Geweberegeneration für den Bewegungsapparat

Atanas Todorov[a], Simone E. Hieber[b], Bert Müller[b], Ivan Martin[a]

[a] Departement Biomedizin, Universitätsspital Basel
[b] Biomaterials Science Center, Universität Basel

Viele Pathologien, unter anderem Knochen- und Knorpelschwund, unvollständige Frakturheilung oder Knochentumoren, basieren auf einer Degeneration der Gewebe und erfordern schliesslich deren Ersatz. Wegen des demographischen Wandels der Gesellschaft nimmt dieser Gewebeersatz an Bedeutung zu. Die bisherigen Therapiemöglichkeiten sind schnell ausgeschöpft und häufig nicht zufriedenstellend. Die regenerative Medizin und die damit verbundene biomedizinische Forschung beschäftigen sich mit der Züchtung von Zellen, Geweben und sogar ganzen Organen ausserhalb des menschlichen Körpers, um die Defektheilung durch diese Gewebe zu ermöglichen und zu unterstützen. Im Vordergrund steht die Regeneration, also der biologisch vollwertige Ersatz des Gewebes, eine Fähigkeit, die der menschliche Organismus nur unvollständig besitzt und im Alter nach und nach verliert. Die Methoden der regenerativen Medizin können diese Fähigkeit verbessern und haben deshalb ein grosses Zukunftspotential für die Patientenbehandlung.

Zielsetzung und Hypothese

Wir forschen innerhalb der regenerativen Medizin an der Heilung und Wiederherstellung von Knorpel und Knochen, mit besonderem Blick auf die Anwendung in der wiederherstellenden Chirurgie.
Für grössere Knochendefekte, die von selbst nicht mehr ausheilen können, wird versucht, Gewebe ausserhalb des Körpers unter optimierten Bedingungen zu züchten. In der Regel werden körpereigene Stammzellen zu funktionsfähigen Gewebszellen wie Osteoblasten oder Chondrozyten differenziert, auf ein geeignetes Biomaterial mit der gewünschten mechanischen Stabilität und Form gebracht und anschliessend implantiert. Wird kein Biomaterial verwendet, ist die Herstellung eines geeigneten Gewebes sehr viel schwieriger und erfordert mehr Zeit.
Lenas et al. haben vorgeschlagen, den Prozess der embryonalen Organentwicklung, der durch Stammzellen nachvollzogen werden kann, zu nutzen [1]. Da die daran beteiligten Zellen sich selbst organisieren, muss der Vorgang nur angestossen werden und verläuft unter geeigneten Bedingungen quasi von selbst. Röhrenknochen entstehen beispielsweise, indem mesenchymale Stammzellen zu einem Knorpelvorläufer kondensieren, der zunächst hypertrophiert, um anschliessend über die Einsprossung von Gefässen zum Knochen modelliert zu werden. Ein ähnlicher Vorgang läuft während des Wachstums und der Frakturheilung ab und wird als endochondrale Ossifikation bezeichnet. Im Gegensatz zur intramembranösen Ossifikation, bei welcher die Stammzellen direkt zu Osteoblasten werden und Knochen bilden, kann das Gewebe während der endochondralen Ossifikation unter Hypoxie gehalten werden und bietet von sich aus ein stärkeres Signal zur Neovaskularisation. Aus diesem Grund möchten wir *in vitro* die endochondrale Ossifikation simulieren.

Die Autoren haben keine finanzielle Unterstützung und keine Interessenkonflikte im Zusammenhang mit diesem Beitrag deklariert.

Methodik

Für die vorliegende Studie wurden die Gewebe mittels Mikrotomographie (µCT) vermessen. Das Gerät der Firma General Electric (phoenix nanotom® m) arbeitet ähnlich wie ein konventionelles CT, liefert aber auf Kosten einer sehr viel höheren Röntgendosis eine um drei Grössenordnungen bessere Ortsauflösung. Selbst kleine Präparate ergeben grosse dreidimensionale Datensätze und erfordern eine rechenintensive Nachbearbeitung.
Zur Herstellung von endochondralem Gewebe wurden mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark von Menschen oder Hasen verwendet [2]. Die Zellen wurden *in vitro* expandiert und danach auf einen 6–8 mm breiten und 2–3 mm dicken Kollagenschwamm (Ultrafoam™) getropft. Dieser Verbund wurde für fünf Wochen unter chondrogenen und anschliessend unter hypertrophen Bedingungen gehalten. Die fertigen Knorpelvorläufer wurden subkutan in Nacktmäusen implantiert, um während 5–12 Wochen zu Knochen umgebaut zu werden. Nach der Explantation wurde das gebildete knöcherne Gewebe mittels µCT und Histologie charakterisiert. Mit der zerstörungsfreien µCT-Methode wurden vor der Herstellung der histologischen Schnitte von jeder Probe 1440 Radiographien mit einer Pixelgrösse von 2,5 µm aufgezeichnet, wobei die Probe über einen Winkelbereich von 360° rotierte. Die Beschleunigungsspannung betrug 70 kV bei einem Strahlstrom von 260 µA. Aus diesen Daten wurden Tomogramme mit isotroper Voxelgrösse rekonstruiert.

