

IMP01

M. Herten, *M. Vogl, M. Jäger

Optimierung der Proliferation und Differenzierung mesenchymaler Progenitorzellen auf Knochenersatzmaterialien durch Thrombozytenkonzentrat

Die autologe Knochentransplantation stellt trotz hoher Co-Morbiditäten die Standardtherapie bei ossären Defekten dar. Aufgrund limitierter Entnahme-Kapazität ist bei kritisch großen Knochendefekten der Einsatz von Spenderknochen bzw. Knochenersatzmaterialien notwendig. Hierbei kommt aufgrund eines unzureichenden ossären Regenerationspotential der Werkstoffe häufig zu keiner kompletten Heilung.

Durch die Kombination von Knochenmark- und Thrombozytenlysate (PL) soll die Anheftung und die osteoblastäre Differenzierung mesenchymaler Progenitorzellen aus dem Knochenmark (MSC) an das Knochenersatzmaterial gesteigert werden.

Es wurden MSC von 3 gesunden Patienten auf 4 verschiedenen Trägerwerkstoffen (Scaffolds) mit verschiedenen PL-Konzentrationen von 1, 2,5 und 5% bei gleichzeitig 20 % FCS Zusatz kultiviert. Als Kontrolle diente 5% *platelet-poor-plasma* (PPP) bzw. Zell-Monolayer auf Polystyrol. Die Zellen wurden nach 3, 7, und 14 Tagen auf Anheftung am Scaffold, Zellproliferation über mitochondriellen ATP-Gehalt und Vitalfärbung mit DAPI und Differenzierung mittels Quantifizierung der alkalischen Phosphatase Aktivität überprüft und Immunzytologie der osteoblastären Marker (Runx-2, Osteocalcin), die Anheftungskontrolle erfolgte mittels Raster-Elektronenmikroskopie.

Es konnte gezeigt werden, dass die Anheftung und Zellproliferation an Tag 3 bzw. 7 sowohl auf Knochenersatzmaterialien auf β -TCP- als auch auf Hydroxylapatit-Basis bei einem 2,5% Thrombozytenlysatzusatz optimiert war. Im Gegensatz dazu waren nach 14 und 21 Tagen die Proliferationsraten der MSCs in allen PL und PPP Ansätzen vergleichbar hoch.

Korrespondenzanschrift

Monika Herten
Universitätsklinik Heinrich-Heine Universität Düsseldorf
Moorenstr. 540225 Düsseldorf
Deutschland

IMP02

*K. Otto, A. Berg, M. Schnabelrauch, G. Schneider

Tierexperimentelle Studie zur Entwicklung und Validierung neuartiger Gewebeklebstoffe für den Einsatz im HNO-Bereich

Einleitung

Medizinische Gewebeklebstoffe werden zum Wundverschluss im Hautbereich als Alternative zur Naht schon seit geraumer Zeit verwendet. Im Bereich der Schleimhaut existiert ein solcher fixierender Wundverschluss bisher nicht. Eine sichere Fixierung von Transplantaten und Implantaten im Schleimhautbereich (Nase, Mittelohr, Aerodigestivtrakt) kann die postoperativen Ergebnisse entscheidend verbessern. Ziel eines vom BMWi geförderten Verbundprojekts (Partner: bess pro GmbH, INNOVENT e.V., Biomateriallabor der HNO-Klinik des UKJ) ist ein universeller, biokompatibler und resorbierbarer Weichgewebeklebstoff für die Klebung im feuchten Milieu.

Material/ Methoden

Der Projektpartner INNOVENT e.V. entwickelte insgesamt 6 verschiedene Klebstoffe, welche in einem Kurzzeittierversuch (4 Wochen) an 18 Kaninchen getestet wurden. Die Tiere wurden dafür einer medianen Rhinotomie mit endonasaler Klebstoffapplikation am Septum nasi unterzogen. Nach Ablauf der Standzeit wurde den Tieren das Septum nasi entnommen und histologisch untersucht. Die zwei Klebstoffe, welche die beste Biokompatibilität zeigten, wurden in einer Langzeitstudie für 3 bzw. 6 Monate erneut in Kaninchen implantiert, und anschließend histologisch begutachtet. Als Referenzklebstoff diente Histoacryl, ein sich schon seit vielen Jahren in der medizinischen Praxis befindlicher Hautklebstoff.

