollagen I kann in hohen Konzentrationen in Bändern, Haut,

Faszie und Knochen nachgewiesen werden, die folglich auch eine ergiebige Quelle zur Isolierung dieses natürlichen Polymers darstellen.

Die Struktur, Funktion und Synthese von Kollagen I wurden eingehend untersucht und beschrieben (Piez, 1984; Tanzer und Kimura, 1988). Kollagenöse Proteine sind durch eine spezifische Triple-Helix-Struktur charakterisiert. Die drei Peptid-Untereinheiten, die die kollagenöse Triple-Helix bilden, weisen eine ähnliche Aminosäuresequenz auf. Wegen seiner phylogenetisch konservierten Primärsequenz und seiner helikalen Struktur ist Kollagen nur sehr wenig immunreaktiv (De Lusto et al., 1987). Die individuellen Kollagen Moleküle polymerisieren in vitro spontan zu stabilen Fasern, die dann zu größeren, organisierten Strukturen geformt werden können (Piez et al, 1984). Kollagen kann so verändert werden, dass es intra- und intermolekulare cross-links ausbildet, die die Bildung von kollagenen Fasern, Fibrillen und auch makroskopisch sichtbaren Faserbündel, die dann zur Formierung von Geweben herangezogen werden können, begünstigen (Nimni und Harkness, 1988). Diese Erhöhung der Festigkeit via in vivo cross-linking wird in den Kollagen-Fasern durch verschiedene enzymatische (Lysyl-Oxidase) und nichtenzymatische Reaktionen hervorgerufen. In vitro kann dies durch eine Vielzahl verschiedener, physikalischer und chemischer Techniken (Pachence et al., 1987) erreicht werden. Eine verstärkte intermolekulare Quervernetzung erhöht die Dauer der Biodegradation, sie verringert die Kapazität des Kollagens, Wasser zu absorbieren, vermindert die Löslichkeit des Kollagens und erhöht die Festigkeit der kollagenen Fasern. Diese relativ einfachen chemischen Veränderungen ermöglichen die Prozessierung von Kollagen auf verschiedenste Art und Weise und bieten ein breites Spektrum an Anwendungen im Bereich des Tissue Engineering.

Es ist bekannt, dass sog. „substrate attachment sites“ für Wachstum, Differenzierung, Replikation und metabolische Aktivität für die meisten Zelltypen sehr wichtig sind. Kollagen und seine integrinbindenden Domänen fördern das Wachstum und Überleben solch adhäsiver Zelltypen in Kultur. So scheinen zum Beispiel Fibroblasten, die auf Kollagen-Matrices kultiviert wurden, auf ähnliche Weise zu differenzieren und weisen fast identische

metabolische Aktivität und Morphologie auf wie in vivo (Silver und Pins, 1992). Ebenso behalten Chondrozyten ihren Phänotyp und ihre zelluläre Aktivität bei, wenn sie auf Kollagen kultiviert werden (Toolan et al., 1996). Verschiedene Studien haben gezeigt, dass Kollagen I die phänotypische Expression von Knochenzellen beeinflusst (Owen et al., 1990; Masi et al., 2000). Wiesmann et al. (2003) untersuchten die Proliferation, Migration und Differenzierung periostaler Kälberzellen in 3D-Kollagen-Gelen und konnte die Synthetisierung knochenähnlicher, extrazellulärer Matrix nachweisen. Harris et al. (2004) konnten bei der Rekonstruktion von Sehnen im Kaninchen-Modell mit MSZ-Kollagen Konstrukten ektope Knochenneubildung in den rekonstruierten Sehnen feststellen, konnten allerdings nicht zwischen systemischen und gelinduzierten Effekten differenzieren. In einer Studie aus dem Jahre 2005 konnten Yoneno et al. zeigen, dass MSZ in dreidimensionalen Kollagen Gel Kulturen bei Kultivierung über 20 Tage mit chondrogenem Differenzierungsmedium, ein Zuwachs an interzellulären Glykosaminoglykanen, eine intensivere Toluidin Blau Anfärbung und auf mRNA-Ebene eine Mehrexpression chondrogener Marker (Col II und X) zu verzeichnen war. Nach Kultivierung der Gele für 14 Tage mit osteogenem Differenzierungsmedium konnte ein positiver Nachweis für ALP geführt werden, es ergab sich ein positiver Farbnachweis in der Alizarin Rot Färbung als Hinweis auf synthetisierte, calciumhaltige, extrazelluläre Matrix und es konnte eine Mehrexpression für Col I, BSP und ALP in der RT-PCR Analyse nachgewiesen werden.

Eines der Hauptprobleme bei der Verwendung von Kollagen Gelen stellt die Kontraktion des Gels dar. Diese hängt überwiegend von der Zelldichte, Zellproliferation im Gel, Serum- und Kollagenkonzentration, Anzahl und Länge der Kollagenfasern sowie der verwendeten Wachstumsfaktoren ab (Steinberg et al., 1980; Lewus et al., 2005; Yokoyama et al., 2005). Es konnte gezeigt werden, dass eine Serumkonzentration von 10% zu einer Kontraktion des Gels bis zu 50% seiner ursprünglichen Größe führen kann (Lewus et al., 2005). Die Kontraktion des Gels könnte verringert werden durch die Verwendung kürzerer Kollagenfasern, was zudem zu einer höheren Permeabilität des Gels führen würde ohne die Zellviabilität zu beeinträchtigen. Zudem könnte das oben

aufgeführte cross-linking zu einer besseren mechanischen Stabilität des Gels führen und so der durch die MSZ bedingten Kontraktilität entgegenwirken (Mehra et al., 2006).

Die Reparatur oder Wiederherstellung der Funktion von traumatisiertem, beschädigtem oder schwindendem Knochen stellt eine bedeutende, klinische Notwendigkeit dar, wobei das Tissue Engineering sich zunehmend als Alternative zur autologen Knochentransplantaten präsentiert. Eine Vielzahl von Studien hat sich mit dem Einsatz von MSZ zu Zwecken der Knochenregeneration in vitro und in vivo auseinandergesetzt (Arinze et al., 2003; Bruder et al., 1998; Derubeis und Cancedda, 2004). Ein ideales Scaffold allerdings, um die Zellen in entsprechende Defekte einzubringen, konnte bisher nicht entwickelt werden, da Degradationsrate, Mikrostruktur und Stabilität bisher verfügbarer Scaffolds den hohen Anforderungen zur Knochenregeneration nicht gerecht wurden (Hutmacher, 2000).

