

Aus dem
Universitätsklinikum Hamburg - Eppendorf
Klinik und Poliklinik für
Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie
Direktor: Professor Dr. med. J. M. Rueger

**Knochenersatzmaterialien:
Etablierung eines osteoblastenspezifischen
Biokompatibilitätstests in vitro**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg
vorgelegt von

Anja Peters
aus Hamburg

Hamburg, 2005

Angenommen vom Fachbereich Medizin

der Universität Hamburg am: 23.02.2006

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs

Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: PD Dr. Wolfgang Linhart

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter: PD Dr. Dr. Max Heiland

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter: Prof. Dr. Michael Amling

Meinen Eltern gewidmet

1. Arbeitshypothese und Fragestellung	1
2. Einleitung	2
2.1 Bedeutung von Knochenersatzmaterialien	2
2.2 Definition	3
2.3 Anforderungen	4
2.4 Klassifikation	7
2.5 Knochenzellbiologie	9
– Osteoblast: Herkunft, Morphologie, Regulation und Kontrolle	9
– Osteoklast: Herkunft, Morphologie, Regulation und Kontrolle	15
– Beziehung zwischen Osteoblasten und Osteoklasten	17
2.6 Biokompatibilitätsprüfung von Knochenersatzmaterialien	17
3. Material und Methoden	20
3.1 Materialien	20
– Endobon [®]	20
– Biobon [®]	21
– Calcibon [®]	21
– Dentin	22
3.2 Vorbereitung der Materialien für die Zellkultur	22
3.3 Osteoblastengewinnung	26
3.4 Aufrechterhaltung der Zellkultur: Zellkulturmedium, Kulturbedingungen, Mediumwechsel	29
3.5 Dokumentation der Osteoblastenproliferation im Auflichtmikroskop	30
3.6 pH – Metrie	31
3.7 Färbungen der Osteoblasten in der Zellkultur	31
– Nachweis von alkalischer Phosphatase mittels Enzymfärbung	31
– Kollagennachweis mittels van Gieson - Färbung	32
– Nachweis mineralisierter extrazellulärer Matrix nach von Kossa	33
3.8 Anfertigung von Schliffpräparaten der Biomaterialien	33

3.9	Quantitativer Nachweis exprimierter alkalischer Phosphatase:	
	Messung der Absorption von p-Nitrophenylphosphat im Photometer	36
3.10	Semiquantitativer Nachweis der Gen – Expression mittels RT –PCR	38
	– RNA – Isolierung	38
	– cDNA – Synthese mit einer Reversen Transkriptase	39
	– Polymerase - Kettenreaktion	40
	– Gelelektrophorese	41
4.	Ergebnisse	43
4.1	Dokumentation der Osteoblastenproliferation im Auflichtmikroskop	43
	– Osteoblastenkulturen in Anwesenheit von Endobon [®]	43
	– Osteoblastenkulturen in Anwesenheit von Biobon [®]	44
	– Osteoblastenkulturen in Anwesenheit von Calcibon [®]	45
	– Osteoblastenkulturen in Anwesenheit von Dentin	46
	– Leerkontrolle der Osteoblastenkultur ohne Anwesenheit eines Biomaterials	47
4.2	pH – Metrie	49
4.3	Färbungen der Zellkultur	50
	– Nachweis exprimierter alkalischer Phosphatase nach 7 Tagen	50
	– Kollagennachweis nach van Gieson nach 14 Tagen	51
	– Darstellung mineralisierter extrazellulärer Matrix mit der Versilberung nach von Kossa nach 28 Tagen	52
4.4	Schliffpräparate der Prüfkörper	53
	– Vergleich der getesteten Biomaterialien nach 7 Tagen Kultivierung: Kollagenbildung der Osteoblasten, Darstellung des Zell – Materialoberfläche – Interface	53
	– Vergleich der getesteten Biomaterialien nach 14 Tagen Kultivierung: Kollagenbildung der Osteoblasten, Darstellung des Zell – Materialoberfläche – Interface	54
	– Vergleich der getesteten Biomaterialien nach 28 Tagen Kultivierung: Kollagenbildung der Osteoblasten, Darstellung des Zell – Materialoberfläche – Interface	55

4.5	Quantitativer Nachweis der AP – Expression durch Messung der Substratumsetzung von p-NPP im Photometer	57
4.6	Ergebnisse der RT-PCR für GAPDH, Tissue nonspecific alkaline Phosphatase (TNSALP), Bone Sialo Protein, Osteocalcin (BGP)	59
	– Quantifizierung der extrahierten RNA der kultivierten Osteoblasten	59
	– Darstellung der RT-PCR für den Zeitpunkt Tag 7	61
	– Darstellung der RT-PCR für den Zeitpunkt Tag 14	62
	– Darstellung der RT-PCR für den Zeitpunkt Tag 28	63
5.	Diskussion	65
5.1	Beurteilung der durchgeführten Versuche	65
5.2	Biokompatibilität der getesteten Knochenersatzmaterialien	70
	– Endobon [®]	70
	– Biobon [®] , Calcibon [®]	72
	– Dentin	73
5.3	Bedeutung von reproduzierbaren Osteoblasten - spezifischen Biokompatibilitätsprüfungen	75
	– Auswahl geeigneter Zellen für die <i>in vitro</i> Biokompatibilitätsprüfung	75
	– Bedeutung der Langzeitzellkultur und der Auswahl der Osteoblasten – spezifischen <i>in vitro</i> Versuche	77
6.	Zusammenfassung	84
7.	Literaturverzeichnis	85
8.	Danksagung	96
9.	Lebenslauf	98
10.	Erklärung	99

A	Adenin
AgNO ₃	Silbernitrat
AP	Alkalische Phosphatase
α-MEM	Minimal essentielles Medium, alpha Modifikation
AMV	Avian Myeloblastosis Virus (Klonierte Reverse Transkriptase)
ASMX	Phosphatsalz von Naphtol
Aqua dest	Destilliertes Wasser
BGP	Bone γ -carboxyglutamic acid containing gla protein (Osteocalcin)
BMPs	Bone morphogenetic proteins
bp	Basenpaare
BSP	Bone Sialo Protein
C	Cytosin
Cbfa1	Core - binding factor α 1 (Transkriptionsfaktor der Osteoblasten- differenzierung) (= Runx2)
CD1	Wildtyp – Mauslinie (Nomenklatur der Fa. Charles River Lab.)
cDNA	Deoxy – Ribonuklein – Säure (c = copy)
c-fos	Transkriptionsfaktor der Osteoklastendifferenzierung
CO ₂	Kohlendioxid
DEPC	Diethyl Cyanophosphonat
dNTP	Mix aus den Nukleotiden dATP, dCTP, dGTP und dTTP (TP = Triphosphat)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FBS	Fötale Rinderserum
G	Guanin
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
Gew.%	Gewicht – Prozent
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
kb	Kilobasen
M	Molar
m	milli (10 ⁻³)
μ	mikro (10 ⁻⁶)

M-CSF	Macrophage-colony stimulating factor (Wachstumsfaktor)
MgCl ₂	Magnesium-Chlorid
MPa	Mega – Pascal
mRNA	Ribonuklein – Säure (m = messenger)
mU	milli – Units
N	normal
n	nano (10 ⁻⁹)
NaOH	Natriumhydroxid
NF-κB	Transkriptionsfaktor der Osteoklastendifferenzierung
OC	Osteocalcin
OPG	Osteoprotegerin
PBS	Phosphat – gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase - Kettenreaktion
P/S	Penicillin / Streptomycin
RANKL	Ligand von RANK (Receptor activator for NF-κB ligand)
rH	relative Luftfeuchtigkeit
RNase OUT	Inhibitor des Enzyms RNase
rpm	Umdrehungen pro Minute (Rounds per minute)
RT	Reverse Transkriptase
Runx2	Runt-related transcription factor 2 (= Cbfa1)
T	Thymin
TAE	Tris Acetat EDTA
Taq	Thermophilus aquarius (DNA Polymerase)
TNSALP	Tissue non-specific alkaline phosphatase
V	Volt

1 Arbeitshypothese und Fragestellung

Die Bedeutung von Knochenersatzmaterialien hat im klinischen Alltag in den letzten 30 Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Im Rahmen der Entwicklung neuer Biomaterialien spielt die präklinische Biokompatibilitätsprüfung *in vitro* eine wichtige Rolle. Es gibt zahlreiche Vorschläge, die genannten Untersuchungen durchzuführen. Bisher ist es nicht gelungen, ein standardisiertes Prüfmodell zu etablieren, das international anerkannt und ausgeführt wird, um die Knochen - spezifischen Eigenschaften von Knochenersatzstoffen hinreichend zu charakterisieren.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird ein *in vitro* Modell vorgestellt, das alle wichtigen Anforderungen an ein geeignetes Testsystem erfüllt.

Dabei sollte die Frage beantwortet werden, in wie weit es möglich ist, *in vitro* das Proliferations- und Differenzierungsverhalten von Osteoblasten in Anwesenheit von Knochenersatzmaterialien zu charakterisieren, um daraus Rückschlüsse auf die Organ – spezifische Verträglichkeit dieser Biomaterialien zu ziehen.

2 Einleitung

2.1 Bedeutung von Knochenersatzmaterialien

Das knöchernen Skelett hat eine mechanische Stütz- und Schutzfunktion und spielt außerdem eine wichtige Rolle für den Mineralstoffwechsel. Seine uneingeschränkte Funktionalität ist von entscheidender Bedeutung für den alltäglichen Bewegungsablauf des Menschen. Kommt es zu einem knöchernen Defekt, z.B. in Form einer Fraktur, so hat das Skelettsystem bis zu einem gewissen Grad die Fähigkeit, sich selbst zu regenerieren. Liegt aber ein Schaden vor, der in bezug auf Größe, Lokalisation und Durchblutungsverhältnisse das Heilungspotential des Knochens übersteigt, ein sogenannter "critical size" - Defekt, droht dem Patienten ohne ein geeignetes Therapieverfahren eine dauerhafte Einschränkung der Mobilität und damit eine Minderung seiner Lebensqualität.

Komplizierte Frakturen, Knochentumoren und -entzündungen sowie periprothetisch entstandene knöchernen Substanzverluste stellen in der Unfall- und Wiederherstellungschirurgie, der Orthopädie sowie der Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie häufig problematische Defekte des Skelettsystems dar, deren Behandlung nur mittels Osteosynthese und Knochentransplantation bzw. durch den Einsatz eines Knochenersatzstoffes zum Erfolg führt.

Bisher gilt nach wie vor als "Goldener Standard" [90;117;138] für die Behandlung knöcherner Defekte die Transplantation von autogenem Knochen. Bei diesem Verfahren wird dem Patienten, meist aus dem Beckenkamm, Knochen entnommen und in den bestehenden Knochendefekt transplantiert. Diese Therapieform birgt den Vorteil, dass es sich um körpereigenes Material handelt und somit keine immunologischen Reaktionen auslöst. Außerdem wird in diesem Fall der bestehende Defekt, neben dem Knochen selbst, mit den für die Knochenneubildung nötigen Matrixproteinen und Zellen aufgefüllt. Allerdings reicht die verfügbare Transplantatmenge vor allem bei ausgedehnten Schäden oder Mehrfacheingriffen häufig nicht aus. Bei osteoporotischen Patienten ist ein autogener Knochenersatz oft nicht sinnvoll. Die Entnahme der Spongiosa ist mit

einer sehr hohen Komplikationsrate wie Nachblutungen, Infektionen, Nervenverletzungen sowie anhaltenden Schmerzen behaftet [79;92;130]. Einen weiteren problematischen Aspekt dieses Verfahrens stellt die damit verbundene Ausdehnung der Operationszeit dar, die für den Patienten eine längere Narkosedauer und damit verbundene Risiken bedeutet und für die Klinik zu einer höheren Kostenbelastung führt [89;91].

Der außerdem in Frage kommenden Behandlungsmöglichkeit mit allogenen Transplantaten, zum Beispiel aus Leichenpräparaten oder den im Rahmen der Endoprothesenimplantation anfallenden Knochenresten, stehen ebenfalls limitierende Faktoren gegenüber. Dazu gehören vor allem Probleme bei der Konservierung bzw. der Sterilität, der AB0-Kompatibilität sowie die Transfektionsgefahr in bezug auf HIV und Hepatitisviren [127].

Aus dem bisher Gesagten wird verständlich, dass Knochenersatzmaterialien heute eine Alternative zur traditionsreichen autogenen und allogenen Knochen transplantation darstellen.

Seit einigen Jahren wird sehr viel Geld in die Entwicklung und Vermarktung neuer Knochenersatzmaterialien investiert. Auf dem internationalen Markt sind weit mehr als 100 verschiedene Ersatzstoffe erhältlich [89]. Problematischerweise bestehen weder in der präklinischen Testung noch in der klinischen Untersuchung Standards, die für oder gegen ein Biomaterial heran gezogen werden können.

Zunächst soll auf die Definition, Anforderungen und Klassifikation von Knochenersatzmaterialien eingegangen werden.

2.2 Definition

Unter dem Begriff Knochenersatzmaterialien werden alle nicht körpereigenen Substanzen, die zur Auffüllung knöcherner Defekte eingesetzt werden, subsumiert [89].

2.3 Anforderungen

Materialien, die in den menschlichen Körper implantiert werden sollen, müssen eine Vielzahl an Anforderungen erfüllen, um einerseits den gewünschten Effekt erzielen zu können und andererseits dem Patienten keinen Schaden zuzufügen. Daher ist es wichtig, dass die Implantate und deren Abbauprodukte nicht toxisch sind und keine antigenen Wirkungen besitzen. Chemisch inkompatible Ersatzmittel rekrutieren verschiedene Immunzellen und lösen somit eine entzündliche Reaktion aus oder führen zum Absterben des umliegenden Gewebes. Selbstverständlich dürfen Knochenersatzstoffe auch keinerlei kanzerogene oder mutagene Eigenschaften aufweisen [15].

Des Weiteren stellen Osteokonduktion und Osteoinduktion wichtige Anforderungen dar. Es handelt sich beim Erstgenannten um die Eigenschaft des Materials, die Bindung und Anheftung von Osteoblasten - Progenitorzellen an der Oberfläche zu fördern, so dass eine knöcherne Einheilung des Implantates möglich ist [36]. Das Material dient dem neuen Knochen als Leitschiene. Eine mögliche Osteokonduktion hängt dabei sowohl von der Porosität als auch von der chemischen Struktur eines Implantates ab [18]. Osteoinduktion beschreibt die beschleunigte Knochenneubildung. Dabei werden undifferenzierte Vorläuferzellen in differenzierte Zellen umgewandelt. Für diesen Vorgang muß ein ungestörter Metabolismus in Anwesenheit des Biomaterials möglich sein bzw. das Ersatzmittel ist in der Lage, geeignete Stimuli an das umliegende Gewebe abzugeben [36]. Diese sind vor allem geeignete Wachstumsfaktoren, z.B. Bone morphogenetic proteins (BMPs), die im Ersatzmaterial anwesend sein können [40]. Für die beschriebenen Anforderungen ist ein effektiver Stoffwechsel zwischen Knochengewebe und Ersatzmaterial erforderlich; es muß bioaktiv sein.

Eine weitere zentrale Rolle in diesem Zusammenhang spielt der Begriff der Osteointegration. Er beschreibt den direkten Kontakt zwischen dem natürlichen, reifen Knochen und der Oberfläche des neuen Implantates, ohne dass sich zwischen beiden Komponenten Bindegewebe befindet [1]. Die gewünschte knöcherne Integration eines Biomaterials fordert dabei eine feste Verbindung zwischen vitalem Knochen und dem Ersatzmittel.

Sie ist grundsätzlich abhängig von drei wichtigen Faktoren, die als *Trias der Osteokonduktion und –integration* beschrieben sind [126]:

- 1) Kontakt
- 2) Vitalität
- 3) Stabilität

Im Idealfall kann das Knochenersatzmaterial biologisch abgebaut und nach einiger Zeit von neu gebildetem Knochen ersetzt werden.

Der biologische Abbau auf der einen Seite, sowie die osteoblastäre Osteoneogenese auf der anderen Seite muß allerdings in einem proportionalen Verhältnis erfolgen, in dem es nicht zu einem Strukturverlust der Defektzone unter Einwachsen von Bindegewebe kommt, so dass eine damit verbundene mechanische Instabilität resultiert.

Um ein erfolgreiches Einwachsen von Knochen in das Material zu gewährleisten, werden in der Literatur unterschiedliche Forderungen an dessen Porengröße angegeben. Die Mindestporenweite für das Einwachsen von neuem Knochen liegt bei 100µm [101]. Das schnellste Einwachsen neugebildeten Knochens in ein poröses Material gibt Predecki et al. [109] mit einer Porengröße von 500µm bis zu 1000µm an. Laut Cornell [18] wiederum ist eine Porenweite von 400µm bis 600µm ideal, wobei die Porosität des Ersatzstoffes 75-80% betragen sollte.

Knochenersatzmittel sollen aber nicht nur das Einwachsen von Knochenzellen ermöglichen, sondern mit ihrer Aufgabe als Platzhalter die Bildung und das Einwachsen von lockerem Granulations- oder Narbengewebe anstelle von Knochen verhindern [92].

Nach Auffüllung eines Knochendefektes mit einem Biomaterial soll der Defekt stabil und möglichst schnell wieder voll belastbar sein. Dazu sollte das Implantat mechanische Eigenschaften aufweisen, die dem Knochen ähnlich sind. Elastizität, Biegezugfestigkeit sowie Druck- und Zugfestigkeit spielen hier eine wichtige Rolle. Wird ein Ersatzstoff ohne ausreichende Festigkeit angewendet, so muß eine Kombination mit einer Osteosynthese oder einem "Fixateur externe" für die nötige Stabilität sorgen, bis das betroffene Areal sicher knöchern durchbaut ist [115].

Eine weitere wünschenswerte Eigenschaft eines Knochenersatzstoffes ist dessen Funktion als Trägermaterial für beispielsweise Antibiotika oder auch, wie oben beschrieben, Wachstumsfaktoren, die dann direkt im Transplantatlager kontinuierlich freigesetzt werden sollen.

Schließlich muß ein geeignetes Knochenersatzmittel gewisse Anforderungen bezüglich seiner Handhabung erfüllen. Ein entscheidender Aspekt ist seine nötige Sterilisierbarkeit. Dabei dürfen dessen chemische und biomechanische Eigenschaften nicht beeinflußt werden. Auch eine langfristige Lagerung ohne Schädigung des Materials ist bedeutsam. Weiterhin sollte der Ersatzstoff in ausreichenden Mengen verfügbar bzw. synthetisierbar sein. Und außerdem ist eine einfache Bearbeitung und Applikation des Implantates durch den Operateur notwendig.

Letztendlich darf auch der Aspekt der Kosteneffektivität nicht außer acht gelassen werden. Die Verwendung von Knochenersatzmaterialien darf im Vergleich zur Knochen transplantation in Zeiten begrenzter Ressourcen nicht mit einer erhöhten finanziellen Belastung einher gehen.

Es wird also eine Vielzahl von Eigenschaften an ein ideales Knochenersatzmittel gefordert. Doch muß man demgegenüber die ökonomischen und sozialen Vorteile einer erfolgreichen Therapie durch Anwendung eines Ersatzstoffes betrachten. Ein positiver Heilungsverlauf mit schnellem Einwachsen von qualitativ gutem Knochen in den Defekt und daraus resultierender frühzeitiger Belastbarkeit bedeutet eine verkürzte Liegezeit des Patienten mit Reduktion der Folgekosten durch Rehabilitationsmaßnahmen und Arbeitsausfall. Außerdem bedeutet eine mögliche rasche Wiederherstellung der Selbstständigkeit des Verletzten eine erhebliche Reduktion der persönlichen Belastung.

Um der beschriebenen Problematik zu begegnen, beschäftigen sich weltweit zahlreiche Arbeitsgruppen bereits seit mehr als 30 Jahren [116] intensiv mit der experimentellen und klinischen Erprobung geeigneter Biomaterialien. Es wurde schon eine Vielzahl an Substanzen entwickelt, doch meist erfüllen die

verwendeten Ersatzmittel nicht alle oben genannten Anforderungen, so dass auch noch die heute entwickelten Biomaterialien als ein Kompromiss betrachtet werden müssen [49]. Außerdem kann bis heute nicht eindeutig vorhergesagt werden, welche Reaktionen ein Knochenersatzmaterial in situ auslöst. Auch der Erfolg dieser Therapie ist abhängig von den lokalen und systemischen Heilungsbedingungen wie beispielsweise Durchblutungsverhältnisse der Defektzone oder Medikamenteneinnahme des Patienten. Die Entwicklung von international standardisierten Biokompatibilitätsprüfungen und Implantat - spezifischen Indikationsstellungen wäre ein wichtiger Ansatz, um unvorhergesehene Ereignisse nach dem Einsatz von Ersatzstoffen weiterhin möglichst gering zu halten und ihre Verbreitung bzw. Akzeptanz zu erhöhen.

2.4 Klassifikation

Seit über 25 Jahren werden immer wieder neue Klassifikationen von Knochenersatzmaterialien vorgeschlagen. Erste Einteilungen bezogen sich auf die verschiedenen Reaktionen, die Biomaterialien im aktiven Gewebe auslösen [27;46;51]. Sie sind heute nicht mehr gebräuchlich. Eine weitere Klassifikation beschrieben Thielemann et al. [131] unter Berücksichtigung der oben genannten zentralen Begriffe Osteokonduktion und Osteoinduktion. Diese basierte allerdings auf einer Trennung beider Reaktionsformen und läßt somit eine Einteilung von Materialien, die diese zwei Komponenten der Knochenheilung verbinden, nicht zu. Weitere modifizierte Klassifikationen berücksichtigen nicht alle anwendbaren Implantate [47;55;118] .

Linhart [89] erarbeitete eine systematische und übersichtliche Klassifikation von Knochenersatzmaterialien:

Tab. 1.1: Klassifikation von Knochenersatzmaterialien nach Linhart 2003

Klasse I	anorganische Knochenersatzmaterialien
	a) kalziumhaltige Formkörper
	b) kalziumhaltige Zemente
	c) Metalle
Klasse II	Organische Knochenersatzmaterialien
	a) biologischer Ursprung
	b) synthetischer Ursprung
Klasse III	Komposite

Die kalziumhaltigen Ersatzstoffe der Klasse I werden häufig im Bereich der Extremitäten eingesetzt. Metalle finden ihre Anwendung v.a. in der Behandlung von Wirbelsäulendefekten sowie bei der Versorgung von Knochentumoren. Organische Materialien biologischen Ursprunges (Klasse IIa) werden aus Knochen gewonnen und beinhalten z.B. die demineralisierte Knochenmatrix oder Wachstumsfaktoren. Diese werden heute allerdings meist rekombinant hergestellt. Ersatzmaterialien synthetischen Ursprungs (Klasse IIb) sind Kunststoffe, die möglicherweise in Zukunft große Bedeutung haben werden.

Die Komposite (Klasse III) bilden eine inhomogene Klasse von Knochenersatzmaterialien. Sie sind wahrscheinlich die idealen Ersatzstoffe der Zukunft.

Eine Erläuterung der im Experiment verwendeten Biomaterialien erfolgt in den Kapiteln 3.1 und 5.2.

2.5 Knochenzellbiologie

Die erfolgreiche Integration von Knochenersatzmitteln in den Heilungsprozess des Skelettsystems setzt das Verständnis der Grundlagen der Knochenzellbiologie voraus. Denn nur das Wissen um die Funktion des Knochens sowie die Aufgaben und Regulation von Osteoblasten und Osteoklasten macht eine erfolgreiche Entwicklung und Testung von Knochenersatzmaterialien möglich.

Die Rolle des Knochens im funktionsfähigen Skelettsystem lässt sich in folgende Teile gliedern:

- 1) Mechanische Stützfunktion und Muskelansatz im Rahmen der Fortbewegung
- 2) Schutzfunktion für innere Organe und das Knochenmark
- 3) Metabolische Aufgaben als Reservoir speziell von Kalzium und Phosphat im Rahmen der Aufrechterhaltung der körpereigenen Ionen-Homöostase [89]

Die wesentlichen Bestandteile dieses speziellen Bindegewebes sind die Zellen und die extrazelluläre Matrix, die, mit Ausnahme von Knorpel und Zahngewebe, die einzigartige Fähigkeit zur Mineralisation besitzt. Diese Eigenschaft ist für die genannten Aufgaben des Knochens genau so bedeutsam wie für eine erfolgreiche Integration von Knochenersatzstoffen. Ebenfalls essentiell für die Anwendung von Biomaterialien im menschlichen Körper ist das Verständnis über den aktiven Stoffwechsel des Knochens hinsichtlich seiner Auf- und -umbauvorgänge. Denn diese spezielle Leistung erfolgt sowohl physiologisch als auch im Rahmen von Reparaturprozessen und bei der Integration von Ersatzmaterialien. Daher soll im Folgenden auf die Darstellung der beiden hauptsächlich daran beteiligten Knochenzellen, die Osteoblasten und Osteoklasten, eingegangen werden.

Osteoblast: Herkunft, Morphologie, Regulation und Kontrolle

Osteoblasten gehen aus mesenchymalen Stammzellen hervor. Sie sind eigentlich Fibroblasten sehr ähnlich. In der Zellkultur lassen sie sich nur durch die Mineralisierung der extrazellulären Matrix unterscheiden [30]. Außerdem exprimieren Osteoblasten die gleichen Gene wie Fibroblasten. Allerdings lassen

sich in Osteoblasten noch weitere Gene finden, deren Expression bei Fibroblasten nicht zu finden sind [4]: z.B. Bone Sialo Protein und Osteocalcin.

Die Knochen bildenden Osteoblasten haben die Ultrastruktur von Zellen mit hoher Syntheseleistung. Osteoblasten sind charakterisiert durch einen runden Zellkern und ein basophiles Zytoplasma. Weiterhin besitzen sie ein stark ausgebildetes rauhes endoplasmatisches Retikulum sowie einen großen Golgi-Apparat. Transmembran befinden sich verschiedene Proteine wie Integrine, Connexine und Cadherine. Sie sind notwendig für einen umfassenden Zell-Matrix und Zell-Zell – Kontakt. Außerdem besitzen Osteoblasten membranständige, spezifische Rezeptoren für Zytokine, Hormone und Wachstumsfaktoren [35;80]. Des Weiteren befindet sich in der Plasmamembran ein Osteoblasten - typisches Enzym; die alkalische Phosphatase. Sie lässt sich im Serum nachweisen und liefert Hinweise über die Knochenaktivität.

Osteoblasten sezernieren eine extrazelluläre Matrix, das vorerst noch aus weicher Grundsubstanz und kollagenen Fibrillen bestehende Osteoid. Pro Tag werden etwa 0,5 – 1,5µm von einer Zelle gebildet [66;106]. Ungefähr 10 bis 15 Tage nach ihrer Formation kalzifiziert die extrazelluläre Matrix [128]. Haben sich die Zellen in das Osteoid eingemauert, werden sie zu den abgeflachten, länglichen Osteozyten. Diese reduzieren ihre Organellen und vermindern die Produktion von Matrixproteinen. Sie haben weniger Ribosomen und endoplasmatisches Retikulum. Das Kern / Zytoplasmaverhältnis ist bei den insgesamt kleineren Osteozyten im Vergleich zu Osteoblasten erhöht [128].

Einige Osteoblasten flachen am Ende der sekretorischen Phase ab und verbleiben als "Lining-Cells" epithelartig auf den Knochenbälkchen. Zwischen Osteozyten und den "Lining-Cells" besteht eine enge interzelluläre Kommunikation [20]. Werden Osteoblasten nicht zu einem dieser beiden Zelltypen, gehen sie in die Apoptose ein (s. Abb. 2.1). Die Lebensdauer von Osteoblasten liegt im Menschen bei bis zu 8 Wochen.

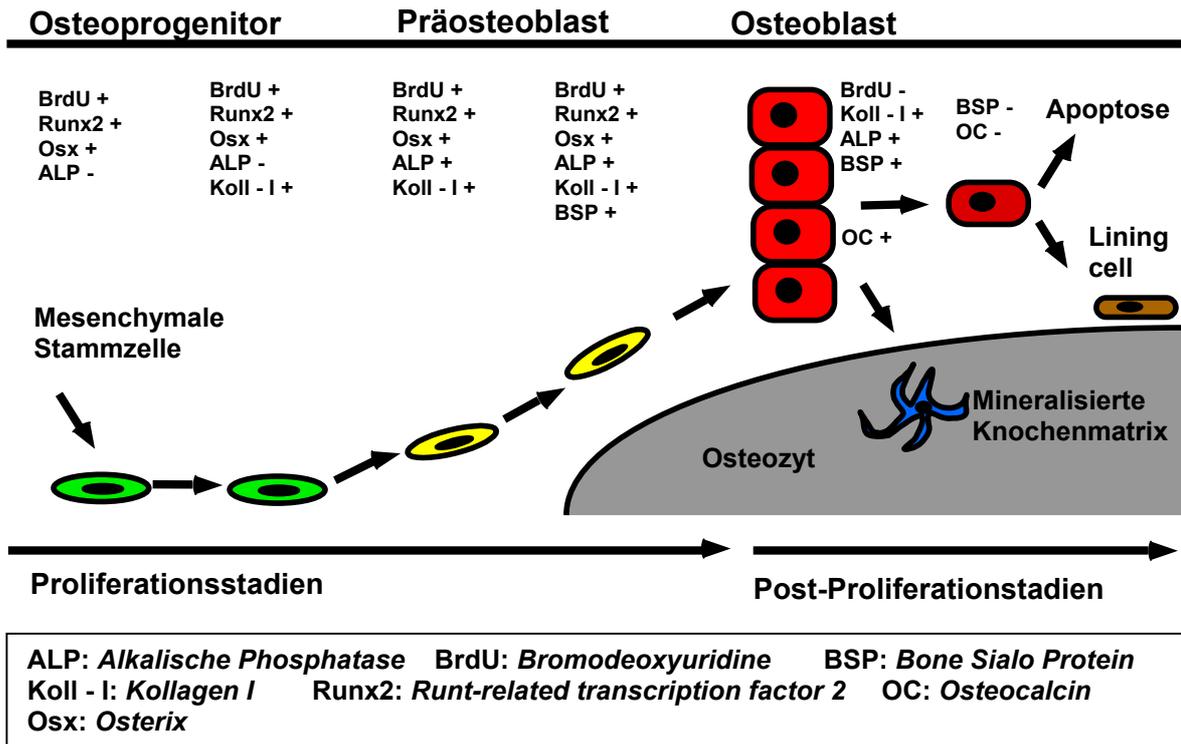


Abb. 2.1: Stadien der Osteoblastendifferenzierung mit den jeweils typischen Expressionsmustern

Extrazelluläre Matrix

Nachdem die organische Matrix von den Osteoblasten extrazellulär abgelagert ist, wird sie von Apatit durchsetzt. Dieses anorganische Mineral hat einen Anteil von 70% am kalzifizierten Knochen. Das Kalziumphosphat bildet die Basis von Hydroxylapatit und gilt als Prototyp von reifem Knochen und Zahnmineral [108]. Über den eigentlichen Mineralisationsprozess gibt es bisher keine einheitliche Theorie. Man weiß allerdings, dass die Matrix-Mineralisation nicht eindeutig nur durch Osteoblasten - spezifische Gene reguliert wird [30]. Der mineralen Phase des Knochens werden zwei wichtige Funktionen zugeschrieben:

- 1) Sie sorgt für die Stabilität des Skeletts durch ihren Einfluß auf die organische Matrix, starre Strukturmaterialien zu bilden
- 2) Das Mineral dient als Speicher für Kalzium, anorganische Orthophosphate, Natrium, Magnesium, Carbonat und andere Ionen.

Durch diese beiden Eigenschaften ist das Mineral in die biomechanischen und metabolischen Funktionen des Knochengewebes involviert [108].

In die extrazelluläre Matrix sind zahlreiche Proteine und Moleküle eingelagert. Ihr Hauptbestandteil ist Kollagen. Daneben lassen sich weitere Bestandteile wie Proteoglykane und Fibronectin finden [112]. Wichtige Signalfunktionen übernehmen Bone morphogenetic proteins (BMPs), Zytokine, Wachstumsfaktoren und Adhäsionsmoleküle. Weiterhin spielen Osteopontin und Osteonectin eine wichtige Rolle für den Mineralisationsprozess [128].

Da Kollagen, alkalische Phosphatase, Osteocalcin und Bone Sialo Protein wichtige Bestandteile der im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente darstellen, sollen diese Proteine im Folgenden näher beschrieben werden.