Ergebnisse

Bei allen Tieren verlief die postoperative äußere Wundheilung ohne Komplikationen. Bei mikroskopischer Betrachtung konnten sowohl nach 4 Wochen als auch nach 3 bzw. 6 Monaten noch vereinzelt Reste der neuen Klebstoffe identifiziert werden. Allerdings weist das umgebende Gewebe (Knorpel, Schleimhaut) keinerlei Schädigungen auf, welche auf eine Unverträglichkeit der Klebstoffe zurück zu führen wären. Im Gegensatz dazu zeigt die Vergleichsgruppe mit Histoacryl neben deutlichen Klebstoffresten auch Gewebeschädigungen in Form von Granulationsgewebe und Knorpelnekrosen.

Zusammenfassung

Zusammen mit unseren Projektpartnern konnten wir einen neuartigen Weichgewebeklebstoff entwickeln, welcher in einer ersten Tierexperimentellen Studie gute Ergebnisse für das Kleben im feuchten Milieu gezeigt hat.

Korrespondenzanschrift

Katja Otto
Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde des Universitätsklinikums Jena
Lessingstraße 2
07743 Jena
Deutschland

IMP03

*P. Kersten-Thiele, K. Berr, C. Naujoks, J. Handschel, F. Langenbach, N. Kübler, G. Kögler, S. Arnhold, R. Depprich

Differenzierung von humanen unrestringierten Nabelschnurblut-stammzellen auf einem dreidimensionalen Kollagengerüst unter dem Einfluss osteogener Stimuli

Knochendefekte in verschiedenen Bereichen der Kiefer- und Plastischen Chirurgie können ohne implantierbares, biologisch aktives Knochenersatzmaterial nicht zufriedenstellend versorgt werden.

Humane Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut (USSCs) wurden für die zweidimensionale Kultur in Kulturflaschen oder für die dreidimensionale Kultur auf unlöslicher Knochenkollagenmatrix (insoluble collagenous bone matrix, ICBM) ausgesät. Unter dem Zusatz von rekombinantem BMP-2 oder einer Mischung aus Dexamethason, Ascorbinsäure und beta-Glyzerophosphat (DAG) wurde nach jeweils 7, 14 und 21 Tagen das Zellmaterial geerntet. Die Gesamt-RNA wurde isoliert und mit genspezifischen Primern und Sonden hinsichtlich des Gehaltes an mRNAs von osteogenen Leitproteinen in realtime PCR quantitativ analysiert. Die Proteinextrakte wurden elektrophoretisch aufgetrennt und mit spezifischen Antikörpern die Proteine RUNX2, Alkalische Phosphatase, Osteopontin und Osteonektin nachgewiesen. In raster-elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurde die Besiedlung der Träger mit Zellen beurteilt.

Die eingesetzten humanen mesenchymalen Stammzellen zeigten unter dem Einfluss der verwendeten osteogenen Stimuli BMP-2 und DAG verschieden starke Mineralisierungsgrade, die in der spezifischen Färbung mit einem fluoreszierenden Farbstoff als Hydroxylapatit identifiziert werden konnten. Den stärksten Effekt zeigte DAG, das nach 21 Tagen deutlich größere Mineralisierungsanteile induziert hatte. Der Anteil der Transkriptmenge für osteogene Leitproteine war im 3D-Modell deutlich verändert. Hierzu zählen das Mastergen der Osteogenese, RUNX2, und Strukturprotein-codierende Gene. Das Fehlen von Alkalischer Phosphatase sowohl auf der translationalen als auch auf der transkriptionellen Ebene im 3D-Modell weist auf den Dialog der extrazellulären Matrix mit den USSCs hin.

