

Osteogene Differenzierung von humanen stromalen Zellen aus dem Knochenmark (hBMSC) unter dem Einfluss von zyklischem mechanischem Dehnungsstress und Dexamethason

Osteogenic Differentiation of Human Bone Marrow Stromal Cells (hBMSC) by Cyclic Longitudinal Mechanical Strain and Dexamethasone

Autoren

C. Haasper, M. Drescher, E. Hesse, C. Krettek, J. Zeichen, M. Jagodzinski

Institut

Unfallchirurgische Klinik, Medizinische Hochschule Hannover

Schlüsselwörter

- Knochen
- Stress
- Stimulation
- Stammzellen

Key words

- bone
- stem cells
- stimulation
- stress

Bibliografie

DOI 10.1055/s-2008-1038578
Z Orthop Unfall 2008; 146:
636–643 © Georg Thieme
Verlag KG Stuttgart · New York ·
ISSN 1864-6697

Korrespondenzadresse

Dr. Carl Haasper
Unfallchirurgische Klinik
Medizinische Hochschule
Hannover
Carl-Neuberg-Straße 1
30625 Hannover
Tel.: 05 11/5 32-20 50
Fax: 05 11/5 32-58 77
haasper.carl@mh-hannover.de

Zusammenfassung



Studienziel: Ziel der Studie war es, den Einfluss von Dexamethason im Nährmedium von humanen stromalen Zellen aus dem Knochenmark (human bone marrow stromal cells, hBMSC) und zyklischem, mechanischem Dehnungsstress auf die osteogene Differenzierung, quantifiziert durch die Bestimmung der mRNA-Expression von Kollagen Typ I, II, III, Tenascin C und Cbfa1 zu untersuchen.

Method: hBMSCs von sieben Spendern mit einem Alter von $32,5 \pm 6,2$ Jahren wurden ab der ersten Passage mit (D+) oder ohne Dexamethason (D-) kultiviert. Nach der zweiten Passage wurden je $2,2 \times 10^5$ Zellen in flexible Silikon-schalen überführt. Nach ihrer Adhäsion auf dem Schalengrund wurden die Zellen einem Dehnungsstress unterzogen von 2% (D+2; D-2), 8% Dehnung (D+8; D-8) und einer Kontrollgruppe ohne Stress (D+0; D-0). Der Stress wurde an drei aufeinander folgenden Tagen mit einer Frequenz von 1 Hz und täglich drei Zyklen Stress mit einer Dauer von jeweils zwei Stunden durchgeführt. Die Zellproben wurden am ersten Stresstag, am ersten Tag nach Stress (Tag 4) und am vierten Tag nach Stress (Tag 7) entnommen. Die Quantifizierung der Genexpression von Kollagen Typ I, II und III, Tenascin C und Cbfa1 erfolgte durch RT-PCR.

Ergebnisse: Die mRNA-Expression von Cbfa1 zeigte an den unterschiedlichen Tagen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) sowie für die Dehnung an Tag 1: 8%: $0,0291 \pm 0,0338$ versus 0%: $0,00528 \pm 0,0127$, $p = 0,017$; Tag 8: 8%: $0,0411 \pm 0,116$, 0%: $0,00103 \pm 0,00217$, $p = 0,009$. Die Beobachtung der anderen Parameter zeigte zwar Tendenzen auf, erbrachte jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Schlussfolgerung: Die Arbeit hat gezeigt, dass über den kurzen Beobachtungszeitraum von sieben Tagen zyklischer mechanischer Dehnungs-

Abstract



Aim: The aim of the study was to investigate the effects of dexamethasone and cyclic mechanical strain on human bone marrow stromal cells (hBMSCs) in osteogenic differentiation by determining levels of mRNA of collagen I, II, III, tenascin C and Cbfa1.

Method: hBMSCs from seven donors (32.5 ± 6.2 years old) were cultivated with (D+) or without (D-) dexamethasone. After the second passage 2.2×10^5 cells were seeded on flexible silicon dishes. A cyclic mechanical strain with an elongation of 2% (D+2; D-2) or 8% (D+8; D-8) was applied for three days with a stimulation time of three times for two hours each day. Cells were harvested on day 1, day 1 after stress (day 4) and day 4 after stress (day 7). mRNA expression of collagen I, II, III, tenascin C and Cbfa1 was investigated by RT-PCR.

Results: Cbfa1 mRNA levels were significantly different on different days ($p < 0.05$), and for strain on day 1: 8%: 0.0291 ± 0.0338 versus 0%: 0.00528 ± 0.0127 , $p = 0.017$; day 8: 8%: 0.0411 ± 0.116 , 0%: 0.00103 ± 0.00217 , $p = 0.009$. All other observed parameters showed tendencies without significant differences.

Conclusion: In the short-term over seven days, cyclic stretching is a stronger differentiation factor than dexamethasone.

stress ein stärkerer osteogener Differenzierungsinduktor ist als Dexamethason.

