

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik – Innenstadt,  
Klinikum der Universität München,  
Experimentelle Chirurgie und Regenerative Medizin  
Direktor: Prof. Dr. med. Wolf Mutschler

---

**Experimentelle Untersuchung zum Nachweis von  
Knochenzellwachstum in besiedelten Konstrukten  
im Mausmodell**

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

vorgelegt von

Christina Ern

aus Odessa

2008

---

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Wolf Mutschler

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Andrea Baur-Melnyk

Prof. Dr. Peter Müller

Mitbetreuung durch die  
promovierten Mitarbeiter: Priv. Doz. Dr. med. Matthias Schieker  
Dr. med. Sebastian Seitz

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

Tag der mündlichen Prüfung: 28.10.2008

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>6</b>
1.1. Grundlagen .....	6
1.1.1. Das Konzept von Tissue Engineering .....	7
1.1.1.1. Humane mesenchymale Stammzellen .....	9
1.1.1.2. Leitschienen.....	10
1.1.1.3. Wachstumsfaktoren .....	12
1.1.2. Kultivierungsbedingungen.....	13
1.1.3. In vivo – Modell .....	16
1.1.4. Nachweismöglichkeiten implantierter Zellen .....	18
1.2. Aufgabenstellung .....	19
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>20</b>
2.1. Zellkultur.....	20
2.1.1. Zellen .....	20
2.1.2. Kultivierungsbedingungen und Medien .....	20
2.1.3. Ausplattieren der Zellen auf die Glasobjektträger .....	21
2.2. Leitschienenbehandlung in vitro.....	21
2.2.1. Leitschienen.....	21
2.2.2. Besiedelung der Leitschienen .....	22
2.2.3. Kultivierung der Leitschienen .....	22
2.2.3.1. Statische Kultivierung .....	22
2.2.3.2. Dynamische Kultivierung .....	22
2.2.3.3. Kontrollgruppe .....	23
2.3. Leitschienenbehandlung in vivo .....	24
2.3.1. Implantation der Leitschienen .....	24
2.3.1.1. Anästhesie .....	24
2.3.1.2. Implantation der Konstrukte .....	26
2.3.1.3. Explantation der Konstrukte und Organentnahme .....	27
2.4. Histologische Auswertung der Konstrukte.....	30
2.4.1. MMA-Einbettung .....	30
2.4.2. Anfertigung der MMA-Schnitte .....	30
2.4.3. Histologische Färbung der Dünnschnitte .....	31
2.4.4. Auswertung der Proben .....	31

2.5. Immunhistochemische Untersuchungen der Leitschienen .....	33
2.5.1. Anfertigung von Kryoschnitten .....	33
2.5.2. Immunhistochemische Markierungen der Kryoschnitte .....	33
2.5.2.1. Immunhistochemische Markierung mit dem Antikörper gegen humane Nuklei.....	33
2.5.2.2. Immunfluoreszenzmarkierung mit Anti- $\beta$ -2-Mikroglobulin .....	34
2.5.2.3. Immunhistochemische Markierung mit HLA-1 Antikörpern .....	35
2.5.3. Immunhistochemische Auswertung der Proben.....	36
2.6. Molekularbiologische Untersuchungen .....	37
2.7. Substanzen, Materialien und Geräte.....	37
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>42</b>
3.1. Effizienz der Leitschienenbesiedlung .....	42
3.2. Histologische Auswertung der Leitschienen.....	42
3.2.1. Granulationsgewebe .....	42
3.2.2. Entzündungen.....	45
3.2.3. Nekrosen.....	46
3.2.4. Fettgewebe .....	47
3.2.5. Blutgefäße.....	48
3.2.6. Fremdkörperriesenzellen .....	49
3.3. Immunhistochemische Auswertung der Leitschienen .....	50
3.3.1. Mouse-to-mouse Detection System .....	50
3.3.2. Immunofluoreszenz Markierung mit Anti- $\beta$ -2-Mikroglobulin Antikörpern .	51
3.3.3. Immunhistologische Markierung mit Anti-HLA-1 Antikörper .....	53
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>56</b>
4.1. Diskussion der Methodik .....	56
4.1.1. Zellen .....	56
4.1.2. Leitschienen.....	57
4.1.3. Beimpfungsmethode .....	59
4.1.4. Kultivierung .....	60
4.1.5. Immunhistologische Färbemethoden .....	61
4.1.5.1. Mouse-to-mouse Detection System.....	61
4.1.5.2. Anti- $\beta$ 2-Mikroglobulin .....	61
4.1.5.3. Anti-HLA-Antikörper .....	63

4.2. Diskussion der Ergebnisse.....	63
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>69</b>
<b>6. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>70</b>
Abkürzungsverzeichnis .....	86
Danksagung.....	87
Lebenslauf .....	88
Publikationen .....	90

## 1. Einleitung

### 1.1. Grundlagen

Die Therapie von ausgedehnten Knochendefekten stellt in der rekonstruktiven Chirurgie und Orthopädie eine große Herausforderung für den Operateur dar. Es sind Traumen, Infektionen sowie Operationen von gutartigen und malignen Tumoren, die nach der entsprechenden Behandlung aufgefüllt werden müssen. Um eine optimale knöcherne Wiederherstellung des Defektes zu gewährleisten, sollen Knochenersatzmaterialien verwendet werden, die im Idealfall osteogene, osteokonduktive und osteoinduktive Eigenschaften aufweisen. Bei osteogenen Materialien findet die Knochenneubildung durch die vorhandenen lebenden Zellen statt. Durch Osteoinduktivität werden die undifferenzierten Stammzellen oder die osteoprogenitor Zellen zur osteogenen Differenzierung angeregt. Durch die Osteokonduktion wird die gezielte Einwanderung der Zellen in den Defekt gefördert. (Laurencin et al. 2006).

Der klinische Goldstandard ist nach wie vor die autogene Knochentransplantation (Rueger 1998). Alleine in Deutschland werden zur Zeit jährlich ca. 71.000 autologe Knochentransplantationen durchgeführt (Jager et al. 2005b). Der autologe Knochen besitzt sowohl osteogene als auch osteoinduktive und osteokonduktive Eigenschaften. Die Entnahme ist jedoch mit Komplikationen behaftet, die von persistierenden Schmerzen bis zu Verletzungen von Nerven und Gefäßen reichen. Vor allem ist die Verfügbarkeit des autogenen Knochens begrenzt.

Als Ersatz für den autologen Knochen wird oft allogener Spenderknochen herangezogen. Allogener Knochen behält seine osteoinduktive und osteokonduktive Eigenschaften bei, dadurch wird das Transplantat gut integriert und in Folge sehr langsam abgebaut und ersetzt. Durch die Tiefkühlung sterben jedoch knochenbildenden Zellen ab, so daß der allogene Knochen seine osteogene Eigenschaften verliert. Das Fehlen der entnahmebedingten Morbidität ist ein großer Vorteil des allogenen Transplantats. Dem stehen die Übertragungen von Infektionen und eine mögliche immunologische Abstoßungsreaktion gegenüber. Des weiteren werden durch das Führen einer Knochenbank hohe Kosten verursacht (von Garrel et al. 1998).

Um die Nachteile der autogenen und allogenen Knochentransplantate zu vermeiden, wurde eine Vielzahl von natürlichen und synthetischen Biomaterialien zum Knochenersatz entwickelt. Deren Vorteile sind sowohl eine fehlende Entnahmemorbidität, ein

nicht vorhandenes Infektionsrisiko als auch eine nahezu unbegrenzte Verfügbarkeit. Die anorganischen Biomaterialien zeigen gute osteokonduktive jedoch keine osteoinduktive Eigenschaften. Sie sind druckstabil, gehen aber durch Scher- und Biegekräfte zu Bruch, so dass deren klinischer Einsatz eingeschränkt ist. Als Beispiel sind kleine spongiöse, metaphysäre Defekte im ersatzstarken Lager zu nennen (Schieker et al. 2006a).

Bei der demineralisierten Knochenmatrix stehen die osteoinduktiven Eigenschaften im Vordergrund, die in zahlreichen Studien im heterotopen Modell nachgewiesen wurden (Hartman et al. 2004, Edwards et al. 1998, Urist et al. 1979). Die biologisch aktiven Substanzen der mineralisierten Knochenmatrix wurden extrahiert und isoliert untersucht. So fördert zum Beispiel BMP (Bone Morphogenetic Protein) die Differenzierung von osteogenen Vorläuferzellen. Bei den tierexperimentellen Studien konnte eine bessere Überbrückung des Defekts bei Verwendung von BMP-7 im Vergleich zu den Kontrollgruppen gezeigt werden (Pluhar et al. 2006, Pekkarinen et al. 2006). In einigen Fällen wurde aber auch die Knochenneubildung außerhalb des knöchernen Defekts beobachtet (Regauer et al. 2005). Bis zum routinemäßigen Einsatz in der Klinik müssen noch die Fragen der Dosierung, der Applikation und der gleichmäßigen Freisetzung über längere Perioden geklärt werden (Schieker et al. 2006b).

Ein innovativer Forschungsansatz auf dem Gebiet des Knochenersatzes ist somit die Entwicklung des Knochens *in vitro* mit einer anschließenden Implantation *in vivo*, der unter dem Namen Tissue Engineering bekannt ist.

### 1.1.1. Das Konzept von Tissue Engineering

Unter Tissue Engineering versteht man „die Applikation von funktionell aktiven Zellen in unterstützende Leitschienen unter kontrollierter Zugabe von Wachstumsfaktoren zur Herstellung von biologischen Ersatzstoffen als funktioneller Gewebeersatz“ (Schieker et al. 2006a). Für die Bildung des Ersatzknochens müssen geeignete Zellen gewonnen, expandiert und dann auf die Leitschienen aufgebracht werden. Je nach Zelltyp kann vor der Implantation die Kultivierung der besiedelten Konstrukte mit Wachstumsfaktoren durchgeführt werden.

Aufgrund dieser Charakteristika, gab es diverse Ansätze Tissue Engineering von Knochen im klinischen Alltag zu etablieren. So wurde versucht, sowohl ausgedehnte Defekte an Röhrenknochen zu therapieren als auch die amputierte Endphalange des Daumens zu rekonstruieren (Quarto et al. 2001, Vacanti et al. 2001). Dafür wurden

die Leitschienen mit den *in vitro* expandierten autologen osteogenen Vorläuferzellen implantiert. Das funktionelle klinische Ergebnis ging mit einem hohen Zeitaufwand für die Behandlung und starker Belastung des Patienten durch mehrere Operationen einher (Hentz et al. 2001). So beschränkte sich die klinische Anwendung bisher auf einzelne Fallbeschreibungen.

Nichtsdestotrotz wird das Konzept von Tissue Engineering in vielen tierexperimentellen Studien weiter untersucht und optimiert. So gelang die originalgetreue Nachbildung einer Phalange und eines Unterkiefergelenkkopfes (Landis et al. 2005, Weng et al. 2001, Isogai et al. 1999). Dabei wurden die Zellen aus dem Periost, Knorpel oder Sehne entsprechend den anatomischen Gegebenheiten auf die Polylactid- und/oder Polyglycolidleitschienen aufgebracht und subkutan auf dem Rücken von athymen Mäusen implantiert.

Bei Untersuchungen von Defekten kritischer Größe im Klein- oder Großtiermodell konnte eine Defektüberbrückung wiederholt nachgewiesen werden. Die erzielten Ergebnisse hingen dabei von verschiedenen Faktoren ab. So zeigte sich, dass durch die Besiedelung der Leitschienen mit Knochenmarkzellen eine schnellere Überbrückung des Defekts in Vergleich zu der Kontrollgruppe erzielt werden konnte (Kruyt et al. 2004). Durch die Zugabe der osteogenen Zusätze zum Kultivierungsmedium wurden im mandibulären Kaninchenmodell biomechanische Werte erreicht, die denen des autologen Transplantats ähnlich waren (Yuan et al. 2007). Aber auch eine alleinige Prekultivierung der besiedelten Konstrukte im Bioreaktor hat einen positiven Effekt auf die Defektheilung, wie im kranialen Rattenmodell gezeigt wurde (Sikavitsas et al. 2003b). Nicht nur die Art der Zellen sondern auch deren Entnahmeort wirkt sich auf deren Fähigkeit aus, einen funktionellen Knochen zu bilden (Matsubara et al. 2005, Jaquiere et al. 2005).

Trotz dieser ermutigenden Resultate bleiben noch einige Fragen offen, die durch intensive Forschung zu beantworten gilt. Im Idealfall soll das zu ersetzende Gewebe jederzeit und für jeden verfügbar sein. Dazu ist eine adäquate Zellquelle mit geeigneter Immunogenität zu wählen. Trotz vielversprechender Ansätze fehlt es zur Zeit an einer Leitschiene, die alle in Kapitel 1.1.1.2 dargestellten Anforderungen erfüllt. Und nicht zuletzt ist die Frage geeigneter Transportvehikel für die biologisch aktiven Stoffe für die Geweberegeneration zu klären (Ahsan et al. 2005).

#### 1.1.1.1. Humane mesenchymale Stammzellen

Die Zelle ist die kleinste Bau- und Funktionseinheit des Gewebes, die zur Replikation, Stoffwechsellleistungen und Bildung der extrazellulärer Matrix fähig in der Lage ist. Für das Tissue Engineering von Knochen eignen sich grundsätzlich alle Zellen, die Potenzial zur Selbsterneuerung und Differenzierung entlang der osteoblastären Kaskade besitzen (Pittenger et al. 1999). Besonders geeignet in dieser Hinsicht sind mesenchymale Stammzellen, da sie eine enorme Fähigkeit zur Selbstreplikation besitzen und in verschiedene Gewebearten, einschließlich Knorpel, Sehnen, Muskeln, Fett und Knochengewebe differenzieren können (Caplan 2005). Am häufigsten werden die Stammzellen aus dem Knochenmark isoliert (Muschler et al. 2004). Sie wurden aber auch in anderen Gewebearten, wie z.B. Muskel-, Fettgewebe oder Haut nachgewiesen (Mastrogiacomo et al. 2005, Musina et al. 2005, Zuk et al. 2002). Auch *in vitro* können mesenchymale Stammzellen vermehrt und durch Zugabe verschiedener Wachstumsfaktoren in die entsprechenden Gewebe differenziert werden. Dabei durchlaufen die Zellen verschiedene Entwicklungsstadien. Im Falle der osteogenen Differenzierungskaskade entwickeln sich mesenchymale Stammzellen zu Osteoblasten (Aubin 1998). Sie bilden die unverkalkte Knochenmatrix, in die sie eingeschlossen werden und damit sich zu nicht mehr teilungsfähigen Osteozyten entwickeln. Dabei verläuft die osteoblastäre Differenzierungskaskade nicht nur streng in eine Richtung, sondern es ist eine Transformation in andere Zelltypen oder eine Dedifferenzierung der Zellen möglich (Aubin 1998).

Für das Tissue Engineering von Knochen werden oft Knochenmarkzellen verwendet (Hosseinkhani et al. 2006, Krut et al. 2003, Tsuchida et al. 2003, van den Dolder et al. 2003a). Dabei nutzt man deren Fähigkeit, an dem Boden von Zellkulturflaschen zu adhären. Allerdings hat sich gezeigt, dass so gewonnene Zellen aus verschiedenen Zellpopulationen bestehen, die sich sowohl in ihrer Morphologie als auch in ihrem Proliferations- und Differenzierungsverhalten unterscheiden (Colter et al. 2001, Muraglia et al. 2000, Pittenger et al. 1999). Aus diesem Grund und der Tatsache, dass die Knochenmarkzellen aus verschiedenen Spezies isoliert werden, ist die Vergleichbarkeit der Studien untereinander eingeschränkt. Um dies zu vermeiden wurden für diese Arbeit kommerziell erworbene, primäre humane mesenchymale Stammzellen gewählt (engl.: human mesenchymal stem cells, (hMSC). Diese Zellen werden nach standardisierten Verfahren mittels Dichtegradientenzentrifugation aus Knochenmarkaspiraten gesunder, adulter Spender gewonnen.

### 1.1.1.2. Leitschienen

Alle Gewebearten bestehen aus einer Grundsubstanz, die für das gewebespezifische Milieu und die Architektur verantwortlich ist. So sollen die Leitschienen in Tissue Engineering den Aufbau der Grundsubstanz temporär imitieren. Durch die Abgabe gewebespezifischer Wachstums- und Differenzierungsfaktoren sollen sie die Neubildung des Gewebes und deren Vaskularisierung fördern (Kneser et al. 2002). Leitschienen ermöglichen ein gerichtetes, dreidimensionales Wachstum der Zellen (Bianco et al. 2001). Eine Leitschiene soll folgende Eigenschaften aufweisen (Hutmacher 2000):

- die Oberfläche soll die Adhäsion, Proliferation und Differenzierung der Zellen ermöglichen;
- eine poröse, vernetzte Struktur für das Einwachsen der Zellen und den Metabolitentransport besitzen;
- biokompatibel und bioresorbierbar sein;
- für das zu ersetzende Gewebe passende mechanische Eigenschaften haben.

In den letzten Jahrzehnten ist eine Vielzahl an Leitschienenmaterialien entwickelt worden, die man in biodegradierbare Polymere, Kalziumphosphatkeramiken und Knochenmatrizen unterteilen kann. Jede Leitschienenart weist sowohl Vor- als auch Nachteile auf, die im Folgenden dargestellt werden.

Zu den biodegradierbaren Polymeren gehören sowohl natürlich vorkommende als auch synthetisch hergestellte Substanzen. Kollagen, Hyaluronsäure oder Fibrin zählen zu der ersten Gruppe und zeichnen sich durch gute Bioresorbierbarkeit und Biokompatibilität aus (Abb. 1, A). Die Leitschienen aus natürlichen Polymeren werden durch Gefriertrocknung, Vernetzung oder Aussalzung hergestellt. Die unzureichende mechanische Festigkeit schränkt deren Einsatz im Knochengewebe ein (Karageorgiou et al. 2005). Die Gruppe der synthetischen Polymere umfasst eine große Anzahl an Substanzen, zu denen zum Beispiel Polylactide, Polyglycolide Polyethylene gehören (Abb.1, B). Deren Bruchfestigkeit, Elastizitätsmodul und Biodegradierbarkeit kann entsprechend den Anforderungen bei der Produktion eingestellt werden. Synthetische Polymere können jedoch toxisch und immunogen wirken und Infektionen begünstigen. (Rezwan et al. 2006).

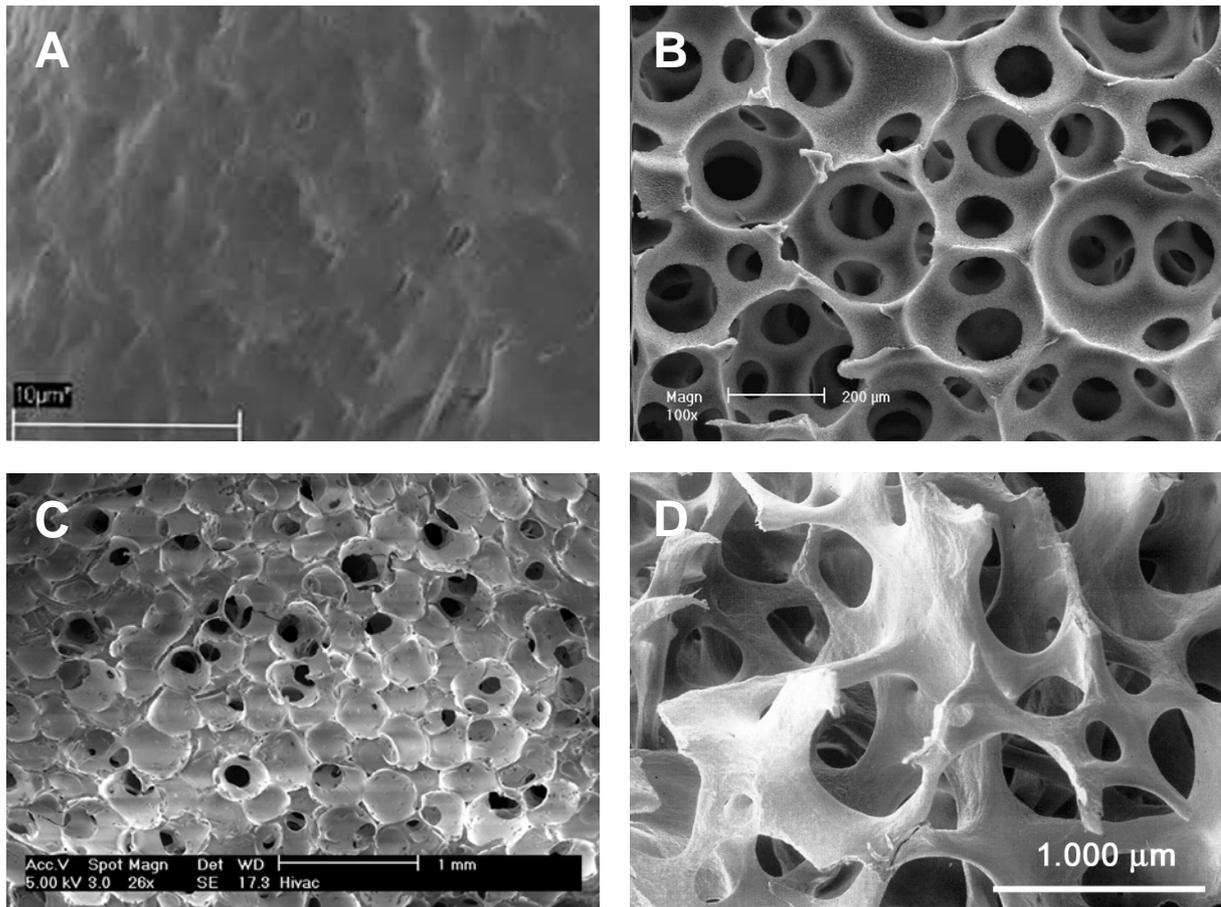
Kalziumphosphatkeramiken bestehen aus Hydroxylapatit,  $\beta$ -Tricalciumphosphat oder deren Kombination (Abb. 1, C). Da sie in ihrer chemischen Struktur der kristallinen Phase des Knochens ähnlich sind und gute mechanische Eigenschaften aufweisen,

werden sie häufig als Knochenersatz eingesetzt. Sie sind sehr biokompatibel, besitzen aber meistens nur osteokonduktive Eigenschaften. Desweiteren sind Kalziumphosphatkeramiken sehr brüchig und langsam abbaubar (Karageorgiou et al. 2005). Sie werden meistens durch Sintern des Keramikpulvers bei hohen Temperaturen hergestellt und sind mit verschiedener Porengröße, Porosität und Form erhältlich (Rezwan et al. 2006).

Bei der Herstellung der demineralisierten Knochenmatrix werden die anorganischen Bestandteile durch Säuren extrahiert, die osteoinduktiven Eigenschaften des Knochens bleiben dabei erhalten (Parikh 2002). Im Gegensatz dazu werden bei anorganischen Knochenmatrizen dem Knochen durch verschiedene chemische oder physikalische Schritte die organischen Bestandteile entzogen. Bei beiden Arten bleibt die ursprüngliche Knochenstruktur erhalten, die mechanischen Eigenschaften gehen jedoch verloren.

Die konventionellen Leitschienen werden in Form von Zylindern, Blöcken oder Granulaten angeboten. Es besteht aber auch die Möglichkeit individualisierte Leitschienen durch *rapid prototyping* anzufertigen. Dabei werden die digitalen Datensätze von Patienten, die mit Hilfe von Computertomographie oder Magnetresonanztomographie gewonnen wurden, in ein dreidimensionales Modell umgewandelt. Die Herstellung der 3D-Modelle erfolgt dann durch die Materialschichtung mit Hilfe eines computer-gesteuerten Druckers (Leong et al. 2003). Da die dazu verwendeten Substanzen meist toxisch sind, können sie für das Tissue Engineering nicht eingesetzt werden. Mithilfe der Modelle kann jedoch die exakte Planung der bevorstehenden chirurgischen Eingriffe durchgeführt werden (D'Urso et al. 1998).

Für die vorliegende Arbeit wurden lösungsmittelkonservierte,  $\gamma$ -strahlensterilisierte bovine Spongiosa (Tutobone, Tutogen Medical) verwendet (Abb. 1, D), die für klinische Anwendungen zugelassen sind. Durch die schonende Behandlung bleibt die natürliche Knochenstruktur und – stabilität erhalten.



**Abb. 1** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme verschiedener Leitschienenarten: A – Kollagenmembrane von Kalb (Wiedmann-Al-Ahmad et al. 2002); B – Polylactidleitschiene (Wei et al. 2007); C- biphasische Hydroxylapatit/ $\beta$ -Trikalziumphosphat-Leitschiene (Holtorf et al. 2005); D – Bovine Spongiosa (Bildquelle: Tutobone, Fa. Tutogen Medical).

### 1.1.1.3. Wachstumsfaktoren

Wachstumsfaktoren sind Zytokine, die von vielen Zelltypen produziert werden und eine Signalwirkung haben. Durch deren Bindung an die Rezeptoren werden Differenzierung, Proliferation oder Migration der Zielzelle ausgelöst (Rose et al. 2002). Diese Moleküle sind essentiell für die Gewebeneubildung und spielen möglicherweise eine wichtige Rolle beim Tissue Engineering. Wie auch andere Gewebe enthält Knochen eine beachtliche Menge an Wachstumsfaktoren, die durch ihre Wechselwirkungen sowohl physiologischen Knochenumbau als auch die Frakturheilung ermöglichen. Die bedeutendsten Wachstumsfaktoren in der Knochenbiologie sind Bone Morphogenetic Protein (BMP) (Wei et al. 2007), Insulin Growth Factor (IGF) und Vascular Endothelial Growth Factor (Kaigler et al. 2006).

Die BMP-Familie besteht aus mehr als 40 verschiedenen Mitgliedern. Im adulten Organismus beteiligen sie sich am permanenten Knochenumbau und werden in der An-

fangsphase der Frakturheilung ausgeschüttet. Dadurch wird die Migration der mesenchymalen Stammzellen in den Defekt angeregt mit einer nachfolgenden Differenzierung entlang der osteogenen Kaskade (Lind et al. 2001). Die osteoinduktiven Eigenschaften von BMP wurden in verschiedenen Studien untersucht. Im mandibulären Rattenmodell konnte eine Erhöhung der Knochenneubildung durch die Zugabe von BMP histologisch nachgewiesen werden (Higuchi et al. 1999). Bei einem Defekt kritischer Größe im Kaninchenmodell steigerten sich die Radioopazität und die biomechanische Eigenschaften bei der Behandlung mit BMP (Hong et al. 1998). Aber auch im ektopen Lager wurde die Knochenneubildung durch die BMP-Induktion gesteigert (Wei et al. 2007). BMP-7 ist bereits bei strenger Indikationsstellung für die Therapie traumatisch bedingter Tibiafrakturen mit Pseudoarthrosebildung zugelassen (Bramlage et al. 2005).

IGF-I und II stimulieren die Proliferation und die Differenzierung von Osteoblasten *in vitro* und *in vivo*. Außerdem regen sie die Produktion von Typ I Kollagen an und verhindern den Kollagenabbau durch die Inhibition der Kollagenasesynthese. IGF wurde auch im Frakturbereich nachgewiesen (Koch et al. 2005). Darüber hinaus konnte im orthotopen Modell die gesteigerte Knochenneubildung in Verbindung mit IGF-I gezeigt werden (Damien et al. 2003).

Für die erfolgreiche Frakturheilung ist eine feinabgestimmte Wechselwirkung zwischen Angio- und Osteogenese von besonderer Bedeutung. Dabei spielt VEGF eine entscheidende Rolle, in dem es die Einwanderung der Endothelzellen in den Frakturspalt und die weitere Bildung von Blutgefäßen induziert (Furumatsu et al. 2003). Im experimentellen Modell wurde die erhöhte Blutgefäßneubildung und dementsprechend höhere Knochenneubildung bei der Behandlung eines Defektes mit VEGF nachgewiesen (Kaigler et al. 2006).

