

Aus dem
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Institut für Osteologie und Biomechanik
Direktor: Professor Dr. med. Michael Amling, MBA

**Vergleichende quantitative Untersuchung der
Resorption von experimentellen und klinisch
verwendeten Knochenersatzmaterialien durch
humane Osteoklasten**

Dissertation

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

**Silja Brink
aus Hamburg**

Hamburg, 2012

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am: 12.12.2012

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg

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

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter: Prof. Dr. W. Rüter

I Inhaltsverzeichnis
III Verzeichnis der Abbildungen
III Verzeichnis der Tabellen
IV Verzeichnis der Abkürzungen

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG	1
1.1 Knochen.....	1
1.2 Knochenzellen	2
1.3 Knochendefekte	4
1.4 Defektheilung.....	5
1.5 Defektersatz.....	5
1.5.1 Knochentransplantation.....	6
1.5.2 Frakturstabilisation und Gelenkersatz	7
1.5.3 Knochenersatzmaterialien.....	9
2 FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG.....	11
3 MATERIAL UND METHODEN	12
3.1 Material.....	12
3.1.1 Geräte und Laborbedarf	12
3.1.2 Chemikalien	14
3.1.3 Medien, Lösungen und Puffer	14
3.1.4 Peripheres Blut.....	15
3.2 Methoden.....	15
3.2.1 Zuschneiden von Dentin und Biomaterialien	15
3.2.2 Isolierung hämatopoetischer Stammzellen.....	16
3.2.3 Kultivierung humaner Zellen.....	17
3.2.4 TRAP-Färbung und Zellzählung.....	18
3.2.5 Resorptionsnachweis auf Dentin	20
3.2.6 Resorptionsnachweis auf Biomaterialien.....	21

3.2.7 Resorptionsauswertung (Photoshop und Image Tool)	22
3.2.8 Sicherheit und Entsorgung	22
3.3 Statistik	22
4 RESULTATE	24
4.1 Biokompatibilität, Zelldifferenzierung, Zellmorphologie	24
4.1.1 Einfluss von Biomaterialien auf den pH-Wert des Mediums	24
4.1.2 Einfluss von Biomaterialien auf die Differenzierung	25
4.2 Resorption auf Dentin	30
4.3 Resorption auf Biomaterialien	32
4.3.1 Nicht auswertbare Biomaterialien	32
4.3.2 Auswertbare Biomaterialien	34
4.4 Relativer Resorptionskoeffizient	36
5 DISKUSSION	39
5.1 Biokompatibilität der Biomaterialien	40
5.2 Resorptionspotential der verwendeten Biomaterialien	40
5.3 Vergleich des relativen Resorptionskoeffizienten (RRC) der untersuchten Biomaterialien	43
5.4 Evaluierung des angewandten Modells	44
6 ZUSAMMENFASSUNG	46
7 LITERATURVERZEICHNIS	47
8 DANKSAGUNG	58
9 LEBENS LAUF	60
10 ANLAGEN	61
10.1 Publikationen	61
10.2 Preise	61
10.3 Eidesstattliche Versicherung	61

Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1: Knochenarchitektur und physikalische Beanspruchung: Transformationsgesetz von Wolff	2
Abb. 2: Schema eines aktiv resorbierenden Osteoklasten	1
Abb. 3: Die wichtigsten Entnahmestellen von Knochen für die autogene Transplantation.....	1
Abb. 4: Zellkultur Tag 0	1
Abb. 5: Zellkultur Tag 14	1
Abb. 6: Zellkultur Tag 28	1
Abb. 7: Resorption auf Dentinchips	1
Abb. 8: Resorption auf Biomaterialien	1
Abb. 9: pH-Wert-Schwankungen der Nährlösungen bei Zusatz von Biomaterialien Tag 0 bis Tag 28	1
Abb. 10: Zellmorphologie, lichtmikroskopisch ausgewertet an Tag 28	1
Abb. 11: Zellkultur Tag 0	1
Abb. 12: Zellkultur Tag 14	1
Abb. 13: Zellkultur Tag 28	1
Abb. 14: Resorption auf Dentinchips, prozentuale Resorptionsbestimmung	1
Abb. 15: Resorption auf Dentinchips, Tag 28, Lichtmikroskopie, Vergrößerung 1:20	1
Abb. 16: Oberfläche der Biomaterialien, deren resorbierte Fläche nicht eindeutig bestimmbar war.....	1
Abb. 17: Prozentuale Resorption auf Biomaterial.....	1
Abb. 18: Resorption auf Biomaterialien	1
Abb. 19: Resorption auf Dentin und auf Biomaterial im Vergleich.	1
Abb. 20: Relativer Resorptionskoeffizient (Resorption auf Dentin / Resorption auf Biomaterial) der 6 auswertbaren Biomaterialien.....	1

Verzeichnis der Tabellen

Tab. 1: Systematik der Knochenersatzmittel nach Rueger.....	9
Tab. 2: Übersicht über die in dieser Studie verwendeten Biomaterialien.....	13

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abb.	Abbildung
alpha-MEM	Alpha-modifiziertes minimal essentielles Medium
ASTM	American Society for Testing and Materials
BMP	bone morphogenetic proteins
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
Ca ²⁺	Calcium
CaCO ₃	Kalziumkarbonat
CaHPO ₄	Kalziumhydrogenphosphat
Ca ₃ (PO ₄) ₂	Trikalziumphosphat
Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	Calciumphosphat-Hydroxylapatit
CAP	Committee on accounting procedure
CD	cluster of differentiation
cm	Zentimeter
Dr.	Doktor
et al.	und andere
FBS	fetal bovin serum
g	Gramm
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
kg	Kilogramm
Kl.	Klasse
M- CSF	macrophage colony stimulating factor
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mm ²	Quadratmillimeter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Na ₂ HPO ₄	Natriumhydrogenkarbonat

- Verzeichnis der Abkürzungen -

NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
NfkappaB	nuclear factor kappa B
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OPG	Osteoprotegerin
p	p-Wert, Signifikanzniveau von 5%
PBS	phosphate buffered saline
pH	potentia hydrogenii
Prof.	Professor
RANKL	receptor activator for NfkappaB Ligand
RRC	relative resorbability coefficient
REM	Rasterelektronenmikroskop(ie)
S.	Seite
SD	Standartabweichung
s.u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
TRAP	tartrate resistant acid phosphatase
Tut hum	Tutogen human
Tut bov	Tutogen bovin
u.a.	unter anderem
UK	United Kingdom
USA	United States of America
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel

1 EINLEITUNG

1.1 Knochen

Das knöcherne Skelett dient als stützendes Gerüst des Körpers und als mechanischer Schutz für empfindliche Strukturen wie Gehirn und Rückenmark. Es umgibt lebenswichtige Organe im Thorax- und Beckenbereich wie ein schützender Panzer, dient als Ursprungs- und Ansatzort der Muskulatur und sorgt als größter Kalziumspeicher des Körpers für die Aufrechterhaltung des Kalziumhaushaltes (Geneser 1990; Soldner und Herr 2001). Knochen beherbergt das Knochenmark und ist unter physiologischen Bedingungen primärer Ort der Blutbildung (Cumano und Godin 2007).

Knochen ist ein Verbundgewebe und besteht aus einer Vielzahl untereinander netzartig verbundener Zellen, welche sich in einer Matrix befinden. Diese Matrix ist eine organische Zwischensubstanz und macht ca. 20% des Knochens aus. Sie beinhaltet das sogenannte Osteoid, z.B. Kollagen (Typ I), Osteonectin, Osteocalcin sowie Proteoglycane. 10% des Knochens bestehen aus Wasser, Zellen und Gefäßen. In der Matrix werden anorganische Mineralsalze abgelagert (Rössler und Rüther 1997). Diese machen etwa 70% des Knochens aus und setzen sich unter anderem aus Hydroxylapatit aber auch aus Magnesium-, Kalzium-, Natrium-, Karbonat- und Zitrationen zusammen. Auch dem menschlichen Knochengewebe eigentlich fremde Substanzen wie z.B. verschiedene Schwermetalle können sich hier eingelagert finden (Geneser 1990). Die mineralischen Anteile des Knochengewebes vermitteln die Druckstabilität, die organischen Anteile sind für die Biege- und Zugbelastbarkeit in großem Maße verantwortlich. Diese Zugbelastbarkeit bzw. Zugfestigkeit wird mit ca. 10 kg/mm² angegeben (Ralston 1997) und damit ist Knochen nach den Zähnen der festeste Baubestandteil des menschlichen Körpers. Die Festigkeit und Belastbarkeit des Knochens ergibt sich aus einem ständigen, aktiven, lebenslänglichen Wechsel aus Knochenbildung und -abbau, der als *Remodeling* bezeichnet wird (Ralston 1997). Die Knochenstruktur insgesamt formiert sich in Form und Masse so, dass sie am besten den einwirkenden Kräften entsprechen kann, was aus dem Transformationsgesetz von Wolff hervorgeht (Ruff et al. 2006) (Abb. 1).

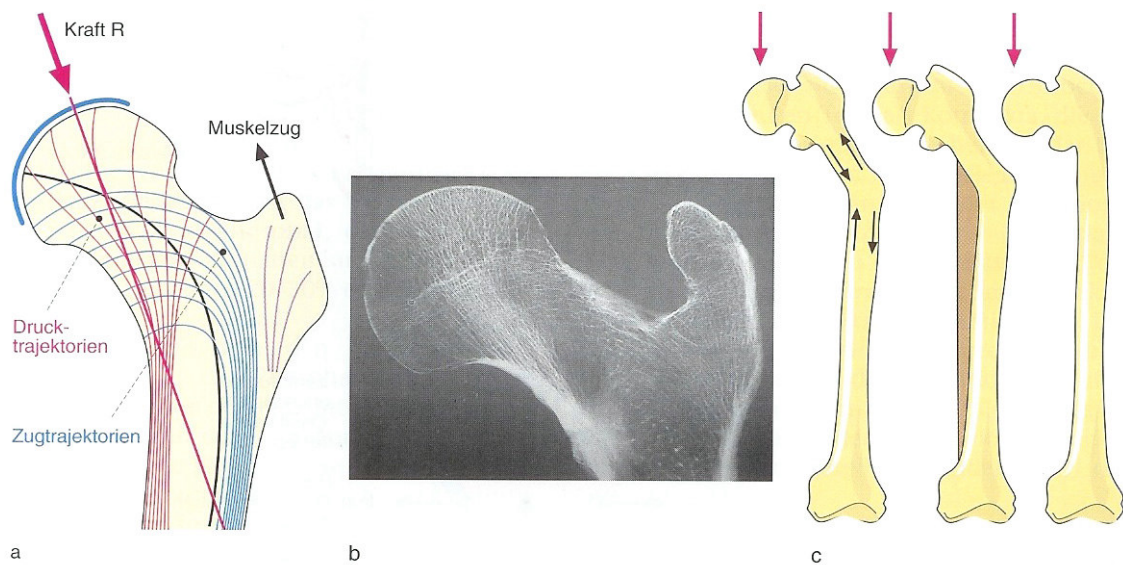


Abb. 1: Knochenarchitektur und physikalische Beanspruchung: Transformationsgesetz von Wolff (aus: Rössler / Rüter „Orthopädie“, S. 8)
a) Zug- und Drucktrajektorien am koxalen Femurende orientieren sich entsprechend der Zug- und Druckbeanspruchung.
b) Trajektorienstruktur im Röntgenbild eines proximalen Femurendes.
c) Vor allem im Kindesalter vermag der Knochen z.B. traumabedingte Fehlstellungen im Laufe der Zeit wieder auszugleichen.

Gerade dieser Wechsel aus Anbau und Abbau ermöglicht also durch angepasste Flexibilität eine optimale Anpassung an die vorliegenden Belastungsbedingungen und Umwelteinflüsse. Die Knochenstruktur kann durch das oben beschriebene *Remodeling* jederzeit verändert, also verstärkt oder vermindert und dadurch optimiert werden (Frost 1987).

1.2 Knochenzellen

Für das *Remodeling* sind verschiedene Zellen von Bedeutung (Teitelbaum 2000; Ross und Christiano 2006).

Osteoblasten sind knochenbildende Zellen (Aubin 2001). Sie bilden die noch unverkalkte Grund- oder Interzellulärsubstanz (Osteoid), welches hauptsächlich aus Kollagen Typ1 sowie Proteoglykanen und u. a. speziellen Glyko- und Phosphoproteinen sowie Wachstums- und Differenzierungsfaktoren besteht (Robey et al. 1993). Durch Ab- bzw. Anlagerung von Kalziumphosphaten (Kalzium-Hydroxylapatit) und in geringem Anteil auch Kalzium-Karbonat an diese organische Grundsubstanz setzt dann die rasche „Verkalkung“ des Osteoids ein, wodurch der Knochen erst seine charakteristischen Eigenschaften erhält (Mundy 1996; Schinke et al. 1999).

Osteozyten sind die eigentlichen Knochenzellen, die sich durch Einbettung in die neu entstehende Grundsubstanz aus den Osteoblasten entwickeln. Es wird diskutiert, ob auch sie gewisse Stoffwechselaktivitäten in Form von u.a. Resorption von Mineralien besitzen und an der Übertragung mechanischer Reize beteiligt sind (Hynes 1987; Ruoslahti und Pierschbacher 1987; Carter et al. 1998). Fehlen Osteozyten, so kann es zu Fehlern in der Balance zwischen An- und Abbau und damit auch dem *Remodeling* kommen (Tatsumi et al. 2007).

Osteoklasten sind knochenabbauenden Zellen. Sie sind in dieser Funktion einzigartig im menschlichen Körper (Baron 1995; Teitelbaum 2000). Es handelt sich hierbei um vielkernige Riesenzellen, entstanden durch Fusion von mononukleären CD 14 positiven Vorläuferzellen / hämatopoetischen Stammzellen (Walker 1993; David et al. 1998). Ihre Zellkernanzahl kann je nach Größe der Zelle stark variieren, ihr größter beschriebener Durchmesser beträgt über 100µm (Karsenty 1999; Shalhoub et al. 1999). Ähnlich wie Makrophagen, mit denen sie eng verwandt sind, können sie sich amöboid fortbewegen (Chambers und Horton 1984). Osteoklasten liegen gewöhnlich in so genannten Howship-Lakunen der Knochenoberfläche an. Howship-Lakunen entstehen dadurch, dass Osteoklasten proteolytische Enzyme abgeben, die dann die kollagene Knochenmatrix auflösen, wobei Kollagenfragmente phagozytiert werden (Linnemann et al. 2002). Die Howship-Lakunen bezeichnet man daher auch als „Fressspuren“ der Osteoklasten. Der Anteil der Zelloberfläche des aktiven Osteoklasten, der dem Knochen zugewandt ist, stellt sich zentral unregelmäßig und gestreift dar. Viele Einfaltungen und Ausstülpungen erinnern an einen Bürstensaum, daher der Name „*ruffled border*“. Hier kommt es zur Lyse der Knochensubstanz durch Sezernierung verschiedener Enzyme und Ionen. In der knochenzugewandten so genannten „*sealing zone*“, „Adhäsionszone“ lateral der „*ruffled border*“, besteht der engste Kontakt zur Knochensubstanz (0,3-0,5nm) (Schenk et al. 1967). Im Zytoplasma der Osteoklasten befinden sich viele Vakuolen, Golgi-Felder und Zentriolen sowie Mitochondrien und wenig endoplasmatisches Retikulum. In der so genannten „*clear zone*“, die weitgehend frei von Zellorganellen ist, befinden sich kontraktile Proteine (Abb. 2).

Osteoklasten könne durch bestimmte Faktoren angeregt werden, hier sind u.a. Dexamethason, Parathormon und Prostaglandin zu nennen (Tsukii et al. 1998). Jedoch kann die Funktion von Osteoklasten auch durch andere Faktoren

gehemmt werden, so z.B. Bisphosphonate, Calcitonin und Estrogene (Girasole et al. 1992; Bellido et al. 1995). Eine Aktivierung der Osteoklastendifferenzierung erfolgt ebenfalls über ein Zell-Oberflächenmolekül auf Osteoblasten, den *RANK-Ligand* (RANKL = receptor-activator for NfκappaB Ligand = Osteoprogesterin-Ligand) (Simonet et al. 1997; Bucay et al. 1998; Lacey et al. 1998; Yasuda et al. 1998; Kong et al. 1999)), während das Protein Osteoprotegerin (OPG) die Osteoklastendifferenzierung hemmt, indem es die *RANK*-Liganden bindet (Matsuzaki et al. 1998; Sabokbar et al. 1998; Soininvaara et al. 2002; Yamaguchi et al. 2005).

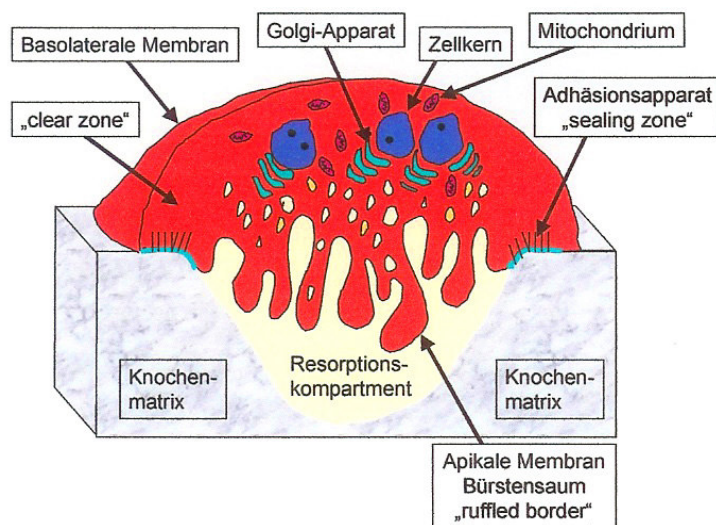


Abb. 2: Schema eines aktiv resorbierenden Osteoklasten. Wasserstoffionen und proteolytische Enzyme werden auf der knochenzugewandten Seite des Osteoklasten sezerniert. Das entstehende saure Milieu im Resorptionskompartiment führt zu einer Lösung der anorganischen Bestandteile des Knochens, so dass die freigelegten organischen Bestandteile von den Enzymen degradiert werden können.

Das Zusammenspiel von Osteoblasten und Osteoklasten muss balanciert werden. Es besteht nur bei ausgewogener Balance ein Gleichgewicht zwischen Knochenanbau und -abbau.

1.3 Knochendefekte

Gerät die Balance von An- und Abbau aus dem Gleichgewicht, kommt es zu Schäden bzw. Defekten in der Knochenstruktur. Diese können die Bildung von minderwertigem Knochengewebe, Substanzverlust aber auch überschüssige Gewebsbildung und / oder Funktionsverlust zur Folge haben (Burr 1993; Sano und Matsuo 2008). Die fehlende Balance kann vielerlei Gründe haben. Entzündungsreaktionen, endokrine Störungen, toxische Substanzen aber auch genetische Erkrankungen oder Tumore können hierbei eine Rolle spielen (Riggs und Melton 1986; Amling et al. 2006).

Ein Knochendefekt ist nicht immer nur Folge eines gestörten Verhältnisses von An- und Abbau. Wichtige Faktoren für resultierende Knochendefekte sind

Traumen bzw. Verletzungen und posttraumatische Störungen (Rössler und Rüter 1997). Allerdings ist es dem Körper in vielen Fällen von Frakturschäden möglich, diese durch genaue Regeneration auszugleichen.

1.4 Defektheilung

Knochendefekte können funktionserhaltend vollständig ausheilen („*restitio ad integrum*“) (Fernandez-Tresguerres-Hernandez-Gil et al. 2006) und durch die Osteoblasten – Osteoklasten – Interaktion ausgeglichen werden. Viele andere Gewebearten zeigen auch eine Fähigkeit zur Selbstheilung, jedoch ist diese oft mit Narbenbildung oder dem Verlust der ursprünglichen Funktion verbunden. Im Falle traumatischer Verletzungen bzw. Frakturen unterscheidet man primäre von sekundärer Frakturheilung.

Die direkte primäre Frakturheilung ist gekennzeichnet durch direkte Einsprossung von Blutgefäßen und Osteonwachstum, also durch knöcherne Defektüberbrückung an stabil aufeinander stehenden Bruchflächen und einem sehr engen Frakturspalt bei guter Vaskularisation (Schenk und Willenegger 1963; Schenk und Willenegger 1977).

Die spontane sekundäre Frakturheilung geht mit Kallusbildung zur Stabilisierung des Bruches einher und verläuft über mehrere Stadien. Oftmals wird diese überschüssige Knochenbildung, der Kallus, Monate bis Jahre nach dem Ereignis durch die balancierte Arbeit von Osteoblasten und –klasten abgebaut. Der Knochen erhält wieder seine ursprüngliche Form (Willenegger et al. 1971; Bolander 1992; Andrew et al. 1993).