Einleitung

Die modernen Methoden der regenerativen Medizin erlauben mit dem Tissue Engineering die Etablierung neuer Therapieansätze zur Rekonstruktion von großen Gewebedefekten. Große Knochendefekte unterschiedlicher Ursache, wie traumatische Verletzungen, Infektionen oder Tumoren erfordern das Überbrücken bzw. Auffüllen des Defektes. Hierfür werden heute sowohl synthetische als auch biologische Materialien verwendet [1]. Der Goldstandard ist die autologe Spongiasplastik, mit den bekannten Nachteilen der begrenzten Menge des zur Verfügung stehenden Knochens und der Spendestellenmorbidity von mehr als 30% [2]. Eine gute Möglichkeit, die Probleme des klassischen Gewebeersatzes (Entnahmestellen Morbidity, Immunreaktion auf allogene Transplantate und Lockerung alloplastischer Implantate) zu umgehen, bietet der Einsatz von humanen stromalen Zellen aus dem Knochenmark (human bone marrow stromal cells, hBMSC) [3]. Diese Zellen können eingefroren und wieder aufgetaut werden, ohne ihre Proliferationsfähigkeit oder die osteogene Potenz zu verlieren [4]. Die Selbsterneuerung und Pluripotenz der Zellen führte dazu, dass sie als adulte Stammzelle angesehen werden [5]. Die Induktion zur unterschiedlichen Differenzierung wird durch unterschiedliche Kulturverfahren hervorgerufen. Dexamethason ist als antiinflammatorisches Medikament bekannt. Zusammen mit anderen Mediumzusätzen wie β -Glycerophosphat und Ascorbinsäure wird es experimentell als osteoinduktives Medium verwandt [6]. Es zeigt dabei ein dosis- und zeitabhängiges Profil, das durch die verbesserte Funktion von Wachstumsfaktoren und den Nachweis osteogener Marker belegt wurde. Mechanischer Stress führt zu einer vermehrten Knochenneubildung, einer Steigerung der Mineralisation und stimuliert die Osteoblastentätigkeit. Diese Mechanismen führen zu einer Optimierung der Knochenarchitektur [7]. Die extrazelluläre Matrix und die Integrine spielen eine wichtige Rolle in der Mechanotransduktion, die ein wichtiger Faktor ist für die koordinierte Anpassung miteinander verbundener Gewebe. Die Kombination von bestimmten Kulturbedingungen und mechanischem Stress kann in einem Bioreaktor erreicht werden [8]. Bioreaktoren sind allgemein betrachtet Systeme, die Vorteile bei der Herstellung eines Produktes bringen, wie bspw. Bier, Medikamente oder Gewebe.

Ziel der Studie war es, erstens den Einfluss von Dexamethason im Nährmedium von humanen stromalen Zellen aus dem Knochenmark (human bone marrow stromal cells, hBMSC) zu untersuchen. Und zweitens die Effekte von zyklischem, mechanischem Dehnungsstress von zwei und acht Prozent über einen Zeitraum von drei aufeinander folgenden Tagen auf die osteogene Differenzierung zu bestimmen. Die Genexpression von Markern für die osteogene, die ligamentäre und die chondrogene Differenzierung nach dem ersten, vierten und siebten Tag wurde bestimmt. Die osteogene Differenzierung der hBMSC wurde mittels der Expressionsraten des Kollagens Typ I und Typ III untersucht. Diese spielen eine wichtige Rolle in der extrazellulären Knochenmatrix. Weiterhin wurde als ein früher Marker für die osteogene Differenzierung der hBMSC die Expressionsrate des Core-binding factor alpha-1 (Cbfa1) bestimmt. Cbfa1 ist ein osteoblastenspezifischer Transkriptionsfaktor, der wichtig ist für die osteogene Differenzierung, die Knochenneubildung und den

Knochenerhalt [9]. Als Negativkontrollen dienten die Expressionsrate des Tenascin C, ein Marker für die fibroblastäre Differenzierung und Kollagen Typ II, ein Marker der chondrogenen Differenzierung von hBMSC.

Material und Methode

Zellkultur

Humane BMSCs wurden von sieben Spendern im Alter zwischen 26,3 und 38,7 Jahren gewonnen. Die Zellen sind nach vorheriger Aufklärung der Patienten während eines Routineeingriffes mit Entnahme eines Knochenspanns aus dem Beckenkamm als Vorpunktion entnommen worden (mit Zustimmung der lokalen Ethikkommission, Antrag Nummer 2562). Nach der Aspiration aus dem Knochenmark wurden die Proben nach einem standardisierten Protokoll mit einem Dichtegradienten aufbereitet [10]. Das Zellpellet wird auf einen Percoll-Gradienten aufgetragen. Die so gereinigten Zellen werden dann in die Kultur überführt. Es wurde dann unter Standardbedingungen (37°C und einer feuchten Atmosphäre mit 5% Kohlendioxid) kultiviert. Das Standardmedium bestand aus Dulbeccos modifiziertem Eagle-Medium (DMEM/Ham's F-12 1 : 1 mit 10% humanem Serum, L-Glutamin, 5 μ g/ml Vitamin C, 100 U/l Penicillin und 100 mg/ml Streptomycin). Der erste Mediumwechsel fand nach 4 Tagen statt und dann alle 2 Tage, bis nach 3 bis 4 Wochen die Zellen konfluieren. Ab der ersten Passage wurde dem Kulturmedium des einen Versuchsarmes 2,55 μ M Dexamethason zugesetzt. Um eine ausreichende Anzahl an hBMSCs zu bekommen, wurde eine weitere Passage mit Aufteilung der Zellen auf mehrere Kulturflaschen durchgeführt, bevor die Zellen aller Spender gepoolt wurden. Im Anschluss daran wurden $2,5 \times 10^5$ Zellen in flexible, sterile Silikonschalen ausgesät und für drei Tage mit dem Standardnährmedium mit und ohne Dexamethason kultiviert, um den Zellen eine Adhäsion an den Schalengrund zu ermöglichen. Nach den drei Tagen wurde der Anteil des humanen Serums für einen Tag lang von 10% auf 1% reduziert.

Dehnungs-Stressversuche

Unser Zelldehnungssystem wurde erstmals für humane Fibroblasten beschrieben [11]. Ein ähnliches kam in anderen Arbeitsgruppen zu osteogenen Untersuchungen zum Einsatz [12]. Das System bestand aus einer rechteckigen Silikonschale, die auf der einen Seite an einer feststehenden Metallhalterung eingespannt wird und auf der anderen Seite an einer beweglichen Halterung befestigt ist, die mit dem Motor verbunden ist, der die mechanische Dehnung der Silikonschale um 2% und 8% durchführte (Abb. 1). Die Frequenz, mit der die Dehnung ausgeführt wurde, betrug 1 Hz.