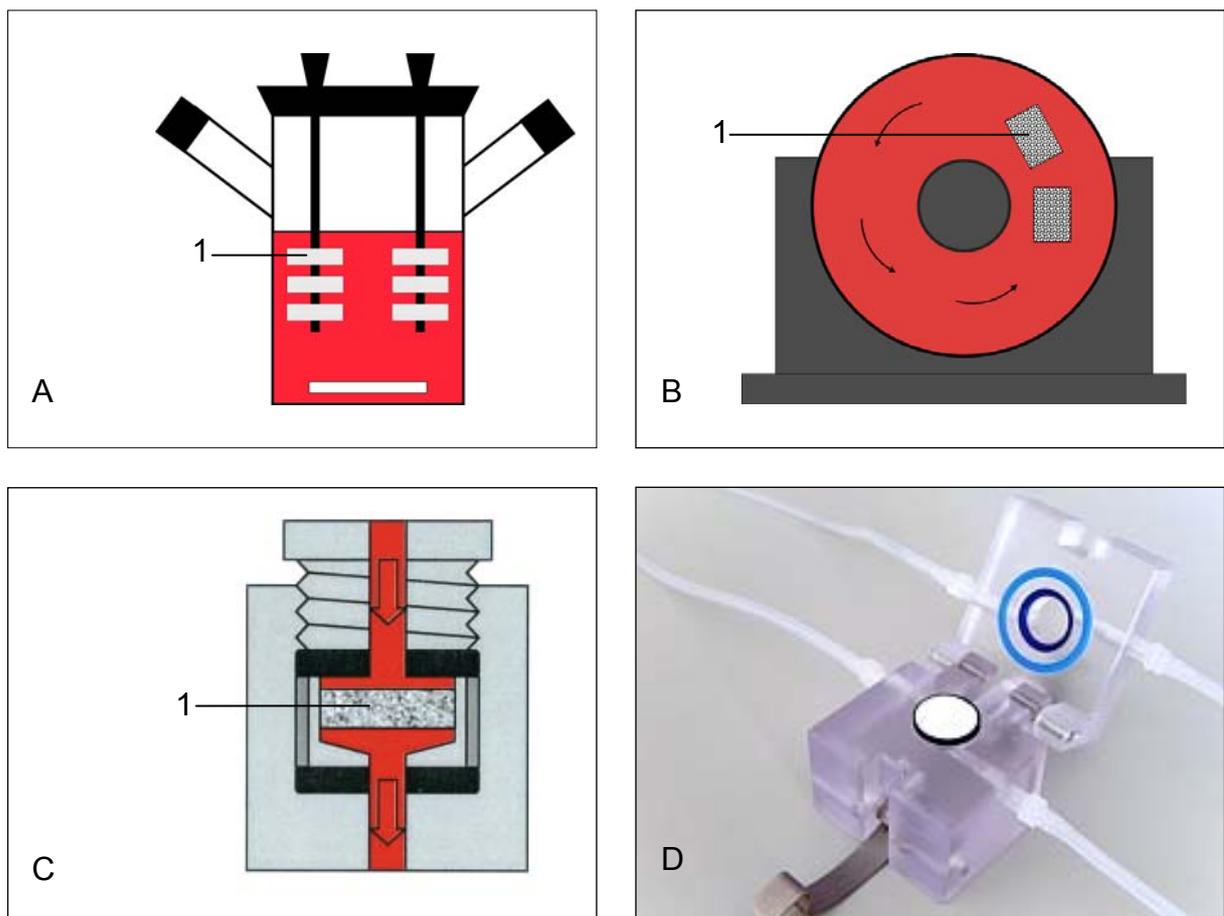
Um den Einfluss der verschiedenen Kultivierungsbedingungen auf die Integration bzw. Knochenneubildung von hMSC zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit auf den Einsatz von Wachstumsfaktoren verzichtet.

### 1.1.2. Kultivierungsbedingungen

Der Knochen ist ein komplexes, mechanisch aktives Gewebe. So stellt die Kultivierung der besiedelten Leitschienen eine Herausforderung dar, weil die im natürlichen Knochen auftretenden Kräfte nachgeahmt werden sollen. Die statische Kultivierung ist die einfachste Möglichkeit die besiedelte Konstrukte über längere Zeit zu kultivie-

ren. Die Konstrukte werden hierbei in einer Zellkulturplatte im Brutschrank kultiviert. Der Mediumwechsel erfolgt in regelmäßigen Abständen. Zu den Vorteilen der statischen Kultivierung zählen die einfache Handhabung und die geringen Kosten, da keine zusätzlichen Geräte erworben werden müssen (Portner et al. 2005). Diese Kultivierungsart ist jedoch nicht im Stande die natürlich vorkommenden Kräfte, wie hydrostatischer Druck und Scherspannung, zu simulieren (Salgado et al. 2004). Diese Faktoren jedoch beeinflussen die Entwicklung der osteoblastischen Vorläuferzellen in jedem Differenzierungsstadium (Sikavitsas et al. 2001).

Bei der dynamischen Kultivierung hingegen werden die besiedelten Konstrukte in einem Bioreaktor kultiviert. Dabei befindet sich das Kulturmedium im ständigen Fluss, der auf verschiedene Art und Weise erzeugt werden kann und die mechanische Stimulation der Zellen bewirkt. Durch den Bioreaktor soll ein stabiles Milieu hinsichtlich des pH-Wertes, der Sauerstoffkonzentration und der Temperatur erzeugt werden. Die Nährstoffzufuhr und die Entfernung der Abfallprodukte soll sichergestellt werden.



**Abb. 2** Verschiedene Typen von Bioreaktoren: A – Dynamisierte Kulturbehälter; B – Rotationsbioreaktor; C – Durchflussbioreaktor (Bancroft et al. 2002); D – Gradient container (Bildquelle Fa. Minucells and Minutissue); 1 – Leitschienenposition.

Außerdem muss die Sterilität des gesamten Systems während der Kultivierungsphase gewährleistet sein (Chen et al. 2006).

Die einfachste Form eines Bioreaktors ist der dynamisierte Kulturbedälter (Spinner flasks) (Hong et al. 1998). Die besiedelten Konstrukte werden an dem Flaschenverschluss fest befestigt. Das Medium wird mit Hilfe eines Magnetrührstäbchens bewegt und umströmt dabei die Konstrukte (Vunjak-Novakovic 1996). Die dynamisierten Kulturbedälter wurden für die Kultivierung von Polymerkonstrukten untersucht, die mit Chondrozyten oder Knochenmarkzellen besiedelt wurden (Goldstein et al. 2001, Vunjak-Novakovic et al. 1998). Die verbesserte Nährstoffzufuhr im Vergleich zu der statischen Kultivierung kann sich positiv auf die Entwicklung der Zellen auswirken.

Der Rotationsbioreaktor (Sikavitsas et al. 2002) wurde zur Simulation der Mikrogravitation entworfen, bevor er für das Tissue Engineering von Knochen eingesetzt wurde. Das System besteht aus zwei horizontal angeordneten, ineinander geschobenen Zylindern (Hong et al. 1998). Der Gasaustausch erfolgt durch den inneren Zylinder, da der äußere Zylinder nicht permeabel ist und in kontrollierter Art und Weise rotiert. Die besiedelten Leitschienen befinden sich im mit Kulturmedium gefüllten Zwischenraum und werden durch die auftretende Kräfte gehalten und mechanisch stimuliert (Freed et al. 1995). Über die positive Einflüsse auf die osteogene Zelldifferenzierung bei der Kultivierung im Rotationsbioreaktor wurde früher berichtet (Botchwey et al. 2001, Qiu et al. 1999). Die letzten Untersuchungen zeigten jedoch leichte Abweichungen vom osteoblastären Phenotyp und eine niedrigere Aktivität der alkalischen Phosphatase verbunden mit einer verminderten Synthese extrazellulärer Proteine und reduzierten Kalziumablagerungen im Vergleich zu statisch kultivierten Konstrukten (Wiesmann et al. 2004). Außerdem ist die negative Wirkung der Mikrogravitation auf die Knochen bekannt (Sinha et al. 2002).

Da die Nährstoffzufuhr durch die Diffusion stattfindet, wird bei der Überschreitung der Diffusionstiefe von ca. 200µm innerhalb der Leitschiene die Nährstoffversorgung zu dem limitierenden Faktor für das Zellwachstum. Durch dynamisierte Kulturbedälter und Rotationsbioreaktoren wird zwar die Nährstoffversorgung an der Oberfläche der Konstrukte verbessert, zum Leitschieneninneren nimmt die Nährstoffkonzentration jedoch ab. Eine verbesserte Versorgung der Zellen mit Nährstoffen im Zentrum der Konstrukte ermöglichen Durchflussbioreaktoren (Flow perfusion bioreaktor). Bei dieser Art der Bioreaktoren wird das besiedelte Konstrukt in der Kulturkammer fixiert (Hong et al. 1998). Eine Pumpe ist an einen Kreislauf mit einem Mediumreservoir

angeschlossen und befördert kontinuierlich das Kulturmedium durch die Leitschiene hindurch (Bancroft et al. 2003). Außerdem werden die Zellen durch den Mediumfluß den mechanischen Kräften ausgesetzt. So waren das Wachstum, die Differenzierung und die Produktion der mineralisierten Knochenmatrix bei den Knochenmarkzellen nach deren Kultivierung im Durchflussbioreaktor erhöht (Sikavitsas et al. 2003a, Bancroft et al. 2002).

Eine andere Art des Bioreaktors ist der Gradient container, der auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde. Die zu kultivierenden Gewebe oder Leitschienen werden in diesen Bioreaktoren zuerst zwischen den mediumgängigen Membranen eingebracht und dann in der Kulturkammer positioniert, diese kann nach Bedarf in eine Ober- und Unterkammer mit verschiedenen Medien getrennt werden (Hong et al. 1998). Mit Hilfe einer Peristaltikpumpe fließt das Medium aus der Vorratsflasche durch die Leitschiene zu einem Abfallbehälter. So werden die Kulturen mit einem gleich bleibenden Medium versorgt (Minuth et al. 1998). Die Untersuchungen der Leitschienen, die mit MC3T3 Zelllinien oder mit humanen Knochenmarkzellen besiedelt wurden, zeigten bei der Kultivierung im Gradient container einen positiven Effekt auf das Zellwachstum und die osteogene Differenzierung der Zellen (Bernhardt et al. 2008, Leukers et al. 2005). Aufgrund dieser besonderen Eignung wurde dieser Bioreaktor für die Aufgabenstellung dieser Arbeit ausgewählt.

### 1.1.3. In vivo – Modell

Vor der klinischen Etablierung der mit Hilfe von Tissue Engineering hergestellten Konstrukte muss deren Prüfung im Tiermodell erfolgen. Das implantierte Konstrukt kann im Organismus eine vielschichtige Reaktion hervorrufen, die eine Bioresorption, eine Immunantwort oder die Entstehung von Tumoren beinhalten. So ist die histologische, molekularbiologische oder radiologische Auswertung der im Tierversuch gewonnenen Proben unerlässlich (Jager et al. 2005a).

Zuerst werden die tierexperimentellen Studien in standardisierten Experimentalmodellen an Kleintieren (Mäusen und Ratten) durchgeführt. Sie sind leicht in der Handhabung und die niedrigen Haltungskosten erlauben es, eine große Untersuchungsgruppe zu bilden, wodurch eine entsprechend größere Datenmenge gesammelt werden kann. Die kürzere Lebenserwartung von Kleintieren ermöglicht außerdem die Beurteilung der Alterungsprozesse des Knochens und implantierten Konstruktes (Liebschner 2004).

Die Beurteilung der Konstrukte kann im heterotopen oder orthotopen Lager erfolgen. Die Implantation im heterotopen Lager ist technisch einfach und erlaubt eine Aussage über eine ausreichende Porosität für die Gewebe- und Gefäßintegration in die Umgebung und das Zellverhalten bei den zukünftigen Therapien (Krebsbach et al. 1999). Meistens wird ein Konstrukt subkutan positioniert, es kommen aber auch andere Orte wie Muskeln, Peritoneum oder Mesenterium in Frage (Ishaug-Riley et al. 1997). Während der Implantationsort keine Auswirkung auf eine mögliche Knochenneubildung hat, birgt die ektope Implantation mehrere Vorteile (van Gaalen et al. 2004). Die bei der Knochenheilung freigesetzten Wachstums- und Differenzierungsfaktoren wie Transforming Growth Factor beta (TGF- $\beta$ 1, - $\beta$ 2, - $\beta$ 3), Growth und Differentiation Factor (GDF-1, 5, 8, 10) und Bone Morphogenetic Protein (BMPs 1-8) können außer Acht gelassen werden (Dimitriou et al. 2005). Ein weiterer Vorteil ist, dass eine mögliche Knochenneubildung nur durch die besiedelten Leitschienen selber und die Gefäßversorgung des Wirtsorganismus zustandekommt (Schantz et al. 2002). Einer der Nachteile des heterotopen Lagers ist das Fehlen der mechanischen Einflüsse auf das implantierte Konstrukt.

Für die Beurteilung der Tissue Engineering-Konstrukten im orthotopen Lager eignet sich besonders der Defekt kritischer Größe. Er ist durch das Ausbleiben der Spontanheilung und einer daraus resultierenden Bildung einer Pseudoarthrose definiert (Schmitz et al. 1986). In den Tiermodellen wird dieser orthotopische Defekt meistens in den langen Knochen oder in der Schädelkalotte erzeugt. Er erlaubt die Aussage über die osteokonduktiven, osteoinduktiven und biomechanischen Eigenschaften der ausgewählten Leitschiene (Goldstein 2002). Da die Knochenheilung maßgeblich von dem Alter des Tieres abhängt, sollten für die Versuche nur Tiere mit geschlossener Epiphysenfuge gewählt werden (Einchorn et al. 1999). So ist das orthotope Modell mit einem hohen operativen Aufwand, einer größeren Weichteilverletzung und einer nötigen Fixierung bei langen Knochen verbunden.

Bei den direkten Vergleichen zwischen dem ektopen und orthotopen Lager konnte gezeigt werden, dass ektop gebildeter Knochen sich gleichmäßig im besiedelten Konstrukt verteilt. Im Gegensatz dazu findet die Knochenneubildung im orthotopen Lager an den Rändern des Konstrukts statt, wobei es keine signifikanten Unterschiede zwischen besiedelten und unbesiedelten Konstrukten gab (Kruyt et al. 2007, Kruyt et al. 2004). Der entscheidende Vorteil des ektopen Lagers liegt in der Möglichkeit der einfachen und schnellen Testung der Leitschienen ohne die Knochenneubildung

beeinflussende Faktoren. Nach der Auswertung der Ergebnisse geht man zur aufwendiger Implantation im orthotopen Lager über (Bensaid et al. 2005, Kon et al. 2000).

Bei den Großtiermodellen werden nicht nur die biologischen Aspekte des Tissue Engineering betrachtet, sondern es können auch die chirurgischen Techniken getestet werden (Buma et al. 2004). Da sich die Großtiere in ihrer Physiologie und Knochenstruktur mehr dem Menschen ähneln, lassen sich die gewonnenen Erkenntnisse besser in der Medizin adaptieren. Die hohen Kosten für die Anschaffung und Haltung der Tiere gehören zu den Nachteilen des Großtiermodells.

In unserem Versuch haben wir uns für das ektope subkutane Modell entschieden, da die mögliche Knochenneubildung nicht von der mechanischen Beanspruchung, dem Knochenmetabolismus und der Muskelspannung beeinflusst wird (Muraglia et al. 1998). Dabei wurden bei der Verwendung von hMSC athymische Nacktmäuse mit einer fehlenden Immunantwort gegen xenogene Zellen gewählt (Meyerrose et al. 2003).

#### 1.1.4. Nachweismöglichkeiten implantierter Zellen

Histologie ist eine der Methoden, die zur Untersuchung der in Versuchen gewonnenen Proben verwendet wird. Mit Hilfe der histologischen Übersichtsfärbungen, wie zum Beispiel Haematoxylin-Eosin-Färbung, kann die Morphologie des Gewebes beurteilt werden. Bei bestimmten Fragestellungen können die Spezialfärbungen durchgeführt werden. So erlaubt die von uns angewendete Paragonfärbung neu gebildetes von älterem, voll mineralisiertem Knochengewebe zu unterscheiden. Ob die Knochenneubildung von den implantierten Zellen oder von den Wirtszellen ausgeht, kann anhand der histologischen Färbung nicht unterschieden werden. Diese Frage kann mit Hilfe der Immunhistochemie beantwortet werden.

Mit Hilfe der Immunhistochemie werden Gewebe mit immunologischen Methoden untersucht, die einen hochempfindlichen und spezifischen Substanznachweis erlauben. Der Nachweis erfolgt mittels spezifischer Antikörper durch Antigen-Antikörper-Reaktion. Zur Visualisierung des Antigen-Antikörper-Komplexes wird ein zweiter Antikörper zugesetzt, der entweder eine Markierung trägt (ein Fluoreszenzfarbstoff) oder in der Lage ist, weitere Substanzen zu binden (Biotin-Avidin-Komplexe). Der Ursprung des Knochengewebes kann anhand der spezifischen, von den implantierten Zellen produzierten Matrix, wie zum Beispiel humaner Vimentin, humaner Osteocalcin, humane GAPDH und humanes Kollagen Typ I im Mausmodell, nachgewiesen

werden (Matsubara et al. 2005, Bareille et al. 2000). Es können auch die implantierten Zellen markiert werden. Dabei können die Antikörper gegen Oberflächenantigene der Knochenmarkzellen oder gegen die HLA-1-Antigene eingesetzt werden (Schantz et al. 2002, Haynesworth et al. 1992).

In Rahmen dieser Arbeit wurden Antikörper gegen humane Nuklei, Anti- $\beta$ 2-Mikroglobulin und Anti-HLA-1 Antikörper eingesetzt, die allesamt mit humanspezifischen Antigenen reagieren und so die Abgrenzung zu dem Wirtsgewebe erlauben.

## 1.2. Aufgabenstellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob die Kultivierungsart und die Kultivierungsdauer *in vitro* einen Einfluss auf die osteogene Differenzierung von hMSC und damit eventuelle Knochenneubildung *in vivo* haben. Aus diesem Grund wurde auf die Zufuhr von Wachstumsfaktoren bzw. osteogene Stimulation während der Kultivierung verzichtet. Die Leitschienen wurden mit undifferenzierten hMSC besiedelt und zwei Wochen dynamisch, zwei Wochen oder zwölf Stunden statisch kultiviert. Eine Kontrollgruppe ohne hMSC wurde zwölf Stunden statisch kultiviert.

Die Auswertung der explantierten Leitschienen erfolgte histologisch und immunohistochemisch. Die Beurteilung der Knochenneubildung, der Gewebereaktion und der Integration der Leitschienen in das umliegende Gewebe erfolgte nach zwei und zwölf Wochen Implantationsdauer anhand der histologischen Färbung. Mit Hilfe immunohistochemischer Markierung wurde das Überleben der implantierten Zellen dokumentiert.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Zellkultur

#### 2.1.1. Zellen

Für die Durchführung der Versuche wurden kommerziell erhältliche humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) von Firma Cambrex (New Jersey, USA) verwendet. Diese wurden unter standardisierten Bedingungen mittels Dichtengradientenzentrifugierung aus dem Knochenmark gesunder Spender isoliert. Durch Überprüfung spezifischer Oberflächenmarker und Differenzierbarkeit in adipogene, chondrogene und osteogene Richtung wurde nachgewiesen, dass es sich um mesenchymale Stammzellen handelt (Pittenger et al. 1999).

#### 2.1.2. Kultivierungsbedingungen und Medien

Für die nachfolgenden Versuche wurden die Zellen in einem Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt entsprechend den Herstellerangaben kultiviert. Für die Anzucht der Zellen und die statische Kultivierung der Leitschienen wurde Mesenchymal Stem Cell Growth Medium (MSCGM) verwendet. Die Zellen wurden im Rahmen der 3D-Kultivierung in DMEM high glucose mit Hepes (Firma Gibco, Carlsbad, USA) kultiviert, welches 10 % (v/v) FBS, 40 U/ml Penicillin, 40 µg/ml Streptomycin und 0,11 mg/ml Na-Pyruvat enthielt. Alle nachfolgend beschriebenen Versuche wurden auf einer Sterilbank durchgeführt mit stetigem laminarem Luftstrom durchgeführt. Zur Kultivierung wurden ca. 3.000 Zellen pro Quadratcentimeter in eine T-75 Zellkulturflasche ausplattiert. Bei Erreichen einer neunzigprozentiger Konfluenz wurden die Zellen wie folgt passagiert:

- Medium aus den Zellkulturflaschen absaugen;
- Zellrasen mit 4 ml PBS (ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>) ca. 30 s waschen;
- PBS absaugen;
- Zellen mit 2 ml Trypsin/EDTA ca. 5 min bei Raumtemperatur inkubieren;
- Zellen durch Klopfen vom Boden ablösen;
- nach mikroskopischer Kontrolle ggf. weitere 5 min inkubieren;
- zur Neutralisierung der Trypsinkomponente 3 ml frisches Medium zugeben;

- nach der Zellzählung die Zellen in einer Dichte von ca. 3.000 Zellen pro Quadrat-zentimeter in Zellkulturflaschen überführen oder zur Besiedelung der Leitschienen verwenden.

Nach Beurteilung der Vitalität der Zellen durch Anfärbung mit Trypanblau erfolgte die Zellzählung mittels Neubauer Zellkammer. Für alle in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Versuchsansätze wurden die Zellen in der sechsten Passage verwendet. Ein Mediumwechsel erfolgte alle drei bis vier Tage.

### 2.1.3. Ausplattieren der Zellen auf die Glasobjektträger

Um später die spezifische Bindung von Antikörpern beurteilen zu können, wurden die Zellen wie folglich beschrieben auf die Glasobjektträger ausgesät. Nach dem Einlegen der sterilen Glasobjektträger in eine QuadriPerm® - Schale wurden auf der gesamten Fläche 0,5 ml einer Zellsuspension ( $0,1 \times 10^6/\text{ml}$ ) gleichmäßig verteilt. Nach einer Adhärenzphase von zwei Stunden im Brutschrank wurden 4 ml Medium in jede Kammer der QuadriPerm® - Schale dazugegeben. Nach ca. 12 Stunden im Brutschrank wurden die hMSC auf den Glasobjektträgern 15 min mit PBS gewaschen und danach 15 min mit 100 % Methanol bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  fixiert. Nach dem austrocknen wurden sie bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  bis zum Gebrauch aufbewahrt.

## 2.2. Leitschienenbehandlung in vitro

### 2.2.1. Leitschienen

Die verwendeten Leitschienen (Tutobone) wurden von der Firma Tutogen Medical GmbH (Neunkirchen am Brand, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Die zylinderförmigen Leitschienen ( $\varnothing$  9 mm, Höhe 3 mm) werden aus boviner Spongiosa gewonnen. Sie wird dann nach dem von der Firma Tutogen Medical patentierten Verfahren dem so genannten Tutuplast® Prozess und beinhaltet die Entfernung antigener Komponenten aus dem Gewebe, die Inaktivierung von Viren und Prionen sowie die Sterilisierung mit Gammastrahlen.

### 2.2.2. Besiedelung der Leitschienen

Um eine bessere Adhärenz der hMSC zu ermöglichen, wurden die Tubobone 6 Stunden in FBS und dann über Nacht in MSCGM in 48-Well Platten vorinkubiert. Nach Passagieren der Zellen und der Zellzahlbestimmung wurde bei den Leitschienen das Vorinkubationsmedium abgesaugt. Die Leitschienen wurden mit  $1,0 \times 10^6$  hMSC in einer hochkonzentrierten Zellsuspension (660  $\mu$ l) beimpft. Um die Effizienz der Besiedelung zu erhöhen, wurde ein 6 Stunden dauerndes Besiedelungsverfahren gewählt. In den ersten 2 Stunden wurde die Leitschienen alle 20 Minuten gewendet und die Zellsuspension resuspendiert und erneut auf die Leitschiene aufpipettiert. In den folgenden 2 Stunden wurde diese Prozedur ein Mal pro Stunde durchgeführt. Nach Ablauf von weiteren 2 Stunden wurden die Leitschienen in eine neue 48-Well-Platten umgesetzt und über Nacht inkubiert. Um die Besiedelungseffizienz zu ermitteln, wurden die Zellen in jedem Well getrennt ausgezählt und der prozentuale Anteil der angesiedelten Zellen ermittelt.

### 2.2.3. Kultivierung der Leitschienen

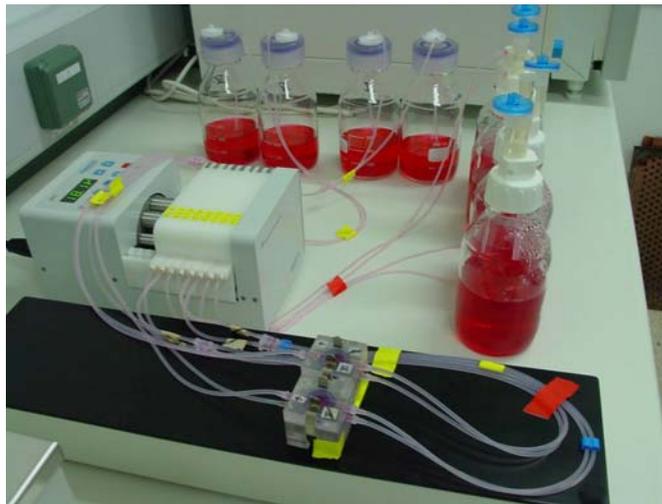
#### 2.2.3.1. Statische Kultivierung

Die statische Kultivierung erfolgte im Brutschrank, wobei eine Gruppe für 12 Stunden und die andere für 14 Tage in 48-Well-Platten kultiviert wurden. Ein Mediumwechsel erfolgte zwei Mal pro Woche.

#### 2.2.3.2. Dynamische Kultivierung

Für die dynamische Kultivierung wurden die Leitschienen nach der Besiedelung über Nacht in den 48-Well-Platten belassen und danach in einen Bioreaktor für weitere zwei Wochen Kultivierung überführt. Als Bioreaktor für die dynamische Kultivierung wurde ein Gradient Container (Minucells and Minutissue, Bad Abbach, Deutschland) gewählt (Abb.3). Er besteht aus einer Kulturkammer ( $\varnothing$  10 mm, Höhe 9 mm), die über Ports und gaspermeable Silikonschläuche mit einem Behälter mit frischem Medium einerseits und einem Abfallbehälter andererseits verbunden ist. Der zuführende Schenkel wurde über eine Peristaltikpumpe geführt, welche einen permanenten Zufluss des frischen Nährmediums (1,1 ml/h) sicherstellt. Um die für das Zellwachstum

erforderliche Temperatur von 37 °C zu gewährleisten, wurde der Bioreaktor auf einer Wärmeplatte (Riminucci et al. 2003) positioniert und mit einer Styroporbox abgedeckt. Kontrollmessungen in der Styroporbox ergaben eine konstante Temperatur von 37 °C. Da die dynamische Kultivierung außerhalb der CO<sub>2</sub>-Atmosphäre eines Brutschrankes erfolgte, wurde ein Kultivierungsmedium DMEM high Glucose mit HEPES-Zusatz verwendet. Dadurch konnte der pH-Wert auf physiologischem Niveau gehalten werden.



**Abb. 3** Beispiel für das Aufbau des Systems in Rahmen einer dynamischen Kultivierung (Bildquelle: [www.AGTEK.de](http://www.AGTEK.de)).

#### 2.2.3.3. Kontrollgruppe

Die Leitschienen in der Kontrollgruppe wurden 6 Stunden in FBS kultiviert und dann ohne vorheriger Besiedelung mit hMSC für 36 Stunden in MSCGM überführt. Das entspricht der 12 Stunden Gruppe bei der statischen Kultivierung der Leitschienen.

## 2.3. Leitschienebehandlung in vivo

Für die Tierversuche wurden athyme immunsupprimierte Nacktmäuse (nu/nu, Fa. Harlan-Winkelmann, Borcheln) verwendet. Der Tierversuch wurde durch die Tierversuchskommission der Regierung von Oberbayern genehmigt. Die Tiere wurden nach der Richtlinie zur Versorgung und Behandlung von Labortieren der Ludwig-Maximilians-Universität München behandelt. Der Tierversuch wurde in der Zentralen Tierversuchsanstalt der LMU durchgeführt. Der schematische Aufbau des Tierversuches ist in der in der Abbildung 4 dargestellt.