1.5 Defektersatz

In manchen Fällen ist nicht zu erwarten, dass eine ausreichende Eigenregeneration des Knochengewebes gewährleistet ist. Beispiele hierfür sind u.a. bestehende Stoffwechselkrankheiten wie z.B. Osteoporose, genetische Erkrankungen oder große Defekte, die die Heilung derselben unzureichend oder langwierig erscheinen lassen.

1.5.1 Knochentransplantation

In diesen Fällen besteht u.a. die Möglichkeit, Knochengewebe zu transplantieren (Sen und Miclau 2007; Onoda et al. 2011). Ein bestehender Defekt kann hierdurch überbrückt oder ausgefüllt werden. Das Transplantat dient hier u.a. als eine Art „Leitschiene“, denn an dieses kann sich neu gebildetes Knochengewebe anlagern. Dies bezeichnet man als Osteokonduktion (Urist et al. 1977; Reddi et al. 1987; Fleming et al. 2000). Zusätzlich kann das Transplantat allmählich durch das Zusammenspiel von Osteoklasten und -blasten und damit von Ab- und Anbau durch neues Gewebe ersetzt werden. Einige Transplantate sind in der Lage, bestimmte Faktoren, so genannte *bone morphogenetic proteins* (BMP) (Gierse und Donath 1999; Ducky und Karsenty 2000; Chen et al. 2004) freizusetzen, die ortständige Mesenchymzellen zur Differenzierung zu Osteoblasten anregen können. Man bezeichnet dies als Osteoinduktion (Reddi et al. 1987; Fleming et al. 2000). BMPs sind Bestandteil der Knochenmatrix, ihre osteoinduktive Wirkung wurde experimentell mehrfach in Gewebe nachgewiesen, welches die Fähigkeit zum eigenständigen Zellersatz nicht besitzt, wie beispielsweise Muskelgewebe (Aldinger et al. 1996; Reddi 1998).

Ein Knochentransplantat kann seinen Ursprung entweder *autolog* (vom Patienten selber), *syngen* (von einem genetisch identischen Menschen, z.B. eineiiger Zwillings), *allogen* (von einem anderen Menschen) oder *xenogen* (von einer anderen Spezies, z.B. einem Schwein) nehmen. Mögliche Knochengewebstransplantate sind Spongiosa, Kortikalis mit oder ohne Gefäßanschluß, osteochondrale Transplantate aber auch Knochenmark. Die Haupt-Entnahmestellen autologen Knochens sind in Abb. 3 abgebildet.

All diese Transplantat-Arten haben ihre Vor- und Nachteile. Spongiöser Knochen hat eine große Oberfläche, an die sich gut neuer Knochen anlagern kann. Er besitzt also gute osteokonduktive Eigenschaften. Allerdings ist er durch seine Porosität weniger schnell belastbar. Kortikaler Knochen hat zwar eine geringere Oberfläche als spongiöser, was das Einwachsen verzögert, ist aber sehr stabil. Auch setzt er viele BMPs frei und besitzt damit eine gute osteoinduktive Potenz (Goldberg 2000).

Autologe Transplantate haben den Vorteil, als körpereigene Substanz keine Abwehr- oder Abstoßungsreaktion hervorzurufen und sowohl gute osteokonduktive als auch osteoinduktive Eigenschaften zu besitzen (Kobbe et al.

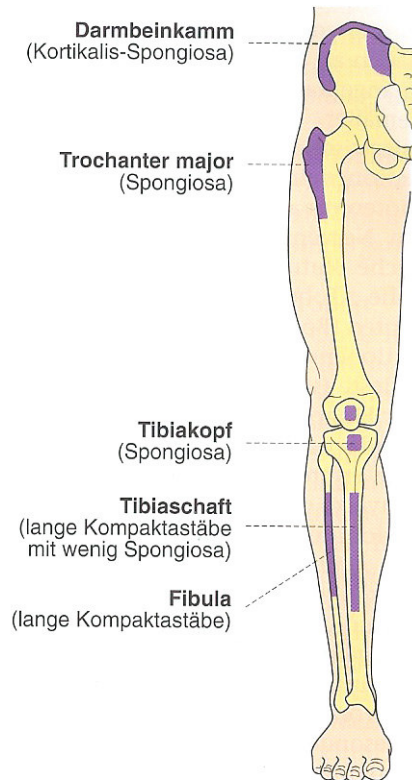


Abb. 3: Die wichtigsten Entnahmestellen von Knochen für die autogene Transplantation (aus: Rössler / Rüter „Orthopädie“)

2008). Diese Art von Transplantat muss nicht erst durch eigenes Knochengewebe ersetzt werden, sondern kann an Ort und Stelle verbleiben. Es wird zusätzlich noch von außen durch Knochenanbau stabilisiert und ist gut vaskularisiert. Nachteile sind die limitierte Verfügbarkeit des Knochengewebes und der invasive Eingriff an zwei Stellen des Körpers (Kobbe et al. 2008). Die intra- und postoperativen Risiken, wie z.B. starke Schmerzen, Blutungen, Nerven- und Gewebeschäden, Thrombosen und Infektionen sind hierbei doppelt gegeben (Burchardt 1983; Kurz et al. 1989). Ist die Entnahme von *autologem* Knochen nicht möglich, z.B. aufgrund erhöhter Blutungsgefahr oder vorbestehenden Erkrankungen (Ehrler und Vaccaro 2000) können *syngene* oder *allogene* Transplantate verwendet werden. Sie sind den *autologen* jedoch klar unterlegen. Möglich ist hier z.B. eine

Abstoßungsreaktion gegen das Fremdmaterial (Goker et al. 2001). Auch die Gefahr der Übertragung von Krankheiten wie HIV oder Hepatitis ist zu berücksichtigen (Knaepler et al. 1992; Tomford 1995). Die Transplantate werden zuvor meist kältebehandelt oder hitzesterilisiert (Knaepler et al. 1992), was einen Blut- und Zellverlust des Transplantats bedeutet, eine osteoinduktive Wirkung kann gänzlich fehlen (Rössler und Rüter 1997; Herr und Schmid 2001).

1.5.2 Frakturstabilisation und Gelenkersatz

In vielen Fällen liegt ein Defekt vor, bei dem Knochen transplantation nicht sinnvoll oder möglich ist, z.B. weil der Defekt zu groß ist. Hier kann eine Stabilisation von

innen oder außen in Form von Platten, Nägeln, Schrauben Drähten oder auch ein Gelenk- oder Teilgelenkersatz nötig sein.

Das Angebot an Materialien zu diesen Zwecken ist vielfältig. Verwendet werden unter anderem Metalle und Metall-Legierungen z.B. aus Chrom, Nickel, Stahl oder Titan, Polyäthylen-Produkte, Keramiken basierend auf Aluminium oder Zirkonium und Zemente auf Harzbasis (Fournier 1995; Rössler und Rütter 1997; Bauer und Muschler 2000; Marti 2000; Prymak et al. 2005; Bauer 2007; Grupp et al. 2010).

Nach Einbringen von frakturstabilisierenden oder gelenkersetzenden Materialien kann es zu Problemen kommen. Der Prozess des Knochenremodelings kann durch Material- und Abriebpartikel (DeHeer et al. 2001; Sommer et al. 2005) der eingebrachten Materialien zu vermehrter Aktivierung von Osteoklasten führen, um diese Partikel zu beseitigen. Dies hat u.a. Materiallockerungen (Ruff et al. 2006) aber auch periprothetische Frakturen zur Folge. Es konnte zwar in verschiedenen klinischen Studien gezeigt werden, dass es möglich ist, die Osteoklastenaktivität mit den oben beschriebenen Komplikationen durch die Gabe von z.B. Bisphosphonaten zu reduzieren (Sabokbar et al. 1998; Soininvaara et al. 2002; Yamaguchi et al. 2005). Jedoch wird durch Gabe dieser Substanz nicht nur an der einen gewünschten Stelle die Aktivität gesenkt, sondern im gesamten Organismus, was auf längere Sicht auch an anderer Stelle zu unerwünschten Nebenwirkungen führen kann (Markiewicz et al. 2005).

Durch die Möglichkeiten der Materiallockerung, der Einnahme von Medikamenten aber auch aufgrund eines oft nötigen zweiten, invasiven und risikobehafteten Eingriff zur Materialentfernung haben Frakturstabilisierung und Gelenkersatz negative Seiten.

Wie oben beschrieben gibt es auch in der Knochentransplantation viele Aspekte, die diese Art der Defektdeckung als nachteilig erscheinen lassen.

Aus diesem Grund wurde in der Vergangenheit viel an der Entwicklung und Verbesserung von Materialien geforscht, die die Knochentransplantation wenn nötig ersetzen können bzw. Materiallockerungen und zweite Eingriffe verhindern sollen. Diese Materialien werden unter dem Begriff Knochenersatzmaterialien zusammengefasst (Rueger 1996; Rueger 1998).

1.5.3 Knochenersatzmaterialien

Knochenersatzmaterialien sind synthetische, anorganische oder biologische, organische Verbindungen. Sie können bei der Behandlung eines Knochendefektes anstelle des *autologen* oder *allogenen* Knochens und zusätzlich bei Fraktur stabilisation oder Gelenkersatz implantiert werden.

Die anfänglichen Ziele der Entwicklung von Knochenersatzmaterialien waren, die Immunantwort auf diese so gering wie möglich zu halten und ihre Zusammensetzung der des Knochens auf die stabilste Art so weit wie möglich anzugleichen. Heutzutage haben sich die Ziele verändert und erweitert. Knochenersatzmaterialien sollen zusätzlich aktiv am Knochenstoffwechsel teilnehmen und Einfluss auf die osteoblastäre und -klastäre Aktivität nehmen (Rueger 1998; Dorozhkin und Epple 2002). Sie sollten in der Lage sein, wie körpereigenes Knochengewebe resorbiert und verändert zu werden.

Hauptbestandteile der Biomaterialien sind in verschiedenen Konzentrationen unter anderem Alpha- und Beta-Tri-Kalziumphosphat ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), Kalziumhydrogenphosphat (CaHPO_4), Kalziumkarbonat (CaCO_3), Di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4), präzipitiertes und nicht-präzipitiertes Hydroxylapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) aber auch Kollagen. Knochenersatzmaterialien unterscheiden sich demnach in ihrer Zusammensetzung stark, während die Zusammensetzung von Knochen im Normalfall annähernd gleich ist (Kapitel 1.1). Entsprechend kann erwartet werden, dass der Einfluß von Knochenersatzmaterialien z.B. auf die Zellentwicklung und damit das *Remodeling* wahrscheinlich ein anderer ist als der von humanem Knochen.

Ein umfassender Versuch, Knochenersatzmittel zu klassifizieren, wurde 1992 durch die Arbeitsgruppe um Prof. Rueger, Hamburg unternommen. Diese Klassifizierung beinhaltet u.a. die biologische Wirksamkeit, die Herkunft der Verbindungen, die chemische Zusammensetzung und die Eingruppierung in Einzelsubstanzen und Substanzkombinationen (Soost et al. 2001) (Tab. 1). Einfacher ist die Unterscheidung anhand der Biokompatibilität. Biokompatibilität bedeutet Gewebeverträglichkeit und bezieht Toxizität, Oberflächenbeschaffenheit, Ausführung und Zusammensetzung von Materialien mit ein. Die Biomaterialien kann man hierbei unterschiedlich bezeichnen. Inkompatibel bedeutet, dass durch das Biomaterial Substanzen in toxischen Konzentrationen freigesetzt werden. Ist das Material biokompatibel, liegen die Konzentrationen

freigesetzter Substanzen unterhalb der toxischen Grenzen. Bioinertes Material setzt keine toxischen Substanzen frei und verbleibt meist unverändert an Ort und Stelle. Bioaktive Materialien interagieren mit Gewebedifferenzierung bzw. Knochenbildung und werden resorbiert sowie ersetzt. Osteoinduktion und Osteokonduktion wurden

Knochenersatzmittel (nach Rueger 1992)

1. Organische, biologische Knochenersatzmaterialien
 - a) Kollagen
 - b) Hochgereinigte Knochenmatrix-Extrakte
 - c) Knochenmatrix
 - d) Korallen (enteiweißtes Skelett)
2. Composites
 - a) Kollagen mit Kalzium-Phosphat-Keramiken
 - b) Demineralisierte Knochenmatrix als Composite
 - c) Hochgereinigte Knochenmatrix als Composite
 - d) Andere, seltene
3. Anorganische, synthetische Knochenersatzmaterialien
 - a) Kalzium-Phosphat-Keramik
 - b) Biogläser
 - c) Glaskeramiken
 - d) Korallen (hydrothermisch umgewandelt)

bereits in Kapitel 1.5.1 definiert.

Es existieren viele Studien und besonders auch Tier-Experimente, die sich mit der Resorption von Biomaterialien und der Osteoklastenfunktion beschäftigen (Jones et al. 1984; Lambrecht 1990; Gomi et al. 1993; Muller-Mai et al. 1995; Yamada et al. 1997; Matsuoka et al. 1998; Benghuzzi et al. 1999; Leeuwenburgh et al.

Tab. 1: Systematik der Knochenersatzmittel nach Rueger (nach: Frank Soost: Validierung des Knochenumbaus von Knochenersatzmaterialien in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie 2001)

2001; Monchau et al. 2002; Taylor et al. 2002; Schilling et al. 2004). Diese Studien dokumentieren meist die qualitative osteoklastäre Funktion. Nachgewiesen wurden hier unter anderem in Maus- und Rattenmodellen aber auch im Modell mit humanen Osteoklasten die Resorbierbarkeit von Tri-Kalzium-Phosphat, Kalzium-Karbonat oder auch Hydroxylapatit (Jones et al. 1984; Lambrecht 1990; Gomi et al. 1993; Muller-Mai et al. 1995; Yamada et al. 1997; Matsuoka et al. 1998; Benghuzzi et al. 1999; Leeuwenburgh et al. 2001; Monchau et al. 2002; Taylor et al. 2002; Schilling et al. 2004). Bisher wurde jedoch noch keine Studie veröffentlicht, in der Biomaterialien einzeln auf ihre Resorbierbarkeit hin untersucht wurden, um danach miteinander vergleichbar gemacht zu werden. Die in dieser Studie zu diesem Zweck untersuchten Biomaterialien sind im Kapitel 3 in Tab. 2 zusammengefasst.

2 FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG

Ziel dieser Arbeit war es, die Resorbierbarkeit verschiedener experimenteller und klinisch verwendeter Biomaterialien durch humane Osteoklasten zu untersuchen. Zu diesem Zweck sollten humane Osteoklasten für den Zeitraum von 4 Wochen auf den jeweiligen Materialien und auf Dentin als Kontrollsubstanz kultiviert werden. Dafür sollte nach Abschluss dieser Versuche die Oberfläche der Biomaterialien rasterelektronenmikroskopisch und die von Dentin lichtmikroskopisch auf Resorption untersucht und der Relative Resorptionskoeffizient (*relative resorbability coefficient* = RRC) bestimmt werden, der das Verhältnis von Resorption auf Biomaterial zu dem auf Knochen / Dentin quantifiziert (Schilling et al. 2004). Zusätzlich sollte der Effekt der Biomaterialien auf die Zellvariabilität, Differenzierung und Fusion mononukleärer Vorläuferzellen zu Osteoklasten untersucht werden.

Insbesondere sollten hierfür folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

- a) Ist das Biomaterial zellkompatibel oder kommt es zu einem Effekt auf die Osteoklastenvorläuferzellen, der die Zelldifferenzierung und die Fusion zu Osteoklasten stört?
- b) Bilden sich in den Kulturen mit den jeweils zugesetzten Biomaterialien resorbierende Osteoklasten aus?
- c) Wird das betreffende Knochenersatzmaterial resorbiert?
- d) Wie hoch ist der RRC für das jeweilige Biomaterial?
- e) Gibt es Unterschiede im RRC zwischen den verschiedenen Biomaterialien?

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Geräte und Laborbedarf

Auflichtmikroskop:	Axiovert 25, Zeiss (Jena)
Autoklav:	5050 ELC, Tuttnauer Systec GmbH (Wettenberg)
Brutschrank:	BBD 6220, Heraeus (Hanau)
Durchlichtmikroskop:	Axioskop II, Zeiss (Jena)
Elektrische Pipettierhilfe:	Pipetboy acu, Integra Biosciences GmbH (Fernwald)
Gefrierschränke:	öko super, Liebherr (Biberach an der Riß) comfort, Liebherr (Biberach an der Riß)
Gefriertruhe:	premium, Liebherr (Biberach an der Riß) GFL 6648, GFL (Burgwedel)
Kamera für Zellfotos:	Digitale Spiegelreflexkamera EOS 10D, Canon
Kühlschrank:	profi line, Liebherr (Biberach an der Riß)
Laborrührer:	Heidolph (Schwabach)
pH-Meßgerät:	pH-Meter MP 220, Mettler Toledo (Schwerzenbach, Schweiz)
Rasterelektronen- mikroskop:	Leo 435 VP, Leo Elektronenmikroskopie GmbH (Oberkochen)
Säge:	Isomet low speed saw, Buehler (Lake Bluff, USA)
Schleifmaschine:	Grinder / Polisher Phoenix Alpha, Buehler (Lake Bluff, USA)
Sicherheitswerkbank Kl.2:	BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH (Sonnenbühl-Gerkingen)
Überkopf-Schüttler:	Bibby Sterilin LTD (Staffordshire, UK)
Zentrifuge:	Megafuge 1.0 R, Heraeus (Hanau)

Artikel für Zellkultur stammten von den Firmen Nunc (Wiesbaden), Falcon (Becton-Dickinson, New Jersey, USA), Cellstar / Greiner Bio-one (Frickenhausen), Costar / Corning Inc. (New York, USA).

Zum Aufbringen der Biomaterialien zur Untersuchung unter dem Rasterelektronenmikroskop wurden 0,5 Zoll Aluminium Specimen Stubs der Firma Agar Scientific (Stansted, Essex, UK) sowie 12 mm leitfähige Kohlenstoffhaftaufkleber der Planto GmbH (Las Vegas, USA) verwendet.

Die Beschichtung mit Goldpartikeln der Biomaterialien und Alu-Stubs erfolgte via Ionisation / sputter coating durch das Gerät Cressington 108 auto (Watford, UK).

Das notwendige Dentin wurde uns freundlicherweise vom Bundesamt für Naturschutz zur Verfügung gestellt.

Verwendete Knochenersatzmaterialien:

Name	Firma	Zusammensetzung	Ursprüngliche Form
<i>Gemischte Materialien</i>			
Biobon	Biomet Merck (Berlin-Zehlendorf)	Hydroxylapatit-Zement aus Tri-Kalzium-Phosphat und Di-Kalzium-Phosphat-Dihydrat	Puder und Flüssigkeit
Calcibon	Biomet Merck (Berlin-Zehlendorf)	Alpha-Tri-Kalzium-Phosphat Kalzium-Hydrogen-Phosphat Kalzium-Karbonat Präzipitiertes Hydroxylapatit Di-Natrium-Hydrogen-Phosphat	Puder und Flüssigkeit
Calciorsorb	Ceraver Osteal (Roissy, Frankreich)	Beta-Tri-Kalzium-Phosphat > 96% Hydroxylapatit < 4 %	Gepresste Rolle
Cerapatite	Ceraver Osteal (Roissy, Frankreich)	Beta-Tri-Kalzium-Phosphat < 5 % Hydroxylapatit > 95 %	Gepresster Block
Lactorsorb	Lorenz Surgical, Biomet Company (Indiana, USA)	L-Lactic-Acid 82% Glycolic Acid 18%	Fertige Schrauben
Perossal	aap Implantate AG (Berlin)	Nanokristallines Hydroxylapatit 51,5% Kalziumsulfat 48,5%	Gepresste Blöcke
<i>Reine Materialien</i>			
Cerasorb	Curasan AG (Kleinostheim)	Phasenreines Beta-Tri-Kalzium-Phosphat	Gepresste Plättchen
Cersorb M	Curasan AG (Kleinostheim)	Phasenreines Beta-Tri-Kalzium-Phosphat	Gepresste Plättchen
Chronos	Synthes (Oberdorf, Schweiz)	Phasenreines Beta-Tri-Kalzium-Phosphat	Puder und Flüssigkeit
<i>Steriler Knochen</i>			
Tutogen bovin	Tutogen Medical GmbH (Neunkirchen am Brand)	Steriler, boviner Knochen	Knochen-Querschnitt
Tutogen human	Tutogen Medical GmbH (Neunkirchen am Brand)	Steriler, humaner Knochen	Knochen-Querschnitt

Tab. 2: Übersicht über die in dieser Studie verwendeten Biomaterialien.