Die Zellen wurden in sechs Gruppen unterteilt. Gruppen 1–3 wurden ohne Dexamethason im Nährmedium kultiviert (D–) und Gruppen 4–6 mit 2,55 μ M Dexamethason (D+). Gruppen 1 und 4 wurden ohne Dehnungsstress als Kontrolle kultiviert (D–0; D+0). Die Zellen der Gruppen 2 und 5 wurden einem zyklischen, mechanischen Dehnungsstress von 2% ausgesetzt mit einer Frequenz von 1 Hz (D–2; D+2). Die Stressdauer bestand aus täglich drei Zyklen mit je zwei Stunden Stress und einer Stunde Pause am ersten, zweiten und dritten Tag. Die Zellen der

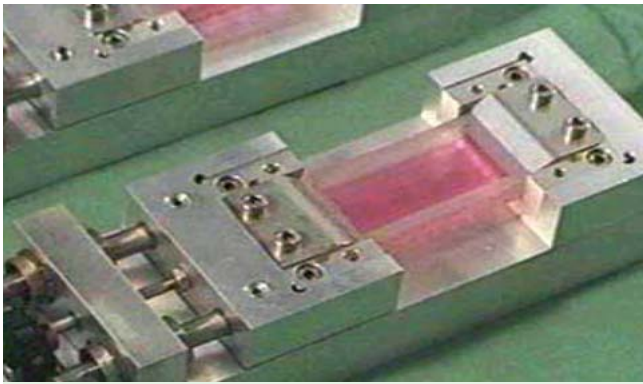


Abb. 1 Silikonschale mit den auf dem Boden adhärenen hBMSC, die hier durch eine Maschine einem zyklischen, mechanischen Dehnungsstress ausgesetzt wird.

Gruppen 3 und 6 wurden einem zyklischen, mechanischen Dehnungsstress von 8% unterzogen, auch hier mit einer Frequenz von 1 Hz (D-8; D+8). Auch in diesen Gruppen bestand die Stressdauer aus täglich drei Zyklen mit jeweils zwei Stunden Stress und einer Stunde Pause an den Tagen eins, zwei und drei. Während der Stressversuche und auch in den vier Tagen danach wurde täglich das Nährmedium gewechselt. Die Stressversuche fanden unter Standardbedingungen (37°C und einer feuchten Atmosphäre mit 5% CO₂) statt. Die Zellentnahmen für die weiteren Auswertungen fanden am ersten Stresstag nach Stressbeginn, am vierten Tag (erster Tag nach Stress) und am siebten Tag (vierter Tag nach Stress) statt (• Tab. 1).

Genexpression mittels RT-PCR

Für die Genexpressionsanalyse wurde ein modifiziertes Protokoll verwandt [13]. Mit Trizol (Invitrogen, Karlsruhe) wurden die Zellen nach Herstellerangaben aus den Silikonschalen gelöst und die RNA extrahiert. Das RNA-Pellet wurde mit Ethanol gewaschen, dann getrocknet und in DEPC-H₂O resuspendiert. Anschließend erfolgte nach fotometrischer Bestimmung der isolierten RNA-Menge das Erstellen der cDNA. Dafür wurde die Reverse Transkriptase Superskript II (Invitrogen, Karlsruhe) und ein Taq Polymerase Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) verwendet.

Die erfolgreiche reverse Transkription wurde mit einer Standard-PCR für GAPDH (Primer siehe • Tab. 2) bestätigt. Als Marker für die osteogene Differenzierung der hBMSC wurden die Expressionsraten des Kollagens Typ I und Typ III untersucht. Die osteogene Differenzierung wurde mit Core-binding factor alpha-1 bestimmt.

Als Negativkontrolle für eine osteogene Differenzierung der hBMSC wurde die Expressionsrate des Tenascin C, ein Marker für die fibroblastäre Differenzierung, quantifiziert sowie für eine chondrogene Differenzierung Kollagen Typ II bestimmt.

Es wurden 1 µg der cDNA (10 µl) in PCR-Tubes gefüllt und mit 40 µl eines Mastermixes bestehend aus 1 µl dNTP (20 mM), 1 µl forward Primer und 1 µl reverse Primer (je 25 µM; Sequenzen siehe • Tab. 2), 5 µl 10 × Puffer, 10 µl Q-Solution, 21,5 µl destilliertes Wasser und 0,5 µl Taq-Polymerase (2,5 U/µl) je Probe vermischt. Die Tubes wurden in den Thermocycler gestellt und mit folgendem PCR-Programm behandelt: Einmalig 5 min bei 95°C, dann folgte ein Zyklus mit 45 s bei 95°C, 45 s bei 60°C und 45 s bei 72°C. Die Wiederholung dieses Zyklus fand 33-mal statt, dann gab es einen zweiten Stopp für 7 min bei 72°C und am Ende des Programms eine Kühlung bei 4°C. Die Auftrennung der hergestellten DNA-Stücke fand mittels Gelelektrophorese in einem Agarosegel statt. Die Auswertung des mit UV-Licht angestrahlten Agarosegels wurde mit dem Programm BioDoc durchgeführt.

Statistik

Die statistische Auswertung wurde mit dem Programm SPSS 10.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) durchgeführt. mRNA-Expressionen wurden zur GAPDH relativiert, sodass der quantitative Unterschied der mRNA-Menge in den einzelnen Proben zu vernachlässigen ist. Aus den Werten der einzelnen Gruppen wurden die Mittelwerte und die Standardabweichungen berechnet und dann mithilfe des Oneway Anova-Tests und dem Post-hoc-Test miteinander verglichen, um statistisch signifikante Unterschiede festzustellen.

Die grafischen Darstellungen der Ergebnisse in Säulendiagrammen wurden mit dem Programm SigmaPlot erstellt, wobei die Zeit auf der Abszisse aufgetragen wurde und die exprimierte Genmenge dividiert durch die Menge an GAPDH auf der Ordinate.

Tab. 1 Zeitpunkte und Dauer der Stressapplikation und die Zeitpunkte der Probenentnahmen.

Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 7
3 × 2 Stunden zyklischer Dehnungsstress mit einer Frequenz von 1 Hz, ggf. Entnahme der Zellen für die PCR	3 × 2 Stunden zyklischer Dehnungsstress mit einer Frequenz von 1 Hz	3 × 2 Stunden zyklischer Dehnungsstress mit einer Frequenz von 1 Hz	Entnahme der Zellen für die PCR	Entnahme der Zellen für die PCR

GAPDH forward	5'-ACCACAGTCCATGCCATCAG-3'
GAPDH reverse	5'-TTCACCACTTGTGCTGTA-3'
Kollagen Typ I forward	5'-AGCCAGCAGATCGAAGCAT-3'
Kollagen Typ I reverse	5'-TCTGTCTTGGGGTTCTTG-3'
Kollagen Typ II forward	5'-AGAAGGGAGAAGTTGGACCT-3'
Kollagen Typ II reverse	5'-GACCATCTTTCCAGAAGGA-3'
Kollagen Typ III forward	5'-CAGGTGAACGTGGAGCTGC-3'
Kollagen Typ III reverse	5'-TGCCACCAGTGTTCCTGG-3'
Core-binding factor alpha-1 forward	5'-GAGTGGACGAGCAAGAG-3'
Core-binding factor alpha-1 reverse	5'-GGGTGGTAGAGTGGATGG-3'
Tenascin C forward	5'-TCTGTGCATAGTAAAAACAATACC-3'
Tenascin C reverse	5'-TCAAGGCAGTGGTCTGTGA-3'

Tab. 2 Primersequenzen für die RT-PCR.

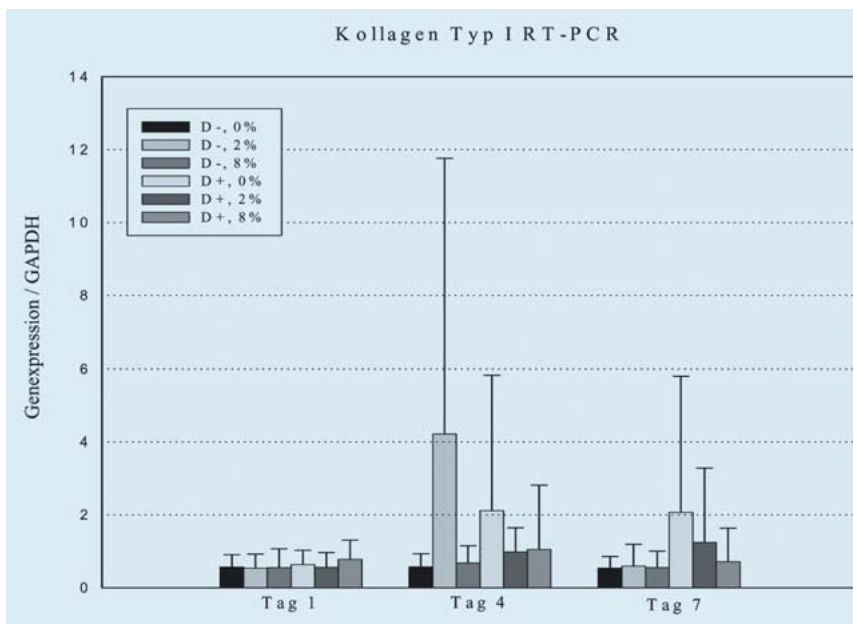


Abb. 2 Relative Genexpression von Kollagen Typ I in den sechs verschiedenen Gruppen an den Tagen 1, 4 und 7.

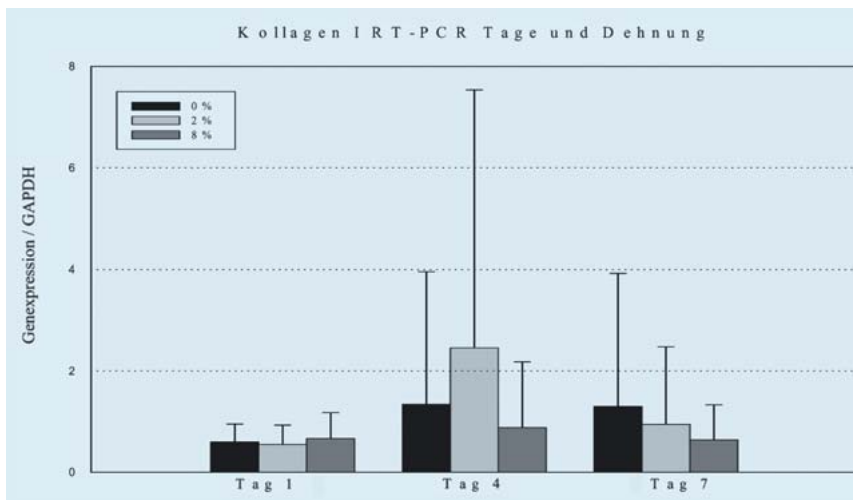


Abb. 3 Relative Genexpression von Kollagen Typ I in den Gruppen mit 0%, 2% und 8% Dehnung an den Tagen 1, 4 und 7.

Ergebnisse

Expression von Kollagen Typ I und III

Für die Genexpression von Kollagen Typ I ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede bei der Betrachtung der Tage, der Dosis von Dexamethason oder des zyklischen Dehnungsstress unterschiedlicher Intensität (Abb. 2). Am ersten Tag ist die Genexpression gleichmäßig niedrig und zeigt an den folgenden Tagen unregelmäßige Schwankungen mit teilweise hohen Standardabweichungen. Im Fokus der Zeit und des zyklischen Dehnungsstress sind keine statistisch signifikanten Unterschiede festzustellen (Abb. 3). Es zeigt sich eine gleichmäßige Genexpression in allen Gruppen des ersten Tages. Am vierten und siebten Tag zeigten die Proben ohne Stress eine nahezu identisch gestiegene Genexpression von Kollagen Typ I. Die Expression bei zwei Prozent Dehnung am vierten Tag war am höchsten und ging am siebten Tag wieder zurück. Bei den Proben, die mit acht Prozent gedehnt wurden, zeigte sich am vierten und siebten Tag eine gleichmäßige Genexpression im Vergleich

zum ersten Tag mit einer geringfügig gesteigerten Expression am zweiten Tag.