### 2.3.1. Implantation der Leitschienen

#### 2.3.1.1. Anästhesie

Zur Herstellung der Narkosemittellösung wurden jeweils 2 ml Fentanyl (0,05 mg/ml) und 2 ml Dormicum (5 mg/ml) sowie 1 ml Dormitor (1 mg/ml) gemischt. Die Endkonzentrationen der Narkoselösung betragen 0,025 mg Fentanyl/ml, 2,5 mg Dormicum/ml und 0,05 mg Dormitor/ml. Zur Herstellung des Antidots wurden 5 ml Anexate (0,1 mg/ml), 3 ml Narcanti (0,4 mg/ml) und 0,5 ml Antisedan (5 mg/ml) zusammen gemischt. Um die benötigte Narkosemittelmenge zu bestimmen, wurden die Mäuse gewogen. Danach wurden die 2,5 ml/kg Körpergewicht Narkoselösung intramuskulär (M. semitendinosus, M. semimembranosus) appliziert. Die ausreichend narkotisierten Mäuse wurden unter einer sterilen Werkbank in Bauchlage mit Leukosilk-Klebestreifen über den vier Extremitäten auf einer mit Zellstoff bezogenen Styroporplatte zur Wärmeisolation fixiert (Abb. 6, A).

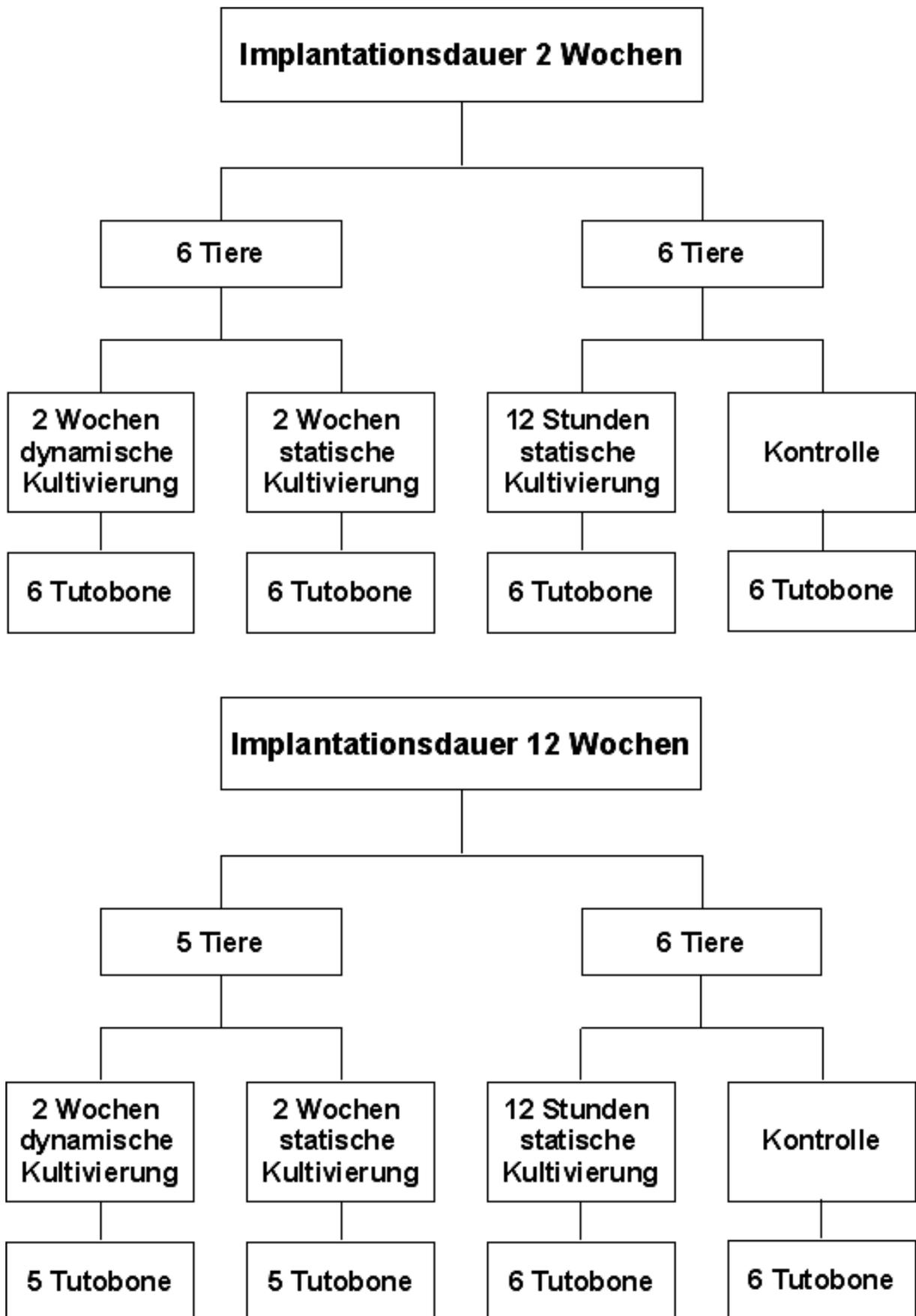
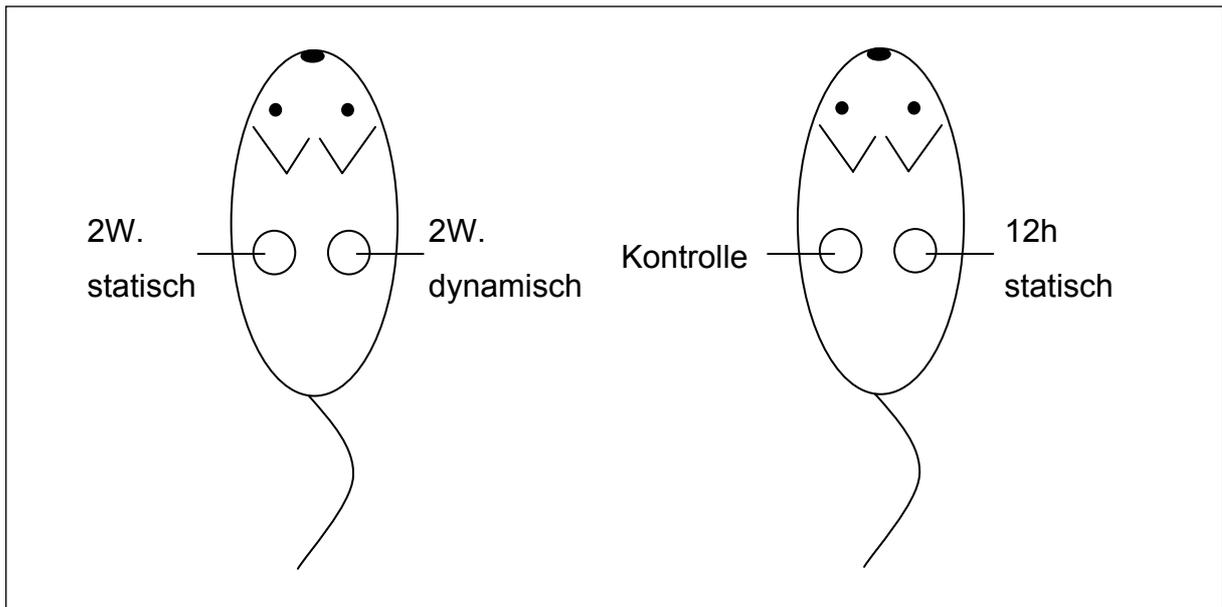


Abb. 4 Schematische Darstellung der Leitschieneimplantation und -dauer

### 2.3.1.2. Implantation der Konstrukte

Die Leitschienen wurden subkutan paravertebral implantiert. (Abb. 5) Dafür wurde die Haut dorsokaudal mit einer Pinzette angehoben und dann mit einer Schere kranialwärts über den Processi spinosi eröffnet. Anschließend wurde die Haut nach links und rechts lateral mit einer stumpfen Schere mobilisiert und somit zwei Taschen für die Leitschiene geschaffen. (Abb. 6, B) Die Leitschienen wurden dann mit einer sterilen Kanüle aus den 48-Well-Platten entnommen und in den vorbereiteten Subkutan-taschen rechts und links paravertebral positioniert. (Abb. 6, C) Um zu verhindern, dass die implantierten Leitschienen im Untersuchungszeitraum miteinander in Kontakt kommen, wurden sie mit einer Subkutannaht fixiert. Nachdem die richtige Lage der Leitschienen noch einmal überprüft wurde, wurde die Haut in Einzelknopfnah-technik mit drei bis fünf Stichen genäht. Als Nahtmaterial wurde Vicryl 3/0 SH bzw. Vicryl 4/0 verwendet. Die zwei Wochen statisch kultivierten Leitschienen wurden links und die zwei Wochen dynamisch kultivierten Leitschienen rechts paravertebral im-plantiert. Die Kontrollleitschienen wurden links und die 12 Stunden statisch kultivier-ten

Leitschienen rechts paravertebral implantiert. Nach Beendigung der Hautnaht wurde zur postoperativen Schmerztherapie 0,05 ml Tramal subkutan nuchal verabreicht und die Narkose anschließend mit dem Antidot antagonisiert (Dosierung 8,5 ml/kg Kör-pergewicht), wobei die Antidotlösung je zur Hälfte in die Streckseite (M. semitendino-sus, M. semimembranosus) des linken und rechten Hinterbeines injiziert wurde. Nach etwa 10 bis 15 Minuten wurden die Tiere einer klinischen Kontrolle unterzogen. Da-bei musste leider der Tod einer Maus mit zwei Wochen dynamisch und statisch kulti-vierten Leitschienen für zwölf Wochen Implantationsdauer festgestellt werden. Alle weiteren Versuchstiere waren postoperativ wieder aktiv und scheinbar schmerzfrei.



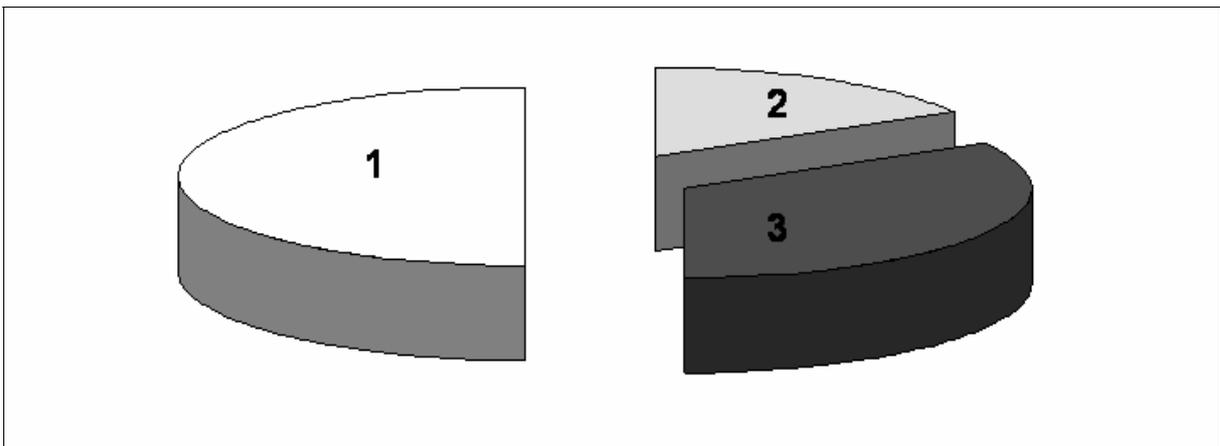
**Abb. 5** Schematische Darstellung der Position der Konstrukte in vivo für beide Untersuchungszeiträume

### 2.3.1.3. Explantation der Konstrukte und Organentnahme

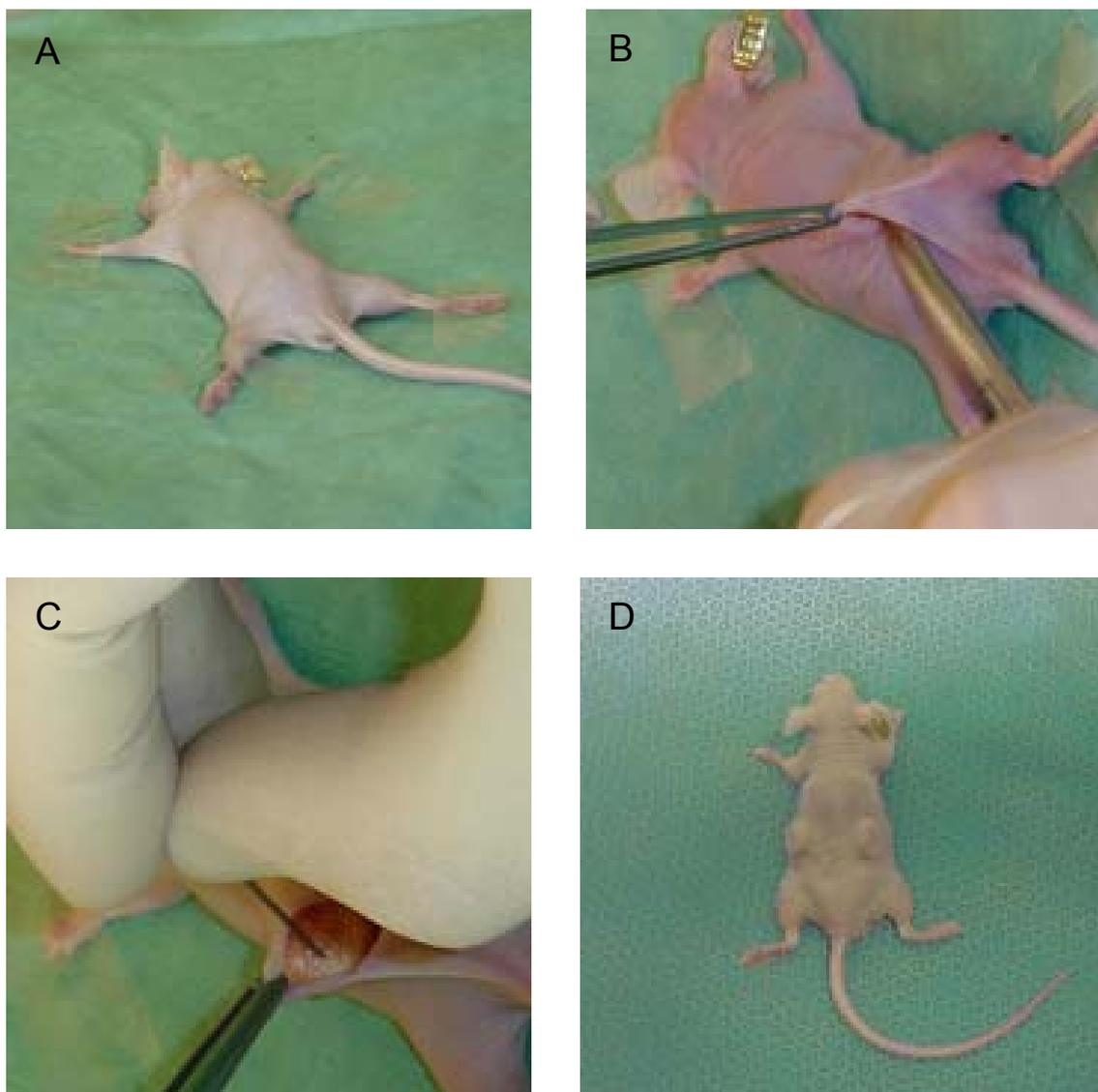
Während der Beobachtungszeit waren die Versuchstiere in einem guten Allgemeinzustand und zeigten in ihrem Trink- und Fressverhalten keine Auffälligkeiten. Durch die Tutobone-Implantate schienen sich keine Beeinträchtigungen zu ergeben. Die Operationswunden waren bereits nach zwei Wochen reizlos verheilt (Abb. 6, D). Nach zwei bzw. zwölf Wochen erfolgte die Explantation von Leitschienen und die Organentnahme. Die Tiere wurden, wie im Rahmen der Implantation bereits beschrieben, narkotisiert und auf einer Sterilbank in Bauchlage fixiert. Im Bereich der Narbe wurde die Haut mit einer Pinzette angehoben und kranialwärts über den Processi spinosi eröffnet. Unter vorsichtiger Präparation wurden die Leitschienen mit dem umliegenden Gewebe entfernt, welches dorsal Haut und Unterhautgewebe und ventral Anteile des M. latissimus dorsi beinhaltete. Die Leitschienen waren makroskopisch mit dem umgebenen Gewebe verwachsen. Um eine Kontamination der unbesiedelten Kontrollleitschienen mit hMSC zu vermeiden, wurden diese zuerst explantiert. Die explantierten Leitschienen wurden für die nachfolgenden Untersuchungen in einer sterilen Petrischale mittels eines Skalpell in drei Teile geteilt (Abb. 6). Jeweils ein Viertel wurde histologisch untersucht und zu diesem Zweck in einem Formaldehyd/Methanolgemisch fixiert. Ein weiteres Viertel wurde für die immunhistochemische Auswertung in 100 % Methanol fixiert. Die verbleibenden Hälften von den Leitschie-

nen wurden für die molekularbiologischen Untersuchungen in flüssigem Stickstoff bei 196 °C schockgefroren.

Nach erfolgreicher Entnahme beider Leitschienen wurden die Mäuse auf den Rücken gewendet und wiederum an den vier Extremitäten fixiert. Mit einer Omifix-Spritze (50 µl EDTA vorgelegt) wurde den Tieren über eine Herzpunktion 0,8 bis 1 ml Blut entnommen. Das Blut wurde in ein Kryoröhrchen überführt und ebenfalls in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Danach wurden die Mäuse durch Fixation am Nacken und gleichzeitigem Zug am Schwanz überstreckt und euthanisiert. Anschließend wurde die Linea alba längst mit einer Schere eröffnet und jeweils Lunge, Milz, Leber, Niere, Herz, Gehirn sowie Hoden entnommen. Die einzelnen Proben wurden jeweils in Kryoröhrchen überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und für molekularbiologische Untersuchungen bei -80 °C aufbewahrt.



**Abb. 6** Schematische Darstellung der Aufteilung von explantierten Leitschienen für die verschiedene Untersuchungsmethoden: 1 – molekularbiologische Auswertung; 2 – histologische Untersuchung; 3 – immunohistologische Untersuchung.



**Abb. 7** Implantation der Leitschienen: A - narkotisierte Maus in der Bauchlage; B - Präparation einer subkutanen Tasche; C - subkutanes Einbringen einer Leitschiene; D - Leitschienen 12 Wochen nach der Implantation.

## 2.4. Histologische Auswertung der Konstrukte

### 2.4.1. MMA-Einbettung

Um eine Veränderung von Struktur und Färbeeigenschaften der Proben durch die bei Anwendung der Kryoschnidetechnik erforderlichen Entkalkung der Leitschienen zu vermeiden, wurde bei jeweils einem Viertel jeder Leitschiene eine aufwändigere Einbettung in Methylmetacrylat (MMA) durchgeführt. Dabei entstehen transparente Kunststoffblöcke. Für die MMA-Einbettung ist eine Fixierung der Proben für 24 Stunden in einem Formaldehyd-Methanolgemisch vorteilhaft, welches zu 64 % aus Methanol, zu 33,3 % aus fünfunddreißigprozentigem Formaldehyd und zu 2,67% einprozentiger Sucrose in PBS (Phosphate-Buffer-Saline) besteht. Nach dieser Fixierung wurden die Proben in aufsteigender Alkoholreihe (2 x 70 %, 80 %, 90 %, 2 x 100 % Ethanol und 2 x Aceton) dehydriert. Die Lösungswechsel der Alkoholreihe erfolgten jeden Tag. In der Zeit zwischen dem Lösungswechsel wurden die Proben bei 4 °C aufbewahrt. Nach der Entwässerung der Proben erfolgte deren Präinfiltration bei 4 °C in purem MMA für 48 Stunden, wobei MMA-Flüssigkeit nach 24 Stunden gewechselt wurde. Die Infiltration der Proben wurde in einem MMA-Einbettgemisch durchgeführt, das aus 100 ml MMA, 25 ml Plastoid N (Monphenyl-Polyethyl-Glycol-Acetat) und 3,5 g Benzoylperoxid bestand. Um eine bessere Infiltration der Proben zu gewährleisten, wurden die Proben nach jedem Wechsel von MMA und MMA-Einbettgemisch im Exsikator für 20 Minuten im Vakuum gelagert. Danach wurden die Proben im Wasserbad bei 21 °C ca. 21 Tage polymerisiert.

### 2.4.2. Anfertigung der MMA-Schnitte

Nach der vollständigen Aushärtung des MMA-Gemisches wurden die polymerisierten Kunststoffblöcke mit einer Bandsäge grob getrimmt und geeignete Auflageflächen mit einer Bandschleifmaschine angeschliffen. Um die gewünschte Schnittebene zu erreichen, wurden die Kunststoffblöcke auf einen Probenstempel aufgeklebt und mit einer Innenlochsäge fein zugeschnitten. Danach wurden die 4 µm-Dünnschnitte mit einem Hartschnittmikrotom hergestellt. Zum Schneiden wurde 30 % Ethanol als Schneidflüssigkeit verwendet. Die Schnitte wurden dann auf Superfrost plus®-Glasobjektträger aufgezogen. Mithilfe einer Streckflüssigkeit aus 96 % Ethanol wurden die Schnitte gestreckt und mit PVC-Folie abgedeckt. Die überschüssige Flüssig-

keit wurde mit Filterpapier abgesaugt und die Objektträger unter Druck in einer Zwin-  
ge über Nacht bei 60 °C ausgetrocknet.

#### 2.4.3. Histologische Färbung der Dünnschnitte

Um die Morphologie der explantierten Leitschienen beurteilen zu können, wurden Paragon-Färbungen angefertigt. Um das MMA aus dem Gewebe herauszulösen, wurden die MMA-Dünnschnitte entplastet. Dafür wurden die Schnitte jeweils zweimal für 30 Minuten in Methoxyethylacetat und jeweils für 5 Minuten zweimal in Xylol, zweimal in 100 %, dann in 90 %, 80 % und 70 % Ethanol eingelegt. Für die Herstellung der Paragon-Färbelösung wurden 0,73 g Toluidinblau und 0,27 g basisches Fuchsin in dreißigprozentigem Ethanol gelöst. Der pH-Wert wurde auf 6,5 eingestellt und die Lösung auf 60 °C erwärmt. Die Färbungen erfolgten dann im Wärmeschrank bei 60 °C für die Dauer von 3 Minuten und anschließend dreifachem Ausspülen der überschüssigen Färbelösung mit destilliertem Wasser. Nach Absaugen des Wassers mit Filterpapier wurden die Schnitte mit DPX eingedeckt.

#### 2.4.4. Auswertung der Proben

Die Präparate wurden nach der Paragon-Färbung lichtmikroskopisch untersucht. In Anlehnung an van Gaalen wurde ein System zur qualitativen Beurteilung von Präparaten entwickelt (van Gaalen et al. 2004). Es wurde die Ausdehnung von Granulationsgewebe, Entzündung, Nekrosen und Fettgewebe bewertet. Dabei wurde nur das Gewebe innerhalb der Leitschiene in die Beurteilung herangezogen. Umliegendes Gewebe wie Haut, subkutanes Gewebe und Muskelgewebe wurden nicht ausgewertet. Es wurden zur Klassifizierung der Ergebnisse Punkte nach dem folgenden Schema vergeben:

- 1 Punkt: Ausdehnung auf 1-20 % der Leitschienenfläche
- 2 Punkte: Ausdehnung auf 21-40 % der Leitschienenfläche
- 3 Punkte: Ausdehnung auf 41-60 % der Leitschienenfläche
- 4 Punkte: Ausdehnung auf 61-80 % der Leitschienenfläche
- 5 Punkte: Ausdehnung auf 81-100 % der Leitschienenfläche

Als weiteres Kriterium wurde die Einsprossung der Gefäße innerhalb der Leitschiene nach dem folgendem Punktsystem beurteilt:

- 1 Punkt: einzelne Kapillare am Rand der Leitschiene
- 2 Punkte: einzelne Kapillare in den ersten zwei Dritteln der Leitschiene vom Rand ausgehend
- 3 Punkte: Kapillare über die ganze Leitschiene verteilt
- 4 Punkte: größere Gefäße am Rand der Leitschiene, generelle Kapillarverteilung
- 5 Punkte: die Leitschiene mit Gefäßen durchzogen

Des Weiteren wurden auch das Vorhandensein und die Verteilung von Fremdkörperriesenzellen wie folgt beurteilt:

- 1 Punkt: eine Fremdkörperriesenzelle oder Fremdkörperriesenzellengruppe am Rande der Leitschiene
- 2 Punkte: zwei bis fünf Fremdkörperriesenzellen oder Fremdkörperriesenzellengruppen am Rand der Leitschiene
- 3 Punkte: sechs bis zehn Fremdkörperriesenzellen oder Fremdkörperriesenzellengruppe am Rand der Leitschiene
- 4 Punkte: die Fremdkörperriesenzellen oder Fremdkörperriesenzellengruppen um die Mitte der Leitschiene
- 5 Punkte: Fremdkörperriesenzellen oder Fremdkörperriesenzellengruppe an mehr als zehn Stellen oder über die ganze Leitschiene verteilt

Um die Beurteilung möglichst objektiv zu gestalten, wurden die Präparate von drei Personen unabhängig voneinander ausgewertet. Die statistische Analyse der Ergebnisse beinhaltete die Berechnung des arithmetischen Mittelwertes und der Standardabweichungen. Die Signifikanzermittlung erfolgte mit dem Wilcoxon Signed Rank-Test mit Hilfe der Statview® Software. Als statistisch signifikant wurden die Differenzen betrachtet bei denen  $p < 0,05$  war. Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit Microsoft Excel Software. Die Aufnahmen wurden bei unterschiedlichen Vergrößerungen mit einem digitalen Bildverarbeitungssystem angefertigt.

## 2.5. Immunhistochemische Untersuchungen der Leitschienen

### 2.5.1. Anfertigung von Kryoschnitten

Nach der Fixierung der Leitschienen in 100 % Methanol erfolgte deren Entkalkung bei 4 °C in 5 % EDTA in PBS für die Dauer von 21 Tagen bei regelmäßigem Wechsel der Entkalkungslösung alle zwei Tage. Das Volumen der Entkalkungslösung betrug dabei mindestens das Zwanzigfache des Präparatvolumens. Anschließend wurden die Präparate über Nacht in eine 5 % Sucroselösung in PBS eingelegt. Dann wurden die Proben mittels eines Kryoeinbettmediums in der Mitte eines Präparatehalters bei -80 °C festgefroren. Die Anfertigung der Kryoschnitte erfolgte bei -25 °C. Die auf dem Präparatehalter festgefrorenen Proben wurden im Kryotom in einer Schneidevorrichtung eingespannt und bei einer Schnittdicke von 50 µm bis zur gewünschten Schnittebene angeschnitten. Dann wurde die Schnittdicke auf 12 µm reduziert und das Präparat sequenziell geschnitten. Die einzelnen Schnitte wurden zu sechs Schnitten zusammengefasst auf Superfrost plus®-Glasobjektträger aufgebracht und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert.

### 2.5.2. Immunhistochemische Markierungen der Kryoschnitte

#### 2.5.2.1. Immunhistochemische Markierung mit dem Antikörper gegen humane Nuklei

Für den Nachweis der hMSC wurde zuerst ein aus der Maus stammende gegen humane Nuklei gerichteter Primärantikörper ausgesucht. Um die Kreuzreaktionen eines sekundären Anti-Maus Antikörpers mit dem eingewachsenem Mausgewebe zu vermeiden, wurde zur Markierung des Primärantikörpers ein Mouse-to-Mouse Detection System (Chemicon, Temecula, Kanada) gewählt. Dieses System enthält einen Sekundärantikörper, der spezifisch mit dem F<sub>c</sub>-Fragment des Primärantikörpers reagiert. Zuvor werden die unspezifischen Bindungen mit Pre-Antibody Blocking Solution blockiert.

