Aus der Klinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirugie der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Norbert R. Kübler

Untersuchung zur *ektopen* Knochenbildung mittels *Tissue Engineering in vivo*

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Charlotte Clementine Wahl

2020

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
gez.:
Dekan: Univ.-Prof. Dr. Nikolaj Klöcker
Erstgutachter: Prof. Dr. Dr. Jörg Handschel
Zweitgutachter: Prof. Dr. Jürgen Becker

Meinen Eltern gewidmet.

Zusammenfassung

Derzeit angewandte Verfahren zur Behandlung von Knochendefekten beinhalten alle spezifische Nachteile. Hierzu zählen unter anderem Donordefekte und eine begrenzte Größe des Transplantats bei autologen Transplantaten oder die Möglichkeit immunologischer Abstoßung und ein mögliches Materialversagen bei synthetischen Materialien. Ein Verfahren, welches diese Nachteile nicht bietet ist daher Gegenstand medizinischer Forschungen der letzten Jahre. Besonders vielversprechend erscheint hierbei die zellbasierte Knochenregeneration.
Ziel dieser Arbeit ist es, die *ektope* Knochenbildung mittels *„Tissue Engineering“* mit *unrestricted somatic stem cells* (USSC) zu untersuchen. Diese bieten die Vorteile embryonaler Stammzellen, ohne deren ethischen Bedenken und rechtlichen Vorschriften zu unterliegen. Des Weiteren scheinen USSCs ein geringes immunogenes Potential aufzuweisen.
In der vorliegenden Arbeit werden neben den üblichen freien Zellsuspensionen, auch USSC in Form von Mikromassen verwendet. Die Forschung erhofft sich durch die Verwendung von Mikromassen zukünftig die manipulierenden Eigenschaften der Trägermaterialien minimieren oder eliminieren zu können. Darüber hinaus scheinen Mikromassen einen positiven Einfluss auf die Differenzierung von osteoblastenähnlichen Zellen (OLCs) zu haben und sind den Bedingungen *in vivo* am ähnlichsten.
In der vorliegenden Arbeit wird das osteogene Potential von USSCs und USSC-Mikromassen mit dem der embryonalen Stammzellen (ESCs*)* und einer Leerprobe verglichen, die jeweils mit Dexamethason, Ascorbinsäure und ß-Glycerophosphat (DAG) vordifferenziert werden. Als Trägermaterial dient *insoluble collagenous bone matrix* (ICBM), als Versuchstiere 31 athymische, T-Zell-defiziente Ratten (RNU-Ratten). Die Ergebnisse werden sowohl computertomographisch, als auch histologisch ausgewertet. In beiden Fällen sind die USSCs und die USSC-Mikromassen den ESCs und der Leerprobe statistisch signifikant überlegen (Signifikanzniveau 5%). Die erhoffte Überlegenheit der Mikromassen gegenüber den freien USSCs bleibt jedoch aus.
Die vorliegende Arbeit zeigt, dass USSCs ein großes Potential zur osteogenen Differenzierung aufweisen und vielversprechende Zellen bezüglich des *„Tissue Engineerings*“ von Knochen sind. Ob sich „*Tissue Engineering*“ mittels USSCs langfristig durchsetzen wird und Transplantate in ausreichender Größe generierbar sein werden, wird sich zeigen müssen.

Summary

Currently used techniques to treat defects of bones all include specific disadvantages. These include defects on the donorsite and a restricted size of the transplant by using autologous transplants or – when using synthetic material - immun mediated rejection and the possibility of material malfunction.
Techniques that preclude these disadvantages are a current subject of medical research. Specifically cell based regeneration of bone appears to be promising.
The objective of this work is to examine the ectopic osteogenesis via *„Tissue Engineering“* with unrestricted somatic stem cells (USSC). USSCs provide the advantages of embryonic stem cells without the ethical concerns and judicial prescriptions. Furthermore they seem to a hold a low immunologic potential.
In the present paper USSCs are used as common free cell suspensions and as microspheres. By the use of microspheres research hopes to avoid or minimise the manipulating characteristics of scaffolds.
In addition, microspheres appear to positively influence the differentiation of osteoblast like cells and and closely represent the conditions *in vivo.*
In this paper, the osteogenetic potential of USSCs and USSC microspheres are compared with the osteogenic potential of embryonic stem cells (ESC) and a control group. All are pre-differentiated with dexamethasone, ascorbic acid and ß-glycerophosphate (DAG). The carrier material applied consists of insoluble collagenous bone matrix (ICBM). 31 athymic, t-cell-deficient rats (RNU-rats) are used.
The results are evaluated histologically and by computed tomography. In both evaluations, the results of the USSCs and USSC microspheres are significantly better than the results of the ESCs and the control group (significance level 5%). However, there is no evidence of USSC microspheres to be superior to USSC alone.
In this paper it is shown that USSCs contain a considerable potential towards the osteogenic differentiation and are promising cells regarding the *„Tissue „Engineering“* of bone. Further research has to be conducted to determine if „*Tissue Engineering*“ with USSCs can be accepted in the long term and if fit would be possible to generate transplants of sufficient dimensions in the future.

Abkürzungen

ADPC	Adipose tissue derived progenitor cells
AP	alkalische Phosphatase
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BMDPC	Bone marrow derived progenitor cells
BMP-2	Bone morphogenic protein 2
BMP-7	Bone morphogenic protein 7
ß-TCP	ß-Tricalziumphosphat
CT	Computertomograph
DMEM	Dulbecco`s modified eagle medium
DAG	Dexamethason + Ascorbinsäure + ß-Glycerophosphat
ECM	Extrazellulärmatrix
ESC	Embryonale Stammzelle
HLA	Human leukocyte antigene
ICBM	Insoluble collagenous bone matrix
i.p.	intraperitoneal
MHC	Major histocompatibility complex
MPC	Multipotente Progenitorzellen
MPS	Mononukleäres-Phagozytäres System
OLC	Osteoblastenähnliche Zellen (osteoblast-like cells)
PDPC	Periost derived progenitor cells
PGA	Polyglycolsäure
PLA	Polylactat
RNU	Rowett nude rat (athymische, T-Zell-defiziente Ratte)
S1	Sicherheitsstufe 1
USSC	Unrestricted somatic stem cell (Nabelschnurblutstammzellen)

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1
1.1 Zellbasierte Knochenregeneration 3
1.2 Einteilung der Zellarten für „*Tissue Engineering*“ 4
1.3 Mikromassen 10
1.4 Knochenbildung 12
1.5 Biomaterialien 14
1.6 Ziel der Studie 16
2 Material und Methoden 17
2.1 Materialien: 17
2.2 Knochenbildung in vivo 20
2.2.1 Verwendete Zellen 20
2.2.2 Verwendete Probenkörper 21
2.2.3 Herstellung der Mikromassen 21
2.2.4 Versuchstiere 22
2.2.5 Versuchsdurchführung 22
2.2.6 Versuchsauswertungen 24
2.2.6.1 Radiologische Auswertung 24
2.2.6.2 Histologische Untersuchung 24
2.3 Statistische Auswertung 26
3 Ergebnisteil 27
3.1 Daten 27
3.2 Radiologische Ergebnisse 27
3.3 Histologische Ergebnisse 33
4 Diskussion 40
4.1 Fördern USSCs die Mineralisation in vivo? 41
4.2 Sind die USSCs den ESC im Hinblick auf die Mineralisation von Knochen überlegen? 42
4.3 Bieten USSC-Mikromassen gegenüber zweidimensionalen USSCs Vorteile bei der Mineralisierung? 44
4.4 Besitzen USSCs das Potential zukünftig klinische Bedeutung zu erlangen? 45
5 Literaturverzeichnis 47

1 Einleitung

Knochendefekte im Kieferbereich können durch eine Vielzahl von Ursachen entstehen. Viele präsentieren sich als so schwerwiegend, dass ohne eine adäquate Therapie eine *Restitutio ad integrum* nicht erfolgen kann. Diese Knochendefekte stellen den behandelnden Arzt zum einen vor die Herausforderung durch eine Rekonstruktion die Skelettfunktion zu erhalten oder wieder herzustellen, zum anderen soll die ästhetische Beeinträchtigung durch den Eingriff auf ein Minimum reduziert werden.

Durch den demographischen Wandel und der damit verbundenen Steigerung der Lebenserwartung kommt es zu einer Zunahme von altersbedingten Kieferatrophien und periodontalen Knochendefekten (Panetta et al., 2009). Des Weiteren entstehen Knochendefekte durch Traumata, Infektionen, sowie bei der Behandlung von Malignomen im Kieferbereich (Scheller et al., 2009). Diese bedürfen im weiteren Verlauf oftmals einer knöchernen Rekonstruktion, mit dem Ziel die Lebensqualität zu erhalten bzw. wiederherzustellen. Die Lebensqualität hängt entscheidend von den ästhetischen und den funktionellen Ergebnissen ab, die durch verschiedene Verfahren erzielt werden können. Die Notwendigkeit adäquate Therapiemöglichkeiten zu etablieren, spiegelt sich in Zahlen aus den USA wider. So ist aktuell davon auszugehen, dass in über 290 Millionen Fällen zahnerhaltende oder wiederherstellende Verfahren erforderlich sind. Zudem würden etwa 30.000 Patienten, nach Resektionen aufgrund von Krebsbehandlungen, von besseren Verfahren der knöcherne Rekonstruktionen profitieren (Garcia and Murray, 2006). Scheller et al. gehen sogar davon aus, dass 85% der Weltbevölkerung eine Therapie oder einen Ersatz von Strukturen im Bereich der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie benötigen (Scheller et al., 2009).

In den letzten Jahren haben sich die Verfahren bei der Behandlung knöcherner Defekte tiefgreifend geändert. In den Anfängen der chirurgischen Malignomtherapie lag das Hauptaugenmerk auf der Resektion des Tumors. Aufgrund des medizinischen Fortschritts stehen heute Verfahren zur Verfügung, die zudem eine funktionelle Regeneration der Defekte ermöglichen. Anfangs dienten artifizielle Materialien der Skelettrekonstruktion, wie Polymethylmetacrylate (Pochon and Kloti, 1991), Polyurethane (Leake and Habal, 1976) oder Metalloxid-Keramiken (Binderman and Fin, 1990; Frenkel

and Niederdellmann, 1975). Auch heutzutage werden einige Knochendefekte noch durch synthetische Materialien, wie beispielsweise Polymethylmetacrylate überbrückt (Louis and Cuzalina, 2000).

Diese Vorgehensweise bietet in einer Vielzahl der Fälle zufriedenstellende ästhetische und bis zu einer gewissen Defektgröße auch gute funktionelle Ergebnisse. Es ergeben sich jedoch auch einige materialspezifische Nachteile. Zum einen können die Materialien immunologisch abgestoßen werden, zytotoxisch wirken oder Entzündungsreaktionen hervorrufen, zum anderen besteht die Möglichkeit des Materialversagens (Panetta et al., 2009; Kanczler et al., 2008). Des Weiteren besitzen die oben genannten Materialien nicht die Charakteristika des physiologischen Knochens, dem es möglich ist dynamische Prozesse wie Knochenanbau und -abbau zu vollziehen. Somit vermag der Knochen sich an wechselnde Bedingungen anzupassen und kann beispielsweise nach Frakturen eine *Restitutio ad integrum* erzielen (Rodan, 1992). Um einen langfristigen und physiologischen Behandlungserfolg zu erreichen, ist es jedoch nötig Materialien zu verwenden, welche diese dynamischen Vorgänge vollziehen können. Diese Vorgänge spielen bei der Defektüberbrückung und der Anpassung an verschiedene Belastungen eine entscheidende Rolle.

Mit der Anwendung *autologer* Transplantate wurde die Medizin dieser Erkenntnis gerecht. Ihr Vorteil besteht darin, dass sie biologisch aktive Zellen beinhalten. Diese begünstigen die Einheilung und Anpassung an die jeweilig vorherrschenden mechanischen Anforderungen. Durch diese Vorteile gegenüber artifiziellen Materialien ist die Knochenrekonstruktion mittels *autologer* Transplantate ein inzwischen etabliertes Verfahren (Pretorius, 2005). Jedoch beinhaltet auch dieses Verfahren Nachteile. Zu diesen Nachteilen zählen insbesondere die eingeschränkte Verfügbarkeit *autologer* Transplantate, sowie die durch den Vorgang der Entnahme entstehende Morbidität auf Seiten des Spenders beziehungsweise der Spenderregion (Donordefekte) (Nkenke et al., 2001; Nkenke et al., 2004; Sasso et al., 2005; Perry 1999; Fernyhough et al., 1992; Heary et al., 2002). Diese Donordefekte können sich in Form von Infektionen, Frakturen, chronischen Schmerzen oder ästhetischen Einschränkungen wie Narben darstellen (Jäger et al., 2009).

Des Weiteren konnte in verschiedenen Studien nachgewiesen werden, dass es je nach Auswahl des *autologen* Transplantates, zu unterschiedlich stark ausgeprägter Resorption des transplantierten Knochens kommt. Diese variiert je nach Studie und Entnahmestelle zwischen 8,8% und 68%. Der größte Verlust ist bei der Verwendung von Transplantaten des Beckenkamms zu beobachten (Díaz-Romeral-Bautista et al., 2010).
Die Forschung der letzten Jahre zielt auf neue zellbasierte Knochenregenerations- bzw. Knochenrekonstruktionsmethoden, die diese Nachteile nicht beinhalten. Die in diesen Verfahren angewendeten vitalen und biologisch aktiven Zellen begünstigen die Wiedererlangung der Gewebefunktionalität (Langer et al., 1993).

1.1 Zellbasierte Knochenregeneration

Zu den zellbasierten Verfahren zählen das *autologe* Knochentransplantat, die *In-situ*-Aktivierung ortsständiger Zellen und die Transplantation isolierter oder extrakorporal kultivierter Zellen bzw. extrakorporal gewonnenen Gewebes. Das letzte der oben genannten Verfahren wird als „*Tissue Engineering*“ bezeichnet.
Das *autologe* Knochentransplantat bietet neben suffizienten funktionellen und ästhetischen Ergebnissen eine gute mechanische Belastbarkeit, beinhaltet jedoch auch die oben bereits erwähnten Nachteile.
Bei der *In-situ*-Aktivierung können verschiedene Techniken angewendet werden. Zum einen kann die Aktivierung der ortsständigen Zellen durch Dehnungsreize (z.B. durch Distraktionsosteogenese) (Meyer U. et al., 1999a, 1999b) oder durch elektromechanische Reize erfolgen (Aaron et al., 2004; Markaki et a., 2004). Zum anderen kann die Aktivierung durch Zytokine, wie BMP-7 oder BMP-2 Mutanten erfolgen (Kübler et al., 1998; Depprich et al., 2005). Die Zellen werden so zu einer Knochenneubildung stimuliert. Ebenso wie bei den bereits beschriebenen Verfahren ist die Überbrückung bestehender Knochendefekte das Ziel. Die fehlenden Entnahmedefekte stellen einen großen Vorteil dieser Technik dar. Zudem führt das *osteogene* Potential der Zellen zu einer physiologischen Knochenregeneration.

Sie beinhaltet jedoch auch Einschränkungen. So ist sie bei ersatzschwachem oder ersatzunfähigem Gewebe z.B. *post radiationem*, oft nicht oder unzureichend durchführbar (Holmes et al., 2002). Eine weitere Limitation dieses Verfahrens stellen große Defekte dar. So kann durch die *In-Situ*-Aktivierung nur eine begrenzte Strecke überbrückt werden. Speziell bei der Distraktionsosteogenese auftretende Komplikationen sind zudem die vorzeitige oder unzureichende Bruchheilung (Panetta et al., 2009).

Das sogenannte „*Tissue Engineering*“ bezeichnet die Transplantation *ex vivo* kultivierten Gewebes. Vier Komponenten spielen beim „*Tissue Engineering*“ eine entscheidende Rolle. Dies sind zum einen die verwendeten Zellen (Handschel et al., 2006), die Wachstumsfaktoren (Kübler et al., 1998; Depprich et al., 2005), das zur Kultivierung verwendete Biomaterial (die Matrix), (Handschel et al., 2002; Meyer et al., 2004; Wiesmann et al., 2004), sowie die Vaskularisation des Transplantats (Liu et al., 2011). Die *osteogene* Differenzierung von Zellen wird *in vitro* stimuliert, die Zellen auf speziellen Biomaterialien kultiviert und die so gewonnenen dreidimensionalen Gewebekonstrukte werden anschließend transplantiert.

Das Verfahren der zellbasierten Knochenregeneration bietet, je nach verwendeter Zellart, den Vorteil fehlender oder geringerer Entnahmemorbidität, sowie ein unbegrenztes oder größeres Reservoir, als *autologe* Knochentransplantate. Des Weiteren handelt es sich bei dieser Art der Rekonstruktion um physiologisches und nicht künstliches Material, welches den Defekt ausfüllt.

Ziel der derzeitigen Forschung ist die Optimierung der Kombination der vier Säulen des „*Tissue Engineerings*“ zur Generierung neuen Knochens. Ob diese Technik in der Lage ist, die anderen oben erwähnten Methoden abzulösen wird das Ziel der weiterführenden Forschung sein müssen.

1.2 Einteilung der Zellarten für „*Tissue Engineering“*

Die im Rahmen des „*Tissue Engineerings*“ verwendeten Zellarten können verschiedenen Ursprungs sein. Als *autolog* werden Zellen bezeichnet, die dem

Körper des zu behandelnden Patienten entnommen werden. *Allogen* sind Zellen der gleichen Spezies jedoch eines anderen Individuums. Als *xenogen* werden Zellen bezeichnet die einer anderen Spezies, als der des Empfängers entnommen werden.

Des Weiteren werden die Zellen entsprechend ihres Differenzierungsgrades in ausdifferenziert, *multipotent, pluripotent* und *totipotent* unterteilt.