Kollagen

Typ I Kollagen macht 90% der in der extrazellulären Matrix vorhandenen Proteine aus [67]. Es handelt sich bei Kollagen I um ein Heteromer, bestehend aus 2 α I – Ketten und 1 α II – Kette [14]. Kollagen hat einen konduktiven Einfluß auf die Knochenbildung und Mineralablagerung. Dazu trägt sowohl seine Oberflächenbeschaffenheit als auch seine Bindungskapazität für non-kollagene Matrixproteine bei. So können z.B. Osteonectin oder saure Phospholipidkomplexe in Verbindung mit Kollagen die Kristallablagerung in die Matrix ermöglichen. Außerdem besitzt Kollagen gute Trägerfunktionen für BMPs [95] und Wachstumsfaktoren [97].

Alkalische Phosphatase

Das Enzym liegt in der Plasmamembran von Osteoblasten und gilt als früher Differenzierungsmarker. Ihre Aktivität erreicht ein Maximum am 10. – 12. Tag der Knochenneubildung [112]. Die alkalische Phosphatase spielt eine wichtige Rolle bei der Knochenmineralisation. Eine Mutation des kodierenden Gens führt beim Menschen zu Hypophosphatasie und zeigt sich in einer Störung der Mineralisation [13;141]. Dieser Defekt resultiert entweder direkt aus dem Funktionsverlust des Proteins oder aus einem erhöhten Gehalt an frei zirkulierendem Pyrophosphat,

einem bekannten Inhibitor des Mineralisationsvorganges [141]. Die alkalische Phosphatase hat allerdings auch multiple Funktionen in nicht kalzifizierten Regionen. Sie läßt sich ebenso z.B. in der Leber und Niere nachweisen (Tissue non-specific alkaline phosphatase).

Bone γ -carboxyglutamic acid containing gla protein (BGP) = Osteocalcin

Osteocalcin ist das einzige absolut Osteoblasten - spezifische Protein. Das Gen wird nur in terminal differenzierten Osteoblasten (und reifen Odontoblasten [143]) exprimiert und sein Promotor ist ausschließlich postnatal und nur in differenzierten Osteoblasten aktiv [30]. Seine Expression wird auf transkriptioneller Ebene durch Hormone wie Vitamin D₃ [24] und Wachstumsfaktoren wie Tumor Nekrosefaktor α (TGF α) reguliert [84]. In der Maus konnten die Kopien der drei Osteocalcin Gene, OG1/OC-A, OG2/OC-B und ORG/OC-X, als ein Gencluster mit 23kb im Maus Genom identifiziert werden [25;110]. Obwohl OG1 *in vivo* mit über 80% den höchsten Expressionsanteil an der Gesamt – mRNA von Osteocalcin hat, wird von kultivierten Osteoblasten *in vitro* OG1 und OG2 etwa gleich stark exprimiert [143]. Die Zellspezifität von Osteocalcin macht es zu einem exzellenten Marker für die Untersuchung des noch wenig erklärten Mechanismus der Osteoblasten - spezifischen Genexpression [29]. Osteocalcin hat die Eigenschaft, mit hoher Affinität Kalzium und andere Mineral-Ionen binden zu können. Verantwortlich dafür sind γ -carboxylierte Glutamatreste (GLA-Reste) [67], die dem Protein auch seinen Namen verleihen (Bone GLA protein = BGP). Der genaue Mechanismus der Wirkung von Osteocalcin ist bisher unklar. Mausmodelle haben gezeigt, daß Osteocalcin-defiziente Mäuse eine erhöhte Osteoblastenfunktion mit einem daraus resultierenden Anstieg der Knochenmasse zeigen [28]. Yanai et al. [143] führten aufgrund ihrer Untersuchungen mit OG1/OG2 – defizienten Mäusen die Überlegung an, daß Osteocalcin nicht, wie bisher angenommen, als Regulator der Knochenmineralisation fungiert, sondern seine Aufgabe in der Inhibition der Knochenneubildung liegt, da in dem Modell neben einer erhöhten Knochenmasse keine ungewöhnliche Mineralisation gefunden werden konnte.

Bone Sialo Protein

Bone Sialo Protein (BSP) ist ein Phosphoprotein, das ebenso wie Osteocalcin am Ende der Mineralisationsphase von Osteoblasten exprimiert wird. BSP fungiert als Regulator der Knochenmineralisation. Es ist allerdings, wie z.B. auch Osteopontin, an diesem Mechanismus nur beteiligt und nicht allein für die Kontrolle des Mineralisationsprozesses *in vivo* verantwortlich [4;57;85]. Die Deletion von BSP im Mausmodell führt nämlich nicht wesentlich zu einer Mineralisationsstörung. Vielmehr zeigen die betroffenen Tiere einen Phänotyp mit erhöhter Knochenmasse [4]. Die exakte Rolle von Bone Sialo Protein als Regulator der Knochenmineralisation *in vivo* ist allerdings bisher nicht ausreichend geklärt [122].

Das Wissen um die molekulare Kontrolle der Osteoblastendifferenzierung ist im Gegensatz zu den Untersuchungsergebnissen bezüglich der Osteoklasten- und Chondrozytendifferenzierung noch beschränkt. Ein Gen, das an der Kontrolle der Osteoblastendifferenzierung beteiligt ist, ist Runx2:

Runx2 = Runt-related transcription factor 2 (Cbfa1 = Core binding factor α_1)

Bei Runx2 handelt es sich um den ersten Osteoblasten - spezifischen Transkriptionsfaktor. Er ist der früheste und spezifischste Marker der Osteogenese [30]. Runx2 beeinflusst in der embryonalen Entwicklung die mesenchymalen Vorläuferzellen bezüglich ihrer Differenzierung zu Osteoblasten oder Chondrozyten [32]. Seine Expression ist eigentlich auf Osteoblasten begrenzt. In geringerem Maße läßt sich Runx2 auch in Odontoblasten und hypertrophen Chondrozyten nachweisen [70]. Der Transkriptionsfaktor reguliert die Produkte der extrazellulären Matrix durch differenzierte Osteoblasten [31]. Dass Runx2 ein wichtiger Differenzierungsfaktor von Osteoblasten ist, zeigt die Expression von Osteoblasten - spezifischen Genen wie Osteocalcin in nicht - osteoblastischen Zellen, wenn diese ektopisch Runx2 exprimieren [32]. Die Deletion von Runx2 im Mausmodell führt zum völligen Fehlen von Knochen. Die Tiere weisen ein Skelett auf, welches lediglich Chondrozyten enthält. Eine Osteoblastendifferenzierung findet bei diesen Mäusen nicht statt [74;105]. Welche Transkriptionsfaktoren die Expression von Runx2 kontrollieren, ist noch nicht geklärt [30].

Osteoklast: Herkunft, Morphologie, Regulation und Kontrolle

Der Osteoklast ist die zweite Zelle, die wesentlich am "bone remodeling" beteiligt ist. Seine Aufgabe besteht in der Knochenresorption und trägt damit einen wichtigen Teil zur Aufrechterhaltung einer konstanten Knochenmasse bei.

Osteoklasten stammen aus hämatopoetischen Vorläuferzellen der Monozyten / Makrophagen – Reihe ab [21]. Sie sind etwa 50 – 100µm groß und besitzen je nach Spezies bis zu 50 Zellkerne [67]. Diese Tatsache beruht auf der Fusion mehrerer Vorläuferzellen während ihrer Entwicklung. Charakteristisch für Osteoklasten ist außerdem vor allem ihre Lage in den Howship'schen Resorptionslakunen an der Knochenoberfläche.

Neben den basophilen Nuclei fallen besonders viele Ribosomen und Vakuolen sowie zahlreiche Mitochondrien im Zytoplasma auf. Die Kerne sind von dichten Golgi-Komplexen umgeben. Osteoklasten zeigen im Gegensatz zu Osteoblasten aber kein ausgeprägtes endoplasmatisches Retikulum. Die mehrkernigen Riesenzellen haben an ihrem apikalen Pol eine stark gefaltete Membran, die einem Bürstensaum entspricht und auch "ruffled border" genannt wird. Die basolaterale Membran ist hingegen glatt begrenzt.

Phenotypische Marker von reifen Osteoklasten zeigen sich in der hohen Expression von der tartratresistenten sauren Phosphatase (TRAP) [98], der Carboanhydrase II [38], dem Vitronectinrezeptor $\alpha_v\beta_3$ [22], Calcitoninrezeptoren [103] sowie der Tyrosinkinase c-Src [129].

Für die genetische Kontrolle sind vor allem vier Transkriptionsfaktoren bedeutsam. Der erste hierfür bekannte Marker ist Pu.1. Er wird spezifisch in Monozyten und B-Lymphozyten exprimiert [71]. Seine Defizienz im Mausmodell führt zu einem osteopetrotischen Phänotypus. Das Knochenmark der betroffenen Tiere weist keine Osteoklasten und Makrophagen auf. Eine Knochenmarktransplantation hingegen läßt den zellautonomen Defekt beheben [132]. Pu.1 ist der erste bekannte Marker der Osteoklastendifferenzierung, der sowohl die Differenzierung von Osteoklasten als auch von Makrophagen kontrolliert [67].

Der zweite kontrollierende Transkriptionsfaktor im Rahmen der Osteoklastendifferenzierung ist *c-fos*. Sein Fehlen führt zur Inhibition der osteoklastären Differenzierung und zeigt im Mausmodell ebenfalls einen osteopetrotischen Phänotyp [64;139]. Da die Suppression von *c-fos* allerdings eine Zunahme von Makrophagen zeigen läßt, muß dieser Faktor unterhalb von Pu.1 in der Signalkaskade aktiv sein [67]. Der *c-fos* – Defekt in der knock-out-Maus kann ebenfalls durch Knochenmarktransplantation korrigiert werden [41].

Ein dritter Transkriptionsfaktor ist NF- κ B. NF- κ B setzt sich aus verschiedenen Proteinen zusammen. Eine Defizienz der enthaltenen Proteine p50 und p52 führt zu einer Blockade der Differenzierung von Osteoklasten [37;60].

Der vierte bedeutende Faktor ist *mi*. Das kodierende Gen wurde in Microphthalmie-Mäusen gefunden. Die Mutation zeichnet sich neben verringerter Augengröße und Pigmentationsverlust der betroffenen Tiere durch Knochenresorptionsstörungen aus [54]. *mi*-Mäuse haben zwar Osteoklasten, doch sind diese nicht zur Resorption fähig. Dieser Transkriptionsfaktor unterliegt in dem Signalweg der Osteoklastendifferenzierung also der Regulation der anderen drei Faktoren [67].

Für die Kontrolle der osteoklastären Differenzierung durch sezernierende Moleküle ist ein Systemkomplex aus der Tumornekrose-Faktor-Rezeptorfamilie von entscheidender Bedeutung. Das OPG-RANK-RANKL-System besteht aus den drei Molekülen Osteoprotegerin (OPG), RANK und RANK-Ligand. Die Funktion von OPG liegt in der Inhibition der Osteoklastendifferenzierung. OPG-defiziente Mäuse zeigen einen erheblichen Anstieg der Osteoklastenzahl und eine damit einhergehende Osteoporose [11;99].

RANKL ist ein Osteoklastendifferenzierungs-Faktor, der auf der Membran von Osteoblasten-Progenitor-Zellen und als gelöstes Molekül in der Knochen-Mikroumgebung zu finden ist. Neben Osteoblasten und einigen anderen Zellen exprimieren und synthetisieren auch T-Zellen, die *in vitro* die Osteoklastogenese induzieren, RANKL [56;113]. *In vitro* fördert RANKL die osteoklastäre Differenzierung in Verbindung mit dem Wachstumsfaktor M-CSF (Macrophage colony stimulating factor). In der Co-Kultur übernimmt er die Funktion von

Osteoblasten, Stromazellen und 1,25-Dihydroxy-Vitamin D₃ zur Induktion der Osteoklastendifferenzierung und er aktiviert reife Osteoklasten zur Knochenresorption [12]. Die Defizienz von RANKL in der Maus führt zum Fehlen von Osteoklasten mit der Ausprägung einer Osteopetrose sowie zu immunologischen Defekten [75].

Beziehung zwischen Osteoblasten und Osteoklasten

Obwohl Osteoblasten und Osteoklasten entscheidend am Knochenstoffwechsel beteiligt sind und bei der Aufrechterhaltung des funktionierenden "bone remodeling" eine entscheidende Rolle spielen, kontrollieren sie sich dennoch nicht gegenseitig. Dass sich beim Fehlen von funktionstüchtigen Osteoklasten eine Osteopetrose entwickeln kann, verdeutlicht, dass die Knochenformation nicht durch die Resorption beeinflusst wird [67]. Umgekehrt gibt es Ergebnisse über transgene Mäuse, deren Knochenresorption trotz gestörter Knochenbildung uneingeschränkt verläuft [19].

Das Wissen um die Beziehung zwischen Osteoblasten und Osteoklasten erscheint auch in bezug auf die Prüfung und Anwendung von Knochenersatzmaterialien bedeutsam. So wird anhand der Aspekte der Kontrolle beider Zelltypen untereinander deutlich, dass man sich weiterhin bei der Entwicklung neuer Biomaterialien auf die einzelnen Ergebnisse von *in vitro* Tests beschränken muß. Eine Einschätzung des Verhaltens von neuen Implantaten *in vivo* bezüglich der Reaktionen von Osteoblasten und Osteoklasten untereinander auf das Material bleibt fraglich. Um so wichtiger ist es deshalb, an einer Standardisierung von *in vitro* Tests zu arbeiten, um der Problematik unerwünschter Reaktionen von Knochenersatzmaterialien im Gewebe möglichst weitgehend begegnen zu können.

2.6 Biokompatibilitätsprüfung von Knochenersatzmaterialien

Wie bereits bei der Darstellung der Anforderungen an einen Knochenersatzstoff beschrieben, spielen der Ausschluß der Zytotoxizität sowie eine Osteoblasten - spezifische Biokompatibilität in der Testung von Biomaterialien eine wichtige Rolle.

In der Literatur sind verschiedene Vorschläge zur Biokompatibilitätsprüfung von Knochenersatzmitteln zu finden. Es werden allerdings unterschiedliche Verfahren und Zellen angewandt (s. Kap. 5.3).

Die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden mit einem einfachen, reproduzierbaren Verfahren unter der Verwendung der Zellen des Zielgewebes, nämlich Osteoblasten, durchgeführt. Das Verfahren erlaubt die notwendige Beantwortung der grundsätzlichen Fragen, die vor der Testung eines Biomaterials in einem zeit- und kostenaufwendigen Großtierexperiment gestellt werden müssen:

- 1) Sind Osteoblasten in Anwesenheit der Prüfsubstanz in der Langzeit-Kultur überlebensfähig?
- 2) Sind Osteoblasten in Anwesenheit der Prüfsubstanz in der Lage zu proliferieren?
- 3) Sind Osteoblasten in Anwesenheit der Prüfsubstanz in der Lage zu differenzieren und aktiv Knochen zu bilden?
- 4) Ist ein grenzschichtfreier Zell-Prüfkörper-Kontakt möglich? [89]

In der vorliegenden Arbeit werden drei verschiedene Knochenersatzmittel und ein Kontrollmaterial hinsichtlich ihrer Biokompatibilität untersucht und miteinander verglichen. Eine Hydroxylapatitkeramik (ENDO BON[®]), zwei verschiedene Kalziumphosphat Zemente (BIO BON[®], CALCIBON[®]) und Dentin, sowie Osteoblasten in Abwesenheit eines Biomaterials als Kontrolle, konnten in einer Langzeit - Zellkultur mit primären Mausosteoblasten über 28 Tage beobachtet werden.

Zur Etablierung des Testverfahrens wurden gezielt 3 Knochenersatzmaterialien ausgewählt, die sich bereits erfolgreich im klinischen Einsatz befinden und die eine ausgewiesene gute Biokompatibilität im Knochen *in vivo* besitzen. Elfenbein (Dentin) wurde als Kontrollmaterial ausgesucht, da es aus knochenähnlichem Material besteht, sich als Knochenersatzmaterial jedoch aufgrund schlechter Langzeitergebnisse nicht durchgesetzt hat.

Der Aufbau des osteoblasten – spezifischen Biokompatibilitätstests gestaltete sich wie folgt:

- Gesamtversuchsdauer: 28 Tage
 - Kultivierung primärer Mausosteoblasten in Anwesenheit der verschiedenen Biomaterialien sowie in Abwesenheit einer Prüfsubstanz als Kontrolle
-
- 1) Lichtmikroskopische Kontrolle und Dokumentation der Zellproliferation
 - 2) pH – Analyse des Kulturmediums
 - 3) Photometrische Messung der alkalischen Phosphatase
 - 4) Enzymatische alkalische Phosphatase - Färbung
 - 5) Kollagenfärbung (van Gieson)
 - 6) Darstellung mineralisierter extrazellulärer Matrix / “bone nodules“
(Versilberung nach von Kossa)
 - 7) Darstellung des Zell – Materialoberflächen – Interface (Dünnschliffpräparate)
 - 8) RT – PCR (Expression von alkalischer Phosphatase, Bone Sialo Protein, Osteocalcin)

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

ENDO BON[®] - eine Hydroxylapatitkeramik

Endobon[®] ist eine Kalziumphosphat - Keramik, die von der Firma Biomet Merck GmbH, Darmstadt, hergestellt wurde. Endobon[®] gehört nach der oben genannten Klassifikation von Knochenersatzmaterialien in die Klasse Ia. Es wird aus spongiösem Rinderknochen von mindestens 3 Jahre alten Tieren gewonnen [5]. Die Spongiosa wird vom Hersteller vor der Formgebung in Blöcke oder Zylinder bei Temperaturen bis 900°C pyrolysiert und danach bei über 1200°C einem Sinterungsprozess unterworfen. Die abschließende Sterilisation in der Verpackung erfolgt mittels γ -Strahlen. Die Anwendung der hohen Temperaturen während der Fertigung ermöglicht sowohl eine vollständige Enteiweißung der Keramik als auch das Sicherstellen der Keimfreiheit bezüglich genuiner pathogener und apathogener organischer Erreger [136].

Endobon[®] ist eine phasenreine Hydroxylapatitkeramik, ihr Gehalt an kristallinem Hydroxylapatit [$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$] beträgt also gemäß der ASTM-Vorschrift (*The American Society for Testing and Materials*) mehr als 95% [3]. Die Druckfestigkeit der Substanz beträgt 300-900MPa. Ihre Makroporosität liegt im Bereich von 45-85%. Die Porenweite der Keramik, die ein interkonnektierendes Porensystem aufweist, wird vom Hersteller mit etwa 100-1500 μm angegeben. Dieser weist das Material außerdem als biokompatibel, osteokonduktiv und osteointegrativ aus.

Endobon[®] ist bereits seit 1992 als Knochenersatzmittel zur Therapie von Knochendefekten in Deutschland zugelassen und wird in der Klinik für unterschiedliche Indikationen erfolgreich eingesetzt [8;48;78;86;140].

BIOBON® - ein Kalziumphosphat Zement

Biobon® (α BSM) ist ein vollständig synthetisch hergestelltes Knochenersatzmaterial, das ursprünglich in den USA entwickelt wurde. Für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente wurde das Produkt Biobon® der Firma Biomet Merck verwendet. Es besteht aus Trikalziumphosphat $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$ und Dikalziumphosphatdihydrat $[\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}]$. Es findet seine Zugehörigkeit nach der oben angegebenen Einteilung von Ersatzmitteln in der Klasse Ib. Das mit γ -Strahlen sterilisierte Kalziumphosphatpulver wird vor der Applikation mit einer sterilen 0,9%igen Natriumchloridlösung hydriert. Es entsteht dabei eine mikrokristalline hydroxylapatitartige Paste, die bei Körpertemperatur endotherm aushärtet. Für 1,0g Pulver werden 0,8ml Salzlösung verwendet. Biobon® weist eine Mikroporosität von 50-60% auf. Die durchschnittliche Porengröße des Zementes wird vom Hersteller mit etwa 10nm angegeben. Biobon® hat keine makroporöse Struktur. Die Druckfestigkeit des Materials beträgt nach Aushärtung durchschnittlich 10MPa.

Biobon® ist laut Firma Biomet Merck biokompatibel und kommt in Deutschland seit 1998 klinisch zum Einsatz. Schilling et al. [121] konnten außerdem in neuesten Studien 2004 nachweisen, dass Biobon® auch resorbierbar ist.

CALCIBON® - Ein Kalziumphosphat Zement

Calcibon® ist ebenfalls ein synthetisches, biokompatibles und resorbierbares Knochenersatzmittel der Firma Biomet Merck GmbH. Es handelt sich um ein Kalziumphosphat Zement, einzuteilen in die Klasse Ib. Das aus Kalzium- und Phosphat – Salzen hergestellte Pulver ist mittels γ -Strahlen sterilisiert und wird mit einer sterilen Di-Natriumhydrogenphosphatlösung $[\text{Na}_2\text{HPO}_4]$ vor Gebrauch gemischt. Es entsteht eine Paste, die bei Körpertemperatur zu einem mikrokristallinen, carbonisierten, kalziumdefizienten Hydroxylapatit aushärtet. Für 1g Pulver werden 0,36ml Lösung verwendet. Die Druckfestigkeit des Zementes beträgt nach Angaben des Herstellers nach 6 Stunden ca. 30MPa, nach 3 Tagen etwa 60MPa. Die fertige Substanz weist keine Makroporen auf. Die Mikroporenweite liegt bei ca. 1 μm .

Calcibon[®] ist ein Knochenersatzmaterial, das sich seit Januar 2003 in Deutschland in der klinischen Anwendung befindet.

DENTIN – ein Elfenbeinpräparat

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurde Dentin als eine weitere Prüfsubstanz untersucht. Das Elfenbein wurde der Arbeitsgruppe in Übereinstimmung mit dem Washingtoner Artenschutzübereinkommens und der dazu erlassenen Rechtsvorschriften vom Bundesamt für Naturschutz überlassen. Dentin besitzt einen Kalzium- bzw. Phosphatanteil von 35 bzw. 17,1 Gew.% [142]. Es weist weder Mikro- noch Makroporen auf und wird klinisch nicht mehr als Knochenersatzmaterial eingesetzt.

3.2 Vorbereitung der Materialien für die Zellkultur

Alle 4 Prüfkörper wurden auf eine Größe von 10mm x 10mm x 10mm präpariert. So war eine einfache und reproduzierbare Herstellung sowohl der zu formenden Zemente als auch der Festkörper Endobon[®] und Dentin möglich. Nach einigen Vorversuchen stellte sich ein gleichseitiger Würfel als am besten geeignet dar.

Endobon[®] wurde zunächst aus seiner sterilen Verpackung herausgenommen und mittels einer Diamantbandsäge [*E310 CP, EXAKT Gerätebau, Norderstedt, D.*] in einen Block von 1cm³ gesägt. Anschließend erfolgte die Sterilisierung im Autoklaven (*5050 ELC Systec; Systec GmbH Labor-Systemtechnik Wettenberg, D*) bei 121°C über einen Zeitraum von 20 Minuten unter Vakuum. Die Blöcke wurden für diesen Vorgang in ein mit Aluminiumfolie abgedecktes Becherglas gelegt. Zur Sicherstellung des erfolgreichen Sterilisationsvorganges ist das Gefäß mit Indikatorklebeband versehen worden.

Die Zubereitung des Kalziumphosphat Zementes Biobon[®] erfolgte unter einer sterilen Werkbank [*Sicherheitswerkbank Klasse 2; BDk Luft- und Reinraumtechnik GmbH Sonnenbühl-Genkingen, D*]. Das oben erwähnte Pulver befindet sich in

einem sterilen Ballon, dem 0,8ml Natriumchloridlösung pro 1g Kalziumphosphat mit Hilfe einer Spritze über einen am Ballon befindlichen Spezialaufsatz zugefügt wird. Dieser Vorgang, sowie alle weiteren Arbeitsschritte, erfolgte unter Verwendung von sterilen OP-Handschuhen. Nach dem Mischen von Pulver und Kochsalz in dem Ballon durch 1minütiges Kneten wurde die entstandene Paste aus der Ballonöffnung gedrückt und auf eine im Autoklaven sterilisierte Metallplatte gebracht. Mit Hilfe von sterilen Skalpellklingen konnte aus der Paste eine glatte Masse geformt werden, die unter Verwendung von einem ebenfalls im Autoklaven sterilisierten Lineal in Blöcke der gewünschten Größe 10mm x 10mm x 10mm geschnitten wurde. Erst nach einem Sicherheitszeitraum von weiteren 5 Minuten für die Aushärtungsphase wurde die Arbeit mit den gefertigten Blöcken fortgesetzt.

Die Anmischung und Präparation des Kalziumphosphat Zementes Calcibon[®] erfolgte ebenfalls unter der sterilen Werkbank. Nach dem Auspacken des sterilen Blisters, in dem sich das Pulver und die Di-Natriumhydrogenphosphatlösung jeweils in einem Glasfläschchen sowie ein Mischbecher und ein Spatel befinden, dienten sterile OP-Handschuhe bei allen folgenden Arbeitsvorgängen der Gewährleistung einer keimfreien Atmosphäre. Die Flüssigkeit und das Pulver wurden nacheinander in das Mischgefäß gegeben und mit dem Spatel für 45 – 60 Sekunden zu einer geschmeidigen Paste verarbeitet. Anschließend konnte der noch weiche Zement wie oben beschrieben auf einer autoklavierten Metallplatte ausgestrichen und in Blöcke von 10mm x 10mm x 10mm Größe geschnitten werden. Wie vom Hersteller empfohlen, erfolgte über eine 5minütige Aushärtungsphase keine Manipulation am Material.

Das Elfenbein wurde genau wie die Hydroxylapatitkeramik mit einer elektrischen Kochensäge in Blöcke der gewünschten Form und Größe gebracht. Um nach dem Sägen eine gleiche Oberflächenbeschaffenheit aller 6 Seiten zu gewährleisten, sind die Dentinkörper von Hand auf einer Schleifscheibe [*HERMES WS-Flex 18-C, p1200*] bearbeitet und danach mit PBS [*Phosphate buffered saline, Cat.Nr.14190-094, GIBCOTM; Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D*] gespült worden. Die Sterilisation erfolgte durch vollständiges bedecken der Blöcke mit 80%igem Ethanol über eine

Dauer von 15 Minuten. Das Elfenbein wurde für diesen Vorgang in "six-well-plates" [Gewebekulturplatte Cellstar[®], 6well, 9,6cm²/well; greiner bio-one, D] gelegt; ein Prüfkörper je "well". Nach anschließendem Absaugen des Alkohols mit einer Wasserstrahlpumpe wurde das Dentin in den "six-well-plates" solange unter dem sterilen Abzug gelagert, bis jegliches Ethanol vollständig verdampft war.

Von jedem der 4 Materialien wurden 12 Blöcke angefertigt. Sie wurden als Vorbereitung für den Zellkulturansatz auf insgesamt 12 "six-well-plates" verteilt. In einem "six-well-plate" befand sich somit je ein Block Endobon[®], Biobon[®], Calcibon[®] und Dentin. Die restlichen zwei "wells" waren für die Kontrollkultur bzw. Leermessung des pH – Wertes des Kulturmediums vorgesehen.

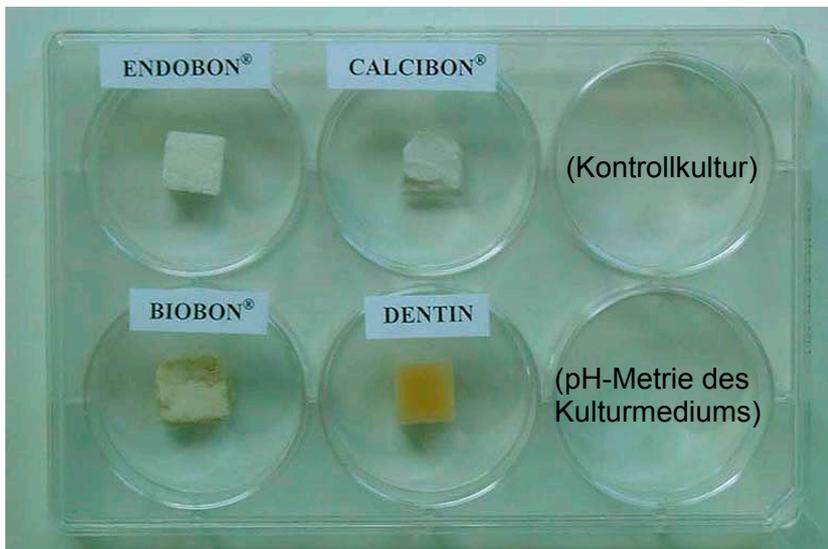


Abb. 3.1: Die 4 Prüfkörper nach Vorbereitung für die Zellkultur

Für die 3 Färbungen von Gieson, von Kossa und alkalische Phosphatase wurden die "wells" zuvor mit je einem im Autoklaven sterilisierten Glas coverslip [Assisten[®] Nr.1001, 12mm \varnothing] versehen. Es wurden dafür 3 "six-well-plates" vorbereitet, je eines für die Kollagenfärbung nach 7 Tagen Zellkultivierung, für die alkalische Phosphatase - Färbung zum Zeitpunkt Tag 14 und eines für die von Kossa - Färbung am 28. Tag des Experimentes. Die restlichen 9 "six-well-plates" waren für die photometrische Messung der Expression von alkalischer Phosphatase und die

Durchführung der Reverse Transkriptase - PCR für die Gene Osteocalcin, Bone Sialo Protein und alkalische Phosphatase sowie für die Anfertigung von Schliffpräparaten vorgesehen; diese jeweils im 3fach Ansatz für die Zeitpunkte 7., 14., 28. Tag der Zellkultur.

Die Prüfkörper wurden mit einer im Autoklaven sterilisierten Pinzette in die vorbereiteten "six-well-plates" überführt und darin vollständig von Zellkulturmedium (α -MEM) [*Minimum Essential Medium, alpha Modification, Cat.Nr.M-0644; SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D*] inklusive 1% Penicillin / Streptomycin Lösung (P/S) [*Penicillin/Streptomycin Solution, steril filtriert, 10.000units Penicillin, 10mg Streptomycin/ml in 0,9%NaCl; Cat.Nr.P-0781; SIGMA-Aldrich Chemie GmbH*] und 10% Fötalem Rinderserum (FBS) [*Fetal Bovine Serum, triple 0,1 μ m sterile filtered, Lot.Nr.3268 ELJ [H1], Cat.Nr.Ch 30160; HyClone™/Perbio Sciences Deutschland GmbH, Bonn, D*] bedeckt für 24 Stunden im Brutschrank [*Sorvall® Heraeus BBD 6220 Hot air disinfectable gassed Incubator; Kendro Laboratory Products, Hanau, D*] unter Standardbedingungen [37°C, 5% CO₂, 95% rH] inkubiert, bevor die Osteoblasten darauf in Kultur gebracht wurden.

An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, welche Bedeutung die Zugabe von Serum in das Medium hat. In ihm befinden sich Haftsubstratmoleküle wie Fibronectin sowie Wachstumsfaktoren, Albumin und andere Proteine. Diese Komponenten überziehen die Kulturschale mit einer Schicht, die es den Zellen ermöglicht, auf verschiedenen Oberflächen anzuwachsen [142]. Weiterhin dienen die Antibiotika im Medium, hier eine Penicillin / Streptomycin Lösung, der Vorsorge vor einer möglichen Vermehrung von Keimen.

Die Durchführung des Experimentes erfolgte allerdings in mehreren Teilen. Es sind zu Beginn der Arbeit einige Vorversuche hinsichtlich der Materialgröße- und Formgebung, des Osteocalcinassay sowie der optimalen Osteoblastenextraktion durchgeführt worden.

3.3 Osteoblastengewinnung

Die Osteoblasten für die Zellkultur wurden aus 2-3 Tage alten Mäusen der Linie CD1 extrahiert. Die Tiere wurden zunächst in ein geschlossenes Gefäß gesetzt, das mit Diethylether getränktem Papier ausgelegt war. Nach etwa 5 Minuten Wartezeit erfolgte die Präparation der toten Mäuse unter einer sterilen Werkbank. Die für die Präparation verwendeten Instrumente befanden sich während des gesamten Arbeitsvorganges in einem mit 80%igem Ethanol gefüllten Becherglas.

