

Int Poster J Dent Oral Med 2009, Vol 11 No 3, Poster 451

Verhalten präformierter Fibrinmembranen für ein rein autologes Bone Tissue Engineering

Sprache: Deutsch

Autoren: Dr. Tim Nolting, Jörg Wünnenberg, Prof. Dr. Dr. Dr.h.c. Ulrich Joos, Prof. Dr. Dr. Johannes Kleinheinz, Abteilung für Mund- und Kiefer-Gesichtschirurgie, Universität Münster

Datum/Veranstaltung/Ort:

14.-17.5.2008

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie
Münster

Einleitung

Autologer Knochen gilt auch heute noch als Knochenersatzmaterial der ersten Wahl zur Regeneration knöcherner Defekte. Der Vorteil der Osteokonduktivität und -induktivität wird jedoch nachteilig beeinflusst durch das limitierte Angebot und die erhöhte Spendermorbidity. Die erfolgreiche Integration extrakorporal erzeugter Gewebeimplantate in einen knöchernen Defekt benötigt eine optimale Zusammensetzung der Gewebe-Matrix sowie darin enthaltener spezifischer Gewebezellen. Für den Knochen bedeutet dies, eine Struktur zu finden, die der natürlichen kollagenen Struktur entspricht und die die Kultivierung und die Anzucht von allen für die Osteogenese entscheidend benötigten Zellen, insbesondere von Endothelzellen, ermöglicht.

Problemstellung

Ziel der Studie war es, durch Tissue Engineering einer primär vaskularisierten Implantatkonstruktion auf Basis einer Fibrin-Matrix eine schnellere und funktionellere Ausheilung so genannter "Critical size defects" (CSD) zu erreichen und dabei ausschließlich autologe Zellen und Gewebsteile zu verwenden.

Material und Methoden

Aus dem venösen Citratblut Göttinger Minischweine wurde eine autologe Fibrin-Matrix hergestellt. Diese Membran wurde mittels Modified Critical Point Dry (MCPD) - Methode aufbereitet und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren. Aus dem Periost der Schädelkalotte der Versuchstiere wurden Osteoblasten, aus Jugularvenen der Tiere Endothelzellen nach Standardverfahren gewonnen und angezüchtet. Beide Zelltypen wurden auf 5mm große und 1mm dicke Fibrinscheiben ausgesiedelt, die vorher bei 20°C für 15 Minuten unter sterilen Kautelen aufgetaut wurden. Die Adhäsion (Fibronectin, VE-Cadherin), die Proliferation (Auszählung) und zelluläre Differenzierung (von - Willebrand - Faktor, Osteocalcin) wurde in vitro histologisch, immunhistologisch und ultrastrukturell untersucht. Je 3 Scheiben der auf diese Weise autolog hergestellten Implantatteile wurden sandwichartig in vivo in definierte 5 mm breite und 7 mm tiefe CSD im Corpus mandibulae der Versuchstiere eingebracht. Die knöcherne Regeneration wurde zu definierten Zeitpunkten von 3, 7, 14 Tage nach Sacrifizierung der Tiere ebenfalls histologisch, immunhistologisch und ultrastrukturell ausgewertet.



Abb. 1: Herstellung Fibrinmembran



Abb. 2: Ungetrocknete Fibrinmembran



Abb. 3: MCPD-Fibrinmembran aufgetaut in NaCl

Abb. 4: MCPD-Fibrinmembran (Schnitt-/Nahtversuch)



Abb. 5: MCPD-Fibrinmembran (Handling)

Ergebnisse

Für beide Zellreihen zeigte sich *in vitro* eine ausgeprägte Adhäsion auf der Matrix wenige Stunden nach Aussiedelung und eine hohe Proliferationsrate mit Ausbildung konfluierender Zellschichten nach 3 Tagen. Die Differenzierungsmarker wiesen für die Osteoblasten eine gesteigerte Expressionsrate extrazellulärer Matrixproteine auf, die Endothelzellen bildeten nach Konfluenz und Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten zyklische Strukturen aus. Die *in vivo* Versuche ergaben eine gesteigerte, dichtere Regeneration im Bereich der knöchernen Defekte. Nach 3 Tagen waren ausgeprägte kapilläre Einsprossungen in die Matrix, nach 7 Tagen erste Mineralisationskeime im Fibrin-Netzwerk nachweisbar. Nach 14 Tagen nach Implantation zeigte sich eine fast vollständig Osteoneogenese im Bereich der Critical size defects. Die knöchernen Regeneration der Defekte breitet sich, im Vergleich zu den Kontrollen signifikant doppelt so schnell aus.

