

Beurteilung des osteogenen Potentials humanen autologen Knochenmehls – eine zell- und molekularbiologische Pilotstudie

C. Kunert-Keil¹, A. Kluge², M. Kemper², M. Neudert², T. Zahnert²

¹Poliklinik für Kieferorthopädie, ²Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde Uniklinikum der Technischen Universität Dresden

Universitätsklinikum Carl Gustav Carus
DIE DRESDNER.



Einleitung

Regenerative Therapieverfahren haben in der Kopf-Hals-Chirurgie eine herausragende Bedeutung. Dabei wird durch unterschiedliche Verfahren gewonnenes autologes Knochenmaterial für Rekonstruktionen eingesetzt. Über die regenerative Potenz sowie die Entnahme-bedingungen existieren bisher nur wenige Daten.

Ziel der Studie

Ziel der vorliegenden Studie war die Beurteilung der osteogenen Potenz von humanem Knochenmehl, welches unter verschiedenen Bedingungen entnommen wurde.

Material und Methoden

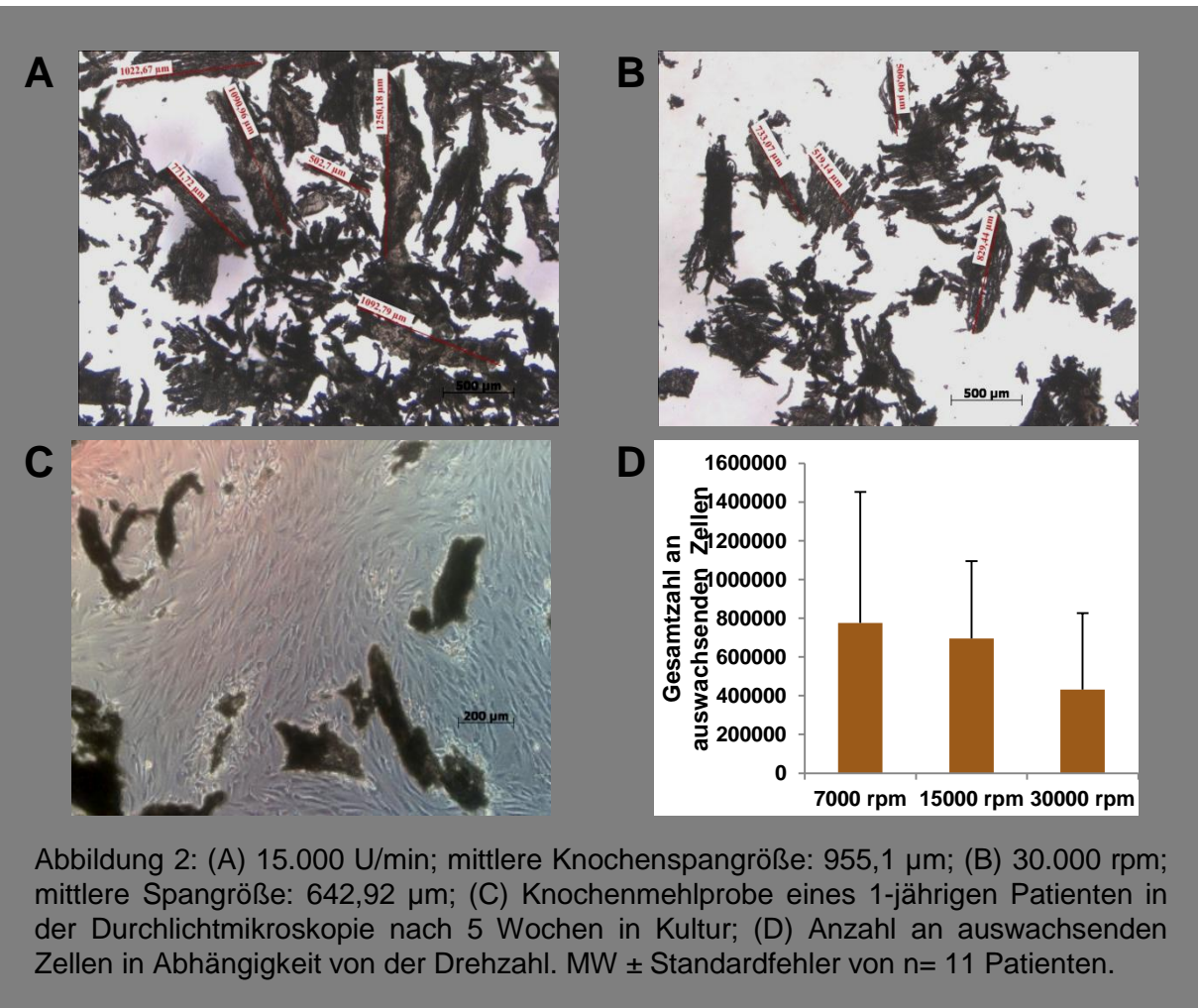
Dazu wurde durch Anwendung einer 7 mm Hartmetallfräse (Abb. 1) Knochenmehl von 11 Patienten gewonnen, in Zellkulturmedien überführt und über einen Zeitraum von 6 Wochen kultiviert. Jedem Patienten wurden jeweils 3 verschiedene Proben mit unterschiedlichen Bohrerndrehzahlen (7.000, 15.000 und 30.000 rpm) entnommen. Im Anschluss wurden sowohl die Anzahl an ausgewachsenen Zellen, als auch die Expression von Stammzellmarkern (Sox2, Kitlg), Wachstumsfaktoren (Bmp4) und knochenspezifischen Genen (Runx2, Bglap, Alpl, Col1a1) mittels qRT-PCR bestimmt.