Eine multidisziplinäre Arbeitsgruppe um Prof. Hutmacher an der National University of Singapore hat ein neuartiges Scaffold entwickelt und via Fused Deposition Modelling (FDM) hergestellt (Schantz et al., 2003). Die FDM-Technologie bietet die Möglichkeit, exakt reproduzierbare, bioresorbierbare, dreidimensionale Scaffolds zu entwerfen und herzustellen, die sich durch ein voll interkonnektiertes, hochporöses Netzwerk und mechanische Eigenschaften auszeichnen, die denen nativen Knochens sehr ähnlich sind (Hutmacher et al., 2001). Polycaprolactone (PCL) Scaffolds verschiedener Größe und Form wurden bereits in Kombination mit Osteoblasten und Vorläuferzellen in verschiedenen kleineren (Schantz et al., 2002) und großen (Rohner et al., 2003) Tissue Engineering Tiermodellstudien zur Knochenrekonstruktion untersucht. Zudem konnte PCL erfolgreich als Matrix in der kranziofazialen, plastischen Chirurgie eingesetzt werden (Corden et al., 2000; Schantz et al., 2003). Diese Studien zeigten, dass PCL die Zelladhäsion wie auch die Proliferation von Knochenzellen fördert (Schantz et al., 2005). Rai et al. (2004) gelang es, wichtige Parameter für die Herstellung der sog. 2. Generation von PCL-Scaffolds zur Knochenregeneration zu erheben, Scaffolds, die auf der

Kombination von PCL/Trikalziumphosphat (TCP) und PCL/Hydroxylapatit (HA) basieren. Diese Scaffolds zeichnen sich vor allem durch noch bessere mechanische Eigenschaften aus mit knochenähnlicher HA-bedingter Steifigkeit bei besserer Plastizität sowie TCP-bedingte, osteoinduktiver und osteokonduktiver Wirkung (Rizzi et al., 2001).

4.2 Osteogene Differenzierung in Monolayerkultur

Die osteogene Differenzierung von kultivierten, humanen MSZ aus dem Knochenmark in Monolayerkultur wurde bereits vielfach charakterisiert (Caplan, 1994; Pittenger et al., 1999). In der vorliegenden Arbeit konnte bestätigt werden, dass in Monolayerkultur unter dem Einfluss von Dexamethason, β -Glycerophosphat und Ascorbat sowie Zusatz von 10% FBS die isolierten, subkonfluenten MSZ Aggregate formen und ihre ALP Expression steigern. Ebenfalls konnte eine Akkumulation von Kalzium in der Alizarin Rot Färbung nachgewiesen werden. Die RT-PCR Analyse für die osteogenen Markergene zeigte eine deutliche Mehrexpression von OP und OC, einem späten Marker osteogener Differenzierung. Auch das osteogene, integrinbindende Matrixprotein BSP sowie der osteogene Transkriptionsfaktor Cbfa1 war in der osteogen differenzierten Versuchsgruppe deutlich stärker exprimiert als in der Kontrolle.

Die Osteogenese ist ein Prozess, der eng mit Funktionen der extrazellulären Matrix (EZM) verbunden ist. Die Knochenentwicklung, Seneszenz und das Remodelling sind, sowohl was die dreidimensionale Struktur als auch die chemische Zusammensetzung betrifft, mit komplizierten Signaltransduktionswegen, verknüpft. Es konnte gezeigt werden, dass bei der Evaluation von Prozessen der Osteogenese konventionelle Zellkultursysteme Limitierungen haben (Sorkin et al., 2004). Zellen, die in konventionellen Zellkulturschalen aus Kunststoff kultiviert werden, werden in einer zweidimensionalen Monolayer expandiert, was in andersartigen Zell-Zell Interaktionen, abweichender Zellkonfiguration, Proliferation und Inhibitionsmechanismen resultiert (Gabbay et al., 2006). Es wird vermutet, dass

dreidimensionale Zellkulturansätze den in vivo vorherrschenden Bedingungen für Zellen, die eine osteogene Differenzierung erfahren, viel eher entsprechen.

4.3 Osteogene Differenzierung in Kollagen Hydrogelen

Die Differenzierung im dreidimensionalen Raum weist einige Unterschiede in der Expression von Genen auf, die normalerweise in der frühen Phase (Col I, ALP) oder späten Phase (OC) der Reifung bei Zellen in zweidimensionalen Kulturen auftritt (Stein et al., 1997). Es konnte gezeigt werden, dass MSZ dazu in der Lage sind im dreidimensionalen Raum speziell auch in Kollagen Gelen in vitro zu proliferieren, zu migrieren und zu differenzieren (Wiesmann et al., 2003; Taira et al., 2003). Die durchgeführten Untersuchungen bestätigten, dass unter dem Einfluss von Dexamethason, Ascorbat und β -Glycerophosphat in einem Kollagen I Hydrogel MSZ phänotypisch osteoblastenähnliche Eigenschaften aufweisen und das Markerprotein OC synthetisieren, ein spezifisches Merkmal funktioneller Osteoblasten.

BMPs gehören zur Superfamilie der Transforming Growth Factors β (TGF β) (Luu et al., 2007). Sie wurden identifiziert als Proteine, die sowohl die Knochen- als auch die Knorpelbildung im Körper stimulieren (Wozney et al., 1988) und fungieren als multifunktionale Regulatoren der Proliferation und Differenzierung während der Entwicklung (Hogan, 1996). BMPs initiieren ihre Signalkaskade über die Bindung an einen dimeren Komplex bestehend aus zwei transmembranen Serin-Threonin Kinase Rezeptoren. Der aktivierte Rezeptor phosphoryliert anschließend Transkriptionsfaktoren, Smads, die ihrerseits zusammen mit Co-Aktivatoren, die Expression von Zielgenen aktiviert (Ten Dijke et al., 2002). In einer Vielzahl verschiedener Studien konnte BMP-2 in vivo und in vitro eine osteoinduktive Wirkung zugeschrieben werden (Chang et al., 2003; Nöth et al., 2003).

In high-density Pellet Kulturen von humanen MSZ oder Chondrozyten konnte eine chondrogene Wirkung von BMP-2, resultierend in einer Col II und AGN Mehrexpression, nachgewiesen werden (Grunder et al., 2004; Sekiya et al., 2005). In der vorliegenden Arbeit zeigten in Kollagen Hydrogelen kultivierte MSZ unter dem Einfluss von 30 ng/ml BMP-2 eine rundliche,

chondrozytenähnliche Morphologie mit perizellulären Lakunen, bei positivem Nachweis sulfatierter Proteoglykane. Die RT-PCR Analyse erbrachte vornehmlich eine Expression chondrogener Markergene. Dieses Ergebnis bestätigt aktuelle Untersuchungen von Nöth et al., 2007, die eine schwache chondrogene Differenzierung von MSZ in Kollagen Hydrogelen unter dem Einfluss von BMP-2 ab Tag 10 nachweisen konnten. Ein Teil der MSZ allerdings schien dennoch zu einer osteogenen Differenzierung angeregt worden zu sein, erkennbar an der wesentlich schwächer ausgeprägten Expression osteogener Marker.

In der Kontrollgruppe, die in Standardmedium mit 10% FBS kultiviert wurde, zeigten die MSZ im Kollagen Hydrogel nach 42 Tagen interessanterweise ebenfalls eine rundliche, chondrozytenähnliche Morphologie. In der Alzian Blau Färbung konnten zudem sulfatierte Proteoglykane nachgewiesen werden bei Expression von chondrogenen Markergenen in der RT-PCR Analyse. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen von Nöth (Nöth et al., 2007). Dies könnte zum einen auf die Eigenschaften des Kollagen Hydrogels zurückzuführen sein, dem aufgrund seiner Zusammensetzung und biologisch-induktiven Merkmale eine eher chondrogene Wirkung zugeschrieben wird. Zum anderen könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass ein Teil der MSZ zur spontanen Differenzierung in Standardmedium fähig ist. Diese Beobachtungen wären vor allem im Bereich der autologen Chondrozytentransplantation von großer klinischer Bedeutung.