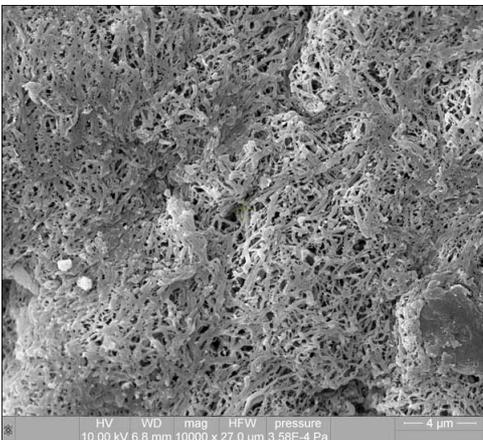


Abb. 6: MCPD-Fibrinmembran (REM)

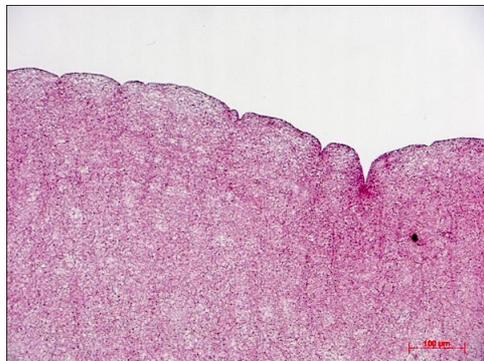


Abb. 7: MCPD-Fibrinmembran (HE,10x)

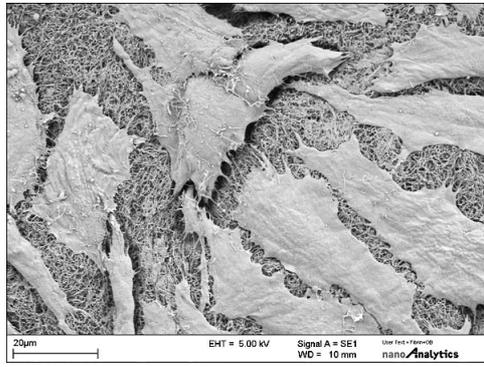
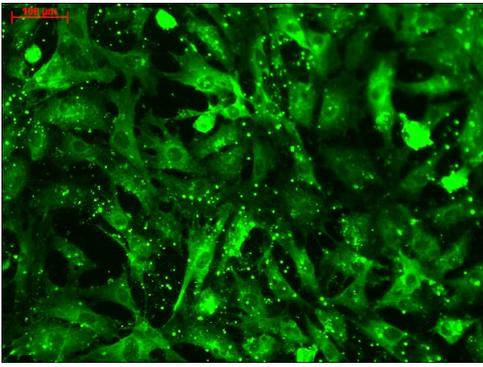


Abb. 8: Osteoblasten auf MCPD-Fibrinmembran (ON, 20x)

Abb. 9: Osteoblasten auf MCPD-Fibrinmembran (REM)

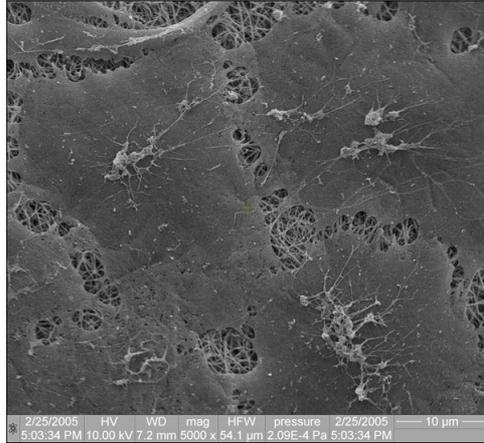
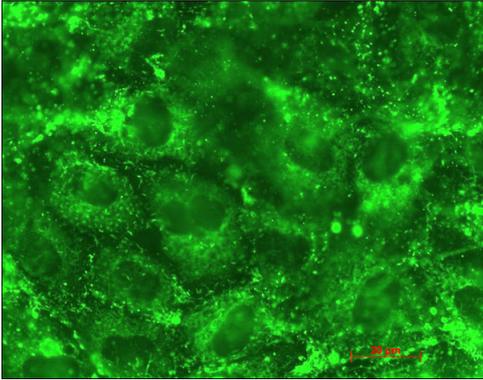


Abb. 10: Endothelzellen auf MCPD-Fibrinmembran (vWF, 63x)

Abb. 11: Endothelzellen auf MCPD-Fibrinmembran (REM)