Die Mäuse wurden nacheinander mit einer Pinzette aus dem Behälter genommen und für etwa 5 Sekunden in 80%igen Alkohol getaucht. Anschließend erfolgte mit der Schere ein Hautschnitt auf Nackenhöhe, der das Ziehen der Haut über den Kopf mit einer Pinzette möglich machte. Ein Rückenmarksschnitt diente nun dem Freilegen des Foramen magnum. Von diesem ausgehend konnte die Schädelkalotte auf beiden Seiten so eingeschnitten werden, daß sich das Calvarium mit der Pinzette leicht abheben ließ. Jetzt wurde das gewonnene Präparat auf ein fusselfreies Papier gelegt. Das occipital gelegene Chondrocranium ließ sich mit einer Skalpellklinge abschneiden. Danach wurde das Calvarium auf beiden Seiten durch gleichmäßiges darüber Streichen mit der Klinge gesäubert, bevor es schließlich mit der Pinzette in ein mit sterilem PBS gefülltes 50ml Tube [*Falcon[®] 50ml Röhrchen, Polypropylen Blue MaxTM; Becton Dickinson Biosciences Discovery Labware, Heidelberg, D*] auf Eis überführt wurde.

Um das Entfernen von zusätzlichen Gewebeteilen zu gewährleisten, wurden die Calvarien zunächst in eine sterile 10ml Kulturschale [*Petrischale Cellstar[®], 94/16mm, greiner bio-one*] gekippt und mit der Pinzette in ein neues, steriles 50ml Tube gelegt. Für das folgende Auftrennen der Proteine zur Extraktion der primären Osteoblasten diente eine Enzymlösung, die so kurz wie möglich vor diesem Vorgang hergestellt wurde.

Rezept für die Herstellung einer Enzymlösung zur Extraktion von Osteoblasten

50mg Collagenase Ia [*Collagenase Ia from Clostridium histolyticum, Clostridiopeptidase A, Cat.Nr.C-9891, SIGMA-Aldrich, Inc.*] und 100mg Dispase II [*Neutral Protease from Bacillus polymyxa, grade II, Cat.Nr.165859, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D*] werden in 10ml α -MEM inklusive 1% P/S gelöst, mit einer Spritze aufgezogen und durch einen sterilen Filter [*Spritzenvorsatzfilter Qualilab[®], ETO sterilisiert, 0,45 μ m CM Membran, Merck Labor und Chemie Vertrieb GmbH, Bruchsal, D*] in ein steriles 50ml Tube gegeben. Diese Lösung wird mit 40ml α -MEM + 1% P/S aufgefüllt.

Den Calvarien wurde zunächst 10ml der Enzymlösung zugefügt. Die anschließende Inkubation erfolgte über 10 Minuten im Rüttler [*GFL[®] Schüttelinkubator, Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, D*] bei 180rpm und 37°C. Die nun getrübbte Lösung wurde vorsichtig mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Der beschriebene Schritt wiederholte sich noch vier mal. Die Überstände der 3.–5. Inkubation wurden allerdings nicht verworfen, sondern in einem sterilen 50ml Tube auf Eis gesammelt, wobei eine Trübung der gewonnenen Lösung auf das Vorhandensein von Zellen schließen ließ.

Nachdem die gewonnene Flüssigkeit durch einen sterilen Filter [*BC Falcon Filter, 40 μ m Nylon Zellsieb, Becton Dickinson Biosciences Discovery Labware*] in ein weiteres steriles 50ml Tube gekippt wurde, erfolgte die Zentrifugation [*Heraeus Instruments, Biofuge primo, Kendro Laboratory Products, Hanau, D*] bei 800rpm und 4°C für 5 Minuten. Das nun erhaltene Zellpellet wurde nach dem Absaugen des Überstandes in α -MEM + 1% P/S und 10% FBS resuspendiert.

Schließlich wurden die Knochenersatzmaterialien durch Absaugen mit der Wasserstrahlpumpe vom Inkubationsmedium befreit und die resuspendierten Osteoblasten konnten mit je 1ml Suspension auf die Prüfsubstanzen gegeben werden. In jedem "six-well-plate", mit Ausnahme des Ansatzes für die Schliffpräparate, wurde außerdem ein "well" zusätzlich mit 1ml der Zelllösung beimpft. Dies diente jeweils als Kontrolle für die später folgenden Versuche. Alle mit Zellen versehenen "wells" wurden mit 8ml Medium aufgefüllt. Maßstab für das

Volumen war die Sicherstellung der vollständigen Bedeckung der Prüfsubstanzen. Außerdem wurde ein "well" zusätzlich mit α -MEM versehen. Dies diente der Kontrolle des Medium-pH Wertes in der Langzeitzellkultur.

Die Menge der aufgebrauchten Osteoblasten wurde durch die Bestimmung der Zellzahl in der Neubauer Zählkammer [$0,0025\text{mm}^2$, Tiefe $0,1\text{mm}$, Neubauer; Labor Optik] kontrolliert. $10\mu\text{l}$ der hergestellten Zellsuspension sind unter dem Auflichtmikroskop [Axiovert 25, Zeiss] hinsichtlich ihres Osteoblastenanteils untersucht worden. Es ergab sich eine durchschnittliche Zellzahl von 27.500 Osteoblasten pro ml Medium auf dem Knochenersatzmaterial bzw. in der Kontrolle.

Die Methode des direkten Ausplattierens der Osteoblasten auf die Ersatzmittel nach der Präparation der Mäusecalvarien ergab sich aus einigen Vorversuchen. Es ergab sich dabei das Problem, daß kein Passagieren der primären Zellen möglich war, da diese bereits im subkonfluenten Zustand einen so starken Verband ausbildeten, der sich nicht durch die Anwendung von Trypsin / EDTA lösen ließ. Eine erfolgreiche Anwendung einer Trypsin / EDTA – Lösung konnte nur bei Zellen durchgeführt werden, die aus einer Präparation gewonnen wurden, in der das Chondrocranium am Calvarium belassen wurde und die Kultur somit keine reinen Osteoblasten enthielt.

3.4 Aufrechterhaltung der Zellkultur: Zellkulturmedium, Kulturbedingungen, Mediumwechsel

Das verwendete Kulturmedium

Das Zellkulturmedium α -MEM wurde aus 10,5g Pulver in 1l destilliertem Wasser in einem Zylindergefäß hergestellt. Das Auflösen erfolgte mit Hilfe eines Magnetrührers [*Magnetrührwerk MR 82, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, D.*]. Weiterhin wurden 2,2g Natrium Bicarbonat hinzugefügt. Dem Vorgang schloß sich die Einstellung des pH-Wertes auf 7,4 mittels eines pH-Meters [*Mettler Toledo pH Meter MP 200, Mettler Instruments AG, Greifensee-Zürich, CH*] an. Das gelöste Medium wurde nun unter der sterilen Werkbank durch einen sterilen Filter [*Falcon® Bottle Top Filter 150ml, 0,22 μ m Celluloseacetat Membran, Becton Dickison Labware*] unter Verwendung eines Vakuums gegossen und dabei auf zwei 500ml Glasflaschen verteilt. Deren Sterilisation erfolgte zuvor im Autoklaven. Dem fertigen Medium wurde schließlich 1% P/S sowie 10% FBS hinzugefügt. Das α -MEM konnte bis zum vollständigen Verbrauch im Kühlschrank bei +4°C gelagert werden.

Kulturbedingungen

Die Osteoblastenkulturen in den "six-well-plates" wurden während der gesamten Versuchszeit von 28 Tagen im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 95% rH gelagert. Weiterhin erfolgte eine tägliche Kontrolle von Vitalität und Proliferations- bzw. Differenzierungsgrad der Zellen im Auflichtmikroskop bei 100facher Vergrößerung.

Mediumwechsel

Der Wechsel des Kulturmediums erfolgte das erste Mal 24 Stunden nach dem Ausplattieren der Zellen, anschließend alle 48 Stunden. Zu diesem Zweck wurde das Medium unter der sterilen Werkbank mit einer Wasserstrahlpumpe vorsichtig jeweils am Rand des "wells" abgesaugt, ohne den bereits nach einigen Tagen deutlich ausgebildeten Zellrasen zu zerstören. Hierzu dienten Glaspipetten, die zuvor im Autoklaven sterilisiert worden waren. Danach konnte mit Hilfe von 25ml

Pipetten das frische Medium langsam auf die Kultur geträufelt werden. Es handelte sich hierbei, wie oben bereits erwähnt, um 8ml je "well".

Ab dem 3. Mediumwechsel, also am 5. Tag der Zellkultur, wurde der Nährlösung jedes Mal 10mM β -Glycerophosphat [*β -Glycerophosphate Disodium Salt, Hydrate, Cat.Nr. G-9891, SIGMA-Aldrich Inc.*] und 50 μ g/ml Ascorbat [*L-Ascorbic Acid, Cat.Nr. A-4034, SIGMA-Aldrich Inc.*] hinzugefügt. Zu diesem Zweck sind von beiden Stoffen vorher 1ml Aliquots angefertigt worden. Beides liegt in Pulverform vor. 250mg Ascorbat und 10,8g β -Glycerophosphat wurden separat abgewogen, jeweils in 50ml PBS gelöst, mit einer Spritze aufgezogen und danach durch einen sterilen Filter [*Spritzenvorsatzfilter Qualilab[®]*] in ein steriles 50ml Tube gegeben. Schließlich konnten die Lösungen jeweils in sterile 1ml Tubes [*Cryo tube 1ml, greiner bio-one*] abgefüllt werden. Die Lagerung erfolgte bei -20°C . Kurz vor jedem Mediumwechsel sind pro 100ml α -MEM von beiden Lösungen je 1ml aufgetaut und der Nährlösung hinzugefügt worden.

3.5 Dokumentation der Osteoblastenproliferation im Auflichtmikroskop

Die Proliferation der kultivierten Osteoblasten während des Untersuchungszeitraumes sowie Änderungen der Morphologie wurden durch Anfertigung von digitalen Fotografien im Lichtmikroskop dokumentiert. Zur Darstellung des Verlaufs der Zellkultur erfolgte die Ablichtung zum ersten Mal nach Erreichen der Konfluenz der Zellen am Tag 4 und schließlich am Ende des Experimentes am Tag 28. Die Fotografien wurden bei 100facher und 200facher Vergrößerung angefertigt. An das verwendete Mikroskop [*Axiovert 25, Zeiss*] konnte eine Digitalkamera angeschlossen und die Bilder darauf gespeichert werden. Abgebildet wurde zu beiden genannten Zeitpunkten jeweils der Zellrasen direkt um das Biomaterial herum sowie die Kultur an einer weiter entfernten Stelle im "well". Außerdem erfolgte auch die Dokumentation der Kontrollkultur in Abwesenheit einer Prüfsubstanz.

3.6 pH – Metrie

Bei jedem Mediumwechsel wurde der pH-Wert des Zellkulturmediums gemessen. Die Bestimmung erfolgte immer aus der gleichen Kulturschale, also aus einem Ansatz, der für 28 Tage vorgesehen war. Aus den für die pH-Metrie vorgesehenen "six-well-plates" wurde das Kulturmedium nicht mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt, sondern mit einer sterilen 5ml Pipette vorsichtig aufgenommen und in ein 15ml Tube [*Falcon® 15ml Röhrchen, Polypropylen Blue Max™, Becton Dickinson Labware*] überführt. Dies erfolgte für die Nährlösung aller 4 Ersatzmittel, der Osteoblastenkontrolle ohne Anwesenheit eines Biomaterials und des Mediums, das ohne Anwesenheit von Zellen im "six-well-plate" inkubiert wurde. Somit ergaben sich insgesamt 6 Proben, deren pH-Wert mittels pH-Meter direkt bestimmt werden konnte. Außerdem erfolgte vor jedem Wechsel eine Kontrolle des pH-Wertes des neuen Kulturmediums. Lag dieser außerhalb des physiologischen Bereiches von 7,2 - 7,6, so wurde das Medium erneuert.

3.7 Färbungen der Osteoblasten in der Zellkultur

Nachweis von alkalischer Phosphatase mittels Enzymfärbung

Die Expression von alkalischer Phosphatase durch die Osteoblasten wurde am 7. Tag der Zellkultur mit einer Enzymfärbung nachgewiesen. Ihre Durchführung erfolgte direkt in den "six-well-plates". Nach dem Absaugen des Zellmediums mit der Wasserstrahlpumpe konnten die Prüfkörper zunächst mit einer Pinzette aus dem "well" entfernt werden. Nach zweimaligem Spülen mit PBS folgte die Fixierung mit 3,7%igem Formaldehyd, verdünnt in PBS, für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurde dreimal für 5 Minuten mit PBS gewaschen. Nun konnte die Farblösung aufgebracht werden. Die Inkubation erfolgte für 20 Minuten bei Raumtemperatur. Die Reaktion wurde durch Waschen mit destilliertem Wasser gestoppt.

Für die Farblösung, die direkt vor der Anwendung angesetzt wurde, mußte zunächst ein 0,1M Trizma Hydrochlorid Puffer, pH 8,5, hergestellt werden. Diesem

wurde dann 2mM MgCl₂ zugesetzt. Weiterhin wurde ein Gemisch aus 0,1mg/ml Naphtol ASMX Phosphat und 0,5% N,N Dimethyl Formamide gefertigt, das ebenfalls in den Puffer gegeben wurde. Die Zugabe von 0,6 mg/ml Fast Blue BB Salt [*Fast Blue BB Salt, Cat.Nr. F-3378, SIGMA-Aldrich Inc.*] erfolgte zuletzt, da dessen Reaktionszeit nur 30 Minuten beträgt.

Schließlich konnten die Glas-coverslips mit den darauf gefärbten Zellen unter Zuhilfenahme von zwei Skalpellklingen aus dem "well" genommen und mit einem Einschlußmittel [*DPX Mountant for Histology, Cat.Nr.44581, Fluka/SIGMA-Aldrich Inc.*] auf Objektträger geklebt werden.

Kollagennachweis mittels van Gieson - Färbung

Die Darstellung der Kollagenexpression durch die kultivierten Osteoblasten wurde nach Abschluß der 2. Woche der Zellkultur durchgeführt. Nach Entfernung des Kulturmediums und der Knochenersatzmittel erfolgte zunächst eine Spülung mit PBS. Anschließend wurde auf den Zellrasen eine vorbereitete van Gieson – Färbelösung pipettiert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Die van Gieson – Färbelösung besteht aus 2,5g Fuchsinsäure, 5ml konzentrierter Salpetersäure, 100ml Glycerin und 900ml gesättigter Pikrinsäure.

Nach einer Spülung mit Leitungswasser durch mehrmaliges Aufträufeln und Absaugen wurde abschließend mit 96%igem Ethanol solange gespült, bis keine Farbschlieren mehr sichtbar waren.

Die Glas-coverslips konnten schließlich nach Entfernung aus den "six-well-plates" ebenfalls mit dem Kleber auf Objektträger gebracht werden.

Nachweis mineralisierter extrazellulärer Matrix nach von Kossa

Um die mineralisierte extrazelluläre Matrix darstellen zu können, wurden die kultivierten Osteoblasten nach 4 Wochen Zellkultur mit einer von Kossa - Versilberung behandelt. Der Vorgang erfolgte ebenfalls noch in den "six-well-plates". Nach dem Entfernen des Mediums und der Biomaterialien wurde zunächst mehrmals mit destilliertem Wasser gespült. Als nächsten Schritt schloß sich eine 10minütige Inkubation mit einer 5%igen Silbernitratlösung, verdünnt in destilliertem Wasser, an. Nach weiteren Spülvorgängen mit destilliertem Wasser folgte die Entwicklung unter UV-Licht für ebenfalls 10 Minuten. Nach der anschließenden Fixierung mit einer 5%igen Natrium-Thiosulfatlösung für 5 Minuten und einer letzten Spülung mit Leitungswasser konnten die Glas-coverslips, wie oben beschrieben, zur Betrachtung auf Objektträger gebracht werden.

Alle gefärbten Präparate wurden im Durchlichtmikroskop [*Axioskop 2, Zeiss*] analysiert und mit einer angeschlossenen Kamera [*Axio Cam, Zeiss*] bei 200facher Vergrößerung dokumentiert.

3.8 Anfertigung von Schliffpräparaten der Biomaterialien

Um das Interface zwischen dem Knochenersatzmittel und den Osteoblasten beurteilen zu können, wurden unentkalkte Schliffpräparate angefertigt und gefärbt. Jeweils nach 7, 14 und 28 Tagen Zellkultur sind die Prüfkörper zu diesem Zweck aus der Kultur entfernt worden. Zunächst wurde das Medium mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt, danach folgte eine Spülung mit PBS. Nun konnten die Materialien mit einer Pinzette aus dem "well" genommen und in ein neues "plate" überführt werden. Die Trennung der Prüfkörper von dem umliegenden Zellrasen erfolgte mit einer Skalpellklinge.

Entwässerung und Infiltration

Nun wurden die Blöcke mit 70%igem Ethanol vollständig bedeckt und für 2 Tage bei +4°C gelagert. Es folgte eine aufsteigende Alkoholreihe um jeweils 10% im 48 Std. Rhythmus bei weiterer Aufbewahrung im Kühlschrank. Nach der letzten Entwässerung wurden die Präparate in Infiltrationskapseln [*medite Megakassette 40x28x12mm*] überführt und zunächst für 3 Tage in ein Ethanol / Technovit – Gemisch (1:1) gelegt. Die weitere Infiltration erfolgte in gleicher Weise noch zwei mal für reines Technovit [*lichthärtender Einkomponentenkunststoff / Methacrylatbasis, Technovit® 7200 VCL, Heraeus*], ebenfalls über 72 Stunden.

Einbettung

Im nächsten Schritt konnten die Blöcke eingebettet werden. Zu diesem Zweck wurden sie in Technovit für ca. 20 Stunden in einem Lichtpolymerisationsgerät [*EXAKT 520, EXAKT Gerätebau, Norderstedt, D.*] gelagert, um eine Aushärtung der Flüssigkeit zu erreichen. Überschüssiges Technovit ließ sich anschließend mit der elektrischen Knochensäge entfernen.

Schleifen

Als Vorbereitung für den eigentlichen Schleifvorgang sind die Blöcke mit einem Drei - Komponenten - Kunststoff [*Technovit® 4000, Heraeus*] auf einen Objektträger geklebt worden. Es ließen sich je 4 Prüfkörper dicht nebeneinander auf einen Objektträger stellen. Zur Gewährleistung der Parallelität der gegenüber liegenden Seiten erfolgte das Planparallelschleifen mit einem Rotationsschleifgerät [*EXAKT 400 CS, EXAKT Gerätebau, Norderstedt, D.*]. Es wurde an dieser Stelle eine p800 Schleifscheibe [*Hermes WS-Flex 18-C p800, ø270mm*] benutzt. Ein zweiter Objektträger ließ sich nun auf die freie Ebene mit einem Einkomponenten-Präzisionskleber [*Technovit® 7210 VCL, Heraeus*] mit Hilfe einer Vakuum Klebepresse [*EXAKT 402, EXAKT Gerätebau, Norderstedt, D.*] bringen. Nach etwa 20 Minuten konnte durch Anlegen eines Vakuums an der Säge eine Trennung der beiden Objektträger erreicht werden. Ein gleichmäßiges Oszillieren der Probe während des Sägevorganges ließ somit eine fehlerfreie Ebene zu. Die gewünschte Schichtdicke der Präparate betrug 150µm.

Vorversuche zeigten, daß sich bei einer geringeren Schichtdicke von etwa 100µm die Dentinpräparate im Rahmen des folgenden Schleifvorganges vom Objektträger lösen.

Um nun die eigentlichen Schliffpräparate mit einer gewünschten Dicke von 60-80µm anzufertigen, wurde auf dem Schleifgerät eine feine Schleifscheibe [*Hermes WS-Flex 18-C p1200, ø 270mm*] verwendet. Auch hier zeigten Vorversuche, daß dünnere Schriffe für Dentin nicht in Frage kommen, 60-80µm jedoch auch für die Darstellung der anderen Materialien und ihrem Zell-Interface ausreichend sind.

Nach der Kontrolle der Schichtdicke mit der Mikrometerschraube [*SMT[®]-Messzeuge*] mußten die Schliffpräparate noch mit einer Silikonscheibe [*Hermes Silicon Carbide 1200/4000*] poliert werden, bevor die beiden verschiedenen Färbungen folgen konnten. Es wurden daher von jedem Präparat zwei Schriffe angefertigt.

Färbungen

Die Darstellung des Knochenersatzmaterial – Zell – Interface auf den Schliffpräparaten erfolgte sowohl mittels von Kossa / van Gieson Färbung als auch durch Toluidinblaufärbung.

Im ersten Schritt der von Kossa / van Gieson Färbung wurden die Objektträger in einem geeigneten Ständer für 5 Minuten in 30%iges H₂O₂ gestellt. Nach einem kurzen Eintauchen in destilliertes Wasser folgte die Inkubation der Schriffe für weitere 5 Minuten in AgNO₃. Diesem Schritt schloß sich eine 10minütige Phase in Aqua dest. an. Nach folgenden 5 Minuten in Sodaformol mußten die Objektträger für 10 Minuten unter fließendes Leitungswasser gestellt werden. Dieser Spülvorgang wiederholte sich nach vorheriger Inkubation der Präparate für 5 Minuten in Natrium-Thiosulfat. Schließlich konnten die Objektträger 20 Minuten in einem van Gieson Gemisch (s.o.) gefärbt werden. Nach einem abschließenden kurzen Eintauchen in Leitungswasser erfolgte die Trocknung der Schriffe durch Aufstellen der Objektträger bei Raumtemperatur.

Auch für die Toluidinblaufärbung wurden die Schliffpräparate zunächst über 5 Minuten in 30%igem H_2O_2 inkubiert. Die Färbung folgte nach einem kurzen Eintauchen der Objektträger in destilliertes Wasser. Die Inkubation im Toluidinblau wurde im Wärmeschrank bei $60^\circ C$ für etwa 30 Minuten durchgeführt. Die Blaufärbung ließ sich direkt bei Betrachtung der Objektträger mit dem bloßen Auge beurteilen. Bei geringer Färbung der Schliffe wurde die Einwirkzeit entsprechend verlängert. Abschließend folgte eine Spülung in Aqua dest. durch mehrmaliges Eintauchen der Präparate und die Trocknung der Schliffe wie oben beschrieben.

Die gefertigten Schliffpräparate konnten im Durchlichtmikroskop betrachtet und mit der AxioZeiss – Kamera bei 200facher Vergrößerung fotografiert werden.

3.9 Quantitativer Nachweis exprimierter alkalischer Phosphatase: Messung der Absorption von p-Nitrophenylphosphat im Photometer

Die quantitative Messung der exprimierten alkalischen Phosphatase durch die Osteoblasten wurde nach den Zeitpunkten 7, 14 und 28 Tage Zellkultur durchgeführt. Nach dem Absaugen des Mediums mit der Wasserstrahlpumpe und dem Entfernen der Prüfsubstanzen mit einer Pinzette sowie vorsichtigem Lösen des anhaftenden Zellrasens mit der Skalpellklinge wurden alle "wells" zunächst zweimal mit eisgekühltem PBS gespült. Dies gilt ebenfalls für die Kontrollkultur in Abwesenheit eines Biomaterials. Anschließend folgte das Aufbringen von genau 1ml kaltem PBS auf jede Probe. Die Zellen mußten nun noch mit einem Gummispatel [*Falcon[®] Cell Scraper, Becton Dickinson Labware*] vom Boden gelöst werden. Danach konnte die Zellsuspension mit der Pipette in ein 1,8ml Tube [*Cryo tube 1,8ml, greiner bio-one*] auf Eis überführt werden.

Die Homogenisierung der Zellsuspension erfolgte, unter Sicherstellung der Kühlung der Röhrchen im Eisbad, für 15 Sekunden im Ultraturrax [*IKA-ULTRATURRAX[®] T25 basic, IKA[®] GmbH & Co. KG, Staufen, D.*]. Die Proben der ersten beiden Zeitpunkte konnten bis zur Beendigung der 28 Tage Zellkultur bei $-20^\circ C$

gelagert werden. Die Messung der alkalischen Phosphatase wurde schließlich für alle 15 Proben gleichzeitig durchgeführt.

Für die photometrische Messung der alkalischen Phosphatase in den Zellsuspensionen mußte zunächst eine 2,5N Natriumhydroxidlösung, ein Puffer und die Substratlösung hergestellt werden.

Der Puffer setzte sich aus 5,26g Diethanolamin, 0,05ml Triton-X-100 und insgesamt 499,95ml Aqua dest. zusammen, Der pH-Wert betrug 9,8.

Die Substratlösung wurde direkt vor ihrer Anwendung angesetzt, da ihre Aktivität bei Lichteinfall sofort abnimmt. Für die Lösung mußten 45mg p-Nitrophenylphosphat [*p-Nitrophenyl Phosphate Tablets, 15mg substrate/tablet, Cat.Nr. N-2640, SIGMA-Aldrich Inc.*] in 10ml Puffer gelöst werden. Das fertige Substrat konnte durch Umwicklung der zur Mischung verwendeten Glasflasche mit Aluminiumfolie vor Helligkeit geschützt werden.

Nach dem Auftauen der eingefrorenen Proben bei Raumtemperatur wurde die Reaktionslösung direkt in vorbereitete Küvetten [*Eppendorf UVette[®], 220-1600nm, 50-2000µl, Eppendorf AG, Hamburg, D.*] pipettiert. Sie setzte sich aus jeweils 200µl vorgelegter Zellsuspension und 500µl Substratlösung zusammen. Die Reaktion wurde nach 3 Minuten Inkubation mit jeweils 200µl 2,5N NaOH gestoppt. Für jede Probe existierte außerdem ein vorbereiteter Leerwert. Hierzu wurden in die Küvetten erst 200µl NaOH vorgelegt und anschließend jeweils 500µl Substrat und 200µl Probe zugefügt.

Nun konnte die Absorption des reagierten p-Nitrophenylphosphates bei 405nm im Photometer [*Ultrospec 2100pro UV/Visible Spectrophotometer, amersham pharmacia biotech by Biochrom Ltd., Cambridge, UK*] gemessen werden. Bei der Messung diente der Leerwert jeder einzelnen Probe als Referenz. Zur Bestimmung des Gehaltes an alkalischer Phosphatase (AP) in den Proben wurde eine Kontrollmessung einer bekannten AP-Menge durchgeführt. Hierzu konnte alkalische Phosphatase aus intestinaler Kälbermukosa [*Phosphatase alkaline from calf intestinal mucosa, 1,26U/mg, Cat.Nr. 79392, Fluka/SIGMA-Aldrich Inc.*]

verwendet werden. Das Pulver ließ sich in PBS lösen und konnte nach Herstellung einer Verdünnungsreihe unter gleichen Bedingungen wie oben beschrieben hinsichtlich der Absorption von umgesetztem Substrat im Photometer gemessen werden. Die Bestimmung der alkalischen Phosphatase in den Proben erfolgte rechnerisch, bezogen auf den Gesamtproteingehalt der Zellsuspension.

3.10 Semiquantitativer Nachweis der Gen - Expression mittels RT - PCR

RNA - Isolierung

Zu den bereits angegebenen Zeitpunkten 7, 14 und 28 Tage Zellkultivierung erfolgte der Nachweis der Expression von Osteocalcin, alkalischer Phosphatase und Bone Sialo Protein durch die Osteoblasten. Zu diesem Zweck wurden die vier Prüfkörper nach einem Spülvorgang mit PBS mit einer Pinzette aus den "plates" genommen und in ein 12ml Röhrchen [*PP-Tube, 12ml, greiner bio-one*] gelegt. In dieses wurden anschließend 1,5ml Trizol [*TRIZOL[®] Reagent, Invitrogen Life Technologies*] pipettiert. Die Kontrolle der Osteoblasten ohne Anwesenheit eines Knochenersatzmaterials wurde ebenfalls mit PBS gespült und direkt im "well" mit 1,5ml Trizol bedeckt. Nach einer Inkubationszeit von 3-5 Minuten bei Raumtemperatur konnte die Phenollösung durch gleichzeitiges homogenisieren mit der Pipette aufgenommen und in ein autoklaviertes 2ml Tube [*Safe-Lock Tube, 2ml, Eppendorf AG*] überführt werden. Die Lagerung der Proben nach 7 und 14 Tagen erfolgte bei -80°C . Nach Erreichen des letzten Zeitpunktes konnten dann alle Lösungen gleichzeitig weiter bearbeitet werden, so daß für die RNA-Isolierung aller Proben möglichst gleiche Bedingungen vorherrschten.

Nach dem Auftauen der Proben bei Raumtemperatur wurden in jedes Tube zunächst 300µl Chloroform gegeben. Nach gutem Mischen mit der Hand und einer Inkubationszeit von 2-3 Minuten folgte die erste Zentrifugation zur Phasenteilung bei 13.000 rpm und 4°C für 15 Minuten [*Biofuge fresco, Heraeus Instruments*]. Danach konnte die sichtbare wässrige Phase, etwa 900µl, in ein neues, steriles 2ml Tube transferiert werden. Nach der Zugabe von 750µl Isopropanol für die Alkoholfällung und erneutem Mischen von Hand folgte wieder eine Inkubation bei

Raumtemperatur über 10 Minuten. Die Proben wurden nun für 10 Minuten bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert.

Im nächsten Schritt ließ sich der Überstand vorsichtig mit einer 1000µl Pipette entfernen. Es schloß sich ein Waschvorgang mit 1ml 75%igem Ethanol/DEPC [*Wasser DEPC-treated, autoklaviert, filtriert durch 0,2µm Membranfilter, Cat.Nr.95284, Fluka/SIGMA-Aldrich Inc.*] an, um noch vorhandene Salze zu entfernen. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4°C für 5 Minuten konnte der Überstand erneut mit der Pipette abgesaugt werden. Befanden sich nun noch Alkoholreste im Tube, mußte eine letzte Zentrifugation über ca. 3 Minuten durchgeführt werden, bevor das sichtbare Pellet mit Hilfe der Pipette von jeglicher Flüssigkeit befreit werden konnte. Erst das völlig trockene RNA-Pellet wurde schließlich in 30µl DEPC-Wasser gelöst.

Bestimmung der RNA - Menge

Für die Bestimmung der RNA-Konzentration in jeder Probe sind zunächst *Eppendorf Küvetten* mit 996µl DEPC-Wasser befüllt worden. Je 4µl gelöste RNA wurde dazu gegeben. Die Absorption der Proben wurde bei 260nm im Photometer gemessen. 1ml DEPC-Wasser diente als Leerwert. Die Ermittlung der RNA-Konzentration in µg/µl erfolgte rechnerisch aus der bestimmten Absorption (s. Kap. 4.6).

cDNA - Synthese mit einer Reversen Transkriptase

Aus der fertigen RNA konnte nun cDNA mit Hilfe eines Synthese Kit [*Cloned AMV First-Strand cDNA Synthesis Kit, Cat.Nr. 12328-040, Invitrogen Life Technologies*] hergestellt werden. Aus einigen Vorversuchen ergab sich als geeigneten Einsatz für die cDNA Synthese eine Menge von 100ng RNA. Diese wurde in einem ersten Schritt zusammen mit einem Oligo(dT)₂₀ Primer, einem 10mM dNTP Mix und DEPC-Wasser für 5 Minuten bei 65°C in autoklavierten 500µl Tubes denaturiert. Anschließend folgte die Zugabe der Reaktionslösung, die kurz zuvor in Form eines sogenannten "Master Mix" hergestellt wurde, der folgende Komponenten enthielt: 5x cDNA Synthese Puffer, 0,1M DTT, RNaseOUT™ (40U/µl), DEPC-Wasser

sowie die Cloned AMV Reverse Transkriptase (15units/ μ l). Die entstandene Lösung mit einem Gesamtvolumen von 20 μ l konnte nun für 50 Minuten bei 50°C im Thermo Cycler [*T3 Thermoblock, Biometra® biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen, D.*] inkubiert werden. Danach schloß sich noch ein 5minütiger Inkubationsschritt bei 85°C an.

Alle hier verwendeten Chemikalien und Reaktionslösungen waren Bestandteil des oben genannten Cycle Kits.

Die fertige cDNA ließ sich direkt für die folgende Polymerase - Kettenreaktion verwenden bzw. bei -20°C lagern.

Polymerase - Kettenreaktion

Da das Ziel dieser Untersuchung der Vergleich der einzelnen Proben hinsichtlich der eventuell unterschiedlichen Genexpression durch die Osteoblasten sein sollte, mußte zunächst eine Angleichung der einzusetzenden cDNA-Menge voran gestellt werden. Zu diesem Zweck wurde die PCR zuerst für das Gen GAPDH [Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase], einem Enzym aus der Glykolyse, durchgeführt, da dieses von (fast) jeder eukaryonten Zelle in gleicher Weise exprimiert wird. Nach dem Ermitteln der je Probe nötigen cDNA Menge für die Darstellung gleicher GAPDH - Banden konnten anschließend entsprechende Primer für Tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNSALP), Bone Sialo Protein (BSP) und Osteocalcin (Bone GLA protein = BGP) in der PCR eingesetzt werden.