Wichtigste Ergebnisse

Abbildung 1 zeigt die endochondrale Ossifikation nach acht Wochen in vivo. Die Mikrotomographie erlaubt die vollständige morphologische Beurteilung des Gewebes, insbesondere das Vorhandensein von trabekulären Strukturen, eine Kortikalis-ähnliche Aussenhülle mit Poren, die durch Gefässe entstehen können, sowie einem ausgedehnten Knochenmarkraum (Abb. 1C und D). Ebenfalls Zeichen von reifen Knochenstrukturen sind dunkle Einschlüsse in der «Kortikalis», die Osteozyten entsprechen können, sowie eine einheitliche Dichte, die geringer ist als der verkalkte Knorpelvorläufer (Abb. 1B). Die Histologie erlaubt entsprechend der gewählten Färbung nicht nur morphologische, sondern auch funktionelle Informationen; sie zeigt durch Eosin rot gefärbtes Osteoid, einen

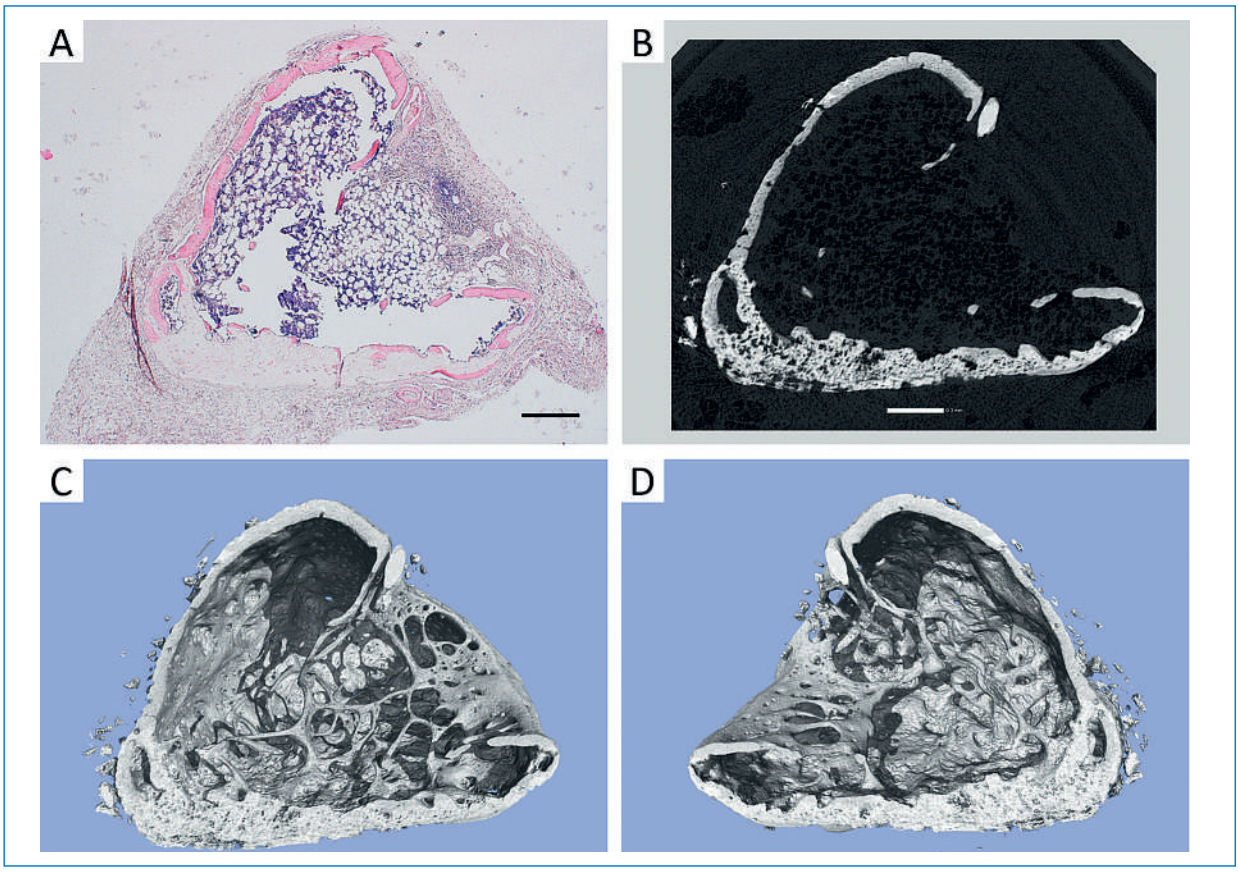

Abbildung 1
A: H&E-Färbung, rotes Osteoid, schwach angefärbte Knorpelmatrix, eher hyperzelluläres Knochenmark in Blau. Der Längenbalken ist 0,3 mm lang.
B: Mikrotomographisches virtuelles Schnittbild auf gleicher Höhe wie A, die Knorpelmatrix erscheint heller, da sie dichter resp. stärker kalzifiziert ist und das Röntgenlicht stärker absorbiert. Der Balken entspricht einer Länge von 0,3 mm.
C und **D**: Dreidimensionale Darstellung der beiden Gewebehälften, virtuell geschnitten auf der Höhe von A; die Darstellung verdeutlicht den Zusammenhang des Gewebes und die vorhandenen trabekulären Strukturen.

wenig bis gar nicht gefärbten Rest der Knorpelmatrix sowie ein eher hyperzelluläres Knochenmark (Abb. 1A). Wir konnten bereits zeigen, dass das auf diese Weise gezüchtete und in vivo umgebaute Gewebe dem Ablauf der endochondralen Ossifikation folgt [2]. Insbesondere kann daraus vollwertiger Knochen mit einem funktionsfähigen Knochenmark entstehen [3].

Schlussfolgerungen und Ausblick

Bei der Gewebezüchtung mittels endochondraler Ossifizierung vermuten wir, dass während des Umbaus ein grosser Teil des gebildeten Knochens zugunsten des ausgedehnten Knochenmarkraums wieder verloren geht. Das könnte an der unzureichenden mechanischen Stimulation liegen oder an der für das Gewebe ungeeigneten subkutanen Umgebung. Aus diesem Grund planen wir als nächsten Schritt die orthotope Implantation innerhalb eines segmentalen Knochendefekts.
