

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik – Innenstadt  
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität zu München  
Direktor: Prof. Dr. med. Wolf Mutschler

---

**Knochenzellwachstum im  
dreidimensionalen Zellkultursystem**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Michael Stengele  
aus Konstanz

2004

---

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Wolf Mutschler

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Reiner Bartl

Prof. Dr. med. Dr. h. c. Reinhard Putz

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Matthias Schieker

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Klaus Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Juli 2004

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>6</b>
1.1. Grundlagen und bisherige Forschung .....	6
1.1.1. Therapieoptionen und Knochenersatzmittel .....	6
1.1.2. Tissue Engineering von Knochen.....	7
1.1.3. Humane mesenchymale Stammzellen .....	8
1.1.4. Leitschienen .....	9
1.1.5. Beimpfungsmethoden .....	11
1.1.6. Nährmedien und Wachstumsfaktoren .....	12
1.1.7. Bioreaktoren und Kultivierung .....	12
1.1.8. Zellwachstum und Zelldifferenzierung .....	16
1.2. Aufgabenstellung.....	16
1.2.1. Etablierung eines 3-D-Zellkultursystems .....	16
1.2.2. Zellkultivierung im 3-D-System im Zeitverlauf bis zu 6 Wochen.....	16
1.2.3. Zelldifferenzierung und Matrixbildung 2-D vs. 3-D nach 2 Wochen.....	17
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>18</b>
2.1. Versuchsansatz.....	18
2.1.1. Dreidimensionale Kulturen .....	18
2.1.1.1. Leitschienen.....	18
2.1.1.2. Beimpfung der Leitschienen.....	19
2.1.1.3. Bioreaktor.....	19
2.1.1.4. Kultivierungsphase.....	20
2.1.2. Zweidimensionale Kulturen Vergleichsgruppen .....	21
2.2. Versuchsbezogene Methoden.....	21
2.2.1. Fixieren von 3-D-Präparaten und 2-D-Kulturen.....	21
2.2.2. Aufteilung der 3-D-Konstrukte .....	21
2.2.3. Auflichtmikroskopie der 3-D-Konstrukte .....	22
2.2.4. Anfertigung von Kryoschnitten von den 3-D-Konstrukten.....	22
2.2.5. Anfertigung von Schnitten nach MMA-Einbettung .....	23
2.2.6. Histologische Färbung der Schnittpräparate .....	23
2.2.7. Anfertigung von immunhistochemischen Markierungen .....	23
2.2.8. Auswertung und Anfertigung lichtmikroskopischer Aufnahmen.....	24
2.3. Weitere Methoden .....	24

2.3.1. Ansatz von Zellkulturen zur Zellvermehrung .....	24
2.3.2. Passagieren von Zellen.....	25
2.3.3. Herstellen von Nährmedien.....	25
2.3.4. Herstellen und Aliquotieren von Stammlösungen.....	26
2.3.5. Herstellen und Aliquotieren von osteogenic supplement.....	26
2.3.6. Inaktivieren und Aliquotieren von FBS .....	27
2.3.7. Zellzahlbestimmung nach Trypanblaufärbung.....	27
2.3.8. Auftauen von Zellen .....	28
2.3.9. Kryokonservieren von Zellen.....	28
2.3.10. Reinigung und Sterilisation.....	28
2.4. Material.....	29
2.4.1. Allgemeine Materialien .....	29
2.4.2. Versuchsdurchführung .....	30
2.4.3. Versuchsauswertung.....	31
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>33</b>
3.1. Auflichtmikroskopie.....	33
3.2. Histologie.....	33
3.2.1. Histologie nach Anfertigung von Kryoschnitten .....	33
3.2.2. Histologie nach Anfertigung von MMA-Einbettungen .....	34
3.3. Immunhistochemische Markierungen .....	35
3.3.1. 2-D-Kultur Vergleichsgruppen, 2 Wochen .....	35
3.3.1.1. 2-D-Kultur ohne osteogene Stimulation, 2 Wochen .....	36
3.3.1.2. 2-D-Kultur mit osteogener Stimulation, 2 Wochen .....	40
3.3.2. 3-D-Konstrukte mit osteogener Stimulation .....	45
3.3.2.1. 3-D-Konstrukte, 2 Wochen.....	46
3.3.2.2. 3-D-Konstrukte, 4 Wochen.....	49
3.3.2.3. 3-D-Konstrukte, 6 Wochen.....	52
3.3.3. Zusammenfassung der immunhistochemischen Ergebnisse .....	55
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>56</b>
4.1. Etablierung der 3-D-Zellkultur.....	56
4.1.1. Zellen, Zellwachstum und Zelldifferenzierung .....	56
4.1.2. Leitschiene .....	58
4.1.3. Beimpfungsmethode .....	59

---

4.1.4. Bioreaktor und Kultivierung .....	60
4.2. Auswertemethoden.....	61
4.2.1. Zellmorphologie.....	61
4.2.2. Zelldifferenzierung und Matrixbildung.....	62
4.3. Ergebnisse .....	66
4.3.1. Zellmorphologie nach 2, 4 und 6 Wochen in Kultur .....	66
4.3.2. Zelldifferenzierung und Matrixbildung 2-D vs. 3-D.....	66
4.4. Aussage der Arbeit.....	67
4.5. Ausblick.....	67
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>69</b>
<b>6. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>71</b>
Anhang .....	83
Abkürzungsverzeichnis.....	85
Danksagung .....	86
Lebenslauf.....	87
Publikationen .....	90

# 1. Einleitung

## 1.1. Grundlagen und bisherige Forschung

Die Therapie von traumatisch und pathologisch bedingten Defekten des skelettalen Systems ist hinsichtlich kritischer Defektdimensionen nach wie vor mit Problemen behaftet (Schaefer et al. 2000, Stevenson 1998, Doppelt et al. 1981). Innovative Therapiemöglichkeiten verspricht das Prinzip des Tissue Engineering, ein modernes und innovatives Forschungsgebiet (Burg et al. 2000, Vacanti et al. 2000, Minuth et al. 1998). Tissue Engineering von Knochen, d.h. die Generierung von Knochenersatz *in vitro* zur anschließenden Implantation *in vivo* bietet dafür den Ansatz. Die vorliegende Arbeit befasst sich im Rahmen dessen mit dem Thema "Knochenzellwachstum im dreidimensionalen Zellkultursystem".

### 1.1.1. Therapieoptionen und Knochenersatzmittel

Klinische Relevanz erhält die Frage nach geeignetem funktionellen Knochenersatz z.B. bei erworbenen, traumatisch, infektiös oder durch Tumorresektionen bedingten sowie angeborenen Defekten. Erreichen diese Defekte eine Dimension, ab der der Organismus auch bei Anwendung optimaler Therapiestrategien nicht mehr in der Lage ist, sich hinsichtlich Form und insbesondere Funktion selbst zu regenerieren, ist der Einsatz von Knochenersatzmitteln indiziert (Cancedda et al. 2003). Knochenersatzmittel können aber auch bereits bei Defektdimensionen innerhalb der kritischen Grenzen indiziert sein, da in bis zu 10 % dieser Defekte die Wiederherstellung der knöchernen Kontinuität aus unbekanntem Gründen ausbleibt (Einhorn 1999). Knochenersatz kann sowohl organischen als auch anorganischen Ursprungs sein (Bauer et al. 2000). An der Stelle eines Defektes wird geeignetes Material eingebracht und mittels Osteosyntheseverfahren stabilisiert. Das implantierte Knochenersatzmaterial fördert die Knochenheilung, indem es den Ansatz zum Durchbau des skelettalen Defektes bietet. Als Resultat entsteht mechanisch belastbarer Knochen, der den physiologischen Umbauvorgängen im Organismus unterworfen werden kann (Rueger 1998, Rueger 1996). Als derzeitiger Goldstandard wird die autogene Knochentransplantation angesehen (Parikh 2002, Rueger 1996, Ecke 1982, Holz et al. 1982). Eine weitere Möglichkeiten bestehen in der Auffüllung eines Defektes mit allogenen Spendermaterial. Alternative Therapien sind die Distraktionsosteogenese und der Segment-

transport bei Unterbrechung der Kontinuität langer Röhrenknochen (Rueger 1998). Alle diese Therapieverfahren sind jedoch meist mit teils erheblichen Nachteilen und Einschränkungen verbunden. Diese reichen von der limitierten Verfügbarkeit autogenen Materials und der Notwendigkeit von Zweiteingriffen zur Materialentnahme über postoperative Beschwerden an der Entnahmestelle bis hin zur Problematik von Abstoßungs- und Entzündungsreaktionen sowie der Infektionsgefahr bei allogenen Transplantaten (Schaefer et al. 2000, Stevenson 1998, Doppelt et al. 1981). Alleine in Deutschland wurden bereits Mitte der neunziger Jahre pro Jahr über 10.000 Eingriffe mit Verwendung von autogenen, bzw. allogenen Knochentransplantaten vorgenommen (Knaepler et al. 1994). Ausgehend von dieser nicht unerheblichen Anzahl von Indikationen liegt im Sinne des Tissue Engineering der Gedanke nahe, aus wirkungsneutralen und biologisch integrierbaren Biomaterialien in Verbindung mit vergleichsweise kleinen Mengen autogener Zellen Knochenersatzmittel in der gewünschten Form und Größe unter optimierten Bedingungen *in vitro* zu generieren (Ringe et al. 2002). Das Knochenersatzmittel kann dann nach Implantation in den menschlichen Organismus dort vorhandene strukturelle Elemente sowie ganze Gewebe und deren Funktion ersetzen (Rueger 1998). Seit Mitte der sechziger Jahre befassen sich Forschungsgruppen weltweit mit der Umsetzung dieses zukunftsweisenden Konzeptes, dem Tissue Engineering von Knochen (Vacanti et al. 1999, Oreffo et al. 1999, Friedenstein et al. 1966).

#### 1.1.2. Tissue Engineering von Knochen

Tissue Engineering ist per definitionem die Verwendung von Zellen, beeinflusst durch Zytokine bzw. gentechnische Maßnahmen, kombiniert mit biogenen bzw. synthetischen Materialien, zur Herstellung von biologischen Ersatzstoffen zum funktionellen Gewebersatz (Vacanti et al. 1998). Die Funktionalität impliziert dabei gewebetypische Eigenschaften wie z.B. mechanische Belastbarkeit bei Knochenersatz (Athanasίου et al. 2000). Tissue Engineering von Knochen bedeutet damit in idealer Weise die Generierung von implantierbarem Knochenersatz *in vitro* unter Verwendung von patienteneigenen Zellen, dem Zusatz geeigneter Wachstumsfaktoren in Verbindung mit biologisch integrierbaren, dreidimensionalen Leitschienen (Bruder et al. 1999). Dazu ist prinzipiell zunächst die Isolierung und Identifikation sowie die Selektion geeigneter Zellen aus patienteneigenem Spendermaterial erforderlich. Weiterhin ist die Auswahl geeigneter osteogen wirkender Wachstumsfaktoren sowie die

Testung wirkungsneutraler und biokompatibler Leitschienen sowie die Bereitstellung eines entsprechenden Zellmilieus *in vitro* notwendig. Die auf die Leitschienen aufgebrachtten Zellen siedeln sich dort an, proliferieren und differenzieren zu Zellen der osteoblastären Differenzierungskaskade. Im Zuge dessen erfolgt auch die Bildung und die Reifung extrazellulärer Matrix. Das so entstehende Knochenersatzmaterial soll nach Implantation und Remodelling vollständig im Organismus integriert sein (Yaszemski et al. 1996). Die Vorbesiedelung der Leitschienen *in vitro* liefert dabei gegenüber der Verwendung unbesiedelten Knochenersatzes signifikant bessere Ergebnisse (Holy et al. 2003, Petite et al. 2000). Insbesondere aber das fein abgestimmte Zusammenspiel aller beteiligten Komponenten und Faktoren ist entscheidend (Noel et al. 2002, Reddi 2000). Tissue Engineering von Knochen bietet somit das Potential zur Schaffung von Knochenersatzmaterial in nahezu beliebiger anatomisch relevanter Größe und Form, bei weitgehender Vermeidung unerwünschter Wirkungen wie z.B. Abstoßungs- und Entzündungsreaktionen. Weiterhin besteht die Möglichkeit zur Vereinfachung von belastenden konventionellen Therapieformen, und auch bisher nicht oder nur schwer therapierbare skelettale Defekte scheinen künftig beherrschbar. Neben einer adäquaten Laborinfrastruktur erfordert das Tissue Engineering von Knochen die Kenntnis der molekularbiologischen Grundlagen des Knochenwachstums (Caplan et al. 1999), Methoden zur Charakterisierung, Identifikation und Selektion geeigneter autogener Zellen (Voegelé et al. 2000), die Anreicherung dieser Zellen und schließlich die Kultivierung dreidimensionaler Konstrukte *in vitro*.

### 1.1.3. Humane mesenchymale Stammzellen

Als Ausgangsmaterial kommen Zellen in Frage, die ausreichend Potential zur Selbstreplikation und zur Differenzierung in Zellen der osteoblastären Differenzierungskaskade besitzen (Pittenger et al. 1999). Pluripotente mesenchymale Stammzellen erscheinen aus diesem Grund besonders geeignet. Pluripotenz bezeichnet dabei die Fähigkeit physiologisch undifferenzierter Zellen, sich unter definierten Bedingungen zwar nicht in alle, jedoch in bestimmte Zellen bzw. Gewebe zu differenzieren. Humane Mesenchymale Stammzellen lassen sich in die verschiedensten menschlichen Gewebe, wie z.B. Sehnen, Bänder, Knorpel und Knochen differenzieren (Lu et al. 2002, Devine et al. 2001, Minguell et al. 2001, Pittenger et al. 1999, Jaiswal et al. 1997). Im adulten menschlichen Organismus konnten mesenchymale

Stammzellen bisher in über 20 Organen nachgewiesen werden, u.a. im Knochenmark (Pittenger et al. 1999). Die Verwendung adulter Stammzellen erübrigt darüber hinaus die nach ethischen Gesichtspunkten umstrittene Verwendung embryonaler Stammzellen. Die mesenchymalen Stammzellen können *in vitro* vermehrt und unter definierten Bedingungen sowie dem Zusatz von Wachstumsfaktoren differenziert werden. Über viele Zwischenstadien zu Osteoprogenitorzellen und weiteren Stufen hin zu Prä-Osteoblasten ist die Zielzelle der osteoblastären Differenzierungskaskade der Osteoblast. Nach Abschluss des Knochenaufbauprozesses entwickelt sich dieser zum Osteozyten (Aubin 1998). Als Osteozyt wird der ruhende Osteoblast bezeichnet, eingeschlossen in einer von ihm selbst aus extrazellulärer Matrix gebildeten Höhlung. Die osteoblastäre Differenzierungskaskade ist dabei kein streng unidirektional ablaufender Prozess, sondern vielfach quervernetzt und mitunter auch rückläufig. Dies bedeutet, dass es physiologisch sowohl zu Übergängen in andere Zelllinien wie auch zu Dedifferenzierungsprozessen kommt (Aubin 1998). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde von kommerziell erworbenen, primären humanen mesenchymalen Stammzellen ausgegangen, die nach einem standardisierten Verfahren mittels Dichtegradientenzentrifugation aus Knochenmarkspiraten gesunder, adulter Spender gewonnen wurden. Das Potential dieser Zellen zur Selbstreplikation und zur Differenzierung in Zellen der osteoblastären Kaskade konnte nachgewiesen werden (Pittenger et al. 1999).

#### 1.1.4. Leitschienen

Ohne Leitschienen ist nach dem derzeitigen wissenschaftlichen Stand kein gerichtetes Zellwachstum möglich (Abukawa et al. 2003, Fang et al. 2003, Stark et al. 2000). Der Einsatz von Leitschienen zur Generierung dreidimensionaler Konstrukte ist daher unumgänglich. Allgemeine Anforderungen an Leitschienen sind freie Verfügbarkeit, Lagerbarkeit, Sterilisierbarkeit, kostengünstige Herstellbarkeit, keine Toxizität, keine Kanzerogenität und keine oder nur passagere Antigenität (Ducheyne 1985, Uchida et al. 1985). Darüber hinaus soll die Leitschiene über gute osteokonduktive Eigenschaften verfügen, und damit den aufgebrachtten Zellen die Möglichkeit zum Durchwachsen der Struktur bieten. Weiterhin ist eine ausreichende mechanische Primärstabilität hinsichtlich der Eignung als Knochenersatzmaterial erforderlich. Von großer Bedeutung ist auch der Grad der Interkonnektivität und die Makroporosität (Parikh 2002, Degasne et al. 1999, White et al. 1986). Der Grad der Interkonnektion

bestimmt das Ausmaß der Zelleinwanderung und Durchdringung der Leitschiene sowie die bedarfsgerechte Versorgung mit Nährstoffmedium. Prinzipiell kann zwischen organischen und anorganischen bzw. synthetischen Leitschienenmaterialien sowie den sog. Composites unterschieden werden. Letztere stellen eine Kombination zweier oder mehrerer Einzelstoffe dar.

#### Natürliche Polymere:

Zu den natürlichen Polymeren zählen im wesentlichen die Kollagene. Kollagen I wäre zwar das am häufigsten vorkommende Protein der extrazellulären Matrix im Knochen, für sich alleine verfügt dieses Biomaterial beispielsweise jedoch kaum über osteokonduktive Eigenschaften. In Verbindung z.B. mit Hydroxylapatit jedoch und in eine dreidimensionale Struktur gebracht, zeigt sich eine signifikante Verbesserung hinsichtlich der Eignung als Leitschiene (Parikh 2002).

#### Demineralisierte Knochenmatrix:

Über den Einsatz von demineralisierter Knochenmatrix als Knochenersatzmittel wurde schon in den sechziger Jahren berichtet (Urist 1965). Mittels Säureextraktion behandelte Knochen allerdings bietet selbst keine mechanische Stabilität mehr. Demineralisierte Knochenmatrix kann jedoch z.B. in Verbindung mit Stoffen wie Hydroxylapatit als strukturgebende Komponente im Rahmen der Knochenheilung dienen (Parikh 2002).

#### Kalziumphosphatkeramiken:

Diese Materialien können als Hydroxylapatit, als  $\beta$ -Tricalciumphosphat oder häufig auch biphasisch, d.h. als Kombination aus beiden Substanzen eingesetzt werden (Bruder et al. 1998). Hydroxylapatit ist eine Komplexverbindung, in der ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion von drei neutralen, tertiären Calciumphosphatmolekülen umgeben ist und ein hexagonales Kristallgitter bildet. Es stellt den Hauptbestandteil von Knochen und Zähnen dar.  $\beta$ -Tricalciumphosphat dient als Calcium- und Phosphatdonor. Hydroxylapatit wird entweder von boviner oder koralliner Grundsubstanz abgeleitet oder synthetisch hergestellt.

### Synthetische Polymere:

Diese Materialien erlauben während des Herstellungsprozesses weitgehende Gestaltungsmöglichkeiten hinsichtlich Interkonnektion und Makroporosität. Sie sind biokompatibel und immunologische Reaktionen sind nicht zu erwarten. In der Anwendung befinden sich Polymere aus Polylactid (PLA) und Polyglykolsäuren (PGA), meist als Co-Polymerisat Poly-D,L-lactid-Co-glycolid (PLGA) (Abukawa et al. 2003).

### Korraline Keramiken:

Ozeanische Korallentiere verfügen über ein korallines Exoskelett, das der Struktur des menschlichen Knochens hinsichtlich der Makroporosität und dem Grad der Interkonnektivität sehr nahe kommt (Tencer et al. 1988). Die koralline Substanz kann in seiner natürlichen Form als Kalziumcarbonat zur Anwendung kommen, aber auch hydrothermal umgewandelt als Hydroxylapatit (White et al. 1986).

### Innovative Ansätze:

Vereinzelt werden innovative Materialien erprobt, wie z.B. von Seidenspinnern produzierte Seiden (Altman et al. 2003).

Spezielle Beschichtungen der einzelnen Leitschienenmaterialien können dabei zur Verbesserung der Zelladhäsion sowie der osteokonduktiven Eigenschaften führen. Auch osteoinduktive Wirkungen lassen sich induzieren (Anselme 2000, Degasne et al. 1999, Dalton et al. 1995). Leitschienen können z.B. mit Fibronectin beschichtet werden, wodurch die Zelladhäsion verbessert wird. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde lösungsmittelkonservierte und  $\gamma$ -Strahlen-sterilisierte, bovine Spongiosa (Tutobone, Tutogen Medical) verwendet, die bereits für die klinische Anwendung zugelassen ist. Die spongiöse Matrix bot eine sehr gute Feingeometrie hinsichtlich dem Grad der Interkonnektivität sowie eine den physiologischen Verhältnissen *in vivo* nahekommende Makroporosität.

#### 1.1.5. Beimpfungsmethoden

Die in zweidimensionaler Kultur expandierten Zellen müssen effizient auf die vorgesehenen Leitschienen aufgebracht werden. Vergleichbare Arbeiten sehen insbesondere in der Dichte der auf die Leitschienen aufgebrachten Zellen einen bedeutenden Faktor hinsichtlich der Ausbildung von Zellmatrix (Holy et al. 2000, Ishaug et al.

1997). Geeignete Vorbeschichtungen der Leitschienenstrukturen, insbesondere bei Verwendung von Keramiken und synthetischen Materialien können die Adhäsion der aufgetragenen Zellen verbessern (Anselme 2000, Degasne et al. 1999, Dalton et al. 1995). Die Effizienz des Beimpfungsvorganges lässt sich aber auch mittels definierter Applikation von Unterdrücken steigern. Dadurch kann die homogene Füllung der Leitschienenstruktur verbessert werden (Bruder et al. 1998).

#### 1.1.6. Nährmedien und Wachstumsfaktoren

Dem Nährmedium fallen entscheidende Steuerungsfunktionen zu, indem es durch seine spezielle Zusammensetzung die Abläufe im Rahmen des Zellwachstums initiiert bzw. supprimiert. In der Expansions- bzw. Proliferationsphase muss das Nährmedium auf die möglichst permanente Initiierung von Teilungszyklen ausgerichtet sein. Dadurch ergeben sich ausreichend große Zellmengen für die Besiedelung der Leitschienen. Dazu eignet sich die Verwendung eines konventionellen Zellkulturmediums wie z.B. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM). Im wesentlichen erfolgt dazu der Zusatz von Fetal Bovine Serum (FBS). Nach Aufbringen der Zellen auf die Leitschienen wird die Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen hin zu Zellen der osteoblastären Differenzierungskaskade angeregt bzw. aufrecht erhalten. Dem Nährmedium werden dazu osteoinduktive bzw. osteogen wirksame Substanzen beigefügt (Barnes et al. 1999). Die Zusätze nehmen Einfluss auf den Zellmetabolismus und bewirken die Expressierung verschiedenster osteogener Stoffwechselprodukte. Auto- oder parakrin wirkende Substanzen nehmen darüber hinaus eine wichtige Stellung im Ablauf der osteoblastären Differenzierungskaskade ein. Osteoinduktive bzw. osteogen wirksame Zusätze sind z.B. Dexamethason, Ascorbinsäure-2-Phosphat und  $\beta$ -Glycerophosphat (Jaiswal et al. 1997), aber auch Transforming Growth Factors (TGF), Fibroblast Growth Factors (FGF), Insulin-like Growth Factors (IGF) oder Bone Morphogenic Proteins (BMP).

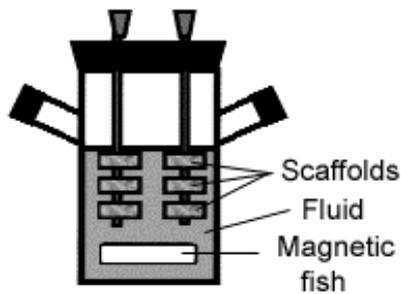
#### 1.1.7. Bioreaktoren und Kultivierung

Im Bioreaktor erfolgt die Initiierung und Aufrechterhaltung der Zelldifferenzierung. Insbesondere um die Zelldifferenzierung aufrecht zu erhalten müssen die reifenden Zellen u.U. über Wochen optimal versorgt werden (Minuth et al. 1997). Um den besiedelten Leitschienen *in vitro* ein adäquates Zellmilieu gewährleisten zu können ist

der Einsatz spezieller Zellkultursysteme erforderlich (Minuth et al. 1996, Minuth et al. 1992). Ein adäquates Zellmilieu umfasst dabei nicht nur die kontinuierliche Zufuhr von Nährmedium und damit die Versorgung mit den gewünschten Wachstumsfaktoren, sondern auch die Entsorgung schädlicher Stoffwechselmetabolite (Goldstein 2001). Darüber hinaus muss eine ausreichende Sättigung des Nährmediums mit Sauerstoff gewährleistet sein, und schließlich bedarf es einer Temperatur von konstant 37°C in der Umgebung des Konstruktes. Zur Kultivierung von dreidimensionalen Konstrukten ist die gewünschte Größe und Form der Leitschiene zu berücksichtigen. Alle diese Vorgaben werden im Rahmen eines Zellkultursystems zusammengefasst und umgesetzt (Minuth et al. 2000). Im wesentlichen besteht dies aus einem Bioreaktor, aus Behältern für frisches sowie verbrauchtes Nährmedium, einer Schlauchpumpe und den erforderlichen Schlauchverbindungen und schließlich einer Vorrichtung, die die erforderliche Umgebungstemperatur aufrecht erhält. Letzteres kann z.B. ein Brutschrank sein, der außerdem den vermehrten Zusatz von atmosphärischen Gasen wie CO<sub>2</sub> ermöglicht. Die Konstruktion und das Design eines Bioreaktors kann prinzipiell verschiedenen Ansätzen folgen. Grundsätzlich bieten sich als Werkstoffe voll- oder halbtransparente Kunststoffmaterialien an, die maschinell vergleichsweise leicht zu bearbeiten sind, und durch ihre Transparenz Einblicke in die makroskopischen Vorgänge innerhalb des Reaktors gewähren. Der Größe und Form des geplanten Konstruktes folgen die Abmessungen des Bioreaktors. Über entsprechende Ports erfolgt die Versorgung mit frischem sowie die Entsorgung von verbrauchtem Medium bzw. der Stoffwechselendprodukte. Die Zu- und Abläufe müssen der Geometrie der Kulturkammer entsprechen, so dass keine Nischen verbleiben, die sich der Ver- und Entsorgung entziehen. Folgende gebräuchliche Prinzipien befinden sich im Einsatz:

#### Dynamisierte Kulturbehälter (Spinner flasks)

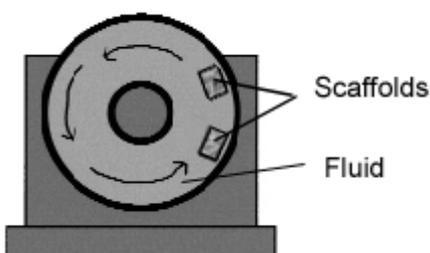
Als einfachste Form von Bioreaktoren gelten dynamisierte Kulturbehälter, sog. Spinner flasks. Dies sind einfache Gefäße, in denen besiedelte Leitschienen an einer Haltevorrichtung hängend von Nährmedium umgeben sind (Bancroft et al. 2003). Das Nährmedium wird mittels einer Magnetrührvorrichtung dynamisiert, um die Durchströmung der Leitschienen zu gewährleisten (Sikavitsas et al. 2002).