Die Anwesenheit eines Kollagengerüsts unter Erhaltung seiner dreidimensionalen Eigenschaften wie im nativen Knochen hat auf USSCs einen positiven Einfluss hinsichtlich der osteogenen Differenzierung. Diese extrazelluläre Matrix ist in der Lage die Expressionsmuster der Zellen zu verändern. Bei der Auswahl von Biomaterialien in Kombination mit Vorläuferzellen erweist sich ICBM mit USSCs für die Osteogenese besonders vielversprechend.

Korrespondenzanschrift

Pia Kersten-Thiele
Universitätsklinikum Düsseldorf
Moorenstraße 5
40225 Düsseldorf
Deutschland

IMP04

*M. Barbeck, *S. Ghanaati, R.E. Unger, C. Hoffmann, F. Peters, C.J. Kirkpatrick

Enhancement of implant lifetime by a novel injectable triphasic bone substitute on basis of β -TCP, methylcellulose and hyaluronic acid

Introduction

A new triphasic and injectable paste-like bone substitute material composed of beta-tricalcium phosphate (β -TCP), methylcellulose (MC) and hyaluronic acid (HY) was analyzed in vivo. The study focused on tissue integration, the cellular tissue response as well as the vascularization and the degradation of this new bone substitute material.

Materials and Methods

Using a subcutaneous implantation model, the interaction of this material and the material-specific peri-implant tissue reaction was tested in Wistar rats for up to 60 days by means of previously described histological and histomorphometrical analysis. The implantation of β -TCP granules alone, sham-operated animals and animals injected with saline were used as controls.

Results

After implantation, the triphasic bone substitute material was present as a bulk-like structure with an inner and outer core for up to 30 days. In this time period the ingrowth of cells and other tissue components was prevented by the integrated polymer solution of MC and HY. This new material underwent a continuous degradation, which was initiated from the periphery and moved inwards the core of the bulk-like material. Macrophages and multinucleated giant cells were involved in materials cellular degradation. The vascularization of this group was significantly higher compared with the control groups.

The implantation bed of the β -TCP-alone group was rapidly invaded by primarily phagocytes soon after implantation. These inflammatory cells continued to penetrate into the implantation bed throughout the study period. Almost no multinucleated giant cell was detected within the implantation bed, which was poorly vascularized. The granules of the β -TCP granules were almost completely degraded at the end of the study period. No adverse tissue reaction was observed within the implantation bed of the two other control groups throughout the study.

Discussion

The combination of the three biocompatible materials into one injectable paste-like bone substitute material enabled the modification of the tissue reaction to the transplant and resulted in a longer lifetime than that of β -TCP granules alone in vivo. In addition, this combination increased the vascularization of the implantation bed, which is essential for successful tissue regeneration.

Korrespondenzanschrift

Shahram Ghanaati
Johannes Gutenberg Universität Mainz
Langenbeckstr. 1
55101 Mainz
Deutschland

IMP05

*A. Southan, C. Schuh, G. Tovar, T. Hirth

Novel hydrogels based on side-chain-functionalized Poly (ethylene glycol)

Introduction

Fully synthetic hydrogels based on end-functionalized Poly(ethylene glycol) (PEG) are formed by radical polymerization or thio-Michael reactions and have been employed for a wide range of biomedical applications for their low toxicity and high hydrophilicity.[1],[2] Hydrogel properties, such as mesh sizes and elastic moduli, are tuned by the choice of the molecular weights of the PEGs used.[3]

In our study, we seek to tailor the properties of PEG-based hydrogels formed by Michael reactions without the effort of using different molecular weight polymers. For this purpose, we developed side-chain amino-functionalized PEG derivatives that can be crosslinked with bifunctional Michael-acceptors.

Methods

Amino-functionalized PEGs were synthesized in a three-step procedure starting from linear poly(glycidol). Subsequent hydrogel formation occurs via aza-Michael-reaction. Physical and chemical characterization of the gels and gel components includes gel permeation chromatography (GPC), spectroscopic methods (¹H-NMR and FT-IR), degradation and swelling behavior and rheological investigations (gelation kinetics, viscoelastic properties). Cell responses towards the gels were evaluated by monitoring proliferation rates of primary human fibroblasts according to DIN ISO 10993-5.