3.1.2 Chemikalien

Laborchemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt) und Sigma (Deisenhofen) bezogen.

Ficoll-Paque wurde von Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden) geliefert.

Alpha-modifiziertes minimal essentielles Medium (alpha-MEM) wurde bei Sigma (Deisenhofen) erworben.

Fötales Kälberserum (Fetal Bovin Serum: (FBS)) wurde bei Cambrex bestellt.

Die verwendete phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline (PBS)) sowie die Penicillin-Streptomycin-Lösung waren von GIBCO BRL, Life Technologies Inc. (Rockville, MD, USA).

Rekombinanter humaner löslicher Rezeptor-Aktivator für NFkappaB Ligand (RANKL) und rekombinanter humaner Makrophagenkolonie stimulierender Faktor (M-CSF) kamen von Peprotech Ltd. (London, UK).

3.1.3 Medien, Lösungen und Puffer

Das Wasser für das Ansetzen sämtlicher Medien, Lösungen und Puffer stammte von einer Milli-Q-Filtrationsanlage (Millipore, Schwalbach). Das aus diesem System produzierte Reinstwasser erfüllt alle Forderungen an Laborwasser Typ 1 nach den Normen der ASTM, CAP und NCCLS.

Die angesetzten Lösungen, Medien und Puffer wurden vor Gebrauch sterilfiltriert.

Wenn diese Methode nicht anwendbar war, (z.B. bei hitzesensiblen oder leicht schäumenden Stoffen), wurde die Lösung mit sterilem Wasser unter sterilen Bedingungen angesetzt.

Medium für Osteoklastenkultur

1000 ml alpha minimal essentielles Medium

2,2 g Natriumbikarbonat

10 % FBS

1 % Penicillin/Streptomycin

pH 6,9

Fixierlösung

3.7 % Formalin in PBS

TRAP-Puffer

40 mM Na-Acetat (pH 5)

10 mM Na-Tartrat

TRAP-Färbelösung

5 mg Naphtol AS-MX Phosphat

500 µl N-N-Dimethylformamid

50 ml TRAP-Puffer

30 mg Fast Red Violett LB Salt

Dentin-Färbelösung

1% Touluidin-Blau

3.1.4 Peripheres Blut

Das periphere Blut zur Isolation von Vorläuferzellen wurde freundlicherweise in Form von *Buffy-Coats* durch den Blutspendedienst des Universitätsklinikums Eppendorf von Prof. Dr. P. Kühnl zur Verfügung gestellt. Ein *Buffy-Coat* ist ein Lymphozytenkonzentrat, das man nach dem Abzentrifugieren von Vollblut erhält. Aus dem Lymphozytenkonzentrat lassen sich mittels Dichtegradienten-Zentrifugation durch das Reagenz Ficoll-Paque die mononukleären Zellen des peripheren Blutes isolieren.

3.2 Methoden

3.2.1 Zuschneiden von Dentin und Biomaterialien

Die Dentin-Blöcke wurden mit einer oszillierenden Säge vom Typ Isomet low speed saw der Firma Buehler in 5x3x1 mm große Chips zurechtgeschnitten.

Die Biomaterialien Tutogen bovin und Tutogen human der Tutogen Medical GmbH sowie Cerapatite der Firma Ceraver Osteal wurden ebenfalls wie oben beschrieben zugeschnitten.

Die Biomaterialien Biobon, Calcibon und Chronos wurden nach mitgelieferter Anleitung aus einer Flüssigkeit sowie einem Pulver angemischt, auf einer sterilen Glasplatte verteilt und nach dem Trocknen mit Einweg-Skalpellen in eine den 24-Well-Plates angemessene Form gebracht.

Calciresorb der Firma Ceraver Osteal, welches als ca. 5 mm dicke und 1 cm lange Rolle vorlag, Perossal der aap Implantate AG, das als 5x5 mm Blöcke geliefert wurde und Lactosorb der Firma Lorenz Surgical, Biomet Company, ursprünglich in Form von 20x17 mm Schrauben wurden alle ebenfalls mit Einweg-Skalpellen in 2 mm dicke Scheiben geschnitten.

Cerasorb und Cerasorb M der Curasan AG lagen bereits in passender, runder Form als 5x5x2 mm Plättchen vor.

3.2.2 Isolierung hämatopoetischer Stammzellen

Um osteoklastäre Funktion und Resorbierbarkeit von Knochenersatzmaterialien überhaupt untersuchen zu können, muss es möglich sein, Osteoklasten *in vitro* auf diesen und auf Knochen anzuzüchten.

In einem 2002 entwickelten *in vitro* Modell der Osteoklastendifferenzierung aus humanen Blutstammzellen konnte gezeigt werden, dass die Differenzierung zu funktionellen Osteoklasten ablaufen kann, unabhängig von der Anwesenheit von Osteoblasten (Schilling et al. 2004). Um dies zu erreichen, wurde humanes periphervenöses Blut zur Isolierung hämatopoetischer Stammzellen verwendet, welches freundlicherweise in Form von 50 ml *Buffy-Coats* durch den Blutspendedienst des Universitätsklinikums Eppendorf von Prof. Dr. P. Kühnl zur Verfügung gestellt wurde. Es wurde die Tatsache ausgenutzt, dass die mononukleäre Zellfraktion, die auch die Osteoklastenvorläufer enthält, eine geringere Dichte hat als Erythrozyten, Thrombozyten und reife Granulozyten, so dass es möglich ist, über einen Dichte-Gradienten diese Zellfraktionen zu trennen. Zur Auftrennung diente dabei Ficoll-Paque, das mit seiner Dichte von $1,0647 \pm 0,001$ g/ml unterhalb der Dichte der mononukleären Zellen, aber oberhalb der Dichte der aus dem Versuchsansatz zu entfernenden Zellen liegt. So gelingt eine Trennung in drei Phasen, wobei die Ficoll-Paque-Phase zwischen mononukleärer Zellfraktion und unerwünschten Zellen liegt. 50 ml Knochenmark / Blut wurden mit PBS auf 200 ml verdünnt und in 4x50 ml Plastikröhrchen überführt. 8x50 ml

Plastikröhrchen wurden mit je 25 ml Ficoll-Paque gefüllt. Die 200 ml mit PBS verdünntes Knochenmark/Blut wurden vorsichtig auf das Ficoll-Paque geschichtet, so dass sich zwei getrennte Phasen ergaben. Die Plastikröhrchen mit dem zweiphasigen Gemisch wurden mit 350xg bei einer Temperatur von 20° C 30 Minuten lang zentrifugiert. Dadurch wurde die Einstellung eines Dichtegradienten erreicht, bei dem sich die mononukleären hämatopoetischen Vorläuferzellen auf der Grenze zwischen Ficoll-Phase und PBS-Phase befanden. Die Zentrifuge lief danach ohne Bremse aus, um die Phasen nicht durch die Bremsbeschleunigung wieder zu vermischen. Die hämatopoetischen Vorläuferzellen wurden vorsichtig aus je zwei Plastikröhrchen in ein neues überführt, so dass sich 4 Plastikröhrchen mit ca. 30-40 ml mononukleärer Zellen ergaben. Diese wurden ad 50 ml mit PBS aufgefüllt und mit 350xg bei 20° C 10 Minuten lang zentrifugiert. In allen weiteren Zentrifugationsschritten war die Bremse wieder aktiviert. Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen. Zur Reinigung der Zellen von Rückständen von Ficoll-Paque wurden die Zellpellets aus den 4 Plastikröhrchen in ein neues überführt. Nach Auffüllen ad 50 ml mit PBS wurde mit 350xg bei 20° C 10 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen und die Zellen im Pellet in 1-5 ml PBS resuspendiert. 10 µl dieser Zelllösung wurden mit 990 µl Essigsäure verdünnt, welche ein Platzen der Erythrozyten bewirkte, um in einer Neubauer-Zählkammer die Fraktion vitaler Vorläuferzellen zu bestimmen.

3.2.3 Kultivierung humaner Zellen

Die mononukleäre Zellfraktion aus humanem peripherem Blut wurde für die Zellkultur in einer Konzentration von 10^7 Zellen/ml verwendet (Schilling et al. 2004). Für die Differenzierung zu Osteoklasten sind RANK-L (*receptor-activator for NfκappaB Ligand*, auch bezeichnet als Osteoprogesterin-Ligand) und MCS-F (*macrophage-colony-stimulating factor*) (Simonet et al. 1997; Bucay et al. 1998; Lacey et al. 1998; Yasuda et al. 1998; Kong et al. 1999) nötig. RANK-L ist ein Zell-Oberflächen-Molekül auf Osteoblasten und MCS-F ein Aktivator hämatopoetischer Vorläuferzellen. Die Vorläuferzellen wurden daher für 28 Tage in Osteoklastenkulturmedium alpha-MEM unter Anwesenheit von 40 ng/ml RANKL und 25 ng/ml M-CSF kultiviert. Die Hälfte des Mediums wurde jeden zweiten Tag gewechselt. Die Kultur erfolgte für die TRAP-Färbung auf Plastikzellkulturschalen

(24-well-plates), für die Untersuchung der Resorptionskapazität erfolgte sie auf Dentin, welches sich ebenfalls in den Plastikzellkulturschalen befand. Die Zellen wurden lichtmikroskopisch an Tag 0 (Abb. 4) und Tag 14 (Abb. 5) fotografiert. Nach 28 Tagen wurden die Kulturen auf den Plastikzellkulturschalen nach Entfernung der nicht adhärenen Zellen fixiert und gefärbt, anschließend lichtmikroskopisch fotografiert (Abb. 6). Das Dentin wurde für die Untersuchung der Resorptionskapazität nach der gleichen Zeit mit Touluidin-Blau-Lösung gefärbt und anschließend lichtmikroskopisch fotografiert.

3.2.4 TRAP-Färbung und Zellzählung

Die TRAP-Färbung erfolgte in humanen Kulturen nach 28 Tagen. Nach Absaugen des Mediums wurden die auf Plastikzellkulturschalen kultivierten Zellen nach Entfernung nichtadhärenter Zellen durch Waschen in PBS-Lösung für 5 Minuten in 3,7% gepuffertem Formaldehyd fixiert. Danach wurde das Formaldehyd wieder abgenommen und die Zellen trockneten für 2 Minuten an der Luft. Zur Färbung wurde für 10 Minuten TRAP-Färbelösung auf die Kulturen gegeben. Das Ergebnis wurde unter Ausnutzung der Eigenfluoreszenz der Färbung im Auflichtmikroskop Axiovert 25 von der Firma Zeiss (Jena) mit einer digitalen Spiegelreflexkamera EOS 10D der Firma Canon fotografiert (Abb. 6). Die Zahl der multinukleären TRAP-positiven Zellen wurde anschließend anhand der Fotografien gezählt. Dabei wurden Zellen mit drei und mehr Zellkernen und gleichzeitiger positiver TRAP-Färbung als Osteoklasten gewertet.

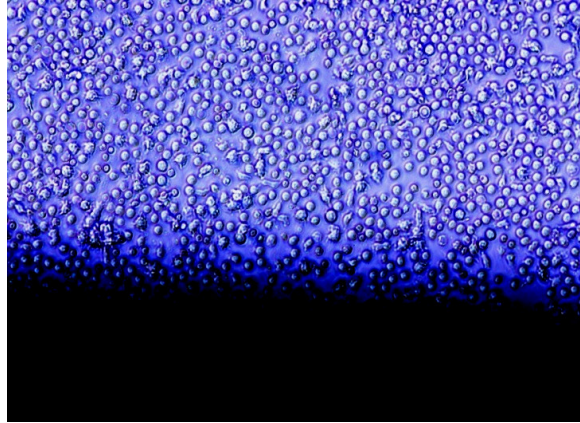


Abb. 4: Zellkultur Tag 0
Lichtmikroskopie, Vergrößerung 1:20.

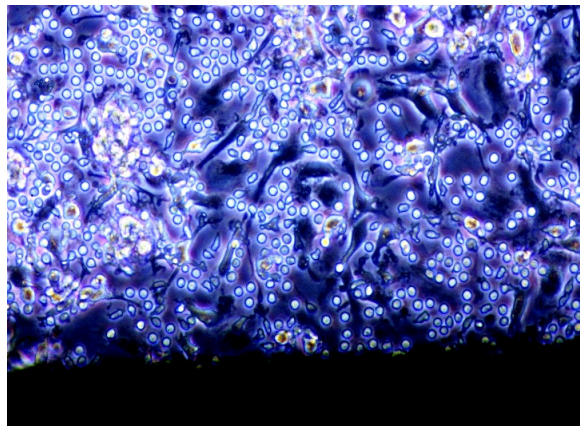


Abb. 5: Zellkultur Tag 14
Lichtmikroskopie, Vergrößerung 1:20.

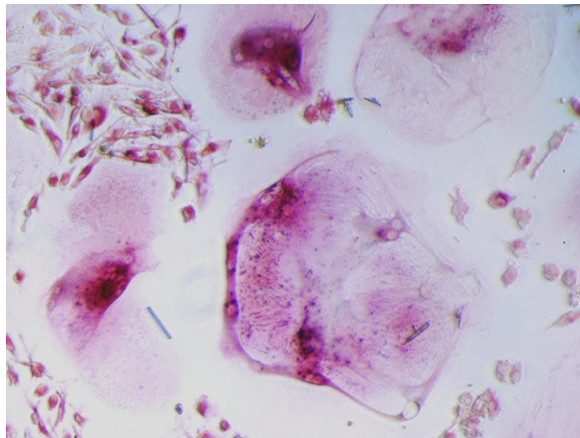


Abb. 6: Zellkultur Tag 28
Formalin-Fixierung, TRAP-Färbung, Lichtmikroskopie, Vergrößerung 1:20.

3.2.5 Resorptionsnachweis auf Dentin

Zum Nachweis der Resorptionsfähigkeit der Zellen blieben die isolierten humanen Zellen für 28 Tage auf Dentinchips, die sich in Plastikzellkulturschalen befanden. Die Dentinchips wurden zuvor an Tag 0 für 30 Minuten in 80%igem Alkohol desinfiziert. Nach Absaugen des Mediums an Tag 28 wurden die adhärennten Zellen durch waschen der Chips in H_2O_2 (Wasserstoffperoxid) vom Dentin entfernt, anschließend wurde das Dentin noch mit trockenen Zellstoffstreifen abgerieben. Zur Visualisierung der Resorptionslakunen wurde das Dentin mit einer einprozentigen Touluidin-Blau-Lösung gefärbt. Die Resorptionslakunen wurden unter dem Durchlichtmikroskop Axioskop II der Firma Zeiss (Jena) fotografiert (Abb. 7, links) und mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogramms Photoshop und des Bildanalyseprogramms Image Tool histomorphometrisch vermessen (Abb. 7, rechts).

Es wurde bei insgesamt 5 Ansätzen pro Knochenersatzmaterial jeweils die Stelle auf dem Dentinchip ausgewählt und fotografiert, welche sich als Stelle der höchsten Resorption repräsentativ für den gesamten Chip darstellte. Ausgewählt wurde dann jeweils das repräsentativste Foto dieser ausgewählten Resorptionsstelle, stellvertretend für die 5 Ansätze des betreffenden Biomaterials.

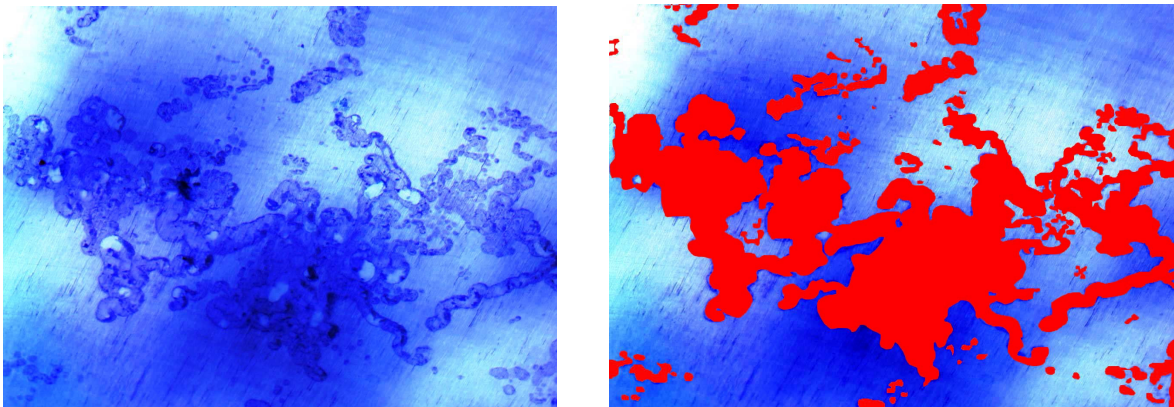


Abb. 7: Resorption auf Dentinchips

links: Tag 28, Resorption auf Dentinchips, Lichtmikroskopie, Vergrößerung 1:20, nach Waschen der Chips in H_2O_2 und Touluidin-Blau-Färbung.

rechts: Tag 28, Resorption auf Dentinchips, Lichtmikroskopie, Vergrößerung 1:20, nach Waschen der Chips in H_2O_2 und Touluidin-Blau-Färbung und anschließender roter Markierung der Resorptionslakunen

3.2.6 Resorptionsnachweis auf Biomaterialien

Die Biomaterialien wurden zur quantitativen Bestimmung der Resorption rasterelektronenmikroskopisch untersucht. Dazu wurden die Biomaterialien zunächst ohne Mediumkontakt an Tag 0 rasterelektronenmikroskopisch fotografiert (Abb. 8, oben).

Nach 28 Tagen Kultivierung wurden sie aus dem Medium und den Kulturschalen entfernt und für 2 Wochen in PBS gelagert, um noch anhaftende Zellen abzutöten und abzulösen. Danach wurden die Proben an der Luft getrocknet und auf 0,5-Zoll-Aluminium-Tellern via Ionisation mit einer leitfähigen Gold-Schicht überzogen. Dies war notwendig zur Vermeidung von elektrischen Aufladungen durch den Elektronenstrahl. Die Proben wurden fotografiert (Abb. 8, links) und die Resorption mit den Computerprogrammen Photoshop und Image Tool bearbeitet (Abb. 8, rechts), um später ausgewertet werden zu können.

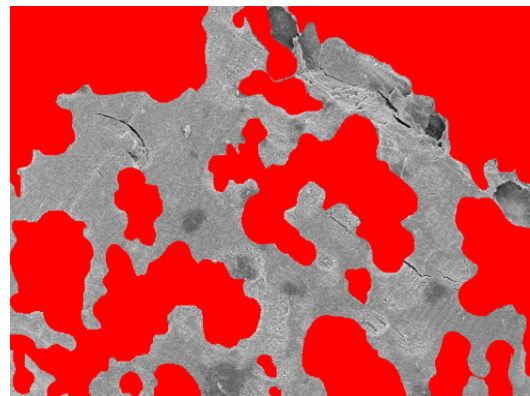
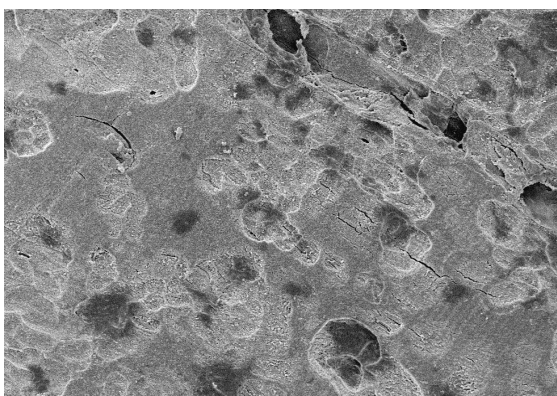
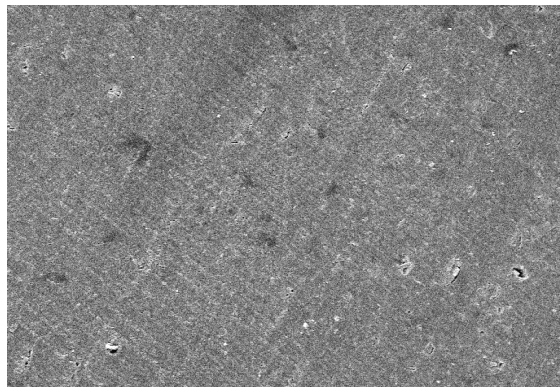


Abb. 8: Resorption auf Biomaterialien
Rasterelektronenmikroskopie, 200fache Vergrößerung.
oben: Biomaterial nach dem Zurechtschneiden für die Versuchsreihen, kein Kontakt zu Nährmedium.
links: Biomaterial nach 28 Tagen Zellkultur mit erkennbaren Resorptionslakunen.
rechts: Resorption auf Biomaterialien. Erkennbaren Resorptionslakunen rot markiert.