**Abb. 1** Spinner Flask nach Sikavitsas et al. 2002

### Rotationsbioreaktoren (Rotating wall vessels)

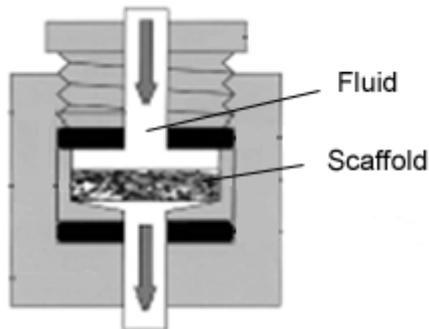
Eine verbreitete Form von Bioreaktoren sind Rotationsbioreaktoren, sog. Rotating wall vessels. Innerhalb einer horizontal angeordneten, zylinderförmigen und komplett mit Nährmedium befüllten Kulturkammer befindet sich zentral die Sauerstoffversorgung über eine semipermeable Schlauchmembran. Die zylinderförmige Kulturkammer lässt sich axial in Rotation versetzen, welche die Konstrukte gemäß der auftretenden Fliehkräfte an die Außenwand versetzt. (Sikavitsas et al. 2002, Botchwey et al. 2001, Schwarz et al. 1992). Fliehkraft und Schwerkraft werden dabei durch die Anpassung der Drehzahl mindestens im Gleichgewicht gehalten. Die Konstrukte stehen damit relativ zum rotierenden Zylinder still. Dies ist insbesondere ein Modell, mit dem definierte Kräfte an die zu kultivierenden Konstrukte angelegt werden können (Sodian et al. 2002, Altman et al. 2002).



**Abb. 2** Rotating wall vessel nach Sikavitsas et al. 2002

### Durchflussbioreaktoren (Flow perfusion bioreactors)

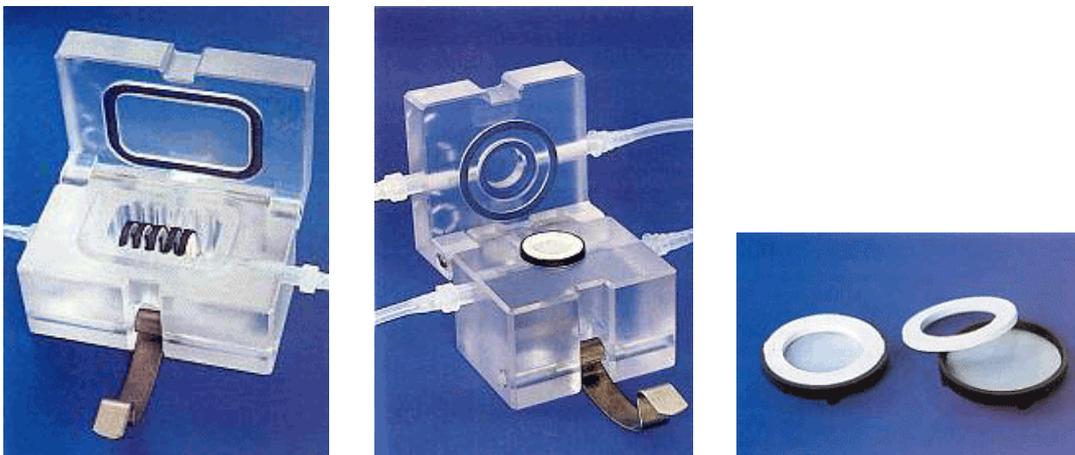
Diese Art von Bioreaktor hält die Leitschienen in statischem Zustand, und gewährleistet den zwangsweisen Fluss des Nährmediums durch die Poren der Leitschiene. Shuntvolumina an der Leitschienenstruktur vorbei sind gemäß der entsprechenden Kammerarchitektur ausgeschlossen (Bancroft et al. 2003).



**Abb. 3** Flow chamber nach Bancroft et al. 2003

Culture container, Gradient container (Fa. Minucells and Minutissue)

Beide Arten dieser Kulturkammern sehen die Leitschiene bzw. das zu kultivierende Gewebe zwischen zwei mediumgängigen Membranen sandwichartig in einer Haltevorrichtung eingebracht. Die so adaptierten Konstrukte werden in die jeweilige Kulturkammer eingebracht und von Nährmedium umströmt. Im Gradient container können darüber hinaus zu beiden Seiten des Konstruktes verschiedenartige Mediumzusammensetzung vorbeigeführt werden (Minuth et al. 1999).



**Abb. 4** Culture container links, Gradient container mittig und Minusheets rechts, Bildquelle: Fa. Minucells and Minutissue

In der vorliegenden Arbeit wurden Bioreaktoren der Fa. Minucells und Minutissue verwendet. Verschiedene Publikationen ließen vermuten, dass sich diese Bioreaktoren für die zu bearbeitenden Aufgabenstellungen und darüber hinaus gut eignen (Kloth et al. 2000, Minuth et al. 1997, Sittinger et al. 1996).

### 1.1.8. Zellwachstum und Zelldifferenzierung

Die qualitative Beurteilung von Zellwachstum und Zelldifferenzierung der dreidimensional kultivierten Zellen sowie die Einstufung in den Verlauf der osteoblastären Differenzierungskaskade war eine der führenden Aufgaben der vorliegenden Arbeit. Die osteoblastäre Differenzierung kann einerseits über den Kalknachweis innerhalb der extrazellulären Matrix mittels histologischer Färbung nach von Kossa nachgewiesen werden, zum anderen durch die immunhistochemische Markierung von Zellsyntheseprodukten wie Proteinen, Signalmolekülen und Enzymaktivität (Pautke 2003). Als klassische osteoblastäre Marker gelten Alkalische Phosphatase, Prokollagen I und insbesondere Osteocalcin (Bruder et al. 1997, Aubin et al. 1995). Zum Nachweis dieser Marker eignet sich besonders die immunhistochemische Detektion mittels der sog. Avidin-Biotin-Methode, die eine lichtmikroskopische Auswertung der angefertigten Markierungen ermöglicht. Für die rein morphologische Beurteilung des Zellwachstums wurden Kernfärbungen nach sequentiellen Kryoschnitten und Sägeschnitten nach Einbettungen in Methylmetacrylat (MMA) angefertigt.

## 1.2. Aufgabenstellung

### 1.2.1. Etablierung eines 3-D-Zellkultursystems

Adulte humane Mesenchymale Stammzellen sollten *in vitro* unter osteogener Stimulation auf einer klinisch bereits zur Knochendefektfüllung zugelassenen Leitschiene (Tutobone, Tutogen Medical) kultiviert werden. Hierzu war es zunächst erforderlich ein Zellkultursystem (Gradient Container, Minucells and Minutissue) zu etablieren, das den 3-D-Konstrukten während der Kultivierungsphase ein konstant adäquates und den physiologischen Verhältnissen *in vivo* möglichst nahekommendes Zellmilieu gewährleistet.

### 1.2.2. Zellkultivierung im 3-D-System im Zeitverlauf bis zu 6 Wochen

Das Wachstumsverhalten der mesenchymalen Stammzellen in der dreidimensionalen Zellkultur sollte über Zeiträume von 2, 4 und 6 Wochen untersucht werden. Die Beurteilungen des Zellwachstums nach qualitativen Gesichtspunkten erfolgte dabei mittels histologischer Färbungen von Kryoschnitten und nach Anfertigung gewebe-

schonender Einbettungen in Methylmetacrylat. Darüber hinaus wurde die Zelldifferenzierung und Matrixbildung mittels immunhistochemischer Methoden beurteilt.

### 1.2.3. Zelldifferenzierung und Matrixbildung 2-D vs. 3-D nach 2 Wochen

In einem weiteren Schritt sollte schließlich insbesondere die Frage untersucht werden, inwieweit die Dreidimensionalität der Leitschienen und damit dreidimensionales Zellwachstum einen zusätzlichen Stimulus hinsichtlich Zelldifferenzierung und Matrixbildung darstellt. Als Vergleichsgruppen dazu dienten unstimulierte sowie stimulierte zweidimensional kultivierte Zellen derselben Zelllinie. Die Beurteilung von Zelldifferenzierung und Matrixbildung erfolgte in allen Gruppen mittels immunhistochemischer Methoden.

## 2. Material und Methoden

Der experimentelle Teil der Arbeit wurde im Chirurgischen Forschungslabor an der Chirurgischen Klinik und Poliklinik - Innenstadt, Klinikum der Universität München im Zeitraum von 04/2001 bis 03/2003 durchgeführt. Die histologischen sowie immunhistochemischen Auswertungen erfolgten im selben Zeitraum in den Labors der Anatomischen Anstalt - Lehrstuhl Anatomie I, Universität München. Die labortechnischen Anforderungen entsprachen in Bezug auf räumliche Voraussetzungen und apparative Ausstattung für die Zell- und Gewebekultur hohen Standards (Bast 1999, Lindl 1999a). Alle Laborarbeiten wurden unter Beachtung entsprechender Richtlinien, insbesondere hinsichtlich der angewandten Steriltechniken durchgeführt (Lindl 1999b, Sellner 1989).

### 2.1. Versuchsansatz

#### 2.1.1. Dreidimensionale Kulturen

Folgenden Versuchsansätze wurden durchgeführt:

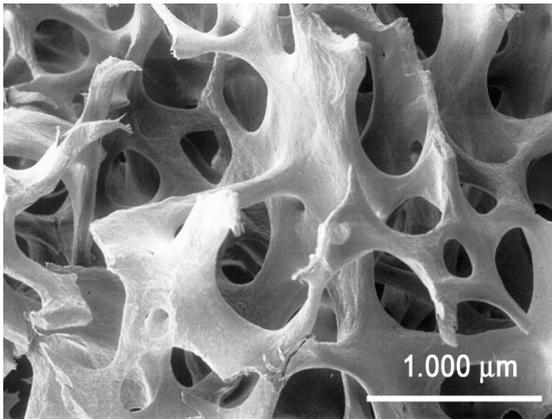
##### Osteogen stimulierte 3-D-Kulturen

Über 2 Wochen	dreifach
Über 4 Wochen	einfach
Über 6 Wochen	dreifach

**Tab. 1** Osteogen stimulierte 3-D-Kulturen

##### 2.1.1.1. Leitschienen

Als dreidimensionale Matrix wurde bovine Spongiosa (Tutobone, Fa. Tutogen Medical) verwendet, die lösungsmittelkonserviert und  $\gamma$ -Strahlen-sterilisiert war. Entsprechend den Abmessungen der Kulturkammer wurden aus dem in Plattenform (25 x 15 x 3 mm) vorgelegenen Material mittels sterilem Meißel und Locheisen kreisrunde Plättchen ( $\varnothing$  9 mm, Höhe 3 mm, Volumen ca. 190  $\mu$ l) hergestellt.



**Abb. 5** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der verwendeten Leitschienenstruktur (Tutobone, Fa. Tutogen Medical), Bildquelle: Fa. Tutogen Medical

#### 2.1.1.2. Beimpfung der Leitschienen

Die hergestellten Plättchen wurden zunächst mit FBS für 30 Min. bei + 37 °C im Brutschrank vorinkubiert. Zum Luftausschluss aus den Poren wurde das FBS zunächst in einem Zentrifugenröhrchen einzentrifugiert und im Anschluss an die Brutschrankphase wieder auszentrifugiert. Die vorinkubierten Plättchen wurden dann mit jeweils  $1,6 \times 10^6$  Zellen in einer hoch konzentrierten Zellsuspension (300 µl) mittels einer Mikroliterpipette beimpft. Nach einer Adhärenzphase von insgesamt 2 h und insgesamt 5-fachem Wenden der Plättchen und erneutem Aufpipettieren der Zellsuspension in gleichen Zeitabständen erfolgte die Kultivierung im Bioreaktor.

#### 2.1.1.3. Bioreaktor

In dem für die vorliegende Arbeit gewählten Bioreaktor (Gradient container, Fa. Minucells and Minutissue) stand eine zylinderförmige Kulturkammer ( $\varnothing$  10 mm, Höhe 9 mm) zur Verfügung. Über entsprechende Ports und gaspermeable Silikonschläuche war die Kulturkammer jeweils mit einem Behälter mit frischem Medium einerseits und einem Behälter für verbrauchtes Medium andererseits verbunden. Die kontinuierliche Versorgung mit frischem Nährmedium wurde über eine im abführenden Schenkel zwischengeschaltete Schlauchpumpe gewährleistet. Die Behälter mit frischem Medium sowie die Bioreaktoren befanden sich innerhalb eines Brutschrankes (37 °C bei 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre in Raumluft), die Schlauchpumpe und die Behälter für verbrauchtes Medium außerhalb.



**Abb. 6** Bioreaktor (Gradient Container, Minucells and Minutissue) mit eingelegter dreidimensionaler Matrix, Deckel aufgeklappt

#### 2.1.1.4. Kultivierungsphase

Die Platzierung der Bioreaktoren erfolgte im Brutschrank unter 5 %-iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre, welche in Verbindung mit Natriumbikarbonat (NaHCO<sub>3</sub>) zur Pufferung der sauren Stoffwechselprodukte und damit zur Konstanthaltung des pH-Wertes innerhalb des Systems diente. Die Mediumversorgung erfolgte kontinuierlich bei einer Flussrate von 3,3 ml / h. Das Nachfüllen der Vorratsbehälter mit frischem Medium war etwa alle 5 d erforderlich und wurde unter der Sterilbank durchgeführt. Dafür musste das Perfusionssystem für kurze Zeit gestoppt werden.



**Abb. 7** Versuchsaufbau 3-D-Kultur, links 4 Kammern im Parallelbetrieb im Brutschrank, rechts in der Gesamtübersicht mit Schlauchpumpe und Abfallflaschen außerhalb des Brutschranks. Die Brutschranktür ist jeweils geöffnet.

### 2.1.2. Zweidimensionale Kulturen Vergleichsgruppen

Folgenden Versuchsansätze wurden durchgeführt:

#### 2-D-Kulturen

Über 2 Wochen, unstimuliert	dreifach
Über 2 Wochen, osteogen stimuliert	

**Tab. 2** 2-D-Kulturen

Für die 2-D-Kultur Vergleichsgruppen wurden Zellen auf unbeschichteten Glasobjektträgern (Menzel-Gläser) angesiedelt. Auf die autoklavierten und in Zellkulturplatten eingelegten Glasobjektträger wurde zunächst eine Zellzahl von jeweils  $0,5 \times 10^5$  Zellen in einem Mediumvolumen von 0,5 ml aufpipettiert. Die Zellsuspension nahm dabei gerade die gesamte Glasoberfläche ein ohne aber vom Glasobjektträger abzufließen. Nach einer Adhärenzphase von ca. 30 Min. wurden die Zellkulturplatten dann soweit mit Medium aufgefüllt, dass die Glasobjektträger ca. 3 mm überschichtet waren. Die Kultivierung erfolgte über einen Zeitraum von 2 Wochen, je nach Versuchsansatz mit oder ohne osteogener Stimulation. Der Wechsel des Nährmediums erfolgte alle 3 d.

## 2.2. Versuchsbezogene Methoden

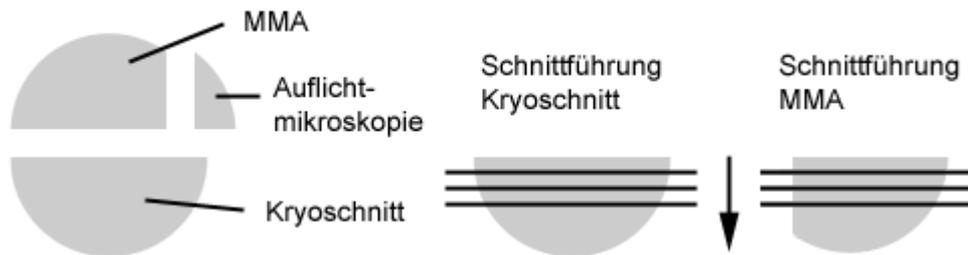
### 2.2.1. Fixieren von 3-D-Präparaten und 2-D-Kulturen

Die Fixierung der 3-D-Präparate erfolgt nach Entnahme aus dem Bioreaktor für min. 1 h in 100 % Methanol. Nach Fixierung verblieben die Proben ggf. in 100 % Methanol und wurden bis zur Weiterverarbeitung bei - 20 °C gelagert. Die Fixierung der 2-D-Kulturen erfolgte mit 0,3 % Wasserstoffperoxid in Methanol.

### 2.2.2. Aufteilung der 3-D-Konstrukte

Alle 3-D-Konstrukte wurden zunächst entlang des Durchmessers halbiert. Von einer Hälfte wurde ein kleiner Teil mittels eines Meißels zur Verwendung zur Auflichtmikroskopie abgetrennt, der Rest in MMA eingebettet und sequentielle Sägeschnitte davon angefertigt. Von der zweiten Hälfte wurden ebenfalls sequentielle, jeweils von

der Mitte der Leitschienen ausgehende Kryoschnitte hergestellt. Das Schnittschema insgesamt war wie folgt:



**Abb. 8** Schnittschema Tutobone (d = 9mm) in der Aufsicht

### 2.2.3. Auflichtmikroskopie der 3-D-Konstrukte

Nach Entnahme aus dem Bioreaktor mit anschließender Fixierung wurde jeweils ein kleiner Teil der 3-D-Konstrukte zur qualitativen Beurteilung des Zellwachstums kerngefärbt. Die Kernfärbung erfolgte für 10 Min. in Mayers Hämalaun. Die überschüssige Färbelösung wurde zwei- bis dreifach für jeweils ca. 1 Min. mit handwarmem Leitungswasser ausgespült.

### 2.2.4. Anfertigung von Kryoschnitten von den 3-D-Konstrukten

Um von den 3-D-Präparaten Schnitte für weitere histologische Färbungen bzw. immunhistochemische Markierungen anfertigen zu können war es erforderlich die Leitschienenmatrix zu entkalken. Die Entkalkung des bovinen, spongiösen Knochens erfolgte bei + 4 °C in 5% EDTA in Aqua dest. für die Dauer von 10 d bei regelmäßigem Wechsel der Entkalkungslösung alle 2 d. Das Volumen der Entkalkungslösung betrug dabei min. das 20-fache des Volumens des Präparates. Von den entkalkten Präparaten wurden am Kryostat sequentielle, von der Mitte ausgehende Schnitte mit einer Stärke von 12 µm angefertigt. Die Anfertigung der Schnitte erfolgte nach Fixierung der Präparate auf dem Probenstempel des Kryostats mittels sog. Tissue Freezing Medium. Die Schnitte wurden auf spezielle beschichtete Glasobjektträger übertragen.

### 2.2.5. Anfertigung von Schnitten nach MMA-Einbettung

Um Schrumpfungs- und Zerreißungsartefakte infolge der Entkalkung der Konstrukte zu vermeiden, wurden bei einem Teil der 3-D-Konstrukte Einbettungen in Methylmethacrylat (MMA) angefertigt. Dies ermöglichte eine realistische Beurteilung der Zellmorphologie. Die Anfertigung der MMA-Einbettungen erfolgte im einzelnen gemäß Protokoll 2, das sich im Anhang befindet. Nach der MMA-Einbettung wurden die Konstrukte mittels einer Bandsäge grob zugeschnitten und geeignete Auflageflächen mittels einer Bandschleifmaschine angeschliffen. Auf entsprechenden Probenstempeln aufgeklebt wurden an einer Innenlochsäge dünne Schnitte mit einer Stärke von 100 µm angefertigt.

### 2.2.6. Histologische Färbung der Schnittpräparate

Um das Zellwachstum qualitativ zu beurteilen wurden von den Kryoschnitten Kernfärbungen mit Mayers Hämalaun und Hämatoxylin-Eosin angefertigt. Die in MMA eingebetteten Schnitte wurden kurz angeätzt und mittels Hämatoxylin-Erythrosin gefärbt. Die Färbungen erfolgten jeweils für die Dauer von 40 Sek. und anschließend zwei- bis dreifachem, ca. 1 Min. dauerndem Ausspülen der überschüssigen Färbelösungen mit handwarmem Leitungswasser. In aufsteigender Alkoholreihe (50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 2 x 100 % Ethanol und 2 x 100 % Xylol) wurden die Präparate für jeweils 3 Min. entwässert. Mittels des hydrophoben Harzes Eukitt wurden die Glasobjektträger mit Deckgläsern eingedeckelt.

### 2.2.7. Anfertigung von immunhistochemischen Markierungen

Die Anfertigung der immunhistochemischen Markierungen erfolgte im einzelnen gemäß Protokoll 1, das sich im Anhang befindet. Um unterschiedliche Markierungen auf demselben Glasobjektträger anfertigen zu können wurden einzelne Schnitte mittels eines Fettstiftes abgegrenzt. Ausgewählte Schnitte, die nicht mit Primärantikörpern inkubiert wurden, dienten als Kontrolle. Während der Fixierung der Zellen in Methanol erfolgte unter Beimischung von Wasserstoffperoxid die Inaktivierung der endogene Peroxidase, was die Spezifität der immunhistochemischen Reaktion steigerte. Durch das anschließende Blocken mit Pferdeserum wurden die geladenen Molekülgruppen der Zellen abgesättigt und so unspezifische Bindungen der Primärantikörper minimiert. Nach Inkubation der einzelnen Schnitte mit den gewünschten Pri-

märantikörpern wurden diejenigen Antikörper, die gebunden wurden mittels des Vectastain ABC-Kit Elite nachgewiesen. Das Kit enthielt als Sekundärantikörper ein biotiniertes Antikörpergemisch aus anti-Maus-Immunglobulin. Seitens der Biotinkomponente der Sekundärantikörper bestand dabei eine hohe Affinität zum sog. Avidin-Biotin-Komplex (ABC-Komplex), welcher die Nachweissubstanz Diaminobenzidin (DAB) als Substrat in eine unlösliche vernetzte Form überführte. Die DAB-Lösung wurde entsprechend den Herstellerangaben in Aqua dest. verdünnt und mit einer Pufferlösung sowie einem Nickelkomplex versetzt. Der Nickelkomplex amplifizierte die Immunreaktion zusätzlich und verlieh den Markierungen letztlich eine schwärzlich-violette Farbtönung. Nach Entwässerung der Präparate in aufsteigender Alkoholreihe erfolgte wiederum die Eindeckelung der Glasobjektträger mittels Eukitt.

#### 2.2.8. Auswertung und Anfertigung lichtmikroskopischer Aufnahmen

Sämtliche Präparate wurden lichtmikroskopisch ausgewertet. Mittels eines digitalen Bildverarbeitungssystems wurden Aufnahmen bei unterschiedlichen Vergrößerungen angefertigt.

### 2.3. Weitere Methoden

#### 2.3.1. Ansatz von Zellkulturen zur Zellvermehrung

Eine der grundlegenden Methoden war der Ansatz von Zellkulturen, d.h. die Aussaat definierter Zellmenge zum Zwecke der Zellvermehrung. Die mesenchymalen Stammzellen wurden im Rahmen der Primärzelllinie nach folgenden Richtgrößen angesetzt:

Kulturbehältnis	Fläche	Zellzahl	Mediumzugabe
Zellkulturflasche	25 cm <sup>2</sup>	0,5 x 10 <sup>6</sup>	5 ml
Zellkulturflasche	75 cm <sup>2</sup>	1 x 10 <sup>6</sup>	15 ml

**Tab. 3** Initiale Zellzahlen bei Kulturansatz

Der erste Mediumwechsel erfolgte jeweils am 5. d nach Ansatz, daran anschließend an jedem 3. d. Das Passagieren der Zellen wurde in Abhängigkeit der Zelldichte durchgeführt. Die Zeitpunkte des Passagierens schwankten etwa um den 8. d nach dem letzten Passagevorgang bzw. dem ersten Ansatz.

### 2.3.2. Passagieren von Zellen

Sind die auf einer Kulturfläche ausgesäten Zellen soweit proliferiert, dass sie die Fläche nahezu vollständig einnehmen, wird der Zellrasen als konfluent bezeichnet. In diesem Stadium müssen die Zellen abgelöst und in Suspension überführt werden. Die Zellsuspension wird nach Ermittlung der Zellzahl ggf. in neue Kulturbedingungen in verdünnter Zellkonzentration ausgesät. Um die Zellen zu passagieren musste zunächst sämtliches Medium sowie Schwebstoffe wie beispielsweise avitale Zellen entfernt werden. Durch mehrfaches Spülen mit PBS wurden dabei auch Mediumreste eliminiert, was für die nachfolgenden Schritte notwendige Voraussetzung war. Mittels einer auf den Zellrasen aufgetragenen einfach konzentrierten Trypsin- / EDTA-Lösung in PBS wurde der Ablösevorgang eingeleitet. Die erforderliche Menge an Trypsin-/ EDTA-Lösung betrug für eine Zellkulturflasche mit 25 cm<sup>2</sup> Gesamtfläche 1 ml, für größere Kulturflächen entsprechend mehr. Die erforderliche Einwirkzeit variierte etwa um 6 Minuten und wurde definitiv durch mikroskopische Kontrolle des Ablösevorgangs festgelegt. Sobald sich die Zellen abgerundet und in der aufgetragenen Trypsin-/ EDTA-Lösung schwebend zeigten, wurde die Kulturfläche intensiv mit Medium gespült und die so entstandene Zellsuspension schließlich vollständig aufgenommen. Die Trypsinwirkung wurde dabei durch die Zugabe des serumhaltigen Mediums weitgehend inaktiviert. Anschließendes Abzentrifugieren und Resuspendieren der Zellen eliminierte schließlich auch Reste der Trypsin-/ EDTA-Lösung.

