

Tissue-Engineering von Röhrenknochen mit einer vaskularisierten Matrix in einem Bioreaktor

Ein neuer Therapieansatz für die Rekonstruktion von Gewebedefekten besteht durch das Tissue-Engineering. Dieses bezeichnet die Genese von dreidimensionalen funktionellen Geweben aus körpereigenen Zellen in vitro. Klinisch ist die Erzeugung von Hauttransplantaten bereits etabliert [7, 10]. Für andere komplexe Gewebe wie Leber- und Herzmuskulatur sind durch Tissue-Engineering-Techniken bereits funktionsfähige Gewebe in vitro hergestellt worden [5, 6]. Für die Herstellung von Knochen in Form eines dreidimensionalen Gewebekonstruktes ist eine Matrix erforderlich.

R. Cancedda [11], der Präsident der Europäischen Gesellschaft für Tissue-Engineering, hat treffend die Anforderungen an Biomaterialien für das Tissue-Engineering von Knochen dargestellt: „*First, the material should allow for uniform loading and retention of cells. Second, the carrier should support rapid vascular ingrowth. Third, the material should be composed of radiolucent materials that are resorbed and replaced by bone as new bone is formed. Fourth, the material should allow or enhance osteoconductive bridging of host bone by the new bone. Finally, the cell matrix combination should be easy for the physician to handle in the clinical setting.*“

Neben den geeigneten Trägermatrices müssen für das Tissue-Engineering Zellen gefunden werden, die in vitro zu einem dreidimensionalen, organotypischen Verbund zusammenwachsen und osteogen

differenzieren. Besonders geeignet erscheinen hier humane, stromale Zellen aus dem Knochenmark (hBMSC). Diese lassen sich z. B. aus dem Beckenkamm aspirieren und in vitro amplifizieren. Neben der chondrogenen und fibroblastären Differenzierung ist auch die osteogene Differenzierung beschrieben worden [9].

Eines der größten Probleme des Tissue-Engineering ist die bisher fehlende Gefäßversorgung von in vitro erzeugten Gewebekonstrukten. So ist die Nekrose in Transplantaten, die eine Dicke von über 4 mm erreichen, beschrieben worden [13].

Eine Lösungsmöglichkeit stellt die Erzeugung eines Kapillarsystems in vitro dar. Dieses könnte bei der Implantation mit den Gefäßen des Empfängers anastomosiert werden. Ziel dieser Untersuchung war daher, mit Hilfe von stromalen Knochenmarkszellen ein osteogenes Konstrukt aus einer kapillarisierten biologischen Matrix zu erzeugen und die histologischen und mechanischen Eigenschaften zu überprüfen.

Material und Methodik

Erzeugung der biologischen Matrix mit Kapillarsystem (BioVaM)

Für die Gewinnung der BioVaM wurden deutsche Landhausschweine (Gewicht: 18–25 kg) verwendet. Für die Versuche lag eine Genehmigung durch die Bezirksregierung Hannover vor. Die Entnahme der

Dünndarmmarkade wurde unter sterilen Kautelen durchgeführt. Über eine mediane Laparotomie wurde ein 15–20 cm langes Jejunumsegment isoliert. Dieses wurde mit einem langen arteriellen und venösen Gefäßstiel unter Einschluss der A. mesenterica superior präpariert und abgangsnah ligiert. Die Endäste der Arkade wurden ebenfalls ligiert (Abb. 1). Der arterielle Pedikel wurde kanüliert und mit 4°C kaltem NaCl 0,9% mit Penicillin (100 U/l) und Streptomycin (100 U/ml) gründlich gespült. Das Präparat wurde bis zur Azellularisierung in der Spüllösung bei 4°C aufbewahrt.

Mit einem Zellschaber wurde die Mukosa vorsichtig abgeschabt und anschließend mit einer modifizierten Methode

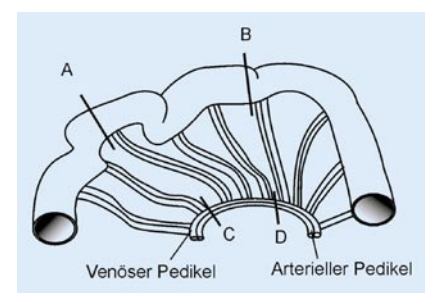


Abb. 1 ▲ Ein Segment des porkinen Jejunums wurde zusammen mit seinem arteriellen und venösen Stiel unter sterilen Bedingungen präpariert (A–D: Absetzungslinien) Das Segment wurde zunächst mechanisch und anschließend chemisch azellularisiert, bis die histologische Untersuchung ein zellfreies Konstrukt zeigte

