

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

Entzündungsinduktion durch mikropartikuläre Knochenersatzmittel *in vitro*

Dissertation

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

Tobias Lange
aus Wittenberge

Hamburg, 2009

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am: 02.11.2009

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. M. Amling

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: PD Dr. H. Korbmacher

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: PD Dr. T. Schinke

I	Inhaltsverzeichnis	
II	Verzeichnis der Abbildungen	
III	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	
1	Einleitung.....	1
1.1.	Knochenersatzmittel in der klinischen Praxis.....	1
1.2.	<i>particle disease</i>	2
1.3.	Calciumphosphat- basierte Biomaterialien.....	4
2	Fragestellung.....	5
3	Material und Methoden.....	6
3.1.	Material.....	6
3.1.1.	Geräte.....	6
3.1.2.	Verbrauchsmaterial.....	7
3.1.3.	Chemikalien.....	7
3.1.4.	Lösungen.....	8
3.1.5.	Biomaterialien und Positivkontrollen.....	8
3.2.	Methoden.....	9
3.2.1.	Isolation humaner mononukleärer Zellen.....	9
3.2.2.	Zelldifferenzierung im FACS.....	10
3.2.3.	Partikelgrößenverteilungsspektren.....	11
3.2.4.	Rasterelektronenmikroskopie.....	11
3.2.5.	Endotoxin- Test.....	12
3.2.6.	SAR- Methode.....	12
3.2.7.	Weitere Zellkulturansätze.....	13
3.2.8.	Bestimmung der Zytokinkonzentrationen.....	14
3.2.9.	Zytotoxizitätsmessung.....	15
3.2.10.	Statistik.....	16
4	Ergebnisse.....	17
4.1.	Zelldifferenzierung im FACS.....	17

4.2.	Charakterisierung von mikropartikulärem Hydroxylapatit und β - Tricalciumphosphat.....	20
4.2.1.	Rasterelektronenmikroskopie.....	20
4.2.2.	Partikelgrößenverteilungsspektren.....	20
4.2.3.	Endotoxin- Test.....	23
4.3.	Einfluss von mikropartikulärem Hydroxylapatit und β - Tricalciumphosphat auf humane mononukleäre Zellen <i>in vitro</i>	23
4.3.1.	Proinflammatorische Zytokine.....	23
4.3.1.1.	Hydroxylapatit und β - Tricalciumphosphat gleicher Primärpartikelgröße.....	23
4.3.1.2.	β - Tricalciumphosphat variabler Primärpartikelgröße	26
4.3.2.	Myeloische Differenzierung.....	29
4.3.2.1.	Hydroxylapatit und β - Tricalciumphosphat gleicher Primärpartikelgröße.....	29
4.3.2.2.	β - Tricalciumphosphat variabler Primärpartikelgröße	31
4.3.3.	Zytotoxizität.....	33
5	Diskussion.....	34
5.1.	Mikropartikuläre Knochenersatzmittel <i>in vitro</i>	34
5.1.1.	Geeignetes Zellmaterial.....	34
5.1.2.	Klinisch relevante Partikel.....	35
5.1.3.	Applikation standardisierter Partikeldosen.....	36
5.2.	Partikuläres Hydroxylapatit und β - Tricalciumphosphat <i>in vitro</i>	37
6	Zusammenfassung.....	42
7	Literaturverzeichnis.....	43
8	Danksagung.....	58

9 Lebenslauf 59

10 Anlagen 60

Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen

Tab. 1	Antikörperschema für Typisierung von Zellpopulationen innerhalb der PBMC- Fraktion	10
Tab. 2	Messung der Partikelgrößenverteilung mittels Laser- Partikel- Sizer	11
Tab. 3	Partikeloberflächen und kalkulierte Dosen für SAR 10: 1	13
Tab. 4	Zusammenfassung von Ergebnissen der FACS- Analyse	19

Abb. 1	Pathogenese der <i>particle disease</i>	3
Abb. 2	Dosisfindungsversuch für Zymosan und LPS	14
Abb. 3	Ergebnisse der FACS- Analyse	18
Abb. 4	Charakterisierung partikulärer Calciumphosphate mittels REM und Laser- Analyse	21
Abb. 5	Wirkung von HA und β - TCP auf proinflammatorische Zytokine	25
Abb. 6	Wirkung von β - TCP variabler Partikelgröße auf proinflammatorische Zytokine	28
Abb. 7	Wirkung von HA und β - TCP auf die myeloische Differenzierung	30
Abb. 8	Wirkung von β - TCP variabler Partikelgröße auf die myeloische Differenzierung	32
Abb. 9	Zytotoxizität von partikulärem β - TCP	33
Abb. 10	Zusammenfassung	41

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abb.	Abbildung
BCP	biphasisches Calciumphosphat
β- TCP	β- Tricalciumphosphat
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
Ca ²⁺	Calcium
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CO ₂	Kohlendioxid
CTL	zytotoxischer T- Lymphozyt
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d.h.	das heißt
ELISA	<i>enzyme- linked immuno- sorbent assay</i>
EU	<i>endotoxin units</i>
FACS	<i>fluorescence- activated cell sorter</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FITC	Fluorescein- Isothyocyanat
FSC	<i>forward scatter</i>
g	Gramm
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
GM- CSF	<i>granulocyte- macrophage colony- stimulating factor</i>
HA	Hydroxylapatit
IL- 1α	Interleukin- 1α
IL- 1β	Interleukin- 1β
IL- 6	Interleukin- 6
IL- 8	Interleukin- 8
kV	Kilovolt
LDH	Laktatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid
m ²	Quadratmeter
mA	Milliampere
M- CSF	<i>macrophage colony- stimulating factor</i>
mg	Milligramm

Mg ²⁺	Magnesium
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µm ²	Quadratmikrometer
µm ³	Kubikmikrometer
n	Anzahl
NK	Natürliche Killerzelle
nm	Nanometer
n.s.	nicht signifikant
OPG	Osteoprotegerin
p	p- Wert
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PE	Phycoerythrin
pg	Picogramm
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
PMMA	Polymethylmethacrylat
R	Region
RANKL	<i>receptor activator of nuclear factor κB- ligand</i>
rcf	<i>relative centrifugal force</i>
REM	Rasterelektronenmikroskop(ie)
rpm	<i>rotations per minute</i>
RPMI- 1640	<i>Roswell Park Memorial Institute- 1640</i>
S.	Seite
SAR	<i>surface- area- ratio</i>
SSC	<i>sideward scatter</i>
s.u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
T _H	T- Helfer- Zelle

THP- 1	humane Monozyten- Zelllinie
TiO ₂	Titandioxid, Rutil
TLR	<i>toll- like- receptor</i>
TNF- α	Tumor- Nekrose- Faktor- α
TRAP	<i>tartrate resistant acid phosphatase</i>
UHMWPE	<i>ultra high molecular weight- polyethylene</i>
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1. Knochenersatzmittel in der klinischen Praxis

Die operative Wiederherstellung von zugrunde gegangener Knochensubstanz stellt bis zum heutigen Tag eine zentrale Herausforderung chirurgischer, orthopädischer und parodontologischer Praxis dar. Dabei bilden vielfältige Ursachen wie Degeneration, Trauma, Tumor oder Entzündung das ätiologische Spektrum. Dieser hohen Variabilität an Erfordernissen kann nur die Anwendung verschiedener Therapiekonzepte Rechnung tragen.

Die heute am häufigsten angewandte Technik zur Knochendefektheilung stellt die autologe Transplantation von spongiosen Knochen dar. Dieses Ersatzmaterial erfüllt natürlicherweise alle physikalisch- chemischen sowie biologischen Eigenschaften des defizitären Knochens und führt somit zu exzellenten Ergebnissen. Allerdings ist der klinische Einsatz durch den erforderlichen Zweiteingriff zur Entnahme des Transplantats (z.B. am Beckenkamm des betroffenen Patienten) und dessen Komplikationen sowie die begrenzte Verfügbarkeit limitiert.^{12;13;30;45;58;78;86;94;100} Zu den Komplikationen zählen in erster Linie Schmerzen an der Entnahmestelle, die sechs Monate nach der Operation von mehr als einem Drittel der Patienten und nach zwei Jahren von rund 18 % der Patienten berichtet werden.^{7;41;119}

Allogene Transplantate oder Knochen tierischen Ursprungs (Xenografts) sind zwar unbegrenzt verfügbar, bleiben jedoch trotz sterilisierender Maßnahmen potenziell immunogen bzw. infektiös und weisen teilweise eine schlechtere Biokompatibilität, d.h. Verträglichkeit im umliegenden Gewebe, auf.^{101;115}

Folglich sind zur Verbesserung der Therapieoptionen neue Strategien erforderlich geworden. Die Entwicklung und der Einsatz industriell hergestellter inerter oder bioaktiver Knochenersatzmittel spielt dabei eine zunehmende Rolle.¹¹⁶ Diese werden entweder zur Stabilisierung von Frakturen bzw. zum Gelenkersatz eingesetzt (z.B. Metalllegierungen, Polyethylen, Zemente) oder zur temporären mechanischen Unterstützung von Defekten mit gleichzeitiger Verbesserung der Knochenregeneration verwendet (z.B. Calciumphosphatbasierte Biomaterialien). Auch die Kombination aus beidem ist in Form von z.B. Hydroxylapatit- beschichteten Titan- Implantaten (Gelenkersatz) zahlreich zur Anwendung gekommen. Einerseits stellte sich die Einführung synthetisch hergestellter Ersatzmittel als effektive und elegante Methode heraus,^{24;26;31;34;97} andererseits traten unabhängig von Material

und Einsatz immer wieder Komplikationen auf, die unter dem Begriff *particle disease* zusammengefasst werden.

1.2. *Particle disease*

Das Hauptproblem bei der Versorgung von Knochendefekten mit synthetischen Ersatzmitteln unterschiedlicher Art besteht im Auftreten aseptischer Implantatlockerungen infolge von Osteolysen im periprothetischen Gewebe.^{33;60;108} Bereits seit den 1970er Jahren wird vermutet, dass solche Osteolysen mit nach der Implantation entstehenden Abriebpartikeln assoziiert sind.⁴ Ursprünglich wurde dies für Polymethylmethacrylat- Partikel, die in zementierten Implantaten entstehen, diskutiert.⁴ Später wurden periprothetische Osteolysen aber auch im Zusammenhang mit unzementierten Ersatzmitteln identifiziert, bei denen die Partikel aus Polyethylen mit ultrahohem Molekulargewicht (UHMWPE) und verschiedenen Metallen bestehen.^{51;52;80;104} Wahrscheinlich resultieren diese Partikel bei artikulierenden Knochenimplantaten vorwiegend aus der mechanischen Belastung und konsekutiven Kleinstbewegung an der Grenzfläche zwischen Ersatzmittel und Knochen.⁶⁸ Für Calciumphosphat- Keramiken hingegen wird angenommen, dass sie sich im Rahmen der Biodegradation pH- abhängig physikalisch lösen und aufgrund ihrer Mikrostruktur dann schrittweise in Partikel zerfallen.²⁸

Ein etabliertes Modell besagt, dass die Abriebpartikel wie Fremdkörper fungieren und Zellen des angeborenen Immunsystems aktivieren (Abbildung 1). Neben einer Rekrutierung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut (PBMC)⁵ und deren Aktivierung zur Produktion von Metalloproteasen⁷² kommt es zur Phagozytose kleinerer Partikel (bis ca. 20 µm) durch Makrophagen.^{18;38;53} Größere Partikel hingegen führen *in vivo* zu einer Einkapselung mit Granulombildung.¹⁰⁶ Diese Wirkung auf PBMC und daraus differenzierten Makrophagen führt auf molekularer Ebene *in situ* zur Ausschüttung verschiedener proinflammatorischer Mediatoren wie Interleukin- (IL-) 1β und IL- 6.^{38-40;62} Experimentell konnte außerdem die Freisetzung von Tumor- Nekrose- Faktor- (TNF-) α, IL- 1 α, IL- 1β, IL- 6, IL- 8 und Prostaglandin (PG) E₂ in Gegenwart partikulärer Ersatzmaterialien nachgewiesen werden (Abbildung 1).^{36;37;44;42;48;54-56;73;74;83;93;98;103} Neben der Vermittlung einer lokalen Entzündungsreaktion (Induktion assoziierter Zytokine,^{2;99} Chemotaxis neutrophiler Granulozyten,⁷⁹ Regulation von Lymphozyten, Fibroblasten und Gefäßendothel⁸) stimulieren einige dieser Botenstoffe auch die Differenzierung bzw. Aktivität von

Osteoklasten (Abbildung 1).^{3;62;112} Osteoklasten sind hochspezialisierte mehrkernige Zellen, die als einzige Zellen des menschlichen Körpers zur Resorption von Knochen befähigt sind. Aus einer zytokinvermittelten Osteoklastenaktivierung resultiert somit letztlich ein gesteigerter Knochenabbau im Implantatgebiet.

Möglicherweise haben partikuläre Knochenersatzmittel außerdem einen Einfluss auf die Differenzierung der Blutzellen, die in das Implantatgebiet rekrutiert werden (Abbildung 1). So konnte bereits nachgewiesen werden, dass Polyethylen *in vitro* eine vermehrte Freisetzung des Granulozyten- Makrophagen- Kolonien- stimulierenden- Faktors (GM- CSF) bewirkt,⁸⁴ dessen Hauptwirkung in der Differenzierung von myeloischen Stammzellen zu Granulozyten und Monozyten besteht. Weiterhin ist eine direkte Beeinflussung der Liberation jener Mediatoren denkbar, die die Osteoklastenentwicklung fördern (receptor activator of nuclear factor κ B- ligand = RANKL und Makrophagen- Kolonien- stimulierenden- Faktor = M- CSF) oder hemmen (Osteoprotegerin = OPG).

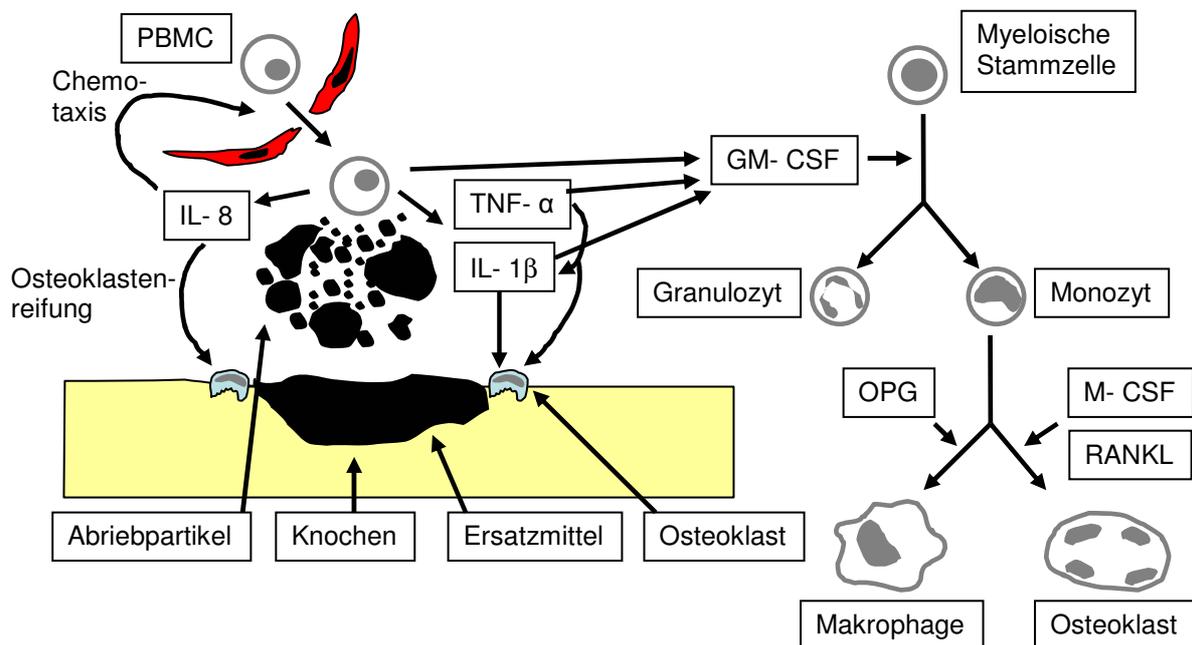


Abbildung 1: Pathogenese der *particle disease*. Im Implantatgebiet entstehende Abriebpartikel fungieren als Fremdkörper und führen zu einer Rekrutierung und Aktivierung von PBMC. Es kommt zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie IL- 1 β , IL- 8 und TNF- α . Außerdem wird die myeloische Differenzierung durch Aktivierung von GM- CSF und möglicherweise auch durch Effekte auf RANKL, M- CSF und OPG beeinflusst. Folgen sind eine Aufrechterhaltung der entzündlichen Reaktion sowie eine gesteigerte Knochenresorption. *In situ* können diese Prozesse eine Lockerung des Ersatzmittels bis hin zum Implantatversagen bedeuten.

1.3. Calciumphosphat- basierte Biomaterialien

Die anorganischen Keramiken Hydroxylapatit (HA) und β - Tricalciumphosphat (β -TCP) haben in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen. Aufgrund ihres stöchiometrischen Calcium/ Phosphat- Verhältnis von 1,5 bei β - TCP ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) bzw. 1,67 bei HA ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$)^{27;35} und ihrer Kristallstruktur sind sie humanem Knochenmineral physikalisch und chemisch sehr ähnlich. Darüber hinaus können sie unter kontrollierten Bedingungen synthetisiert werden und sind unbegrenzt verfügbar. Zusätzliche Voraussetzung für einen erfolgreichen Einsatz als Knochenersatzmittel ist jedoch eine mit autologem Knochen vergleichbare Biokompatibilität. Dazu zählt die Fähigkeit zur Osteogenese (Zellen innerhalb des Implantats bilden neuen Knochen am Defektort), Osteoinduktion (aktive Rekrutierung mesenchymaler Stammzellen, welche zu Knochen aufbauenden Osteoblasten differenzieren) und Osteokonduktion (Vaskularisation und Knochenformation in Richtung des Implantats).²⁹

Mittlerweile haben HA und β - TCP Eingang in zahlreiche medizinische Arbeitsfelder wie die Parodontologie, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Hals- Nasen- Ohren- Medizin, Wirbelsäulenchirurgie und Orthopädie gefunden.^{23;32;50;75-77} Dabei konnte einerseits eine verbesserte Effizienz und biologische Wertigkeit von z.B. HA- beschichteten Implantaten im Vergleich zu unbeschichteten zementierten oder zementfreien Prothesen belegt werden.^{16;17;57;61} Ebenso existieren Studien, die β - TCP als Ersatzmaterial hervorragende osteokonduktive Eigenschaften zuschreiben.⁶⁶

Andererseits wurde auch für HA die Generierung von Abriebpartikeln und Osteolysen im Sinne einer *particle disease* angenommen,^{25;90} teilweise für HA sogar eine höhere Tendenz zur Fragmentation im Vergleich zu anderen Materialien diskutiert.¹¹

Bereits durchgeführte experimentelle Studien mit partikulärem HA und biphasischem Calciumphosphat (BCP), das sich aus unterschiedlichen HA- und β - TCP- Anteilen zusammensetzt, konnte ein immunogenes Potential *in vitro* und *in vivo* belegen.^{42;95;107;114} Für phasenreines β - TCP fehlen Daten über eine mögliche Induktion proinflammatorischer Zytokine *in vitro* bisher. Außerdem existieren keine experimentellen Daten zur Wirkung von HA und β - TCP auf die Aktivierung von Osteoklasten.