Die Polymerase - Kettenreaktion setzte sich aus folgender Reaktionslösung zusammen: 5mM dNTP Mix, 10x PCR Puffer [*PCR reaction buffer 10x, Cat.Nr.1271318, Roche Diagnostics GmbH*], je ein 2 μ M forward und reverse Primer, DEPC-Wasser sowie eine Polymerase [*Taq DNA Polymerase, 5U/ μ l, Cat.Nr.1435094, Roche Diagnostics GmbH*]. Die Lösung wurde ebenfalls nach Herstellung eines "Master Mix" auf die in vorbereitete Reaktionsgefäße [*PCR Softstripes, 0,2ml, Biozym®*] vorgelegte cDNA gegeben. Das Gesamtvolumen betrug 20 μ l.

Die nun folgende Reaktion wurde im Thermo - Cycler durchgeführt. Das gewählte Programm begann mit einer 4minütigen Inkubation bei 94°C zur Denaturierung. Die folgenden drei Schritte, ein Intervall von 15 Sekunden bei 95°C, 15 Sekunden bei 58°C sowie 1 Minute bei 72°C, wurden 35 mal wiederholt. Anschließend folgten weitere 10 Minuten Inkubation bei 72°C zur Sicherstellung der Synthese eventuell wieder zusammen gelagerter Stränge. Die fertige Reaktion konnte bei 4°C im Thermo - Block gehalten werden.

Die verwendeten Primer

GAPDH forward: 5' – GAC ATC AAG AAG GTC GTG AAG CAG – 3'

GAPDH reverse: 5' – CTC CTG TTA TTA TGG GGG TCT GG – 3'

Erwartetes PCR-Produkt: 361 bp

TNSALP forward: 5' – TGT TCC TGG GAG ATG GTA TGG G – 3'

TNSALP reverse: 5' – GGA TGG ATG TGA CCT CAT TGC C – 3'

Erwartetes PCR-Produkt: 285 bp

BSP forward: 5' – ACG CCA CAC TTT CCA CAC TCT C – 3'

BSP reverse: 5' – TCA TCC ACT TCT GCT TCT TCG TTC – 3'

Erwartetes PCR-Produkt: 211 bp

BGP forward: 5' – TCC AAG CAG GAG GGC AAT AAG – 3'

BGP reverse: 5' – GCG TTT GTA GGC GGT CTT CAA G – 3'

Erwartetes PCR-Produkt: 162 bp

Gelelektrophorese

Zur Darstellung der jeweiligen Genexpression diente eine Gelelektrophorese. Das Gel wurde aus 2% Agarose [*SeaKem® LE agarose, BioWhittaker Molecular Applications, Rockland, USA*] in Gelelektrophorese Puffer [*1x TAE Puffer (Tris Acetat EDTA)*] durch Lösen des Pulvers für 1-2 Minuten in der Mikrowelle hergestellt. Der Flüssigkeit wurden 5% Ethidiumbromid zugefügt. Anschließend

konnte das Gel in eine vorbereitete Kammer gegossen werden. Die Aushärtung war nach etwa 20 Minuten abgeschlossen und das Gel konnte in die Elektrophoresekammer [*Wide Mini Sub Cell[®] GT Agarose Gel Electrophoresis System, BIO·RAD Laboratories, München, D.*] gestellt und vollständig mit 1x TAE Puffer bedeckt werden. Jeder Reaktionslösung wurden 2µl Probenpuffer [*Gelladepuffer aus Bromphenolblau, Cat.Nr. B-8026, SIGMA und Xylencyanolblau, Cat.Nr. X-4126, SIGMA-Aldrich Inc.*] zugefügt. Es folgte der Transfer der gesamten Probelösung von 22µl in die bei der Aushärtung des Gels berücksichtigten Taschen. 10µl einer vorbereiteten Lösung als Marker für 100bp [*verdünnt aus 1kb plus DNA Ladder, 1µg/µl, Invitrogen Life Technologies*] wurde ebenfalls auf das Gel gebracht. Die Elektrophorese konnte nun bei einer angelegten Spannung von 100V [*Power Pac 200, Quick Reference Guide, BIO·RAD*] über etwa 20 Minuten durchgeführt werden.

Schließlich erfolgte die Betrachtung der gemäß ihrer Ladung gewanderten cDNA-Banden unter UV-Licht. Ein *Quantity One* PC Programm [*BIO·RAD*] ermöglichte die Speicherung der Abbildung.

4 Ergebnisse

4.1 Dokumentation der Osteoblastenproliferation im Auflichtmikroskop

Die Beurteilung der Osteoblastenproliferation und Morphologie wurde täglich im Lichtmikroskop nach subjektiven Kriterien durchgeführt. Avitale Zellen, die durch Schwimmen im Kulturmedium und Nicht - Anhaften an der Unterlage auffielen, waren im beschriebenen Versuchsansatz in Anwesenheit der Knochenersatzmaterialien nur in den ersten 48 Stunden nach dem Ausplattieren zu erkennen. Eine ungewöhnliche Zellmorphologie in Hinblick auf zu viele und zu große intrazelluläre Vakuolen war in allen Kulturen nur vereinzelt zu beobachten.

Die Abbildungen 4.1 – 4.5 zeigen die verschiedenen Osteoblastenkulturen in Anwesenheit der Biomaterialien sowie die Kontrollkulturen im Vergleich zwischen dem 4. Tag und dem 28.Tag des Experimentes. Die Zellen weisen in Anwesenheit aller Testsubstanzen sowie in der Leerkontrolle einen konfluenten Zellrasen auf. [“Konfluenz wurde als ununterbrochener Kontakt der Zellen innerhalb des wells definiert.“ [89]] Die Osteoblasten erscheinen zu Beginn des Versuches am 4.Tag der Zellkultur aufgrund ihrer länglichen Gestalt Fibroblasten sehr ähnlich. Im Verlauf der Untersuchung weisen sie aber eine Änderung der Morphologie zu kubischen Zellen auf. Der später beschriebene positive Osteocalcinnachweis sowie die Fähigkeit der Kalzifizierung der Knochenmatrix beweist, dass es sich bei den Zellen um Osteoblasten handelt.

Osteoblastenkultur in Anwesenheit von Endobon®

Abbildung 4.1 zeigt die kultivierten Osteoblasten in Anwesenheit der Hydroxylapatitkeramik Endobon®. Es lässt sich ein ungestörtes Zellwachstum bis an dessen Rand erkennen. Ein darüber hinaus gehendes Einwachsen in die Struktur der Keramik lässt sich, soweit anhand der lichtmikroskopischen Betrachtung möglich, bereits erahnen. Die gezeigten Ausschnitte der Zellkultur von einer dem Material entfernten Stelle lassen keine deutlichen Unterschiede der Zellproliferation erkennen. Die Osteoblasten wachsen in der gesamten Kulturschale gleich stark. Insgesamt ist im Vergleich der Zellkultur zwischen dem

4. und dem 28. Tag eine deutliche Zunahme der Osteoblasten bezüglich ihrer Anzahl und Dichte zu verzeichnen.

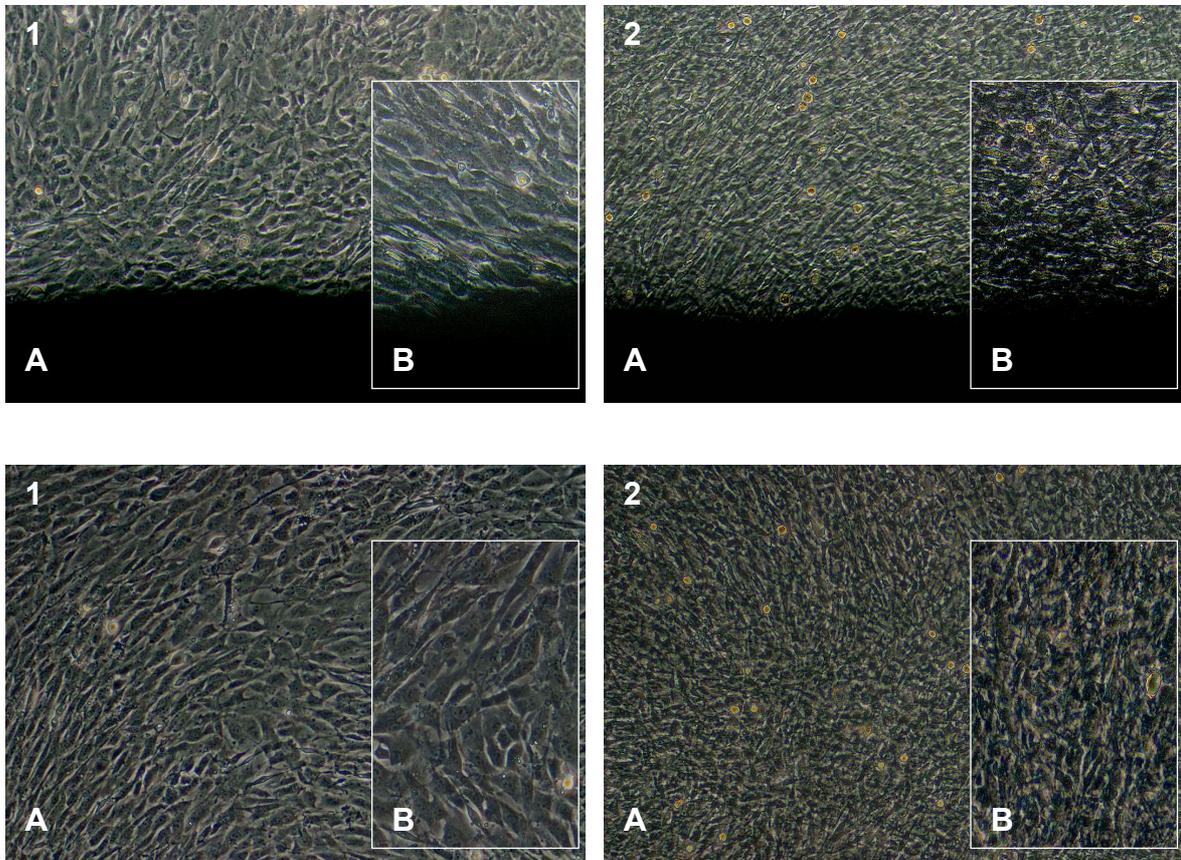


Abb. 4.1: Osteoblasten in Anwesenheit von Endobon® (1) Tag 4 (2) Tag 28; (A) x100 (B) x200

Osteoblastenkultur in Anwesenheit von Biobon®

Osteoblasten, die in Anwesenheit des Kalziumphosphatzementes Biobon® kultiviert wurden, umschließen das Biomaterial bereits nach 4 Tagen mit einem konfluenten Zellrasen. Im Verlauf des Untersuchungszeitraumes von 4 Wochen ist eine deutliche Vermehrung der Zellen eingetreten, so dass am letzten Tag der Zellkultur ein dichter Osteoblastenverband zu erkennen ist, der keinen Unterschied zwischen dem direkten Kontakt zum Knochenersatzmittel und der umliegenden Kultur aufweist.

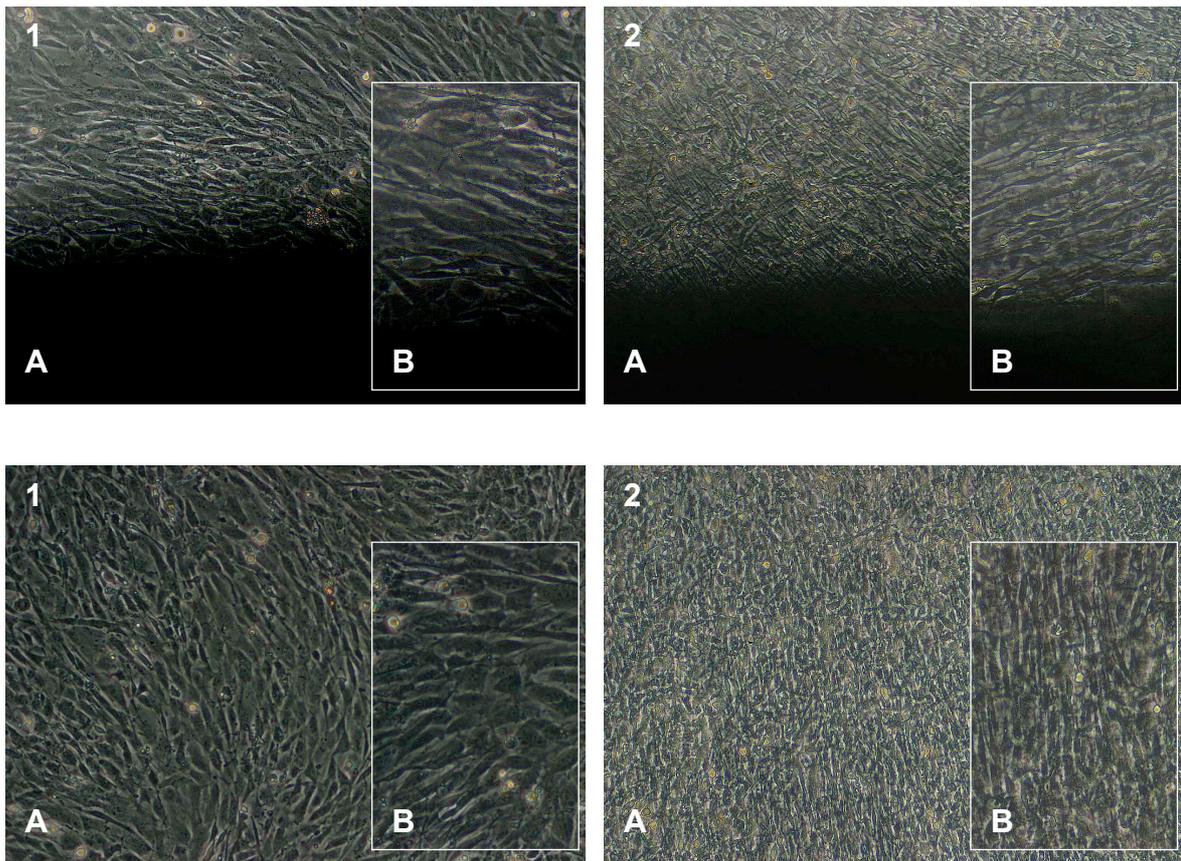


Abb. 4.2: Osteoblasten in Anwesenheit von Biobon[®] (1) Tag 4 (2) Tag 28; (A) x100 (B) x200

Osteoblasten in Anwesenheit von Calcibon[®]

Die Osteoblasten in Kultur mit dem Kalziumphosphatzement Calcibon[®] (s. Abb. 4.3) weisen zu Beginn des Versuches ein ähnliches Wachstumsverhalten wie die oben dargestellten Zellen in Anwesenheit von Endobon[®] und Biobon[®] auf. Auch hier ist ein konfluenter Zellrasen, der in unmittelbarer Nähe zu dem Prüfkörper und auch weiter entfernt keine wesentlichen Unterschiede in der Morphologie und dem Wachstumsverhalten der Osteoblasten aufweist.

Nach 28 Tagen Kultivierung der Zellen in Anwesenheit von Calcibon[®] läßt sich eine extrem starke Besiedelung des gesamten "wells" mit vor allem kubisch geformten Osteoblasten erkennen. Weiterhin scheint es, dass die Zellen vor allem in der unmittelbaren Umgebung des Zementes eine besonders hohe Dichte aufweisen. Diese Beurteilung bleibt allerdings subjektiven Kriterien vorbehalten.

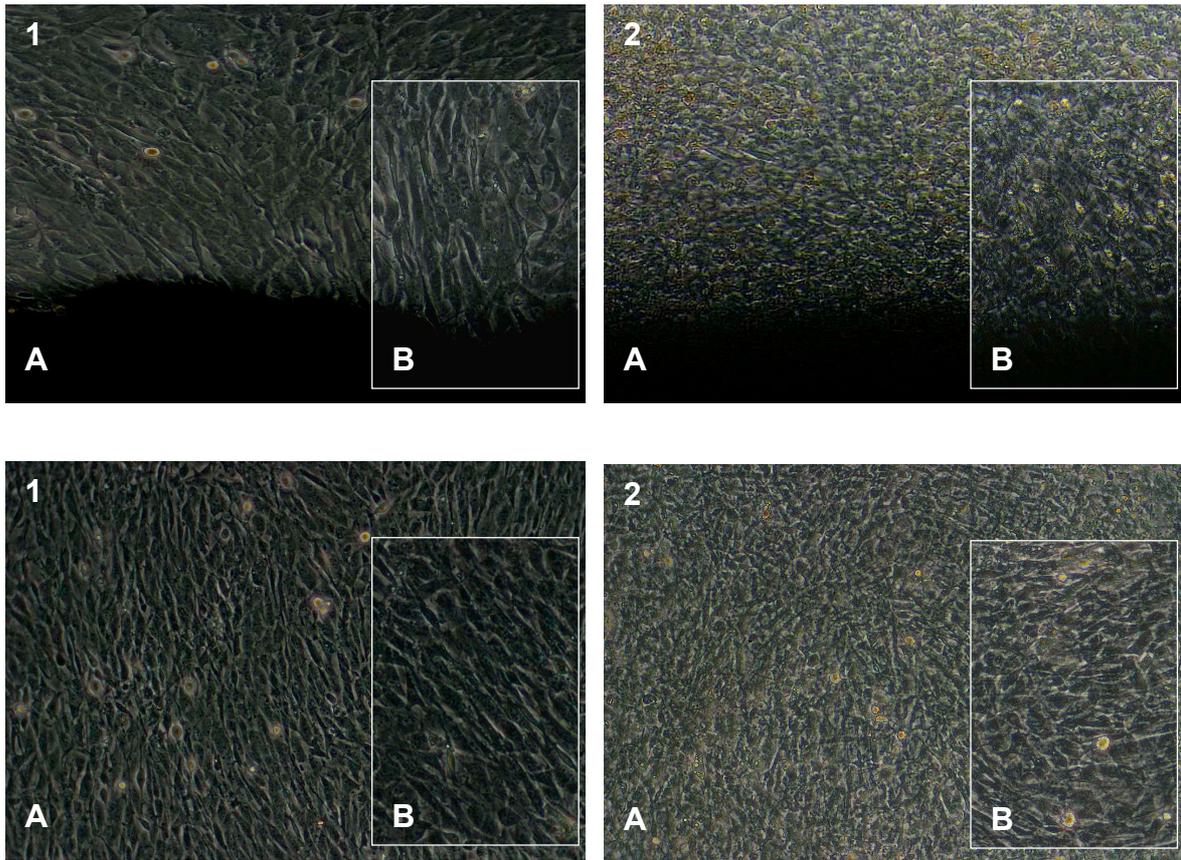


Abb. 4.3: Osteoblasten in Anwesenheit von Calcibon® (1) Tag 4 (2) Tag 28; (A) x100 (B) x200

Osteoblasten in Anwesenheit von Dentin

Obwohl Elfenbein keine Poren besitzt und es eine glatte Oberfläche hat, lässt sich auch um den Dentinkörper bereits zu Beginn der Zellkultur ein dichtes Zellwachstum erkennen. Die Osteoblasten im restlichen "well" sind ebenfalls konfluent.

Nach 28 Tagen Inkubation in Anwesenheit von Dentin weisen die Zellen ebenfalls eine starke Proliferation zu einem mehrschichtigen Zellrasen auf. Auch ein direktes Umschließen des Prüfkörpers ist sichtbar. Das Zellbild erscheint hier sehr dicht, allerdings im Vergleich zur umliegenden Kultur inhomogener.

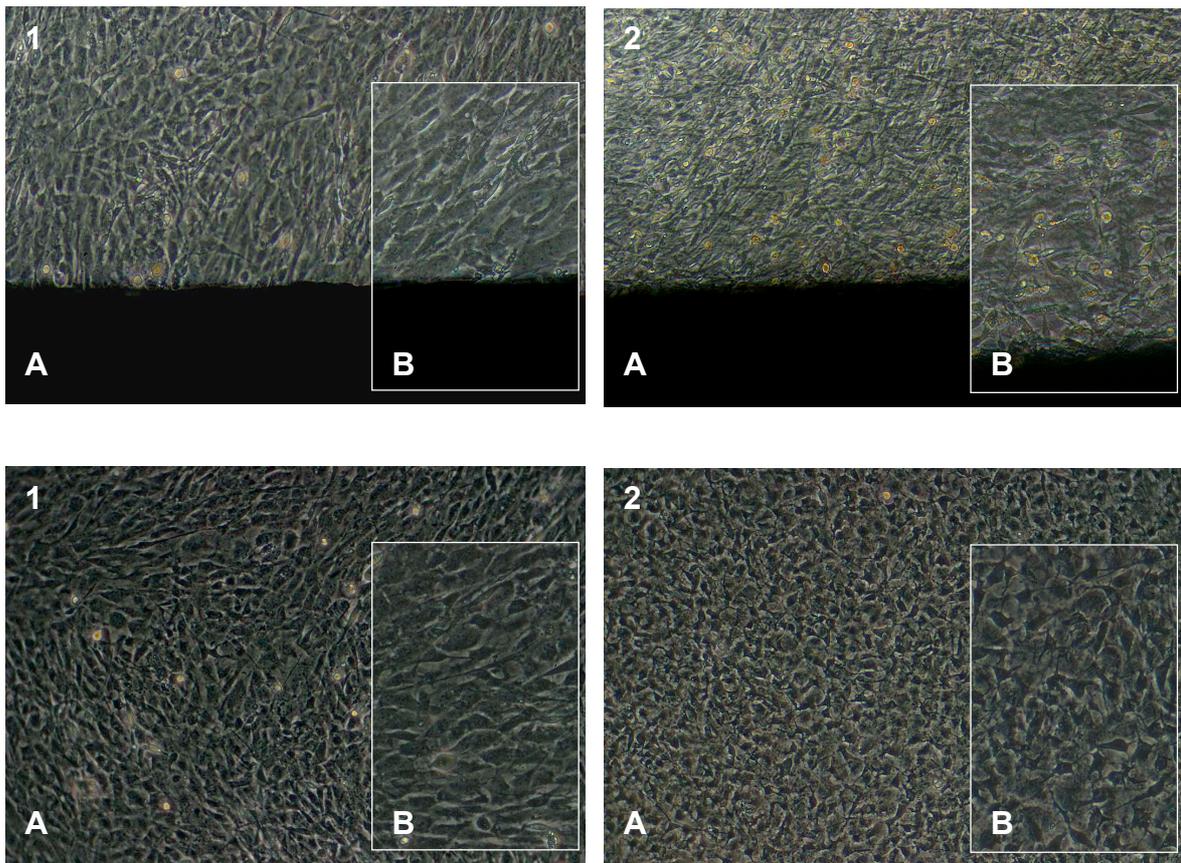


Abb. 4.4: Osteoblasten in Anwesenheit von Dentin (1) Tag 4 (2) Tag 28; (A) x100 (B) x200

Leerkontrolle der Osteoblasten ohne Anwesenheit eines Biomaterials

Kultivierte Osteoblasten in Abwesenheit eines Knochenersatzmaterials weisen nach 4 Tagen Inkubation ebenso einen konfluenten Zelllayer auf, wie er auch in Anwesenheit der getesteten Prüfsubstanzen gezeigt werden konnte. Im Verlauf des Experimentes erfolgte in der Kontrollkultur ebenfalls eine Zunahme der Osteoblasten, so dass am 28. Tag des Experimentes ein dichter Zellrasen im "well" zur Darstellung kommt.

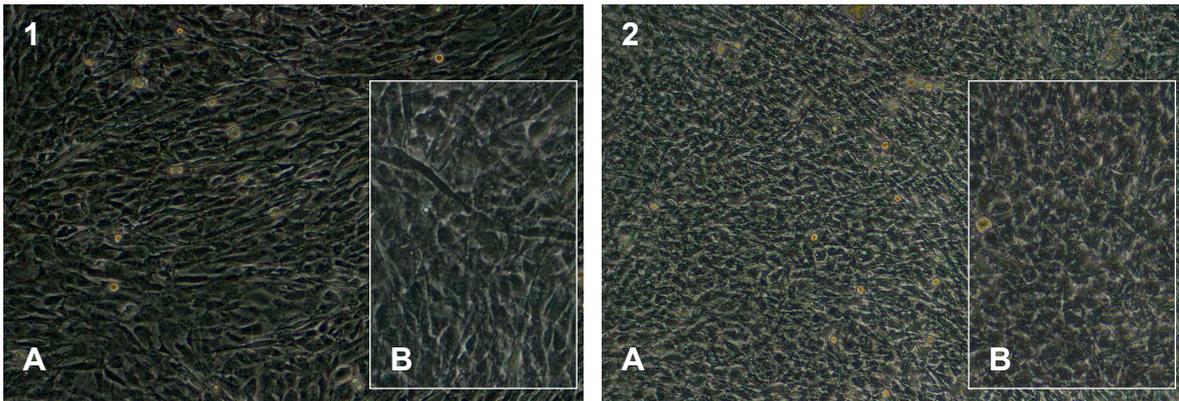


Abb. 4.5: Osteoblastenleerkontrolle (1) Tag 4 (2) Tag 28; (A) x100 (B) x200

Im Gegensatz zu der erfolgreichen Proliferation der Zellen in Anwesenheit der getesteten Biomaterialien soll eine Zellkultur von Osteoblasten in Anwesenheit eines reinen Polyglykolids gezeigt werden (s. Abb. 4.6). Die Kultivierung wurde von einer Arbeitsgruppe der experimentellen Unfallchirurgie der Universitätsklinik Hamburg in Zusammenarbeit mit der chemischen Fakultät der Universität Bochum in gleicher Weise wie oben beschrieben durchgeführt [93]. Dabei kann beobachtet werden, dass sich Osteoblasten in Anwesenheit des Polyglykolids von dem Material lösen und absterben.

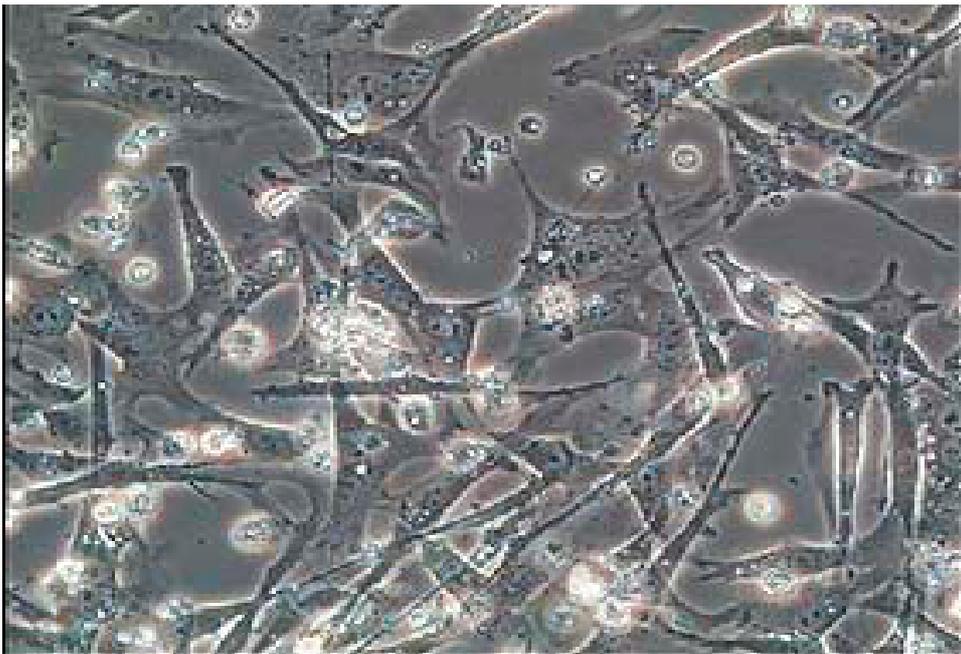


Abb. 4.6: Osteoblasten in Anwesenheit eines reinen Polyglykolids nach 4 Tagen

4.2 pH - Metrie

Im Verlauf des Experimentes wurde der pH-Wert des Zellkulturmediums jeden 2. Tag im Rahmen des Mediumwechsels bestimmt. Abbildung 4.7 zeigt eine Verlaufsanalyse der pH-Werte von α -MEM in Anwesenheit von Endobon[®], Biobon[®], Calcibon[®], Dentin, der Osteoblasten – Leerkontrolle sowie des Mediums in Abwesenheit kultivierter Osteoblasten.

[pH-Wert]

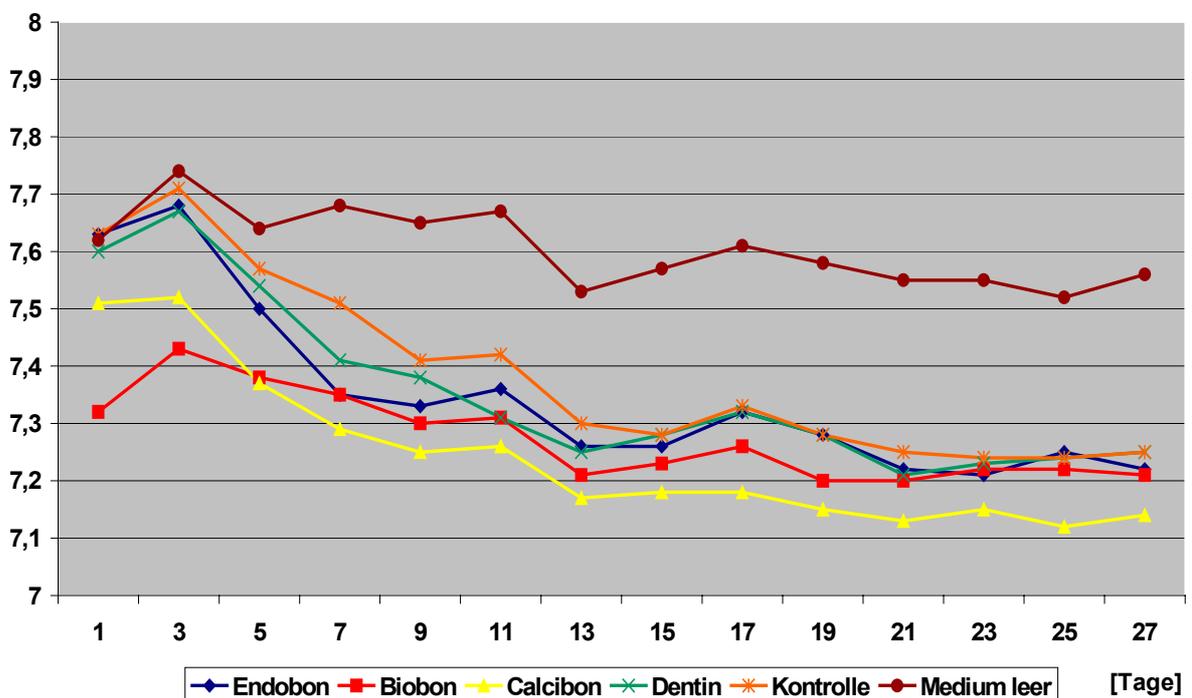


Abb. 4.7: pH-Metrie von α -MEM über den gesamten Versuchszeitraum

Das Medium aller Kulturen zeigt ab Tag 5 einen Abfall des pH-Wertes. Dieser läßt sich dadurch erklären, daß ab dem 5. Tag der Zellkultur dem Medium bei jedem Wechsel Ascorbinsäure zugesetzt wurde. Das Kulturmedium in der Leerkontrolle weist insgesamt einen höheren pH-Wert auf. Kultivierte Osteoblasten säuern das Medium also an. Die Kulturen in Anwesenheit von Endobon[®], Biobon[®], Dentin und die Osteoblastenkontrolle befinden sich im gesamten Verlauf noch in der physiologischen pH-Wert – Spanne von 7,2 – 7,6. Calcibon[®] hingegen hat die Tendenz, das Medium etwas vermehrt anzusäuern.

4.3 Färbungen der Zellkultur

Nachweis exprimierter alkalischer Phosphatase nach 7 Tagen

Die enzymatische Färbung der kultivierten Osteoblasten in Anwesenheit der Knochenersatzmaterialien sowie in der Leerkontrolle hinsichtlich der von den Zellen exprimierten alkalischen Phosphatase erfolgte nach 7 Tagen Kultivierung.

