

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

**Optimierung der Sauerstoffversorgung in
dreidimensionalen Zell-Leitschienen-Konstrukten für das *tissue
engineering* von Knochen**

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

vorgelegt von

Dr. med. dent. Sven Otto
aus Zschopau

2011

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Matthias Schieker

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Franz-Xaver Reichl
Priv. Doz. Dr. Kim A. Boost

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Elias Volkmer

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Maximilian Reiser, FACR,
FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 13.01.2011

1. Einleitung	5
1.1. Grundlagen	5
1.1.1. Entstehung und Eigenschaften knöcherner Defekte	5
1.1.2. Therapeutische Optionen zur Versorgung knöcherner Defekte	6
1.2. Tissue engineering	9
1.2.1. Grundlagen und Geschichte des <i>tissue engineering</i>	9
1.2.2. Möglichkeiten und Grenzen des <i>tissue engineering</i>	9
1.2.3. Die Rolle des Sauerstoffs für das <i>tissue engineering</i>	11
1.2.4. Sauerstoffeinfluss auf Entwicklung und Heilung von Knochen.....	12
1.2.5. Dreidimensionale Zellkultursysteme für das <i>tissue engineering</i>	12
1.3. Aufgabenstellung	15
1.3.1. Sauerstoffmessung in dreidimensionalen Zellkultursystemen.....	15
1.3.2. Optimierung der Kulturbedingungen	15
1.3.3. Übertragung der Ergebnisse auf humane Zellen	15
2. Material und Methoden	16
2.1. Zellkultur.....	16
2.1.1. Zellkultur allgemein	16
2.1.2. Zellpassagierung.....	16
2.1.3. Zellzählung.....	16
2.1.4. Besiedlung der Leitschienen	17
2.1.5. Statische und dynamische Zellkultur.....	17
2.2. Messmethodik und Auswertung der Versuche	19
2.2.1. Sauerstoffmessung	19
2.2.2. Auswertung des Zellüberlebens mit Hilfe des <i>live-dead-assay</i>	22
2.2.3. Auswertung der Zellaktivität mit Hilfe des <i>WST-assay</i>	24
2.2.4. Statistische Auswertung.....	25
3. Ergebnisse	26
3.1. Ergebnisse unter statischen Zellkulturbedingungen	26
3.1.1. Vorversuche unter statischen Kulturbedingungen.....	26
3.1.2. Versuche unter statischen Bedingungen in dreidimensionalen Zellkultursystemen	27
3.2. Ergebnisse unter dynamischen Zellkulturbedingungen	30

3.2.1. Versuche unter dynamischen Bedingungen mit Standardperfusions- geschwindigkeit.....	30
3.2.2. Quantitative Auswertung des Zellüberlebens durch Zellzählung.....	32
3.2.3. Versuche unter dynamischen Bedingungen mit gesteigerter Perfusions- geschwindigkeit.....	33
4. Diskussion	38
4.1. Statische Zellkultursysteme für das <i>tissue engineering</i> von Knochen.....	38
4.2. Dynamische Zellkultursysteme für das <i>tissue engineering</i> von Knochen.....	41
4.3. Versuche mit Steigerung der Perfusionsgeschwindigkeit.....	43
5. Zusammenfassung	45
6. Literaturverzeichnis	48
Abkürzungsverzeichnis.....	53
Danksagung	54
Publikationen.....	555
Drittmittelanträge	633

1. Einleitung

1.1. Grundlagen

Das Vorliegen knöcherner Defekte stellt ein häufiges und wichtiges klinisches Problem dar, welches sowohl nach Traumata, aber auch im Rahmen von angeborenen und erworbenen Erkrankungen auftreten kann (1). Der Wunsch nach einer adäquaten Versorgung dieser Läsionen zur Wiederherstellung von Form und Funktion des betroffenen Knochens ist so alt wie die Chirurgie selbst. In den vergangenen Jahrzehnten wurden zahlreiche Methoden zum Ersatz des verloren gegangenen Knochens beschrieben und klinisch eingesetzt (2). Allerdings konnte sich neben der autologen Knochentransplantation, die trotz ihrer hohen Hebedefekt morbidity bis heute als Goldstandard der Behandlung von Knochendefekten gilt, kein Verfahren zum Knochenersatz breitflächig durchsetzen (1;2).

Eine innovative Therapiemöglichkeit von Knochendefekten stellt das *tissue engineering* von Knochen dar, wobei bei diesem Verfahren das Ersatzgewebe zunächst *in vitro* generiert wird, um anschließend in den lebenden Organismus implantiert werden zu können. Während es mittlerweile gängige Praxis ist, multipotente Vorläuferzellen zu isolieren, zu expandieren, in Knochengewebe zu differenzieren und auf biologischen Leitschienen dreidimensional zu kultivieren, stellt die ausreichende Versorgung von dreidimensionalen Zell-Leitschienen-Konstrukten mit Sauerstoff ein bisher ungelöstes Problem dar.

Die vorliegende Dissertation beschäftigt sich daher mit der Sauerstoffversorgung und ihrer Optimierung in dreidimensionalen Zellkultursystemen für das *tissue engineering* von Knochen.

1.1.1. Entstehung und Eigenschaften knöcherner Defekte

Knöcherne Defekte können angeboren sein, im Rahmen von Traumata, aber auch durch Infektionen oder andere pathologische Prozesse wie Zysten oder Tumoren entstehen (1). Aufgrund der demographischen Entwicklung stellen auch durch Osteoporose bedingte knöcherne Läsionen nach Defektfrakturen ein zunehmendes

klinisches Problem dar (3-5). Knochendefekte lassen sich nach makromorphologischen Aspekten wie Länge, Breite und Tiefe der Läsion charakterisieren. Zudem spielt die Lokalisation eines Defektes für die Möglichkeiten der Versorgung eine entscheidende Rolle. Man unterscheidet zwischen kortikalen, spongiösen sowie kortiko-spongiösen Defekten mit und ohne Gelenkbeteiligung (1). Bei der Behandlung von Knochendefekten muss zusätzlich auch der Zustand des angrenzenden Knochens sowie der bedeckenden und umgebenden Weichgewebe wie Muskulatur und Haut in differentialtherapeutische Überlegungen einbezogen werden (1).

Neben diesen makromorphologischen Gegebenheiten spielen mikromorphologische Eigenschaften eine ebenso wichtige Rolle zur Beurteilung der Lagerqualität. Man unterscheidet ein ersatzstarkes Lager, welches auf der Basis einer guten Vaskularisierung und guten Weichgewebsdeckung zur Regeneration befähigt ist von einem ersatzschwachen Lager, welches aufgrund schlechter Vaskularisierung und gegebenenfalls bakterieller Kontamination, zum Beispiel durch Schädigung der bedeckenden Weichgewebe, nur ungenügend zur knöchernen Regeneration befähigt ist. Als ersatzunfähig gelten Lager im Bereich atropher Pseudarthrosen sowie in Folge von Bestrahlung osteoradionekrotisch veränderte Knochenareale (1;6). Eine wichtige Rolle spielt zudem die mechanische Belastung der Defektregion (6;7).

1.1.2. Therapeutische Optionen zur Versorgung knöcherner Defekte

Der Ersatz von Knochengewebe ist indiziert, wenn die Dimensionen des knöchernen Defektes die körpereigene regenerative Kapazität überschreiten (8). Aber auch innerhalb kritischer Defektdimensionen kann ein Knochenersatz sinnvoll sein, da in einem nicht unerheblichen Prozentsatz der Fälle die knöcherne Regeneration unterbleibt beziehungsweise verlangsamt ist (9).

Ziel der Behandlung von Knochendefekten ist die Förderung und Beschleunigung der Knochenheilung, wobei im Ergebnis mechanisch belastbarer Knochen entsteht, der dem physiologischen *remodeling*, das heißt den natürlichen Umbauvorgängen unter mechanischer Belastung, unterliegt (10;11).

Die verschiedenen Möglichkeiten zur Rekonstruktion knöcherner Läsionen können nach unterschiedlichen Kriterien beurteilt werden. Zu den wesentlichen Parametern gehören vor allem die biologische Leistungsfähigkeit sowie die möglichst frühe mechanische Belastbarkeit und Stabilität. Aber auch die Verfügbarkeit des jeweiligen Knochenersatzmaterials, der technische und operative Aufwand der Methode, die mit dem Verfahren einhergehende Morbidität sowie die entstehenden Kosten spielen für die Beurteilung und Indikationsstellung eine entscheidende Rolle (1;6;7).

Die biologische Leistungsfähigkeit beschreibt dabei die osteogenetischen, osteoinduktiven beziehungsweise osteokonduktiven Wirkungen eines Knochenersatzmaterials (1;7). Osteogenese beschreibt das Vorhandensein lebender knochenbildender Zellen im Knochenersatzmaterial, während man unter osteoinduktiven Eigenschaften die Stimulation ortsständiger oder transplanteder Zellen zur Differenzierung zu Osteoblasten mit der daraus resultierenden Knochenbildung versteht. Osteokonduktive Merkmale werden vor allem Leitschienen zugeschrieben, welche die Einsprossung von Knochenmatrix produzierenden Zellen vereinfachen (1;6;7).

Grundsätzlich unterscheidet man Knochenersatzmittel organischen und anorganischen Ursprungs (6). Den aktuellen Goldstandard zur Versorgung knöcherner Defekte stellt die autologe Knochentransplantation dar (1;10;12-15). Dabei handelt es sich um ein Knochentransplantat, welches entweder nur aus spongiosen Knochen oder als kortikospongiöser Span typischerweise am Becken des Patienten entnommen wird. Die Hauptvorteile dieses Transplantates sind, dass es einerseits nicht immunogen ist und außerdem osteogene Zellen beherbergt. Aber auch die autologe Knochentransplantation ist aufgrund ihrer biologischen Eigenschaften, insbesondere durch ihre limitierte quantitative Verfügbarkeit, mit Nachteilen verbunden. Zudem ist die Transplantatentnahme mit einer zum Teil erheblichen Hebedefektmorbidität verbunden (1;6;15-17).

Neben autologen Transplantaten (*autografts*) stehen genetisch differente (heterologe), humane Transplantate (*allografts*) und spezie-differente Transplantate (*xenografts*) als organische Knochenersatzmaterialien zur Verfügung (6;7;15;17).

Humane heterologe Knochentransplantate können als alleiniges Knochenersatzmaterial oder in Kombination mit autogenem Knochen verwendet werden. Sie bieten den Vorteil der höheren quantitativen Verfügbarkeit und kommen ohne Hebedefekt morbidity aus. Nachteilig wirken sich jedoch die nicht exakt prognostizierbare Osteoinduktivität, die Gefahr von Abstoßungs- und Entzündungsreaktionen sowie die aktuell nicht zu eliminierende Möglichkeit von Infektionen mit viralen und prionären Erkrankungen aus (15;17-19).

Alloplastische Knochenersatzmaterialien, also künstliche Knochenersatzmaterialien (alloplasts) unterscheiden sich in zahlreichen Eigenschaften vom natürlichen Knochen. Es wurde eine Vielzahl von Knochenersatzmaterialien auf Kalziumphosphatbasis entwickelt und klinisch erprobt, dazu gehören zum Beispiel BioBon und BioOss. Diese Substanzen sind zwar in der Lage, kleinere Defekte zu füllen, es konnte jedoch bisher kein Material entwickelt werden, welches zur Therapie größerer ossärer Defekte geeignet ist. Der Hauptgrund hierfür liegt in der fehlenden Vitalität der Implantate, die zwar meist eine gute Biokompatibilität aufweisen, jedoch letztlich nicht in das Körpergewebe integriert werden (1;7).

Darüber hinaus stehen weitere operativ und technisch aufwendige sowie anspruchsvolle Therapien wie die Distractionsosteogenese zur Verfügung (5). All diesen Verfahren gemeinsam ist das beschränkte Indikationsspektrum sowie die zum Teil erheblichen Nachteile und Einschränkungen (20). Hierzu gehören nicht zuletzt die extreme Belastung für den Patienten aufgrund der langen Behandlungsdauer sowie die hohen Kosten dieser Verfahren (1;20).

Vor diesem Hintergrund liegt der Wunsch nach *in vitro* herstellbaren, biologisch integrierbaren und in Form als auch Größe beeinflussbaren Knochenersatzmitteln mit autogenen Zellen nahe (21). Das Potenzial hierfür bietet die innovative und zukunftsweisende Technik des *tissue engineering* (20).

1.2. Tissue engineering

1.2.1. Grundlagen und Geschichte des *tissue engineering*

Bereits seit Mitte der 60er Jahre des vergangenen Jahrhunderts existierten Bestrebungen körpereigenen Knochen mit Hilfe von transplantierten autologen Stammzellen zu ersetzen (22). Anfang der 70er Jahre unternahm die Gruppe um Green mehrere Versuche mit Hilfe von Chondrozyten, welche auf Knochenspänen besiedelt wurden, Knorpel zu generieren und diesen in Mäuse zu implantieren (23;24). Obwohl die Experimente scheiterten, schlussfolgerte er zutreffend, dass es mit zunehmendem Fortschritt und der Entwicklung biokompatiblerer Materialien möglich sein würde, unter Verwendung von lebenden Zellen und Leitschienen neues Gewebe zu generieren (25). Einige Jahre später gelang es Burke und Yannas unter Nutzung von dermalen Fibroblasten, welche auf einer Kollagenmatrix angesiedelt wurden, einen *tissue engineerten* Hautersatz zu gewinnen (25).

Der Begriff „*tissue engineering*“ war zunächst nur unzureichend definiert und wurde bis zum Ende der 80er Jahre auch für chirurgische Manipulationen an Geweben sowie für prothetische Ersatzmittel verwendet (25). Eine der ersten Arbeiten, welche den Begriff „*tissue engineering*“ in seinem heutigen Sinne verwendete wurde 1991 von Vacanti CA und Vacanti JP publiziert (26). Die Gruppe um Vacanti CA unternahm zahlreiche Experimente, um funktionelle Gewebeäquivalente mit Hilfe von synthetischen biokompatiblen und biodegradierbaren Polymeren sowie lebenden Zellen zu erzeugen (27;28).

Nach der aktuellen Definition bedeutet *tissue engineering* die Herstellung von biologischen Ersatzstoffen zum funktionellen Gewebersatz unter Verwendung von Zellen kombiniert mit biogenen oder synthetischen Materialien, gegebenenfalls beeinflusst durch Zytokine beziehungsweise gentechnische Maßnahmen (20;29).

1.2.2. Möglichkeiten und Grenzen des *tissue engineering*

Tissue engineering bietet theoretisch das Potenzial zum Gewebersatz in unbegrenzter Menge sowie in beliebiger Größe und Form (2;30;31). Insbesondere die Entdeckung und Charakterisierung der pluripotenten, adulten mesenchymalen

Stammzelle (hMSC), die in quasi unbegrenzter Menge im Knochenmark und in geringerem Ausmaß auch in anderen Geweben wie Fettgewebe oder Muskel vorkommt und *in vitro* in verschiedenste Gewebearten wie Knochen, Knorpel oder Fettgewebe differenziert werden kann (sog. Plastizität), hat die Forschung im Bereich des *tissue engineering* beflügelt. Die relativ leichte Zugänglichkeit sowie die Plastizität und Vermehrungsfähigkeit dieser Zellen eröffnete enorme Möglichkeiten für den Ersatz von Geweben und Teilen des menschlichen Körpers (25), so dass namhafte Autoren bereits einen Paradigmenwechsel in der orthopädischen und rekonstruktiven Chirurgie von der Benutzung medizinischer Apparate und autologer Gewebetransplantate hin zu *tissue-engineering*-Anwendungen vorhersehen. Wie in Abbildung 1 schematisch dargestellt, werden dabei biodegradierbare Leitschienen kombiniert mit lebenden Zellen oder biologischen Molekülen zur Reparatur und Regeneration von Gewebe eingesetzt (32).

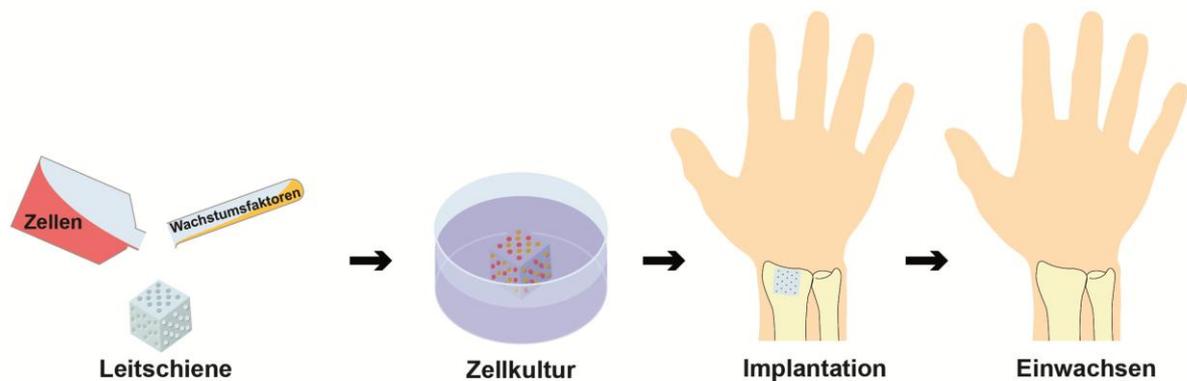


Abb. 1 Prinzip des *tissue engineering* für mögliche klinische Anwendungen mit schematischer Darstellung der Entnahme mesenchymaler Stammzellen, deren Kultivierung auf Leitschienen *in vitro* unter Einfluss von Wachstumsfaktoren sowie der Implantation der Zell-Leitschienen-Konstrukte in den lebenden Organismus nach Drosse et al. 2008 (33)

Doch trotz dieser beeindruckenden Potenziale und Perspektiven sowie des kontinuierlichen wissenschaftlichen Fortschrittes auf dem Gebiet des *tissue engineering* gibt es bisher nur verhältnismäßig wenige klinische Anwendungen (25;34). Auch das *tissue engineering* von Knochenersatzmaterial in klinisch relevanten Größenordnungen konnte bisher keinen Durchbruch erzielen (34). Eine wesentliche Ursache für diese Diskrepanz zwischen den spektakulären Möglichkeiten und der noch weitgehend fehlenden klinischen Umsetzung wird in der

mangelnden Sicherstellung des Zellüberlebens innerhalb der Leitschienen gesehen, insbesondere in der *in vitro* sowie in der initialen Phase *in vivo*, wenn infolge der fehlenden Vaskularisierung ein hypoxisches Milieu mit konsekutivem Zelltod entsteht (25).