2 Fragestellung

Die vorliegende Studie wurde zur Verbesserung des Verständnisses der biologischen Wirkungen partikulärer Knochenersatzmittel durchgeführt. Es wurden erstmals gleichzeitig HA und phasenreines β -TCP gleicher Partikelgröße und -dosis sowie β -TCP variabler Partikelgröße hinsichtlich ihres Einflusses auf humane mononukleäre Zellen *in vitro* untersucht.

Zunächst wurden die verwendeten Biomaterialpartikel und Immunzellen charakterisiert. Dafür wurden eine Größenverteilungsanalyse innerhalb der Partikelproben mittels Laserstreuung und REM sowie eine FACS-Analyse der Zellen durchgeführt. Weiterhin wurden die spezifischen inneren Oberflächen des HA und der verschiedenen β -TCP-Proben mittels Gasadsorptionsmethode bestimmt, um eine oberflächen-bezogene standardisierte Dosisapplikation pro Zellkulturansatz unter Berücksichtigung der SAR-Methode zu ermöglichen. Zudem wurde eine mögliche Immunogenität der Partikel aufgrund einer Kontamination mit bakteriellen Endotoxinen ausgeschlossen.

Im Rahmen des eigentlichen Experiments sollte die Frage geklärt werden, ob HA und β -TCP gleicher Primärpartikelgröße (1 μm)

- die Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-8 und TNF- α sowie die
- Produktion von Zytokinen der myeloischen Differenzierung (GM-CSF, M-CSF, RANKL und OPG)

unterschiedlich stark beeinflussen.

In einem zweiten Schritt sollte untersucht werden, ob der Effekt von β -TCP größenabhängig ist. Dafür sollte der Versuch mit β -TCP-Proben der Primärpartikelgrößen 1, 3, 13, 32 und 40 μm wiederholt werden.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Geräte

Laminar- Flow Werkbank	BDK Luft- und Reinraumtechnik (Sonnenbühl- Genkingen)
Zentrifuge für 15 / 50 ml- Tubes: Megafuge 1.0R	Heraeus Instruments (Hanau)
Zentrifuge für 5 ml- Tubes: Rotanta 460 R	Hettich (Tuttlingen)
Zentrifuge für 1,5 ml- Tubes	Eppendorf (Hamburg)
Inverses Mikroskop: Axiovert 25	Zeiss (Jena)
Durchlichtmikroskop: Axioskop	Zeiss (Jena)
Rasterelektronenmikroskop: Leo 435vp	Leo (Oberkochen)
Fluorescence- activated- cell- sorter: FACSCalibur	Becton- Dickinson (Franklin Lakes, USA)
Stiftprobenteller	Plano (Wetzlar)
Wasserbad	Ges. f. Labortechnik mbH (Burgwedel)
Inkubator: BBD 6220	Heraeus Instruments
Laborwaage	Sartorius AG (Göttingen)
Magnetrührer	Heidolph-Elektro KG (Kelheim)
Schüttelapparat	IKA Janke & Kunkel (Staufen)
Mikrotiterplatten- Lesegerät: Versamax	Molecular Devices (Ismaning)
Kolbenhubpipetten	Gilson (Bad Camberg); Eppendorf (Hamburg)
Pipettierhilfe: Pipetboy acu	Integra Biosciences (Fernwald)
Autoklav: Tuttnauer 5050 ELC	Systec (Wettenberg)
Klimaschrank 300 °C: T6760	Heraeus Instruments
Kühltruhe -20 °C	Liebherr Comfort (Ochsenhausen)
Digitalkamera: EOS 10 D	Canon (Krefeld)
Wasser- Filtrationsanlage: Q- Gard 3	Millipore (Billerica, USA)
Fuchs- Rosenthal- Zählkammer	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt)

3.1.2. Verbrauchsmaterial

Polypropylen- Zentrifugenröhrchen

a) 1,5 ml

Eppendorf (Hamburg)

b) 15 und 50 ml

Falcon (Becton- Dickinson)

polystyrene- round- bottom- tube (5 ml)

Falcon

Pipettenspitzen (20- 200 µl und 1000 µl)

Eppendorf (Hamburg)

Serologische Pipetten (5, 10 und 25 ml)

Falcon

Pasteur- Pipetten

VWR (Darmstadt)

Zellkulturschale (6- und 96- well): Cellstar

Greiner Bio- one
(Frickenhausen)

Reagenzgläser 10x 75 mm: Rotilabo

Roth (Karlsruhe)

Kohlenstoff- Leit- *tabs* für REM

Plano (Wetzlar)

Goldbeschichter für REM

sputtercoater 108 Auto
(Cressington, Watford, U.K.)

3.1.3. Chemikalien

Ethanol (80%)

Merck (Darmstadt)

Essigsäure

Sigma (Seelze)

Wasser

a) MilliQ

Millipore- Filtrationsanlage

b) DEPC- Wasser, steril

Fluka (Steinheim)

Phosphate buffered saline (PBS)

Gibco (Paisley, U.K.)

Ficoll Paque Plus

Amersham Biosciences
(Uppsala, Schweden)

RPMI-1640 (+ L-Glutamin)

Gibco

Fetales Kälberserum (FCS)

Cambrex BioSciences
(Verviers, Belgien)

Penicillin- Streptomycin- Lösung

Gibco

Antikörper für FACS- Analyse

human CD 3/ 4/ 11b/ 14/ 16b/ 19

Becton- Dickinson

human CD 8

Dako (Hamburg)

Triton X- 100

Sigma (St. Louis, USA).

LDH- Cytotoxizitäts- Assay- Kit

Biovision (Mountain View, USA)

E- Toxate- Kit

Sigma

Instant- ELISA- Kit, humaner (s)	Bender Med Systems (Wien, Österreich)
a) Tumor- Nekrose- Faktor- α (TNF- α)	
b) Interleukin- 1β (IL- 1β)	
c) Interleukin- 8 (IL- 8)	
d) Granulozyten- Makrophagen- Kolonien stimulierender Faktor (GM- CSF)	
e) Rezeptor- Aktivator des NF κ B- Liganden (RANKL)	
f) Osteoprotegerin (OPG)	
ELISA- Kit, humaner Makrophagen- Kolonien stimulierender Faktor (M-CSF)	Hölzel Diagnostika (Köln)

3.1.4. Lösungen

<i>buffy- coat</i>	Blutspendedienst des Universitätskrankenhauses Hamburg-Eppendorf
Zellkulturmedium	RPMI- 1640 10 % FCS 1 % Penicillin- Streptomycin

3.1.5. Biomaterialien und Positivkontrollen

Partikuläres HA der Primärpartikelgröße 1 μm sowie phasenreines γ -sterilisiertes β -TCP der Größen 1, 3, 13, 32 und 40 μm wurden von der curasan AG (Kleinostheim) bereitgestellt. Als Positivkontrollen für die Entzündungsinduktion wurden Lipopolysaccharid (LPS) von Sigma (St.Louis, USA) und Zymosan von Invivogen (San Diego, USA) verwendet. LPS ist ein Oberflächenbestandteil gramnegativer Bakterien und fungiert als stark immunogenes Antigen,⁷¹ indem es Makrophagen über einen *toll- like- receptor* (TLR) aktiviert und mitogen auf humane B-Lymphozyten wirkt.¹⁰⁹ Zymosan besteht aus Zellwandbestandteilen eines Hefepilzes (*Saccharomyces cerevisiae*) und aktiviert als TLR- 2- Ligand in Makrophagen die Nuclear- Factor- κ B- Signaltransduktion.¹¹¹ Es koordiniert auch die Makrophagen-Aktivierung durch Bindung an TLR- 2 und TLR- 6.⁹⁶

3.2. Methoden

3.2.1. Isolation humaner mononukleärer Zellen

Als Ausgangsmaterial zur Gewinnung menschlicher Abwehrzellen wurden *buffy coats* verwendet. Diese entstanden als Nebenprodukt der freiwilligen peripheren venösen Blutspende nach Entfernen des Hauptanteils an Erythrozyten und Thrombozyten. Der Inhalt eines *buffy coat* (50 ml) wurde auf vier 50 ml-Plastikröhrchen verteilt, so dass jedes Röhrchen 12,5 ml Blut enthielt. Mit PBS ($-Ca^{2+}$ $-Mg^{2+}$) wurde jeweils auf 50 ml aufgefüllt und gemischt. 200 ml Ficoll Paque Plus wurden auf 8 Plastikröhrchen verteilt und anschließend mit jeweils 25 ml des verdünnten Blutes beschichtet, so dass zwei getrennte Phasen entstanden. In der oberen Phase befand sich das verdünnte Blut, die untere Phase bestand aus Ficoll Paque Plus. Die Röhrchen wurden anschließend bei ausgeschalteter Bremse für 30 Minuten bei 20°C und 1300 Umdrehungen pro Minute (*rotations per minute* [rpm]), entsprechen rund 300 *relative centrifugal force* [rcf] bzw. 300-fache Erdbeschleunigung [$\times g$] zentrifugiert. Bei der Zentrifugation kamen Dichteunterschiede zwischen Ficoll Paque Plus und den verschiedenen korpuskulären Blutbestandteilen zum Tragen. Ficoll Paque Plus besitzt eine niedrigere Dichte als Erythrozyten und Thrombozyten und eine höhere Dichte als Leukozyten. Nach dieser Dichtegradientenzentrifugation lag eine mittlere milchig-weiße Phase vor, in der sich die mononukleären Zellen (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) befanden. Die mittlere Phase aus je zwei Röhrchen wurde nun in ein neues 50ml- *tube* überführt und mit PBS ($-Ca^{2+}$ $-Mg^{2+}$) auf 50ml aufgefüllt. Es resultierten 4 Röhrchen, die nun erneut für 10 Minuten bei 20°C, 1300 rpm und jetzt aktivierter Bremse zentrifugiert wurden. Die Überstände wurden anschließend abgesaugt und jedes Zellpellet mit 5 ml PBS resuspendiert, bevor alle Suspensionen in ein Röhrchen überführt wurden. Anschließend wurde wiederum mit PBS auf 50 ml aufgefüllt. Es folgte ein letzter Zentrifugationsschritt (10 Minuten, 20°C, 1300 rpm, Bremse aktiv). Der abgesaugte Überstand wurde durch 10 ml Medium, das zuvor im Wasserbad auf 37°C erwärmt wurde, ersetzt. Als Medium wurde RPMI-1640, versetzt mit 10% hitzeinaktiviertem FCS und 1% Penicillin-/Streptomycin- Lösung, verwendet.

Zur Hitzeinaktivierung wurde die benötigte Serummenge über Nacht bei 4°C aufgetaut und anschließend im Wasserbad auf 60°C erhitzt. Nach Erreichen der Zieltemperatur verblieb das Serum für weitere 30 Minuten bei 60°C und wurde anschließend auf Eis gekühlt.

Nach der Isolation wurden zur Ermittlung der erzielten Zellzahl 10 µl Zellsuspension mit 990 µl einmolarer Essigsäure verdünnt. Dies führte zur Lyse eventuell noch vorhandener Erythrozyten. 10 µl dieser Lösung wurden in eine Fuchs-Rosenthal-Zählkammer pipettiert.

Die isolierten PBMC wurden in einer Zelldichte von 1×10^6 pro *well* in 6- *well*-Kulturschalen ausgesät und anschließend mit verschiedenen Testsubstanzen inkubiert. In allen Versuchsansätzen wurde ein Zielvolumen von 5 ml erzeugt. Sämtliche Ansätze wurden zur Generierung statistisch auswertbarer Ergebnisse fünffach erstellt.

3.2.2. Zelldifferenzierung im FACS

Zur Identifizierung einzelner Zellpopulationen innerhalb der isolierten PBMC- Fraktion wurden vier *polystyrene- round- bottom- tubes* mit je 1×10^6 Zellen in 3 ml Medium befüllt. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 1600 rpm und 4 °C wurden die Röhrchen dekantiert, so dass rund 100 µl verblieben. Durch Mischen wurde das Pellet resuspendiert und nach folgendem Schema mit je 1 µl humanem Fluoreszenzfarbstoff- gekoppelten Antikörper versehen (Tabelle 1).

Tube	Fluorescein- Isothiocyanat (FITC)	Phycoerythrin (PE)
1	CD 4	CD 8
2	CD 14	CD 11 b
3	CD 3	CD 19
4	CD 3	CD 16 b

Tabelle 1: Antikörperschema. Kombinierte Zugabe von je 1 µl zweier FITC- bzw. PE- gekoppelter Antikörper zu vier Proben humaner PBMC zur Identifizierung verschiedener Zellpopulationen.

Die durchmischten Versuchsansätze wurden für 30 Minuten bei 4° C im Dunkeln inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit je 3 ml PBS und fünfminütigem Abzentrifugieren bei 1600 rpm und 4° C wurden die Ansätze mit 300 µl PBS beschichtet und durchmischt. Anschließend wurden pro Versuchsröhrchen 50.000 Zellen analysiert. Die Auswertung erfolgte unter Anwendung von CellquestPro 5.2.1. (Becton- Dickinson). Die Charakterisierung der isolierten Zellpopulationen im FACS

wurde vom Institut für Immunologie des Universitätsklinikums Hamburg- Eppendorf ermöglicht (Prof. F. Haag, T. Freiwald).

3.2.3. Partikelgrößerverteilungsspektren

Da im Versuch verschiedene Calciumphosphat- Proben hinsichtlich ihrer Wirkung auf humane PBMC untersucht werden sollten, musste zunächst eine genaue Analyse der in den Proben vorhandenen Partikelgrößen erfolgen. Dazu wurden mittels Laserstreuungsmethode die Verteilungsspektren der vorliegenden Partikeldurchmesser in einem Laser- Partikel- Sizer (Analysette 22, Fritsch Laborgeräte, Idar-Oberstein) gemessen. Es resultierten für jede Gruppe Häufigkeitsverteilungen der Partikeldurchmesser (Tabelle 2), die graphisch im Kapitel „Ergebnisse“ dargestellt sind (Abb. 4 G-M). Der jeweilige d_{50} -Wert der Größenverteilungskurve diene als gerundeter Wert zur Bezeichnung des Biomaterials (z.B.: β - TCP mit $d_{50} = 3 \mu\text{m}$ entspricht „ β - TCP 3 μm “; Dr. F. Peters, curasan AG, Kleinostheim). Demnach wurden die Gruppen HA 1 μm sowie β - TCP 1, 3, 13, 32 und 40 μm definiert.

Biomaterial	HA	β -TCP				
Bezeichnung	1 μm	1 μm	3 μm	13 μm	32 μm	40 μm
d_{10} [μm]	0,63	0,7	0,7	1,4	12,5	15,8
d_{50} [μm]	1,5	1,8	3,0	13,5	31,5	39,3
d_{90} [μm]	2,9	14,6	20,2	32,7	43,3	64
Partikel <5 μm [%]	99,6	76	60	23	3,8	3
Partikel < 10 μm [%]	100	82	70	39	7,0	5

Tabelle 2: Messung der Partikelgrößen mittels Laser-Partikel-Sizer. D_{50} -Werte geben die in der Probe vorherrschende Partikelgröße an und wurden zur Einteilung der Biomaterialien in sechs Gruppen (HA 1 μm , β -TCP 1, 3, 13, 32 und 40 μm) verwendet (Dr. F. Peters, curasan AG, Kleinostheim). Die Hälfte der innerhalb einer Probe vorhandenen Partikel ist größer bzw. kleiner als der d_{50} - Wert.

3.2.4. Rasterelektronenmikroskopie

In einem zweiten Schritt wurden Form und Oberflächenbeschaffenheit der Biomaterial- Partikel mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) untersucht. Nach Fixieren der verschiedenen Proben mit Kohlenstoff- Leit- *tabs* auf dem Stiftprobenteller und anschließender Goldbeschichtung erfolgte bei 15 kV und 150 mA eine 2000- fache Vergrößerung (Abb. 4 A- F).

3.2.5. Endotoxin-Test

Zum Ausschluss einer Kontamination der Biomaterialien durch bakterielle Endotoxine wurde pro Gruppe eine repräsentative Probe mit dem E-Toxate-Kit getestet. Alle Arbeitsschritte zum Endotoxinnachweis wurden mit Reagenzgläsern durchgeführt, die zuvor für drei Stunden im Klimaschrank auf 180 °C erhitzt worden waren.

Die Biomaterial-Proben wurden mit 5 ml Endotoxin-freiem Wasser gespült und nach Sedimentation der Calcium-Phosphat-Partikel davon 100 µl in Reagenzgläser gegeben. Ebenso wurde eine Standardreihe hergestellt. Zum Start der Reaktion wurden 100 µl der *Limulus-polyphemus*-Lösung zugegeben. Nach einstündiger Inkubation im Wasserbad bei 37 °C wurde das Reaktionsgemisch durch Inversion der Reagenzgläser auf Gelisierung geprüft. Die Bildung eines festen Gels am Boden des Reagenzglases entsprach dem Nachweis von bakteriellem Endotoxin.

3.2.6. SAR- Methode

Die getesteten Biomaterial-Partikel unterschieden sich zum einen in ihrer chemischen Struktur (HA vs. β -TCP) und zum anderen in Partikelgrößenverteilung ($d_{50} = 1, 3, 13, 32$ und $40 \mu\text{m}$), Oberflächenbeschaffenheit und Form. Dies wurde durch die Laseranalyse und Rasterelektronenmikroskopie dokumentiert. Trotz dieser Unterschiede mussten im Versuch jedoch gleich bleibende Reaktionsflächen zwischen Partikeln und Zellen hergestellt werden, um später das Ausmaß einer Zytokininduktion oder Zytotoxizität *in vitro* untereinander vergleichen zu können. Da aber Dosismaße wie Partikelanzahl, -masse oder -volumen je Durchmesser und Oberflächenstruktur unterschiedliche Partikelmengen bedingen, konnten sie für den Versuch nicht verwendet werden. Stattdessen kam die *surface-area-ratio*- (SAR-) Methode zur Anwendung. Bei dieser Methode wird ein Zahlenverhältnis zwischen Biomaterialoberflächen und Zellgesamtoberfläche (SAR) definiert und durch Applikation variabler Partikelmassen konstant gehalten.

Dafür wurde zunächst die Gesamtoberfläche aller Zellen pro well bestimmt. Ausgehend von einer Oberfläche von durchschnittlich $314 \mu\text{m}^2$ pro Zelle ergab sich bei einer Anzahl von 1×10^6 Zellen eine Gesamtoberfläche von 314mm^2 . Anschließend wurde die Partikeloberfläche unter Anwendung der Gasadsorptionsmethode bestimmt. Dazu wurden mittels Oberflächen- und Porositätsanalysator (ASAP 2000, Micromeritics, Mönchengladbach) die spezifischen

Oberflächen der Partikel [m^2/g] ermittelt (Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung, Berlin; Tabelle 3).

Bei einer SAR von 1: 1 ist beispielsweise innerhalb eines Reaktionsraumes die Oberfläche der Partikel gleich der Oberfläche der Zellen. Das Prinzip der SAR wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen bei der vergleichenden Untersuchung von Partikeln *in vitro* angewendet. Unter Berücksichtigung dieser Daten wurde die SAR auf 10: 1 festgelegt.⁴² Zur Einhaltung dieser SAR waren von jeder Biomaterial-Probe definierte Massen erforderlich (Tabelle 3). Schlussfolgernd wurden von jeder Testsubstanz ca. 3140 mm^2 pro well appliziert.

