

Verhalten von humanen Tendinozyten auf Nylon (LARS)

Zielsetzung

Das Ziel dieses Versuches ist das Wachstumsverhalten von Tendinozyten auf dem Trägermaterial Nylon (LARS), das als Bandersatz verwendet wird, zu untersuchen.

Tendinozyten sind die Zellen der Sehnen und bilden parallelfasriges, kollagenes Bindegewebe. Humane Tendinozyten wurden kultiviert und auf Nylon-Kordeln aufgebracht. Die Hälfte der Kordeln wurde mit Fibronectin, einem potenten Adhäsionsfaktor, vorbeschichtet. Nach 18h, 37h, 5 Tagen, 13 Tagen und 54 Tagen wurden Proben entnommen und elektronenmikroskopisch untersucht.

Material und Methoden

Die verwendete Primärkultur für diesen Versuch wurde aus einem Kreuzband isoliert. Die Zellen wurden kultiviert und bei einer Dichte von $9,4 \times 10^6$ Zellen auf das Trägermaterial aufgebracht. Als Trägermaterial wurden je 10 cm der Nylon-Kordel (LARS, P.C.100, CODE L011005) verwendet. Die Hälfte der Kordelsegmente wurde 24 h mit $30 \mu\text{g}$ Fibronectin (+FN) beschichtet. Nach 18h, 37h, 5 Tagen, 13 Tagen, und 54 Tagen wurden Proben entnommen und rasterelektronenmikroskopisch untersucht.

Resultate

Die elektronenmikroskopische Untersuchung der Nylon-Kordeln ergab folgendes Ergebnis: Nach 18h haben sich sowohl bei der beschichteten als auch bei der unbeschichteten Kordel wenige Zellen abgesetzt. Auf der aus etwa $30 \mu\text{m}$ Fibrillen geflochtenen Oberfläche konnten einige runde, zellähnliche Strukturen, teilweise mit filamentartigen Pseudopodien, nachgewiesen werden (Abb.1.).

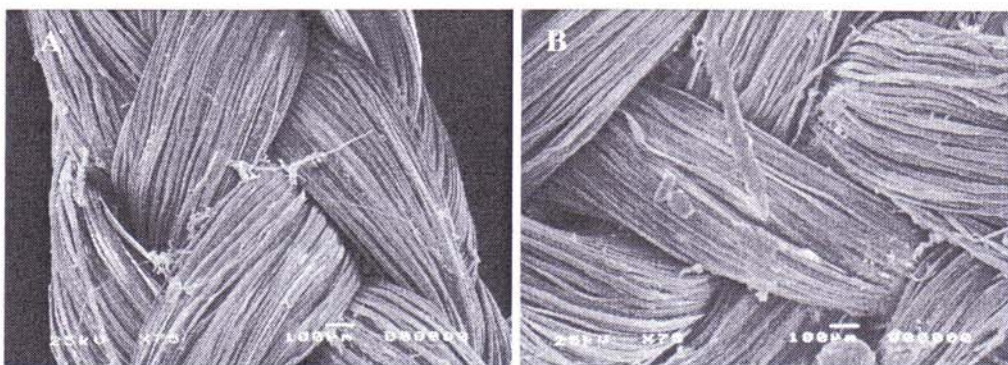


Abb.1. Nylon Kordel 18 h
A) zeigt ein fibronectinbeschichtetes Kordel (+FN); B) zeigt eine unbeschichtete (w/o Fibronectin) Probe. An beiden Proben haben sich keine Zellen abgesetzt. Beide Aufnahmen zeigen die 75-fache Vergrößerung.

Nach 37h Inkubation haben sich auf der unbeschichteten Kordel vereinzelt Zellen abgesiedelt. Diese Zellen waren auf der beschichteten Probe kaum gespreidet, während auf der unbeschichteten Probe Inseln von gespreiteten Zellen vorhanden waren (Abb.2.). Sowohl bei der +FN als auch bei der w/o FN Nylon-Probe konnte man nach 5 Tagen teilweise Zellinseln erkennen, wobei aber keine Konfluenz der Zellen zu beobachten war (Abb.3.).