1.2.3. Die Rolle des Sauerstoffs für das *tissue engineering*

Im lebenden Organismus beträgt die Distanz zwischen Zellen und Kapillaren, die einerseits die Versorgung mit Sauerstoff sowie Nährstoffen und andererseits die Eliminierung von Stoffwechselendprodukten übernehmen zwischen 20 und 200 μm (35). In der zweidimensionalen (2D), klassischen Zellkultur in der Petrischale wird das frische, nähr- und sauerstoffreiche Medium direkt auf die Zellen appliziert. Es ist ausreichend belegt, dass es hier nicht zu Versorgungsengpässen kommt. In der dreidimensionalen (3D)-Kultur gestaltet sich die homogene Versorgung der Zellen auf dem Konstrukt schwieriger, da Zellen, die auf dem äußeren Abschnitt eines Zell-Leitschienen-Konstruktes angesiedelt sind, besser mit frischem Medium versorgt werden als solche, die im Zentrum angesiedelt sind. Aufgrund der schlechten Diffusionskapazität und Löslichkeit von Sauerstoff in wässrigen Lösungen ist die Versorgung von Zellen auf Leitschienen *in vitro* durch Diffusion auf circa 100–200 μm limitiert (36;37). Es ist bekannt, dass es mit zunehmender Größe und damit zunehmender klinischer Relevanz der besiedelten Leitschienen zu ungleichmäßiger Proliferation und Differenzierung der Zellen kommt, so dass eine inhomogene Gewebequalität entsteht, wobei sich ein deutlicher Gradient von der Oberfläche bis in die zentrale Region der Leitschienen etabliert (38-42). Einige aktuelle Studien weisen darauf hin, dass Sauerstoffmangel die Differenzierung von Zellen limitiert. Es liegt daher nahe zu vermuten, dass eine zentrale Hypoxie innerhalb der Konstrukte für die Inhomogenität der dreidimensionalen Gewebe verantwortlich ist. Entsprechend wird angenommen, dass Sauerstoffmangel gegenwärtig der limitierende Faktor für die Weiterentwicklung von dreidimensionalen Zellkultursystemen *in vitro* und letztlich auch *in vivo* ist (43;44). Das aktuelle Dilemma des Leitschienen-basierten *tissue engineering* ist, dass mit zunehmender Größe und folglich Zunahme der klinischen Relevanz der Zell-Leitschienen-Konstrukte die Schwierigkeit der gleichmäßigen Versorgung mit Nährstoffen und vor allem Sauerstoff der in den Leitschienen angesiedelten Zellen zunimmt.

1.2.4. Sauerstoffeinfluss auf Entwicklung und Heilung von Knochen

Die Anwesenheit von Sauerstoff ist eine notwendige Voraussetzung für das Überleben aller Zellen. Sauerstoff spielt eine entscheidende Rolle für zahlreiche Stoffwechselprozesse, den Zellzyklus und die Zellproliferation bis hin zur Apoptose (39;44). Die Sauerstoffkonzentration beeinflusst dabei nicht nur, welche Stoffwechselwege zur Energiegewinnung eingesetzt werden können. Auch im Rahmen der Wundheilung spielt die An- beziehungsweise Abwesenheit von Sauerstoff eine entscheidende Rolle (39). So stellt eine lokale und zeitlich beschränkte Hypoxie einen wesentlichen Stimulus zur Neubildung von Gefäßen dar und führt durch die daraus resultierende bessere Vaskularisierung zu einer beschleunigten Wundheilung. Eine länger bestehende Hypoxie kann hingegen Ursache einer deutlich verlangsamten Wundheilung sein und die Entstehung chronischer Wunden oder gar einer Nekrose zur Folge haben (39). In besonderer Weise wird die Entwicklung und Heilung des Skelettsystems von der Sauerstoffkonzentration beeinflusst. Zahlreiche jüngere Untersuchungen belegen, dass der Prozess der osteogenen Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen wesentlich von der Sauerstoffkonzentration abhängt (45-48) und dass Hypoxie die Knochenentwicklung hemmt (44).

Daraus resultiert die Notwendigkeit zur Aufrechterhaltung einer ausreichenden und gleichmäßigen Sauerstoffversorgung als Grundvoraussetzung für die Generierung einer gleichmäßigen Gewebequalität im Rahmen des *tissue engineering* von Knochen (34). Doch im Gegensatz zu dieser immensen Bedeutung existieren bisher nahezu keine Daten zur Sauerstoffversorgung von dreidimensionalen Zellkultursystemen für das *tissue engineering* von Knochen, speziell im Hinblick auf klinisch relevante Größenordnungen von mehreren Millimetern Dicke (34).

1.2.5. Dreidimensionale Zellkultursysteme für das *tissue engineering*

Die Etablierung von dynamischen Zellkultursystemen unter anderem für das *tissue engineering* von Knorpel und Knochen unter Verwendung von Bioreaktoren konnte im Vergleich zu statischen Kulturbedingungen die Qualität der verschiedenen Gewebesysteme deutlich verbessern (49). Allerdings existieren nur wenige Arbeiten, die die Sauerstoffkonzentration innerhalb statischer und dynamischer

dreidimensionaler Zellkultursysteme sowie ihren Einfluss auf das Zellüberleben und die Gewebequalität direkt untersucht haben (34). Diese wenigen Untersuchungen, die an Chondrozyten und Kardiomyozyten durchgeführt wurden, konnten zeigen, dass die Sauerstoffkonzentration von der Oberfläche zum Zentrum dieser dreidimensionalen Konstrukte abnahm (38;50). An dreidimensionalen Chondrozytenkulturen wurden zudem Veränderungen in Abhängigkeit von der Zeit festgestellt (38). In Modellen mit Kardiomyozyten konnte kürzlich nachgewiesen werden, dass die Sauerstoffkonzentration mit der Zelldichte und dem Zellüberleben korreliert (41). Die Anwendung dynamischer Zellkultursysteme mit konstantem Mediumfluss um und durch die Leitschienen führte zu einer Verminderung des Sauerstoffgradienten von der Oberfläche zum Zentrum der Leitschiene und beeinflusste das Zellüberleben positiv (41). Allerdings wurden in diesen Untersuchungen extrem dünne Leitschienen (1,5 mm Dicke) verwendet, so dass die Frage nach den tatsächlichen Sauerstoffkonzentrationsverhältnissen in dickeren und damit klinisch relevanteren Konstrukten unbeantwortet bleibt, insbesondere da gezeigt werden konnte, dass das Zellwachstum als auch die Matrixproduktion zu einer zusätzlichen Beeinträchtigung der Nährstoffversorgung und des Zellüberlebens führen (39;51). Darüber hinaus können die Ergebnisse von Untersuchungen an den stoffwechselträgen und damit deutlich weniger Sauerstoff verbrauchenden Chondrozyten nicht auf die stoffwechselaktiven Zellen der osteogenen Differenzierungsreihe übertragen werden. Da die osteogene Differenzierung wie oben angeführt auf die Anwesenheit von Sauerstoff angewiesen ist, kann eine Hypoxie zudem deutlich schwerwiegendere Auswirkungen haben.

Das Labor für experimentelle Chirurgie und regenerative Medizin der Chirurgischen Klinik-Innenstadt beschäftigt sich seit mehreren Jahren mit dem *tissue engineering* von Knochen. Es konnte hierbei ein Modell zur Besiedlung und Kultivierung von präfabrizierten Leitschienen aus demineralisierter boviner Matrix (DBM) etabliert werden (20). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass unter Verwendung dieses Modells und dynamischen Zellkulturbedingungen, welche mit Hilfe eines Durchflussbioreaktors erzeugt wurden, innerhalb der dreidimensionalen Leitschienen eine osteogene Differenzierung sowie knochentypische Matrixproduktion stattfindet (20).

Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe bestätigten zudem, dass unter statischen Kulturbedingungen mit zunehmender Zellzahl ein stärkerer Abfall der Sauerstoffkonzentration auftritt (siehe Abb. 2). Wie ebenfalls in Abbildung 2 dargestellt zeigte sich im umgebenden Medium von mit 50.000 Zellen (MC3T3) besiedelten DBM-Leitschienen ein deutlicher Sauerstoffabfall innerhalb von sieben Tagen, weshalb man davon ausgehen muss, dass auf der größeren Oberfläche dreidimensionaler Leitschienen mehr Zellen wachsen. Dies legt die Vermutung nahe, dass im Zentrum besiedelter Leitschienen eine für das Überleben und die osteogene Differenzierung von Vorläuferzellen kritische Sauerstoffkonzentration möglicherweise unterschritten wird (34).

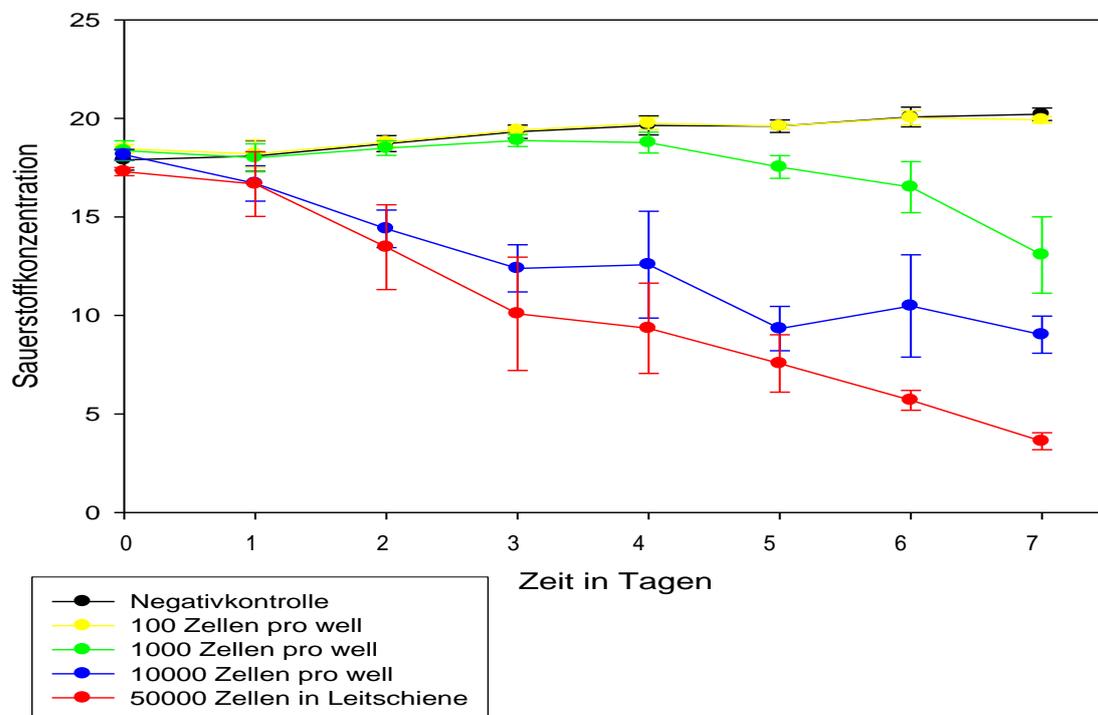


Abb. 2 Bestimmung der Sauerstoffkonzentration unter statischen Zellkulturbedingungen. Mit zunehmend dichter Besiedlung von initial 100 bis 10.000 Zellen pro *well* resultiert ein stärkerer Abfall der Sauerstoffkonzentration im Verlauf von 7 Tagen, wobei bei initialer Besiedlung mit 10.000 Zellen bereits nach circa 5 Tagen Konfluenz im *well* erreicht wird. Bei Besiedlung einer Leitschiene mit 50.000 Zellen kann an der Oberfläche nach sieben Tagen ein Abfall der Sauerstoffkonzentration auf circa 4 % beobachtet werden, so dass eine Hypoxie im Zentrum der Konstrukte vermutet werden muss. Auf der vergrößerten Oberfläche der dreidimensionalen Leitschienen wachsen wahrscheinlich wesentlich mehr Zellen. Anzahl der Versuchswiederholungen: n=2

1.3. Aufgabenstellung

1.3.1. Sauerstoffmessung in dreidimensionalen Zellkultursystemen

Obwohl die Sauerstoffversorgung als ein entscheidendes Problem für dreidimensionale Zellkultursysteme angesehen wird, existieren bisher keine zuverlässigen Daten bezüglich der Sauerstoffkonzentration in derartigen Konstrukten für das *tissue engineering* von Knochen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand daher in der Bestimmung der Sauerstoffkonzentration innerhalb dreidimensionaler Zellkultursysteme für das *tissue engineering* von Knochen. Zusätzlich sollte überprüft werden, inwiefern sich auftretende Gradienten auf das Zellüberleben auswirken.

1.3.2. Optimierung der Kulturbedingungen

Da bisher insbesondere die Herstellung von in der Größe klinisch relevanten dreidimensionalen Knochenersatzmaterialien mit Problemen behaftet ist, sollte überprüft werden, ob durch dynamische Zellkulturbedingungen und durch Modifikation der Perfusionsgeschwindigkeit eine günstigere Sauerstoffversorgung und in der Konsequenz ein verbessertes Zellüberleben erreicht werden kann.

1.3.3. Übertragung der Ergebnisse auf humane Zellen

Der Hauptteil der Versuche wurde mit murinen osteoblastären Vorläuferzellen (MC3T3) durchgeführt, welche gut kultivierbar und schnell wachsend sind und somit ein gutes Modell für die ebenfalls stoffwechselaktiven osteogenen Vorläuferzellen darstellen. Allerdings sollten zum Nachweis der Übertragbarkeit der so gewonnenen Daten auf menschliche Zellen auch Versuche mit humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC), welche für den klinischen Einsatz am ehesten in Frage kämen, durchgeführt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Zellkultur

2.1.1. Zellkultur allgemein

Für die Untersuchungen wurden gut wachsende, murine Zellen der Linie MC3T3 verwendet, die von der Firma DSZM (Braunschweig, Deutschland) vertrieben werden. MC3T3-Zellen sind schnell proliferierende, osteoblastäre Vorläuferzellen, welche in der fünften Passage bei -80 Grad Celsius eingefroren wurden und als Grundstock für alle weiteren Experimente dienten. Die Kultivierung und Expansion dieser Zellen erfolgte in Mem alpha-Medium mit L-Glutamin der Firma Invitrogen (Carlsbad, Kalifornien), welchem 10% fetales Rinderserum (FBS) der Firma Sigma (München, Deutschland) sowie 40 internationale Einheiten (IU) Penicillin/Streptomycin der Firma PAA (Pasching, Österreich) zugesetzt wurde. Die Zellen wurden bei 37 Grad Celsius im feuchten Milieu bei 95% Luft und 5% Kohlendioxid kultiviert. Das Medium wurde dreimal wöchentlich gewechselt.

2.1.2. Zellpassagierung

Zellpassagierungen wurden durchgeführt, wenn der Zellrasen in der Kulturflasche zur Konfluenz neigte. Für das im Zuge dieser Passagierung notwendige *splitting* beziehungsweise Trypsinieren wurde 1 ml Trypsin/EDTA der Firma PAA (Pasching, Österreich) sowie zum Spülen 10 % (v/v) PBS der Firma Sigma (München, Deutschland) verwendet.

2.1.3. Zellzählung

Für die Zählung der Zellen wurden diese zunächst in der gewünschten Verdünnung mit Trypanblau der Firma Gibco (Karlsruhe, Deutschland) gefärbt, wobei 10 µl Zellsuspension mit 5 µl Trypanblau durchmischt wurden. Circa 5 µl der entstehenden Mischsuspension wurden anschließend auf die vorbereitete Neubauer-Zählkammer appliziert und gezählt. Mit Hilfe einer standardisierten Formel wurde unter Beachtung des Verdünnungsfaktors die Zellzahl pro Volumen Suspension berechnet.

2.1.4. Besiedlung der Leitschienen

Für die Besiedlung wurden in allen Experimenten zylindrische Leitschienen aus boviner demineralisierter Knochen-Matrix (demineralized bone matrix / DBM) der Firma Tutogen Medical (Neunkirchen, Deutschland) mit einem Durchmesser von 9 mm und einer Höhe von 5 mm verwendet. Vor der Besiedlung wurden die Leitschienen in Medium für 5 Minuten bei 500 G zentrifugiert, um Luft einschüsse aus der porösen Leitschiene zu entfernen. Zunächst wurden die in Kultur befindlichen Zellen trypsinisiert, zentrifugiert und nach Zellzählung in Medium resuspendiert, so dass eine Konzentration von 75.000 Zellen pro Milliliter erreicht wurde. Für die Besiedlung der Leitschienen wurden 666 µl (entsprechend 50.000 Zellen) dieser Stammsuspension verwendet. Für die Besiedlung wurden diese 666 µl Stammsuspension auf die in einer 48-*well*-Platte (Firma Nunc, Wiesbaden, Deutschland) befindliche Leitschiene pipettiert, wobei dieser Vorgang in den ersten zwei Stunden in einem Intervall von 20 Minuten in standardisierter Art und Weise wiederholt wurde, um eine möglichst hohe Besiedlungseffizienz sowie eine gleichmäßige Verteilung der Zellen innerhalb der Leitschiene zu erreichen. Abschließend erfolgte die Überführung der nun besiedelten Leitschienen in die statische oder dynamische Zellkultur. Die Besiedlungseffektivität wurde durch Zellzählung der in der 48-*well*-Platte verbliebenen Zellen bestimmt, wobei mit Hilfe der beschriebenen Technik eine Besiedlungseffizienz von circa 90% erreicht werden konnte.

2.1.5. Statische und dynamische Zellkultur

Für die Experimente unter statischen Zellkulturbedingungen wurden die besiedelten Leitschienen nun in 24-*well*-Platten (Firma Nunc, Wiesbaden, Deutschland) übertragen und in einem Standardzellkulturinkubator bei 37 Grad Celsius aufbewahrt. Das Medium wurde alle 48 Stunden gewechselt. Für die Durchführung der Versuche unter dynamischen Zellkulturbedingungen wurden Polykarbonat-Durchfluss-Bioreaktoren verwendet, welche für diese Verwendung etabliert sind (Firma Minucells and Minutissue, Bad Abbach, Deutschland). Das Vorgehen orientierte sich an aktuellen Publikationen (20;31). Leitschienen, welche unter dynamischen Bedingungen kultiviert werden sollten, wurden zunächst für 24 Stunden bei 37 Grad Celsius in einem Standardzellkulturinkubator aufbewahrt, um die

Adhärenz der Zellen zu ermöglichen und anschließend unter wiederum sterilen Bedingungen in einen Bioreaktor mit zylindrischer Flusskammer (Minucells und Minutissue GmbH, Bad Abbach, Deutschland) eingebracht.