Auch bei der Genexpression von Kollagen Typ III zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede (Abb. 4). Am ersten Tag zeigte sich eine gleichmäßige Genexpression in allen sechs Gruppen. Am vierten Tag war eine Steigerung besonders in den beiden Gruppen, die mit zwei Prozent gedehnt wurden, zu beobachten, genauso in der Gruppe mit acht Prozent Dehnung und dem Zusatz von Dexamethason. In den übrigen Gruppen war die Genexpression eher gleich geblieben bzw. leicht zurückgegangen. Die Genexpression am siebten Tag zeigte einen Rückgang im Vergleich zum vierten Tag. An diesem Tag wurden die höchsten Expressionen in der Gruppe mit zwei Prozent Dehnung und dem Zusatz von Dexamethason und in der Gruppe ohne Dehnung und ohne Dexamethason festgestellt. Die geringste Genexpression war in der Gruppe ohne Dehnung und mit dem Zusatz von Dexamethason zu finden. Insgesamt zeigte sich die Genexpression des Kollagen Typ III variabel.

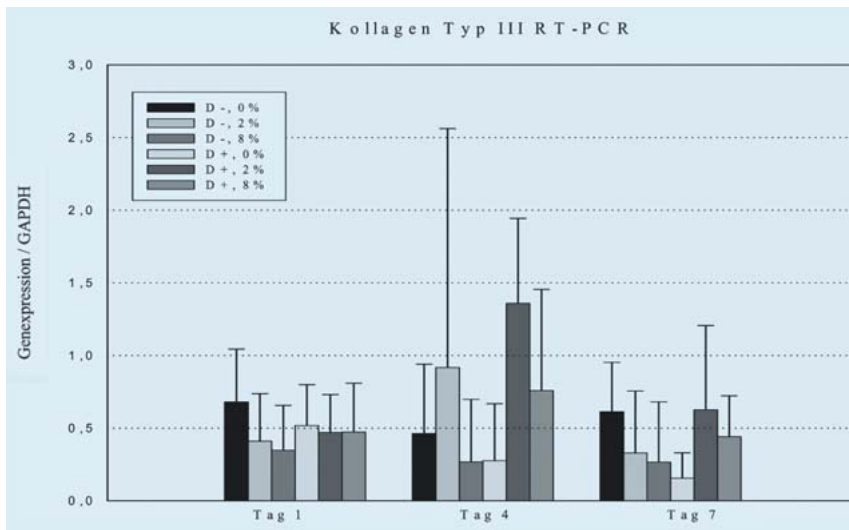


Abb. 4 Relative Genexpression von Kollagen Typ III in den sechs verschiedenen Gruppen an den Tagen 1, 4 und 7.

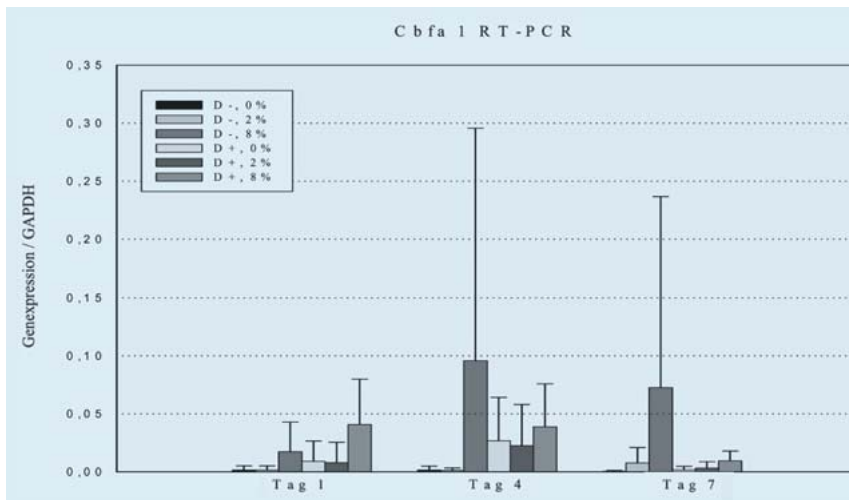


Abb. 5 Relative Genexpression von Cbfa1 in den sechs verschiedenen Gruppen an den Tagen 1, 4 und 7.

Expression von Kollagen Typ II

Eine Expression von Kollagen Typ II war bei keiner der Proben nachweisbar.

Cbfa 1

Betrachtet man Cbfa1 unter dem Einfluss von Dexamethason und zyklischem Dehnungsstress, so sind auch hier keine statistisch signifikanten Unterschiede festzustellen (Abb. 5). Die Tendenzen, die sich in der Expression von Cbfa1 abzeichnen, zeigen am ersten Tag eine geringere Expression ohne und mit zwei Prozent Stress als mit acht Prozent Stress. Darüber hinaus zeigt sich in allen drei Gruppen mit Zusatz von Dexamethason eine höhere Expression als ohne Dexamethason.

Am vierten Tag zeigte die Gruppe mit acht Prozent und ohne den Zusatz von Dexamethason die höchste Genexpression, die zweithöchste war in der Gruppe mit acht Prozent Dehnung und Dexamethason zu finden, dann folgten die Gruppen ohne Stress und mit zwei Prozent Stress, beide mit dem Zusatz von Dexamethason. In den Gruppen ohne Stress und mit zwei Prozent Stress, ohne den Zusatz von Dexamethason, war die Genexpression am geringsten.

Am siebten Tag zeigte sich wieder, wie am vierten Tag, die höchste Genexpression in der Gruppe mit acht Prozent und ohne

den Zusatz von Dexamethason. Auch hier wurde in der Gruppe mit acht Prozent Dehnung und Dexamethason die zweithöchste Cbfa1-Expression nachgewiesen, jedoch gab es kaum einen Unterschied zu der Gruppe mit zwei Prozent Dehnung ohne Dexamethasonzusatz. Am geringsten war an diesem Tag die Genexpression bei den Gruppen ohne Stress, mit und ohne den Zusatz von Dexamethason.

Reduziert man den Betrachtungsschwerpunkt auf den Einfluss des zyklischen Dehnungsstress und der Zeit auf die Genexpression von Cbfa1, so findet man am ersten und siebten Tag statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) (Abb. 6).