4.4 Konstruktherstellung

Caplan und Kollegen gehörten zu den ersten, die das Potential von MSZ im Bereich des Tissue Engineering Knochen studierten, indem sie ein Scaffold mit humanen MSZ kombinierten (Haynesworth et al., 1992; Dennis et al., 1992). Eine Reihe von Gruppen folgte, die ausschließlich synthetische Polymere, natürlich vorkommende Polymere oder Keramiken verwendeten. Die erste Generation von Scaffolds illustrierte das Potential osteogener Scaffold/Zell Konstrukte zu kultivieren. Gleichzeitig aber wurde deutlich, dass die Scaffolds bezüglich ihrer Materialzusammensetzung weiter der Verbesserung bedurften.

Die osteokonduktive Eigenschaften von Kalziumphosphat hatte Wissenschaftler dazu veranlasst, Polymer/Keramik Mischungen und keramikbeschichtete Polymer Matrices für die Anwendung im Bereich der Knochenrekonstruktion zu entwickeln. HA/PLA Mischungen wurden durch Einschmelzen und Heiss/Kalt Pressen (Zhang et al., 1999; Li et al., 2002), Flüssiggussverfahren (Ramay und Zhang, 2003) und in situ Polymerisation (Zheng et al., 2001; Ma et al., 2001) zu schwammähnlichen Scaffolds verarbeitet. Ihre genaue Untersuchung ergab, dass diese Polymer-Scaffolds Zellwachstum nur an der Oberfläche der Matrix förderten, die Zellen hingegen bei Verwendung der Verbundwerkstoffe in der gesamten Architektur des Scaffolds adhärten. Marra und Kollegen (Marra et al., 1999) untersuchten schwammähnliche Scaffolds aus PCL, PGLA und PCL/HA sowie PGLA/HA die via NaCl Partikel Leaching hergestellt worden waren. Es konnte eine dichte Zellbesiedelung auf der Außenseite aller Scaffold Variationen festgestellt werden, allerdings nur ein limitiertes Einwachsen und geringe Kollagen Bildung innerhalb des 1 mm dicken HA/Polymer Scaffolds. Zurückzuführen ist das geringere Einwachsen der Zellen sowie die schwächer ausgeprägte Zelladhäsion auf die geringere Interkonnektivität und Porengröße bei der Verwendung von Solvent Leaching Techniken.

Die meisten konventionellen Polymer Prozessierungstechniken haben den Nachteil, dass die beigemengte Keramik dazu tendiert, durch eine dünne Haut aus Polymer an der Matrixoberfläche von direkten Zellkontakten separiert zu sein. Solche Scaffolds zeigen generell eine geringe Zellbindung an die Polymermatrix, was in insuffizienten mechanischen Eigenschaften resultiert (Schantz et al., 2005). Desweiteren erlauben die traditionellen Herstellungsverfahren keine schichtweise Scaffold Fabrikation, um Design und Funktion der Materialien in einem Scaffold nach Anforderung variieren und anpassen zu können. Im Gegensatz dazu bieten direkte/indirekte SFF (Sold Free Form) Verfahren die Möglichkeit, die innere Architektur biomimetischer Strukturen von unterschiedlichem Design und Materialzusammensetzung zu konzipieren, um die dreidimensionale Porenstruktur, Interkonnektivität, Verzweigung, Geometrie, Durchmesser und Ausrichtung so passgerecht festzulegen. Generell bieten diese Techniken mehr Kontrolle über die

physikalischen und chemischen Eigenschaften eines Scaffolds sowie über die Bioaktivität und Degradationskinetik (Hollister et al., 2002). Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher ein via FDM hergestelltes PCL Scaffold der ersten Generation verwendet.

Durch Kombination des PCL mit Kalziumphosphat (CaP) könnte eine höhere Hydrophilie und drei- bis vierfach schnellere Degradationskinetik erreicht werden als die von PCL alleine (Schantz et al., 2005). Auch Ural und Kollegen (Ural et al., 2000) fanden in Studien mit PCL/PDLA und PCL/PDLA/CaP Scaffolds heraus, dass die CaP Komponente zu einer schnelleren Degradation führt. Diese Ergebnisse wurden von Marra et al. (1999) bestätigt. Eine Arbeitsgruppe um Rizzi (Rizzi et al., 2001) zeigte in Studien mit einfachen PLA/HA und PCL/HA Scaffolds, dass die Zellen dazu tendieren zwischen oberflächenexponierten HA-Partikeln zu adhären und diese zu überbrücken. Zudem führte die Anwesenheit von HA zu einer erhöhten Zellaktivität. Es wurde daraus abgeleitet, dass HA ein geeignetes Mittel darstellen würde, um die Zelldichte an Materialoberflächen zu kontrollieren. Es ist allerdings schwierig, diese in zweidimensionalen Kulturen gewonnenen Erkenntnisse auf dreidimensionale Modelle in Scaffolds zu extrapolieren.

Für Scaffolds mit einem geringeren Volumen/Oberflächen Verhältnis, wie textile Materialien (Rotter et al., 1998; Freed et al., 1994) oder FDM Scaffolds mit wabenförmiger oder kanalförmiger Architektur, wie in der vorliegenden Arbeit, ergeben sich andere Probleme. Aus physikalischer Sicht verringert die geringe Oberfläche, die für die Zelladhäsion zur Verfügung steht, die Effektivität der Zellbesiedelung mit konventionellen Pippetiermethoden (Schantz et al., 2005). Eine Möglichkeit dieses Problem zu lösen ist die Verwendung einer Gel Matrix, die die Zellen im Intersitium des Scaffolds zurückhält. Viele Arbeitsgruppen haben Methoden entwickelt, um die Zellen in Scaffolds anzusiedeln, hierbei fanden vor allem Fibrinkleber (Isogai et al., 2000), Alginate (Chang et al., 2003) und Agarose (Rotter et al., 1998) Verwendung. Aufgrund seiner geringen Antigenität, einer relativ langen Polymerisationszeit von 30 min. und großer Verfügbarkeit bei geringen Kosten, wurde in der vorliegenden Arbeit ein Kollagen Gel verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass MSZ effektiv in das

Gel bzw. durch das Gel migrieren. Das Hydrogel erlaubt den Zellen zu proliferieren ohne die Proliferation oder Zellstruktur zu beeinträchtigen und unterstützt die Zelladhäsion an die rigide Polymerstruktur in der Initialphase. Zudem werden Kollagen I Eigenschaften zugeschrieben, die die osteogene Zelldifferenzierung positiv beeinflussen. Daher stellt das Kollagen I Hydrogel ein geeignetes Mittel dar, um Zellen in ein dreidimensionales Scaffold einzubringen. Es ließ sich ein gutes Bonding an der Grenzfläche zwischen Kollagen Gel und PCL-Scaffold nachweisen. Trotz kontraktischer Vorgänge innerhalb des Gels war es zu keiner Ablösung des Gels vom Scaffold gekommen. Das Kollagen Gel war in alle Bereiche des Scaffolds eingedrungen und hatte die makroporösen und mikroporösen Freiräume des Scaffolds komplett ausgefüllt, wodurch eine homogene Verteilung der MSZ innerhalb des Scaffolds erreicht werden konnte. Die Zellen im Konstrukt waren von länglicher, spindelförmiger, fibroblastärer Morphologie.

Im Rahmen fortführender Studien, soll die Anwendung des stammzellbasierte Kollagen-PCL Konstrukts im Ulnadefektmodell in Kaninchen getestet werden. Es werden sich radiologische Untersuchungen, histochemische und immunhistochemische Aanalysen und mechanische Testungen anschließen. Des Weiteren wird Kombination des Konstrukts mit unterschiedlichen Wachstumsfaktoren wie zum Beispiel BMP-2 oder hCyr61 erfolgen.