Die Experimente unter dynamischen Zellkulturbedingungen wurden unter Anwendung von zwei verschiedenen Versuchsanordnungen durchgeführt. Als Standardperforationsbedingungen wurden dabei jene bezeichnet, die einen Mediumfluss durch und um die Leitschiene erlaubten. In diesem System ist die Flusskammer größer als die Leitschiene (siehe Abb. 3a). Mit Hilfe eines speziell angefertigten Polykarbonatringes, der exakt an die Flusskammer angepasst und in seinem Innendurchmesser (9 mm) genau auf den Durchmesser der Leitschiene abgestimmt wurde, konnte ein vollständiger Durchfluss des Mediums durch die Leitschiene sichergestellt werden (siehe Abb. 3b). Dieser Versuchsaufbau wird daher als forcierte Perfusion bezeichnet. Abbildung 3c illustriert die Platzierung der Sauerstoffmesssonden.

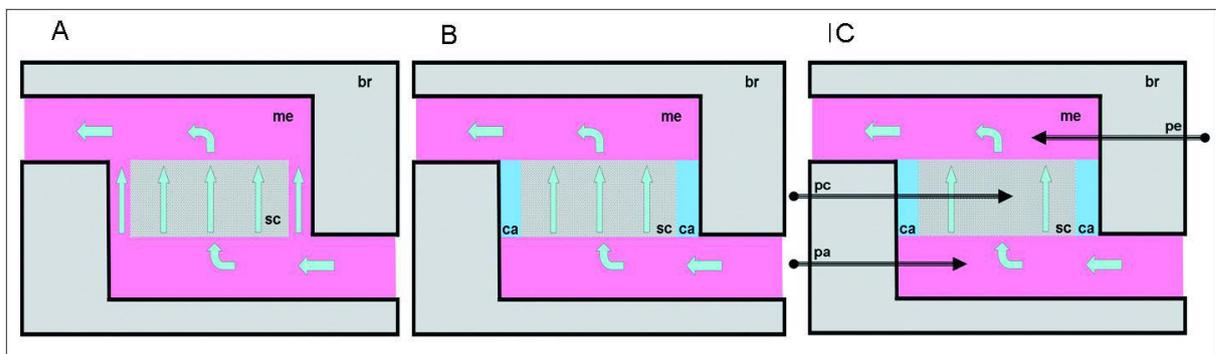


Abb. 3 Schematische Darstellung des Mediumflusses (me) im Bioreaktor (br) bei Standardperforationsbedingungen (Abb. 3a) und bei forcierter Perfusion (Abb. 3b) unter Verwendung eines Polykarbonatringes (ca) sowie der Lokalisation der Sauerstoffmesssonden (Abb. 3c) im Mediumzu- und abfluss sowie im Zentrum der Leitschiene (sc)

Dieser Bioreaktor wurde unter Verwendung von Silikonschläuchen einerseits an eine Flasche mit frischem Medium angeschlossen, andererseits an eine Flasche, die als Auffangbehälter für verbrauchtes Medium fungierte. Auch das Anschließen der Silikonschläuche und Mediumflaschen erfolgte unter sterilen Bedingungen, um eine Kontamination der besiedelten Leitschiene zu vermeiden. Mit Hilfe einer im zuführenden Schenkel eingebrachten Pumpe (Firma Ismatec, IPC, Schweiz) wurde der kontinuierliche Nachschub von frischem Medium sichergestellt. Die Durchströmung der Leitschiene erfolgte von unten nach oben, wobei durch

zusätzliches Kippen des Bioreaktors eine Ansammlung von Luftblasen innerhalb der Flusskammer vermieden werden sollte.

Als Standardperfusionsgeschwindigkeit wurde die in unserem Forschungslabor etablierte und in früheren Versuchen verwendete Geschwindigkeit von 18 $\mu\text{l}/\text{min}$ gewählt (20;31). Hiervon ausgehend berechnet sich die drei- beziehungsweise fünffache Perfusionsgeschwindigkeit mit 54 $\mu\text{l}/\text{min}$ und 90 $\mu\text{l}/\text{min}$. Das gesamte System wurde nun in einen Inkubator mit einer Temperatur von 37 Grad Celsius eingebracht und der Bioreaktor auf eine ebenfalls 37 Grad Celsius warme Heizplatte gestellt.

Die Versuche mit einfacher Perfusionsgeschwindigkeit wurden parallel unter den Bedingungen der Standard- und der forcierten Perfusion durchgeführt. Die Versuche mit höherer Perfusionsgeschwindigkeit (drei- beziehungsweise fünffache Perfusionsgeschwindigkeit) erfolgten unter den Bedingungen der forcierten Perfusion, da sich diese Versuchsanordnung als effizienter erwiesen hatte. Außerdem konnte dadurch sichergestellt werden, dass die Erhöhung der Perfusionsgeschwindigkeit auch zu einem verstärkten Mediumfluss durch die poröse Leitschiene und nicht nur zu einem verstärkten Fluss um die Leitschiene führt.

2.2. Messmethodik und Auswertung der Versuche

2.2.1. Sauerstoffmessung

Die vorbereitenden Sauerstoffmessungen in zweidimensionalen Zellkultursystemen sowie die Messungen der Sauerstoffsättigung im die Leitschienen umgebenden Medium unter statischen Zellkulturbedingungen wurden mit Hilfe von speziellen Sauerstoffsensoren in kommerziell erhältlichen 24-*well*-Platten (OxoPlate® OP24F) der Firma PreSens, Regensburg, Deutschland durchgeführt, wobei die Registrierung und Aufzeichnung der Messwerte durch die zugehörige Software der gleichen Firma realisiert wurde. Das Grundprinzip dieser Sauerstoffmessung beruht auf der Anwesenheit von zwei unterschiedlich sauerstoffsensiblen Farbstoffen (*dyes*) innerhalb des Sensors, wobei die Phosphoreszenz des einen Farbstoffes von der Sauerstoffkonzentration im *well* abhängig ist, während die Fluoreszenz des anderen

sauerstoffunabhängig ist. Das Verhältnis der Lumineszenz beider *dyes* lässt eine Berechnung der Sauerstoffkonzentration in der Probe zu, wobei die Zweipunktkalibration der Sonden bereits herstellerseitig erfolgt. Für eine detaillierte Beschreibung des Wirkungsmechanismus dieser Sauerstoffmesssonden wird auf diesbezügliche Publikationen verwiesen (52;53).

Die Sauerstoffmessungen innerhalb der dreidimensionalen Zellkultursysteme wurden mit nadelartigen Sauerstoffmikrosensoren (NFSx) der Firma PreSens (Regensburg, Deutschland) durchgeführt. Das Messprinzip entspricht dem oben angeführten, wobei die Farbstoffe auf eine Glasfaser von 50 µm Dicke aufgetragen sind, welche innerhalb einer handelsüblichen Hohnadel (Durchmesser 0,4 mm) gelagert ist, um eine mechanische Irritation oder Schädigung beim Einführen der Sonde in die Leitschiene zu vermeiden.



Abb. 4 Schematische Darstellung des Aufbaus der verwendeten Sauerstoffmesssonden mit einem sauerstoffsensiblen Sensor innerhalb einer Hohnadel (Abbildung mit freundlicher Genehmigung der Firma Presens)

Für die Messung der Sauerstoffkonzentration unter statischen Zellkulturbedingungen wurde die Messsonde unter Verwendung einer Messhilfe in die Mitte der Leitschienenoberseite eingeführt und rechtwinklig exakt 2,5 mm vorgeschoben, so dass eine Platzierung in der Mitte der Leitschiene sichergestellt werden konnte. Die Ableitung der Sonde erfolgte durch ein Loch im Deckel der 24-well-Platte.

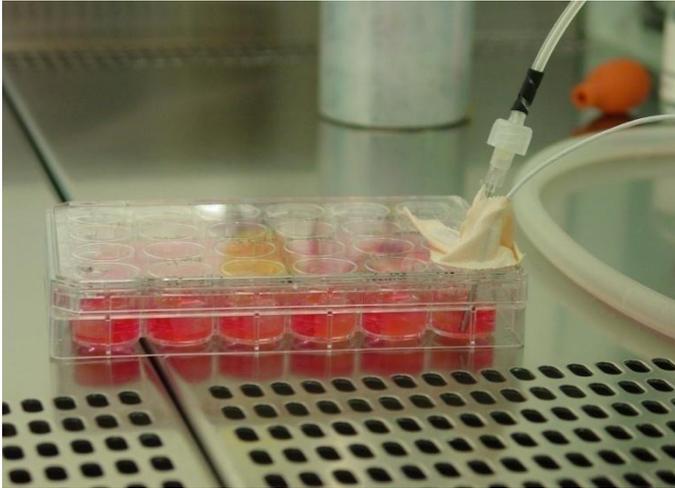


Abb. 5 Versuchsanordnung zur Messung der Sauerstoffkonzentration im Zentrum der Leitschienen innerhalb einer 24-well-Platte unter statischen Bedingungen

Ein analoges Vorgehen wurde für die Versuche unter dynamischen Zellkulturbedingungen gewählt, wobei aufgrund der Konstruktion und zur Gewährleistung des exakten Verschlusses des Bioreaktors die Messsonde von der Seite in die geometrische Mitte der Leitschiene platziert werden musste. Um eine gleiche Positionierung der Spitze der Messsonde zu gewährleisten, wurde diese wiederum rechtwinklig und unter Verwendung einer Messhilfe 4,5 mm tief in die Leitschiene eingeführt. Um auch unter den forcierten Perfusionsbedingungen eine regelrechte und die Dichtigkeit des Systems nicht gefährdende kontinuierliche Messung der Sauerstoffkonzentration zu erreichen, musste im oben beschriebenen Polykarbonatring eine exakt 0,4 mm Bohrung vorgenommen werden, damit die die Messsonde beinhaltende Hohlneedle von der Seite her in die Leitschiene eingeführt werden konnte.



Abb. 6 Einführen der Sauerstoffmesssonde in die besiedelte Leitschiene unter Verwendung der Hilfsbohrung im angefertigten Polykarbonatring

Zusätzlich wurden für alle Versuche unter statischen Bedingungen Messsonden direkt neben der Leitschiene und unter dynamischen Zellkulturbedingungen Sauerstoffmesssonden im zu- und abführenden Mediumschenkel sowie in der Umgebung des Bioreaktors platziert (siehe Abb. 3c beziehungsweise Abb. 7).

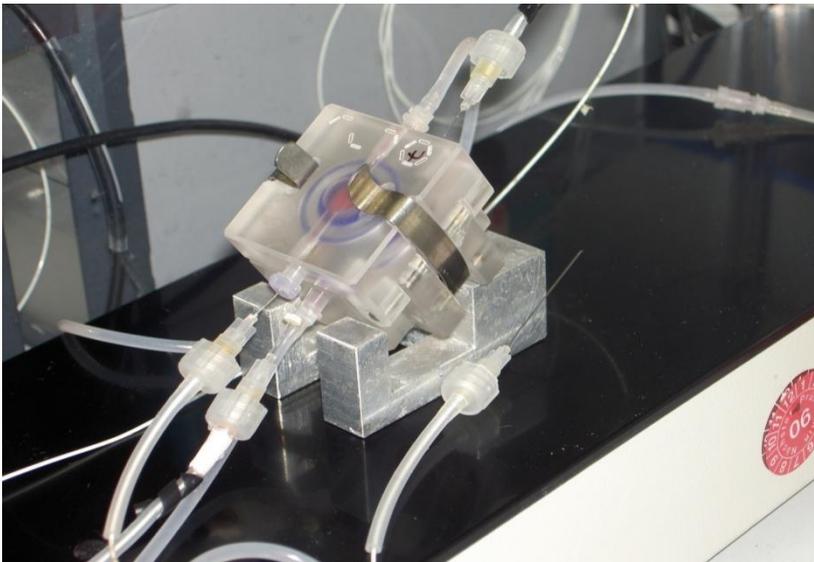


Abb. 7 Platzierung der zentralen Messsonde und der Messsonden im zu- und abführenden Mediumschenkel des Bioreaktors sowie der Kontrollsonde in der Umgebung

Die Sauerstoffmesssonden wurden vor ihrem Einsatz unter Verwendung einer 100% Kohlendioxidatmosphäre (entsprechend 0% Sauerstoff) und Umgebungsluft (entsprechend 21% Sauerstoff) zweipunktkalibriert. Nach der Startmessung innerhalb der Leitschiene wurden die Messungen automatisiert über sieben Tage in stündlichem Abstand durchgeführt und mit Hilfe der zugehörigen Software registriert. Zur Vorbereitung der statistischen Auswertung wurden die Messwerte jedes Tages (24 Stunden) zusammengefasst und gemittelt.

2.2.2. Auswertung des Zellüberlebens mit Hilfe des *live-dead-assay*

Um auch das Zellüberleben innerhalb der Leitschienen auswerten zu können, wurde der auf der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung nach Inkubation der Leitschienen mit Fluoreszeindiazetat (FDA) und Propidiumiodid (PI) beruhende *live-dead-assay* der Firma Fluka/Sigma (München, Deutschland) verwendet. Das Prinzip dieses assays beruht darauf, dass die nicht fluoreszierende Esterverbindung Fluoreszeindiazetat passiv durch die Zellmembran diffundiert und in lebenden Zellen

durch unspezifische Esterasen zu einem grün fluoreszierenden Farbstoff hydrolysiert wird. Avitale Zellen besitzen keine Esteraseaktivität und zeigen konsekutiv keine grüne Fluoreszenz. Propidiumiodid hingegen kann nur die nicht intakte Zellmembran avitaler Zellen durchdringen, lagert sich anschließend im Zellkern in die DNA ein und verursacht die rote Fluoreszenz der toten Zellen. Nach Durchführung des *live-dead*-assays erscheinen somit lebende Zellen im fluoreszenzmikroskopischen Bild grün, während sich tote Zellen rot darstellen.

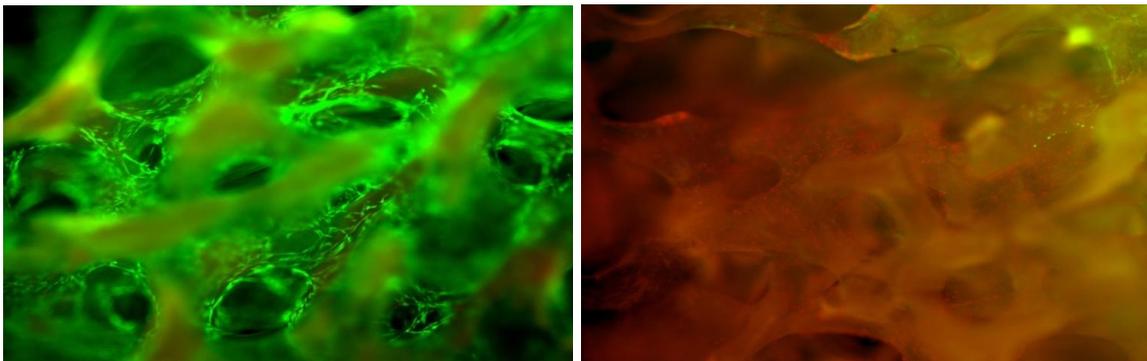


Abb. 8 Beispielhafte Darstellung des fluoreszenzmikroskopischen Bildes von *live-dead*-assays einer DBM-Leitschiene mit lebenden Zellen (grün) im linken und toten Zellen (rot) im rechten Bildanteil

Die Stammlösung zur Durchführung des *live-dead*-assay wurde dabei durch Auflösung von 10 mg Fluoreszeindiazetat in 2 ml reinem Aceton und Verdünnung dieser Lösung mit PBS im Verhältnis 1:500 erzeugt. Die so erhaltene Lösung wurde im Verhältnis 1:1 mit Propidiumiodid gemischt und somit die letztendliche Färbelösung erzeugt. Vor Beginn der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung wurden die Leitschienen unter Verwendung eines Skalpell und einer Metallschablone halbiert. Letztere diente einer standardisierten Teilung in zwei gleich große Hälften. Eine Hälfte wurde nun dem *live-dead*-assay zugeführt, die andere in 4% Formaldehydlösung zur späteren histologischen Aufarbeitung fixiert. Vor der Färbung wurden Mediumrückstände an den *well*-Platten beziehungsweise der Leitschiene mit 0,5 ml PBS gewaschen, um eine Interferenz mit der FDA/PI-Färbelösung zu vermeiden. Nach sterilem Absaugen der PBS-Lösung wurden die halbierten Leitschienen für eine Minute mit 500 µl der vorbereiteten FDA/PI-Lösung inkubiert. Nach Absaugung der Färbelösung und erneuter Spülung mit PBS folgte nun die umgehende Fluoreszenzmikroskopie der Präparate.

Für diese wurde das Fluoreszenzmikroskop Axiovert 100 der Firma Zeiss (Jena, Deutschland) verwendet. Mit Hilfe eines Grünlicht- sowie eines Rotlichtfilters wurde die grüne beziehungsweise rote Fluoreszenz der Zellen sichtbar gemacht. Mit der an das Mikroskop angeschlossenen Digitalkamera AxioCam MRm der Firma Zeiss (Jena, Deutschland) wurden die Bilder aufgenommen und unter Verwendung der zugehörigen Software (Axiovision) der Firma Zeiss (Jena, Deutschland) weiterverarbeitet und gespeichert.

Das Fotografieren der Leitschiene erfolgte dabei in standardisierter Art und Weise, wobei zunächst mit kleiner Vergrößerung (1,25-fache Objektivvergrößerung) Übersichtsaufnahmen und später mit steigenden Vergrößerungen (5-, 10- und 20-fache Objektivvergrößerung) Detailaufnahme zuvor festgelegter Areale angefertigt wurden.

Aufnahmen mit 20-facher Vergrößerung aus der zentralen Region der Leitschiene wurden nachfolgend für die Zellzählung in 16 Felder mit einer Kantenlänge von 500 x 500 µm durch drei unabhängige Untersucher verwendet.

2.2.3. Auswertung der Zellaktivität mit Hilfe des WST-assay

Der kommerziell verfügbare WST-assay der Firma Roche ermöglicht die Messung der metabolischen Aktivität von Zellen. Das Funktionsprinzip beruht auf der Umsetzung des hellroten Substrates WST-I durch mitochondriale Enzyme vor allem die Succinatdehydrogenase in intensivrotes Formazan. Die dadurch veränderte Extinktion kann mit Hilfe des ELISA-*plate-readers* bei einer Wellenlänge von 450 nm photometrisch bestimmt werden.

Zur Durchführung wurde WST-I auf 37 Grad Celsius erwärmt und im Verhältnis 1:10 mit Medium verdünnt. Von der so erhaltenen Lösung wurden 500 µl in jedes *well* pipettiert. Nach zweistündiger Inkubation bei 37 Grad Celsius wurden aus jedem *well* zweimal 100 µl in eine 96-*well*-Platte überführt, so dass anschließend mit Hilfe des ELISA-*plate-readers* eine Doppelbestimmung jeder Probe möglich war.

