

Janicki P, Richter W

Neue Ansätze für die in situ Regeneration und das Tissue Engineering von Knochen

New Approaches for In Situ Regeneration and Tissue Engineering of Bone

Forschungszentrum für Experimentelle Orthopädie, Orthopädische Universitätsklinik Heidelberg

ZUSAMMENFASSUNG

Bis zu 5% aller Knochenbrüche weisen eine gestörte Frakturheilung auf und die Überbrückung großer Knochendefekte stellt nach wie vor eine Herausforderung für den Chirurgen dar. Methoden zur Förderung der in situ Regeneration basierend auf avitalen Komponenten wie Knochenersatzmaterialien und Wachstumsfaktoren haben inzwischen in vielfältiger Weise erfolgreichen Eingang in die Klinik gefunden. Die Anwendung von Tissue Engineering-Produkten hingegen, also die Regeneration von Knochen unter Verwendung von vitalen Komponenten, wie gezüchteten Zellen mit Hilfe unterstützender Trägerstrukturen und/oder Biomolekülen, ist im Knochen dagegen bislang weniger verbreitet. Da Knochen, im Gegensatz zum Knorpel, sehr zellreich und gut durchblutet ist, ist das Zusammenspiel von osteokonduktiven Knochenersatzmaterialien, osteoinduktiven Stimuli und osteogenen Zellen für die Rekonstruktion großer Knochendefekte besonders wichtig und notwendig. In Anbetracht einer immer älter werdenden Bevölkerung mit eingeschränkter Spontanregeneration, sowie im Leistungssport, wo eine möglichst schnelle Ausheilung und vollständige Belastungsfähigkeit des wiederhergestellten Gewebes essentiell ist, könnte die zusätzliche Bereitstellung einer großen Zahl autologer Stammzellen im Kontext von Tissue Engineering-Verfahren vielversprechend sein. Der Artikel fasst spenderabhängige Aspekte humaner mesenchymaler Stammzellen, ihre Eignung für das Tissue Engineering von Knochengewebe, sowie neue Ansätze der in situ Regeneration zusammen und informiert über relevante Aspekte der Zulässigkeit im Rahmen der Einstufung von Tissue Engineering-Produkten in Europa als Arzneimittel.

Schlüsselwörter: Sprunggelenksverletzungen, sensomotorisches Training, Verletzungsprävention, neuromuskuläres Training, propriozeptives Training.

URSACHEN GESTÖRTER KNOCHENHEILUNG

Gesunder Knochen ist normalerweise in der Lage gut zu regenerieren, wobei die Reparaturmechanismen je nach Lage, Ausmaß und Art des Knochenbruchs variieren (14,34,45). Falls während der Knochenheilung die Kallusbildung (mechanisch) unterbrochen oder verzögert wird, kann es zur Entstehung eines nicht überbrückten Knochendefektes kommen. In ca. 5-10% der Fälle kann dies zum Ausbleiben der Kallusmineralisierung und dadurch zur Entstehung einer nicht heilenden Pseudarthrose führen (36,40,41). Auch komplizierte Knochenbrüche (z.B. Trümmerbrüche), pathologische Frakturen (z.B. bei Osteoporose-Patienten) oder große Knochendefekte (z.B. nach Tumorresektionen) führen häufig dazu, dass der betroffene Knochen nicht mehr in der Lage ist, sich selbst genügend zu stabilisieren und zu regenerieren. Ungenügende Blutversorgung und Infektionen des Kallusgewebes oder auch systemische Krankheiten (wie z.B. Diabetis mellitus) können ebenfalls

SUMMARY

Up to 5% of all bone fractures show impaired healing and the bridging of large bony defects still represents a challenge for the orthopedic surgeon. In recent years, methods to promote in-situ regeneration based on non-vital components like bone substitute materials and growth factors have found successful entrance to the clinic. However, the application of vital components such as in-vitro cultured cells in combination with supporting carriers and/or biomolecules, thus tissue-engineered products, is less common for the regeneration of bone. In contrast to cartilage, bone tissue represents a cell-rich and well-vascularized tissue. Consequently, a functional interplay of supporting osteoconductive bone graft substitutes, osteoinductive stimuli and osteogenic cells is important and necessary for the regeneration of large bone defects. The additional provision of high quantities of autologous stem cells for bone tissue engineering strategies may be promising for a steadily aging population as well as for high-performance sports, where fast regeneration and full load-bearing capacity of the reconstructed bone are required. The article summarizes donor-dependent aspects of human mesenchymal stem cells and their suitability for bone tissue engineering. Additionally, new approaches for the in-situ regeneration of bone and relevant regulatory statutes due to the classification of tissue-engineered products as pharmaceuticals in Europe will be discussed.

Key words: In-situ regeneration, tissue engineering, bone substitute material, growth factor, mesenchymal stem cells.

einen negativen Einfluss auf die Knochenheilung haben. Für den Chirurgen stellt die Überbrückung großer Knochendefekte nach wie vor eine große Herausforderung dar.

KONVENTIONELLE THERAPIEMÖGLICHKEITEN GESTÖRTER KNOCHENHEILUNG

Eine der ältesten und bewährtesten Methoden, um nicht-heilende Knochendefekte zu regenerieren, ist der Ersatz des fehlenden Knochens durch Transplantation von autogenem Knochengewebe.

accepted: December 2011

published online: February 2012

DOI: 10.5960/dzsm.2011.064

Janicki P, Richter W: Neue Ansätze für die in situ Regeneration und das Tissue Engineering von Knochen. Dtsch Z Sportmed 63 (2012) 30-35.