Durch die Kultivierung auf Biomaterialien und Dentin im selben Ansatz gelang es demnach, ein System zu entwickeln, das das Verhältnis von Resorption auf Biomaterial zu der auf Knochen / Dentin quantitativ erfasst. Der international standardisierte Parameter hierfür ist der RRC (*relative resorbability coefficient*) (Schilling et al. 2004). Ist der RRC = 1, so besteht eine 100%ige Übereinstimmung von Resorption auf Biomaterial zu der auf Dentin. Demnach können auch unterschiedliche Biomaterialien bezüglich ihrer Resorbierbarkeit miteinander verglichen und so für den Gebrauch im menschlichen Körper nach dem Zustand des vorliegenden Knochens oder nach bestehenden Vorerkrankungen wie z.B. Osteoporose ausgewählt werden.

3.2.7 Resorptionsauswertung (Photoshop und Image Tool)

Im Bildbearbeitungsprogramm Photoshop wurde der auf den Fotos erkennbare resorbierte Bereich auf Dentinchip oder auf Biomaterial in der Farbe Rot flächenhaft markiert. (Abb. 8, rechts). Der Farbbereich Rot wurde im Programm Photoshop ausgewählt, der übrige Bereich in Weiß eingefärbt. Mit dem Bildanalyseprogramm Image Tool wurden dann die Bilder histomorphometrisch vermessen, um den prozentualen Anteil der Oberflächenresorption bestimmen zu können.

3.2.8 Sicherheit und Entsorgung

Alle Chemikalien wurden entsprechend ihren R- und S-Sätzen gehandhabt. Ebenfalls diesen Bestimmungen entsprechend erfolgte auch die jeweilige Entsorgung. Abfälle, die Reste humaner Zellen enthielten, wurden vor der Entsorgung autoklaviert.

3.3 Statistik

Die statistischen Analysen erfolgten unter Verwendung des „*Oneway-Anova-Tests*“ und eines „*Post-Hoc-Tests*“. Als signifikant wurde $p < 0,05$ betrachtet. Jedem Knochenersatzmaterial wurde ein Buchstabe des Alphabets zugeordnet (Biobon=a, Calcibon=b, Tutogen bovin=c, Tutogen human=d, Chronos=e, Cerapatite=f, Perossal=g, Calciresorb=h, Cerasorb=i, Cerasorb M=k, Lactororb=m). In den Diagrammen wurden dann oberhalb jeden Materials mit

Sternchen markiert die zu dem Material signifikanten anderen Materialien angegeben. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen (SD).

4 RESULTATE

4.1 Biokompatibilität, Zelldifferenzierung, Zellmorphologie

4.1.1 Einfluss von Biomaterialien auf den pH-Wert des Mediums

Biomaterialien wirken sich auf die Osteoklastendifferenzierung aus

Um einen Eindruck über mögliche zytotoxische Effekte auf die Osteoklastenvorläuferzellen zu erlangen, wurde bei den Kulturmedien-Wechseln jeweils der pH-Wert des Mediums mittels pH-Meter gemessen. Der Ausgangs-pH-Wert der Nährlösung lag in jedem Ansatz und bei jedem neuen Wechsel bei 6,9. Während sich fast alle pH-Werte der Medien in physiologischen Bereichen bewegten, zeigten sich bei den Ansätzen mit dem Biomaterial Biobon deutlich saurere pH-Werte mit einem Maximum bei pH 6,62, (Abb. 9).

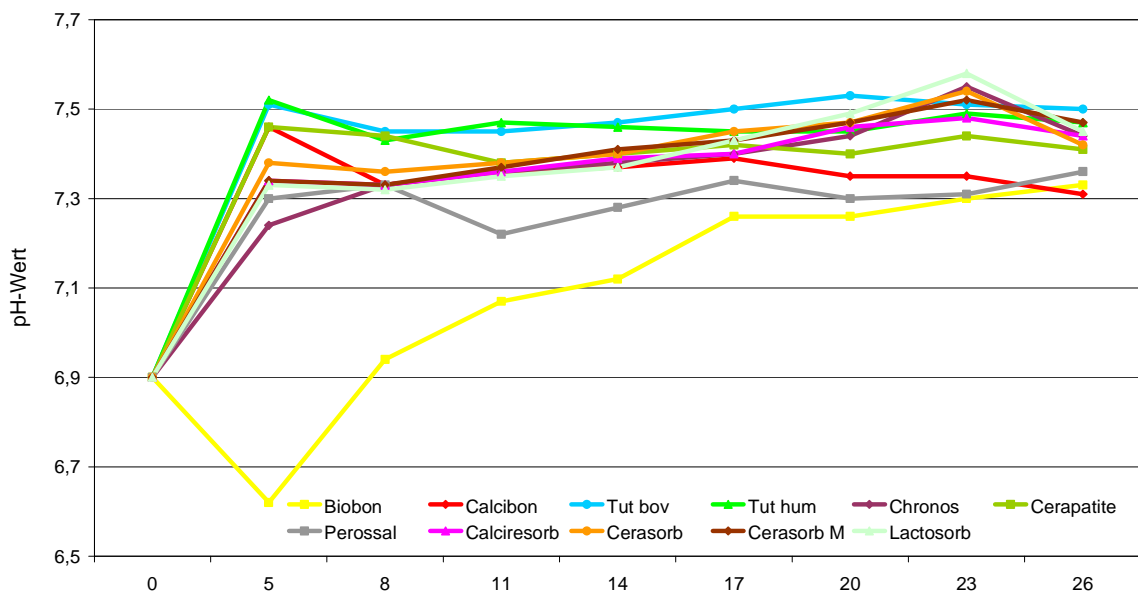


Abb. 9: pH-Wert-Schwankungen der Nährlösungen bei Zusatz von Biomaterialien Tag 0 bis Tag 26

Auswirkungen des Materials Biobon auf die Osteoklastendifferenzierung und – morphologie wird deutlich, betrachtet man lichtmikroskopisch die Entwicklung der Vorläuferzellen zu humanen Osteoklasten (Abb. 11-13).

4.1.2 Einfluss von Biomaterialien auf die Differenzierung

Biobon und Perossal wirken sich auf die Differenzierung von Vorläuferzellen zu humanen Osteoklasten aus

Die Ausprägung der Entwicklung zu humanen Osteoklasten wurde jeweils an Tag 0, Tag 14 und Tag 28 durch lichtmikroskopische Photographie der Zellkulturansätze verfolgt. An Tag 0, dem Tag, an dem 10^7 Vorläuferzellen / ml Nährmedium der Zellkultur zugeführt wurden, wiesen alle Kulturansätze eine gleichmäßig verteilte Menge an Zellen auf. Zu diesem Zeitpunkt waren noch keine Unterschiede in Zelldichte oder Differenzierung erkennbar (Abb. 11).

Bereits nach 2 Wochen zeigten sich dann Unterschiede in der Entwicklung der Vorläuferzellen zu humanen Osteoklasten (Abb. 12):

In 8 Ansätzen entsprachen sich die beginnenden Ausbildungen zu humanen Osteoklasten nahezu vollständig. Es bildeten sich im Vergleich zu Tag 0 nun größere, rundliche Zellen mit hoher Zelldichte, rundem Zellkern und vielen Zellausläufern zu anderen, sich in der Nähe befindlichen Zellen aus.

In 3 Ansätzen stellten sich jedoch Unterschiede in Bezug auf die Zelldifferenzierung dar. In den Kulturansätzen mit dem Biomaterial Perossal bildeten sich kaum Osteoklasten aus, die sichtbaren Zellen ließen sich als eher spindelförmig beschreiben und es zeigten sich nur wenige Zellausläufer und damit Zellzusammenschlüsse. Die Zelldichte bei Biobon war herabgesetzt, Zellzusammenschlüsse und -ausläufer waren nur in sehr geringem Umfang zu erkennen. Bei Cerapatite zeigte sich die Zelldichte aufgelockert, nur wenige Zellzusammenschlüsse waren zu erkennen.

An Tag 28 und nach TRAP-Färbung waren die Unterschiede in der Zellmorphologie noch deutlicher zu erkennen (Abb. 13):

In den Ansätzen mit Tutogen human und Tutogen bovin zeigten sich die höchsten Zellkernanzahlen. Bei Tutogen human lag der höchste Wert bei 36 Zellkernen pro Osteoklast bei einem Mittelwert von 18,3 Zellkernen pro Osteoklast. Tutogen bovin zeigte sein Maximum bei 30 Zellkernen pro Osteoklast bei einem Mittelwert von 13,8 Zellkernen pro Osteoklast.

Die geringste Anzahl an Zellkernen war bei Perossal zu registrieren, hier lag der höchste Wert bei 7 Zellkernen pro Osteoklast bei einem Mittelwert von 3,5 Zellkernen pro Osteoklast.

In den jeweiligen paarweisen Vergleichen in den Signifikanztests wurden für jede Kombination von zwei Biomaterialien bezüglich ihrer Zellkernzahlen die in Abb. 10 mit Sternchen markierten Ergebnisse ausgegeben. Bezogen auf Tutogen human sind bei einem vorgegebenen Signifikanzniveau von 5% die Mittelwerte von Tutogen human und allen anderen Biomaterialien bis auf Tutogen bovin und Calciresorb signifikant (p-Werte zwischen $\leq 0,1\%$ und $1,6\%$).

Für die Zellzahlen konnte statistisch kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt werden.

Zusammenfassend lassen sich die ermittelten Werte für Zellanzahl und Zellkernanzahl pro Gesichtsfeld im unten stehenden Diagramm darstellen (Abb. 10):

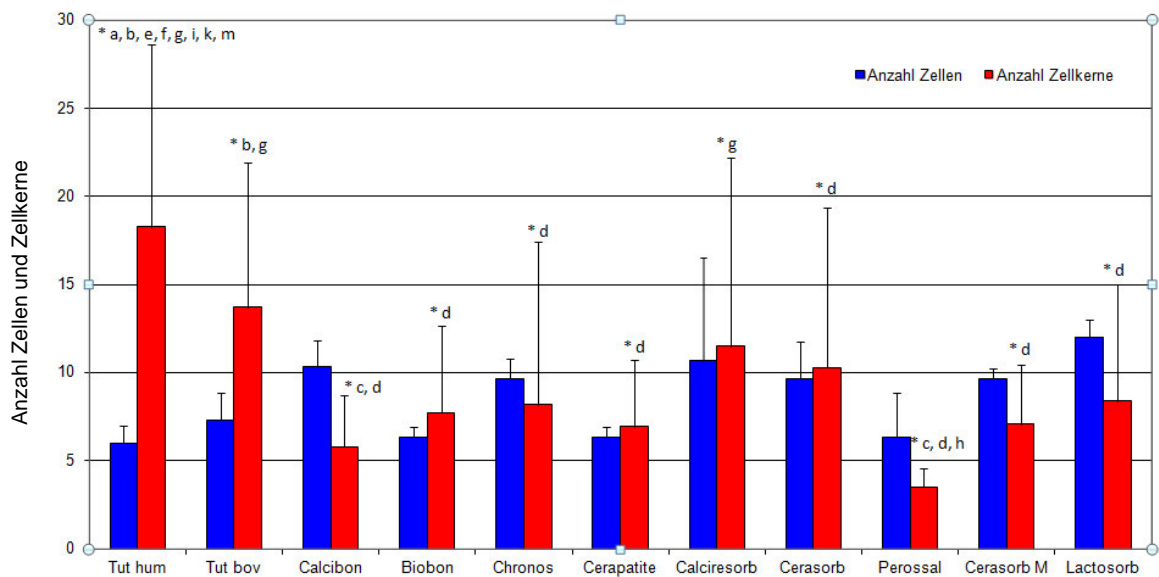


Abb. 10: Zellmorphologie, lichtmikroskopisch ausgewertet an Tag 28 nach Formalin-Fixierung und Trap-Färbung, Anzahl Zellen und Zellkerne pro Gesichtsfeld, Vergrößerung 1:20. (* = Materialien, welche zum betroffenen Biomaterial einen signifikanten Unterschied von $p < 0,05$ zeigten. a= Biobon, b= Calcibon, c= Tutogen bovin, d= Tutogen human, e= Chronos, f= Cerapatite, g= Perossal, h= Calciresorb, i= Cerasorb, k= Cerasorb M, m= Lactosorb)

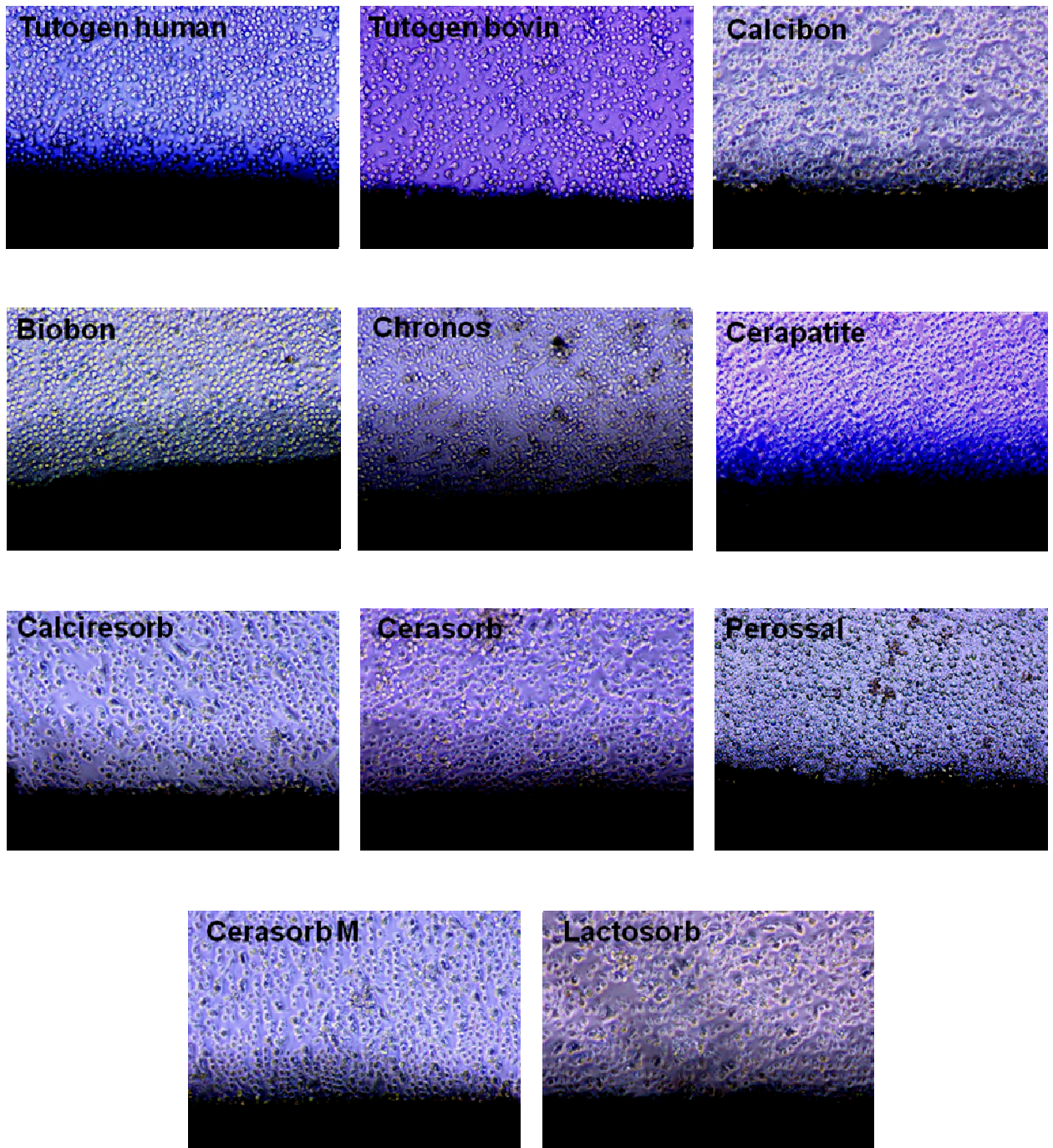


Abb. 11: Zellkultur Tag 0
Lichtmikroskopie, Vergrößerung 1:20.

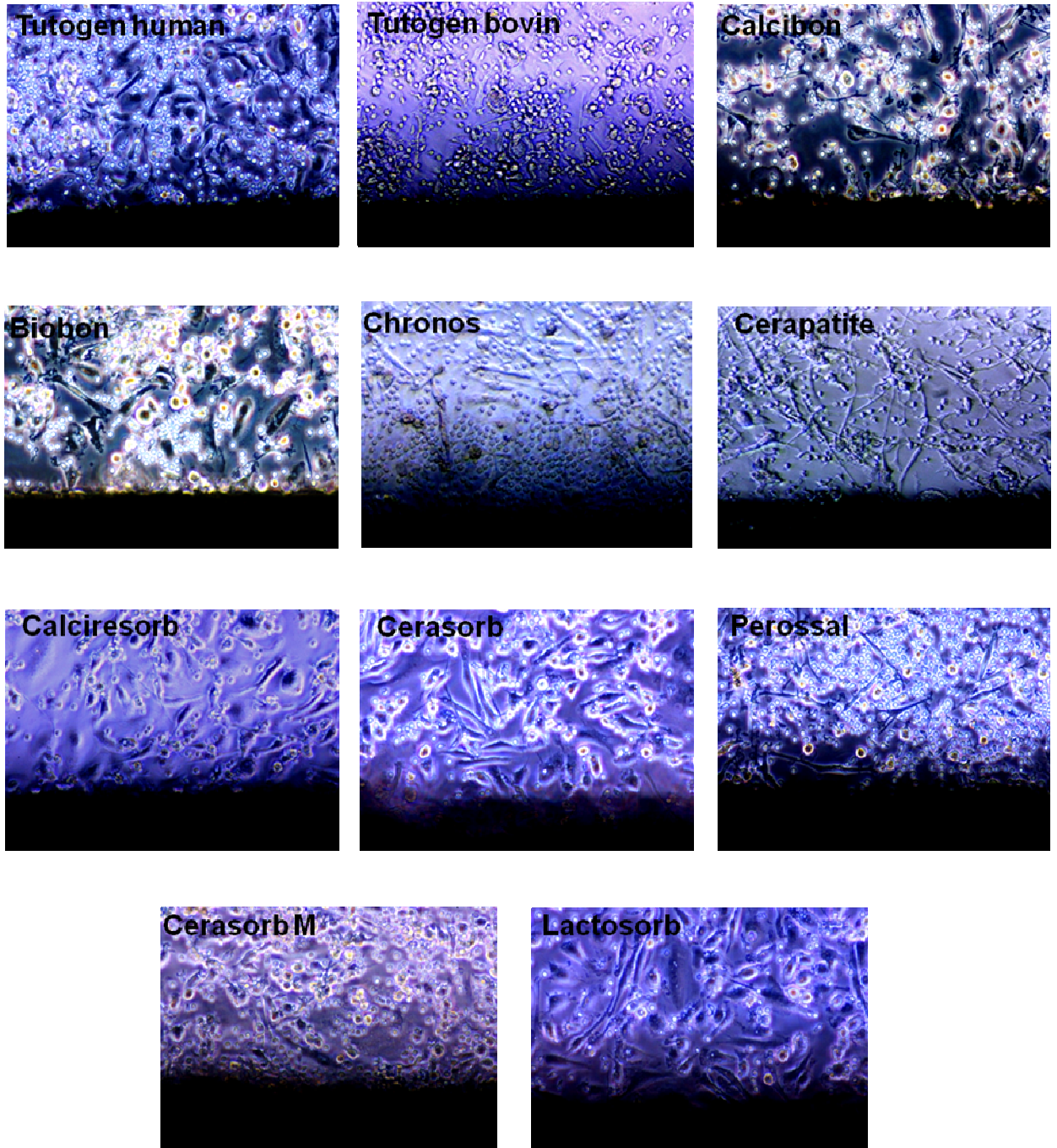


Abb. 12: Zellkultur Tag 14
Lichtmikroskopie, Vergrößerung 1:20.

