

Alternatives for bone replacement? Tissue engineering with osteoblast cell cultures

Alternative zum Knochenersatz? Tissue Engineering mit Osteoblasten aus der Zellkultur

T. Vögele, R. Schabus, U. Oberndorfer, K. Macfelda², M. Vögele-Kadletz¹, V. Vecsei

Universitätsklinik für Unfallchirurgie, Wien

¹Universitätsklinik für Chirurgie, Abteilung für Herz- und Thoraxchirurgie, Wien

²Zentrum für Biomedizinische Forschung, Wien

Summary

Background: Tissue engineering has become a modern slogan - however, it could actually become the treatment of the future. No doubt, many years will pass before tissue engineering actually becomes the routine therapy of choice. The question is, in fact, whether it will always remain limited to specific cases. The aim of tissue engineering is optimum reconstruction of bone defects ultimately providing autologous cell tissue without artificial material.

Methods: It has been shown that cell growth and duplication of human osteoblasts is possible in cell cultures. This can be accomplished by enzymatic cell harvesting as well as by spontaneous cell outgrowth from small pieces of human bone. In this study we have compared the time required to gain 500 000 cells by means of these two different modes of cell harvesting. Additionally, we compared these two modes regarding to the influence of collagen coating on cell growth.

Results: When we compared the growing time required to achieve an osteocyte cell count of 500 000, we found a significant correlation between the isolation technique used and the number of cells produced by the cell culture. Collagenase pre-treatment clearly shortened the period from cell extraction to confluence. Using the method of spontaneous cell outgrowth, a period of 37 days is needed to reach a comparable cell count. Collagen type I coating of the culture plate reduced the time

needed to reach a comparable cell count to 25 ± 3 days. Immunohistochemically, cells were specified as osteoblasts by bone morphogenic protein 2.4 and by collagen type I.

Conclusion: Tissue engineering is a method of the future. By modifying the mode of cell harvesting, the time required to reach an adequate cell count could be reduced. There is no immunohistochemical difference between the two modes of cell harvesting. Some basic research will be necessary, however, before autologous osteoblasts are accepted for clinical use.

Zusammenfassung

Grundlagen: Tissue Engineering, ist auch in der Knochenchirurgie ein sehr modernes Schlagwort geworden und doch möglicherweise der Weg in die Zukunft. Der Weg bis zum Breiten klinischen Einsatz ist sicher noch weit und es stellt sich die Frage, ob es nicht eine Therapie, nur für spezielle Fälle bleibt. Ziel des Tissue Engineering ist es, Knochendefekte optimal zu rekonstruieren, diese mit lebenden, am besten autologen Knochenzellen zu füllen, um so zumindest am Ende der Therapie, einen fremdmaterialfreien Zellverband wieder herzustellen.

Methodik: Es hat sich gezeigt, daß das Zellwachstum und die Vermehrung humaner Osteoblasten in-vitro erfolgreich möglich ist. Die Gewinnung der Zellen aus Knochenstücken ist sowohl enzymatisch als auch durch direktes Auswachsen von Osteoblasten aus Knochensplittern möglich. Das Ziel unserer Untersuchung war es, diese beiden Methoden bezüglich der primär zu erreichenden Zellzahl

und des erforderlichen Wachstumszeitraumes zu vergleichen. In einer zweiten Untersuchung wurde der Einfluß einer Kollagen Vorbeschichtung der Kulturplatte auf das Auswachsen der Osteoblasten untersucht.

Ergebnisse: Vergleicht man die Zeitspanne, die Osteoblasten benötigen, um eine Zellzahl von 500 000 zu erreichen, so läßt sich ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Isolationstechnik und des erforderlichen Zeitraumes ableiten. Bei der enzymatischen Zellgewinnung ist ein Zeitraum von ca. 29 Tagen erforderlich. Im Gegensatz dazu benötigt man beim spontanen Auswachsen der Zellen 37 Tage, um eine annähernd gleiche Zellzahl zu erreichen. Eine Vorbeschichtung der Kulturplatte mit Kollagen Typ I verkürzt die erforderliche Zeitspanne auf 25 ± 3 Tage.

Immunhistochemisch konnten die Zellen als Osteoblasten mit Bone-Morphogenic-Protein 2,4 und Kollagen Typ I spezifiziert werden.

Schlußfolgerung: Tissue engineering ist die Methode der Zukunft. Durch die Modifizierungen der in-vitro Zellgewinnung, konnte der Zeitraum bis zum Erreichen einer adäquaten Zellzahl von Osteoblasten deutlich verkürzt werden. Die unterschiedlichen Gewinnungsmethoden zeigten in der immunhistochemischen Färbung keine Differenzen. Einiger Grundlagenforschung bedarf es sicher, bevor autologe Knochenzellen endgültig zur klinischen Anwendung zugelassen werden.