Der Vorteil einer autogenen Knochentransplantation liegt darin, dass der eingesetzte Knochen vital ist und folglich alle erforderlichen Eigenschaften für das Wachstum eines neuen Knochens mitbringt (21,27,34). Er induziert keine Immunreaktionen und enthält alle erforderlichen Zellen und Komponenten, die die Integration des Transplantats und eine schnelle Knochenneubildung ermöglichen (osteogene Eigenschaften). Das autogene Transplantat dient zudem als Gerüst und bietet Anheftungsmöglichkeiten für knochenbildende Zellen und Blutgefäße (osteokonduktive Eigenschaften), die die Knochenheilung ermöglichen. Gleichzeitig verfügt das Transplantat über osteoinduktive Eigenschaften, da es undifferenzierte Stammzellen und Osteoprogenitor-Zellen z.B. über die Sezernierung von Wachstumsfaktoren zur Differenzierung zu reifen Knochenzellen anregt. Die Verwendung autogener Transplantate erfordert die Entnahme von gesundem Knochengewebe an einer anderen Stelle des Organismus. Das hat zur Folge, dass nicht nur die Menge des Materials limitiert ist, sondern auch der Patient zusätzliche Schmerzen erleidet und, bedingt durch mehrfache chirurgische Eingriffe, die Gefahr von Infektionen leicht aufsteigt (1,2).

Eine Alternative zur autogenen Transplantation ist die Verwendung allogener Transplantate von Spendern derselben Spezies. Diese stehen in ausreichender Menge zur Verfügung und verhindern die Entnahmemorbidity beim Patienten. Da die Transplantate jedoch meist aus Leichen gewonnen werden, besteht ein minimales Risiko, Krankheiten von Spender zu Empfänger zu übertragen und Immunreaktionen hervorzurufen (4,52). Das Infektionsrisiko wird vermindert, indem die Transplantate durch z. B. Gefriertrocknung oder den Einsatz unterschiedlicher Sterilisationsverfahren (z.B. Gamma-Bestrahlung, Behandlung mit Ethylenoxid) vorbehandelt werden. Diese Methoden haben jedoch zur Folge, dass alle zur Knochenbildung wichtigen Faktoren (wie Wachstumsfaktoren, Proteine und andere bioaktive Stoffe) zerstört werden und das Transplantat dadurch nicht nur seine osteoinduktiven Eigenschaften verliert, sondern auch biologisch „getötet“ wird (27).

Alternative, nicht-invasive Behandlungsmethoden zur Regeneration des Knochens stellen die elektrische Stimulation, der Einsatz von elektromagnetischen Feldern, extrakorporalen Stoßwellen oder auch gepulstem Ultraschall dar (42), wobei die Wirksamkeit dieser Methoden kontrovers diskutiert wird.

KONZEPTE DER REGENERATIVEN MEDIZIN

Die Regenerative Medizin beinhaltet sowohl neuartige Konzepte zur Regeneration der Morphologie und der biologischen Funktion von beschädigtem Gewebe, als auch neue Strategien zur Rekonstruktion der mechanischen Eigenschaften und der chemischen Zusammensetzung des Gewebes (39). Neuere Therapiemöglichkeiten für nicht-heilende Knochenbrüche lassen sich hauptsächlich den Gebieten der in situ Regeneration (Gewebereneration) und dem Tissue Engineering (Gewebeersatz) zuordnen. Bei der In situ-Regeneration liegt das Hauptaugenmerk auf der Stimulation endogener Reparaturmechanismen, wobei das geschädigte Gewebe durch Transplantation von Knochenersatzmaterialien mit/ohne Wachstumsfaktoren, jedoch ohne Zugabe vitaler Komponenten, stimuliert wird. Das Tissue Engineering hingegen basiert auf der Wiederherstellung, Erhaltung und Verbesserung biologischer Gewebe mit Hilfe von Ansätzen, die stets eine vitale Komponente enthalten. Meist besteht ein Tissue Enginee-

ring-Präparat aus Biomaterialien, die entweder mit Signalmolekülen angereichert und/oder mit Zellen besiedelt werden, die das Gewebe neu aufbauen sollen.

Im Gegensatz zu Knorpel, der dünnes, avaskuläres Gewebe darstellt und durch Tissue Engineering-Ansätze weitgehend erfolgreich restauriert werden kann (11), ist die Wiederherstellung des Knochens mit Hilfe von Tissue Engineering-Konstrukten insofern komplizierter, als es sich hier um zellreiches, stark durchblutetes Gewebe handelt. Eine erfolgreiche Rekonstruktion wird damit, besonders bei großen Knochendefekten, durch mangelnden Nährstofftransport und unzureichende Durchblutung des Transplantats limitiert. Dabei ist ebenfalls die Sicherstellung des Überlebens der transplantierten Zellen von großer Bedeutung.

STIMULATION ENDOGENER REPARATURMECHANISMEN DURCH IN SITU REGENERATION

Für den Ersatz des fehlenden Knochens und für dessen biomechanische Stabilität ist der Einsatz von biologischen bzw. synthetischen Knochenersatzmaterialien unerlässlich. Dabei sind neben der osteokonduktiven Eigenschaften, auch die chemische Zusammensetzung, Form, Beschaffenheit, Porosität, Porengröße, -verteilung und -form für die Integration des Transplantats und für den Heilungserfolg des Knochens ausschlaggebend.