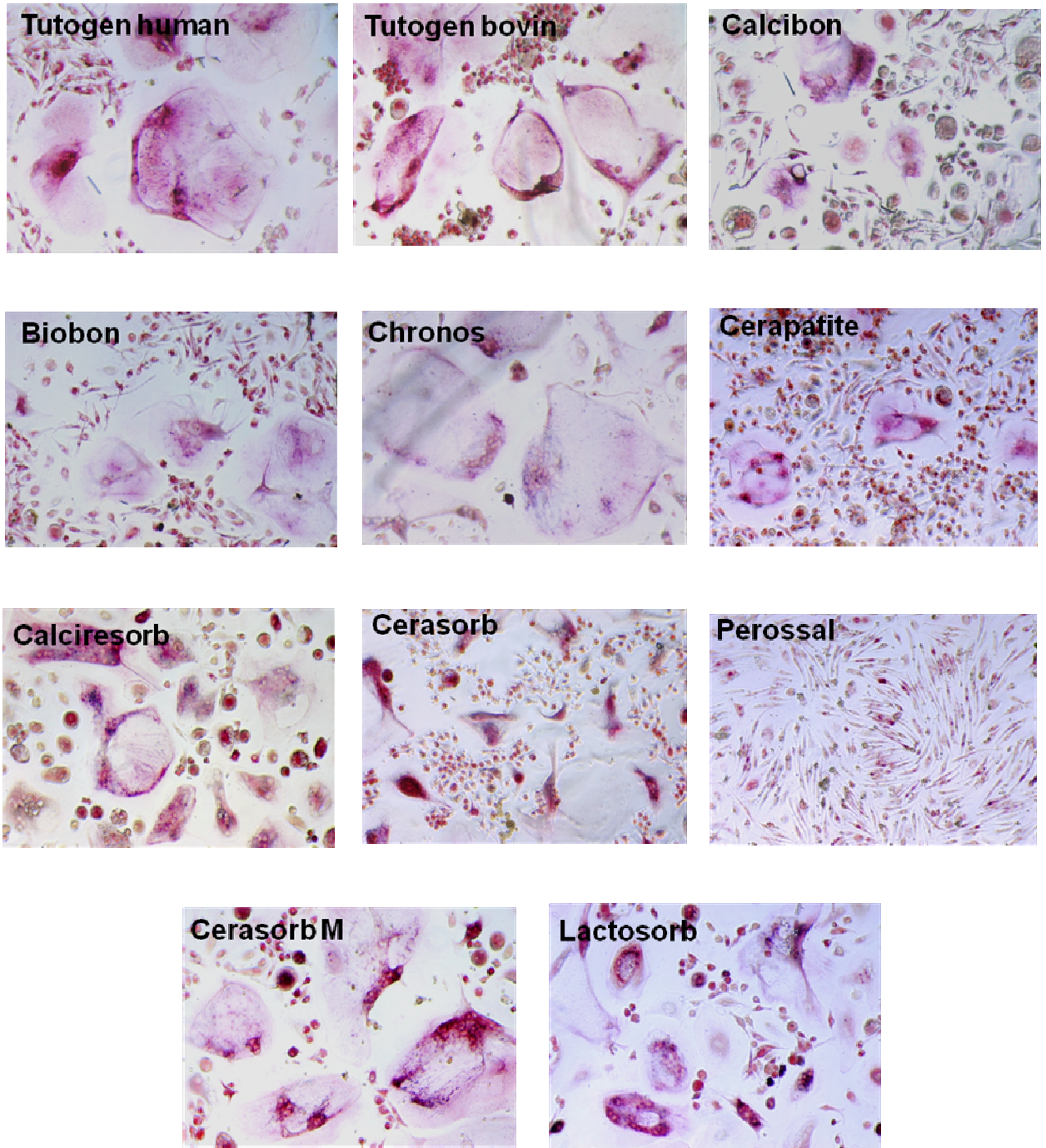


Abb.13: Zellkultur Tag 28
Formalin-Fixierung, TRAP-Färbung, Lichtmikroskopie, Vergrößerung 1:20.

4.2 Resorption auf Dentin

Perossal und Biobon zeigen die geringste Oberflächenresorption auf Dentin

Es ist bekannt, dass Dentin durch humane Osteoklasten resorbiert wird. Als Kontrollsubstanz zur Überprüfung der Resorption befand sich daher in jedem Ansatz mit Biomaterial auch ein Dentinchip. Die Resorptionsnachweise nach Touluidin-Blau-Färbung (Abb. 15, große Bilder) und anschließende Anwendung der verschiedenen Bildbearbeitungsprogramme (Abb. 15, kleine Bilder) erlaubten eine histomorphologische Vermessung der Resorptionslakunen auf den Dentinchips. Die Ergebnisse dieser Vermessung sind in Abb. 14 dargestellt:

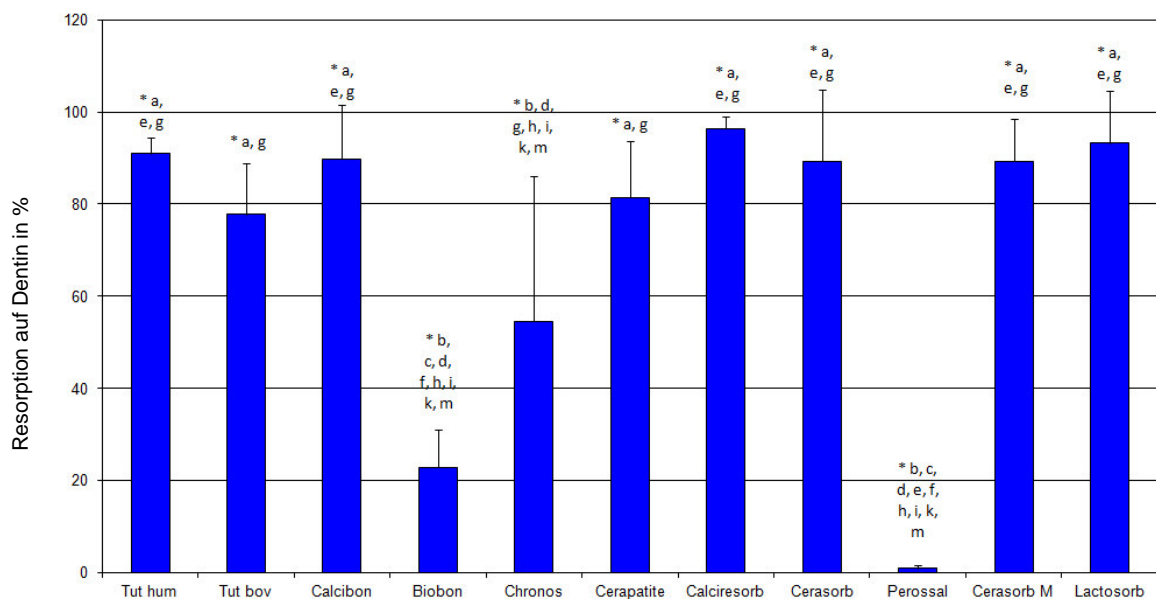


Abb. 14: Resorption auf Dentinchips, prozentuale Resorptionsbestimmung durch die Programme PhotoShop und Image Tool.

(* = Materialien, welche zum betroffenen Biomaterial einen signifikanten Unterschied von $p < 0,05$ zeigten.

a= Biobon, b= Calcibon, c= Tutogen bovin, d= Tutogen human, e= Chronos, f= Cerapatite, g= Perossal, h= Calciresorb, i= Cerasorb, k= Cerasorb M, m= Lactosorb)

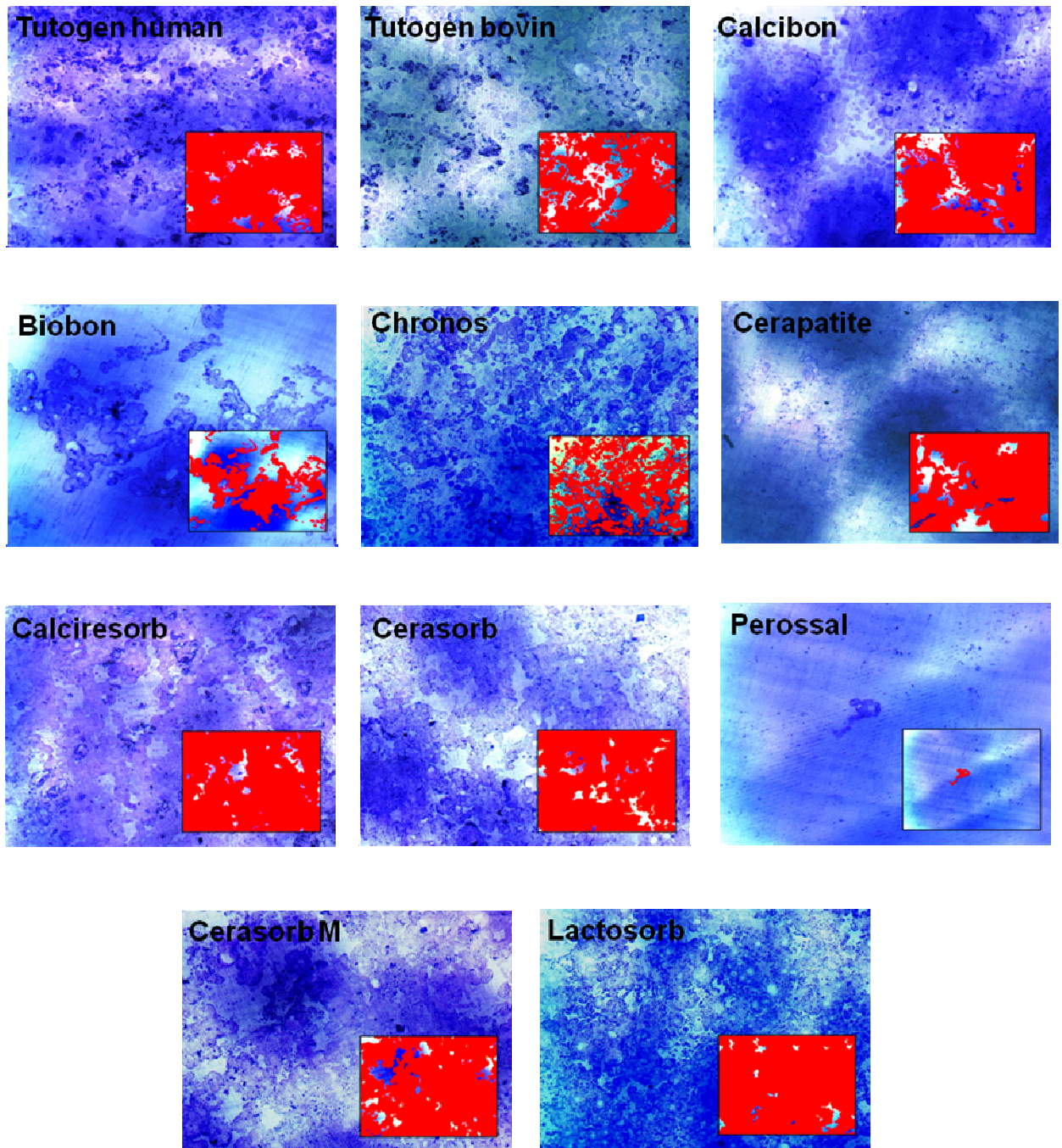


Abb.15: Resorption auf Dentinchips, Tag 28, Lichtmikroskopie, Vergrößerung 1:20
große Bilder: nach Waschen der Chips in H_2O_2 und Touloidin-Blau-Färbung
kleine Bilder: nach roter Markierung der Resorptionslakunen

Die Resorptions-Mittelwerte von fast allen getesteten Biomaterialien bewegten sich um einen Resorptions-Mittelwert von 80%.

Abweichend hiervon ergab sich bei Chronos ein Mittelwert von 54,6% mit einer Standardabweichung von 31,52% und bei Biobon ein Mittelwert von 22,83% mit einer Standardabweichung von 8,17%.

Die geringste Oberflächenresorption auf Dentinchips zeigte sich im Ansatz mit Perossal: Mittelwert 0,89%, Standardabweichung 0,8%.

In den jeweiligen paarweisen Vergleichen in den Signifikanztests wurden für jede Kombination von zwei Biomaterialien bezüglich ihrer Resorption auf Dentinchips die in Abb. 14 mit Sternchen markierten Ergebnisse ausgegeben. Bezogen auf Tutogen human sind bei einem vorgegebenen Signifikanzniveau von 5% nur die Mittelwerte von Tutogen human und Biobon (p-Wert $\leq 0,1\%$), Chronos (p-Wert gleich 1,7%) und Perossal (p-Wert gleich $\leq 0,1\%$) signifikant, bei allen anderen Vergleichen mit Tutogen human nicht.

4.3 Resorption auf Biomaterialien

4.3.1 Nicht auswertbare Biomaterialien

Einige Biomaterialien sind für die rasterelektronische Auswertung zu grobporig, andere ändern nach Mediumkontakt ihre Oberflächenstruktur

Einige der untersuchten Biomaterialien ließen sich am Ende der Versuchsreihe nicht auswerten. Die Ursache lag bei Perossal in der Tatsache, dass sich das Biomaterial in dem flüssigen Nährmedium fast vollständig in kleine Partikel auflöste und eine Untersuchung der Oberfläche demnach nicht mehr möglich war. Bei Cerasorb, Cerasorb M und Calciresorb erwies sich rasterelektronenmikroskopisch betrachtet die Oberfläche der Materialien als zu großporig, um mit Sicherheit Resorptionszonen abgrenzen zu können. Bei Cerapatite ergaben sich durch den Schneidevorgang striemenartige Züge auf dem Biomaterial, welche nicht sicher von Resorptionslakunen abgrenzbar waren. Lactosorb zeigte nach Kultivierung und Mediumkontakt eine insgesamt etwas aufgelockerte Oberfläche, Resorptionslakunen waren nicht sicher abgrenzbar. Alle nicht auswertbaren Biomaterialien sind in Abb. 16 dargestellt.

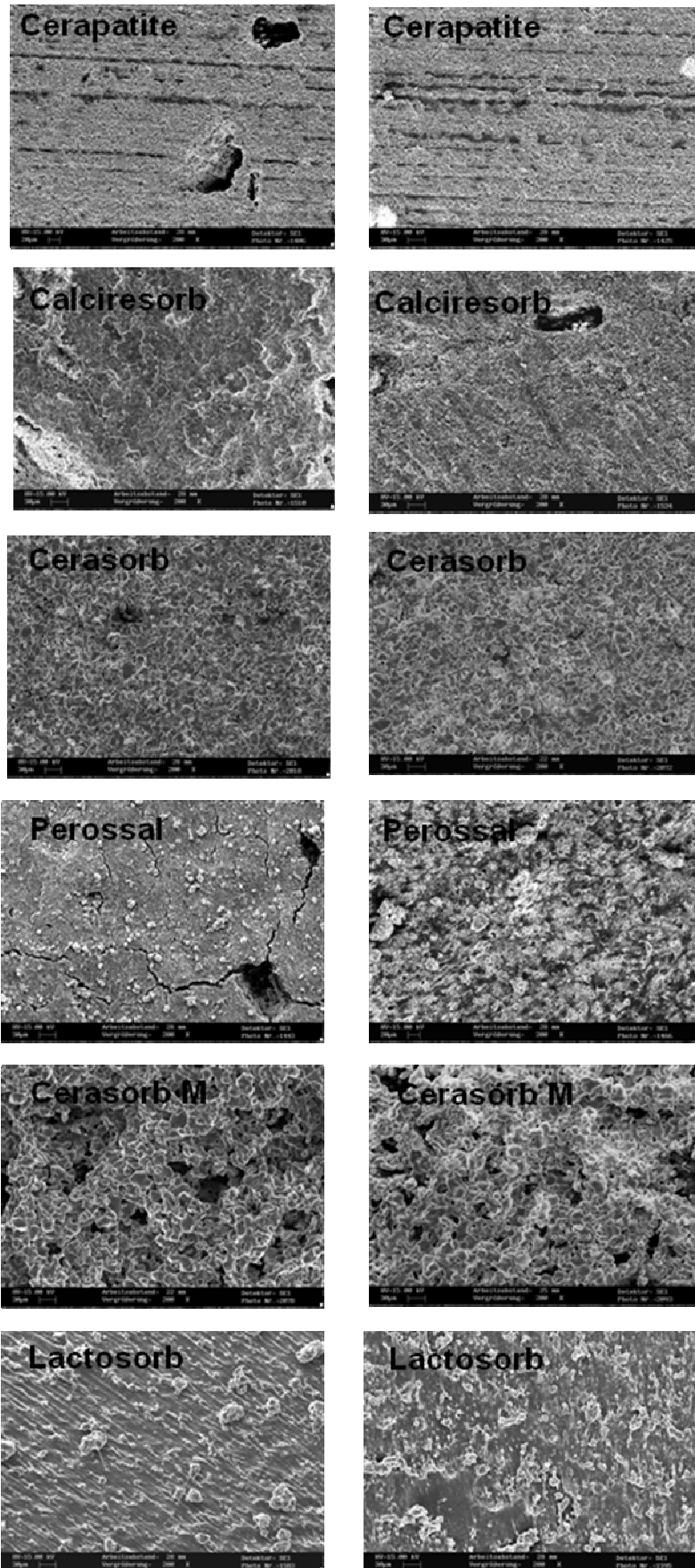


Abb. 16: Oberfläche der Biomaterialien, deren adsorbierte Fläche nicht eindeutig bestimmbar war.
Linke Spalte: Biomaterial nach dem Zurechtschneiden für die Versuchsreihen, kein Kontakt zu Nährmedium.
Rechte Spalte: Biomaterial nach 28 Tagen Zellkultur mit Mediumkontakt.

4.3.2 Auswertbare Biomaterialien

Auf dem Biomaterial Tutogen bovin zeigt sich die höchste Resorption.

Die auf den rasterelektronenmikroskopisch erstellten Fotos der Biomaterialien erkennbaren Resorptionslakunen wurden mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogramms Photoshop rot markiert (Abb. 18).

Nach Markierung der Resorptionslakunen wurden die Bilder mit dem Bildanalyseprogramm Image Tool histomorphometrisch vermessen.

Die Ergebnisse dieser Vermessung sind in Abb. 17 dargestellt.