Key words

Osteoblast – cell culture – cell harvesting – tissue engineering.

Schlüsselwörter

Osteoblasten - Zellkultur – Zellgewinnung – Tissue Engineering.

Grundlagen

Die verzögerte Wundheilung sowie Knochenbruchheilung ist ein nicht unbekanntes Problem bei Patienten mit traumatisch oder degenerativen Knochendefekten, mit Osteoporose, Diabetes Mellitus, oder peripherer arterieller Verschußkrankheit(1). Ein anderes Kollektiv sind jene Personen, die aufgrund eines Knochentumors, einer lokalen Osteomyelitis oder nach einem offenen Trauma mit erheblichem Weichteilschaden einen Teil der langen Röhrenknochen verloren haben (2).

Diese schon seit langem bekannte Tatsache führte zur Entwicklung unterschiedlichster Strategien bei der Behandlung von Knochendefekten. Auch wenn einige der verwendeten Therapiemöglichkeiten, wie ein Fixateur externe, mit dessen Hilfe eine sogenanntes Shifting durchgeführt werden kann, so vergehen alleine bis zur Erreichung der gewünschten Knochenlänge, meist Monate. Abgesehen von den Schmerzen in der betroffenen Extremität, ist der neue Knochen oft nicht imstande die erforderlichen mechanischen Eigenschaften des Röhrenknochens zu erfüllen. Tissue engineering ist ein alternatives Konzept in der biologischen Behandlung von Knochendefekten. Das Ziel ist die vollständige Regeneration der Defektzone mit autologem Knochenzellmaterial.

Methodik

Das Ausgangsmaterial für die Kultivierung humaner Osteoblasten stellte Knochengewebe von Hüft-, Knie- und Schulteroperation, das im Rahmen einer osteosynthetischen Versorgung abgefallen ist. Bei diesem Versuch wurde Knochenmaterial von 43% weiblichen und 57% männlichen Spendern verwendet. Das Durchschnittsalter war 45 Jahre, es inkludierte Patienten zwischen 17 und 77 Jahren.

Die Knochensplitter wurden mechanisch in 1-2 mm Stücke zerkleinert und in der ersten Gruppe in Kollagenase Typ II für 24 Stunden verdaut. Nach mehrfachem Waschen der Zellen, Bestimmung der Vitalität mittels Trypanblaufärbung in der Bürker-Türk-Zellkammer, wurden die gelösten Zellen in RPMI - Kulturmedium mit 10% Kälberserum, bei 37°C und 5% Co₂ kultiviert. Das Zellmedium wurde zweimal wöchentlich gewechselt.

In der zweiten Gruppe wurden die 1-2 mm großen Knochensplitter unbehandelt im RPMI - Kulturmedium mit 10% Kälberserum, bei 37°C und 5% Co₂ ausgesät. Um den Osteoblasten die Chance des

Auswachsens zu geben, wurden diese für eine Woche unberührt im Zellinkubator belassen.

In einer weiteren Untersuchungsgruppe haben wir versucht, durch Veränderung der Kulturbedingungen das Auswachsen der Zellen aus den Knochensplittern zu beschleunigen. Wie in der Literatur beschrieben (3,4) und wie auch wir in unseren immunhistochemischen Untersuchungen feststellen konnten, produzieren und sezernieren Osteoblasten Kollagen Typ I. Kollagen Typ I gehört zu den natürlichen Bestandteilen der Extrazellulärmatrix des Knochens. Kulturplatten wurden vor der Einbringung humaner, 1–2 mm großer Knochensplitter mit Kollagen Typ I vorbeschichtet und unter den selben Bedingungen, wie in Gruppe Zwei beschrieben, kultiviert.

Zur Spezifizierung der Osteoblasten wurde die immunhistochemische Färbungen unter Verwendung spezifischer monoklonaler Antikörper gegen Kollagen Typ I und Bone Morphogenic Protein 2,4 (BMP 2,4) durchgeführt (5). Zur elektronenmikroskopischen Ausarbeitung wurden die Präparate mit Glutaraldehyd fixiert, über Azeton entwässert und mit Gold gesputet.