Wachstumsfaktoren

Die Anreicherung von Knochenersatzstoffen durch Wachstumsfaktoren, die die Knochenregeneration fördern bzw. in der Lage sind Knochen zu bilden, kann additiv die osteokonduktiven Eigenschaften des Materials verstärken. Wachstumsfaktoren sind Proteine, die natürlicherweise von Zellen sekretiert werden und entweder direkt auf Zielzellen wirken oder eine spezifische Reaktion hervorrufen. Prinzipiell können sie auch mit einem Trägermaterial verabreicht werden. Zu den Wachstumsfaktoren, die während unterschiedlicher Heilungsphasen experimentell induzierter Knochenbrüche exprimiert werden, zählen z.B. Mitglieder der Transforming Growth Factor Beta (TGF- β)-Superfamilie (TGF- β Bone Morphogenetic Protein (BMP), Growth/Differentiation Faktor (GDF), Fibroblast Growth Factor (FGF), Platelet-derived Growth Factor (PDGF) und Insulin-like Growth Factor (IGF) (29).

TGF- β ist besonders für das Wachstum und die Differenzierung der Zellen und die Bildung der extrazellulären Matrix notwendig. In Tiermodellen wurde gezeigt, dass TGF- β Periostzellen zur endochondralen Differenzierung stimuliert (20) oder auch die Bildung des Kallus verstärkt (30). Da es jedoch zusätzlich einen positiven Einfluss auf die Proliferation diverser Zellen hat, wird es nur eingeschränkt zur Knochenheilung eingesetzt.

BMPs hingegen eignen sich zur Knochenregeneration, da sie mesenchymale Zellen zur osteochondroblastären Differenzierung anregen (18,57). In experimentell induzierten Knochendefekten am besten untersucht sind BMP-2 (3,13,43,58) und BMP-7 (7,8). Die klinische Anwendung von BMPs wurde in einigen Studien beschrieben und beschränkt sich hauptsächlich auf die Behandlung von Tibiafrakturen oder Pseudarthrosen (zusammengefasst in (12)).

Neben dem Knochenaufbau ist die Versorgung des Transplantats mit Blut und Nährstoffen essentiell, weshalb Wachstumsfaktoren, die zusätzlich Angiogenese-fördernde Eigenschaften besitzen, in Tiermodellen getestet wurden. Zu diesen zählt z.B. der Vascular

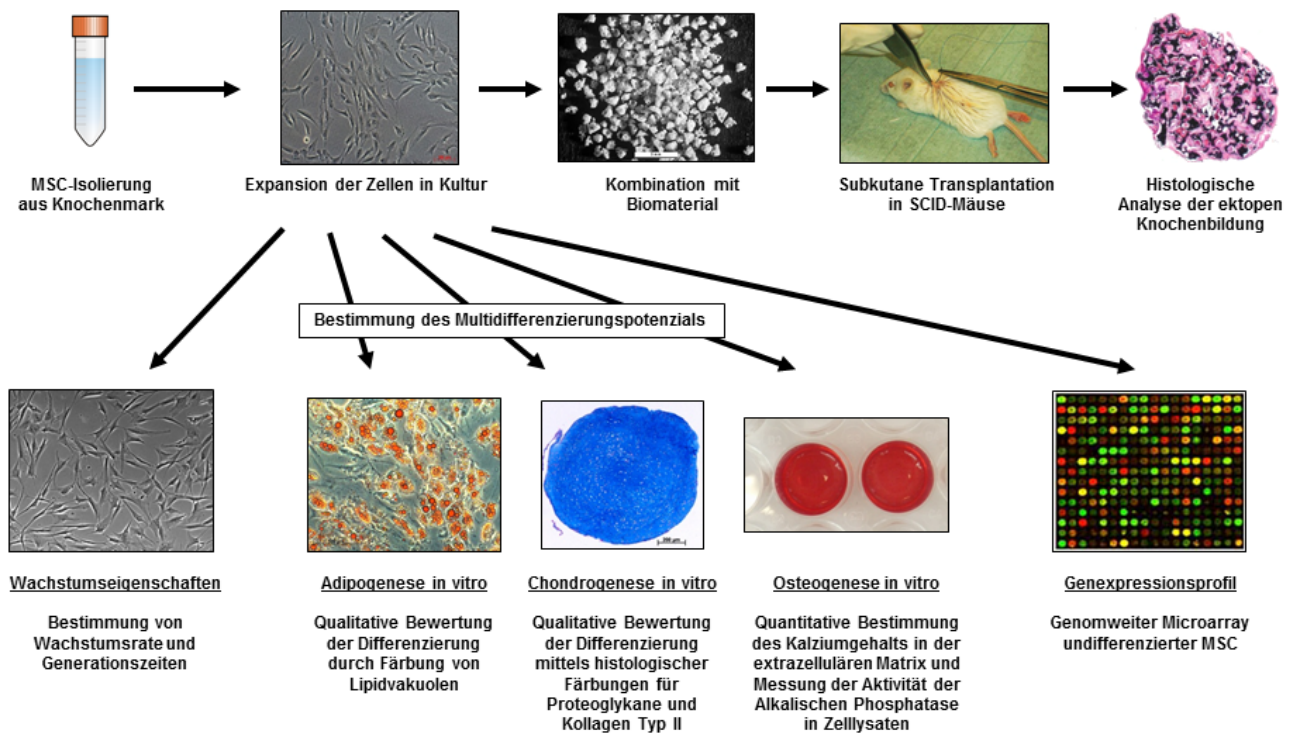


Abbildung 1: Schematische Darstellung der in vitro Analysen zum Multidifferenzierungspotenzial, der Wachstumseigenschaften und der Genexpression von MSC und der Untersuchung der ektopen Knochenbildung von MSC nach Kombination mit Knochenersatzmaterialien im Tiermodell.