Als ausdifferenzierte Zellen werden beispielsweise Osteoblasten bezeichnet, die ihre Kompetenz verloren haben sich zu anderen Zellen zu differenzieren. *Multipotente* Zellen sind in der Lage sich in unterschiedliche Zelltypen zu differenzieren, jedoch nicht so weitreichend wie die *pluripotenten* Zellen, die die Fähigkeit besitzen, sich in Zell- und Gewebetypen aller drei Keimblätter zu differenzieren (Jäger et al., 2004).

Totipotente Zellen können darüber hinaus einen gesamten komplexen Organismus generieren.

Des Weiteren besteht die Möglichkeit die Zellen in natürliche und genetisch modifizierte einzuteilen (Handschel et al., 2006).

Sowohl ausdifferenzierte Zelllinien wie Osteoblasten, als auch *multipotente* mesenchymale Progenitorzellen (MPCs) werden bereits im *osteogenen „Tissue Engineering“* eingesetzt.

Inzwischen wurden Versuche mit *totipotenten* Zellen (z.B. embryonalen Stammzellen) und weiteren *multipotenten* Zellen (z.B. Nabelschnurblutstammzellen) durchgeführt (Heng et al., 2004; zur Nieden et al., 2005).

Die beim „*Tissue Engineering*“ verwendeten Zellpopulationen lassen sich modifiziert nach Handschel wie folgt einteilen (Handschel et al., 2006):

Natürlich vorkommende Zellen	Genetisch modifizierte Zellen

Toti- und Pluripotente Zellen
• Embryonale Stammzellen (ESC)
	• Osteosarkom Zelllinien
	• Immortalisierte Zelllinien
	  ○ spontan
	  ○ transformiert
	• Nicht transformierte klonale Zelllinien

Multipotente Zellen • ADPC • BMDPC • Nabelschnurblutstammzellen (USSC) • PDPC • Progenitorzellen aus Gefäßwänden • Progenitorzellen aus Plazenta	
Unipotente Zellen • Präosteoblasten • “Lining cells” • Osteoblasten • Osteocyten	

Tabelle 1 Einteilung von Zellen für das Tissue Engineering von Knochen. ADPC = Progenitorzellen aus Fettgewebe, BMDPC = Progenitorzellen aus Knochenmark, PDPC = Progenitorzellen aus Periost (modifiziert nach Handschel et al., 2006)

Multipotente mesenchymale Progenitorzellen (MPCs) können zu unterschiedlichen mesenchymalen Zelllinien differenzieren (Handschel et al., 2006) und aus unterschiedlichen Geweben extrahiert werden (beispielsweise Knochenmark, Fett oder Periost) (Pittenger et al., 1999; Moosmann et al., 2005; Covas et al., 2005; Wulf et al., 2004; Sakaguchi et al., 2004). Dabei haben die unterschiedlichen MPCs (ADPCs, BMDPCs, PDPCs), je nachdem welchem Gewebe sie entstammen, unterschiedliche Charakteristika (Handschel et al., 2006). Diese Zellart ist stets *autologen* Ursprungs und bei Ihrer Gewinnung besteht, wenn auch geringer als bei *autologen* Knochentransplantaten, eine Entnahmemorbidität.

Nachteilig ist zudem der hohe Aufwand zur Gewinnung der MPCs. Unter 100.000 Zellen des Knochenmarks stellt nur eine Zelle eine MPC dar (in diesem Falle eine BMDPC) (D`Ippolito et al., 1999; Quarto et al., 1995). Darüber hinaus weisen MPCs ein begrenztes Erneuerungspotential verglichen mit *ESCs* und *USSCs*, sowie ein vermindertes Proliferationspotential und eine geringere Differenzierungskapazität in fortgeschrittenem Lebensalter des Spenders auf

(D´Ippolito et al., 1999; McCulloch et al., 1991; Quarto et al., 1995), so dass diese Zellen bei älteren Patienten eventuell nicht mehr für das „*Tissue Engineering*“ von ossären Geweben geeignet sind (Panetta et al., 2009).

Ihnen gegenüber steht die Anwendung der *totipotenten* embryonalen Stammzellen (*ESC*), sowie der multipotenten *unrestringated somatic stem cells* (*USSC*). Sie bieten multiple Vorteile gegenüber den MPCs.

Sie sind zur Differenzierung in Zellen für die Knochenbildung und –mineralisierung fähig, sowie zur Differenzierung in Zellen, die bei der Generierung weiterer für die Funktion wichtiger Gewebe beteiligt sind. Als Beispiel dient die Differenzierung zu Endothelzellen um Gefäße ausbilden zu können. Dies ist wichtig für das osteogene Potenzial der entstandenen Osteoblasten, da diese ohne ausreichende Blutversorgung fibrosieren und nicht mehr zur Osteogenese fähig sind (Ham, 1952). Ohne die Versorgung der Zellen mit Nährstoffen, ist das Herstellen von größeren Knochenkonstrukten für den klinischen Gebrauch, nur begrenzt möglich (Meyer et al., 2003; Liu et al., 2011). So wird die Größe der Gewebekonstrukte ohne bestehende Neoangiogenese durch die Diffusionskapazität limitiert (Karageorgiou et al., 2005). Diese liegt in einem Bereich von 150-200 µm zum versorgenden Gefäßsystem (Muschler et al., 2004; Sutherland et al., 1986; Colton, 1995,). Innerhalb dieses Bereichs ist eine ausreichende Versorgung mit Nährstoffen, Hormonen, Wachstumsfaktoren, Zellen, Zytokinen, Chemokinen und Sauerstoff gegeben, sowie der Abtransport von Metaboliten gewährleistet (Kanczler et al., 2008, Ami et al., 2012). Zellen, die außerhalb dieses Bereichs liegen sterben aufgrund des Sauerstoffmangels ab und es entstehen zellfreie Bereiche innerhalb des Transplantats, in denen keine Osteogenese mehr stattfinden kann. So verbessert die schnelle Vaskularisation eines Transplantats dessen Einheilung in die Umgebung und die Erfolgsrate transplantierten Gewebes wird erhöht (Muschler GF et al., 2004, Kanczler et al., 2008). Des Weiteren besitzen Stammzellen, im Gegensatz zu MPCs die Fähigkeit zur Selbsterneuerung (Weissman., 2000), wodurch theoretisch eine unbegrenzte Verfügbarkeit an Zellen für das „*Tissue Engineering*“ besteht. Durch die höhere Proliferationskapazität sind außerdem kürzere Kulturzeiten notwendig um ausreichend Zellen zu generieren.

ESCs werden aus der inneren Zellmasse der Blastozyste gewonnen und können zu jedem Zelltyp differenzieren (Handschel et al., 2006). Unter bestimmten Bedingungen können sie somit auch zu osteoblastenähnlichen Zellen (OLC) differenziert werden.

Zu diesen Kultivierungsbedingungen zählt die Zugabe spezieller Substanzen zum Nährmedium, die die Differenzierung der Zellen beeinflussen. Zum einen stellt DAG einen möglichen osteogenen Stimulus dar, eine Mischung aus Dexamethason, Ascorbinsäure und β-Glycerophosphat (Bielby et al., 2004; Chaudhry et al., 2004; zur Nieden et al., 2003), zum anderen Vitamin D3 oder Zytokine, wie BMP-2 (zur Nieden et al., 2003; Kübler et al, 1998). Handschel et al. zeigen, dass die Kultivierung von USSCs mit DAG zu einer besseren *osteogenen* Differenzierung führt als mit BMP-2 (Handschel et al., 2009).

Vorteil der ESCs ist darüber hinaus, dass sie sich zu einer unbegrenzten Anzahl von Osteoblasten für Transplantationen differenzieren lassen (Handschel et al., 2006).

Kontrovers diskutiert wird derzeit wie sich die immunologische Reaktion des Transplantatempfängers vermeiden lässt. Zu dieser Fragestellung gibt es zwei interessante Beobachtungen. So kann bei Mäusen, ohne jeglichen Nachweis einer *graft-versus-host* Reaktion eine MHC-*mismatched* ESC-Transplantation durchgeführt werden (Burt et al., 2004). Zavazava beschreibt ein mögliches Potential der ESCs eine Immuntoleranz zu induzieren (Zavazava, 2003).

Umstritten ist weiterhin, ob transplantierte ESCs zu malignen Entartungen wie Teratomen und Teratokarzinomen führen können (Davis et al., 2012). Während Trounson diesbezüglich eine mögliche Gefahr bei der Verwendung von ESCs propagiert (Trounson, 2002), können Zhang und andere Autoren diese Beobachtung in ihren Studien nicht bestätigen (Zhang et al., 2001).

Ein weiteres Problem bei der Verwendung humaner ESCs ist die ethische und rechtliche Diskussion über die Verwendung von humanen Stammzellen. So stellt sich die Frage, zu welchem Zeitpunkt der Entwicklung von menschlichem Leben gesprochen werden kann, es dieses zu schützen und die Menschenwürde zu beachten gilt. Des Weiteren wird kontrovers diskutiert, ob das Leben des Embryos und somit das Wohl des Einzelnen höher zu stellen ist als mögliche Therapieoptionen für eine Vielzahl an Patienten und somit das Wohl der Allgemeinheit. Da es das Ziel der Medizin ist Krankheiten zu heilen

oder zu verhindern, gilt es die langfristigen Vorteile der Stammzellforschung mit den ethischen und rechtlichen Bedenken abzuwägen (Cogle et al., 2003; Gilbert, 2004).

Bei der Verwendung von *unrestringated somatic stem cells* (*USSCs*) ist diese Problematik nicht gegeben. Es handelt es sich um mesenchymale Stammzellen aus Nabelschnurblut (Kögler et al., 2004).

Dies sind *multipotente*, mononukleäre Vorläuferzellen, die mittels Dichtezentrifugation gewonnen werden (Jäger et al., 2004). Sie exprimieren HLAI nur in geringem Umfang und sind HLAII negativ (Jäger et al., 2009, Shafiee et al., 2011). So zeigt sich eine geringe Inzidenz der Transplantatabstoßungen, von *graft-versus-host diseases* und Infektionen nach der Transplantation von USSCs (Davis et al., 2012). Darüber hinaus besitzen sie ein hohes Erneuerungspotential (Jäger et al., 2009). So ist eine Vervielfältigung auf 10^{15} Zellen in 20 Passagen möglich (Kögler et al., 2006). Die Zeit zum Duplizieren der Population beträgt in etwa 39 Stunden (Jäger et al., 2009). Die Zellen können *in vitro* in Chondroblasten, Osteoblasten, sowie hämatopoetische und neurale Zellen differenziert werden (Kögler et al., 2004). Vorteil der USSCs ist die Gewinnung ohne Entnahmedefekte, da sie meist allogenen Ursprungs sind. Laut Jäger et al. lassen sich jedoch nur in 35,4% von 573 Nabelschnurblutstichproben USSCs gewinnen (Jäger et al., 2009).

Es existieren mittlerweile sogenannte Nabelschnurstammzellbanken, die es ermöglichen HLA-*gematchte* USSCs zu verwenden, und somit das Risiko immunologischer Reaktionen zu minimieren. Des Weiteren besteht die Möglichkeit jedem Säugling Nabelschnurblut zu entnehmen und somit *autologe* USSCs für spätere Behandlungen zu gewinnen und zu konservieren.

Klinische Anwendung erfahren die USSCs bereits bei der Behandlung von Leukämien, Myelodysplasien, Hämoglobinopathien und Immundefekten (Rocha and Gluckman, 2007). Hier verwendet man inzwischen zunehmend *allogene* USSCs. So vermeidet man die Problematik die Krankheiten mittels Zellen zu therapieren, die den ursächlichen Gendefekt bereits in sich tragen.

Zum *„Tissue Engineering“* können außerdem *autologe,* ausdifferenzierte osteoblastäre Zellen verwendet werden. Bei der Verwendung dieser Zellart sind weder immunogene Abstoßungsreaktionen zu befürchten, noch bestehen rechtliche oder ethische Einschränkungen (Handschel et al., 2006). Nachteilig

ist hier jedoch der entstehende Entnahmedefekt, der zur Gewinnung der Zellen nötig ist. So wird das Ursprungsgewebe, wie Knochen, Periost oder Knochenmark zunächst explantiert, um die Zellen dann durch verschiedene Techniken, beispielsweise durch Enzymdigestion, zu isolieren (Vacanti et al., 2003; Handschel et al., 2006). Diese Zellen können anschließend kultiviert werden (Meyer et al., 2005a) und nach Proliferation und Differenzierung zum Zwecke des „*Tissue Engineerings*“ verwendet werden.

1.3 Mikromassen

Gewöhnlich werden *in vitro* Kulturen als 2D-Zellkulturen kultiviert. Es ist jedoch davon auszugehen, dass dies nur unzureichend die Bedingungen *in vivo* imitiert. Zellen höherer Organismen stehen mit anderen Zellen in Verbindung und sind von einer extrazellulären Matrix umgeben. Sowohl die Zellen untereinander, als auch die Zellen und die extrazelluläre Matrix interagieren miteinander (Abott, 2003; Moosmann et al., 2005). So werden über verschiedene Transduktionswege (beispielsweise Integrine) Funktionen wie Proliferation, Differenzierung, Migration und Apoptose der Zellen beeinflusst (Boudreau and Jones, 1999).

Ein Beispiel dafür liefern die Versuche mit β1-Integrin-Antikörpern. Sowohl *in vivo*, als auch in 3D-Kulturen führen sie zu einer Blockierung der Proliferation von Mammakarzinomzellen, in zweidimensionalen Kulturen können sie eine solche Blockierung jedoch nicht verursachen (Weaver et al., 1997).

Als dreidimensionale Matrix, auf der die Zellen kultiviert werden können, existieren verschiedene Möglichkeiten wie beispielsweise Kollagengel (Maeno et al., 2005), Alginatgel (Steinert et al., 2003) oder Polylactatester (Wang et al., 2004).

Die Zellen können die dreidimensionale extrazelluläre Matrix jedoch auch selbst bilden. So werden sie nach der Proliferation von einem 2-D-Monolayer abgelöst und in nicht-adhäsive Kulturkammern überführt, in denen sich nach drei Tagen sphärische Formationen ausbilden (Handschel et al., 2007). Die, durch dieses Verfahren hergestellten Kulturen werden als Mikromassen bezeichnet und

spiegeln die Verhältnisse *in vivo* vorteilhaft wider (Handschel et al., 2007). Die Zellen der Mikromassen sezernieren die extrazelluläre Matrix selbst und können in der gewonnenen Formation interagieren. Ihre Differenzierung ist der *in vivo* Differenzierung am nächsten (Handschel et al., 2007).

In Bezug auf Mikromassen mit OLCs scheint es, als imitierten die OLCs den Kondensationsprozess, der *in vivo* für die skelettale Entwicklung wichtig ist (Hall et al., 2000). Die osteoblastäre Differenzierung der Mikromassenkulturen mit OLCs zeigt sich ausgeprägter und schneller, als die der Zellen in zweidimensionalen Kulturen (Gerber et al., 2001; Gerber et al., 2002). Dies zeigt sich auch in einer gesteigerten Aktivität der alkalischen Phosphatase und einer gesteigerten Expression des Osteocalcins gegenüber den 2D-Kulturen (Gerber et al., 2002).

Weitere Unterschiede stellen eine deutlich höhere Kollagenexpression und die frühere Mineralisation dar. Diese setzt in Mikromassenkulturen bereits nach einer Woche ein, im Vergleich zu 2-3 Wochen bei den zweidimensionalen Kulturen (Gerber et al., 2002). Jedoch sei, am DNA-Gehalt gemessen, auf eine geringere Proliferationsrate hingewiesen (Gerber et al., 2002).

Des Weiteren besteht ein möglicher Vorteil in der Verwendung von Mikromassen darin, die Verwendung künstlicher Trägermaterialien auf ein Minimum zu reduzieren oder ganz auf Trägermaterialien verzichten zu können (Handschel et al., 2010). Diese werden bislang zur Defektüberbrückung genutzt (Handschel et al., 2007). Dies ist ein Vorteil, da künstliches Trägermaterial das Ergebnis *ex vivo* generierten Gewebes, im Vergleich zu natürlichen Materialien beeinflussen und verschlechtern kann (van der Kraan et al., 2002). So beeinflussen die künstlichen Trägermaterialien einige Eigenschaften der Zellen, wie Differenzierung, Zellmigration, Proliferation und Apoptose (Bodreau et al., 1999; Abbott 2003).

Auch aus embryonalen Stammzellen lassen sich Mikromassen herstellen, die sowohl eine chondrogene (Tanaka et al., 2004), als auch osteogene Differenzierung zulassen (Handschel et al., 2008).

1.4 Knochenbildung

Knochen ist das skelettbildende Stützgewebe der Wirbeltiere. Er beinhaltet multiple Zelltypen und eine gut strukturierte extrazelluläre Matrix, die aus organischen und anorganischen Komponenten besteht. Die verschiedenen Zellarten sind für die Entwicklung und Aufrechterhaltung des Knochens, die metabolischen Prozesse und die Signalübertragung von entscheidender Bedeutung (Meyer et al., 2005).

Zu diesen Zellarten gehören zum einen die für die Ausbildung des Knochens entscheidenden Osteoblasten, sowie Praeosteoblasten und Osteozyten. Alle drei Zelllinien differenzieren sich aus mesenchymalen Vorläuferzellen (Ducy et al., 2000) und sind durch tight junctions miteinander verbunden (Caetano-Lopes et al., 2007). Weitere Zellen stellen die Osteoklasten dar, die am Knochenumbau beteiligt sind. Osteoklasten differenzieren sich aus monozytären Stammzellen des Knochenmarks und sind somit hämatopoetischen Ursprungs. Sie sind mehrkernig und gehören dem mononukleären-phagozytären System (MPS) an. Die Resorption der Knochensubstanz ist ihre Hauptaufgabe (Teitelbaum, 2000). Osteoblasten sind in der Lage die Differenzierung von Zellen zu Osteoklasten zu generieren und zu kontrollieren (Ducy et al., 2000). Unter physiologischer Knochenbelastung ermöglicht dies ein Gleichgewicht in der Aktivität von Osteoblasten und Osteoklasten.