Results and Discussion

A novel PEG-based polymer bearing amino-groups in the side chain has been introduced. Hydrogel formation with different bifunctional Michael-acceptors has been demonstrated successfully. It has been shown that hydrogel properties can be fine-tuned simply by changing the polymer-to-crosslinker-ratio. Thus, mesh sizes and elastic moduli can be altered using a single polymer-crosslinker system. Cell responses to the gels, gel formation and gel degradation will be discussed as well as the dynamic viscoelastic properties of the hydrogels. Exemplary, the development of the shear moduli during the gelation process is shown in Fig. 1.

Fig. 1 Development of the shear moduli during gelation.

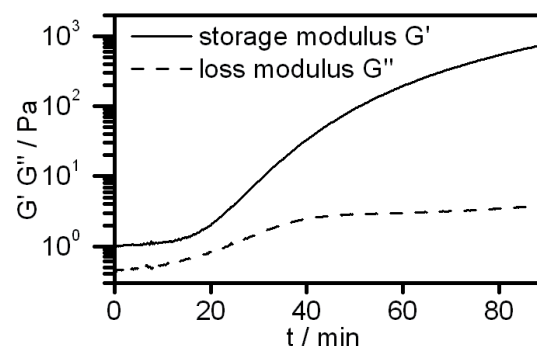
Conclusion

A new multifunctional polymer enabling us to build up customized hydrogel properties has been established.

References

- [1] M. Mahoney, K.S. Anseth, Biomaterials, 2006, 26, 2265.
- [2] Y. Qiu et al., Acta Biomaterialia, 2011, 7, 959.
- [3] M. van Dijk et al., Biomacromolecules, 2010, 11, 1608.

Anhang 1



Korrespondenzanschrift

Alexander Southan
Universität Stuttgart
Nobelstr. 12
70569 Stuttgart
Deutschland

IMP06

*H. Menzel, C. Lorenz, W. Dempwolf, V. Seifart, G. Gross, F. Thorey, H. Windhagen

Cross-linked polymer films for binding of growth factors on titanium implants

Introduction

Therapeutic proteins are important for further improvement of implant ingrowth and function. The immobilization of such proteins on the surface of the implant would allow reduction of the amount necessary to achieve effects. However, problems might arise from a deactivation of the protein due to the binding and the limited binding capacity of the surface. Binding of the proteins might also require sophisticated surface chemistry procedures. We report on a polymer system that binds to the surface in a simple process and has a much higher binding capacity than previously described systems [1].

Methods

Copolymers were prepared from vinylbenzyl-diethylphosphonate (VBP) that binds to metallic surfaces and glycidylmethacrylate (GMA) which is able to react with the proteins. Furthermore, the GMA groups can crosslink the polymer in the preparation process. The copolymers were applied to Ti surfaces and characterized. The layers were used to bind BMP2. The amount bound and activity was measured. [2]

Fig. 1: Schematic of the binding of BMP2 to slightly crosslinked copolymer films

Results

The copolymers form layers, which are thicker than expected for a monolayer of polymer coils. This can be rationalized by a crosslinking of the polymer chains. Being much thicker than previously described systems [1] the films can bind up to 110 ng/cm^2 BMP. Biological activity can be proven and quantified by a luciferase assay (BRE-luc) [2].

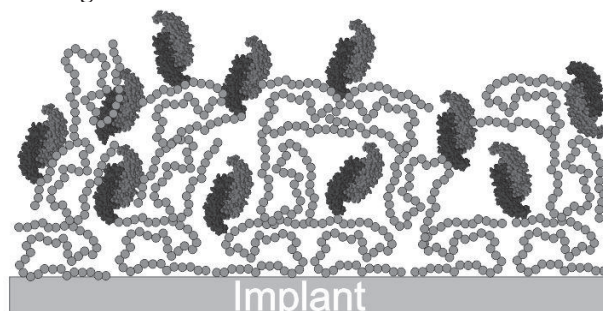
Conclusions

Copolymers were synthesized which from thin slightly crosslinked films on Titanium surfaces and can bind higher amounts of BMP2. The BMP2 is in part biologically active.