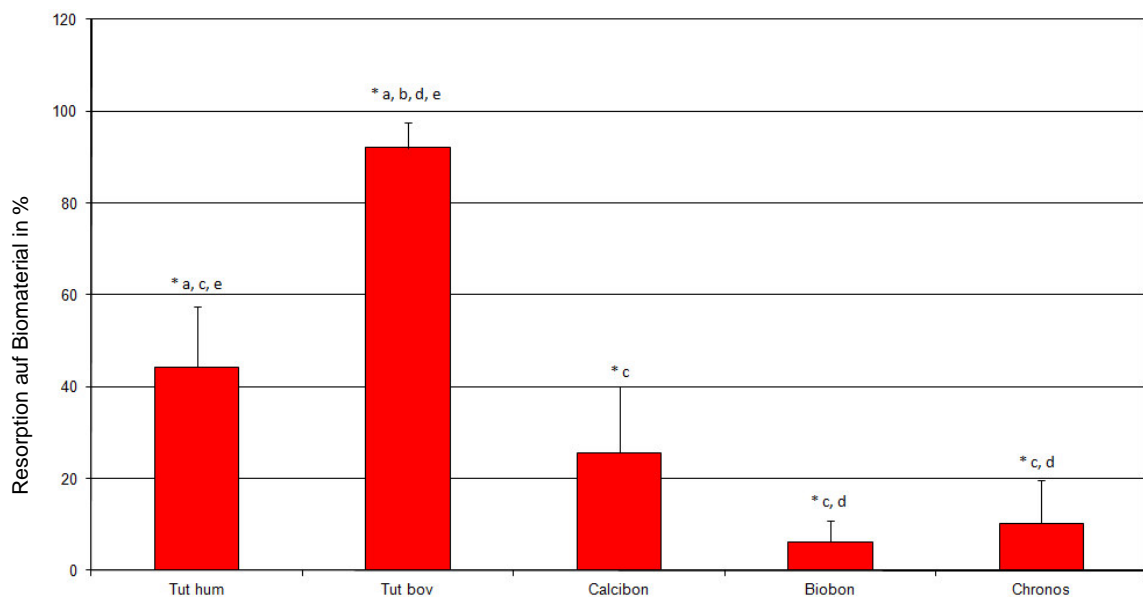


Abb. 17: Prozentuale Resorption auf Biomaterial

Rasterelektronenmikroskopie, 200fache Vergrößerung, Bildanalyse durch die Programme PhotoShop und Image Tool. (* = Materialien, welche zum betroffenen Biomaterial einen signifikanten Unterschied von $p < 0,05$ zeigten.

a= Biobon, b= Calcibon, c= Tutogen bovin, d= Tutogen human, e= Chronos, f= Cerapatite, g= Perossal, h= Calciresorb, i= Cerasorb, k= Cerasorb M, m= Lactosorb)

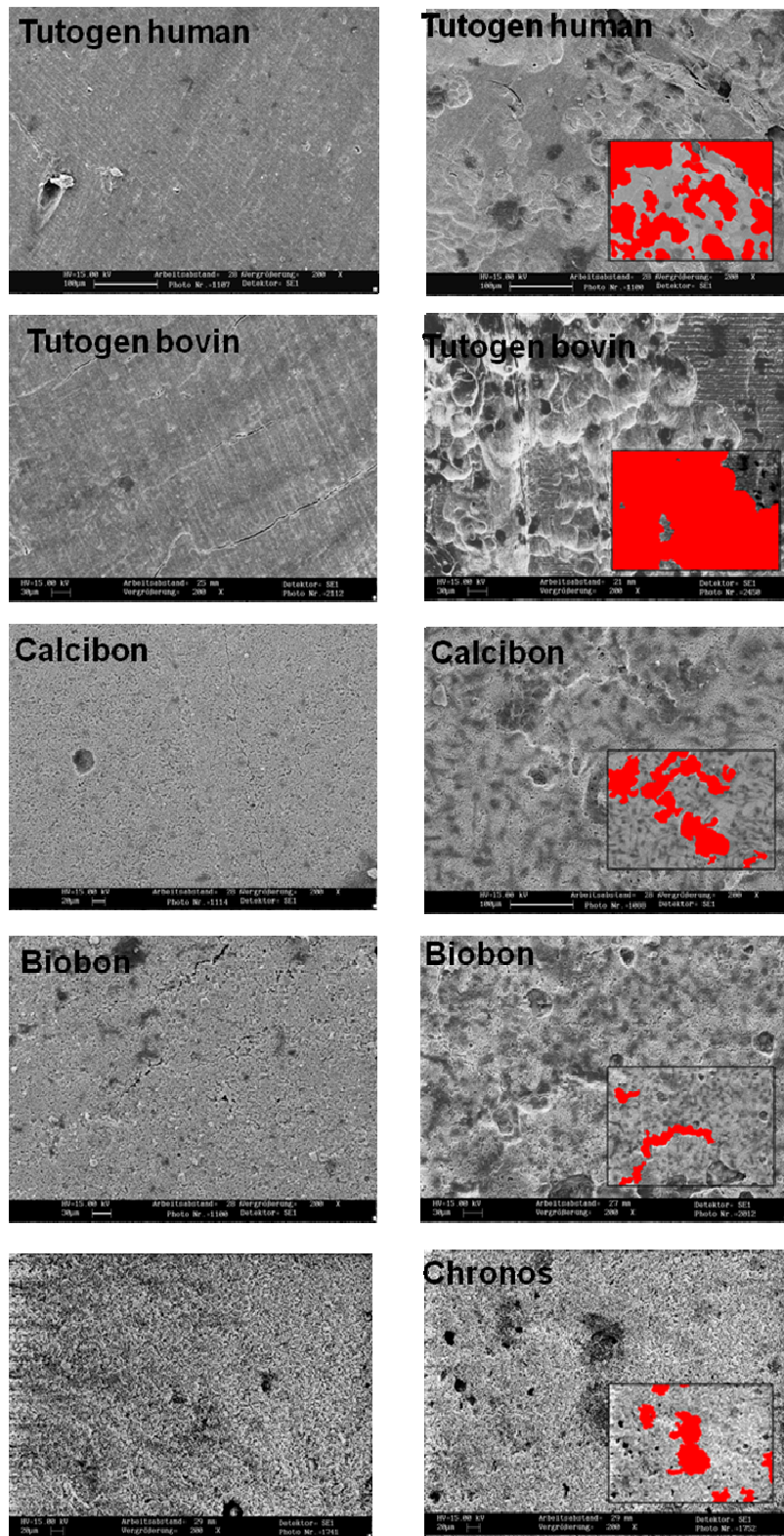


Abb. 18: Resorption auf Biomaterialien

Rasterelektronenmikroskopie, 200fache Vergrößerung.

Linke Spalte: Biomaterial nach dem Zurechtschneiden für die Versuchsreihen, kein Kontakt zu Nährmedium.

Rechte Spalte: Biomaterial nach 28 Tagen Zellkultur mit erkennbaren Resorptionslakunen.

Kleine Bilder: Resorption auf Biomaterialien. Erkennbaren Resorptionslakunen rot markiert.

Bei den auswertbaren Materialien zeigte sich, dass bei dem Biomaterial Tutogen bovin mit einem Mittelwert von 92,05% bei einer Standardabweichung von 5,59% die Resorption am höchsten war.

Die niedrigste Resorptionsrate lag bei Biobon bei einem Mittelwert von 6,21% mit einer Standardabweichung von 4,55%.

Die Mittelwerte der resorbierten Oberfläche der übrigen Materialien lagen bei Tutogen human bei 44,36% (Standardabweichung 13,13%) und bei Calcibon bei 25,61% (Standardabweichung 14,54%).

In den jeweiligen paarweisen Vergleichen in den Signifikanztests wurden für jede Kombination von zwei Biomaterialien bezüglich ihrer Resorption auf Biomaterial die in Abb. 18 mit Sternchen markierten Ergebnisse ausgegeben. Bezogen auf Tutogen human ist bei einem vorgegebenen Signifikanzniveau von 5% nur der Mittelwert von Tutogen human und Calcibon nicht signifikant (p-Wert hier gleich 13,9%), bei allen anderen Vergleichen mit Tutogen human lag Signifikanz vor (p-Wert von Biobon $\leq 0,1\%$, 1% bei Biobon und 2% bei Chronos).

4.4 Relativer Resorptionskoeffizient

Die größte Übereinstimmung in Resorption auf Dentin und Resorption auf Biomaterial ergibt sich bei dem Biomaterial Tutogen bovin.

Wie in Kapitel 3.2.6 beschrieben, ist es dank des international standardisierten Parameters RRC (relativer Resorptionskoeffizient) möglich, das Verhältnis von Resorption auf Biomaterial zu der auf Knochen / Dentin quantitativ zu erfassen (Schilling et al. 2004).

Auch in diesem Fall wurde der RRC für jedes Biomaterial bestimmt.

Die Vergleiche von Resorption auf Biomaterial und Resorption auf Dentin sind in Abb. 19 zusammengefasst:

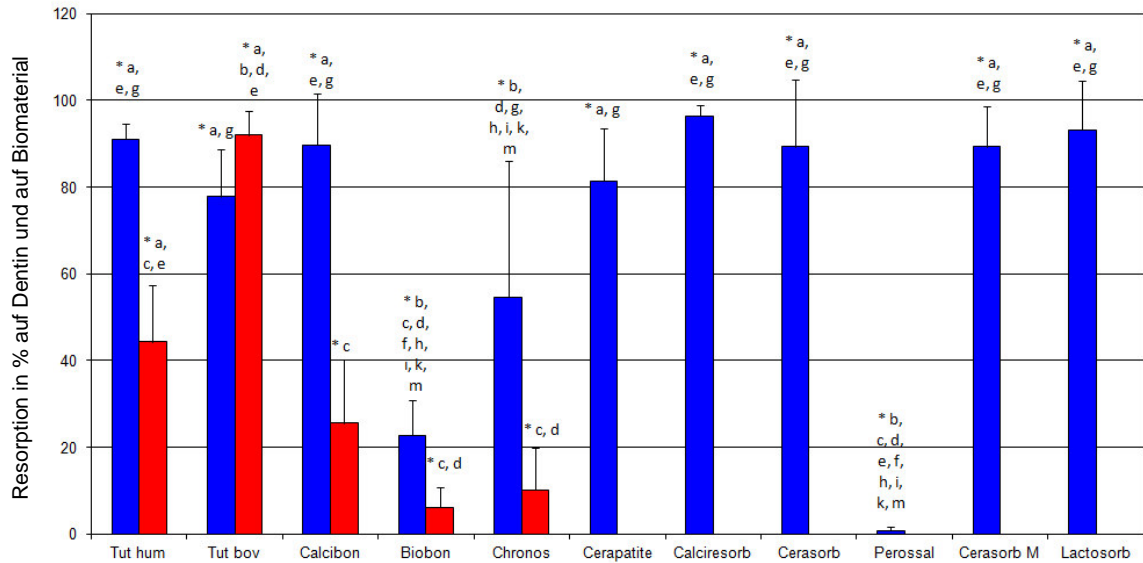


Abb. 19: Resorption auf Dentin und auf Biomaterial im Vergleich.

Dentin = blau, Biomaterial = rot

(* = Materialien, welche zum betroffenen Biomaterial einen signifikanten Unterschied von $p < 0,05$ zeigten.

a= Biobon, b= Calcibon, c= Tutogen bovin, d= Tutogen human, e= Chronos, f= Cerapatite, g= Perossal, h= Calciresorb, i= Cerasorb, k= Cerasorb M, m= Lactosorb)

Hierbei wurde erkennbar, dass die größte Übereinstimmung von Resorption auf Biomaterial und auf Dentin bei dem Biomaterial zu finden war, welches auch schon den höchsten Mittelwert für Resorption auf seiner Oberfläche aufwies: Tutogen bovin (Mittelwert Resorption auf Dentin 77,85%, Mittelwert Resorption auf Tutogen bovin 92,05%).

Optisch ist der RRC für alle auswertbaren Biomaterialien in Abb. 20 dargestellt, wobei der Wert 1 einer Übereinstimmung von Resorption auf Biomaterial und Resorption auf Dentin entspricht:

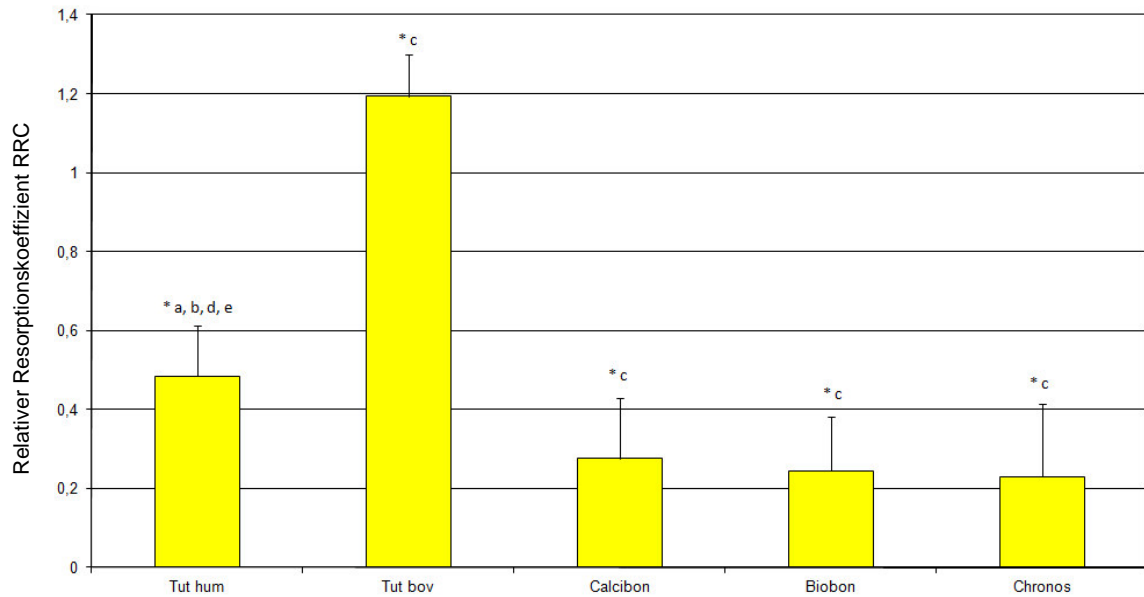


Abb. 20: Relative Resorptionskoeffizient RRC (Resorption auf Dentin / Resorption auf Biomaterial) der 6 auswertbaren Biomaterialien (Bei einem Wert von 1 entspricht die Menge an Resorption auf Dentin der Menge auf Biomaterial). (* = Materialien, welche zum betroffenen Biomaterial einen signifikanten Unterschied von $p < 0,05$ zeigten. a= Biobon, b= Calcibon, c= Tutogen bovin, d= Tutogen human, e= Chronos, f= Cerapatite, g= Perossal, h= Calciresorb. i= Cerasorb. k= Cerasorb M. m= Lactosorb)

Der RRC-Mittelwert lag für Tutogen human bei 0,49% (Standardabweichung 0,13%), für Tutogen bovin bei 1,19% (bei einer Standardabweichung von 0,11%), für Calcibon bei 0,28% (Standardabweichung 0,15%), für Biobon bei 0,25% (Standardabweichung 0,14%), und für Chronos bei 0,23% (Standardabweichung 0,18%).

In den jeweiligen paarweisen Vergleichen in den Signifikanztests wurden für jede Kombination von zwei Biomaterialien bezüglich des RRC die in Abb. 20 mit Sternchen markierten Ergebnisse ausgegeben. Bezogen auf Tutogen human ist bei einem vorgegebenen Signifikanzniveau von 5% nur der Mittelwert von Tutogen human und Tutogen bovin ($p\text{-Wert} \leq 0,1\%$) signifikant, bei allen anderen Vergleichen mit Tutogen human nicht.

5 DISKUSSION

Durch die Aktivität Knochen resorbierender Osteoklasten und Knochen bildender Osteoblasten befindet sich Knochengewebe in einem ständigen Umbau, was eine optimale Anpassung an wechselnde Belastungsbedingungen und Umwelteinflüsse ermöglicht. Kommt es zu einer Störung der am *Remodeling* (Ralston 1997) beteiligten Zelltypen, so führt dies häufig zum Krankheitsbild der Osteoporose, das durch eine erniedrigte Knochenmasse und erhöhte Frakturneigung charakterisiert ist. Gleichermaßen führen Traumata und posttraumatische Störungen zu Störungen des Knochenstoffwechsels, was in schwerwiegenden Defekten der Knochenstruktur resultiert (Rössler und Rüther 1997). Ist eine spontane Regeneration des Knochengewebes nicht gewährleistet, so kann eine Defektdeckung durch das Einbringen von Knochenersatzmaterialien oder Knochentransplantation erreicht werden (Sen und Miclau 2007; Onoda et al. 2011). Die hierbei verwendeten Knochenersatzmaterialien sollten möglichst aktiv am Knochenstoffwechsel beteiligt sein, um so eine rasche Einheilung und Wiederherstellung des Patienten zu gewährleisten (Rueger 1998; Dorozhkin und Epple 2002). Dafür ist es einerseits notwendig, dass die verwendeten Biomaterialien durch Osteoklasten resorbierbar sind und sich andererseits positiv auf die Aktivität der knochenbildenden Osteoblasten auswirken.

Ziel dieser Arbeit war es daher, verschiedene experimentell und klinisch verwendete Biomaterialien bezüglich ihrer Biokompatibilität und Resorbierbarkeit zu untersuchen. Dafür wurden humane Osteoklasten für die Dauer von 4 Wochen in Gegenwart von unterschiedlichen Biomaterialien und von Dentin kultiviert und zunächst der Einfluss der Knochenersatzmittel auf die Zellvariabilität, die Differenzierung und die Fusion von mononukleären Vorläuferzellen zu Osteoklasten untersucht. Anschließend wurde die Oberfläche der Biomaterialien rasterelektronenmikroskopisch und die von Dentin lichtmikroskopisch hinsichtlich Resorptionslakunen analysiert (Kapitel 3). Das Verhältnis von Resorption auf dem Biomaterial zu der auf Dentin wurde quantitativ erfasst und als standardisierter *relative resorbability coefficient* (RRC) ausgedrückt (Schilling et al. 2004).

5.1 Biokompatibilität der Biomaterialien

Durch die lichtmikroskopische Beobachtung der Zellen und der fotografischen Dokumentation an Tag 0, 14 und 28 der Osteoklastenkultur konnte gezeigt werden, dass sich in Anwesenheit der entsprechenden Biomaterialien morphologisch reife Osteoklasten ausbilden und die verwendeten Biomaterialien daher insgesamt als biokompatibel zu bezeichnen sind (Kapitel 4.1.2). Bereits in der Gruppe um *Shibutani et al* konnte am Tiermodell gezeigt werden, dass eine Veränderung des Medium-pH-Wertes sowohl die Zahl der Osteoklasten als auch ihre resorptive Aktivität dramatisch ändern kann (Shibutani und Heersche 1993). Nachdem *Schilling et al.* bereits demonstrierten, dass ein pH-Wert im sauren Bereich zwischen 6,9 und 7,1 für die Ausbildung von Osteoklasten optimal ist (Schilling et al. 2004), wurden in dieser Studie die Zellkulturmedien hinsichtlich pH-Wert-Veränderungen analysiert (Kapitel 4.1.1). In Voruntersuchungen zeigte sich, dass die Zeitspanne zwischen Entnahme des Mediums und Bestimmung des pH-Wertes von essentieller Bedeutung war. Beispielsweise ergaben sich bei einer verzögerten pH-Messung von 2 Minuten schon um 0,2 Punkte basisch veränderte Messresultate. Demnach erfolgte die Bestimmung des pH-Wertes unmittelbar nach Entnahme des jeweiligen Kulturmediums. In Übereinstimmung mit *Schilling et al.* konnte hierbei beobachtet werden, dass bei einem pH-Wert unterhalb von 6,9 eine negative Auswirkung auf die Zelldifferenzierung auftritt und somit das vorhandene Biomaterial über lokale Veränderung des pH-Werts die Osteoklastogenese beeinflusst (Kapitel 4.1). Besonders deutlich wurde dies bei der Betrachtung des Biomaterials Biobon, bei dem die Osteoklastenzahl am Ende der Zelldifferenzierung mit dem gemessenen pH-Wert korrelierte (Abb. 9-13). Überwiegend jedoch fanden sich in den meisten Ansätzen morphologisch reife Osteoklasten am Ende der Differenzierungsperiode, sodass von einer guten Biokompatibilität der entsprechenden Substanzen auszugehen ist.

5.2 Resorptionspotential der verwendeten Biomaterialien

Nachdem potentiell zytotoxische Effekte der Biomaterialien auf die Osteoklastendifferenzierung ausgeschlossen werden konnten, wurden die Resorbierbarkeit der Materialien sowie deren Einfluss auf die Osteoklastenaktivität untersucht. In jedem Kulturansatz befand sich neben dem entsprechenden Biomaterial gleichzeitig Dentin, das durch humane Osteoklasten resorbiert werden

kann und somit Aufschluss über die Resorptionsleistung der kultivierten Zellen bietet (Boyde et al. 1984; Wedenberg und Yumita 1990; Liewehr et al. 1995; Domon et al. 1997; Kawaguchi et al. 2000; Schilling et al. 2004). Obgleich alle verwendeten Biomaterialien auf osteoklastäre Resorptionsspuren hin analysiert wurden (Kapitel 4.3), war eine quantitative Auswertung nur im Falle von Tutogen human, Tutogen bovin, Calcibon, Biobon und Chronos möglich (Kapitel 4.3.2). Die anderen Biomaterialien (Cerapatite, Calciresorb, Cerasorb, Perossal, Cerasorb M, Lactorsorb) zeigten rasterelektronenmikroskopisch eine durchgehend poröse und aufgelockerte Oberflächenstruktur, sodass eine quantitative Analyse der zellulären Resorption nicht möglich war und sich demnach diese Materialien durch die angewandten Methoden nur schlecht *in vitro* untersuchen ließen (Kapitel 4.3.1). Bei diesen Knochenersatzmaterialien müsste man hier zur genaueren Charakterisierung andere Methoden wie beispielsweise *Confocal laser scanning microscopy* oder *Infinite focus microscopy* sowie die quantitative Messung von Biomaterial-Abbauprodukten im Medium (Sheppard und Shotton 1997; Zhang et al. 2012) anwenden.

Innerhalb der auswertbaren Biomaterialien wies Tutogen bovin die stärkste Resorbierbarkeit auf, gefolgt von Tutogen human (Abb. 17). Dies ist in Übereinstimmung mit klinischen Untersuchungen, die eine gute Einheilung boviner und humaner Knochenersatzmaterialien mit rascher Durchbauung durch endogenen Knochen demonstrieren konnten (Tudor et al. 2008). Morphologisch zeigte sich in den Zellkulturansätzen mit Tutogen bovin und human keine signifikante Erhöhung der Osteoklastenzahl (Abb. 10), was die verstärkte Resorption dieser Ersatzmittel hätte erklären können. Allerdings zeigte sich bei den Biomaterialien mit der höchsten Resorption, dass trotz vergleichbarer Anzahl an Osteoklasten deren Kernzahl erhöht war (Abb. 10). Demnach scheint die Anzahl der Zellkerne mit der Resorptionsaktivität der Osteoklasten assoziiert zu sein. Diese Beobachtung stimmt mit verschiedenen Studien überein, die eine positive Korrelation zwischen der Anzahl an Nuclei pro Osteoklast und dem Resorptionsvolumen *in vitro* feststellen konnten (Piper et al. 1992). Dieses Phänomen ist klinisch beim Krankheitsbild des Morbus Paget zu beobachten, bei dem es zur Bildung von Osteoklasten mit sehr hohen Kernzahlen kommt und das durch eine überschießende Knochenresorption charakterisiert ist (Rössler und Rüther 1997).