### 2.3.3. Herstellen von Nährmedien

Grundsätzlich wurde zwischen zwei Arten von Nährmedien unterschieden. Zum einen Nährmedium, das überwiegend auf die Proliferation der Zellpopulation ausgerichtet war, zum anderen Nährmedium, das primär die Differenzierung in Richtung osteoblastärer Zellen initiieren und unterhalten sollte. Als Nährmedium während der Proliferationsphase wurde für einen Ansatz von 500 ml folgende Medienformulierung verwendet:

Inhaltsstoffe	Konzentration im Medium	Volumina für 500 ml
DMEM		438 ml
FBS hitzeinaktiviert	10 %	50 ml
L-Glutamin	4 mM	10 ml (einer 200 mM Lösung)
Penicillin-Streptomycin	40 IU/ml	2 ml (einer 10.000 IU/ml Lösung)

**Tab. 4** Nährmedienformulierung Proliferationsphase

Die Differenzierung in Richtung knochenbildende Zellen erfolgte unter zusätzlicher Beimischung von osteogenetic supplement (Tab. 5).

#### 2.3.4. Herstellen und Aliquotieren von Stammlösungen

Bei Zusätzen zu Nährmedien in sehr kleinen Konzentrationen stellt sich i.d.R. das Problem, geringe Mengen zu pipettieren bzw. im Falle pulvriger Substanzen einzuwiegen. Für die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Nährmedien war z.T. der Zusatz von Dexamethason in einer Konzentration von 100 nM erforderlich. Dexamethason liegt in Cyclodextrin gekapselter (65 mg/g), pulvriger und unsteriler Form vor. Das Molekulargewicht von Dexamethason beträgt 392,5 g/mol. Für einen Ansatz von 500 ml Medium hätte demnach von der pulvrigen Substanz eine Menge von 0,0003019 g eingewogen werden müssen bei einer technisch bedingten Mindesteinwaage von 0,01 g. Von Dexamethason wurde daher die 100-fache wägbare Menge eingewogen, in 100 ml Aqua dest. gelöst, zu jeweils 1 ml in Eppendorf-Reaktionsgefäße aliquotiert und bei - 20 °C eingefroren und gelagert.

#### 2.3.5. Herstellen und Aliquotieren von osteogenetic supplement

Für die Versuchsphasen, in denen die Differenzierung in Richtung osteoblastärer Zellen angeregt werden sollte, wurde dem verwendeten Nährmedium  $\beta$ -Glycerophosphat, Ascorbinsäure-2-Phosphat und Dexamethason beigefügt, die jeweils in pulvriger, unsteriler Form vorliegen. Um den Arbeitsablauf zu vereinfachen, wurden diese Substanzen für den üblichen Ansatz von 500 ml Nährmedium nicht jedes Mal neu eingewogen und sterilfiltriert, sondern es wurde so genanntes osteogenetic supplement hergestellt, das die erforderlichen Mengen für jeweils 500 ml Nährmedium fertig gelöst und sterilfiltriert enthält. In der folgenden Tabelle sind die erforderli-

chen Konzentrationen und Stoffmengen der einzelnen Stimulanzen für die Herstellung von osteogenic supplement für 10 l Nährmedium (20 x 500 ml) aufgeführt.

Substrat	Konzentration im Medium	Pulvermenge für 500 ml	Pulvermenge für 10.000 ml
$\beta$ -Glycerophosphat	10 mM	1,53 g	30,6 g
L-Ascorbinsäure-2-Phosph.	0,05 mM	0,00911 g	0,1822 g
Dexamethason	100 nM	0,0003019 g	0,006038 g

**Tab. 5** Wachstumsfaktoren, Konzentrationen und Stoffmengen

$\beta$ -Glycerophosphat und L-Ascorbinsäure-2-Phosphat wurden jeweils eingewogen und in 20 ml Aqua dest. vollständig gelöst. Anschließend wurden 20 Aliquots der Dexamethason-Stammlösung hinzugefügt. Die so entstandene Lösung wurde schließlich mit Aqua dest. auf 50 ml aufgefüllt, sterilfiltriert, in 20 Teile aliquotiert und bei - 20 °C eingefroren und gelagert.

### 2.3.6. Inaktivieren und Aliquotieren von FBS

Fetal Bovine Serum (FBS) wurde vor Zusatz zu den Nährmedien hitzeinaktiviert. Dies erfolgte für 20 Min. im Wasserbad bei + 56 °C Temperatur im Serum, nachdem das vorher bei - 20 °C gelagerte Serum zunächst langsam bei + 4 °C aufgetaut wurde. Das hitzeinaktivierte Serum wurde anschließend in Portionen zu 50 ml aliquotiert und bis zur Verwendung wiederum bei - 20 °C eingefroren und gelagert.

### 2.3.7. Zellzahlbestimmung nach Trypanblaufärbung

Während des Passagierens von Zellen, aber auch im Rahmen von Versuchsabläufen war es meist erforderlich, die Anzahl der Zellen in einer Zellsuspension zu ermitteln. Dies erfolgte manuell mittels einer Neubauer-Zählkammer, in der unter mikroskopischer Betrachtung die Anzahl der Zellen in einem definierten Volumen über einem Gitternetz ausgezählt wurden. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde zu diesem Zweck zuvor mit Trypanblau im Verhältnis 1:1 verdünnt, was gleichzeitig die Prüfung auf Lebensfähigkeit der Zellen erlaubte, da Trypanblau ein hochmolekularer, nicht membrangängiger Farbstoff ist, der Zellen nur dann anfärbt wenn deren Membran beschädigt ist. Unbeschädigte, vitale Zellen hingegen wurden nicht gefärbt, was bei der Zellzählung entsprechend berücksichtigt wurde.

### 2.3.8. Auftauen von Zellen

In Kryotubes in flüssigem Stickstoff gelagerte Zellen wurden zum Auftauen für einen kurzen Moment in der Sterilbank geöffnet und anschließend in ein Wasserbad (+ 37 °C) überführt. Sofort nachdem der gesamte Inhalt des Einfrierröhrchens gerade verflüssigt war, wurde die Zellsuspension in 5 ml Medium aufgenommen, die Zellen abzentrifugiert, resuspendiert und in der gewünschten Anzahl in Zellkulturflaschen angesetzt.

### 2.3.9. Kryokonservieren von Zellen

Die Kryokonservierung von Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff bei - 196 °C. Unmittelbar nach Passagieren einer Zellpopulation wurden die Zellen abzentrifugiert und in Einfriermedium resuspendiert. Die Zusammensetzung des Einfriermediums ist wie folgt:

Inhaltsstoffe	Volumenanteil
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	85 %
Dimethylsulfoxid (DMSO)	10 %
Bovines Serumalbumin 12,5 % in Medium	5 %

**Tab. 6** Zusammensetzung Einfriermedium

Die Zelldichte soll nach Resuspension im Einfriermedium zwischen  $0,5 \times 10^5$  bis  $1 \times 10^6$  Zellen/ml betragen. Die Zellsuspension wird in Kryotubes abgefüllt, zunächst für 2 h bei - 20 °C gelagert, über Nacht bei - 80 °C und schließlich in flüssigem Stickstoff bei - 196 °C.

### 2.3.10. Reinigung und Sterilisation

Unerlässliche Voraussetzung für die erfolgreiche Durchführung von experimentellen Laborarbeiten sind saubere bzw. sterile Bedingungen zur Vermeidung von Kontaminationen. Dies gilt insbesondere für Arbeiten im Bereich der Zell- und Gewebekultur. Folgende Verfahren wurden angewendet:

70 % Ethanol in Aqua dest.

Vor Beginn der Arbeiten wurden jeweils die benötigten Arbeitsflächen, insbesondere die der Sterilbank, gründlich mit 70 % Ethanol in Aqua dest. abgewischt, ebenso die erforderlichen Geräte und Labor-Hilfsmittel.

#### Autoklavieren

Nicht hitzeempfindliche Labor-Hilfsmittel, bzw. Materialien wurden im Autoklaven für die Dauer von 20 Min. bei feuchter Hitze (+ 105 °C) und Überdruck (+ 0,3 bar) autoklaviert.

#### Wärmeschrank

Alternativ zum Autoklavieren bot sich für hitzeunempfindliche Materialien die Sterilisation mit trockener Heißluft an. Hierbei erfolgte die Sterilisation in einem Wärmeschrank für die Dauer von 4 h bei + 200 °C.

#### Sterilfiltration

Hitzeempfindliche, flüssige Substanzen wurden unter Verwendung geeigneter Filtervorrichtungen (0,2 µm Porengröße) sterilfiltriert.

## 2.4. Material

### 2.4.1. Allgemeine Materialien

#### Laborgeräte

Analysenwaage Kern 770	Kern, D
Autoklav Varioklav 300	H+P Labortechnik, D
Brutschrank (+ 37 °C, 5% CO <sub>2</sub> ) IG 150	Jouan, Frankreich
Flüssigkeitsabsaugssystem	Roth, D
Kühl-Gefrierkombination (+ 4 °C, - 20 °C)	Liebherr, D
Laborwaage Kern GJ	Kern, D
pH-Meter inoLab	WTW, D
Pipettierhilfe Accu-Jet	Hirschmann, D
Schüttelgerät Unimax 100	Heidolph, D
Sterilbank Antares 72	Steril S.p.a., Italien
Tiefkühlschrank (- 86 °C)	Jouan, Frankreich
Trockenschrank	Jouan, Frankreich
Vortex-Schüttler	Heidolph, D
Wasserbad (+ 37 °C, + 50 °C)	Jouan, Frankreich
Zentrifuge CT 422	Jouan, Frankreich

## Labor-Hilfsmittel

Neubauer-Zählkammer	Brand, D
Mikroliterpipetten (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1.000 µl)	Eppendorf, D

## Materialien und Verbrauchsmaterialien

Einfrierröhrchen	Nalgene, USA
Einmal-Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Eppendorf, D
Einmal-Skalpelle	Feather, Japan
Einmal-Spritzen (2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml)	Becton Dickinson, USA
Eppendorf-Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Eppendorf, D
Pasteur-Pipetten (230 mm)	Schott, D
Petrischalen aus Polystyrol (15 cm)	Becton Dickinson, USA
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1.000 µl)	Eppendorf, D
Sterilfilter	Nalgene, USA
Sterilfiltriervorrichtung	Nalgene, USA
Wägeschälchen	Roth, D
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, D

## Substanzen

Aqua dest.	Noll, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, D
Ethanol 70 % in Aqua dest.	Klinikapotheke
PBS 10 X Ca <sup>++</sup> - und Mg <sup>++</sup> -frei	Merck, D
Trypanblau	Life Technologies, USA
Trypsin / EDTA (1 X in PBS)	Life Technologies, USA

**Tab. 7** Material, Allgemeine Materialien

## 2.4.2. Versuchsdurchführung

## Laborgeräte

Schlauchpumpe IPC 8	Ismatec, D
---------------------	------------

## Labor-Hilfsmittel

Hammer	Baumarkt, D
Locheisen (9 mm)	Baumarkt, D
Meißel	Baumarkt, D

## Materialien und Verbrauchsmaterialien

Zellkulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> )	Nunc, USA
Zellkulturplatten (48 wells, rund)	Nunc, USA

## Versuchsaufbau

Glasflaschen (500 ml)	Schott, D
Glasobjektträger, unbeschichtet (75 x 25 x 1 mm)	Menzel, D
Gradient-Container (1 x 13 mm)	Minucells, D
Schlauch-Kit (13 mm)	Minucells, D
Schlauchklemmen	Novodirect, D
Schraubkappen (classic, innovative)	Minucells, D
Sterilfilter	Nalgene, USA
Zellkulturplatten (4 wells, rechteckig)	Schubert, D

## Zellen

Humane Mesenchymale Stammzellen (hMSC)	BioWhittaker, USA
--	-------------------

## Leitschiene

Tutobone Platten (25 x 15 x 3 mm)	Tutogen Medical, D
-----------------------------------	--------------------

## Nährmedium und Mediumzusätze

Ascorbinsäure-2-Phosphat	Sigma, D
Dexamethason, water soluble	Sigma, D
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco, USA
Fetal Calf Serum (FCS)	Sigma, D
L-Glutamin	Sigma, D
Penicillin-Streptomycin	Gibco, USA
β-Glycerophosphat	Sigma, D

**Tab. 8** Material, Versuchsdurchführung

## 2.4.3. Versuchsauswertung

## Laborgeräte

Digitales Bildverarbeitungssystem KS 400	Zeiss, D
Exsikator	Schott, D
Innenlochsäge SP 1600	Leica, D
Kryostat Vacutome HM 200 OM	Microm, D
Lupenmikroskop M 420	Wild-Leitz, D
Photomikroskop Axiophot	Zeiss, D
Videokamera	Sony, Japan
Wärmeschrank 37°C	Jouan, Frankreich
Wasserbad 27 °C	Jouan, Frankreich

## Materialien und Verbrauchsmaterialien

Deckgläser (24 x 50 mm)	Menzel, D
Eindecksubstanz Eukitt	Kindler, D
Fettstift für Immunhistochemie (Dako Pen)	Dako, D
Glasobjektträger, beschichtet (75 x 25 x 1 mm)	Menzel, D
Kryostatklingen R 35	Feather, Japan

## Tissue Freezing Medium

| Jung, D

## Substanzen, Allgemein

EDTA (5% in Aqua dest.)	Merck, D
Ethanolreihe (50%, 70%, 80%, 90%, 100%)	Merck, D
Glucose (5% in PBS 1 X)	Merck, D
Methanol 100 %	Merck, D
PBS (1 X)	Merck, D
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Merck, D
Xylol 100 %	Merck, D

## Substanzen, Histologie

Hämatoxylin-Eosin	Merck, D
Mayers Hämalaun	Merck, D
Weigert Färbung	Merck, D

## Substanzen, MMA-Einbettung

Aceton	Merck, D
Benzoylperoxid	Merck, D
Formaldehyd 35 %	Merck, D
Glucose-Phosphatpuffer isoton pH 7,4	Merck, D
Methylmetacrylat (MMA)	Merck, D
Plastoid N	Fluka, Schweiz

## Substanzen, Immunhistochemie

Pferdeserum	Sigma, D
Vectastain ABC-Kit	Vector, USA

## Substanzen, Immunhistochemie, Antikörper

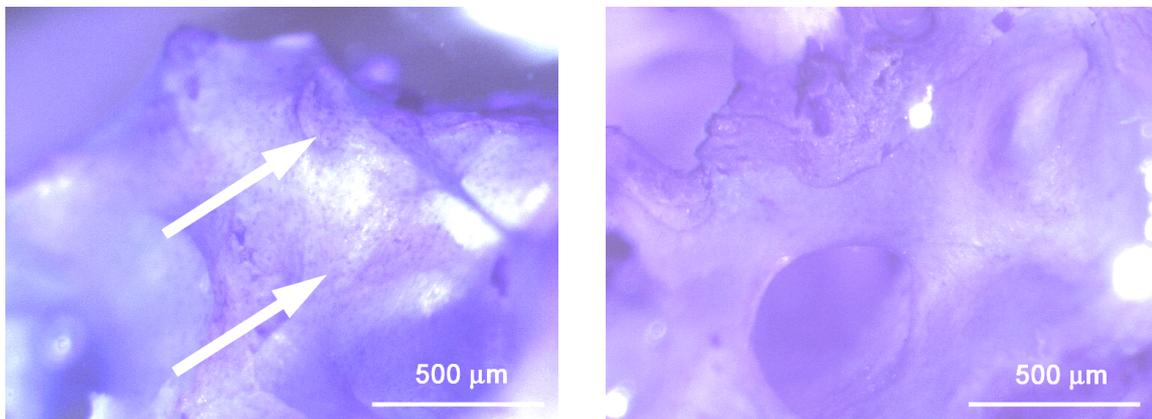
Antikörper	Clone	Dilution	Host	Hersteller
Alkalische Phosphatase	B4-78	1:10	Maus	DSHB, USA
Decorin	CB-1	1:5	Maus	DSHB, USA
Prokollagen I	M-38	1:5	Maus	DSHB, USA
Kollagen I	Col1	1:2000	Maus	Sigma, D
Kollagen IV	M3F7	1:5	Maus	DSHB, USA
Osteocalcin	OC1	1:10	Maus	Dunn, USA
Osteonectin	AON-1	1:5	Maus	DSHB, USA
Versican	12C5	1:5	Maus	DSHB, USA

**Tab. 9** Material, Versuchsauswertung

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Auflichtmikroskopie

Zur qualitativen Beurteilung des Zellwachstums in den dreidimensionalen Kulturen wurde zunächst die auflichtmikroskopische Betrachtung der 3-D-Konstrukte nach Kernfärbungen mit Mayers Hämalaun herangezogen. In den einsehbaren, oberflächlichen Bereichen der Leitschienen ist im Vergleich zur Leerprobe bereits nach 2 Wochen eine deutliche Besiedelung mit Zellen erkennbar. In der Aufnahme links (Abb. 9) zeigen sich mit Pfeilen andeutet Bereiche mit dicht gesäten angefärbten Zellkernen. In der Aufnahme rechts dazu die Leerprobe ohne Zellbesiedelung.



**Abb. 9** 3-D-Konstrukt nach 2 Wochen Kultur, links Kernfärbung mit Mayers Hämalaun (Pfeile deuten auf Bereiche mit angefärbten Zellkerne), rechts Leerprobe ohne Zellbesiedelung

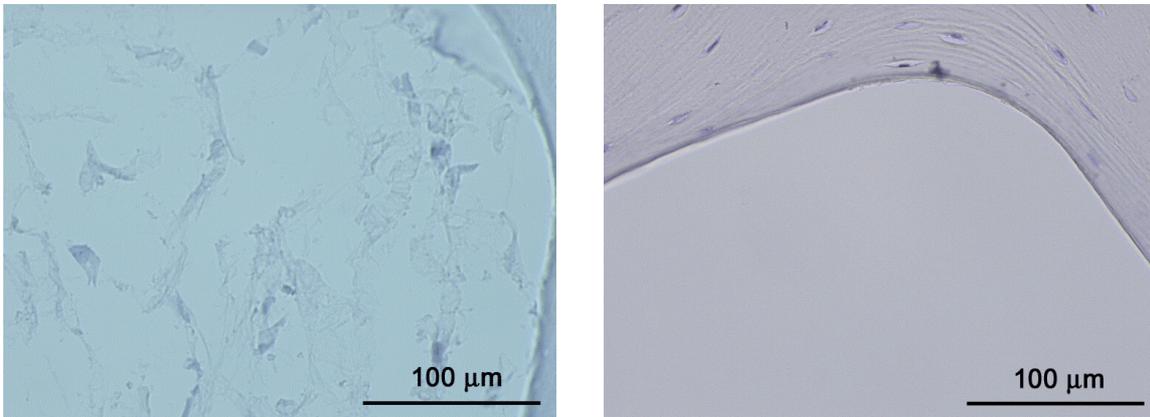
#### 3.2. Histologie

Von den Kryoschnitten der 3-D-Konstrukte wurden zunächst histologische Färbungen (Mayers Hämalaun, Hämatoxylin-Eosin) in sequentieller Folge von außen nach innen angefertigt. Damit konnte ebenfalls bereits nach zwei Wochen homogenes dreidimensionales Zellwachstum innerhalb der Leitschienen gezeigt werden.

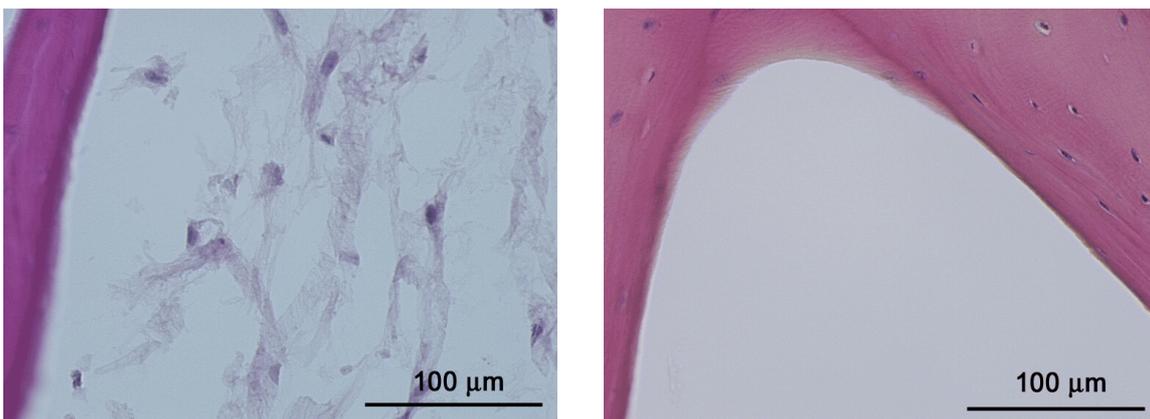
##### 3.2.1. Histologie nach Anfertigung von Kryoschnitten

Auf den folgenden Aufnahmen sind jeweils links im Bild kerngefärbte Schnitte mit homogener und dichter Zellbesiedelung zu sehen. Jeweils rechts dazu eine Leerprobe ohne Zellbesiedelung. Die am Bildrand erkennbaren Strukturen entsprechen den

Trabekeln der Leitschienenmatrix. Schrumpfungs- und Zerreißungsartefakte sind methodisch bedingt.



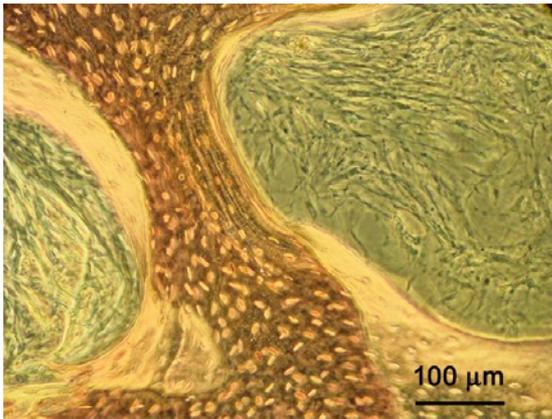
**Abb. 10** 3-D-Konstrukt nach 2 Wochen Kultur, Kryoschnitt und Kernfärbung mit Mayers Hämalaun, rechts Leerprobe ohne Zellbesiedelung



**Abb. 11** 3-D-Konstrukt nach 2 Wochen Kultur, Kryoschnitt und histologische Färbung mit Hämatoxylin-Eosin, rechts Leerprobe ohne Zellbesiedelung

### 3.2.2. Histologie nach Anfertigung von MMA-Einbettungen

Die artefaktfreie Darstellung von dichtem, homogenem Zellwachstum nach 6 Wochen in Kultur ist auf folgender Aufnahme nach histologischer Färbung mit Hämatoxylin-Erythrosin ersichtlich. Die Abbildung entstand in Phasenkontrasttechnik. Die zentral liegende, dichte Struktur entspricht den Trabekeln der Leitschienenmatrix.



**Abb. 12** 3-D-Konstrukt nach 6 Wochen Kultur, MMA-Einbettung, histologische Färbung mit Hämatoxylin-Erythrosin in Phasenkontrastaufnahme

### 3.3. Immunhistochemische Markierungen

Was die Zelldifferenzierung in den 2-D- im Vergleich zu den 3-D-Kulturen anbelangt, begründen sich die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit im wesentlichen auf immunhistochemische Markierungen. Die Beurteilung erfolgte dabei nach folgenden Kriterien: + = positive Reaktion, (+) = positive, aber schwache Reaktion, - = negative Reaktion, weniger als 5% positive Zellen. Die gezeigten Negativkontrollen entstanden jeweils ohne Applikation von Primärantikörpern.

#### 3.3.1. 2-D-Kultur Vergleichsgruppen, 2 Wochen

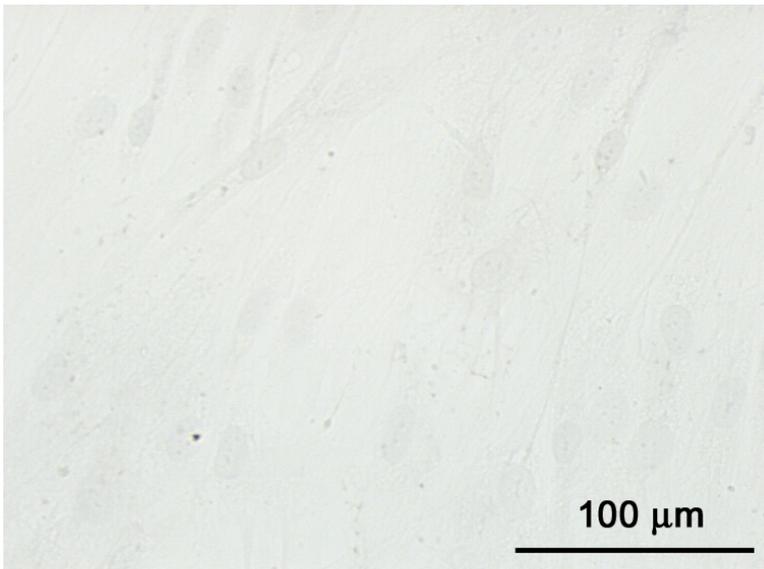
Die Ergebnisse der 2-D-Kulturen im Überblick:

Antigen	2-D-Kultur	
	2 Wo.	
n =	unstim.	stim.
Alkalische Phosphatase	-	(+)
Decorin	-	(+)
Prokollagen I	+	+
Kollagen I	+	+
Kollagen IV	+	(+)
Osteocalcin	-	(+)
Osteonectin	(+)	(+)
Versican	+	+

**Tab. 10** Ergebnisse der immunhistochemischen Markierungen nach 2 Wochen 2-D-Kultur ohne und mit osteogener Stimulation. + = positive Reaktion, (+) = positive, aber schwache Reaktion, - = negative Reaktion, weniger als 5% positive Zellen

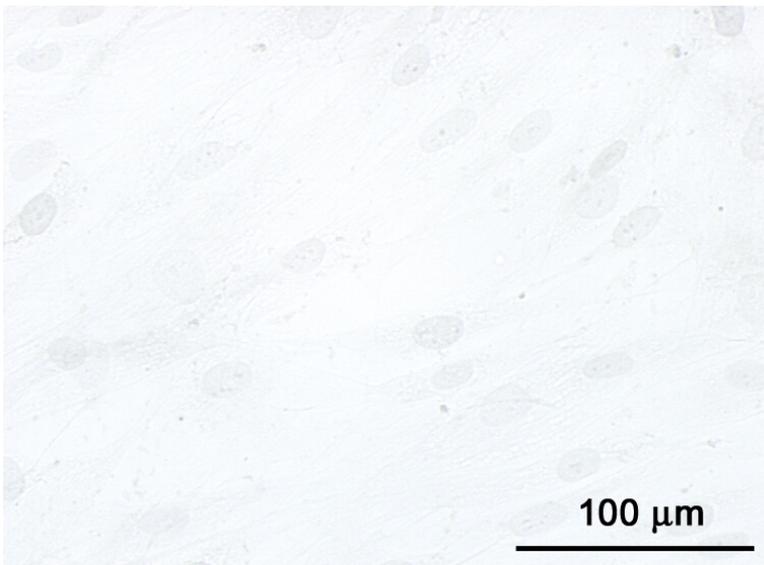
### 3.3.1.1. 2-D-Kultur ohne osteogene Stimulation, 2 Wochen

Zunächst folgt die Darstellung der Ergebnisse der 2-D-Kulturen ohne osteogene Stimulation. Die Markierungen von Prokollagen I, Kollagen I und IV und Versican fallen positiv aus, Osteonectin etwas schwächer. Die Markierungen von Alkalischer Phosphatase, Decorin und Osteocalcin sind negativ.