Um unterschiedliche Markierungen auf demselben Glasobjektträger anfertigen zu können, wurden die einzelnen Schnitte mit einem Fettstift (DakoCytomation GmbH, Hamburg, Deutschland) abgegrenzt. Als Kontrolle dienten Schnitte, welche nicht mit

Primärantikörpern sondern nur mit dem Sekundärantikörper inkubiert wurden. Zuerst erfolgte die Rehydrierung der Schnitte für 5 Minuten in Tris-Puffer (Tris-Buffer-Saline, TBS) mit 0,01 % Triton X-100. Um die Inaktivierung der endogenen Peroxidasen zu erreichen, wurden die Proben in 100 % Methanol unter Beimischung von 30 % Wasserstoffperoxyd 30 Minuten fixiert. Dadurch wurde die Spezifität der immunhistochemischen Reaktion gesteigert. Dann wurde die Markierung nach dem von der Firma Chemicon vorgegebenen Protokoll durchgeführt:

- Abblocken der Schnitte mit Pre-Antibody Blocking Solution für 120 min.
- Zweimal jeweils 3 min mit TBS spülen.
- Inkubieren mit dem aus der Maus stammenden monoklonalen Antikörper gegen humane Zellkerne für 60 min.
- Zweimal jeweils 3 min mit TBS spülen.
- Abblocken mit Post-antibody Blocking Solution für 10 min.
- Zweimal jeweils 3 min mit TBS spülen.
- Inkubieren mit Poly-HRP-Anti-Mouse/Rabbit IgG für 10 min.
- Zweimal jeweils 3 min mit TBS spülen.
- Auftragen von Aminoethylcarbazol/Diaminobenzidin (AEC/DAB) für 10 min.
- Mit destilliertem Wasser spülen.
- Gegenfärbung mit Mayer's Hämalaun.

Danach wurden die Präparate in aufsteigender Alkoholreihe entwässert und eingedeckt.

#### 2.5.2.2. Immunfluoreszenzmarkierung mit Anti- $\beta$ -2-Mikroglobulin

$\beta$ -2-Mikroglobulin ist ein Teil des HLA-Klasse-I-Moleküls (Human Leucocyte Antigen System). Da diese Antigene humanspezifisch sind, wurde als nächstes ein Primärantikörper gegen  $\beta$ -2-Mikroglobulin gewählt.

Wie im Punkt 2.5.2.1. beschrieben wurden die einzelnen Schnitte mit einem Fettstift abgegrenzt und danach in 100 % Methanol bei -20 °C für 8 Minuten fixiert. Nachfolgend wurde der Blockierungsschritt mit 5 % Ziegenserum in PBS über Nacht durchgeführt. Dadurch wurden die geladenen Gruppen der Proteine abgesättigt, um so unspezifische Bindungen der Primärantikörper zu minimieren. Danach folgte das Aufbringen des Primärantikörpers gegen  $\beta$ -2-Mikroglobulin. Dieser vom Kaninchen

stammende polyklonale Antikörper wurde in der Verdünnung 1:400 auf die jeweiligen Felder aufgebracht und 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem erneuten Waschen der Glasobjektträger in PBS mit Tween wurden die Proben mit dem Sekundärantikörper 60 Minuten inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde der highly cross-adsorbed Anti-Kaninchen-Antikörper in der Verdünnung 1:200 verwendet, der mit Alexa Fluor 488 konjugiert war. Es folgte ein erneutes Waschen der Präparate in PBS. Als letzter Schritt wurde die Kernmarkierung mit DAPI in einer Verdünnung von 1:10.000 durchgeführt. Dieser Schritt erleichterte zum einen das Auffinden der Schnitte unter dem Mikroskop leichter, zum anderen diente er als Marker für die Kontrollfelder, auf denen nur Sekundärantikörper aufgetragen wurden und wo kein positives Signal zu erwarten war. Es folgte erneut ein Waschschritt. Nach Abklopfen der Flüssigkeit wurden die Glasobjektträger mit einem wässrigen Einbettmedium und Deckgläschen eingedeckt. Alle Inkubationsschritte erfolgten in einer dunklen Feuchtkammer. Im Folgenden sind die einzelnen Schritte der Immunfluoreszenzmarkierung beschrieben:

- 5 min in PBS rehydrieren,
- 8 min in 100 % Methanol bei -20 °C fixieren,
- 5 min in PBS und Tween (PBS+Tween) waschen,
- über Nacht bei 4 °C mit Ziegen Serum abblocken,
- 60 min mit Primärantikörper inkubieren,
- 3x5 min in PBS+Tween waschen,
- 60 min mit Sekundärantikörper inkubieren,
- 3x5 min in PBS+Tween waschen,
- 1 min mit DAPI inkubieren,
- 5 min in Leitungswasser waschen,
- Eindecken.

#### 2.5.2.3. Immunhistochemische Markierung mit HLA-1 Antikörpern

Nach der Abtarnung der Schnitte mit einem Fettstift und deren Fixierung in 100 % Methanol mit Zugabe des dreißigprozentigen Wasserstoffperoxyds, wurde die Blockierung mit 5 % Pferdeserum in PBS durchgeführt. Danach wurde der aus der Ratte stammende Primärantikörper gegen HLA-1 der Firma Dunn Labortechnik (Asbach, Deutschland) in der Verdünnung 1:25 aufgetragen. Nach Waschen der Proben in

PBS mit Tween wurde der aus dem Kaninchen gewonnene biotinylierte Sekundärantikörper gegen Ratten in einer Konzentration 1:200 aufgetragen. Die Primär-Sekundär-Antikörperkomplexe wurden mit Hilfe von dem Vectastain ABC-Kit Elite nachgewiesen. Die Biotin-Komponente des Sekundärantikörpers hat eine hohe Affinität zum Avidin-Biotin-Komplex, welcher die Nachweissubstanz Diaminobenzidin (DAB) als Substrat in eine unlösliche vernetzte Form überführt. Entsprechend der Herstellerangaben wurde die DAB-Lösung in destiliertem Wasser verdünnt und mit einer Pufferlösung und einem Nickelkomplex versetzt. Der Nickelkomplex amplifiziert die Immunreaktion zusätzlich und verleiht den Markierungen eine braun-violette Farbtonung. Die Gegenfärbung wurde mit Mayer's Hämalaun durchgeführt. Nach Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe wie bereits beschrieben wurden die Präparate mit DPX eingedeckt. Im Folgenden sind die einzelnen Schritte zur immunhistochemischen Markierung zusammengefasst:

- 5 min in PBS rehydrieren,
- 30 min in 100 % Methanol mit 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (in 100 ml Methanol 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dazugeben) fixieren,
- 5 min in PBS und Tween (PBS+Tween) waschen,
- 60 min mit Pferdeserum abblocken,
- Über Nacht bei 4 °C mit Primärantikörper inkubieren,
- 3x5 min in PBS+Tween waschen,
- 60 min mit Sekundärantikörper inkubieren,
- 3x5 min in PBS+Tween waschen,
- Auftragen des ABC-Komplexes für 30 min,
- 3x5 min in PBS+Tween waschen,
- 4 min mit DAB inkubieren,
- 5 min in Leitungswasser waschen,
- Gegenfärben und Eindecken.

### 2.5.3. Immunhistochemische Auswertung der Proben

Nach der Markierung der Präparate mit dem Mouse-to-Mouse Detection System und HLA-1 Antikörper erfolgte die lichtmikroskopische Untersuchung. Nach der Immunofluoreszenzmarkierung wurden die Proben mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops beurteilt. Die immunhistochemische Auswertung wurde nach der Markierung der

Präparate mit HLA-1 Antikörpern durchgeführt. Die Beurteilung erfolgte nach dem „Ja / nein“ Prinzip. Bei Vorhandensein eines Signals wurde das Präparat als positiv beurteilt. Die Ergebnisse wurden mithilfe der Software Microsoft Excel dargestellt.

## 2.6. Molekularbiologische Untersuchungen

Die molekularbiologischen Untersuchungen der jeweils erhaltenen Leitschienehälften sowie der explantierten Organe wurden im Rahmen einer parallel durchgeführten Arbeit innerhalb unserer Arbeitsgruppe behandelt.

## 2.7. Substanzen, Materialien und Geräte

In den folgenden Tabellen sind die verwendeten Antikörper, Chemikalien und Reagenzien, Pharmazeutika, Materialien und Geräte mit Typen- und Herstellerbezeichnungen aufgeführt.

Antigen	Antikörper	Verdünnung	Spezies	Hersteller
Human nuclei	MAB1281	1:20	Maus	Chemicon, Kanada
B-2-Microglobulin	Ab15976	1:400	Kaninchen	Biozol, Deutschland
HLA-1	LO-HLA-1	1:25	Ratte	Dunn, Deutschland
Alexa Fluor 488 highly cross-adsorbed Anti-rabbit IgG	A11034	1:200	Ziege	Molecular Probes, USA
Biotinylated anti-rat IgG	BA-4001	1:200	Kaninchen	Vector Laboratories, USA

Tab. 1 Verwendete Antikörper gegen verschiedene Antigene mit spezifischer Bezeichnung, Verdünnung, Herkunftsspezies und Hersteller

<b>Chemikalien und Reagenzien</b>	<b>Hersteller</b>
D-MEM	Gibco / Invitrogen, USA
MSCGM	Cambrex, USA
D-PBS	Gibco / Invitrogen, USA
FBS	Sigma-Aldrich, USA
Penicillin/Streptomycin	Gibco / Invitrogen, USA
Sodiumpyruvat	Sigma-Aldrich, USA
Formaldehyd 4% gepuffert	Microcos GmbH
Methanol pro analysi	Merck, Deutschland
70 % Ethanol	Klinikapotheke
Trypanblau	Gibco
Trypsin/EDTA (10X)	Gibco
Tissue Freezing Medium	Jung, Deutschland
Äthyldiamintetraacetat	Merck, Deutschland
Ethanol pro analysi	Merck, Deutschland
Sucrose	Merck, Deutschland
Wasserstoffperoxyd	Merck, Deutschland
Xylol	Merck, Deutschland
Mayer's Hämalun	Merck, Deutschland
Aceton	Merck, Deutschland
Benzoylperoxyd	Merck, Deutschland
Methylmetacrylat	Merck, Deutschland
Plastoid N	Fluka, Schweiz
Pferdeserum	Sigma, Deutschland
Vectastein ABC-Kit	Vector, USA
Peroxidase Substrate Kit DAB	Vector, USA
Toluidinblau	Sigma, Deutschland
Basisches Fuchsin	Chroma, Deutschland
Isotone Kochsalzlösung 0,9 %	Braun, Deutschland

Tab. 2 Übersicht über die verwendeten Chemikalien und Reagenzien mit Angabe des Herstellers

Geräte	Hersteller
Autoklav, Zirbus LTA400	Apparate und Maschinenbau GmbH, Deutschland
Bildanalysesystem, KS 400 Version 3.0	Zeiss, Deutschland
Brutschrank IG 150	Jouan, Frankreich
Digitalkamera	Sony, Japan
Digitalkamera	Zeiss, Deutschland
Laborwaage Typ 770	Kern, Deutschland
Mikrobiologische Werkbank Biohit	Antares, Deutschland
Mikroskop Axiovert S 100	Zeiss, Deutschland
Mikroskop Axioskop 2	Zeiss, Deutschland
Mikroskop Axiophot	Zeiss, Deutschland
Pipettierhilfe Pipettus akku	Hirschmann, Deutschland
Schüttler Typ VM4	CAT, Deutschland
Zentrifuge CT 422	Jouan, Frankreich
Neubauer-Zählkammer	Brand, Deutschland
Schlauchpumpe IPC 8	Ismatec, Deutschland
Gradient-Container	Minucells, Deutschland
Schlauch-Kit	Minucells, Deutschland
Schlauchklemme	Novodirect, Deutschland
Schraubkappen	Minucells, Deutschland
Sterilfilter	Nalgene, USA
Exsikator	Schott, Deutschland
Polycut	Reichert-Jung, Deutschland
Innenlochsäge SP 1600	Leica, Deutschland
Kryostat Vacutome HM 200 OM	Microm, Deutschland
Datenverarbeitungsprogramm Statview®	SAS Institute, USA

Tab. 3 Übersicht über die verwendeten Geräte mit der Typenbezeichnung und des Herstellers

<b>Materialien</b>	<b>Hersteller</b>
Kulturflasche T-75	Nunc, USA
Multischale 48-Well	Nunc, USA
Serologische Pipetten 2ml, 5ml, 10ml, 25ml	Sarstedt, Deutschland
Pasteurpipetten	Wagner und Kunz, Deutschland
Superfrost®-Glasobjektträger	Menzel-Gläser, Deutschland
Deckgläser	Menzel-Gläser, Deutschland
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Deutschland
Petrischalen	Sarstedt, Deutschland
Pipettenspitzen D10, D200, D1000	Gilson, USA
Fettstift	Dako, Deutschland
Eindeckmedium DPX	Sigma-Aldrich, USA
Eindeckmedium	Biomeda, Kanada
Reagenzröhren 50ml, 15ml	Sarstedt, Deutschland
Kryostatklängen R35	Feather, Japan
Scheren klein, groß	Aeskulap, Deutschland
Pinzetten anatomische, chirurgische	Aeskulap, Deutschland
Nadelhalter	Aeskulap, Deutschland
Vicryl 3/0 SH	Ethicon Nahtmaterial, Deutschland
Sterican Microlance 0,55*25 Nr.17	Braun, Deutschland
Omnifix 1ml Spritzen	Braun, Deutschland
QuadriPerm®-Schallen	Greiner BioOne, Deutschland
Leukosilk	BSN medical GmbH, Deutschland

Tab. 4 Übersicht der verwendeten Materialien mit der Herstellerangabe

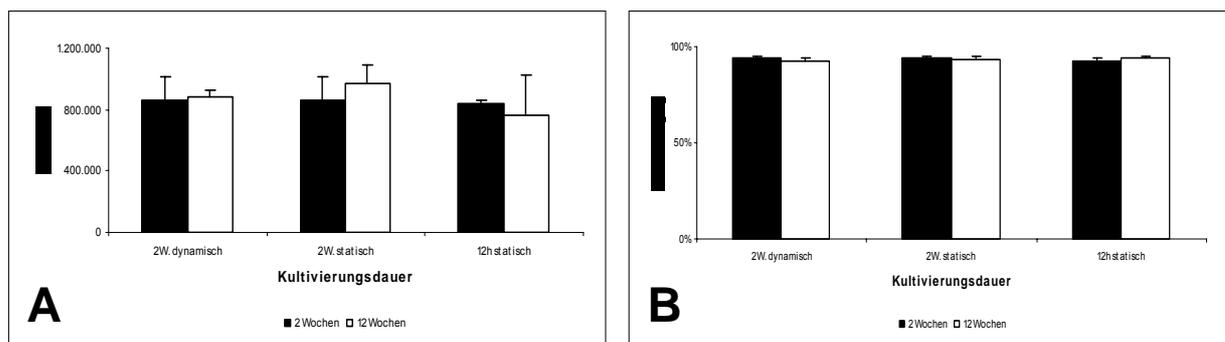
<b>Pharmazeutika</b>	<b>Hersteller</b>
Tramundin®100 Injektionslösung	Mundipharma, Deutschland
Domitor (1mg/ml)	Orion Corporation, Finland
Dormicum (5mg/ml)	Roche, Schweiz
Naloxon Inresa 0,4mg/ml	Inresa Arzneimittel GmbH, Deutschland
Antisedan 5mg/ml	Pfizer, Deutschland
Anexate 0,5mg/5ml	Roche, Schweiz
Fentanyl 0,5mg/5ml	Jansen GmbH, Deutschland

Tab. 5 Übersicht über die verwendete Pharmazeutika mit Angabe des Herstellers

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Effizienz der Leitschienenbesiedelung

Um den prozentuellen Anteil der adhärennten Zellen auf den Leitschienen zu bestimmen, wurde die Besiedlungseffizienz ermittelt. Der Mittelwert nach Besiedelung betrug 860.000 Zellen pro Leitschiene, was einer Besiedlungseffizienz von 93 % entsprach. (Abb.8) Nach statistischer Analyse wurden keine signifikanten Unterschiede bei der Besiedlungseffizienz zwischen den Leitschienen in der drei verschiedenen Kultivierungsgruppen (2 Wochen dynamisch, 2 Wochen und 12 Stunden statisch) festgestellt. Es gab auch keine signifikanten Unterschiede bei der Besiedelung der Leitschienen für die beiden Implantationszeiträume.



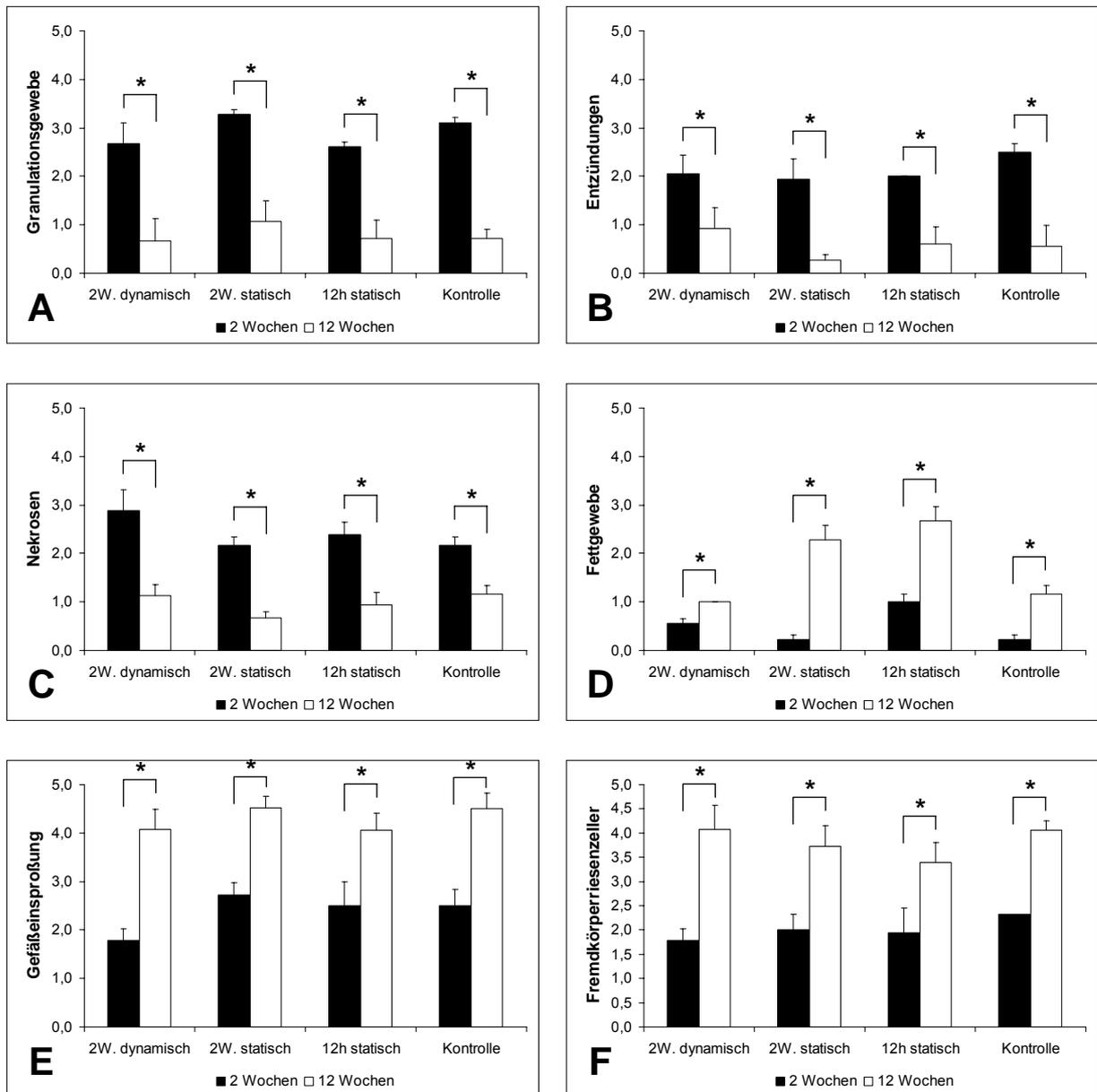
**Abb. 8** Besiedlungseffizienz der Leitschienenbesiedelung: A – die mittlere Zahl der adhärennten Zellen auf den Leitschienen nach der Besiedelung; B – prozentueller Anteil der auf den Leitschienen adhärennten Zellen.

#### 3.2. Histologische Auswertung der Leitschienen

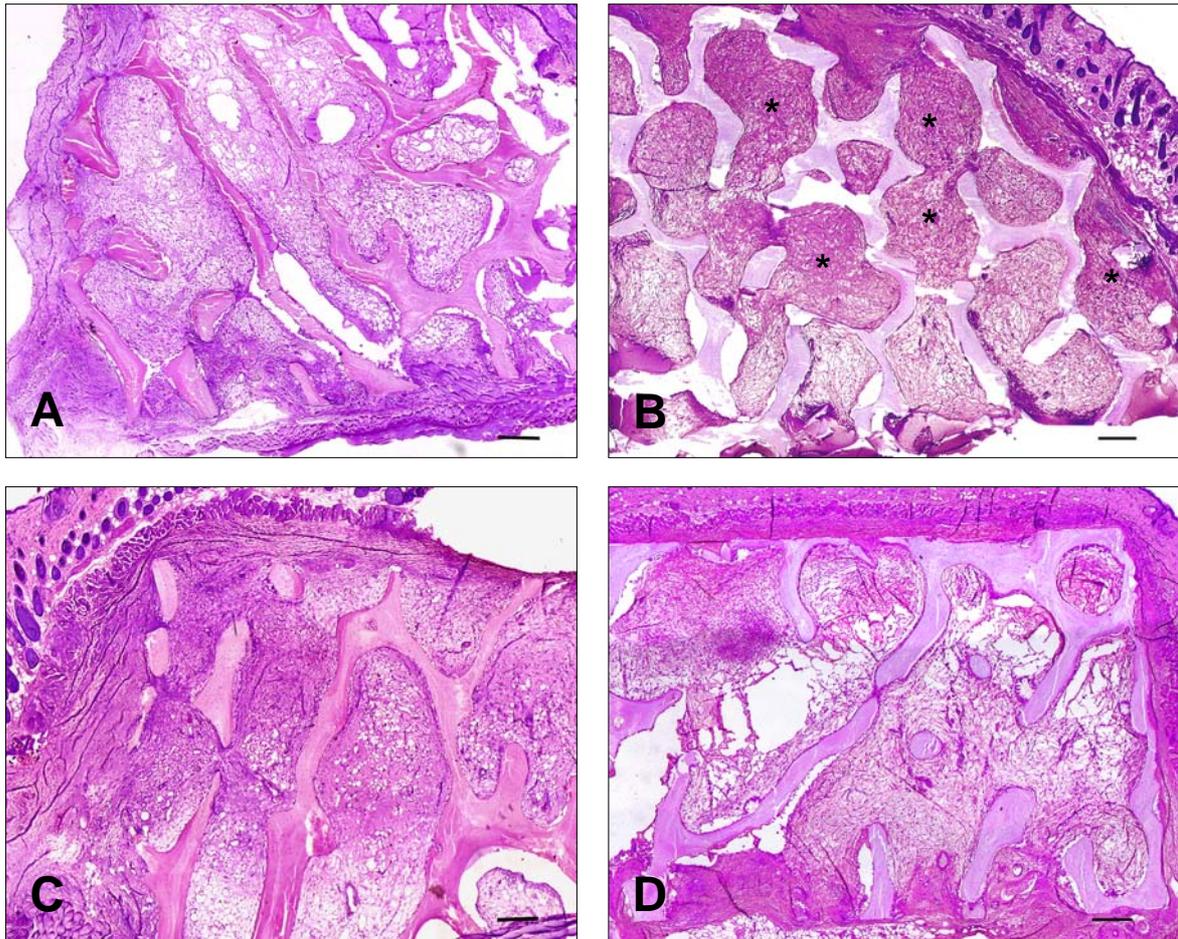
##### 3.2.1. Granulationsgewebe

2 Wochen nach Implantation kam es in allen untersuchten Gruppen unabhängig von der Kultivierungsart und -dauer zu einem Einwachsen des umgebenden Bindegewebes in die Peripherie der Leitschiene. (Abb. 10,B) Dabei handelte es sich um Granulationsgewebe, das aus neu gebildeten Kapillaren, lockerem Bindegewebe mit Fibrozyten und Fibroblasten und Entzündungszellen bestand. Die Entzündungszellen des Granulationsgewebes waren Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen. Nach 12 Wochen Beobachtungszeit waren die ganzen Leitschienen mit dem Bindegewebe bzw. Fettgewebe ausgefüllt. (Abb. 11, B) Das Granulationsgewebe nahm dabei signi-

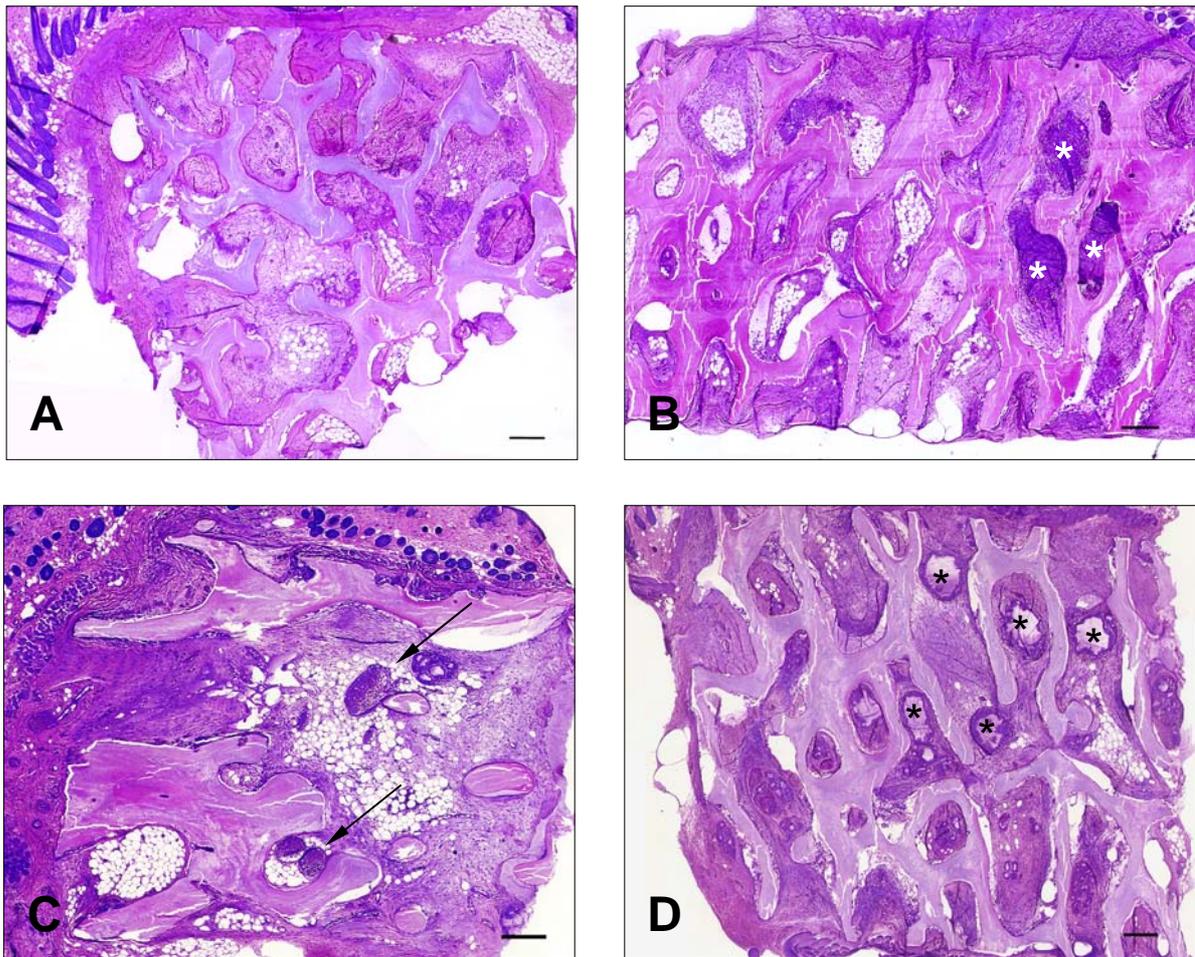
fikant ab. (Abb. 9, A) Innerhalb der untersuchten Gruppen konnten signifikante Unterschiede zu diesem Zeitpunkt ebenfalls nicht nachgewiesen werden.