Biomaterial	Oberfläche [m^2/g]	Einwaage für SAR 10:1 [mg]/ well
HA 1 μm	7,24	0,043
β - TCP 1 μm	4,22	0,074
β - TCP 3 μm	1,43	0,22
β - TCP 13 μm	0,31	1,008
β - TCP 32 μm	0,12	2,7
β - TCP 40 μm	0,11	2,9

Tabelle 3: Bestimmung der spezifischen Oberflächen der Partikelproben mittels Gasadsorptionsmethode. Ermittlung erforderlicher Partikelmassen zur Einhaltung konstanter Reaktionsflächen zwischen humanen PBMC und Biomaterialien.

3.2.7. Weitere Zellkulturansätze

Neben der Inkubation mit partikulären Biomaterialien wurden humane PBMC ohne Zusätze kultiviert, um eine mögliche Induktion von Zytokinen aufgrund der gewählten Versuchsbedingungen zu berücksichtigen (Negativkontrolle). Hier wurde mit Medium auf das Gesamtvolumen von 5 ml aufgefüllt.

Weitere Ansätze wurden mit LPS in einer Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und Zymosan in einer Konzentration von 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ versehen, jeweils in einem Gesamtvolumen von 5 ml pro well (Positivkontrollen). Diese Konzentrationen wurden im Rahmen eines Vorversuches (Abbildung 2) und unter Berücksichtigung der Literatur ermittelt.⁴² Schließlich wurde ein Zellkulturansatz einprozentig mit Triton X-100 versetzt und wiederum mit Medium auf das Gesamtvolumen von 5 ml aufgefüllt. Da Triton X- 100

als Detergenz die Zellmembran zerstört, wurde diese Substanz als Positivkontrolle der Zytotoxizitätsmessung verwendet (s.u.).

Alle Versuchsansätze wurden bei 37 °C, 5% CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% inkubiert. Nach sechs und 18 Stunden wurde 1 ml des Überstandes in ein Eppendorf- *tube* überführt, für eine Minute bei 1300 rpm und 20 °C zentrifugiert und anschließend für Bestimmung der Zytokine und der Laktatdehydrogenase verwendet.

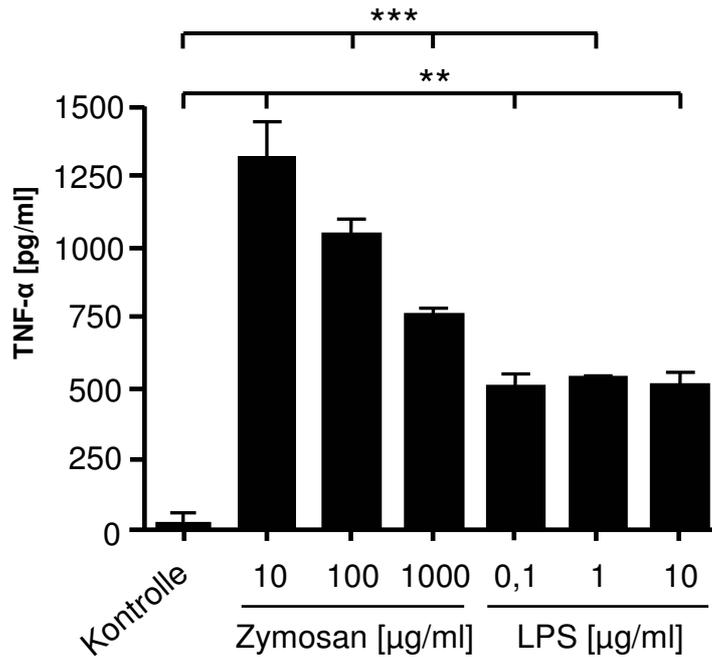


Abbildung 2: Dosisfindungsversuch für die Positivkontrollen Zymosan und LPS. Nach einer Inkubationsdauer von sechs Stunden werden die höchsten TNF α - Konzentrationen durch Zugabe von Zymosan 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und LPS 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bewirkt. Unter Berücksichtigung bereits veröffentlichter Daten anderer Arbeitsgruppen wurden diese Konzentrationen auch im vorliegenden Versuch verwendet. Gezeigt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n = 3$), *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$.

3.2.8. Bestimmung der Zytokinkonzentrationen

Nach sechs- und 18- stündiger Inkubation erfolgte die Messung der Konzentrationen von humanem TNF- α , IL- 1 β und IL- 8 sowie nach 18 Stunden die Bestimmung von GM- CSF, M- CSF, RANKL und OPG.

Zum Nachweis von TNF- α , IL- 1 β , IL- 8, GM- CSF, RANKL und OPG wurden die lyophilisierten *pellets* der Standard- und Testreihe gemäß Protokoll mit MilliQ beschichtet. 50 μl der abzentrifugierten Überstände aus dem Versuch wurden in

korrespondierende Reaktionsansätze übertragen. Die ELISA's verblieben je nach Anleitung bei Raumtemperatur zwei bzw. drei Stunden auf einem Schüttelapparat (100 bzw. 200 rpm). Anschließend wurde der Inhalt der Standardreihe sowie der Testansätze verworfen und gemäß Protokoll mit Waschpuffer gespült, abgesaugt und schließlich mit 100 µl Substrat-Lösung beschichtet. Dabei wurde die Farbentwicklung während der ersten zehn Minuten beobachtet. Bei kräftiger Blaufärbung des am höchsten konzentrierten Standards wurden 100 µl der Stopp-Lösung auf alle Ansätze gegeben und die Adsorption im ELISA-*reader* bei 450 nm gemessen.

Im Falle von M-CSF wurden 100 µl der Überstände und Standards auf die mit Antikörpern beschichtete Mikrotiterplatte gegeben und zweieinhalb Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze mehrfach gewaschen und mit 100 µl biotinyliertem Detektions-Antikörper versehen. Nach einer Stunde wurde gewaschen und 100 µl eines verdünnten Streptavidin-Konzentrats zugegeben. Nach 45 Minuten erfolgte der letzte Waschvorgang und die Applikation von 100 µl der Substratlösung (Tetramethylbenzidin) zur Farbentwicklung. Nach 30 Minuten wurde dieser Vorgang durch die Zugabe von 50 µl der Stopp-Lösung beendet. Auch hier wurde die Absorption im ELISA-*reader* bei 450 nm gemessen.

Die Messwerte der Standardreihe ergaben eine Eichkurve, anhand derer die ZytokinKonzentrationen der Testansätze ermittelt wurden.

3.2.9. Zytotoxizitätsmessung

Weiterhin wurde in den Überständen aller Versuchsansätze eine photometrische Bestimmung der Laktatdehydrogenase (LDH) durchgeführt. LDH befindet sich unter physiologischen Bedingungen stets intrazellulär. Die detektierte LDH-Menge korreliert demnach mit dem Anteil der unter den Versuchsbedingungen zugrunde gegangenen PBMC. Als Positivkontrolle diente dabei ein mit Triton X-100 behandelte Zellansatz. Triton X-100 ist ein Detergenz, das Zellmembranproteine aus ihrem Verband herauslöst und somit Zellen zerstört.⁴⁹

Zur Durchführung der Messung wurden 100 µl der abzentrifugierten Überstände in korrespondierende 96-wells übertragen und anschließend gemäß Protokoll des LDH-*Cytotoxicity- Assay- Kits* mit einer Mischung aus Katalysator und Färbelösung im Verhältnis 1: 45 beschichtet. Nach 20- minütiger Inkubation im Dunkeln wurde die Absorption bei 490 nm gemessen. Zur Kalkulation der Ergebnisse wurde für jede Gruppe der Mittelwert berechnet und prozentual auf die Positivkontrolle bezogen.

3.2.10. Statistik

Die Versuche zur Induktion von TNF- α , IL- 1 β , IL- 8, GM- CSF, M- CSF, RANKL und OPG sowie zur Zytotoxizität erfolgten für jede Gruppe im fünffachen Ansatz (n = 5). Für jede Testgruppe wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet und unter Verwendung des *student's t- test* p- Werte ermittelt. Ein p- Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant definiert.

4. Ergebnisse

4.1. Zelldifferenzierung im FACS

Die für den Versuch isolierten humanen PBMC stellen die Fraktion der Leukozyten und Lymphozyten dar. Enthalten sind darin Träger der unspezifischen (angeborenen) und spezifischen (erworbenen) Immunabwehr. Zur Generierung möglichst realistischer Bedingungen *in vitro* wurden alle Zellen dieser Fraktion verwendet. Dennoch erfolgte eine Differenzierung der einzelnen Populationen mit gleichzeitiger quantitativer Analyse mittels FACS. Diese stellt eine sehr genaue Methode zur Identifizierung von Zelltypen dar.

Zunächst erfolgte eine Einteilung der PBMC nach typischen Größen- und Granularitätsmustern. Dabei wurden 68,88 % der Zellen als Lymphozyten [Region (R) 1], 15 % als Monozyten (R 2) und 3,57 % als Granulozyten (R 3) erkannt (Abbildung 3 A, rot).

Durch Markierung der *cluster of differentiation* (CD) 3 und 19 wurden dann innerhalb der Lymphozyten- Region zu 61,23 % T- Lymphozyten und zu 4,22 % B- Lymphozyten identifiziert (Abbildung 3 B, grün).

Weiterhin wurde innerhalb der Lymphozytenregion mittels CD3- und CD16b- Markierung auf das Vorhandensein von Natürlichen Killerzellen (NK) getestet. Diese wurden nicht nachgewiesen (Abbildung 3 C, grün).

Die weitere Typisierung der Lymphozyten- Population wies CD8- positive zytotoxische T- Lymphozyten (CTL) in einem Anteil von 30,56 % sowie CD4- positive T- Helfer- Zellen (T_H) in einem Anteil von 42,36 % nach (Abbildung 3 D, grün).

In der Monozyten- Region (R 2, Abbildung 3 A, rot) war ein Anteil von 87,88 % gleichzeitig positiv für CD14 und CD11b, welcher die tatsächliche Monozytenpopulation repräsentiert (Abbildung 3 E, schwarz).

Die Verteilungen der einzelnen Populationen sind graphisch in Abbildung 3 dargestellt. Jede Zelle wird durch einen Punkt repräsentiert, Anhäufungen von Zellen gleichen Typs bilden Punktwolken. Je Messung wurden 50.000 Zellen untersucht. In Abbildung 3 B- E stellen die vertikale und horizontale Linie die Grenzen für eine spezifische Detektion von Oberflächenmarkern dar. Prozentuale Anteile der einzelnen Populationen zeigt zusammenfassend Tabelle 4.

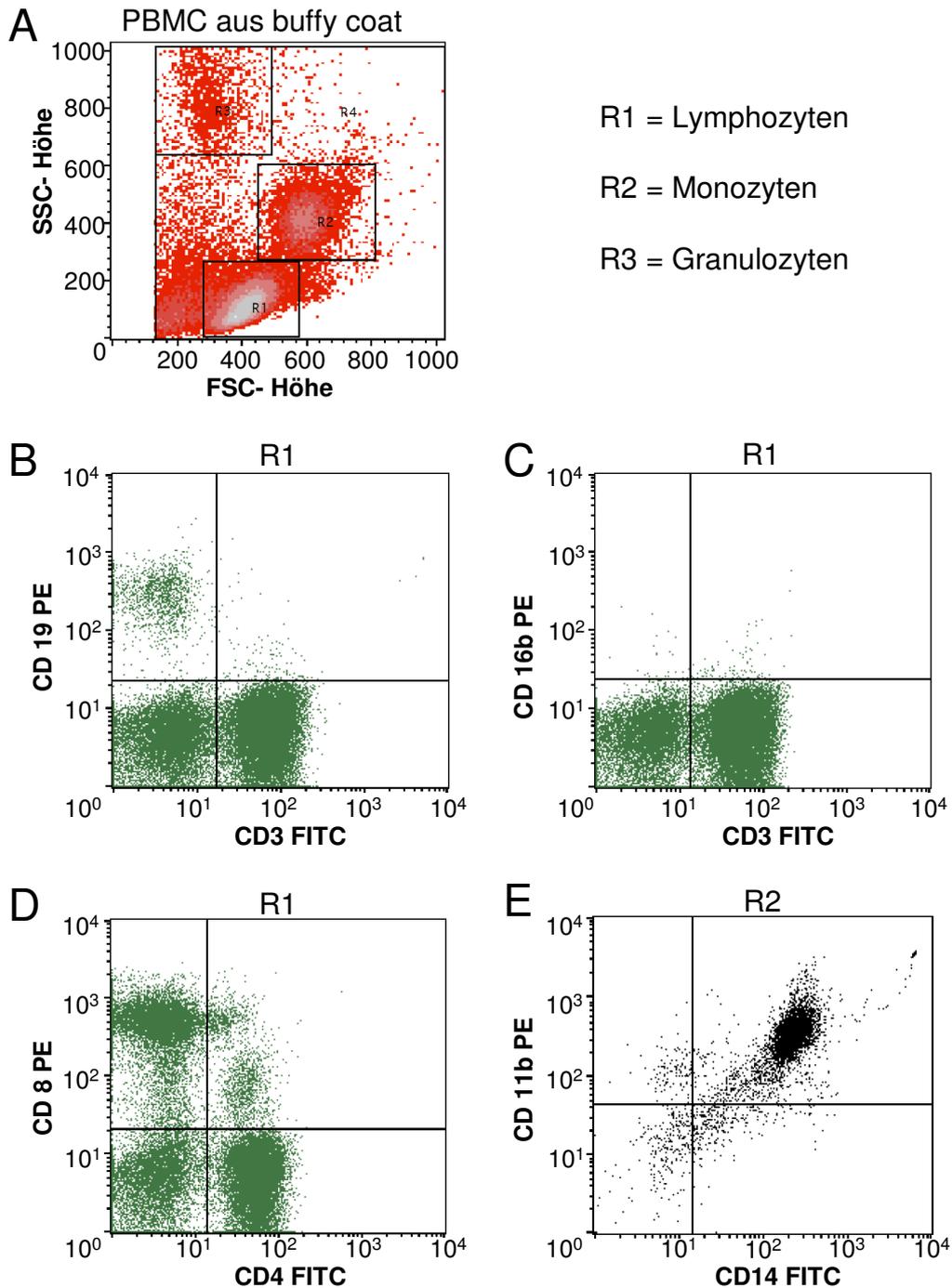


Abbildung 3: Identifikation einzelner Zellpopulationen der PBMC- Fraktion mittels FACS.

Größen- und Granularitätsanalyse (A, rot): drei Regionen (R) mit Lymphozyten (R1), Monozyten (R2) und Granulozyten (R3). R1 (grün): CD19- positive (+) B- und CD3+ T- Lymphozyten (B); keine CD16b+ Natürlichen Killerzellen (C); CD8+ T- Killer- und CD4+ T- Helfer- Zellen (D). R2 (schwarz): CD11b+/ CD14+ Monozyten (E). SSC: sideward scatter, FSC: forward scatter, PE: Phycoerythrin, FITC: Fluorescein- Isothyocyanat.

Region	Zelltyp	Anteil an allen Zellen [%]	Anteil an Region (R) [%]					
		SSC / FSC	CD19	CD3	CD8	CD4	CD 16b	CD11b CD14
1	Lymphozyt	68,8						
	B- Lymphozyt		4,2					
	T- Lymphozyt			61,2				
	▪ CTL ▪ T _H				30,5	42,3		
	NK					~ 0		
2	Monozyt	15						87,8
3	Granulozyt	3,5					80,3	

Tabelle 4: Typisierung von Zellpopulationen innerhalb der mononukleären Fraktion peripheren Blutes. Isolation per Dichtegradientenzentrifugation mittels Ficoll Paque Plus. Analyse im Fluorescence- activated- cell- sorter, Einteilung in Lymphozyten-, Monozyten- und Granulozyten-Regionen (R1 bis R3) aufgrund Größe und Granularität. Differenzierung der Regionen durch Fluoreszenzmarkierung verschiedener *cluster of differentiation* (CD). CTL: zytotoxischer T-Lymphozyt; T_H: T- Helferzelle; NK: Natürliche Killerzelle.

4.2. Charakterisierung von mikropartikulärem Hydroxylapatit und β -Tricalciumphosphat

4.2.1. Rasterelektronenmikroskopie

Zur morphologischen Charakterisierung wurden die Biomaterialien im REM untersucht (Abbildung 4 A- F). Die 2000- fache Vergrößerung ließ Partikel mit unterschiedlichem Durchmesser sowie die Häufung bestimmter Größen innerhalb einer Probe deutlich erkennen. Des Weiteren konnte im REM- Bild die heterogene Oberflächenbeschaffenheit der Partikel dargestellt werden (vgl. Abbildung 4 D und E). Diese Heterogenität belegt die Notwendigkeit der Gasadsorptionsmethode zur Messung der spezifischen Oberfläche, auf deren Grundlage die SAR- Methode angewandt werden konnte.

4.2.2. Partikelgrößenverteilungsspektren

Die Verteilungsspektren der innerhalb der Calciumphosphat-Proben vorhandenen Partikeldurchmesser wurden unter der Leitung von Dr. F. Peters, curasan AG, Kleinostheim, mittels Laserstreuungsmethode bestimmt.

Die graphische Darstellung (Abbildung 4 G- M) zeigt erstens anhand der kontinuierlichen Linie die kumulierten Verteilungen, also die addierten Einzelhäufigkeiten und somit den Anteil bestimmter Größen am Gesamtverteilungsspektrum (linke Ordinate). Für das untersuchte Hydroxylapatit (Abbildung 4 G) gilt somit beispielsweise, dass 50% aller vorhandenen Durchmesser kleiner bzw. größer sind als $1,5 \mu\text{m}$ ($d_{50} = 1,5 \mu\text{m}$). Dieser d_{50} - Wert entspricht der Primärpartikelgröße und dient zur Benennung der Biomaterial- Proben. Im vorliegenden Versuch wurden entsprechend dem d_{50} - Wert die Gruppen HA $1 \mu\text{m}$, β -TCP $1 \mu\text{m}$, β - TCP $3 \mu\text{m}$, β - TCP $13 \mu\text{m}$, β - TCP $32 \mu\text{m}$ und β - TCP $40 \mu\text{m}$ definiert. Zweitens sind durch die diskontinuierliche Linie absolute Häufigkeiten bestimmter Durchmesser dargestellt (rechte Ordinate). Das genutzte Hydroxylapatit beispielsweise wies einen Durchmesser von rund $1,8 \mu\text{m}$ am häufigsten auf (Abbildung 4 G). Der Anteil dieses Durchmessers lag bei ca. 7,6 %.