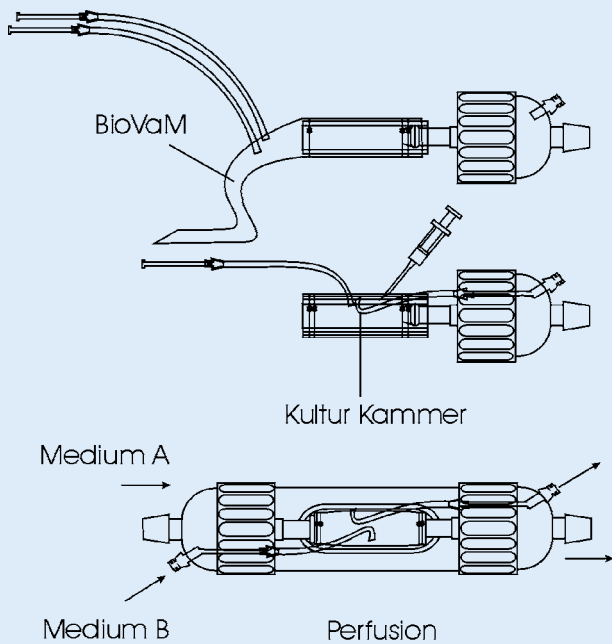


Abb. 2 ▲ BMSC wurden zwischen der 4. und 6. Passage trypsinisiert und mit flüssiger Kollagenmatrix (SIS) oder demineralisierter Knochenmatrix (DBM, Grafton®, Osteotec Inc., Eatontown/NJ, USA) in einer Dichte von 3×10^6 Zellen zwischen 2 Schichten der azellulierten, vaskulären Matrix injiziert. In der Kontrollgruppe blieb das Innere der Matrix zellfrei. Die Konstrukte wurden zunächst 24 h unter Rotation und anschließend unter Perfusion kultiviert. Das vaskuläre System der Matrix wurde ebenfalls mit 3×10^6 BMSC besiedelt. Ein separates, endothelzellspezifisches Medium wurde für die Perfusion verwendet (Medium B)

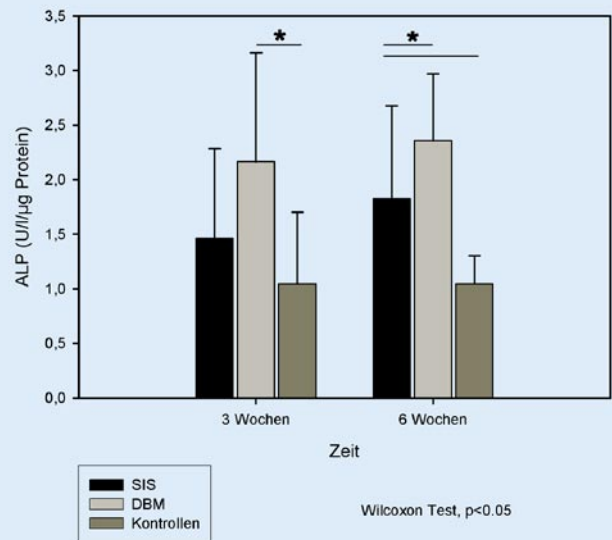


Abb. 3 ▲ Die Aktivität der alkalischen Phosphatase nach 3 und 6 Wochen für SIS- und DBM-Kulturen, verglichen mit den Kontrollen: Es konnte ein signifikanter Anstieg der ALP-Aktivität zwischen den DBM- und den Kontrollgruppen nach 3 und 6 Wochen und für SIS nach 6 Wochen beobachtet werden

nach Meezan [15] eine chemische Azellularisierung durchgeführt. Das Präparat wurde in einem Endothelzelldifferenzierungsmedium (EBM-2, Clonetics, CA, USA) bei 37°C bis zur Besiedelung aufbewahrt. Dem Medium wurde 10% fetales Kälberserum, $0,5 \mu\text{g/ml}$ humaner „Vascular Endothelial Growth Factor“ (VEGF-1, Merck AG, Darmstadt), 3 ng/ml humaner rekombinanter „Fibroblast Growth Factor“ (FGF-2, Pepro Tech, Offenbach), $5 \mu\text{g/ml}$ „Epidermal Growth Factor“ (EGF), $5 \mu\text{g/ml}$ „Insulinlike Growth Factor-1“ (IGF-1, Merck AG, Darmstadt) und $5 \mu\text{g/ml}$ Ascorbinsäure zugesetzt.

Zellamplifizierung und Differenzierung

Für die In-vitro-Generierung eines vaskularisierten osteogenen Konstruktes wurden 7 Knochenmarkbiopsien von Patienten, bei denen im Rahmen einer Routineoperation die Eröffnung des Beckenkamms zur Spanentnahme erfolgte (Alter:

18–51 Jahre; $35 \pm 12,4$ Jahre), entnommen. Für dieses Verfahren lag eine Bewilligung der Ethikkommission der MHH vor. Die Spender wurden über das Verfahren aufgeklärt und willigten ein.

Die Aspirate wurden zunächst in DMEM/Ham's F12 kultiviert (1:1; Fa. Biochrom AG, Berlin) zusammen mit 10% humanem Serum aus der institut-eigenen Blutbank, 200 U/ml Penicillin/Streptomycin (Gibco AG, Karlsruhe), $2,5 \mu\text{g/ml}$ Amphotericin B (Biochrom AG, Berlin), gepuffert mit HEPES-Puffer (Roth AG, Karlsruhe; pH 7,0) und anschließend für 5 min bei 2000 g zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet über einen Percoll-Gradienten (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) 15 min bei 2000 g zentrifugiert. 14 ml Überstand wurden in dem oben genannten Medium resuspendiert und erneut 5 min zentrifugiert. Die Zelldichte wurde errechnet und anschließend in einer 75-cm^2 -Kulturflasche (Nunc GmbH, Berlin) bei ei-

ner Zelldichte von 2×10^5 Zellen bei 37°C und in 5% CO_2 und gesättigtem Wasserdampf kultiviert. Das Medium wurde jeden 2. Tag gewechselt. Nach Erreichen von Konfluenz wurden die Zellen mit $0,25\%$ Trypsin (Gibco AG, Karlsruhe) abgelöst, gezählt und dann wiederum in 75-cm^2 -Zellkulturflaschen in einer Zelldichte von 2×10^5 Zellen weiter kultiviert. Die Zellen wurden nach der 3. Passage je zur Hälfte für die weitere Zellkultur aufgeteilt.