Abbildung 1: Stahlfräse (7mm; „Allport“) zur Gewinnung der Knochenmehlproben

Ergebnisse

- Bei der flächigen Knochenabtragung mit Hartmetallfräsen am Schädel entstehen Knochenpartikel, die nur maximal 1-2 mm groß sind (Abb. 2A-B).
- Innerhalb des Beobachtungszeitraums von 6 Wochen gelang die Kultivierung von Zellen aus allen Knochenmehlproben, wobei die Anzahl an auswachsenden Zellen umgekehrt proportional zur Drehzahl war (Abb. 2C-D).
- In Abhängigkeit von der Drehzahl sank die mRNA-Expression aller getesteten Gene in den untersuchten nativen Knochenmehlproben, mit Ausnahme von Sox2 und Col1a1, ab. Bei 7000 U/min wurden die höchsten mRNA-Mengen detektiert (Abb. 3).
- Im Gegensatz dazu unterschieden sich die Genexpressionslevel bei den kultivierten Zellen nicht voneinander. Eine Abhängigkeit von der Drehzahl ist bei diesen Zellen nicht mehr nachweisbar (Abb. 4).



A	Gen	7000 rpm	15000 rpm	30000 rpm
	Alpl	0.116 ± 0.13	0.05 ± 0.052	0.027 ± 0.021
	Bglap	2.64 ± 2.71	0.95 ± 1.04	0.44 ± 0.38
	Col1a1	2.63 ± 1.71	3.73 ± 4.37	2.74 ± 3.63
	Runx2	0.022 ± 0.024	0.007 ± 0.008	0.003 ± 0.001
	Bmp4	0.0032 ± 0.0033	0.00098 ± 0.0011	0.0022 ± 0.0039
	Kitlg	0.0102 ± 0.011	0.0026 ± 0.0037	0.0011 ± 0.00093
	Sox2	0.0096 ± 0.015	0.0015 ± 0.0014	0.0025 ± 0.0047
B	Gen	7000 rpm	15000 rpm	30000 rpm
	Alpl	0.00017 ± 0.00021	0.00080 ± 0.00072	0.00018 ± 0.00029
	Bglap	0.00082 ± 0.0012	0.0024 ± 0.0029	0.011 ± 0.0033
	Col1a1	0.12 ± 0.06	0.18 ± 0.089	0.092 ± 0.081
	Runx2	0.00028 ± 0.00019	0.00026 ± 0.00017	0.00023 ± 0.00022
	Bmp4	6.36E-06 ± 3.55E-06	2.09E-05 ± 2.22E-05	8.97E-05 ± 0.00013
	Kitlg	4.64E-05 ± 4.31E-05	2.73E-05 ± 2.61E-05	3.73E-05 ± 4.9E-05
	Sox2	3.61E-06 ± 5.05E-06	4.47E-05 ± 8.7E-05	4.61E-05 ± 5.9E-05

Abb. 3: TaqMan-RT-PCR (A) humane Knochenmehlproben; Abhängigkeit von der Drehzahl eindeutig nachweisbar. (B) humane Explantatkulturen nach 6 Wochen Kultivierung; Genexpression der Zellen unabhängig von der Drehzahl. MW±SD von n=3-6 Patienten pro Drehzahl.

Zusammenfassung

Die Bohrerndrehzahl als Entnahmeparameter hat einen nachweisbaren Einfluss auf die Qualität des Knochenmehls. Sowohl die molekularbiologischen Untersuchungen wie auch die Zellzahl sprechen für eine niedrigere Drehzahl.