

BioGlas - Scaffolds aus Glas für ‚Tissue Engineering‘ mit einstellbaren Wachstumsfaktoren

Prof. Dr. Armin Lenhart
Fakultät Werkstofftechnik
Technische Hochschule Nürnberg

Prof. Dr. Ralf Lösel
Fakultät Angewandte Chemie
Technische Hochschule Nürnberg

Wesentliche Projektziele

Beim Krankheitsbild der Arthrose werden die Knorpel in den Gelenken angegriffen und teilweise aufgelöst. Die Forschung an der TH Nürnberg zielt darauf ab, körpereigenes Gewebe in vitro zu züchten und es anschließend in den Körper zu übertragen. Die Zellen sollen auf einem Träger wachsen, in der Form der geschädigten Stelle im Gelenk des Patienten. Das Ziel ist, dass dieser Träger sich zu einem späteren Zeitpunkt selbsttätig restlos auflöst. Im Rahmen des Projekts werden bioaktive poröse Gläser entwickelt, die sich besonders für das Wachstum von Knorpelgewebe eignen. Durch die Optimierung der Zusammensetzung kann die Auflösungsgeschwindigkeit mit einem kontrolliertem Zellwachstum auf den Gläsern gesteuert werden.

1. Projektdaten

Fördersumme	30.000 Euro
Laufzeit	März bis Dezember 2016
Fakultät / Institut / Kompetenzzentrum	Fakultät Werkstofftechnik und Fakultät Angewandte Chemie
Projektleitung	Prof. Dr. Armin Lenhart Prof. Dr. Ralf Lösel
Kontaktdaten	E-Mail: armin.lenhart@th-nuernberg.de ralf.loesel@th-nuernberg.de

2. Ausgangslage

Die regenerative Medizin entwickelt vielversprechende Ansätze, um eine vollständige Wiederherstellung eines geschädigten Gewebes / Organs zu realisieren. Eine Möglichkeit ist das Verfahren des ‚Tissue Engineerings‘, bei dem zunächst in vitro eine Zellproliferation durch adhärente Zellen auf einem 3D-Scaffold erreicht wird.

Die Lebenserwartung der Menschen nimmt weltweit in den letzten Jahrzehnten konstant zu. In Kombination mit einem geänderten Lebensstil mit mangelnder Bewegung und nicht angepassten Essgewohnheiten treten insbesondere im Alter Folgeschäden und Organversagen auf. So sind vor allem die Organe des Bewegungsapparates von dieser Entwicklung erheblich betroffen.

Vor diesem Hintergrund wurden 2004 etwa sieben Mrd. Euro für Behandlungen von Arthrose ausgegeben, Tendenz steigend. [Quelle: Statistisches Bundesamt].

Arthrose ist eine Erkrankung, bei der in den Gelenken unter anderem die Knorpel angegriffen und teilweise aufgelöst werden. Eine Möglichkeit der Therapie sind chirurgische Eingriffe, die in der Regel mit einem vollständigen Ersatz des Gelenks durch ein Implantat verbunden sind. Sehr viel effizienter ist dagegen die Züchtung von entsprechendem körpereigenem Gewebe in vitro mit anschließender Übertragung in den Körper.

Um ein in vitro Wachstum von Knorpelzellen zu erreichen, werden aus dem Körper entnommene Zellen in einer

geeigneten Umgebung stimuliert. Eine passende geometrische Form unterstützt die Bildung von neuem Gewebe. Zu diesem Zweck werden weltweit die Techniken des sogenannten ‚Tissue Engineerings‘ (Gewebe konstruktion oder Gewebezüchtung) erforscht und weiterentwickelt. Für das in vitro Wachstum des Gewebes sind vier grundlegende Faktoren von hoher Bedeutung: Erstens wird ein geeignetes Gerüst für das Wachstum der Zellen benötigt (sog. Scaffold), zweitens müssen lebende und vermehrbare Zellen auf dem Scaffold ansiedelbar sein, drittens ist eine Kontrolle der Signaltransduktion an die lebenden Zellen erforderlich (Wachstumsfaktoren) und viertens wird ein für die Zellenproliferation (Wachstum und Vermehrung) förderliches extrazelluläres Medium in dem Scaffold und um die Zellen herum benötigt.

Von besonderem Interesse sind neben dem geometrischen Aufbau vor allem die Wachstumsfaktoren, die steuern, wie sich die Zellen auf dem Scaffold proliferieren. Bei den Wachstumsfaktoren wird im Wesentlichen zwischen mechanischen und (elektro-) chemischen Faktoren unterschieden. Für die gute Vermehrung der angesiedelten Zellen, müssen diese Faktoren passend für jede Zelllinie angeglichen werden.