Um eine Endothelzelldifferenzierung zu erreichen, wurden die Zellen auf Kulturschalen mit Gelatinebeschichtung (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA) und in dem zuvor beschriebenen Endothelzellmedium kultiviert. Nach 3 Tagen in Kultur wurden nichtadhärente Zellen mit PBS (Biochrom AG, Berlin) abgespült und neues Medium zugesetzt. Die Kultur wurde über 3 Wochen durchgeführt und ein Mediumwechsel erfolgte in dieser Zeit 3-mal pro Woche. Die differenzierten BMSC wurden mit $0,25\%$ Trypsin (Gibco, Karlsruhe)

Hier steht eine Anzeige
This is an advertisement

he) abgelöst, gezählt und in EBM-2 mit einer Zelldichte von 3×10^6 Zellen resuspendiert. 1 ml der Zellsuspension wurde in den arteriellen und in den venösen Pedikel der Matrix injiziert und dieser für 24 h abgeklemmt. Anschließend wurden die Pedikel geöffnet und die Matrix in dem oben beschriebenen Differenzierungsmedium unter Perfusion kultiviert.

Um eine osteogene Differenzierung der anderen Hälfte der Zellen zu erreichen, wurden diese in dem oben für die Kultur bis zur 3. Passage beschriebenen Medium kultiviert. Dem Medium wurden 2,55 mM Dexamethason (Fortecortin, Merck AG, Darmstadt) zugesetzt. Zwischen der 4. und 6. Passage wurden die Zellen mit 0,25% Trypsin (Gibco, Karlsruhe) abgelöst und in einer Dichte von 3×10^6 zwischen 2 Schichten der vaskularisierten Zellmatrix injiziert (**Abb. 2**).

Bioreaktorsystem

Es wurde ein Bioreaktorsystem benutzt, das von Bader entwickelt und für das kardiovaskuläre Tissue-Engineering bereits benutzt wurde [5]. Ein Silikonschlauch wurde auf das interne Perfusionssystem aufgesetzt und die vaskuläre Matrix auf dieses in einer Doppellage aufgesetzt. Dadurch wurde eine innere Kammer für das osteogene Konstrukt geschaffen. Die Kammer wurde durch 2 Ligaturen auf jeder Seite gesichert (Mersilene No. 2-0, Ethicon Inc., Somerville/NJ, USA). In Gruppe 1 wurde eine injizierbare demineralisierte Knochenmatrix (Grafton® DBM Plus, Osteotec Inc., Eatontown/NJ, USA) mit einer Spritze in die Kammer injiziert. Die Zellen wurden in Suspension eingespritzt. Die Suspension wurde mit dem DBM 5 min durch eine Schüttelmaschine vermischt.

In Gruppe 2 wurden die Zellen mit flüssigem SIS resuspendiert und in die Matrixkammer injiziert.

In der Kontrollgruppe wurde die Matrix ohne osteogene Zellen kultiviert. Die Pedikel der BioVaM® wurden mit einem separaten Perfusionssystem verbunden und mit dem zuvor beschriebenen EBM-2-Medium perfundiert. Die Perfusionsrate betrug 10 ml/min. Die äußere Perfusionskammer des Bioreaktors wurde mit einem zweiten Perfusionssystem verbunden,

das mit dem oben beschriebenen osteogenen Medium perfundiert wurde. Die Perfusionsrate betrug 20 ml/min. (**Abb. 2**). Der Reaktor wurde in 95% gesättigtem Wasserdampf und 5% CO₂ bei 37°C kultiviert. Das Kulturmedium wurde jede Woche gewechselt. Nach 3 und 6 Wochen wurden je zwei 5×10-mm-Gewebeproben zur weiteren Analyse entnommen.

Histologische Untersuchung und Bestimmung der Differenzierungsparameter

Die immunhistochemische Analyse wurde durch Färbung mit der Avidin-Biotin-Peroxidase-Technik durchgeführt. Der Endothelzellphänotyp wurde durch den Nachweis der Expression von Faktor-VIII-Antigen (Primärantikörper: v.-Willebrand-Faktor; Klon 8/86, DAKO, Hamburg) und durch UEA1-Fitc-Markierung (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) bestimmt. Ein oviner Mausantikörper (DAKO) wurde als Sekundärantikörper verwendet. Streptavidinperoxidase-Konjugat wurde zugesetzt und die Färbereaktion mit Diaminobenzidin (DAKO) ausgelöst.

Für die histologische Analyse der osteogenen Konstrukte wurden die Proben in Paraffin eingebettet und Schnitte mit einem Mikrotom erzeugt. Es wurde eine HE- und v.-Kossa-Färbung [3] für die lichtmikroskopische Untersuchung durchgeführt. Die zweite Gewebeprobe wurde homogenisiert und der Proteinanteil mit der Methode nach Lowry bestimmt [8]. Die Aktivität der alkalischen Phosphatase (ALP) wurde mit Hilfe der Spektrophotometrie bestimmt [14]. Die Absorptionswellenlänge betrug 578 nm. Der Osteokalzinspiegel wurde mittels ELISA (N-MID™ Osteocalcin One Step ELISA, Osteometer BioTech, Herlev, Dänemark) bestimmt. Die Absorptionswellenlänge betrug 450 nm.