2.2.4. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte mit der Software SigmaPlot Version 8 (SPSS, München, Deutschland). Jedes beschriebene Experiment wurde mindestens zweifach ausgeführt. Zur statistischen Analyse der erhobenen Daten wurde der T-Test verwendet, wobei ein $p < 0,05$ als statistisch signifikant gewertet wurde. In Bezug auf die Sauerstoffmesswerte wurden die in den beiden unabhängigen Experimenten ermittelten Daten einer gemeinsamen statistischen Auswertung zugeführt und somit der Mittelwert und die Standardabweichung bestimmt.

3. Ergebnisse

3.1. Ergebnisse unter statischen Zellkulturbedingungen

3.1.1. Vorversuche unter statischen Kulturbedingungen

Um den Sauerstoffverbrauch der verwendeten Zellen (MC3T3) in zwei- und dreidimensionalen Zellkulturen zu vergleichen und eine adäquate Zellzahl für die geplanten Versuche unter dreidimensionalen Zellkulturbedingungen zu ermitteln, wurde zunächst unter statischen Zellkulturbedingungen in Ansätzen mit unterschiedlichen Zellzahlen die Sauerstoffkonzentration im Verlauf von sieben Tagen gemessen.

In der Negativkontrolle und im mit 100 Zellen besiedelten *well* konnte kein Abfall der Sauerstoffkonzentration festgestellt werden (Abb. 9, Kreise). Im mit 1000 Zellen besiedelten *well* wurde ein leichter und über die Zeit zunehmender Abfall der Sauerstoffkonzentration im Medium beobachtet (Abb. 9, Quadrate). Bei Besiedlung der *wells* mit 10.000 (Abb. 9, Dreiecke) und mehr Zellen fiel die Sauerstoffkonzentration im Vergleich zu den mit 1000 Zellen besiedelten *wells* stärker ab, wobei die Zellen nach circa 5 Tagen Konfluenz erreichten und sich ein nahezu unverändertes Sauerstoffkonzentrationsniveau von circa 8-10 % einstellte. Ein stärkerer Abfall der Sauerstoffkonzentration wurde bei Besiedlung von Leitschienen mit 50.000 Zellen (dreidimensionale Kulturbedingungen) im umgebenden Medium festgestellt. Nach sieben Tagen wurde hier ein Niveau von circa 4 % erreicht (Abb. 9, Rauten).

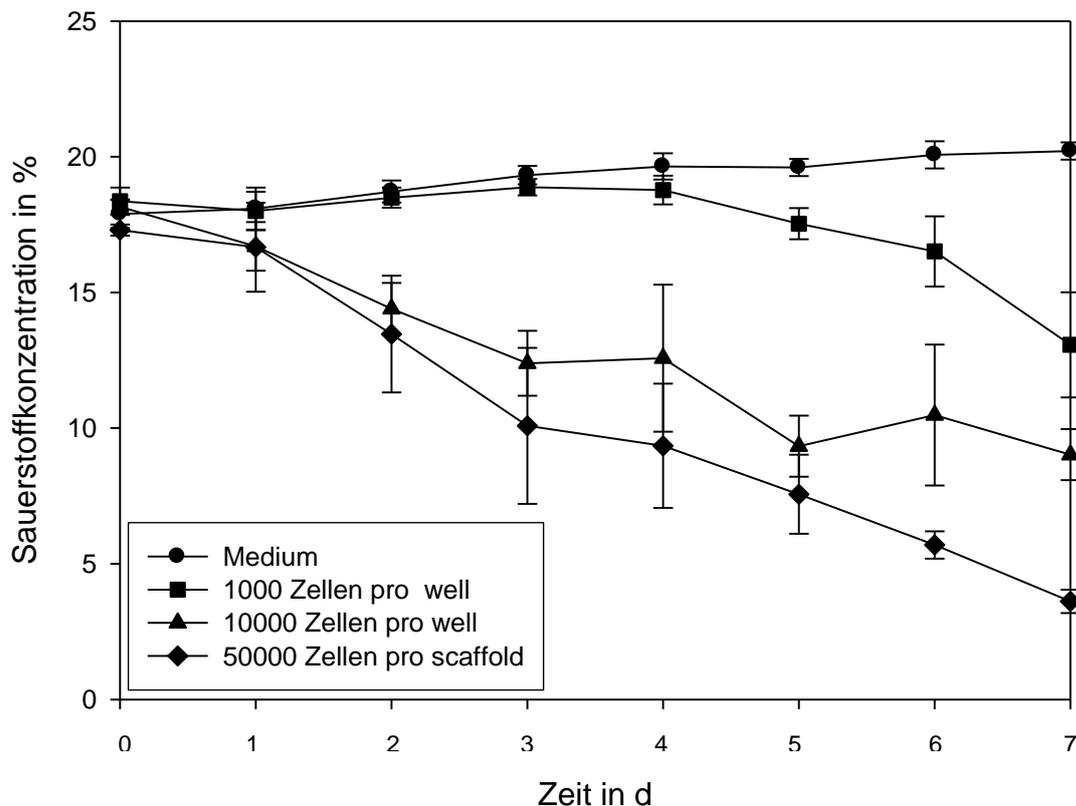


Abb. 9 Sauerstoffmessung unter statischen Zellkulturbedingungen: Die Sauerstoffkonzentration fällt mit zunehmender Besiedlungsdichte (1000 bzw. 10.000 Zellen pro well) im Verlauf von sieben Tagen im Vergleich zur Mediumkontrolle stärker ab. Bei initialer Besiedlung mit 10.000 Zellen wird nach circa 5 Tagen Konfluenz erreicht. Bei Besiedlung einer Leitschiene mit 50.000 Zellen kann an der Oberfläche nach sieben Tagen ein Abfall der Sauerstoffkonzentration auf circa 4 % beobachtet werden kann, so dass eine Hypoxie im Zentrum vermutet werden muss. Anzahl der Versuchswiederholungen: n=2

3.1.2. Versuche unter statischen Bedingungen in dreidimensionalen Zellkultursystemen

Im vorangegangenen Versuch fiel die Sauerstoffkonzentration in die besiedelte Leitschiene unmittelbar umgebenden Medium im Beobachtungszeitraum ab und erreichte nach 7 Tagen einen Wert von circa 4%. Da angenommen werden muss, dass die Sauerstoffkonzentration im Zentrum der Konstrukte noch mehr absinkt, haben wir in statisch kultivierten Leitschienen die Sauerstoffkonzentration aus dem Zentrum abgeleitet. Diese Sauerstoffmesswerte in der geometrischen Mitte der besiedelten Leitschienen zeigten im zeitlichen Verlauf einen stärkeren Abfall als die an der Oberfläche gemessenen Werte und lagen somit in den ausgewerteten Intervallen jeweils niedriger. Nach nur 5 Tagen fiel die Sauerstoffkonzentration im Zentrum der besiedelten Leitschienen auf 0% (siehe Abb. 10). Aus der Differenz zwischen den an der Oberfläche und im Zentrum der Konstrukte gemessenen

Sauerstoffkonzentrationen kann das Vorliegen eines Sauerstoffgradienten von der Oberfläche zur Mitte der Leitschiene geschlossen werden (siehe Abb. 10).

Um das Zellüberleben innerhalb der Leitschienen zu bestimmen wurden die zusätzlich angefertigten *live-dead-assays* ausgewertet. In den nach drei beziehungsweise fünf Tagen aus dem System entnommenen Leitschienen stellten sich nahezu alle Zellen innerhalb der Leitschienen als lebend (grün) dar, obwohl am fünften Tag bereits sehr niedrige Sauerstoffkonzentrationen von circa 1 % gemessen wurden (Abb. 11 a, b). Die nach sieben Tagen angefertigten *live-dead-assays* stellten zahlreiche tote Zellen (rot) insbesondere im Zentrum und am Boden der Leitschienen dar, während nur noch an den seitlichen und oberen Rändern lebende Zellen beobachtet werden konnten (Abb. 11 c).

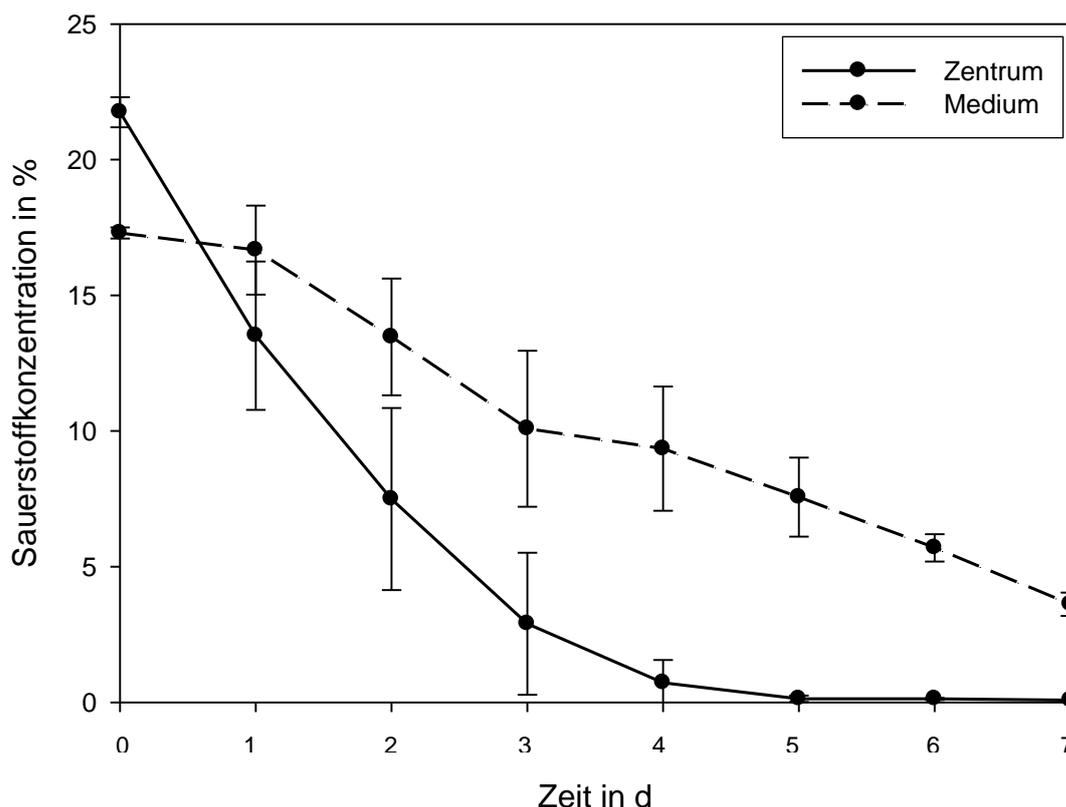


Abb. 10 Sauerstoffmessung unter statischen Zellkulturbedingungen im Zentrum und an der Oberfläche der besiedelten Leitschienen: Die Sauerstoffkonzentration im Zentrum der mit 50.000 Zellen (MC3T3) besiedelten Leitschienen fällt nach nur fünf Tagen auf Null, während die an der Oberfläche der Leitschiene gemessene Sauerstoffkonzentration nach sieben Tagen bei circa 4 % liegt, woraus sich auf das Vorliegen eines Sauerstoffkonzentrationsgradienten von der Oberfläche zum Zentrum der besiedelten Leitschiene schließen lässt. Anzahl der Versuchswiederholungen: n=2

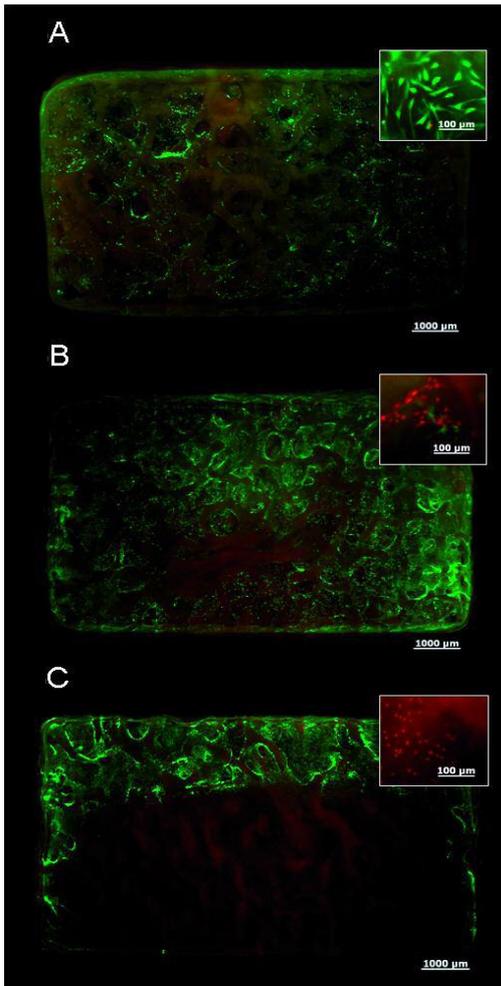


Abb. 11 Untersuchungen der Zellvitalität mit Hilfe des *live-dead-assay* an statisch kultivierten Konstrukten – Überblick: 1,25-fache Vergrößerung – Ausschnitt: 10-fache Vergrößerung eines repräsentativen zentralen Abschnittes. Während nach 3 Tagen (A) noch nahezu alle Zellen vital (grün) erscheinen, können nach 5 Tagen (B) bereits zahlreiche tote Zellen (rot) im Zentrum der Leitschiene beobachtet werden. 7 Tage (C) statische Zellkultur führte zum nahezu vollständigen Absterben der Zellen im Zentrum und am Boden der Konstrukte.

3.1.3. Untersuchung der Übertragbarkeit des Modells auf humane Zellen

Da der Großteil der Versuche mit schnell wachsenden, murinen Zellen durchgeführt wurde, sollte die Übertragbarkeit der so gewonnenen Ergebnisse auf humane Zellen unter statischen Zellkulturbedingungen überprüft werden. Bei Auftragung der im Zentrum der Leitschiene gemessenen Sauerstoffkonzentration über die Zeit unter Verwendung von humanen SCP-Zellen (durch single cell picking gewonnene und mittels hTERT immortalisierte mesenchymale Stammzellen) stellen sich hierbei sehr ähnliche Verhältnisse wie bei Verwendung der murinen Präosteoblasten dar. Es konnte ein im zeitlichen Verlauf deutlicher Abfall der Sauerstoffkonzentration im Zentrum der Leitschiene beobachtet werden, wobei nach circa 5 Tagen Sauerstoffmesswerte nahe Null gemessen wurden (siehe Abb. 12).

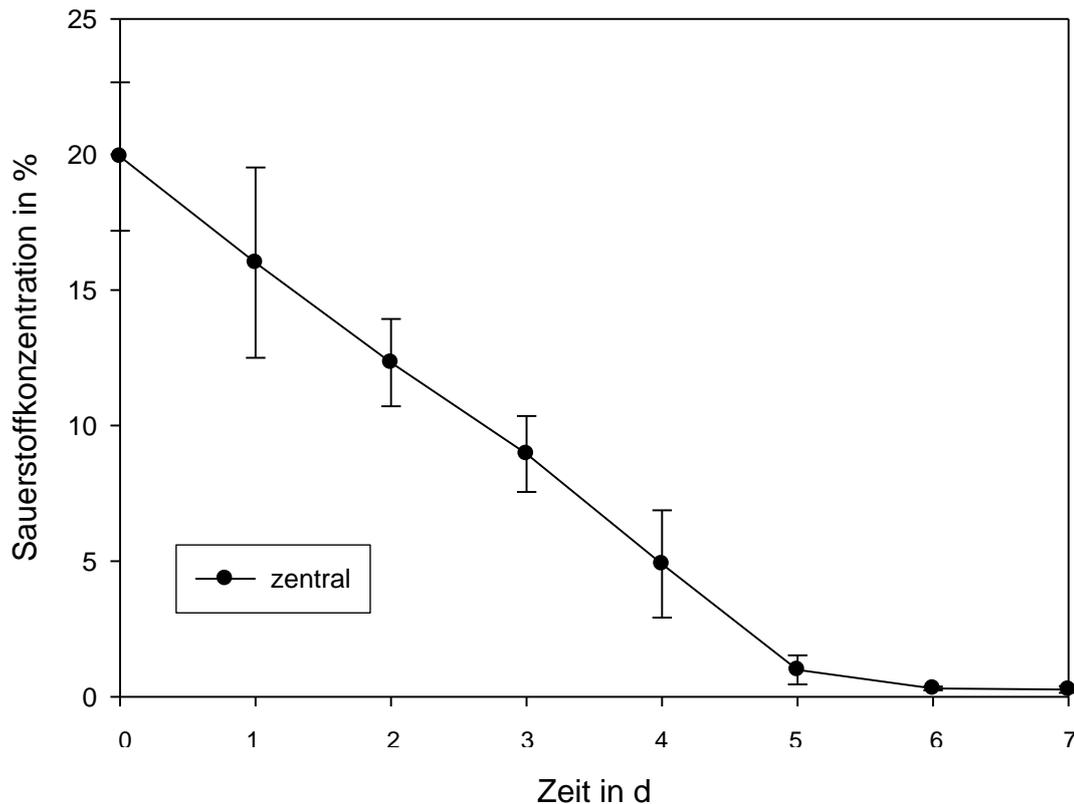


Abb. 12 Darstellung der Sauerstoffmesswerte im Zentrum von mit 50.000 humanen SCP-1 Zellen besiedelten und statisch kultivierten Leitschienen: Die Sauerstoffkonzentration im Zentrum der mit 50.000 humanen Zellen (SCP-1) besiedelten Leitschienen fällt in Analogie zu den Versuchen an murinen Zellen nach nur fünf Tagen auf Werte nahe Null ab. Anzahl der Versuchswiederholungen: n=2

3.2. Ergebnisse unter dynamischen Zellkulturbedingungen

Bei ansonsten identischem Versuchsaufbau und Besiedlung mit ebenfalls 50.000 MC3T3 Zellen wurden nun die Sauerstoffmesswerte und das Zellüberleben unter dynamischen Zellkulturbedingungen untersucht, wobei wie oben angeführt zwischen einer Versuchsdurchführung ohne (Standardperfusion) und mit einem Perfusionsring (forcierte Perfusion) unterschieden wurde.

3.2.1. Versuche unter dynamischen Bedingungen mit Standardperfusionsgeschwindigkeit

Die Sauerstoffmessungen unter dynamischen Zellkulturbedingungen bei Standardperfusion-*setup* und -geschwindigkeit zeigten im Vergleich zu den Versuchen unter statischen Bedingungen (siehe Abb. 13 c) einen deutlich langsameren Abfall der Sauerstoffmesswerte, wobei auch unter dynamischen

Zellkulturbedingungen nach einigen Tagen hypoxische Sauerstoffkonzentrationen erreicht wurden. Die Sauerstoffkonzentration fiel allerdings im Unterschied zu den Messungen unter statischen Bedingungen innerhalb des Messintervalls nicht auf Null. Die Sauerstoffmesswerte unterschieden sich dabei kaum in Abhängigkeit von der Verwendung des Perfusionsrings (Standard- versus forcierte Perfusion).