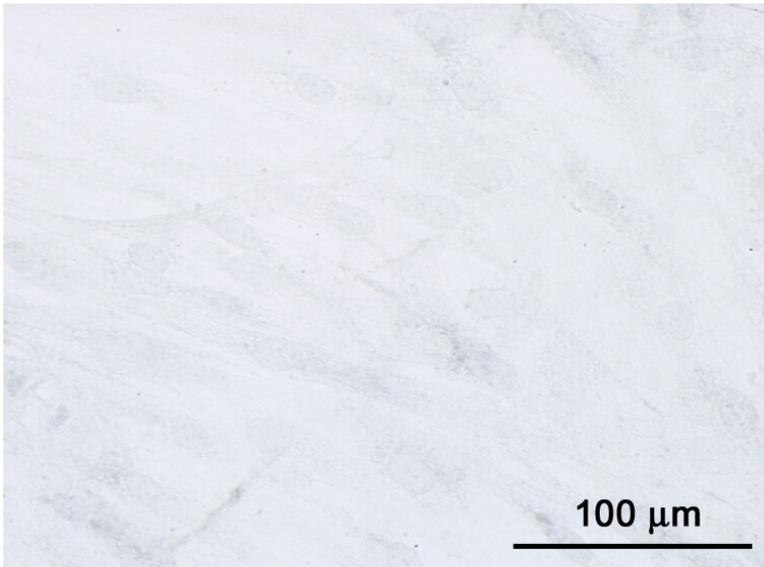
Negativkontrolle

**Abb. 13** 2-D-Kultur nach 2 Wochen ohne osteogene Stimulation, Kontrolle ohne Applikation von Primärantikörpern



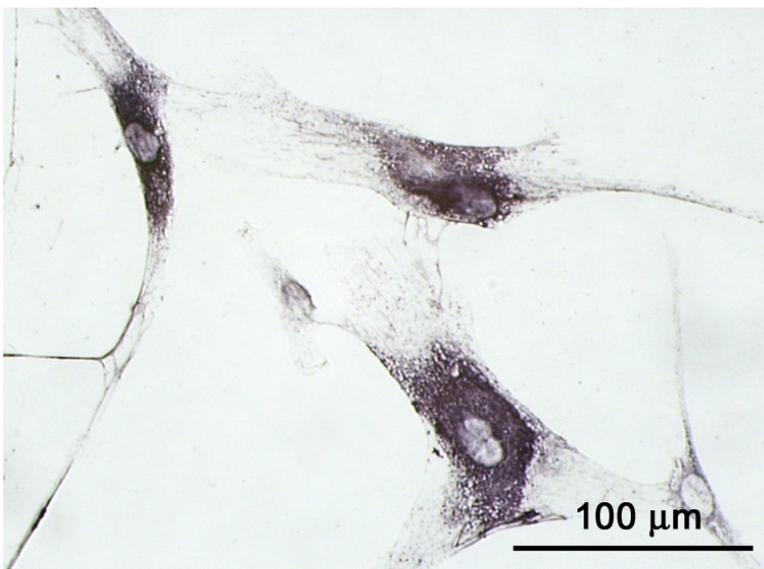
- = negative Reaktion, weniger als 5% positive Zellen

**Abb. 14** 2-D-Kultur nach 2 Wochen ohne osteogene Stimulation, Immunhistochemische Markierung von Alkalischer Phosphatase



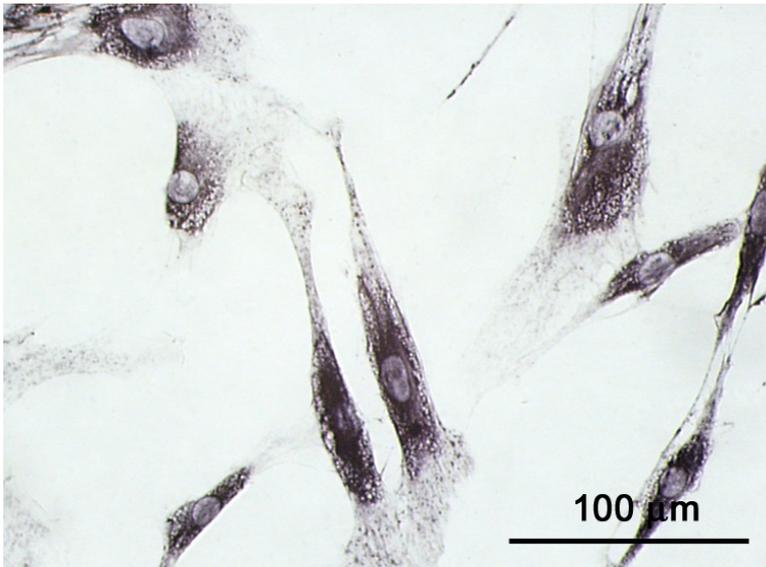
- = negative Reaktion, weniger als 5% positive Zellen

**Abb. 15** 2-D-Kultur nach 2 Wochen ohne osteogene Stimulation, Immunhistochemische Markierung von Decorin



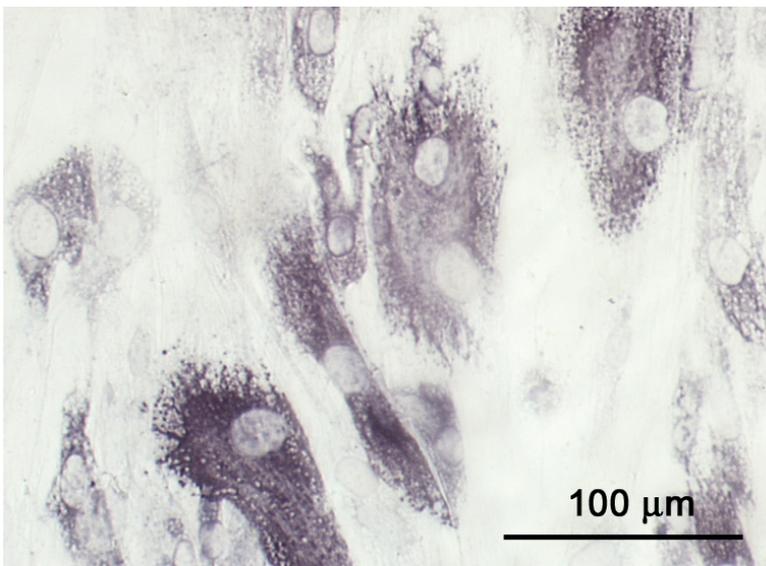
+ = positive Reaktion

**Abb. 16** 2-D-Kultur nach 2 Wochen ohne osteogene Stimulation, Immunhistochemische Markierung von Prokollagen I



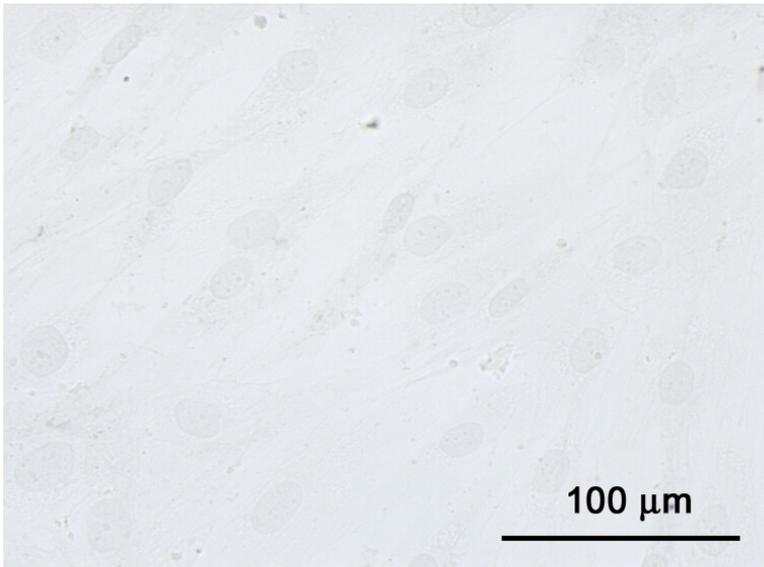
+ = positive Reaktion

**Abb. 17** 2-D-Kultur nach 2 Wochen ohne osteogene Stimulation, Immunhistochemische Markierung von Kollagen I



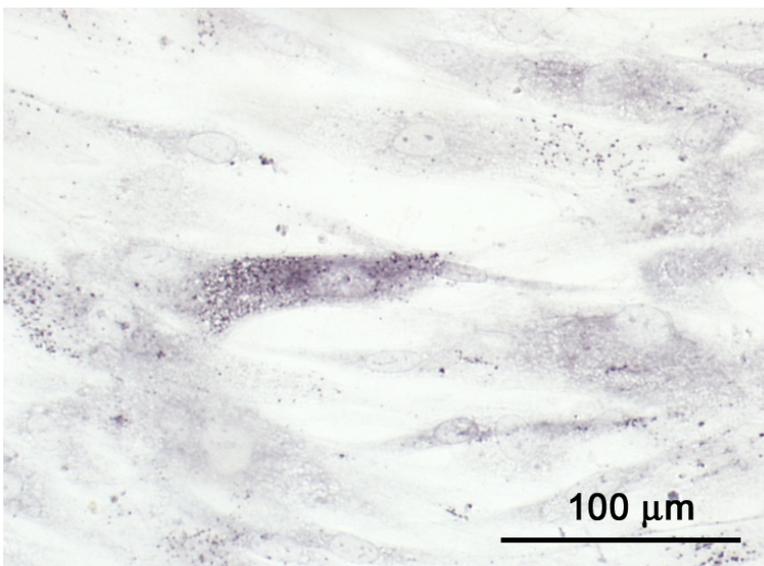
+ = positive Reaktion

**Abb. 18** 2-D-Kultur nach 2 Wochen ohne osteogene Stimulation, Immunhistochemische Markierung von Kollagen IV



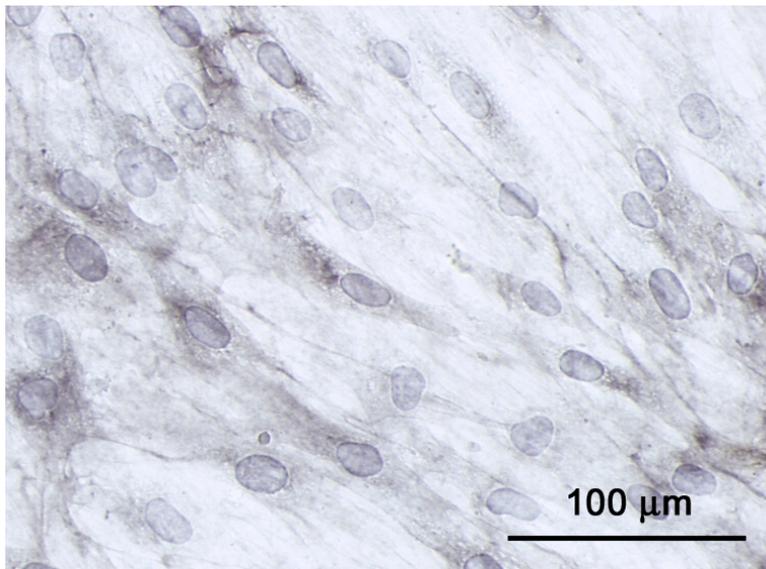
- = negative Reaktion, weniger als 5% positive Zellen

**Abb. 19** 2-D-Kultur nach 2 Wochen ohne osteogene Stimulation, Immunhistochemische Markierung von Osteocalcin



(+) = positive, aber schwache Reaktion

**Abb. 20** 2-D-Kultur nach 2 Wochen ohne osteogene Stimulation, Immunhistochemische Markierung von Osteonectin

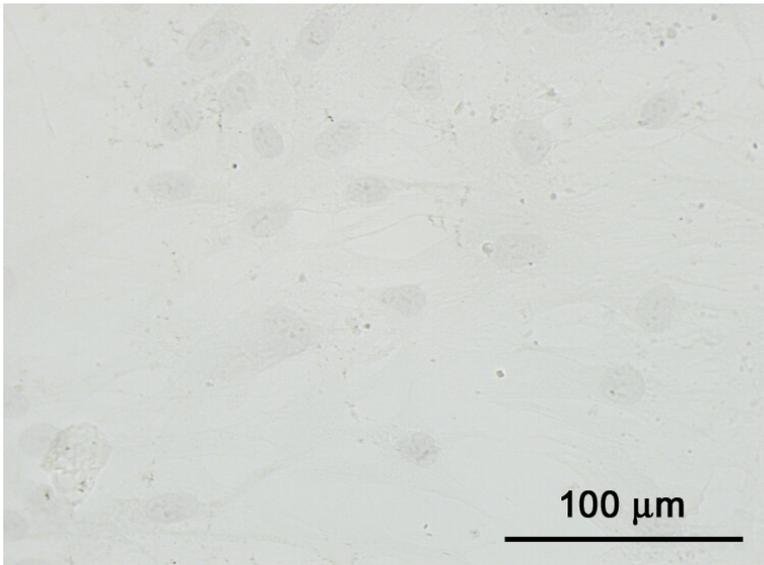


+ = positive Reaktion

**Abb. 21** 2-D-Kultur nach 2 Wochen ohne osteogene Stimulation, Immunhistochemische Markierung von Versican

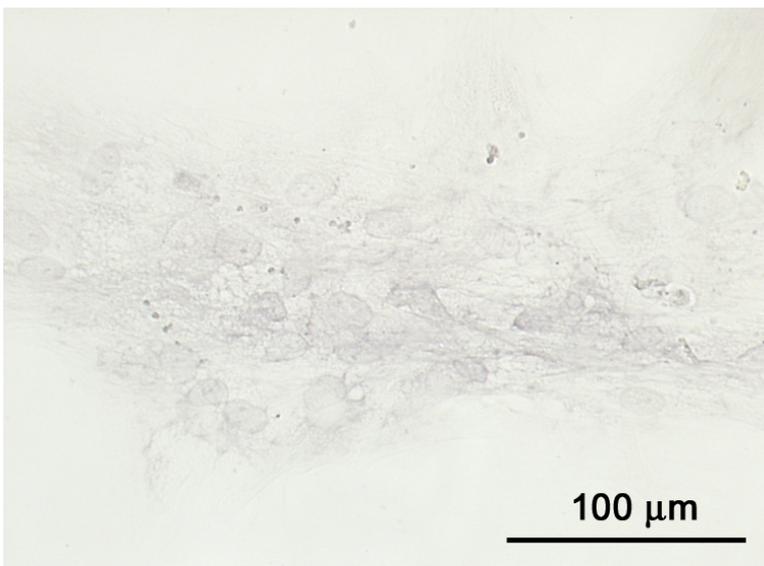
### 3.3.1.2. 2-D-Kultur mit osteogener Stimulation, 2 Wochen

Die Markierungen der 2-D-Kulturen mit osteogener Stimulation bieten im Vergleich zu den unstimulierten Kulturen nach wie vor positive Nachweise für Prokollagen I, Kollagen I und Versican. Kollagen IV und Osteonectin etwas schwächer. Im Gegensatz zur unstimulierten Kultur fallen die Markierungen von Alkalischer Phosphatase, Decorin und Osteocalcin nun vergleichsweise positiv aus, allenfalls jedoch in einer schwachen und kaum detektierbaren Markierung. Insbesondere in Bezug auf Osteocalcin lassen sich etwas deutlichere Markierungen im Bereich von Zellclustern vermuten.



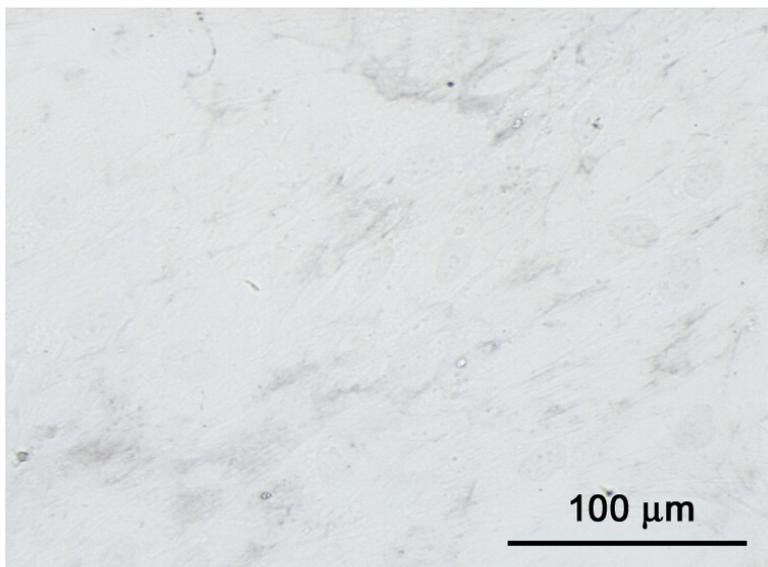
Negativkontrolle

**Abb. 22** 2-D-Kultur nach 2 Wochen mit osteogener Stimulation, Kontrolle ohne Applikation von Primärantikörpern



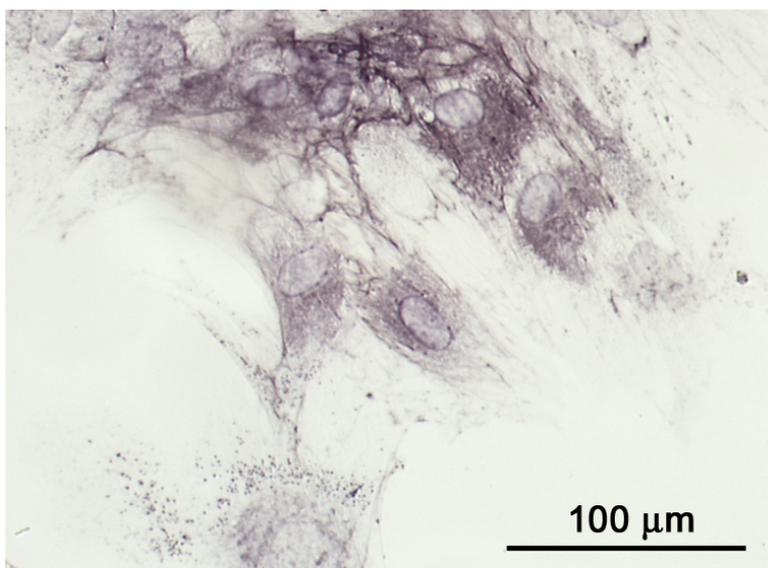
(+) = positive,  
aber schwache Reaktion

**Abb. 23** 2-D-Kultur nach 2 Wochen mit osteogener Stimulation, Immunhistochemische Markierung von Alkalischer Phosphatase



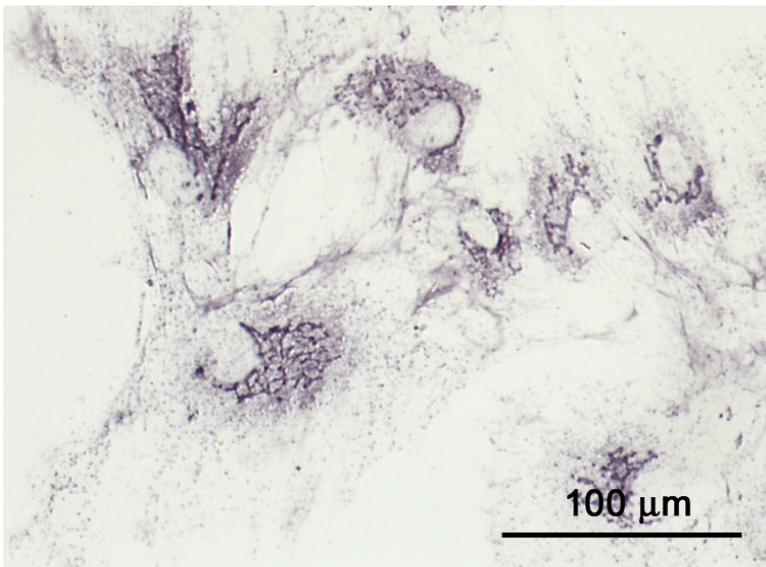
(+) = positive,  
aber schwache Reaktion

**Abb. 24** 2-D-Kultur nach 2 Wochen mit osteogener Stimulation, Immunhistochemische Markierung von Decorin



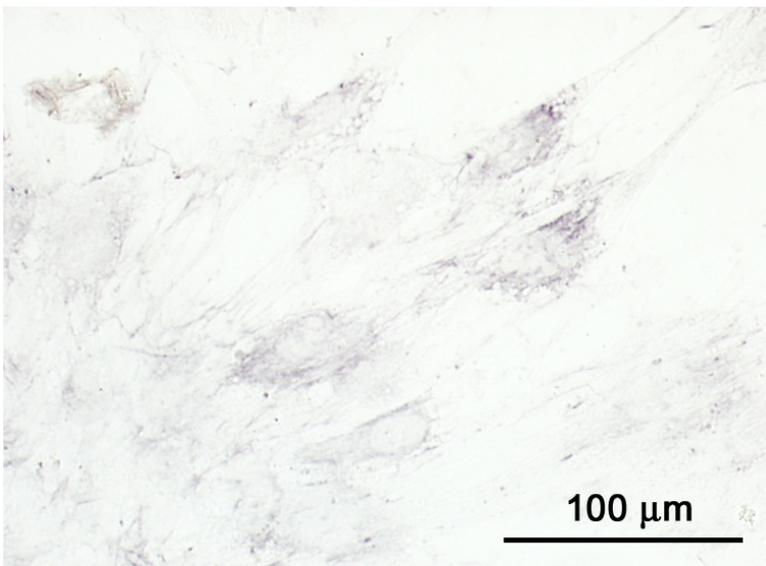
+ = positive Reaktion

**Abb. 25** 2-D-Kultur nach 2 Wochen mit osteogener Stimulation, Immunhistochemische Markierung von Prokollagen I



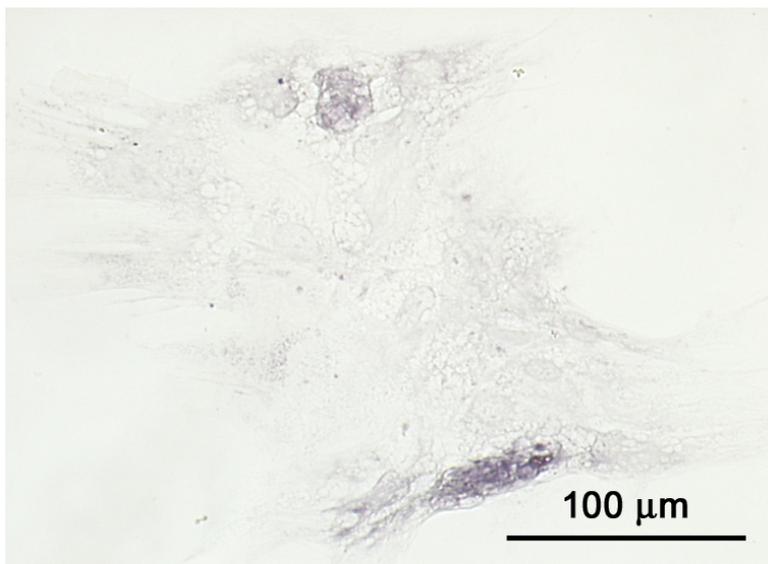
+ = positive Reaktion

**Abb. 26** 2-D-Kultur nach 2 Wochen mit osteogener Stimulation, Immunhistochemische Markierung von Kollagen I



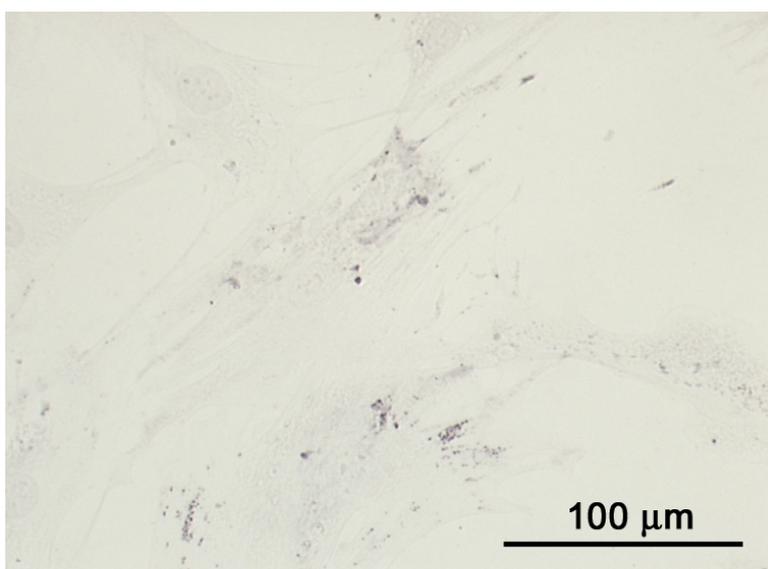
(+) = positive,  
aber schwache Reaktion