Für die Bestimmung der maximalen relativen Reißfestigkeit wurden die Konstrukte zunächst mit einem Laser-Abtastverfahren vermessen [2]. Anschließend wurde an einer biomechanischen Testmaschine (Universalprüfmaschine Zwick 1484 200 KN, Zwick GmbH&CoKG, Ulm) ein Versagenstest durchgeführt. Die Proben wurden von beiden Seiten mit Quetschklemmen gehalten. Der Versuch wurde mit einer Vorlast von 0,1 N und einer Vorschub-

Orthopäde 2004 · 33:1394–1400
DOI 10.1007/s00132-004-0733-1
© Springer Medizin Verlag 2004

M. Jagodzinski · S. Cebotari · I. Tudorache · J. Zeichen · S. Hankemeier · C. Krettek
M. van Griensven · H. Mertisching

Tissue-Engineering von Röhrenknochen mit einer vaskularisierten Matrix in einem Bioreaktor

Zusammenfassung

Ziel der Studie war die Herstellung und Testung eines vaskularisierten osteogenen Konstrukts.

Schweinejejunum mit venösem und arteriellem Gefäßstiel wurde mechanisch und chemisch azellularisiert. Das Kapillarsystem wurde mit humanen stromalen Zellen aus dem Knochenmark (hBMSC), das Lumen der Matrix mit hBMSC, die mit demineralisierter Knochenmatrix (DBM) oder flüssiger Schweinesubmukosa (SIS) vermischt wurden, besiedelt. Nach 3 und 6 Wochen Kultur in einem Perfusionsbioreaktor in separaten angiogenen und osteogenen Medien wurde der Gehalt an Osteokalzin (OC) und alkalischer Phosphatase (ALP), sowie die maximale relative Reißfestigkeit im Vergleich zu einer Kontrollgrup-

pe bestimmt. Es wurde eine histologische Analyse mit v.-Willebrand-Faktor, UEA-1-Immunhistochemie, HE und v.-Kossa-Färbungen durchgeführt.

Das Kapillarsystem der Matrix zeigte eine Expression von Endothelzellmarkern. Die Aktivität der ALP war in den mit DBM besiedelten Gruppen nach 3 und 6 Wochen ($2,2 \pm 1,0$ und $2,4 \pm 0,6$ U/l/ μ g Protein; $p < 0,05$) und in den SIS-Gruppen nach 6 Wochen ($1,8 \pm 0,9$ U/l/ μ g Protein; $p < 0,03$) erhöht. Die Osteokalzinsekretion war für die DBM-Gruppen nach 3 und 6 Wochen erhöht ($23,5 \pm 21,1$ und $11,1 \pm 4,5$ ng/ml; $p < 0,05$). Die Reißfestigkeit war für SIS und DBM nach 6 Wochen erhöht ($15,1 \pm 3,7$ N/mm² und $17,0 \pm 5,0$ N/mm²; $p < 0,05$). Die histologische Untersuchung zeigte die Bil-

dung von Osteonen in den DBM- und SIS-Gruppen. Kalzifizierungen wurden in den DBM-Kulturen häufiger beobachtet.

Es gelang in vitro, das Kapillarsystem der Matrix mit angiogen differenzierten BMSC zu besiedeln. Die osteogene Besiedlung führte mit DBM und SIS zur mechanischen Festigung. Nach 3- und 6-wöchiger Kultur fanden sich in beiden zellbesiedelten Gruppen Osteone. Die osteogene Differenzierung war bei der Verwendung von DBM am höchsten.

Schlüsselwörter

Tissue-Engineering · Knochen · Bioreaktor · Vaskularisierung

Tissue engineering of long bones with a vascular matrix in a bioreactor

Abstract

Background. The purpose of this study was to assess the feasibility of tissue engineering a vascular osteogenic construct.

Methods. The capillary system of a vascular biologic matrix (BioVaM) was seeded with human bone marrow stromal cells (hBMSC) that were differentiated in an endothelial cell-specific media. Within two layers of the vascular matrix, hBMSC were either cultivated with demineralized bone matrix (DBM) or liquefied small intestine submucosa (SIS). After 3 and 6 weeks in a perfusion bioreactor, endothelial cell phenotype and cell adherence were investigated with immunohistology. The contents of alkaline phosphatase (ALP) and osteo-

calcin (OC) were determined and a load to failure test was executed. Histologic differences were analyzed using H&E and von Kossa staining.

Results. The capillary system of the matrix stained positive for endothelial markers. ALP activity increased in DBM after 3 and 6 weeks (2.2 ± 1.0 and 2.4 ± 0.6 U/l/ μ g protein, $p < 0.05$). Osteocalcin levels were highest for DBM (23.5 ± 21.1 and 11.1 ± 4.5 ng/ml, $p < 0.05$). Tissue strength was enhanced in SIS and DBM after 6 weeks (15.1 ± 3.7 N/mm² and 17.0 ± 5.0 N/mm², $p < 0.05$). Tissue morphology resembled osteons in DBM and SIS cultures; however, areas that stained positive for phosphate were more often found in the DBM group.

Conclusion. The capillary system of the matrix could be seeded with BMSC in vitro. Seeding of hBMSC mixed with DBM or SIS within a vascular matrix led to enhanced tissue strength and to osteon-like tissue structures. Osteogenic differentiation was highest when DBM was used.