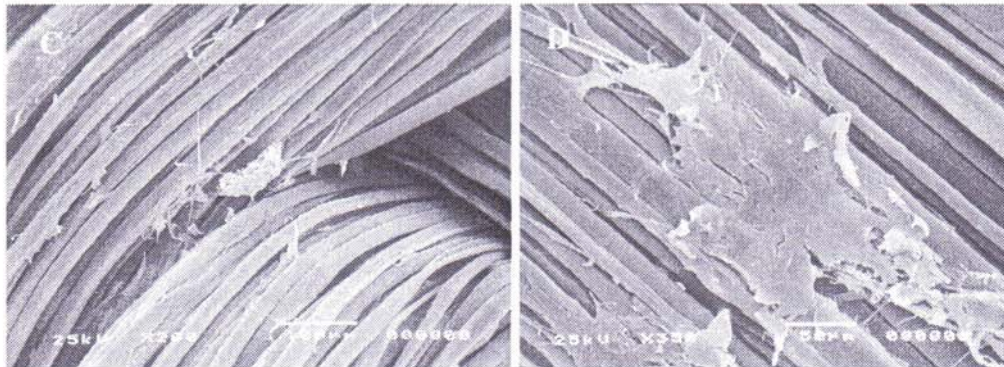


Abb.2. Nylon Kordel 37 h - 200-fache Vergrößerung

C) An der +FN Kordel kann man kaum Zellen erkennen; D) Bei der Nylonprobe w/o FN konnte man einige Zellen erkennen.

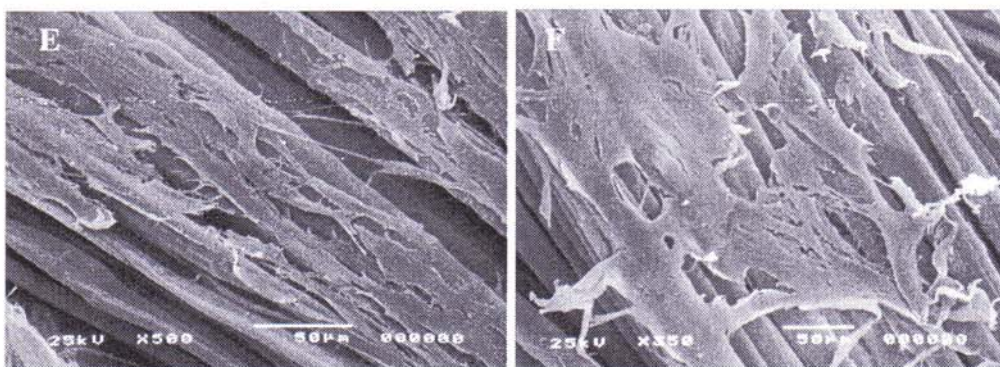


Abb.3. Nylon Kordel 5Tage

E) (+FN) - 500-fache Vergrößerung, sowie in F) (w/o FN) - 350-fache Vergrößerung sind Zellen zu erkennen.

Nach 2 Wochen sind in der +FN-Probe und in der w/o FN Nylon-Probe Zellen angewachsen. Bei der w/o FN Kordel sind die Zellen etwas dichter (Abb.4.). Nach 54 Tagen sind sowohl die Zellen an der FN-Kordel als auch an der w/o FN Probe weiter angewachsen. Jedoch weisen die Zellen an beiden Proben starke Brüche an den Überlappungen auf (Abb.5.). Als Kontrolle wurden unbeschichtete Nylon-Kordel verwendet (Abb.6.).

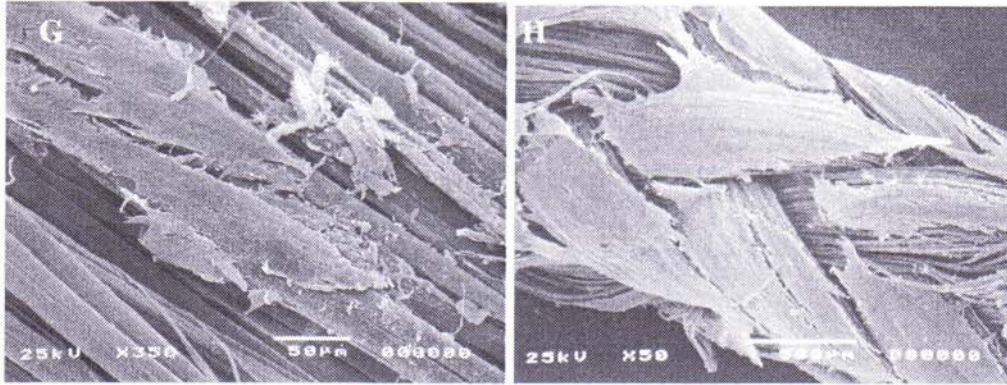


Abb.4. Nylon Kordel 13 Tage G) zeigt eine 350-fache Vergrößerung der +FN Kordel . Hier sind die Zellen nicht so konfluent wie in der w/o Kordel (H) – 50-fache Vergrößerung.