Eine ausreichende Vaskularisation ist ein entscheidender Faktor bei der Knochenbildung, dem Längenwachstum und dem Erhalt des Knochens.

Es wird vermutet, dass Endothelzellen eine entscheidende Rolle zukommt. Sie sind wichtig für die Gefäßneubildung und sollen die Differenzierung von MSCs zu Osteoblasten beeinflussen und an der kontrollierten Rekrutierung von Osteoklasten beteiligt sein. So stellt die Interaktion von Endothel- und Knochenzellen einen entscheidenden Faktor für die Integrität des Knochens dar (Kanczler et al., 2008).

Zu den anorganischen Bestandteilen des Knochens zählen neben den Hydroxylapatitkristallen auch Kalziumcarbonat, Kalziumhydrogenphosphat, Magnesium, Eisen, Zink, Kupfer, Fluorid und Zitrate. Die organische Komponente des Knochens wird hauptsächlich durch Kollagen Typ I

repräsentiert (90%) (Teitelbaum, 2000). Kollagen Typ V, Osteocalcin, Osteonectin, Osteopontin und einige andere Proteine bilden weitere Bestandteile der organischen Matrix (Heng et al., 2004).

Die Knochenbildung wird durch die Interaktion der verschieden Zellen des Knochens, der extrazellulären Matrix, sowie anorganischer Materialien vollzogen (Meyer et al., 2005). Sowohl die Proliferation und Differenzierung der Zellen, als auch die Entstehung der kollagenen Mikroarchitektur und der Mineralisationsprozess werden dabei durch biophysikalische Stimuli induziert (Wiesmann et al., 2001; Meyer et al., 2005).

Insbesondere die vorherrschenden Belastungen beeinflussen die Bildung, die Umbauprozesse, die Aufrechterhaltung des Knochens und dessen Mineralgehalt. Diese Prozesse sind durch die aufeinander abgestimmte Aktivität von Osteoklasten und Osteoblasten möglich (Ducy et al., 2000).

So zeigen Knochen ohne mechanische Belastungen (beispielsweise bei Astronauten) eine deutlich verminderte Produktion der Knochenmatrix, sowie einen geringeren Mineralgehalt (Meyer et al., 2005). Dieses Charakteristikum der Adaptationsfähigkeit wird als phänotypische Plastizität des Knochens bezeichnet (Frost, 2000) und macht ungefähr 40% der Knochenstärke und -masse aus (Meyer et al., 2005).

Es existieren zwei verschiedene Arten der Knochenbildung. Die desmale (direkte) und die chondrale (indirekte) Ossifikation. Bei der desmalen Ossifikation entsteht der Knochen direkt aus Bindegewebe. Bei der chondralen Ossifikation besteht zunächst ein Gerüst aus hyalinem Knorpel, der dann durch Knochen ersetzt wird (Ducy et al., 2000). Man unterteilt die chondrale Ossifikation weiter in die enchondrale und perichondrale Ossifikation.

Die nicht mineralisierte Grundsubstanz der Knochen ist das Osteoid. Dieses wird von Osteoblasten sezerniert und stellt etwa die Hälfte des Knochenvolumens dar (Caetano-Lopes et al., 2007). Osteoid besteht überwiegend aus Kollagen Typ I. Kollagen Typ I besteht aus drei Polypeptidketten, die sich zu einer Tripelhelix umeinander winden und ist ein repräsentativer Marker für mesenchymale Zellen (Bilezikian et al., 1996). Die Kollagenfibrillen werden von Beginn an durch die Osteoblasten gebildet (Caetano-Lopes et al., 2007).

Während der Knochenbildung exprimieren die Osteoblasten das membranständige Glykoprotein alkalische Phosphatase, welches als biochemischer Marker für die Aktivität von Osteoblasten gilt (Jaiswal et al., 1997). Die Expression der alkalischen Phosphatase führt zur Ausfällung von Calciumphosphationen. Durch die Einlagerung dieser Calciumphosphationen in das Osteoid bilden sich Hydroxylapatitkristalle, die sich an die Kollagenfibrillen anlagern. Somit stellt der Zeitpunkt der Expression der alkalischen Phosphatase wahrscheinlich den Zeitpunkt der beginnenden Mineralisation der Matrix dar (Zernik et al., 1990).

Osteocalcin, welches u.a. die Rekrutierung von Osteoklasten generiert (Davies, 1996), hat einen Anteil von 1-2% aller Proteine im Knochen und wird erst spät als Protein der extrazellulären Matrix sezerniert (Aubin and Liu, 1996; Caetano-Lopes et al., 2007).

Durch diese Umstände stellen Kollagen Typ I, die alkalische Phosphatase und Osteocalcin gute Marker der verschiedenen Phasen der Knochenbildung dar. Zunächst entsteht der Geflechtknochen. Er enthält ungeordnete Kollagenfibrillen und bildet sich allmählich durch einen dynamischen Prozess in Lamellenknochen um. In diesem weisen die Kollagenfibrillen ein geordnetes Verlaufsmuster auf. Unterschiedliche Faktoren begünstigen die Entwicklung des Geflechtknochens zu Lamellenknochen. Beispielsweise die mechanische Beanspruchung und der Einfluss von Osteoblasten und Osteoklasten. Der Lamellenknochen zeichnet sich gegenüber dem Geflechtknochen durch eine höhere Festigkeit aus (Lüllmann-Rauch, 2003).

Die Mineralisation des Knochens ist von entscheidender Bedeutung für dessen Funktion, Form und Festigkeit. Diese lässt sich sowohl histologisch als auch radiologisch detektieren.

1.5 Biomaterialien

Um Knochendefekte zu therapieren, benötigt man derzeit dreidimensionale Strukturen, die mit Hilfe spezieller Biomaterialien gebildet werden können. An dieses Biomaterial werden verschiedene Anforderungen gestellt, damit eine *Restitutio ad integrum* erfolgen kann. Das Biomaterial sollte u.a. biokompatibel,

nicht toxisch, biologisch abbaubar und nicht immunogen sein, die individuelle Knochengeometrie imitieren, die Knochenbildung und das Zellattachement fördern sowie von ortsständigen Zellen umgebaut werden können (Harlan et al., 2002; Wiesmann et al., 2004). Da derzeit kein Biomaterial existiert, welches allen Anforderungen gerecht wird, werden verschiedene Materialien untersucht.

Van der Kraan et al. zeigen, dass bei der Verwendung künstlicher Trägermaterialien die Resultate von Transplantationen negativ beeinflusst werden können. So kann die Defektheilung *in vivo* durch immunogenes Potential des Materials, nicht vorherzusehende Abbauzeiten, sowie durch die beim Abbau entstehenden Produkte gestört werden (van der Kraan et al., 2002). Durch diese Problematik wird der mögliche Nutzen der Mikromassentechnologie deutlich, da man sich erhofft auf Trägermaterialien in Zukunft verzichten zu können.

In einer Untersuchung von Handschel et al. bezüglich der Biokompatibilität von verschiedenen Biomaterialien wird die Zellproliferation von ESCs beurteilt (Handschel et al., 2009).

Die höchste Rate an lebenden Zellen ist dabei auf boviner ICBM (insoluble collagenous bone matrix) nachweisbar. Sowohl die Proliferation, als auch das Zellattachment sind hier verglichen mit den anderen Materialien am größten, gefolgt von β-Tricalciumphosphat multiporös (Cerasorb M®), β-Tricalciumphosphat kleinporig (Cerasorb®), Copolymer aus Polylactat und Polyglycolsäure (PLA/PGA) und anorganischem bovinen Knochen (Bio Oss®) (Handschel et al., 2009).

Die Proteinbedeckung der Oberfläche des Biomaterials beeinflusst das Zellattachment von Osteoblasten (Dennis et al., 1992; Meyer et al., 1998; Petrovic et al., 2006). Diese Ergebnisse stellen eine mögliche Erklärung der hohen Proliferationsraten bei Verwendung von bovinem ICBM dar. Dieses besteht zum überwiegenden Anteil aus Kollagen Typ I (Naujoks et al., 2008). Ein hoher Kollagenanteil führt somit zu höheren Zellzahlen und höheren Proliferationsraten (Petrovic et al., 2006).

Zudem ist auch die Porösität eines Biomaterials von entscheidender Bedeutung für die Zelladhäsion und Zellmigration und die Vaskularisation des Implantats (Chehroudi et al., 1997; Karageorgiou, 2005; Liu et al., 2011). Da ICBM die höchste Porösität unter den getesteten Biomaterialien aufweist, stellt auch

dieser Faktor einen Vorteil von ICBM dar. Zudem stehen die Poren untereinander in Verbindung, was die Knochenbildung positiv beeinflusst (Chaudhry et al., 2004; Handschel et al., 2009; Liu et al., 2011, Ami et al., 2012). Darüber hinaus untersuchen Handschel et al., inwiefern Biomaterialien die Genexpression der verwendeten Zellen beeinflussen. Die Zellen zeigen nach siebentägiger Kultivierung auf PLA/PGA eine statistisch signifikante Erhöhung von CD34, das ein typischer Marker hämatopoetischer Stammzellen darstellt. ICBM induziert eine signifikante Erhöhung von CD34, sowie alkalischer Phosphatase, wohingegen ß-TCP eine signifikante Steigerung von CD34 und Osteopontin bewirkt (Handschel et al., 2009).
Bezüglich der Zellproliferation, der Zelladhäsion und der Zahl lebender Zellen stellt ICBM somit das geeignetste Biomaterial für osteogenes *„Tissue Engineering“* dar. Auch der Phänotyp, den die Zellen nach siebentägiger Kultivierung auf ICBM aufweisen, ist diesbezüglich positiv zu beurteilen.
Untersuchungen bezüglich des geeigneten Biomaterials für USSCs erzielen ähnliche Ergebnisse. Auch hier stellt ICBM das am besten geeignetste Biomaterial dar und erzielt die höchsten Werte für Proliferation und Zellhaftung (Naujoks et al., 2011).

1.6 Ziel der Studie

Wie in den vorrangegangenen Abschnitten erläutert, stellt die Verwendung von USSCs im Rahmen des osteogenen *„Tissue Engineerings“* eine vielversprechende Therapiealternative dar, knöcherne Defekte zu behandeln.
Ziel dieser Studie ist die Untersuchung der Knochenbildung *in vivo.* Der Vergleich von osteogen vordifferenzierten ESCs und humanen USSCs in 3D- und 2D-Kulturverfahren auf ICBM-Trägern steht dabei im Vordergrund.
Insbesondere sollen folgende Fragestellungen erläutert werden:

- Fördern USSCs die Mineralisation in vivo?
- Sind die USSCs den ESC im Hinblick auf die Mineralisation von Knochen überlegen?
- Bieten USSC-Mikromassen gegenüber zweidimensionalen USSCs Vorteile bei der Mineralisierung?

2 Material und Methoden

2.1 Materialien:

Chemikalien

Alizarin Red S,
Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim (D)

Ethanol 99,5%, 96%,
Fa. Merck KGaA, Darmstadt (D)

Formaldehydlösung 4% (gepuffert, pH 6,9),
Fa. Merck KGaA, Darmstadt (D)

Xylol (Isomere),
Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe (D)

Medien und Puffer

Basismedium für die Mikromassenherstellung:

- 350ml Dulbecco`s modified eagle medium,
  Fa. Lonza, Verviers (B)
- 50ml Fetal Bovine Serum (FKS),
  Fa. Biochrom AG, Berlin (D)
- 5ml L-Glutamin (200mM),
  Fa. Biochrom AG, Berlin (D)
- 5ml Penicillin/Streptomycin (10000U/ml),
  Fa. Biochrom AG, Berlin (D)

DAG (Dexamethason-Ascorbinsäure-ß-Glycerolphosphat),
Fa. Sigma, Taufkirchen, (D)

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS),
Fa. Invitrogen GmbH, Karlsruhe (D)

Phosphate Buffered Saline (PBS) (pH 7, 4),
Fa. Invitrogen GmbH, Karlsruhe (D)

Materialien, Geräte und Hilfsmittel

96 Well Cell Culture Cluster,
Fa. Corning Incorporated, New York (USA)

Autoklav: D-65,
Fa. Systec GmbH, Wettenberg (D)

Computertomograph Sensation 64,
Fa. Siemens AG, Erlangen (D)

Deckgläser für Mikroskopie, 24 x 50, 18 x 18, 24 x 32,
Fa. Engelbrecht Medizin & Labortechnik GmbH, Edermünde

Einbettformen (Probendicke 16mm),
Fa. PSI Grünewald GmbH & Co. KG, Laudenbach (D)

Einbettgerät,
Fa. Sakura Finetek U.S.A., Inc., Torranca (USA)

Färbekästen nach Schiefferdecker,
Fa. DURAN Group GmbH, Mainz (D)

Fluoromount-G,
Fa. SouthernBiotech, Alabama(USA)

Gefrierschränke,
Fa. Liebherr, Ochsenhausen (D)
Fa. Thermo Fisher Scientific, Waltham (Massachusetts, USA)

Kühlschränke,
Fa. Liebherr, Ochsenhausen (D)

Kulturschalen,
Fa. Vitaris, Baar (Schweiz)

Laborflasche mit Gewinde,
Fa. DURAN Group GmbH, Mainz (D)

Leica QWin V3,
Fa. Leica Microsystems Imaging solutions Ltd., 2003

Messzylinder, B, blau graduiert 100 : 1ml,
Fa. Hirschmann, Eberstadt (D)

Messzylinder, B, blau graduiert 500: 5 ml,
Fa. Hirschmann, Eberstadt (D)

Mikroliterpipette Research,
Fa. Eppendorf, Weseling-Erzdorf (D)

Mikroskop: DM5000 B,
Fa. Leica, Wetzlar (D)

Mikroskopkamera: DC300F,
Fa. Leica, Wetzlar (D)

Mikrotom Blades (Low Profile) Leica 819,
Fa. Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch (D)

Millipore-Analge, Direct-Q UV3,
Fa. Millipore, Billerica (Massachusetts, USA)

Objektträger SuperFrost® Plus (geputzt, gESChliffen, 25 x 75 x 1,0 mm),
Fa. VWR International bvba, Leuven (B)

Pinzette,
Fa. Hammacher, Solingen (D)

Pipettenspitzen TipOne (0,1-1; 1-100; 101-1000µl),
Fa. Starlab GmbH, Ahrensburg (D)

Präparate-Kasten,
Fa. Welabo VGKL, Düsseldorf (D)

Präparate-Mappe,
Fa. Welabo VGKL, Düsseldorf (D)

Schlittenmikrotom SM2000 R,
Fa. Leica Mikrosysteme GmbH, Wetzlar (D)

Sterile Zentrifugen- und Probenröhrchen, 50 ml,
Fa. Greiner Bio-One, Frickenhausen (D)

Stoppuhr,
Fa. neoLab ®, Heidelberg (D)

Waage MK 500 C,
Fa. Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern (D)

Wasserbad für Paraffinschnitte,
Fa. Leica, Wetzlar (D)

Zentrifuge, Multifuge 1S-R,
Fa. Hereaus, Osterode (D)

2.2 Knochenbildung in vivo

Ziel dieses Versuchs ist es zu zeigen, ob es möglich ist durch geeignete Transplantate die Bildung *ektopen* Knochens zu induzieren.
In Anlehnung an bereits durchgeführte Versuche mit embryonalen Stammzellen wird ein *ektopes* Tiermodel gewählt. Um eine Verfälschung der Ergebnisse zu vermeiden soll eine ausreichende Distanz zu *autologem* Knochen gehalten werden. Gleichzeitig wird ein Transplantatlager gewählt, das ausreichend vaskularisiert ist, um gute Bedingungen für die Knochenbildung zu schaffen. Es wird die Implantation der Probenkörper in eine Muskeltasche auf dem Rücken gewählt.
Der Tierversuch wurde von der zuständigen Bezirksregierung genehmigt (Aktenzeichen 50.05-230-58/05).

2.2.1 Verwendete Zellen

Bei dem Versuch werden ESC, USSC und USSC-Mikromassen verwendet.
Die ESC werden am Gestationstag 3,5 aus der inneren Zellmasse einer *murinen* Blastozyste entnommen. Die Zellen werden von dem Institut für Medizinische Mikrobiologie der HHU Düsseldorf (Univ.-Prof. Dr. med. K. Pfeffer) zur Verfügung gestellt.
Des Weiteren werden USSC verwendet, die aus Nabelschnurblut gewonnen werden und anschließend nach einem bereits publizierten Protokoll isoliert und kultiviert werden (Kögler et al., 2004). Die Entnahme erfolgt nach Einverständnis der Mutter. Die Zellen werden von dem Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika der HHU Düsseldorf (Prof. Dr. rer. nat. G. Kögler, Leiterin der José Carreras Stammzellbank Düsseldorf) zur Verfügung gestellt.
Die vor der Transplantation erforderliche osteogene Differenzierung erfolgt nach einem bereits publizierten Protokoll (Handschel et al., 2008), durch Hinzugabe von DAG-Medium. Es wird eine Zusammensetzung von 100nM Dexamethason, 50µM L-Ascorbat und 10 mM ß-Glycerolphosphat gewählt.

Ein Ethikvotum über das Knochen-Engineering mit humanen Nabelschnurstammzellen (USSC) *in vivo* liegt vor. Es wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität die Studiennummer 2888 vergeben.

2.2.2 Verwendete Probenkörper

Als Biomaterial wird ICBM verwendet, welches zuvor nach einem etabliertem Verfahren aus Rinder-Femurknochen gewonnen wird (Depprich et al., 2005; Wurzler et al., 2004). Dadurch entstehen entfettete, geblichene und demineralisierte (lyophilisierte) Trägermaterialien, bei denen die osteoinduktiven Matrixproteine inaktiviert werden. Für die Verwendung bei dem *in vivo* Versuch werden Probenkörper mit einem Durchmesser von 6,0 mm und einer Länge von 5,0 mm hergestellt (Abbildung 1).