Endothelial Growth Factor (VEGF). In experimentell induzierten Knochendefekten von Maus und Kaninchen wurde gezeigt, dass die optimierte Freigabe und lokale Applikation von VEGF (51) oder auch die Transplantation von VEGF-exprimierenden Fibroblasten (28) die Gefäßbildung während der Knochenheilung verstärkte.

Der kombinierte Einsatz von osteogenen und angiogenen Wachstumsfaktoren wie z.B. BMP-2 und TGF-β3 in Alginat-Hydrogelen zeigte sowohl im ektopen Modell (49) als auch im Defektmodell (35) eine verstärkte Knochenbildung. Die Kombination von BMP-2 und VEGF erwies sich hingegen als nicht signifikant besser in der Knochenbildung bzw. beim Gefäßaufbau im orthotopen Modell als der jeweilige Wachstumsfaktor alleine (24).

Designer-Wachstumsfaktoren

Verbesserte Angiogenese mit gleichzeitigem Knochenaufbau kann durch die Entwicklung von sogenannten „Designer-Wachstumsfaktoren“ erreicht werden. BMP-2 und GDF-5 beispielsweise vermitteln ihre osteoinduktive Wirkung u. a. über den BMP-Ia Rezeptor, wobei BMP-2 mit 17-fach stärkerer Affinität an den Rezeptor bindet. Durch die Angleichung definierter Aminosäuren innerhalb der Rezeptor-Bindungsregion von GDF-5 an BMP-2 ist es gelungen eine mutierte Form von GDF-5 (GDF-5_{V453/V456}) herzustellen, die ein gleichbleibend angiogenes und verstärkt osteogenes Potential aufwies. Im Defektmodell am Kaninchen, in den mit GDF-5_{V453/V456} angereicherte Kollagenschwämme transplantiert wurden, fanden wir eine Überbrückung aller behandelten Defekte bereits vier Wochen post OP und es bildeten sich signifikant mehr Knochen und Blutgefäße als in Defekten mit BMP-2 alleine (Kleinschmidt et al., Holschbach et al., Manuskripte in Vorbereitung).

Hypoxie-assoziierte Signalwege

Die gezielte Aktivierung von Schlüssel-molekülen, die während des Knochenaufbaus die Vaskularisierung regulieren, könnte einen neuen therapeutischen Ansatz zur Förderung der Knochenheilung ermöglichen. Unter anderem wurde gezeigt, dass der Hypoxia Inducible Factor (HIFα)-Signalweg eine Verbindung zwischen Osteogenese und Angiogenese herstellt. HIF-1α ist ein Transkriptionsfaktor, der unter hypoxischen Bedingungen Angiogenese und Osteogenese durch die Hochregulation von VEGF stimuliert. Unter normoxischen Bedingungen wird er jedoch von Prolylhydroxylasen (PHD) abgebaut. Durch Anwendung von PHD-Inhibitoren bei Mäusen konnte das HIF-1α Signal so verstärkt werden, dass deutlich mehr Angiogenese induziert und damit die Knochenregeneration signifikant erhöht werden konnte (46,54).

MESENCHYMALLE STAMMZELLEN FÜR DIE KNOCHENREGENERATION

Mesenchymale Stammzellen (MSC) eignen sich aufgrund ihres mesodermalen Ursprungs ideal zum Wiederaufbau des Knochens. Postnatal sind MSC zwar aus vielen Geweben isolierbar, allerdings ist das Knochenmark bislang die am häufigsten verwendete Quelle für osteogen potente MSC. Ex vivo zeichnen sich MSC durch ihre Plastikadhärenz, ihre Multipotenz und durch die kombinierte Expression ausgewählter Oberflächenmarker aus (10).

Die klinische Anwendung humaner autologer MSC für die Regeneration von Knochengewebe stellt den Mediziner jedoch vor einige Herausforderungen. Zum einen ist die Anzahl der MSC im