Keywords

Tissue engineering · Bone · Bioreactor · Vascularization

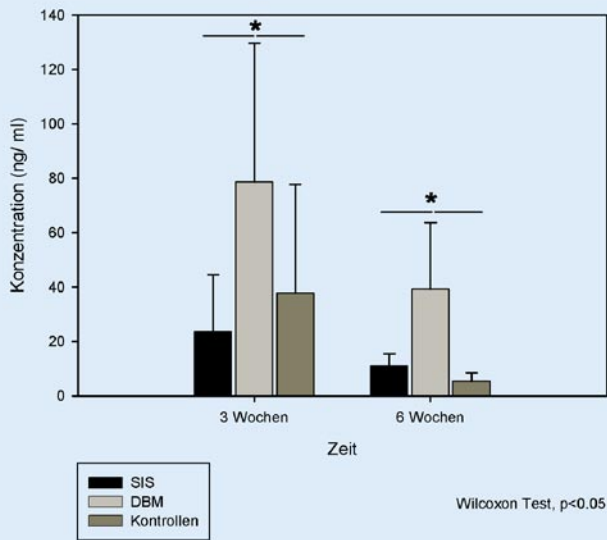


Abb. 4 ▲ Osteokalzinsekretion nach 3 und 6 Wochen: Es wurde ein signifikanter Anstieg des Osteokalzin in den DBM-Kulturen – verglichen mit den SIS- und den Kontrollgruppen nach 3 und 6 Wochen – nachgewiesen (Wilcoxon-Test, $p < 0,05$)

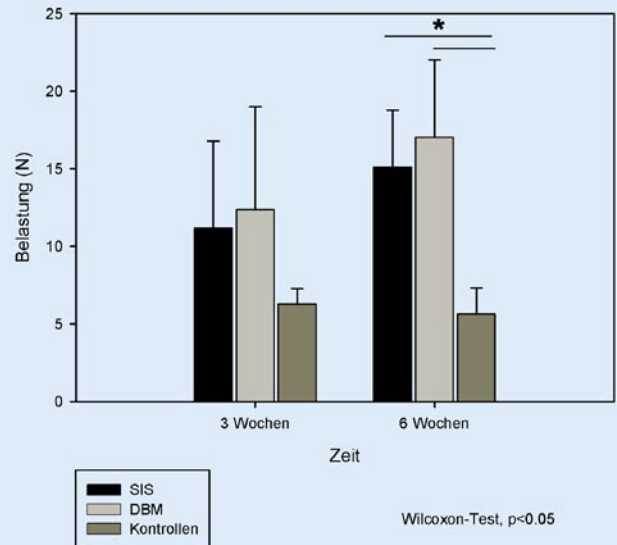


Abb. 5 ▲ Relative Reißfestigkeit: Die relative Reißfestigkeit nahm sowohl in der DBM als auch in der SIS-Gruppe nach 6 Wochen gegenüber den Kontrollen zu (Wilcoxon-Test, $p < 0,05$)

geschwindigkeit von 0,1 mm/s durchgeführt.

Statistische Auswertung

Alle Variablen wurden als Mittelwerte mit Standardabweichung und Maximal- sowie Minimalwerten berichtet. Wegen der geringen Fallzahl wurde ein nichtparametrischer Wilcoxon-Test für die Mittelwertvergleiche herangezogen. Für abhängige Variablen wurden die Mittelwerte mittels Mann-Whitney-U-Test [4] verglichen. Das Signifikanzniveau wurde mit 0,05 festgelegt. Die Analysen wurden mit „SPSS for Windows“ 11.0 (SPSS-Inc., Chicago/IL, USA) durchgeführt. Alle Graphen wurden mit „Sigma-Plot for Windows“ Version 8.0 (SPSS-Inc., Chicago/IL, USA) durchgeführt.

Ergebnisse

Alkalische Phosphatase und Osteokalzinsekretion

Die Ergebnisse werden nach 3 und 6 Wochen ermittelt. Der Proteingehalt der Proben wurde mit $24,4 \pm 7,0$ (15–32 μg) und $36,4 \pm 15,6$ (18–55 μg) für SIS, $29,4 \pm 8,6$ (16–38 μg) und $40,8 \pm 15,0$ (20–54 μg) für DBM, und $8,6 \pm 1,7$ (6–10 μg) und $10,4 \pm 3,4$ (6–

14 μg) für die Kontrollgruppe bestimmt. Die relative Aktivität der alkalischen Phosphatase wurde mit $1,5 \pm 0,8$ (0,8–2,6 U/l/ μg) und $1,8 \pm 0,9$ (1,2–3,3 U/l/ μg) für SIS, $2,2 \pm 1,0$ (1,4–3,6 U/l/ μg) und $2,4 \pm 0,6$ (1,8–3,2 U/l/ μg) für DBM, und $1,0 \pm 0,7$ (0,4–2,0 U/l/ μg) und $1,0 \pm 0,3$ (0,6–1,4 U/l/ μg) für die Kontrollgruppe bestimmt. Es wurde ein signifikanter Anstieg der ALP-Sekretion zwischen DBM und SIS und der Kontrollgruppe nach 3 Wochen ($p < 0,04$; $p < 0,03$) und 6 Wochen ($p < 0,03$) festgestellt. Für die DBM-Gruppe ergab sich nach 3 Wochen ein signifikanter Unterschied gegenüber der SIS-Gruppe ($p < 0,05$). Die Werte sind in **Abb. 3** zusammengefasst.