Dies ist eine zentrale Frage des Tissue Engineerings, die nicht durch Analogschlüsse mit dotierten Zelllösungen beantwortet werden kann. Durch das Auflösen der bioaktiven Scaffolds entstehen Konzentrationsgradienten mit entsprechenden chemischen und elektrochemischen Potentialen, die die Zellenproliferation unterstützen. Glas ist in diesem Kontext ein exzellenter Werkstoff.

3. Ziele des Forschungsprojekts

Im Rahmen des Forschungsprojektes werden in einer interdisziplinären Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Gundula Schulze-Tanzil von der Paracelsus Medizinischen Privatuniversität in Nürnberg bioaktive poröse Gläser entwickelt, die sich besonders für das Wachstum von Knorpelgewebe eignen. Die generellen Anforderungen an bioaktive Gläser sind die Sterilisierbarkeit, die Biokompatibilität (nicht toxisch), die 3D-Struktur, die Zelladhäsion und Zelldifferenzierung, die ausreichende mechanische Stabilität für den Implantationsort und die nichttoxische, rasche Degradation beim in vivo-Einsatz. Darüber hinaus muss die Struktur in einfacher Weise dem Defekt anzupassen sein. Eine hohe Bioaktivität wird in der Literatur oft mit einem erhöhten Ion-Release korreliert. Allerdings ist eine gezielte Adhärenz der Zellen an der Scaffoldoberfläche nur dann möglich, wenn unter diesen dynamischen Korrosionsbedingungen keine Toxizität (erhöhter pH-Wert durch Alkalien) auftritt. Bei den gut untersuchten bioaktiven Gläsern zur Bildung eines Knochengewebes wird hierbei die sich auf der Glasoberfläche bildende Hydroxylapatitschicht genutzt. Im Rahmen dieses Forschungsprojektes wird eine Korrosionsschicht erzeugt, die die Rolle der diffusionssperrenden Hydroxylapatitschicht übernimmt. Ein Glasscaffold zur Knorpelzüchtung sollte also von Anfang an eine geeignete bioaktive Oberfläche und ein rasches biokompatibles Auflösungsvermögen innerhalb weniger Wochen gewährleisten.

Eine schnelle Auflösung eines Silikatglases lässt sich relativ einfach durch eine hohe Konzentration nicht bindender Sauerstoffe erreichen. Dies führt aber zu einem nicht akzeptablen pH-Wert-Anstieg in der extra-zellulären Matrix. Deshalb ist ein Ziel des Projekts die Entwicklung neuartiger Gläser, die diese Anforderungen erfüllen.

4. Herangehensweise und Forschungsergebnisse

Die experimentelle Herangehensweise der Glasentwicklung gliedert sich in vier Bereiche: Die Schmelztechnologie, die optimierte Scaffoldherstellung, die Bestimmung der chemischen Stabilität bezüglich der einzustellenden

Korrosionsschicht und der Auflösungsgeschwindigkeit einschließlich der Bestimmung der resultierenden pH-Wert-Änderung. Die Glaszusammensetzungen werden so gewählt, dass keine selektive Verdampfung und unerwünschte Kristallisation bei der Verarbeitung eintritt.

Schmelzen des Rohglases

Die hochreinen, pulverförmigen, hauptsächlich oxidischen Rohstoffe werden entsprechend der gewählten Zusammensetzung eingewogen, im Keramikmörser homogenisiert und zur Vermeidung von Schmelzkontamination in einem Platin-Gold-Tiegel geschmolzen. Die Schmelztemperatur von etwa 1300 °C und die Haltezeit von ca. 6 h werden entsprechend der Glaszusammensetzung jeweils neu gewählt. Die Schmelze wird anschließend bei einer Viskosität von 10² dPa·s in eine vorgewärmte Stahlform gegossen, entformt und in einer festen Form in einen weiteren Ofen – einen sogenannten Kühllofen – überführt, um Kühlspannungen abzubauen (Bild 1).



Bild 1: a) Rohstoffgemenge im Platin-Gold-Tiegel, b) Ausgießen der Schmelze, c) Abschneiden der Glasschmelze.