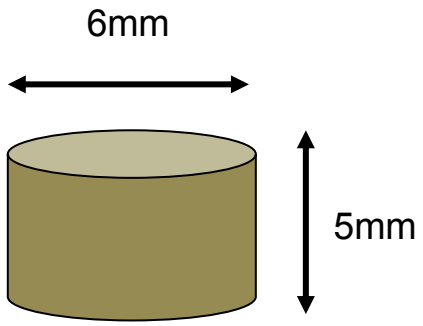


Abb. 1 Schematische Darstellung des verwendeten ICBM-Probenkörpers mit Maßangaben.

2.2.3 Herstellung der Mikromassen

Die Bildung der USSC-Mikromassen wird von unserer Arbeitsgruppe wie folgt durchgeführt: nach 14 Passagen werden die USSC von den Kulturschalen abgelöst, bei 250xg für 7 Minuten zentrifugiert und anschließend in das Kulturmedium resuspendiert (1Mio. Zellen/ml). 60µl 2%ige Agarose in DMEM dient zur Beschichtung von 96-well Platten, so dass ein Anhaften der Zellen an der Unterlage und somit eine Bildung von 2D-Kulturen verhindert wird. Pro „*well*“ werden 180µl Zellsuspension hinzugegeben, was etwa 200.000 Zellen

entspricht. Die Zellkultur wird über Nacht inkubiert. Bei dem Mediumwechsel werden, zur osteogenen Differenzierung, 160µl DAG-Medium zu den Mikromassen hinzugefügt.

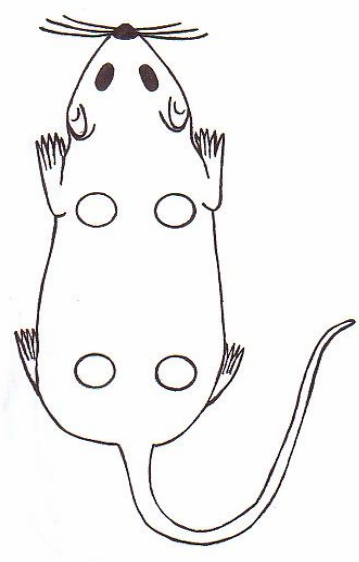
2.2.4 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienen immuninkompetente Ratten (RNU-Ratten). Zum einen bieten diese den Vorteil, das Auftreten unerwünschter Immunreaktionen auszuschließen, zum anderen ermöglichen sie ein einfaches *Handling* der Transplantate, ohne dabei eine zu große Belastung für die Tiere darzustellen. Die in den Versuch einbezogenen Ratten sind alle männlich, zwei bis drei Monate alt und werden mit Trockenfutter sowie Aqua ad libidum gefüttert. Die Haltung erfolgt in den S1-Räumen der Tierversuchsanstalt der HHU Düsseldorf, gemäß den Bestimmungen des Tierschutzgesetzes. Die Anstalt stellt die Betreuung durch Tierärzte sicher.

2.2.5 Versuchsdurchführung

In den Versuch werden 31 Tiere einbezogen. Der Versuch wird von unserer Arbeitsgruppe wie folgt durchgeführt: unter Injektionsnarkose mit Ketamin und Xylazin i.p. werden den Ratten pro Seite zwei Transplantate in die Rückenmuskulatur implantiert. Die Muskeltaschen, in die die Transplantate eingebracht werden, befinden sich 3 cm paravertebral, 1,5 cm unterhalb der Schulter und 1,5 cm oberhalb des Beckens (Abbildung 2). Sie werden mit zwei nicht resorbierbaren Nähten (Ethilon 4-0) verschlossen, die Haut und Unterhaut wird mit Ethilon 2-0 zugenäht.

a)



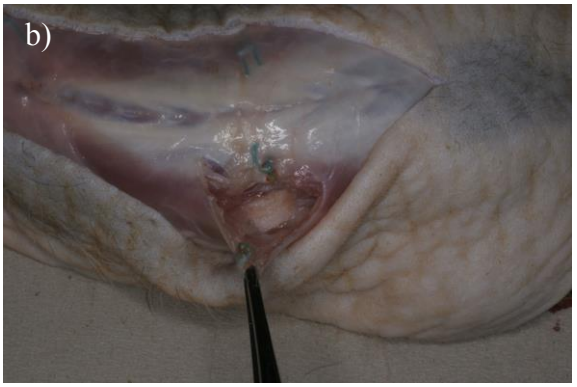


Abb. 2 Tiermodell

a) Implantatlokalisationen paravertebral rechts und links anterior sowie posterior (Handschel et al., 2010)

b) Explantation eines Probenkörpers aus einer Muskeltasche

c) Explantiertes Biomaterial-Zell-Konstrukt

In die oben beschriebenen Muskeltaschen werden folgende vier Transplantattypen in randomisierter Reihenfolge implantiert:

- Probenkörper mit osteogen vordifferenzierten USSC (USSC): Die USSC werden mittels DAG vordifferenziert und für drei Tage auf dem Probenkörper inkubiert *(prae implantationem).*

- Probenkörper mit USSC-Mikromassen (USSC-Mikro): Auf diesem Probenkörper werden zwei, mit DAG vordifferenzierte USSC-Mikromassen drei Tage *prae implantationem* inkubiert.

- Probenkörper mit ESC (ESC): Nach Vordifferenzierung mittels DAG werden ESC für 3 Tage *prae implantationem* auf dem Probenkörper inkubiert.

- Probenkörper ohne Zellen (Kontrolle): *Prae implantationem* wird der Probenkörper in DAG eingelegt. Er dient jeweils als Kontrollgruppe.

2.2.6 Versuchsauswertungen

Die mögliche Knochenbildung soll sowohl histologisch, als auch radiologisch beurteilt werden. Für die histologische Auswertung werden die Transplantate nach zwei, drei, vier und sechs Monaten explantiert. So werden acht Tiere nach zwei Monaten, neun Tiere nach drei Monaten, vier Tiere nach vier Monaten und noch einmal vier Tiere nach sechs Monaten geopfert. Vier Tiere versterben vor der ersten radiologischen Auswertung, weitere zwei Tiere vor der letzten Opferung nach sechs Monaten. Um die Tiere radiologisch zu beurteilen wird zu fünf Zeitpunkten bei allen lebenden Tieren eine Computertomographie durchgeführt.

2.2.6.1 Radiologische Auswertung

Die Tiere werden nach einer Woche, einem Monat, zwei Monaten, drei Monaten und vier Monaten einem Ganzkörper-CT unterzogen. Dem durchführenden Radiologen liegen dabei zu keinem Zeitpunkt Daten über die Transplantatzusammensetzung vor, so dass die Werte ohne subjektive Beeinflussung erstellt werden können. Anschließend wird das Mineralisationsvolumen im Implantationsbereich gemessen.

2.2.6.2 Histologische Untersuchung

Um die Mineralisation der Transplantate histologisch auswerten zu können, müssen diese zunächst explantiert und dann in Paraffin eingebettet werden.
Zunächst werden diese nach der Explantation einmalig in 1x PBS gewaschen und anschließend in 4% gepuffertem Formaldehyd fixiert. Um nun die

Einbettung in Paraffin zu ermöglichen, werden die Proben durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert. Diese besteht aus 20%igem Ethanol, in welchem die Proben über Nacht gelagert werden und anschließend für jeweils zehn Minuten in 50%igem, 70%igem, 96%igem und 100%igem Ethanol belassen werden. Bis zum Einbetten befinden sich die Proben in Xylol. Nach dem Einbetten in einen Paraffinblock werden aus den Proben mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms jeweils 7µm dicke Schnitte angefertigt und auf Superfrost Objektträger aufgezogen.

Die zur Färbung benötigte 2%ige Alizarin-Lösung wird wie folgt hergestellt. Dazu werden 5g Alizarin in 250 ml Aqua dest. gelöst. So entsteht ausreichend Alizarin Rot-Lösung, um die Schnitte vollständig einzutauchen.

Vor der Färbung muss das Paraffin der Schnitte herausgelöst werden und die Schnitte gewässert werden. Das Paraffin wird mittels siebenminütigem Xylolbad herausgelöst, eine absteigende Alkoholreihe führt zu Entwässerung. Dabei werden die Schnitte für jeweils eine Minute in 100%igem, 96%igem, 70%igem und 50%igem Ethanol getränkt und bis zur Färbung in Aqua dest. belassen.

Die Färbung erfolgt durch die 2%ige Alizarin-Lösung, in die die Schnitte für jeweils zwei Minuten getränkt werden. Der Farbstoff des Alizarin-Rot bindet an die Kalziumsalze der Schnitte. Werden diese gewaschen verbleibt nur der Anteil des Farbstoffs, der erfolgreich binden konnte, der übrige Farbstoff löst sich wieder von den Proben. Anschließend erfolgt eine aufsteigende Alkoholreihe, in der die Schnitte für jeweils 30 Sekunden in 50%igem, 70%igem und 96%igem Ethanol und für drei Minuten in 99,5%igem Ethanol verbleiben. Danach werden die Schnitte für sieben Minuten in Xylol eingelegt.

Eingedeckt wird mittels 1-2 Tropfen Fluoromount G auf den Superfrost-Objektträgern, anschließend wird ein passendes Deckglas aufgelegt.

Die mit Alizarin-Rot angefärbten Proben werden bei 25facher Vergrößerung am Mikroskop betrachtet und aussagekräftige Bereiche, mit Hilfe einer Kamera (DC300F, Fa. Leica, Wetzlar (D)) auf den PC übertragen. Die mineralisierten Anteile des ICBM werden mittels Image-Analyser (Computerprogramm: Leica QWin V3) ausgemessen (Handschel et al., 2010). Hierfür wird zunächst ein geeignet großer Rahmen um die angeschnittene ICBM-Fläche gelegt. Innerhalb dessen wird durch virtuelle Anfärbung der prozentualer Anteil der angeschnittenen ICBM-Fläche am Gesamtbild ermittelt. Anschließend wird

derjenige Teil des ICBM virtuell angefärbt, an dem das Alizarin-Rot gebunden hat und der somit den mineralisierten Teil des ICBM darstellt. Auch hier wird der prozentuelle Wert des gefärbten ICBM am Gesamtbild errechnet.
Um den mineralisierten Anteil des ICBM zu ermitteln werden die beiden Werte mittels Dreisatz zueinander in Relation gesetzt. ICBM mineralisiert = ICBM Alizarin Rot/ ICBM Gesamt x 100
Beträgt der Anteil des ICBM am Gesamtbild beispielsweise 40% und der mineralisierte Anteil des ICBM am Gesamtbild 20%, so sind insgesamt 50% des ICBM mineralisiert. Mit den so erhaltenen relativen Prozentwerten wird die statistische Analyse durchgeführt.

2.3 Statistische Auswertung

Mit Hilfe einer Statistiksoftware werden anhand der gewonnenen Daten die Berechnungen und Signifikanzanalysen durchgeführt. Durch zwei nichtparametrische Tests (Kruskal-Wallis-Test und Mann-Whitney-U-Test) wird das prozentuale Volumen der Mineralisation der Matrixfläche auf signifikante Unterschiede getestet. Mithilfe des Kruskal-Wallis-Tests wird getestet, ob zwischen den Werten der Probenkörper mit USSCs, USSC-Mikromassen, ESCs und der Leerprobe zu jedem Zeitpunkt signifikant unterschiedliche Ergebnisse vorliegen. Dies lässt sich anhand der durch den Kruskal-Wallis-Test ermittelten p-Werte zu einem Signifikanzniveau <5% an 3 der 4 Messzeitpunkte statistisch darlegen. Der Mann-Whitney-U-Test wird verwendet um die Signifikanz des Unterschieds zwischen den Verteilungen zweier Färbungen zueinander zu überprüfen. So kann das Signifikanzniveau bestimmt werden zu dem die Nullhypothese, dass die Werte aus einer identischen Verteilung stammen, abgelehnt wird. Wird die Nullhypothese abgelehnt, bedeutet dies, dass sich die Lage der Verteilungen zueinander signifikant unterscheidet. Das Signifikanzniveau für den Mann-Whitney-U-Test wird auf 5% festgelegt.

3 Ergebnisteil

3.1 Daten

Ursprünglich werden 31 Tiere in den Versuch einbezogen, von denen vier vorzeitig verstarben. Somit werden in dem Versuch die radiologischen Daten von 27 verschiedenen Tieren ausgewertet. Vor der letzten Opferung nach sechs Monaten verstarben wiederum zwei Tiere, so dass die Probenkörper von 25 verschiedenen Tieren ausgewertet werden können. Weder Zeichen einer Wundheilungsstörung, noch einer Entzündung oder andere Auffälligkeiten können bei den Tieren festgestellt werden (Handschel et al., 2010).

3.2 Radiologische Ergebnisse

Eine Woche, einen Monat, zwei, drei und vier Monate nach Implantation der Proben werden die Tiere von einem Radiologen untersucht, der bezüglich der Transplantattyplokalisation verblindet ist. Dabei wird anhand der einzelnen Schichten der CTs das Volumen der Mineralisation bestimmt.
Wie auf den Abbildungen zu erkennen, zeigen die computertomographischen Aufnahmen kurz nach der Implantation der Proben keine röntgenundurchlässigen Strukturen (Abbildung 3, Abbildung 4 und Abbildung 6) (Handschel et al., 2010). Diese können jedoch in den folgenden Aufnahmen, einige Monate nach Implantation in unterschiedlicher Ausprägung beobachtet werden (Tabelle 2, Abbildung 3, Abbildung 5 und Abbildung 6).

Mittelwerte (und Standardabweichung)	1 Woche	1 Monat	2 Monate	3 Monate	4 Monate
Leerprobe	0,0 (0,0)	0,3 (0,2)	0,4 (0,3)	0,4 (0,3)	0,4 (0,4)
ESC	0,0 (0,0)	1,2 (0,6)	5,6 (2,6)	4,1 (2,1)	10,4 (7,1)
USSC	0,0 (0,0)	187,6 (13,1)	174,7 (16,8)	186,9 (16,2)	197,4 (16,5)
USSC-Mikromassen	0,0 (0,0)	151,3 (14,8)	155,2 (18,1)	147,5 (21,6)	142,3 (33,2)

Tabelle 2 Mittelwerte (in mm³) und Standardabweichungen der Volumenmessung des mineralisierten Gewebes der vier Transplantattypen zu den fünf Zeitpunkten der computertomographischen Untersuchungen.

Volumen der Mineralisierung

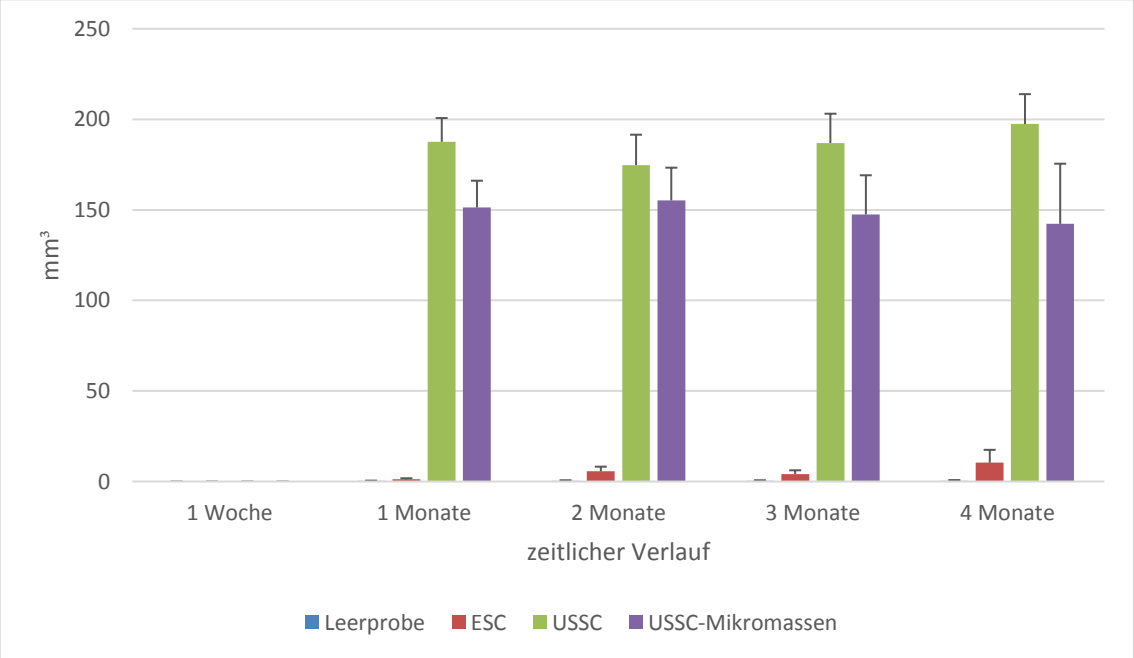


Abb. 3 Volumen-Messung des mineralisierten Gewebes in mm³ nach Implantation. Eigene Darstellung, publiziert in Handschel et al., 2010.

Wie deutlich zu erkennen ist, zeigen sich hinsichtlich des Mineralisationsvolumens deutliche Unterschiede zwischen den verwendeten

Transplantattypen. So werden bei den Transplantaten mit USSC bereits nach einem Monat hohe Werte um 187,6 ± 13mm³ (USSC) und 151,3 ± 15mm³ (USSC-Mikromassen) beobachtet (Handschel et al., 2010). Im weiteren zeitlichen Verlauf können jedoch keine statistisch signifikanten Änderungen mehr festgestellt werden. Unter Verwendung der oben beschriebenen Tests, weisen beide Transplantattypen verglichen mit ESC und der Kontrollgruppe ein hochsignifikant größeres Volumen der Mineralisation auf ($p<0,001$) (Handschel et al., 2010). Untereinander können jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Transplantaten mit USSC festgestellt werden (Handschel et al., 2010). Auch die Kontrolle und ESCs zeigen untereinander keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Mineralisationsvolumens. Die ESC-Transplantate erreichen darüber hinaus nur knapp 10% des Volumens der USSC-Transplantate (Handschel et al., 2010).