Die Osteokalzinspiegel lagen in der SIS-Gruppe bei $23,5 \pm 21,1$ ng/ml (8,5–60,1 ng/ml) und $11,1 \pm 4,5$ ng/ml (7,0–18,6 ng/ml), in der DBM Gruppe bei $78,6 \pm 51,0$ ng/ml (18,3–136,0 ng/ml) und $39,2 \pm 24,5$ ng/ml (18,8–80,6 ng/ml) sowie in der Kontrollgruppe bei $37,7 \pm 40,0$ ng/ml (5,7–97,6 ng/ml) und $5,3 \pm 3,2$ ng/ml (2,4–10,6 ng/ml). Damit ergab sich für SIS im Vergleich mit den Kontrollen nach 6 Wochen ($p < 0,03$) und für die DBM-Gruppe – verglichen mit den Kontrollen nach 3 und 6 Wochen – ein signifikanter Unterschied ($p < 0,03$). Zu beiden Zeitpunkten war die Osteokal-

zinsekretion in der DBM-Gruppe verglichen mit SIS erhöht ($p < 0,05$; **Abb. 4**).

Mechanische Untersuchung

Der Durchmesser der Konstrukte wurde mit $2,2 \pm 0,3$ mm (1,9; 2,6 mm) und $2,2 \pm 0,5$ mm (1,8; 3,0 mm) für SIS, $2,2 \pm 0,3$ mm (1,8; 2,4 mm) und $2,3 \pm 0,2$ mm (2,1; 2,6 mm) für DBM sowie $1,4 \pm 0,1$ mm (1,2; 1,5 mm) und $1,4 \pm 0,4$ mm (1,0; 2,0 mm) für die Kontrollgruppen bestimmt.

Die absoluten Ausreißkräfte wurden mit $24,2 \pm 11,1$ N (14,1; 40,6 N) und $32,7 \pm 8,0$ N (20,2; 40,1 N) für SIS, $26,4 \pm 14,4$ N (14,1; 45,3 N) und $38,6 \pm 8,0$ N (28,1; 47,0 N) für DBM sowie $8,6 \pm 0,9$ N (7,2; 9,7 N) und $7,6 \pm 1,2$ N (6,1; 9,2 N) für die Kontrollgruppe bestimmt.

Diese Ergebnisse ergaben eine relative Reißfestigkeit von $11,2 \pm 5,6$ N/mm² (6,1; 18,5 N/mm²) und $15,1 \pm 3,7$ N/mm² (9,6; 19,1 N/mm²) für SIS, $12,4 \pm 6,6$ N/mm² (6,1; 19,7 N/mm²) und $17,0 \pm 5,0$ N/mm² (11,2; 22,4 N/mm²) für DBM und $6,3 \pm 1,0$ N/mm² (5,1; 7,5 N/mm²) sowie $5,6 \pm 1,7$ N/mm² (3,8; 7,8 N/mm²) für die Kontrollen. Die Reißfestigkeit war in den SIS- und DBM-Konstrukten gegenüber den Kontrollen nach 6 Wochen signifikant erhöht