Am ersten Tag bestand eine signifikant höhere Genexpression in der Gruppe, die mit acht Prozent gedehnt wurde, im Vergleich zu der Gruppe ohne Dehnung (8%: $0,0291 \pm 0,0338$, 0%: $0,00528 \pm 0,0127$, $p = 0,017$). Genauso bestand eine signifikant höhere Genexpression in der Gruppe mit acht Prozent Dehnung im Vergleich zu der Gruppe mit zwei Prozent Dehnung (8%: $0,0291 \pm 0,0338$, 2%: $0,0047 \pm 0,0125$, $p = 0,015$).

Am vierten Tag bestand kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den unterschiedlichen Gruppen, jedoch ließ sich auch an diesem Tag eine höhere Expression der Zellen, die mit acht Prozent gedehnt wurden, im Vergleich zu den Zellen mit zwei Prozent Dehnung und ohne Dehnung feststellen.

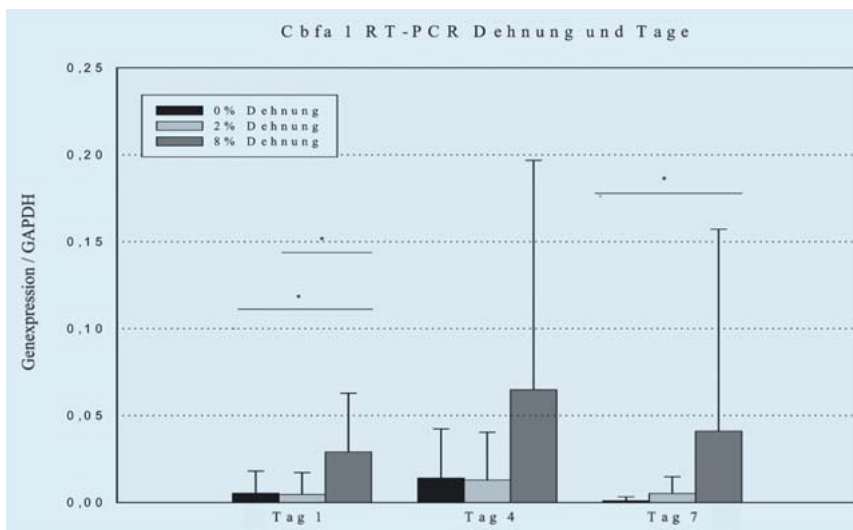


Abb. 6 Relative Genexpression von Cbfa1 in den Gruppen mit 0%, 2% und 8% Dehnung an den Tagen 1, 4 und 7. Strich und Stern kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede.

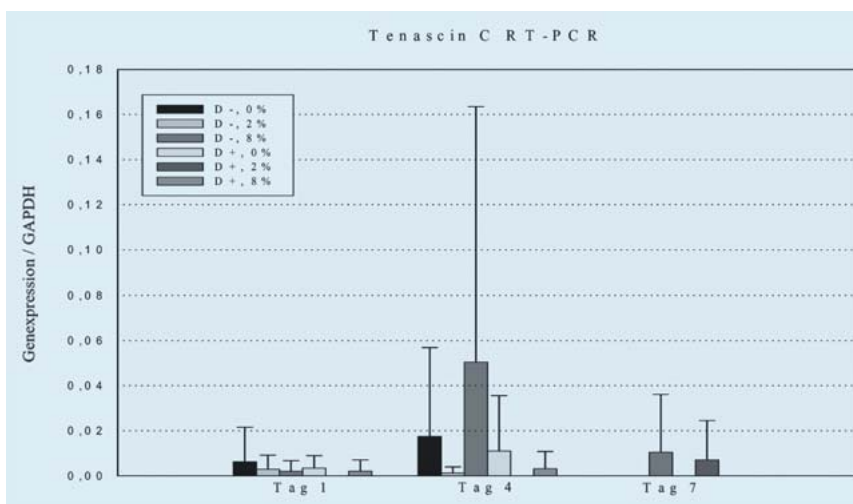


Abb. 7 Relative Genexpression von Tenascin C in den sechs verschiedenen Gruppen an den Tagen 1, 4 und 7.

Am achten Tag bestand eine statistisch signifikant höhere Genexpression der Gruppe mit acht Prozent Dehnung im Vergleich zu der Gruppe ohne Dehnung (8%: $0,0411 \pm 0,116$, 0%: $0,00103 \pm 0,00217$, $p=0,009$). Der Unterschied zwischen der Gruppe mit zwei Prozent und acht Prozent Dehnung war statistisch nicht signifikant, zeigte aber auch hier die Tendenz einer stärkeren Genexpression im Zusammenhang mit einer Dehnung von acht Prozent.

Tenascin-C

Die Beobachtung der Auswirkungen von Dexamethason und zyklischem mechanischem Dehnungsstress auf die Genexpression von Tenascin C erbrachte keine statistisch signifikanten Unterschiede (Abb. 7).

Am ersten Tag zeigt sich eine eher gleichmäßige, geringe Genexpression in allen Gruppen. Nur in der Gruppe mit Dexamethasonzusatz und zwei Prozent Dehnung war es nicht möglich, die Expression von Tenascin C nachzuweisen.

Am vierten Tag war eine erhöhte Genexpression in den Gruppen ohne Stress und ohne Dexamethasonzusatz, in der Gruppe mit acht Prozent Dehnung und ohne Dexamethason und in der Gruppe ohne Dehnung und mit Dexamethasonzusatz festzustellen. In der Gruppe mit zwei Prozent Dehnung und Dexametha-

son konnte wieder keine Tenascin-C-Expression nachgewiesen werden.

Am siebten Tag zeigte sich ein anderes Bild: Hier war es nur noch in den Gruppen mit acht Prozent Dehnung und ohne Dexamethason und in der Gruppe mit zwei Prozent Dehnung und Dexamethasonzusatz möglich, eine Tenascin-C-Expression nachzuweisen. In allen anderen Gruppen ließ sich keine Genexpression von Tenascin C mehr nachweisen.

Diskussion

Mittels Methoden der regenerativen Medizin könnten neue Therapieansätze zur Rekonstruktion von großen Knochendefekten entwickelt werden. Ziel der Studie war es, den Einfluss von Dexamethason im Nährmedium von humanen stromalen Zellen aus dem Knochenmark und die Effekte von zyklischem, mechanischem Dehnungsstress auf die osteogene Differenzierung zu bestimmen. Die Arbeit konnte zeigen, dass über den kurzen Beobachtungszeitraum von sieben Tagen zyklischer mechanischer Dehnungsstress ein stärkerer osteogener Differenzierungsinduktor ist als Dexamethason.