**Abb. 27** 2-D-Kultur nach 2 Wochen mit osteogener Stimulation, Immunhistochemische Markierung von Kollagen IV



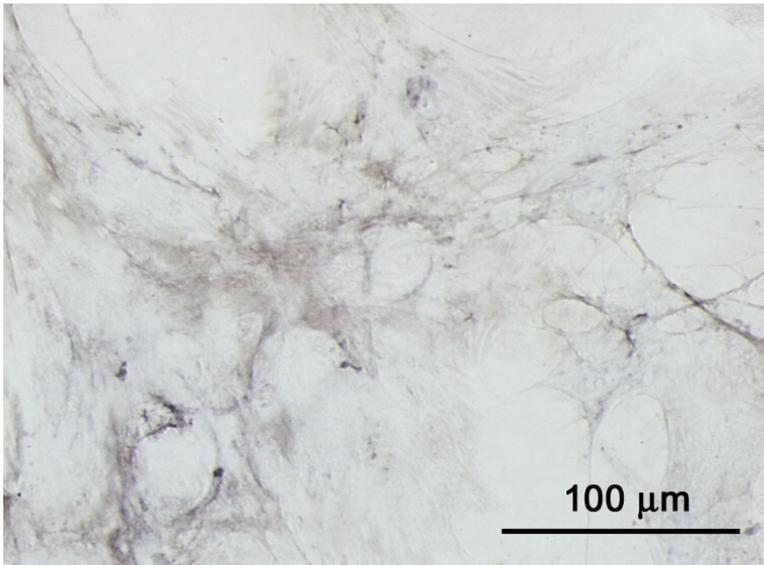
(+) = positive,  
aber schwache Reaktion

**Abb. 28** 2-D-Kultur nach 2 Wochen mit osteogener Stimulation, Immunhistochemische Markierung von Osteocalcin



(+) = positive,  
aber schwache Reaktion

**Abb. 29** 2-D-Kultur nach 2 Wochen mit osteogener Stimulation, Immunhistochemische Markierung von Osteonectin



+ = positive Reaktion

**Abb. 30** 2-D-Kultur nach 2 Wochen mit osteogener Stimulation, Immunhistochemische Markierung von Versican

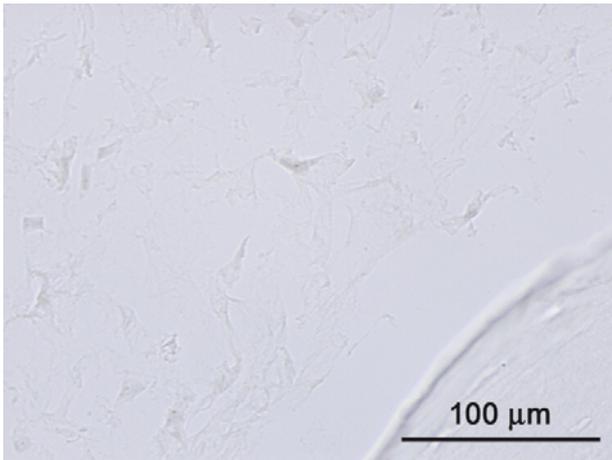
### 3.3.2. 3-D-Konstrukte mit osteogener Stimulation

Die Ergebnisse der 3-D-Kulturen im Überblick:

Antigen	3-D-Kultur		
	2 Wo. stim.	4 Wo.	6 Wo.
n =	3	1	3
Alkalische Phosphatase	-	-	-
Decorin	-	-	-
Prokollagen I	+	+	(+)
Kollagen I	+	+	+
Kollagen IV	+	+	+
Osteocalcin	+	+	+
Osteonectin	+	+	+
Versican	+	+	+

**Tab. 11** Ergebnisse der immunhistochemischen Markierungen nach 2, 4 und 6 Wochen 3-D-Kultur mit osteogener Stimulation. + = positive Reaktion, (+) = positive, aber schwache Reaktion, - = negative Reaktion, weniger als 5% positive Zellen

Die folgende Negativkontrolle entstand wiederum ohne Applikation von Primärantikörpern. Die am Rand erkennbaren Strukturen entsprechen jeweils den Trabekeln der Leitschienenmatrix.

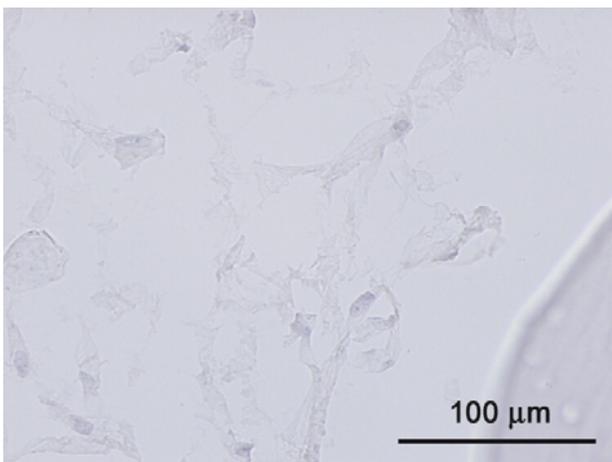


Negativkontrolle

**Abb. 31** Kontrolle ohne Applikation von Primärantikörpern

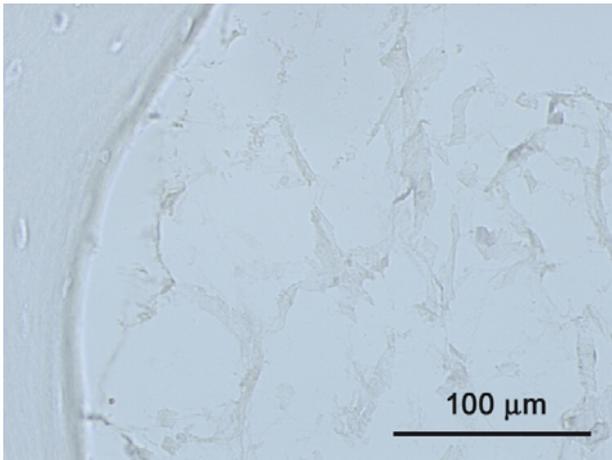
### 3.3.2.1. 3-D-Konstrukte, 2 Wochen

Die Nachweise für Prokollagen I, Kollagen I und Versican fielen wie bereits in den unstimulierten und stimulierten 2-D-Kulturen positiv aus. Die in den 2-D-Kulturen nur schwach positiv dokumentierbaren Markierungen für Kollagen IV und Osteonectin waren in den 3-D-Kulturen ebenfalls positiv. Insbesondere aber der Nachweis für Osteocalcin gelang nun im Vergleich zu beiden 2-D-Vergleichsgruppen deutlich positiv. Die in der stimulierten 2-D-Kultur schwach positiven Nachweise für Alkalische Phosphatase und Decorin fielen nun negativ aus.



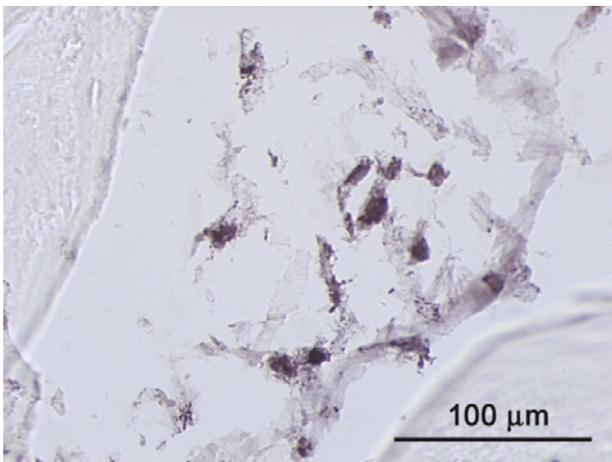
- = negative Reaktion, weniger als 5% positive Zellen

**Abb. 32** 3-D-Kultur nach 2 Wochen mit osteogener Stimulation, Immunhistochemische Markierung von Alkalischer Phosphatase



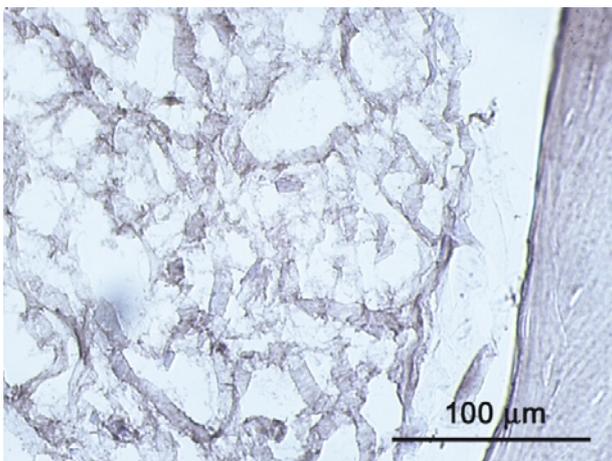
- = negative Reaktion, weniger als 5% positive Zellen

**Abb. 33** 3-D-Kultur nach 2 Wochen mit osteogener Stimulation, Immunhistochemische Markierung von Decorin



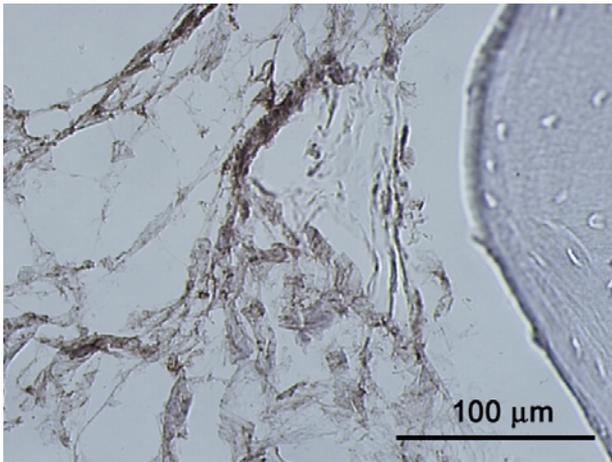
+ = positive Reaktion

**Abb. 34** 3-D-Kultur nach 2 Wochen mit osteogener Stimulation, Immunhistochemische Markierung von Prokollagen I



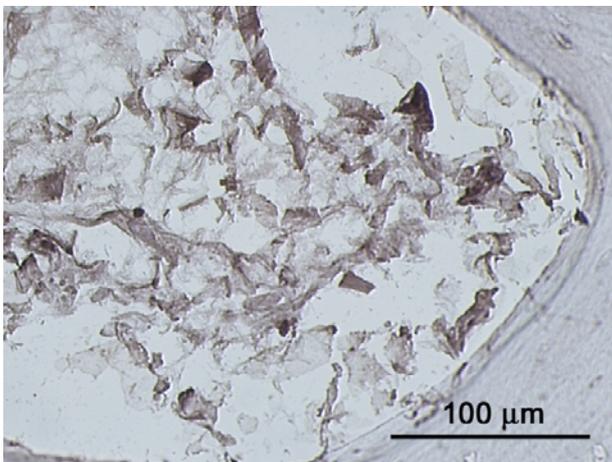
+ = positive Reaktion

**Abb. 35** 3-D-Kultur nach 2 Wochen mit osteogener Stimulation, Immunhistochemische Markierung von Kollagen I



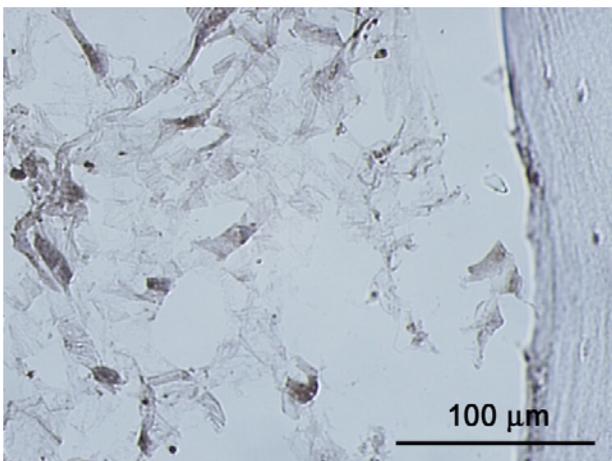
+ = positive Reaktion

**Abb. 36** 3-D-Kultur nach 2 Wochen mit osteogener Stimulation, Immunhistochemische Markierung von Kollagen IV



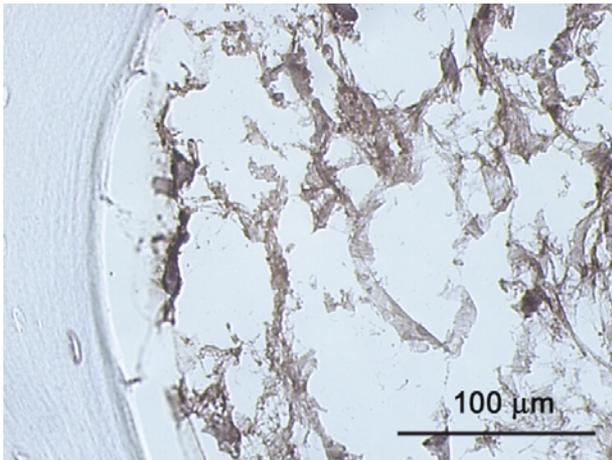
+ = positive Reaktion

**Abb. 37** 3-D-Kultur nach 2 Wochen mit osteogener Stimulation, Immunhistochemische Markierung von Osteocalcin



+ = positive Reaktion

**Abb. 38** 3-D-Kultur nach 2 Wochen mit osteogener Stimulation, Immunhistochemische Markierung von Osteonectin

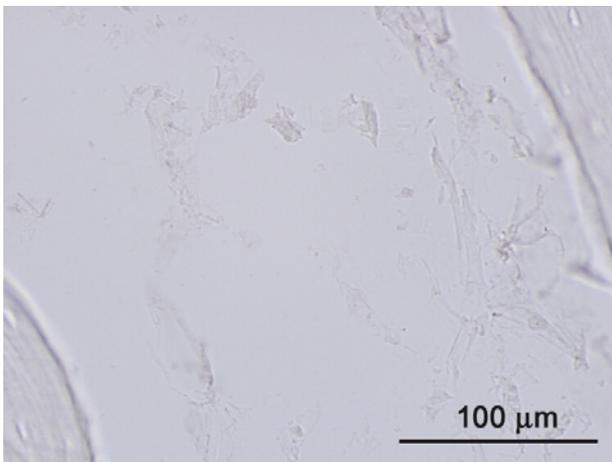


+ = positive Reaktion

**Abb. 39** 3-D-Kultur nach 2 Wochen mit osteogener Stimulation, Immunhistochemische Markierung von Versican

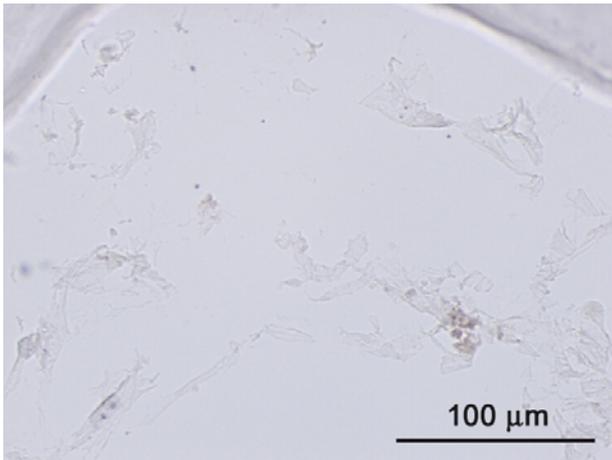
### 3.3.2.2. 3-D-Konstrukte, 4 Wochen

Im Vergleich zu den 2-Wochen-Kulturen ließ sich keine Veränderung des Markierungsprofils nachweisen. Positive Nachweise für Prokollagen I, Kollagen I und IV, Osteocalcin, Osteonectin und Versican. Negative Nachweise für Alkalische Phosphatase und Decorin.



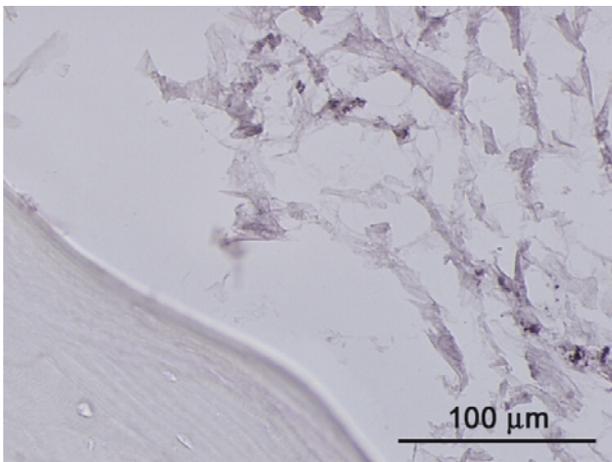
- = negative Reaktion, weniger als 5% positive Zellen

**Abb. 40** 3-D-Kultur nach 4 Wochen mit osteogener Stimulation, Immunhistochemische Markierung von Alkalischer Phosphatase



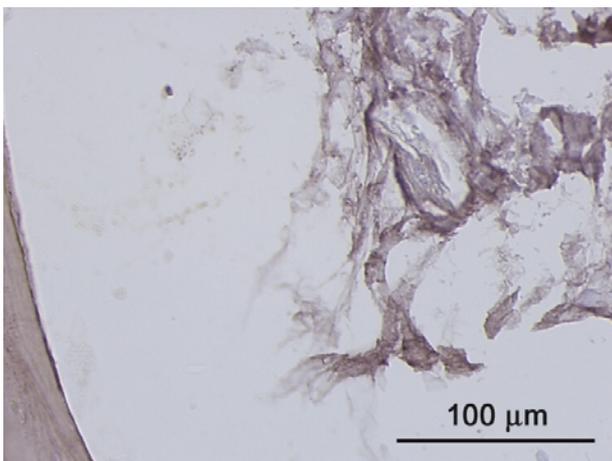
- = negative Reaktion, weniger als 5% positive Zellen

**Abb. 41** 3-D-Kultur nach 4 Wochen mit osteogener Stimulation, Immunhistochemische Markierung von Decorin



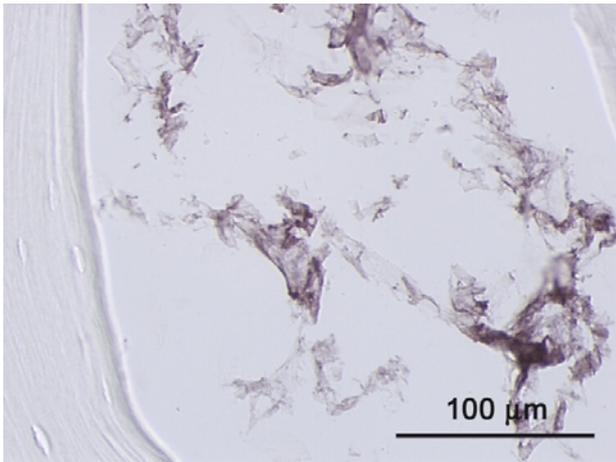
+ = positive Reaktion

**Abb. 42** 3-D-Kultur nach 4 Wochen mit osteogener Stimulation, Immunhistochemische Markierung von Prokollagen I



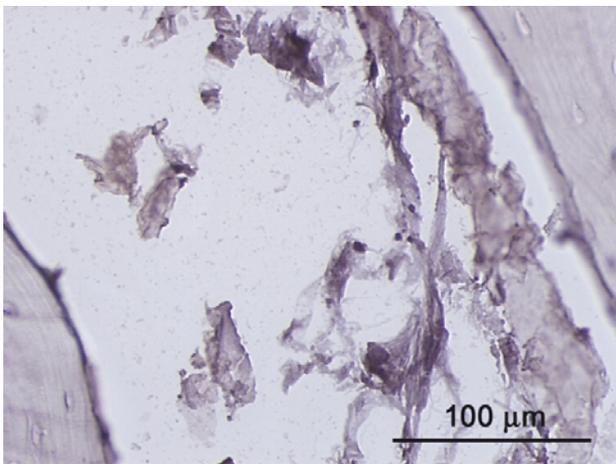
+ = positive Reaktion

**Abb. 43** 3-D-Kultur nach 4 Wochen mit osteogener Stimulation, Immunhistochemische Markierung von Kollagen I



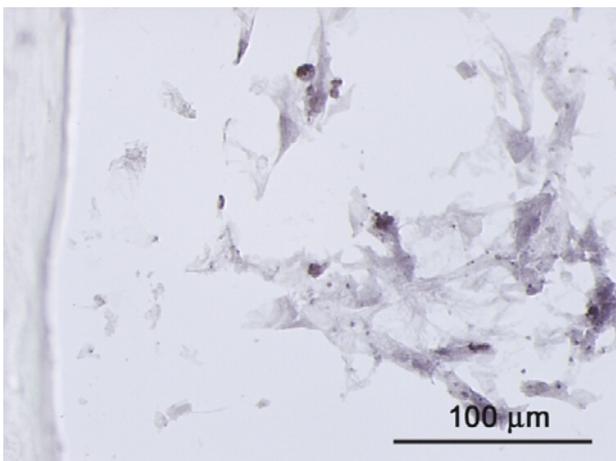
+ = positive Reaktion

**Abb. 44** 3-D-Kultur nach 4 Wochen mit osteogener Stimulation, Immunhistochemische Markierung von Kollagen IV



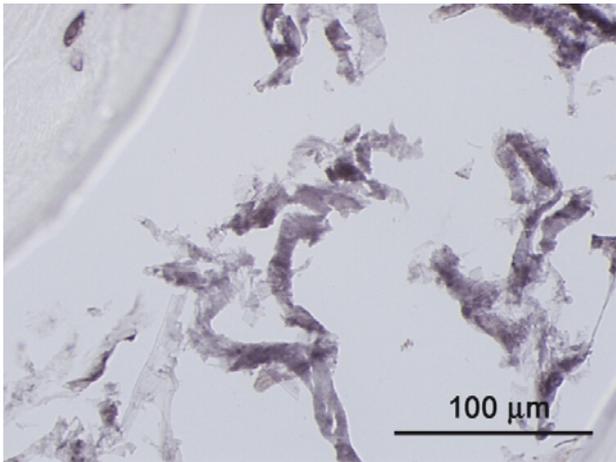
+ = positive Reaktion

**Abb. 45** 3-D-Kultur nach 4 Wochen mit osteogener Stimulation, Immunhistochemische Markierung von Osteocalcin



+ = positive Reaktion

**Abb. 46** 3-D-Kultur nach 4 Wochen mit osteogener Stimulation, Immunhistochemische Markierung von Osteonectin

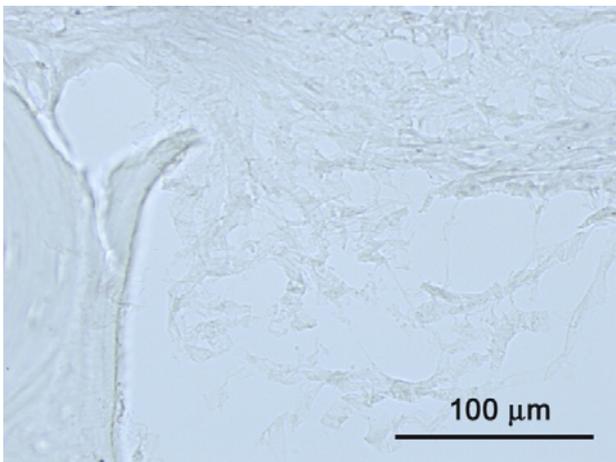


+ = positive Reaktion

**Abb. 47** 3-D-Kultur nach 4 Wochen mit osteogener Stimulation, Immunhistochemische Markierung von Versican

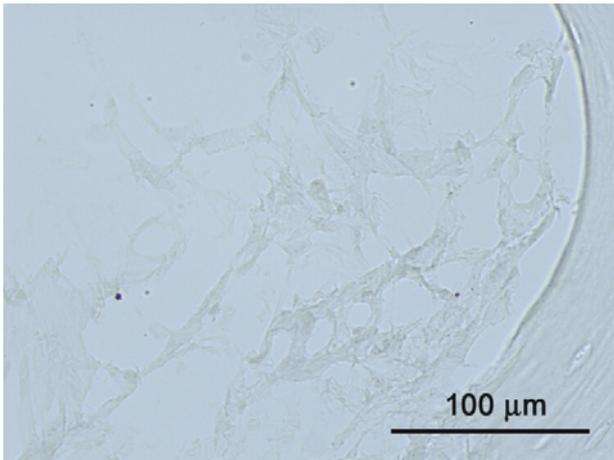
### 3.3.2.3. 3-D-Konstrukte, 6 Wochen

Im Vergleich zu den 4-Wochen-Kulturen ließ sich wiederum keine Veränderung des Markierungsprofils nachweisen, allenfalls eine leichte Abschwächung der positiven Markierung von Prokollagen I. Positive Nachweise weiterhin für Kollagen I und IV, Osteocalcin, Osteonectin und Versican. Negative Nachweise für Alkalische Phosphatase und Decorin.