**Abb. 9** Ergebnisse der histologischen Auswertung der explantierten Konstrukte (\* -  $p < 0,01$ ): A – Granulationsgewebe; B – Entzündungen; C – Nekrosen; D – Fettgewebe; E – Gefäßinsproßungen; F – Fremdkörperriesenzellen. Es wurde eine signifikante Abnahme der Entzündungsreaktion, des Granulationsgewebes und Nekrosen nach zwölf Wochen Implantationsdauer festgestellt. Des Weiteren kam es im gleichen Zeitraum zu einer signifikanten Zunahme an Fettgewebe, Fremdkörperriesenzellen und Vaskularisierung.



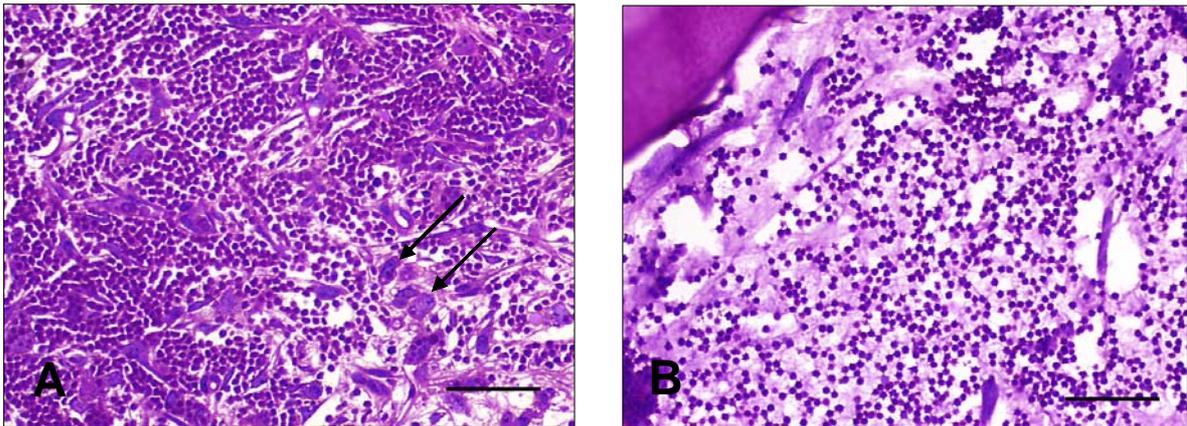
**Abb. 10** Konstrukte nach zwei Wochen Implantationsdauer: A – zwei Wochen dynamisch kultiviertes Tubobone; B – zwei Wochen statisch kultiviertes Tubobone mit gut sichtbarem Granulationsgewebe in der Peripherie der Leitschiene (\*); C – zwölf Stunden statisch kultiviertes Tubobone. In der Mitte der Leitschiene sind einzelne Fettzellen sichtbar; D – Kontrolleitschiene. Maßstabsbalken - 300 $\mu$ m.



**Abb. 11** Konstrukte nach zwölf Wochen Implantationsdauer: A – zwei Wochen dynamisch kultiviertes Tutobone; nur einzelne Areale sind mit dem Granulationsgewebe (\*) ausgefüllt; B – zwei Wochen statisch kultiviertes Tutobone; C – zwölf Stunden statisch kultiviertes Tutobone, im Fettgewebe sind gut ausgebildete Blutgefäße (Pfeile) sichtbar; D – Kontrollleitschiene, durch die Demarkationsgrenze vom umliegenden Gewebe abgetrennte Nekrosen (\*). Maßstabsbalken - 300µm.

### 3.2.2. Entzündungen

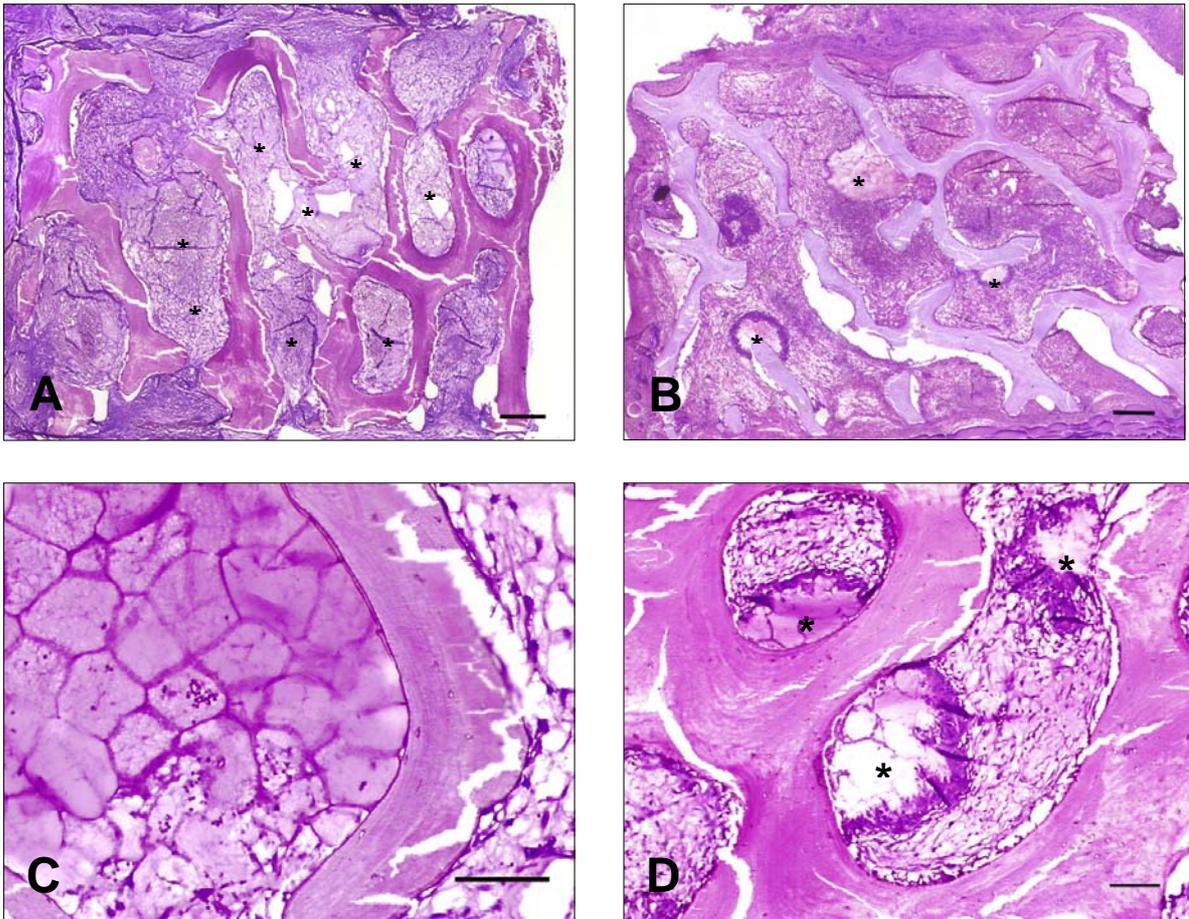
Bereits 2 Wochen nach Implantation konnten in allen untersuchten Leitschienen gleichermaßen Entzündungszellen beobachtet werden. (Abb. 12, A, B) Dies stand in engem Zusammenhang mit dem nachgewiesenen Granulationsgewebe und den Nekrosen, die die Migration von Monozyten und Granulozyten förderten. Nach 12 Wochen Implantationsdauer kam es gleichermaßen im Granulationsgewebe und nekrotischem Gewebe zu einer signifikanten Abnahme der Entzündungszellen. (Abb. 9, B) Innerhalb der unterschiedlichen Kultivierungsformen konnten weder nach 2 noch nach 12 Wochen signifikante Unterschiede nachgewiesen werden.



**Abb. 12** Entzündungen: A – Entzündungszellen im Granulationsgewebe, einzelne Fibroblasten sind zwischen den Entzündungszellen (Pfeil) bei einer Kontrollleitschiene nach 2 Wochen Implantationsdauer zu sehen; B – Entzündungszellen in nekrotischem Gewebe bei einem 2 Wochen statisch kultivierten Tutobone nach 2 Wochen Implantationsdauer; Maßstabsbalken - 50µm.

### 3.2.3. Nekrosen

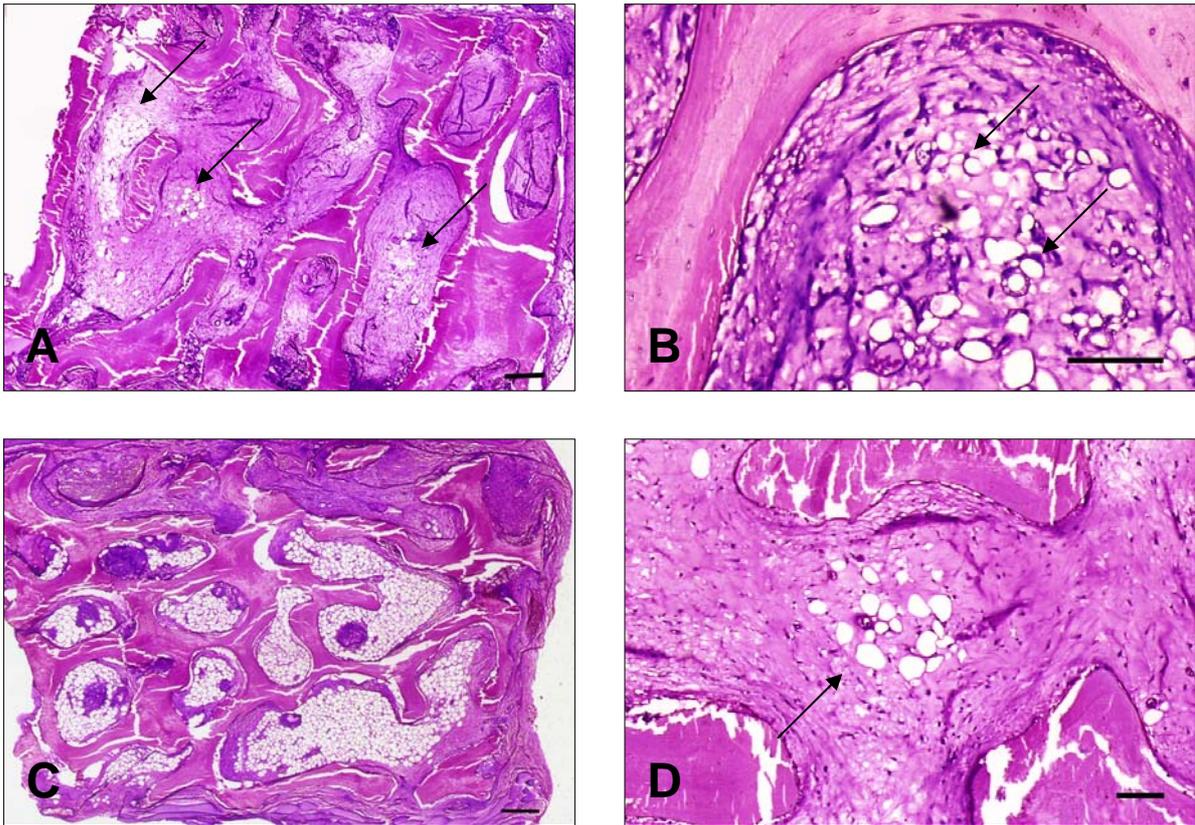
Nekrosen konnten nach 2 Wochen Implantationsdauer unabhängig von der Kultivierungsart und –dauer innerhalb der gesamten Leitschiene nachgewiesen werden. (Abb. 13, A, B) Bei den meisten Leitschienen war ein fließender Übergang zwischen den Nekrosen und umliegendem Gewebe zu beobachten. (Abb. 13, C) Bei 4 Leitschienen jedoch zeichneten sich die Nekrosen durch eine Demarkationsgrenze vom umgebenden Gewebe deutlich ab. (Abb. 13, D) Die Leitschienen mit 2 wöchiger dynamischer Kultivierung zeigten tendenziell mehr Nekrosen im Vergleich zu den anderen Gruppen, die aber nicht signifikant war. (Abb. 9, C) Nach 12 Wochen nahm die Anzahl und Fläche der Nekrosen in allen Gruppen signifikant ab. (Abb. 9, C) Auch zu diesem Zeitpunkt bestand kein Unterschied zwischen den untersuchten Kultivierungsarten und –dauer. Zu diesem Zeitpunkt bestand bei allen Leitschienen eine eindeutige Abgrenzbarkeit zwischen den Nekrosen und umliegendem Gewebe. (Abb. 11, D)



**Abb. 13** Nekrosen: A, B – 2 Wochen statisch kultivierte Tubobone nach 2 Wochen Implantationsdauer; A, C – eine flächige Nekrose (\*) ohne ausgebildeter Demarkationsgrenze; B, D – die Nekrosen (\*) sind durch die Demarkationsgrenze vom Bindegewebe abgetrennt. Maßstabsbalken: A, B, – 300 $\mu$ m; C, D, – 100 $\mu$ m.

#### 3.2.4. Fettgewebe

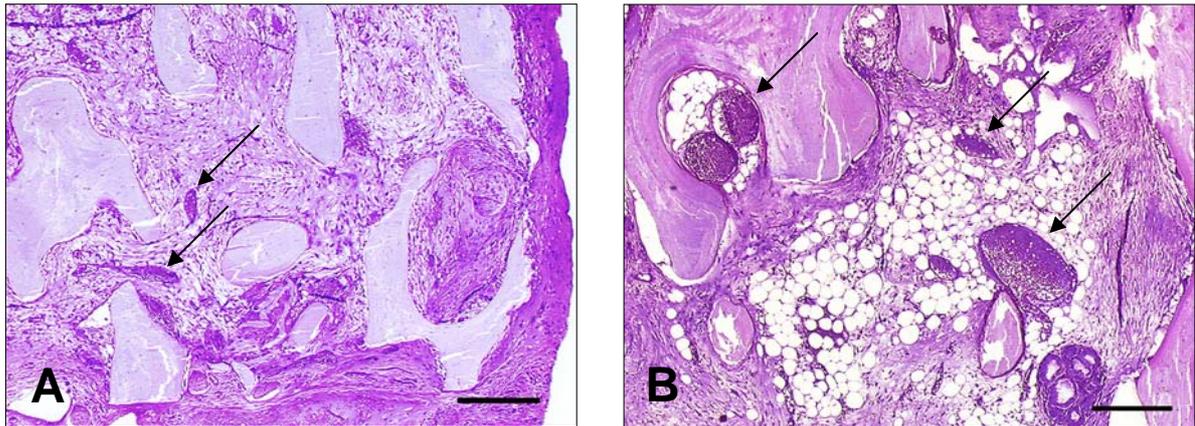
Nach 2 Wochen Implantationsdauer konnten allenfalls einzelne Fettzellen in den Leitschienen beobachtet werden. (Abb. 10, C; 14, A, D) Ein Zusammenhang zwischen Kultivierungsart und –dauer und dem Auftreten von Fettzellen bestand nicht. Nach 12 Wochen Implantationsdauer kam es zur signifikanten Zunahme der Fettzellen in den Leitschienen ausgenommen die Gruppe mit 2 Wochen dynamischer Kultivierung. (Abb. 9, D) Man konnte zwei Verteilungsmuster innerhalb dieser Gruppe feststellen. Zum einen wurden kleine Gruppen von Fettzellen über die Leitschiene verteilt beobachtet. (Abb. 14, B, C) Zum anderen war das Fettgewebe über die ganze Leitschiene flächig verteilt, was bei den zwei Wochen und zwölf Stunden statisch kultivierten Leitschienen am meisten vorkam. (Abb. 14,D)



**Abb. 14** Fettgewebe: A, C, D – Verteilung der Fettzellen und Fettgewebes bei 12 Stunden statisch kultiviertem Tubobone nach 12 Wochen Implantationsdauer; B – Fettzellen in einer Leitschiene nach 12 Stunden statischer Kultivierung und zwei Wochen Implantationsdauer; A, B, D – einzelne Fettgewebezellen (Pfeile) im Bindegewebe sichtbar; C – Fettgewebe ist über die gesamte Leitschienenfläche verteilt. Maßstabsbalken: A, B – 300 $\mu$ m; C – 50 $\mu$ m; D – 100 $\mu$ m.

### 3.2.5. Blutgefäße

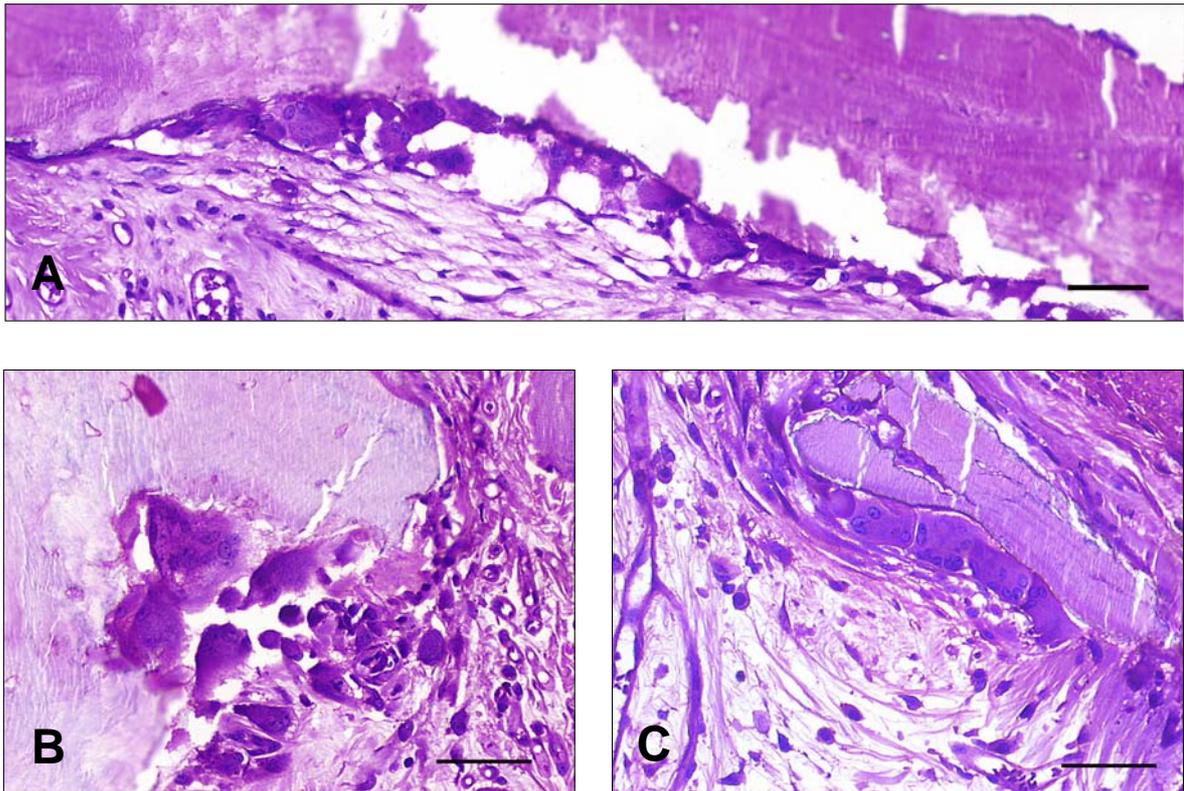
Nach 2 Wochen Implantationsdauer konnte eine große Anzahl an Kapillaren, aber auch einzelne Arteriolen und Venolen in der Peripherie der Leitschiene nachgewiesen werden. (Abb. 15, A) Zur signifikanten Zunahme der Blutgefäße kam es in allen Gruppen nach 12 Wochen Implantationsdauer. (Abb. 9, E) Sowohl Kapillaren, als auch Arteriolen und Venolen waren über die gesamte Fläche der Leitschiene verteilt (Abb. 11, C; 15, B). Tendenziell wurden mehr Blutgefäße bei 2 Wochen statisch kultivierten und Kontrollleitschienen beobachtet. (Abb. 9, E) Der Unterschied war jedoch nicht signifikant.



**Abb. 15** Blutgefäße: A – eine Leitschiene nach 12 Stunden statischer Kultivierung und 2 Wochen Implantationsdauer, einzelne Blutgefäße (Pfeile) am Rande der Leitschiene im lockerem Bindegewebe; B – eine Leitschiene nach 12 Stunden statischer Kultivierung und 12 Wochen Implantationsdauer, gut vaskularisiertes Binde- und Fettgewebe (Pfeile – Blutgefäße). Maßstabsbalken: – 300µm.

### 3.2.6. Fremdkörperriesenzellen

Fremdkörperriesenzellen konnten bereits nach 2 Wochen Implantationsdauer in der Peripherie der Leitschienen beobachtet werden. Die Zellen hafteten an der Leitschienenoberfläche und formierten kleine Gruppen, die aus drei bis fünf Zellen bestanden. Tendenziell wurden mehr Fremdkörperriesenzellen in den Kontrollleitschienen und weniger in den 2 Wochen dynamisch kultivierten Leitschienen beobachtet, die Differenz war jedoch nicht signifikant. (Abb. 9, F) Nach zwölf Wochen Implantationsdauer nahm die Anzahl der Fremdkörperriesenzellen signifikant zu. (Abb. 9, F) Die meisten Fremdkörperriesenzellen hafteten sich entlang der Tutobone an. (Abb. 16, A, C) Es konnten aber auch die Zellen im eingewachsenen Bindegewebe festgestellt werden. In einigen Fällen wurde die Resorption der Leitschiene durch die Fremdkörperriesenzellen beobachtet. (Abb. 16, B) Nach 12 Stunden statischer Kultivierung wurden die wenigsten Fremdkörperriesenzellen festgestellt, was jedoch im Vergleich zu den anderen Gruppen nicht signifikant war.



**Abb. 16** Fremdkörperriesenzellen: A – eine Leitschiene nach 2 Wochen dynamischer Kultivierung und 12 Wochen Implantationsdauer; B, C – Tubobone nach 2 Wochen statischer Kultivierung und 12 Wochen Implantationsdauer; B – Resorption der Leitschiene durch die Fremdkörperriesenzellen. Maßstabsbalken – 50µm.

### 3.3. Immunhistochemische Auswertung der Leitschienen

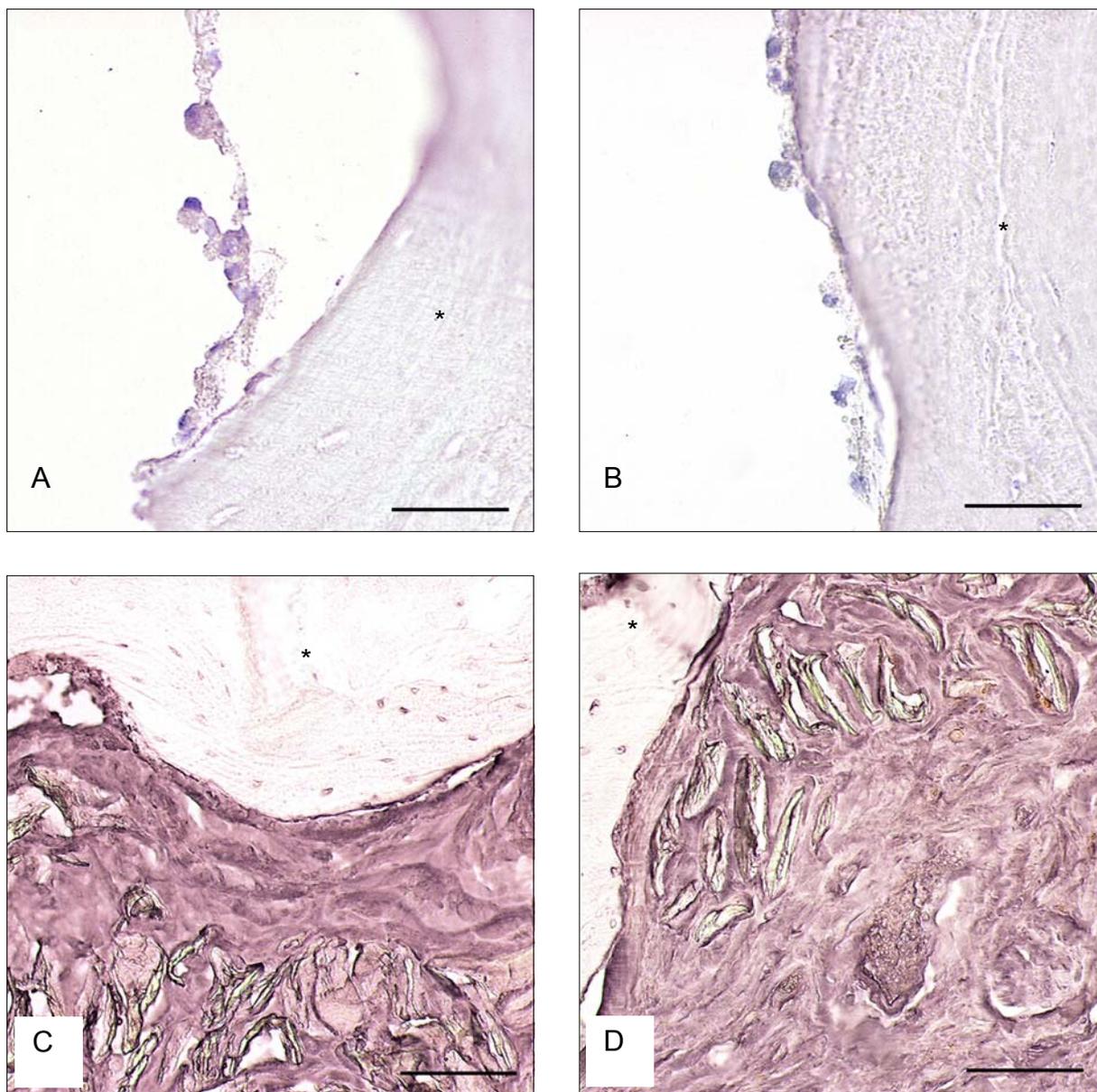
#### 3.3.1. Mouse-to-mouse Detection System

Um die Antikörperbindung in den besiedelten Konstrukten nach der Explantation beurteilen zu können, wurden zuerst *in vitro* besiedelte Leitschienen ohne Implantation (nur hMSC und Tubobone) und Kontrollleitschienen nach 12 Wochen Implantation markiert. Da der Antikörper gegen die humanen Nuklei gerichtet war, wurde ein Signal in den Zellkernen von hMSC erwartet. Bei dem Vergleich der Schnitte von besiedelten Tubobone mit und ohne Primärantikörper konnte kein Signal festgestellt werden. (Abb. 17, A, B) Bei den Kontrollleitschienen wurde hingegen eine starke Hintergrundmarkierung des Mausegewebes beobachtet, die an der unspezifischen Bindung des sekundären Antikörpers am Mausegewebe und daraus folgenden Ausfall des DAB-Komplexes beruhte. (Abb. 17, C, D) In diesem Fall konnten auch keine Differenzen in der Signalintensität zwischen den Schnitten mit und ohne Primärantikörper

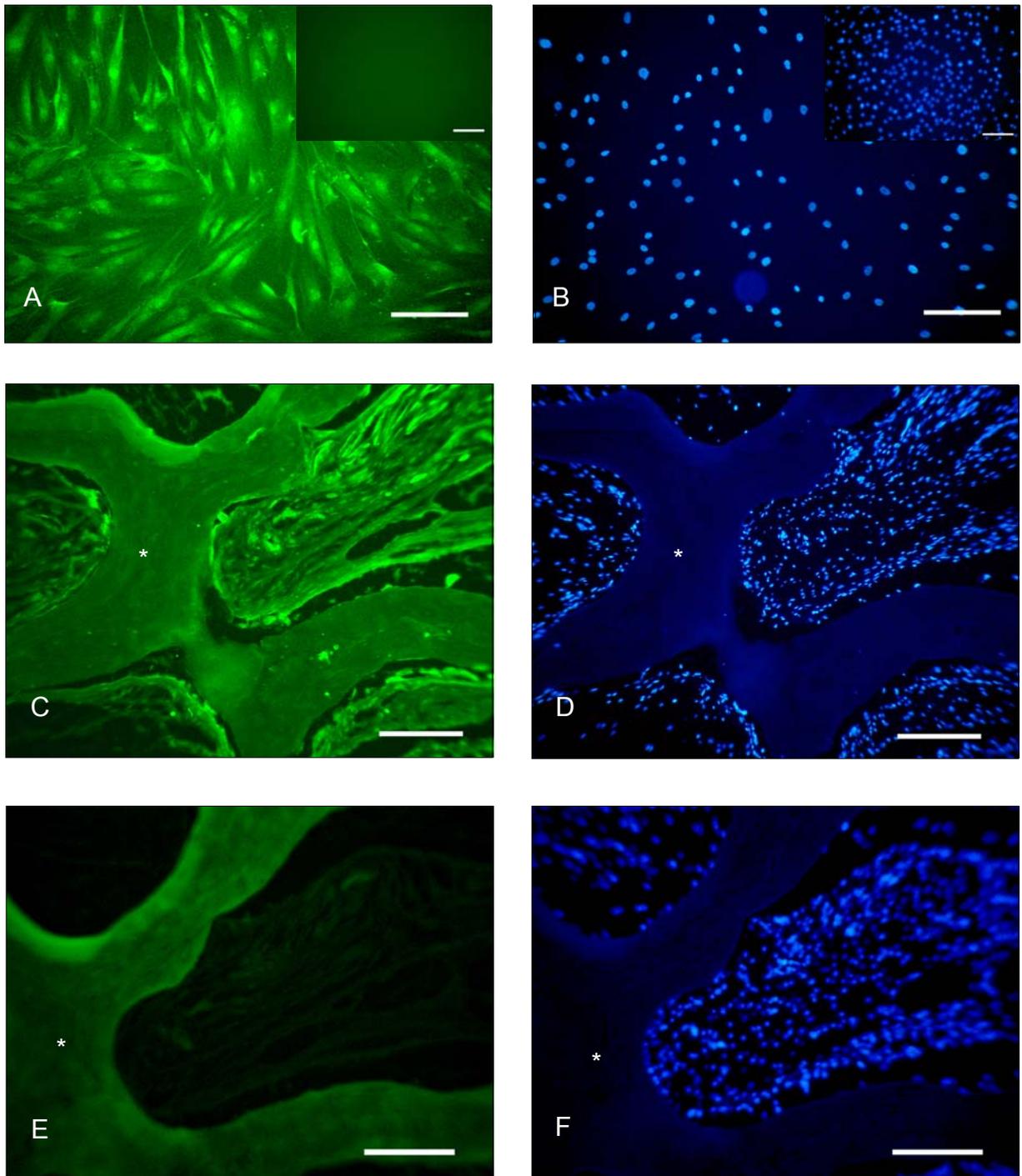
erkannt werden, so das nachfolgende Detektieren von hMSC in besiedelten explantierten Leitschienen als nicht sinnvoll eingestuft wurde. Aus diesem Grund wurden weitere Detektionsmethoden in Erwägung gezogen.