Dexamethason hat eine induzierende Wirkung auf die Differenzierung der hBMSC zu Osteoblasten. Nach der Gabe von Dexamethason zeigt sich in der hBMSC-Kultur ein früher Abfall von Osteopontin und Bone Sialoprotein, zusammen mit einer verminderten Expression von Osteocalcin. Diese Änderung weist darauf hin, dass die Suppression dieser negativ geladenen Proteine nötig ist, um ein Maximum an dexamethasoninduzierter Mineralisation zu erreichen [14]. Im Gegensatz dazu führt Dexamethason zu einem Anstieg der Kollagen-Typ-I- und -III-Expression [15]. Neben Dexamethason und Vitamin D₃ haben auch β -Glycerolphosphat, Vitamin-C-Phosphat [16] und mechanischer Stress einen positiven Einfluss auf die osteogene Differenzierung der hBMSC.

Es wurden bereits intensiv die Auswirkungen von zyklischem Dehnungsstress (1%) bei sehr ähnlichem Versuchsaufbau auf Osteoblasten aus kallösen Knochenstücken untersucht und auch auf die Differenzierung und Proliferation von Zellen im Kallusgewebe übertragen [17]. In diesen Versuchen hat sich gezeigt, dass die Expression von Prokollagen und Propeptiden gesteigert werden kann, jedoch die Synthese der alkalischen Phosphatase und des Osteocalcin abnahm. Die axiale Dehnung scheint für Osteoblasten besonders wichtig [18]. Aus diesem Grund wurde auch auf die hBMSC in dieser Arbeit ein axialer Dehnungsstress appliziert, allerdings mit anderen und unterschiedlichen Größen an Dehnungsstress. Die Antwort der kultivierten Zellen auf mechanischen Dehnungsstress ist abhängig von der Zeit, die die Zellen bereits kultiviert wurden. Stress zu einem sehr frühen Zeitpunkt, nach sieben Kulturtagen, steigert die Apoptoserate und inhibiert das Zellwachstum. Wird der Stress erst nach 14 Tagen appliziert, fördert er die osteogene Differenzierung der Zellen und führt zu einem gesteigerten Zellwachstum [19]. Die Applikation von Stress in dieser Arbeit fand frühestens nach sechs Wochen statt und war damit außerhalb des Zeitraums, in dem der Stress eine gesteigerte Apoptose zur Folge hatte. Cbfa1 ist ein osteoblastenspezifischer Transkriptionsfaktor, der wichtig ist für die osteogene Differenzierung, die Knochenneubildung und den Knochen-erhalt [9]. Auch Dexamethason steigert die Expression von Cbfa1 [9]. Die Aktivität von Cbfa1 wird über die Transkriptionsrate, die anwesenden Proteine und die DNA-Bindungs-kapazität während der osteogenen Differenzierung reguliert [21]. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass zyklischer mechanischer Dehnungsstress die osteogene Differenzierung der hBMSC in vitro induzieren kann. So findet eine signifikant höhere Expression von Cbfa1 bei einer Dehnung von acht Prozent statt im Vergleich zu den Proben mit einer Dehnung von zwei Prozent oder ohne Dehnung. Die Dehnung der auf den Silikonschalen adhären-ten BMSC unterscheidet sich von der Stimulation, die von anderen Autoren verwendet wurde [13]. Hier wurden die BMSC in eine Kollagenmatrix eingebettet und zwei Wochen lang einem kontinuierlichen axialen und rotatorischen Stress ausgesetzt. Unter diesen Bedingungen war es nicht möglich, eine osteogene Differenzierung nachzuweisen. Der Gebrauch einer Kollagenmatrix und die unterschiedliche Zusammensetzung des Kulturmediums mit dem Zusatz von Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF) können zu den unterschiedlichen Ergebnissen der beiden Studien geführt haben. Ein weiterer Faktor für die unterschiedlichen Ergebnisse der beiden Studien kann die unterschiedliche Stressapplikation sein. In einer anderen Studie wurde das axiale Dehnungs-limit für Fibroblasten ($4,2 \pm 0,4\%$) und Osteoblasten ($6,4 \pm 0,6\%$) untersucht [18]. Dieser Stressgrad für Osteoblasten korrespondiert mit den Ergebnissen unserer Untersuchungen, in denen ein signifikanter Anstieg der Cbfa1-Expression in den Gruppen

stattfand, die einem zyklischen Dehnungsstress von acht Prozent ausgesetzt waren.

Ein sehr wichtiges Kriterium für den erfolgreichen Einsatz des Dexamethasons ist der kontinuierliche Zusatz zum Nährmedium, da eine mehrtägige Pause in der Dexamethasongabe zu einem starken Abfall der exprimierten osteogenen mRNA führt, der auch durch erneute Gabe von Dexamethason nicht wieder ausgeglichen werden kann [22]. Dies könnte eine Erklärung für die nicht eindeutige Differenzierungsrichtung der hBMSC durch Dexamethason in dieser Studie sein. Hier wurde Dexamethason lediglich bei jedem Mediumwechsel alle zwei bis vier Tage zugegeben.

Ein großer Schwachpunkt dieser Untersuchungen ist der kurze Beobachtungszeitraum und die Heterogenität der hBMSC in Bezug auf die Morphologie und die Differenzierung.

Die Ergebnisse der Arbeit zeigen in Verbindung mit der aktuellen Literatur, dass die Zugabe von Dexamethason zum Nährmedium der hBMSC und die Applikation von zyklischem mechanischem Dehnungsstress einen positiven Einfluss auf die osteogene Differenzierung der humanen stromalen Zellen aus dem Knochenmark hat. In dem kurzen Beobachtungsintervall dieser Arbeit hat sich der zyklische mechanische Dehnungsstress als ein deutlich potenteres Mittel zur Induktion der osteogenen Differenzierung herausgestellt.