Bei Betrachtung der Sauerstoffmesswerte am Mediumzu- und abfluss im Vergleich zu den Messwerten innerhalb des Zentrums der Leitschiene kann festgestellt werden, dass am Mediumzufluss eine relativ konstante Sauerstoffkonzentration von circa 20% gemessen werden konnte (siehe Abb. 13). Die Sauerstoffmesswerte am Mediumabfluss fielen im Beobachtungszeitraum bis auf circa 12,5 % ab, was auf den Sauerstoffverbrauch der Zellen innerhalb der Leitschiene zurückgeführt werden kann (siehe Abb. 13). Die zu jedem Zeitpunkt niedrigsten Messwerte ergaben sich im Zentrum der besiedelten Leitschienen, was auch unter dynamischen Zellkulturbedingungen auf das Bestehen eines Gradienten von der Oberfläche zum Zentrum solcher besiedelten Leitschienen hinweist (Abb. 13 d, durchgängige Linie).

Die Untersuchung des Zellüberlebens am Ende des Beobachtungsintervalls zeigte deutliche Unterschiede im Vergleich zur Versuchsdurchführung unter statischen Bedingungen (siehe Abb. 13 a und 13 b). Es konnten deutlich mehr lebende Zellen und deutlich weniger tote Zellen mit Hilfe des *live-dead-assay* detektiert werden, so dass auf einen positiven Effekt der dynamischen Zellkulturbedingungen auf das Zellüberleben und die Kulturbedingungen insbesondere im Zentrum besiedelter Leitschienen geschlossen werden kann. Zwischen der Versuchsdurchführung unter Standard- und forcierter Perfusion ergaben sich nur leichte Unterschiede zugunsten der forcierter Perfusion (Abb. 13).

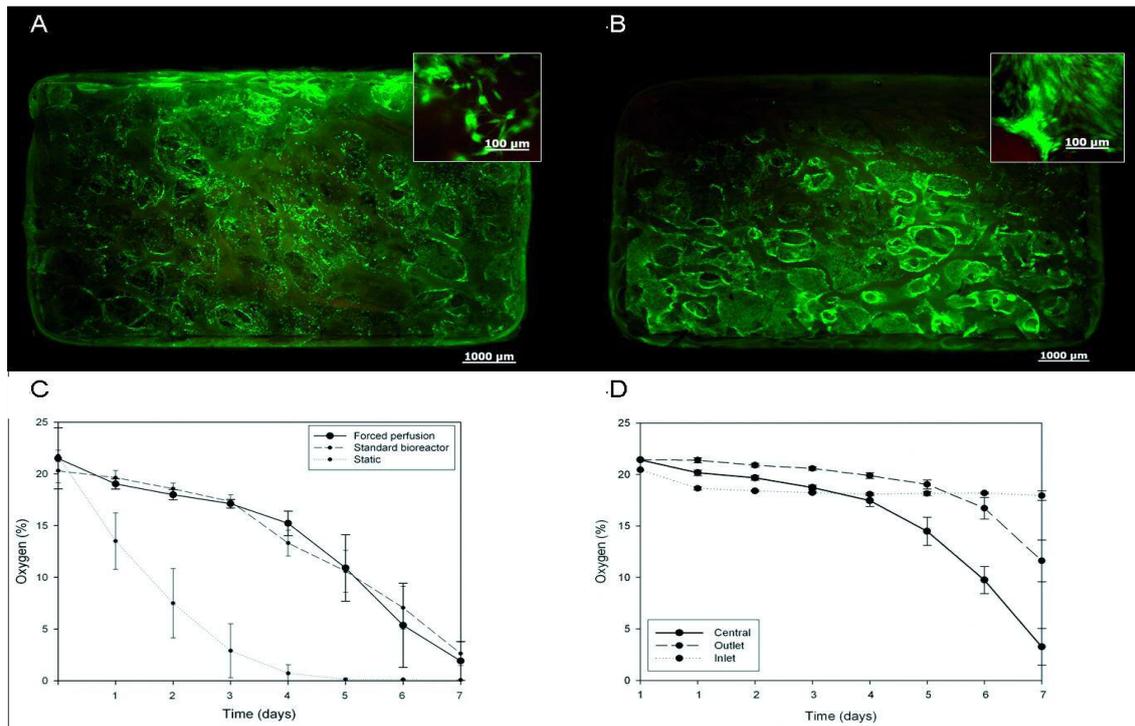


Abb. 13 Darstellung der Sauerstoffmesswerte und des Zellüberlebens unter dynamischen Zellkulturbedingungen im Vergleich zu den Ergebnissen unter statischen Bedingungen. 14 a und b: Live-dead-assay von dynamisch kultivierten Leitschienen (a: ohne und b: mit Anwendung eines Perfusionsringes); 14c: Vergleich der im Zentrum der Leitschienen gemessenen Sauerstoffkonzentrationen unter statischen Bedingungen (gepunktete Linie) mit den unter dynamischen Zellkulturbedingungen (Standardperfusion: gestrichelte Linie; forcierte Perfusion: durchgezogene Linie); 14d: unter dynamischen Zellkulturbedingungen (forcierte Perfusion) gemessene Sauerstoffkonzentration zentral (durchgezogene Linie), am Mediumzufluss (gepunktete Linie) und am Mediumabfluss (gestrichelte Linie). Anzahl der Versuchswiederholungen: n=2

3.2.2. Quantitative Auswertung des Zellüberlebens durch Zellzählung

Um die Anzahl an überlebenden Zellen im Zentrum der Leitschienen unter den unterschiedlichen Bedingungen vergleichen zu können wurde eine Zellzählung in 500 μm x 500 μm Arealen im Bereich des Zentrums der Leitschiene durchgeführt. In diesem zentralen Areal der Leitschienen, welche über 7 Tage unter statischen Bedingungen kultiviert wurden, konnten keine überlebenden Zellen detektiert werden. Bei Standardperfusionsgeschwindigkeit (18 $\mu\text{l}/\text{min}$) und -bedingungen (kein Perfusionsring im Bioreaktor) wurden signifikant ($p < 0,01$) mehr überlebende Zellen im Zentrum der Leitschiene beobachtet (siehe Abb. 14). Eine weitere Verbesserung des Zellüberlebens nach Auswertung des *live-dead-assay* konnte bei gleicher Perfusionsgeschwindigkeit unter Anwendung der forcierten Perfusionsbedingungen (mit Perfusionsring im Bioreaktor) beobachtet werden. Die Verwendung dieses Versuchsaufbaus resultierte nochmals in einer signifikant größeren Anzahl lebender

Zellen in definierten Abschnitten des Zentrums der Leitschiene ($p < 0,01$). Daher wurde für die weiteren Versuche nur noch dieser Versuchsaufbau verwendet.

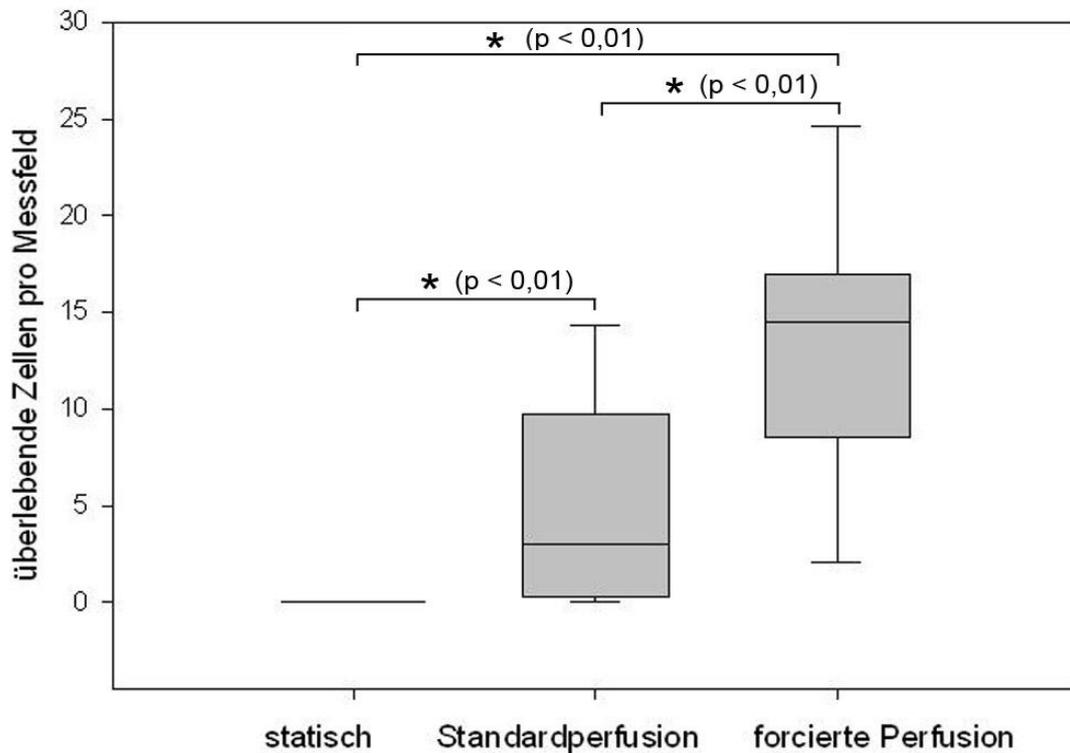


Abb. 14 Vergleich des Zellüberlebens im Zentrum der Leitschienen unter statischen und dynamischen (Standardperfusion / forcierte Perfusion) Kulturbedingungen: Quantifizierung der lebenden Zellen in Ausschnitten von $500\mu\text{m} \times 500\mu\text{m}$ aus dem geometrischen Zentrum der Leitschienen: unter statischen Bedingungen sind im Zentrum der Leitschienen keine lebenden Zellen nachweisbar. Unter Standardperusionsbedingungen ($p < 0,01$) sowie unter den Bedingungen der forcierten Perfusion ($p < 0,01$) konnten bei analogem Vorgehen signifikant mehr lebende Zellen nachgewiesen werden. Beim Vergleich der Anzahl überlebenden Zellen zwischen Standardperfusion und forcierte Perfusion ließen sich signifikant mehr überlebende Zellen bei forcierte Perfusion nachweisen ($p < 0,01$). Anzahl der Versuchswiederholungen: $n=2$

3.2.3. Versuche unter dynamischen Bedingungen mit gesteigerter Perfusionsgeschwindigkeit

Aufgrund der deutlichen Unterschiede zwischen statischen und dynamischen Zellkulturbedingungen sollte im Folgenden untersucht werden, ob aus einer weiteren Steigerung der Perfusionsgeschwindigkeit auch eine weitere Verbesserung der Sauerstoffversorgung und des Zellüberlebens resultieren würde. Damit die Erhöhung der Perfusionsgeschwindigkeit auch zu einer Erhöhung der Perfusion durch die Leitschiene führt und nicht zu einer stärkeren Perfusion um die Leitschiene herum, wurden alle Versuche mit erhöhter Geschwindigkeit unter Verwendung des angefertigten Perfusionsrings (forcierte Perfusion) durchgeführt. Zur Objektivierung

des Zellüberlebens und der Zellaktivität wurde neben dem *live-dead-assay* zusätzlich ein WST-assay eingesetzt.

Durch Steigerung der Perfusionsgeschwindigkeit auf das Dreifache ($54 \mu\text{l}/\text{min}$) beziehungsweise auf das Fünffache ($90 \mu\text{l}/\text{min}$) konnte der Abfall der Sauerstoffkonzentration im Zentrum der Leitschienen deutlich verlangsamt werden (siehe Abb. 15). Es resultierten deutlich höhere Sauerstoffkonzentrationen im Zentrum der Leitschiene am Ende des Messintervalls von sieben Tagen. Die zentral registrierten Messwerte lagen am siebten Tag mit circa 12% bei dreifacher Perfusionsgeschwindigkeit und circa 14% bei fünffacher Geschwindigkeit deutlich höher als die bei einfacher Perfusionsgeschwindigkeit ermittelten Werte von circa 4,5% (siehe Abb. 15 und 16). Die Sauerstoffmesswerte im zuführenden Schenkel des Bioreaktors lagen erwartungsgemäß auch bei drei- und fünffacher Perfusionsgeschwindigkeit bei circa 20%. Die Erhöhung der Perfusionsgeschwindigkeit führte auch zu einer Verminderung des Abfalls der Sauerstoffmesswerte im abführenden Schenkel des Bioreaktors.

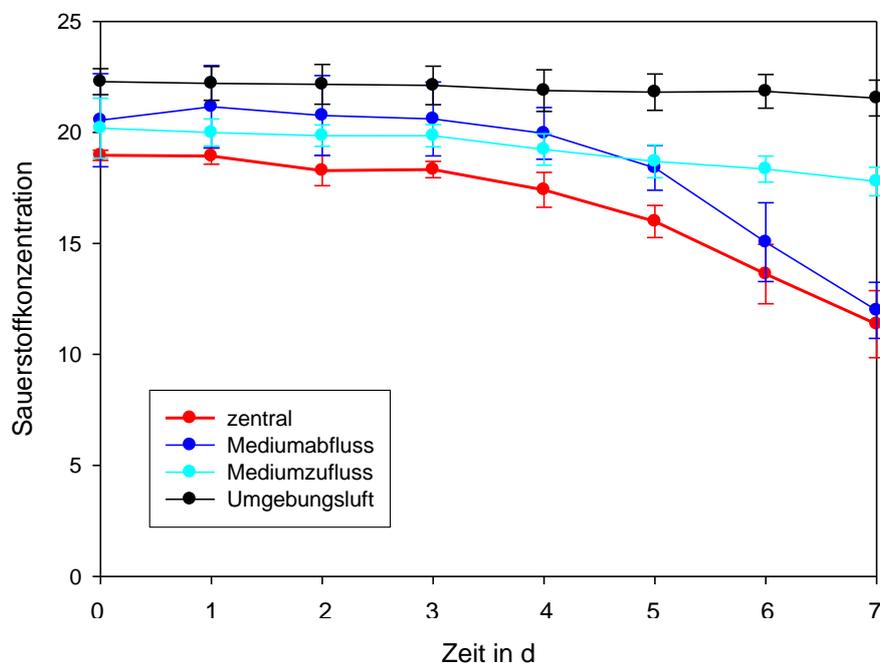


Abb. 15 Sauerstoffmessung unter dynamischen Zellkulturbedingungen mit dreifacher Perfusionsgeschwindigkeit ($54 \mu\text{l}/\text{min}$). Der Abfall der Sauerstoffkonzentration im Zentrum der Leitschiene (roter Graph) stellt sich hierbei im Vergleich zur Messung unter statischen Bedingungen und dynamischen Bedingungen mit einfacher Perfusionsgeschwindigkeit deutlich weniger ausgeprägt dar. Anzahl der Versuchswiederholungen: $n=2$

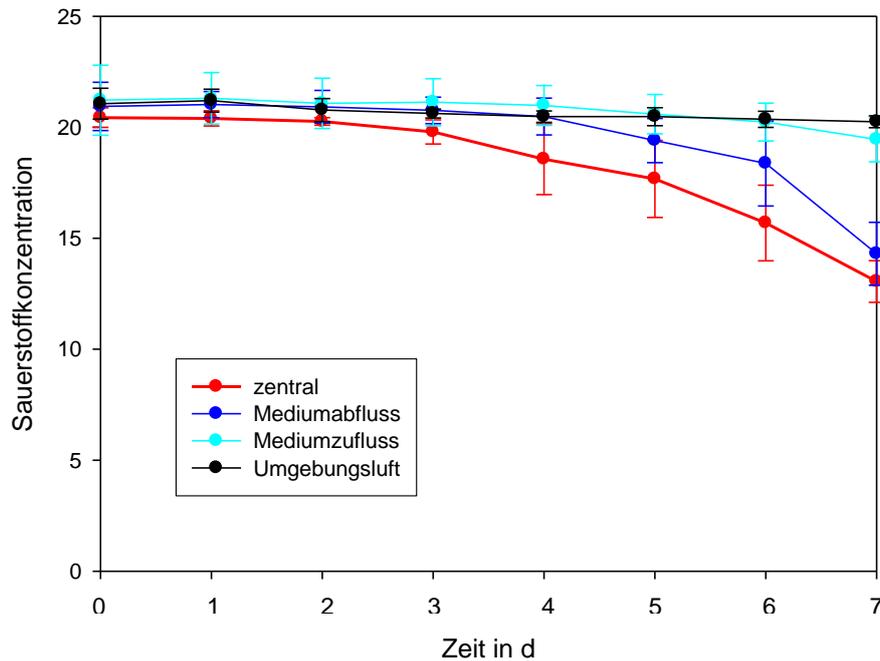


Abb. 16 Sauerstoffmessung unter dynamischen Zellkulturbedingungen mit fünffacher Perfusionsgeschwindigkeit (90 $\mu\text{l}/\text{min}$). Auch bei fünffacher Perfusionsgeschwindigkeit bestätigt sich der weniger ausgeprägte Abfall der zentralen Sauerstoffkonzentration im Vergleich zu den statischen Bedingungen und der dynamischen Versuchsanordnung mit einfacher Perfusionsgeschwindigkeit. Anzahl der Versuchswiederholungen: $n=2$

3.2.4. Auswertung der *live-dead-assays* unter dynamischen Bedingungen

Im Vergleich der Ergebnisse des *live-dead-assays* bei einfacher (18 $\mu\text{l}/\text{min}$), dreifacher (54 $\mu\text{l}/\text{min}$) und fünffacher Perfusionsgeschwindigkeit (90 $\mu\text{l}/\text{min}$) fiel eine mit zunehmender Perfusionsgeschwindigkeit zunehmende Anzahl überlebender (grün gefärbter) Zellen bei gleichzeitig abnehmender Anzahl toter (rot gefärbter) Zellen auf (siehe Abb.17 a-c). Die Zunahme an überlebenden Zellen erwies sich hierbei im Zentrum der Leitschiene als besonders ausgeprägt. Dies stellt eine weitere qualitative Bestätigung der günstigeren Bedingungen für das Zellüberleben unter dynamischen Zellkulturbedingungen insbesondere in den zentralen und somit hypoxiegefährdeten Regionen der Leitschienen dar.