### 3.3.2. Immunofluoreszenz Markierung mit Anti- $\beta$ -2-Mikroglobulin Antikörpern

Im Anschluss wurde ein Antikörper gewählt, der gegen  $\beta$ -2-Mikroglobulin gerichtet war.  $\beta$ -2-Mikroglobulin ist ein Bestandteil von HLA-Klasse-I-Moleküle (Human Leucocyte Antigen System) und ist auf der Zellmembran aller humaner Zellen mit Zellkern vorhanden. Nach der ersten Testreihe auf den mit hMSC besiedelten Objektträgern und in vitro besiedelten Leitschienen ohne Implantation (nur hMSC und Tutobone) konnte ein positives Signal an den mit primärem Anti- $\beta$ -2-Mikroglobulin Antikörpern inkubierten Zellen auf dem Objektträger und auf dem Tutobone festgestellt werden. (Abb.18, A, B) Bei der zweiten Testreihe wurden die Kontrollleitschienen nach 12 Wochen Implantation getestet. Bei der Inkubation ohne Primärantikörper wurde bei den Schnitten erwartungsgemäß auch kein positives Signal detektiert. (Abb. 18, E, F) Nach Inkubation mit dem Primärantikörper konnte jedoch wieder Erwartung ein positives Signal detektiert werden, der auf eine unspezifische Bindung des Anti- $\beta$ -2-Mikroglobulin Antikörpers schließen ließ. (Abb. 18, C, D) Da die unspezifischen Bindungsstellen durch die Verlängerung des Blockierungsschrittes und die Steigerung der Konzentration der Blockierungslösung nicht beseitigt werden konnten, musste ein anderer Antikörper herangezogen werden.



**Abb. 17** Mouse-to-mouse Detektion System: A, B –in vitro besiedelte Leitschiene ohne Implantation (nur hMSC und Tutobone); C, D – explantierte Kontrollleitschienen nach 12 Wochen Implantationsdauer; A, C –ohne Primärantikörper; B, D –mit Primärantikörper; \* - Tutobone; Maßstabbalken – 50µm.



**Abb. 18** Immunofluoreszenzfärbung mit Anti- $\beta$ -2-Mikroglobulin Antikörpern: A, B – hMSC auf Objektträger inkubiert mit Primärantikörper, Insert – Zellen ohne Primärantikörper; C, D, E, F – explantierte Kontrollleitschienen; C, D – mit Primärantikörper; E, F – ohne Primärantikörper; A, C, E – Alexa Fluor 488 (Filtersatz 10); B, D, F – DAPI (Filtersatz 01); \* - Tubone; Maßstabballen – 200 $\mu$ m.

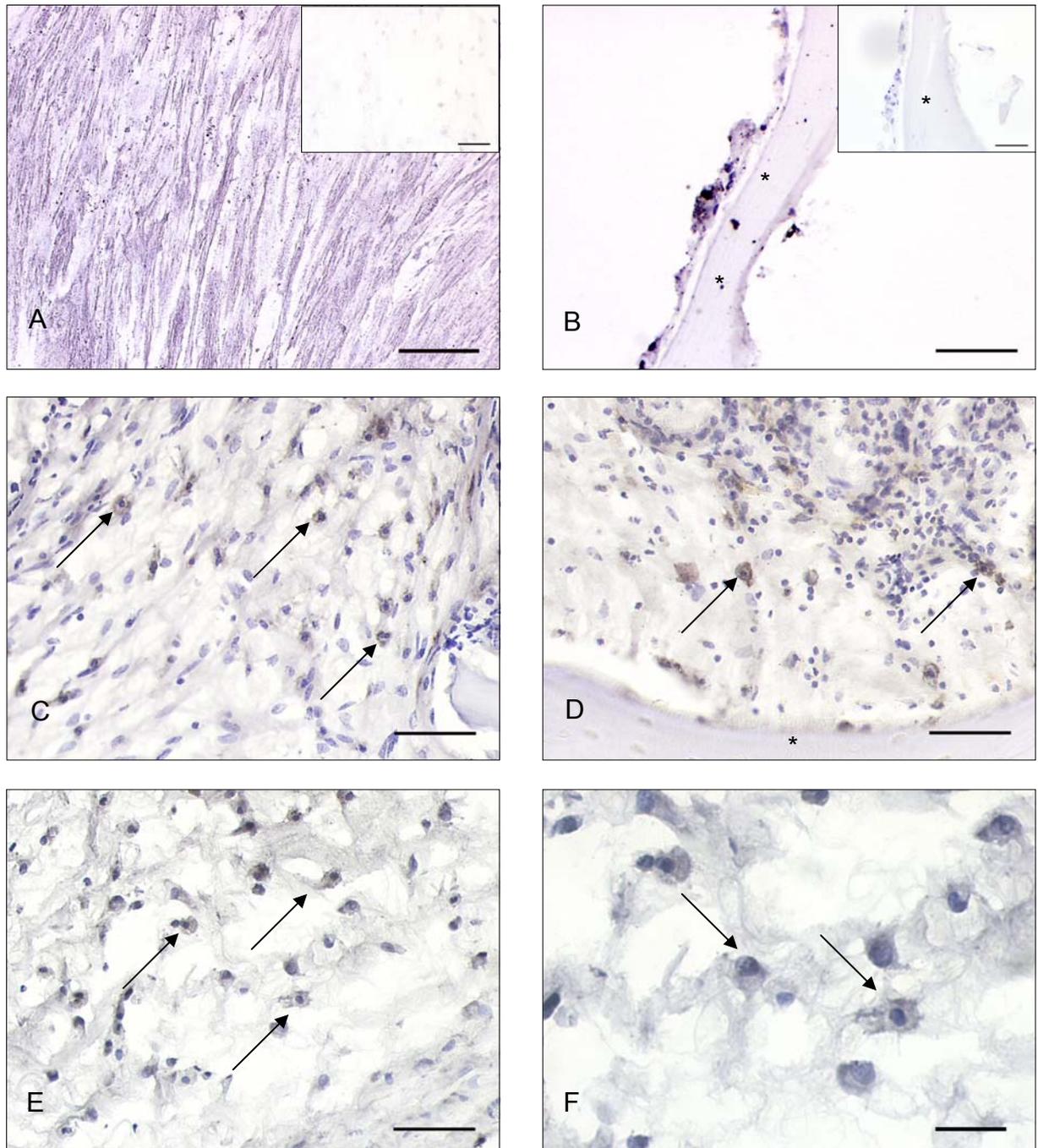
### 3.3.3. Immunhistologische Markierung mit Anti-HLA-1 Antikörper

Die folgenden Markierungen wurden mit dem anti-HLA-1 Antikörper durchgeführt, der gegen die HLA-Klasse-I-Moleküle gerichtet war. Wie in vorangegangenen Versuchen

wurden zuerst die hMSC auf dem Objektträger, explantierte Tutobone aus der verstorbenen Maus und eine explantierte Kontrollleitschiene markiert. Es wurde ein deutliches positives Signal bei den Zellen auf dem Objektträger und Tutobone festgestellt. (Abb.19, A, B) Bei den Zellen ohne Primärantikörper und explantierten Kontrollleitschienen war hingegen kein Signal erkennbar. So konnte ausgeschlossen werden dass der Primär- oder Sekundärantikörper unspezifische Bindungen eingeht. Nach der immunhistologischen Markierung wurden alle explantierten Leitschienen untersucht. Dabei wurden die positiven Signale in jeder Gruppe mit verschiedenen Kultivierungsarten und Implantationsdauer zusammengefasst und in der Tabelle 6 dargestellt. Es konnten nur einzelne Zellen zerstreut im Mausgewebe beobachtet werden. (Abb.19, C – F) Es wurde sowohl ein positives Signal nach 2 als auch nach 12 Wochen bei den besiedelten Leitschienen beobachtet. Die Kultivierungsbedingungen *in vitro* hatten keinen Einfluss auf die Anzahl positiver Befunde *in vivo*.

<b>Implantationsdauer</b> <b>Kultivierungsart</b>	<b>2 Wochen</b>	<b>12 Wochen</b>
<b>2 Wochen dynamisch</b>	1	1
<b>12 Wochen statisch</b>	2	2
<b>12 Stunden statisch</b>	2	1
<b>Kontrollleitschienen</b>	0	0

Tab. 6 Anzahl der positiven Befunde in den Gruppen unter verschiedenen Implantations- und Kultivierungsbedingungen



**Abb. 19** Immunohistologische Färbung mit Anti-HLA-1 Antikörpern: A – mit hMSC inkubierte Objektträger mit Primärantikörper, Insert – im Vergleich hMSC ohne Primärantikörper; B – hMSC besiedeltes Tubone mit Primärantikörper, Insert – ohne Primärantikörper; C – Leitschiene nach 12 Stunden statischer Kultivierung und 2 Wochen Implantationsdauer; D – Leitschiene nach 2 Wochen statischer Kultivierung und 12 Wochen in vivo; E, F – Leitschiene nach 2 Wochen dynamischer Kultivierung und 2 Wochen Implantationsdauer; Pfeil – Zellen mit positiven Signal; \* - Tubone; Maßstab Balken: A – 100µm; B, C, D, E – 50µm; F – 20µm.

## 4. Diskussion

### 4.1. Diskussion der Methodik

#### 4.1.1. Zellen

Die Fähigkeit der hMSC sich aus undifferenzierten Vorläufern zu ausdifferenzierten Zellen zu entwickeln, macht sie für das Tissue Engineering von Knochen besonders interessant. Sie können aus dem Knochenmark gewonnen und leicht in der Zellkultur vermehrt werden, so dass autologe Zellen zur Wiederherstellung des Defektes verwendet werden können. Laut International Society for Cellular Therapy (ISCT) dürfen als mesenchymale Stammzellen nur die Zellen bezeichnet werden, die folgende Kriterien erfüllen (Dominici et al. 2006). Sie müssen auf dem Kunststoff in der Zellkultur adhären und mehrere Antigene, wie CD105, CD73 und CD90 exprimieren. Dabei dürfen sie nicht positiv für die hämatopoetischen Antigene CD45, CD34 und Monozyten-, Makrophagen- und B-ZellMarker sein. Außerdem müssen die Zellen in der Lage sein unter den standardisierten Bedingungen *in vitro* in Adipozyten, Chondroblasten und Osteoblasten zu differenzieren, was anhand spezieller histologischer Färbungen visualisiert werden kann. So wurden für diese Arbeit kommerziell erhältliche Zellen gewählt, die nach etablierten Methoden gewonnen wurden und zu einem großen Anteil hMSC enthalten, was die Protokolle der Fa. Cambrex und die Studien aus unserer Arbeitsgruppe belegen (Schieker et al. 2007, Docheva et al. 2007, Stengele 2004). Im Gegensatz dazu werden in den meisten Studien nicht näher untersuchte Knochenmarkszellen, so genannte BMSC (bone marrow stromal (stem) cells) verwendet, die als Hauptmerkmal die Fähigkeit zur Adhäsion auf dem Kunststoff der Zellkulturflasche zeigen (Kruyt et al. 2007, Huang et al. 2005, Lee et al. 2001b). Die so gewonnenen Zellen stellen jedoch nicht nur morphologisch ein heterogenes Gemisch dar. Sie sind auch in ihrem Differenzierungspotenzial verschieden. Die Untersuchung der Differenzierungsfähigkeit der gewonnenen Zellen ergab, dass nur etwa 30% der Zellen sich in drei verschiedene Zelllinien (adipogen, chondrogen und osteogen) entwickeln können (Muraglia et al. 2000). Die restlichen Zellen konnten osteogen/chondrogen oder nur osteogen differenziert werden. Die mangelnde Charakterisierung der Zellen in verschiedenen Studien erschwert die Vergleichbarkeit der gewonnenen Resultate untereinander.

#### 4.1.2. Leitschienen

Um die dreidimensionale Struktur des natürlichen Knochens nachzuahmen, werden die hMSC auf Leitschienen besiedelt. Bei der Auswahl von Leitschienen sind folgende Eigenschaften zu beachten. Zum einen sollen sie die Anhaftung der Zellen an deren Oberfläche sowie deren Wachstum und Differenzierung begünstigen (Schieker et al. 2006b). Zum anderen sollen sie bioresorbierbar, belastungsstabil und biokompatibel sein sowie geeignete Porosität und Porengröße aufweisen (Yang et al. 2001). Schließlich müssen sie sterilisierbar, lagerungsfähig und implantierbar sein (Olivier et al. 2004).

Es gibt eine Vielzahl von Leitschienen, die grob in folgende Gruppen unterteilt werden können.

##### *Biodegradierbare Polymere*

Natürliche Polymere wie Collagen, Fibrin und Stärke sind biokompatibel und besitzen osteokonduktive Eigenschaften (Salgado et al. 2007, Bensaid et al. 2003, Lee et al. 2001a). Diese Materialien können jedoch nur beschränkt eingesetzt werden, da sie über eine sehr geringe mechanische Stabilität verfügen.

Bei den synthetischen Polymeren wie z.B. Polylactide, Polyglycolyde, Polydioxanone handelt es sich um eine Gruppe von Materialien mit sehr unterschiedlicher chemische Struktur und Eigenschaften. Die mechanische Stabilität ist bei diesen Verbindungen meistens unzureichend, lässt sich aber durch die Verwendung hochmolekularer Polymere erhöhen. Das größere Problem ist jedoch die mäßige Biokompatibilität, da die beim hydrolytischen Abbau freigesetzten sauren Abbauprodukte die Zellen *in vitro* schädigen und *in vivo* Entzündungsreaktionen hervorrufen können. Darüber hinaus verläuft die Degradation nicht durch den langsamen Volumenabbau, wie es biologisch und biomechanisch vorteilhaft wäre, sondern durch einen plötzlichen partikulären Zerfall (Claes et al. 2002).

##### *Kalziumphosphatkeramiken*

Kalziumphosphatkeramiken wie Hydroxylapatite, Trikalziumphosphate oder deren Kombination gleichen in ihrem chemischen Aufbau weitgehend der mineralisierten Knochenmatrix. Die biologische Reaktion jedoch hängt von der Herstellungsart, der Poren- und Leitschienenengröße ab. Sie kann von einer vollständigen bis zu keiner Resorption und von einer knöchernen Integration bis hin zu einer sterilen Entzündung

reichen. Aufgrund ihrer unzureichenden mechanischen Eigenschaften und einer unsicheren Voraussage bei einer Defektheilung wird der breite Einsatz von Kalziumphosphatkeramiken in der Klinik erschwert (Riminucci et al. 2003, Rueger 1998).

### *Knochenmatrizen*

Als Leitschienen werden demineralisierte, anorganische und lösungsmittelkonservierte Knochenmatrizen verwendet.

Demineralisierte Knochenmatrix zeichnet sich durch ihre Osteoinduktivität und Osteokonduktivität aus (Glowacki 2005). Anorganische Knochenmatrizen werden durch Hitzebehandlungen hergestellt, die auf verschiedene Art und Weise durchgeführt werden können. Dadurch werden sie jedoch spröde und die biologische Abbaubarkeit lässt nach (Tadic et al. 2004). Die mechanischen Eigenschaften sind in beiden Fällen unzureichend.

Tutobone von der Firma Tutogen Medical GmbH (Neunkirchen am Brand, Deutschland) sind lösungsmittelkonservierte Leitschienen, die ihre natürliche Knochenstruktur und Biomechanik beibehalten (Tadic et al. 2004). Darüber hinaus bieten sie zahlreiche Vorteile und wurden deshalb für diese Arbeit ausgewählt. Sie sind bereits klinisch zugelassen und werden erfolgreich für die gezielte Knochenregeneration (GBR: Guided Bone Regeneration) und Weichgewebsregeneration (GTR: Guided Tissue Regeneration) in der Implantologie und Parodontologie angewendet (Kurashina et al. 2002). Sie werden aus Rinderspongiosa hergestellt und durchlaufen eine Konservierung, die unter dem Namen Tutoplast®Prozess patentiert wurde. Die Leitschienenkonservierung beinhaltet die Entfettung des Gewebes mit Aceton und die osmotische Zerstörung der Zellen durch Salzlösungen. Die Antigene werden durch Wasserstoffperoxyd entfernt. Danach werden die Leitschienen mit Aceton getrocknet und mit Gammastrahlen sterilisiert. Trotz dieses aufwendigen Herstellungsprozesses können die Unverträglichkeitsreaktionen nicht gänzlich ausgeschlossen werden. So empfiehlt es sich vor der klinischen Anwendung die biologische Toleranz des Patienten gegenüber Kollagen bovinen Ursprungs zu klären. Außerdem ist die Übertragung von Infektionskrankheiten durch bisher unbekannte oder nicht nachweisbare Krankheitserreger nicht mit letzter Sicherheit auszuschließen. Tutobone sind in verschiedenen Formen und als Granulat erhältlich. Die Untersuchungen des Bohrlochmodells an Schweinen und Schafen haben eine knöcherne Integration ohne bindegewebige Abgrenzung der implantierten Leitschienen gezeigt. Die Reste der

eingebrachten Knochenmatrix konnten zwar histologisch nachgewiesen werden, die Defektgröße war jedoch signifikant kleiner im Vergleich zu den leeren Kontrollen und zeigte keine signifikanten mechanischen Unterschiede im Vergleich zum Knochen (Thorwarth et al. 2007, Kessler et al. 2001). In verschiedenen klinischen Studien zeigten die im Tutoplastprozess® hergestellten Knochenmatrizen gute Ergebnisse. Im direkten Vergleich mit den anorganischen Knochenmatrizen wurde signifikant mehr Knochenneubildung bei Lösungsmittelkonservierten Leitschienen beobachtet (Froum et al. 2006). Die Gegenüberstellung von autologem Knochen und Tutoplast®-Matrizen bei der Sinuselevation und Radiusfrakturen mit ausgedehnten Methaphysedefekten zeigten sowohl histologisch als auch radiologisch ähnlich gute Ergebnisse (Rajan et al. 2006, Gapski et al. 2006). Dabei konnte die Operationszeit bei Tutoplast®-Matrizen erheblich reduziert werden.

#### 4.1.3. Beimpfungsmethode

Die in zweidimensionaler Kultur expandierten Zellen müssen effizient auf die Leitschienen aufgebracht werden. Dabei sind die Dichte der auf die Leitschienen aufgetragenen Zellen und deren Vordringen in die Tiefe für die Ausbildung der Zellmatrix und das spätere Einwachsen des Knochengewebes besonders relevant (Olivier et al. 2004, Ishaug et al. 1997). Um die Leitschienen möglichst effizient zu besiedeln, wurde eine sechsstündige Inkubation der Tutobone in FBS mit anschließender Inkubation im MSCGM über Nacht durchgeführt. Durch diesen Vorgang konnten sich die Serumproteine an der Leitschienenoberfläche anlagern, was die Adhäsion der Zellen förderte (Anselme 2000, McFarland et al. 1999). Ferner konnte die Anzahl der luftgefüllten Räume innerhalb der Leitschienen gesenkt werden, die anderenfalls die Diffusion des Mediums und die gleichmäßige Verteilung der hMSC innerhalb der Leitschiene verhindern würden (Wang et al. 2006). Das Zellsuspensionsvolumen wurde bei dem Aufbringen auf die Tutobone minimiert, um die Anzahl der hMSC die auf der Zellkulturplatte adhären könnten, möglichst gering zu halten (Wiedmann-Al-Ahmad et al. 2002).

Wie die Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen ergaben, hafteten nach einer Stunde nur etwa ein Viertel der aufgetragenen Zellen an der Leitschiene (Holy et al. 2000). Deswegen wurde die Zellsuspension innerhalb der ersten zwei Stunden jede zwanzig Minuten resuspendiert und auf die Tutobone aufpipettiert. Dabei wurden die Leitschienen gewendet, um die einseitige Besiedelung der Tutobone zu vermeiden

(van den Dolder et al. 2003b).

Durch diese standardisierte Besiedelungsmethode konnte eine Besiedelungseffizienz von über 90% erreicht werden. Dabei konnte auch die exakte Anzahl der Zellen pro Leitschiene ermittelt werden. Im Gegensatz dazu wird die Ermittlung der Besiedelungseffizienz in anderen Studien vernachlässigt. Es werden vor allem die Anzahl der Zellen angegeben, die initial auf die Leitschienen aufgebracht werden (Bensaid et al. 2005, Boo et al. 2002, Dong et al. 2001, Mizuno et al. 1997). Die Menge der auf der Leitschiene adhärenen Zellen wird nicht ermittelt. Für eine bessere Vergleichbarkeit verschiedener Studien wäre es wünschenswert, wenn sich die von uns vorgeschlagene Besiedelungstechnik mit der nachfolgenden Ermittlung der Besiedelungseffizienz durchsetzen würde.

#### 4.1.4. Kultivierung

Eines der Ziele dieser Arbeit ist der Vergleich von Leitschienen nach der Implantation unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen und Kultivierungsarten. Dabei wurden vier verschiedene Gruppen gebildet. Eine Gruppe wurde nach der Besiedelung zwei Wochen dynamisch, die Zweite zwei Wochen und die Dritte zwölf Stunden statisch kultiviert. Die vierte Gruppe blieb unbesiedelt und wurde analog der Dritten behandelt. Die statische Kultivierung ist im Allgemeinen leicht durchführbar und erfordert keine speziellen Vorrichtungen. Zu den Nachteilen zählt, dass der Transport der Nährstoffe in das Zentrum der Leitschiene nur durch Diffusion stattfinden kann. Die Zellen, die zuerst in der Mitte der Leitschiene ansiedeln, wandern dabei aufgrund der Chemotaxis zur Oberfläche, wo das Nährstoffangebot größer ist (Sikavitsas et al. 2002).

Durch die dynamische Kultivierung sollen die Proliferation der osteoblastischen Progenitorzellen und deren Verteilung innerhalb der Leitschiene positiv beeinflusst werden. Das konnte durch die Erhöhung der Kalziummenge und der größeren Expression osteogener Marker wie z.B. alkalische Phosphatase und Osteocalcin bei dynamisch kultivierten Konstrukten im Vergleich zu statisch kultivierten dokumentiert werden (Mygind et al. 2007, Meinel et al. 2004, Sikavitsas et al. 2002). Im Gegensatz zu den dynamisierten Kulturbehältern, Rotations- und Durchflussbioreaktoren ermöglicht der von uns gewählte Gradient Container die Kultivierung vom Gewebe unter gleichbleibenden Bedingungen. Durch den permanenten Austausch von Medium bleiben die Nährstoffe und parakrine Faktoren konstant, wohingegen die Abfallprodukte perma-

ment abtransportiert werden. So kann die Schädigung der Zellen durch einen zu niedrigen pH-Wert oder zu hohe Laktatkonzentration vermieden werden (Wang et al. 2003). Außerdem ermöglicht die Kultivierung im Gradient Container durch den anhaltenden Medienfluss durch die Konstrukte die Herstellung von relativ größeren Gewebemengen als es mit anderen Kultivierungssystemen möglich wäre (Uemura et al. 2003). Ein weiterer Vorteil des Gradient Containers ist die Möglichkeit zwei verschiedene Gewebearten in verschiedenen Spezialmedien zu kultivieren. So wurde in unserer Arbeitsgruppe eine erfolgreiche Kultivierung von Knorpel- und Knochengewebe durchgeführt, was für die Herstellung der Gelenke unabdingbar ist (M. Stengele, nicht publizierte Daten).

#### 4.1.5. Immunohistologische Färbemethoden

##### 4.1.5.1. Mouse-to-mouse Detection System

Für die Identifizierung der hMSC wurde zuerst der Antikörper MAB 1281 ausgewählt, der die Zellkerne von allen humanen Zellen markiert (Windrem et al. 2004, Kohama et al. 2001). Bei der Beurteilung der besiedelten Leitschienen konnten jedoch keine Farbunterschiede zwischen den mit Antikörper behandelten Leitschienen und den Kontrollleitschienen ohne hMSC festgestellt werden. Eine mögliche Erklärung für die mangelhafte Antigen-Antikörper-Bindung könnte die für diesen Antikörper ungeeignete Methanolfixierung des Gewebes sein. Diese Fixierungsmethode führt zur Koagulation der Proteine, was zur Änderung deren dreidimensionaler Struktur führt. Aus diesem Grund kann die Epitoperkennung für die Antikörper erschwert sein.

Außerdem wurde bei den Kontrollleitschienen eine starke Hintergrundfärbung des Mausgewebes festgestellt, die auf der starken unspezifischen Bindung des sekundären Antikörpers und dem daraus folgenden Ausfall des DAB-Komplexes basierte.

##### 4.1.5.2. Anti- $\beta$ 2-Mikroglobulin

Nachfolgend wurde Anti- $\beta$ 2-Mikroglobulin zur Markierung der hMSC ausgewählt. HLA-Antigene sind aus H- und L-Ketten (engl.: heavy and light chains) zusammengesetzt und an der Zellmembran aller kernhaltigen Zellen des Menschen zu finden. Die L-Ketten sind nicht kovalent an die H-Ketten gebunden und bestehen aus  $\beta$ 2-

Mikroglobulin, das aus 99 Aminosäurenresten zusammengesetzt ist (Rosano et al. 2005). Die Spezifität des Antikörpers wurde zuerst an den mit hMSC besiedelten Leitschienen und Kontrollleitschienen überprüft. Dabei wurde ein positives Signal an den mit Primärantikörpern behandelten Kontrollleitschienen festgestellt, was auf die unspezifische Antikörperbindung hindeutete. Die Ursache kann in einer relativen Ähnlichkeit von humanem und murinem  $\beta 2$ -Mikroglobulin begründet sein, die in ihrer Aminosäurenabfolge zu 68 % identisch sind (Abb. 20). Da die polyklonalen Seren im Stande sind mit verschiedenen Epitopen eines Antigens zu reagieren und außerdem unspezifische Antikörper enthalten, führte dies zu einer unspezifischen Kreuzreaktion (Höfler et al. 2003). Unter diesen Umständen war es nicht möglich die hMSC von den Mauszellen zu unterscheiden.