5. Zusammenfassung

Segmentale Knochendefekte, stellen ein bedeutendes, klinisches Problem mit bisher limitierten, therapeutischen Möglichkeiten dar. Sie schränken nicht nur die Gesundheit und Lebensqualität des Betroffenen ein sondern bringen bei steigender Inzidenz und kostenintensiver Behandlung auch eine gewaltige sozioökonomische Problematik mit sich. Die bisher zur Verfügung stehenden, therapeutischen Mittel wie die Entnahme von autologer Spongiosa aus dem Beckenkamm bergen das Problem der Morbidität an der Entnahmestelle, von persistierender Schmerzsyndromen, von Hypersensitivität, Instabilität des Beckens und Infektionen. Zudem ist die Menge an Knochen, die gewonnen werden kann, limitiert. Allografts sind von einer bedeutend niedrigeren Zellularität, besitzen eine geringere Revaskularisierungsrate sowie eine höhere Resorptionsrate, führen zu einer niedrigeren Knochenformationsrate und gehen mit der Gefahr einer Abstoßungsreaktion einher. Zukünftig könnte das Tissue Engineering als interdisziplinäres Forschungskonzept hier eine entscheidende Rolle spielen. Insbesondere MSZ wird ein großes therapeutisches Potential für die Rekonstruktion von Knochengewebe zugeschrieben.

Die vorliegende Studie beschäftigte sich einerseits mit der Frage, ob unter dem Einfluss entsprechender Wachstumsfaktoren humane MSZ aus dem Knochenmark in Kollagen I Hydrogelen zu einer osteogenen Differenzierung und der Produktion mineralisierter, extrazellulärer Matrix angeregt werden können. Zum andern wurde untersucht, ob es möglich ist, ein Konstrukt aus MSZ, einem Kollagen Gel und einem geeigneten Scaffold herzustellen, das sich zur Rekonstruktion segmentaler Knochendefekte eignet.

Zunächst wurden MSZ aus dem Knochenmark isoliert und in Monolayerkulturen osteogen differenziert. Die histochemischen Untersuchungen zeigten, dass in osteogenem Differenzierungsmedium kultivierte MSZ in der primären Zellkultur vermehrt mineralisierte Matrix bildeten und ALP exprimierten. In den RT-PCR Analysen konnte eine deutliche Mehrexpression später osteogener Markergene wie Osteokalzin nachgewiesen werden. MSZ, die leicht zu isolieren und zu

kultivieren sind, eignen sich demnach gut als Zellen zur Herstellung eines Konstruktes für die Rekonstruktion von segmentalen Knochendefekten.

Eingebracht in Kollagen I Hydrogele zeigten die Zellen unter dem Einfluss verschiedener osteogener Differenzierungsbedingungen unterschiedliche Genexpressionsmuster. Nach 42 Tagen Kultur in SZM (Kontrollgruppe) konnte sowohl die Expression osteogener Markergene als auch eine chondrogene Differenzierung nachgewiesen werden. Es konnte eine deutliche Mehrexpression von AGN, Col II und SOX-9, gleichfalls der osteogenen Marker ALP und Cbfa1 gezeigt werden. Ein entsprechendes Bild hatte auch die histologische Aufarbeitung ergeben. Dies könnte auf die Eigenschaften des Kollagen Hydrogels zurückzuführen sein, dem aufgrund seiner Zusammensetzung und biologisch-induktiven Merkmale eine chondrogene Induktion, sogar ohne Wachstumsfaktoren, zugeschrieben wird. In der mit BMP-2 differenzierten Gruppe zeigte sich eine deutliche Zunahme der Expression der chondrogenen Markergene, wie Col II und SOX-9. Auch die osteogenen Marker wie ALP, Cbfa1 und OC waren etwas stärker exprimiert. Den Ergebnissen nach zu schließen begünstigte BMP-2 bei der Kultivierung von MSZ in Kollagen I Hydrogelen in vitro eine eher chondrogene Differenzierung. Zumindest in Kombination mit Kollagen I Hydrogelen scheint daher BMP-2 als osteogener Wachstumsfaktor bei der Herstellung stammzellbasierter Konstrukte für den Knochenersatz weniger geeignet. Nach Kultur in osteogenem Medium konnte gegenüber der SZM Gruppe eine deutliche Mehrexpression aller getesteten, osteogenen Marker, insbesondere auch von Cbfa1 und OC, nachgewiesen werden. Allerdings zeigte sich auch bei den chondrogenen Markergenen wie Col II eine geringe Zunahme der Genexpression. Das osteogene Medium induzierte demnach MSZ in Kollagen I Gelen vorwiegend eine osteogene Differenzierung. Entsprechend konnte in den histologischen Untersuchungen die Bildung einer mineralisierten, extrazellulären Matrix nachgewiesen werden. Weiterhin konnte im Rahmen dieser Arbeit in vitro aus einem Kollagen I Gel, MSZ und einem PCL-Scaffold ein Konstrukt hergestellt werden, das die Regeneration segmentaler Knochendefekte positiv beeinflussen könnte. Es zeigte sich ein gutes Bonding an der Grenzfläche zwischen Kollagen Gel und

PCL-Scaffold. Das Kollagen Gel hatte die makroporösen und mikroporösen Freiräume des Scaffolds komplett ausgefüllt, wodurch eine homogene Verteilung der MSZ innerhalb des Scaffolds erreicht werden konnte. Versuche zur osteogenen Potenz eines solchen Konstruktes in vivo, zur möglichen Beeinflussung der osteogene Zelldifferenzierung durch das Kollagen I Hydrogel in einen chondrozytären Phänotyp sowie zur Testung biomechanischer Eigenschaften nach Einbringen in einen segmentalen Defekt sind Gegenstand derzeitiger Untersuchungen.

6. Literaturverzeichnis

Anselme K, Bacques C, Charriere G, Hartmann DJ, Herbage D, Garrone R (1990) Tissue reaction to subcutaneous implantation of a collagen sponge. A histological, ultrastructural, and immunological study. *J Biomed Mater Res* 24:689-703.

Arinze TL, Peter SJ, Archambault MP, van den Bos C, Gordon S, Kraus K (2003) Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-sized canine segmental defect. *J Bone Joint Surg* 85-A:1927-1935

Arrington ED, Smith WJ, Chambers HG, Bucknell AL, Davino NA (1996) Complications of iliac crest bone graft harvesting. *Clin Orthop Relat Res* 329:300-309

Bertone AL, et al. (2004) Adenoviral-mediated transfer of human BMP-6 gene accelerates healing in a rabbit ulnar osteotomy model. *J Orthop Res* 22:1261-1270

Bianco P, Robey PG (2000) Marrow stromal stem cells. *J Clin Invest* 105:1663-1668

Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG (2001) Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 19:180-192

Brekke JH, Toth JM (1998) Principles of Tissue Engineering Applied to Programmable Osteogenesis. *J Biomed Mater Res* 43:380-398

Brighton CT (1984) The biology of fracture repair. *The American Academy Orthopaedic Surgeons Instructional Course Lectures* 33:60-106

Brigstock DR, (2003) The CCN family: a new stimulus package. *J Endocrinol* 178:169-175