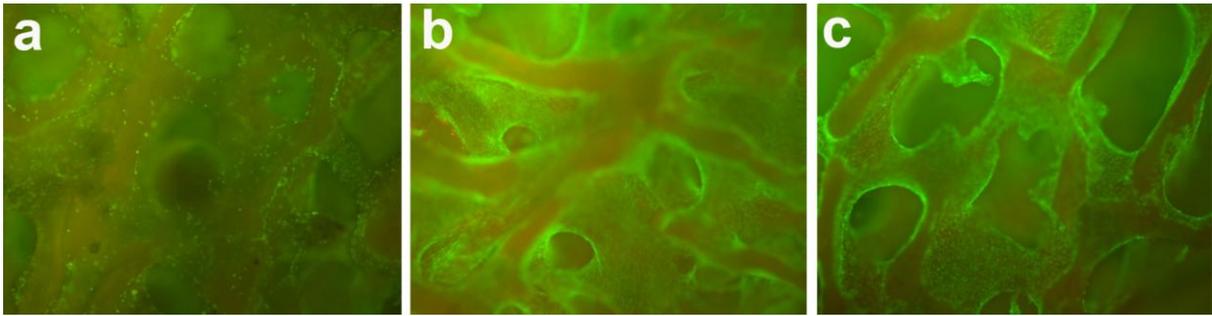


Abb. 17 Auswertung der *live-dead-assays* bei dynamischen Zellkultur mit unterschiedlichen Perfusionsgeschwindigkeiten (a: 18 $\mu\text{l}/\text{min}$ b: 54 $\mu\text{l}/\text{min}$ c: 90 $\mu\text{l}/\text{min}$). Hier fluoreszenzmikroskopische Darstellung repräsentativer zentraler Ausschnitte bei 10-facher Vergrößerung, wobei bei allen Versuchen mit dynamischen Zellkulturbedingungen im Unterschied zu den statischen Zellkulturbedingungen lebende Zellen im Zentrum der Leitschienen beobachtet werden konnten. Beim Vergleich der verschiedenen dynamischen Versuchsanordnungen fiel qualitativ eine Tendenz zur Zunahme der überlebenden Zellen bei steigender Perfusionsgeschwindigkeit auf.

3.2.5. Ergebnisse der *WST*-assay Untersuchungen unter dynamischen Bedingungen

Auch der ergänzend durchgeführte *WST*-assay, der Rückschlüsse auf die Quantität und metabolische Aktivität der Zellen zulässt, bestätigte eine Zunahme der Zellzahl mit zunehmender Perfusionsgeschwindigkeit. Die bestimmten Extinktionswerte konnten nach Abzug der Extinktion der Mediumkontrollwerte sowie unter Berücksichtigung einer mit bekannten Zellzahlen bestimmten Eichkurve durch lineare Regression in eine Zellzahl umgerechnet werden.

Im der Untersuchung zugeführten Leitschienenanteil ergaben sich bei einer Perfusionsgeschwindigkeit von 18 $\mu\text{l} / \text{min}$ eine Extinktion von 1,616, welche unter Berücksichtigung der bestimmten Eichgeraden einer Zellzahl von circa 53.250 entsprach. Die für eine Perfusionsgeschwindigkeit von 54 $\mu\text{l} / \text{min}$ bestimmte Extinktion entsprach circa 136.400 Zellen, während bei einer Perfusionsgeschwindigkeit von 90 $\mu\text{l} / \text{min}$ der höchste relative Extinktionswert bestimmt werden konnte, der wiederum unter Berücksichtigung der zugehörigen Eichgerade einer Zellzahl von circa 313.450 entsprach. Die Ergebnisse bestätigen somit semiquantitativ eine Begünstigung des Zellüberlebens und der Proliferation in den verwendeten dynamisch kultivierten Leitschienen bei zunehmender Perfusionsgeschwindigkeit.

3.2.6. Auswertung der *area under the curve* der Sauerstoffmesswerte

Die quantitative Auswertung der *area under the curve* der zentralen Sauerstoffmesswerte über die Zeit ist in Abb. 18 dargestellt. Es zeigt sich ein deutlicher und signifikanter ($p < 0,01$) Unterschied der AUC im Vergleich zwischen statischen und dynamischen Zellkulturbedingungen, die auf eine deutlich bessere Sauerstoffversorgung unter dynamischen Bedingungen im Zentrum der Leitschiene schließen lässt.

Bei dynamischen Bedingungen und einfacher Perfusionsgeschwindigkeit konnte kein Unterschied zwischen dem Versuchsaufbau mit und ohne Perfusionsring festgestellt werden. Bei Zunahme der Perfusionsgeschwindigkeit fiel jedoch ein Anstieg der AUC auf, der auf eine bessere Sauerstoffversorgung der zentralen Leitschienenareale bei steigender Perfusionsgeschwindigkeit schließen lässt.

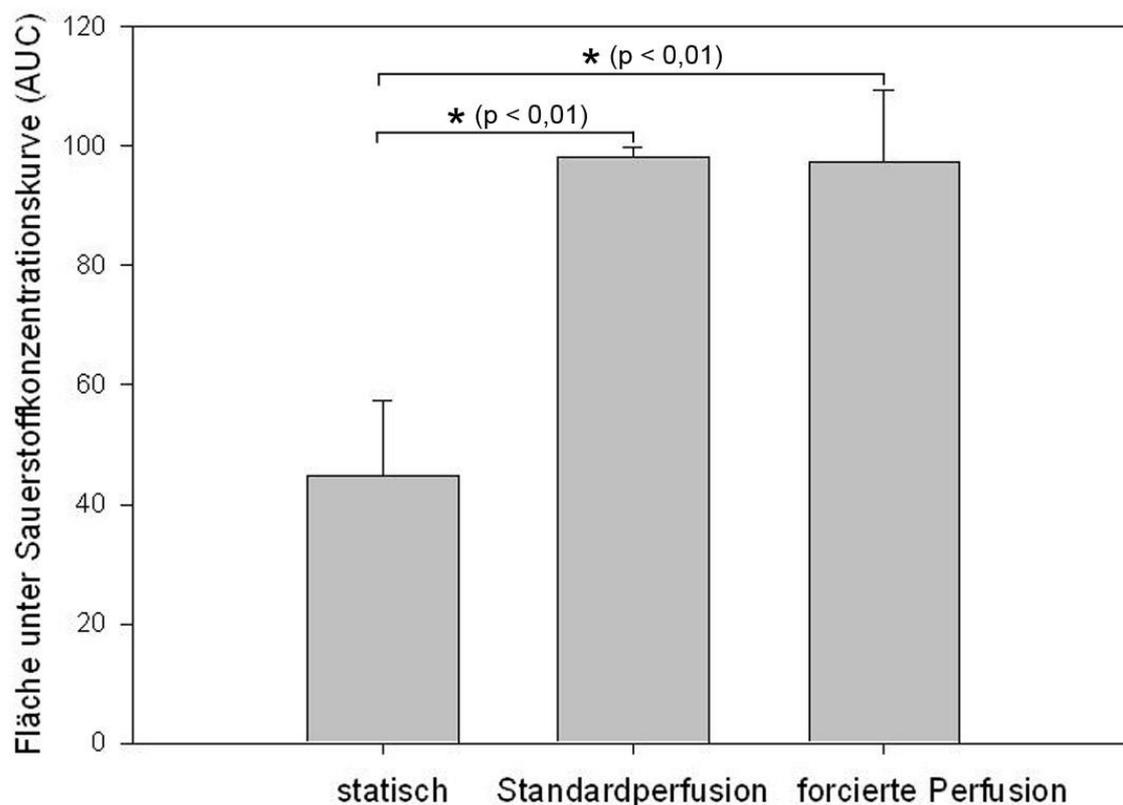


Abb. 18 Auswertung der Fläche unter der Sauerstoffkonzentrationskurve (*area under the curve* = AUC) im Vergleich statische versus dynamische Zellkulturbedingungen. Die unter statischen Zellkulturbedingungen bestimmte Fläche unter der Sauerstoffkonzentrationskurve ist dabei signifikant ($p < 0,01$) kleiner als die unter dynamischen Zellkulturbedingungen bestimmten Sauerstoffkonzentrationskurven. Zwischen der Versuchsanordnung mit Standardperfusion und forcierter Perfusion konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Anzahl der Versuchswiederholungen: $n=2$

4. Diskussion

Eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen ist Grundvoraussetzung für das Zellüberleben in jedem Gewebe und somit auch für das Leitschienen-basierte *tissue engineering* von Knochen (34). Aufgrund der Dreidimensionalität der hierfür verwendeten Konstrukte kann es zu einer inhomogenen Verteilung von Sauerstoff und Nährstoffen kommen. Hinsichtlich der Sauerstoffversorgung resultieren aus der niedrigen Löslichkeit von Sauerstoff in wässrigen Lösungen sowie seiner niedrigen Diffusionskapazität besondere Schwierigkeiten, wenn es um die Etablierung dreidimensionaler Zellkultursysteme geht (39;43). In derartigen Systemen für das *tissue engineering* von Herzmuskel- und Knorpelgewebe konnten relevante Sauerstoffgradienten nachgewiesen werden. Die Existenz derartiger Gradienten in dreidimensionalen Zellkultursystemen zur Züchtung von Knochen ist bisher nicht quantitativ belegt. Die Auswirkung potenzieller Gradienten für das Zellüberleben und die Gewebequalität sind nicht ausreichend geklärt. Da eine Minderversorgung mit Sauerstoff ein limitierender Faktor für das Zellüberleben in zellbesiedelten Konstrukten ist (48), sollte der Versuch einer Optimierung der Sauerstoffversorgung mit Hilfe dynamischer Zellkultursysteme unternommen werden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand somit in der Untersuchung und Optimierung der Sauerstoffversorgung von dreidimensionalen Zellkultursystemen für das *tissue engineering* von Knochen.

4.1. Statische Zellkultursysteme für das *tissue engineering* von Knochen

In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass dreidimensionale Zellkultursysteme für das *tissue engineering* von Knochen unter statischen Bedingungen mit dem Auftreten hypoxischer Bedingungen insbesondere in den zentralen Arealen einhergehen. Aus den gewonnenen Ergebnissen lässt sich die Existenz eines Sauerstoffgradienten von der Oberfläche der besiedelten Leitschienen zum Zentrum hin ableiten, welcher die Grundlage für die Inhomogenitäten im Zellüberleben und der Gewebequalität darstellt. Der langsam

beginnende Abfall der Sauerstoffkonzentration im Zentrum der Leitschiene erklärt sich aus der zunächst relativ geringen Anzahl von Zellen in der Leitschiene, die sich ansiedeln und vermehren. Diese zunehmende Anzahl sauerstoffverbrauchender Zellen führt dann zu einem Abfall insbesondere der zentralen Sauerstoffkonzentration und limitiert somit das Zellüberleben sowie die weitere Zellvermehrung.

Der höhere Sauerstoffverbrauch bei initial gleicher Zellzahl unter dreidimensionalen im Vergleich zu zweidimensionalen Bedingungen (Abb. 9) erklärt sich aus der schnell erreichten Zellkonfluenz bei Vermehrung der Zellen unter zweidimensionalen Bedingungen, welche zur Hemmung der weiteren Proliferation führt. In dreidimensionalen Zellkultursystemen besteht dagegen die Möglichkeit einer stärkeren Zellvermehrung, da aufgrund der größeren Oberfläche eine deutlich stärkere Zellvermehrung möglich ist. Daraus erklärt sich der erhöhte Sauerstoffverbrauch und die zunehmende Bedeutung einer adäquaten Sauerstoffversorgung unter dreidimensionalen Zellkulturbedingungen. Von besonderer Bedeutung scheint eine suffiziente Sauerstoffversorgung in den frühen Proliferationsphasen zu sein, da Zellen in diesen einen höheren Sauerstoffbedarf aufweisen als in späteren Phasen der Proliferation (38;41).

Die Entstehung einer zentralen Hypoxie in dreidimensionalen Zellkultursystemen sowie die Etablierung eines Sauerstoffkonzentrationsgradienten von der Oberfläche zum geometrischen Zentrum der besiedelten Konstrukte ist somit in Übereinstimmung mit neueren Ergebnissen in statischen 3D-Kulturen aus Kardiomyozyten und Chondrozyten (39;41;50). Malda et al. berichteten hierbei unter statischen Bedingungen über Sauerstoffkonzentrationen von circa 5% in dreidimensionalen Chondrozytenkulturen (39), während die Arbeitsgruppe um Kellner unter Verwendungen dickerer Leitschienen (4x4 mm gegenüber 5x2 mm) sogar einen Abfall der Sauerstoffkonzentration unter 1% feststellte (50).

Ein wesentlicher Unterschied in der Betrachtung dreidimensionaler Zellkultursysteme für Knorpel und Knochen liegt allerdings darin, dass Chondrozyten, als wichtigste zelluläre Komponente des bradytrophen Knorpelgewebes, eine ausgeprägte Hypoxietoleranz besitzen, ja diese sogar für ihre Proliferation und Differenzierung

benötigen (39;45). Im Gegensatz dazu ist die optimale Sauerstoffkonzentration für die Kultivierung von Knochenzellen nicht bekannt.

Aus den Ergebnissen unserer Experimente wird allerdings deutlich, dass ein zu starker Abfall der Sauerstoffkonzentration mit absoluter Hypoxie im Zentrum der Leitschiene zum Absterben der Zellen im Bereich dieser extremen Hypoxie führt. Dies lässt für die klinische Anwendung die Gefahr der Entstehung von Inhomogenitäten der Gewebequalität mit allen nachfolgenden Konsequenzen vermuten. Man kann zudem schlussfolgern, dass der Sauerstoffversorgung eine entscheidende und zumindest unter statischen Bedingungen die Größe und klinische Anwendbarkeit der Konstrukte limitierende Bedeutung zukommt. Da diese Einschränkungen schon nach kurzer Zeit und trotz der geringen Dimensionierung der verwendeten Leitschienen (Durchmesser 9 mm; Höhe 5 mm) zum Absterben der Zellen im Zentrum der Leitschienen führte, lässt sich schlussfolgern, dass statische Zellkultursysteme ungeeignet für das leitschienenbasierte *tissue engineering* von Knochenersatz sind. Die Überwindung der Limitationen hinsichtlich der Sauerstoffversorgung und Größe der verwendbaren Leitschienen kann somit einen wichtigen Beitrag zur Verbreitung der klinischen Anwendbarkeit des Leitschienenbasierten *tissue engineerings* darstellen.

4.1.1. Untersuchung der Übertragbarkeit des Modells auf humane Zellen

Die klinische Relevanz der Ergebnisse wird auch durch die Tatsache unterstrichen, dass sich die an gut proliferierenden murinen Zellen gewonnenen Erkenntnisse auch auf schnell wachsende humane Zellen (SCP-Zellen) übertragen ließen (siehe Abb. 12). Vor dem Hintergrund der verhältnismäßig geringen Zellzahl, mit der die Leitschienen besiedelt wurden, können sich unter klinischen Bedingungen sogar noch ausgeprägtere Gradienten sowie ein noch rascherer Abfall der Sauerstoffkonzentration ergeben. Es muss jedoch erwähnt werden, dass bis dato die für die Entwicklung und Proliferation von Knochenvorläuferzellen optimalen Sauerstoffkonzentrationen *in vivo* und *in vitro* unbekannt sind, wobei von einer relativen Hypoxietoleranz ausgegangen werden kann. Mit zunehmender Größe der verwendeten Konstrukte und steigender Zellzahl beziehungsweise Zellvermehrung können die Grenzen dieser Toleranz jedoch leicht unterschritten werden.

Zusammenfassend lässt sich konstatieren, dass statische Zellkulturbedingungen für das *tissue engineering* von dreidimensionalen Knochenkonstrukten als ungeeignet erscheinen und die klinische Anwendbarkeit von der Überwindung der entstehenden zentralen Hypoxie und der Vermeidung der Etablierung zu starker Sauerstoffgradienten mit konsekutiven Inhomogenitäten der Gewebequalität abhängt.

4.2. Dynamische Zellkultursysteme für das *tissue engineering* von Knochen

Die durchgeführten Versuche unter dynamischen Zellkulturbedingungen führten zu einer deutlichen Verbesserung der Sauerstoffversorgung innerhalb der Leitschienen sowie zu einer Verminderung des Sauerstoffgradienten von der Oberfläche der Leitschiene zum Zentrum. Daraus resultierend wurden die Bedingungen für das Zellüberleben, insbesondere im Zentrum der Leitschiene deutlich verbessert.

Dynamische Zellkultursysteme wurden entwickelt, um die Nährstoffversorgung und den Abtransport von Stoffwechselendprodukten in dreidimensionalen Zellkultursystemen zu verbessern (49;51). Flow-Perfusions-Bioreaktoren gelten als besonders geeignet für die Versorgung von dreidimensionalen Zellkultursystemen von Knochen, da durch den Durchfluss von Medium eine ständige mechanische Stimulation durch auf die Zellen einwirkende Scherkräfte hervorgerufen wird. Zudem sind Perfusionseinschränkungen weniger ausgeprägt als bei anderen dynamischen Zellkultursystemen(54-57).

Bei näherer Betrachtung der Sauerstoffmesswerte im Untersuchungszeitraum kann unter dynamischen (Standardperfusion und forcierte Perfusion) im Unterschied zu statischen Bedingungen ein deutlich langsamerer Abfall der Sauerstoffkonzentration und ein erheblich veränderter Kurvenverlauf festgestellt werden (siehe Abb. 13 c). Diese Veränderung der zentralen Sauerstoffkonzentration lässt sich sowohl bei Standardperfusion als auch bei forcierter Perfusion in vergleichbarer Weise feststellen und führt zu einer deutlich vergrößerten area under the curve (AUC) und konsekutiv zu einer deutlichen Verbesserung hinsichtlich des Zellüberlebens. Diese Unterschiede insbesondere hinsichtlich des Zellüberlebens im Zentrum der

Leitschiene können als direkte Folge der verbesserten Sauerstoff- und Nährstoffzufuhr interpretiert werden.

Dennoch muss festgestellt werden, dass am Ende des Untersuchungszeitraumes eine deutlich niedrigere Sauerstoffkonzentration vorliegt als am Beginn des Versuchszeitraumes. Dieser Abfall der Sauerstoffkonzentration konnte sowohl unter forcierter Perfusion als auch unter Standardperforationsbedingungen bei einfacher Perforationsgeschwindigkeit beobachtet werden. Die Konsequenzen dieser zentralen Hypoxie sind aufgrund unserer noch unzureichenden Kenntnisse hinsichtlich der komplexen Wechselwirkungen zwischen Sauerstoffkonzentration und Zellwachstum sowie Differenzierung aktuell schwierig zu interpretieren. Möglicherweise werden kurzzeitige hypoxische Phasen problemlos toleriert. Andererseits können längere und ausgeprägte Hypoxien durch Wachstums- und Proliferationshemmung Grundlage für Inhomogenitäten der Gewebequalität mit Entstehung von Gradienten von der Oberfläche zum Zentrum sein oder im Extremfall zum Zelltod führen. Es ist davon auszugehen, dass das Problem der zentralen Hypoxie umso ausgeprägter ist, je größer die Dimensionen der Leitschiene sind und je geringer die Interkonnektivität der Poren ist. Da für den klinischen Einsatz relevante Leitschienen eine zum Teil erhebliche Größe haben dürften, besteht die dringende Notwendigkeit zur weiteren Verbesserung der Perforationsbedingungen.