Human	AS 1	M S R S V A L A V L A L L S L S G L E A	
	NS 61	ATGTCTCGCTCCGTGGCCTTAGCTGTGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCTGGCCTGGAGGCT	120
Mouse	NS 55	ATGGCTCGCTCGGTGACCCTGGTCTTTCTGGTGTGTGCTCACTGACCGCCTGTATGCT	114
	AS 1	M A R S V T L V F L V L V S L T G L Y A	
Human	AS 21	I Q R T P K I Q V Y S R H P A E N G K S	
	NS 121	ATCCAGCGTACTCCAAAGATTCAGGTTTACTCACGTCATCCAGCAGAGAATGGAAAGTCA	180
Mouse	NS 115	ATCCAGAAAACCCCTCAAATCAAGTATACTCACGCCACCCACCGGAGAATGGGAAGCCG	174
	AS 21	I Q K T P Q I Q V Y S R H P P E N G K P	
Human	AS 41	N F L N C Y V S G F H P S D I E V D L L	
	NS 181	AATTCCTGAATTGCTATGTGTCTGGGTTTCATCCATCCGACATTGAAGTTGACTTACTG	240
Mouse	NS 175	AACATACTGAACTGCTACGTAACACAGTTCACCCCGCCTCACATTGAAATCCAAATGCTG	234
	AS 41	N I L N C Y V T Q F H P P H I E I Q M L	
Human	AS 61	K N G E R I E K V E H S D L S F S K D W	
	NS 241	AAGAATGGAGAGAGAATTGAAAAAGTGGAGCATTCAGACTTGTCTTTTCAGCAAGGACTGG	300
Mouse	NS 235	AAGAACGGGAAAAAATTCCTAAAGTAGAGATGTGATATGTCCTTCAGCAAGGACTGG	294
	AS 61	K N G K K I P K V E M S D M S F S K D W	
Human	AS 81	S F Y L L Y Y T E F T P T E K D E Y A C	
	NS 301	TCTTTCTATCTCTTGTACTACACTGAATTCACCCCACTGAAAAGATGAGTATGCCTGC	360
Mouse	NS 295	TCTTTCTATATCCTGGCTCACACTGAATTCACCCCACTGAGACTGATACATACGCCTGC	354
	AS 81	S F Y I L A H T E F T P T E T D T Y A C	
Human	AS 101	R V N H V T L S Q P K I V K W D R D M	
	NS 361	CGTGTGAACCATGTGACTTTGTACAGCCCAAGATAGTTAAGTGGGATCGAGACATG	417
Mouse	NS 355	AGAGTTAAGCATGCCAGTATGGCCGAGCCCAAGACCGTCTACTGGGATCGAGACATG	411
	AS 101	R V K H A S M A E P K T V Y W D R D M	

**Abb. 20** Sequenzvergleich zwischen humanem (NM – 004048.2) und murinem (NM – 009735.2)  $\beta 2$ -Mikroglobulin. NS – Nukleotidensequenz; AS – Aminosäuresequenz.

#### 4.1.5.3. Anti-HLA-Antikörper

Um oben beschriebene unspezifischen Bindungen zu vermeiden, wurde ein monoklonaler Anti-HLA-1 Antikörper ausgewählt. Bei der Überprüfung der Antikörperspezifität wurden keine Kreuzreaktionen oder unspezifische Bindungen festgestellt. Nach der Beurteilung der explantierten Leitschienen wurde in einigen besiedelten Leitschienen ein positives Signal als Nachweis von hMSC beobachtet. Ein Unterschied bei der Besiedelungsart und -dauer der Leitschienen konnte jedoch nicht festgestellt werden. Markierten Zellen konnten vor allem an den Rändern der Leitschienen im angewachsenen Bindegewebe der Maus nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis stimmt mit Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen überein (Kuznetsov et al. 1997). Über den Beobachtungszeitraum nahm die Anzahl der positiv markierten Zellen ab. Bei der molekularbiologischen Untersuchung mittels qRT-PCR (quantitative real-time polymerase chain reaction) konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der Zellen innerhalb des Beobachtungszeitraums abnahm (Doktorarbeit von cand. Med. Gabrielle Lamper). Durch die immunohistochemische Untersuchung konnte dieses Ergebnis nicht bestätigt werden. Die inkongruenten Resultate können am Unterschied zwischen den Untersuchungsmethoden liegen. Die molekularbiologische Methode erlaubt den Nachweis von zehn hMSC in einem Gemisch von einer Million Mausfibroblasten, außerdem wurde jeweils die Hälfte der Leitschiene molekularbiologisch untersucht. Zwar erlaubt Immunohistochemie den Nachweis von einzelnen Zellen im Mausgewebe, aus Zeit- und Kostengründen wurden jedoch nur ausgesuchte Schnitte auf hMSC-Präsenz untersucht.

## 4.2. Diskussion der Ergebnisse

Die Beurteilung des Einflusses der Kultivierungsdauer und Kultivierungsmethode *in vitro* auf die mögliche Knochenneubildung *in vivo* war das Hauptziel dieser Arbeit. Im Gegensatz zu anderen Studien konnte jedoch in Rahmen dieser Arbeit weder nach zwei noch nach zwölf Wochen *in vivo* die Knochenneubildung an den besiedelten Konstrukten nachwiesen werden. Dieses Ergebnis kann mehrere Ursachen haben. Zum einen haben die verwendeten hMSC weniger Vorläuferzellen der osteogenen Kaskade als das Zellgemisch, das aus dem Knochenmark gewonnen wird. Zum anderen wurde in dieser Studie auf die Zugabe von osteogenen Zusätze verzichtet. Die Inkubation der besiedelten Leitschienen im osteogenen Medium erhöht bereits *in*

*vitro* die Anzahl der osteoblastären Vorläuferzellen (Li et al. 2005, Takahashi et al. 2005). Die Evaluation der preinkubierten besiedelten Konstrukte zeigte eine Bildung des lamellaren Knochens, ausgehend von der Leitschienenoberfläche im ektopen Modell (Mauney et al. 2005, Boo et al. 2002, Dong et al. 2001, Lee et al. 2001b). Bei den unstimulierten Konstrukten konnte keine osteogene Matrix im direkten Vergleich zu den osteogen Stimulierten nachgewiesen werden (Kruyt et al. 2003).

Durch die dynamische Kultivierung der besiedelten Konstrukte *in vitro* konnte kein positiver Effekt auf das Zellwachstum und die Knochenneubildung im Vergleich zu statisch kultivierten Leitschienen festgestellt werden. Die Publikationen anderer Autoren zeigten einen signifikanten Anstieg der osteogener Marker bei der dynamischen Kultivierung der Konstrukte (Mygind et al. 2007, Sikavitsas et al. 2002). Der Unterschied kann an den verschiedenen Strömungsarten in den Bioreaktoren liegen. So wurde für diese Arbeit ein Gradient Kontainer mit der laminären Strömung ausgewählt, in anderen Studien wurde die Kultivierung in den dynamisierten Kulturbehälter mit der turbulänten Strömung durchgeführt.

Eine andere Ursache der fehlenden Knochenneubildung kann in der Abnahme der hMSC liegen. In anderen Studien wurde die Verringerung der Zellzahl mit der Implantationsdauer ebenfalls dokumentiert (Xia et al. 2004, De Bari et al. 2004, Bareille et al. 2000). Die wahrscheinliche Ursache des Zellsterbens liegt am Nährstoffmangel besonders innerhalb der ersten zwei Wochen *in vivo*. Die in der Literatur angegebene Diffusionsstrecke von 0,1 bis 3,5 mm für die Versorgung mit Nährstoffen wurde in dieser Studie zwar nicht überschritten, sie erscheint jedoch zu groß für das relativ gefäßarme subkutane Gewebe in der Rückenhaut der Maus (Muschler et al. 2004, Kruyt et al. 2004). Bei der histologischen Untersuchung konnte zwar die Einsprossung der Blutgefäße in die Leitschiene beobachtet werden, deren Anzahl schien jedoch für das Überleben der Zellen nicht auszureichen. Außerdem befanden sich die meisten Blutgefäße in den ersten zwei Wochen an den Rändern der Leitschiene. Mit der Dauer der Implantation nahm die Anzahl der Blutgefäße signifikant zu und sie waren über die ganze Leitschienenfläche verteilt. Da jedoch die meisten Zellen Nährstoffmangel nur wenige Stunden tolerieren, kann die gute Vaskularisierung des Gewebes zum späteren Zeitpunkt deren Absterben nicht mehr verhindern. Über die Ausbildung des gut vaskularisierten Bindegewebes in den Konstrukten nach zwölf Wochen *in vivo* wurde auch in anderen Studien berichtet (Kruyt et al. 2004, Kruyt et al. 2003). Eine größere Anzahl an Blutgefäßen in den besiedelten Konstrukten im

Vergleich zu den Kontrollleitschienen, wie sie in anderen Forschungsarbeiten beschrieben sind (Pelissier et al. 2003, Bareille et al. 2000), konnten in Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Um die Durchblutung der Leitschienen zu verbessern, wäre deren Anschluss an das Gefäßsystem des Wirtes möglich. Durch die verbesserte Prevascularisation könnte auch die Knochenneubildung gesteigert werden (Hoang et al. 2005, Pelissier et al. 2003). Die Steigerung der Gefäßneubildung könnte auch durch die Vorbehandlung der Leitschienen mit VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) erzielt werden. So steigerte die Zugabe von VEGF zu den mit humanen Knochenmarkzellen besiedelten Leitschienen signifikant die Knochenneubildung. Die besseren Resultate wurden jedoch nach deren zusätzlicher Behandlung mit BMP-4 erzielt (Huang et al. 2005).

Ein anderer Grund für die Abnahme der hMSC könnte auch durch die beobachtete Entzündungsreaktion des Gewebes bedingt sein, die durch die Freisetzung verschiedener Zytokine und Wachstumsfaktoren gekennzeichnet ist und die Einwanderung von Makrophagen zur Folge hat (Broughton et al. 2006a). Ob eine direkte Phagozytose von hMSC durch Makrophagen stattfindet, ist nicht ausreichend geklärt (Xia et al. 2004). So wurden nach zweiwöchiger Implantationsdauer die Entzündungen in allen Bereichen an allen Leitschienen unabhängig von der Kultivierungsart und -dauer beobachtet und nahmen im weiteren Verlauf nach 12 Wochen signifikant ab. Eine vergleichbare Entzündungsentwicklung wurde an den unbesiedelten Leitschienen aus synthetischen biodegradierbaren Polymeren beobachtet (van Tienen et al. 2002). Entzündungsreaktionen bei der im Tutoplast®-Prozess behandelten Spongiosa wurden jedoch nicht beschrieben, was für eine gute Gewebeverträglichkeit der Leitschienen spricht (Thorwarth et al. 2007, Dayi et al. 2002). Im Gegensatz dazu wurden in dieser Studie sowohl bei den besiedelten als auch bei unbesiedelten Konstrukten Entzündungen festgestellt. So können diese Entzündungsreaktionen als ein Wundheilungsprozess nach der chirurgischen Prozedur angesehen werden.

Die Ausbreitung der Entzündungszellen hängt auch mit dem Granulationsgewebe zusammen. Charakteristisch für diese Gewebeart sind lockeres Bindegewebe, Kapillarenreichtum und Entzündungszellen, unter denen die eingewanderten Makrophagen eine wichtige Rolle spielen. Durch die Produktion der Wachstumsfaktoren wie Tumor Necrosis Factor – alpha (TNF- $\alpha$ ), Epidermal Growth Factor (Kaigler et al. 2006) (Kaigler et al. 2006) und TGF- $\alpha$  regen die Makrophagen die Angiogenese und die Proliferation der Fibroblasten an (Broughton et al. 2006b). Da die Bildung des

Granulationsgewebes aus dem umliegenden Gewebe voranschreitet, konnte es nach zwei Wochen Implantationsdauer nur an den Rändern der Leitschienen festgestellt werden. Im Laufe der Zeit wird das Granulationsgewebe durch die anderen Gewebearten ersetzt. Dadurch verkleinerte sich nach zwölf Wochen Implantationsdauer die Granulationsgewebefläche in allen Kultivierungsgruppen signifikant. Nur einzelne Inseln mit Granulationsgewebe wurden innerhalb der Konstrukte festgestellt. Diese Beobachtung des Granulationsgewebes wird auch von einer anderen Arbeitsgruppe gestützt, die eine ähnliche Abfolge in der Gewebeentwicklung beschrieb (Kessler et al. 2004, Dalkyz et al. 2000). Sowohl bei zwei als auch bei zwölf Wochen Implantationsdauer konnten keine signifikanten Unterschiede bei den besiedelten Konstrukten und den Kontrollleitschienen festgestellt werden. Somit kann gefolgert werden, dass die hMSC aber auch die Kultivierungsbedingungen keinen Einfluss auf die Bildung von Granulationsgewebe haben.

Ein weiterer Grund für die Ausbreitung der Entzündungszellen sind die in den Leitschienen weit verbreiteten Nekrosen. Histologische Zeichen einer Nekrose sind strukturloses Gewebe mit Leukozyteninfiltration und nachfolgende Demarkation des nekrotischen Gewebes mit Randsaum und Bildung des Granulationsgewebes. Das nekrotische Gewebe war nach zwei Wochen Implantationsdauer über die ganze Leitschienenfläche verteilt und nahm nach zwölf Wochen signifikant ab. Ein möglicher Grund für den Rückgang des nekrotischen Gewebes sind Umbauprozesse, die durch die Entzündungszellen ausgelöst werden und zur Bildung der Demarkationsgrenze und des Granulationsgewebes führen. Nach zwölf Wochen *in vivo* waren alle Nekrosen durch eine Demarkationsgrenze umschlossen. Nach sorgfältiger Recherche der internationalen Literatur konnten keine Hinweise auf die Nekrosebildung im Zusammenhang mit den Leitschienen gefunden werden (Kessler et al. 2001, Weng et al. 2001, Kon et al. 2000, Edwards et al. 1998, Mizuno et al. 1997). In manchen Studien wurde über die Bildung eines Exsudats im Inneren der Leitschiene berichtet, die in den histologischen Färbungen nekroseähnlich aussehen kann (Taylor et al. 1983). Ein spezifischer Nekrosenachweis kann durch die DNA-Fragmentierung mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion oder einer immunhistologischen Poly(ADP-Ribose)-Markierung erbracht werden (Stadelmann et al. 2000, Saraste et al. 2000). Erst dann ist die eindeutige Beurteilung des festgestellten histologischen Bildes möglich.

Bei der histologischen Beurteilung der Leitschienen konnten auch bei der Ausbreitung von Fettgewebe und Fremdkörperriesenzellen keine signifikanten Unterschiede

hinsichtlich der Kultivierungsart und –dauer und zwischen den besiedelten Leitschienen und Kontrollen festgestellt werden.

So wurde interessanterweise das meiste Fettgewebe bei den statisch kultivierten Leitschienen nach zwölf Wochen Implantationsdauer beobachtet. Der Unterschied zu den dynamisch kultivierten und Kontrollleitschienen war aber nicht signifikant. Die Bildung des Fettgewebes in den besiedelten Konstrukten nach zwölfwöchiger Periode *in vivo* wurde auch in vergleichbaren Studien dokumentiert (Mizuno et al. 1997, Kuznetsov et al. 1997).

Die implantierten Leitschienen können im Organismus eine Fremdkörperreaktion hervorrufen, die die Fusion der Makrophagen zu den Fremdkörperriesenzellen anregt. Diese zeichnen sich durch eine hohe Aktivität der lysosomalen Enzyme. (Anderson 2000). Die Fremdkörperriesenzellen sind an der Bioadsorption der Leitschienen beteiligt. Die Materialienart und -beschaffenheit nimmt dabei eine entscheidende Rolle ein (Murata et al. 2007, Harris et al. 2004, Anderson 2000).

Nach zwei Wochen Implantationsdauer wurden an den Rändern der Leitschiene einzelne und kleine Gruppen von Fremdkörperriesenzellen festgestellt. Im Vergleich dazu war zu dem zweiten Explantationszeitpunkt nicht nur die Anzahl der Fremdkörperriesenzellen signifikant erhöht, sondern sie waren in allen Bereichen entlang der Leitschienen zu finden. Außerdem wurden auch die Resorptionen der Tutobone durch die Fremdkörperriesenzellen beobachtet. Eine andere Arbeitsgruppe konnte ein ähnliches Verteilungsmuster von Fremdkörperriesenzellen innerhalb der Konstrukte im Verlaufe der acht Wochen dokumentieren (Xia et al. 2004). Es wurde über das vermehrte Vorkommen der Fremdkörperriesenzellen in unbesiedelten Konstrukten berichtet (Bareille et al. 2000, Bruder et al. 1999). Es konnten jedoch keine relevante Unterschiede zwischen den besiedelten und unbesiedelten Konstrukten festgestellt werden. Ob es sich bei den multinuklearen Riesenzellen um Fremdkörperriesenzellen oder Osteoklasten handelt, konnte noch nicht ausreichend geklärt werden. Die beiden Zellarten sind morphologisch nicht zu unterscheiden. Bei der TRAP-Färbung (Tartrateresistant Acid Phosphatase) wurden sowohl positive als auch negative Ergebnisse beschrieben (Salgado et al. 2007, Ferrera et al. 2002, Bareille et al. 2000). Nur mit einer immunohistochemischen Färbung gegen Calcitoninrezeptoren ist eine eindeutige Charakterisierung der Riesenzellen möglich (Anderson 2000, Bareille et al. 2000).

In dieser Untersuchung konnte gezeigt werden, dass die Art und Dauer der Kultivierung *in vitro* keinen Einfluss auf die Integration der Konstrukte auf dem Implantationsort hat. Für die weiteren Studien ist eine osteogene Prekultivierung der besiedelten Leitschienen zu empfehlen. Dadurch kann eine Knochenneubildung *in vivo* sichergestellt werden. Des Weiteren sollen die Untersuchungen an den kleineren Konstrukten durchgeführt werden könnten, wodurch ein Untergang der Zellen in den Konstrukten vermieden werden. Eine andere Möglichkeit stabile Nährstoffversorgung der Zellen zu gewährleisten ist deren Anschluss an das Gefäßsystem des Wirtes.

## 5. Zusammenfassung

In verschiedenen tierexperimentellen Studien wurde die Knochenneubildung aus besiedelten Biomaterialien sowohl im heterotopen als auch orthotopen Lager untersucht. Die erzielten Ergebnisse waren dabei maßgeblich von den verwendeten Zellen, der Leitschienenart und den Kultivierungsbedingungen *in vitro* abhängig. Ziel dieser Studie war es daher, den Einfluss der *in vitro* Kultivierung von Zell-Matrix Konstrukten auf deren Integration und die Knochenneubildung *in vivo* zu untersuchen.

Klinisch zugelassene Leitschienen (Tutubone, h=3mm, d=9mm) wurden mit humanen mesenchymalen Stammzellen besiedelt und danach statisch (12 Stunden oder 14 Tage) oder dynamisch (14 Tage) unter kontinuierlichem Medienfluss kultiviert. Die Kontrollleitschienen blieben unbesiedelt und wurden analog den 12 Stunden statisch kultivierten Leitschienen behandelt. Danach wurden die Konstrukte in athymen Nacktmäuse subkutan paravertebral implantiert. Nach 2 und 12 Wochen *in vivo* erfolgte die histologische bzw. immunohistochemische Auswertung der Konstrukte. Unabhängig von der Kultivierungsart und -dauer konnte bereits nach 2 Wochen ein Einwachsen des umliegenden Gewebes in die Konstrukte mit einer begleitenden Entzündungsreaktion beobachtet werden. In der weiteren Untersuchungsperiode wurden die signifikante Abnahme der Entzündungsreaktion sowie eine Zunahme von Blutgefäßen und multinuklearen Riesenzellen festgestellt. Zusätzlich konnten Fettzellen überwiegend in den statisch besiedelten Konstrukten nachgewiesen werden. Die Knochenneubildung in den implantierten Konstrukten wurde nicht beobachtet. Immunohistochemisch konnten die hMSC mit Hilfe von HLA-1-Antikörpern nur in besiedelten Leitschienen nach 2 und 12 Wochen Implantationsdauer detektiert werden.

Es konnte eine gute Integration der Leitschienen in das umliegende Gewebe sowie ein Überleben der implantierten Zellen über einen Untersuchungszeitraum von 12 Wochen nachgewiesen werden, wobei keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Kultivierungsformen beobachtet wurden. Das Auftreten von Fettzellen ist möglicherweise auf eine adipogene Differenzierung der implantierten Zellen zurückzuführen.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Ahsan T, Nerem RM (2005); Bioengineered tissues: the science, the technology, and the industry; *Orthod Craniofac Res* 8(3):134-140
2. Anderson JM (2000); Multinucleated giant cells; *Curr Opin Hematol* 7(1):40-47
3. Anselme K (2000); Osteoblast adhesion on biomaterials; *Biomaterials* 21(7):667-681
4. Aubin JE (1998); Bone stem cells; *J Cell Biochem Suppl* 30-31:73-82
5. 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
6. Bancroft GN, Sikavitsas VI, van den DJ, Sheffield TL, Ambrose CG, Jansen JA et al. (2002); Fluid flow increases mineralized matrix deposition in 3D perfusion culture of marrow stromal osteoblasts in a dose-dependent manner; *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(20):12600-12605
7. Bareille R, Lafage-Proust MH, Faucheux C, Laroche N, Wenz R, Dard M et al. (2000); Various evaluation techniques of newly formed bone in porous hydroxyapatite loaded with human bone marrow cells implanted in an extraosseous site; *Biomaterials* 21(13):1345-1352
8. Bensaid W, Oudina K, Viateau V, Potier E, Bousson V, Blanchat C et al. (2005); De novo reconstruction of functional bone by tissue engineering in the metatarsal sheep model; *Tissue Eng* 11(5-6):814-824
9. Bensaid W, Triffitt JT, Blanchat C, Oudina K, Sedel L, Petite H (2003); A biodegradable fibrin scaffold for mesenchymal stem cell transplantation; *Biomaterials* 24(14):2497-2502
10. Bernhardt A, Lode A, Boxberger S, Pompe W, Gelinsky M (2008); Mineralised collagen-an artificial, extracellular bone matrix-improves osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells; *J Mater Sci Mater Med* 19(1):269-275

11. Bianco P, Robey PG (2001); Stem cells in tissue engineering; *Nature* 414(6859):118-121
12. Boo JS, Yamada Y, Okazaki Y, Hibino Y, Okada K, Hata K et al. (2002); Tissue-engineered bone using mesenchymal stem cells and a biodegradable scaffold; *J Craniofac Surg* 13(2):231-239
13. 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
14. Bramlage CP, Haupl T, Kaps C, Bramlage P, Muller GA, Strutz F (2005); Bone Morphogenetic Proteins im Skelettsystem - eine zusammenfassende Darstellung.; *Z Rheumatol* 64(6):416-422
15. Broughton G, Janis JE, Attinger CE (2006a); The basic science of wound healing; *Plast Reconstr Surg* 117(7 Suppl):12S-34S
16. Broughton G, Janis JE, Attinger CE (2006b); Wound healing: an overview; *Plast Reconstr Surg* 117(7 Suppl):1e-32e
17. Bruder SP, Fox BS (1999); Tissue engineering of bone. Cell based strategies; *Clin Orthop Relat Res*(367 Suppl):S68-S83
18. Buma P, Schreurs W, Verdonschot N (2004); Skeletal tissue engineering-from in vitro studies to large animal models; *Biomaterials* 25(9):1487-1495
19. Caplan AI (2005); Review: mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics; *Tissue Eng* 11(7-8):1198-1211
20. Chen HC, Hu YC (2006); Bioreactors for tissue engineering; *Biotechnol Lett* 28(18):1415-1423
21. Claes L, Ignatius A (2002); [Development of new, biodegradable implants]; *Chirurg* 73(10):990-996
22. Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ (2001); Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells; *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(14):7841-7845

23. D'Urso PS, Atkinson RL, Lanigan MW, Earwaker WJ, Bruce IJ, Holmes A et al. (1998); Stereolithographic (SL) biomodelling in craniofacial surgery; *Br J Plast Surg* 51(7):522-530
24. Dalkyz M, Ozcan A, Yapar M, Gokay N, Yuncu M (2000); Evaluation of the effects of different biomaterials on bone defects; *Implant Dent* 9(3):226-235
25. Damien E, Hing K, Saeed S, Revell PA (2003); A preliminary study on the enhancement of the osteointegration of a novel synthetic hydroxyapatite scaffold in vivo; *J Biomed Mater Res A* 66(2):241-246
26. Dayi E, Aslan M, Simsek G, Yilmaz AB (2002); The effects of bone chips dehydrated with solvent on healing bone defects; *J Int Med Res* 30(2):168-173
27. De Bari C, Dell'Accio F, Luyten FP (2004); Failure of in vitro-differentiated mesenchymal stem cells from the synovial membrane to form ectopic stable cartilage in vivo; *Arthritis Rheum* 50(1):142-150
28. Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis PV (2005); Current concepts of molecular aspects of bone healing; *Injury* 36(12):1392-1404
29. Docheva D, Popov C, Mutschler W, Schieker M (2007); Human mesenchymal stem cells in contact with their environment: surface characteristics and the integrin system; *J Cell Mol Med* 11(1):21-38
30. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D et al. (2006); Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement; *Cytotherapy* 8(4):315-317
31. Dong J, Kojima H, Uemura T, Kikuchi M, Tateishi T, Tanaka J (2001); In vivo evaluation of a novel porous hydroxyapatite to sustain osteogenesis of transplanted bone marrow-derived osteoblastic cells; *J Biomed Mater Res* 57(2):208-216
32. Edwards JT, Diegmann MH, Scarborough NL (1998); Osteoinduction of human demineralized bone: characterization in a rat model; *Clin Orthop Relat Res*(357):219-228

33. Einhorn TA, Caplan AI, Goldberg VM (1999); Clinically applied models of bone regeneration in tissue engineering research; *Clinical orthopedie and related research* 367 supplement:S59-S67
34. Ferrera D, Poggi S, Biassoni C, Dickson GR, Astigiano S, Barbieri O et al. (2002); Three-dimensional cultures of normal human osteoblasts: proliferation and differentiation potential in vitro and upon ectopic implantation in nude mice; *Bone* 30(5):718-725
35. Freed LE, Vunjak-Novakovic G (1995); Cultivation of cell-polymer tissue constructs in simulated microgravity; *Biotechnol Bioeng* 46:306-313
36. Froum SJ, Wallace SS, Elian N, Cho SC, Tarnow DP (2006); Comparison of mineralized cancellous bone allograft (Puros) and anorganic bovine bone matrix (Bio-Oss) for sinus augmentation: histomorphometry at 26 to 32 weeks after grafting; *Int J Periodontics Restorative Dent* 26(6):543-551
37. Furumatsu T, Shen ZN, Kawai A, Nishida K, Manabe H, Oohashi T et al. (2003); Vascular endothelial growth factor principally acts as the main angiogenic factor in the early stage of human osteoblastogenesis; *J Biochem (Tokyo)* 133(5):633-639
38. Gapski R, Neiva R, Oh TJ, Wang HL (2006); Histologic analyses of human mineralized bone grafting material in sinus elevation procedures: a case series; *Int J Periodontics Restorative Dent* 26(1):59-69
39. Glowacki J (2005); A review of osteoinductive testing methods and sterilization processes for demineralized bone; *Cell Tissue Bank* 6(1):3-12
40. Goldstein AS, Juarez TM, Helmke CD, Gustin MC, Mikos AG (2001); Effect of convection on osteoblastic cell growth and function in biodegradable polymer foam scaffolds; *Biomaterials* 22(11):1279-1288
41. Goldstein SA (2002); Tissue engineering: functional assessment and clinical outcome; *Ann N Y Acad Sci* 961:183-192
42. Harris CT, Cooper LF (2004); Comparison of bone graft matrices for human mesenchymal stem cell-directed osteogenesis; *J Biomed Mater Res A*