Besonders die Chancen des Tissue Engineering, traumatisierte, kranke oder degenerierte Knochen und Gelenke wieder herzustellen oder ihre Funktion zu verbessern, wird auch noch weiterhin eine große Herausforderung bleiben, da das perfekte Regenerationsprotokoll noch nicht etabliert werden konnte.

Schlussfolgerung



Die Methoden der regenerativen Medizin ermöglichen unter anderem den Einsatz von Bioreaktoren. Die osteogene Differenzierung von hBMSC kann durch mechanischen Stress stärker als durch Mediumzusätze wie Dexamethason gefördert werden. Daraus darf geschlossen werden, dass für die In-vitro-Generierung die Qualität und Quantität des Tissue-engineered-Gewebes günstig durch physikalische Stimuli in Hinblick auf die Ausbildung von Knochen beeinflusst werden kann und eine zentrale Rolle bei der Herstellung spielen muss.

Interessenkonflikt: Nein

Literatur

- 1 Schieker M, Mutschler W. [Bridging posttraumatic bony defects. Established and new methods]. Unfallchirurg 2006; 109: 715–732
- 2 Heary RF, Schlenk RP, Sacchieri TA, Barone D, Brotea C. Persistent iliac crest donor site pain: independent outcome assessment. Neurosurgery 2002; 50: 510–516
- 3 Schaefer DJ, Klemt C, Zhang XH, Stark GB. Tissue engineering with mesenchymal stem cells for cartilage and bone regeneration. Chirurg 2000; 71: 1001–1008
- 4 Lennon DP, Edmison JM, Caplan AI. Cultivation of rat marrow-derived mesenchymal stem cells in reduced oxygen tension: effects on in vitro and in vivo osteochondrogenesis. J Cell Physiol 2001; 187: 345–355
- 5 Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 1999; 284: 143–147
- 6 Byers RJ, Brown J, Brandwood C, Wood P, Staley W, Hainey L, Freemont AJ, Hoyland JA. Osteoblastic differentiation and mRNA analysis of STRO-1-positive human bone marrow stromal cells using primary in vitro culture and poly (A) PCR. J Pathol 1999; 187: 374–381

- 7 Carter DR, Beaupre GS, Giori NJ, Helms JA. Mechanobiology of skeletal regeneration. *Clin Orthop Relat Res* 1998; S41–S55
- 8 Jagodzinski M, Krettek C. Effect of mechanical stability on fracture healing – an update. *Injury* 2007; 38: S3–S10
- 9 Igarashi M, Kamiya N, Hasegawa M, Kasuya T, Takahashi T, Takagi M. Inductive effects of dexamethasone on the gene expression of Cbfa1, Osterix and bone matrix proteins during differentiation of cultured primary rat osteoblasts. *J Mol Histol* 2004; 35: 3–10
- 10 Bruder SP, Fink DJ, Caplan AI. Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *J Cell Biochem* 1994; 56: 283–294
- 11 Zeichen J, van Griensven M, Bosch U. The proliferative response of isolated human tendon fibroblasts to cyclic biaxial mechanical strain. *Am J Sports Med* 2000; 28: 888–892
- 12 Ignatius A, Blessing H, Liedert A, Kaspar D, Kreja L, Friemert B, Claes L. Effekte mechanischer Reize auf humane osteoblastäre Zellen in einer dreidimensionalen Kollagen-Typ-I-Matrix. *Orthopäde* 2004; 33: 1386–1393
- 13 Altman GH, Horan RL, Martin I, Farhadi J, Stark PR, Volloch V, Richmond JC, Vunjak-Novakovic G, Kaplan DL. Cell differentiation by mechanical stress. *FASEB J* 2002; 16: 270–272
- 14 Henriksen Z, Hiken JF, Steinberg TH, Jorgensen NR. The predominant mechanism of intercellular calcium wave propagation changes during long-term culture of human osteoblast-like cells. *Cell Calcium* 2006; 39: 435–444
- 15 Ogston N, Harrison AJ, Cheung HF, Ashton BA, Hampson G. Dexamethasone and retinoic acid differentially regulate growth and differentiation in an immortalised human clonal bone marrow stromal cell line with osteoblastic characteristics. *Steroids* 2002; 67: 895–906
- 16 Yoshikawa T, Ohgushi H, Ichijima K, Takakura Y. Bone regeneration by grafting of cultured human bone. *Tissue Eng* 2004; 10: 688–698
- 17 Kaspar D, Seidl W, Neidlinger-Wilke C, Ignatius A, Claes L. Dynamic cell stretching increases human osteoblast proliferation and C1CP synthesis but decreases osteocalcin synthesis and alkaline phosphatase activity. *J Biomech* 2000; 33: 45–51
- 18 Neidlinger-Wilke C, Grood ES, Wang JHC, Brand RA, Claes L. Cell alignment is induced by cyclic changes in cell length: studies of cells grown in cyclically stretched substrates. *J Orthop Res* 2001; 19: 286–293
- 19 Weyts FA, Bosmans B, Niesing R, van Leeuwen JP, Weinans H. Mechanical control of human osteoblast apoptosis and proliferation in relation to differentiation. *Calcif Tissue Int* 2003; 72: 505–512
- 20 Simmons CA, Matlis S, Thornton AJ, Chen S, Wang CY, Mooney DJ. Cyclic strain enhances matrix mineralization by adult human mesenchymal stem cells via the extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) signaling pathway. *J Biomech* 2003; 36: 1087–1096
- 21 Banerjee C, Javed A, Choi JY, Green J, Rosen V, van Wijnen AJ, Stein JL, Lian JB, Stein GS. Differential regulation of the two principal Runx2/Cbfa1n-terminal isoforms in response to bone morphogenetic protein-2 during development of the osteoblast phenotype. *Endocrinology* 2001; 142: 4026–4039
- 22 Atmani H, Audrain C, Mercier L, Chappard D, Basle MF. Phenotypic effects of continuous or discontinuous treatment with dexamethasone and/or calcitriol on osteoblasts differentiated from rat bone marrow stromal cells. *J Cell Biochem* 2002; 85: 640–650