Scaffoldherstellung

Die mechanischen und glastechnischen Eigenschaften der entwickelten Glaszusammensetzungen ermöglichen es, Spongiosa-ähnliche Glasstrukturen mit einzustellender Stegdicke, Porengröße und Raumfüllgrad herzustellen (Bild 3 a). Hierzu wird fraktioniertes Glaspulver mit Hilfe von Dispergatoren und Bindemittel in wässrigen oder organischen Lösungsmitteln dispergiert. Ein Schwamm auf Polyurethanbasis kann in der Lösung so mit Glaspulver beschichtet werden, dass eine gleichmäßige, partikuläre Schicht auf den Oberflächen entsteht. Durch eine geeignete Wärmebehandlung degradieren die Organikbestandteile. Das Glas sintert durch viskoses Fließen und bildet die Schwammstruktur kongruent verkleinert ab.

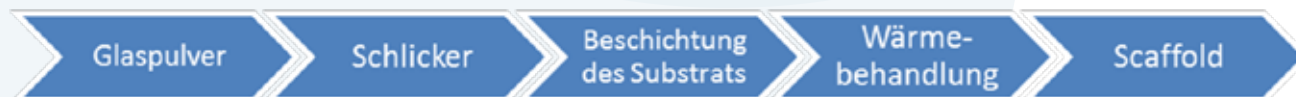


Bild 2: Verfahrensweg der Scaffoldherstellung

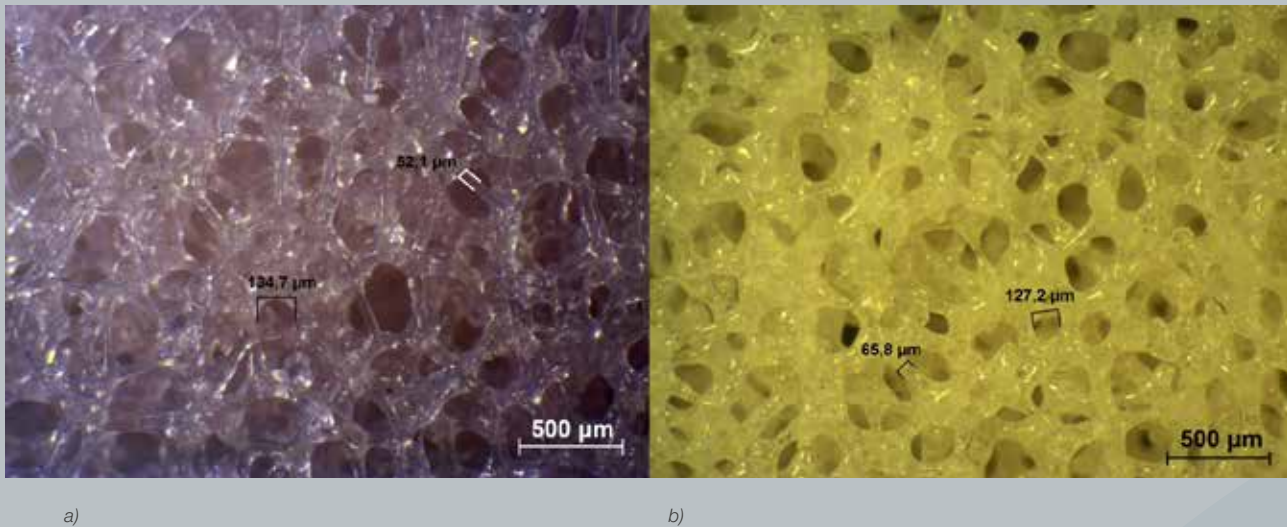


Bild 3: Scaffold der Zusammensetzung Bio6; a) ohne, b) mit Korrosionsschicht

Bestimmung der chemischen Stabilität – Bildung einer Korrosionsschicht

Entscheidend für die Bioaktivität der Glasscaffolds ist die Adhärenz der Zellen an der Glasoberfläche. Aufgrund der Kenntnis vielfältiger Untersuchungen verfolgt das Forschungsprojekt das Ziel, eine definierte Korrosionsschicht zu erzeugen.