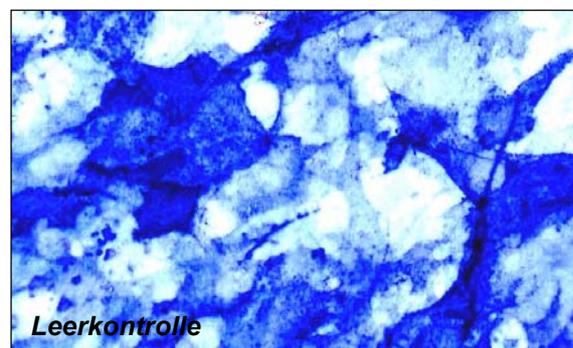
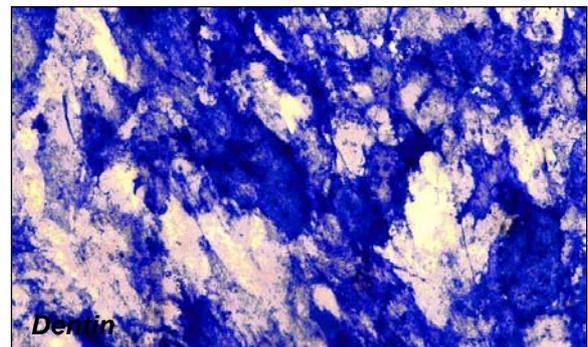
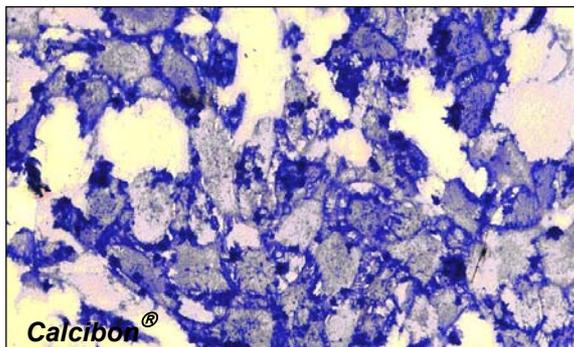
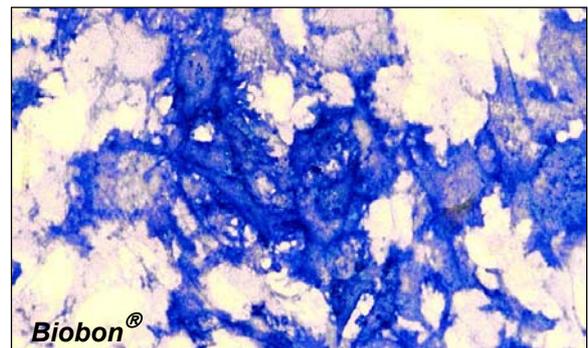
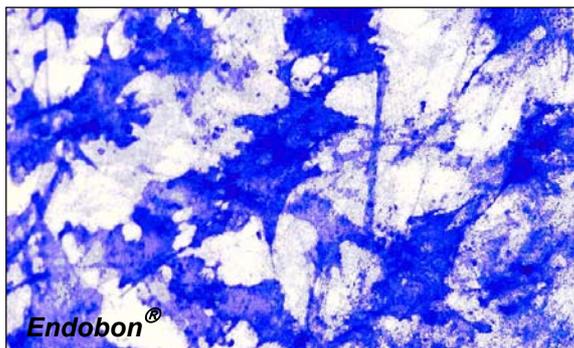


Abb. 4.8: Enzymatische Alkalische Phosphatase – Färbung nach 7 Tagen; x200

In allen gezeigten Abbildungen läßt sich eine Blaufärbung deutlich erkennen. Sie stellt den positiven Nachweis für exprimierte alkalische Phosphatase dar und macht damit sichtbar, daß die Osteoblasten bereits nach 7 Tagen *in vitro* begonnen haben, zu differenzieren. Die abgebildeten Färbungen weisen keine wesentlichen Unterschiede hinsichtlich der Stärke der Bildung von alkalischer Phosphatase in den verschiedenen Kulturansätzen auf.

Kollagennachweis nach van Gieson nach 14 Tagen

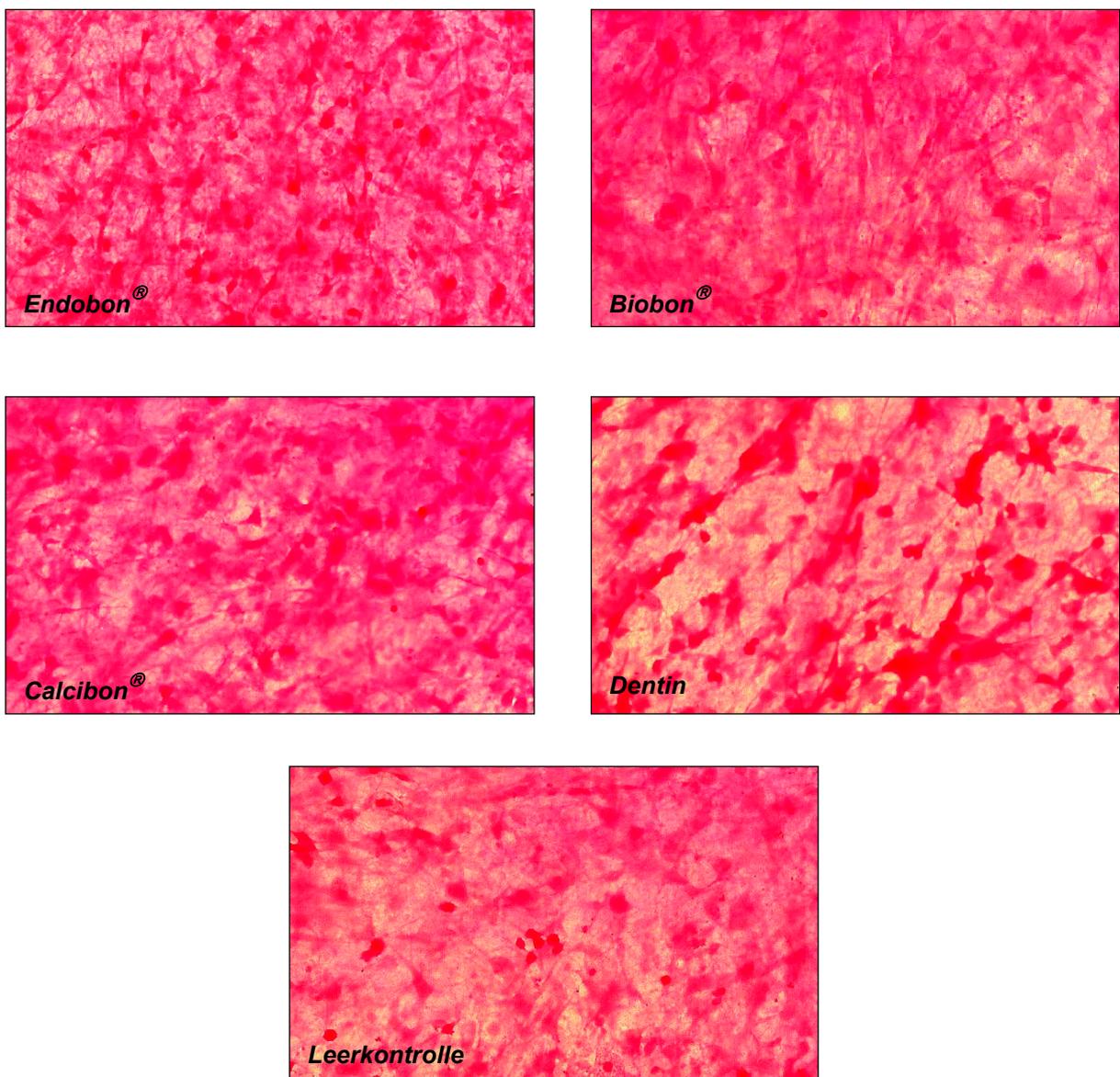


Abb. 4.9: Kollagenfärbung nach van Gieson nach 14 Tagen; x200

Die Kollagenfärbung nach van Gieson wurde nach 2 Wochen Kultivierung in allen 5 Ansätzen durchgeführt. Kollagen stellt sich in der van Gieson - Färbung rot dar. Die Abbildung 4.9 zeigt, dass das wichtige Matrixprotein der Osteoblasten nach 14 Tagen Inkubation in allen Ansätzen vorhanden ist.

Darstellung mineralisierter extrazellulärer Matrix mit der Versilberung nach von Kossa nach 28 Tagen

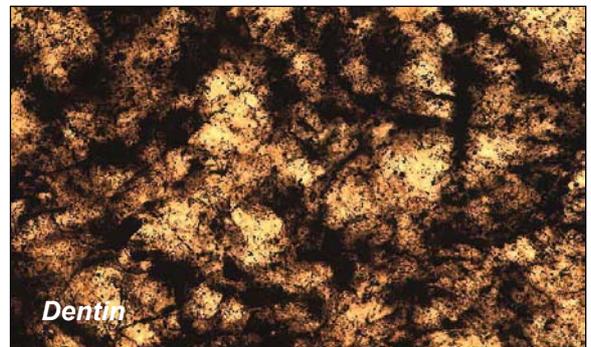
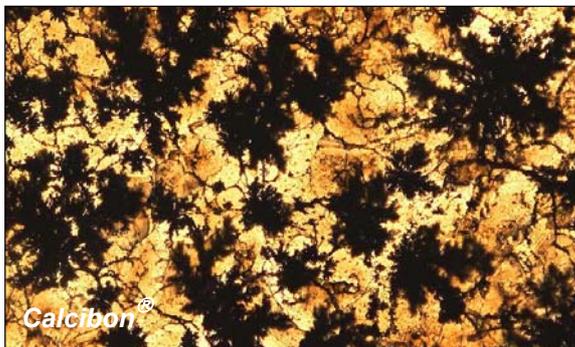
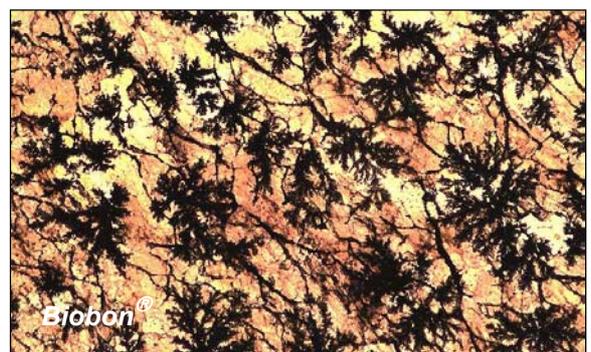
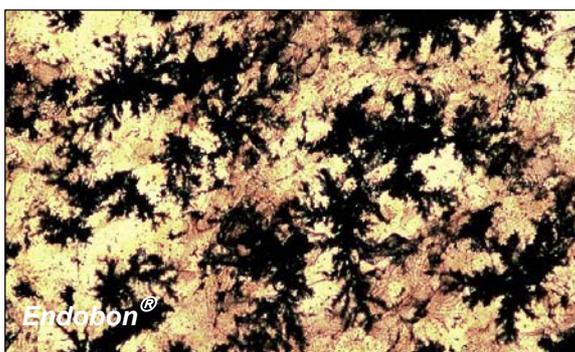


Abb. 4.10: Mineralisierte extrazelluläre Matrix nach von Kossa nach 28 Tagen; x200

Die Abbildung 4.10 läßt deutliche Mineralablagerungen in der Zellkultur aller Ansätze erkennen. Die Kulturen in Anwesenheit der Biomaterialien sowie die Leerkontrolle zeigen die Ausbildung von Apatitkristallen. Eine positive Darstellung der mineralisierten extrazellulären Matrix nach 4 Wochen Kultivierung der Osteoblasten verdeutlicht den späten Differenzierungsgrad der Zellen.

4.4 Schliffpräparate der Prüfkörper

Die dargestellten von Kossa / van Gieson Gegenfärbungen der Schliffpräparate dienen dem Nachweis der Kollagenexpression durch die Osteoblasten, die sich in direktem Kontakt mit den Prüfkörpern befinden. Während sich der Zellayer in dieser Färbung insgesamt gelb darstellt, ist hier besonders auf den positiven Kollagennachweis durch eine Rotfärbung zu achten. In den abgebildeten Toluidinblau – Färbungen der Präparate ist das Interface zwischen dem Osteoblastenlayer und der Oberfläche der jeweiligen Testsubstanz dargestellt. Die Zellen sind direkt durch ihre Blaufärbung zu erkennen.

Vergleich der getesteten Biomaterialien nach 7 Tagen Kultivierung: Kollagenbildung der Osteoblasten, Darstellung des Zell - Materialoberfläche – Interface

Abb. 4.11 läßt am 7. Tag der Zellkultur auf allen Materialien eine beginnende Kollagenbildung der Osteoblasten erkennen. Die Toluidinblau – Färbungen zeigen die gelungene Darstellung eines grenzschichtfreien Interface zwischen einem Monolayer von Osteoblasten und der jeweiligen Oberfläche der Biomaterialien. Deutliche Unterschiede bezüglich des Verhaltens der Osteoblasten auf den verschiedenen Prüfkörpern sind zu dem hier dargestellten Zeitpunkt des Versuches noch nicht nachzuvollziehen.

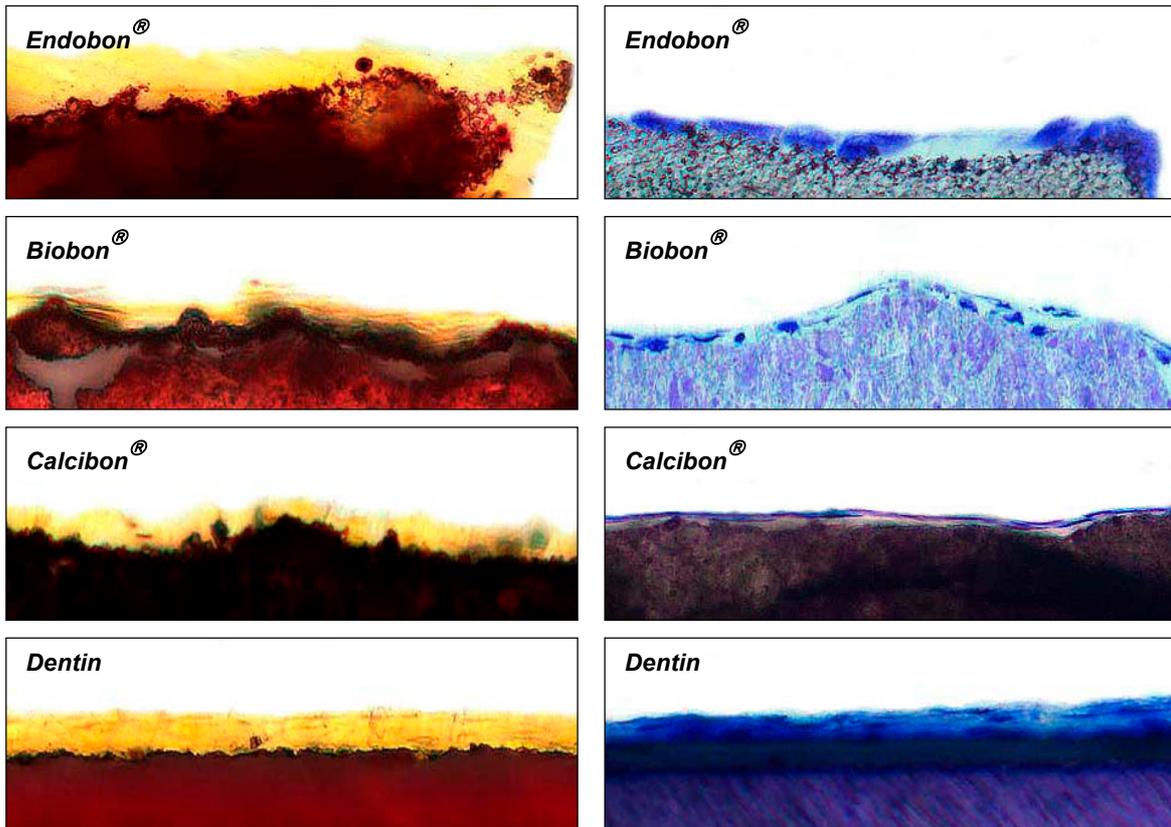


Abb. 4.11: Schliffpräparate nach 7 Tagen Kultivierung: Kollagenbildung [links / van Gieson], Zell-Material-Interface [rechts / Toluidinblau]; x200

Vergleich der getesteten Biomaterialien nach 14 Tagen Kultivierung: Kollagenbildung der Osteoblasten, Darstellung des Zell - Materialoberfläche - Interface

Nach 2 Wochen Inkubation der Osteoblasten auf den Testsubstanzen läßt sich insgesamt eine vermehrte Kollagenbildung darstellen. Diese ist vor allem in Anwesenheit von Calcibon[®] besonders deutlich zu erkennen. Die Abbildung des Kollagennachweises auf Dentin hingegen läßt eine sichtbare Zunahme der entsprechenden Rotfärbung vermissen. Der Vergleich der Schliffpräparate von Tag 7 und Tag 14 weist die Ausbildung eines mehrschichtigen Zellayers nach 2 Wochen Inkubation auf. Ein grenschichtfreies Interface zwischen den Osteoblasten und der Materialoberfläche ist weiterhin in Anwesenheit aller vier Biomaterialien nachzuweisen. Die Kollagendarstellung in Anwesenheit von Biobon[®] am 14. Tag zeigt außerdem, daß Unterbrechungen der rauhen Oberfläche von einem Osteoblastengeflecht überbrückt werden.

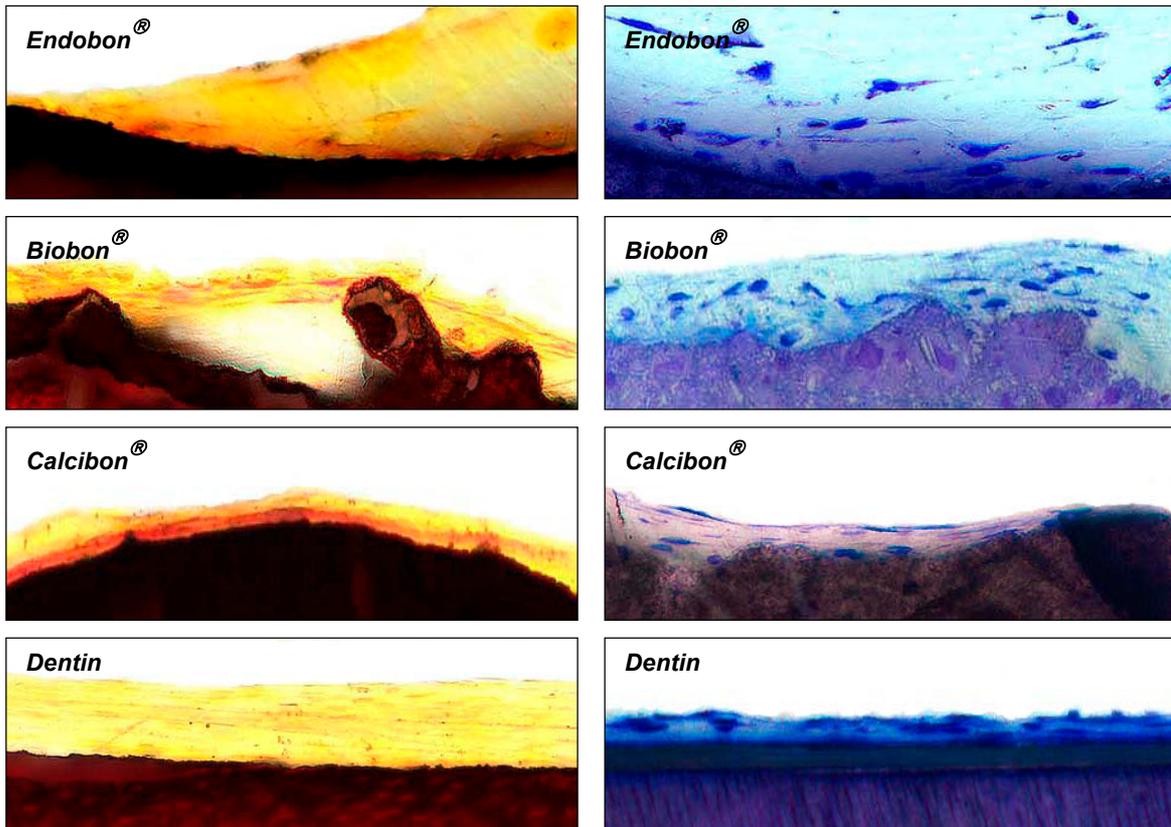


Abb. 4.12: Schliffpräparate nach 14 Tagen Kultivierung: Kollagenbildung [links / van Gieson], Zell-Material-Interface [rechts / Toluidinblau]; x200

Vergleich der getesteten Biomaterialien nach 28 Tagen Kultivierung: Kollagenbildung der Osteoblasten, Darstellung des Zell - Materialoberfläche - Interface

Der Vergleich der Schliffpräparate am 28. Tag des Versuches weist sowohl bezüglich der Kollagenbildung als auch in Hinblick auf den Osteoblastenmultilayer und das Zell – Material – Interface einige Unterschiede zwischen den verschiedenen Prüfkörpern auf. Während in Anwesenheit von Dentin keine vermehrte Kollagenbildung nach 4 Wochen Kultivierung zu verzeichnen ist, lässt sich auf Calcibon® ein dichtes Kollagenband auf der Oberfläche des Kalziumphosphatzementes darstellen. Die Schliffpräparate von Endobon® und Biobon® lassen insgesamt ebenfalls eine Zunahme des Matrixproteins erkennen. Der Ausschnitt des Endobon® - Präparates zeigt den positiven Kollagennachweis an einer anderen Stelle des gleichen Schliffes.

Auf den Knochenersatzmaterialien ist am 28. Tag des Experimentes die erfolgreiche Ausbildung eines mehrschichtigen Osteoblastenlayers zu erkennen. Der Zellrasen hat sich in Anwesenheit von Endobon[®] im Vergleich zur 2. Woche der Zellkultur, s. Abb. 4.12, verdichtet. Hier ist in Abb. 4.13 außerdem ein Ausschnitt des Schliffpräparates gezeigt, in dem das Umspannen der porösen Struktur der Hydroxylapatitkeramik zu sehen ist. Besonders auf den Kalziumphosphatzementen Biobon[®] und Calcibon[®] zeigt sich ein Multilayer, der im Verlauf des Experimentes an Zellschichten zugenommen hat und weiterhin den Materialien grenzsichtfrei aufliegt. In Anwesenheit von Dentin kann ebenfalls ein Multilayer von Osteoblasten dargestellt werden, der direkten Kontakt zur Oberfläche des Elfenbeins hat.

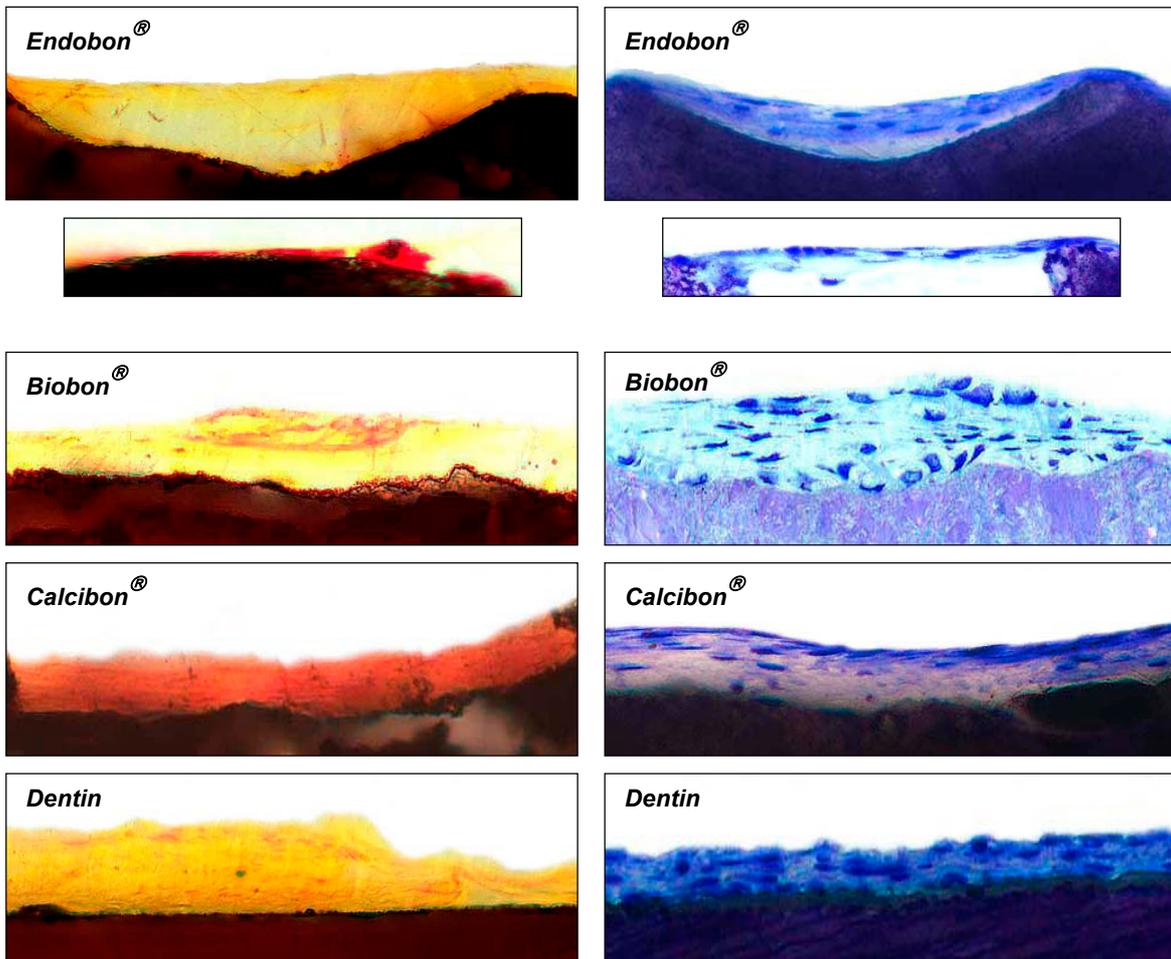


Abb. 4.13: Schliffpräparate nach 28 Tagen Kultivierung: Kollagenbildung [links / van Gieson], Zell-Material-Interface [rechts / Toluidinblau]; x200

4.5 Quantitativer Nachweis der Alkalische Phosphatase – Expression durch Messung der Substratumsetzung von p-Nitrophenylphosphat im Photometer

Die angesetzte Verdünnungsreihe der alkalischen Phosphatase [*Fluka: Phosphatase alkaline from calf intestinal mucosa*] mit einem Proteinanteil von 1,26U/mg ergab folgende Absorptionswerte bei 405nm:

Tab 4.1: Verdünnungsreihe Alkalische Phosphatase

1mU ⇒	0,182
5mU ⇒	0,341
10mU ⇒	0,515
20mU ⇒	0,841

Die gemessene Absorption der Proben wurde in mU alkalische Phosphatase am Gesamtproteingehalt der Proben umgerechnet. Die errechneten Werte wurden auf zwei Stellen nach dem Komma auf- bzw. abgerundet.

Tab. 4.2: Ergebnisse der Photometrie; Alkalische Phosphatase

Zeitpunkt	Probe	Absorption	Alk. Phosphat. [mU]
Tag 7	Endobon	0,018	0,1
Tag 7	Biobon	0,01	0,05
Tag 7	Calcibon	0,017	0,09
Tag 7	Dentin	0,012	0,07
Tag 7	Kontrolle	0,019	0,1
Tag 14	Endobon	0,073	0,4
Tag 14	Biobon	0,079	0,43
Tag 14	Calcibon	0,026	0,14
Tag 14	Dentin	0,033	0,18
Tag 14	Kontrolle	0,009	0,05
Tag 28	Endobon	0,019	0,1
Tag 28	Biobon	0,034	0,19
Tag 28	Calcibon	0,002	0,01
Tag 28	Dentin	0,005	0,03
Tag 28	Kontrolle	0,033	0,18

Aus den ermittelten Werten ergibt sich zur vereinfachten Darstellung der Ergebnisse folgendes Diagramm:

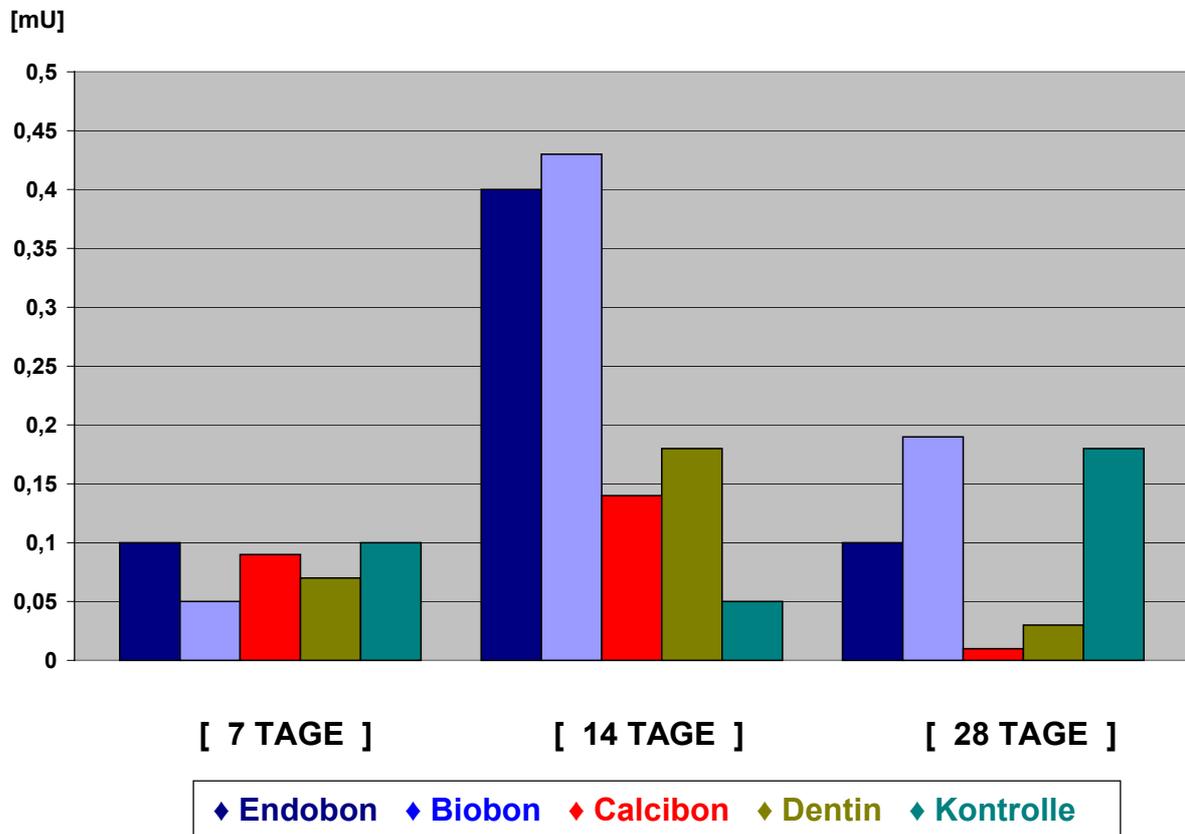


Abb. 4.14: Quantitative Messung der alkalischen Phosphatase; Photometrie

Zu beachten sind die insgesamt niedrigen Werte des ermittelten Gehaltes an alkalischer Phosphatase. Weiterhin läßt sich kein ansteigender Verlauf der Bildung des Enzyms über den Versuchszeitraum darstellen. Die hier ermittelten Ergebnisse stimmen keineswegs mit den Resultaten der RT - PCR hinsichtlich der alkalischen Phosphatase überein (s. Abb. 4.15 – 4.17). Weitere Aussagen über den hier durchgeführten Test folgen nach der Darstellung der RT - PCR für alkalische Phosphatase in dem Kapitel 5.1.