CT-Bilder 1 Woche post OP

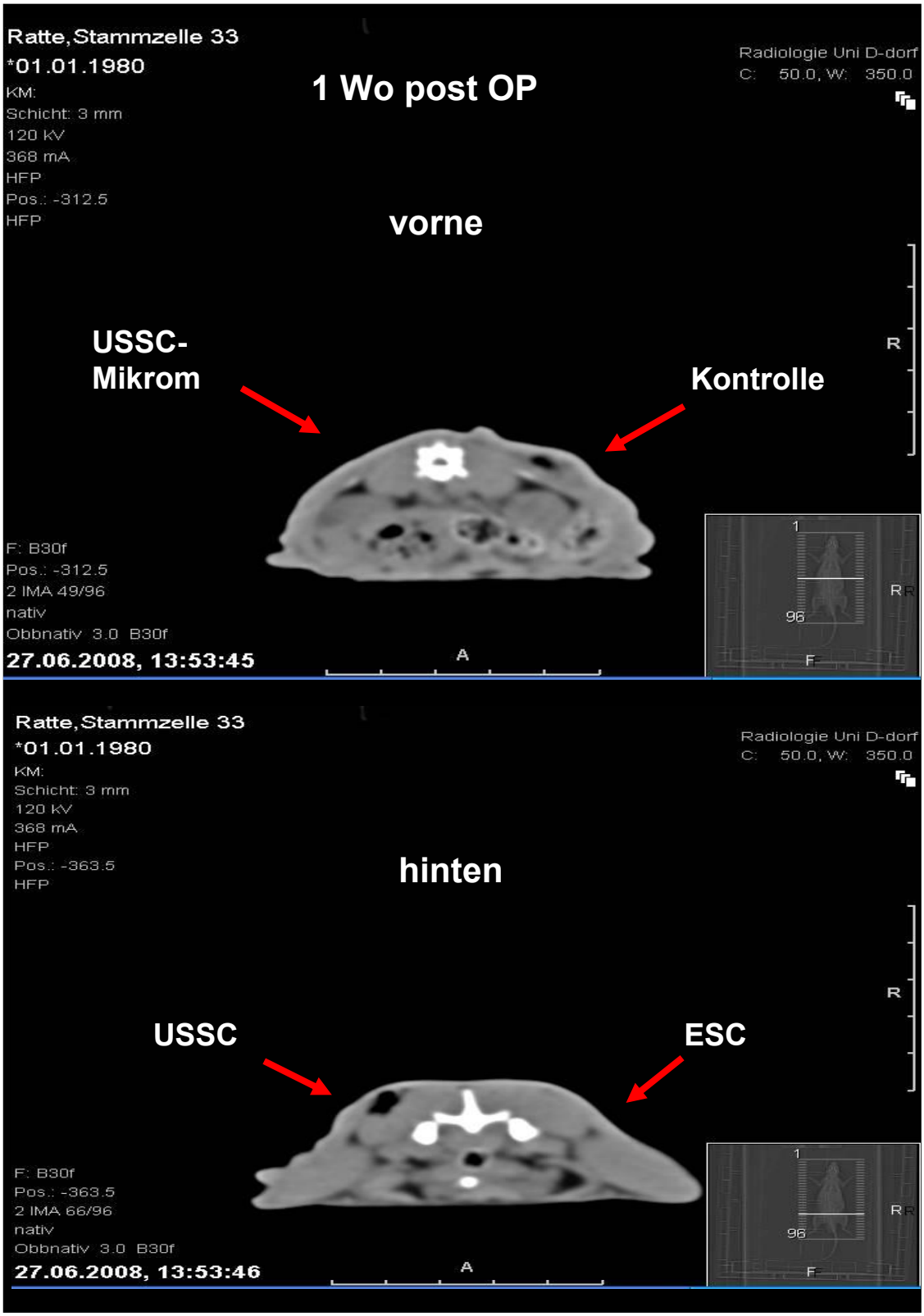


Abb. 4 Computertomographische Schnittbilder eine Woche nach Transplantatimplantation. An keiner Lokalisation der vier Transplantattypen sind Mineralisierungen zu erkennen.

CT-Bilder 4 Monate post OP

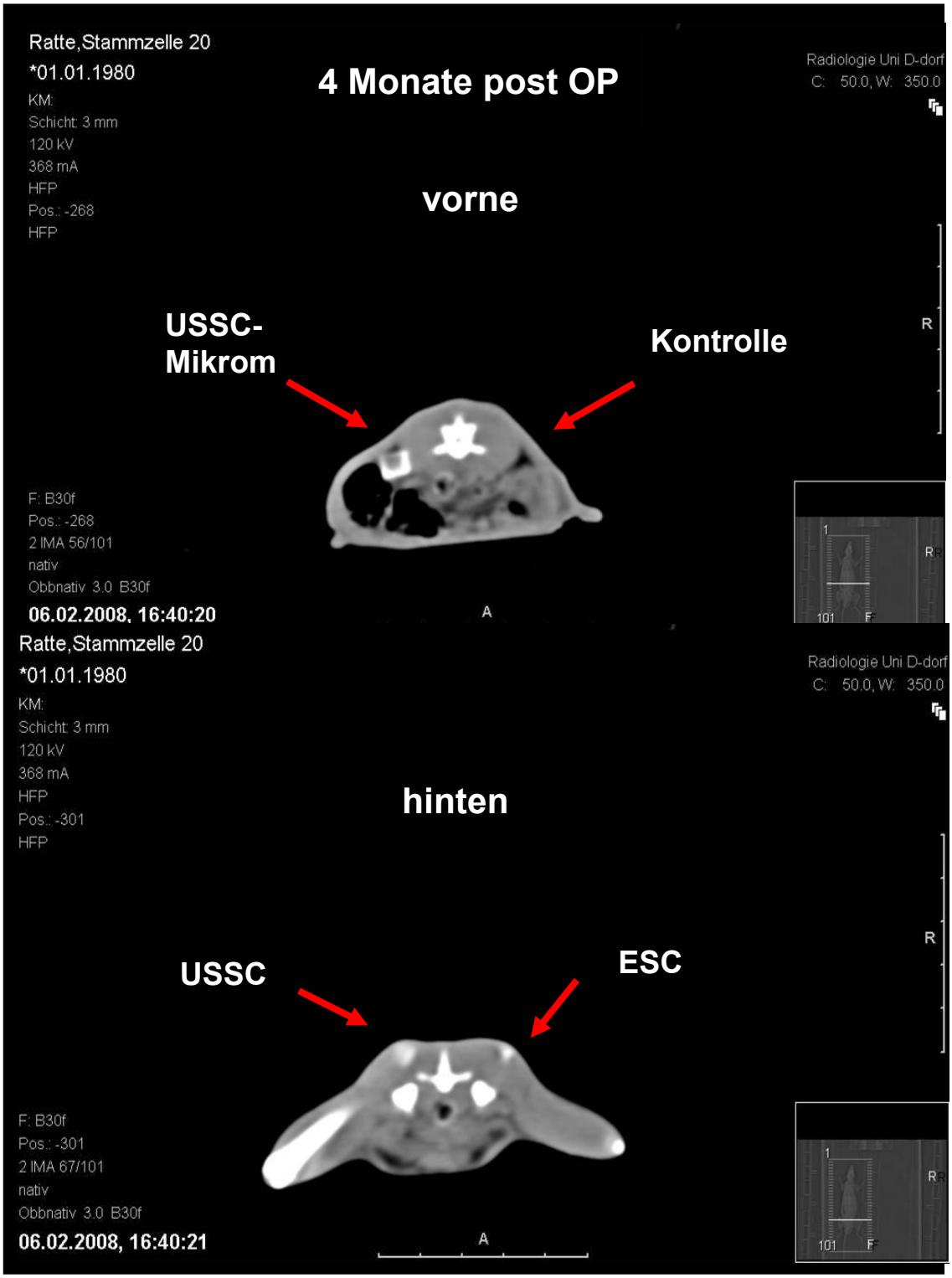


Abb. 5 Computertomographische Schnittbilder vier Monate nach Transplantatimplantation. Deutliche Mineralisierung im Bereich der USSC-Mikromassen und der USSCs. Geringe Mineralisierung im Bereich des ESC-Transplantats. Keine Mineralisierung im Bereich der Kontrolle.

CT-Rekonstruktionen

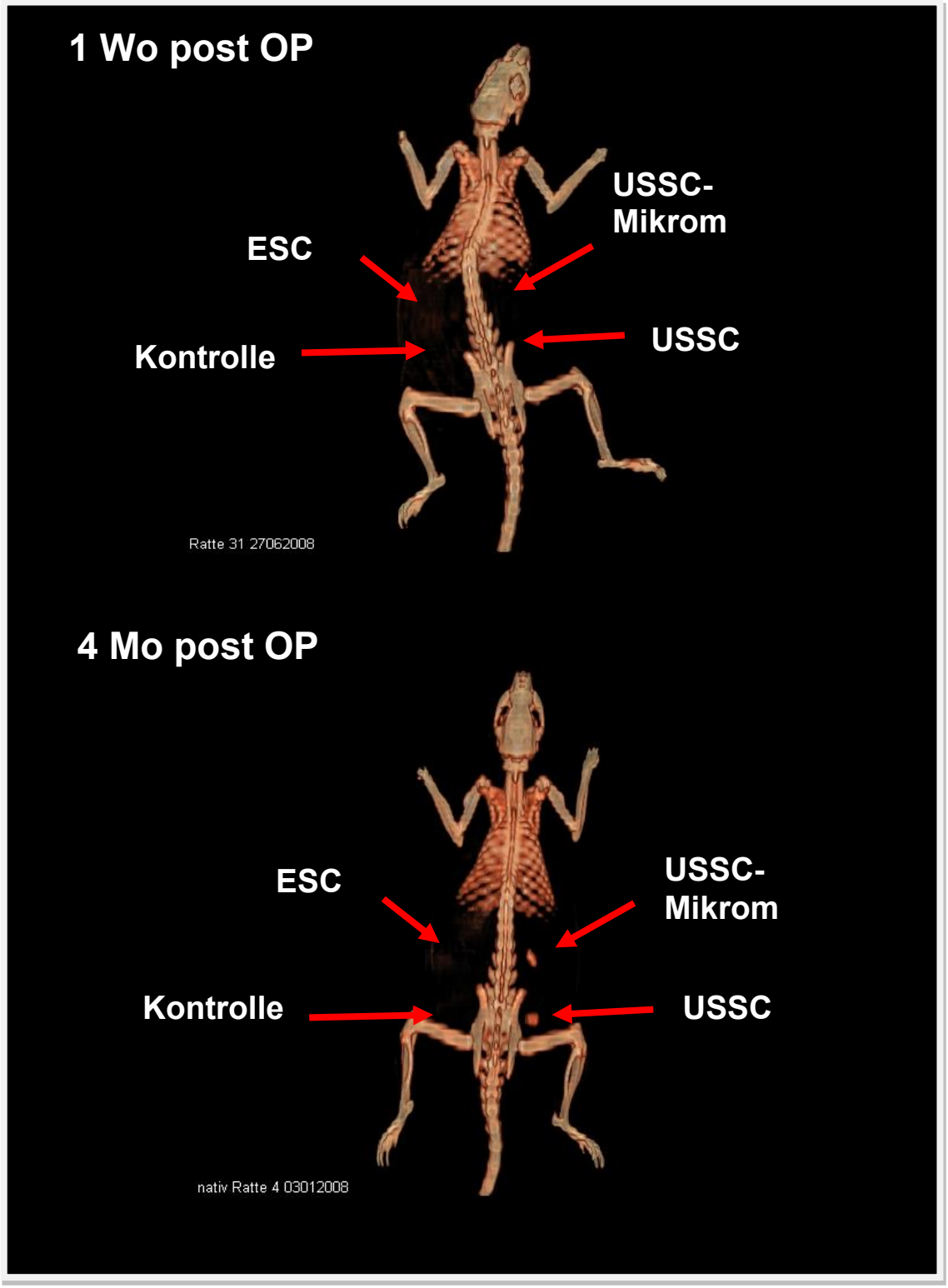


Abb. 6 Computertomographische Rekonstruktion eine Woche und vier Monate nach Transplantatimplantation. Deutliche Mineralisierung im Bereich der USSC-Mikromassen und der USSCs. Keine Mineralisierung im Bereich der ESCs und der Kontrolle. Eigene Darstellung, publiziert in Handschel et al., 2010.

3.3 Histologische Ergebnisse

Die oben beschriebenen radiologischen Ergebnisse können durch die histologischen Auswertungen insgesamt bestätigt werden. Es werden wiederum der Kruskal-Wallis-Test und Mann-Whitney-U-Test angewendet, um die statistische Signifikanz zu überprüfen. So zeigen die Mineralisationen, die durch die Alizarin Rot Färbung nachgewiesen werden, eine signifikante Abhängigkeit bezüglich des verwendeten Transplantattyps (Handschel et al., 2010). Wie in den Abbildungen 8, 9, 10 und 11 zu erkennen ist, finden sich in den Transplantaten der Kontrollgruppe und den Transplantaten der ESCs zu keinem der vier Opferzeitpunkte signifikante Mineralisationsnachweise durch die Alizarin Rot Färbung. Die USSC- und USSC-Mikromassen-Transplantate hingegen zeigen zu allen vier Opferzeitpunkten eine deutliche Färbung durch Alizarin Rot.

Die Auswertung des Kruskal-Wallis Tests zeigt zunächst anhand der bestimmten p-Werte, dass die vier verschiedenen Probenkörper-Zell-Konstrukte zu drei der vier Opferzeitpunkte signifikante Unterschiede zueinander haben (bei einem Signifikanzniveau von 5%). Die entsprechenden Opferzeitpunkte sind der erste, zweite und vierte Opferzeitpunkt. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass die vier verschiedenen Probenkörper zu unterschiedlich ausgeprägten Ergebnissen bezüglich der Mineralisation führen (Tabelle 3 und Abbildung 7).

Mittelwerte (und Standardabweichung)	2 Monate	3 Monate	4 Monate	6 Monate
Leerprobe	1,38 (1,61)	6,01 (10,889)	0,22 (0,36)	11,58 (19,99)
ESC	5,41 (10,37)	5,00 (4,66)	14,27 (23,21)	1,03 (0,26)
USSC	72,38 (34,39)	73,58 (16,82)	21,73 (32,05)	81,18 (11,26)
USSC-Mikromassen	48,10 (40,61)	78,43 (16,56)	28,41 (30,35)	77,19 (12,10)

Tabelle 3 Mittelwerte (in %) und Standardabweichungen der vier Transplantattypen zu den vier Opferzeitpunkten.

Mineralisierung der Matrixfläche in %

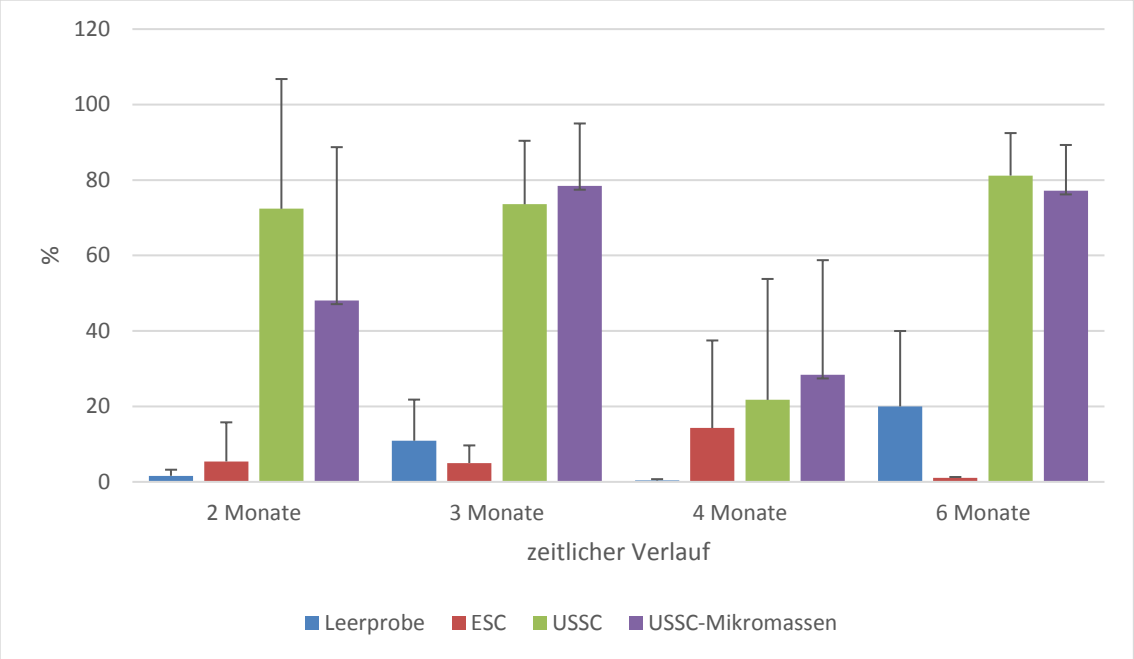


Abb. 7 Mineralisierung in Prozent nach Alizarin Rot Färbung.

Anhand der Mittelwerte ist zu erkennen, dass die USSC- und USSC-Mikromassen-Transplantate zu allen vier Entnahmezeitpunkten eindeutig höhere Mineralisationen als die Leerprobe und ESC aufweisen.