Bruder SP, Gazit D, Passi-Even L, Bab I and Caplan AI (1990) Osteochondral differentiation and the emergence of stage-specific osteogenic cell-surface molecules by bone marrow cells in diffusion chambers. *Bone Miner* 11:141-151

Bruder SP, Kraus KH, Goldberg VM, Kadiyala S (1998) The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *J Bone Joint Surg* 80-A:985-996

Byrom D (1991) Chitosan and chitosan derivatives. In: Byrom D (Herausgeber) *Biomaterials: Novel Materials from Biological Sources*, Stockton Press, New York, pp. 333-359

Cancedda R, Mastrogiacomo M, Bianchi G, Derubeis A, Muraglia A, Quarto R (2003) Bone marrow stromal cells and their use in regenerating bone. *Novartis Found Symp* 249:133-143

Caplan AI (1991) Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 9:641-650

Caplan AI, Fink DJ, Goto T, Linton AE Young RG, Wakitani S, Goldberg VM, Haynesworth SE (1993) Mesenchymal stem cells and tissue repair. In: Jackson DW (Herausgeber) *The Anterior Cruciate Ligament: Current and Future Concepts*, Raven Press N. Y., pp. 405-417

Caplan AI (1994) The mesenchymal process. *Clin. Plast. Surg.* 21:429-435

Chang SC, Tobias G, Roy AK, Vacanti CA, Bonassar LJ (2003) Tissue engineering of autologous cartilage for craniofacial reconstruction by injection molding. *Plast Reconstr Surg* 112:793-799

Corden TJ, Jones IA, Rudd C, Christian P, Downes S, McDougall KE (2000) Physical and biocompatibility properties of poly-epsilon-caprolactone produced using in situ polymerisation: a novel manufacturing technique for long-fibre composite materials. *Biomaterials* 21:713-724

Coventry MB, Trapper EM (1972) Pelvic instability: A consequence of removing iliac bone for grafting. *J Bone Joint Surg Am* 54:83-101

Damien CJ, Parsons JR (1991) Bone graft and bone graft substitutes: A review of current technology and applications. *J Appl Biomaterials* 2:187-208

De Bari C, Dell'Accaio F, Tylzanowski P, Luyten FP (2001) Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis & Rheumatism* 44:1928-1942

Dell PC, Burchardt H, Glowczewskie FP Jr (1985) A roentgenographic, biomechanical, and histological evaluation of vascularized and non-vascularized segmental fibular canine autografts. *J Bone Joint Surg Am* 67:105-112

De Lusto F, Condell RA, Nguyen MA, McPherson JM (1987) A comparative study of the biologic and immunologic response to medical devices derived from dermal collagen. *J Biomed Mater Res* 20:109-120

Dennis LW (1992) Tissue-cultured skin grafts. *J Burn Care Rehabil* 13:93-94

Derubeis AR, Cancedda R (2004) Bone marrow stromal cells (BMSCs) in bone engineering: limitations and recent advances. *Ann Biomed Eng* 32:160-165

Doi Y, Kanesawa Y, Kunioka M, Saito T (1990) Biodegradation of microbial copolyesters. *Macromolecules* 23:26-31

East GC, McIntyre JE, Qin Y (1989) Medical use of chitosan. In: Skjak-Braek G (Herausgeber) *Chitin and Chitosan*, Elsevier, London, pp. 757-764

Elsdale T, Bard J (1972) Collagen substrata for studies on cell behaviour. *J Cell Biol* 54:626-637

Freed LE, Vunjak-Novakovic G, Biron RJ, Eagles DB, Lesnoy DC, Varlow SK, Langer R (1994) Biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering. *Biotechnology* 12:689-693

Friedenstein AJ (1976) Precursor cells of mechanocytes. *Int Rev Cytol* 47:327-355

Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP (1968) Heterotropic transplants of bone marrow: analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 6:230-247

Gabbay JS, Heller JB, Mitchell SA, Zuk PA, Spoon DB, Wasson KL, Jarrahy R, Benhaim P, Bradley JP (2006) Osteogenic Potentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells in a 3-Dimensional Matrix. *Ann Plast Surg* 57:89-93

Gerber T, Knoblich B, Traykova T, Holzhüter G, Dörfling P, Henkle KO, Bienengräber V (2001) Entwicklung, in vitro und in vivo Tests eines hochporösen Knochenersatzmaterials. *Osteologie* 10:175-183

Greisler HP, Ellinger J, Schwarcz TH, Golan J, Raymond RM Kim DU (1987) Arterial regeneration over polydioxanone prostheses in the rabbit. *Arch Surg* 122:715-721

Grillo H, Gross J (1962) Thermal reconstitution of collagen from solution and the response to its heterologous implantation. *J Surg Res* 11:69-82

Grunder T, Gassmaier C, Fritz J, Stoop R, Hortschansky P, Mollenhauer J, Aicher WK (2004) Bone morphogenetic protein (BMP)-2 enhances the expression of type II collagen and aggrecan in chondrocytes embedded in alginate beads. *Osteoarthritis Cartilage* 12:559-567

Hamm AW (1930) A histological study of the early phase of bone repair. *J Bone Jt Surg* 12-A:827-844

Harris MT, Butler DL, Boivin GP, Florer JB, Schantz EJ, Wenstrup RJ (2004) Mesenchymal stem cells used for rabbit tendon repair can form ectopic bone and express alkaline phosphatase activity in constructs. *J Orthop Res* 22:998-1003

Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI (1992) Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone* 13, 81-88

Helmus MN, Hubbell JA (1993) Materials selection. *Kardiovas Pathol* 2(3):53-71

Hirano S (1989) Chitosan wound dressings. In: Skjak-Braek G (Herausgeber) *Chitin and Chitosan*, Elsevier, London, pp. 1-835

Hogan BL (1996) Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev* 10:1580-1594

Hollister SJ, Maddox RD, Taboas JM (2002) Optimal design and fabrication of scaffolds to mimic tissue properties and satisfy biological constraints. *Biomaterials* 20:4095-4103

Holzman S, Connolly RJ, Schwaitzberg SD (1994) Effect of hyaluronic acid solution on healing of bowel anastomoses. *J Invest Surg* 7:431-437

Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Gordon PL, Neel M, Sussman M, Orchard P, Marx JC, Pyeritz RE, Brenner MK. (1999) Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med* 5:309-313

Huard J, Li Y, Peng H, Fu FH (2003) Gene therapy and tissue engineering for sports medicine. *J Gene Med* 5:93-108

Hubbel JA (1995) Biomaterials in tissue engineering. *Bio Technology* 13:565-576

Hutmacher DW (2000) Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* 21:2529-2543

Hutmacher DW, Zein I, Teoh SH, Ng KW, Schantz, JT, Leahy JC (2000) Design and fabrication of a 3D scaffold for tissue engineering bone. In: Agrawal CM, Parr, JE, Lin, ST (Herausgeber) *Synthetic bioabsorbable polymers for implants*, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, pp. 152-167

Ignatius A, Blessing H, Liedert A, Kaspar D, Kreja L, Friemert B, Claes L (2004) Effekte mechanischer Reize auf humane osteoblastäre Zellen in einer dreidimensionalen Kollagen-Typ-I-Matrix. *Orthopäde* 33:1386-1392

Isogai N, Landis WJ, Mori R, Gotoh Y, Gerstenfeld C, Upton J Vacanti JP (2000) Experimental use of fibrin glue to induce site-directed osteogenesis from cultured periosteal cells. *Plast Reconstr Surg* 105:953-963