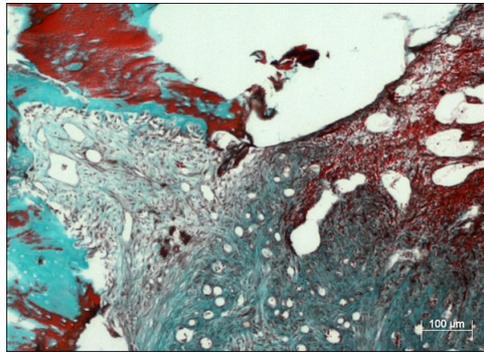


Abb. 12: Implantationsbeispiel am Schweinekiefer

Abb. 13: Kapilläre Eionsprossung 3 Tage post implantationem (Masson-Goldner, 40x)



Abb. 14: Knöcherne Regeneration 14 Tage post implantationem (HE, 20x)

Schlußfolgerungen

Fibrin stellt somit eine ideale Grundmatrix für das rein autologe Bone Tissue Engineering dar mit deutlichen Vorteilen im Zellverhalten und bei der Inkorporation in den Defekt gegenüber Alternativkonstrukten.

Literatur

1. Aper T, Teebken OE, Haverich A (2004) Use of fibrin preparation in the engineering of a vascular graft model. Eur J Vasc Endovasc Surg 28(3);296-302
2. Bollinger-Stucki B, Baillod P, Mader W, Furlan M (2000) Biochemical Properties of the Fibrinogen Component of a Fibrin Glue Before and After Severe Dry Heat Treatment. Appl Biomater 53;577-83
3. Bootle-Wilbraham CA, Tazzyman S, Stirk CM, Lewis CE (2001) Fibrin Fragment E stimulates the proliferation, migration and differentiation of human microvascular endothelial cells in vitro. Angiogenesis 4;269-75
4. Carmeliet P (2000) Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. Nature Medicine Vol 6(3):389-95
5. Carr ME, Carr SL (1995) Fibrin structure and concentration alter clot elastic modulus but do not alter platelet mediated force development. Blood Coagul Fibrinolysis 6; 79-86
6. Frerich B, Lindemann N, Kurtz-Hoffmann J, Franke RP (1999). Engineering of vascular tissues. Clin Hemorheol Microcirc 20:3
7. Groger A, Merten HA, Holste J, Sittinger M (2003) Tissue engineering of bone for mandibular augmentation in immunocompetent minipigs: preliminary study. Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg 37(3):129-3

Dieses Poster wurde übermittelt von Dr. Tim Nolting.

Korrespondenz-Adresse:

[Dr. Tim Nolting](#)

Universität Münster

Abteilung für Mund- und Kiefer-, Gesichtschirurgie

Waldeyerstr. 30

48149 Münster

Verhalten präformierter Fibrinmembranen für ein rein autologes Bone Tissue Engineering

Nolting T, Wünnenberg J, Joos U, Kleinheinz J

Abteilung für Mund- und Kieler-, Gesichtschirurgie Universitätsklinikum Münster

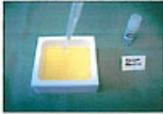


Abbildung 1: Herstellung Fibrinmembran



Abbildung 2: Ungewaschene Fibrinmembran



Abbildung 3: MCFD-Fibrinmembran (adaptiert in NaCl)



Abbildung 4: MCFD-Fibrinmembran



Abbildung 5: MCFD-Fibrinmembran (Zellkulturmaterie)



Abbildung 6: MCFD-Fibrinmembran (Zellkulturmaterie)

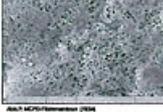


Abbildung 7: MCFD-Fibrinmembran (SEM)



Abbildung 8: MCFD-Fibrinmembran (H&E)

Einleitung

Autologer Knochen gilt auch heute noch als Knochenersatzmaterial der ersten Wahl zur Regeneration knöcherner Defekte. Der Vorteil der Osteokonduktivität und -induktivität wird jedoch nachteilig beeinflusst durch das limitierte Angebot und die erhöhte Spendermorbidity. Die erfolgreiche Integration extrakorporal erzeugter Gewebeimplantate in einen knöchernen Defekt benötigt eine optimale Zusammensetzung der Gewebe-Matrix sowie darin enthaltener spezifischer Gewebezellen. Für den Knochen bedeutet dies, eine Struktur zu finden, die der natürlichen kollagenen Struktur entspricht und die die Kultivierung und die Anzüchtung von allen für die Osteogenese entscheidend benötigten Zellen, insbesondere von Endothelzellen, ermöglicht.

Zielsetzung

Ziel der Studie war es, durch Tissue Engineering einer primär vaskularisierten Implantatkonstruktion auf Basis einer Fibrin-Matrix eine schnellere und funktionellere Ausheilung so genannter „Critical size defects“ (CSD) zu erreichen und dabei ausschließlich autologe Zellen und Gewebsanteile zu verwenden.