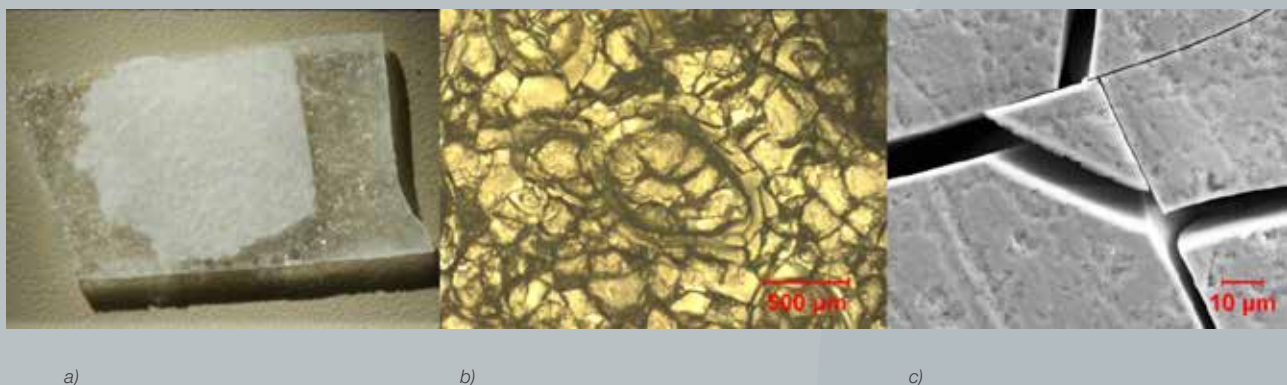


Bild 4: a) Korrosionsschicht auf Glasplättchen, b) im Interferenzkontrast Durchlicht, c) Rasterelektronenmikroskop (REM)

Diese Schicht ist im Bild 4 a) als helle Schicht auf einem Glasplättchen zu sehen. Die milchige Trübung resultiert aus der elastischen Streuung des Lichts an rauen Oberflächen (Mie-Streuung) und an Rissen in dieser getrockneten Schicht. Sowohl die Topologie als auch die chemische Zusammensetzung dieser Schicht erwiesen sich als hervorragend bioaktiv in Bezug auf die Adhärenz der Zellen. Die Rissbildung ist nicht erwünscht. Sie lässt sich prinzipiell vermeiden, ist aber noch Gegenstand der aktuellen Forschung. In den Bildern 4 b) und c) sind lichtmikroskopische und REM-Bilder der Schicht zu sehen. In den Bildern 5 a), b) und c) sind Querschnitte dieser Korrosionsschichten abgebildet. Durch die Elementanalyse mit Hilfe des EDX-Verfahrens werden die stattfindenden chemischen Prozesse erklärbar.

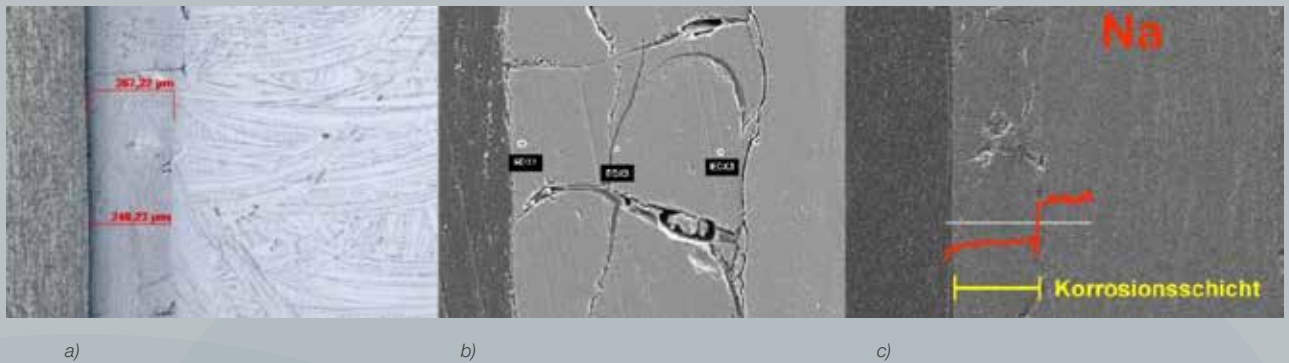


Bild 5: a) Querschnitt der Korrosionsschicht im Interferenzkontrast, b) REM-Abbildung, c) punktuelle EDX-Analyse und semiquantitativer Linescan

Bestimmung der chemischen Stabilität – Auflösegeschwindigkeit der Scaffolds

Gebrauchsgläser auf Silikatbasis zeichnen sich oft durch hervorragende chemische Stabilität gegen wässrige Lösungen aus. Eine reduzierte chemische Stabilität kann sehr einfach durch Hinzufügen von einwertigen Kationen und durch Verringerung der Konzentration höherwertiger Ionen erreicht werden. Diese einfache Maßnahme ist für den aktuellen Anwendungsfall allerdings nicht brauchbar, weil der pH-Wert der umgebenden wässrigen Lösung zu stark steigen würde und damit eine inakzeptable Toxizität erreicht würde. Durch die erzeugten Glasproben, bei denen das Glas innerhalb von sieben Tagen bei erhöhten Temperaturen ohne zu starkem pH-Wertanstieg aufgelöst wird, wird dieses Problem entschärft. Für die Optimierung sind allerdings noch mehrere Untersuchungen nötig.