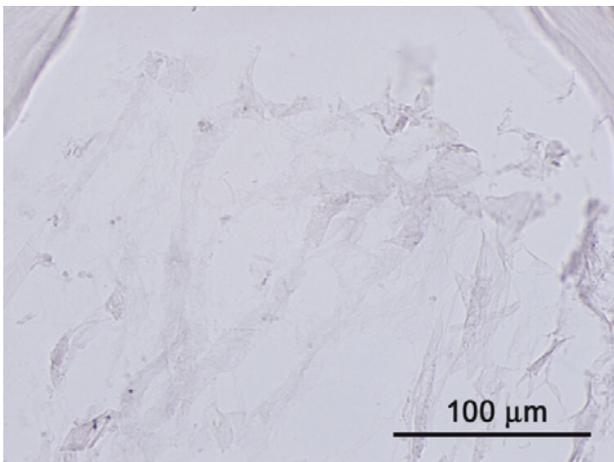
- = negative Reaktion, weniger als 5% positive Zellen

**Abb. 48** 3-D-Kultur nach 6 Wochen mit osteogener Stimulation, Immunhistochemische Markierung von Alkalischer Phosphatase



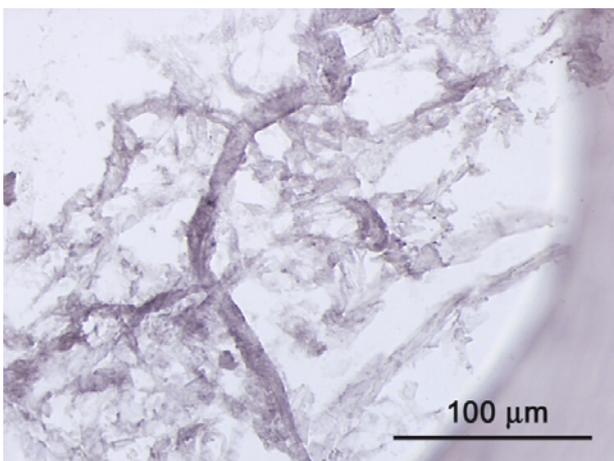
- = negative Reaktion, weniger als 5% positive Zellen

**Abb. 49** 3-D-Kultur nach 6 Wochen mit osteogener Stimulation, Immunhistochemische Markierung von Decorin



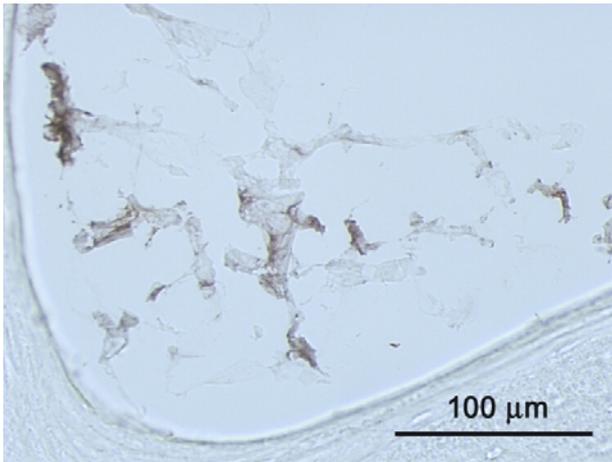
(+) = positive, aber schwache Reaktion

**Abb. 50** 3-D-Kultur nach 6 Wochen mit osteogener Stimulation, Immunhistochemische Markierung von Prokollagen I



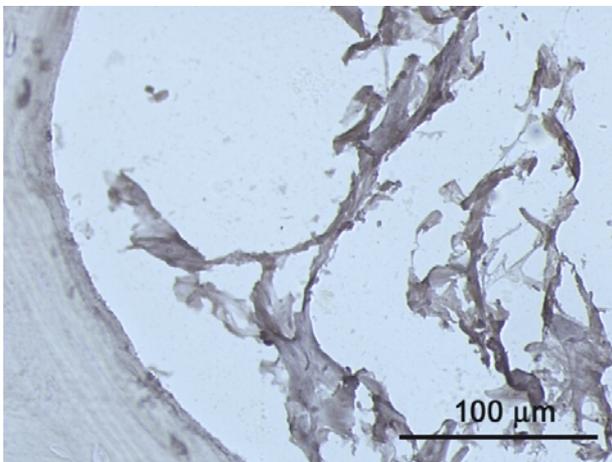
+ = positive Reaktion

**Abb. 51** 3-D-Kultur nach 6 Wochen mit osteogener Stimulation, Immunhistochemische Markierung von Kollagen I



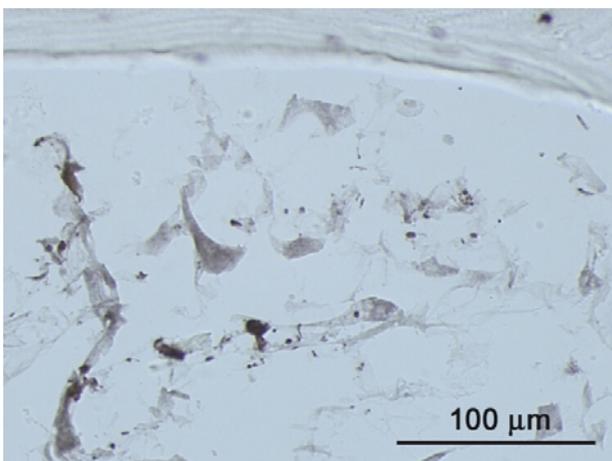
+ = positive Reaktion

**Abb. 52** 3-D-Kultur nach 6 Wochen mit osteogener Stimulation, Immunhistochemische Markierung von Kollagen IV



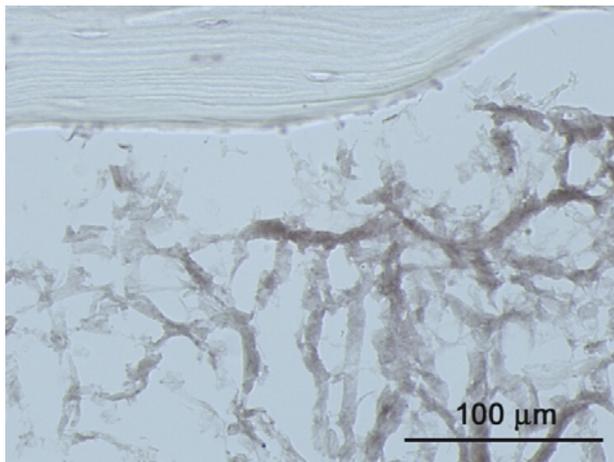
+ = positive Reaktion

**Abb. 53** 3-D-Kultur nach 6 Wochen mit osteogener Stimulation, Immunhistochemische Markierung von Osteocalcin



+ = positive Reaktion

**Abb. 54** 3-D-Kultur nach 6 Wochen mit osteogener Stimulation, Immunhistochemische Markierung von Osteonectin



+ = positive Reaktion

**Abb. 55** 3-D-Kultur nach 6 Wochen mit osteogener Stimulation, Immunhistochemische Markierung von Versican

### 3.3.3. Zusammenfassung der immunhistochemischen Ergebnisse

Die folgenden Tabelle fasst die Ergebnisse der immunhistochemischen Markierungen, sowohl der 2-D- als auch der 3-D-Kulturen zusammen:

Antigen	2-D-Kultur		3-D-Kultur		
	2 Wo. unstim.	stim.	2 Wo. stim.	4 Wo.	6 Wo.
n =	3	3	3	1	3
Alkalische Phosphatase	-	(+)	-	-	-
Decorin	-	(+)	-	-	-
Prokollagen I	+	+	+	+	(+)
Kollagen I	+	+	+	+	+
Kollagen IV	+	(+)	+	+	+
Osteocalcin	-	(+)	+	+	+
Osteonectin	(+)	(+)	+	+	+
Versican	+	+	+	+	+

**Tab. 12** Zusammenfassung der Ergebnisse der immunhistochemischen Markierungen. + = positive Reaktion, (+) = positive, aber schwache Reaktion, - = negative Reaktion, weniger als 5% positive Zellen

## 4. Diskussion

### 4.1. Etablierung der 3-D-Zellkultur

#### 4.1.1. Zellen, Zellwachstum und Zelldifferenzierung

Prinzipiell lassen sich osteogene Zellen, die sich innerhalb der Differenzierungskaskade von mesenchymaler Stammzelle hin zum Osteblasten bzw. Osteozyten befinden (Aubin 1998) auf verschiedene Art und Weise isolieren. Osteogene Zellen können aus Knochenmark, z.B. über Dichtegradienten isoliert werden, oder auch aus spongiösem Knochen mittels mechanischer Verfahren (Tuli et al. 2003). Man erhält jedoch oft einen Pool verschiedenartiger Zellen, u.a. Fibroblasten und Erythrozyten, die nicht den Zielzellen entsprechen (Jonsson et al. 1999). Standardisierte Verfahren gibt es kaum. Für die vorliegende Arbeit wurden daher kommerziell erhältliche humane mesenchymale Stammzellen gewählt, die gemäß einem etablierten herstellerseitigen Protokoll einen hohen Anteil an hMSC als Ausgangspool der osteblastären Differenzierungskaskade enthalten (Pittenger et al. 1999, Owen 1988). Gegenstand künftiger Untersuchungen könnte jedoch auch sein, bereits weitgehend differenzierte Zellen auf Leitschienen aufzubringen (Cancedda et al. 2003). Die Knochenbildung ist davon abgesehen ein komplexes Zusammenspiel verschiedenster Einflüsse und Faktoren (Reddi 2000, Baylink et al. 1993). Die osteogene Stimulation der hMSC erfolgte im Rahmen der vorliegenden Arbeit mittels Dexamethason,  $\beta$ -Glycerophosphat und Ascorbinsäure-2-Phosphat (Jaiswal et al. 1997, Bellows et al. 1986). Parallel in unserer Arbeitsgruppe durchgeführte Versuchsansätze in 2-D-Kultur konnten damit bereits deutliche Veränderungen der Morphologie, der Wachstumseigenschaften sowie des immunhistochemischen Markierungsprofils nachweisen. Eine vollständige Identität mit humanen Osteoblasten jedoch konnte nicht erreicht werden (Pautke 2003). Insofern erscheint es unwahrscheinlich, dass eine Stimulation mit Dexamethason,  $\beta$ -Glycerophosphat und Ascorbinsäure-2-Phosphat alleine die komplizierten Abläufe der Osteogenese *in vivo* nachahmen kann. Dies könnte bereits dadurch zu belegen sein, dass dem Nährmedium über die oben genannten Stimulanzen hinaus, wie auch in den meisten vergleichbaren Arbeiten (Denk et al. 1998) fetales, bovines Serum (FBS) zugesetzt wird, was per se in seiner Zusammensetzung nicht exakt definiert ist. Ohne diesen Zusatz verliefen Untersuchungen hinsichtlich der Kno-

chenneubildung *in vitro* frustran (Beresford et al. 1993). Der Zusatz von Serum scheint damit ebenfalls eine wichtige Funktion im Rahmen der osteoblastären Differenzierungskaskade zu erfüllen. Dass aber genau dieses fötale Kälberserum ein Ungleichgewicht zu Ungunsten der Zelldifferenzierung und zu Gunsten einer vermehrten Zellproliferation, also einer raschen Abfolge von Zellmitosen bewirkt, wird wiederum zumindest in einzelnen Arbeiten beschrieben (Strehl et al. 2002). Die Betrachtung der osteogenen Stimulanzen im einzelnen ergab folgendes:

#### Dexamethason:

Zunächst erscheint der Zusatz eines Glucokorticoids paradox, da diese Stoffgruppe ja primär für die Reduzierung von Knochenmasse bzw. Knochendichte verantwortlich gemacht wird (Canalis 1996). Zudem führen Glucokorticoide innerhalb der osteoblastären Kaskade prinzipiell eher zu einer Inhibierung der osteogenen Differenzierung bzw. gar zur Dedifferenzierung der Zellen (Pereira et al. 2002). Trotzdem scheint Dexamethason insbesondere im Zusammenspiel mit  $\beta$ -Glycerophosphat einen positiven Einfluss auf die Knochenneubildung *in vitro* zu haben. Dies konnte eine parallel in unserer Arbeitsgruppe durchgeführte Untersuchung (Pautke 2003) modellhaft u.a. mit einer Steigerung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase, und in Verbindung mit  $\beta$ -Glycerophosphat einer günstigen Wirkung auf die Bildung von extrazellulärer Matrix erklären (Bhargava et al. 1988, Bellows et al. 1986). Darüber hinaus steigert die Anwesenheit von Dexamethason auch die Expression der Alkalischen Phosphatase (Pereira et al. 2002) und hat positiven Einfluss auf Migrations- und Adhäsionseigenschaften von Zellen (Frank et al. 2002). Für die Kalzifizierung der extrazellulären Matrix *in vitro* ist Dexamethason essentiell (Rickard et al. 1996).

#### $\beta$ -Glycerophosphat:

Die Funktion des  $\beta$ -Glycerophosphat wird den vorhergehenden Ausführungen entsprechend in erster Linie in der Egalisierung der nachteiligen Wirkungen insbesondere des Dexamethasons gesehen, und erst nachrangig in der originären Funktion eines Phosphatdonors (Pereira et al. 2001, Beresford et al. 1993).

#### Ascorbinsäure-2-Phosphat:

Ascorbinsäure fungiert im allgemeinen als Radikalfänger und dient daneben unter anderem als Redoxsystem bei Hydroxylierungsreaktionen. Somit fördert Ascorbin-

säure die Knochenneubildung sehr wahrscheinlich insbesondere durch die maßgebliche Beteiligung an der Hydroxilierung von Kollagen und Kollagen I, und damit der Bildung der extrazellulären Matrix, welche wiederum Voraussetzung für die Knochenmineralisierung ist (Bellows et al. 1986).

#### 4.1.2. Leitschiene

Die dreidimensionale *in vitro* Kultivierung von humanen mesenchymalen Stammzellen kann nur in Verbindung mit porösen Leitschienen erfolgen. Das Leitschienenmaterial muss dabei den Anforderungen des zu kultivierenden Gewebes genügen. Hinsichtlich der Kultivierung von Knochengewebe sind dies in erster Linie Eigenschaften wie Biokompatibilität, Porengröße, Interkonnektivität, mechanische Stabilität und Bearbeitbarkeit (Yang et al. 2001).

#### Natürliche Polymere:

Kollagen I als originär im Knochengewebe vorkommendes Strukturprotein der extrazellulären Matrix wird hinsichtlich der Förderung der Zelladhäsion ein positiver Einfluss auf das Zellwachstum *in vitro* zugeschrieben (Yang et al. 2004). Darüber hinaus lassen sich Leitschienen aus kollagenen Materialien gut der Biointegration und dem Remodelling *in vivo* unterwerfen. Wesentliche Nachteile sind allerdings unzureichende mechanische Eigenschaften sowie das Risiko des Auftretens von immunologischen Reaktionen, da das verwendete Kollagen I meist tierischen Ursprungs ist. Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine hinreichende mechanische Stabilität hinsichtlich einer potentiellen Osteointegration *in vivo* gefordert war, wurde von der Verwendung kollagenen Materials abgesehen.

#### Demineralisierte Knochenmatrix:

Aus demselben Grund, der die Verwendung von natürlichen Polymeren nicht ratsam erscheinen ließ, schieden demineralisierte Knochenmatrices aus. Zwar wird verschiedentlich über den Einsatz solcher Materialien berichtet (Urist 1965), doch fehlt die wesentliche Eigenschaft ausreichender mechanischer Stabilität. Auch als Composit in Verbindung beispielsweise mit Hydroxylapatit kann nur eine unzureichende Steigerung der mechanischen Parameter erreicht werden (Parikh 2002).

Kalziumphosphatkeramiken:

Keramikmaterialien wie diese bieten primär sehr gute osteokonduktive Eigenschaften. Aufgrund der erforderlichen hohen Temperaturen und Drücke verursachen Kalziumphosphatkeramiken jedoch vergleichsweise hohen Aufwand in der Herstellung. Intraoperativ lässt sich das Material kaum bearbeiten, da es sehr spröde ist. Die mechanische Stabilität ist darüber hinaus vergleichsweise gering (Parikh 2002).

Synthetische Polymere:

Im Gegensatz zu den natürlichen Polymeren bergen die synthetischen Polymere zwar nicht die Gefahr des Auftretens von immunologischen Reaktionen, hinsichtlich der mechanischen Primärstabilität bieten sie jedoch keine wesentlichen Vorteile. Die Biokompatibilität wird durch das Auftreten saurer Stoffwechselmetabolite im Rahmen des Remodellings bzw. des Abbaus des Leitschienenmaterials *in vivo* beeinträchtigt (Yang et al. 2001).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde lösungsmittelkonservierte und  $\gamma$ -Strahlensterilisierte bovine Spongiosa (Tutobone, Fa. Tutogen Medical) verwendet, die bereits für die klinische Anwendung zugelassen ist. Das Material ist kommerziell in einfachen geometrischen Formen erhältlich und dient als unbesiedelter Knochenersatz bei geringen Defektdimensionen. Die spongiöse Matrix bot nicht nur eine gute mechanische Primärstabilität, sondern auch eine sehr gute Feingeometrie hinsichtlich des Grades der Interkonnektivität sowie eine den physiologischen Verhältnissen *in vivo* nahekommende Makroporosität. Vergleichbare Matrices wurden bereits in anderen Arbeiten verwendet (Liu et al. 2003, Yang et al. 2000, Guenther et al. 1996). Untersuchungen im Bohrlochmodell am Kaninchen zeigten hierbei einen raschen Ablauf des Heilungsprozesses bis hin zu nahezu vollständigem Remodelling (Guenther et al. 1996).

#### 4.1.3. Beimpfungsmethode

Ausgehend von den in zweidimensionaler Kultur expandierten Zellen ist es erforderlich, diese effizient auf die vorgesehenen Leitschienen aufzubringen (Wiedmann-Al-Ahmad et al. 2002). Eine definierte Adhärenzphase in stationären Zustand erschien dabei alleine bereits deshalb unumgänglich, da die aufgetragenen Zellen ansonsten bereits durch den Mediumfluss wieder von der Leitschiene abgetragen würden. Ei-

gene Messungen ergaben einen Anteil von 60 – 80 % Zellen, von denen anzunehmen war, dass sie nach der Adhärenzphase auf der Leitschiene anhafteten. Vergleichbare Arbeiten sehen insbesondere in der Dichte der auf die Leitschienen aufgebrauchten Zellen einen relevanten Faktor hinsichtlich der Ausbildung von Zellmatrix (Holy et al. 2000, Ishaug et al. 1997). Solche Faktoren sind auch geeignete Vorbeschichtungen der Leitschienenstrukturen, wie z.B. Fibronectin, insbesondere bei Verwendung von Keramiken oder anderen synthetischen Materialien (Anselme 2000, Degasne et al. 1999, Dalton et al. 1995). Andere Arbeitsgruppen steigerten die Effizienz des Beimpfungsvorganges aber auch mittels definierter Applikation von Unterdrücken, um eine homogene Füllung der Leitschienenstruktur zu erreichen (Bruder et al. 1998).

#### 4.1.4. Bioreaktor und Kultivierung

Prinzipiell muss ein geeignetes Perfusionssystem eine sichere und kontinuierliche Versorgung mit entsprechendem Nährmedium gewährleisten, mehrfach verwendbar, d.h. autoklavierbar sein und sich in Verbindung mit definierten Umgebungsbedingungen (+ 37 °C Temperatur, 5 % CO<sub>2</sub> - Atmosphäre) betreiben lassen. Die Versorgung mit Nährmedium erfolgt dabei über Vorratsflaschen und gaspermeable Silikon-schläuche sowie Peristaltikpumpen. Sterilität innerhalb des Perfusionssystems muss während der gesamten Kultivierungsphase ebenso gewährleistet sein wie die ausreichende Versorgung des Systems mit Sauerstoff, um anaerobe Stoffwechselfvorgänge weitgehend zu vermeiden (Obradovic et al. 1999). Längerfristig hingegen ist der Einsatz modifizierter Bioreaktoren erforderlich, wenn Form oder Dimension eines Konstruktes den Einsatz von Standardbioreaktoren nicht mehr zulassen. Darüber hinaus sind dynamische wie z.B. rotierende Systeme im Einsatz (Abukawa et al. 2003, Sika-vitsas et al. 2002, Granet et al. 1998) oder Systeme, die mit definiertem Druck innerhalb der Bioreaktoren arbeiten (Dong et al. 2002). Insbesondere Bewegung und Druck scheinen vielversprechende Parameter zu sein, die die Knochenneubildung positiv beeinflussen (Claes et al. 1998). Auch die Flussgeschwindigkeit des Nährmediums und die dabei auftretenden Scherkräfte sind Gegenstand vergleichbarer Untersuchungen (Botchwey et al. 2003). Während der Kultivierungsphase bei kontinuierlicher Versorgung mit frischem Medium wird zum einen die Versorgung mit Nährstoffen und den gewünschten Wachstumsfaktoren sicher gestellt, zum anderen aber auch der stetige Abtransport von potentiell schädlichen Stoffwechselmetaboliten ge-

währleistet (Mueller et al. 1999). Inwieweit dadurch evt. auch parakrin wirksame Stoffe zu rasch eliminiert werden scheint zu weiterführenden Überlegungen Anlass zu geben (Gerstenfeld et al. 2002). Fraglich wäre die Möglichkeit oder die Art der Umsetzung einer solchen weiteren Annäherung an die physiologischen Verhältnisse *in vivo*. Darüber hinaus könnten in der Kultur *in vitro* kontinuierliche Messungen in der Art von Blutgasanalysen erfolgen, durch die der pH-Wert, der Elektrolytgehalt und die Partialdrücke von Sauerstoff und Kohlendioxid innerhalb der Bioreaktoren überwacht würde. Alleine der Elektrolytgehalt wird in einzelnen Arbeiten als wichtige Größe genannt, die ebenso wie die osteogenen Stimulanzen Einfluss auf das Differenzierungsverhalten nimmt (Minuth et al. 1999).

## 4.2. Auswertemethoden

### 4.2.1. Zellmorphologie

Zellmorphologisch sollten insbesondere das dreidimensionale Zellwachstum im Rahmen der 3-D-Kulturen beurteilt werden. Zwar ließen sich die 2-D-Kulturen ebenfalls nach verschiedenen Kriterien, etwa nach der Zellgröße, der Zellform oder nach dem Grad der Konfluenz morphologisch beurteilen. Dennoch stand die Beurteilung dieser Kriterien bei den 2-D-Kulturen nicht im Vordergrund, zumal dies alleine keine eindeutige Zuordnung zu einer definierten Differenzierungsstufe zulassen würde. Die kultivierten Konstrukte wurden vor Anwendung weiterführender Methoden zunächst nach histologischer Kernfärbung auflichtmikroskopisch betrachtet. Diese Methode erlaubte bei niedrigen Vergrößerungsstufen zwar lediglich einen orientierenden Blick in die einsehbaren Bereiche der Leitschiene, trotzdem konnten dadurch bereits Aussagen z.B. über die Dichte der Zellbesiedelung auf den Leitschienenoberflächen getroffen werden. In einem weiteren Schritt wurden von den 3-D-Konstrukten sequentielle Kryoschnitte angefertigt, von denen histologische Kernfärbungen angefertigt wurden. Infolge der notwendigen Entkalkungsprozedur methodisch bedingte Schrumpfungs- und Zerreißungsartefakte verhinderten jedoch wie auch später bei den immunhistochemischen Markierungen eine naturgetreue Darstellung des Zellwachstums. Daher wurde zur realistischen Beurteilung des Zellwachstum innerhalb der Trabekel der Leitschienen schließlich Einbettungen in Methylmetacrylat (MMA) angefertigt. Die eingebetteten Konstrukte wurden in 100 µm dünne Scheiben gesägt, und davon his-

tologische Kernfärbungen angefertigt. Im Gegensatz zu den kryogeschrittenen Präparaten entstanden nach Einbettungen in MMA weder Schrumpfungs- noch Zerreißungsartefakte. Allerdings können in MMA eingebettete Präparate lediglich histologischen Methoden zugeführt werden. Die Anwendung immunhistochemischer Verfahren ist nicht möglich, da während der Polymerisation des Kunststoffes hohe Temperaturen auftreten, welche die antigenen Epitope der Zelloberflächen schädigen (Milz 1993).

#### 4.2.2. Zelldifferenzierung und Matrixbildung

Zur Auswertung der Versuchsergebnisse, bzw. zur Charakterisierung der kultivierten Zellen wurden neben rein morphologischen Aspekten insbesondere immunhistochemische Markierungen der Zellsyntheseprodukte (Proteine, Enzyme) herangezogen. Wenn auch dieses Verfahren letztendlich keine quantitative Ergebnisermittlung erlaubt (Bilbe et al. 1996), so ermöglicht es jedoch prinzipiell die Unterscheidung ob ein bestimmtes Protein oder ein Enzym exprimiert wurde oder nicht. Bei der Auswertung der 3-D-Konstrukte schied darüber hinaus Verfahren aus, die die Unversehrtheit der Zellen voraussetzen, da sich die Zellen aus der von uns gewählten Leitschiene nach Kultivierung nicht mehr herauslösen ließen. Die immunhistochemische Auswertung der 3-D- sowie der 2-D-Kulturen erfolgte mittels der im Kapitel Material und Methoden beschriebenen DAB-Methode. Diese Methode zeichnet sich sowohl durch eine hohe Sensitivität wie auch eine hohe Spezifität aus (Hsu et al. 1981). Während die immunhistochemischen Markierungen der auf Glasobjektträgern kultivierten 2-D-Kulturen neben der reinen Detektion von Zellsyntheseprodukten auch eine Aussage über deren Lokalisation in Relation zur Zelle erlaubt, ist dies in der 3-D-Kultur nur bedingt möglich. Im wesentlichen ist dies aufgrund der für die Anfertigung der Kryoschnitte erforderlichen Entkalkung der Präparate nicht mehr möglich. Während der Entkalkungsprozedur entstehende Schrumpfungs- und Zerreißungsartefakte verändern den Zellaspekt teilweise erheblich. Für die im Rahmen der vorliegenden Untersuchung definierten Fragestellungen wurden Markierungen der folgenden Zellsyntheseprodukte angefertigt.

Alkalische Phosphatase:

Das Enzym Alkalische Phosphatase gehört zur Gruppe der Esterasen, die organische Phosphorsäuremonoester hydrolytisch spalten. Alkalische Phosphatase wird an

sich traditionell als Indikator für osteogene Aktivität angesehen (Pittenger et al. 1999, Kasperk et al. 1995, Owen 1988, Robey et al. 1985). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit eignete sich Alkalische Phosphatase jedoch nicht für die Detektion osteogener Aktivität, was sich auch mit den Ergebnissen anderer Arbeiten deckt (Frank et al. 2002, Siggelkow et al. 1999, Gronthos et al. 1999). In allen Versuchsansätzen, 2-D wie 3-D waren die entsprechenden Markierungen negativ, allenfalls schwach positiv, was daher keine Unterscheidung der verschiedenen Reifungsstufen erlaubte. Ursächlich für die Nichteignung von Alkalischer Phosphatase scheint im wesentlichen der Umstand, dass dieses Enzym im Gegensatz zur vorliegenden Untersuchung zu meist über seine Enzymaktivität gemessen wird, z.B. über die Umsetzung von p-Nitrophenol (Halvorsen et al. 2001, Bennett et al. 2001). Die Messung der Enzymaktivität lässt jedoch nicht auf die tatsächlich vorhandene Menge an Protein schließen.