Material und Methoden

Aus dem venösen Citratblut Göttinger Mischweine wurde eine autologe Fibrin-Matrix hergestellt. Diese Membran wurde mittels Modified Critical Point Dry (MCPD) - Methode aufbereitet und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

Aus dem Periostr. der Schädelkalotte der Versuchstiere wurden Osteoblasten, aus Jugularvenen der Tiere Endothelzellen nach Standardverfahren gewonnen und angezüchtet. Beide Zelltypen wurden auf 5mm große und 1mm dicke Fibrinscheiben ausgesiedelt, die vorher bei 20°C für 15 Minuten unter sterilen Kautelen aufgetaut wurden.

Die Adhäsion (Fibronectin, VE-Cadherin), die Proliferation (Auszählung) und zelluläre Differenzierung (von - Willebrand - Faktor, Osteocalcin) wurde in vitro histologisch, immunhistologisch und ultrastrukturell untersucht.

Je 3 Scheiben der auf diese Weise autolog hergestellten Implantatanteile wurden sandwichartig in vivo in definierte 5 mm breite und 7 mm tiefe CSD im Corpus mandibulae der Versuchstiere eingebracht. Die knöcherne Regeneration wurde zu definierten Zeitpunkten von 3, 7, 14 Tage nach Sacrifizierung der Tiere ebenfalls histologisch, immunhistologisch und ultrastrukturell ausgewertet.

Ergebnisse

Für beide Zellreihen zeigte sich in vitro eine ausgeprägte Adhäsion auf der Matrix wenige Stunden nach Aussiedelung und eine hohe Proliferationsrate mit Ausbildung konfluierender Zellschichten nach 3 Tagen. Die Differenzierungsmarker wiesen für die Osteoblasten eine gesteigerte Expressionsrate extrazellulärer Matrixproteine auf, die Endothelzellen bildeten nach Konfluenz und Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten zyklische Strukturen aus.

Die in vivo Versuche ergaben eine gesteigerte, dichtere Regeneration im Bereich der knöchernen Defekte. Nach 3 Tagen waren ausgeprägte kapilläre Einsprossungen in die Matrix, nach 7 Tagen erste Mineralisationskeime im Fibrin-Netzwerk nachweisbar. Nach 14 Tagen nach Implantation zeigte sich eine fast vollständig Osteoneogenese im Bereich der Critical size defects.

Die knöcherne Regeneration der Defekte breitet sich, im Vergleich zu den Kontrollen signifikant doppelt so schnell aus.

Zusammenfassung

Fibrin stellt somit eine ideale Grundmatrix für das rein autologe Bone Tissue Engineering dar mit deutlichen Vorteilen im Zellverhalten und bei der Inkorporation in den Defekt gegenüber Alternativkonstrukten.

Literatur

- 1. Nollmann, C. H., Hübner, K. (2004) Use of bone proteinase in the engineering of a vascular graft model for a new delivery. *Langmuir*, 20(22), 9292-9297.
- 2. Nolting, T., Wünnenberg, J., Joos, U., Kleinheinz, J. (2005) In vitro and in vivo evaluation of a fibrin-based scaffold for bone tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 73(2), 307-314.
- 3. Nolting, T., Wünnenberg, J., Joos, U., Kleinheinz, J. (2005) In vitro and in vivo evaluation of a fibrin-based scaffold for bone tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 73(2), 307-314.
- 4. Nolting, T., Wünnenberg, J., Joos, U., Kleinheinz, J. (2005) In vitro and in vivo evaluation of a fibrin-based scaffold for bone tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 73(2), 307-314.
- 5. Nolting, T., Wünnenberg, J., Joos, U., Kleinheinz, J. (2005) In vitro and in vivo evaluation of a fibrin-based scaffold for bone tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 73(2), 307-314.

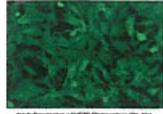


Abbildung 9: Osteoblasten auf MCFD-Fibrinmembran (SEM)

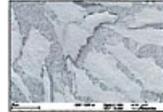


Abbildung 10: Osteoblasten auf MCFD-Fibrinmembran (SEM)



Abbildung 11: Endothelzellen auf MCFD-Fibrinmembran (SEM)

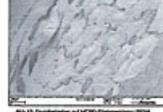


Abbildung 12: Endothelzellen auf MCFD-Fibrinmembran (SEM)



Abbildung 13: In vivo Regeneration an 3 Tagen



Abbildung 14: In vivo Regeneration an 7 Tagen

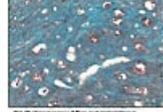


Abbildung 15: In vivo Regeneration an 14 Tagen

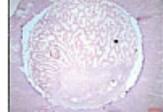


Abbildung 16: In vivo Regeneration an 14 Tagen