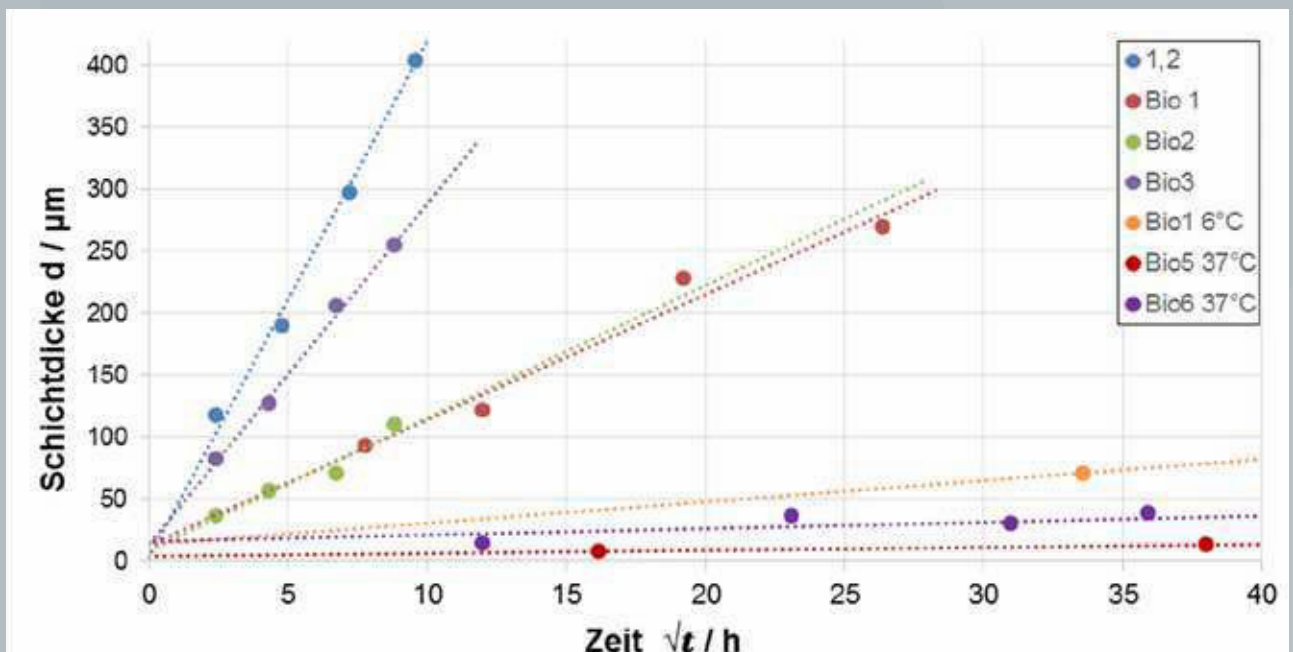


Bild 6: Korrosionsschichtdicken verschiedener Biogläser bei Raumtemperatur bzw. angegebener Temperatur

Der diffusive Korrosionsvorgang kann durch die Fick'schen Gesetze beschrieben werden. Anhand der Schichtdicke d kann für eine vorgegebene Temperatur der mittlere Diffusionskoeffizient D einfach ermittelt werden. Durch Exposition der Gläser bei unterschiedlichen Temperaturen erhält man auch die wichtigen Größen D_0 und Q (Aktivierungsenergie) für diesen Prozess.

$$D = D_0 \cdot e^{-\frac{Q}{RT}}$$

Die Ergebnisse sind in Bild 6 für verschiedene Gläser dargestellt. Bei gleichen Zeiten kann die Schichtwachstumsgeschwindigkeit um den Faktor 100 variiert werden. Nun ermöglicht die Auftragung einerseits, die Stabilität einer neuen Glaszusammensetzung abzuschätzen, und andererseits eine definierte Gelschicht auf den Stegen der Scaffolds einzustellen (Bild 3 b).