So sind die Mittelwerte von ESC und Leerprobe größtenteils einstellig, während die der Transplantate mit USSC und USSC-Mikromassen zwischen 21,73% und 81,18% liegen. Zwar sind auch die Standardabweichung der Werte von USSC und USSC-Mikromassen zu den vier Zeitpunkten höher, allerdings nur geringfügig in Bezug auf die Mittelwerte. Der Mann-Whitney-U-Test, welcher verwendet wird um zu prüfen, ob sich 2 Stichproben in der Größe der Messwerte signifikant unterscheiden ergibt, dass die Proben mit USSC und USSC-Mikromassen zu allen Zeitpunkten jeweils signifikant größere Werte als die Transplantate mit der Leerprobe zeigen ($p<0,025$) und an 3 der 4 Zeitpunkte signifikant größere Werte als die mit ESCs haben (zu einem Signifikanzniveau von 5%). Somit sind sowohl die Werte der Transplantate mit USSCs als auch die mit USSC-Mikromassen gegenüber denen mit ESCs und der Kontrollen bereits nach einem Monat signifikant höher (Handschel et al., 2010). Dagegen kann ein signifikanter Unterschied zwischen ESCs und der Leerprobe nicht statistisch erwiesen werden (p zu 3 der 4 Zeitpunkte >0,13). Signifikante Unterschiede zwischen den USSCs und USSC-Mikromassen-Transplantaten können anhand des Mann-Whitney-U-Test zu keinem Zeitpunkt zum festgelegten Signifikanzniveau von 5% erbracht werden (p zu allen vier Zeitpunkten >0,05).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Ergebnisse der Alizarin-Rot Färbung mit den radiologischen Ergebnissen übereinstimmen. In beiden Fällen zeigen die beiden Transplantattypen mit USSCs signifikant höhere Werte bezüglich der Mineralisation als die Transplantate der Kontrolle oder der ESCs. In keinem Versuch können signifikante Unterschiede zwischen der Mineralisation von ESC-Transplantaten und Transplantaten der Kontrollgruppe, sowie zwischen Transplantaten mit USSCs und USSC-Mikromassen gezeigt werden.

Mineralisierung nach 2 Monaten

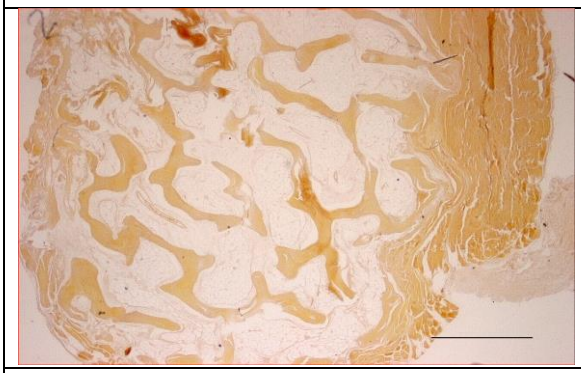
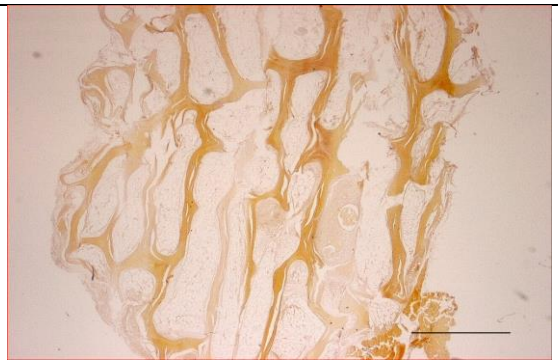
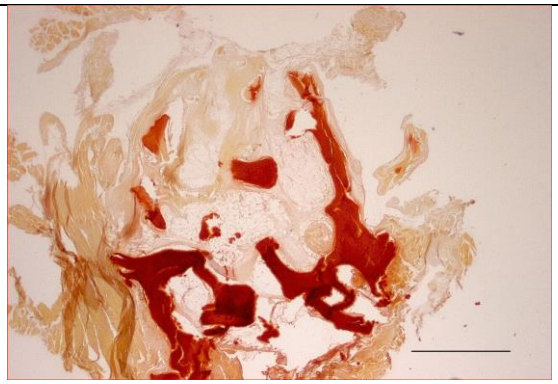
Kontrolle:	ESC:
	
USSC:	USSC-Mikromassen:
	

Abb. 8 Mineralisierung der verschiedenen Transplantattypen 2 Monate nach Implantation (Alizarin-Rot Färbung). Mineralisierungen sind rot gefärbt. Maßstab 1:25 (der Balken entspricht 1mm).

Mineralisierung nach 3 Monaten

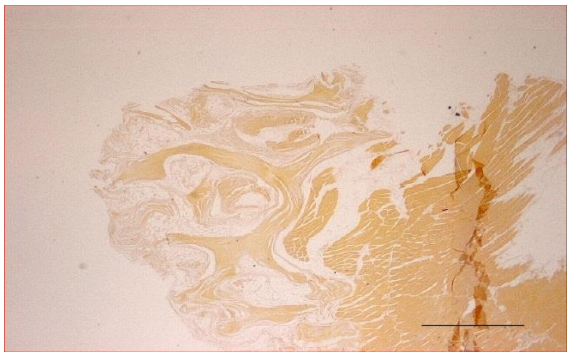
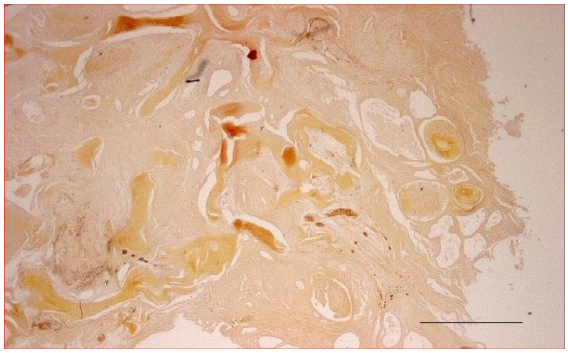
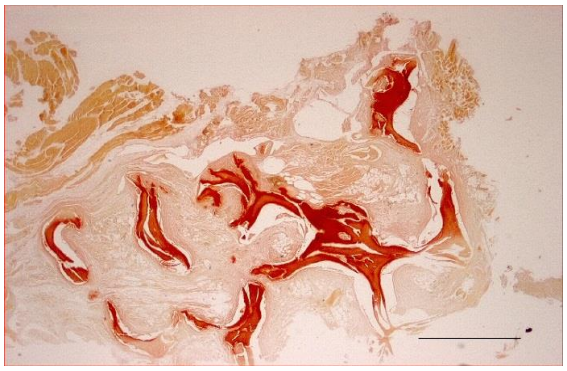
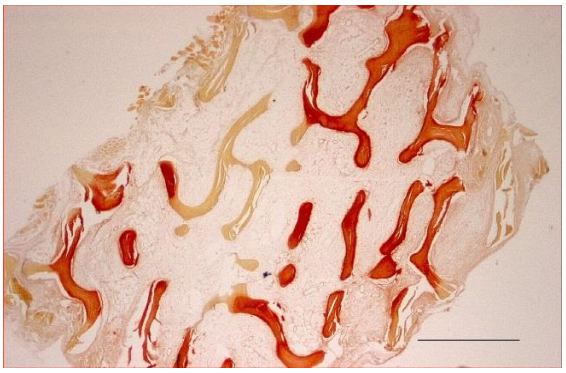
Kontrolle:	ESC:
	
USSC:	USSC-Mikromassen:
	

Abb. 9 Mineralisierung der verschiedenen Transplantattypen 3 Monate nach Implantation (Alizarin Rot Färbung). Mineralisierungen sind rot gefärbt. Maßstab 1:25 (der Balken entspricht 1mm). Eigene Darstellung, publiziert in Handschel et al., 2010.

Mineralisierung nach 4 Monaten

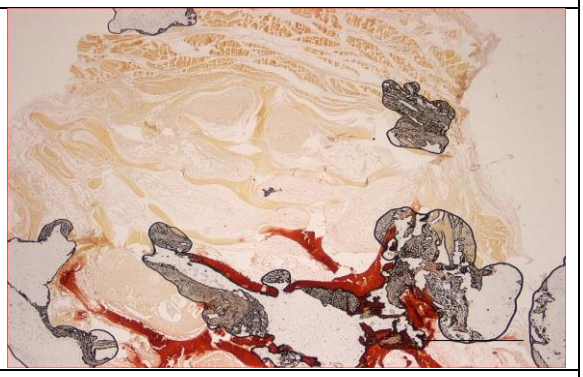
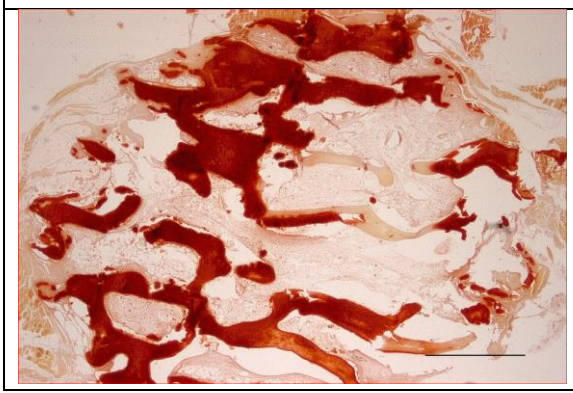
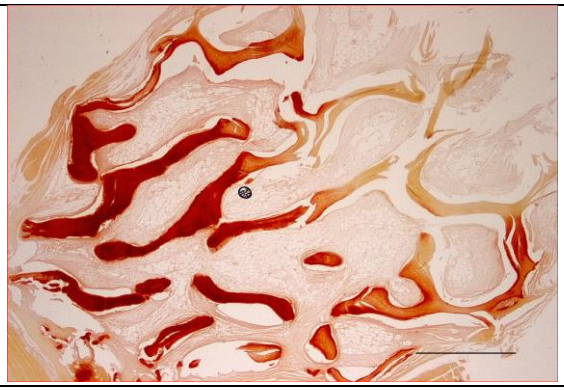
Kontrolle:	ESC:
	
USSC:	USSC-Mikromassen:
	

Abb. 10 Mineralisierung der verschiedenen Transplantattypen 4 Monate nach Implantation (Alizarin Rot Färbung). Mineralisierungen sind rot gefärbt. Maßstab 1:25 (der Balken entspricht 1mm).

Mineralisierung nach 6 Monaten

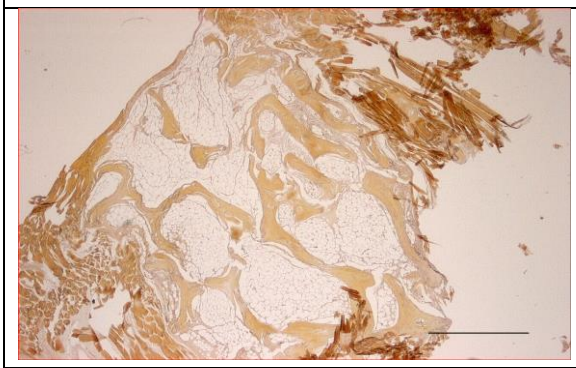
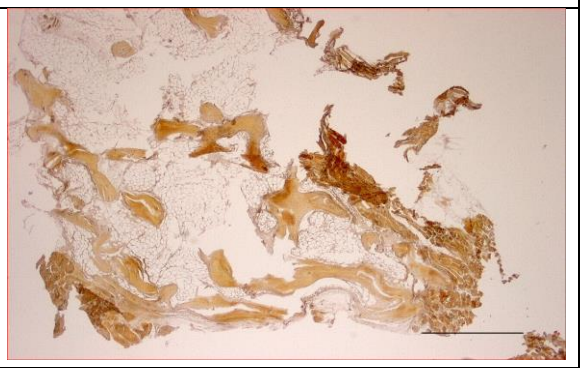
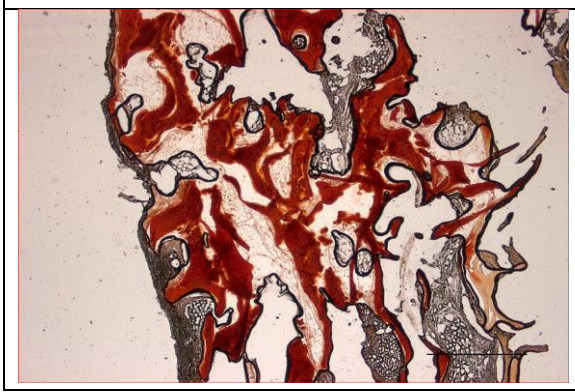
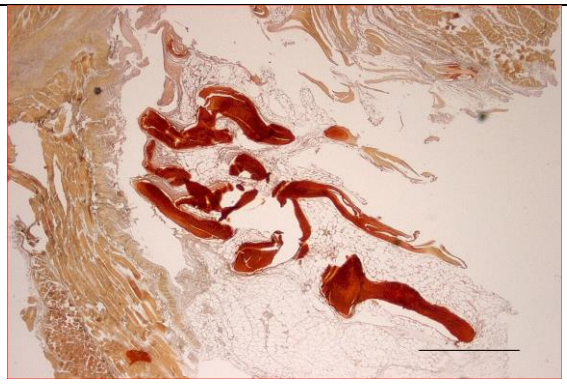
Kontrolle:	ESC:
	
USSC:	USSC-Mikromassen:
	

Abb. 11 Mineralisierung der verschiedenen Transplantattypen 6 Monate nach Implantation (Alizarin Rot Färbung). Mineralisierungen sind rot gefärbt. Maßstab 1:25 (der Balken entspricht 1mm).

4 Diskussion

In der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie stellt das "*Tissue Engineering*" von Knochen einen vielversprechenden Ansatz zur Therapie von Knochendefekten dar. Um ein gutes und für die Zukunft erfolgsversprechendes Ergebnis zu erreichen, sind vier Faktoren entscheidend:

1) geeignete Zellen (Handschel et al., 2006)

2) eine adäquate Matrix (Handschel et al., 2002; Meyer et al., 2004, Wiesmann et al., 2004)

3) geeignete Wachstumsfaktoren (Kübler et al., 1998; Depprich et al., 2005)

4) eine ausreichende Vaskularisation (Liu et al.,2011)

Ziel dieser Arbeit ist es, das "*Tissue Engineering"* von Knochen bezüglich der Eignung von humanen Nabelschnurblutstammzellen (USSCs) und deren Konfiguration zu untersuchen. Die humanen Nabelschnurstammzellen werden zum einen als 2D-Zellsuspension und zum anderen als Mikromassenkultur eingesetzt, um etwaige Vor- oder Nachteile der Mikromassentechnologie erkennen zu können. Die USSCs gelten als vielversprechende Zellen bezüglich des "*Tissue Engineerings*" von Knochen (Degistririci et al., 2008; Penolazzi et al., 2008). Sie gelten als *multipotent* und scheinen ein bedeutend niedrigeres immunogenes Potential zu zeigen als andere Stammzellen. Dies zeigt sich sogar bei nicht HLA-kompatiblen Transplantationen (Bradstock et al., 2006). Laut einigen *in vivo* Studien kann das Matrixmaterial die Verwendung von *ex vivo* generierten Knochen negativ beeinflussen, so dass die *in vivo* Regeneration durch Immunogenität des verwendeten Materials oder dessen Abbauprodukte beeinträchtigt wird (Meyer and Wiesmann, 2005; van der Kraan et al., 2002). Daher scheinen Trägermaterialien, die die natürliche extrazelluläre Matrix am besten imitieren, am geeignetsten. Bei der Verwendung von Mikromassenkulturen wird die extrazelluläre Matrix von den Zellen synthetisiert (Handschel et al., 2007) und kommt den *in vivo* Verhältnissen daher am nächsten.

Da jedoch auch unter der Verwendung von Mikromassen, bei der Generierung von größeren Knochenkonstrukten, derzeit nicht auf eine Matrix verzichtet werden kann, werden von Naujoks et al. Trägermaterialen bezüglich ihrer Biokompatibilität mit USSCs untersucht. Hierbei erweist sich ICBM als das

Trägermaterial mit der höchsten Biokompatibilität (Naujoks et al., 2011). Zudem wird die optimale Kultivierungsdauer, unter welcher das Aussprossen der Zellen nach Kulturende in großem Umfang gewährleistet ist, untersucht. Die optimale Kultivierungsdauer wird mit drei Tagen beziffert. Die osteogene Differenzierung wird dabei mittels DAG durchgeführt, welches in vorherigen Studien als geeignetes Stimulanz beschrieben wird (Handschel et al., 2009). Durch Implantation der Probenkörper in vorpräparierte Muskeltaschen gehen wir von einer ausreichenden Vaskularisation des Transplantatlagers aus.
Um die *ektope* Knochenbildung durch die verschiedenen Transplantattypen auswerten zu können, werden osteogen vordifferenzierte Matrix-Zellformationen in Versuchstiere implantiert, zum einen Probenkörper mit USSC-Mikromassen, Probenkörper mit USSCs in 2D-Konfiguration und Probenkörper mit ESCs. Alle Matrix-Zellformationen werden zuvor mit DAG vordifferenziert. In DAG eingelegte Probenkörper ohne Zellen dienen hierbei als Leerprobe. Als Versuchstiere dienen T-Zell-defiziente Ratten (RNU-Ratten). So können immunologische Abstoßungsreaktionen, auf Grund *xenogener* Herkunft der Zellen, verhindert werden. Des Weiteren können so Transplantate implantiert werden, die eine, für die weiteren Untersuchungen, ausreichende Größe aufweisen. Je Ratte werden die vier verschiedenen Transplantattypen in vorpräparierte Muskeltaschen eingebracht. So soll ein gut vaskularisiertes Transplantatlager sichergestellt werden, welches sich in ausreichendem Abstand zu den tiereigenen Knochen befindet. Die *ektope* Knochenbildung wird anschließend nach einer Woche, einem, zwei, drei und vier Monaten computertomographisch und nach zwei, drei, vier und sechs Monaten histologisch befundet.