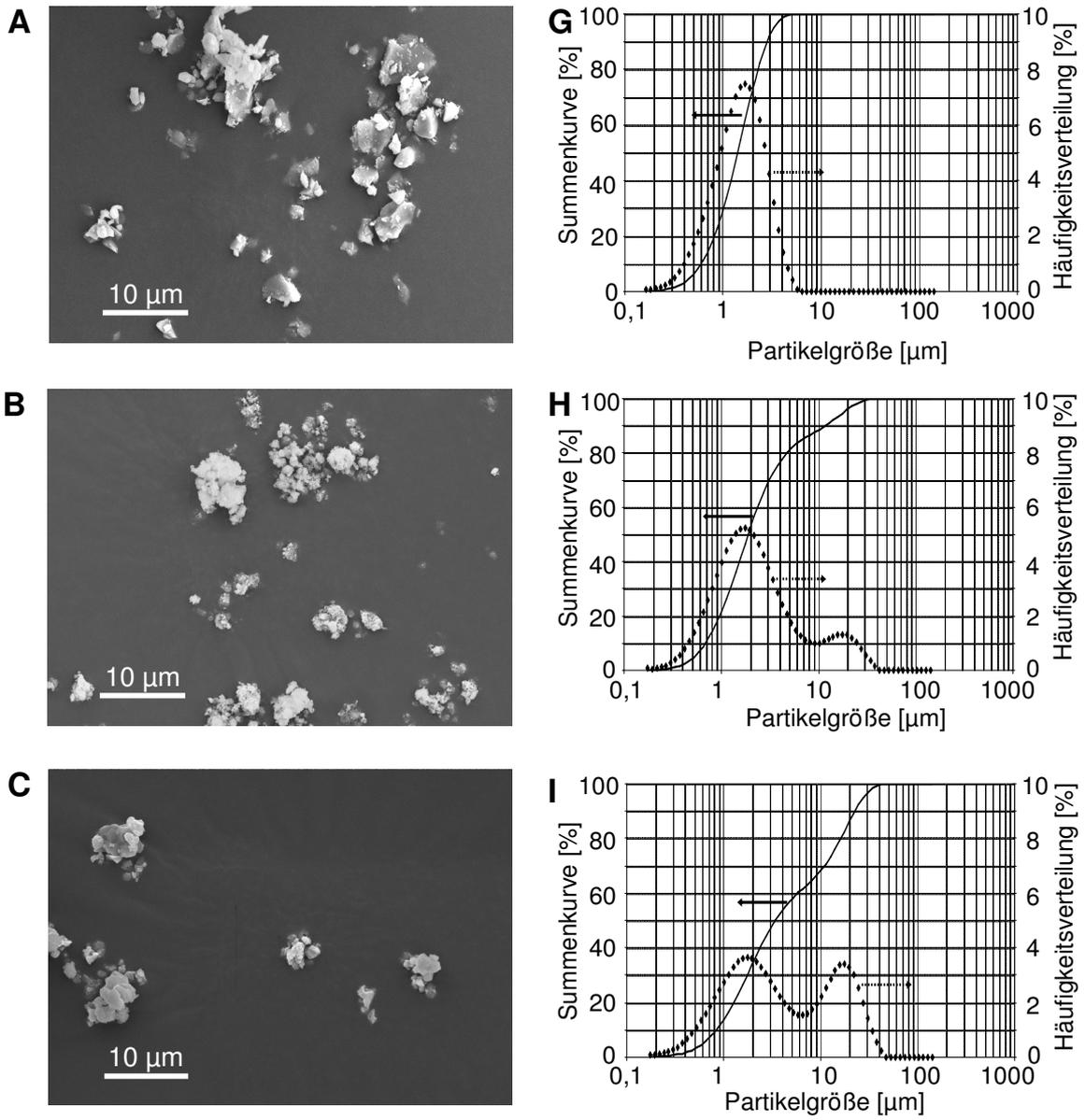


Abbildung 4 A- C; G- I: Fortsetzung Seite 22

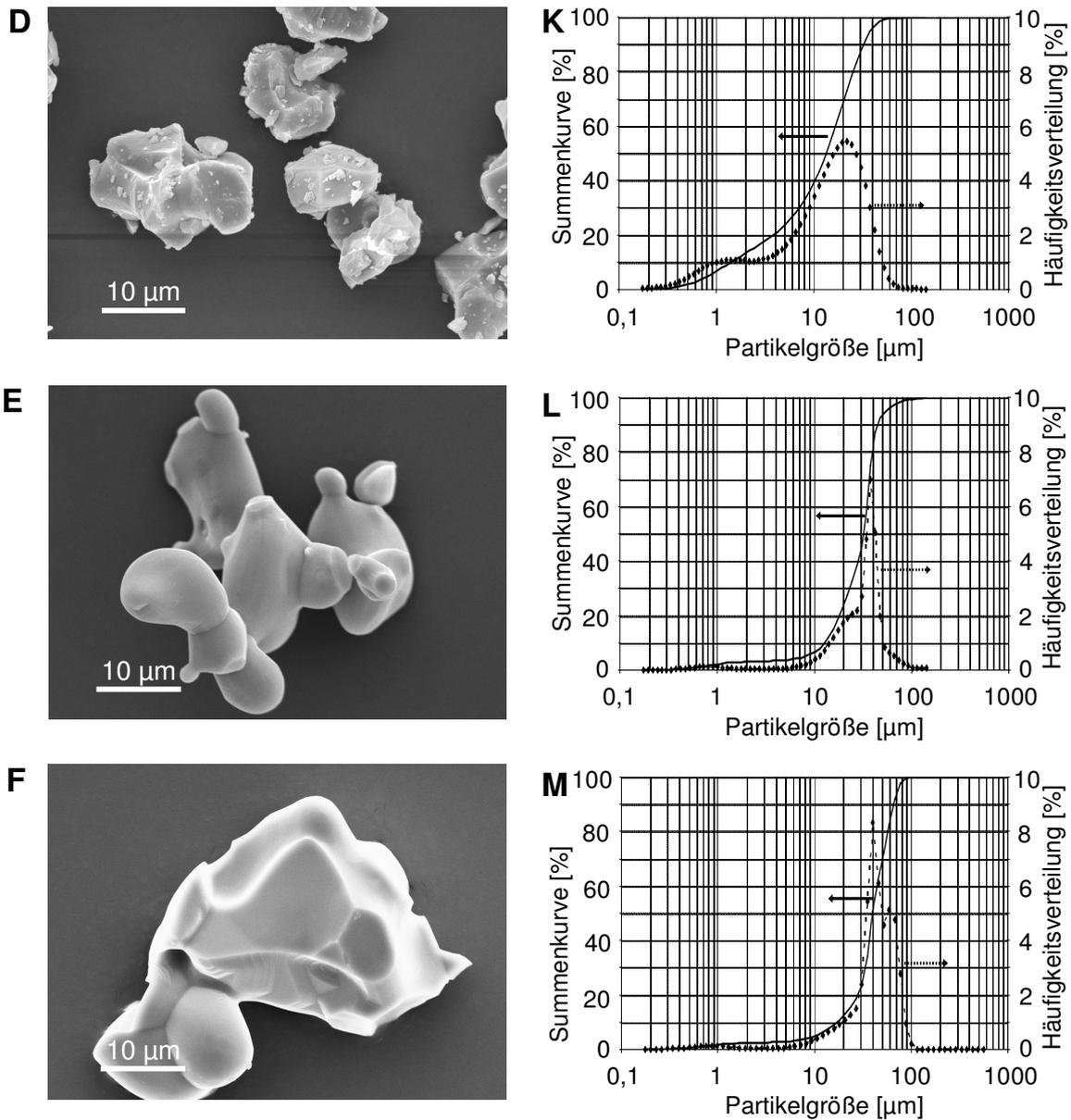


Abbildung 4: Charakterisierung partikulärer Calciumphosphate. Darstellung der getesteten Biomaterialien in der Rasterelektronenmikroskopie (A- F, 2000- fache Vergrößerung) und Messung aller innerhalb einer Probe vorhandenen Partikeldurchmesser mittels Laserstreuungsmethode (G- M). Definition der Partikelgruppen gemäß Durchmesser (Abszisse) bei 50%- Punkt der Summenkurve (linke Ordinate, kontinuierlicher Graph): HA 1 µm (A, G), β - TCP 1 µm (B, H), β - TCP 3 µm (C, I), β - TCP 13 µm (D, K), β - TCP 32 µm (E, L), β - TCP 40 µm (F, M). Der diskontinuierliche Graph repräsentiert die Häufigkeit einzelner Partikelgrößen innerhalb der Probe (rechte Ordinate).

4.2.3. Endotoxin-Test

Nach einstündiger Inkubation mit *Limulus- polyphemus*- Konzentrat kam eine Gelbildung in keinem Testansatz zustande. Unter Berücksichtigung der Nachweisgrenze des verwendeten Tests ist demnach von einer Endotoxinkonzentration unter 0,05 EU/ ml in allen Biomaterial- Proben auszugehen. Damit verhielten sich die Testsubstanzen wie Endotoxin- freies Wasser.

4.3. Einfluss von mikropartikulärem Hydroxylapatit und β - Tricalciumphosphat auf humane mononukleäre Zellen *in vitro*

4.3.1. Proinflammatorische Zytokine

4.3.1.1. Hydroxylapatit und β - Tricalciumphosphat gleicher Primärpartikelgröße

Abbildung 5 (S. 26) zeigt sowohl nach sechs als auch nach 18 Stunden Inkubation eine im Vergleich zur Kontrolle signifikante Induktion aller proinflammatorischen Cytokine durch Zugabe von 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Zymosan bzw. 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS ($p < 0,0005$).

In der frühen Phase der Inkubation wurde die TNF- α - Konzentration im Vergleich zur Kontrolle ($18,5 \pm 4,4 \text{ pg}/\text{ml}$) durch Zugabe von HA und β - TCP ($24,4 \pm 6,3$ und $16,5 \pm 5,7 \text{ pg}/\text{ml}$) nicht gesteigert (Abbildung 5 A).

Nach einer Inkubationsdauer von 18 Stunden hingegen wurde eine niedrigere TNF- α - Menge in der Kontrolle gemessen ($10,81 \pm 2,78 \text{ pg}/\text{ml}$) und HA führte zu einem signifikanten TNF- α - Anstieg ($20,3 \pm 1,5 \text{ pg}/\text{ml}$, $p < 0,0005$), ebenso β - TCP mit einer Konzentration von $18 \pm 3 \text{ pg}/\text{ml}$ ($p < 0,005$, Abbildung 5 B).

IL- 1β wurde nach sechs Stunden im unbehandelten Zellansatz in einer Konzentration von $6,9 \pm 3,9 \text{ pg}/\text{ml}$ gemessen. Die Zugabe von partikulärem HA und β - TCP ($3,8 \pm 2,4$ und $5,6 \pm 6,8 \text{ pg}/\text{ml}$) bewirkte keine signifikante Änderung der IL- 1β - Konzentration (Abbildung 5 C).

Nach Fortführen der Inkubation wurde auch hinsichtlich IL- 1β eine Konzentrationsminderung in der Kontrolle nachgewiesen ($1 \pm 0,9 \text{ pg}/\text{ml}$). HA und β - TCP führten im Vergleich dazu zu einem signifikant erhöhten IL- 1β ($3,2 \pm 1,7$ bzw. $2,8 \pm 1,5 \text{ pg}/\text{ml}$, $p < 0,05$, Abbildung 5 D).

Die Messung von IL-8 ergab nach sechsständiger Inkubation eine Konzentration von $652 \pm 398,5 \text{ pg}/\text{ml}$ im Medium der unbehandelten PBMC. Durch Zugabe von HA und

β - TCP ($627,9 \pm 164,6$ und $646,1 \pm 782,3$ pg/ ml) blieb IL- 8 nach sechs Stunden unverändert (Abbildung 5 E).

Im weiteren Verlauf nahm die IL- 8- Konzentration in allen Versuchsansätzen deutlich zu. Ausgehend von $4513,42 \pm 1049,23$ pg/ ml in der Kontrolle verursachten die Biomaterial- Partikel nach 18 Stunden einen signifikanten IL- 8- Anstieg ($10909,8 \pm 2299$ pg/ ml durch HA bzw. $10955,4 \pm 1817,4$ pg/ ml durch β - TCP, $p < 0,0005$, Abbildung 5 F).

Zusammenfassend konnten Induktionen von TNF- α , IL- 1β und IL- 8 durch HA und β -TCP mit einer Primärpartikelgröße von $1 \mu\text{m}$ nach 18- stündiger Inkubation nachgewiesen werden.

Signifikante Unterschiede zwischen den proinflammatorischen Effekten beider Calciumphosphate waren nicht messbar.

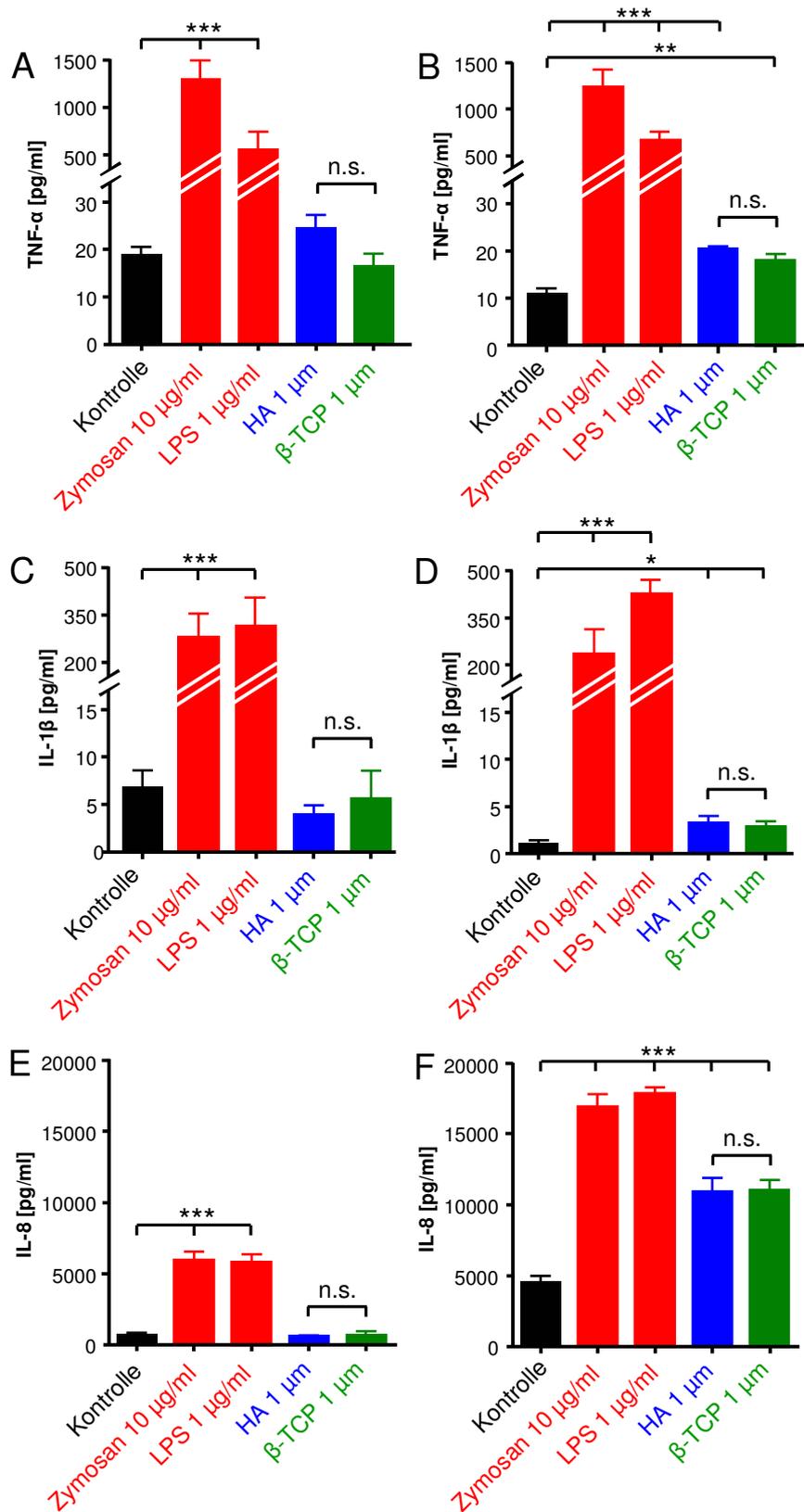


Abbildung 5: Induktion von TNF- α (A, B), IL- 1β (C, D) und IL- 8 (E, F) nach sechs- und 18-stündiger Inkubation von humanen PBMC mit HA (blau) und β- TCP (grün) der Größe 1 µm. Nach 18 Stunden (B, D, F) konnte eine signifikante Induktion nachgewiesen werden. Unterschiede in der Wirkung beider Calciumphosphate wurden nicht gefunden. Gezeigt sind Mittelwerte ± Standardabweichung (n = 5); * p < 0,0005, ** p < 0,005, * p < 0,05; n.s.: nicht signifikant.**

4.3.1.2. β - Tricalciumphosphat variabler Primärpartikelgröße

Wie der Abbildung 6 zu entnehmen ist, verursachten die Partikel der Gruppen 3, 13, 32 und 40 μm bereits nach sechsständiger Inkubation einen signifikanten TNF- α -Anstieg im Vergleich zu unbehandelten PBMC (Abbildung 6 A). So wurden ausgehend von $18,5 \pm 4,4$ pg/ ml (Kontrolle) TNF- α - Konzentrationen von $34,09 \pm 5,9$ pg/ ml (β - TCP 3 μm , $p < 0,005$), $90,4 \pm 17,9$ pg/ ml (β - TCP 13 μm), $71,8 \pm 14,2$ pg/ ml (β - TCP 32 μm) sowie $95,3 \pm 16,3$ pg/ ml (β - TCP 40 μm , $p < 0,0005$) gemessen.

Diese tendenziell mit der Partikelgröße zunehmende TNF- α - Induktion zeigte sich auch nach 18 Stunden (Abbildung 6 B). Im Vergleich zur Kontrolle ($10,8 \pm 4,4$ pg/ ml) bewirkten β - TCP- Partikel nun folgende TNF- α - Werte ($p < 0,0005$): $27,7 \pm 3,4$ pg/ ml (3 μm), $46,4 \pm 6,9$ pg/ ml (13 μm), $115 \pm 12,5$ pg/ ml (32 μm) sowie $175,6 \pm 37,2$ pg/ ml (40 μm).

Zu beiden Zeitpunkten wurden signifikante größenabhängige Unterschiede in der TNF- α - Induktion gefunden ($p < 0,0005$). So bewirkte β - TCP 40 μm nach 18 Stunden eine rund zehnfach höhere TNF- α - Konzentration als β - TCP 1 μm .

β - TCP 32 μm verursachte im Vergleich zur Kontrolle ($6,9 \pm 3,9$ pg/ ml) bereits nach sechs Stunden einen signifikanten IL- 1 β - Anstieg ($24 \pm 9,4$ pg/ ml, $p < 0,05$, Abbildung 6 C). Auch im Vergleich zu β - TCP 1 μm ($5,6 \pm 6,8$ pg/ ml) erfolgte durch dieses Material eine IL- 1 β - Induktion ($p < 0,05$).

Nach 18 Stunden (Abbildung 6 D) induzierten bezogen auf unbehandelte PBMC ($1 \pm 0,9$ pg/ ml) neben dem bereits erwähnten β - TCP 1 μm ($2,8 \pm 1,5$ pg/ ml, $p < 0,05$) auch β - TCP 32 μm ($65,5 \pm 21,6$ pg/ ml, $p < 0,0005$) und β - TCP 40 μm ($55,8 \pm 22,4$ pg/ ml, $p < 0,005$) die IL- 1 β - Produktion. Partikel mittlerer Größe (3 und 13 μm) hatten keinen Einfluss.

β - TCP 32 μm rief nach 18- stündiger Inkubation eine rund 20fach höhere IL- 1 β - Konzentrationen hervor als β - TCP 1 μm ($p < 0,0005$).