4.6 Ergebnisse der Reverse Transkriptase - PCR für GAPDH, Tissue - nonspecific alkaline phosphatase (TNSALP), Bone Sialo Protein (BSP), Osteocalcin (BGP)

Quantifizierung der extrahierten RNA der kultivierten Osteoblasten

Die Menge der gewonnenen Osteoblasten – RNA wurde durch Messung der Absorption der Proben bei 260nm im Photometer bestimmt. Bei der Verwendung der *Eppendorf Uvette® Küvetten* entspricht bei einem Volumen von 1ml eine Absorption von 1,0 bei genannter Wellenlänge einem RNA – Gehalt von 40µg. Da 4µl gelöste RNA zur Bestimmung der Menge eingesetzt wurden, ergibt sich entsprechend aus einer Absorption von 0,1 ein RNA – Gehalt von 1µg/µl. Somit konnten die in Tabelle 4.3 dargestellten Werte für die untersuchten Proben festgestellt werden:

Tab. 4.3: ermittelte RNA – Menge der einzelnen Proben

Zeitpunkt	Probe	Absorption	RNA [µg/µl]	RNA [ng/µl]
Tag 7	Endobon	0,015	0,15	150
Tag 7	Biobon	0,004	0,04	40
Tag 7	Calcibon	0,026	0,26	260
Tag 7	Dentin	0,023	0,23	230
Tag 7	Kontrolle	0,073	0,73	730
Tag 14	Endobon	0,011	0,11	110
Tag 14	Biobon	0,015	0,15	150
Tag 14	Calcibon	0,022	0,22	220
Tag 14	Dentin	0,011	0,11	110
Tag 14	Kontrolle	0,06	0,6	600
Tag 28	Endobon	0,014	0,14	140
Tag 28	Biobon	0,003	0,03	30
Tag 28	Calcibon	0,014	0,14	140
Tag 28	Dentin	0,011	0,11	110
Tag 28	Kontrolle	0,049	0,49	490

Zur Synthese der cDNA mit Hilfe des *AMV First-Strand cDNA Synthesis Kit* wurden jeweils 100ng der gewonnenen RNA eingesetzt. Die Angleichung der GAPDH – Signale erfolgte durch Variation der für die PCR verwendeten cDNA – Mengen. Diese ermittelten Volumina wurden entsprechend für die zu untersuchenden Gene TNSALP, Bone Sialo Protein und Osteocalcin eingesetzt. Es handelte sich um die in Tabelle 4.4 dargestellten cDNA – Mengen:

Tab. 4.4: eingesetzte cDNA

Zeitpunkt	Probe	cDNA
Tag 7	Endobon	4 µl
Tag 7	Biobon	4 µl
Tag 7	Calcibon	1,5 µl
Tag 7	Dentin	2 µl
Tag 7	Kontrolle	2,5 µl
Tag 14	Endobon	2 µl
Tag 14	Biobon	3 µl
Tag 14	Calcibon	2 µl
Tag 14	Dentin	2 µl
Tag 14	Kontrolle	4 µl
Tag 28	Endobon	2 µl
Tag 28	Biobon	2 µl
Tag 28	Calcibon	3 µl
Tag 28	Dentin	3 µl
Tag 28	Kontrolle	2 µl

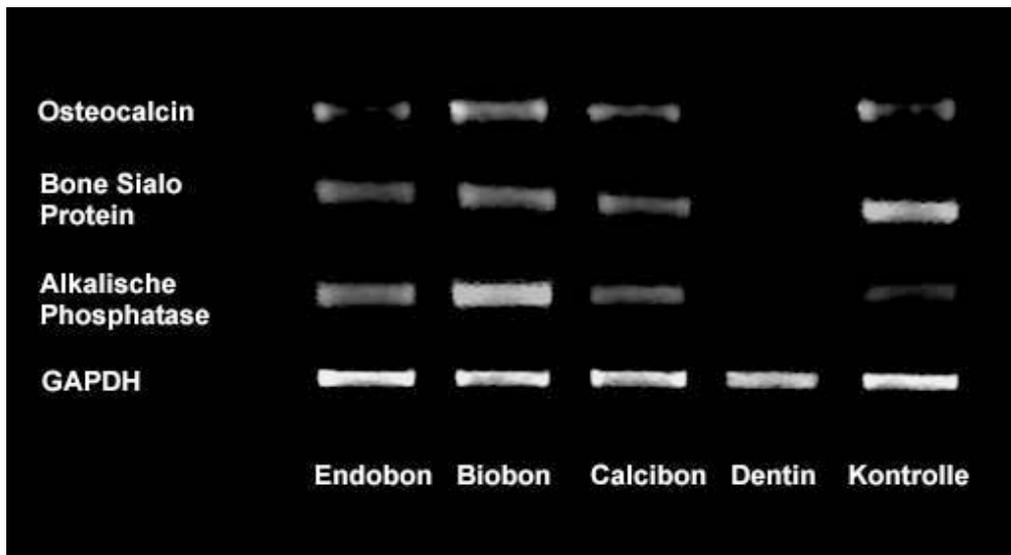
Darstellung der RT - PCR für den Zeitpunkt Tag 7

Abb. 4.15: Ergebnisse der RT - PCR zum Zeitpunkt Tag 7 der Zellkultur

Die sichtbaren Banden der cDNA aus den kultivierten Osteoblasten nach 7 Tagen Inkubation auf den Knochenersatzmaterialien lassen bereits einige Unterschiede hinsichtlich der Gen - Expression erkennen. Während für das Gen GAPDH als Kontrolle der Durchführung der RT - PCR eine einheitliche Darstellung aller fünf Proben zu sehen ist, läßt sich (beim Einsatz gleicher cDNA Volumina) bezüglich der drei untersuchten Gene Osteocalcin, Bone Sialo Protein und alkalische Phosphatase ein unterschiedlich intensives Expressionsmuster unter dem Einfluß der einzelnen Biomaterialien erkennen. Sowohl Osteocalcin als auch Bone Sialo Protein werden in Anwesenheit der Knochenersatzstoffe Endobon[®], Biobon[®] und Calcibon[®] bereits nach der ersten Woche in gleicher Weise exprimiert. Auch in der Kontrollkultur ist die Expression beider Gene zu diesem Zeitpunkt nachzuweisen. Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen kann man sehen, dass Osteoblasten auf Dentin nach 7 Tagen Zellkultur noch nicht so weit differenziert sind, dass sie diese Osteoblasten - typischen Marker, Osteocalcin und Bone Sialo Protein, bereits exprimieren.

Die Untersuchung der alkalischen Phosphatase weist ebenfalls einige Unterschiede im Vergleich der unterschiedlich beeinflussten Zellen auf.

Osteoblasten auf Endobon[®], Calcibon[®] sowie in Abwesenheit einer Prüfsubstanz lassen etwa gleich starke cDNA Banden für das Gen erkennen. In Anwesenheit von Biobon[®] ist diese noch deutlich intensiver vorhanden. Hingegen sieht man auch in bezug auf die alkalische Phosphatase, daß Osteoblasten in Kultur mit dem Elfenbein nach einer Woche nicht dem Differenzierungsgrad der anderen Zellen entsprechen und sich keine entsprechende cDNA Bande nachweisen läßt.

Darstellung der RT - PCR für den Zeitpunkt Tag 14

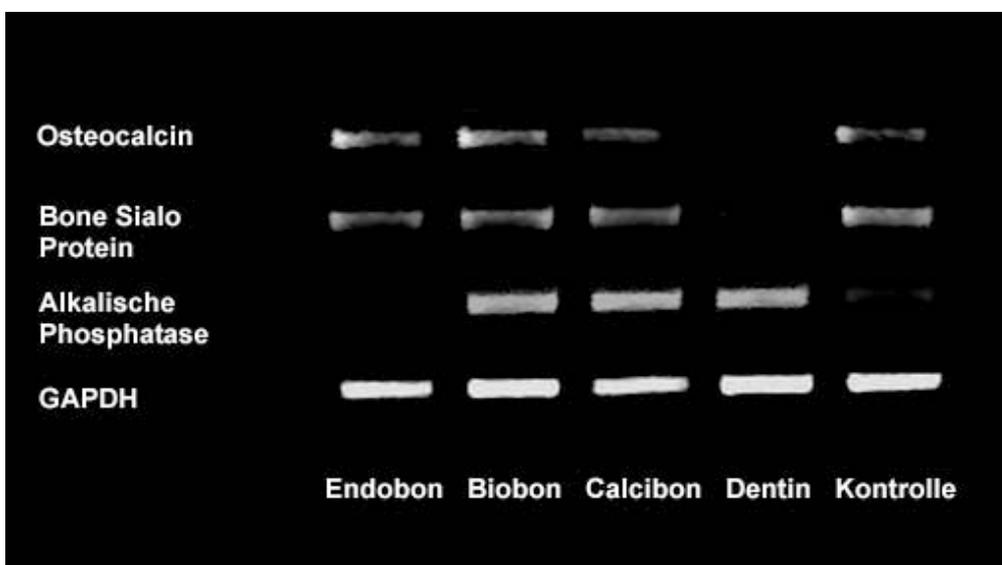


Abb. 4.16: Ergebnisse der RT - PCR zum Zeitpunkt Tag 14 der Zellkultur

Die Untersuchung der mRNA Expression durch die kultivierten Osteoblasten nach 2 Wochen Inkubation zeigt bezüglich Osteocalcin und Bone Sialo Protein ähnliche Ergebnisse wie schon nach 7 Tagen. Die Expression beider Gene kann in den Zellen in Anwesenheit von Endobon[®], Biobon[®] und Calcibon[®] sowie in der Kontrollkultur in etwa gleicher Intensität nachgewiesen werden. Osteoblasten auf Dentin exprimieren in geringen Mengen Osteocalcin und Bone Sialo Protein am 14. Tag des Experimentes. Wie in Abb. 4.16 zu sehen ist, erscheinen die entsprechenden cDNA Banden schwach, aber erkennbar. Dies ist Ausdruck einer

verzögerten, aber erfolgreich stattfindenden Differenzierung der Zellen in Anwesenheit des Elfenbeins.

Wie auch in der ersten Woche der Zellkultur, s. Abb. 4.15, weist die Expression der alkalischen Phosphatase (AP) ebenfalls nach 2 Wochen Inkubation der Osteoblasten deutliche Unterschiede in den verschiedenen Proben auf. Nachdem Zellen unter dem Einfluß von Endobon[®] in der ersten Woche das Gen noch in vergleichbarer Intensität wie die Kontrolle exprimierten, ist dieses bereits nach 14 Tagen nicht mehr nachweisbar. Die mRNA Expression für alkalische Phosphatase erfolgt hingegen in Anwesenheit von Biobon[®] in etwa gleicher Intensität wie in der ersten Woche des Versuches. Osteoblasten in Kultur mit Calcibon[®] zeigen eine starke Zunahme des Gehaltes an AP. Weiterhin zeigen nun auch Zellen auf Dentin eine deutliche Expression des Enzyms. Die Proben aus der Kontrollkultur weisen bezüglich der alkalischen Phosphatase keine Veränderungen im Vergleich zum 7. Tag auf.

Darstellung der RT - PCR für den Zeitpunkt Tag 28

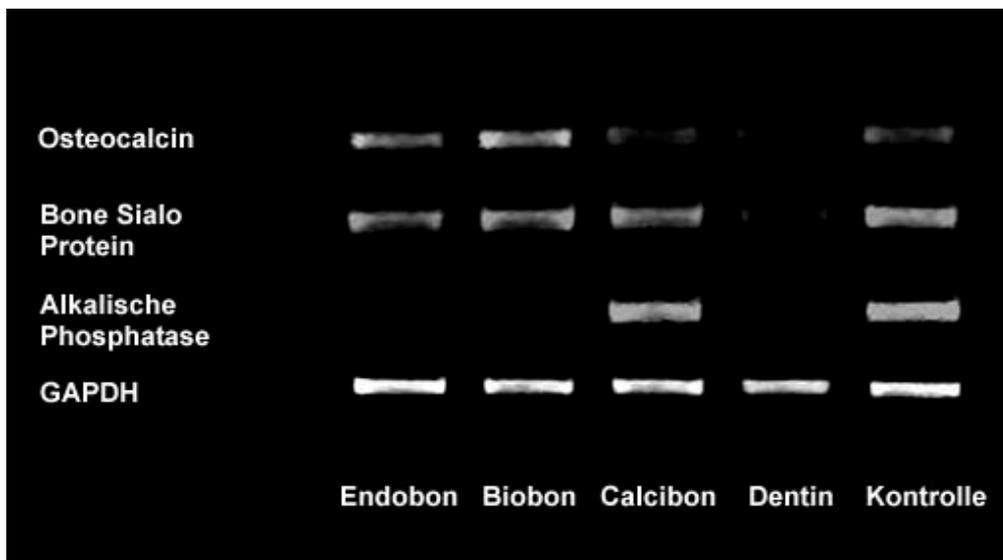


Abb. 4.17: Ergebnisse der RT - PCR zum Zeitpunkt Tag 28 der Zellkultur

Die Betrachtung der cDNA Banden für die Proben des 28. Tages der Zellkultur ermöglicht einen Vergleich hinsichtlich der Expression von Osteocalcin und Bone

Sialo Protein. Vor allem Zellen auf Endobon[®], Biobon[®] und Calcibon[®] sowie die Osteoblasten in der Kontrollkultur exprimieren beide Gene jeweils in etwa gleicher Intensität. Die Hydroxylapatitkeramik und Biobon[®] lassen dabei insgesamt stärkere cDNA Banden erkennen. Weiterhin fällt auf, dass die Osteoblasten in Anwesenheit von Dentin auch zum Zeitpunkt Tag 28 beide Gene exprimieren, wobei das Osteoblasten - spezifische Osteocalcin eine geringere Intensität aufweist.

Entscheidend ist bei der Untersuchung der Zellkultur am Ende des Experimentes, dem 28. Tag der Inkubation, erneut der Vergleich der einzelnen Proben in bezug auf die alkalische Phosphatase. Nachdem die Expression des Gens unter dem Einfluß von Endobon[®] bereits nach 14 Tagen nicht mehr erkennbar war, s. Abb. 4.16, läßt sich diese auch nach 4 Wochen nicht mehr nachweisen. Ebenso findet am 28 Tag der Zellkultur keine AP – Expression der Osteoblasten auf Biobon[®] mehr statt. Obwohl nach einer verzögerten Differenzierung der Zellen auf Dentin am 14. Tag alkalische Phosphatase nachzuweisen war, ist das Gen am Ende der Langzeitkultur nicht mehr zu finden (s. Abb. 4.17).

Das wichtigste Ergebnis liefert der Vergleich der Osteoblastenkultur unter dem Einfluß des Kalziumphosphatzementes Calcibon[®] mit der Kontrollkultur in Hinblick auf die alkalische Phosphatase. Nachdem die Osteoblasten auf Calcibon[®] das Gen bereits im Verlauf der ersten zwei Wochen des Untersuchungszeitraumes zunehmend exprimierten, ist es auch am 28. Tag stark nachweisbar. Seine Intensität läßt sich mit der cDNA Bande der Kontrollkultur gleichsetzen. Die Zellen in Abwesenheit eines Biomaterials zeigen nämlich ebenfalls eine Zunahme der AP – Expression. Diese ist allerdings erst nach 4 Wochen deutlich erkennbar. Die beiden Proben (Calcibon[®] und Leerkontrolle) sind bezüglich der alkalischen Phosphatase die Einzigen, die über den gesamten Versuchszeitraum eine Steigerung der Genexpression erfahren. Die Anwesenheit des Knochenersatzmaterials Calcibon[®] scheint somit am besten eine vergleichbare Osteoblastenkultur wie unbeeinflusste Zellen *in vitro* zu ermöglichen.

5 Diskussion

5.1 Beurteilung der durchgeführten Versuche

Das im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführte Testsystem erlaubt den Vergleich verschiedener Knochenersatzmaterialien bezüglich ihrer Osteoblasten-spezifischen Biokompatibilität. Eine schnelle und kontinuierliche Proliferation der Zellen in Anwesenheit der Biomaterialien konnte durch die Anfertigung von Fotografien der Zellkultur nachgewiesen werden und zeigte keine entscheidenden Unterschiede im Vergleich zur Leerkontrolle.

Die Verlaufsanalyse des pH - Wertes im Kulturmedium α -MEM zeigte für jede Testsubstanz eine Stabilität des pH. Schwankungen der Werte waren nur in den ersten 72 Stunden zu beobachten und stellten sich spätestens nach 5 Tagen Kultivierung gänzlich ein. Die ermittelten pH - Werte lagen in dem physiologischen Bereich von 7,2 – 7,6, was eine wichtige Rolle bezüglich der Anwendung von Biomaterialien *in vivo* spielt. Der Kalziumphosphatzement Calcibon[®] zeigte zwar eine leicht vermehrte Ansäuerung des Milieus, doch die Osteoblasten wiesen keinerlei Einschränkungen in ihrem Wachstums- und Differenzierungsverhalten auf. Dies bestätigt die Ergebnisse von Ramp et al. [111], die sie bei Untersuchungen mit embryonalen Hühnerosteoblasten sowie einer osteoblastenähnlichen Zelllinie aus Hühnerembryos bezüglich der Zellaktivität in Abhängigkeit von pH - Änderungen herausfanden: Die Zellzahl- und proliferation kann von gewissen pH - Schwankungen unbeeinflusst bleiben, da Osteoblasten die Fähigkeit zur pH - Regulierung in ihrem umliegenden Milieu haben. Diese Funktion beruht auf einem Rückkopplungsmechanismus bezüglich der Laktatproduktion. Diese wird von den Zellen bei einem pH - Wert unterhalb von 7,0 stark reduziert, während hohe pH - Werte durch eine vermehrte Laktatproduktion auf 7,8 - 8,0 eingestellt werden [34;82;102]. In einem weiteren *in vitro* - Experiment mit humanen Osteoblasten konnten auch Kaysinger et al. [68] zeigen, dass diese Zellen die Tendenz haben, ihr umliegendes Milieu auf einen pH - Wert von 7,2 – 7,4 zu bringen, bzw. zu halten. Die Arbeitsgruppe fand weiterhin heraus, daß die Aktivität humaner Osteoblasten *in vitro* zwar mit steigendem pH zunimmt, allerdings nur innerhalb einer Spanne von pH 7,0 – 7,6.

Senkt ein Biomaterial den pH - Wert des Mediums allerdings stark unterhalb von 7,0 ab, so ist dieses Milieu dennoch toxisch für kultivierte Osteoblasten. Dies konnten Linhart et al. [93] im Rahmen einer Untersuchung von primären Mausosteoblasten auf einem Polyglykolid zeigen. Bei pH - Werten des Kulturmediums zwischen 6,2 - 6,8 starben die Zellen ab und lösten sich von der Oberfläche des Materials.

Unter Berücksichtigung dieser beschriebenen Beobachtungen und der im vorliegenden Experiment ermittelten Verlaufsanalyse des pH - Wertes im Kulturmedium kann also davon ausgegangen werden, dass die getesteten Biomaterialien diesbezüglich für die Anwendung *in vivo* geeignet erscheinen.

Die Verlaufsanalyse des pH - Wertes des Kulturmediums in Abwesenheit von Osteoblasten zeigt während des gesamten Untersuchungszeitraumes einen insgesamt höheren pH - Wert. Diese Beobachtung lässt zwar die Frage zu, ob das Medium selbst eine zu geringe eigene Pufferkapazität besitzt und daher gewissermaßen ungeeignet für die Kultur erscheint. Da aber, wie bereits oben beschrieben, die kultivierten Osteoblasten in dem Medium proliferieren und differenzieren konnten, zeigt der Unterschied des pH - Wertes zwischen der Zellkultur und der Leerkontrolle, dass die Osteoblasten vital und funktionstüchtig waren, so dass sie zu einer pH - Regulierung fähig sein konnten.

Mit der Durchführung von Färbungen der Zellkultur konnte eine gelungene Differenzierung der Osteoblasten in der Langzeitkultur bewiesen werden. Die Expression von alkalischer Phosphatase sowie eine deutliche Bildung von Kollagen und die Mineralisierung der extrazellulären Matrix ließ sich in allen Kulturen der verschiedenen Ersatzmittel in gleicher Weise wie in der Kontrollkultur darstellen.

Die erfolgreiche Anfertigung der Schliifpräparate zeigt ein grenzschichtfreies Interface zwischen der Oberfläche aller Prüfkörper und einem im Verlauf des Experimentes zunehmendem Multilayer der Osteoblasten. Obwohl die vier Testsubstanzen eine unterschiedliche Oberflächenbeschaffenheit aufweisen, können die Zellen jedes der Materialien dicht bewachsen und umspannen.

Zur Beurteilung des Differenzierungsgrades der Osteoblasten wurde in dem hier vorgestellten Testmodell sowohl eine photometrische Messung der exprimierten alkalischen Phosphatase als auch eine Reverse Transkriptase - PCR bezüglich der Gene alkalische Phosphatase, Bone Sialo Protein und Osteocalcin durchgeführt.

Wie in Abbildung 4.14 zu erkennen, wurden in der photometrischen Ermittlung der in den Proben enthaltenen alkalischen Phosphatase insgesamt sehr geringe Werte von weniger als 1mU Enzym umgesetzt. Weiterhin nimmt der Gehalt an alkalischer Phosphatase nach dem hier verwendeten Test in allen Proben der Biomaterialien zwischen 14 Tagen und 28 Tagen wieder ab. Die Leerkontrolle zeigt hingegen eine Abnahme der Substratwirkung zwischen Tag 7 und Tag 14 mit einem darauf folgenden Anstieg am Tag 28. Diese Ergebnisse erscheinen insgesamt schlecht vergleichbar und zu erklären. Vor allem zeigt der Vergleich der Ergebnisse bezüglich des Enzyms zwischen der Photometrie und der Reverse Transkriptase - PCR keinerlei Übereinstimmung.

Die zweifelhaften Ergebnisse der photometrischen Analyse der Aktivität exprimierter alkalischer Phosphatase ergeben sich vor allem aus der Problematik, dass für die Messung nur Proben aus dem Zellayer verwendet werden, der das Knochenersatzmaterial umgibt. Osteoblasten, die direkt auf dem Ersatzstoff gewachsen sind, werden nicht mit in den Versuch einbezogen. Somit ist ein gewünschter Vergleich von Osteoblastenkulturen in Kontakt mit verschiedenen Biomaterialien nicht erreichbar. Dieser sollte jedoch insbesondere dargestellt werden.

Grundsätzlich ist davon auszugehen, dass die vorgestellte Methode der photometrischen alkalische Phosphatase – Messung im Rahmen eines leicht und reproduzierbar durchzuführenden Biokompatibilitätsprüfungssystems nicht geeignet ist.

Hingegen zeigt sich ein entscheidender Vorteil im dem dargestellten Verfahren der Reverse Transkriptase - PCR. Wie bereits in dem Kapitel 3.10 erklärt, lässt sich die zu untersuchende RNA direkt aus den Osteoblasten, die auf den Biomaterialien

gewachsen sind, gewinnen. Diese Tatsache spielt eine wichtige Rolle für den Vergleich verschiedener Knochenersatzmaterialien *in vitro* bezüglich ihrer Osteoblasten - spezifischen Biokompatibilität. Eine positive Kontrolle der erfolgreich durchgeführten Reaktion läßt sich durch die Darstellung der GAPDH zeigen. Da für die Untersuchung der fraglichen Genexpression für alkalische Phosphatase, Bone Sialo Protein und Osteocalcin die gleiche cDNA - Menge wie für GAPDH eingesetzt wurde, sind die erhaltenen unterschiedlichen Ergebnisse als realistisch anzusehen.

So läßt sich erkennen, dass alle Osteoblasten, die auf den biokompatiblen Knochenersatzmaterialien Endobon[®], Biobon[®] und Calcibon[®] kultiviert wurden, sowie auch die Leerkontrolle, bereits nach 7 Tagen differenziert sind und über den gesamten Untersuchungszeitraum von 4 Wochen Bone Sialo Protein und auch Osteocalcin exprimieren. Letzteres ist der definitive Beweis für die gelungene Extraktion und Kultivierung von echten Osteoblasten, da nur diese Zellen in der Lage sind, Osteocalcin zu exprimieren. Dieses Ergebnis widerlegt eventuelle Zweifel, die, wie bereits oben erwähnt, bei der mikroskopischen Betrachtung der Zellkultur am Tag 4 auftreten könnten, wonach die dargestellten Zellen auch als Fibroblasten angesehen werden könnten (Abb. 4.1 – 4.5 (1)).

Auch Osteoblasten auf Dentin exprimieren Bone Sialo Protein und Osteocalcin, doch da die entsprechenden cDNA – Banden erst am Tag 28 deutlicher erkennbar und insgesamt schwächer sind (s. Abb. 4.15 – 4.17), ist von einer verzögerten Differenzierung der Zellen in direktem Kontakt mit dem Elfenbein auszugehen.

Das eindrucksvollste Ergebnis der Reverse Transkriptase - PCR ist allerdings in der Darstellung der alkalischen Phosphatase zu erkennen. Der durchgeführte Vergleich verschiedener Biomaterialien hat hier zu deutlichen Unterschieden geführt. Das Gen wird von Osteoblasten auf der Hydroxylapatitkeramik Endobon[®] nur zu Beginn des Experimentes, erkennbar am Tag 7, exprimiert. Zu den zwei folgenden Untersuchungszeitpunkten läßt sich keine entsprechende cDNA – Bande mehr nachweisen. Kultivierte Zellen auf dem Kalziumphosphatzement Biobon[®] exprimieren alkalische Phosphatase (AP) noch bis zur 2. Woche des Versuchszeitraumes, doch auch hier ist nach 28 Tagen kein positiver AP -

Nachweis mehr möglich. Eine verzögerte Expression des besagten Gens der Osteoblasten auf Dentin läßt sich durch das Fehlen einer entsprechenden cDNA – Bande am Tag 7 darstellen. Es wird nur nach 2 Wochen Zellkultur auf dem Material exprimiert und läßt sich nach 28 Tagen ebenfalls nicht mehr darstellen. Nur die gewachsenen Zellen auf dem zweiten untersuchten Kalziumphosphatzement, Calcibon®, lassen einen Anstieg der Expression alkalischer Phosphatase über den gesamten Zeitraum der Zellkultur erkennen. Diese Osteoblasten weisen genauso ein Verhalten wie die Zellen der Leerkontrolle auf und sind daher am besten mit deren Differenzierungsgrad vergleichbar.

Die dargestellten Unterschiede bezüglich der Genexpression durch Osteoblasten auf den verschiedenen Biomaterialien widersprechen aber nicht den im Rahmen der Färbungen und Schliffpräparate herausgefundenen Ergebnissen, die keine erkennbaren Unterschiede zwischen den Testsubstanzen aufweisen. Vielmehr machen die positiven Ergebnisse der Färbungen sowie die Darstellungen des grenzschichtfreien Interface auf allen Prüfkörpern deutlich, daß die getesteten Materialien keine toxischen Eigenschaften auf die Osteoblasten haben und die Zellen sehr gut in Anwesenheit der Ersatzstoffe proliferieren und differenzieren können. Weiterhin zeigt die Tatsache, dass nur in den Ergebnissen der Reverse Transkriptase - PCR Unterschiede bezüglich der Differenzierung der kultivierten Zellen erkennbar sind, dass dieses Verfahren sehr gut für die Untersuchung verschiedener Knochenersatzmaterialien *in vitro* geeignet ist.

Insgesamt liefert das im Rahmen der vorliegenden Arbeit dargestellte *in vitro* - Modell zur Osteoblasten - spezifischen Biokompatibilitätsprüfung von Knochenersatzstoffen die Möglichkeit einer umfassende Charakterisierung neuer Biomaterialien. Um dem Ziel solcher Versuche, nämlich die eingehende Untersuchung potentieller Ersatzmaterialien vor deren Einsatz in kostspieligen und aufwendigen Großtierexperimenten, noch näher zu kommen, wäre eine Ausweitung des hier beschriebenen Prüfsystems unter der Berücksichtigung Osteoklasten - spezifischer Biokompatibilitätsprüfungen wünschenswert. Wie in Kapitel 2.3. erläutert, muß ein geeignetes Knochenersatzmaterial erfolgreich in das physiologische "bone remodeling" mit einbezogen werden. Daher erscheint eine ergänzende Zellkultur mit Osteoklasten in Anwesenheit der zu

untersuchenden Prüfsubstanzen sinnvoll. Insbesondere sollten Darstellungen eventuell erfolgter Resorptionsvorgänge gezeigt werden. Des Weiteren ließen sich die hier vorgestellten Experimente mit einer Analyse Osteoklasten - spezifischer Gene (s. Kap. 2.5) in der Reverse Transkriptase - PCR ergänzen.

Eine Kombination von *in vitro* - Versuchen bezüglich der Anwesenheit neuer Biomaterialien in Kulturen mit Osteoblasten *und* Osteoklasten könnte somit eventuell später *in vivo* auftretenden Komplikationen ein Stück weit vorbeugen. Ein geeignetes Osteoklasten – spezifisches Nachweismodell wurde 2004 von Schilling et al. in "*Biomaterials*" vorgestellt [121].

5.2 Biokompatibilität der getesteten Knochenersatzmaterialien

Endobon[®]

Da die Hydroxylapatitkeramik Endobon[®] bereits seit über 10 Jahren als etabliertes Knochenersatzmaterial seine erfolgreiche Anwendung zur Auffüllung von Knochendefekten in der Klinik erfährt, sollte es für die vorgelegte Arbeit als Vergleichsmaterial dienen.

Seine Biokompatibilität konnte mit dem vorgestellten Testsystem bestätigt werden. Das Material übt keinen zytotoxischen Effekt auf die kultivierten Osteoblasten aus, so dass eine rasche und deutliche Proliferation der Zellen in Anwesenheit der Substanz möglich war. Weiterhin ist die gelungene Darstellung eines grenzschichtfreien Interface zwischen Prüfkörper und einem ausgebildeten mehrschichtigen Zellayer ein wichtiges Kriterium für die positive Biokompatibilitätsprüfung.

Schließlich konnten die durchgeführten Färbungen der mit Endobon[®] kultivierten Osteoblasten sowie u.a. die Darstellung der Osteoblasten - spezifischen Gen - Expression in der RT - PCR zeigen, dass die Zellen eine typische Differenzierung unter Einwirkung der Hydroxylapatitkeramik erfahren.

Diese Ergebnisse stellen die Basis für den Erfolg des im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Biokompatibilitätsprüfsystems dar.

Auch in der Literatur lassen sich verschiedene Studien finden, die die Biokompatibilität von Endobon[®] belegen konnten. Sowohl im Tiermodell [26], als auch in mittelfristigen [39;48;78;86;140] Untersuchungen und sogar in der Langzeituntersuchung [8] an Patienten, die mit Endobon[®] versorgt wurden, ließ sich die Biokompatibilität der Hydroxylapatitkeramik zeigen. Seine knöchernen Integration ist möglich, da es zur chemischen Bindung zwischen dem Hydroxylapatit und dem natürlichen Knochen kommt. Außerdem können Kollagenfasern an der Oberfläche der Keramik anhaften und sich Grundsubstanz zwischen den Kristalliten ablagern (micromechanical interlocking) [23;100]. Es wird allerdings darauf hingewiesen, dass eine knöchernen Integration von Hydroxylapatitkeramiken nur bei einer Implantation mit flächigem Kontakt zur Spongiosa und möglichst ohne direkte Beziehung zum lokalen Bindegewebe erfolgen kann [48]. Weichteilgewebe wie Muskulatur oder Periost kann mit der eingebrachten Hydroxylapatitkeramik in Konkurrenz zum Knocheneinwachsen stehen und dadurch die Integration stören oder sogar verhindern [6].

Eine sichere Beurteilung der knöchernen Integration von Endobon[®] *in vivo* gestaltet sich jedoch schwierig. Konventionelle Röntgenaufnahmen liefern aufgrund der hohen Strahlendichte von Endobon[®] nur diskrete Hinweise über seine knöchernen Integration [8]. Die beste Methode zum Nachweis der knöchernen Durchbauung ist die Histologie [8;136], die allerdings nach erfolgter Implantation nur bei wenigen Patienten, z.B. im Rahmen einer Metallentfernung der stabilisierenden Osteosynthese, erfolgen kann. Ansätze zur Durchführung einer Kernspintomographie unter Verwendung von intravenös appliziertem Kontrastmittel zur Darstellung der erfolgten Integration von Hydroxylapatitimplantaten sind bereits in der Anwendung [87;119]. Allerdings zeigt dieses Verfahren Nachteile bezüglich eines zusätzlichen Risikos für den Patienten hinsichtlich der Ausbildung einer allergischen Reaktion. Und weiterhin ist die Durchführung von Magnetresonanztomographien keinesfalls kostengünstig.

Sowohl röntgenologisch als auch im Rahmen von möglichen histologischen Untersuchungen [8;48;86] wurde mehrfach gezeigt, dass Endobon[®] im Rahmen

des "bone remodeling" nicht resorbiert wird. Diese Tatsache wäre ein wichtiger Ansatz für eventuelle weitere Biokompatibilitätsprüfungen unter Verwendung von Osteoklasten in der Zellkultur. Endobon[®] könnte hier als Negativkontrolle seine Anwendung finden.

Das Material eignet sich, neben seiner Primärfunktion als Knochenersatzstoff, aufgrund seines vielfältigen und langjährigen Einsatzes *in vitro* und *in vivo* sehr gut als Vergleichsmaterial für die Untersuchung verschiedener Biokompatibilitätsprüfungen.

Biobon[®], Calcibon[®]

Für die beiden getesteten Kalziumphosphatzemente Biobon[®] und Calcibon[®] konnte mit Hilfe der durchgeführten *in vitro* Prüfungen ihre Biokompatibilität in gleicher Weise wie für die Hydroxylapatitkeramik belegt werden. Es läßt sich eine spontane Zellproliferation, ein direkter Zell – Prüfkörper - Kontakt und auch eine Osteoblasten - spezifische Differenzierung der Kultur in Anwesenheit der Knochenersatzmaterialien im Rahmen der dargestellten Experimente zeigen.