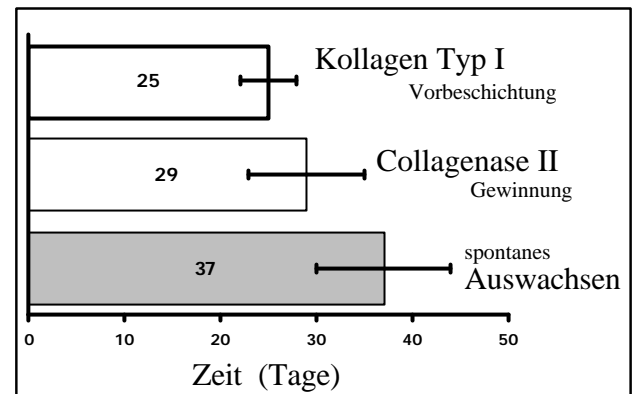
Ergebnisse

Nach einem Zeitraum der Kultivierung von 29 ± 6 Tagen konnte in der enzymatisch gewonnenen Osteoblastenreihe eine Zellzahl von etwa einer halben Million Osteoblasten erreicht werden. Läßt man hingen die Zellen spontan aus den Knochenstücken auswachsen, so wird eine vergleichbare Zellzahl erst nach 37 ± 7 Tagen erreicht.

Der Unterschied dieser beiden Methoden liegt sicher darin, daß einerseits durch die Inkubation in einem Enzym, in unserem Fall Collagenase Typ II für 24 Stunden, es zu einem Herauslösen einer größeren Zellzahl aus der doch sehr kompakten Extrazellulärmatrix kommt. Im Gegensatz dazu ist bei der Methode des spontanen Auswachsens der Zellen aus den Knochenstücken, die Schwerkraft, die einzige Motivation für die Zellen, die kalzifizierte Extrazellulärmatrix zu verlassen. Osteoblasten produzieren und sezernieren wie in der Literatur beschrieben und wie auch wir in unseren immunhistochemischen Untersuchungen feststellen konnten Kollagen Typ I. Dieses gehört zu den natürlichen Bestandteilen der Extrazellulärmatrix des Knochens. Durch die Vorbeschichtung der Kulturplatten mit Kollagen Typ I konnte die Zeit bis zum

Erreichen einer Zellzahl von 500 000 auf 25 ± 3 Tage verkürzt werden (Tab.1). Es scheint daher, daß durch das Anbieten von Teilen der Extrazellulärmatrix an die Osteoblasten, das Auswachsen dieser aus den Knochenstücken beschleunigt werden kann.

Humane OSTEOLASTEN: 500.000 Zellen



Tab.1 Osteoblasten Zellgewinnung: (500 000 Zellen) Spontan Auswachsen mit Kollagen Typ I Vorbeschichtung, Enzymatisch (Collagenase II), Spontan Auswachsen ohne Vorbeschichtung

In beiden Gewinnungsarten konnten Knochenzellen kultiviert werden, die histologisch Osteoblasten entsprachen. Neben ihrer polygonalen Morphologie lagen die Osteoblasten oft in Gruppen zusammen und zeigten in der frühen Phase des präkonfluenten Monolayers die typische polygonale Formation, während in der Phase der Konfluenz, eine fischzugartige Anordnung sichtbar wurde. In allen Zellkulturen, unabhängig von der unterschiedlichen Gewinnungstechnik konnte keine Differenz im Phänotyp noch in der Morphologie der Zellen gefunden werden. Die immunhistochemische Spezifizierung der Zellen mit Kollagen Typ I und BMP 2,4 ergab bei allen Proben eine positive Färbung und als negative Kontrolle diente ein monoklonaler Fibroblasten Antikörper und ein Kollagen Typ II Antikörper. Das Auswachsen der Osteoblasten aus den Knochensplittern konnte im Elektronenmikroskop sehr gut dargestellt und demonstriert werden. Die Osteoblasten nahmen unmittelbar nach dem Verlassen der verkalkten Extrazellulärmatrix des Knochens einen innigen Kontakt mit der angebotenen künstlichen Extrazellulärmatrix – Kollagen Typ I – auf (Abb.1). Bei der Auswertung unserer Daten zeigte weder das Alter noch das Geschlecht der Spender einen Einfluß auf unsere Ergebnisse.