Die IL- 8- Konzentrationen wurden ausgehend von $652 \pm 398,5$ pg/ ml (Kontrolle) bereits nach den ersten sechs Stunden durch β - TCP 13 μm ($1711,3 \pm 566,4$ pg/ ml, $p < 0,05$), β - TCP 32 μm ($1880,7 \pm 568,7$ pg/ ml, $p < 0,005$) und β - TCP 40 μm ($1647 \pm 765,6$ pg/ ml, $p < 0,05$) gesteigert (Abbildung 6 E). Der durch β - TCP 32 μm

verursachte Anstieg war im Vergleich zum Einfluss des β - TCP 1 μm signifikant erhöht ($p < 0,05$).

Die im weiteren Versuchsverlauf in allen Ansätzen registrierbare Steigerung der IL-8- Produktion wurde im Vergleich zu einer Konzentration von $4513,4 \pm 1049,2$ pg/ ml in der Kontrolle durch alle β - TCP- Proben weiter verstärkt (Abbildung 6 F). Dabei war wiederum eine tendenziell mit der Primärpartikelgröße zunehmende Steigerung nachweisbar (3 μm : $11469,6 \pm 2468,4$ pg/ ml, $p < 0,005$; 13 μm : $13434,9 \pm 1931,3$ pg/ ml, 32 μm : $12067,6 \pm 845,7$ pg/ ml, 40 μm : $15088,1 \pm 1034,9$ pg/ ml, $p < 0,0005$). Die Partikel der Probe β - TCP 40 μm verursachten einen rund 40 % stärkeren IL- 8- Anstieg als die Partikel der Probe β - TCP 1 μm ($10955,4 \pm 1817,4$ pg/ ml, $p < 0,005$).

Zusammenfassend waren bereits nach sechsstündiger Inkubation signifikante Steigerungen der TNF- α -, IL- 1 β - und IL- 8- Konzentrationen durch β - TCP höherer Primärpartikelgröße nachweisbar. β - TCP 32 μm induzierte in der frühen Phase der Inkubation alle Entzündungsmediatoren.

Größere Partikel verursachten stets signifikant höhere Entzündungsinduktionen als β - TCP 1 μm .

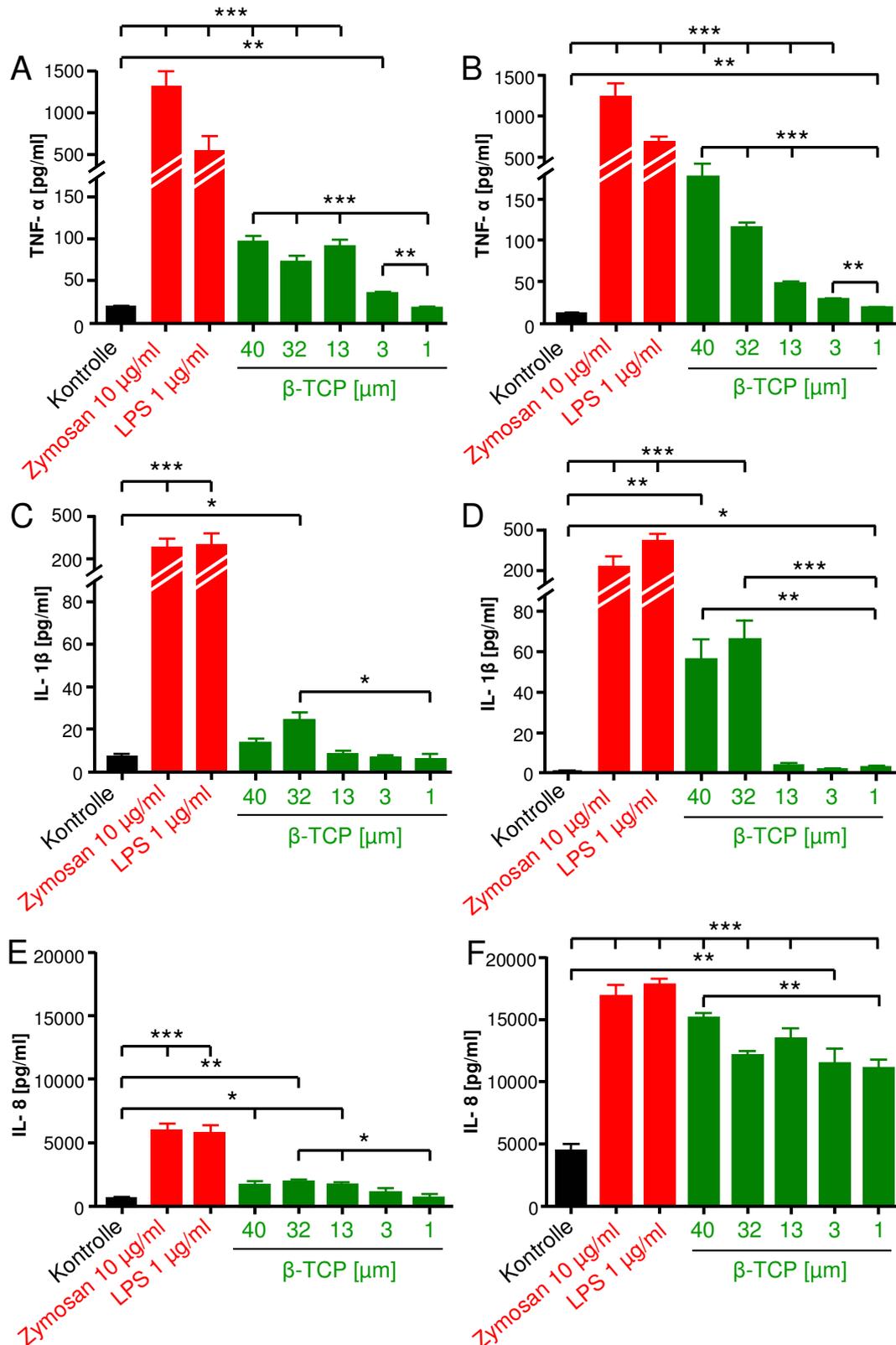


Abbildung 6: Induktion von TNF- α , IL-1 β und IL-8 nach sechs- und 18- stündiger Inkubation von humanen PBMC mit β - TCP variabler Größe. Größere β - TCP- Partikel induzierten bereits nach 6 Stunden TNF- α (A), IL- 1 β (C) und IL- 8 (E). Nach 18 Stunden bewirkten alle β - TCP- Größen einen Cytokin- Anstieg (B, D, F), dabei verursachten größere Partikel höhere Konzentrationen als kleinere Partikel. Mittelwerte \pm Standardabweichung (n = 5); *** p < 0,0005, ** p < 0,005, * p < 0,05.

4.3.2. Myeloische Differenzierung

4.3.2.1. Hydroxylapatit und β -Tricalciumphosphat gleicher Primärpartikelgröße

In einem nächsten Schritt sollten mögliche Effekte von HA und β -TCP mit einem d_{50} -Wert von 1 μm auf Mediatoren der Differenzierung humaner mononukleärer Blutzellen untersucht werden. Im Gegensatz zur Betrachtung der Entzündungsinduktion wurde auf die Trennung in eine frühe und späte Phase verzichtet. Nach 18-stündiger Inkubation wurden GM-CSF, M-CSF, RANKL und OPG im Überstand gemessen.

Wie aus Abbildung 7 A hervorgeht, bewirkte ausgehend von $1,6 \pm 1,3 \text{ pg/ml}$ in der Kontrolle in erster Linie das proinflammatorische Zymosan einen deutlichen GM-CSF-Anstieg ($239,7 \pm 62,3 \text{ pg/ml}$, $p < 0,0005$). LPS verursachte eine ebenfalls gesteigerte Konzentration ($43,8 \pm 16 \text{ pg/ml}$, $p < 0,0005$). Beide getesteten Biomaterialien induzierten GM-CSF signifikant (HA 1 μm : $22,3 \pm 8,1 \text{ pg/ml}$, $p < 0,0005$; β -TCP 1 μm : $8,9 \pm 3,2 \text{ pg/ml}$, $p < 0,005$), HA jedoch rund 2,5-fach stärker als β -TCP ($p < 0,05$).

M-CSF wurde nach 18-stündiger Inkubation in keinem Versuchsansatz nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

Der osteoclastogene RANKL wurde nur in sehr niedriger Konzentration gemessen. Im Vergleich zu unbehandelten PBMC (Kontrolle: $5,1 \pm 2,9 \text{ pg/ml}$) wurde allein durch Zugabe von partikulärem HA mit einer Primärpartikelgröße von 1 μm eine Konzentrationssteigerung ($12,7 \pm 2,8 \text{ pg/ml}$, $p < 0,005$) erreicht (Abbildung 7 B). β -TCP gleicher Größe verursachte hingegen keinen signifikanten RANKL-Anstieg ($9,6 \pm 4,5 \text{ pg/ml}$, $p \sim 0,09$). Die Effekte von HA und β -TCP auf RANKL unterschieden sich jedoch nicht signifikant ($p \sim 0,22$).

OPG konnte nach der Inkubation in allen Versuchsansätzen ebenfalls nur in sehr niedriger Konzentration nachgewiesen werden. Signifikante Unterschiede infolge Zugabe verschiedener Testsubstanzen wurden dabei nicht gemessen (Abbildung 7 C).

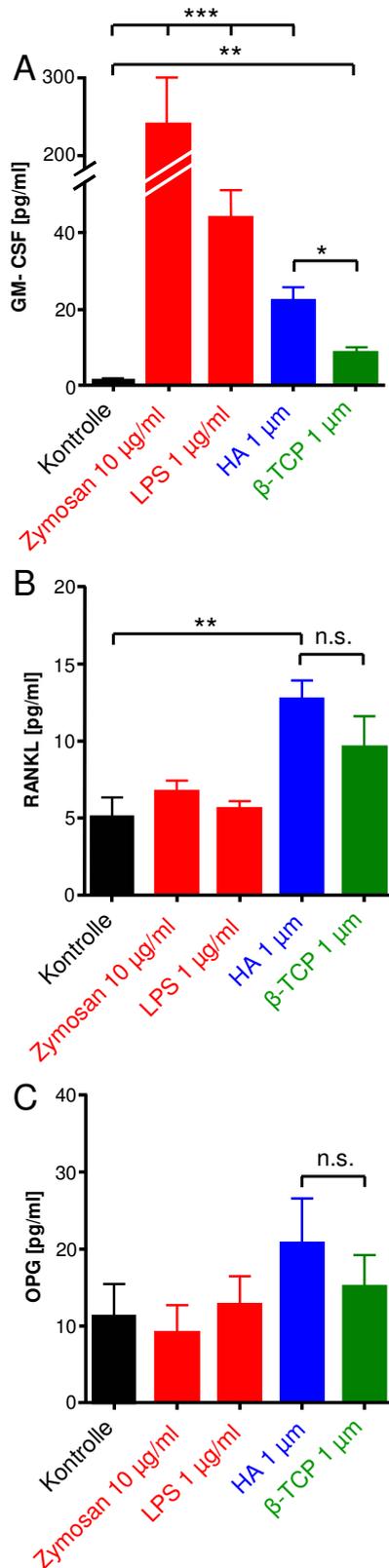


Abbildung 7: GM- CSF (A), RANKL (B) und OPG (C) nach 18- stündiger Inkubation von humanen PBMC mit HA und β - TCP der Größe 1 μ m. HA induzierte GM- CSF stärker als β - TCP und bewirkte allein einen RANKL- Anstieg. OPG wurde nicht beeinflusst. M- CSF konnte nicht nachgewiesen werden. Gezeigt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (n = 5); *** p < 0,0005, ** p < 0,005, * p < 0,05; n.s.: nicht signifikant.

4.3.2.2. β -Tricalciumphosphat variabler Primärpartikelgröße

Zur Untersuchung eines möglicherweise größenabhängigen Einflusses wurden die Konzentrationen an GM-CSF, M-CSF, RANKL und OPG in den mit β -TCP-Partikeln der Größen 3, 13, 32 und 40 μm behandelten PBMC-Ansätzen bestimmt.

Wie aus Abbildung 8 A hervorgeht, wurde die GM-CSF-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle ($1,6 \pm 1,3 \text{ pg/ml}$) durch alle β -TCP-Partikelgrößen signifikant induziert: $8,4 \pm 3,3 \text{ pg/ml}$ (3 μm , $p < 0,005$); $11,2 \pm 1,3 \text{ pg/ml}$ (13 μm), $13,4 \pm 3,8 \text{ pg/ml}$ (32 μm), $17,7 \pm 3,7 \text{ pg/ml}$ (40 μm , p jeweils $< 0,0005$).

Tendenziell nahm die GM-CSF-Konzentration mit steigendem Partikeldurchmesser zu. So konnte eine ungefähr doppelt so starke Induktion durch β -TCP 40 μm als durch β -TCP 1 μm nachgewiesen werden ($p < 0,005$).

M-CSF wurde nach 18 stündiger Inkubation in keiner Gruppe nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

Im Gegensatz zu β -TCP 1 μm wurde durch größere Partikel eine signifikante Induktion von RANKL im Vergleich zur Kontrolle ($5,1 \pm 2,9 \text{ pg/ml}$) bewirkt (Abbildung 8 B). Nach einer Inkubationsdauer von 18 Stunden verursachte β -TCP 3 μm eine Konzentration von $9,1 \pm 2,1 \text{ pg/ml}$, β -TCP 13 μm steigerte RANKL bis $8,8 \pm 1,7 \text{ pg/ml}$ ($p < 0,005$), β -TCP 32 μm rief eine Konzentration von $11 \pm 1,4 \text{ pg/ml}$ hervor ($p < 0,0005$) und β -TCP 40 μm bewirkte eine RANKL-Konzentration von $9,1 \pm 2,1 \text{ pg/ml}$ ($p < 0,005$). Im Vergleich von β -TCP 32 μm mit β -TCP 1 μm konnte allerdings kein Unterschied nachgewiesen werden ($p \sim 0,51$).

Größere β -TCP-Partikel verursachten keinen Anstieg der OPG-Produktion nach einem Zeitraum von 18 Stunden. Unterschiede zwischen einzelnen β -TCP-Größen wurden nicht gemessen (Abbildung 8 C).

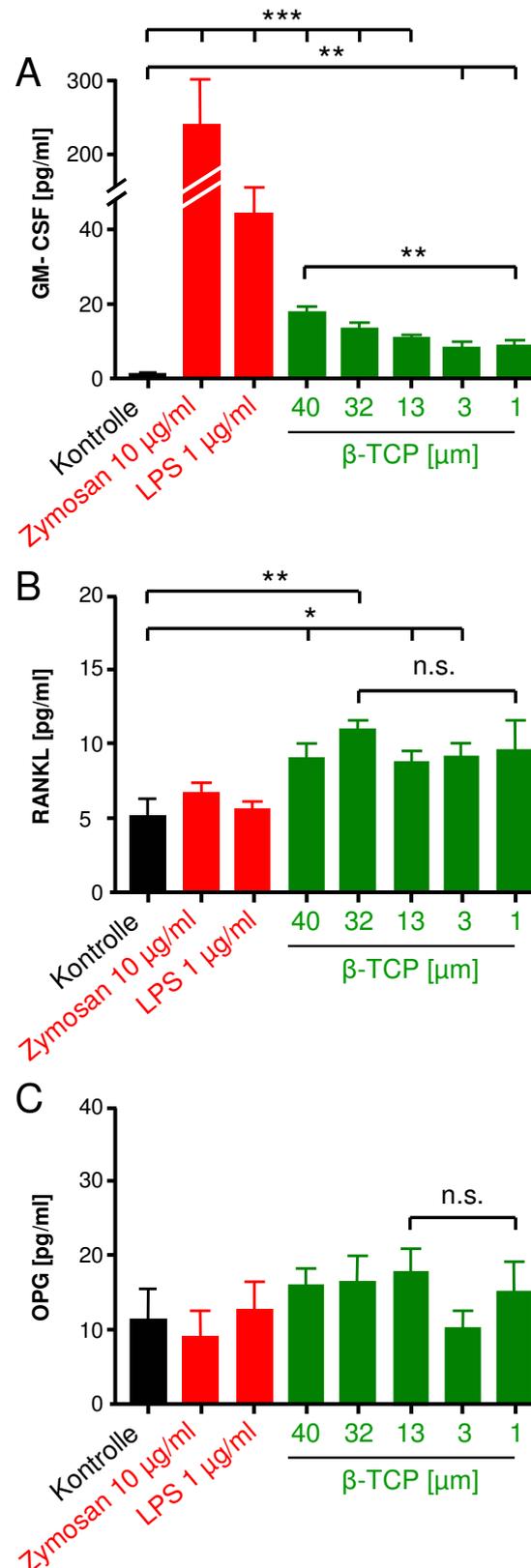


Abbildung 8: GM- CSF (A), RANKL (B) und OPG (C) nach 18- stündiger Inkubation von humanen PBMC mit β - TCP variabler Größe. Alle größeren β - TCP- Partikel verursachten einen GM- CSF- und RANKL- Anstieg. β - TCP 40 μm bewirkte eine höhere GM- CSF- Konzentration als β - TCP 1 μm . OPG blieb unbeeinflusst. M- CSF konnte nicht nachgewiesen werden. Mittelwerte \pm Standardabweichung (n = 5); *** p < 0,0005, ** p < 0,005, * p < 0,05; n.s.: nicht signifikant.

4.3.3. Zytotoxizität

Zur Klärung der in der vorliegenden Arbeit für β -TCP gezeigten größenabhängigen Zytokininduktion wurde die Zytotoxizität der getesteten Partikel gemessen. Abbildung 9 zeigt die Menge an freigesetzter Laktatdehydrogenase (LDH) nach 18- stündiger Inkubation. LDH liegt unter physiologischen Bedingungen obligat intrazellulär vor, so dass ein Anstieg im extrazellulären Medium einem Zelluntergang durch zytotoxische Umgebungsbedingungen entspricht. Die durch das Detergenz Triton X-100 hervorgerufene LDH- Menge wurde dabei als 100% definiert. Die LDH- Konzentration im unbehandelten Zellansatz entsprach 0%. Durch die potenten Entzündungsinduktoren Zymosan und LPS wurde eine LDH- Freisetzung von 20,3% bzw. 12,3% verursacht ($p < 0,0005$). Die β -TCP- Ansätze mit den Primärpartikelgrößen 3, 13, 32 und 40 μm bewirkten eine im Vergleich zur Kontrolle erhöhte Zytotoxizität ($p < 0,05$). Insgesamt lag die LDH-Freisetzung in allen β -TCP- Ansätzen unterhalb 2,5% des Triton X- 100- Wertes.