#### Decorin:

Decorin ist ein zur Gruppe der Proteoglykane gehörendes Matrixprotein, das unter anderem essentiell für die Fibrillogenese verschiedener Kollagentypen wie Kollagen I, II, V und VI ist. In der vorliegenden Arbeit waren die Nachweise für Decorin in allen Zeiträumen, sowohl bei den 2-D- wie auch bei den 3-D-Kulturen wie bereits beim Nachweis der Alkalischen Phosphatase negativ, allenfalls schwach positiv. Aus diesem Grund war die Eignung zur Unterscheidung der verschiedenen Reifungsstufen auch im Falle von Decorin nicht gegeben. Zwar soll Decorin bereits in einem frühen Stadium der osteoblastären Kaskade exprimiert werden (Kamiya et al. 2001), im Rahmen der vorliegenden Untersuchung *in vitro* konnte dies jedoch nicht reproduziert werden. Möglicherweise behindern die gewählten osteogenen Stimmulanzien  $\beta$ -Glycerophosphat und Ascorbinsäure-2-Phosphat die Synthese dieses Proteins (Blumberg et al. 1997). Insofern erscheint zum einen wiederum fraglich, inwieweit es unter den gewählten experimentellen Bedingungen zu einer vollständigen Ausdifferenzierung von hMSC zu humanen Osteoblasten kommen kann bzw. ob die etablierten Protokolle hinsichtlich der osteogenen Differenzierung den Verhältnissen *in vivo* hinreichend nahe kommen.

#### Prokollagen I:

Für Prokollagen I als Kollagenvorstufe finden sich positive Nachweise in allen Kulturen und über alle Zeiträume. Vergleichbar ausgeprägte Ergebnisse fanden sich be-

reits in früheren Arbeiten (Kassem et al. 1991). Allenfalls etwas schwächer positive Nachweise fanden sich in den 3-D-Kulturen über 6 Wochen. Dies könnte mit einer nach 6 Wochen zunehmenden Kalzifizierung erklärt werden und damit einer Abnahme der Synthese von Prokollagen I. Insgesamt ergibt sich jedoch durch die Markierung dieses Proteins aufgrund der überwiegend positiven Nachweise kein Erkenntnisgewinn was die Beurteilung der Differenzierung von hMSC hin zu Zellen der osteoblastären Kaskade anbelangt (Pautke 2003).

#### Kollagen I:

Kollagen I gehört zu der Gruppe der Kollagene, die fibrilläre Strukturproteine der extrazellulären Matrix sind und Hauptbestandteil des Bindegewebes, wie Sehnen, Faszien, Bänder, Knorpel und Zahnbein. Insbesondere in der extrazellulären Matrix des Knochengewebes ist es der am häufigsten vorkommende Kollagentyp (Velleman 1999). In der vorliegenden Untersuchung war der Nachweis von Kollagen I sowohl in den unstimulierten wie auch in den stimulierten 2-D-Kulturen und in den 3-D-Kulturen in allen Zeiträumen positiv. Obwohl Kollagen I als klassischer Marker der osteoblastären Kaskade gilt (Frank et al. 2002, Candelieri et al. 1999, Aubin et al. 1995), eignete er sich in der vorliegenden Untersuchung nicht zur Unterscheidung zwischen hMSC und differenzierten Stadien der osteoblastären Kaskade, da er in deutlichem Maße von allen Zellpopulationen synthetisiert wurde. In der Rahmen der immunhistochemischen Auswertung ergaben sich dadurch gleichartige, nicht differenzierbare Färbeprofile.

#### Kollagen IV:

Im Gegensatz zu Kollagen I wird Kollagen IV als Syntheseprodukt insbesondere von hMSC angesehen (Deschaseaux et al. 2000, Chichester et al. 1993). Der Nachweis von Kollagen IV war allerdings wie auch bereits bei Kollagen I in den unstimulierten und stimulierten 2-D-Kulturen wie auch in den 3-D-Kulturen in allen Zeiträumen positiv. Die positiven Nachweise von Kollagen IV lassen sich am ehesten mit dem Vorhandensein früher Vorstufen osteoblastärer Vorgängerzellen erklären, zumal andere Arbeiten zeigen konnten, dass Osteoblasten nicht in der Lage sind dieses Strukturprotein zu synthetisieren (Becker et al. 1986).

#### Osteocalcin:

Osteocalcin ist ein Protein der Knochenmatrix, das in Osteoblasten gebildet wird und Calcium bzw. Hydroxylapatit bindet. Es wird als hochspezifischer und praktisch alleiniger Marker für osteoblastische Aktivität angesehen (Ducy et al. 2000) und nur in reifen Osteoblasten und Osteozyten exprimiert (Gronthos et al. 1999, Kasai et al. 1994). In der vorliegenden Arbeit war Osteocalcin in den 3-D-Kulturen in allen Zeiträumen deutlich positiv und erlaubte damit eine Abgrenzung zu den 2-D-Kulturen. Insbesondere in der osteogen stimulierten 2-D-Kultur konnte lediglich eine schwache, kaum detektierbare Markierung nachgewiesen werden. Schwache Markierungen zeigten sich insbesondere in Arealen, die vom Aspekt her bereits eine beginnende dreidimensionale Anhäufung von Zellen vermuten ließen. Die Hochregulation der Expression von Osteocalcin in Abhängigkeit von der Zelldichte konnte bereits in anderen Arbeiten nachgewiesen werden (Siggelkow et al. 1999). Ausgehend von den im Vergleich zu den 2-D-Kulturen deutlich positiven Nachweisen von Osteocalcin in den 3-D-Kulturen scheint die Dreidimensionalität der Leitschiene damit einen zusätzlichen Stimulus für die Zelldifferenzierung darzustellen.

#### Osteonectin:

Osteonectin ist ein den Kollagenen und Osteocalcin vergleichbares Knochenmatrixprotein und damit ebenfalls Bestandteil der Knochengrundsubstanz. Osteonectin gilt neben Kollagen I, Osteopontin und Alkalischer Phosphatase ebenfalls als klassischer osteoblastärer Marker (Candeliere et al. 1999, Aubin et al. 1995). Die Nachweise von Osteonectin waren jedoch in den unstimulierten und stimulierten 2-D-Kulturen wie auch in den 3-D-Kulturen in allen Zeiträumen positiv. Zur Unterscheidung zwischen hMSC und weiter differenzierten Zellen ist dieser Marker daher wie auch bereits Prokollagen I, Kollagen I und IV nicht geeignet (Pautke 2003).

#### Versican:

Versican ist sowohl für die räumliche Anordnung von Proteoglykanen in Bindegeweben verantwortlich, als auch ausschlaggebend für Diffusionsvorgänge sowie die Regulierung des Wassergehaltes der Bindegewebe. Sie determinieren somit im wesentlichen die physikalischen Eigenschaften von Bindegeweben. Im Rahmen der Osteogenese wird Versican sowohl von hMSC als auch von osteoblastären Zellen exprimiert (Lee et al. 1998), was sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchung

deckt. Sowohl in den unstimulierten wie auch in den stimulierten 2-D- Kulturen und in den 3-D-Kulturen waren die Nachweise von Versican in allen Zeiträumen positiv. Versican eignet sich damit in Rahmen der vorliegenden Arbeit ebenfalls nicht zur Unterscheidung der Differenzierungsstadien.

### **4.3. Ergebnisse**

#### **4.3.1. Zellmorphologie nach 2, 4 und 6 Wochen in Kultur**

Bereits mit Anfertigung der auflichtmikroskopischen Aufnahmen konnten im Vergleich zu den Leerproben homogen besiedelte Leitschienenoberflächen nachgewiesen werden. Die kerngefärbten bzw. histologisch gefärbten Präparate nach Kryoschnitt, insbesondere aber nach MMA-Einbettung zeigten nahezu durchgehend dreidimensionales Zellwachstum innerhalb der Trabekelstruktur der Leitschienen. Die für die vorliegende Arbeit gewählte Leitschiene scheint somit hinsichtlich der Struktur und insbesondere der Porengröße sowie dem Grad der Interkonnektion geeignete Voraussetzungen für das Zellwachstum zu bieten. Vielfach ließ sich nach Betrachtung sequentieller Schnitte Zellwachstum darstellen, was auf mehrschichtige Zelllayer-Strukturen hindeutete. Teilweise waren die interkonnektierenden Poren der Leitschiene nahezu vollständig mit Zellen ausgefüllt. Ergebnisse vergleichbarer Untersuchungen konnten damit mit der im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewählten Leitschiene reproduziert werden (Acil et al. 2000).

#### **4.3.2. Zelldifferenzierung und Matrixbildung 2-D vs. 3-D**

Eine Hypothese der vorliegenden Arbeit war der zusätzliche Stimulus, den die Dreidimensionalität der Leitschienenstruktur und damit dreidimensionales Zellwachstum hinsichtlich der Zelldifferenzierung von hMSC zu Zellen der osteoblastären Differenzierungskaskade darstellt. Von den gewählten immunhistochemischen Markierungen erwiesen sich Prokollagen I, Kollagen I und IV, Osteonectin und Versican jedoch als nicht geeignet, diese Hypothese zu stützen oder zu verwerfen (Pautke 2003). Die Nachweise dieser spezifischen Marker sowohl in den unstimulierten und stimulierten 2-D-Kulturen als auch in den 3-D-Kulturen waren in allen Zeiträumen positiv. Die Nachweise von Alkalischer Phosphatase sowie Decorin fielen in allen Kulturen und

allen Zeiträumen negativ aus, so dass auch diese beiden Markerproteine nicht der Beurteilung von Zelldifferenzierung und Matrixbildung im dreidimensionalen System im Vergleich zur zweidimensionalen Kultur dienen konnten. Der Nachweis von Osteocalcin hingegen fiel in der vorliegenden Untersuchung nur in den 3-D-Kulturen deutlich positiv aus. In den unstimulierten 2-D-Kulturen konnte dieses Protein nicht, in den stimulierten 2-D-Kulturen kaum dokumentierbar nachgewiesen werden. Die Hypothese, dass bereits die Dreidimensionalität der Leitschiene und damit dreidimensionales Zellwachstum einen zusätzlichen Stimulus auf die Zelldifferenzierung von hMSC ausübt, scheint damit bestätigt. Dies umso mehr, da Osteocalcin ein bereits vielfach anerkannter und hochspezifischer Marker osteoblastischer Aktivität darstellt (Aubin 1998, Beresford et al. 1993).

#### **4.4. Aussage der Arbeit**

In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass dreidimensionale Kultivierung von humanen MSC *in vitro* in Verbindung mit der gewählten Leitschiene und unter kontinuierlicher Mediumversorgung über Zeiträume bis zu 6 Wochen möglich ist. In allen Versuchszeiträumen zeigten sich bereits nach qualitativen Gesichtspunkten ausgeprägtes dreidimensionales Zellwachstum. Als Zeichen osteogener Differenzierung fällt der Nachweis des osteoblastentypischen Markers Osteocalcin in den 3-D-Kulturen im Vergleich zu den 2-D-Kulturen deutlich positiv aus. Dreidimensionales Zellwachstum *in vitro* stellte unter den gewählten Bedingungen einen zusätzlichen Stimulus für die osteogene Differenzierung dar. Alkalische Phosphatase, Decorin, Prokollagen I, Kollagen I und IV, Osteonectin und Versican eigneten sich in der vorliegenden Untersuchung nicht als spezifische Marker der osteoblastären Kaskade.

#### **4.5. Ausblick**

Nach dem derzeitigen wissenschaftlichen Stand und aufbauend auf die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit scheint das Tissue Engineering von Knochen großes Potential hinsichtlich künftiger Therapieverfahren bei skelettalen Defekten zu beinhalten. Die vorliegende Arbeit sowie eine Vielzahl anderer Studien unterstreichen die besondere Stellung dieses innovativen Forschungsgebietes (Cancedda et al. 2003, Parikh 2002, Burg et al. 2000, Vacanti et al. 2000). Für die Zukunft erscheint es denkbar

maßangefertigte Bioimplantate unter Verwendung wirkungsneutraler und biologisch integrierbarer Leitschienen in Verbindung mit autogenen Zellen herzustellen. Gleichwohl bedarf es hinsichtlich der für die klinischen Anwendung am Menschen erforderlichen Formen und Dimensionen weiterer Forschungsarbeit, insbesondere was die Nährstoffversorgung größerer Konstrukte *in vitro* wie auch *in vivo* anbelangt (Stark et al. 2000). Hierbei scheint die Versorgung über zentrale, künstliche Gefäße ein vielversprechender Ansatz. In unserer Arbeitsgruppe durchgeführte Untersuchungen zu diesem Thema verliefen bisher viel versprechend (Tischer et al. 2004). Hinsichtlich der Optimierung der Leitschienen können rechnergestützt in Form und Dimension an anatomische Gegebenheiten angepasste Leitschienen hergestellt werden (Yang et al. 2002). Die Kombination des Tissue Engineering von Knochen mit dem Tissue Engineering von Knorpel im Rahmen von Knochen- / Knorpel-Co-Kultivierungen eröffnet darüber hinaus weitere breit gefächerte Anwendungsgebiete (Gao et al. 2001).

## 5. Zusammenfassung

### Zielsetzung und Fragestellung:

Bei der Behandlung von Knochendefekten wird dem Tissue Engineering großes Potential zugesprochen. In der vorliegenden Untersuchung wurden humane Mesenchymale Stammzellen (hMSC) *in vitro* vermehrt und unter osteogener Stimulation auf einer bereits klinisch zur Knochendefektfüllung zugelassenen Leitschiene kultiviert. Ziel der Arbeit war neben der Etablierung des Modells zunächst die qualitative Beurteilung des Zellwachstums über Zeiträume von 2, 4 und 6 Wochen. Insbesondere aber sollte der immunhistochemische Nachweis von Zelldifferenzierung und Matrixbildung im dreidimensionalen System im Vergleich zur zweidimensionalen Kultur über einen Zeitraum von 2 Wochen erfolgen, und damit die Untersuchung des Einflusses der Dreidimensionalität der gewählten Leitschiene.

### Material und Methoden:

Die Vermehrung der hMSC (Fa. Poietics) erfolgte in DMEM unter Zugabe von FBS, L-Glutamin und Antibiotika. Die zylinderförmigen Leitschienen (Tutobone, Fa. Tutogen Medical, d= 9 mm, h= 3 mm) wurden mit jeweils  $1,6 \times 10^6$  Zellen besiedelt. Die Kultivierung erfolgte im Bioreaktor für 2, 4 und 6 Wochen bei kontinuierlicher Mediumversorgung (3,3 ml/h). Zur osteogenen Stimulation wurde Dexamethason, Ascorbinsäure-2-Phosphat und  $\beta$ -Glycerophosphat zugesetzt. Für die 2-D-Vergleichsgruppen wurde ein Teil der Ausgangszellen mit, ein weiterer Teil ohne osteogene Stimulation für 2 Wochen fortgeführt. Nach 2, 4 und 6 Wochen erfolgte die auflichtmikroskopische, histologische und immunhistochemische Auswertung aller Präparate. Alle Versuche wurden dreifach durchgeführt, die Kulturen über 4 Wochen einfach.

### Ergebnisse:

Innerhalb der Leitschienen konnte in allen Versuchszeiträumen homogenes, dreidimensionales Zellwachstum sowie deutliche Matrixbildung gezeigt werden. Die immunhistochemischen Nachweise für Prokollagen I, Kollagen I und IV, Osteocalcin, Osteonectin, und Versican waren in den 3-D-Präparaten in allen Zeiträumen deutlich positiv, die Nachweise für Alkalische Phosphatase und Decorin negativ. Im Vergleich zu den 3-D-Kulturen war in der stimulierten 2-D-Kultur die Markierung von Osteocal-

cin deutlich schwächer ausgeprägt. Ohne osteogene Stimulation konnten in den 2-D-Kulturen positive Nachweise für Kollagen I, Kollagen IV, Osteonectin, Prokollagen I und Versican gefunden werden, keine Nachweise für Alkalische Phosphatase, Decorin und Osteocalcin.

Schlussfolgerungen:

1. Die dreidimensionale Kultivierung von humanen MSC *in vitro* in Verbindung mit der gewählten Leitschiene und unter kontinuierlicher Mediumversorgung ist über Zeiträume bis zu 6 Wochen möglich.
2. In allen Versuchszeiträumen führte dies bereits nach qualitativen Gesichtspunkten zu ausgeprägtem dreidimensionalem Zellwachstum.
3. Als Zeichen osteogener Differenzierung fällt der Nachweis des osteoblastentypischen Markers Osteocalcin in den 3-D-Kulturen im Vergleich zu den 2-D-Kulturen deutlich positiv aus. Dreidimensionales Zellwachstum *in vitro* stellte unter den gewählten Bedingungen einen zusätzlichen Stimulus für die osteogene Differenzierung dar.
4. Alkalische Phosphatase, Decorin, Prokollagen I, Kollagen I und IV, Osteonectin und Versican eigneten sich in der vorliegenden Untersuchung nicht als spezifische Marker der osteoblastären Kaskade.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Abukawa H, Terai H, Hannouche D, Vacanti JP, Kaban LB, Troulis MJ (2003); Formation of a mandibular condyle in vitro by tissue engineering; J Oral Maxillofac Surg 61(1):94-100
2. Acil Y, Terheyden H, Dunsche A, Fleiner B, Jepsen S (2000); Three-dimensional cultivation of human osteoblast-like cells on highly porous natural bone mineral; J Biomed Mater Res 51(4):703-710
3. Altman GH, Diaz F, Jakuba C, Calabro T, Horan RL, Chen J et al. (2003); Silk-based biomaterials; Biomaterials 24(3):401-416
4. Altman GH, Lu HH, Horan RL, Calabro T, Ryder D, Kaplan DL et al. (2002); Advanced bioreactor with controlled application of multi-dimensional strain for tissue engineering; J Biomech Eng 124(6):742-749
5. Anselme K (2000); Osteoblast adhesion on biomaterials; Biomaterials 21(7):667-681
6. Athanasiou KA, Zhu C, Lanctot DR, Agrawal CM, Wang X (2000); Fundamentals of biomechanics in tissue engineering of bone; Tissue Eng 6(4):361-381
7. Aubin JE (1998); Bone stem cells; J Cell Biochem Suppl 30-31:73-82.:73-82
8. Aubin JE, Liu F, Malaval L, Gupta AK (1995); Osteoblast and chondroblast differentiation; Bone 17(2 Suppl):77S-83S
9. Bancroft GN, Sikavitsas VI, Mikos AG (2003); Design of a flow perfusion bioreactor system for bone tissue-engineering applications; Tissue Eng 9(3):549-554
10. Barnes GL, Kostenuik PJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA (1999); Growth factor regulation of fracture repair; J Bone Miner Res 14(11):1805-1815
11. Bast E (1999); Steriles Arbeiten - Sicherheit im Labor; Spektrum Akademischer Verlag; Mikrobiologische Methoden 1:35-46

12. Bauer TW, Muschler GF (2000); Bone graft materials. An overview of the basic science; Clin Orthop(371):10-27
13. Baylink DJ, Finkelman RD, Mohan S (1993); Growth factors to stimulate bone formation; J Bone Miner Res 8 Suppl 2:S565-72.:S565-S572
14. Becker J, Schuppan D, Benzian H, Bals T, Hahn EG, Cantaluppi C et al. (1986); Immunohistochemical distribution of collagens types IV, V, and VI and of pro-collagens types I and III in human alveolar bone and dentine; J Histochem Cytochem 34(11):1417-1429
15. Bellows CG, Aubin JE, Heersche JN, Antosz ME (1986); Mineralized bone nodules formed in vitro from enzymatically released rat calvaria cell populations; Calcif Tissue Int 38(3):143-154
16. Bennett JH, Carter DH, Alavi AL, Beresford JN, Walsh S (2001); Patterns of integrin expression in a human mandibular explant model of osteoblast differentiation; Arch Oral Biol 46(3):229-238
17. Beresford JN, Graves SE, Smoothy CA (1993); Formation of mineralized nodules by bone derived cells in vitro: a model of bone formation?; Am J Med Genet 45(2):163-178
18. Bhargava U, Bar-Lev M, Bellows CG, Aubin JE (1988); Ultrastructural analysis of bone nodules formed in vitro by isolated fetal rat calvaria cells; Bone 9(3):155-163
19. Bilbe G, Roberts E, Birch M, Evans DB (1996); PCR phenotyping of cytokines, growth factors and their receptors and bone matrix proteins in human osteoblast-like cell lines; Bone 19(5):437-445
20. Blumberg P, Brenner R, Budny S, Kresse H (1997); Increased turnover of small proteoglycans synthesized by human osteoblasts during cultivation with ascorbate and beta-glycerophosphate; Calcif Tissue Int 60(6):554-560
21. Botchwey EA, Pollack SR, El Amin S, Levine EM, Tuan RS, Laurencin CT (2003); Human osteoblast-like cells in three-dimensional culture with fluid flow; Biorheology 40(1-3):299-306

22. Botchwey EA, Pollack SR, Levine EM, Laurencin CT (2001); Bone tissue engineering in a rotating bioreactor using a microcarrier matrix system; *J Biomed Mater Res* 55(2):242-253
23. Bruder SP, Fox BS (1999); Tissue engineering of bone. Cell based strategies; *Clin Orthop*(367 Suppl):S68-S83
24. Bruder SP, Horowitz MC, Mosca JD, Haynesworth SE (1997); Monoclonal antibodies reactive with human osteogenic cell surface antigens; *Bone* 21(3):225-235
25. 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 Am* 80(7):985-996
26. Burg KJ, Porter S, Kellam JF (2000); Biomaterial developments for bone tissue engineering; *Biomaterials* 21(23):2347-2359
27. Canalis E (1996); Clinical review 83: Mechanisms of glucocorticoid action in bone: implications to glucocorticoid-induced osteoporosis; *J Clin Endocrinol Metab* 81(10):3441-3447
28. Cancedda R, Dozin B, Giannoni P, Quarto R (2003); Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone; *Matrix Biol* 22(1):81-91
29. Candelieri GA, Rao Y, Floh A, Sandler SD, Aubin JE (1999); cDNA fingerprinting of osteoprogenitor cells to isolate differentiation stage-specific genes; *Nucleic Acids Res* 27(4):1079-1083
30. Caplan AI, Goldberg VM (1999); Principles of tissue engineered regeneration of skeletal tissues; *Clin Orthop*(367 Suppl):S12-S16
31. Chichester CO, Fernandez M, Minguell JJ (1993); Extracellular matrix gene expression by human bone marrow stroma and by marrow fibroblasts; *Cell Adhes Commun* 1(2):93-99
32. Claes LE, Heigele CA, Neidlinger-Wilke C, Kaspar D, Seidl W, Margevicius KJ et al. (1998); Effects of mechanical factors on the fracture healing process; *Clin Orthop*(355 Suppl):S132-S147

33. Dalton BA, McFarland CD, Underwood PA, Steele JG (1995); Role of the heparin binding domain of fibronectin in attachment and spreading of human bone-derived cells; *J Cell Sci* 108 ( Pt 5):2083-2092
34. Degasne I, Basle MF, Demais V, Hure G, Lesourd M, Grolleau B et al. (1999); Effects of roughness, fibronectin and vitronectin on attachment, spreading, and proliferation of human osteoblast-like cells (Saos-2) on titanium surfaces; *Calcif Tissue Int* 64(6):499-507
35. Denk PO, Wunderlich K, Knorr M (1998); [Serum-free cultivation of bovine stromal fibroblasts]; *Ophthalmologie* 95(3):148-152
36. Deschaseaux F, Charbord P (2000); Human marrow stromal precursors are alpha 1 integrin subunit-positive; *J Cell Physiol* 184(3):319-325
37. Devine SM, Peter S, Martin BJ, Barry F, McIntosh KR (2001); Mesenchymal stem cells: stealth and suppression; *Cancer J* 7 Suppl 2:S76-S82
38. Dong J, Uemura T, Kikuchi M, Tanaka J, Tateishi T (2002); Long-term durability of porous hydroxyapatite with low-pressure system to support osteogenesis of mesenchymal stem cells; *Biomed Mater Eng* 12(2):203-209
39. Doppelt SH, Tomford WW, Lucas AD, Mankin HJ (1981); Operational and financial aspects of a hospital bone bank; *J Bone Joint Surg Am* 63(9):1472-1481
40. Ducheyne P (1985); Bioglass coatings and bioglass composites as implant materials; *J Biomed Mater Res* 19(3):273-291
41. Ducy P, Schinke T, Karsenty G (2000); The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance; *Science* 289(5484):1501-1504
42. Ecke H (1982); [Surgical fracture treatment, its development, performance and results in comparison with conservative treatment procedures - account report. Part IV]; *Unfallchirurgie* 8(1):69-78
43. Einhorn TA (1999); Clinically applied models of bone regeneration in tissue engineering research; *Clin Orthop*(367 Suppl):S59-S67

44. Fang L, Weng W, Shen G, Han G, Santos JD, Du P (2003); [Bone tissue engineering scaffolds]; *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi* 20(1):148-152
45. Frank O, Heim M, Jakob M, Barbero A, Schafer D, Bendik I et al. (2002); Real-time quantitative RT-PCR analysis of human bone marrow stromal cells during osteogenic differentiation in vitro; *J Cell Biochem* 85(4):737-746
46. Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV (1966); Osteogenesis in transplants of bone marrow cells; *J Embryol Exp Morphol* 16(3):381-390
47. Gao J, Dennis JE, Solchaga LA, Awadallah AS, Goldberg VM, Caplan AI (2001); Tissue-Engineered Fabrication of an Osteochondral Composite Graft Using Rat Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells; *Tissue Eng* 7(4):363-371
48. Gerstenfeld LC, Cruceta J, Shea CM, Sampath K, Barnes GL, Einhorn TA (2002); Chondrocytes provide morphogenic signals that selectively induce osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells; *J Bone Miner Res* 17(2):221-230
49. Goldstein AS (2001); Effect of seeding osteoprogenitor cells as dense clusters on cell growth and differentiation; *Tissue Eng* 7(6):817-827
50. Granet C, Laroche N, Vico L, Alexandre C, Lafage-Proust MH (1998); Rotating-wall vessels, promising bioreactors for osteoblastic cell culture: comparison with other 3D conditions; *Med Biol Eng Comput* 36(4):513-519
51. Gronthos S, Zannettino AC, Graves SE, Ohta S, Hay SJ, Simmons PJ (1999); Differential cell surface expression of the STRO-1 and alkaline phosphatase antigens on discrete developmental stages in primary cultures of human bone cells; *J Bone Miner Res* 14(1):47-56
52. Guenther KP, Scharf HP, Pesch HJ, Puhl W (1996); Osteointegration Lösungsmittelkonservierter Knochentransplantate im Tiermodell; *Osteologie* 5(1):4-12