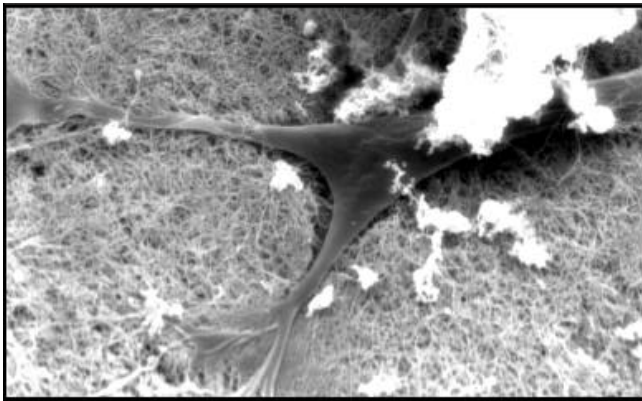


Abb.1 Elektronenmikroskop: X 3500. Aus Knochensplitter auswachsender Osteoblast, Kollagen Typ I Fibrillen als Extrazellulärmatrix

Schlußfolgerung

In vielen Forschungslabors wurde in den letzten Jahren auf dem Gebiet der Isolierung und Kultivierung von humanen Zellen große Fortschritte gemacht. Tissue engineering als Therapie der Zukunft, bedarf sicher noch der Klärung mancher offener Fragen. Durch die Modifizierungen der Methoden in der Zellgewinnung lassen sich in vitro, humane Knochenzellen vermehren und in weiterer Folge, biologisches – autologes - Knochensatzmaterial schaffen(6). Die meisten Konzepte sehen dabei die Kultivierung der Zellen auf bioresorbierbaren Materialien vor. Bislang wurden verschiedene Zellen wie z.B. Keratinozyten, Hepatozyten, Osteoblasten und Chondrozyten auf unterschiedlichen Trägersubstanzen kultiviert, hauptsächlich. Bei jedem dieser Konzepte war die Voraussetzung für den Erfolg, in möglichst kurzer Zeit eine möglichst große Anzahl an autologen Zellen zu erhalten. Wichtig scheint es auch, daß durch die in-vitro Bedingungen und die erforderliche rasche Zellvermehrung, nicht zu einer Dedifferenzierung der Zellen führt. Es muß der Osteoblast in seiner hochdifferenzierten Form erhalten bleiben.

In der vorliegenden Untersuchung ist es uns gelungen durch die Modifizierung der Gewinnungstechnik die primär gewonnene Zellzahl signifikant zu erhöhen. Durch die Kollagenvorbeschichtung erreichen wir in einer ähnlich kurzen Zeit wie bei der enzymatischen Zellgewinnung eine Zellzahl von ungefähr einer halben Million Osteoblasten. Der Vorteil dieser Gewinnung liegt sicher darin, daß die Zellen nicht einer Enzymlyösung für mehrere Stunden ausgesetzt wurden. Wenn wir auch morphologisch und immunhistochemisch keine Veränderungen nach-

weisen konnten, ist nicht sicher auszuschließen, ob bei der Inkubation in einem Enzym, nicht doch die Zellmembranen bedingt Schaden erleiden.

Bis zum klinischen Einsatz der gewonnenen autologen Knochenzellen ist noch einige Arbeit in Grundlagenforschung zu investiert, aber dennoch hoffen wir auf dem Weg zum Ziel wieder einen kleinen Schritt nach vorne gekommen zu sein.

Unterstützung

Diese experimentelle Laborarbeit zur biologischen Knochendefektheilung wird durch den Medizinisch – Wissenschaftlichen Fonds des Bürgermeisters der Bundeshauptstadt Wien (Projekt - Nr.: 1873) und durch das Ludwig Boltzmann Institut für Biomechanik und Zellbiologie (Leitung o. Univ. Prof. Dr. V. Vécsei) unterstützt.

Literatur

1. Prince RL, Dick IM, Lemmon J, Rondell D: Tue pathogenesis of age-related osteoporotic fracture: effects of dietary calcium deprivation. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:260-4
2. Kapukaya A, Subasi M, Kandiya E, Ozates M, Yilmaz F: Limb reconstruction with the callus distraction method after bone tumor resection. *Arch Orthop Trauma Surg* 2000;120:215-8
3. Ong JL, Bess EG, Bessho K: Osteoblast progenitor cell responses to characterized titanium surfaces in the presence of bone morphogenetic protein-atelopeptide type I collagen in vitro. *J Oral Implantol* 1999;25:95-100
4. Basle MF, Lesourd M, Grizon F, Pascaretti C, Chappard D: Type I collagen in xenogenic bone material regulates attachment and spreading of osteoblasts over the beta1 integrin subunit. *Orthopade* 1998 Feb;27:136-42
5. Suzawa M, Takeuchi Y, Fukumoto S, Kato S, Ueno N, Miyazono K, Matsumoto T, Fujita T: Extracellular matrix-associated bone morphogenetic proteins are essential for differentiation of murine osteoblastic cells in vitro. *Endocrinology* 1999;140:2125-33
6. Rattner A, Sabido O, Le J, Vico L, Massoubre C, Frey J, Chamson A: Mineralization and alkaline phosphatase activity in collagen lattices populated by human osteoblasts. *Calcif Tissue Int* 2000;66:35-42