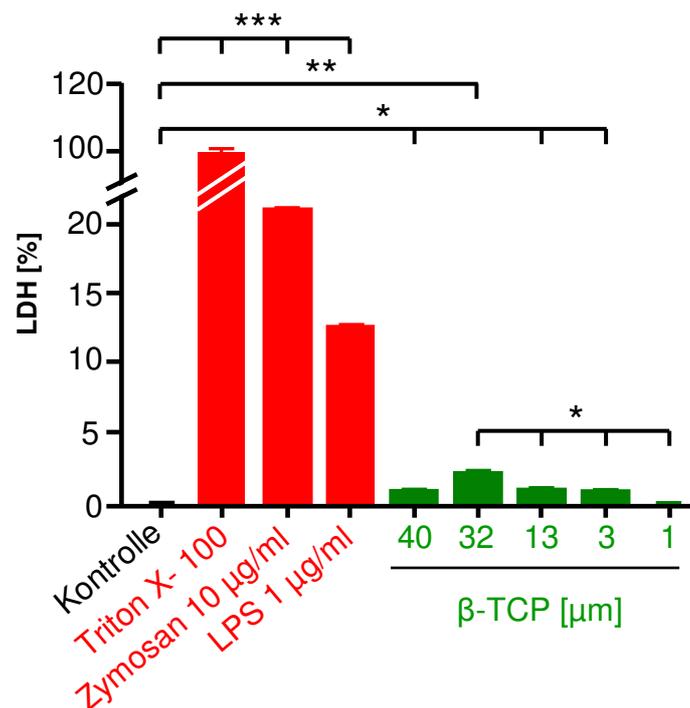


Abbildung 9: Zytotoxizität von partikulärem β -TCP nach 18- stündiger Inkubation mit humanen PBMC. Die durch Triton X- 100- Zugabe bewirkte LDH- Freisetzung wurde als 100% definiert. Im Vergleich dazu verursachten die Entzündungsinduktoren Zymosan und LPS eine Zytotoxizität von 20% respektive 12%. Für β -TCP der Größe 1 μm wurde keine zytotoxische Wirkung nachgewiesen. Größere β -TCP- Partikel riefen eine signifikant erhöhte LDH- Freisetzung hervor. Diese betrug maximal 2,5% der durch Triton X- 100 verursachten LDH- Menge. Gezeigt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n = 5$), *** $p < 0,0005$, ** $p < 0,005$, * $p < 0,05$.

5 Diskussion

5.1. Mikropartikuläre Knochenersatzmittel *in vitro*

Der Einsatz von synthetischen Knochenersatzmitteln stellt eine effektive Methode zur Behandlung von Knochendefekten dar und bildet somit eine viel versprechende Alternative zur autologen Knochentransplantation. Trotz guter klinischer Ergebnisse^{26;34} bleibt die Bildung von Abriebpartikeln mit konsekutiver aseptischer Implantatlockerung oder Osteolyse ein häufiges Problem.^{33;60;108} Zur künftigen Vermeidung solcher Komplikationen sind genauere Kenntnisse über die biologischen Wirkungen partikulärer Ersatzmittel notwendig.

Bisher wurden zahlreiche Knochenersatzmittel hinsichtlich ihrer Biokompatibilität *in vitro* untersucht^{1;6;22;42;46;64;84;95;102;107;113;120} Dabei wurden im Laufe der Jahrzehnte einige methodische Voraussetzungen entwickelt. Von entscheidender Bedeutung sind vor allem die Wahl des geeigneten Zellmaterials, die Erzeugung klinisch relevanter Partikel sowie deren standardisierte Applikation.

5.1.1. Geeignetes Zellmaterial

Im Versuch wurden humane PBMC, die sich zu rund 69% aus Lymphozyten, 15 % aus Monozyten und 3,5 % aus Granulozyten zusammensetzten, verwendet.

Die Beteiligung dieser Zelltypen an der Reaktion auf synthetische Knochenersatzmittel konnte mehrfach nachgewiesen werden. Bereits 1988 wies Anderson auf eine Aktivierung von Monozyten durch biomedizinische Kunststoffimplantate hin.⁵ Shimizu zeigte im selben Jahr eine Infiltration des subkutanen Gewebes von Ratten durch Monozyten und Granulozyten nach Injektion partikulären Hydroxylapatits.¹⁰⁶ Eine Reihe weiterer *in vivo*- Studien dokumentierten ebenfalls eine Rekrutierung und Beteiligung dieser Entzündungszellen bei der Auseinandersetzung verschiedener Empfängergewebe (Peritoneum, Femur- und Tibiakondylen) mit implantierten Calciumphosphat- Keramiken.^{67; 81;114}

Auch *in vitro*- Versuche verschiedener Arbeitsgruppen zeigten eine Aktivierung von humanen PBMC bzw. aufgereinigten CD 14- positiven Monozyten durch partikuläre Knochenersatzmittel (Polyethylen, Hydroxylapatit, biphasisches Calciumphosphat) mit konsekutiver Induktion von Zytokinen wie TNF- α , IL- 1 β , IL- 8 und GM-CSF.^{42;46;84;85} Matthews *et al.* dokumentierten 2000 dabei einen Nachteil bei der Verwendung von aus *buffy coats* isolierten PBMC: die Spenderabhängigkeit. Die

TNF- α - Aktivität schwankte hier je nach Blutspender, dessen Zellen für den Versuch verwendet wurden, um mehr als das 10- fache.⁸⁵

Vor diesem Hintergrund legen andere Studien die Eignung von Makrophagen-Zelllinien zur Immunevaluation *in vitro* nahe. So wurden proinflammatorische Effekte von partikulärem Titan, Rutil (TiO_2), Polyethylen und biphasischem Calciumphosphat (80% HA und 20% β - TCP) auf THP- 1- Zellen nachgewiesen.^{1;6;107;113}

Die THP- 1- Zelllinie geht auf eine Monozytenpopulation zurück, die 1980 aus dem Blut eines Jungen mit akuter Leukämie kultiviert werden konnte - monozytäre Eigenschaften wurden nachgewiesen.¹¹⁰ Der Einsatz der THP- 1- Linie bietet einerseits eine gewisse Standardisierung experimenteller Immunevaluationen und erlaubt somit direkte Vergleiche von Ergebnissen verschiedener Arbeitsgruppen. Andererseits handelt es sich jedoch um seit nahezu 30 Jahren kontinuierlich kultivierte Zellen eines Malignoms, so dass möglicherweise veränderte Eigenschaften dieser Zellen keine exakten Rückschlüsse auf die tatsächliche Situation im humanen Gewebe erlauben.

5.1.2. Klinisch relevante Partikel

Weitaus problematischer scheint die Bereitstellung partikulärer Knochenersatzmittel, die ähnliche Eigenschaften besitzen wie Implantatversagen verursachende Partikel. Neben der chemischen Struktur scheint insbesondere die Partikelgröße bezüglich der Induktion einer Immunreaktion eine entscheidende Rolle zu spielen.

In der vorliegenden Arbeit wurden HA- und β - TCP- Partikel der Größe 1 μm miteinander verglichen sowie β - TCP- Partikel mit einem Durchmesser zwischen 1 und 40 μm untersucht. Zuvor wurden mittels Laseranalyse bzw. REM Größen- und Oberflächenunterschiede exakt dokumentiert.

Der Einschluss von Partikeln dieses Größenbereichs in die eigenen Untersuchungen basiert auf zahlreichen Arbeiten zu gleichen oder ähnlichen partikulären Knochenersatzmaterialien. So haben Nadra *et al.* für Hydroxylapatit gezeigt, dass Partikel mit einem Durchmesser zwischen 1 und 2 μm deutlich bioaktiver sind als größere.⁹¹ Ebenso wurde für Polyethylen- Partikel ein Durchmesser im einstelligen Mikrometerbereich als klinisch relevant deklariert: In Explantaten aseptisch gelockerter Gelenkprothesen wurden nahezu ausschließlich Polyethylen- Partikel kleiner als 5 μm nachgewiesen.^{15;104} Ingham und Fisher dokumentierten 2005, dass UHMWPE mit einem Durchmesser zwischen 0,1 und 1 μm *in vitro* biologisch sehr

aktiv ist.⁵⁹ Beispielsweise bewirkt UHMWPE der Größe 0,24 μm *in vitro* bereits in einem Verhältnis von 10 μm^3 pro Makrophage die Freisetzung proinflammatorischer und osteolytischer Zytokine. Von UHMWPE der Größe 0,45 und 1,71 μm ist für diesen Effekt bereits das zehnfache Volumen pro Zelle erforderlich.⁴³ Für Titan wiesen Shanbhag *et al.* 1994 nach, dass Partikel mit einem Durchmesser von 1,76 μm höhere IL- 1- Konzentrationen hervorriefen als Partikel der Größe 0,15 oder 0,45 μm .¹⁰² Ebenso wurde der Einfluss der Partikelgröße auf die Biokompatibilität einer Aluminium- Keramik und verschiedener Knochenzemente *in vitro* beschrieben.^{47;88}

Eine Kontamination der Partikel mit adhärennten bakteriellen Endotoxinen wurde in der vorliegenden Arbeit mittels Inkubation mit *Limulus- polyphemus*- Konzentrat ausgeschlossen. Die zentrale Bedeutung dieser Untersuchung wurde beispielsweise mehrfach von Bi *et al.* belegt, dessen Arbeiten zeigten, dass adhärennte Endotoxine die Zellreaktionen *in vitro* stimulieren.^{9;10} Zudem wiesen Akisue *et al.* nach, dass LPS- behandelte Titan- Partikel im Gegensatz zu unbehandelten Partikeln eine signifikant gesteigerte TNF- α - und IL- 1 β - Freisetzung aus THP- 1- Zellen verursachen.¹

5.1.3. Applikation standardisierter Partikeldosen

In der vorliegenden Arbeit wurde als Dosismaß eine *surface- area- ratio* (SAR) von 10: 1 pro Versuchsansatz gewählt.

Shanbhag *et al.* wiesen 1994 darauf hin, dass bei der vergleichenden Analyse von partikulären Knochenersatzmitteln verschiedener Zusammensetzung, Größe bzw. Form übliche Dosismaße wie Volumen, Gewicht oder Partikelanzahl nicht herangezogen werden können.¹⁰² Differenzen in Durchmesser, Oberflächeninhalt oder Dichte der Partikel würden sich auf die applizierte Menge auswirken, konstante Reaktionsflächen zwischen Partikel und Zelle wären somit nicht gewährleistet. Deshalb empfahlen Shanbhag *et al.* die oberflächenbezogene Dosierung unter Anwendung der SAR- Methode.^{102;105;118} Dabei gilt als Dosismaß eine definierte Partikeloberfläche, die in einem festgelegten mathematischen Zahlenverhältnis auf die Zelloberfläche bezogen wird. Zur Einhaltung des gewünschten Oberflächenverhältnisses werden von den Knochenersatzmitteln unterschiedliche Massen erforderlich. Da durch dieses Verfahren konstante Reaktionsflächen zwischen Zellen und Partikeln erzeugt werden, können folgende Resultate miteinander verglichen werden. Grandjean- Laquerriere *et al.* zeigten 2005 eine

Aktivierung von humanen PBMC durch partikuläres HA, welches in einer SAR von 10: 1 appliziert wurde.⁴² Ein Oberflächenverhältnis von 1: 1 hingegen bewirkte weniger ausgeprägte Effekte.⁷³ Shanbhag *et al.* dokumentierten ebenfalls eine SAR von 10: 1 als geeignete Dosis zur Untersuchung der biologischen Wirkungen von Titan- Partikeln *in vitro*.¹⁰² Die SAR- Methode wird auch von Arbeitsgruppen anderer medizinischer Forschungsfelder angewendet.⁸⁹

5.2. Partikuläres Hydroxylapatit und β - Tricalciumphosphat *in vitro*

HA und β -TCP der Größe 1 μ m führen zu einer Entzündungsinduktion nahezu gleichen Ausmaßes

Im ersten Schritt der vorliegenden Arbeit wurden erstmals gleichzeitig die calciumphosphat- basierten partikulären Biomaterialien HA und phasenreines β - TCP hinsichtlich ihres Einflusses auf die Produktion proinflammatorischer Zytokine *in vitro* untersucht. HA und β - TCP der Primärpartikelgröße 1 μ m bewirkten nach einer Inkubationsdauer von 18 Stunden gleichermaßen ungefähr eine Verdopplung der Konzentrationen an TNF- α , IL- 1 β und IL- 8.

Eine Induktion der TNF- α - und IL- 8- Produktion durch partikuläres HA konnte auch von Grandjean- Laquerriere *et al.* dokumentiert werden.⁴² Dort wurden Monozyten über einen Zeitraum von sechs und 18 Stunden mit verschiedenen HA- Partikeln in einer SAR von 10: 1 inkubiert. Das Ausmaß der Konzentrationssteigerung schwankte je nach Form und Größe des HA. Nadelförmige Partikel mit einem mittleren Durchmesser von 2 μ m führten zur tendenziell stärksten Zytokininduktion. Allerdings wurden diese Ergebnisse nicht statistisch ausgewertet. Kim *et al.* wiesen eine Steigerung der IL- 1 β - Produktion von mononukleären Zellen des Knochenmarks bei Inkubation mit HA- Partikeln nach.⁶⁵ Nagase *et al.* zeigten auch *in vivo* eine Steigerung der TNF- α - Freisetzung durch partikuläres HA und β - TCP.⁹²

Harada *et al.* hingegen konnten keine Induktion von TNF- α oder IL- 1 β durch gesintertes HA und BCP nachweisen. Allerdings führten ungesinterte HA- Partikel, die bei 110°C getrocknet wurden und sich durch ihre unregelmäßige und scharfkantige Form von gesinterten Partikeln unterschieden, zu einer signifikanten Steigerung der Zytokine.⁴⁶ Eine Verdopplung der extrazellulären TNF- α - und IL- 1 β - Konzentration konnten zwar auch Curran *et al.* nach einer Inkubation von 24 Stunden

nicht zeigen, doch wurden dort BCP- Partikel mit einem Durchmesser von einigen Millimetern verwendet.²² Dies stützt die Hypothese, dass insbesondere Partikel im Mikrometerbereich immunologische Effekte bewirken.

Schlussfolgernd bestätigt die eigene Arbeit den mehrfach gezeigten proinflammatorischen Effekt von partikulärem HA und ergänzt die Erkenntnis, dass phasenreines β - TCP gleicher Größe *in vitro* denselben proinflammatorischen Effekt auf humane PBMC besitzt. *In vivo* wurde eine ähnliche Beobachtung bereits 1994 von van der Meulen & Koerten dokumentiert.¹¹⁴ Dort wurde eine gleichmäßige granulozytäre Infiltration der Bauchhöhle von Mäusen nach Injektion von partikulärem HA und β - TCP nachgewiesen.

Die Entzündungsinduktion durch β -TCP ist größenspezifisch und mit einer gesteigerten Zytotoxizität assoziiert

In einem zweiten Schritt dieser Studie wurden erstmals β - TCP- Partikel unterschiedlicher Primärgröße untersucht. β - TCP 3, 13, 32 und 40 μm zeigte einen stärkeren proinflammatorischen Einfluss auf humane PBMC und rief teilweise bereits nach sechs Stunden signifikante Zytokinsteigerungen hervor. Größere Partikel ($d_{50} = 32$ bzw. 40 μm) verursachten stets höhere Zytokinspiegel als kleinere ($d_{50} = 1 \mu\text{m}$) (Abbildung 10, S. 41). Die gleiche Abhängigkeit wurde von Shanbhag et al. 1994 nachgewiesen: größere Titan- Partikel bewirkten eine stärkere IL- 1- Produktion durch eine Monozyten- Makrophagen- Zelllinie als kleinere.¹⁰²

Diese größenabhängige Zytokininduktion könnte möglicherweise dadurch erklärt werden, dass die Partikel aufgrund ihrer Größe (in der eigenen Arbeit bis zu 40 μm) oder Oberflächenstruktur nicht erfolgreich von PBMC phagozytiert werden können. Diesen Zusammenhang zeigte Shimizu bereits 1988: während HA- Partikel mit einem Durchmesser von wenigen Mikrometern *in vivo* phagozytiert wurden, verblieben größere Partikel extrazellulär und verursachten eine andauernde Fremdkörperreaktion mit Granulom- und Kapselbildung.¹⁰⁶ Weiterhin wiesen mehrere Arbeitsgruppen nach, dass Partikel und Fasern unterschiedlicher Art nur bis zu einer Größe von 20 μm phagozytiert werden konnten.^{14;82} Champion *et al.* beschrieben außerdem, dass die Partikelgeometrie entscheidenden Einfluss auf das Phagozytoseverhalten von Makrophagen hat. So muss für eine erfolgreiche

Phagozytose die Partikelform die Bildung eines bestimmten Aktinkomplexes ermöglichen.¹⁹

Auf dem Hintergrund dieser Daten ist zu vermuten, dass die größeren β -TCP-Partikel mit teils unregelmäßiger Oberfläche in der eigenen Studie entweder gar nicht phagozytiert werden können und so eine prolongierte Inflammation bewirken oder aber zu einer Schädigung der Zellmembranintegrität beim Versuch einer Phagozytose führen. Dabei zugrunde gehende Zellen könnten wiederum die entzündliche Reaktion unterhalten. Diese Hypothese wird zusätzlich dadurch gestützt, dass in den Versuchen von Grandjean- Laquerriere *et al.* nadelförmige HA-Partikel und bei Harada *et al.* scharfkantige HA-Partikel die höchsten Konzentrationen an TNF- α und IL-8 bzw. IL-1 β induzierten.^{42; 46} Auch *in vivo* konnte gezeigt werden, dass durch langgezogene Polyethylen-Partikel eine stärkere proinflammatorische Reaktion hervorgerufen wird als durch globuläre Partikel.¹¹⁷ Es ist vorstellbar, dass derart geformte Partikel ebenfalls nicht erfolgreich phagozytiert werden können und über einen resultierenden Zelluntergang zu einer stärkeren Entzündungsinduktion führen.

Im Gegensatz zu dieser Hypothese stehen Daten anderer Arbeitsgruppen, die insbesondere eine erfolgreiche Phagozytose als wesentlichen Entzündungsstimulus deklarieren und damit das proinflammatorische Potential kleiner Partikel erklären. So haben Silva *et al.* dokumentiert, dass sich Makrophagen *in vitro* an BCP-Partikel ($d_{50} \sim 10 \mu\text{m}$) heften und nach 48-stündiger Inkubation ihrerseits Partikel in das Kulturmedium abgeben.¹⁰⁷ Diese Partikel weisen dasselbe Calcium-Phosphat-Verhältnis wie die Testpartikel auf, was eine erfolgreiche Phagozytose sowie intrazelluläre Prozessierung der Partikel voraussetzt. Es ist zu vermuten, dass diese extrazellulären Ablagerungen zu einer Unterhaltung der Entzündungsreaktion führen könnten. Diese Annahme wird auch durch Ergebnisse von *in vivo*-Experimenten gestützt. So zeigten Koerten und van der Meulen 1994 und 1999 die Bildung extrazellulärer Depots nach Injektion von Calcium-Phosphat-Partikeln einer Größe von $11,3 \mu\text{m}$ in die Bauchhöhle von Mäusen.^{67;114} Diese Ablagerungen enthielten wie bei Silva *et al.* Calcium und Phosphat, was ebenfalls für eine Aufrechterhaltung der Inflammation durch die Exozytose zuvor phagozytierter Partikel sprechen könnte. Allerdings wurde in diesen drei Arbeiten kein Nachweis über eine evtl. Kontamination der Partikel mit bakteriellen Endotoxinen geführt. Somit ist nicht auszuschließen, dass unterschiedliche biologische Reaktionen durch Endotoxine verursacht waren.