Evaluation der Glassubstrate mit in vitro kultivierten Zellen

Ein Knorpel in Gelenken ist dadurch charakterisiert, dass vergleichsweise wenige Knorpelzellen in einer sehr elastischen, von diesen Zellen gebildeten extrazellulären Matrix vorliegen. Typische Bestandteile dieser Matrix sind das Gerüstprotein Collagen II sowie das Glykoprotein Aggrecan, das durch die große Zahl seiner Sulfatgruppen Wasser fest bindet und bei mechanischer Belastung reversibel wieder abgibt. Ein Problem der Regeneration von funktionellen Knorpeln besteht darin, dass differenzierte Knorpelzellen, wie sie aus dem Gelenk gewonnen werden könnten, sich nicht mehr teilen und deswegen auch nicht mehr vermehren lassen. Stattdessen besteht bei der Kultur außerhalb des Organismus die Gefahr, dass Knorpelzellen transdifferenzieren, d. h. ihre Eigenschaften so verändern, dass sie ebenfalls nicht mehr funktionell sind. Eine Lösung besteht darin, nicht fertig differenzierte Zellen – sondern stattdessen Vorläuferzellen – zu verwenden, die noch nicht die typischen Produkte einer Knorpelzelle herstellen, sich aber noch mit ausreichender Geschwindigkeit vermehren lassen. Im Rahmen dieses Projekts wurden die artikulären Vorläuferzellen CP5, die aus den Gelenkköpfen von Rindern stammen, eingesetzt. Allerdings müssen diese Zellen zu einem späteren Zeitpunkt ebenfalls differenzieren. Um diesen Prozess gezielt einleiten und steuern zu können, werden Wachstumsfaktoren (Peptidhormone) zugesetzt. Dieser Teil des Projekts hat also mehrere Ziele:

- Evaluierung des Wachstums der Vorläuferzellen auf den verschiedenen Glassubstraten
- Etablierung eines Systems zur Beurteilung des Differenzierungsgrads
- Optimierung der Bedingungen für die Differenzierung

Zur Verwendung in der Zellkultur ist es erforderlich, die Glassubstrate (Plättchen oder Scaffolds) vorher zu sterilisieren. Die üblichen physikalischen Sterilisationsmethoden (feuchte Hitze 121 °C, 2 bar oder trocken 180 °C) schädigen die meisten Glasproben so stark, dass sie im Kulturmedium innerhalb von 48 h vollständig hydrolysieren. In einigen Fällen verfestigt sich das Medium durch das entstandene Silikat. Deshalb wurden im Projektverlauf mehrere chemische Sterilisationsmethoden miteinander verglichen. Die Desinfektion mit Ethanol erweist sich als sehr leicht handhabbar, allerdings kommt es in Einzelfällen wegen der ungenügenden sporoziden Wirkung zur Verkeimung. Die Sterilisation mit Aldehyden ist erheblich arbeitsintensiver, außerdem erweisen sich die Reste der Reagenzien als toxisch für die Zellen.

Die verwendeten bovinen Progenitorzellen wurden vor der Aussaat auf die Gläser (Plättchen oder Scaffolds) in üblichen Polystyrol-Kulturflaschen vermehrt. Nach einigen Tagen zeigten die Zellen die typische verzweigte fibroblastenähnliche Morphologie, was auf eine Anhaftung an der Oberfläche hindeutet (Bild 7 links).

Nach der Besiedelung erwiesen sich einige der Glassubstrate als inkompatibel mit lebenden Zellen. Bild 7 rechts zeigt tote, kugelförmige Zellen (Pfeile) ohne Anhaftung an die Oberfläche.

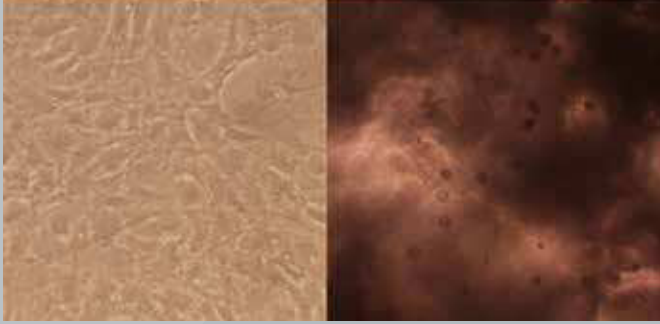


Bild 7: CP5-Zellen, links auf Polystyrol-Oberfläche, rechts auf Bioglas 1

Ergebnisse aus dem kooperierenden Institut für Anatomie der Paracelsus medizinischen Privatuniversität (Leitung Prof. Dr. Gundula Schulze-Tanzil) deuten jedoch darauf hin, dass die Kompatibilität von den eingesetzten Zellen abhängt. So zeigen dort menschliche Zellen ein anderes Verhalten als Zellen vom Schwein.

Es können auch lebende und tote Zellen gleichzeitig mit einer Doppelfärbung (Diacetylfluorescein als zellgängiger Farbstoff, der lebende Zellen grün färbt; Propidiumiodid als roter Farbstoff, der nur tote Zellen mit defekter Membran färbt) an demselben Präparat dargestellt werden (Bild 8). Wie zu erkennen ist, sind auf den späteren Bioglasvarianten nur vereinzelt tote Zellen (rot) zu erkennen, der größte Teil ist vital (grün).