Knochenmark sehr gering (7-33 MSC pro Million nukleäre Zellen (5, 6, 17, 22, 37, 56)), sodass die Zellen ex vivo expandiert werden müssen, um genügend MSC für die Therapie zu erhalten. Zum anderen sind MSC-Populationen sehr heterogen, was zu einer erheblichen Variabilität in der Knochenbildungsfähigkeit zwischen den einzelnen Spendern führt (25, 26, 32, 47, 48). Das osteogene Potential der MSC kann sowohl in vitro durch spezielle Induktionsmedien, als auch in vivo in Kombination mit Knochenersatzmaterialien in ektopen Tiermodellen abgefragt werden. Jüngste Ergebnisse zeigen jedoch, dass die Fähigkeit humaner MSC aus dem Knochenmark in Zellkultur zu Osteoblasten zu differenzieren keineswegs mit ihrer in vivo Knochenbildungsfähigkeit korreliert (19). Folglich sind Methoden, die die Osteogenese humaner MSC in vitro beurteilen, als Tests für die Prädiktion der Knochenbildungsfähigkeit der Zellen in vivo untauglich. Ein wichtiger Faktor, der bei der Knochenbildungsfähigkeit humaner MSC eine Rolle spielt, ist das Alter des Spenders. Unsere Arbeiten konnten zeigen, dass aus Knochenmark von älteren Spendern nicht grundsätzlich weniger MSC isoliert werden können als von jungen Menschen, die Reaktivierbarkeit der Zellen zu schnellem Wachstum jedoch bei älteren Spendern eingeschränkt war (9). Keineswegs bevorzugten MSC von älteren Spendern jedoch eine Differenzierung zu Fettzellen gegenüber der zu Osteoblasten (9) wie man aus der mit dem Alter zunehmenden Menge an Fettmark im Knochen annehmen könnte. Allerdings erwies sich eine schlechtere Wachstumsrate von MSC grundsätzlich als ein so entscheidender Parameter für den Erfolg der in vivo Knochenbildung (19), dass wir durch Ermittlung der Verdopplungszeit von MSC unmittelbar vor Transplantation korrekt vorhersagen konnten, ob die Knochenbildung gelingen wird oder nicht. Damit liegt nahe, dass die altersabhängige Verringerung der MSC-Vermehrung zur Verschlechterung der Knochenregeneration beim alten Menschen beiträgt. In der Tat konnten wir durch irreversible Blockierung der Proliferationsfähigkeit von MSC zum Zeitpunkt der Transplantation die Knochenbildung unterbinden, während wachstumsfähige Zellen aus der korrespondierenden unbehandelten MSC-Population Knochen bilden konnten. Durch die gezielte Beschleunigung der Wachstumsgeschwindigkeit langsam wachsender MSC (z.B. von älteren Spendern) konnten wir eine erfolgreiche Knochenbildung im ektopen Mausmodell erreichen (19). Dies stellt in Aussicht, dass auch für ältere Spender geeignete Herstellungsbedingungen für MSC gefunden werden können, die eine Therapie von Knochendefekten vielversprechend erscheinen lassen können und das Alter kein Ausschlusskriterium für stammzellbasierte Therapiestrategien darstellen muss.

KLINISCHE STUDIEN MIT AUTOLOGEN MSC AUS KNOCHENMARK

Bis heute gibt es nur wenige aussagekräftige klinische Studien über die Anwendung autologer MSC bei Knochendefekten. Berichte über erfolgreiche Wiederherstellung des Knochengewebes zeigen Fallstudien, bei denen z.B. Kieferknochen mit Hilfe boviner Spongiosa, BMP-7 und Knochenmark regeneriert wurde (55) oder Knochendefekte mit Hilfe von Keramiken und osteogen induzierten MSC behandelt wurden (23, 33). Einzelne Studien berichteten, dass auch durch die direkte Injektion frisch entnommenen Knochenmarks in Pseudarthrosen bei 68 von 72 Patienten (50) bzw. bei 15 von 20 Patienten (15) eine Knochenregeneration möglich war.

Hernigou und Kollegen berichteten gar über eine standardisierte Behandlung von Knochendefekten an der Tibia mit Hilfe einer Methode, die darauf abzielte das Knochenmark des Patienten mittels eines geschlossenen Zentrifugationssystems im Operationssaal zu konzentrieren und das Konzentrat direkt in den Knochendefekt zu applizieren (16, 17). Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass nur ein operativer Eingriff für die Therapie genügt und Kosten gespart werden könnten. Zuvor wurde mit Hilfe dieser Technik bei 53 von 60 Patienten nach 3 bis 8 Wochen post OP eine Kallusbildung beobachtet (17), allerdings wird nicht von einer signifikanten Verbesserung im statistischen Sinne der Knochenheilung gesprochen, da gar keine Kontrollgruppe ohne MSC-Behandlung in dieser Studie eingeschlossen worden war. Die Autoren um Hernigou berichteten lediglich, dass bei den 7 Patienten, bei denen der Knochen nicht heilte, signifikant weniger Progenitoren injiziert wurden (16). Auffallend ist, dass bislang über einen Zeitraum von 6 Jahren noch keine Folgestudien anderer Gruppen vorliegen, die einen solchen Erfolg bestätigen könnten.

Expandierte autologe MSC in Kombination mit einem HA-Träger wurden ebenfalls zur Behandlung von 4-7 cm großen Defekten eingesetzt und zeigten bereits zwei Monate post OP eine gute Integration des Transplantats und Kallusbildung, was bei einer Standardbehandlung in der Regel etwa 12-18 Monate dauern würde (31, 38).

Zulassungsrelevante Aspekte

Die Verwendung von biotechnologisch bearbeiteten Gewebeprodukten, also von Tissue Engineering-Produkten, ist seit Dezember 2008 durch die zentrale Verordnung (EC) Nr. 1394/2007, auch Verordnung über „Arzneimittel für neuartige Therapien“ (Advanced Therapy Medicinal Product, ATMP) genannt, europaweit strikt reguliert (59). Aufgrund dieser Verordnung müssen Zulassungsanträge für potentielle Produkte in diversen Behörden bewertet und eingestuft werden. Bei Kombinationsprodukten, die aus Medizinprodukten und Zellen bestehen, überschneiden sich die Zuständigkeiten der deutschen Bundesbehörden, da das Medizinprodukt in die Zuständigkeit des Bundesinstituts für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) fällt, zelluläre Komponenten jedoch vom Paul-Ehrlich-Institut (PEI) bewertet werden (53). Zusätzlich zum bürokratischen Aufwand müssen bei der Aufarbeitung und Herstellung von Tissue Engineering-Produkten hohe GMP-Standards (EU-Richtlinie 2003/94/EC, für MSC: (44)) eingehalten werden, die Zellvitalität, Sterilität der Komponenten und hohe Sicherheitsanforderungen sicherstellen. Die Anwendung autologer MSC erfordert auch die Feststellung der exakten Identität der Zellen mittels eindeutiger in vivo MSC-Marker. Hinzu kommen die Sicherstellung der Reproduzierbarkeit der Aufarbeitung der Zellen und der Herstellung des Produktes. Zudem stellt sich die Frage nach dem genauen Wirkungsmechanismus des ATMP, da sowohl Erfahrungswerte als auch klinische Studien noch sehr begrenzt sind. Damit gibt es aufgrund dieser Gegebenheiten bislang kein zugelassenes und kommerziell erwerbliches Tissue Engineering-Produkt für die Knochenregeneration.