Jürgens C, Wolter D, Queitsch C, Schultz JH (1994) Treatment concepts and results in non-infected post-traumatic pseudarthroses of the femur and tibia. *Zentralbl Chir* 119:706-713

Krebsbach PH, Kuznetsov SA, Satomura K, Emmons RV, Rowe DW, et al. (1997) Bone formation in vivo: Comparison of osteogenesis by transplanted mouse and human marrow stromal fibroblasts. *Transplantation* 63:1059-1069

Kruyt MC, Dhert WJ, Yuan H, Wilson CE, van Blitterswijk CA, Verbout AJ, de Bruijn JD (2004) Bone tissue engineering in a critical size defect compared to ectopic implantations in the goat. *J Orthop Res* 22:544-551

Lane JM, Tomin E, Bostrom MP (1999) Biosynthetic bone grafting. *Clin Orthop Relat Res* 367:S107-117

Laurencin CT, Ambrosio AMA, Borden MD, Cooper JA Jr. (1999) Tissue engineering: Orthopedic applications. *Annu Rev Biomed Eng* 1:19-46

Lechner A, Schütze N, Siggelkow H, Seufert J, Jakob F (2000) The immediate early gene product hCYR61 localizes to the secretory pathway in human osteoblasts. *Bone* 27:53-60

Lewus KE, Nauman EA (2005) In vitro characterization of a bone marrow stem cell-seeded collagen gel composite for soft tissue grafts: Effects of fiber number and serum concentration. *Tissue Eng* 11:1015-1022

Li SH, De Wijn JR, Layrolle P, De Groot K (2002) Synthesis of macroporous hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res* 61:109-20

Luu HH, Song WX, Luo X, Manning D, Luo J, Deng ZL, Sharff, KA, Montag AG, Haydon RC, He TC (2007) Distinct roles of bone morphogenetic proteins in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 25:665-667

Ma PX, Zhang R, Xiao G, Franceschi R (2002) Engineering new bone tissue in vitro on highly porous poly(alpha-hydroxyl acids)/hydroxyapatite composite scaffolds. *J Biomed Mater Res* 54:284-293

Mäkelä EA, Vainionpää S, Vihtonen K, Mero M, Helevirta P, Törmälä P, Rokkanen P (1989) The effect of a penetrating biodegradable implant on the growth plate. *Clin Orthop Relat Res* 241:300-308

Mankani MH, Krebsbach PH, Satomura K (2001) Predicted bone flap formation using transplanted bone marrow stromal cells. *Arch Surg* 136:263-270

Marler JJ, Upton J, Langer R, Vacanti JP (1998) Transplantation of cells in matrices for tissue regeneration. *Advanced Drug Delivery Reviews* 33:165-182

Marra KG, Szem JW, Kumta PN, DiMilla PA, Weiss LE (1999) In vitro analysis of biodegradable polymer blend/hydroxyapatite composites for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res* 47:324-35

Masi L, Malentacchi C, Benvenuti S, Amedei A, Bigozzi U, Montali E, Brandi ML (2000) In vitro expression of proalpha1(I) collagen mRNA by human pre-osteoclastic cells. *J Endocrinol Invest* 23:1-4.

Mbalaviele G, Sheikh S, Stains JP, Salazar VS, Cheng SL, Chen D, Civitelli R (2005) Beta-Catenin and BMP-2 synergize to promote osteoblast differentiation and new bone formation. *J Cell Biochem* 94:403-18

Medvinsky A, Smith A (2003) Stem cells: fusion brings down barriers. *Nature* 422:823-825

Mehra TD, Gosh K, Shu XZ, Prestwich GD, Clark RAF (2006) Molecular stenting with a crslinked hyaluronan derivative inhibits collagen gel contraction. *J Invest Dermatol* 126:2202-2209

Meijer GJ, de Bruijn JD, Koole R, van Blitterswijk CA (2007) Cell-Based Bone Tissue Engineering. *PLoS Med.* 4:e9

Minas T, Nehrer S (1997) Current concepts in the treatment of articular cartilage defects. *Orthopaedics* 20:525-538

Nimni ME und Harkness RD (1988) Molecular structure and functions of collagen. In: Nimni ME (Herausgeber) *Collagen*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 10-48

Nöth U, Osyczka AM, Tuli R, Hickok NJ, Danielson KG, Tuan RS (2002) Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. *J Orthop Res* 20:1060-1069

Nöth U, Tuli R, Asoyczka AM, Danielson KG, Tuan RS (2002) In vitro engineered cartilage constructs produced by press-coating biodegradable polymer with human mesenchymal stem cells. *Tissue Engineering* 8:131-144

Nöth U, Tuli R, Seghatoleslami R, Howard M, Shah A, Hall DJ, Hickok NJ, Tuan RS (2003) Activation of p38 and Smads mediates BMP-2 effects on human trabecular bone-derived osteoblasts. *Exp Cell Res* 291:201-11

Nöth U, Rackwitz L, Heymer A, Weber M, Baumann B, Steinert A, Schütze N, Jakob F, Eulert J (2007) Chondrogenic differentiation of human mesenchymale stem cells in collagen type I hydrogels (in press)

Owen TA, Bortell R, Yocum SA, Smock SL, Zhang M, Abate C, Shalhoub V, Aronin N, Wright KL, van Wijnen AJ (1990) Free in PMC Coordinate occupancy of AP-1 sites in the vitamin D-responsive and CCAAT box elements by Fos-Jun in the osteocalcin gene: model for phenotype suppression of transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:9990-9994

Pachence JM, (1996) Collagen-Based devices for soft tissue repair. *J Appl Biomater* 33:35-40

Pachence JM, Berg RA, Silver FH (1987) Collagen: Its place in the medical device industry. *MD&DI*, pp.55

Pachence JM, Kohn J (2000) Biodegradable Polymers. In: Lanza RP, Langer R, Vacanti J (Herausgeber) *Principles of Tissue Engineering*, Academic Press, New York, pp. 263-264

Peppas NA, Langer RI (1994) New challenges in biomaterials. *Science* 263:1715-1720

Piez KA (1984) Molecular and aggregate structures of the collagens. In: In: Piez KA, Reddi AH (Herausgeber) *Extracellular Matrix Biochemistry*, Elsevier, New York, pp. 1-39

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143-147

Rai B, Teoh SH, Ho KH, Cao T, Chen F, Yacob K (2004) The effect of rhBMP-2 on canine osteoblasts seeded onto 3D bioactive polycaprolactone scaffolds. *Biomaterials* 25:5499-506

Ramay HR, Zhang M (2003) Preparation of porous hydroxyapatite scaffolds by combination of the gel-casting and polymer sponge methods. *Biomaterials* 24:3293-3302.