53. Halvorsen YD, Franklin D, Bond AL, Hitt DC, Auchter C, Boskey AL et al. (2001); Extracellular matrix mineralization and osteoblast gene expression by human adipose tissue-derived stromal cells; *Tissue Eng* 7(6):729-741
54. Holy CE, Fialkov JA, Davies JE, Shoichet MS (2003); Use of a biomimetic strategy to engineer bone; *J Biomed Mater Res* 65A(4):447-453
55. Holy CE, Shoichet MS, Davies JE (2000); Engineering three-dimensional bone tissue in vitro using biodegradable scaffolds: investigating initial cell-seeding density and culture period; *J Biomed Mater Res* 51(3):376-382
56. Holz U, Weller S, Borell-Kost S (1982); [Indications, technic and results of autogenic bone transplantations]; *Chirurg* 53(4):219-224
57. Hsu SM, Raine L (1981); Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry; *J Histochem Cytochem* 29(11):1349-1353
58. Ishaug SL, Crane GM, Miller MJ, Yasko AW, Yaszemski MJ, Mikos AG (1997); Bone formation by three-dimensional stromal osteoblast culture in biodegradable polymer scaffolds; *J Biomed Mater Res* 36(1):17-28
59. Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP (1997); Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro; *J Cell Biochem* 64(2):295-312
60. Jonsson KB, Frost A, Nilsson O, Ljunghall S, Ljunggren O (1999); Three isolation techniques for primary culture of human osteoblast-like cells: a comparison; *Acta Orthop Scand* 70(4):365-373
61. Kamiya N, Shigemasa K, Takagi M (2001); Gene expression and immunohistochemical localization of decorin and biglycan in association with early bone formation in the developing mandible; *J Oral Sci* 43(3):179-188
62. Kasai R, Bianco P, Robey PG, Kahn AJ (1994); Production and characterization of an antibody against the human bone GLA protein (BGP/osteocalcin) propeptide and its use in immunocytochemistry of bone cells; *Bone Miner* 25(3):167-182

63. Kasperk C, Wergedal J, Strong D, Farley J, Wangerin K, Gropp H et al. (1995); Human bone cell phenotypes differ depending on their skeletal site of origin; *J Clin Endocrinol Metab* 80(8):2511-2517
64. Kassem M, Risteli L, Mosekilde L, Melsen F, Eriksen EF (1991); Formation of osteoblast-like cells from human mononuclear bone marrow cultures; *APMIS* 99(3):269-274
65. Kloth S, Kobuch K, Domokos J, Wanke C, Monzer J (2000); Polar application of test substances in an organotypic environment and under continuous medium flow: a new tissue-based test concept for a broad range of applications in pharmacotoxicology; *Toxicol In Vitro* 14(3):265-274
66. Knaeppler H, v Garell T, Gürtler L (1994); Die allogene Knochen transplantation - eine aktuelle Standortbestimmung; *Deutsches Ärzteblatt* 91:798-804
67. Lee I, Ono Y, Lee A, Omiya K, Moriya Y, Takagi M (1998); Immunocytochemical localization and biochemical characterization of large proteoglycans in developing rat bone; *J Oral Sci* 40(2):77-87
68. Lindl T (1999a); Räumliche und apparative Voraussetzungen, Sicherheitsvorschriften; Spektrum Akademischer Verlag; *Zell- und Gewebekultur* 4:1-19
69. Lindl T (1999b); Steriltechnik - Kontaminationen; Spektrum Akademischer Verlag; *Zell- und Gewebekultur* 4:36-68
70. Liu XJ, Chen Y, Yuan L, Yu L (2003); Morphological observation of mesenchymal stem cells cultured with allogenic decalcified bone matrix; *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* 23(1):40-42
71. Lu X, Li S, Cheng J (2002); [Bone marrow mesenchymal stem cells: progress in bone/cartilage defect repair]; *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi* 19(1):135-139
72. Milz S (1993); Morphologie der subchondralen Spongiosa und der subchondralen Mineralisierungszone des Tibiaplateaus; Dissertation, Universität München, Medizinische Fakultät

73. Minguell JJ, Erices A, Conget P (2001); Mesenchymal stem cells; *Exp Biol Med (Maywood)* 226(6):507-520
74. Minuth WW, Kloth S, Aigner J, Sittinger M, Rockl W (1996); Approach to an organo-typical environment for cultured cells and tissues; *Biotechniques* 20(3):498-501
75. Minuth WW, Schumacher K, Strehl R, Kloth S (2000); Physiological and cell biological aspects of perfusion culture technique employed to generate differentiated tissues for long term biomaterial testing and tissue engineering; *J Biomater Sci Polym Ed* 11(5):495-522
76. Minuth WW, Sittinger M, Kloth S (1998); Tissue engineering: generation of differentiated artificial tissues for biomedical applications; *Cell Tissue Res* 291(1):1-11
77. Minuth WW, Steiner P, Strehl R, Schumacher K, de Vries U, Kloth S (1999); Modulation of cell differentiation in perfusion culture; *Exp Nephrol* 7(5-6):394-406
78. Minuth WW, Stockl G, Kloth S, Dermietzel R (1992); Construction of an apparatus for perfusion cell cultures which enables in vitro experiments under organotypic conditions; *Eur J Cell Biol* 57(1):132-137
79. Minuth WW, Strehl R, Steiner P, Kloth S (1997); Von der Zellkultur zum Tissue Engineering; *Biscope* 9/97:19-24
80. Mueller SM, Mizuno S, Gerstenfeld LC, Glowacki J (1999); Medium perfusion enhances osteogenesis by murine osteosarcoma cells in three-dimensional collagen sponges; *J Bone Miner Res* 14(12):2118-2126
81. Noel D, Djouad F, Jorgense C (2002); Regenerative medicine through mesenchymal stem cells for bone and cartilage repair; *Curr Opin Investig Drugs* 3(7):1000-1004
82. Obradovic B, Carrier RL, Vunjak-Novakovic G, Freed LE (1999); Gas exchange is essential for bioreactor cultivation of tissue engineered cartilage; *Biotechnol Bioeng* 63(2):197-205

83. Oreffo RO, Triffitt JT (1999); Future potentials for using osteogenic stem cells and biomaterials in orthopedics; *Bone* 25(2 Suppl):5S-9S
84. Owen M (1988); Marrow stromal stem cells; *J Cell Sci Suppl* 10:63-76
85. Parikh SN (2002); Bone graft substitutes: past, present, future; *J Postgrad Med* 48(2):142-148
86. Pautke C (2003); Charakterisierung von humanen mesenchymalen Stammzellen und Zellen der osteoblastären Differenzierungskaskade; Dissertation
87. Pereira RC, Delany AM, Canalis E (2002); Effects of cortisol and bone morphogenetic protein-2 on stromal cell differentiation: correlation with CCAAT-enhancer binding protein expression; *Bone* 30(5):685-691
88. Pereira RM, Delany AM, Canalis E (2001); Cortisol inhibits the differentiation and apoptosis of osteoblasts in culture; *Bone* 28(5):484-490
89. Petite H, Viateau V, Bensaid W, Meunier A, de Pollak C, Bourguignon M et al. (2000); Tissue-engineered bone regeneration; *Nat Biotechnol* 18(9):959-963
90. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD et al. (1999); Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells; *Science* 284(5411):143-147
91. Reddi AH (2000); Morphogenesis and tissue engineering of bone and cartilage: inductive signals, stem cells, and biomimetic biomaterials; *Tissue Eng* 6(4):351-359
92. Rickard DJ, Kassem M, Hefferan TE, Sarkar G, Spelsberg TC, Riggs BL (1996); Isolation and characterization of osteoblast precursor cells from human bone marrow; *J Bone Miner Res* 11(3):312-324
93. Ringe J, Kaps C, Burmester GR, Sittlinger M (2002); Stem cells for regenerative medicine: advances in the engineering of tissues and organs; *Naturwissenschaften* 89(8):338-351
94. Robey PG, Termine JD (1985); Human bone cells in vitro; *Calcif Tissue Int* 37(5):453-460

95. Rueger JM (1996); [Bone substitutes. State of the art and: what lies ahead?]; Unfallchirurg 99(3):228-236
96. Rueger JM (1998); [Bone substitution materials. Current status and prospects]; Orthopade 27(2):72-79
97. 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
98. Schwarz RP, Goodwin TJ, Wolf DA (1992); Cell culture for three-dimensional modeling in rotating-wall vessels: an application of simulated microgravity; J Tissue Cult Methods 14(2):51-57
99. Sellner W (1989); Gewebe und Zellkultur; Urban und Schwarzenberg Verlag; Romeis - Mikroskopische Technik 17:39-66
100. Siggelkow H, Schulz H, Kaesler S, Benzler K, Atkinson MJ, Hufner M (1999); 1,25 dihydroxyvitamin-D3 attenuates the confluence-dependent differences in the osteoblast characteristic proteins alkaline phosphatase, procollagen I peptide, and osteocalcin; Calcif Tissue Int 64(5):414-421
101. Sikavitsas VI, Bancroft GN, Mikos AG (2002); Formation of three-dimensional cell/polymer constructs for bone tissue engineering in a spinner flask and a rotating wall vessel bioreactor; J Biomed Mater Res 62(1):136-148
102. Sittlinger M, Bujia J, Rotter N, Reitzel D, Minuth WW, Burmester GR (1996); Tissue engineering and autologous transplant formation: practical approaches with resorbable biomaterials and new cell culture techniques; Biomaterials 17(3):237-242
103. Sodian R, Lemke T, Fritsche C, Hoerstrup SP, Fu P, Potapov EV et al. (2002); Tissue-engineering bioreactors: a new combined cell-seeding and perfusion system for vascular tissue engineering; Tissue Eng 8(5):863-870
104. Stark GB, Bannasch H, Schaefer DJ, Bittner K, Bach A, Voigt M (2000); [Tissue engineering: possibilities and perspectives]; Zentralbl Chir 125 Suppl 1:69-73

105. Stevenson S (1998); Enhancement of fracture healing with autogenous and allogeneic bone grafts; Clin Orthop(355 Suppl):S239-S246
106. Strehl R, Schumacher K, de Vries U, Minuth WW (2002); Proliferating Cells versus Differentiated Cells in Tissue Engineering; Tissue Eng 8(1):37-42
107. Tencer AF, Woodard PL, Swenson J, Brown KL (1988); Mechanical and bone ingrowth properties of a polymer-coated, porous, synthetic, coralline hydroxyapatite bone-graft material; Ann N Y Acad Sci 523:157-172
108. Tischer T, Schieker M, Stengele M, Pautke C, Neth P, Jochum M et al. (2004); [3D-Culturing of human osteoblastic cells with vessel-like nutrient supply]; Z Orthop Ihre Grenzgeb 142(3):344-349
109. Tuli R, Seghatoleslami MR, Tuli S, Wang ML, Hozack WJ, Manner PA et al. (2003); A simple, high-yield method for obtaining multipotential mesenchymal progenitor cells from trabecular bone; Mol Biotechnol 23(1):37-49
110. Uchida A, Nade S, McCartney E, Ching W (1985); Bone ingrowth into three different porous ceramics implanted into the tibia of rats and rabbits; J Orthop Res 3(1):65-77
111. Urist MR (1965); Bone: formation by autoinduction; Science 150(698):893-899
112. Vacanti CA, Bonassar LJ (1999); An overview of tissue engineered bone; Clin Orthop(367 Suppl):S375-S381
113. Vacanti CA, Vacanti JP (2000); The science of tissue engineering; Orthop Clin North Am 31(3):351-356
114. Vacanti JP, Langer R, Upton J, Marler JJ (1998); Transplantation of cells in matrices for tissue regeneration; Adv Drug Deliv Rev 33(1-2):165-182
115. Velleman SG (1999); The role of the extracellular matrix in skeletal muscle development; Poult Sci 78(5):778-784
116. Voegelé TJ, Voegelé-Kadletz M, Esposito V, Macfelda K, Oberndorfer U, Vecsei V et al. (2000); The effect of different isolation techniques on human osteoblast-like cell growth; Anticancer Res 20(5B):3575-3581

117. White E, Shors EC (1986); Biomaterial aspects of Interpore-200 porous hydroxyapatite; *Dent Clin North Am* 30(1):49-67
118. Wiedmann-Al-Ahmad M, Gutwald R, Lauer G, Hubner U, Schmelzeisen R (2002); How to optimize seeding and culturing of human osteoblast-like cells on various biomaterials; *Biomaterials* 23(16):3319-3328
119. Yang C, Hillas PJ, Baez JA, Nokelainen M, Balan J, Tang J et al. (2004); The application of recombinant human collagen in tissue engineering; *BioDrugs* 18(2):103-119
120. Yang S, Leong KF, Du Z, Chua CK (2001); The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors; *Tissue Eng* 7(6):679-689
121. Yang S, Leong KF, Du Z, Chua CK (2002); The Design of Scaffolds for Use in Tissue Engineering. Part II. Rapid Prototyping Techniques; *Tissue Eng* 8(1):1-11
122. Yang ZM, Zhao YF, Xie HQ (2000); [Huge thoracic wall defect repaired by tissue engineered bone transplantation]; *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* 14(6):365-368
123. Yaszemski MJ, Payne RG, Hayes WC, Langer R, Mikos AG (1996); Evolution of bone transplantation: molecular, cellular and tissue strategies to engineer human bone; *Biomaterials* 17(2):175-185

## Anhang

### Protokoll 1 - Anfertigung Immunhistochemische Markierungen

1. Abgrenzen einzelner Schnitte auf den Glasobjektträgern mittels Fettstift
2. Rehydrieren (5 Min. in PBS 10 X)
3. Fixieren (30 Min. in 100 ml 100 % Methanol mit einer Beimischung von 1 ml 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (Wasserstoffperoxid) in Aqua dest.)
4. Waschen (3 x 5 Min. in PBS 10 X)
5. Blocken (60 Min. mit jeweils 1 Tropfen Pferdeserum (1:20 in PBS 10 X verdünnt) pro Schnitt
6. Abklopfen ohne Waschen
7. Inkubation (30 Min. mit jeweils 1 Tropfen der gewünschten Primärantikörper pro Schnitt, Kontrollen mit PBS 10 X)
8. Waschen (3 x 5 Min. in PBS)
9. Inkubation (30 Min. mit jeweils 1 Tropfen Sekundärantikörper pro Schnitt)
10. Herstellung des ABC-Komplexes (Zugabe von jeweils 20 µl der Komponenten ABC-A und ABC-B zu 1 ml PBS 10 X. Vor Verwendung min. 30 Min. bei + 4 °C lagern und täglich frisch ansetzen)
11. Waschen (3 x 5 Min. in PBS)
12. Inkubation (30 Min. bei + 4 °C mit jeweils 1 Tropfen des zuvor hergestellten ABC-Komplexes pro Schnitt.
13. Waschen (3 x 5 Min. in PBS 10 X)
14. Inkubation (4 Min. mit jeweils 1 Tropfen der DAB-Lösung bei Dunkelheit)
15. Unterbrechung der DAB-Nachweisreaktion durch ausgiebige Spülung der Schnitte mit handwarmem Leitungswasser
16. Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe (jeweils 5 Minuten 50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 2 x 100 % Ethanol und 2 x 100 % Xylol)
17. Eindeckeln der Schnitte mit Deckgläsern mittels Eukitt

## Protokoll 2 - Anfertigung von MMA-Einbettungen

1. Fixierung der Proben in Fixierungsgemisch (siehe unten) für 3 d bei + 4 °C
2. Für 1 d in 70 % ETOH bei + 4 °C
3. Für 1 d in 80 % ETOH bei + 4 °C
4. Für 1 d in 100 % ETOH bei + 4 °C
5. Für 1 d in 100 % ETOH bei + 4 °C (nach Wechsel)
6. Für 1 d in 100 % Aceton bei + 4 °C
7. Für 2 d in Einbettgemisch (siehe unten) im Exsikator
8. Für 2 d in Einbettgemisch (siehe unten) im Exsikator (nach Wechsel)
9. Für 2 d in Einbettgemisch bei + 4 °C nach 30 Min. im Exsikator
10. Einbettgemisch bis Aushärtung im Wasserbad bei + 27 °C
11. Aushärten bei + 37 °C

### Fixierungsgemisch:

- 1 Teil        35 % Formaldehyd in Aqua dest.
- 2 Teile       96 ml 100 % Methanol
- 4 ml Isotoner Glucose-Phosphatpuffer pH 7,4

### Einbettgemisch:

- 100 ml Methylmetacrylat (MMA)
- 25 ml Plastoid N
- 3,5 g Benzoylperoxid

## Abkürzungsverzeichnis

12C5	Clone Number für Versican
ABC	Avidin-Biotin Complex
AON-1	Clone Number für Osteonectin
B4-78	Clone Number für Alkalische Phosphatase
BMP	Bone Morphogenic Protein
CAD / CAM	Computer aided design / Computer aided manufacturing
CB-1	Clone Number für Decorin
Col1	Clone Number für Kollagen I
DAB	Diaminobenzidin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSHB	Developmental Studies Hybridoma Bank (University of Iowa)
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
ETOH	Ethanol
FBS	Fetal Bovine Serum
FGF	Fibroblast Growth Factor
hMSC	Humane Mesenchymale Stammelle
HOB	Humane Osteoblasten
IGF	Insulin-like Growth Factor
M-38	Clone Number für Prokollagen I
M3F7	Clone Number für Kollagen IV
MMA	Methylmetacrylat
OC1	Clone Number für Osteocalcin
PBS	Phosphat buffered saline
PGA	Polyglykolsäure
PLA	Polylactid
PLGA	Poly-(D,L-lactid-Co-glycolid)-Acid
TGF	Transforming Growth Factor

## Danksagung

Für die Überlassung des Themas danke ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Wolf Mutschler, sehr herzlich. Für die hervorragende und intensive Betreuung meiner Arbeit danke ich ganz besonders Herrn Dr. Matthias Schieker, der sich als Leiter der Arbeitsgruppe Tissue Engineering Knochen in stetigem und unermüdlichem Einsatz für unser Forschungsgebiet befindet. Seine Beteiligung trug maßgeblich zum Gelingen meiner Arbeit bei. Herrn Dr. Thomas Tischer bin ich für die Begleitung weiter Strecken meiner Arbeit zu großem Dank verpflichtet, insbesondere was die aufwendigen histologischen und immunhistochemischen Auswertungen der Versuchsansätze betrifft. Besonders die Anfertigung der immunhistochemischen Markierungen gelang nur durch seine stetige und unermüdliche Unterstützung. Hierbei gilt mein Dank auch Herrn PD Dr. Stefan Milz, der als wissenschaftlicher Mitarbeiter des Lehrstuhls Anatomie I der Anatomischen Anstalt der Universität München und Mitglied unserer Arbeitsgruppe den gesamten Bereich der feingeweblichen Untersuchungen wissenschaftlich begleitet, und darüber hinaus den stetigen Zugang zur umfangreichen Laborinfrastruktur der Anatomischen Anstalt der Universität München gewährleistet. Herrn Dr. Christoph Pautke danke ich besonders für seine Unterstützung und seine Beiträge im Bereich der 2-D-Vergleichsgruppen sowie deren immunhistochemische Auswertung. Darüber hinaus war er für mich stets auch ein wertvoller Ansprechpartner in vielen Belangen wissenschaftlicher Tätigkeit. Mein Dank gilt auch dem Leiter des Chirurgischen Forschungslabors Herrn Dr. rer. nat. Peter Neth, der stets für konstruktive wissenschaftliche Gespräche zur Verfügung stand, wie auch sein Vorgänger Herr Dr. rer. nat. Hans-Peter Sattler. Schließlich gebührt mein Dank neben den Genannten auch all denjenigen, die ungezählte Hilfestellungen beim Erlernen und bei der Durchführung der umfangreichen labortechnischen Arbeiten geleistet haben. Widmen möchte ich die vorliegende Arbeit meinen Eltern, ohne deren Unterstützung weder mein Studium der Humanmedizin noch die damit verbundene Möglichkeit zur wissenschaftlichen Arbeit denkbar gewesen wäre.

## Lebenslauf

### Lebenslauf

---

Michael Stengele      Gabelsbergerstr. 48 E  
80333 München

### Persönliche Daten

---

Geburtsdatum      21. April 1967  
Geburtsort      Konstanz am Bodensee  
Familienstand      ledig

### Wissenschaftliche Tätigkeiten

---

seit 07/2000      Experimentelle Forschung in der Arbeitsgruppe Tissue Engineering Knochen ([www.agtek.de](http://www.agtek.de)) an der Chirurgischen Klinik und Poliklinik – Innenstadt, Klinikum der Universität München

### Berufliche / Klinische Tätigkeiten

---

seit 12/2003      AiP an der Chirurgischen Klinik und Poliklinik – Innenstadt, Klinikum der Universität München  
Chirurgische Ambulanz  
Chirurgisches Forschungslabor

### Hochschulbildung

---

11/2003      Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und Abschluss des Studiums der Humanmedizin am 27.11.2003

---

10/2002 – 09/2003	Praktisches Jahr
Chirurgie	Chirurgische Klinik und Poliklinik – Innenstadt, Klinikum der Universität München Prof. Dr. Wolf Mutschler
Anästhesiologie	Klinik für Anästhesiologie – Klinikum Großhadern, Klinikum der Universität München Prof. Dr. Dr. h. c. Klaus Peter
Innere Medizin	Städtisches Krankenhaus München – Neuperlach, 5. Med. Abt. – Zentrum für Akutgeriatrie und Frührehabilitation Prof. Dr. Robert Heinrich
09/2002	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
08/2000 – 10/2001	Famulaturen im Bereich Chirurgie und Allgemeinmedizin
03/2000	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/1996 – 11/2003	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München

#### Dissertation

---

07/2000 – 06/2004	"Knochenzellwachstum im dreidimensionalen Zellkultursystem" Doktorvater: Prof. Dr. Wolf Mutschler Experimentelle Arbeit in der Arbeitsgruppe Tissue Engineering Knochen ( <a href="http://www.agtek.de">www.agtek.de</a> ) an der Chirurgischen Klinik und Poliklinik – Innenstadt, Klinikum der Universität München
-------------------	--

#### Nebentätigkeit

---

01/1994 – 12/2003	Stiftsklinik Augustinum – Fachklinik für Innere Medizin mit angegliederter Herzchirurgischer Klinik, München – vielfältiger Einsatz im Bereich der Verwaltung
-------------------	---

---

## Weitere Qualifikationen, Schulbildung, Grundwehrdienst

---

- 09/1993 – 06/1996 Allgemeine Hochschulreife am Städtischen Münchenkolleg, München (Zweiter Bildungsweg) – Leistungskurse: Biologie und Mathematik, zweite Fremdsprache: Latein
- 10/1989 – 09/1993 Acht Semester Ingenieurstudium der Fahrzeugtechnik – Fachrichtung Luftfahrzeugbau an der Staatlichen Fachhochschule München (inkl. zwei Praxissemester)
- 10/1987 – 12/1988 Grundwehrdienst Ellwangen an der Jagst, Stetten am kalten Markt
- 08/1986 – 06/1987 Fachhochschulreife an der Gewerbeschule in Überlingen am Bodensee
- 07/1983 – 08/1986 Berufsausbildung im Ausbildungsberuf Schreiner – duales System mit schulischer Ausbildung an der Gewerbeschule in Überlingen am Bodensee
- 1973 – 1983 Grund- und Realschule in Überlingen am Bodensee

## Publikationen

### Originalarbeiten

---

Tischer T, Schieker M, Stengele M, Pautke C, Neth P, Jochum M, Mutschler W, Milz S

"3D-Kultivierung humaner Osteoblasten um ein künstliches Gefäß *in vitro*"

Z Orthop Ihre Grenzgeb. 2004 May-Jun;142(3):344-9

### Bibliographisch zitierfähige Abstracts von Vorträgen und Postern

---

11/2002 Tischer T, Pautke C, Stengele M, Neth P, Milz S, Jochum M, Mutschler W, Schieker M

"3D-culturing of human osteoblasts around an artificial vessel *in vitro*"

Langenbecks Arch Surg 2002 Oct;387(5-6): 259

6. Chirurgische Forschungstage der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie

Köln

28. - 30. November 2002

11/2002 Strobl S, Tischer T, Happ T, Stengele M, Guelkan H, Milz S, Mutschler W, Schieker M

"Co-culturing osteoblasts and chondrocytes in a 3D-perfusion system *in vitro*"

Langenbecks Arch Surg 2002 Oct;387(5-6): 258

6. Chirurgische Forschungstage der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie e.V.

Köln

28. - 30. November 2002

- 11/2002 Schieker M, Tischer T, Stengele M, Pautke C, Milz S, Mutschler W  
"Tissue engineering von Knochen - Dreidimensionales Wachstum von humanen mesenchymalen Stammzellen *in vitro*"  
Unfallchirurg, Heft 284  
66. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie  
Berlin  
13. - 15. November 2002
- 07/2002 Stengele M, Schieker M, Tischer T, Milz S, Mutschler W  
"Knochenzellwachstum in dreidimensionalen Zellkultursystemen"  
Wissenschaftliche Referate, 79. Tagung, Vereinigung der Bayerischen Chirurgen e.V., Hieronymus Verlag, München  
79. Tagung der Vereinigung der Bayerischen Chirurgen e.V.  
Schweinfurt  
18. - 20. Juli 2002

#### Sonstige Vorträge

---

- 10/2001 Stengele M  
"Etablierung eines *in vitro*-Modells zur 3D-Kultivierung von Knochen"  
Wissenschaftliches Kolloquium, Chirurgische Klinik und Poliklinik Innenstadt – Klinikum der Universität München  
München  
01. Oktober 2001