Es ist bekannt, dass zahlreiche primäre Zelllinien in der Lage sind, sich niedrigen Sauerstoffkonzentration durch Umstellung von Stoffwechselwegen anzupassen (58). Die in den beschriebenen Experimenten verwendete murine Zelllinie (MC3T3) ist aufgrund ihres schnellen Wachstumsverhaltens unter den Versuchsbedingungen zu dieser Anpassung nicht in der Lage gewesen. Einerseits scheint es im Rahmen eines Modells sinnvoll mögliche Schwächen des verwendeten Systems aufzudecken. Andererseits ergaben die Versuche unter Verwendung von humanen mesenchymalen Stammzellen unter statischen Versuchsbedingungen einen sehr ähnlichen Kurvenverlauf der Sauerstoffkonzentration, so dass die Vergleichbarkeit des verwendeten Modells mit den möglichen klinischen Anforderungen belegt werden konnte.

4.3. Versuche mit Steigerung der Perfusionsgeschwindigkeit

Aufgrund des deutlichen Unterschiedes zwischen statischen und dynamischen Zellkulturbedingungen bestand die Hoffnung, durch eine weitere Steigerung der Perfusionsgeschwindigkeit die Sauerstoffversorgung insbesondere der zentralen Leitschienenareale weiter verbessern zu können. Andererseits wurde befürchtet, dass ein stärkerer Mediumfluss in der Leitschiene zum Auswaschen der Zellen führen könnte. Um diese Hypothesen zu überprüfen wurden Versuche mit drei- und fünffacher Perfusionsgeschwindigkeit durchgeführt, welche eine mit zunehmender Perfusionsgeschwindigkeit bessere Oxygenierung der zentralen Leitschienenareale ergab. Darüber hinaus konnte mit Hilfe der Ergebnisse des *live-dead-assays* und des *WST-assays* eine Zunahme der Zellzahl in der Leitschiene bestätigt werden. Die optimale Perfusionsgeschwindigkeit ist wahrscheinlich für jede Leitschienenart, jeden Zelltyp und Bioreaktor unterschiedlich und muss daher für jeden Versuchsaufbau individuell titriert werden. Eine obere Grenze für die Perfusionsgeschwindigkeit ergibt sich dabei nicht nur durch die steigende Gefahr des Auswaschens der Zellen aus der Leitschiene, sondern auch durch die nicht unerheblichen Kosten für das benötigte Medium.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass dreidimensionale Zellkultursysteme für das *tissue engineering* von Knochen sowohl unter statischen als auch unter dynamischen Kulturbedingungen mit dem Auftreten von zentraler Hypoxie und der Entstehung von Sauerstoffgradienten verbunden sein können. Statische Zellkultursysteme sind aufgrund der Ausprägung der zentralen Hypoxie mit konsekutivem Zelltod ungeeignet für das *tissue engineering* von Knochen in klinisch relevanten Dimensionen. Die Verwendung von Bioreaktoren und dynamischen Zellkulturbedingungen erscheint hingegen als geeignete Möglichkeit, um die Ausprägung zentraler Hypoxien sowie entstehende Sauerstoffgradienten zu vermindern und somit das Zellüberleben innerhalb dreidimensionaler Konstrukte *in vitro* zu verbessern. Daneben lässt sich im Ergebnis unserer Versuche die Notwendigkeit zu einem Monitoring im Rahmen des *tissue engineering*s von dreidimensionalen Zellkultursystemen ableiten.

Eine wesentliche Herausforderung für die Zukunft stellt nicht nur die Verbesserung der Nährstoff- und Sauerstoffversorgung dieser dreidimensionalen Konstrukte *in vitro*

dar, sondern auch die Entwicklung adäquater Strategien, welche die Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff auch nach Implantation der Konstrukte *in vivo* gewährleistet.

5. Zusammenfassung

Zielsetzung und Fragestellung:

Das Vorliegen knöcherner Defekte ist ein wesentliches klinisches Problem in zahlreichen chirurgischen Disziplinen. Das *tissue engineering* von Knochen stellt eine innovative Methode dar, welche die Möglichkeit eröffnet, ein Knochenersatzmaterial in theoretisch unbegrenzter Menge und vorbestimmbarer Form bei minimaler oder fehlender Hebedefektmorbidität zu gewinnen. Trotz dieses immensen Potenzials konnte sich das *tissue engineering* in klinisch relevanten Ausmaßen noch nicht durchsetzen. Ein wesentliches Problem wird in der bei zunehmender Größe der Leitschienen inhomogenen Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen vermutet. Bisher konnte dies jedoch quantitativ für das *tissue engineering* von Knochen nicht belegt werden. Folglich fehlen auch Strategien zur Überwindung dieses Problems nahezu gänzlich.

Das Ziel der vorliegenden Untersuchung bestand daher darin, die Sauerstoffkonzentration im Zentrum besiedelter Leitschienen zunächst unter statischen Bedingungen zu messen und zu überprüfen, ob es zu Auswirkung auf das Überleben der Zellen kommt. Anschließend sollten die Bedingungen mit Hilfe eines dynamischen Zellkultursystems optimiert und wiederum der Einfluss auf die zentrale Sauerstoffkonzentration und das Zellüberleben ermittelt werden.

Material und Methoden:

Zylindrische Leitschienen aus demineralisierter boviner Matrix (DBM) mit einem Durchmesser von 9 mm und einer Höhe von 5 mm wurden unter Verwendung einer standardisierten Methodik mit 50.000 murinen präosteoblastären Zellen (MC3T3) besiedelt und anschließend unter statischen und dynamischen Bedingungen kultiviert. Unter statischen Bedingungen erfolgte der Mediumwechsel (Mem alpha) alle 48 Stunden, während unter dynamischen Bedingungen eine kontinuierliche Mediumzufuhr mit Hilfe einer Pumpe erfolgte. Als Standardperfusionsgeschwindigkeit wurde 18 µl/min verwendet. Weitere Versuche erfolgten mit drei- (54 µl/min) und fünffacher (90 µl/min) Perfusionsgeschwindigkeit.

Im Untersuchungszeitraum von sieben Tagen wurde die Sauerstoffkonzentration mit einer nadelartigen Sauerstoffsonde, die definiert ins geometrische Zentrum der Leitschiene appliziert wurde gemessen. Zusätzliche Messungen erfolgten unter statischen Bedingungen im umgebenden Medium, unter dynamischen Bedingungen im Mediumzu- und abfluss. Die Auswertung des Zellüberlebens und der Zellproliferation erfolgte mit Hilfe eines *live-dead-assays* sowie durch Zellzählung im Zentrum der Leitschiene.

Ergebnisse:

Unter statischen Zellkulturbedingungen kommt es im Zentrum der mit 50.000 Zellen besiedelten Leitschienen zu einem dramatischen Abfall der Sauerstoffkonzentration, wobei nach nur 5 Tagen die Sauerstoffkonzentration bei 0 % liegt. Konsekutiv kann im *live-dead-assay* ein ausgeprägtes Zellsterben, insbesondere im Zentrum der Leitschienen nachgewiesen werden. Hier konnten nach sieben Tagen keine überlebenden Zellen mehr beobachtet werden. Aus den Sauerstoffmessungen im umgebenden Medium sowie den Ergebnissen des *live-dead-assay* kann auf das Vorliegen eines deutlichen Sauerstoffgradienten von der Oberfläche zum Zentrum der besiedelten Leitschienen geschlossen werden. Diese Ergebnisse ließen sich bei Besiedlung mit 50.000 humanen SCP-Zellen bestätigen.

Unter Verwendung dynamischer Zellkulturbedingungen konnte der Abfall der zentralen Sauerstoffkonzentration deutlich vermindert und die Fläche unter der Sauerstoffkurve (AUC) signifikant ($p < 0,01$) vergrößert werden. Darüber hinaus konnte eine deutliche Verbesserung des Zellüberlebens beobachtet werden, insbesondere fielen signifikant ($p < 0,01$) mehr überlebende Zellen im Zentrum der Leitschiene auf. Dennoch kommt es im Beobachtungszeitraum zu einem deutlichen Abfall der Sauerstoffkonzentration im Zentrum der Leitschiene. Durch eine Steigerung der Perfusionsgeschwindigkeit auf das Drei- (54 $\mu\text{l}/\text{min}$) beziehungsweise Fünffache (90 $\mu\text{l}/\text{min}$) konnte nochmals eine deutliche Verbesserung der Sauerstoffversorgung und des Zellüberlebens, insbesondere in den kritischen zentralen Arealen der Leitschiene, erreicht werden.

Schlussfolgerungen:

Zentrale Hypoxie stellt einen wesentlichen limitierenden Faktor für das Leitschienenbasierte *tissue engineering* von Knochen in klinisch relevanten Dimensionen dar. Daher sollte im Rahmen der Kultivierung von dreidimensionalen Konstrukten ein adäquates Monitoring der Sauerstoffversorgung gewährleistet sein. In der Optimierung der Sauerstoffversorgung innerhalb von dreidimensionalen Konstrukten liegt ein entscheidender Schlüssel für die Verbesserung der klinischen Einsetzbarkeit des *tissue engineering* von Knochen.

6. Literaturverzeichnis

- (1) Schieker M, Mutschler W. [Bridging posttraumatic bony defects. Established and new methods]. *Unfallchirurg* 2006; 109(9):715-732.
- (2) Vacanti CA, Bonassar LJ, Vacanti MP, Shufflebarger J. Replacement of an avulsed phalanx with tissue-engineered bone. *N Engl J Med* 2001; 344(20):1511-1514.
- (3) Konnopka A, Jerusel N, König HH. The health and economic consequences of osteopenia- and osteoporosis-attributable hip fractures in Germany: estimation for 2002 and projection until 2050. *Osteoporos Int* 2008.
- (4) Lindner T, Kanakaris NK, Marx B, Cockbain A, Kontakis G, Giannoudis PV. Fractures of the hip and osteoporosis: the role of bone substitutes. *J Bone Joint Surg Br* 2009; 91(3):294-303.
- (5) Lohmann R, Haid K, Stockle U, Raschke M. [Epidemiology and perspectives in traumatology of the elderly]. *Unfallchirurg* 2007; 110(6):553-560.
- (6) Bauer TW, Muschler GF. Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clin Orthop Relat Res* 2000;(371):10-27.
- (7) Schieker M, Heiss C, Mutschler W. [Bone substitutes.]. *Unfallchirurg* 2008; 111(8):613-620.
- (8) Cancedda R, Dozin B, Giannoni P, Quarto R. Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone. *Matrix Biol* 2003; 22(1):81-91.
- (9) Einhorn TA. Clinically applied models of bone regeneration in tissue engineering research. *Clin Orthop Relat Res* 1999;(367 Suppl):S59-S67.
- (10) Rueger JM. [Bone substitutes. State of the art and: what lies ahead?]. *Unfallchirurg* 1996; 99(3):228-236.
- (11) Rueger JM. [Bone substitution materials. Current status and prospects]. *Orthopade* 1998; 27(2):72-79.
- (12) Holz U, Weller S, Borell-Kost S. [Indications, technic and results of autogenic bone transplantations]. *Chirurg* 1982; 53(4):219-224.
- (13) Parikh SN. Bone graft substitutes: past, present, future. *J Postgrad Med* 2002; 48(2):142-148.
- (14) Parikh SN. Bone graft substitutes in modern orthopedics. *Orthopedics* 2002; 25(11):1301-1309.
- (15) Dorea HC, McLaughlin RM, Cantwell HD, Read R, Armbrust L, Pool R et al. Evaluation of healing in feline femoral defects filled with cancellous autograft, cancellous allograft or Bioglass. *Vet Comp Orthop Traumatol* 2005; 18(3):157-168.

- (16) Cricchio G, Lundgren S. Donor site morbidity in two different approaches to anterior iliac crest bone harvesting. *Clin Implant Dent Relat Res* 2003; 5(3):161-169.
- (17) Wehrhan F, Nkenke E, Srour S, Schlegel A. Knochenersatzmaterialien- biologischer Hintergrund und klinische Evidenz. *Zahnärztliche Mitteilungen* 98[10], 1428-1432. 2008. 16-5-2008.

Ref Type: Journal (Full)

- (18) Schaefer DJ, Klemm C, Zhang XH, Stark GB. [Tissue engineering with mesenchymal stem cells for cartilage and bone regeneration]. *Chirurg* 2000; 71(9):1001-1008.
- (19) Stevenson S. Enhancement of fracture healing with autogenous and allogeneic bone grafts. *Clin Orthop Relat Res* 1998;(355 Suppl):S239-S246.
- (20) Stengele M. Knochenzellwachstum im dreidimensionalen Zellkultursystem. Ludwig-Maximilians-Universität, 2004.
- (21) Ringe J, Kaps C, Burmester GR, Sittering M. Stem cells for regenerative medicine: advances in the engineering of tissues and organs. *Naturwissenschaften* 2002; 89(8):338-351.
- (22) Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* 1966; 16(3):381-390.
- (23) Green WT, Jr., Dickens DR. Culture model for investigation of cartilage matrix formation. *Surg Forum* 1972; 23(0):453-455.
- (24) Green WT, Jr., Ferguson RJ. Histochemical and electron microscopic comparison of tissue produced by rabbit articular chondrocytes in vivo and in vitro. *Arthritis Rheum* 1975; 18(3):273-280.
- (25) Vacanti CA. The history of tissue engineering. *J Cell Mol Med* 2006; 10(3):569-576.
- (26) Vacanti CA, Vacanti JP. Functional organ replacement: The new technology of tissue engineering. Braverman MH, Tawes RL, editors. *Surgical technology international*, 43-49. 2008. London, Century press.

Ref Type: Serial (Book, Monograph)

- (27) Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993; 260(5110):920-926.
- (28) Vacanti JP. Beyond transplantation. Third annual Samuel Jason Mixer lecture. *Arch Surg* 1988; 123(5):545-549.
- (29) Vacanti JP, Langer R, Upton J, Marler JJ. Transplantation of cells in matrices for tissue regeneration. *Adv Drug Deliv Rev* 1998; 33(1-2):165-182.

- (30) Schieker M, Pautke C, Haasters F, Schieker J, Docheva D, Bocker W et al. Human mesenchymal stem cells at the single-cell level: simultaneous seven-colour immunofluorescence. *J Anat* 2007; 210(5):592-599.
- (31) Seitz S, Ern K, Lamper G, Docheva D, Drosse I, Milz S et al. Influence of in vitro cultivation on the integration of cell-matrix constructs after subcutaneous implantation. *Tissue Eng* 2007; 13(5):1059-1067.
- (32) Hutmacher DW, Cool S. Concepts of scaffold-based tissue engineering--the rationale to use solid free-form fabrication techniques. *J Cell Mol Med* 2007; 11(4):654-669.
- (33) Drosse I, Volkmer E, Capanna R, De Biase P, Mutschler W, Schieker M. Tissue engineering for bone defect healing: an update on a multi-component approach. *Injury* 2008; 39 Suppl 2:S9-20.
- (34) Volkmer E, Drosse I, Otto S, Stangelmayer A, Stengele M, Kallukalam BC et al. Hypoxia in Static and Dynamic 3D Culture Systems for Tissue Engineering of Bone. *Tissue Eng Part A* 2008; 14(8):1331-1340.
- (35) Mutschler GF, Nakamoto C, Griffith LG. Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. *J Bone Joint Surg Am* 2004; 86-A(7):1541-1558.
- (36) Carrier RL, Rupnick M, Langer R, Schoen FJ, Freed LE, Vunjak-Novakovic G. Perfusion improves tissue architecture of engineered cardiac muscle. *Tissue Eng* 2002; 8(2):175-188.
- (37) McClelland RE, Cogger RN. Use of micropathways to improve oxygen transport in a hepatic system. *J Biomech Eng* 2000; 122(3):268-273.
- (38) Malda J, Rouwkema J, Martens DE, Le Comte EP, Kooy FK, Tramper J et al. Oxygen gradients in tissue-engineered PEGT/PBT cartilaginous constructs: measurement and modeling. *Biotechnol Bioeng* 2004; 86(1):9-18.
- (39) Malda J, Klein TJ, Upton Z. The roles of hypoxia in the in vitro engineering of tissues. *Tissue Eng* 2007; 13(9):2153-2162.
- (40) Malladi P, Xu Y, Chiou M, Giaccia AJ, Longaker MT. Effect of reduced oxygen tension on chondrogenesis and osteogenesis in adipose-derived mesenchymal cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 290(4):C1139-C1146.
- (41) Radisic M, Malda J, Epping E, Geng W, Langer R, Vunjak-Novakovic G. Oxygen gradients correlate with cell density and cell viability in engineered cardiac tissue. *Biotechnol Bioeng* 2006; 93(2):332-343.
- (42) Wendt D, Stroebel S, Jakob M, John GT, Martin I. Uniform tissues engineered by seeding and culturing cells in 3D scaffolds under perfusion at defined oxygen tensions. *Biorheology* 2006; 43(3-4):481-488.
- (43) Arkudas A, Beier JP, Heidner K, Tjiawi J, Polykandriotis E, Srour S et al. Axial prevascularization of porous matrices using an arteriovenous loop

- promotes survival and differentiation of transplanted autologous osteoblasts. *Tissue Eng* 2007; 13(7):1549-1560.
- (44) Wang Y, Wan C, Deng L, Liu X, Cao X, Gilbert SR et al. The hypoxia-inducible factor alpha pathway couples angiogenesis to osteogenesis during skeletal development. *J Clin Invest* 2007; 117(6):1616-1626.
- (45) Malladi P, Xu Y, Chiou M, Giaccia AJ, Longaker MT. Hypoxia inducible factor-1alpha deficiency affects chondrogenesis of adipose-derived adult stromal cells. *Tissue Eng* 2007; 13(6):1159-1171.
- (46) Potier E, Ferreira E, Andriamanalijaona R, Pujol JP, Oudina K, Logeart-Avramoglou D et al. Hypoxia affects mesenchymal stromal cell osteogenic differentiation and angiogenic factor expression. *Bone* 2007; 40(4):1078-1087.
- (47) Salim A, Nacamuli RP, Morgan EF, Giaccia AJ, Longaker MT. Transient changes in oxygen tension inhibit osteogenic differentiation and Runx2 expression in osteoblasts. *J Biol Chem* 2004; 279(38):40007-40016.
- (48) Volkmer E, Kallukalam BC, Maertz J, Otto S, Drosse I, Polzer H et al. Hypoxic preconditioning of hMSC overcomes hypoxia-induced inhibition of osteogenic differentiation. *Tissue Eng Part A* 2009.
- (49) Abousleiman RI, Sikavitsas VI. Bioreactors for tissues of the musculoskeletal system. *Adv Exp Med Biol* 2006; 585:243-259.
- (50) Kellner K, Liebsch G, Klimant I, Wolfbeis OS, Blunk T, Schulz MB et al. Determination of oxygen gradients in engineered tissue using a fluorescent sensor. *Biotechnol Bioeng* 2002; 80(1):73-83.
- (51) Martin Y, Vermette P. Bioreactors for tissue mass culture: design, characterization, and recent advances. *Biomaterials* 2005; 26(35):7481-7503.
- (52) Deshpande RR, Heinzle E. On-line oxygen uptake rate and culture viability measurement of animal cell culture using microplates with integrated oxygen sensors. *Biotechnol Lett* 2004; 26(9):763-767.
- (53) John GT, Klimant I, Wittmann C, Heinzle E. Integrated optical sensing of dissolved oxygen in microtiter plates: a novel tool for microbial cultivation. *Biotechnol Bioeng* 2003; 81(7):829-836.
- (54) Bancroft GN, Sikavitsas VI, van den DJ, Sheffield TL, Ambrose CG, Jansen JA et al. 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* 2002; 99(20):12600-12605.
- (55) Bancroft GN, Sikavitsas VI, Mikos AG. Design of a flow perfusion bioreactor system for bone tissue-engineering applications. *Tissue Eng* 2003; 9(3):549-554.