4.1 Fördern USSCs die Mineralisation in vivo?

Die computertomographischen Auswertungen der Mineralisationsvolumina zeigen beeindruckende Ergebnisse. So kann eine deutliche Abhängigkeit des Volumens vom jeweiligen Zelltyp beobachtet werden. Die USSC-Proben zeigen nach einem Monat hohe Werte von 187,6 ± 13mm³ *(USSCs)* und 151,3 ±

15mm³ (USSC-Mikromassen). Diese Werte bedeuten ein signifikant größeres Volumen der Mineralisation als die der Probenkörper mit ESCs und die der Leerprobe ($p<0.001$). Es besteht somit ein eindeutiger Zusammenhang zwischen den Nabelschnurstammzellen und den erzielten Mineralisationsvolumina. Interessanterweise ist das Mineralisationsvolumen der 2D-USSC-Transplantate entgegen der Erwartungen höher, als das der USSC-Mikromassen. Dieser Vorteil ist jedoch nicht statistisch signifikant. Interessant ist ebenfalls der zeitliche Verlauf der Mineralisation. Nach einer Woche ist auf den CT-Bildern noch keine röntgendichte Struktur zu erkennen. Es ist davon auszugehen, dass die Zellen eine gewisse Zeit benötigen, um sich zu Osteoblasten zu differenzieren und die Mineralisation zu initiieren. Bereits nach einem Monat sind dann Werte von bis zu 187,6mm³ erreicht. Die ESCs erreichen lediglich 10% der Mineralisationsvolumina der USSC-Transplantate. Diese bereits nach einem Monat entstandenen Volumina ändern sich im weiteren Verlauf bis zur letzten Vermessung nach vier Monaten nicht mehr signifikant. Dies legt nahe, dass das Potential zur Mineralisierung bereits nach einem Monat ausgeschöpft ist. Eine mögliche Erklärung könnte der Verlust lebender Zellen über den Zeitverlauf sein, so dass keine Zellen zur weiteren Mineralisierung zur Verfügung stehen. Des Weiteren könnten die Zellen zwar noch in ausreichendem Maße vorhanden sein, jedoch ihr Potential zur Mineralisierung eingebüßt haben. Die möglichen Unterschiede der Mineralisierung zwischen den 2D-USSC-Transplantaten und den USSC-Mikromassen-Transplantaten werden in 4.3 diskutiert.

4.2 Sind die USSCs den ESCs im Hinblick auf die Mineralisation von Knochen überlegen?

Die Ergebnisse der computertomographischen Untersuchung können in der histologischen Untersuchung bestätigt werden. So zeigen beide Probenkörper mit USSCs eine signifikant höhere Mineralisation, als die Probenkörper mit ESCs und die Leerproben ($p<0,025$ in Bezug zur Leerprobe). Die Signifikanz wird bei der histologischen Untersuchung bereits nach einem Monat erreicht.

Auch hier sind die 2D-USSCs den USSC-Mikromassen bevorteilt, jedoch nicht signifikant. Die Mittelwerte der Mineralisationsanteile nach einem Monat liegen bei den USSC mit 72,38% deutlich höher als die der USSC-Mikromassen mit 48,10%. Dieser Unterschied entspricht einem Signifikanzniveau von 92%. Im weiteren Verlauf werden solch hohe Unterschiede jedoch nicht mehr erzielt. Zwischen den ESCs und der Leerprobe lässt sich kein statistisch signifikanter Unterschied herausarbeiten. Der zeitliche Verlauf der Mineralisation zeigt jedoch einige Unterschiede zu der radiologischen Auswertung: im Gegensatz zu der radiologischen Auswertung zeigt sich in der histologischen Auswertung keine Stagnation der Werte nach einem Monat. Im Gegenteil zeigt die prozentuale Mineralisation der Probenkörper über den Zeitverlauf zwischen dem ersten Opferzeitpunkt zwei Monate *post implantationem* (*USSCs*: 72,38% und *USSC*-Mikromassen 48,10%) und dem letzten Opferzeitpunkt sechs Monate *post implantationem* (*USSCs*: 81,18% und *USSC*-Mikromassen: 77,19%) eine Steigerung. Zwischenzeitlich fallen die Werte jedoch ab und erreichen ein Minimum von 21,73% bei den 2D-USSC-Transplantaten und von 28,41% bei den USSC-Mikromassen-Transplantaten nach vier Monaten. Dieser Gegensatz zwischen Abfall nach vier Monaten und Anstieg nach sechs Monaten gegenüber dem Ausgangswert nach zwei Monaten kann mit dem geringen Stichprobenumfang der letzten zwei Opferzeitpunkte zusammenhängen. Ein Erklärungsversuch für den Abfall der Werte ist, dass die Osteoblasten bis zu einem gewissen Zeitpunkt die Mineralisation induzieren, danach diese Fähigkeit jedoch einbüßen und die bereits entstandene mineralisierte Fläche wieder abgebaut wird. Möglich ist auch, dass die Zellen der USSC-Transplantate nach einer gewissen Zeit nicht mehr in ausreichender Menge vorhanden sind. Lässt man den zwischenzeitlichen Abfall der Werte außer Acht, nimmt der Anteil der Mineralisation bis zum sechsten Monat zu. Dies würde bedeuten, dass sowohl die Zellen der 2D-USSCs, als auch die der USSC-Mikromassen über einen Zeitraum von sechs Monaten zu einer Mineralisation des ICBM führen und über den gesamten Zeitraum in ausreichender Menge im Transplantat vorhanden sind.

4.3 Bieten USSC-Mikromassen gegenüber zweidimensionalen USSCs Vorteile bei der Mineralisierung?

Ziel dieser Arbeit ist es zum einen den etwaigen Vorteil von USSCs gegenüber ESCs zu testen und einen etwaigen Vorteil der Mikromassentechnologie gegenüber den zweidimensionalen USSCs zu untersuchen. Wie oben bereits beschrieben, zeigen beide Applikationsformen mit USSCs einen statistisch signifikanten Vorteil gegenüber den ESCs und der Leerprobe. Da Mikromassen den *in vivo* Verhältnissen am nächsten kommen, erhoffen wir uns einen deutlichen Vorteil in der Bildung *ektopen* Knochens. Entgegen der Erwartungen, kann der Mikromassentechnologie jedoch kein signifikanter Vorteil gegenüber der gewöhnlichen zweidimensionalen Zellsuspension zugesprochen werden. Im Gegenteil zeigt die histologische Auswertung mit Alizarin-Rot sogar eine schnellere Mineralisierung der zweidimensionalen USSC-Kulturen gegenüber den USSC-Mikromassen. So ist bei der Auswertung nach zwei Monaten ein großer Unterschied der Mineralisationsanteile der USSCs gegenüber der USSC-Mikromassen fest zu stellen. Dieser Unterschied entspricht zwar nicht dem festgelegten Signifikanzniveau von 95%, erreicht aber Werte von 92%. Auch bei der computertomographischen Auswertung zeigen die „freien“ USSCs über den gesamten Zeitverlauf höhere Mineralisierungsvolumina als die USSC-Mikromassen. Diese Werte sind jedoch ohne statistische Signifikanz.

Die, in der histologischen Auswertung gemessene frühere Mineralisierung der „freien“ USSCs gegenüber der Mikromassenkonfiguration kann mit der geringeren Aussprossbereitschaft vordifferenzierter Mikromassen zusammenhängen. So zeigen Langenbach et al., dass Mikromassen ohne Vordifferenzierung mittels DAG zunächst eine Mineralisierung im zentralen Bereich erkennen lassen. Mikromassen, die mit DAG vordifferenziert werden, zeigen jedoch eine frühzeitige Mineralisierung der Randzone. Diese Randzone erschwert den Zellen ein Aussprossen in die Peripherie und könnte somit einen Nachteil gegenüber der zweidimensionalen Applikationsform darstellen (Langenbach et al., 2009). Die 2-D-USSCs können ohne Hindernisse aussprossen und somit nach einem Monat einen höheren Mineralisationsanteil aufweisen, als die Mikromassen. Dieser Vorteil der freien Suspension scheint sich jedoch mit zunehmender Versuchsdauer zu relativieren, da sich zu keinem

Zeitpunkt ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Mikromassen und den „freien“ USSCs zeigt. Ab dem zweiten Monat *post implantationem* zeigen sowohl die 2D-USSCs, als auch die Mikromassen eine statistisch signifikant höhere Mineralisierung als die ESCs und die Kontrollgruppe.

4.4 Besitzen USSCs das Potential zukünftig klinische Bedeutung zu erlangen?

Es ist zu erwarten, dass das „*Tissue Engineering*“ mit USSCs in Zukunft eine immer bedeutendere Rolle in der Behandlung knöcherner Defekte einnehmen wird. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die USSCs den ESCs und der Leerprobe im Hinblick auf die Bildung knöcherner Gewebe deutlich überlegen sind. Dies ist sowohl histologisch, als auch computertomographisch nachzuweisen. USSCs weisen verschiedene Eigenschaften auf, die sie zu vielversprechenden Zellen für das „*Tissue Engineering*“ machen. Zum einen die fehlende Entnahmemorbidität im Vergleich zu anderen verwendeten Zellarten (z.B. mesenchymale Stammzellen des Knochenmarks). Zum anderen die fehlenden ethischen und rechtlichen Bedenken bei der Verwendung von USSCs im Gegensatz zu ESCs. Aber auch Ihre Multipotenz, das hohe Selbsterneuerungspotential und die hohe Differenzierungskapazität sind wichtige Eigenschaften hinsichtlich des „*Tissue Engineerings*“. Des Weiteren müssen USSCs im Vergleich zu MCSs nicht erst gewonnen werden und stehen der Therapie umgehend zur Verfügung. Auch die positiven klinischen Erfahrungen hinsichtlich der Leukämiebehandlung mit USSCs zeigen deren Potential und bieten Grund zur Hoffnung bald auch bei der Behandlung knöcherner Defekte Anwendung zu finden (Bachanova et al., 2008). Aktuell werden in Blutbanken bereits eine große Anzahl von Nabelschnurblutproben gelagert und stehen bei Bedarf dem Spender oder einem anderen Empfänger zur Verfügung. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit, HLA-kompatible Zellen zu finden und für die angestrebte Therapie zu nutzen. Nach jetzigem Kenntnisstand muss dazu zunächst eine Immuninkompatibilität zwischen Empfänger und verwendeten Zellen ausgeschlossen werden. Jedoch ist die

Bedeutung der Immuntoleranz bei der Verwendung von USSCs noch nicht abschließend geklärt. So scheinen selbst bei HLA-inkompatiblen Transplantationen nur geringe Immunreaktionen aufzutreten (Bradstock et al., 2006; Kleen et al., 2005). Auch eine andere Frage wird in Zukunft Gegenstand weiterer Forschungen sein müssen, um einen bedenkenlosen Einsatz der USSCs garantieren zu können, die nach der möglichen Entartungstendenz der USSCs. Die Ergebnisse bisheriger Studien scheinen Befürchtungen hinsichtlich eines erhöhten Entartungspotentials jedoch zu entkräften (Kögler et al., 2004). Neben all diesen Vorteilen, existieren jedoch auch Studien, die andere Zelltypen den USSCs als überlegen ansehen. Nach den Studien von Shafiee et al., zeigen USSCs im Vergleich zu BM-MSCs ein geringeres Potential zur osteogenen Differenzierung. Sind die Proliferationsraten noch gleich hoch und erreichen USSCs das Maximum der Aktivität der alkalischen Phosphatase bereits früher als BM-MSCs, zeigen diese insgesamt eine höhere Aktivität von alkalischer Phosphatase und die ausgeprägtere Mineralisation gegenüber den USSCs (Shafiee et al., 2011).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die transplantierten Zell-Trägermaterial-Konstrukte in der Lage sind, eine Mineralisation zu bewirken. Darüber hinaus sind die USSCs den ESCs in unserem Versuch deutlich überlegen und zeigen höhere Werte bezüglich der Mineralisation (Handschel et al., 2010).

Somit besitzen USSC nach heutiger Sicht die Möglichkeit zukünftig auch in der klinischen Praxis Bedeutung zu erlangen. Entscheidend wird die Möglichkeit sein, ausreichend große Zell-Trägermaterial-Konstrukte zu generieren, um auch große Knochendefekte zukünftig behandeln zu können.

5 Literaturverzeichnis

Aaron RK, Boyan BD, Ciombor DM, Schwartz Z, Simon BJ (2004). Stimulation of growth factor synthesis by electric and electromagnetic fields. *Clin Orthop Relat Res* 419):30-37.

Abbott A (2003) Cell culture: biology's new dimension. Nat 424 (6951):870–872.

Ami R. Amini, Cato T. Laurencin and Syam P. Nukavarapu (2012). Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges.Crit Rev Biomed Eng. 2012; 40(5): 363–408.

Aubin JE, Liu F (1996). The osteoblast lineage. In: Principles of Bone Biology. J Bilezikian, L Raisz and G Rodan editors. San Diego: Academic Press, pp. 51-67.

Bachanova V, Weisdorf D (2008). Unrelated donor allogeneic transplantation for adult acute lymphoblastic leukemia: a review. Bone Marrow Transplant. 2008 Mar;41(5):455-64. Epub 2007 Oct 29.

Bielby RC, Boccaccini AR, Polak JM, Buttery LD (2004). In vitro differentiation and in vivo mineralization of osteogenic cells derived from human embryonic stem cells. Tissue Eng. 2004 Sep-Oct;10(9-10):1518-25.

Bilezikian J, Raisz L, Rodan GA (1996). Principles of Bone Biology San Diego: Academic Press, Inc.

Binderman I, Fin N (1990). Bone substitutesorganic, inorganic, and polymeric: Cell material interactions. In: CRC Handbook of Bioactive Ceramics. T Yamamuro, L Hench and J Wilson editors. Boca Raton, Florida: CRC Press, pp. 45-51.

Boudreau NJ, Jones PL (1999). Extracellular matrix and integrin signalling: the shape of things to come. *Biochem J* 339 (Pt 3)(481-488.

Bradstock KF, Hertzberg MS, Kerridge IH, Svennilson J, McGurgan M, Huang G, Antonenas V, Gottlieb DJ (2006). Unrelated umbilical cord blood transplantation for adults with haematological malignancies: results from a single Australian centre. Intern Med J. 2006 Jun;36(6):355-61.

Burt RK1, Verda L, Kim DA, Oyama Y, Luo K, Link C (2004). Embryonic stem cells as an alternate marrow donor source: engraftment without graft-versus-host disease. J Exp Med. 2004 Apr 5;199(7):895-904. Epub 2004 Mar 29.

Caetano-Lopes J, Canhão H, Fonseca JE (2007). Osteoblasts and bone formation. Acta Reumatol Port. 2007 Apr-Jun;32(2):103-10.

Chaudhry GR, Yao D, Smith A, Hussain A (2004). Osteogenic Cells Derived From Embryonic Stem Cells Produced Bone Nodules in Three-Dimensional Scaffolds. J Biomed Biotechnol. 2004;2004(4):203-210.

Chehroudi B, McDonnell D, Brunette DM (1997). The effects of micromachined surfaces on formation of bonelike tissue on subcutaneous implants as assessed by radiography and computer image processing. J Biomed Mater Res. 1997 Mar 5;34(3):279-90.

Cogle CR, Guthrie SM, Sanders RC, Allen WL, Scott EW, Petersen BE (2003). An overview of stem cell research and regulatory issues. Mayo Clin Proc. 2003 Aug;78(8):993-1003.

Colton CK (1995). Implantable biohybrid artificial organs. Cell Transplant. 1995 Jul-Aug;4(4):415-36.

Covas DT1, Piccinato CE, Orellana MD, Siufi JL, Silva WA Jr, Proto-Siqueira R, Rizzatti EG, Neder L, Silva AR, Rocha V, Zago MA (2005). Exp Cell Res. 2005 Oct 1;309(2):340-4.

Davies JE (1996). In vitro modeling of the bone/implant interface. *Anat Rec* 245(2)*:*426-445.

Davies N, Dobner S, Bezuidenhout D, Schmidt C, Beck M, Zisch AH, Zilla P (2008). The dosage dependance of VEGF stimulation on scaffold neovascularisation. Biomaterials. 2008;29:3531–8.

Davis H, Guo X, Lambert S, Stancescu M, Hickman JJ (2012). Small Molecule Induction of Human Umbilical Stem Cells into MBP-positive Oligodendrocytes in a Defined Three-Dimensional Environment. ACS Chem Neurosci. 2012 Jan 18;3(1):31-39. Epub 2011 Nov 29.

Degistirici O, Jäger M, Knipper A (2008). Applicability of cord blood-derived unrestricted somatic stem cells in tissue engineering concepts. Cell Prolif. 2008 Jun;41(3):421-40. doi: 10.1111/j.1365-2184.2008.00536.x. Epub 2008 Apr 24.

Dennis JE, Haynesworth SE, Young RG, Caplan AI (1992). Osteogenesis in marrow-derived mesenchymal cell porous ceramic composites transplanted subcutaneously: effect of fibronectin and laminin on cell retention and rate of osteogenic expression. *Cell Transplant* 1(1)*:*23-32.

Depprich R, Handschel J, Sebald W, Kubler NR, Wurzler KK (2005). [Comparison of the osteogenic activity of bone morphogenetic protein (BMP) mutants.]. *Mund Kiefer Gesichtschir* 9(363-368).

Díaz-Romeral-Bautista M, Manchón-Miralles A, Asenjo-Cabezón J, Cebrián-Carretero J.L, Torres-García-Denche J, Linares-García-Valdecasas R (2010). Autogenus calvarium bone grafting as a treatment for severe bone resorption in the upper maxilla: A case report. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2010 Mar 1;15(2):e361-5.

D'Ippolito G, Schiller PC, Ricordi C, Roos BA, Howard GA (1999). Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *J Bone Miner Res* 14(7)*:*1115-1122.

Ducy P, Schinke T, Karsenty G (2000). The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. Science 2000; 289:1501-1504.

Fernyhough J.C, Schimandle J.J, Weigel M.C, Edwards C.C, Levine A.M. (1992). Chronic donor site pain complicating bone graft harvesting from posterior iliac crest for spinal fusion. Spine 17: 1474-80.

Frenkel G, Niederdellmann H (1975). [Use of compact aluminum oxide ceramics for reconstruction of the temporomandibular joint]. *Quintessenz* 26(11):37-44.

Frost HM (2000). The Utah paradigm of skeletal physiology: an overview of its insights for bone, cartilage and collagenous tissue organs. J Bone Miner Metab 18: 305-16.