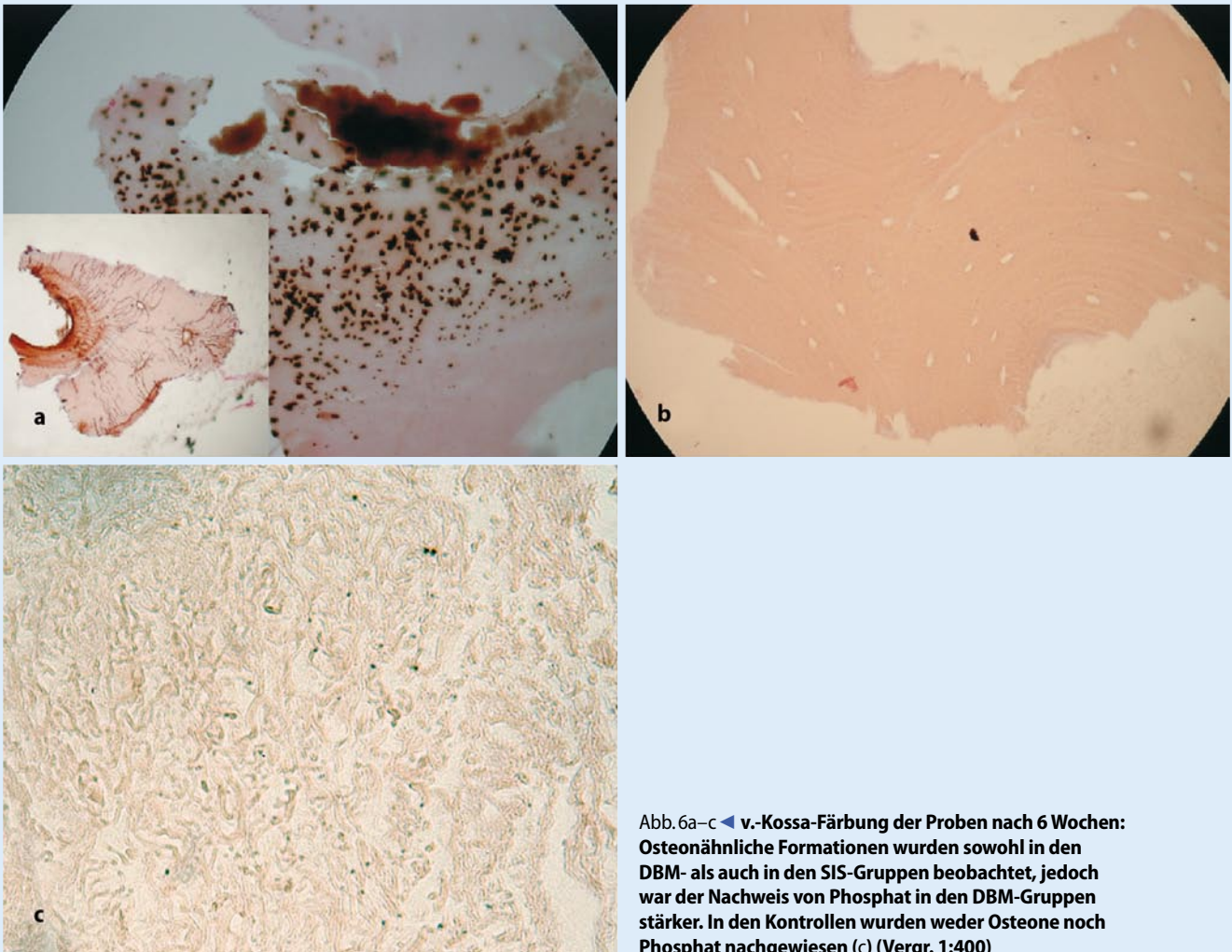
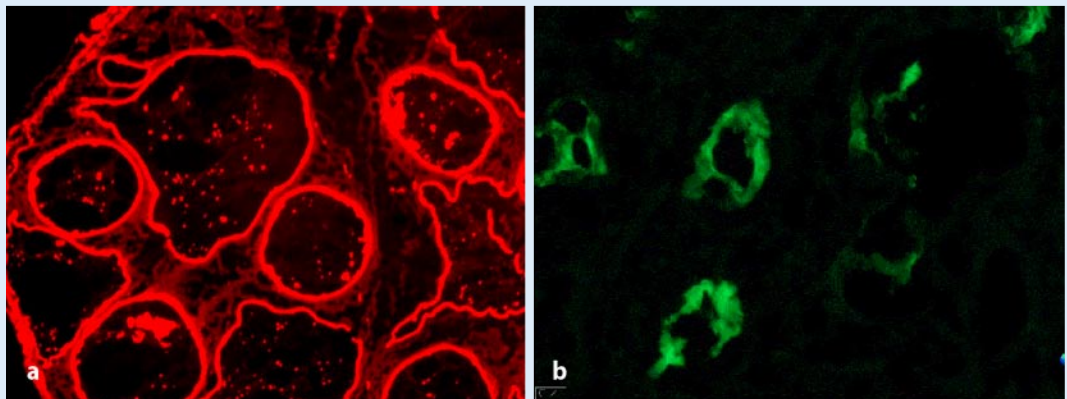


Abb. 6a–c ◀ v.-Kossa-Färbung der Proben nach 6 Wochen: Osteonähnliche Formationen wurden sowohl in den DBM- als auch in den SIS-Gruppen beobachtet, jedoch war der Nachweis von Phosphat in den DBM-Gruppen stärker. In den Kontrollen wurden weder Osteone noch Phosphat nachgewiesen (c) (Vergr. 1:400)

Abb. 7 ▶ Immunfluoreszenz der Pedikel der Bio-VaM (a) mit UEA-1 und des Kapillarsystems (b) mit vWF-Antikörpern. Es wurde in den Pedikeln nach 6-wöchiger Kultur ein Multilayer an Zellen und im Kapillarsystem ein Mono- bis Multilayer nachgewiesen (Vergr. 1:400)



($p < 0,05$). Die Werte sind in [Abb. 5](#) zusammengefasst.

Histologie

Die HE-Färbung zeigte, dass die Kollagenstruktur der BioVaM zu beiden Zeitpunkten intakt blieb. Zellen und osteonförmige

Matrixformationen konnten in den SIS- und DBM-Gruppen nachgewiesen werden. Die BMSC nahmen eine Osteozytenform in diesen Kulturen an. Es konnten Kapillaren, die einem Harvers-System entsprechen, gefunden werden. Die v.-Kossa-Färbung wies eine stärkere Phosphatbildung in den DBM-Gruppen als in den SIS-

Gruppen nach. Die Anreicherung nahm von der 3. zur 6. Woche zu. In den Kontrollgruppen konnte kein Phosphat nachgewiesen werden ([Abb. 6](#)).

Nach 3- und 6-wöchiger Kultur wurden endothelzellspezifische Marker im Pedikel- und Kapillarsystem der Matrix nachgewiesen (vWF und UEA-1, [Abb. 7](#)). Es

fand sich eine mehrreihige Zellschicht im Pedikelsystem und eine Mono- bis Multilayerschicht im Kapillarsystem der Matrix.

Diskussion

Eine Verbesserung der Integration von azellulären Implantaten verspricht die Zellbesiedelung mit undifferenzierten oder differenzierten Zellen in vitro. Mit diesem Verfahren konnten bereits klinisch langstreckige Röhrenknochendefekte überbrückt werden [11]. Eine Schwachstelle dieser Verfahren stellt die unzureichende Vaskularisierung der Transplantate nach der Implantation dar [13].

Ein neuer Lösungsansatz für die das Tissue-Engineering von dreidimensionalen Matrices ist daher die In-vitro-Erzeugung eines Gefäßsystems, das den Ad-hoc-Anschluss an vorhandene Empfängergeräße bei der Implantation erlaubt.