Weiterhin existieren in Bezug auf partikuläre Knochenersatzmittel anderer chemischer Zusammensetzung vielfache Hinweise auf eine schlechtere Biokompatibilität kleinerer Partikel. So belegen mehrere Arbeiten zu Polyethylen, dass kleine Partikel höhere TNF- α - und IL- 1 β - Konzentrationen induzieren als große.^{43;59;84;85}

Um auf dem Hintergrund dieser gegensätzlichen Daten nun zu klären, ob zu große oder zu unregelmäßig geformte Partikel tatsächlich die Zellmembranintegrität stören und möglicherweise durch einen Zelluntergang die Entzündungsreaktion verstärken, wurde in der vorliegenden Arbeit die Freisetzung des obligat intrazellulären Enzyms Lactatdehydrogenase (LDH) ermittelt. Größere β - TCP- Partikel führten zu einer signifikant höheren LDH- Konzentration in der Umgebung der Zellen (Abbildung 9, S. 33). Demnach muss angenommen werden, dass β - TCP- Partikel mit einem Durchmesser im nicht- phagozytierbaren Bereich ($> 20 \mu\text{m}$) eine zellschädigende Wirkung besitzen und dadurch stärkere entzündliche Reaktionen hervorrufen.

Die erhöhte Freisetzung vor allem von TNF- α durch β - TCP mit größerem Primärdurchmesser könnte infolge der Entzündungsinduktion auch zu einem Anstieg der Knochenresorption im Bereich des Implantats führen (Abbildung 1, S. 3). Hinweise für eine direkte Stimulation von Osteoklasten durch TNF- α finden sich *in vitro* und *in vivo*.^{63;70;87} Der Einsatz eines TNF- α - Blockers (Etanercept) könnte deshalb in Zukunft zur Vermeidung oder Therapie Partikel- induzierter Osteolysen in Bezug auf β - TCP relevant werden. Die Wirksamkeit dieser Strategie konnte hinsichtlich partikulären Titans bereits im Tierversuch belegt werden.²⁰

*HA der Größe 1 μm induziert RANKL *in vitro**

Im Gegensatz zu β - TCP induziert HA gleicher Größe die Produktion von RANKL (Abbildung 10, S. 41). Dieser Effekt wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals *in vitro* gezeigt. Somit wurde hier eine mögliche Erklärung für die in klinischen Studien beschriebene Inzidenz von Osteolysen nach HA- Implantation geliefert.^{25;90} Außerdem stützt dieses Ergebnis die Beobachtung von Zerbo *et al.*, dass sechs Monate nach β - TCP- Ersatz immunhistochemisch keine multinukleären TRAP- positiven Zellen (Osteoklasten), sondern Runx2/ Cbfa1- positive Zellen (Osteoblasten) nachweisbar sind.¹²⁰ Es ist daher anzunehmen, dass HA im Gegensatz zu β - TCP die Bildung von RANKL begünstigt und somit die

Osteoklastogenese und folglich die Knochenresorption fördert. In diesem Zusammenhang konnten Childs *et al.* bereits *in vivo* zeigen, dass die Gabe von RANKL- Antikörpern das Auftreten von Osteolysen verhindert.²¹ Somit wurde diese Strategie als mögliche Methode zur Verhütung von Implantatlockerungen diskutiert. Im Gegensatz dazu detektierten Koulouvaris *et al.* statt eines erhöhten RANKL eine verringerte Expression von OPG in Gewebeproben von Patienten mit aseptischer Prothesenlockerung.⁶⁹ Dieser Einfluss wurde in der eigenen Arbeit nicht bestätigt, allerdings wurden bei Koulouvaris *et al.* Titan- und PMMA- Partikel als ursächlich identifiziert, so dass ein direkter Vergleich nicht ohne weiteres möglich ist.

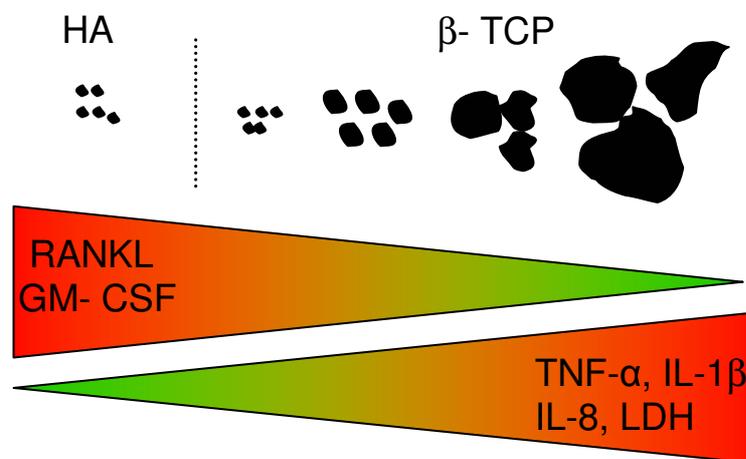


Abbildung 10: Zusammenfassung. HA und β - TCP der Größe 1 μm führen in gleichem Ausmaß zu einer signifikanten Induktion von $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ und IL-8 . Im Gegensatz zu β - TCP verursacht HA einen RANKL- Anstieg. Dies erklärt möglicherweise die gesteigerte Inzidenz von Osteolysen nach Implantation von HA. Größere β - TCP- Partikel bewirken höhere Zytokinkonzentrationen als kleine. Gleichzeitig induzieren diese Partikel die Freisetzung von LDH. Dies spricht für eine schlechtere Biokompatibilität von β - TCP- Produkten mit einer Primärpartikelgröße von 10- 40 μm im Vergleich zu Partikeln mit einer Primärgröße von ca. 1 μm .

6 Zusammenfassung

Der Einsatz von synthetischen Knochenersatzmitteln stellt eine effektive Methode zur Behandlung von Knochendefekten dar und bildet somit eine viel versprechende Alternative zur autologen Knochentransplantation. Trotz guter klinischer Ergebnisse bleibt die Bildung von partikulärem Abrieb mit konsekutiver Aktivierung von Immunzellen ein häufiges Problem. Aufgrund einer zytokinvermittelten Entzündungsreaktion kommt es zu aseptischen Implantatlockerungen und Osteolysen, die in einem Versagen des Implantats mit erforderlicher Revision resultieren können (*particle disease*).

Für Hydroxylapatit (HA) und biphasisches Calciumphosphat wurde bereits der Einfluss auf die Produktion proinflammatorischer Zytokine *in vitro* untersucht. Für phasenreines β - Tricalciumphosphat (β - TCP), das seit einigen Jahren in breiter klinischer Anwendung steht, fehlen diese Daten bisher. Ebenso existieren keine Studien über eine mögliche größenspezifische Entzündungsinduktion durch β - TCP sowie über den Einfluss von HA und β - TCP auf die Differenzierung myeloischer Vorläuferzellen.

Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit sowohl die Wirkung von HA und β - TCP gleicher Partikelgröße (1 μm) als auch von β - TCP variabler Größe (1- 40 μm) auf die Bildung von TNF- α , IL- 1 β , IL- 8, GM- CSF, M- CSF, RANKL und OPG durch humane mononukleäre Zellen untersucht.

HA und β - TCP bewirkten erst nach 18 h Inkubation einen Anstieg von TNF- α , IL- 1 β , IL- 8 und GM- CSF. Im Gegensatz zu β - TCP induzierte HA den osteoklastogenen Mediator RANKL. Größere β - TCP- Partikel verursachten bereits nach sechsstündiger Inkubation eine Induktion von TNF- α , IL- 1 β und IL- 8, die bis zum Ende des Versuchs weiter gesteigert wurde. β - TCP- Partikel der Größe 32 und 40 μm bewirkten stets höhere Zytokinkonzentrationen als Partikel der Größe 1 μm .

Diese Daten lassen einen stärkeren osteoklastogenen Einfluss von HA vermuten und liefern eine mögliche Erklärung für die in einigen Studien beschriebene Inzidenz von Osteolysen nach HA- Implantation. Weiterhin wird durch diese Arbeit erstmals eine schlechtere Biokompatibilität von β - TCP- Produkten mit höherer Primärpartikelgröße belegt. Möglicherweise können darauf basierend neue β - TCP- Keramiken entwickelt werden, die durch eine definierte Partikelstruktur eine *particle disease* vermeiden.

7 Literaturverzeichnis

1. Akisue T, Bauer TW, Farver CF, Mochida Y (2002) The effect of particle wear debris on NF κ B activation and pro- inflammatory cytokine release in differentiated THP- 1 cells. *J Biomed Mat Res* 59(3): 507- 515.
2. Albrightson CR, Baenziger NL, Needleman P (1985) Exaggerated human vascular cell prostaglandin biosynthesis mediated by monocytes: role of monokines and interleukin 1. *J Immunol* 135: 1872- 1877.
3. Al- Saffar N, Revell PA (1994) Interleukin- 1 production by activated macrophages surrounding loosened orthopaedic implants: a potential role in osteolysis. *Br J Rheumatol* 33: 309- 316.
4. Amstutz HC, Campbell P, Kossovsky N, Clarke IC (1992) Mechanism and clinical significance of wear debris- induced osteolysis. *Clin Orthop* 276: 7- 18.
5. Anderson JM (1988) Inflammatory response to implants. *Trans Am Soc Artif Intern Organs* 34: 101- 107.
6. Baumann B, Seufert J, Jakob F, Nöth U, Rolf O, Eulert J, Rader CP (2005) Activation of NF- κ B signalling and TNF α - expression in THP- 1 macrophages by TiAlV- and polyethylene- wear particles. *J Orthop Res* 23: 1241- 1248.
7. Banwart JC, Asher MA, Hassanein RS (1995) Iliac crest bone harvest donor site morbidity. A statistical evaluation. *Spine* 20: 1055- 1060.
8. Bevilacqua MP, Pober JS, Wheeler ME, Cotran RS, Gimbrone MA (1985) Interleukin 1 acts on cultured human vascular endothelium to increase the adhesion of polymorphonuclear leukocytes, monocytes and related leukocyte cell lines. *J Clin Invest* 76: 2003- 2011.
9. Bi Y, Collier TO, Goldberg VM, Anderson JM, Greenfield EM (2002) Adherent endotoxin mediates biological responses of titanium particles without stimulating their phagocytosis. *J Orthop Res* 20: 696- 703.

10. Bi Y, Seabold JM, Kaar SC, Ragab AA, Goldberg VM, Anderson JM, Greenfield EM (2001) Adherent endotoxin on orthopaedic wear particles stimulates cytokine production and osteoclast differentiation. *J Bone Miner Res* 16: 2082-2091.
11. Bloebaum RD, Zou L, Bachus KN, Shea KG, Hofmann AA, Dunn HK (1997) Analysis of particles in acetabular components from patients with osteolysis. *Clin Orthop* 338: 109- 118.
12. Bohner M (2000) Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. *Injury* 31 D37– 47.
13. Bohner M (2001) Physical and chemical aspects of calcium phosphates used in spinal surgery. *Eur Spine J* 10: 114- 121.
14. Brandwood A, Noble KR, Schindhelm K (1992) Phagocytosis of carbon particles by macrophages in vitro. *Biomaterials* 13: 646- 648.
15. Campbell P, Ma S, Yeom B, McKellop HA, Schmalzried TP, Amstutz HC (1995) Isolation of predominantly submicron-sized UHMWPE wear particles from periprosthetic tissues. *J Biomed Mater Res* 29: 127- 131.
16. Capello WN (1994) Hydroxyapatite in total hip arthroplasty: five- year clinical experience. *Orthopedics* 17: 781- 792.
17. Capello WN, D'Antonio JA, Feinberg JR, Manley MT (1997) Hydroxyapatite-coated total hip femoral components in patients less than fifty years old. Clinical and radiographic results after five to eight years of follow- up. *J Bone Joint Surg Am* 79: 1023- 1029.
18. Catelas I, Huk OL, Petit A, Zukor DJ, Marchand R, Yahia L (1998) Flow cytometric analysis of macrophage response to ceramic and polyethylene particles: Effects of size, concentration, and composition. *J Biomed Mater Res* 41: 600- 607.

19. Champion JA, Mitragotri S (2006) Role of target geometry in phagocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 4930- 4934.
20. Childs LM, Goater JJ, O' Keefe RJ, Schwarz EM (2001) Efficacy of etanercept for wear debris- induced osteolysis. *J Bone Miner Res* 16: 338- 347.
21. Childs LM, Paschalis EP, Xing L, Dougall WC, Anderson D, Boskey AL, Puzas JE, Rosier RN, O' Keefe RJ, Boyce BF, Schwarz EM (2002) In vivo RANK signaling blockade using the receptor activator of NF- κ B:Fc effectively prevents and ameliorates wear debris- induced osteolysis via osteoclast depletion without inhibiting osteogenesis. *J Bone Miner Res* 17: 192- 199.
22. Curran JM, Gallagher JA, Hunt JA (2005) The inflammatory potential of biphasic calcium phosphate granules in osteoblast/ macrophage co- culture. *Biomaterials* 26: 5313- 5320.
23. Daculsi G, Bouler JM, LeGeros RZ (1997) Adaptive crystal formation in normal and pathological calcifications in synthetic calcium phosphates and related biomaterials. *Int Rev Cytol* 172: 129- 191.
24. Damien CJ, Parsons JR, Benedict JJ, Weisman DS (1990) Investigation of a hydroxyapatite and calcium sulfate composite supplemented with an osteoinductive factor. *J Biomed Mat Res* 24: 639- 654.
25. D'Antonio JA, Capello WN, Manley MT, Feinberg J (1997) Hydroxyapatite coated implants: Total hip arthroplasty in the young patient and patients with avascular necrosis. *Clin Orthop Relat Res* 344: 124- 138.
26. D'Antonio JA, Capello WN, Manley MT, Geesink R (2001) Hydroxyapatite femoral stems for total hip arthroplasty: 10- to 13- year followup. *Clin Orthop Relat Res* 393: 101- 111.
27. de Groot K (1983) *Bioceramics of calciumphosphate*. CRC Press, Boca Raton.

28. de Groot K (1988) Effect of porosity and physicochemical properties on the stability, resorption and strength of calcium phosphate ceramics. *Ann NY Acad Sci* 523: 227- 233.
29. den Boer FC, Wippermann BW, Blokhuis TJ, Patka P, Bakker FC, Haarman HJ (2003) Healing of segmental bone defects with granular porous hydroxyapatite augmented with recombinant human osteogenic protein-1 or autologous bone marrow. *J Orthop Res* 21: 521- 528.
30. Deppe H, Horch HH, Kolk A (2004) Microstructured dental implants and palatal mucosal grafts in cleft patients: a retrospective analysis. *J Craniomaxillofac Surg* 32: 211- 215.
31. Doremus RH, Tracy DM (1984) Direct electron microscopy studies of the bone-hydroxyapatite interface. *J Biomed Mat Res* 18: 719- 726.
32. Dorozhkin SV, Epple M (2002) Biological and medical significance of calcium phosphates. *Angew Chem Int Ed Engl* 41: 3130- 3146.
33. Friedman RJ, Black J, Galante JO, Jacobs JJ, Skinner HB (1994) Current concepts in orthopaedic biomaterials and implant fixation. *Instr Course Lect* 43: 233- 255.
34. Gaasbeeck RDA, Toonen HG, van Heerwaarden RJ, Buma P (2005) Mechanism of bone incorporation of b- TCP bone substitute in open wedge tibial osteotomy in patients. *Biomaterials* 26: 6713- 6719.
35. Geret V, Rahn BA, Mathys R, Perren SM (1983) Quantitative Analyse der in vivo Gewebeverträglichkeit von Hydroxylapatit Ceros 80. *Hefte Unfallheilkd* 165: 75- 76.
36. Glant TT, Jacobs JJ (1994) Response of three murine macrophage populations to particulate debris: Bone resorption in organ cultures. *J Orthop Res* 12: 720- 731.

37. Gonzalez O, Smith RL, Goodman SB (1996) Effect of size, concentration, surface area, and volume of polymethylmethacrylate particles on human macrophages *in vitro*. J Biomed Mater Res 30: 463- 473.
38. Goodman SB, Huie P, Song Y, Lee K, Doshi A, Rushdieh B, Woolson S, Maloney W, Schurman D, Sibley R (1997) Loosening and osteolysis of cemented joint arthroplasties: A biologic spectrum. Clin Orthop Relat Res 337: 149- 163.
39. Goodman SB, Knoblich G, O'Connor M, Song Y, Huie P, Sibley R (1996) Heterogeneity in cellular and cytokine profiles from multiple samples of tissue surrounding revised hip prostheses. J Biomed Mater Res 31: 421- 428.
40. Goodman SB, Lind M, Song Y, Smith RL (1998) In vitro, in vivo, and tissue retrieval studies on particulate debris. Clin Orthop Relat Res 352: 25- 34.
41. Goulet JA, Senunas LE, DeSilva GL, Greenfield ML (1997) Autogenous iliac crest bone graft. Complications and functional assessment. Clin Orthop Relat Res 339: 76- 81.
42. Grandjean- Laquerriere A, Laquerriere P, Guenounou M, Laurent- Maquin D, Phillips TM (2005) Importance of the surface area ratio on cytokines production by human monocytes in vitro induced by various hydroxyapatite particles. Biomaterials 26: 2361- 2369.
43. Green TR, Fisher J, Matthews JB, Stone MH, Ingham E (2000) Effect of size and dose on bone resorption activity of macrophages in vitro by clinically relevant ultra high molecular weight polyethylene particles. J Biomed Mat Res Appl Biomat 53: 490- 497.
44. Green TR, Fisher J, Stone M, Wroblewski BM, Ingham E (1998) Polyethylene particles of a 'critical size' are necessary for the induction of cytokines by macrophages in vitro. Biomaterials 19: 2297- 2302.

45. Greenwald AS, Boden SD, Goldberg VM, Khan Y, Laurencin CT, Rosier RN (2001) Bone- graft substitutes: facts, fictions, and applications. *J Bone Joint Surg* 83: 98- 103.
46. Harada Y, Wang JT, Doppalapudi VA, Willis AA, Jasty M, Harris WH, Nagase M, Goldring SR (1996) Differential effects of different forms of hydroxyapatite and hydroxyapatite/ tricalcium phosphate particulates on human monocyte/ macrophages in vitro. *J Biomed Mat Res* 31: 19- 26.
47. Hatton A, Nevelos JF, Matthews JB, Fisher J, Ingham E (2003) Effects of clinically relevant alumina ceramic wear particles on TNF- α production by human peripheral blood mononuclear cells. *Biomaterials* 24: 1193- 1204.
48. Haynes DR, Rogers SD, Howie DW, Pearcy MJ, Vernon- Roberts B (1996) Drug inhibition of the macrophage response to metal wear particles in vitro. *Clin Orthop* 323: 316- 326.
49. Helenius A, Simons K. Solubilization of membranes by detergents. *Biochim Biophys Acta* 1975; 415: 29-79.
50. Hench LL (1998) Bioceramics. *J Am Ceram Soc* 81: 1705- 1728.
51. Hidakawa K, Bauer TW, Stulberg BN, Wilde AH (1996) Comparison and quantitation of wear debris of failed total hip and total knee arthroplasty. *J Biomed Mater Res* 31: 257- 263.
52. Hidakawa K, Bauer TW, Stulberg BN, Wilde AH, Secic M (1996) Characterization and comparison of wear debris from failed total hip implants of different types. *J Bone Joint Surg* 78: 1235- 1243.
53. Horowitz SM, Doty SB, Lane JM, Burstein AH (1993) Studies of the mechanism by which the mechanical failure of polymethylmethacrylate leads to bone resorption. *J Bone Joint Surg* 75: 802- 813.