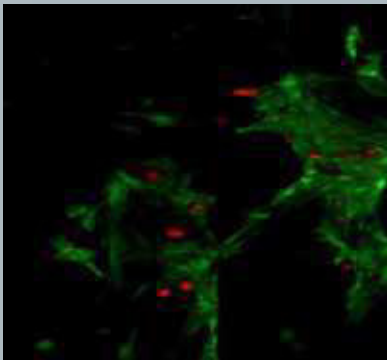


Bild 8: Lebend/tot Färbung von primären Knorpelzellen. Aufnahme von Clemens Gögele B. Sc. und Prof. Dr. Gundula Schulze-Tanzil, PMU Nürnberg

Differenzierung der Zellen in vitro

Zur Beurteilung des Differenzierungsgrads mussten geeignete Verfahren etabliert werden. Das stark sulfatierte Aggrecan lässt sich vergleichsweise einfach durch kationische Farbstoffe wie Alcianblau oder Safranin anfärben (Bild 9). Andere Verfahren nutzen den immunhistologischen Nachweis von Collagen II (das typisch für Knorpel ist) oder des Aggrecan-Proteingerüsts. Eine derart vollständige Differenzierung wie im lebenden Organismus ist in der Zellkultur jedoch nach derzeitigem Stand der Forschung nicht zu erreichen.

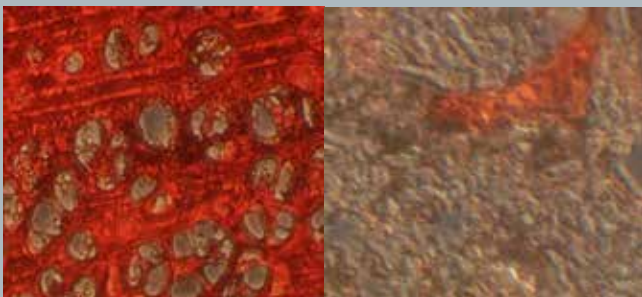


Bild 9: Schnittpräparate von Gelenkknorpeln vom Schwein, gefärbt mit Safranin. Links Knorpelzone, rechts Übergang zum Knochen, nur einzelne Inseln von Knorpelzellen sind sichtbar

Um in der Kultur Differenzierung gezielt zu induzieren, werden Wachstumsfaktoren als eine Art Katalysator benötigt. Diese liefern das Signal für die Zelle, ihren Phänotyp zu ändern. Für die Differenzierung zu Knorpelzellen wurden in der Literatur häufig das synthetische Glucocorticoid Dexamethason sowie die Peptidhormone IGF-1 und TGF- β 3 eingesetzt, oft zusammen mit der Aminosäure Prolin (die einen großen Anteil des Collagens ausmacht) sowie Ascorbinsäure (Vitamin C), das für das Crosslinking der Collagen-Peptidketten benötigt wird.

Da die Differenzierung ein langsamer, viele Wochen dauernder Prozess ist und die Färbungen zur Beurteilung nicht zerstörungsfrei sind, werden entsprechend viele Ansätze unter identischen Bedingungen angelegt, die dann zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen, fixiert, gefärbt und beurteilt werden. Im Rahmen dieses Vorlaufprojekts wurde aufgrund des begrenzten Materials und der knappen Zeit nur eine Phase von drei Wochen untersucht.

Die Kombination aller drei Wachstumsfaktoren erweist sich als die effektivste Variante. Bild 10 zeigt die mit Safranin gefärbten Zellen nach Exposition gegen alle drei Substanzen nach drei Wochen. Deutlich erkennbar sind Zonen von Zellaggregaten, die offensichtlich von extrazellulärer Matrix zusammengehalten werden und mit Safranin färbbar sind. Die Zusätze Prolin und Ascorbinsäure zeigen jedoch keinen nachweisbaren Effekt. Im Rahmen dieser Versuchsreihe kann jedoch keine Dosis-Wirkungsabhängigkeit der Wachstumsfaktoren bestimmt werden, da dies die Anzahl der nötigen Ansätze vervielfacht hätte. Es ist daher anzunehmen, dass die hier verwendeten Bedingungen zwar wirksam, aber nicht optimal sind.