Da sich in den Zellkulturansätzen neben den eigentlichen osteoklastären Vorläuferzellen auch andere immunkompetente Zellen der mononukleären Fraktion humanen Blutes befinden, könnte das Biomaterial außerdem eine proinflammatorische Reaktion hervorrufen, die wiederum über lokale Mediatoren (Zytokine) die Osteoklastenaktivität fördert. Ein häufig angenommener Auslöser dieser immunogenen Reaktion stellt die sog. Biodegradation dar, bei der die Biomaterialien durch verschiedene physikalische und chemische Prozesse in Mikropartikel zerfallen (LeGeros et al. 1988; Ishaug et al. 1997; Hutmacher 2000; Lu et al. 2002). Diese Mikropartikel können von in den Osteoklastenkulturen befindlichen Zellen des angeborenen Immunsystems als Fremdkörper erkannt und phagozytiert werden. Sowohl die Phagozytose von Mikropartikeln als auch damit einhergehend die Freisetzung von unterschiedlichen proinflammatorischen Zytokinen konnte bislang insbesondere für Kalziumphosphat-basierte, gesinterte Biomaterialien wie Hydroxylapatit und β -Trikalziumphosphat nachgewiesen werden (Lange et al. 2009; Lange et al. 2011).

Obgleich gemäß morphologischer Kriterien der reifen Osteoklasten keine signifikanten Unterschiede der Osteoklastendifferenzierung in den Ansätzen von Biobon, Calcibon und Chronos zu verzeichnen waren (Abb. 10), zeigte sich eine deutlich erhöhte Resorbierbarkeit von Calcibon im Vergleich zu Chronos und Biobon (Abb. 17). Während einige *in vivo* Studien Biobon als gute Alternative zur Transplantation von autologem Knochen postulierten (Linhart et al. 2003) und eine teilweise Durchbauung des Materials durch neuen Knochen beobachtet wurde, konnten auch noch nach 2 bis 12 Monaten Überreste dieses Biomaterials im humanen Knochen röntgenologisch nachgewiesen werden (Sarkar et al. 2001). Diese erniedrigte Resorbierbarkeit von Biobon ist auch *in vitro* nachzuweisen und demnach in dieser Hinsicht Knochenersatzmaterialien aus humanem oder bovinem Knochen deutlich unterlegen. Allerdings könnte diese Eigenschaft bei bestimmten Knochenerkrankungen wie beispielsweise der *high-turn-over* Osteoporose (Adler 2009) von Vorteil sein, da hier primär eine gute Stabilität des Knochenersatzmaterials gewährleistet sein muss, die der erhöhten Resorptionsaktivität der Osteoklasten lange standhält. In mehreren klinischen Studien wurde Biobon mit Chronos verglichen (Kuemmerle et al. 2005; Oberle et al. 2005). Es zeigte sich, dass Chronos gute osteokonduktive Eigenschaften aufwies und durch eine hohe Biokompatibilität und Resorbierbarkeit

ausgezeichnet ist, wobei allerdings häufig fibrotische Gewebearrangungen an der Kontaktstelle zwischen Knochen und Biomaterial beobachtet wurden. Allerdings ist nicht davon auszugehen, dass die beobachtete Fibrose primär durch eine Malfunktion von resorbierenden Osteoklasten ausgeht, da in den Zellkulturansätzen mit Chronos die Differenzierung der Osteoklasten unbeeinflusst war (Abb. 10).

5.3 Vergleich des relativen Resorptionskoeffizienten (RRC) der untersuchten Biomaterialien

Die alleinige quantitative Erhebung der osteoklastären Resorption auf dem untersuchten Biomaterial unterliegt häufig extremen Schwankungen, da keine standardisierte und einheitliche Methode zur Osteoklastendifferenzierung existiert und absolute Resorptionswerte demnach schon alleine durch die Effizienz der angewandten Zellkulturansätze beeinflusst werden. Um dieses Problem zu umgehen und die Resorbierbarkeit von Biomaterialien international vergleichen zu können, wurde der standardisierte Parameter RRC (*relative resorbability coefficient*) eingeführt, der den Resorptionsquotienten aus Biomaterial und Dentin repräsentiert (Schilling et al. 2004). Der RRC bietet den Vorteil, dass Differenzen in der Art der Osteoklastendifferenzierung neutralisiert werden, da die Resorption des Biomaterials auf die der Dentinchips normalisiert wird. Zudem wird ersichtlich, inwiefern die untersuchten Biomaterialien Substanzen und Abbauprodukte in das Medium abgeben, die die Knochenresorption nachhaltig beeinflussen. Ein RRC von 1 bedeutet also, dass die quantitative Resorption auf dem Biomaterial der auf im gleichen Kulturansatz vorhandenen Dentinchips entspricht.

Nachdem zur Errechnung des RRCs die prozentuale Resorption der Biomaterialien auf die der Dentinchips normalisiert wurde, konnten aufgrund der porösen Oberflächenbeschaffenheit einiger Biomaterialien erneut nur Tutogen human, Tutogen bovin, Calcibon, Biobon und Chronos untereinander verglichen werden (Kapitel 4.3.2). Bei der Erhebung des RRC der auswertbaren Biomaterialien zeigte sich, dass die höchsten Werte bei Tutogen bovin und Tutogen human festgestellt werden konnten (Abb.20). Erneut wies Tutogen bovin einen signifikant höheren RRC auf als Tutogen human, was auf eine sehr hohe Resorbierbarkeit von Tutogen bovin hindeutet, die über der von menschlichem Knochen liegt. Demnach könnte sich Tutogen bovin gut als Knochenersatzmaterial

bei Patienten mit *low-turn-over* Osteoporose (Adler 2009) eignen, ist aber bei Erkrankungen mit hoher Knochenumbaurate mit Vorsicht einzusetzen. Im Gegensatz dazu wiesen Biobon, Chronos und Calcibon die geringsten RRCs auf, sodass sich diese Substanzen für Patienten mit erhöhtem Knochenumbau eignen könnten, da eine verfrühte Resorption des Knochenersatzmaterials nicht zu befürchten wäre.

5.4 Evaluierung des angewandten Modells

Die Relevanz des RRC zeigt sich deutlich am Beispiel von Biobon und Calcibon. Obgleich quantitativ betrachtet erheblich mehr Biomaterial und auch Dentin in den Ansätzen von Calcibon resorbiert wurde als bei Biobon (Abb. 17), ist der RRC annähernd gleich (Abb. 20). Dies könnte zum einen durch Unterschiede in der Ausplattierung der initialen Zellen bedingt sein (Kapitel 3.2.2, 3.2.3), zum anderen aber auch darauf hindeuten, dass Biobon Substanzen in das Kulturmedium abgibt, die sich negativ auf die Osteoklastendifferenzierung und -funktion auswirken. Übereinstimmend damit waren am Ende der 4-wöchigen Differenzierungszeit im Ansatz mit Biobon signifikant weniger Osteoklasten zu zählen als in Anwesenheit von Calcibon (Abb. 10). Diese Beobachtung macht deutlich, dass idealerweise bei diesem Modell eine separate Kontrolle für jeden Ansatz benötigt wird, in der allein Dentinchips vorhanden sind. Somit könnte eindeutig differenziert werden, ob beobachtete Unterschiede vom Ausplattieren der Zellen herrühren oder durch von Biomaterialien freigegebene Substanzen bedingt sind, die nachhaltig die Osteoklastendifferenzierung und -funktion beeinflussen.

Darüber hinaus ist es mit diesem Modell nicht abschließend möglich, die absolute Resorption der Biomaterialien quantitativ zu bestimmen. Aufgrund der 2-dimensionalen Quantifizierung (fotographische Abbildung und Quantifizierung der Dentinchips sowie die rasterelektronenmikroskopische Darstellung und Bearbeitung mit den entsprechenden Bildanalyseprogrammen) ist es einzig möglich, die Fläche, nicht jedoch die Tiefe der Resorptionslakunen zu bestimmen. Nachdem die Knochenresorption allerdings durch 3-dimensionale Abläufe charakterisiert ist, erscheint eine zusätzliche Quantifizierung der Resorptionstiefe erstrebenswert. Damit könnte das komplette Resorptionsvolumen errechnet werden, was einen höheren Informationsgehalt über die Resorbierbarkeit der Materialien und des RRCs ermöglichen würde.

Während im angewandten Modell die Resorbierbarkeit durch Osteoklasten analysiert wurde, konnten keine Rückschlüsse auf die osteoinduktiven, also auf die die Osteoblastenreifung stimulierenden Eigenschaften der Knochenersatzmaterialien gezogen werden. Dies ist von hoher klinischer Relevanz, da resorbiertes Biomaterial idealerweise durch endogenen Knochen ersetzt wird und somit in einer vollständigen *restitutio ad integrum* resultieren sollte. Während verschiedene Co-Kultursysteme etabliert werden konnten, die die bidirektionale Kommunikation zwischen Osteoklasten und Osteoblasten ansatzweise imitieren konnten, fehlen diese Modelle in Hinblick auf osteokonduktive und osteoinduktive Eigenschaften der Biomaterialien. Auch sind primär generierte Zellen wie Osteoklasten sowie Osteoblasten nur zeitlich begrenzt unter Laborbedingungen kultivierbar, so dass eine teilweise oder vollständige Resorption und anschließende Durchbauung des jeweiligen Biomaterials nicht zu erwarten ist (Zhang et al. 2012). Obgleich in dieser Studie die Resorbierbarkeit der Biomaterialien detailliert untersucht werden konnte, ist für eine genaue Charakterisierung der Knochenersatzmaterialien die Entwicklung eines System notwendig, welches sowohl die Resorption als auch die osteoinduktiven Eigenschaften der Materialien *in vitro* simulieren kann.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Durch *in vitro* Kultivierung von Osteoklasten auf Biomaterialien und Dentin wurde ein System entwickelt, das das Verhältnis von Resorption auf Biomaterial zu der auf Knochen/Dentin quantitativ erfasst. Der international standardisierte Parameter hierfür ist der RRC (*relative resorbability coefficient*) (Schilling et al. 2004). Durch Berechnung des RRC wurden in dieser Studie erstmals experimentell und klinisch verwendete biologische und synthetische Biomaterialien (Tutogen human, Tutogen bovin, Calcibon, Biobon, Chronos, Cerapatite, Calciresorb, Cerasorb, Perossal, Cerasorb M und Lactosorb) bezüglich ihrer Resorbierbarkeit miteinander verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass die Biokompatibilität der verschiedenen Biomaterialien *in vitro* unterschiedlich ist, dass die Resorptionsgeschwindigkeiten sich unterscheiden und dass das Biomaterial über lokale Veränderung des pH-Werts unter 6,9 die Osteoklastogenese negativ beeinflusst. Besonders deutlich wurde dies bei Biobon, hier zeigten sich deutlich saurere pH-Werte mit einem Maximum bei pH 6,62. Biobon und Perossal wirkten sich negativ auf die Differenzierung von Vorläuferzellen zu humanen Osteoklasten aus und zeigten die geringste Resorption auf Dentin. Die höchste Zahl Zellkerne pro Osteoklast zeigte sich bei Tutogen human und Tutogen bovin, wohingegen die geringste Anzahl in den Zellkulturen mit Perossal beobachtet werden konnte. Abgesehen von Chronos, in dessen Ansatz der Mittelwert der Resorption auf Dentin bei 54,6% lag, bewegten sich die Mittelwerte der übrigen Biomaterialien alle um einen Wert von 80%. Die höchsten Resorptionsraten auf Biomaterial waren bei Tutogen bovin und Tutogen human zu verzeichnen, die niedrigste zeigte Biobon. Die größte Übereinstimmung in Resorption auf Dentin und Resorption auf Biomaterial (RRC-Mittelwert) ergab sich bei Tutogen bovin, bei dem auch der höchste Mittelwert für Resorption auf seiner Oberfläche bestand. Die geringsten RRC-Mittelwerte fanden sich bei Biobon und Chronos.

Zusammenfassend wiesen biologische Knochenersatzstoffe eine insgesamt hohe Resorbierbarkeit auf, während synthetische deutlich verzögert durch humane Osteoklasten abgebaut werden konnten. Die Ergebnisse dieser Studie können demnach dazu beitragen, die Auswahl eines Biomaterials für individuelle Patienten mit erhöhtem oder erniedrigtem Knochenumbau zu optimieren.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Adler, R. A. (2009). *Osteoporosis: Pathophysiology and Clinical Management (Contemporary Endocrinology)*, Humana Press.
- Aldinger, G., A. Beyer, U. Schmid and G. Herr (1996). "[Fundamental aspects of osteoinductive activity of bone tissue and potential clinical application]." *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 134(3): 205-9.
- Amling, M., A. F. Schilling, P. Pogoda, M. Priemel and J. M. Rueger (2006). "Biomaterials and bone remodeling: The physiologic process required of biologization of bone substitutes." *Eur J Trauma* 32(2): 102-106.
- Andrew, J. G., J. Hoyland, A. J. Freemont and D. Marsh (1993). "Insulinlike growth factor gene expression in human fracture callus." *Calcif Tissue Int* 53(2): 97-102.
- Aubin, J. E. (2001). "Regulation of osteoblast formation and function." *Rev Endocr Metab Disord* 2(1): 81-94.
- Baron, R. (1995). "Molecular mechanisms of bone resorption. An update." *Acta Orthop Scand Suppl* 266: 66-70.
- Bauer, T. W. (2007). "Bone graft substitutes." *Skeletal Radiol* 12(36): 1105-7.
- Bauer, T. W. and G. F. Muschler (2000). "Bone graft materials. An overview of the basic science." *Clin Orthop Relat Res*(371): 10-27.
- Bellido, T., R. L. Jilka, B. F. Boyce, G. Girasole, H. Broxmeyer, S. A. Dalrymple, R. Murray and S. C. Manolagas (1995). "Regulation of interleukin-6, osteoclastogenesis, and bone mass by androgens. The role of the androgen receptor." *J Clin Invest* 6(95): 2886-95.
- Benghuzzi, H., A. Puckett, M. Tucci and B. Roberts (1999). "Bioceramics surface modification by means of osteoclasts in culture." *Biomed Sci Instrum* 35: 321-6.
- Bolander, M. E. (1992). "Regulation of fracture repair by growth factors." *Proc Soc Exp Biol Med* 200(2): 165-70.
- Boyde, A., N. N. Ali and S. J. Jones (1984). "Resorption of dentine by isolated osteoclasts in vitro." *Br Dent J* 156(6): 216-20.

- Bucay, N., I. Sarosi, C. R. Dunstan, S. Morony, J. Tarpley, C. Capparelli, S. Scully, H. L. Tan, W. Xu, D. L. Lacey, W. J. Boyle and W. S. Simonet (1998). "osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification." *Genes Dev* 12(9): 1260-8.
- Burchardt, H. (1983). "The biology of bone graft repair." *Clin Orthop Relat Res*(174): 28-42.
- Burr, D. B. (1993). "Remodeling and the repair of fatigue damage." *Calcif Tissue Int* 53 Suppl 1: S75-80; discussion S80-1.
- Carter, D. R., G. S. Beaupre, N. J. Giori and J. A. Helms (1998). "Mechanobiology of skeletal regeneration." *Clin Orthop Relat Res*(355 Suppl): S41-55.
- Chambers, J. J. and M. A. Horton (1984). "Osteoclasts: putative, surrogate and authentic." *J Pathol* 4(4): 295-6.
- Chen, D., M. Zhao and G. R. Mundy (2004). "Bone morphogenetic proteins." *Growth Factors* 22(4): 233-41.
- Cumano, A. and I. Godin (2007). "Ontogeny of the hematopoietic system." *Annu Rev Immunol* 25: 745-85.
- David, J. P., L. Neff, Y. Chen, M. Rincon, W. C. Horne and R. Baron (1998). "A new method to isolate large numbers of rabbit osteoclasts and osteoclast-like cells: application to the characterization of serum response element binding proteins during osteoclast differentiation." *J Bone Miner Res* 13(11): 1730-8.
- DeHeer, D. H., J. A. Engels, A. S. DeVries, R. H. Knapp and J. D. Beebe (2001). "In situ complement activation by polyethylene wear debris." *J Biomed Mater Res* 54(1): 12-9.
- Domon, T., M. Osanai, M. Yasuda, E. Seki, S. Takahashi, T. Yamamoto and M. Wakita (1997). "Mononuclear odontoclast participation in tooth resorption: the distribution of nuclei in human odontoclasts." *Anat Rec* 249(4): 449-57.
- Dorozhkin, S. V. and M. Epple (2002). "Biological and medical significance of calcium phosphates." *Angew Chem Int Ed Engl* 41(17): 3130-46.
- Ducy, P. and G. Karsenty (2000). "The family of bone morphogenetic proteins." *Kidney Int* 57(6): 2207-14.

- Ehrler, D. M. and A. R. Vaccaro (2000). "The use of allograft bone in lumbar spine surgery." *Clin Orthop Relat Res*(371): 38-45.
- Fernandez-Tresguerres-Hernandez-Gil, I., M. A. Alobera-Gracia, M. del-Canto-Pingarron and L. Blanco-Jerez (2006). "Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue." *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 11(1): E47-51.
- Fleming, J. E., Jr., C. N. Cornell and G. F. Muschler (2000). "Bone cells and matrices in orthopedic tissue engineering." *Orthop Clin North Am* 31(3): 357-74.
- Fournier, E. (1995). "[Incidents and side effects of metallic orthopedic and odontologic prostheses]." *Bull Acad Natl Med* 179(3): 507-16.
- Frost, H. M. (1987). "Bone "mass" and the "mechanostat": a proposal." *Anat Rec* 219(1): 1-9.
- Geneser, F. (1990). *Histologie*. Köln, Deutscher Ärzte-Verlag.
- Gierse, H. and K. Donath (1999). "Reactions and complications after the implantation of Endobon including morphological examination of explants." *Arch Orthop Trauma Surg* 119(5-6): 349-55.
- Girasole, G., R. L. Jilka, G. Passeri, S. Boswell, G. Boder, D. C. Williams and S. C. Manolagas (1992). "17 beta-estradiol inhibits interleukin-6 production by bone marrow-derived stromal cells and osteoblasts in vitro: a potential mechanism for the antiosteoporotic effect of estrogens." *J Clin Invest* 3(89): 883-91.
- Goker, H., I. C. Haznedaroglu and N. J. Chao (2001). "Acute graft-vs-host disease: pathobiology and management." *Exp Hematol* 29(3): 259-77.
- Goldberg, V. M. (2000). "Selection of bone grafts for revision total hip arthroplasty." *Clin Orthop Relat Res*(381): 68-76.
- Gomi, K., B. Lowenberg, G. Shapiro and J. E. Davies (1993). "Resorption of sintered synthetic hydroxyapatite by osteoclasts in vitro." *Biomaterials* 14(2): 91-6.
- Grupp, T. M., T. Weik, W. Bloemer and H. P. Knaebel (2010). "Modular titanium alloy neck adapter failures in hip replacement--failure mode analysis and influence of implant material." *BMC Musculoskelet Disord* 4(11): 3.
- Herr, G. and U. Schmid (2001). "Wirkung verschiedener Verfahren zur Keiminaktivierung auf die BMP-Aktivität von Knochengewebe." *Trauma Berufskrankh* 3: 288-292.