Die BMSC, die für diese Studie verwendet wurden, entstammten jungen Spendern ($35 \pm 12,4$ Jahre) und konnten ohne Probleme in vitro amplifiziert und anschließend in die dreidimensionale Zellkultur überführt werden. Es wurde eine Zunahme der osteogenen Differenzierung – v. a. unter Einfluss von DBM – beobachtet. Dies mag an den in einer demineralisierten Knochenmatrix enthaltenen Wachstumsfaktoren liegen [12]. Die mechanischen Eigenschaften verbesserten sich ebenfalls durch die Zellbesiedelung. Jedoch liegt die beobachtete Reißfestigkeit noch weit hinter der von nativem Knochen [16]. Ein verbessertes osteogenes Konstrukt könnte aus einer äußeren Schicht (BioVaM) und einer zellbesiedelten azellularisierten Spongiosa bestehen.

Eine fibroblastäre Differenzierung von BMSC wurde erst jüngst unter dem Einfluss von mechanischer Stimulation beobachtet [1]. Die Ergebnisse dieser Studie belegen, dass eine osteogene Differenzierung mit dem verwendeten Medium stattfand. Diese Differenzierung war in der DBM-Gruppe am stärksten ausgeprägt. Weitere Studien müssen die Frage klären, inwieweit eine mechanische Stimulation in einem Mechanoreaktor die osteogene Differenzierung unterstützt.

Fazit für die Praxis

Das Tissue-Engineering ermöglicht die Generierung zunehmend komplexer dreidimensionaler Konstrukte in vitro. Die schnellstmögliche Gefäßversorgung nach der Implantation ist ein essenzielles Problem. Hier ist die Angiogenese in vitro ein vielversprechender Lösungsansatz. Es gelang in der Kokultur, mit angiogenen und osteogenen Medien die Differenzierung von BMSC in verschiedene Richtungen zu lenken und die mechanischen Eigenschaften der Matrix zu verbessern. Um die Wertigkeit eines vaskularisierten osteogenen Konstrukts weiter zu untersuchen, sind In-vivo-Studien am Großtiermodell erforderlich. Insbesondere müssen die Thrombogenität und die Proliferation des Gefäßsystems in das Konstrukt dabei untersucht werden.

Korrespondierender Autor

M. Jagodzinski

OE 6230, Medizinische Hochschule Hannover, Carl-Neuberg-Str. 1, 30625 Hannover
E-Mail: jagodzinski.michael@mh-hannover.de

Danksagung

Wir bedanken uns bei Herrn Dr. L. Hoy, Institut für Biometrie der MHH, für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Untersuchung. Die Studie wurde durch eine hochschulinterne Leistungsförderung (HilF) unterstützt.

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

Literatur

1. Altman GH, Horan RL, Martin I et al. (2002) Cell differentiation by mechanical stress. *FASEB J* 16 (2): 270–272
2. Bohnsack M, Surie B, Kirsch IL, Wulker N (2002) Biomechanical properties of commonly used autogenous transplants in the surgical treatment of chronic lateral ankle instability. *Foot Ankle Int* 23 (7): 661–664
3. Franklin RM, Martin MT (1980) Staining and histochemistry of undecalcified bone embedded in a water-miscible plastic. *Stain Technol* 55 (5): 313–321
4. Glantz SA (2002) *Primer of biostatistics*. McGraw-Hill, New York

5. Jasmund I, Bader A (2002) Bioreactor developments for tissue engineering applications by the example of the bioartificial liver. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 74: 99–109
6. Kofidis T, Akhyari P, Wachsmann B et al. (2002) A novel bioartificial myocardial tissue and its prospective use in cardiac surgery. *Eur J Cardiothorac Surg* 22 (2): 238–243
7. Limat A, French LE, Blal L et al. (2003) Organotypic cultures of autologous hair follicle keratinocytes for the treatment of recurrent leg ulcers. *J Am Acad Dermatol* 48 (2): 207–214
8. Lonnerdal B, Woodhouse LR, Glazier C (1987) Compartmentalization and quantitation of protein in human milk. *J Nutr* 117 (8): 1385–1395
9. Mauney JR, Sjöstorm S, Blumberg J et al. (2004) Mechanical stimulation promotes osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells on 3-D partially demineralized bone scaffolds in vitro. *Calcif Tissue Int* 74 (5): 458–468
10. Mulder GT (1999) The role of tissue engineering in wound care. *J Wound Care* 8 (1): 21–24
11. Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutepov SM, Mukhachev V, Lavroukov A, Kon E, Marcacci M (2001) Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med* 344: 385–386
12. Russell JL (2000) Grafton demineralized bone matrix: performance consistency, utility, and value. *Tissue Eng* 6 (4): 435–440
13. Schaefer DJ, Klemm C, Zhang XH, Stark GB (2000) Tissue engineering with mesenchymal stem cells for cartilage and bone regeneration. *Chirurg* 71 (9): 1001–1008
14. Shin JS, Kim BG, Kim DH, Lee YS (1996) Spectrophotometric assay using streptavidin-alkaline phosphatase conjugate for studies on the proteolysis of polymer bead-bound peptides. *Anal Biochem* 236 (1): 9–13
15. Teebken OE, Bader A, Steinhoff G, Haverich A (2000) Tissue engineering of vascular grafts: human cell seeding of decellularised porcine matrix. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 19 (4): 381–386
16. Turner CH, Wang T, Burr DB (2001) Shear strength and fatigue properties of human cortical bone determined from pure shear tests. *Calcif Tissue Int* 69: 373–378