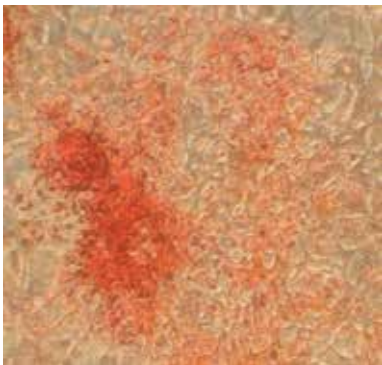


Bild 10: Teildifferenzierte CP5 Zellen nach drei Wochen, gefärbt mit Safranin

Dreidimensionale Kultur in Alginate

In der Literatur wird die dreidimensionale Kultur in einer Matrix als Verfahren beschrieben, die Entdifferenzierung von reifen Knorpelzellen zu verhindern und in anderen Fällen die Differenzierung zu unterstützen. In Alginate-Beads eingeschlossene CP5 Zellen (hergestellt durch Eintropfen in Calciumchloridlösung) wurden ebenfalls denselben Differenzierungsbedingungen ausgesetzt. Bei der Beurteilung war eine leichte Steigerung der Differenzierung erkennbar, die aber aufgrund des qualitativen Ansatzes nicht quantifiziert werden konnte. Da die Zellen in den relativ großen Poren der Scaffolds jedoch auch in einer quasi dreidimensionalen Kultur vorliegen, ist zu vermuten, dass von den Scaffolds auch eine, die Differenzierung unterstützende, Wirkung ausgeht. Deren Ausmaß kann jedoch gegenwärtig noch nicht abgeschätzt werden.

Durchfluss-System für die Zellkultur

Ausgehend von der Überlegung, dass beim Auflösen der Gläser erhebliche Mengen Alkaliionen frei werden und die Zellschicht schädigen könnten, wird ein sehr einfaches Durchflusssystem entwickelt, um den Alkalianteil möglichst schnell zu entfernen.

Dieses System kam jedoch nicht zum Einsatz, aufgrund der sehr einfachen Handhabung ist es aber ein brauchbares Nebenprodukt des Projekts, dargestellt in Bild 11. Die Kulturkammer besteht aus Silikon (Sylgard184) und kann in jeder beliebigen Form im Labor hergestellt werden. Alle Teile mit Kontakt zu den Zellen oder dem Medium bestehen aus Silikon oder Polyethylen und sind getrennt von den Pumpen autoklavierbar. Das System kann sehr einfach unter Thermostatbedingungen betrieben werden, die Kosten liegen (ohne Pumpen) bei etwa 20 Euro. Dieses low-cost System hat verschiedene Einsatzmöglichkeiten in Zellkultur-Laboratorien.

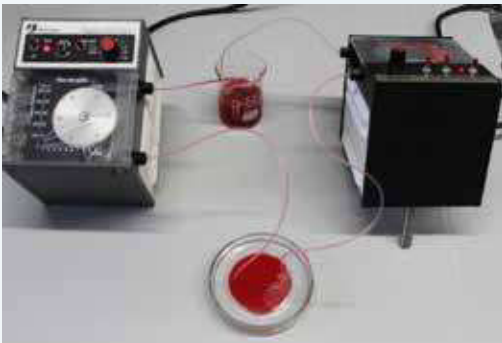


Bild 11: Durchfluss-Zellkultursystem mit zwei Peristaltik-Pumpen

5. Nachhaltigkeit / Verwertung / wissenschaftliche Arbeiten

In den beschriebenen Versuchen wurden Glaszusammensetzungen entwickelt, die unter Zellkulturbedingungen hinreichend lange beständig sind. Die Zusammensetzung unterstützt das Wachstum von Zellen in einer definierten geometrischen Form und löst sich danach auf. Es wurde gezeigt, dass Zellen für mehrere Wochen auf diesen Substraten überleben können, sich teilen und differenzieren. Außerdem wurden Verfahren entwickelt, mit denen aus den genannten Glasmaterialien poröse, dreidimensionale Formkörper (Scaffolds) in nahezu beliebiger Geometrie hergestellt werden können.

Die Versuche zur Besiedlung der Gläser mit Zellen zeigen, dass Zellen adhärieren und sich teilen.

Durch die Kombination verschiedener Wachstumsfaktoren konnte eine Differenzierung der vermehrten Zellen in Richtung Knorpelzellen gezeigt werden.

Aufgrund der begrenzten Zahl der Versuche konnte bisher kein quantitativer Zusammenhang zwischen der Wachstums-/ Teilungsrate der Zellen auf den verschiedenen Gläsern ermittelt werden, ebenso konnte bisher keine Dosis / Wirkungsbeziehung für die Differenzierung erstellt werden. Die nächsten Schritte erfordern daher den Übergang zu quantitativen Messungen, was einen größeren Projektrahmen erfordert.