54. Horowitz SM, Gautsch TL, Frondoza CG, Riley L Jr (1991) Macrophage exposure to polymethyl methacrylate leads to mediator release and injury. *J Orthop Res* 9: 406-413.
55. Horowitz SM, Gonzales JB (1997) Effects of polyethylene on macrophages. *J Orthop Res* 15: 50- 56.
56. Horowitz SM, Purdon MA (1995) Mediator interactions in macrophage/particulate bone resorption. *J Biomed Mater Res* 29: 477- 484.
57. Huracek J, Spirig P (1994) The effect of hydroxyapatite coating on the fixation of hip prostheses. A comparison of clinical and radiographic results of hip replacement in a matched- pair study. *Arch Orthop Trauma Surg* 113: 72- 77.
58. Ilankovan V, Stronczek M, Telfer M, Peterson LJ, Stassen LFA, Ward- Booth P (1998) A prospective study of trephined bone grafts of the tibial shaft and iliac crest. *Br J Oral Maxillofac Surg* 36: 434- 439.
59. Ingham E, Fisher J (2005) The role of macrophages in osteolysis of total joint replacement. *Biomaterials* 26: 1271- 1286.
60. Jacobs JJ, Roebuck KA, Archibeck M, Hallab NJ, Glant TT (2001) Osteolysis: Basic science. *Clin Orthop* 393: 71- 77.
61. Jaffe WL, Scott DF (1996) Total hip arthroplasty with hydroxyapatite- coated prostheses. *J Bone Joint Surg Am* 78: 1918- 1934.
62. Jiranek WA, Machado M, Jasty M, Jevsevar D, Wolfe HJ, Goldring SR, Goldberg MJ, Harris WH (1993) Production of cytokines around loosened cemented acetabular components. *J Bone Joint Surg* 75: 863- 879.
63. Kaji K, Katogi R, Azuma Y, Naito A, Inoue JI, Kudo A (2001) Tumor necrosis factor alpha- induced osteoclastogenesis requires tumor necrosis factor receptor- associated factor 6. *J Bone Miner Res* 16: 1593- 1599.

64. Kaufman AM, Alabre CI, Rubash HE, Shanbhag AS (2008) Human macrophage response to UHMWPE, TiAlV, CoCr and alumina particles: Analysis of multiple cytokines using protein assays. *J Biomed Mat Res A* 84: 464- 474.
65. Kim KJ, Sato K, Kotake S, Kato Y, Itoh T (1993) Biochemical and histochemical analysis of bone marrow cells activated by HA particles. In: Ducheyne and D.Christiansen (eds.) *Bioceramics*, Vol. 6, Butterworth- Heinemann Ltd., Philadelphia, pp. 365- 369.
66. Knop C, Sitte I, Canto F, Reinhold M, Blauth M (2006) Successful posterior interlaminar fusion at the thoracic spine by sole use of β - tricalcium phosphate. *Arch Orthop Trauma Surg* 126: 204- 210.
67. Koerten HK, van der Meulen J (1999) Degradation of calcium phosphate ceramics. *J Biomed Mat Res* 44(1): 78- 86.
68. Konttinen YT, Zhao D, Beklen A, Ma G, Takagi M, Kivelä- Rajamäki M, Ashammakhi N, Santavirta S (2005) The microenvironment around total hip replacement prostheses. *Clin Orthop Relat Res* 430: 28- 38.
69. Koulouvaris P, Ly K, Ivashkiv LB, Bostrom MP, Nestor BJ, Sculco TP, Purdue PE (2008) Expression profiling reveals alternative macrophage activation and impaired osteogenesis in periprosthetic osteolysis. *J Orthop Res* 26: 106- 116.
70. Lam J, Takeshita S, Barker JE, Kanagawa O, Ross FP, Teitelbaum SL (2000) TNF- alpha induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand. *J Clin Invest* 106: 1481- 1488.
71. Landy M, Baker PJ (1966) Cytodynamics of the distinctive immune response produced in regional lymph nodes by *Salmonella* somatic polysaccharide. *J Immunol* 97: 670- 679.

72. Laquerriere P, Grandjean- Laquerriere A, Addadi- Rebbah S, Jallot E, Laurent- Maquin D, Frayssinet P, Guenounou M (2004) MMP- 2, MMP- 9 and their inhibitors TIMP- 2 and TIMP- 1 production by human monocytes in vitro in presence of different hydroxyapatite: importance of particle physical characteristics. *Biomaterials* 25: 2515- 2524.
73. Laquerriere P, Grandjean- Laquerriere A, Jallot E, Balossier G, Frayssinet P, Guenounou M (2003) Importance of hydroxyapatite particles characteristics on cytokines production by human monocytes in vitro. *Biomaterials* 24: 2739- 2747.
74. Lee SH, Brennan FR, Jacob JJ, Urban RM, Ragasa DR, Glant TT (1997) Human monocyte/ macrophage response to cobalt–chromium corrosion products and titanium particles in patients with total joint replacements. *J Orthop Res* 15: 40- 49.
75. LeGeros RZ (1991) Calcium phosphates in oral biology and medicine. *Monogr Oral Sci* 15: 1- 201.
76. LeGeros RZ (1994) Biological and synthetic apatites. In: Brown PW, Constantz B (eds.) *Hydroxyapatite and related materials*, CRC Press, Boca Raton, pp. 3- 28.
77. LeGeros RZ, LeGeros JP (1997) Bone substitute materials and their properties. In: Schnettler R, Markgraf E (eds.) *Knochenersatzmaterialien und Wachstumsfaktoren*, Thieme, Stuttgart- New York, p. 180.
78. Le Huec JC, Clement D, Lesprit E, Faber J (2000) The use of calcium phosphates, their biological properties. *Eur J Orthop Surg Traumatol* 10: 223- 229.
79. Leonard EJ, Yoshimura T (1990) Neutrophil attractant/activation protein-1 (NAP-1 [interleukin-8]). *Am J Respir Cell Mol Biol* 2: 479- 486.
-

80. Lerouge S, Huk O, Yahia LH, Sedel L (1996) Characterization of *in vivo* wear debris from ceramic- ceramic total hip arthroplasties. J Biomed Mater Res 32: 627- 633.
81. Lu J, Descamps M, Dejoux J, Koubi G, Hardouin P, Lemaitre J, Proust JP (2002) The biodegradation mechanism of calcium phosphate biomaterials in bone. J Biomed Mat Res 63: 408- 412.
82. Luoto K, Holopainen M, Perander M, Karppinen K, Savolainen KM (1996) Cellular effects of particles – impact of dissolution on toxicity of man- made mineral fibers. Cent Eur J Public Health 4: 29- 32.
83. Maloney WJ, James RE, Smith RL (1996) Human macrophage response to retrieved titanium alloy particles in vitro. Clin Orthop 322: 268- 278.
84. Matthews JB, Besong AA, Green TR, Stone MH, Wroblewski BM, Fisher J, Ingham E (2000) Evaluation of the Response of primary human peripheral blood mononuclear phagocytes to challenge with in vitro generated clinically relevant UHMWPE particles of known size and dose. J Biomed Mat Res 52: 296- 307.
85. Matthews JB, Green TR, Stone MH, Wroblewski BM, Fisher J, Ingham E (2000) Comparison of the response of primary human peripheral blood mononuclear phagocytes from different donors to challenge with model polyethylene particles of known size and dose. Biomaterials 21: 2033- 2044.
86. Mazock JB, Schow SR, Triplett RG (2003) Posterior iliac crest bone harvest: review of technique, complications and use of an epidural catheter for postoperative pain control. J Oral Maxillofac Surg 61: 1497- 1503.
87. Merkel KD, Erdmann JM, McHugh KP, Abu- Amer Y, Ross FP, Teitelbaum SL (1999) Tumor necrosis factor- alpha mediates orthopedic implant osteolysis. Am J Pathol 154: 203- 210.
-

88. Mitchell W, Matthews JB, Stone MH, Fisher J, Ingham E (2003) Comparison of the response of human peripheral blood mononuclear cells to challenge with particles of three bone cements in vitro. *Biomaterials* 24: 737- 748.
89. Monteiller C, Tran L, MacNee W, Faux S, Jones A, Miller B, Donaldson K (2007) The proinflammatory effects of low-toxicity low-solubility particles, nanoparticles and fine particles, on epithelial cells in vitro: the role of surface area. *Occup Environ Med* 64: 609- 615.
90. Morscher J, Hefti A, Aebi U (1998) Severe osteolysis after third- body wear due to hydroxyapatite particles from acetabular cup coating. *J Bone Joint Surg Br* 80: 267- 272.
91. Nadra I, Boccaccini AR, Philippidis P, Whelan LC, McCarthy GM, Haskard DO, Landis RC (2008) Effect of particle size on hydroxyapatite crystal- induced tumor necrosis factor alpha secretion by macrophages. *Atherosclerosis* 196: 98-105.
92. Nagase M, Baker DG, Schumacher R (1988) Prolonged inflammatory reactions induced by artificial ceramics in the rat air pouch model. *J Rheumatol* 15: 1334- 1338.
93. Nakashima Y, Sun DH, Trindade MCD, Maloney WJ, Goodman SB, Schurman DJ, Smith RL (1999) Signaling pathways for tumor necrosis factor- α and interleukin- 6 expression in human macrophages exposed to titanium- alloy particulate debris in vitro. *J Bone Joint Surg* 81: 603- 615.
94. Niedhart C, Pingsmann A, Jurgens C, Marr A, Blatt R, Niethard FU (2003) Komplikationen nach Entnahme autologen Knochens aus dem ventralen und dorsalen Beckenkamm – eine prospektive, kontrollierte Studie. *Z Orthop Grenzgeb* 141: 481- 486.

95. Ninomiya JT, Struve JA, Stelloh CT, Toth JM, Crosby KE (2001) Effects of hydroxyapatite particulate debris on the production of cytokines and proteases in human fibroblasts. *J Orthop Res* 19: 621- 628.
96. Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, Schroeder L, Aderem A (2000) The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 25: 13766-71.
97. Parsons JR, Ricci JL, Alexander H (1988) Osteoconductive composite grouts for orthopedic use. *Ann NY Acad Sci* 523: 190- 207.
98. Prabhu A, Shelburne CE, Gibbons DF (1998) Cellular proliferation and cytokine responses of murine macrophage cell line J774A.1 to polymethylmethacrylate and cobalt- chrome alloy particles. *J Biomed Mater Res* 42: 655- 663.
99. Rossi V, Breviario F, Ghezzi P, Dejana E, Mantovani A (1985) Prostacyclin synthesis induced in vascular cells by Interleukin- 1. *Science* 229: 174- 176.
100. Rueger JM (1998) Bone substitution materials. Current status and prospects. *Orthopäde* 27: 72- 79.
101. Schwartz Z, Weesner T, van Dijk S, Cochran DL, Mellonig JT, Lohmann CH, Carnes DL, Goldstein M, Dean DD, Boyan BD (2000) Ability of deproteinized cancellous bovine bone to induce new bone formation. *J Periodontol* 71: 1258- 1269.
102. Shanbhag AS, Jacobs JJ, Black J, Galante JO, Glant TT (1994) Macrophage/particle interactions: Effect of size, composition and surface area. *J Biomed Mat Res* 28: 81- 90.
103. Shanbhag AS, Jacobs JJ, Black J, Galante JO, Glant TT (1995) Human monocyte response to particulate biomaterials generated in vivo and vitro. *J Orthop Res* 13: 792- 801.
-

104. Shanbhag AS, Jacobs JJ, Glant TT, Gilbert JL, Black J, Galante JO (1994) Composition and morphology of wear debris in failed uncemented total hip replacement. *J Bone Jt Surg Br* 76: 60- 67.
105. Shanbhag AS, Yang J, Lilién J, Black J (1992) Decreased neutrophil respiratory burst on exposure to cobalt- chrome alloy and polystyrene in- vitro. *J Biomed Mat Res* 26: 185- 195.
106. Shimizu S (1988) Subcutaneous tissue responses in rats to injection of fine particles of synthetic hydroxyapatite ceramic. *Biomed Res* 9: 95- 111.
107. Silva SN, Pereira MM, Goes AM, Leite MF (2003) Effect of biphasic calcium phosphate on human macrophage functions in vitro. *J Biomed Mat Res* 65: 475- 481.
108. Sinha RK, Shanbhag AS, Maloney WJ, Hasselman CT, Rubash HE (1998) Osteolysis: Cause and effect. *Instr Course Lect* 47: 307- 320.
109. Smith CI, Hammarström L, Bird AG, Kunori T, Gustafsson B, Holme T (1979) Lipopolysaccharide and lipid A- induced human blood lymphocyte activation as detected by a protein A plaque assay. *Eur J Immunol* 9: 619- 625
110. Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi M, Kobayashi Y, Konno T, Tada K (1980) Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP- 1). *Int J Cancer* 26: 171- 176.
111. Underhill DM, Ozinsky A, Hajjar AM, Stevens A, Wilson CB, Bassetti M, Aderem A (1999) The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* 401: 811- 815.
112. Vaes G (1988) Cellular biology and biochemical mechanisms of bone resorption: a review of recent developments on the formation, activation and mode of action of osteoclasts. *Clin Orthop* 231: 239- 271.
-

113. Valles G, Gonzalez- Melendi P, Gonzalez- Carrasco JL, Saldana L, Sanchez- Sabate E, Munuera L, Vilaboa N (2006) Differential inflammatory macrophage response to rutile and titanium particles. *Biomaterials* 27: 5199- 5211.
114. van der Meulen J, Koerten HK (1994) Inflammatory response and degradation of three types of calcium phosphate ceramic in a non- osseous environment. *J Biomed Mat Res* 28: 1455- 1463.
115. Vehmeyer S, Wolkenfeldt J, Deijkers R, Petit P, Brand R, Bloem R (2002) Bacterial contamination in postmortem bone donors. *Acta Orthop Scand* 73: 678- 683.
116. Wolff KD, Swaid S, Nolte D, Bockmann RA, Holzle F, Muller- Mai C (2004) Degradable injectable bone cement in maxillofacial surgery: indications and clinical experience in 27 patients. *J Cranio- Maxillofac Surg* 32: 71- 79.
117. Yang SY, Ren W, Park Y, Sieving A, Hsu S, Nasser S, Wooley PH (2002) Diverse cellular and apoptotic responses to variant shapes of UHMWPE particles in a murine model of inflammation. *Biomaterials* 23: 3535- 3543.
118. Yang J, Shanbhag AS, Lilien J, Black J (1992) Human neutrophil response to short- term exposure to F- 75 cobalt- based alloy. *J Biomed Mat Res* 26: 1217- 1230.
119. Younger E, Chapman M (1989) Morbidity at bone graft donor sites. *J Orthop Trauma* 3: 192- 195.
120. Zerbo IR, Bronckers AL, de Lange G, Burger EH (2005) Localisation of osteogenic and osteoclastic cells in porous b- tricalcium phosphate particles used for human maxillary sinus floor elevation. *Biomaterials* 26: 1445- 1451.

Preise und Publikationen im Rahmen der Dissertation

Preise

2007 1. Preis für innovative Medizin- und Biotechnologie an Hamburger Hochschulen des Hamburger Senats und der Philips Medizin Systeme GmbH

Originalarbeiten

1. Schilling AF*, Filke S*, Lange T, Gebauer M, Brink S, Baranowsky A, Zustin J, Amling M (2008) Gap Junctional Communication in Human Osteoclasts in vitro and in vivo. J Cell Mol Med 2008; 12: 2497- 504.
2. Lange T*, Schilling AF*, Peters F, Haag F, Morlock MM, Rueger JM, Amling M (2009) Proinflammatory and Osteoclastogenic Effects of beta-tricalciumphosphate and Hydroxyapatite Particles on Human Mononuclear Cells in vitro. Biomaterials 2009, doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.06.023

Vorträge

Studententagung Medizin und Biotechnologie 2007, Hamburg

Lange T

Entzündungsinduktion durch mikropartikuläre Knochenersatzmaterialien *in vitro*

8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Michael Amling für die Überlassung des interessanten Forschungsthemas, die uneingeschränkte Unterstützung bei der Umsetzung der Experimente und die intensive Betreuung bei der Publikation wesentlicher Inhalte. Sein Interesse nicht nur am Vorankommen meiner Arbeit, sondern auch an meiner individuellen Entwicklung fand in zahlreichen wertvollen Ratschlägen Ausdruck, für die ich sehr dankbar bin.

Darüber hinaus möchte ich mich insbesondere bei Prof. Dr. Arndt F. Schilling für die ausgesprochen umfassende, wissensreiche und unmittelbare Unterstützung bei Experimenten, Vorträgen, Publikationen und der Dissertation bedanken. Seine didaktisches Geschick, seine Ansprechbarkeit und nicht zuletzt seine sehr schätzenswerte persönliche Art ermöglichten wissenschaftliches Arbeiten in sehr angenehmer Atmosphäre.

Allen (ehemaligen) Mitarbeitern und Doktoranden des Zentrums für Biomechanik und molekulare Skelettbiologie danke ich für ihre kollegiale Unterstützung und freundliche Art; mein Dank gilt vor allem PD Dr. Thorsten Schinke, Sandra Perkovic, Claudia Neunaber, Anke Baranowsky, Silja Brink, Antje Hübner und Tilman Linn. Ebenso danke ich allen Kooperationspartnern für die Zusammenarbeit und den interessanten Austausch.

Meiner Ehefrau Annika Lange danke ich für ihre Liebe, für alle Geduld und zahlreiche hilfreiche Vorschläge. Ich danke außerdem meinen Eltern Helmut und Regine Lange und meinen Geschwistern Lydia Weisner und Sabine Schütz für ihren uneingeschränkten Rückhalt, ihr Interesse und ihre Begleitung.

9 Lebenslauf

Name: Lange
Vorname: Tobias
Geburtsdatum und -ort: 29. 04.1984 in Perleberg, Brandenburg

1990 - 1997 Grundschole, Wittenberge, Brandenburg
1997 - 2003 Marie- Curie- Gymnasium Wittenberge, Abitur
08/ 2002 Stipendium der Walter-Stich-Stiftung Elmshorn,
wissenschaftliche Arbeit am Institut für Biologie und
Biochemie der Universität Potsdam
07/ 2003 Ernennung zum Soldaten auf Zeit in der Laufbahn der
Offiziere des Sanitätsdienstes
seit 10/ 2003 Studium der Humanmedizin am
Universitätsklinikum Hamburg- Eppendorf
08/ 2005 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
seit 04/ 2006 Wissenschaftliche Arbeit zur Biokompatibilität von
Knochenersatzmitteln und zur Osteoklastenbiologie *in*
vitro, Zentrum für Biomechanik und molekulare
Skelettbiologie, Universität Hamburg
seit 08/ 2008 Praktisches Jahr

Hamburg, 05.07.2009

Tobias Lange

10 Anlagen

Anlage 1

Lange T*, Schilling AF*, Peters F, Haag F, Morlock MM, Rueger JM, Amling M

(2009) Proinflammatory and Osteoclastogenic Effects of Beta-tricalciumphosphate and Hydroxyapatite Particles on Human Mononuclear Cells in vitro. *Biomaterials* 2009 [Epub ahead of print].

Anlage 2

Schilling AF*, Filke S*, Lange T, Gebauer M, Brink S, Baranowsky A, Zustin J, Amling M (2008) Gap junctional communication in human osteoclasts in vitro and in vivo. J Cell Mol Med 12: 2497- 504.

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

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, 05.07.2009

Tobias Lange