68(4):747-755

43. Hartman EH, Pikkemaat JA, Van Asten JJ, Vehof JW, Heerschap A, Oyen WJ et al. (2004); Demineralized bone matrix-induced ectopic bone formation in rats: in vivo study with follow-up by magnetic resonance imaging, magnetic resonance angiography, and dual-energy X-ray absorptiometry; *Tissue Eng* 10(5-6):747-754
44. Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI (1992); Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow; *Bone* 13(1):81-88
45. Hentz VR, Chang J (2001); Tissue engineering for reconstruction of the thumb; *N Engl J Med* 344(20):1547-1548
46. Higuchi T, Kinoshita A, Takahashi K, Oda S, Ishikawa I (1999); Bone regeneration by recombinant human bone morphogenetic protein-2 in rat mandibular defects. An experimental model of defect filling; *J Periodontol* 70(9):1026-1031
47. Hoang NT, Kloeppel M, Staudenmaier R, Werner J, Biemer E (2005); Prefabrication of large fasciocutaneous flaps using an isolated arterialised vein as implanted vascular pedicle; *Br J Plast Surg* 58(5):632-639
48. Höfler H, Müller KM, Noll S, Schaub-Kuhnen S. *Praxis der Immunhistochemie*. Urban&Fischer, 2003.
49. Holtorf HL, Sheffield TL, Ambrose CG, Jansen JA, Mikos AG (2005); Flow perfusion culture of marrow stromal cells seeded on porous biphasic calcium phosphate ceramics; *Ann Biomed Eng* 33(9):1238-1248
50. 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
51. Hong L, Tabata Y, Yamamoto M, Miyamoto S, Yamada K, Hashimoto N et al. (1998); Comparison of bone regeneration in a rabbit skull defect by recombinant human BMP-2 incorporated in biodegradable hydrogel and in solution; *J Biomater Sci Polym Ed* 9(9):1001-1014

52. Hosseinkhani H, Hosseinkhani M, Tian F, Kobayashi H, Tabata Y (2006); Ectopic bone formation in collagen sponge self-assembled peptide-amphiphile nanofibers hybrid scaffold in a perfusion culture bioreactor; *Biomaterials* 27(29):5089-5098
53. Huang YC, Kaigler D, Rice KG, Krebsbach PH, Mooney DJ (2005); Combined angiogenic and osteogenic factor delivery enhances bone marrow stromal cell-driven bone regeneration; *J Bone Miner Res* 20(5):848-857
54. Hutmacher DW (2000); Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage; *Biomaterials* 21(24):2529-2543
55. 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
56. Ishaug-Riley SL, Crane GM, Gurlek A, Miller MJ, Yasko AW, Yaszemski MJ et al. (1997); Ectopic bone formation by marrow stromal osteoblast transplantation using poly(DL-lactic-co-glycolic acid) foams implanted into the rat mesentery; *J Biomed Mater Res* 36(1):1-8
57. Isogai N, Landis W, Kim TH, Gerstenfeld LC, Upton J, Vacanti JP (1999); Formation of phalanges and small joints by tissue-engineering; *J Bone Joint Surg Am* 81(3):306-316
58. Jager M, Sager M, Lensing-Hohn S, Krauspe R (2005a); The critical size bony defect in a small animal for bone healing studies (II): implant evolution and surgical technique on a rat's femur; *Biomed Tech (Berl)* 50(5):137-142
59. Jager M, Westhoff B, Wild A, Krauspe R (2005b); [Bone harvesting from the iliac crest]; *Orthopade* 34(10):976-90, 992
60. Jaquiere C, Schaeren S, Farhadi J, Mainil-Varlet P, Kunz C, Zeilhofer HF et al. (2005); In vitro osteogenic differentiation and in vivo bone-forming capacity of human isogenic jaw periosteal cells and bone marrow stromal cells; *Ann Surg* 242(6):859-67
61. Kaigler D, Wang Z, Horger K, Mooney DJ, Krebsbach PH (2006); VEGF scaf-

- folds enhance angiogenesis and bone regeneration in irradiated osseous defects; *J Bone Miner Res* 21(5):735-744
62. Karageorgiou V, Kaplan D (2005); Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis; *Biomaterials* 26(27):5474-5491
63. Kessler S, Koepp HE, Mayr-Wohlfart U, Ignatius A, Claes L, Puhl W et al. (2004); Bone morphogenetic protein 2 accelerates osteointegration and remodelling of solvent-dehydrated bone substitutes; *Arch Orthop Trauma Surg* 124(6):410-414
64. Kessler S, Mayr-Wohlfart U, Ignatius A, Puhl W, Claes L, Gunther KP (2001); Solvent dehydrated bone transplants to bridge segmental bone defects: histomorphological and biomechanical investigations in an animal model; *Arch Orthop Trauma Surg* 121(8):472-475
65. Kneser U, Schaefer D, Munder B, Klemm C, Andrea C, Stark G (2002); Tissue Engineering of bone; *Min Invas Ther & Allied Technol* 11(2):107-116
66. Koch H, Jadowiec JA, Campbell PG (2005); Insulin-like growth factor-I induces early osteoblast gene expression in human mesenchymal stem cells; *Stem Cells Dev* 14(6):621-631
67. Kohama I, Lankford KL, Preiningerova J, White FA, Vollmer TL, Kocsis JD (2001); Transplantation of cryopreserved adult human Schwann cells enhances axonal conduction in demyelinated spinal cord; *J Neurosci* 21(3):944-950
68. Kon E, Muraglia A, Corsi A, Bianco P, Marcacci M, Martin I et al. (2000); Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones; *J Biomed Mater Res* 49(3):328-337
69. Krebsbach PH, Kuznetsov SA, Bianco P, Robey PG (1999); Bone marrow stromal cells: characterization and clinical application; *Crit Rev Oral Biol Med* 10(2):165-181
70. Kruyt MC, de Bruijn JD, Wilson CE, Oner FC, van Blitterswijk CA, Verbout AJ

- et al. (2003); Viable osteogenic cells are obligatory for tissue-engineered ectopic bone formation in goats; *Tissue Eng* 9(2):327-336
71. Kruyt MC, Dhert WJ, Oner FC, van Blitterswijk CA, verbout AJ, de Bruijn JD (2007); Analysis of ectopic and orthotopic bone formation in cell-based tissue-engineered constructs in goats; *Biomaterials* 28(10):1798-1805
72. Kruyt MC, Dhert WJ, Yuan H, Wilson CE, van Blitterswijk CA, verbout AJ et al. (2004); Bone tissue engineering in a critical size defect compared to ectopic implantations in the goat; *J Orthop Res* 22(3):544-551
73. Kurashina K, Kurita H, Wu Q, Ohtsuka A, Kobayashi H (2002); Ectopic osteogenesis with biphasic ceramics of hydroxyapatite and tricalcium phosphate in rabbits; *Biomaterials* 23(2):407-412
74. Kuznetsov SA, Krebsbach PH, Satomura K, Kerr J, Riminucci M, Benayahu D et al. (1997); Single-colony derived strains of human marrow stromal fibroblasts form bone after transplantation in vivo; *J Bone Miner Res* 12(9):1335-1347
75. Landis WJ, Jacquet R, Hillyer J, Lowder E, Yanke A, Siperko L et al. (2005); Design and assessment of a tissue-engineered model of human phalanges and a small joint; *Orthod Craniofac Res* 8(4):303-312
76. Laurencin C, Khan Y, El Amin SF (2006); Bone graft substitutes; *Expert Rev Med Devices* 3(1):49-57
77. Lee CH, Singla A, Lee Y (2001a); Biomedical applications of collagen; *Int J Pharm* 221(1-2):1-22
78. Lee YM, Seol YJ, Lim YT, Kim S, Han SB, Rhyu IC et al. (2001b); Tissue-engineered growth of bone by marrow cell transplantation using porous calcium metaphosphate matrices; *J Biomed Mater Res* 54(2):216-223
79. Leong KF, Cheah CM, Chua CK (2003); Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs; *Biomaterials* 24(13):2363-2378
80. Leukers B, Gulkan H, Irsen SH, Milz S, Tille C, Schieker M et al. (2005); Hy-

- droxyapatite scaffolds for bone tissue engineering made by 3D printing; *J Mater Sci Mater Med* 16(12):1121-1124
81. Li WJ, Tuli R, Huang X, Laquerriere P, Tuan RS (2005); Multilineage differentiation of human mesenchymal stem cells in a three-dimensional nanofibrous scaffold; *Biomaterials* 26(25):5158-5166
  82. Liebschner MA (2004); Biomechanical considerations of animal models used in tissue engineering of bone; *Biomaterials* 25(9):1697-1714
  83. Lind M, Bunger C (2001); Factors stimulating bone formation; *Eur Spine J* 10 Suppl 2:S102-S109
  84. Mastrogiacomo M, Derubeis AR, Cancedda R (2005); Bone and cartilage formation by skeletal muscle derived cells; *J Cell Physiol* 204(2):594-603
  85. Matsubara T, Suardita K, Ishii M, Sugiyama M, Igarashi A, Oda R et al. (2005); Alveolar bone marrow as a cell source for regenerative medicine: differences between alveolar and iliac bone marrow stromal cells; *J Bone Miner Res* 20(3):399-409
  86. Mauney JR, Jaquiere C, Volloch V, Heberer M, Martin I, Kaplan DL (2005); In vitro and in vivo evaluation of differentially demineralized cancellous bone scaffolds combined with human bone marrow stromal cells for tissue engineering; *Biomaterials* 26(16):3173-3185
  87. McFarland CD, Mayer S, Scotchford C, Dalton BA, Steele JG, Downes S (1999); Attachment of cultured human bone cells to novel polymers; *J Biomed Mater Res* 44(1):1-11
  88. Meinel L, Karageorgiou V, Fajardo R, Snyder B, Shinde-Patil V, Zichner L et al. (2004); Bone tissue engineering using human mesenchymal stem cells: effects of scaffold material and medium flow; *Ann Biomed Eng* 32(1):112-122
  89. Meyerrose TE, Herrbrich P, Hess DA, Nolte JA (2003); Immune-deficient mouse models for analysis of human stem cells; *Biotechniques* 35(6):1262-1272
  90. Minuth WW, Sittinger M, Kloth S (1998); Tissue engineering: generation of dif-

- ferentiated artificial tissues for biomedical applications; *Cell Tissue Res* 291(1):1-11
91. Mizuno M, Shindo M, Kobayashi D, Tsuruga E, Amemiya A, Kuboki Y (1997); Osteogenesis by bone marrow stromal cells maintained on type I collagen matrix gels in vivo; *Bone* 20(2):101-107
  92. Muraglia A, Cancedda R, Quarto R (2000); Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model; *J Cell Sci* 113 ( Pt 7):1161-1166
  93. Muraglia A, Martin I, Cancedda R, Quarto R (1998); A nude mouse model for human bone formation in unloaded conditions; *Bone* 22(5 Suppl):131S-134S
  94. Murata M, Akazawa T, Tazaki J, Ito K, Sasaki T, Yamamoto M et al. (2007); Blood permeability of a novel ceramic scaffold for bone morphogenetic protein-2; *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 81(2):469-475
  95. Muschler GF, Nakamoto C, Griffith LG (2004); Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering; *J Bone Joint Surg Am* 86-A(7):1541-1558
  96. Musina RA, Bekchanova ES, Sukhikh GT (2005); Comparison of mesenchymal stem cells obtained from different human tissues; *Bull Exp Biol Med* 139(4):504-509
  97. Mygind T, Stiehler M, Baatrup A, Li H, Zou X, Flyvbjerg A et al. (2007); Mesenchymal stem cell ingrowth and differentiation on coralline hydroxyapatite scaffolds; *Biomaterials* 28(6):1036-1047
  98. Olivier V, Faucheux N, Hardouin P (2004); Biomaterial challenges and approaches to stem cell use in bone reconstructive surgery; *Drug Discov Today* 9(18):803-811
  99. Parikh SN (2002); Bone graft substitutes: past, present, future; *J Postgrad Med* 48(2):142-148
  100. Pekkarinen T, Jamsa T, Maatta M, Hietala O, Jalovaara P (2006); Reindeer BMP extract in the healing of critical-size bone defects in the radius of the rabbit; *Acta Orthop* 77(6):952-959

101. Pelissier P, Villars F, Mathoulin-Pelissier S, Bareille R, Lafage-Proust MH, Vilamitjana-Amedee J (2003); Influences of vascularization and osteogenic cells on heterotopic bone formation within a madreporic ceramic in rats; *Plast Reconstr Surg* 111(6):1932-1941
102. 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
103. Pluhar GE, Turner AS, Pierce AR, Toth CA, Wheeler DL (2006); A comparison of two biomaterial carriers for osteogenic protein-1 (BMP-7) in an ovine critical defect model; *J Bone Joint Surg Br* 88(7):960-966
104. Portner R, Nagel-Heyer S, Goepfert C, Adamietz P, Meenen NM (2005); Bioreactor design for tissue engineering; *J Biosci Bioeng* 100(3):235-245
105. Qiu QQ, Ducheyne P, Ayyaswamy PS (1999); Fabrication, characterization and evaluation of bioceramic hollow microspheres used as microcarriers for 3-D bone tissue formation in rotating bioreactors; *Biomaterials* 20(11):989-1001
106. Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutepov SM, Mukhachev V, Lavroukov A et al. (2001); Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells; *N Engl J Med* 344(5):385-386
107. Rajan GP, Fornaro J, Trentz O, Zellweger R (2006); Cancellous allograft versus autologous bone grafting for repair of comminuted distal radius fractures: a prospective, randomized trial; *J Trauma* 60(6):1322-1329
108. Regauer M, Jurgens I, Kotsianos D, Stutzle H, Mutschler W, Schieker M (2005); Knochenneubildung durch Osteogenic Protein-1 und autogenes Knochenmark im Problemdefektmodell der Schafstibia; *Zentralbl Chir* 130(4):338-345
109. Rezwan K, Chen QZ, Blaker JJ, Boccaccini AR (2006); Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering; *Biomaterials* 27(18):3413-3431
110. Riminucci M, Bianco P (2003); Building bone tissue: matrices and scaffolds in

- physiology and biotechnology; *Braz J Med Biol Res* 36(8):1027-1036
111. Rosano C, Zuccotti S, Bolognesi M (2005); The three-dimensional structure of beta2 microglobulin: results from X-ray crystallography; *Biochim Biophys Acta* 1753(1):85-91
  112. Rose FR, Oreffo RO (2002); Bone tissue engineering: hope vs hype; *Biochem Biophys Res Commun* 292(1):1-7
  113. Rueger JM (1998); [Bone substitution materials. Current status and prospects]; *Orthopade* 27(2):72-79
  114. Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL (2004); Bone tissue engineering: state of the art and future trends; *Macromol Biosci* 4(8):743-765
  115. Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL, Davies JE (2007); In vivo response to starch-based scaffolds designed for bone tissue engineering applications; *J Biomed Mater Res A* 80(4):983-989
  116. Saraste A, Pulkki K (2000); Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis; *Cardiovasc Res* 45(3):528-537
  117. Schantz JT, Hutmacher DW, Chim H, Ng KW, Lim TC, Teoh SH (2002); Induction of ectopic bone formation by using human periosteal cells in combination with a novel scaffold technology; *Cell Transplant* 11(2):125-138
  118. Schieker M, Mutschler W (2006a); Die Überbrückung von posttraumatischen Knochendefekten. Bewährtes und neues.; *Unfallchirurg* 109(9):715-732
  119. Schieker M, Pautke C, Haasters F, Schieker J, Docheva D, Bocker W et al. (2007); Human mesenchymal stem cells at the single-cell level: simultaneous seven-colour immunofluorescence; *J Anat* 210(5):592-599
  120. Schieker M, Seitz H, Drosse I, Seitz S, Mutschler W (2006b); Biomaterials as scaffold for bone tissue engineering; *European Journal of Trauma* 32(2):114-124
  121. Schmitz JP, Hollinger JO (1986); The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions; *Clin Orthop Relat Res*(205):299-

308

122. Sikavitsas VI, Bancroft GN, Holtorf HL, Jansen JA, Mikos AG (2003a); Mineralized matrix deposition by marrow stromal osteoblasts in 3D perfusion culture increases with increasing fluid shear forces; Proc Natl Acad Sci U S A 100(25):14683-14688
123. 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
124. Sikavitsas VI, Temenoff JS, Mikos AG (2001); Biomaterials and bone mechanotransduction; Biomaterials 22(19):2581-2593
125. Sikavitsas VI, van den DJ, Bancroft GN, Jansen JA, Mikos AG (2003b); Influence of the in vitro culture period on the in vivo performance of cell/titanium bone tissue-engineered constructs using a rat cranial critical size defect model; J Biomed Mater Res A 67(3):944-951
126. Sinha RK, Shah SA, Hume EL, Tuan RS (2002); The effect of a 5-day space flight on the immature rat spine; Spine J 2(4):239-243
127. Stadelmann C, Lassmann H (2000); Detection of apoptosis in tissue sections; Cell Tissue Res 301(1):19-31
128. Stengele M. (2004) Knochenzellwachstum im dreidimensionalen Zellkultursystem. Dissertation der Ludwig-Maximilians-Universität München
129. Tadic D, Epple M (2004); A thorough physicochemical characterisation of 14 calcium phosphate-based bone substitution materials in comparison to natural bone; Biomaterials 25(6):987-994
130. Takahashi Y, Yamamoto M, Tabata Y (2005); Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in biodegradable sponges composed of gelatin and beta-tricalcium phosphate; Biomaterials 26(17):3587-3596
131. Taylor SR, Gibbons DF (1983); Effect of surface texture on the soft tissue response to polymer implants; J Biomed Mater Res 17(2):205-227

132. Thorwarth M, Wehrhan F, Srour S, Schultze-Mosgau S, Felszeghy E, Bader RD et al. (2007); Evaluation of substitutes for bone: Comparison of microradiographic and histological assessments; *Br J Oral Maxillofac Surg* 45(1):41-47
133. Tsuchida H, Hashimoto J, Crawford E, Manske P, Lou J (2003); Engineered allogeneic mesenchymal stem cells repair femoral segmental defect in rats; *J Orthop Res* 21(1):44-53
134. Uemura T, Dong J, Wang Y, Kojima H, Saito T, Iejima D et al. (2003); Transplantation of cultured bone cells using combinations of scaffolds and culture techniques; *Biomaterials* 24(13):2277-2286
135. Urist MR, Mikulski A, Lietze A (1979); Solubilized and insolubilized bone morphogenetic protein; *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(4):1828-1832
136. Vacanti CA, Bonassar LJ, Vacanti MP, Shufflebarger J (2001); Replacement of an avulsed phalanx with tissue-engineered bone; *N Engl J Med* 344(20):1511-1514
137. van den Dolder J, Farber E, Spauwen PH, Jansen JA (2003a); Bone tissue reconstruction using titanium fiber mesh combined with rat bone marrow stromal cells; *Biomaterials* 24(10):1745-1750
138. van den Dolder J, Spauwen PH, Jansen JA (2003b); Evaluation of various seeding techniques for culturing osteogenic cells on titanium fiber mesh; *Tissue Eng* 9(2):315-325
139. van Gaalen SM, Dhert WJ, van den MA, Oner FC, van Blitterswijk C, verbout AJ et al. (2004); Bone tissue engineering for spine fusion: an experimental study on ectopic and orthotopic implants in rats; *Tissue Eng* 10(1-2):231-239
140. van Tienen TG, Heijkants RG, Buma P, de Groot JH, Pennings AJ, Veth RP (2002); Tissue ingrowth and degradation of two biodegradable porous polymers with different porosities and pore sizes; *Biomaterials* 23(8):1731-1738
141. von Garrel T, Gotzen L (1998); Allogene Knochentransplantation und Knochenbanking; *Unfallchirurg* 101(9):713-727

142. Vunjak-Novakovic G (1996); Effects of mixing on the composition and morphology of tissue-engineering cartilage; *AIChE Journal* 42(3):850-860
143. Vunjak-Novakovic G, Obradovic B, Martin I, Bursac PM, Langer R, Freed LE (1998); Dynamic cell seeding of polymer scaffolds for cartilage tissue engineering; *Biotechnol Prog* 14(2):193-202
144. Wang J, Asou Y, Sekiya I, Sotome S, Orii H, Shinomiya K (2006); Enhancement of tissue engineered bone formation by a low pressure system improving cell seeding and medium perfusion into a porous scaffold; *Biomaterials* 27(13):2738-2746
145. Wang Y, Uemura T, Dong J, Kojima H, Tanaka J, Tateishi T (2003); Application of perfusion culture system improves in vitro and in vivo osteogenesis of bone marrow-derived osteoblastic cells in porous ceramic materials; *Tissue Eng* 9(6):1205-1214
146. Wei G, Jin Q, Giannobile WV, Ma PX (2007); The enhancement of osteogenesis by nano-fibrous scaffolds incorporating rhBMP-7 nanospheres; *Biomaterials* 28(12):2087-2096
147. Weng Y, Cao Y, Silva CA, Vacanti MP, Vacanti CA (2001); Tissue-engineered composites of bone and cartilage for mandible condylar reconstruction; *J Oral Maxillofac Surg* 59(2):185-190
148. 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
149. Wiesmann HP, Joos U, Meyer U (2004); Biological and biophysical principles in extracorporeal bone tissue engineering. Part II; *Int J Oral Maxillofac Surg* 33(6):523-530
150. Windrem MS, Nunes MC, Rashbaum WK, Schwartz TH, Goodman RA, McKhann G et al. (2004); Fetal and adult human oligodendrocyte progenitor cell isolates myelinate the congenitally dysmyelinated brain; *Nat Med* 10(1):93-97

151. Xia Z, Ye H, Choong C, Ferguson DJ, Platt N, Cui Z et al. (2004); Macrophagic response to human mesenchymal stem cell and poly(epsilon-caprolactone) implantation in nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice; *J Biomed Mater Res A* 71(3):538-548
152. 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
153. Yuan J, Cui L, Zhang WJ, Liu W, Cao Y (2007); Repair of canine mandibular bone defects with bone marrow stromal cells and porous beta-tricalcium phosphate; *Biomaterials* 28(6):1005-1013
154. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H et al. (2002); Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells; *Mol Biol Cell* 13(12):4279-4295

## Abkürzungsverzeichnis

AEC	Aminoethylcarbazol
BMP-4	Bone morphogenetic protein 4
BMP-7	Bone morphogenetic protein 7
CD	Clusters of differentiation
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal growth factor
FBS	Fetal bovine serum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GDF	Growth and differentiation factor
HLA-1	Human leukocyte antigen 1
hMSC	Human mesenchymal stem cells
IGF	Insulin growth factor
MMA	Methylmetacrylat
MSCGM	Mesenchymal stem cell growth medium
PBS	Phosphate buffered saline
TBS	Tris buffered saline
TGF	Transforming growth factor
TNF	Tumor necrosis factor
VEGF	Vascular endothelial growth factor

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand in der experimentellen Medizin und regenerativen Chirurgie der chirurgischen Klinik-Innenstand der Universität München. Für die Überlassung des Themas danke ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Wolf Mutschler, sehr herzlich.

Mein besonderer Dank bei der Experimented gilt Herrn Dr. Matthias Schieker, der mich immer unterstützt hat und maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen hat. Beim Herrn Dr. Sebastian Seitz möchte ich mich für die Betreuung und intensives Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken.

Ausgesprochen dankbar bin ich Frau Brigitte Hackl, die mich in die Geheimnisse der Zellkultur eingewiesen hat. Eben solcher Dank geht an Frau Claudia Harbauer, die mir bei allen histologischen Fragen eine große Hilfe war. Außerdem danke ich Frau Gisela Lippelt und Frau Elisabeth Meyer, die mir in der Anatomie immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Bei Herr Dr. Michael Stengele bedanke ich mich für die Beantwortung vieler EDV-Fragen.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Labors, die während der Entstehung dieser Dissertation durch Erläuterungen und Anregungen zu meinem Erkenntnisgewinn beigetragen haben.

Ganz großer Dank geht an meine Familie. An meine Eltern, die mir das Studium in Deutschland erst ermöglicht haben, und an meinen lieben Mann Marcus, der mich bei diesem Promotionsvorhaben und bei allen anderen Forschungsprojekten immer mit Rat und Tat unterstützte.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Christina Ern
Geburtsdatum	10.10.1976
Geburtsort	Odessa, Ukraine
Familienstand	verheiratet

### Schulbildung

09.1983 - 06.1993	Allgemeinbildende Schule Maryniwka, Biljajwskyj Rayon, Odessaer Gebiet, Ukraine
-------------------	--

### Hochschulbildung

09.1993 - 06.1994	Universitätsvorbereitender Kurs, Medizinische Staatsuniversität Odessa, Ukraine
-------------------	--

09.1994 - 07.1996	Studium der Zahnmedizin, Medizinische Staatsuniversität Odessa, Ukraine
-------------------	--

11.1996 - 04.1997	Sprachkurs „Deutsch für Ausländer“, Ludwig-Maximilians-Universität München
-------------------	---

10.1997 - 01.2004	Studium der Zahnmedizin, Ludwig-Maximilians-Universität München
-------------------	--

**Berufliche Tätigkeit**

- 01.2005 -03.2007                      Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung für Experimentelle Chirurgie und Regenerative Medizin der Chirurgischen Klinik Innenstadt der LMU München
- 03.2007                                      Erteilung der zahnärztlichen Approbation durch die Regierung von Oberbayern am 14.03.2007
- Seit 05.2007                                Assistenz Zahnärztin an der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie der LMU München

## Publikationen

**Krafft C, Salzer R, Seitz S, Ern C, Schieker M.**

*Differentiation of individual human mesenchymal stem cells probed by FTIR microscopic imaging.*

Analyst. 2007 Jul;132(7):647-53. Epub 2007 May 24. PMID: 17592583

**Seitz S, Ern K, Lamper G, Docheva D, Drosse I, Milz S, Mutschler W, Schieker M**

*Influence of in vitro cultivation on the integration of cell-matrix constructs after subcutaneous implantation*

Tissue Eng. 2007 May;13(5):1059-67. PMID: 17394385

**Huth KC, B. Saugel B, Jakob FM, Cappello C, Quirling M, Paschos E, Ern K, Hickel R, Brand K.**

*Effect of Aqueous Ozone on the NF- $\kappa$ B System*

J Dent Res 2007 86: 451-456

**Schieker M, Wierer M, Haasters F, Ern C, Shakibaei M, Docheva D, Mutschler W**

*Identification and differentiation of highly proliferation single human mesenchymal stem cells for tissue engineering applications*

Langenbecks Arch Surg (2005) 390: 482

**Seitz S, Ern C, Lamper G, Gülkan H, Milz S, Mutschler W, Schieker M**

*Einfluss der in vitro Kultivierung auf die Integration von besiedelten Konstrukten im Mausmodell*

Vortrag: 1. Gemeinsamer Kongress Orthopädie – Unfallchirurgie Berlin, 19.- 22. Oktober 2005

**Wierer M, Docheva D, Ern C, Mutschler W, Shakibaei M, Schieker M**

*Plasticity and characterisation of single mesenchymal stem cells*

Vortrag: Stem cell workshop – Human mesenchymal stem cells: selection, cultivation phenotyping

EMPA St. Gallen, Schweiz, 07.-09.November 2005

**Wierer M, Haasters F, Ern C, Gülkan H, Schieker J, Milz S, Mutschler W, Schieker M**

*Differentiation of single mesenchymal stem cells in three mesenchymal lineages*

Vortrag: 4<sup>th</sup> Annual Meeting of the EUROPEAN TISSUE ENGINEERING SOCIETY  
(Xia et al. 2004) München, 31. August - 03. Sept. 2005

**Wierer M, Haasters F, Gülkan H, Ern K, Schieker J, Mutschler W, Schieker M**

*Differenzierung von Stammzellen ausgehend von Einzelzellen*

Vortrag: 1. Gemeinsamer Kongress Orthopädie – Unfallchirurgie  
Berlin, 19.- 22. Oktober 2005

**Haasters F, Pautke C, Docheva D, Krump-Konvalinkova V, Ern K, Mutschler W, Schieker M**

*Differenzierung zwischen humanen mesenchymalen Stammzellen, Osteoblasten und Fibroblasten mittels simultaner Mehrfachfluoreszenz auf Einzellzellniveau*

Gemeinsamer Kongress Orthopädie – Unfallchirurgie Berlin, 02.-06. Oktober 2006

**Ern K, Krump-Konvalinkova V, Docheva D, Schindler S, Mutschler W, Schieker M**

*Interactions of human mesenchymal stem cells and endothelial cells in cocultures*

Abstrakt: 1<sup>st</sup> Congress of the Society for Stem Cell Research, 03.-04. November  
2006