- (56) Sikavitsas VI, Bancroft GN, Lemoine JJ, Liebschner MA, Dauner M, Mikos AG. Flow perfusion enhances the calcified matrix deposition of marrow stromal cells in biodegradable nonwoven fiber mesh scaffolds. *Ann Biomed Eng* 2005; 33(1):63-70.
- (57) Wang Y, Uemura T, Dong J, Kojima H, Tanaka J, Tateishi T. Application of perfusion culture system improves in vitro and in vivo osteogenesis of bone marrow-derived osteoblastic cells in porous ceramic materials. *Tissue Eng* 2003; 9(6):1205-1214.
- (58) Semenza GL. Regulation of physiological responses to continuous and intermittent hypoxia by hypoxia-inducible factor 1. *Exp Physiol* 2006; 91(5):803-806.

Abkürzungsverzeichnis

AUC	area under the curve (Fläche unter der Kurve)
DBM	demineralisierte bovine Matrix
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FBS	fetal blood serum
FDA	Fluoreszeindiazetat
IU	International unit (internationale Einheit)
MC3T3	murine präosteolastäre Zelllinie
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
PBS	phosphate buffered saline
PI	Propidiumiodid

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die mich bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. med. habil. W. Mutschler möchte ich für die Möglichkeit zur wissenschaftlichen Arbeit im chirurgischen Forschungslabor danken.

Herrn Prof. Dr. med. habil. Matthias Schieker und Herrn Dr. med. Elias Volkmer gilt mein ganz besonderer Dank für die Überlassung des Themas sowie für die hervorragende und persönliche Betreuung der Arbeit. Ohne diese intensive Unterstützung wäre die Anfertigung dieser Dissertation nicht möglich gewesen.

Herrn Dr. med. Michael Stengele danke ich für seinen Rat in allen Fragen der Datenverarbeitung.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe, insbesondere Inga Drosse, Bobby Cherian Kallukalam und Maximilian Saller für ihre Unterstützung des Projektes bedanken.

Des Weiteren danke ich allen am Projekt beteiligten Firmen für ihre Unterstützung, insbesondere der Firma Tutogen für die Bereitstellung der verwendeten Leitschienen, der Firma KL-Technik für die Herstellung der Polykarbonat-Ringe und bei der Firma Presens für die Überlassung der notwendigen Sauerstoffmesssonden.

Publikationen

Otto, S., Baum, T., Keller, F. (2006): Sex-dependence of the relative number of elastic fibres in human heart valves. *Annals of Anatomy* 188. 153-158

Lieger O., **Otto S.**, Clemetson I.A., Arnold M., Iizuka T. (2007): Orbital manifestation of whipple`s disease. *J Craniomaxillofac Surg* 35. 393-396

Volkmer E., Drosse I., **Otto S.**, Stangelmayer A., Stengele M., Kallukalam B.C., Mutschler W., Schieker M. (2008): Hypoxia in static and dynamic 3D culture systems for tissue engineering of bone. *Tissue engineering Part A* 14(8), 1331-40

Otto, S., Hafner, S. and Grötz, K.G. (2009): The role of inferior alveolar nerve involvement in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *J Oral Maxillofac Surg* 67 (3), 589-592

Volkmer E., Kallukalam B.C., Maertz J., **Otto S.**, Drosse I., Polzer H., Böcker W., Stengele M., Docheva D., Mutschler W., Schieker M. (2009): Hypoxic preconditioning of hMSC overcomes hypoxia-induced inhibition of osteogenic differentiation. *Tissue engineering Part A* in press

Otto S., Schuler K., Moser S., Sotlar K., Ehrenfeld M., Pautke C. (2009): Differentialdiagnosen einer schmerzlosen wurzelresorbierenden Raumforderung des Oberkiefers. *Der MKG-Chirurg* 2009, Vol.3 Nr.4, 278-283

Pautke C., Bauer F., Bissinger O., Tischer T., Kreutzer K., Steiner T., Weitz J., **Otto S.**, Wolff K.D., Stürzenbaum S.R., Kolk A. (2010): Tetracycline bone fluorescence: a valuable marker for osteonecrosis characterization and therapy. *J Oral Maxillofac Surg.* 68(1), 125-29

Otto S., Hafner S., Mast G., Tischer T., Volkmer E., Schieker M., Stürzenbaum S.R., von Tresckow E., Ehrenfeld M., Pautke C. (2010): Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: Is pH the missing part in the pathogenesis puzzle? *J Oral Maxillofac Surg.* 68 (5), 1158-61

Otto S., Schuler K., Ihrler S., Ehrenfeld M., Mast G. (2009): Osteonecrosis or metastases of the jaw or both? Case report and review of the literature (2009): J Oral Maxillofac Surg. 68 (5), 1185-88

Otto, S., Abu-Id, M.H., Warnke, P.H., Kolk, A., Hafner, S., Becker, S., Lieger, O., Iizuka, T., Köhnke, R., Ploder, O., Ehrenfeld, M., Kreuzsch, T., Wolff, K.D., Schieker, M., Pautke C. (2010): Osteoporosis and Bisphosphonate-associated osteonecrosis of jaw-a rare side effect but a population dilemma. Journal of Craniomaxillofacial Surgery (in press)

Otto S, Pautke C, Opelz C, Westphal I, Dorsse I, Schwager J, Bauss F, Ehrenfeld M, Schieker M. (2010): Osteonecrosis of the jaw: impact of bisphosphonate type, local concentration and acidic milieu on the pathomechanism. J Oral Maxillofac Surg. (in press)

In Vorbereitung:

Mast G. *, **Otto S.***, Mücke T., Hafner S., Ihrler S., Schreyer C., Bissinger O., Kolk A., Wolff K.D., Ehrenfeld M., Pautke C. Involvement of the maxillary sinus in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw.

Zur Publikation eingereicht bei Head and Neck (* geteilte Erstautorenschaft)

Pautke C., Bauer F., **Otto S.**, Tischer T., Steiner T., Kreutzer K., Hohlweg-Majert B., Wolff K.D., Hafner S., Mast G., Ehrenfeld M., Stürzenbaum S.R., Kolk A. Fluorescence guided bone resection in bisphosphonate related osteonecrosis of the jaws – first clinical results of a prospective pilot study.

Zur Publikation eingereicht bei J Oral Maxillofac Surg

Zitierfähige Abstracts:

Hafner S., **Otto S.**, Mast G., Ehrenfeld M. (2008): Bisphosphonat-assoziierte Osteonekrosen im Kieferbereich-Patientenmanagement und Therapie. Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift 63. D17

Otto S., Volkmer E., Drosse I., Cherian Kallukalam B., Stangelmayer A., Schieker M., Ehrenfeld M. (2008): Oxygen measurement in three-dimensional scaffolds for the tissue engineering of bone. European Cells and Materials Vol 16. Suppl. 4 page 20

Pautke C, Kolk A, Warnke PH, Abu-Id MH, Fedele S, Kesting MR, Hölzle F, Bauer F, Mücke T, Hafner S, Mast G, Becker ST, Köhnke R, Volkmer E, Lieger O, Iizuka T, Knitschke M, Porter S, Campisi G, Colella G, Ploder O, Neff A, Ehrenfeld M, Kreuzsch T, Wolff KD, Schieker M, Stürzenbaum SR, **Otto S**

Osteoporosis therapy and bisphosphonates-associated osteonecrosis of the jaw
19th International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery in conjunction with
8th Chinese National Conference on Oral & Maxillofacial Surgery, 24-29 May 2009,
Shanghai, China

Int J Oral Maxillofac Surg 2009, Vol 38, Iss 5

Otto S, Pautke C, Drosse I, Westphal I, Bauss F, Ehrenfeld M, Schieker M (2010):
Do dose and acidic environment facilitate the manifestation of osteonecrosis of the
jaw by increasing local bisphosphonate toxicity? Bone Volume 46 Supplement 1, S41

Posterpräsentationen:

Beitrag zu Altersveränderungen des elastischen Fasersystems an menschlichen Herzklappen

Keller, F., Weiß, J., Baum, T., **Otto, S.**

19. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft

02.10.2002 bis 04.10.2002 in Würzburg

Beitrag zur Verteilung des elastischen Fasersystems in menschlichen Herzklappen

Keller, F., Weiß, J., Baum, T., **Otto, S.**

20. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft

01.10. bis 03.10.2003 in Würzburg

Morphometric analysis of the elastic fibre system in human heart valves

Otto S., Baum, T., Keller, F.

100th Annual Meeting Anatomische Gesellschaft

11.03. bis 14.03.2005

A new effective treatment protocol for bisphosphonate associated osteonecrosis of jaws by using low-level-laser therapy combined with conservative dentoalveolar surgery

Hafner SG, Schiel S, Breiffeld M, **Otto S**, Mast G, Ehrenfeld M

Osteology, 10.05. bis 12.05.2007 in Monaco

Zentrale Hypoxie: Ein limitierender Faktor für das leit-schienen-basierte tissue engineering von Knochen?

Otto S, Volkmer E, Drosse I, Cherian Kallukalam B, Stangelmayer A, Mutschler W. Schieker M.

12. Chirurgische Forschungstage, 25.09. bis 27.09.2008 in Freiburg

Das Vincent`sche Zeichen bei bisphosphonat-assoziiierter Osteonekrose

Otto S., Hafner S., Schreyer C., Mast G., Ehrenfeld M., Grötz K.A.

Fachdental

11.10.2008 in München

Bisphosphonat-assoziierte Osteonekrosen im Kieferbereich – Patientenmanagement und Therapie

Hafner S., **Otto S.**, Mast G., Ehrenfeld M.

Deutscher Zahnärztetag 2008

22.10. – 25.10.2008 in Stuttgart

Vorträge:

Untersuchungen zur Verteilung und Biomorphose des elastischen Fasersystems an menschlichen Herzklappen

Otto S., Baum T., Keller F.

14. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Altersforschung

13.11. 2004 in Karlsruhe

Kann beim Plattenepithelkarzinom des Oberkiefers stadienabhängig auf eine elektive Halslymphknotenausräumung verzichtet werden?

Schiel S., **Otto S.**, Winter W., Ehrenfeld M.

57. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft für Kieferchirurgie

19.05.2007 in Wiesbaden

Risikoprophylaxe bei bisphosphonat-assoziiierter Osteonekrose

Otto S.

Expertenworkshop „Bisphosphonat-assoziierte Kiefernekrosen – klinische Katastrophe oder beherrschbare Nebenwirkung: Eine interdisziplinäre Herausforderung“

30.08.2008 in Frankfurt

Kiefernekrosen (ONJ)-Definition und Häufigkeit

Mast G., Hafner S. **Otto S.**

Interdisziplinärer Workshop: Bisphosphonate und Kiefernekrosen-Mythen und Fakten

24.09.2008 in München

Oxygen measurement in three-dimensional scaffolds for the tissue engineering of bone

Otto S., Volkmer E., Drosse I., Cherian Kallukalam B., Stangelmayer A., Schieker M., Ehrenfeld M.

2nd International Symposium on Biotechnology in Musculoskeletal repair

02.10. – 04.10.2008 in Lausanne (Schweiz)

Risikoprophylaxe bisphosphonat-assoziiierter Osteonekrosen und Weiterführung der Bisphosphonattherapie

Otto S.

Satellitensymposium im Rahmen des Deutschen Zahnärztetages: Bisphosphonat-assoziierte Kiefernekrosen-klinische Katastrophe oder beherrschbare Nebenwirkung?

22.10.-25.10.2008 in Stuttgart

Paukte C, Kolk A, Hafner S, Schiel S, Mast G, Bauer F, Kreutzer K, Hölzle F, Kesting M, Stürzenbaum S, Schieker M, Köhnke R, Ploder O, Wolff KD, Ehrenfeld M, **Otto S**
Osteoporosetherapie und Bisphosphonat-assoziierte Kiefernekrose – ein aufkommendes Problem ?

13. Jahreskongress der Österreichischen Gesellschaft für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie

28.01.-31.01.2009 in Bad Hofgastein (Österreich)

Otto S, Hafner S, Ihrler S, Grötz KA

Die Rolle des Vincent'schen Zeichens bei Bisphosphonat-assoziiierter Osteonekrose des Kiefers

59. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft für Kieferchirurgie und 30. Jahrestagung des Arbeitskreises für Oralpathologie und Oralmedizin

21.05.-23.05.2009 in Wiesbaden

Otto S, Ehrenfeld M

Therapy of Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws

19th International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery

24.05.-27.05.2009 in Shanghai (China)

Pautke C, Kolk A, Warnke P, Abu-Id MH, Fedele S, Kesting MR, Hölzle F, Bauer F, Mücke T, Hafner S, Mast G, Köhnke R, Volkmer E, Lieger O, Iizuka T, Knitschke M, Porter S, Campisi G, Colella G, Ploder O, Neff A, Ehrenfeld M, Kreusch T, Wolff KD, Schieker M, Stürzenbaum SR, **Otto S**

Osteoporosis therapy and Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws

19th International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery

24.05.-27.05.2009 in Shanghai (China)

Otto S, Hafner S, Mast G, Ehrenfeld M, Schieker M, Pautke C

Zellkulturelle Untersuchungen zur Pathogenese Bisphosphonat-assoziiierter Kiefernekrosen

14. Jahrestagung der Österreichischen Gesellschaft für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie

27.01.-30.01.2010 in Bad Hofgastein (Österreich)

Pautke C, Bauer F, **Otto S**, Kreutzer K, Weitz J, Hafner S, Mast G, Ehrenfeld M, Wolff KD, Kolk A

Fluoreszenz-gesteuerte Knochenabtragung zur Therapie der Bisphosphonat-assoziierten Kiefernekrose – erste Ergebnisse einer Pilotstudie

14. Jahrestagung der Österreichischen Gesellschaft für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie

27.01.-30.01.2010 in Bad Hofgastein (Österreich)

Kolk A, Bauer F, **Otto S**, Wolff KD, Hölzle F, Ehrenfeld M, Pautke C

Osteonekrose der Kieferknochen – erste Ergebnisse einer Pilotstudie

29. Internationales Symposium für Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgen, Oralchirurgen und Zahnärzte

06.02.-12.02.2010 in Sankt Anton am Arlberg (Österreich)

Otto S

Bisphosphonat-assoziierte Kiefernekrosen-Definition, klinisches Bild, Risikofaktoren und Pathogenese

6. Tag der Akademie im Rahmen der 60. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie

28.05.2010 in München

Otto S, Schwager J, Drosse I, Westphal I, Schieker M, Ehrenfeld M, Pautke C

Einfluss von Dosis und pH-Wert auf die Entstehung Bisphosphonat-assoziiierter Kiefernekrosen

60. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie

25.05.-29.05.2010 in München

Otto S, Kolk A, Hafner S, Mast G, Abu-Id MH, Warnke P, Becker S, Kesting M, Bauer F, Mücke T, Köhnke R, Lieger O, Knitschke M, Ploder O, Wiltfang J, Neff A, Ehrenfeld M, Kreuzsch T, Wolff KD, Schieker M, Pautke C

Osteoporose und Bisphosphonat-assoziierte Kiefernekrose – eine Multicenterstudie

60. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie

25.05.-29.05.2010 in München

Pautke C, Bauer F, **Otto S**, Kreutzer K, Weitz J, Steiner T, Hohlweg-Majert B, Hafner S, Mast G, Wolff KD, Ehrenfeld M, Kolk A

Fluoreszenz-orientierte Knochenabtragung zur Therapie Bisphosphonat-assoziiertes Kiefernekrosen

60. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie
25.05.-29.05.2010 in München

Otto S, Volkmer E, Zagar D, Drosse I, Pautke C, Ehrenfeld M, Schieker M

Optimierung der Sauerstoffversorgung in dreidimensionalen Zellkultursystemen für das Tissue Engineering von Knochen

60. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie
25.05.-29.05.2010 in München

Drittmittelanträge:

Schieker M, Drosse I, Otto S, Ehrenfeld M

“Custom-made vitalized implants for the reconstruction of extensive bone defects in maxillofacial surgery”

AO-Antrag (Mitantragsteller)

Förderungszeitraum: 3 Jahre (01.04.2009 – 31.03.2012)

Gesamtvolumen: 264.000 SF

Otto S

„Untersuchungen zur Pathogenese Bisphosphonat-assoziiierter Kiefernekrosen“

FöFoLe: Förderprogramm für Forschung und Lehre (Hauptantragsteller)

FöFoLe-Reg.-Nr.: 623

Förderungszeitraum: 1 Jahr (01.01.2009 – 31.12.2009)

Gesamtvolumen: 43.084 Euro

Otto S

„Optimierung der chirurgischen Therapie von Patienten mit Bisphosphonat-assoziiierter Osteonekrose durch Anwendung einer Technik zur Fluoreszenz-orientierten Nekroseabtragung“

Friedrich-Baur-Stiftung: Antrag Nr. 65/09 (Hauptantragsteller)

Gesamtvolumen: 5.331 Euro

Otto S

„Untersuchungen zum Einfluss von Bisphosphonaten auf Zellen des mononukleär phagozytierenden Systems“

Kooperationsvertrag mit der Firma Roche-Pharma AG (Hauptantragsteller)

Förderungszeitraum: geplant 01.01.2010 – 31.12.2010

Gesamtvolumen: 40.000 Euro