FAZIT

Die Behandlung nicht-heilender Knochendefekte mittels klassischer Methoden wie autogener oder allogener Transplantation von Knochengewebe hat sich bislang zwar bewährt, birgt jedoch

einige Risiken und Nachteile für den Patienten. Neue Konzepte der Regenerativen Medizin hingegen bieten vielversprechende „patientenfreundliche“ Möglichkeiten wie die Geweberegeneration mittels in situ Regeneration oder den vollständigen Gewebeersatz mittels Tissue Engineering-Methoden. Dabei kann der endogene Reparaturmechanismus mit Hilfe von geeigneten Knochensatzmaterialien, multifunktionalen „Designer-Wachstumsfaktoren“ und bestimmten Transkriptionsfaktoren wie HIF-1 α stimuliert werden, oder aber das fehlende Knochengewebe durch potente Vorläuferzellen gänzlich ersetzt werden. Erste klinische Studien demonstrieren den erfolgreichen Einsatz autologer MSC zum Wiederaufbau des Knochens, jedoch sind prospektive, randomisierte Studien mit standardisierten Protokollen zur Zellgewinnung notwendig, um valide Aussagen über die Anwendbarkeit von MSC-basierten Tissue Engineering-Produkten und ihren Langzeitfolgen machen zu können. Die hohen regulatorischen Hürden verbunden mit der bislang nicht vollständig verstandenen Biologie mesenchymaler Stammzellen machen noch viele weitere methodische und funktionelle Untersuchungen notwendig.

Angaben zu finanziellen Interessen und Beziehungen, wie Patente, Honorare oder Unterstützung durch Firmen: Keine.