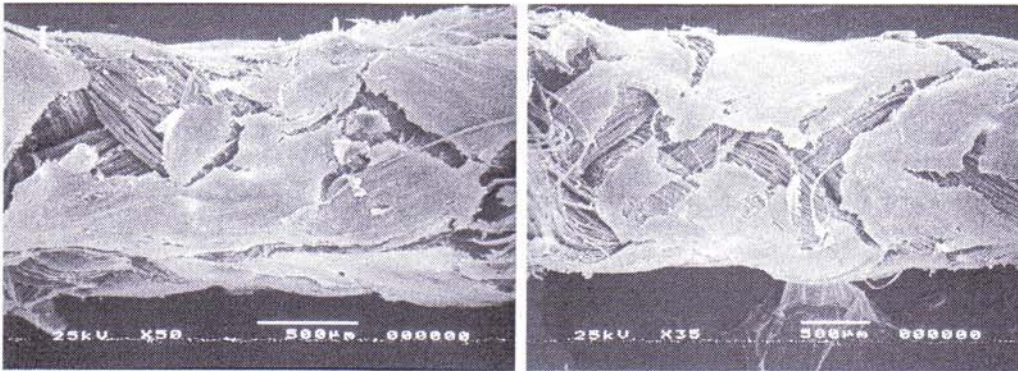


Abb.5. Nylon Kordel 54 Tage
I) Nylon +FN Kordel bei einer 50-fachen Vergrößerung; J) w/o FN Probe bei einer 35-fachen Vergrößerung

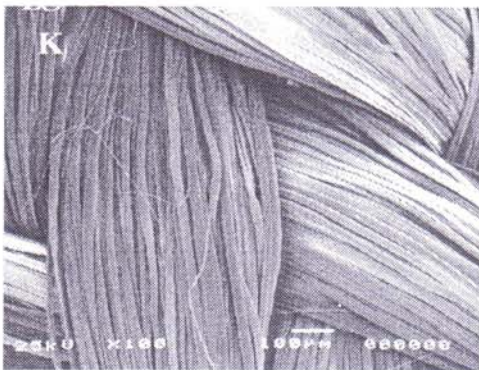


Abb.6. Unbehandelte Nylon- (K) bei einer 100-fachen Vergrößerung

Diskussion

Das Ziel dieses Versuches war das Verhalten der Zellen auf dem LARS-Band zu untersuchen. Humane kultivierte Tendinozyten wurden auf Segmente von Nylon Kordeln aufgebracht. Die Hälfte der Segmente wurde mit Fibronectin einem, potenten Adhäsionsmolekül vorbeschichtet, um die Möglichkeit der Oberflächenveränderung für potentielle Zellbeschichtungsverfahren darzustellen.

Nach 18h, 37h, 5 Tagen, 13 Tagen, und 54 Tagen wurden Proben entnommen und rasterelektronenmikroskopisch untersucht.

Auf dem Nylon Band konnte, mit oder ohne Fibronectinbeschichtung, ein Anheften und Wachstum der Zellen beobachtet werden. Anfänglich erschien die Anheftung der Zellen verzögert. Nach 18h konnte sowohl an der beschichteten (+FN) als auch an der unbeschichteten (w/o FN) Kordel lediglich einige zellähnliche Strukturen beobachtet werden. Einige angewachsene Zellen konnten nach 37h an der unbeschichteten Nylon-Kordel festgestellt werden. Im Vergleich zeigte die Fibronectin-beschichtete Probe nach der gleichen Zeit kein Zellwachstum an der Kordel. Nach 5 Tagen sind dann doch einige Zellinseln, an der be- und an der unbeschichteten Kordel angewachsen. Es lässt sich aber kein Unterschied zur Fibronectinbeschichtung (+FN oder w/o FN) erkennen.

Erst nach 13 Tagen ließ sich ein Unterschied zwischen den beiden Nylon-Proben feststellen. In der w/o FN Probe konnte ein stärkeres Wachstum an der Kordel gezeigt werden, welches aber keine Konfluenz aufwies. An den Überlappungen der Kordel sind sehr starke Brüche zu erkennen, welche an den Zellschichtgrenzen „Fransen“ haben. Nach 54 Tagen wird die Zellschicht zwar kompakter, auch kann man extrazelluläre Matrix an beiden Proben (+FN und w/o FN) erkennen, jedoch ändert sich nichts an den großen Brüchen an den Flechtgrenzen der Kordeln. Das Geflecht der Kordeln erscheint teilweise gelockert.

Zusammenfassung

Am untersuchten Material Nylon (LARS) ist eine Anheftung und Proliferation von Tendinozyten möglich. Insbesondere konnte keine Zeichen von Zytotoxizität festgestellt werden. Dies ist für potentielle Anwendungen des Tissue Engineerings ein wichtiger Umstand.