Ray JA, Doddi, M, Regula D, Williams JA Melveger A (1981) Polydioxanone (PDS), a novel monofilament synthetic absorbable suture. Surg, Gynecol Obstet 153:479-507

Ripamonti U, Van den Heever B, Crooks J, Tucker MM, Sampath TK, Rueger DC, Reddi AH (2000) Long-term evaluation of bone formation by osteogenic protein 1 in the baboon and relative efficacy of bone-derived bone morphogenetic proteins delivered by irradiated xenogeneic collagenous matrices. J Bone and Miner Res 15:1798-1809

Rizzi SC, Heath DJ, Coombes AG, Bock N, Textor M, Downes S (2001) Biodegradable polymer/hydroxyapatite composites: surface analysis and initial attachment of human osteoblasts. J Biomed Mater Res 15:475-486

Robey PG (2000) Stem cells near the century mark. J Clin Invest 105: 1489-91

Rohner D, Hutmacher DW, Cheng TK, Oberholzer M, Hammer B (2003) In vivo efficacy of bone marrow-coated polycaprolactone scaffolds for the reconstruction of orbital defects in the pig. J Biomed Mater Res 66-B:574-580

Rotter N, Aigner J, Naumann A, Planck H, Hammer C, Burmester G, Sittlinger M (1998) Cartilage reconstruction in head and neck surgery: comparison of resorbable polymer scaffolds for tissue engineering of human septal cartilage. J Biomed Mater Res 42(3):347-356.

Saito A, Suzuki Y, Ogata S, Ohtsuki C, Tanihara M (2005) Accelerated bone repair with the use of a synthetic BMP-2-derived peptide and bone-marrow stromal cells. J Biomed Mater Res 72-A:77-82

Sampath TK, Coughlin JE, Whetstone RM, Banach D, Corbett C, Ridge RJ, Ozkaynak E, Oppermann H, Rueger DC (1990) Bovine osteogenic protein is composed of dimers of OP-1 and BMP-2A, two members of the transforming growth factor- β family. *J Biol Chem* 265:13198-13205

Sandford PA (1989) Chitosan Chemistry. In: Skjak-Braek G, Anthonsen T, Sandford P (Herausgeber) Chitin and Chitosan, Elsevier, London, pp. 51-69

Schantz JT, Hutmacher DW, Chim H, Ng KW, Lim TC, Teoh SH (2002) Induction of ectopic bone formation by using human periosteal cells in combination with a novel scaffold technology. *Cell Transplantation* 11:125-138

Schantz JT, Ng ML, Netto P, Chong LM, Wong KM, Hutmacher DW, et al. (2002) Application of an X-ray microscopy technique to evaluate tissue-engineered bone-scaffold constructs. *Mat Sci Eng* 20:9-17

Schantz JT, Hutmacher DW, Lam CXF, Brinkmann M, Wong KM, Lim TC, Chou N, Guldborg RE, Teoh SH (2003) Repair of calvarial defects with customized tissue-engineered bone grafts II. Evaluation of cellular efficiency and efficacy in vivo. *Tissue Eng* 9:127-39

Schantz, JT, Brandwood A, Hutmacher DW, Khor HL, Bittner K (2005) Osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells in computer designed fibrin-polymer-ceramic scaffolds manufactured by fused deposition modelling. *J Mat Sci Mater Med* 16:807-819

Schimming R, Schmelzeisen R (2004) Tissue-engineered bone for maxillary sinus augmentation. *J Oral Maxillofac Surg* 62:724-729

Schliephake H, Knebel JW, Aufderheide M, Tauscher M (2001) Use of cultivated osteoprogenitor cells to increase bone formation in segmental mandibular defects: An experimental pilot study in sheep. *Int J Oral Maxillofac Surg* 30:531-537

Schütze N, Rücker N, Müller J, Adamski J, Jakob F (2001) 5' flanking sequence of the human immediate early responsive gene *ccn1* (*cyr61*) and mapping of polymorphic CA repeat sequence motifs in the human *ccn1* (*cyr61*) locus. *Mol Pathol* 52:170-175

Sekiya I, Larson BL, Vuoristo JT, Reger RL, Prockop DJ (2005) Comparison of effect of BMP-2, -4, and -6 on in vitro cartilage formation of human adult stem cells from bone marrow stroma. *Cell Tissue Res* 320:269-276

Serakinci N, Guldberg P, Burns JS, Abdallah B, Schroder H, Jensen T, Kassem M (2004) Adult human mesenchymal stem cell as a target for neoplastic transformation. *Oncogene* 23:5095-5098

Shalaby SW, Johnson RA (1994) Synthetic absorbable polyesters. In: Shalaby SW (Herausgeber) *Biomedical Polymers: Designed to degrade systems*. Hanser, New York, pp. 2-34

Shang Q, Wang Z, Liu W, Shi Y, Cui L, Cao Y (2001) Tissue-engineered bone repair of sheep cranial defects with autologous bone marrow stromal cells. *J Craniofac Surg* 12:586-593

Silver FH und Pins G (1992) Cell growth on collagen: A review of tissue engineering using scaffolds containing extracellular matrix. *J Long-Term Eff Med Implants* 2:67-80

Soballe K, Jensen TB, Mouzin O, Kidder L, Bechtold JE (2004) Differential effect of a bone morphogenetic protein-7 (OP-1) on primary and revision loaded stable implants with allograft. *J Biomed Mater Res* 71-A:569-576

Song L, Young NJ, Webb NE, Tuan RS (2005) Origin and characterization of multipotential mesenchymal stem cells derived from adult human trabecular bone. *Stem Cells Dev* 14:712-721.

Sorkin AM, Dee KC, Knothe Tate ML (2004) "Culture shock" from the bone cell's perspective: emulating physiological conditions for mechanobiological investigations. *Am J Physiol Cell Physiol* 287:C1527-C1536

Stein GS, Lian JB, van Wijnen AJ, Stein JL (1997) The osteocalcin gene: A model for multiple parameters of skeletal-specific transcriptional control. *Mol Biol Rep* 24:185-196

Steinberg BM, Smith K, Colozzo M, Pollak R (1980) Establishment and transformation diminish the ability of fibroblasts to contract a native collagen gel. *J Cell Biol* 87:304-308

Stopak D, Wessells N, Harris A (1985) Morphogenetic rearrangement of injected collagen in developing chicken limb buds. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:2804-2808

Taira M, Toyosawa S, Ijyuin N, Takahashi J, Araki Y (2003) Studies on osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells cultured in type I collagen gel by RT-PCR analysis. *J Oral Rehabil* 30:802-807

Tanzer ML, Kimura S (1988) Phylogenetic aspects of collagen structure and function. In: Nimni ME (Herausgeber) *Collagen*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 55-98

Taylor GI, Miller GD, Ham FJ (1975) The free vascularized bone graft. A clinical extension of microvascular techniques. *Plast Reconstr Surg* 55:533-544

Ten Dijke P, Goumans MJ, Itoh F (2002) Regulation of cell proliferation by SMad proteins. *J Cell Physiol* 191:1-16

Toolan BC, Frenkel SR, Yalowitz BS, Pachence JM, Alexander H (1996) An analysis of a collagen-chondrocyte composite for cartilage repair. *J Biomed Mater Res* 31:273-280

Ural E, Kesenci K, Fambri L, Migliaresi C, Piskin E (2000) Poly(D,L-lactide/epsilon-caprolactone)/hydroxyapatite composites. *Biomaterials* 21:2147-54

Urmann B, Gomel V, Jetha N (1991) Effect of hyaluronic acid on post-operative intraperitoneal adhesion prevention in the rat model. *Fertil Steril* 56:563-567

Vaccaro AR, Patel T, Fischgrund J, Anderson DG, Truumees E, Herkowitz HN, Phillips F, Hilibrand A, Albert TJ, Wetzel T, McCulloch JA (2004) A pilot study evaluating the safety and efficacy of OP-1 Putty (rhBMP-7) as a replacement for iliac crest autograft in posterolateral lumbar arthrodesis for degenerative spondylolisthesis. *Spine* 29:1885-1892