Garcia-Godoy F, Murray PE (2006). Status and potential commercial impact of stem cell-based treatments on dental and craniofacial regeneration. Stem Cells Dev. 2006 Dec;15(6):881-7.

Gerber I, ap Gwynn I (2001). Influence of cell isolation, cell culture density, and cell nutrition on differentiation of rat calvarial osteoblast-like cells in vitro. *Eur Cell Mater* 2(10-20.

Gerber I, ap Gwynn I (2002). Differentiation of rat osteoblast-like cells in monolayer and micromass cultures. *Eur Cell Mater* 3(19-30).

Gilbert DM (2004). The future of human embryonic stem cell research: addressing ethical conflict with responsible scientific research. Med Sci Monit. 2004 May;10(5):RA99-103. Epub 2004 Apr 28.

Hall BK, Miyake T (2000). All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development. *Bioessays* 22(2):138-147.

Ham A.W. (1952). Some histophysiological problems peculiar to calcified tissues. J bone Joint Surg 34A:701-28.

Handschel J, Wiesmann HP, Stratmann U, Kleinheinz J, Meyer U, Joos U (2002). TCP is hardly resorbed and not osteoconductive in a non-loading calvarial model. *Biomaterials* 23(7)*:*1689-1695.

Handschel J, Wiesmann HP, Depprich R, Kubler NR, Meyer U (2006). Cell-based bone reconstruction therapies--cell sources. Int J Oral Maxillofac Implants 21(6)*:*890-898.

Handschel J (2007). Untersuchungen zur Eignung embryonaler Stammzellen für das Tissue Engineering von Knochen (Habilitationsschrift). Düsseldorf, Heinrich-Heine-Universität.

Handschel JG, Depprich RA, Kubler NR, Wiesmann HP, Ommerborn M, Meyer U (2007). Prospects of micromass culture technology in Tissue Engineering. Head Face Med. 2007 Jan 9;3:4.

Handschel J, Berr K, Depprich RA, Kubler NR, Naujoks C, Wiesmann HP, Ommerborn MA, Meyer U (2008). Induction of osteogenic markers in differentially treated cultures of embryonic stem cells. Head Face Med. 2008 Jun 10;4:10.

Handschel J, Berr K, Depprich R, Naujoks C, Kubler NR, Meyer U, Ommerborn M, Lammers L (2009). Compatibility of Embryonic Stem Cells with Biomaterials. J Biomater Appl. 2009 May;23(6):549-60.

Handschel J, Naujoks C, Langenbach F, Berr K, Depprich RA, Ommerborn MA, Kübler NR, Brinkmann M, Kögler G, Meyer U (2010). Comparison of ectopic bone formation of embryonic stem cells and cord blood stem cells in vivo. Tissue Eng Part A. 16(8):2475-83.

Heary R.F, Schlenk R.P, Sacchieri T.A, Barone D, Brotea C (2002). Persistant iliac crest donor site pain: independent outcome assessment. Neurosurgery 50:510-6.

Heng BC, Cao T, Stanton LW, Robson P, Olsen B (2004). Strategies for directing the differentiation of stem cells into the osteogenic lineage in vitro. *J Bone Miner Res* 19(9)*:*1379-1394.

Holmes S.B, Lloyd T, Coghlan K.M, Newman L (2002). Distraction osteogenesis of the mandible in the previously irradiated patient. J Oral Maxillofac Surg 60:305-9.

Jäger M, Sager M, Knipper A, Degistirici O, Fischer J, Kögler G, Wernet P, Krauspe R. R (2004).In vivo and in vitro bone regeneration from cord blood derived mesenchymal stem cells. Orthopade. 2004 Dec;33(12):1361-72.

Jäger M, Zilkens C, Bittersohl B, Krauspe R (2009). Cord Blood—An Alternative Source for Bone Regeneration Stem Cell Rev and Rep (2009) 5:266–277.

Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP (1997). Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. J Cell Biochem 1997 Feb;64:295–312.

Kanczler J.M, Oreffo R.O.C (2008). Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone.JEuropenan Cells and Materials Vol. 15 2008 (pages 100-114).

Karageorgiou V, Kaplan D. (2005). Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis.Biomaterials. 2005 Sep;26(27):5474-91.

Kleen TO, Kadereit S, Fanning LR, Jaroscak J, Fu P, Meyerson HJ, Kulchycki L, Slivka LF, Kozik M, Tary-Lehmann M, Laughlin MJ (2005). Recipient-specific tolerance after HLA-mismatched umbilical cord blood stem cell transplantation. Transplantation. 2005 Nov 15;80(9):1316-22.

Kögler G, Sensken S, Airey JA, Trapp T, Muschen M, Feldhahn N, Liedtke S, Sorg RV, Fischer J, Rosenbaum C, GrESChat S, Knipper A, Bender J, Degistirici O, Gao J, Caplan AI, Colletti EJ, Almeida-Porada G, Muller HW, Zanjani E, Wernet P (2004). A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med* 200(2)*:*123-135.

Kögler G, Sensken S, Wernet P (2006). Comparative generation and characterization of pluripotent unrestricted somatic stem cells with mesenchymal stem cells from human cord blood. *Experimental hematology 34 (2006) 1589-1595.*

Kübler NR, Reuther JF, Faller G, Kirchner T, Ruppert R, Sebald W (1998). Inductive properties of recombinant human BMP-2 produced in a bacterial expression system. *Int J Oral Maxillofac Surg* 27(4)*:*305-309.

Langenbach F, Naujoks C, Kersten-Thiele PV, Berr K, Depprich R, Kübler N, Kögler G, Handschel J (2009). Osteogenic differentiation influence stem cell migration out of scaffold free microspheres. Tissue Eng Part A. 2010 Feb;16(2):759-66. doi: 10.1089/ten.TEA.2009.0131.

Langer R, Vacanti JP (1993). Tissue Engineering. *Science* 260(5110)*:*920-926.

Leake DL, Habal MB (1976). Craniofacial contour defect reconstruction with a dacron/urethane composite: an alloplastic tray for bone induction fabrication and application. *J Biomed Mater Res* 10(4)*:*555-560.

Liu F., Zhang X., Yu X., Xu Y., Feng T., Ren D. (2011). In vitro study in stimulating the secretion of angiogenic growthfactors of strontium-doped calcium polyphosphate for bone Tissue Engineering. J Mater Sci Mater Med. 2011 Mar;22(3):683-92. doi: 10.1007/s10856-011-4247-1. Epub 2011 Feb 2.

Louis PJ, Cuzalina LA (2000). Alloplastic augmentation of the face. Atlas Oral Maxillofac Surg Clin North Am. 2000 Sep;8(2):127-91.

Lüllmann-Rauch R (2003). Histologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart - New York.

Maeno S, Niki Y, Matsumoto H, Morioka H, Yatabe T, Funayama A, Toyama Y, Taguchi T, Tanaka J (2005). The effect of calcium ion concentration on osteoblast viability, proliferation and differentiation in monolayer and 3D culture. *Biomaterials* 26(23):4847-4855.

Markaki AE1, Clyne W (2004). Magneto-mechanical stimulation of bone growth in a bonded array of ferromagnetic fibres. Biomaterials. 2004 Aug;25(19):4805-15.

McCulloch CA, StrugurESCu M, Hughes F, Melcher AH, Aubin JE (1991). Osteogenic progenitor cells in rat bone marrow stromal populations exhibit self-renewal in culture. *Blood* 77(9):1906-1911.

Meyer U, Meyer T, Jones DB (1998). Attachment kinetics, proliferation rates and vinculin assembly of bovine osteoblasts cultured on different pre-coated artificial substrates. *J Mater Sci Mater Med* 9(6):301-307.

Meyer U, Meyer T, Wiesmann HP, Stratmann U, Kruse-Losler B, Maas H, Joos U (1999a). The effect of magnitude and frequency of interfragmentary strain on the tissue response to distraction osteogenesis. *J Oral Maxillofac Surg* 57(11):1331-1339; discussion 1340-1331.

Meyer U, Wiesmann HP, Kruse-Losler B, Handschel J, Stratmann U, Joos U (1999b). Strain-related bone remodeling in distraction osteogenesis of the mandible. *Plast Reconstr Surg* 103(3):800-807.

Meyer U., Joos U., Wiesmann H.P. (2004). Biological and biophysical principles in extracorporal bone tissue engineering. Part I. Int J Oral Maxillofac Surg. 2004 Jun;33(4):325-32.

Meyer U, Wiesmann HP (2005). Bone and cartilage Tissue Engineering Heidelberg, Berlin, Tokyo, New York: Springer.

Meyer U, Kruse-Lösler B, Wiesmann HP (2005). Principles of bone formation driven by biophysical forces in craniofacial surgery. Br J Oral Maxillofac Surg. 2006 Aug;44(4):289-95. Epub 2005 Sep 12.

Moosmann S, Hutter J, Moser C, Krombach F, Huss R (2005). Milieu-adopted in vitro and in vivo differentiation of mesenchymal tissues derived from different adult human CD34-negative progenitor cell clones. Cells Tissues Organs. 2005;179(3):91-101.

Muschler GF, Nakamoto C, Griffith LG (2004). Engineering principles of clinical cell-based Tissue Engineering. J Bone Joint Surg Am. 2004;86:1541–58.

Naujoks C, Depprich R, Handschel J (2008). Aktueller Stand des osteogenen Tissue Engineerings. *Zahnärztliche Mitteilungen* 98(19)*:*44-51.

Naujoks C, Langenbach F, Berr K, Depprich R, Kübler N, Meyer U, Handschel J, Kögler G (2011). Biocompatibility of osteogenic predifferentiated human cord blood stem cells with biomaterials and the influence of the biomaterial on the process of differentiation. J Biomater Appl.25(5):497-512.

Nkenke E, Weisbach V, Winckler E, Kessler P, Schultze-Mosgau S, Wiltfang J, Neukam FW (2004). Morbidity of harvesting of bone grafts from the iliac crest for preprosthetic augmentation procedures: a prospective study. *Int J Oral Maxillofac Surg* 33(2)*:*157-163.

Panetta N.J., Gupta D.M., Quarto N., Longaker M.T. (2009). Mesenchymal cells for skeletal Tissue Engineering. Panminerva Med 51:25-41.

Penolazzi L, Lambertini E, Tavanti E, Torreggiani E, Vesce F, Gambari R, Piva R (2008). Evaluation of chemokine and cytokine profiles in osteoblast

progenitors from umbilical cord blood stem cells by BIO-PLEX technology. Cell Biol Int. 2008 Feb;32(2):320-5. Epub 2007 Sep 7.

Perry C.R. (1999). Bone repair techniques, bone graft, and bone graft substitutes. Clin Orthop Relat Res (360); 71-86.

Petrovic L, Schlegel AK, Schultze-Mosgau S, Wiltfang J (2006). Different substitute biomaterials as potential scaffolds in Tissue Engineering. *Int J Oral Maxillofac Implants* 21(2)*:*225-231.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science. 1999 Apr 2;284(5411):143-7.

Pochon JP, Kloti J (1991). Cranioplasty for acquired skull defects in children--a comparison between autologous material and methylmethacrylate 1974-1990. *Eur J Pediatr Surg* 1(4)*:*199-201.

Pretorius JA, Melsen B, Nel JC, Germishuys PJ (2005). A histomorphometric evaluation of factors influencing the healing of bony defects surrounding implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 20(3)*:*387-398.

Quarto R, Thomas D, Liang CT (1995). Bone progenitor cell deficits and the age-associated decline in bone repair capacity. *Calcif Tissue Int* 56(2)*:*123-129.

Rocha V, Gluckman E (2007). Outcomes of transplantation in children with acute leukaemia. *Lancet* 369(9577)*:*1906-1908.

Rodan GA (1992). Introduction to bone biology. Bone. 1992;13 Suppl 1:S3-6.

Sakaguchi Y1, Sekiya I, Yagishita K, Ichinose S, Shinomiya K, Muneta T (2004). Suspended cells from trabecular bone by collagenase digestion become

virtually identical to mesenchymal stem cells obtained from marrow aspirates. Blood. 2004 Nov 1;104(9):2728-35. Epub 2004 Jul 8.

Sasso RC, LeHuec JC, Shaffrey C (2005). Iliac crest bone graft donor site pain after anterior lumbar interbody fusion: a prospective patient satisfaction outcome assessment. J Spinal Disord Tech. 2005 Feb;18 Suppl:S77-81.

Scheller E.L., Krebsbach P.H., Kohn D.H. (2009). Tissue engineering: state of the art in oral rehabilitation. J Oral Rehabil. May 2009; 36(5): 368–389.

Shafiee A, Seyedjafari E, Soleimani M, Ahmadbeigi N, Dinarvand P, Ghaemi N (2011). A comparison between osteogenic differentiation of human unrestricted somatic stem cells and mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue. Biotechnol Lett (2011) 33:1257–1264.

Steinert A, Weber M, Dimmler A, Julius C, Schutze N, Noth U, Cramer H, Eulert J, Zimmermann U, Hendrich C (2003). Chondrogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells encapsulated in ultrahigh-viscosity alginate. *J Orthop Res* 21(6)*:*1090-1097.

Sutherland RM, Sordat B, Bamat J, Gabbert H, Bourrat B, Mueller-Klieser W (1986) Oxygenation and differentiation in multicellular spheroids of human colon carcinoma. Cancer Res 46: 5320-5329.

Tanaka H, Murphy CL, Murphy C, Kimura M, Kawai S, Polak JM (2004). Chondrogenic differentiation of murine embryonic stem cells: effects of culture conditions and dexamethasone. *J Cell Biochem* 93(3)*:*454-462.

Teitelbaum SL (2000). Bone Resorption by Osteoclasts Science 1 September 2000: 1504-1508.

Trounson A. (2002). Human embryonic stem cells: mother of all cell and tissue types. Reprod Biomed Online. 2002;4 Suppl 1:58-63.

van der Kraan PM, Buma P, van Kuppevelt T, van den Berg WB (2002). Interaction of chondrocytes, extracellular matrix and growth factors: relevance for articular cartilage Tissue Engineering. *Osteoarthritis Cartilage* 10(8)*:*631-637.

Wang YW, Wu Q, Chen GQ (2004). Attachment, proliferation and differentiation of osteoblasts on random biopolyester poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) scaffolds. *Biomaterials* 25(4)*:*669-675.

Weaver VM, Petersen OW, Wang F, Larabell CA, Briand P, Damsky C, Bissell MJ (1997). Reversion of the malignant phenotype of human breast cells in three-dimensional culture and in vivo by integrin blocking antibodies. *J Cell Biol* 137(1)*:*231-245.

Weissman IL (2000). Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: Barriers and opportunities. Science 287:1442-1446.

Wiesmann H., Hartig M., Stratmann U., Meyer U., Joos U. (2001) Electrical stimulation influences mineral formation of osteoblast-like cells in vitro. Biochim Biophys Acta 1538:28-37.

Wiesmann HP, Joos U, Meyer U (2004). Biological and biophysical principles in extracorporal bone Tissue Engineering. Part II. *Int J Oral Maxillofac Surg* 33(6)*:*523-530.

Wulf GG1, Viereck V, Hemmerlein B, Haase D, Vehmeyer K, Pukrop T, Glass B, Emons G, Trümper L. (2004). Mesengenic progenitor cells derived from human placenta. Tissue Eng. 2004 Jul-Aug;10(7-8):1136-47.

Wurzler KK, Emmert J, Eichelsbacher F, Kubler NR, Sebald W, Reuther JF (2004). [Evaluation of the osteoinductive potential of genetically modified BMP-2 variants]. *Mund Kiefer Gesichtschir* 8(2)*:*83-92.

Zavazava N. (2003). Embryonic stem cells and potency to induce transplantation tolerance. Expert Opin Biol Ther. 2003 Feb;3(1):5-13.

Zernik J, Twarog K, Upholt WB (1990). Regulation of alkaline phosphatase and alpha 2(I) procollagen synthesis during early intramembranous bone formation in the rat mandible. Differentiation 44(3):207-215.

Zhang SC, Wernig M, Duncan ID, Brüstle O, Thomson JA (2001). In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells.
Nat Biotechnol. 2001 Dec;19(12):1129-33.

zur Nieden NI, Kempka G, Ahr HJ (2003). In vitro differentiation of embryonic stem cells into mineralized osteoblasts. Differentiation. 2003 Jan;71(1):18-27.

zur Nieden NI, Kempka G, Rancourt DE, Ahr HJ (2005). Induction of chondro-, osteo- and adipogenesis in embryonic stem cells by bone morphogenetic protein-2: effect of cofactors on differentiating lineages. *BMC Dev Biol* 5(1)*:*1.

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. Jörg Handschel für die freundliche Überlassung dieses Themas, die fortwährende Unterstützung während der Dissertation und die Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten bedanken.

Ein besonderer Dank gilt außerdem Herrn PD Dr. Dr. Christian Naujoks für die gute Betreuung, zahlreichen Ratschläge, die Anregungen zur schriftlichen Ausarbeitung der Dissertation und deren Durchsicht. Frau Dr. Karin Berr, Herrn Dr. Fabian Langenbach und Frau Juliane Hartmann danke ich, dass sie mir von Anfang an bei allen Fragen und praktischen Problemen im Labor mit hilfreichen Ratschlägen zur Seite standen.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. G. Kögler, José Carreras Stammzellbank der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf für die Bereitstellung der USSCs und bei Herrn Prof. Dr. K. Pfeffer, Institut für Mikrobiologie der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf, für die Bereitstellung der murinen ESCs.

Ganz besonders möchte ich meinen Eltern Anna und Peter Wahl danken, für die Unterstützung und Motivation während des Studiums und der Dissertation. Darüber hinaus möchte ich meinen Brüdern Axel und Carsten Wahl danken, die mir geduldig bei Fragen bezüglich der Statistik und computertechnischen Fragen zur Seite standen und meinem Freund Frederic Kreiten für den Rückhalt während der Zeit der Promotion.