Verschiedene Untersuchungen mit Kalziumphosphatzementen ergaben, dass entsprechende Materialien biokompatibel sind [10;16;17;62;72;77]. Die biokompatiblen Eigenschaften von Kalziumphosphaten können unter anderem durch ihre Ähnlichkeit mit dem natürlichen Knochenmineral aufgrund ihrer chemischen Zusammensetzung erklärt werden [81;124;130]. Außerdem ist es Schilling et al. [121] gelungen, die Resorbierbarkeit von Kalziumphosphatzementen nachzuweisen. Da die Knochenzemente als eine formbare Paste angemischt werden und erst bei Körpertemperatur aushärten, sind sie leicht zu verarbeiten. Außerdem weisen einige Autoren darauf hin, dass Kalziumphosphate im Rahmen des Knochenersatzes auch als Träger für Medikamente und Wachstumsfaktoren dienen können [91;130].

Hinsichtlich der Ergebnisse nach klinischer Anwendung von Biobon[®] lassen sich in der gegenwärtigen Literatur noch keine Langzeitdaten finden. Linhart et al. [91] konnten allerdings in einer klinischen Studie mittelfristige Untersuchungsergebnisse von Patienten, die mit dem Kalziumphosphatzement

versorgt wurden, erheben. Die Autoren haben keine Komplikationen bezüglich der Anwendung von Biobon[®] festgestellt und dem Material, unter gleichzeitiger Verwendung einer stabilen Osteosynthese, einen alternativen Stellenwert zu nicht resorbierbaren Knochenersatzstoffen eingeräumt. Es konnte weiterhin darauf hingewiesen werden, dass die funktionellen Resultate keine relevanten Unterschiede im Vergleich zu autogenen Transplantaten aufwiesen.

Der Kalziumphosphatzement Calcibon[®] ist erst seit Januar 2003 auf dem Markt und entsprechend bleibt abzuwarten, welche klinischen Ergebnisse seine Anwendung hervorbringt. Es ist noch einmal darauf hinzuweisen, dass das Material neben einer guten Proliferation und Expression von Osteocalcin und Bone Sialo Protein vor allem bezüglich der alkalischen Phosphatase den besten Vergleich zu den kultivierten Osteoblasten ohne Einfluß eines Biomaterials aufweist. Entsprechend könnte erwartet werden, dass Calcibon[®] im Rahmen der klinischen Anwendung ebenfalls gute Ergebnisse bringt.

Dentin

Elfenbein ist eines der ersten Knochenersatzmaterialien überhaupt. In seiner Anwesenheit konnte im Rahmen der durchgeführten Experimente eine rasche Proliferation der Osteoblasten nachgewiesen werden. Die Färbungen der Zellkultur bezüglich alkalischer Phosphatase, Kollagen sowie der Mineralisation von extrazellulärer Matrix weisen keine deutlichen Unterschiede im Vergleich zu denen in Anwesenheit der anderen Knochenersatzmaterialien auf. Außerdem ist auch auf den Schliffpräparaten ein grenzschichtfreies Interface zwischen der Dentinoberfläche und den Osteoblasten mit Kollagenbildung und der Ausbildung eines Multilayers zu erkennen. Die Ergebnisse der Reverse Transkriptase - PCR bezüglich der Osteoblasten - spezifischen Differenzierung zeigen, dass Zellen auf Dentin später Osteocalcin, Bone Sialo Protein und auch alkalische Phosphatase exprimieren bzw. eine verzögerte Differenzierung erfahren.

Dentin besitzt eine vollkommen glatte Oberfläche und weist überhaupt kein Porensystem auf. Somit können Osteoblasten in der Zellkultur sich zwar an das Material anlagern, dieses jedoch nicht infiltrieren. Allerdings konnte Prof. König

[76] bereits 1913 von dem erfolgreichen Einsatz von Elfenbeinprothesen in Tier und Mensch berichten, die unter aseptischen Bedingungen unter Gewährleistung einer festen Fixierung zur knöchernen Einheilung gebracht werden konnten. Der Autor berichtete sogar, dass das Material im natürlichen Knochen eine Veränderung seiner glatten Oberfläche erfährt, so dass Zellen hinein wachsen können und das Implantat nicht nur wie ein Fremdkörper eingekapselt wird. Daher ist ebenfalls die Untersuchung des Materials in einer Osteoklastenkultur von Interesse, wie Schilling et al. bereits zeigten [121].

Allerdings hat Dentin aufgrund der heutigen wissenschaftlichen Entwicklung im Rahmen der Forschung auf dem Gebiet von Knochenersatzstoffen und insbesondere in Hinblick auf die zahlreichen und hohen Anforderungen an entsprechende Substanzen seine Bedeutung verloren. Seine Rolle in *in vitro* - Biokompatibilitätsprüfungen sollte daher in der internen Kontrolle liegen.

Basierend auf der erfolgreichen Durchführung der Osteoblasten - spezifischen Biokompatibilitätsprüfung der hier erläuterten, bekannten Biomaterialien ist davon auszugehen, dass das vorgestellte *in vitro* - Modell sehr gut zur Charakterisierung neuer Knochenersatzstoffe geeignet ist. Die verwendeten Biomaterialien Endobon[®] und Biobon[®] sind bereits längere Zeit in der klinischen Anwendung etabliert, so dass die positiven Testergebnisse in der Zellkultur ihre exzellente Biokompatibilität bestätigen können. Gleiches trifft auch für die Untersuchung des neuen Kalziumphosphatzementes Calcibon[®] zu. Da der Beginn seines klinischen Einsatzes jedoch noch nicht lange zurück liegt, sind neue *in vitro* - Untersuchungen mit dem Material weiterhin interessant und liefern Ansätze für weitere Fragestellungen im Rahmen der Erforschung von Knochenersatzmaterialien. Die Untersuchung von Dentin im Rahmen von standardisierten Biokompatibilitätsprüfungen spielt allerdings eine untergeordnete Rolle. Seine Bedeutung für interne Kontrollen wurde bereits oben beschrieben. Für die Entwicklung von anerkannten Testsystemen, die Ersatzstoffe vor allem auch für die Anwendung in der Unfall- und Wiederherstellungschirurgie und operativen Orthopädie untersuchen und vergleichen sollen, ist Dentin den anderen Biomaterialien unterlegen.

5.3 Bedeutung von reproduzierbaren Osteoblasten - spezifischen Biokompatibilitätsprüfungen

Der Einsatz von Biomaterialien hat in den letzten 30 Jahren in vielen Bereichen der Medizin entscheidend an Bedeutung gewonnen [49-51]. Es werden unterschiedliche Materialien für verschiedene Indikationen eingesetzt. Ein "ideales" Knochenersatzmaterial, das alle in Kapitel 2.3. erläuterten Anforderungen erfüllt, gibt es jedoch noch lange nicht. Daher ist es um so wichtiger, dass im Rahmen der Entwicklung von neuen Ersatzstoffen ein standardisiertes Modell zur Biokompatibilitätsprüfung angewendet wird, das leicht reproduzierbar ist, das Verständnis um die Knochenzellbiologie mit einbezieht und die in Kap. 2.6. dargestellten Fragen (s. S.18) vor der Durchführung eines Großtierexperimentes beantworten kann.

In der Literatur werden zahlreiche Testsysteme zur Biokompatibilitätsprüfung von Knochenersatzmaterialien angeboten. Die meisten lassen sich jedoch schlecht miteinander vergleichen, da einerseits unterschiedliche Parameter bezüglich der Biokompatibilität von Biomaterialien untersucht werden und andererseits verschiedene Zelllinien- und arten für die Tests ihre Anwendung finden [2;7;9;42;52;61;63;69;93;94;96;104;114;123;134;135;137].

Auswahl geeigneter Zellen für die *in vitro* - Biokompatibilitätsprüfung

Zur Durchführung von standardisierten *in vitro* - Zytotoxizitätstest werden häufig Fibroblasten, aus humanen [83] oder Mausfibroblasten – Zelllinien [58;59], verwendet. Da diese Zellen *in vivo* entscheidend an der Reparationsphase der Wundheilung beteiligt sind, spielen sie natürlich auch in bezug auf die Gewebsreaktion auf ein eingebrachtes Ersatzmaterial eine wichtige Rolle. Die Ermittlung von Zytotoxizitäts - Titern im Rahmen dieser Versuche liefert daher bereits wichtige Hinweise auf die Eigenschaften eines zu untersuchenden Materials. Es muß allerdings bedacht werden, dass mit diesen Untersuchungen keine Zell - spezifischen Reaktionen nachgewiesen werden können. Insbesondere unter Berücksichtigung der in Kapitel 2.3. dargestellten zahlreichen Anforderungen

an einen geeigneten Knochenersatzstoff ist sein Einfluß auf die Zielzellen des betreffenden Gewebes, also auf Osteoblasten, bereits im *in vitro* Modell bedeutsam. Eine standardisierte Osteoblasten - spezifische Biokompatibilitätsprüfung ist daher von großer Bedeutung.

Im Rahmen von *in vitro* - Modellen zur Testung von Biomaterialien finden in der Literatur verschiedene Osteoblastentypen Anwendung. Unter Berücksichtigung ihrer Eigenschaften und in bezug auf die Zell - spezifischen Fragestellungen in Versuchen mit neuen Knochenersatzmitteln weisen die verwendeten Zellen allerdings einige Nachteile auf. Häufig werden Tumor - Zelllinien [2;52;96] und primäre humane Knochenzellen [65;104;123;135;144] genutzt. Die Tumorzellen können zwar relativ einfach und lange kultiviert werden, doch fehlt ihnen die Möglichkeit zur Differenzierung. Es läßt sich somit nicht die physiologische Reaktion der Zielzellen im Gewebe nachahmen. Denn wenn man sich noch einmal die Komplexität der Knochenbiologie und die gewünschte Integration von Biomaterialien in diesen Prozeß vergegenwärtigt, so wird deutlich, dass bereits das Verhalten der Osteoblasten *in vitro* entscheidend für die Charakterisierung von Prüfsubstanzen ist. Tumor - Zelllinien sind daher für Osteoblasten - spezifische Biokompatibilitätsprüfungen nicht die erste Wahl.

Primäre humane Osteoblasten weisen hingegen ein anderes Problem für die Standardisierung von entsprechenden *in vitro* - Modellen auf. Es läßt sich unter Verwendung dieser Zellen keine Reproduzierbarkeit der Experimente erreichen, da die Spendermaterialien eine gewisse Heterogenität aufweisen. Weiterhin bringen die gewonnenen Osteoblasten je nach Versuchsprotokoll unterschiedliche Eigenschaften mit. Dem Vorteil dieser Osteoblasten, die von der Zielspezies stammen, steht somit die mangelnde Vergleichbarkeit durch ihre Inhomogenität gegenüber. Nebenbei muß außerdem bedacht werden, dass die Aufbereitung der primären humanen Osteoblasten einen langen Zeitraum von einigen Wochen benötigen kann.

Toricelli et al. [133] machen noch einen weiteren Vorschlag für Osteoblastenkulturen. Sie haben Zellen von osteopenischen und gesunden Schafen zur Charakterisierung von Titan und Biogläsern *in vitro* eingesetzt. Die

Eignung dieses Zelltyps ist allerdings ebenso fragwürdig wie die oben genannten primären humanen Osteoblasten, da Zellen von Großtieren ebenfalls eine hohe Heterogenität aufweisen.

Den vorgestellten Zelltypen stehen primäre Mausosteoblasten gegenüber. Die Zellen aus Schädelcalvarien weisen eine hohe Homogenität auf. Sie können, wie in Kapitel 3.3. beschrieben, relativ einfach und reproduzierbar gewonnen werden. Ihre Kultivierung ist unter Standardbedingungen über mehrere Wochen möglich. Mit primären Mausosteoblasten lassen sich *in vitro* - Charakterisierungen von Knochenersatzmaterialien mit den späteren Zielzellen des Knochens vornehmen. Ihr einziger Nachteil besteht in der Zugehörigkeit einer anderen Spezies. Doch unter den oben genannten bisherigen Möglichkeiten stellen die Mausosteoblasten eine sinnvolle Alternative dar und sollten in einem Standardmodell zur präklinischen Untersuchung von Biomaterialien ihren festen Platz erhalten.

Genormte Zytotoxizitätstest mit Fibroblasten in Anwesenheit neuer Knochenersatzmaterialien (ISO 10993-5 (11/1999) und 10993-12 (09/1996)) sind gewebeunabhängig und könnten weiterhin durchaus vor Osteoblasten - spezifischen Biokompatibilitätstest erfolgen. Sie sollten dann vielleicht den Stellenwert der primären Auswahl von neuen Ersatzstoffen einnehmen.

Bedeutung der Langzeitzellkultur und der Auswahl der Osteoblasten - spezifischen *in vitro* – Versuche

Untersuchungszeitraum

Zur Standardisierung eines geeigneten *in vitro* - Modells für die Osteoblasten - spezifische Biokompatibilitätsprüfung sollte die Überlegung angestellt werden, welcher Untersuchungszeitraum sinnvoll ist. Dieser hängt allerdings unter anderem von dem verwendeten Zelltyp ab. Humane primäre Osteoblasten beispielsweise benötigen 2 bis 3 Wochen zum Erreichen eines konfluenten Zellayers in der Kultur, während primäre Zellen aus Ratten- oder Mauscalvarien diesen Zustand bereits nach 3 – 5 Tagen zeigen. Im Folgenden soll aber auf

Letzere eingegangen werden, da sie, wie oben beschrieben, z. Zt. die Zellen der Wahl sind.

Obwohl primäre Ratten- oder Mausosteoblasten lange in der Kultur gehalten werden können, beschreiben einige Autoren Versuchsprotokolle unter Verwendung besagter Zelltypen zur Charakterisierung von Biomaterialien, in denen der Untersuchungszeitraum nur etwa 1 bis 2 Wochen beträgt [2;33;61;137]. Die Proliferation der Osteoblasten sowie die Expression früher Differenzierungsmarker wie die alkalische Phosphatase oder Kollagen können zwar nach 2 Wochen Kultivierung dargestellt werden, doch machen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deutlich, dass erst durch die Untersuchung der Zellkultur über den längeren Zeitraum von 28 Tagen einzelne Unterschiede bezüglich der Anwesenheit der verschiedenen Knochenersatzmaterialien aufgezeigt werden konnten. Unter Gewährleistung steriler und standardisierter Inkubationsbedingungen stellt die Kultivierung von primären Mausosteoblasten über 4 Wochen und länger kein Hindernis bezüglich der Reproduzierbarkeit des *in vitro* - Modells dar. Die Langzeitkultur bietet die Möglichkeit, unvorhergesehene Reaktionen der Zellen auf neue Biomaterialien besser erkennen zu können, die Beeinflussung des pH - Milieus durch die Ersatzstoffe genauer zu betrachten und vor allem den eventuell unterschiedlichen Grad der Differenzierung der Osteoblasten zu mehreren bestimmten Zeitpunkten darstellen zu können.

In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass die Kultivierung von Osteoblasten über 28 Tage hinaus keine neuen Hinweise liefern. Daher erscheint der Untersuchungszeitraum von 28 Tagen als sinnvolle Basis für ein standardisiertes Osteoblasten - spezifisches Biokompatibilitätsprüfungssystem *in vitro*.

Regelmäßige Kontrolle der Zellkultur

Während der Durchführung des hier beschriebenen Experimentes stellten die lichtmikroskopische Beobachtung der Zellkultur sowie die regelmäßige Analyse des pH - Wertes im Kulturmedium grundlegende Parameter der Biokompatibilitätsprüfung dar. Beide Verfahren liefern erste Hinweise bezüglich der Proliferation der kultivierten Zellen bzw. eventueller zytotoxischer

Eigenschaften der Prüfkörper. Ihre regelmäßige Durchführung unterliegt keinen wesentlichen Fehlerquellen und verursacht keine zusätzlichen Kosten für das Experiment. Die fotografische Dokumentation der Zellproliferation sowie die pH - Metrie sollten also in jedem Fall ein fester Bestandteil eines *in vitro* - Modells sein.

Färbungen der Zellkultur

Im Rahmen des hier vorgestellten *in vitro* - Modells wurden die in Anwesenheit der verschiedenen Biomaterialien gewachsenen Zellen bezüglich unterschiedlicher Merkmale gefärbt. Die Bedeutung der drei dargestellten Parameter bezüglich Wachstum und Differenzierung von Osteoblasten wurde in Kapitel 2.5. genauer erläutert. Obwohl vor allem Osteoblasten - typische Gene wie Kollagen und alkalische Phosphatase auch mittels einer Reverse Transkriptase - PCR erfaßt werden können, bieten entsprechende Färbungen die Möglichkeit, eine gelungene Proliferation und Differenzierung der Zellkultur darzustellen. Der Kollagennachweis nach van Gieson sowie enzymatische Färbungen bezüglich alkalischer Phosphatase werden auch von anderen Autoren als ergänzende Methoden zur *in vitro* - Biokompatibilitätsprüfung von neuen Testsubstanzen vorgeschlagen [45;92;93]. Zusätzlich ist außerdem die Versilberung nach von Kossa ein entscheidender Nachweis für die erfolgte Mineralisierung extrazellulärer Matrix. Denn die Kalzifizierung der Knochenmatrix ist nur durch differenzierte Osteoblasten möglich.

Besagte Färbungen kultivierter Osteoblasten in Anwesenheit verschiedener Biomaterialien lassen sich relativ einfach und mehrfach anfertigen und tragen neben Zell - spezifischen Untersuchungen entscheidend zur Beurteilung einer gelungenen Zellkultur bei. Sie liefern wichtige Hinweise für eventuelle unterschiedliche Einflüsse der Prüfsubstanzen auf die Zielzellen. Wie aber auch bereits erläutert, sollten nur anhand der Färbungen keine definitiven Aussagen bezüglich der Eignung getesteter Materialien gemacht werden. Diese bleiben semiquantitativen und quantitativen Untersuchungen vorbehalten.

Die Durchführung von Färbungen der Zellkultur zur Darstellung Osteoblasten - typischer Proteine wie Kollagen und alkalische Phosphatase sowie der Nachweis

von sog. "bone nodules" mittels Versilberung sollten als ergänzende Methoden im Rahmen der Biokompatibilitätsprüfung von neuen Knochenersatzstoffen mit einbezogen werden.

Darstellung des Zellayer – Material – Interface

Die präklinische Untersuchung neuer Biomaterialien hinsichtlich des Kontaktes zwischen deren Oberfläche und dem angrenzenden Zellayer ist ein besonders wichtiger Aspekt in der Biokompatibilitätsprüfung von Knochenersatzstoffen. Auf die Bedeutung eines direkten Kontaktes zwischen dem Implantat und dem umliegenden Knochen zur Unterhaltung der Osteokonduktion wurde schon in Kapitel 2.3. hingewiesen. Die Anfertigung von Schliffpräparaten zur Darstellung dieses Interface in *in vitro* Versuchen stellt eine geeignete Methode dar. Wie in Kapitel 3.8. beschrieben, lassen sich kultivierte Osteoblasten, die auf getesteten Ersatzstoffen gewachsen sind, sogar bei einer Schichtdicke der Präparate von 60 µm zeigen. Diese Tatsache macht es möglich, auch Prüfkörper zu untersuchen, die, wie in dem vorliegenden Experiment das Dentin, aufgrund eines fehlenden Porensystems nicht ausreichend in der Vorbereitung infiltriert werden können. Hierbei scheint die Toluidinblau – Färbung zur sicheren Darstellung eines grenzschichtfreien Kontaktes zwischen Zellen und Materialoberfläche besonders gut geeignet.

Die knöcherne Integration von implantierten Knochenersatzstoffen wird im Rahmen von *in vivo* - Studien sowohl im Tierexperiment [26;43;44;72;125] als auch, wenn möglich, bei entsprechend versorgten Patienten [8;39;48;78;86;120;140] mittels histologischer Analyse beurteilt. Zur Untersuchung des Zellverhaltens auf neuen Biomaterialien *in vitro* hingegen lässt sich in der Literatur anstelle von histologischen Präparaten vor allem die Rasterelektronenmikroskopie finden [9;69;73;88;135;137]. Diese macht sicherlich eine genauere Darstellung von Änderungen der zytologischen Morphologie möglich und lässt den Kontakt zwischen Osteoblasten und Materialoberfläche ebenfalls verdeutlichen. Zum Aufzeigen des Interface zwischen beiden Komponenten und zur Beurteilung einer Grenzschicht zwischen Zellayer und Prüfkörper ist die Schlifftechnik allerdings besonders gut geeignet. Neben diesem

Aspekt spricht auch die Reproduzierbarkeit dieser Methode für seine Bedeutung in der Standardisierung eines Testsystems für Knochenersatzstoffe. Von einem Präparat lassen sich zahlreiche Schliffe anfertigen und bei Bedarf mehrfach anfärben. Außerdem ist für ihre Anfertigung kein gesonderter Versuchsansatz notwendig, da hierfür beispielsweise die Prüfkörper verwendet werden können, die im Rahmen der direkten Färbungen der Zellkultur entnommen werden. Schliffpräparate von zu testenden Biomaterialien, auf denen Osteoblasten inkubiert wurden, stellen die Affinität der Zellen zu den untersuchten Prüfsubstanzen dar und sollten in jedem Fall im standardisierten *in vitro* - Modell eine wichtige Rolle spielen.

Die Anfertigung von Schliffpräparaten läßt sich auch für entsprechende Untersuchungen nach Kultivierung von Osteoklasten auf Biomaterialien durchführen. Es wurde bereits auf die Bedeutung zusätzlicher Versuche zur Beurteilung der Resorbierbarkeit eines neuen Ersatzstoffes hingewiesen. Die Methode der Schlifftechnik bietet hierfür eine entscheidende Möglichkeit.

Semiquantitative Analyse Osteoblasten - spezifischer Genexpression

In der Literatur werden verschiedene Möglichkeiten zum Nachweis von alkalischer Phosphatase und Osteocalcin angeboten. Einige Autoren verwenden die Analyse des Umsatzes von p-Nitrophenylphosphat zur Untersuchung der Aktivität von alkalischer Phosphatase [2;53;96;135]. Zur quantitativen Bestimmung der Expression von Osteocalcin lassen sich unter anderem auch Enzymimmunoassays und Radioimmunoassays finden [104;144].

Allen genannten Verfahren steht die Reverse Transkriptase - PCR gegenüber. Sie findet in der Literatur mehrfach ihre Anwendung zur Darstellung unterschiedlicher Genexpressionen in Zellkulturen [45;53;96;107;134]. Ihre Durchführung stellt ein semiquantitatives Analyseverfahren dar, da die erfolgreiche Synthese der entsprechenden Gensequenzen durch die zur Verfügung stehende Menge des Primers limitiert sein kann, selbst wenn sich noch ausreichend cDNA im Reaktionsmix befindet. Dennoch sind der RT - PCR einige Vorteile zuzuschreiben.

Es wird noch einmal darauf hingewiesen, dass dieses Verfahren die Möglichkeit bietet, mit einem Versuchsansatz die Expression unterschiedlicher Gene nebeneinander zu bestimmen. Es müssen also nicht verschiedene Versuche durchgeführt werden, deren abschließende Vergleichbarkeit durch die unterschiedlichen Darstellungsformen der Ergebnisse sowie die größere Gefahr von Fehlerquellen durch mehrere Versuchsprotokolle erschwert sein könnte. Es kann statt dessen nach einem einheitlichen Schema vorgegangen werden, das auf einem allgemein üblichen Reaktionsgemisch basiert und nur anhand von gewünschten Primern und eventuell entsprechend geänderten Temperaturen für die Reaktion variiert werden kann.

Weiterhin soll erneut der wichtige Aspekt unterstrichen werden, dass die mRNA - Isolierung zur Durchführung der Reaktion direkt aus den Osteoblasten gewonnen werden kann, die unmittelbar auf den Knochenersatzmaterialien gewachsen sind und somit ein echter Vergleich der Osteoblasten - spezifischen Biokompatibilität verschiedener Testsubstanzen möglich ist. Außerdem lassen sich mit der Anwendung einer RT - PCR Ergebnisse anderer Biokompatibilitätsprüfungen ergänzen bzw. vertiefen, wie z.B. die Verdeutlichung der Kollagen- oder alkalische Phosphatase – Expression, die bereits mit Hilfe von Färbungen der in Anwesenheit der Prüfsubstanzen kultivierten Zellen nachgewiesen wurde.

Geht man davon aus, dass die in Kapitel 3.3. beschriebene Durchführung zur Osteoblastenextraktion die Methode der Wahl ist, so ist klar, dass die Möglichkeit der photometrischen Messung der alkalische Phosphatase – Aktivität durch vorherige Lyse des Zellayers entfällt. Die beschriebene Methode der Präparation erscheint aber sinnvoll, da nur so eine möglichst reine Osteoblastenkultur hergestellt werden kann. Somit stellt die Darstellung der Genexpression für alkalische Phosphatase mit Hilfe der RT - PCR eine gute Alternative zur photometrischen Analyse dar.

ELISA- und Radioimmunassays sind geeignete Methoden, um die Osteocalcinexpression durch kultivierte Osteoblasten zu bestimmen, da beide Verfahren eine quantitative Analyse erlauben. Allerdings wird mit den angebotenen Kits nur das Kulturmedium hinsichtlich Osteocalcin untersucht.

Hierbei werden nicht die Osteoblasten in direktem Kontakt zum Biomaterial erfaßt. Es läßt sich also kein gewünschter Vergleich der Knochenersatzmaterialien in der Zellkultur erreichen. Außerdem darf im Vergleich der ELISA- und Radioimmunassays mit der RT - PCR nicht außer acht gelassen werden, dass entsprechende Kits hohe Kosten im Rahmen eines *in vitro* - Modells zur Osteoblasten - spezifischen Biokompatibilitätsprüfung verursachen.

Die aufgezeigten Vorteile der RT - PCR zur Bestimmung von durch Osteoblasten exprimierte Gene sollte dazu Anlaß geben, diesem Verfahren eine feste Rolle in Hinblick auf die Standardisierung Osteoblasten - spezifischer Biokompatibilitätsprüfungen in entsprechenden *in vitro* - Modellen zukommen zu lassen.

Außerdem bietet dieses Verfahren, wie bereits oben erwähnt, zusätzlich die Möglichkeit, im Rahmen eines ergänzenden Experimentes unter Einbezug von Osteoklasten die Biokompatibilität von neuen Ersatzmaterialien weiter zu untersuchen.

6 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein Testsystem entwickelt, das den Vergleich verschiedener Knochenersatzmaterialien hinsichtlich ihrer Osteoblasten-spezifischen Biokompatibilität erlaubt. In einer Langzeitzellkultur wurden primäre Mausosteoblasten auf einer Hydroxylapatitkeramik (Endobon[®]), zwei Kalziumphosphatzementen (Biobon[®], Calcibon[®]) und Dentin über 4 Wochen inkubiert und die Proliferation und Differenzierung der Zellen in Anwesenheit der Biomaterialien, sowie in einer Leerkontrolle, untersucht.

Die Verlaufsanalyse des pH - Wertes im Kulturmedium, Färbungen der Zellkultur bezüglich Kollagen, alkalischer Phosphatase und der Mineralisation extrazellulärer Matrix sowie die Darstellung des Zellaufbau – Materialoberflächen - Interface mit Schliffpräparaten konnten die Biokompatibilität der Prüfsubstanzen aufzeigen. Während sich die Durchführung einer photometrischen Messung der Aktivität exprimierter alkalischer Phosphatase als ungeeignet herausstellte, erlaubte die Anwendung einer RT - PCR zur Bestimmung von Bone Sialo Protein, Osteocalcin und alkalischer Phosphatase die Aufdeckung einiger wichtiger Unterschiede hinsichtlich der Biokompatibilität der Biomaterialien. Nur durch die RT - PCR konnte deutlich gemacht werden, dass Osteoblasten in Gegenwart von Dentin eine verzögerte Differenzierung erfahren und in Anwesenheit von Calcibon[®] am besten mit der Kontrollkultur ohne Ersatzmaterial zu vergleichen sind. Dieses Verfahren sollte neben der regelmäßigen Kontrolle des pH - Wertes des Kulturmediums, den genannten Färbungen kultivierter Osteoblasten und der Anfertigung von Schliffpräparaten der Testsubstanzen unbedingt in einem standardisierten *in vitro* - Modell zur Biokompatibilitätsprüfung neuer Knochenersatzstoffe einen besonderen Stellenwert einnehmen.

Das vorgestellte Testsystem ist reproduzierbar, ermöglicht einen Osteoblasten-spezifischen Vergleich von Biomaterialien und kann wichtige Fragen vor Einsatz neuer Implantate in einem Großtierexperiment beantworten. Wünschenswert wäre für die zukünftige Biokompatibilitätsprüfung von Ersatzstoffen eine Kombination der hier beschriebenen Versuche mit Experimenten bezüglich des Verhaltens von Osteoklastenkulturen in Anwesenheit der getesteten Materialien.

7 Literaturverzeichnis

- (1) Ahmad M, McCarthy MB, Gronowicz G. An in vitro model for mineralization of human osteoblast-like cells on implant materials. *Biomaterials* 1999; 20(3):211-220.
- (2) Alliot-Licht B, Gregoire M, Orly I, Menanteau J. Cellular activity of osteoblasts in the presence of hydroxyapatite: an in vitro experiment. *Biomaterials* 1991; 12(8):752-756.
- (3) ASTM-COMMITTEE: F-4 - The American Society for Testing and Materials. Standard Specification for Composition of Ceramic Hydroxylapatite for Surgical Implants. ASTM Standards Dec: ASTM-Designation 1988; F 1185-1188.
- (4) Aubin JE, Liu F. The osteoblast lineage. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, editors. *Principles of bone biology*. San Diego, CA, USA: Academic Press, 1996: 51-68.
- (5) Bauer HJ, Bauer M, Dingeldein E. Zusammensetzung und Aufbau einer porösen Hydroxylapatitkeramik biologischer Herkunft. *Osteo Int* 1994; (2):106-116.
- (6) Bloebaum RD, Bachus KN, Momberger NG, Hofmann AA. Mineral apposition rates of human cancellous bone at the interface of porous coated implants. *J Biomed Mater Res* 1994; 28(5):537-544.
- (7) Blottiere HM, Daculsi G, Anegon I, Pouezat JA, Nelson PN, Passuti N. Utilization of activated U937 monocytic cells as a model to evaluate biocompatibility and biodegradation of synthetic calcium phosphate. *Biomaterials* 1995; 16(6):497-503.
- (8) Briem D, Linhart W, Lehmann W, Meenen NM, Rueger JM. Langzeitergebnisse nach Anwendung einer porösen Hydroxylapatitkeramik (Endobon) zur operativen Versorgung von Tibiakopffrakturen. *Unfallchirurg* 2002; 105(2):128-133.
- (9) Brook IM, Craig GT, Lamb DJ. In vitro interaction between primary bone organ cultures, glass-ionomer cements and hydroxyapatite/tricalcium phosphate ceramics. *Biomaterials* 1991; 12(2):179-186.
- (10) Brown WE, Chow LC. A new calcium phosphate setting cement. *J Dent Res* 1983; (62):672.
- (11) Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, Scully S, Tan HL, Xu W, Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 1998; 12(9):1260-1268.
- (12) Burgess TL, Qian Y, Kaufman S, Ring BD, Van G, Capparelli C, Kelley M, Hsu H, Boyle WJ, Dunstan CR, Hu S, Lacey DL. The ligand for

- osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. *J Cell Biol* 1999; 145(3):527-538.
- (13) Caswell AM, Russell RGG, Whyte MP. Hypophosphatasia: Pediatric forms. *J Pediatr Endocrinol* 1989; (3):73-92.
- (14) Chu ML, Williams CJ, Pepe G, Hirsch JL, Prockop DJ, Ramirez F. Internal deletion in a collagen gene in a perinatal lethal form of osteogenesis imperfecta. *Nature* 1983; 304(5921):78-80.
- (15) Claes L, Hoellen I, Ignatius A. Resorbierbare Knochenzemente. *Orthopäde* 1997; 26(5):459-462.
- (16) Constantino PD, Friedman CD, Jones K, Chow LC, Pelzer HJ, Sisson GASr. Hydroxyapatite cement: Basic chemistry and histological properties. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1991; (117):379-384.
- (17) Constanz BR, Ison IC, Fulmer MT, Poser RD, Smith ST, VanWagoner M, Ross J, Goldstein SA, Jupiter JB, Rosenthal DI. Skeletal repair by in situ formation of the mineral phase of bone. *Science* 1995; (267):1796-1799.
- (18) Cornell CN. Osteoconductive materials and their role as substitutes for autogenous bone grafts. *Orthop Clin North Am* 1999; 30(4):591-598.
- (19) Corral DA, Amling M, Priemel M, Loyer E, Fuchs S, Ducy P, Baron R, Karsenty G. Dissociation between bone resorption and bone formation in osteopenic transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(23):13835-13840.
- (20) Curtis TA, Ashrafi SH, Weber DF. Canalicular communication in the cortices of human long bones. *Anat Rec* 1985; 212(4):336-344.
- (21) David JP, Neff L, Chen Y, Rincon M, Horne WC, Baron R. A new method to isolate large numbers of rabbit osteoclasts and osteoclast-like cells: application to the characterization of serum response element binding proteins during osteoclast differentiation. *J Bone Miner Res* 1998; 13(11):1730-1738.
- (22) Davies J, Warwick J, Totty N, Philp R, Helfrich M, Horton M. The osteoclast functional antigen, implicated in the regulation of bone resorption, is biochemically related to the vitronectin receptor. *J Cell Biol* 1989; 109(4):1817-1826.
- (23) de Bruijn JD, van Blitterswijk CA, Davies JE. Initial bone matrix formation at the hydroxyapatite interface in vivo. *J Biomed Mater Res* 1995; 29(1):89-99.
- (24) Demay MB, Roth DA, Kronenberg HM. Regions of the rat osteocalcin gene which mediate the effect of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on gene transcription. *J Biol Chem* 1989; 264(4):2279-2282.
- (25) Desbois C, Hogue DA, Karsenty G. The mouse osteocalcin gene cluster contains three genes with two separate spatial and temporal patterns of expression. *J Biol Chem* 1994; 269(2):1183-1190.