Van der Rest WJ, Dublet B, Champlaud M (1990) Fibril associated collagens. *Biomaterials* 11:28

Vats A, Tolley NS, Buttery LDK, Pola JM (2004) The stem cell in orthopaedic surgery. *J Bone Joint Surg Br* 86:159-164

Vogel G (2001) Stem cell policy: can adult stem cells suffice? *Science* 292:1820-22

Wallace DG, Rosenblatt J (2003) Collagen gel systems for sustained delivery and tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews* 55:1631-1649

Watt FM, Hogan BL (2000) Out of Eden: stem cells and their niches. *Science* 287:1427-30

Wiesmann HP, Nazer N, Klatt C, Szuwawrt T, Meyer U (2003) Bone Tissue Engineering by Primary Osteoblast-Like Cells in a Monlayer System an 3-Dimensional Collagen Gel. *J Oral Maxillofac Surg* 61:1455-1462

Wozney JM, Rosen V (1998) Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair. *Clin Orthop Relat Res* 346:26-37

Yasin M, Holland SJ, Jolly AM, Tighe BJ (1989) Polymers for biodegradable medical devices. VI. Hydroxybutyrate-hydroxyvalerate copolymers: accelerated degradation of blends with polysaccharides. *Biomaterials* 10:400-412

Yokoyama A, Sekiya I, Miyazaki K, Ichinose S, Hata Y, Muneta T (2005) In vitro cartilage formation of composites of synovium derived mesenchymale stem cells with collagen gel. *Cell Tissue Res* 322:289-298

Yoneno K, Ohno S, Tanimoto K, Honda K, Tanak N, Doi T, Kawata T, Tanaka E, Kapila S, Tanne K (2005) Multidifferentiation potential of mesenchymal stem cells in three-dimensional collagen gel cultures. *J Biomed Mater Res* 75:733-741

Zang R und Ma PX (1999) Poly(alpha-hydroxyl acids)/hydroxyapatite porous composites for bone-tissue engineering. I. Preparation and morphology. *J Biomed Mater Res* 44:446-455

Zheng Q, Guo X, Du J Liu Y (2001) Bioactivity of bioresorbable osteosynthetic devices made of hydroxyapatite/poly-DL-lactide composites: an experimental study. Chin Med Sci J 16:141-146

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Jochen Eulert für die Überlassung dieses interessanten Themas bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Ulrich Nöth für seine engagierte Betreuung und Unterstützung. Er war stets eine große Hilfe bei der praktischen und theoretischen Umsetzung meiner Arbeit und stand mir jederzeit beratend zur Seite.

Für die Bereitstellung der Kollagen Hydrogele danke ich der Firma Arthro Kinetics in Esslingen.

Weiterhin möchte ich ganz besonders Herrn Dr. Dietmar W. Hutmacher sowie Herrn Dr. med. Jan T. Schantz von der National University of Singapore für die Herstellung und Überlassung der Polycaprolacton Scaffolds danken.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Osteologiezentrums und des Labors für klinische Forschung der orthopädischen Universitätsklinik, König-Ludwig-Haus, bedanken für die Einführung an den Geräten und Hilfestellung beim Erlernen verschiedenster Arbeitstechniken.

Ich danke meinen Eltern sowie meiner Freundin für ihre verständnisvolle Beratung während meiner Arbeit und die liebevolle, geistige und moralische Unterstützung während meiner Studienzeit.

Curriculum vitae

Johannes Christian Reichert

Persönliche Daten

Name Johannes Christian Reichert

Geburtsdatum 05.07.1979

Geburtsort Mutlangen

Familienstand ledig

Eltern: Birgit C. Reichert, MTA
Manfred R. A. Reichert, Oberstudiendirektor

Geschwister: Birte G. Reichert, Studentin der Anglistik und Romanistik
Tina M. Reichert, Rechtsanwältin

Derzeitige Tätigkeit Assistenzarzt

Dienstanschrift Orthopädische Klinik
König-Ludwig-Haus
Lehrstuhl für Orthopädie der Universität Würzburg
Brettreichstrasse 11
97074 Würzburg
Tel: 0931/803-0
Fax: 0931/803-1109

Privatanschrift Methfesselstr. 10
97074 Würzburg
Tel: 0931/80499711
Mobil: 0163/2567683
e-mail: johannes.c.reichert@gmail.com

Ausbildung

Schule

1986-1990 Christoph-von-Schmid Schule, Durlangen

1990-1996 Scheffold-Gymnasium, Schwäbisch Gmünd

1996-1997 Cadillac Area Public School, Michigan, USA

1997-1999 Scheffold-Gymnasium, Schwäbisch Gmünd

Juni 1999 Abiturprüfung
Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst

08/1999 – 5/2000 Staufferklinik Schwäbisch Gmünd

Studium

WS 2000/01-WS 2006/07

Studium der Humanmedizin, Julius-Maximilians-Universität Würzburg

08/2002

Ärztliche Vorprüfung

08/2003

Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

09/2005

Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

11/2006

Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
(Note 1, Gesamtnote 1,83)

Abgeschlossenes Studium der Humanmedizin an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg am 22.11.2006

Approbation

27.11.2006

Approbation als Arzt nach §3 der Bundesärzteordnung

Beruflicher Werdegang

01/2007 - 07/2007

Assistenzarzt in der Weiterbildung, Orthopädische Klinik, König-Ludwig-Haus, Lehrstuhl für Orthopädie der Universität Würzburg (Prof. Dr. med. Jochen Eulert)

07/2007 - 06/2009

Postdoctoral Research Fellow, Institute of Health and Biomedical Innovation, Division of Tissue Engineering, Queensland University of Technology, Brisbane, Australia (Dietmar W. Hutmacher, MBIomed. Eng., PhD, MBA)

Stipendien

1996/97

High-School-Jahr in den USA, Parlamentarisches Patenschafts-Programm des Deutschen Bundestages und des US Congress

Poster

10/2006

Reichert J, Heymer A, Weber M, Schantz, JT, Hutmacher DW, Jakob F, Nöth U.
Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie 2006. Herstellung eines osteogenen Polycaprolacton-Stammzell-Hydrogel Konstruktes für die Rekonstruktion segmentaler Knochendefekte. Berlin 02.- 06.10.2006.

Veröffentlichte Abstracts

06/2006 Reichert J, Heymer A, Weber M, Schantz, JT, Hutmacher DW, Jakob F, Nöth U. 2nd International Conference "Strategies in Tissue Engineering". Construction of an osteogenic PCL-MSC-hydrogel-interponate for regeneration of segmental bone defects. Cytotherapy 8:62

Vorträge

10/06 Reppenhagen S, Raab P. Reichert J, Eulert J, Nöth U. Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie 2006. TricOs Knochenersatzmaterial – Erste Ergebnisse der Therapie von benignen Knochentumoren und tumorähnlichen Läsionen mit einer neuartigen Fibrinkleber-Zweiphasenkeramik

Publikationen

5/2007 Nöth U, Reichert J, Reppenhagen S, Steinert A, Rackwitz L, Eulert J, Beckmann J, Tingart M. Zellbasierte Therapie der Femurkopfnekrose. Orthopäde (in press)

5/2007 Reppenhagen S, Kenn W, Reichert J, Raab P, Eulert J, Nöth U. Bildgebung der aseptischen Femurkopfnekrose des Erwachsenen. Orthopäde (in press)

Johannes Reichert