- Hutmacher, D. W. (2000). "Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage." *Biomaterials* 21(24): 2529-43.
- Hynes, R. O. (1987). "Integrins: a family of cell surface receptors." *Cell* 48(4): 549-54.
- Ishaug, S. L., G. M. Crane, M. J. Miller, A. W. Yasko, M. J. Yaszemski and A. G. Mikos (1997). "Bone formation by three-dimensional stromal osteoblast culture in biodegradable polymer scaffolds." *J Biomed Mater Res* 36(1): 17-28.
- Jones, S. J., A. Boyde and N. N. Ali (1984). "The resorption of biological and non-biological substrates by cultured avian and mammalian osteoclasts." *Anat Embryol (Berl)* 170(3): 247-56.
- Karsenty, G. (1999). "The genetic transformation of bone biology." *Genes Dev* 13(23): 3037-51.
- Kawaguchi, H., D. Chikazu, K. Nakamura, M. Kumegawa and Y. Hakeda (2000). "Direct and indirect actions of fibroblast growth factor 2 on osteoclastic bone resorption in cultures." *J Bone Miner Res* 15(3): 466-73.
- Knaepler, H., F. Koch and H. Bugany (1992). "[Studies on HIV inactivation in allogeneic bone transplants using chemical disinfection and radioactive irradiation]." *Unfallchirurgie* 18(1): 1-6.
- Knaepler, H., T. von Garrel, H. M. Seipp and R. Ascherl (1992). "[Experimental studies of thermal disinfection and sterilization of allogeneic bone transplants and their effects on biological viability]." *Unfallchirurg* 95(10): 477-84.
- Kobbe, P., I. S. Tarkin, M. Frink and H. C. Pape (2008). "[Voluminous bone graft harvesting of the femoral marrow cavity for autologous transplantation. An indication for the "Reamer-Irrigator-Aspirator-" (RIA-)technique]." *Unfallchirurg* 111(6): 469-72.
- Kong, Y. Y., H. Yoshida, I. Sarosi, H. L. Tan, E. Timms, C. Capparelli, S. Morony, A. J. Oliveira-dos-Santos, G. Van, A. Itie, W. Khoo, A. Wakeham, C. R. Dunstan, D. L. Lacey, T. W. Mak, W. J. Boyle and J. M. Penninger (1999). "OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis." *Nature* 397(6717): 315-23.
- Kuemmerle, J. M., A. Oberle, C. Oechslin, M. Böhner, C. Frei, I. Boecklen and B. von Rechenberg (2005). "Assessment of the suitability of a new brushite calcium

- phosphate cement for cranioplasty - an experimental study in sheep." *J Craniomaxillofac Surg* 33(1): 37-44.
- Kurz, L. T., S. R. Garfin and R. E. Booth, Jr. (1989). "Harvesting autogenous iliac bone grafts. A review of complications and techniques." *Spine* 14(12): 1324-31.
- Lacey, D. L., E. Timms, H. L. Tan, M. J. Kelley, C. R. Dunstan, T. Burgess, R. Elliott, A. Colombero, G. Elliott, S. Scully, H. Hsu, J. Sullivan, N. Hawkins, E. Davy, C. Capparelli, A. Eli, Y. X. Qian, S. Kaufman, I. Sarosi, V. Shalhoub, G. Senaldi, J. Guo, J. Delaney and W. J. Boyle (1998). "Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation." *Cell* 93(2): 165-76.
- Lambrecht, J. T. (1990). "[Cell cultures of human osteoclasts for testing biomaterials]." *Dtsch Zahnarztl Z* 45(2): 82-6.
- Lange, T., A. F. Schilling, F. Peters, F. Haag, M. M. Morlock, J. M. Rueger and M. Amling (2009). "Proinflammatory and osteoclastogenic effects of beta-tricalciumphosphate and hydroxyapatite particles on human mononuclear cells in vitro." *Biomaterials* 30(29): 5312-8.
- Lange, T., A. F. Schilling, F. Peters, J. Mujas, D. Wicklein and M. Amling (2011). "Size dependent induction of proinflammatory cytokines and cytotoxicity of particulate beta-tricalciumphosphate in vitro." *Biomaterials* 32(17): 4067-75.
- Leeuwenburgh, S., P. Layrolle, F. Barrere, J. de Bruijn, J. Schoonman, C. A. van Blitterswijk and K. de Groot (2001). "Osteoclastic resorption of biomimetic calcium phosphate coatings in vitro." *J Biomed Mater Res* 56(2): 208-15.
- LeGeros, R. Z., J. R. Parsons, G. Daculsi, F. Driessens, D. L. Lee, S. T., S. Metsger, D. Peterson and M. Walker (1988). "Significance of the porosity and physical chemistry of calcium phosphate ceramics. Biodegradation-bioresorption." *Ann N Y Acad Sci* 523: 268-71.
- Liewehr, F. R., D. W. Craft, P. D. Primack, J. C. Kulild, D. K. Turgeon, D. E. Sutherland, G. S. Schuster and D. H. Pashley (1995). "Effect of bisphosphonates and gallium on dentin resorption in vitro." *Endod Dent Traumatol* 11(1): 20-6.
- Linhart, W., D. Briem, N. D. Schmitz, M. Priemel, W. Lehmann and J. M. Rueger (2003). "[Treatment of metaphyseal bone defects after fractures of the distal radius.

- Medium-term results using a calcium-phosphate cement (BIOBON)]." *Unfallchirurg* 106(8): 618-24.
- Linnemann, M., M. Köhl, T. Holletz and S. Güler (2002). *Biochemie für Mediziner: Ein Lern- und Arbeitsbuch mit klinischem Bezug*.
- Lu, J., M. Descamps, J. Dejou, G. Koubi, P. Hardouin, J. Lemaitre and J. P. Proust (2002). "The biodegradation mechanism of calcium phosphate biomaterials in bone." *J Biomed Mater Res* 63(4): 408-12.
- Markiewicz, M. R., J. E. Margarone, 3rd, J. H. Campbell and A. Aguirre (2005). "Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws: a review of current knowledge." *J Am Dent Assoc* 136(12): 1669-74.
- Marti, A. (2000). "Cobalt-base alloys used in bone surgery." *Injury* 31 Suppl 4: 18-21.
- Matsuoka, H., T. Nakamura, H. Takadama, S. Yamada, J. Tamura, Y. Okada, M. Oka and T. Kokubo (1998). "Osteoclastic resorption of bone-like apatite formed on a plastic disk as an in vitro assay system." *J Biomed Mater Res* 42(2): 278-85.
- Matsuzaki, K., N. Udagawa, N. Takahashi, K. Yamaguchi, H. Yasuda, N. Shima, T. Morinaga, Y. Toyama, Y. Yabe, K. Higashio and T. Suda (1998). "Osteoclast differentiation factor (ODF) induces osteoclast-like cell formation in human peripheral blood mononuclear cell cultures." *Biochem Biophys Res Commun* 8(246(1)): 199-204.
- Monchau, F., A. Lefevre, M. Descamps, A. Belquin-myrdycz, P. Laffargue and H. F. Hildebrand (2002). "In vitro studies of human and rat osteoclast activity on hydroxyapatite, beta-tricalcium phosphate, calcium carbonate." *Biomol Eng* 19(2-6): 143-52.
- Muller-Mai, C. M., S. I. Stupp, C. Voigt and U. Gross (1995). "Nanoapatite and organoapatite implants in bone: histology and ultrastructure of the interface." *J Biomed Mater Res* 29(1): 9-18.
- Mundy, G. R. (1996). "Regulation of bone formation by bone morphogenetic proteins and other growth factors." *Clin Orthop Relat Res*(324): 24-8.
- Oberle, A., F. Theiss, M. Böhner, J. Müller, S. B. Kastner, C. Frei, I. Boeckel, K. Zlinszky, S. Wunderlin, J. A. Auer and B. von Rechenberg (2005). "[Investigation about the

- clinical use of brushite- and hydroxylapatite-cement in sheep]." *Schweiz Arch Tierheilkd* 147(11): 482-90.
- Onoda, S., M. Sakuraba, T. Asano, S. Miyamoto, Y. Beppu, H. Chuman, A. Kawai, F. Nakatani and Y. Kimata (2011). "Use of vascularized free fibular head grafts for upper limb oncologic reconstruction." *Plast Reconstr Surg* 3(127): 1244-53.
- Piper, K., A. Boyde and S. J. Jones (1992). "The relationship between the number of nuclei of an osteoclast and its resorptive capability in vitro." *Anat Embryol (Berl)* 186(4): 291-9.
- Prymak, O., D. Bogdanski, M. Koller, S. A. Esenwein, G. Muhr, F. Beckmann, T. Donath, M. Assad and M. Epple (2005). "Morphological characterization and in vitro biocompatibility of a porous nickel-titanium alloy." *Biomaterials* 26(29): 5801-7.
- Ralston, S. H. (1997). "What determines peak bone mass and bone loss?" *Baillieres Clin Rheumatol* 11(3): 479-94.
- Reddi, A. H. (1998). "Initiation of fracture repair by bone morphogenetic proteins." *Clin Orthop Relat Res*(355 Suppl): S66-72.
- Reddi, A. H., S. Wientroub and N. Muthukumaran (1987). "Biologic principles of bone induction." *Orthop Clin North Am* 18(2): 207-12.
- Riggs, B. L. and L. J. Melton, 3rd (1986). "Involutional osteoporosis." *N Engl J Med* 314(26): 1676-86.
- Robey, P. G., N. S. Fedarko, T. E. Hefferan, P. Bianco, U. K. Vetter, W. Grzesik, A. Friedenstein, G. Van der Pluijm, K. P. Mintz, M. F. Young and et al. (1993). "Structure and molecular regulation of bone matrix proteins." *J Bone Miner Res* 8 Suppl 2: S483-7.
- Ross, F. P. and A. M. Christiano (2006). "Nothing but skin and bone." *J Clin Invest* 5(116): 1140-9.
- Rössler and Rüter (1997). *Orthopädie*. München-Wien-Baltimore, Urban & Schwarzenberg.
- Rueger, J. M. (1996). "[Bone substitutes. State of the art and: what lies ahead?]." *Unfallchirurg* 99(3): 228-36.

- Rueger, J. M. (1998). "[Bone substitution materials. Current status and prospects]." *Orthopade* 27(2): 72-9.
- Ruff, C., B. Holt and E. Trinkaus (2006). "Who's afraid of the big bad Wolff?: "Wolff's law" and bone functional adaptation." *Am J Phys Anthropol* 129(4): 484-98.
- Ruoslahti, E. and M. D. Pierschbacher (1987). "New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins." *Science* 238(4826): 491-7.
- Sabokbar, A., Y. Fujikawa, D. W. Murray and N. A. Athanasou (1998). "Bisphosphonates in bone cement inhibit PMMA particle induced bone resorption." *Ann Rheum Dis* 57(10): 614-8.
- Sano, G. and K. Matsuo (2008). "[Assessment of bone quality. Bone remodeling and bone quality]." *Clin Calcium* 18(3): 315-20.
- Sarkar, M. R., N. Wachter, P. Patka and L. Kinzl (2001). "First histological observations on the incorporation of a novel calcium phosphate bone substitute material in human cancellous bone." *J Biomed Mater Res* 58(3): 329-34.
- Schenk, R. and H. Willenegger (1963). "[on the Histological Picture of So-Called Primary Healing of Pressure Osteosynthesis in Experimental Osteotomies in the Dog]." *Experientia* 19: 593-5.
- Schenk, R. and H. Willenegger (1977). "Zur Histologie der primären Knochenheilung." *Unfallheilkunde* 80: 155-160.
- Schenk, R. K., D. Spiro and J. Wiener (1967). "Cartilage resorption in the tibial epiphyseal plate of growing rats." *J Cell Biol* 34(1): 275-91.
- Schilling, A. F., W. Linhart, S. Filke, M. Gebauer, T. Schinke, J. M. Rueger and M. Amling (2004). "Resorbability of bone substitute biomaterials by human osteoclasts." *Biomaterials* 25(18): 3963-72.
- Schinke, T., M. D. McKee and G. Karsenty (1999). "Extracellular matrix calcification: where is the action?" *Nat Genet* 21(2): 150-1.
- Sen, M. K. and T. Miclau (2007). "Autologous iliac crest bone graft: should it still be the gold standard for treating nonunions?" *Injury* 1(38): 75-80.
- Shalhoub, V., J. Faust, W. J. Boyle, C. R. Dunstan, M. Kelley, S. Kaufman, S. Scully, G. Van and D. L. Lacey (1999). "Osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand effects

- on osteoclast formation from human peripheral blood mononuclear cell precursors." *J Cell Biochem* 72(2): 251-61.
- Sheppard, C. and D. Shotton (1997). *Confocal Laser Scanning Microscopy*, Bios Scientific Publ.
- Shibutani, T. and J. N. Heersche (1993). "Effect of medium pH on osteoclast activity and osteoclast formation in cultures of dispersed rabbit osteoclasts." *J Bone Miner Res* 8(3): 331-6.
- Simonet, W. S., D. L. Lacey, C. R. Dunstan, M. Kelley, M. S. Chang, R. Luthy, H. Q. Nguyen, S. Wooden, L. Bennett, T. Boone, G. Shimamoto, M. DeRose, R. Elliott, A. Colombero, H. L. Tan, G. Trail, J. Sullivan, E. Davy, N. Bucay, L. Renshaw-Gegg, T. M. Hughes, D. Hill, W. Pattison, P. Campbell, S. Sander, G. Van, J. Tarpley, P. Derby, R. Lee and W. J. Boyle (1997). "Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density." *Cell* 89(2): 309-19.
- Soininvaara, T. A., J. S. Jurvelin, H. J. Miettinen, O. T. Suomalainen, E. M. Alhava and P. J. Kroger (2002). "Effect of alendronate on periprosthetic bone loss after total knee arthroplasty: a one-year, randomized, controlled trial of 19 patients." *Calcif Tissue Int* 71(6): 472-7.
- Soldner, E. and G. Herr (2001). "Knochen, Knochentransplantate und Knochenersatzmaterialien." *Trauma Berufskrankh* 3: 256-269.
- Sommer, B., R. Felix, C. Sprecher, M. Leunig, R. Ganz and W. Hofstetter (2005). "Wear particles and surface topographies are modulators of osteoclastogenesis in vitro." *J Biomed Mater Res A* 72(1): 67-76.
- Soost, F., S. Koch, C. Stoll, H. Amthauer, C. Grosse-Siestrup and P. Zorn (2001). "Validation of bone conversion in osteoconductive and osteoinductive bone substitutes." *Cell Tissue Bank* 2(2): 77-86.
- Tatsumi, S., K. Ishii, N. Amizuka, M. Li, T. Kobayashi, K. Kohno, M. Ito, S. Takeshita and K. Ikeda (2007). "Targeted ablation of osteocytes induces osteoporosis with defective mechanotransduction." *Cell Metab* 5(6): 464-75.
- Taylor, J. C., S. E. Cuff, J. P. Leger, A. Morra and G. I. Anderson (2002). "In vitro osteoclast resorption of bone substitute biomaterials used for implant site augmentation: a pilot study." *Int J Oral Maxillofac Implants* 17(3): 321-30.

- Teitelbaum, S. L. (2000). "Bone resorption by osteoclasts." *Science* 289(5484): 1504-8.
- Tomford, W. W. (1995). "Transmission of disease through transplantation of musculoskeletal allografts." *J Bone Joint Surg Am* 77(11): 1742-54.
- Tsukii, K., N. Shima, S. Mochizuki, K. Yamaguchi, M. Kinosaki, K. Yano, O. Shibata, N. Udagawa, H. Yasuda, T. Suda and K. Higashio (1998). "Osteoclast differentiation factor mediates an essential signal for bone resorption induced by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D₃, prostaglandin E₂, or parathyroid hormone in the microenvironment of bone." *Biochem Biophys Res Commun* 19(246(2)): 337-41.
- Tudor, C., S. Srour, M. Thorwarth, P. Stockmann, F. W. Neukam, E. Nkenke, K. A. Schlegel and E. Felszeghy (2008). "Bone regeneration in osseous defects-application of particulated human and bovine materials." *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 105(4): 430-6.
- Urist, M. R., A. J. Mikulski, M. Nakagawa and K. Yen (1977). "A bone matrix calcification-initiator noncollagenous protein." *Am J Physiol* 232(3): C115-27.
- Walker, D. G. (1993). "Bone resorption restored in osteopetrotic mice by transplants of normal bone marrow and spleen cells. 1975." *Clin Orthop Relat Res*(294): 4-6.
- Wedenberg, C. and S. Yumita (1990). "Evidence for an inhibitor of osteoclast attachment in dentinal matrix." *Endod Dent Traumatol* 6(6): 255-9.
- Willenegger, H., S. M. Perren and R. Schenk (1971). "[Primary and secondary healing of bone fractures]." *Chirurg* 42(6): 241-52.
- Yamada, S., D. Heymann, J. M. Bouler and G. Daculsi (1997). "Osteoclastic resorption of biphasic calcium phosphate ceramic in vitro." *J Biomed Mater Res* 37(3): 346-52.
- Yamaguchi, K., K. Masuhara, S. Yamasaki and T. Fuji (2005). "Efficacy of different dosing schedules of etidronate for stress shielding after cementless total hip arthroplasty." *J Orthop Sci* 10(1): 32-6.
- Yasuda, H., N. Shima, N. Nakagawa, K. Yamaguchi, M. Kinosaki, S. Mochizuki, A. Tomoyasu, K. Yano, M. Goto, A. Murakami, E. Tsuda, T. Morinaga, K. Higashio, N. Udagawa, N. Takahashi and T. Suda (1998). "Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(7): 3597-602.

Zhang, Z., J. T. Egaña, A. K. Reckhenrich, T. L. Schenck, J. A. Lohmeyer, J. T. Schantz, H. G. Machens and A. F. Schilling (2012). "Cell-based resorption assays for bone graft substitutes." *Acta Biomater* 8(1): 13-9.

8 DANKSAGUNG

Ein großer Dank gebührt allen, die an der Fertigstellung dieser Arbeit beteiligt waren.

Vielen Dank meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Michael Amling, der mich in dieses unglaublich liebenswerte Team geholt hat und den ich für seine Arbeit und seinen unerschütterlichen Einsatz für sein Fach sehr bewundere. Danke auch für dein Verständnis.

Danke an Arndt Schilling, der mich in der langen Zeit betreut hat und mir sehr viel beigebracht hat, der mir ein Freund geworden ist und mir gezeigt hat, dass Forschung auch ein Teil meines Lebens werden kann. Viel Erfolg weiterhin, Herr Professor, bei deiner Karriere und mit deiner wundervollen Familie.

Danke Johannes Keller, dass du dich in meine Ergebnisse und Gedanken eingelesest, Feedback gegeben, deine Hilfe nicht nur angeboten sondern auch umgesetzt und mit mir alles beendet hast. Ich kann den Stein jetzt noch plumpsen hören, der mir von der Seele gefallen ist.

Danke, Björn Busse, der so viel Zeit für mich vor und mit dem Rasterelektronenmikroskop verbracht hat und auch trotz seiner eigenen Projekte immer noch Zeit für das meinige gefunden hat. Ich rechne dir das sehr hoch an.

Danke an Sandra Filke, für mein Thema, ihre Tipps und ihre zwischenzeitliche Hilfe. Ich weiß, dass ich dir immer noch ein Essen dafür schulde.

Nicht zu vergessen: Danke dem ganzen (auch ehemaligen) Team der zunächst experimentellen Unfallchirurgie und dann Osteologie und Biomechanik, besonders aber Cordula, Tilman, Thorsten, Tobias, Claudia, Timo und Antje für die Hilfe und die guten Gespräche zwischendurch! Ebenso danke ich allen Kooperationspartnern.

Danken möchte ich meinen Eltern Loni und Klaus Brink für ihre Liebe, ohne die es mir versagt geblieben wäre diesen Weg einzuschlagen, der mich sehr glücklich macht. Danke auch für die häufige Nachfrage nach den Fortschritten bezüglich meiner Dissertation... Ich liebe Euch.

Danke, Carsten, für deine Ruhe, deine Fragen, deine Liebe. Danke, dass du auch mal nicht nachgefragt hast. Ich freue mich auf unsere gemeinsame Zukunft – ich liebe dich.

Danke an alle meine Freunde, die mir immer wieder Mut gemacht haben, weiter zu machen, nicht aufzugeben und für das dankbar zu sein, was ich schon erreicht habe. Es war erleichternd, wie ihr euch mit mir geärgert habt, wenn wieder einmal einige Ansätze und Experimente fehlgeschlagen sind. Und Danke der ständigen Nachfrage, ob ich denn jetzt endlich Frau Doktor bin oder doch nur Frau Arzt....
Wacher Ärger ist viel besser als müde Frustration.

Und letzten Endes: Danke meinem inneren Schweinehund, dass er endlich losgelassen hat und sich nicht länger in mich verbeißt. Die Wunden davon sind zwar schon längst verheilt, die Narben werden mich aber immer an diese Zeit erinnern.

9 LEBENSLAUF

entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

10 ANLAGEN

10.1 Publikationen

Schilling, A. F., Filke, S., Brink, S., Korbmacher, H., Amling, M., Rueger, J. M. (2006). "Osteoclasts and Biomaterials." Eur J Trauma 32(2): 107-113.

Schilling, A. F., 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(6A):2497-504.

10.2 Preise

Posterpreis für: „Resorption von Knochenersatzmaterialien durch humane Osteoklasten“ der 4. Hamburger Studententagung Mai 2007, Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg (Campus Bergedorf).

10.3 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, den 19.04.2012

Silja Brink