In Zukunft soll das Verfahren den Knochenersatz in einer Reihe klinischer Situationen ermöglichen, für die es derzeit keine zufriedenstellende Lösung für die Patienten gibt. Eine Schlüsselrolle spielt das Nanotom®, weil es die zerstörungsfreie dreidimensionale quantitative Analyse des kalzifizierten Gewebes ermöglicht. Die Erweiterung der Instrumentierung durch Phasenkontrasttomographie wird die gleichzeitige Visualisierung der Weichgewebe gestatten.

Verdankung
Die Autoren danken dem Schweizerischen Nationalfonds, Abteilung Biologie und Medizin, der im Rahmen der R'Equip-Initiative die Beschaffung des phoenix nanotom® m finanziell unterstützt hat (Grant 316030_133802/1). Die Studie wurde ausserdem von der AO-Stiftung (Grant S-11–13P) getragen.

Korrespondenz:
Atanas Todorov
Departement Biomedizin
Universitätsspital Basel
CH-4031 Basel
AtTodorov[at]uhbs.ch

Literatur
1 Lenas P, Moos M, Luyten FP. Developmental engineering: a new paradigm for the design and manufacturing of cell-based products. Part I: from three-dimensional cell growth to biomimetics of in vivo development. Tissue Eng Part B Rev. 2009;15:381–94.
2 Scotti C, Tonnarelli B, Papadimitropoulos A, Scherberich A, Schaeren S, Schauerte A, et al. Recapitulation of endochondral bone formation using human adult mesenchymal stem cells as a paradigm for developmental engineering. Proc Natl Acad Sci USA. 2010;107:7251–6.
3 Scotti C, Piccinini E, Takizawa H, Todorov A, Bourgine P, Papadimitropoulos A, et al. Engineering of a functional bone organ through endochondral ossification. Proc Natl Acad Sci USA. 2013;110:3997–4002.

Weiterführende Literatur
– Saldamli B, Müller B: Mikro-Computertomographie für die dreidimensionale Charakterisierung von Implantaten und Geweben. Sport-Orthopädie – Sport-Traumatologie. 2010;26:145–51.
– Saldamli B, Herzen J, Beckmann F, Tübel J, Schauwecker J, Burgkart R, et al. Internal structures of scaffold-free 3D cell cultures visualized by synchrotron radiation-based micro-computed tomography. Proceedings of SPIE. 2008;7078:70781X.