- (26) Dingeldein E, Donath K, Wahlig H, Bauer HJ. Einheilung einer porösen Hydroxylapatit-Keramik biologischer Herkunft im spongiösen Knochenlager von Kaninchen. *Osteo Int* 1994; (2):112-116.
- (27) Ducheyne P, De Meester P, Aernoudt E. Influence of a functional dynamic loading on bone ingrowth into surface pores of orthopedic implants. *J Biomed Mater Res* 1977; 11(6):811-838.
- (28) Ducy P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C, Smith E, Bonadio J, Goldstein S, Gundberg C, Bradley A, Karsenty G. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* 1996; 382(6590):448-452.
- (29) Ducy P, Karsenty G. Two distinct osteoblast-specific cis-acting elements control expression of a mouse osteocalcin gene. *Mol Cell Biol* 1995; 15(4):1858-1869.
- (30) Ducy P, Schinke T, Karsenty G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science* 2000; 289(5484):1501-1504.
- (31) Ducy P, Starbuck M, Priemel M, Shen J, Pinero G, Geoffroy V, Amling M, Karsenty G. A *Cbfa1*-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development. *Genes Dev* 1999; 13(8):1025-1036.
- (32) Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 1997; 89(5):747-754.
- (33) el Ghannam A, Ducheyne P, Shapiro IM. Formation of surface reaction products on bioactive glass and their effects on the expression of the osteoblastic phenotype and the deposition of mineralized extracellular matrix. *Biomaterials* 1997; 18(4):295-303.
- (34) Felix R, Neuman WF, Fleisch H. Aerobic glycolysis in bone: lactic acid production by rat calvaria cells in culture. *Am J Physiol* 1978; 234(1):51-55.
- (35) Ferrari SL, Traianedes K, Thorne M, Lafage-Proust MH, Genever P, Cecchini MG, Behar V, Bisello A, Chorev M, Rosenblatt M, Suva LJ. A role for N-cadherin in the development of the differentiated osteoblastic phenotype. *J Bone Miner Res* 2000; 15(2):198-208.
- (36) Fleming JE, Jr., Cornell CN, Muschler GF. Bone cells and matrices in orthopedic tissue engineering. *Orthop Clin North Am* 2000; 31(3):357-374.
- (37) Franzoso G, Carlson L, Xing L, Poljak L, Shores EW, Brown KD, Leonardi A, Tran T, Boyce BF, Siebenlist U. Requirement for NF-kappaB in osteoclast and B-cell development. *Genes Dev* 1997; 11(24):3482-3496.
- (38) Gay CV, Mueller WJ. Carbonic anhydrase and osteoclasts: localization by labeled inhibitor autoradiography. *Science* 1974; 183(123):432-434.

-
- (39) Gierse H, Donath K. Reactions and complications after the implantation of Endobon including morphological examination of explants. *Arch Orthop Trauma Surg* 1999; 119(5-6):349-355.
- (40) Greenwald AS, Boden SD, Goldberg VM, Khan Y, Laurencin CT, Rosier RN. Bone-graft substitutes: facts, fictions, and applications. *J Bone Joint Surg Am* 2001; 83(2):98-103.
- (41) Grigoriadis AE, Wang ZQ, Cecchini MG, Hofstetter W, Felix R, Fleisch HA, Wagner EF. c-Fos: a key regulator of osteoclast-macrophage lineage determination and bone remodeling. *Science* 1994; 266(5184):443-448.
- (42) Grimandi G, Weiss P, Millot F, Daculsi G. In vitro evaluation of a new injectable calcium phosphate material. *J Biomed Mater Res* 1998; 39(4):660-666.
- (43) Günther KP, Scharf HP, Pesch HJ, Puhl W. Einwachsverhalten von Knochenersatzstoffen. Tierexperimentelle Untersuchung. *Orthopäde* 1998; 27(2):105-117.
- (44) Handschel J, Wiesmann HP, Stratmann U, Kleinheinz J, Meyer U, Joos U. TCP is hardly resorbed and not osteoconductive in a non-loading calvarial model. *Biomaterials* 2002; 23(7):1689-1695.
- (45) Hattar S, Berdal A, Asselin A, Loty S, Greenspan DC, Sautier JM. Behaviour of moderately differentiated osteoblast-like cells cultured in contact with bioactive glasses. *Eur Cell Mater* 2002; (4):61-69.
- (46) Heimke G, Griss P. Ceramic implant materials. *Med Biol Eng Comput* 1980; 18(4):503-510.
- (47) Heini PF, Berlemann U. Bone substitutes in vertebroplasty. *Eur Spine J* 2001; 10(2):205-213.
- (48) Helber MU, Ulrich C. Metaphysärer Defektersatz mit Hydroxylapatitkeramik. 3- bis 4-Jahresnachuntersuchungs-Ergebnisse. *Unfallchirurg* 2000; 103(9):749-753.
- (49) Hench LL. Biomaterials. *Science* 1980; 208(4446):826-831.
- (50) Hench LL, Polak JM. Third-generation biomedical materials. *Science* 2002; 295(5557):1014-1017.
- (51) Hench LL, Wilson J. Surface-active biomaterials. *Science* 1984; 226(4675):630-636.
- (52) Hendrich C, Geyer M, Scheddin D, Schutze N, Eulert J, Thull R. Ein neues Osteoblasten-Zellkultursystem zur normgerechten Prüfung von Biomaterialien. *Biomed Tech (Berl)* 1996; 41(10):278-283.
- (53) Hendrich C, Noth U, Stahl U, Merklein F, Rader CP, Schutze N, Thull R, Tuan RS, Eulert J. Testing of skeletal implant surfaces with human fetal osteoblasts. *Clin Orthop* 2002;(394):278-289.

-
- (54) Hertwig P. Neue Mutationen und Kopplungsgruppen bei der Hausmaus. *Z Indukt Abstammungs-Vererbungs* 1942; (80):220-246.
- (55) Hing KA, Best SM, Tanner KE, Revell PA, Bonfield W. Histomorphological and biomechanical characterization of calcium phosphates in the osseous environment. *Proc Inst Mech Eng (H)* 1998; 212(6):437-451.
- (56) Horwood NJ, Kartsogiannis V, Lam MHX, Romas E, Quinn JMW, Martin TJ, Gillespie MT. Activated T cells are capable of inducing osteoclast formation: A mechanism for rheumatoid arthritis. In: Drezner MC, editor. *Second Joint Meeting of The American Society for Bone and Mineral Research and The International Bone and Mineral Society*. San Francisco, CA: Elsevier Sciences, Inc., 1998: 214.
- (57) Hunter GK, Hauschka PV, Poole AR, Rosenberg LC, Goldberg HA. Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. *Biochem J* 1996; 317 (1):59-64.
- (58) Ignatius AA, Claes LE. In vitro biocompatibility of bioresorbable polymers: poly(L, DL-lactide) and poly(L-lactide-co-glycolide). *Biomaterials* 1996; 17(8):831-839.
- (59) Ignatius AA, Schmidt C, Kaspar D, Claes LE. In vitro biocompatibility of resorbable experimental glass ceramics for bone substitutes. *J Biomed Mater Res* 2001; 55(3):285-294.
- (60) Iotsova V, Caamano J, Loy J, Yang Y, Lewin A, Bravo R. Osteopetrosis in mice lacking NF-kappaB1 and NF-kappaB2. *Nat Med* 1997; 3(11):1285-1289.
- (61) Ishaug SL, Yaszemski MJ, Bizios R, Mikos AG. Osteoblast function on synthetic biodegradable polymers. *J Biomed Mater Res* 1994; 28(12):1445-1453.
- (62) Jarcho M. Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. *Clin Orthop* 1981;(157):259-278.
- (63) Johnson HJ, Northup SJ, Seagraves PA, Atallah M, Garvin PJ, Lin L, Darby TD. Biocompatibility test procedures for materials evaluation in vitro. II. Objective methods of toxicity assessment. *J Biomed Mater Res* 1985; 19(5):489-508.
- (64) Johnson RS, Spiegelman BM, Papaioannou V. Pleiotropic effects of a null mutation in the c-fos proto-oncogene. *Cell* 1992; 71(4):577-586.
- (65) Josset Y, Oum'hamed Z, Zarrinpour A, Lorenzato M, Adnet JJ, Laurent-Maquin D. DNA image cytometry and Ag-NORs-staining application in biocompatibility studies on human osteoblast cells in vitro. *Biomaterials* 1998; 19(19):1791-1798.
- (66) Jowsey J. *Metabolic diseases of bone*. Saunders, Philadelphia: 1977.

- (67) Karsenty G. The genetic transformation of bone biology. *Genes Dev* 1999; 13(23):3037-3051.
- (68) Kaysinger KK, Ramp WK. Extracellular pH modulates the activity of cultured human osteoblasts. *J Cell Biochem* 1998; 68(1):83-89.
- (69) Keller JC, Collins JG, Niederauer GG, McGee TD. In vitro attachment of osteoblast-like cells to osteoceramic materials. *Dent Mater* 1997; 13(1):62-68.
- (70) Kim IS, Otto F, Zabel B, Mundlos S. Regulation of chondrocyte differentiation by Cbfa1. *Mech Dev* 1999; 80(2):159-170.
- (71) Klemsz MJ, McKercher SR, Celada A, Van Beveren C, Maki RA. The macrophage and B cell-specific transcription factor PU.1 is related to the ets oncogene. *Cell* 1990; 61(1):113-124.
- (72) Knaack D, Goad ME, Aiolova M, Rey C, Tofighi A, Chakravarthy P, Lee DD. Resorbable calcium phosphate bone substitute. *J Biomed Mater Res* 1998; 43(4):399-409.
- (73) Knabe C, Gildenhaar R, Berger G, Ostapowicz W, Fitzner R, Radlanski RJ, Gross U. Morphological evaluation of osteoblasts cultured on different calcium phosphate ceramics. *Biomaterials* 1997; 18(20):1339-1347.
- (74) Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S, Kishimoto T. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 1997; 89(5):755-764.
- (75) Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, Morony S, Oliveira-dos-Santos AJ, Van G, Itie A, Khoo W, Wakeham A, Dunstan CR, Lacey DL, Mak TW, Boyle WJ, Penninger JM. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 1999; 397(6717):315-323.
- (76) König F. Über die Implantation von Elfenbein zum Einsatz von Knochen- und Gelenkenden. Nach experimentellen und klinischen Beobachtungen. *Beitr klin Chir* 1913; (85):91-114.
- (77) Kopylov P, Jonsson K, Thorngren KG, Aspenberg P. Injectable calcium phosphate in the treatment of distal radial fractures. *J Hand Surg Br* 1996; 21(6):768-771.
- (78) Langendorff HU, Kaivers P, Schöntag H. Die Auffüllung knöcherner Defekte mit bovinen Hydroxylapatit-Formkörpern bei Frakturen. *Osteo Int* 1994; (2):171-176.
- (79) Langstaff S, Sayer M, Smith TJ, Pugh SM. Resorbable bioceramics based on stabilized calcium phosphates. Part II: evaluation of biological response. *Biomaterials* 2001; 22(2):135-150.

-
- (80) Lecanda F, Towler DA, Ziambaras K, Cheng SL, Koval M, Steinberg TH, Civitelli R. Gap junctional communication modulates gene expression in osteoblastic cells. *Mol Biol Cell* 1998; 9(8):2249-2258.
- (81) Lee DD, Tofighi A, Aiolova M, Chakravarthy P, Catalano A, Majahad A, Knaack D. alpha-BSM: a biomimetic bone substitute and drug delivery vehicle. *Clin Orthop* 1999;(367):396-405.
- (82) Lenz LG, Ramp WK. Elevated medium pH increases collagen synthesis and alkaline phosphatase activity without affecting cell proliferation in osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res* 1991; 6(1):255.
- (83) Li SH, Liu Q, de Wijn JR, Zhou BL, de Groot K. In vitro calcium phosphate formation on a natural composite material, bamboo. *Biomaterials* 1997; 18(5):389-395.
- (84) Li YP, Stashenko P. Characterization of a tumor necrosis factor-responsive element which down-regulates the human osteocalcin gene. *Mol Cell Biol* 1993; 13(6):3714-3721.
- (85) Liaw L, Birk DE, Ballas CB, Whitsitt JS, Davidson JM, Hogan BL. Altered wound healing in mice lacking a functional osteopontin gene (*spp1*). *J Clin Invest* 1998; 101(7):1468-1478.
- (86) Liebendörfer A, Tröster S. Hydroxylapatitkeramik im klinischen Einsatz. Histologische Befunde von 23 Patienten. *Unfallchirurgie* 1997; (23):60-68.
- (87) Liebendörfer A, Tröster S, Dard M, Specht R. Biokompatibilitätsprüfung einer Biokeramik. In: Schnettler R, Hrsg. Knochenersatzmaterialien und Wachstumsfaktoren. Thieme, 1997.
- (88) Lin FH, Yao CH, Sun JS, Liu HC, Huang CW. Biological effects and cytotoxicity of the composite composed by tricalcium phosphate and glutaraldehyde cross-linked gelatin. *Biomaterials* 1998; 19(10):905-917.
- (89) Linhart W. Knochenersatzmaterialien: Biokompatibilität und Funktionalität *in vivo* und *in vitro*. Habilitationsschrift, Universität Hamburg, 2003.
- (90) Linhart W, Briem D. Knochenersatz 2000 bis 2010. Standortbestimmung und Innovation in der Therapie von Knochendefekten. *Orthopäde* 2001; 30(3):189-192.
- (91) Linhart W, Briem D, Schmitz ND, Priemel M, Lehmann W, Rueger JM. Therapie des metaphysären Substanzdefektes nach distaler Radiusfraktur. Mittelfristige Ergebnisse mit einem Kalziumphosphatzement (BIOBON®). *Unfallchirurg* 2003; 106(8):618-624.
- (92) Linhart W, Meenen NM, Rueger JM. Knochenersatzmaterialien: Neue Möglichkeiten und Techniken. *OP-Journal* 2000; (16):294-300.
- (93) Linhart W, Peters F, Lehmann W, Schwarz K, Schilling AF, Amling M, Rueger JM, Epple M. Biologically and chemically optimized composites of

- carbonated apatite and polyglycolide as bone substitution materials. *J Biomed Mater Res* 2001; 54(2):162-171.
- (94) Loty C, Sautier JM, Boulekbache H, Kokubo T, Kim HM, Forest N. In vitro bone formation on a bone-like apatite layer prepared by a biomimetic process on a bioactive glass-ceramic. *J Biomed Mater Res* 2000; 49(4):423-434.
- (95) Ma S, Chen G, Reddi AH. Collaboration between collagenous matrix and osteogenin is required for bone induction. *Ann NY Acad Sci* 1990; (580):524-525.
- (96) Mayr-Wohlfart U, Fiedler J, Gunther KP, Puhl W, Kessler S. Proliferation and differentiation rates of a human osteoblast-like cell line (SaOS-2) in contact with different bone substitute materials. *J Biomed Mater Res* 2001; 57(1):132-139.
- (97) McPherson JM. The utility of collagen-based vehicles in delivery of growth factors for hard and soft tissue wound repair. *Clin Mater* 1992; 9(3-4):225-234.
- (98) Minkin C. Bone acid phosphatase: tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. *Calcif Tissue Int* 1982; 34(3):285-290.
- (99) Mizuno A, Amizuka N, Irie K, Murakami A, Fujise N, Kanno T, Sato Y, Nakagawa N, Yasuda H, Mochizuki S, Gomibuchi T, Yano K, Shima N, Washida N, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Ozawa H. Severe osteoporosis in mice lacking osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 247(3):610-615.
- (100) Muller-Mai CM, Stupp SI, Voigt C, Gross U. Nanoapatite and organoapatite implants in bone: histology and ultrastructure of the interface. *J Biomed Mater Res* 1995; 29(1):9-18.
- (101) Nade S, Armstrong L, McCartney E, Baggaley B. Osteogenesis after bone and bone marrow transplantation. The ability of ceramic materials to sustain osteogenesis from transplanted bone marrow cells: preliminary studies. *Clin Orthop* 1983;(181):255-263.
- (102) Neuman WF, Neuman MW, Brommage R. Aerobic glycolysis in bone: lactate production and gradients in calvaria. *Am J Physiol* 1978; 234(1):41-50.
- (103) Nicholson GC, Moseley JM, Sexton PM, Mendelsohn FA, Martin TJ. Abundant calcitonin receptors in isolated rat osteoclasts. Biochemical and autoradiographic characterization. *J Clin Invest* 1986; 78(2):355-360.
- (104) Oliva A, Salerno A, Locardi B, Riccio V, Della RF, Iardino P, Zappia V. Behaviour of human osteoblasts cultured on bioactive glass coatings. *Biomaterials* 1998; 19(11-12):1019-1025.

-
- (105) Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp GW, Beddington RS, Mundlos S, Olsen BR, Selby PB, Owen MJ. *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 1997; 89(5):765-771.
- (106) Owen M. Cellular dynamics of bone. In: Bourne G, editor. *The biochemistry and physiology of bone*, 2nd edn. Academic. New York: 1972: 271.
- (107) Papagerakis P, Berdal A, Mesbah M, Peuchmaur M, Malaval L, Nydegger J, Simmer J, Macdougall M. Investigation of osteocalcin, osteonectin, and dentin sialophosphoprotein in developing human teeth. *Bone* 2002; 30(2):377-385.
- (108) Posner AS. The mineral of bone. *Clin Orthop* 1985;(200):87-99.
- (109) Predecki P, Stephan JE, Auslaender BA, Mooney VL, Kirkland K. Kinetics of bone growth into cylindrical channels in aluminum oxide and titanium. *J Biomed Mater Res* 1972; 6(5):375-400.
- (110) Rahman S, Oberdorf A, Montecino M, Tanhauser SM, Lian JB, Stein GS, Laipis PJ, Stein JL. Multiple copies of the bone-specific osteocalcin gene in mouse and rat. *Endocrinology* 1993; 133(6):3050-3053.
- (111) Ramp WK, Lenz LG, Kaysinger KK. Medium pH modulates matrix, mineral, and energy metabolism in cultured chick bones and osteoblast-like cells. *Bone Miner* 1994; 24(1):59-73.
- (112) Reddi AH. Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nat Biotechnol* 1998; 16(3):247-252.
- (113) Rifas L, Holliday LS, Gluck SL, Aviolo LV. Activated T cells induce osteoclastogenesis. In: Drezner, editor. *Second Meeting of The American Society for Bone and Mineral Research and The International Bone and Mineral Society*. San Francisco, CA: Elsevier Science, Inc., 1998: 195.
- (114) Risbud M, Saheb DN, Jog J, Bhonde R. Preparation, characterization and *in vitro* biocompatibility evaluation of poly(butylene terephthalate)/wollastonite composites. *Biomaterials* 2001; 22(12):1591-1597.
- (115) Rueger JM. Knochenersatzmittel. In: Rehn J, Schweiberer L, Tscherne H, Hrsg. *Berlin Heidelberg New York* (213): Springer-Verlag, 1992.
- (116) Rueger JM. Knochenersatzmittel: Heutiger Stand und Ausblick. *Orthopäde* 1998; 27(2):72-79.
- (117) Rueger JM, Linhart W, Sommerfeldt D. Biologische Reaktionen auf Kalziumphosphatkeramik-Implantationen: Tierexperimentelle Ergebnisse. *Orthopäde* 1998; 27(2):89-95.
- (118) Sailer HF, Weber FE. Knochenersatzmaterialien. *Mund Kiefer Gesichtschir* 2000; 4(1):384-391.

- (119) Sailer R, Gabl M, Lutz M, Seykora P, Pechlaner S. Integration einer porösen Hydroxylapatitkeramik am distalen Radius älterer Patienten. Radiologische Untersuchung. Unfallchirurg 1999; 102(7):531-534.
- (120) Sarkar MR, Wachter N, Patka P, Kinzl L. First histological observations on the incorporation of a novel calcium phosphate bone substitute material in human cancellous bone. J Biomed Mater Res 2001; 58(3):329-334.
- (121) Schilling AF, Linhart W, Filke S, Gebauer M, Schinke T, Rueger JM, Amling M. Resorbability of bone substitute biomaterials by human osteoclasts. Biomaterials 2004; 25(18):3963-3972.
- (122) Schinke T, McKee MD, Karsenty G. Extracellular matrix calcification: where is the action? Nat Genet 1999; 21(2):150-151.
- (123) Schmidt C, Ignatius AA, Claes LE. Proliferation and differentiation parameters of human osteoblasts on titanium and steel surfaces. J Biomed Mater Res 2001; 54(2):209-215.
- (124) Schmitz JP, Hollinger JO, Milam SB. Reconstruction of bone using calcium phosphate bone cements: a critical review. J Oral Maxillofac Surg 1999; 57(9):1122-1126.
- (125) Shinzato S, Kobayashi M, Mousa WF, Kamimura M, Neo M, Kitamura Y, Kokubo T, Nakamura T. Bioactive polymethyl methacrylate-based bone cement: comparison of glass beads, apatite- and wollastonite-containing glass-ceramic, and hydroxyapatite fillers on mechanical and biological properties. J Biomed Mater Res 2000; 51(2):258-272.
- (126) Shors EC. Coralline bone graft substitutes. Orthop Clin North Am 1999; 30(4):599-613.
- (127) Sommerfeldt DW, Linhart W, Schmandra TC, Konold P, Rueger JM. Die Knochenbank, Richtlinien - Probleme - Anwendung. Unfallchirurgie 1998; 24(5):236-244.
- (128) Sommerfeldt DW, Rubin CT. Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. Eur Spine J 2001; 10(2):86-95.
- (129) Tanaka S, Takahashi N, Udagawa N, Sasaki T, Fukui Y, Kurokawa T, Suda T. Osteoclasts express high levels of p60c-src, preferentially on ruffled border membranes. FEBS Lett 1992; 313(1):85-89.
- (130) Tay BK, Patel VV, Bradford DS. Calcium sulfate- and calcium phosphate-based bone substitutes. Mimicry of the mineral phase of bone. Orthop Clin North Am 1999; 30(4):615-623.
- (131) Thielemann FW, Schmidt K, Koslowski L. Neue Aspekte in der Behandlung größerer Knochendefekte. Aktuelle Traumatol 1983; 13(3):115-119.
- (132) Tondravi MM, McKercher SR, Anderson K, Erdmann JM, Quiroz M, Maki R, Teitelbaum SL. Osteopetrosis in mice lacking haematopoietic transcription factor PU.1. Nature 1997; 386(6620):81-84.

- (133) Torricelli P, Fini M, Giavaresi G, Rocca M, Pierini G, Giardino R. Isolation and characterization of osteoblast cultures from normal and osteopenic sheep for biomaterials evaluation. *J Biomed Mater Res* 2000; 52(1):177-182.
- (134) Trentz OA, Hoerstrup SP, Sun LK, Bestmann L, Platz A, Trentz OL. Osteoblasts response to bone substitutes *in vitro*. *European Cells and Materials* 2003; 5(1):55.
- (135) Trentz OA, Zellweger R, Amgwerd MG, Uhlschmid GK. Testung von Knochenimplantaten auf Zelllinien und humanen Osteoblasten. *Unfallchirurg* 1997; 100(1):39-43.
- (136) Tröster SD. Die Hydroxylapatitkeramik Endobon[®] - Eine alternative Therapiemöglichkeit für Knochendefekte. *Jahrbuch der Orthopädie* 1993;231-246.
- (137) Tsuang YH, Lin FH, Sun JS, Hang YS, Liu HC. In vitro cell behavior of osteoblasts on Pyrost bone substitute. *Anat Rec* 1997; 247(2):164-169.
- (138) Van Heest A, Swiontkowski M. Bone-graft substitutes. *Lancet* 1999; 353(1):28-29.
- (139) Wang ZQ, Ovitt C, Grigoriadis AE, Mohle-Steinlein U, Ruther U, Wagner EF. Bone and haematopoietic defects in mice lacking c-fos. *Nature* 1992; 360(6406):741-745.
- (140) Werber KD, Brauer RB, Weiss W, Becker K. Osseous integration of bovine hydroxyapatite ceramic in metaphyseal bone defects of the distal radius. *J Hand Surg Am* 2000; 25(5):833-841.
- (141) Whyte MP. Hypophosphatasia and the role of alkaline phosphatase in skeletal mineralization. *Endocr Rev* 1994; 15(4):439-461.
- (142) Wintermantel E, Ha SW. *Medizintechnik mit biokompatiblen Werkstoffen und Verfahren*. (Hrsg.) 3. Auflage. Berlin Heidelberg New York: Springer, 2002.
- (143) Yanai T, Katagiri T, Akiyama S, Imada M, Yamashita T, Chiba H, Takahashi N, Suda T. Expression of mouse osteocalcin transcripts, OG1 and OG2, is differently regulated in bone tissues and osteoblast cultures. *J Bone Miner Metab* 2001; 19(6):345-351.
- (144) Zambonin G, Grano M. Biomaterials in orthopaedic surgery: effects of different hydroxyapatites and demineralized bone matrix on proliferation rate and bone matrix synthesis by human osteoblasts. *Biomaterials* 1995; 16(5):397-402.

8 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Johannes M. Rueger (Direktor der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie am Universitätsklinikum Hamburg – Eppendorf) dafür, dass ich die Möglichkeit erhielt, in seiner Abteilung promovieren zu dürfen. Ich fühlte mich als Doktorandin in der Unfallchirurgie des UKE sehr wohl und habe immer wieder freundliche Unterstützung durch die wissenschaftlichen Mitarbeiter von Herrn Prof. Rueger bekommen.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Wolfgang Linhart für die Überlassung des Themas. Darüber hinaus möchte ich mich bei ihm für die Organisation und Betreuung der Arbeit bedanken. Vor allem bei auftretenden Problemen im Rahmen des experimentellen Teils der Dissertation war es immer wieder möglich, mit Herrn Linhart über mögliche Lösungswege zu diskutieren und gemeinsam zu einem Ergebnis zu gelangen. Weiterhin habe ich mit seiner Hilfe gelernt, wissenschaftliche Vorträge zu erstellen und zu präsentieren, was für mich persönlich eine sehr spannende Erfahrung war. Die Arbeit in der experimentellen Unfallchirurgie des UKE unter der Leitung von Herrn Linhart vertiefte nicht nur mein Interesse für das Fach Unfallchirurgie, sondern weckte vor allem meine Freude an wissenschaftlicher Arbeit und Forschung.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Michael Amling, dem Leiter des Forschungspavillons der experimentellen Unfallchirurgie des UKE. Herr Amling konnte mit Hilfe seiner wissenschaftlichen Erfahrung immer wieder zu Verbesserungen des Projektes und Problemlösungen beitragen. Besonders hilfreich war darüber hinaus die stetige und vor allem kollegiale Zusammenarbeit zwischen den Mitarbeitern seiner und Herrn Linharts Arbeitsgruppe.

Ich danke Herrn Dr. Thorsten Schinke, der durch seine andauernde Einsatzbereitschaft in hohem Maße zur erfolgreichen Durchführung der Arbeit beigetragen hat. Besonders hervorheben möchte ich seine freundliche und lehrreiche Anleitung auf dem Gebiet der Molekularbiologie sowie seine zeitweise notwendige moralische Unterstützung.

Ich bedanke mich bei Herrn Dr. Arndt F. Schilling, der mir während der gesamten Dauer meiner Arbeit immer wieder bei diversen Fragen zur Seite stand. Neben seinem technischen Verständnis waren vor allem seine eigenen Erfahrungen als ehemaliger Doktorand der experimentellen Unfallchirurgie des UKE für mich sehr hilfreich.

Mein Dank gilt Herrn Dr. Wolfgang Lehmann, der mich damals für das Projekt begeistern konnte und meine Einarbeitung in die Techniken der Zellkultur übernahm. Seine Hilfe zu Beginn meiner Arbeit schaffte die Basis für das Gelingen der Experimente und mein Interesse für die Forschung.

Ich bedanke mich ganz besonders bei Frau Cordula Müldner, der MTA der experimentellen Unfallchirurgie des UKE. Ohne sie wäre eine erfolgreiche Durchführung der Versuche wahrscheinlich gar nicht möglich gewesen. Frau Müldner half mir nicht nur durch ihre umfangreiche Erfahrung auf den Gebieten der Zellkultur, Molekularbiologie und Histologie, sondern vor allem durch ihre enorme Hilfsbereitschaft, ihr Ideenreichtum und ihre Offenheit für Fragen auch außerhalb ihrer Arbeitszeiten.

Mein Dank gilt außerdem meinem ganzen Freundeskreis, allen voran Dagmar Blicharski und Teresa Müller. Sie haben mir immer wieder Respekt und Bewunderung für meine Arbeit entgegen gebracht und mich mit ihrer Geduld und Kritik bei der Fertigstellung der Dissertation unterstützt.

Mein größter Dank gilt meiner Schwester Kirsten und vor allem meinen Eltern. Sie haben zu jeder Zeit an mich geglaubt und mir vor allem in Phasen von Misserfolgen und Zweifel zur Seite gestanden. Ihrer moralischen und finanziellen Unterstützung und vor allem ihrem Stolz mir gegenüber habe ich es zu verdanken, dass ich diese Arbeit erfolgreich beendet habe.

9 Curriculum Vitae

15. 12. 1977	Geboren in Hamburg
1988 – 1997	Gymnasium Hummelsbüttel Hamburg, Abiturjahrgang 1997
1997 – 1998	Freiwilliges soziales Jahr, Israelitisches Krankenhaus in Hamburg
1998 – 2005	Medizinstudium Universität Hamburg
2000	Ärztliche Vorprüfung
2001	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2003	Famulatur: Abteilung für Anästhesie und Intensivmedizin, Bezirkskrankenhaus Ryhov in Jönköping, Schweden
2004	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2005	3. Tertial des Praktischen Jahres: Abteilung für Orthopädie, Zentralkrankenhaus Kristianstad in Malmö, Schweden
Juni 2005	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung und Erteilung der Approbation als Ärztin

Publikation

W. Linhart, D. Briem, A. Peters, W. Lehmann, J. Windolf, J. M. Rueger. Resorbierbare Kalziumphosphatzemente. Trauma und Berufskrankheit 2004; 6: 277 – 284; Springer Medizin Verlag 2004

Wissenschaftliche Vorträge

Oktober 2003: Bone 2003, Maastricht

In vitro biocompatibility testing of bone substitution materials.

Linhart W., Peters A., Schilling A.F., Schinke T., Amling M., Rueger J.M.

September 2004: Kuntscher Society - Osteosynthese International, Graz

Bone specific in vitro testing of bone substitution materials.

Linhart W., Peters A., Schinke T., Windolf J., Amling M., Rueger J.M.

Oktober 2004: 68. Jahrestagung der DGU, Berlin

Osteoblastenspezifische Biokompatibilitätsprüfung von Knochenersatzmaterialien in vitro.

Peters A., Schinke T., Schilling A.F., Rueger J.M., Amling M., Linhart W.

10 Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Hamburg, August 2005

Anja Peters