LITERATUR

- ARRINGTON ED, SMITH WJ, CHAMBERS HG, BUCKNELL AL, DAVINO NA: Complications of iliac crest bone graft harvesting. *Clin Orthop Relat Res* (1996) 300-309. doi:10.1097/00003086-199608000-00037.
- BANWART JC, ASHER MA, HASSANEIN RS: Iliac crest bone graft harvest donor site morbidity. A statistical evaluation. *Spine* 20 (1995) 1055-1060. doi:10.1097/00007632-199505000-00012.
- BOSTROM M, LANE JM, TOMIN E, ET AL: Use of bone morphogenetic protein-2 in the rabbit ulnar nonunion model. *Clin Orthop Relat Res* (1996) 272-282. doi:10.1097/00003086-199606000-00034.
- BOYCE T, EDWARDS J, SCARBOROUGH N: Allograft bone. The influence of processing on safety and performance. *Orthop Clin North Am* 30 (1999) 571-581. doi:10.1016/S0030-5898(05)70110-3.
- BRUDER SP, FINK DJ, CAPLAN AL: Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *J Cell Biochem* 56 (1994) 283-294. doi:10.1002/jcb.240560303.
- CAMPAGNOLI C, ROBERTS IA, KUMAR S, BENNETT PR, BELLANTUONO I, FISK NM: Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood* 98 (2001) 2396-2402. doi:10.1182/blood.V98.8.2396.
- COOK SD, BAFFES GC, WOLFE MW, SAMPATH TK, RUEGER DC: Recombinant human bone morphogenetic protein-7 induces healing in a canine long-bone segmental defect model. *Clin Orthop Relat Res* (1994) 302-312.
- COOK SD, WOLFE MW, SALKELD SL, RUEGER DC: Effect of recombinant human osteogenic protein-1 on healing of segmental defects in non-human primates. *J Bone Joint Surg Am* 77 (1995) 734-750.
- DEXHEIMER V, MUELLER S, BRAATZ F, RICHTER W: Reduced reactivation from dormancy but maintained lineage choice of human mesenchymal stem cells with donor age. *PLoS ONE* 6 (2011) e22980. doi:10.1371/journal.pone.0022980.
- DOMINICI M, LE BLANC K, MUELLER I, ET AL: Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8 (2006) 315-317. doi:10.1080/14653240600855905.
- FRITZ J, JANSSEN P, GAISSMAIER C, SCHEWE B, WEISE K: Articular cartilage defects in the knee--basics, therapies and results. *Injury* 392 (Suppl 1) (2008) 50-57. doi:10.1016/j.injury.2008.01.039.
- GARRISON KR, SHEMILT I, DONELL S, ET AL: Bone morphogenetic protein (BMP) for fracture healing in adults. *Cochrane Database Syst Rev* (2010) CD006950.
- GERHART TN, KIRKER-HEAD CA, KRIZ MJ, ET AL: Healing segmental femoral defects in sheep using recombinant human bone morphogenetic protein. *Clin Orthop Relat Res* (1993) 317-326.
- GERSTENFELD LC, CULLINANE DM, BARNES GL, GRAVES DT, EINHORN TA: Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J Cell Biochem* 88 (2003) 873-884. doi:10.1002/jcb.10435.
- GOEL A, SANGWAN SS, SIWACH RC, ALI AM: Percutaneous bone marrow grafting for the treatment of tibial non-union. *Injury* 36 (2005) 203-206. doi:10.1016/j.injury.2004.01.009.
- HERNIGOU P, MATHIEU G, POIGNARD A, MANICOM O, BEAUJEAN F, ROUARD H: Percutaneous autologous bone-marrow grafting for non-unions. Surgical technique. *J Bone Joint Surg Am* 88 (Suppl 1 Pt 2) (2006) 322-327. doi:10.2106/JBJS.F.00203.
- HERNIGOU P, POIGNARD A, BEAUJEAN F, ROUARD H: Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Influence of the number and concentration of progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am* 87 (2005) 1430-1437. doi:10.2106/JBJS.D.02215.
- HOFFMANN A, GROSS G: BMP signaling pathways in cartilage and bone formation. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 11 (2001) 23-45.
- JANICKI P, BOEUF S, STECK E, EGERMANN M, KASTEN P, RICHTER W: Prediction of in vivo bone forming potency of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells. *Eur Cell Mater* 21 (2011) 488-507.
- JOYCE ME, JINGUSHI S, BOLANDER ME: Transforming growth factor-beta in the regulation of fracture repair. *Orthop Clin North Am* 21 (1990) 199-209.
- KALFAS IH: Principles of bone healing. *Neurosurg Focus* 10 (2001) 1. doi:10.3171/foc.2001.10.4.2.
- KASTEN P, BEYEN I, EGERMANN M, ET AL: Instant stem cell therapy: characterization and concentration of human mesenchymal stem cells in vitro. *Eur Cell Mater* 16 (2008) 47-55.
- KAWATE K, YAJIMA H, OHGUSHI H, ET AL: Tissue-engineered approach for the treatment of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head: transplantation of autologous mesenchymal stem cells cultured with beta-tricalcium phosphate ceramics and free vascularized fibula. *Artif Organs* 30 (2006) 960-962. doi:10.1111/j.1525-1594.2006.00333.x.
- KEMPEN DH, LU L, HEIJINK A, ET AL: Effect of local sequential VEGF and BMP-2 delivery on ectopic and orthotopic bone regeneration. *Biomaterials* 30 (2009) 2816-2825. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.01.031.
- KREBSBACH PH, KUZNETSOV SA, SATOMURA K, EMMONS RV, ROWE DW, ROBEY PG: Bone formation in vivo: comparison of osteogenesis by transplanted mouse and human marrow stromal fibroblasts. *Transplantation* 62 (1997) 1059-1069. doi:10.1097/00007890-199704270-00003.
- KUZNETSOV SA, KREBSBACH PH, SATOMURA K, ET AL: Single-colony derived strains of human marrow stromal fibroblasts form bone after transplantation in vivo. *J Bone Miner Res* 12 (1997) 1335-1347. doi:10.1359/jbmr.1997.12.9.1335.
- LAURENCIN C, KHAN Y, EL AMIN SF: Bone graft substitutes. *Expert Rev Med Devices* 3 (2006) 49-57. doi:10.1586/17434440.3.1.49.
- LI R, STEWART DJ, VON SCHROEDER HP, MACKINNON ES, SCHEMITSCH EH: Effect of cell-based VEGF gene therapy on healing of a segmental bone defect. *J Orthop Res* 27 (2009) 8-14. doi:10.1002/jor.20658.
- LIEBERMAN JR, DALUISKI A, EINHORN TA: The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg Am* 84-A (2002) 1032-1044.
- LIND M, SCHUMACKER B, SOBALLE K, KELLER J, MELSEN F, BUNGER C: Transforming growth factor-beta enhances fracture healing in rabbit tibiae. *Acta Orthop Scand* 64 (1993) 553-556. doi:10.3109/17453679308993691.
- MARCACCI M, KON E, MOUKHACHEV V, ET AL: Stem Cells Associated with Macroporous Bioceramics for Long Bone Repair: 6- to 7-Year Outcome of a Pilot Clinical Study. *Tissue Eng* 13 (2007) 947-955. doi:10.1089/ten.2006.0271.
- MENDES SC, TIBBE JM, VEENHOF M, ET AL: Bone tissue-engineered implants using human bone marrow stromal cells: Effect of