References

- [1] N. Adden, et al., *Biomacromolecules* **7** (2006) 2552
- [2] C. Lorenz, et al., *Macromol. Biosci.* **11** (2011) 234.

Anhang 1



Korrespondenzanschrift

Henning Menzel
Institut für Technische Chemie
Hans-Sommer-Str. 10
38106 Braunschweig
Deutschland

IMP07

*A. Burmester, F. Feyerabend, R. Willumeit

Influence of MgCl_2 on bone cells

Introduction

Magnesium-based implants exhibit various advantages e.g., biodegradability and may enhance *in vivo* bone formation [1]. However, cellular mechanisms for osteoconductivity remain unclear but changes in magnesium (Mg) storage or cell type specific changes in the metabolism are expected. Therefore the study of (a) the intracellular Mg content, (b) the influence of Mg on cell proliferation and (c) osteoblast differentiation may unravel some aspects of this so far not understood phenomenon. In this paper we present our results on the first two points.

Methods

To examine the relation between extracellular available Mg and intracellular Mg content osteoblasts and osteosarcoma derived cell lines (MG63, SaoS2) were incubated with MgCl_2 (0-20 mM, 1 week). The intracellular concentration of Mg was determined using a fluorescent indicator (Mag-Fura-2, AM).

To test the influence of MgCl_2 on cell proliferation the relation between cell count and various MgCl_2 concentrations was determined (osteoblasts, MG63, SaoS2, U2OS; 0-25 mM, 1 week). Moreover, proteomics were performed (human mesenchymal stem cells (hMSC); 5 mM MgCl_2 , 1 week). Proteins were separated in two dimensions and selected spots were analysed by mass spectrometry. Spontaneous differentiation during proliferation was examined by PCR of matrix related genes.

Results

Significant differences in the uptake of Mg^{2+} ions were observed for the three used cell types. The intracellular Mg content does not change significantly in MG63 cells, whereas it is increased in SaoS2 cells and osteoblasts (Fig. 1).

The influence of MgCl_2 on cell growth is also very diverse. MgCl_2 has no influence on the proliferation of osteoblasts but increases U2OS whereas SaoS2 proliferation is decreased. MG63 growth increases to 10 mM MgCl_2 and then decreases. PCR analysis revealed no spontaneous differentiation of any cell type under high extracellular Mg regimes.

The proteome analysis of hMSC revealed a 3.25 fold higher proliferation and involved proteins could be identified.

Conclusion

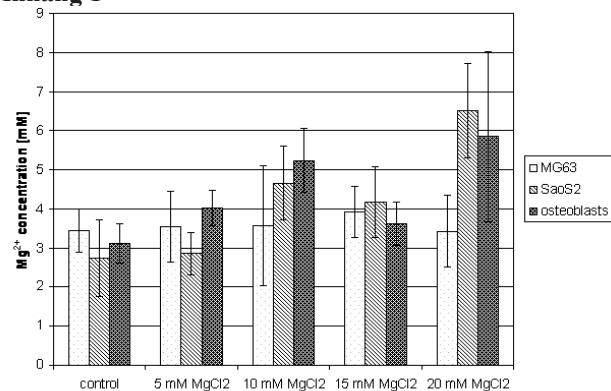
In general our experiments show no correlation between intracellular magnesium concentration and an increased cell proliferation.

[1] Witte et al, Biomaterials 2005, 26:3557-63

Fig. 1: intracellular Mg^{2+} content

Cells were incubated with various MgCl_2 concentrations (0-20 mM, 1 week).

Anhang 1



Korrespondenzanschrift

Anna Burmester
Helmholtz-Zentrum Geesthacht
Max-Planck-Straße 1
21502 Geesthacht
Deutschland