- culture conditions and donor age. *Tissue Eng* 8 (2002) 911-920. doi:10.1089/107632702320934010.
33. MORISHITA T, HONOKI K, OHGUSHI H, KOTOBUKI N, MATSUSHIMA A, TAKAKURA Y: Tissue engineering approach to the treatment of bone tumors: three cases of cultured bone grafts derived from patients' mesenchymal stem cells. *Artif Organs* 30 (2006) 115-118. doi:10.1111/j.1525-1594.2006.00190.x.
 34. NEUFELD DA UND MOHAMMAD K: Regeneration of Bone. *Encyclopedia of Life Sciences* (1 A.D.).
 35. OEST ME, DUPONT KM, KONG HJ, MOONEY DJ, GULDBERG RE: Quantitative assessment of scaffold and growth factor-mediated repair of critically sized bone defects. *J Orthop Res* 25 (2007) 941-950. doi:10.1002/jor.20372.
 36. PRAEMER, A, FURNER, S, RICE, D: Musculoskeletal Condition in the United States. (1992).
 37. PROCKOP DJ, AZIZI SA, COLTER D, DIGIROLAMO C, KOPEN G, PHINNEY DG: Potential use of stem cells from bone marrow to repair the extracellular matrix and the central nervous system. *Biochem Soc Trans* 28 (2000) 341-345. doi:10.1042/0300-5127:0280341.
 38. QUARTO R, MASTROGIACOMO M, CANCEDDA R, ET AL: Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med* 344 (2001) 385-386. doi:10.1056/NEJM200102013440516.
 39. RICHTER, W UND DIEDERICH, S: [Regenerative medicine in orthopaedics : Cell therapy - tissue engineering - in situ regeneration.]. *Orthopäde* (2009).
 40. RUNKEL M, ROMMENS PM: [Pseudoarthrosis]. *Unfallchirurg* 103 (2000) 51-63. doi:10.1007/s001130050008.
 41. RUTER A, MAYR E: [Pseudoarthrosis]. *Chirurg* 70 (1999) 1239-1245. doi:10.1007/s001040050775.
 42. SCHMIDT-ROHLFING B, TZIOPIS C, MENZEL CL, PAPE HC: [Tissue engineering of bone tissue. Principles and clinical applications]. *Unfallchirurg* 112 (2009) 785-795. doi:10.1007/s00113-009-1695-x.
 43. SCIADINI MF, JOHNSON KD: Evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 as a bone-graft substitute in a canine segmental defect model. *J Orthop Res* 18 (2000) 289-302. doi:10.1002/jor.1100180218.
 44. SENSEBÉ L, BOURIN P, TARTE K: Good manufacturing practices production of mesenchymal stem/stromal cells. *Hum Gene Ther* 22 (2011) 19-26. doi:10.1089/hum.2010.197.
 45. SHAPIRO, F: Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. *Eur Cell Mater* 15 (2008) 53-76.
 46. SHEN X, WAN C, RAMASWAMY G, ET AL: Prolyl hydroxylase inhibitors increase neoangiogenesis and callus formation following femur fracture in mice. *J Orthop Res* 27 (2009) 1298-1305. doi:10.1002/jor.20886.
 47. SIDDAPPA R, LICHT R, VAN BLITERSWIJK C, DE BOER J: Donor variation and loss of multipotency during in vitro expansion of human mesenchymal stem cells for bone tissue engineering. *J Orthop Res* 25 (2007) 1029-1041. doi:10.1002/jor.20402.
 48. SIDDAPPA R, MARTENS A, DOORN J, ET AL: cAMP/PKA pathway activation in human mesenchymal stem cells in vitro results in robust bone formation in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 105 (2008) 7281-7286. doi:10.1073/pnas.0711190105.
 49. SIMMONS CA, ALSBERG E, HSIONG S, KIM WJ, MOONEY DJ: Dual growth factor delivery and controlled scaffold degradation enhance in vivo bone formation by transplanted bone marrow stromal cells. *Bone* 35 (2004) 562-569. doi:10.1016/j.bone.2004.02.027.
 50. SIWACH RC, SANGWAN SS, SINGH R, GOEL A: Role of percutaneous bone marrow grafting in delayed unions, non-unions and poor regenerates. *Indian J Med Sci* 55 (2001) 326-336.
 51. STREET J, BAO M, DEGUZMAN L, ET AL: Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci USA* 99 (2002) 9656-9661. doi:10.1073/pnas.152324099.
 52. TOMFORD WW: Transmission of disease through transplantation of musculoskeletal allografts. *J Bone Joint Surg Am* 77 (1995) 1742-1754.
 53. WALTER C, ROHDE B, WICKE DC, POHLER C, LUHRMANN A. VON DER, LH: [Regulatory framework of innovative therapies : From bench to bedside]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 54 (2011) 803-810. doi:10.1007/s00103-011-1308-z.
 54. WAN C, GILBERT SR, WANG Y, ET AL: Activation of the hypoxia-inducible factor-1alpha pathway accelerates bone regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 105 (2008) 686-691. doi:10.1073/pnas.0708474105.
 55. WARNKE PH, SPRINGER IN, WILTFANG J, ET AL: Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man. *Lancet* 364 (2004) 766-770. doi:10.1016/S0140-6736(04)16935-3.
 56. WEXLER SA, DONALDSON C, DENNING-KENDALL P, RICE C, BRADLEY B, HOWS JM: Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *Br J Haematol* 121 (2003) 368-374. doi:10.1046/j.1365-2141.2003.04284.x.
 57. YAMAGUCHI A: Regulation of differentiation pathway of skeletal mesenchymal cells in cell lines by transforming growth factor-beta superfamily. *Semin Cell Biol* 6 (1995) 165-173. doi:10.1006/scel.1995.0023.
 58. YASKO AW, LANE JM, FELLINGER EJ, ROSEN V, WOZNEY JM, WANG EA: The healing of segmental bone defects, induced by recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP-2). A radiographic, histological, and biomechanical study in rats. *J Bone Joint Surg Am* 74 (1992) 659-670.
 59. ZIEGELE B, DAHL L, MULLER AT: [The Innovation Office of the Paul-Ehrlich-Institut. Regulatory support during the scientific development of ATMP]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 54 (2011) 857-866. doi:10.1007/s00103-011-1307-0.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Wiltrud Richter

Forschungszentrum für Experimentelle Orthopädie

Orthopädische Universitätsklinik Heidelberg

Schlierbacher Landstraße 200a

69118 Heidelberg

E-Mail: wiltrud.richter@med.uni-heidelberg.de