universität wien

DIPLOMARBEIT

„Austestung von Biomaterialien auf Osteoklasten“

verfasst von

Verena Kimla

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, Juni 2013

Studienkennzahl lt. Studienblatt:	A 449
Studienrichtung lt. Studienblatt:	Diplomstudium Pharmazie
Betreuer:	Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Oskar Hoffmann

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.
Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Wien, 17.06.2013

Unterschrift

Danksagung

Zunächst möchte ich Professor Hoffmann für die Zuweisung des Themas, die gute Betreuung, Motivation und Inspiration danken. Durch Einbindung in dieses großartige Team und umfassende Beschäftigung mit einer Vielzahl von Fragestellungen wurde mein Horizont wirklich erweitert.

Ebenso möchte ich Dr. Marjan Enayati und Dr. Kanthi Lewis danken, die mir beide durch ihr großes Fachwissen im Bereich der Biomaterialen weiterhelfen konnten und auch als Ansprech- und Sprachpartnerinnen immer zur Verfügung standen. Durch die gemeinsamen Diskussionen konnte ich meine sprachliche Kompetenz in Englisch sehr verbessern.

Auch meinen Studienkolleginnen Frau Carina Kampleitner und Frau Mag. Stefanie Erbler gebührt an dieser Stelle ein Wort des Dankes – die vielen gemeinsam im Labor verbrachten Stunden werden mir mein Leben lang in Erinnerung bleiben.

Weiters gilt mein Dank Frau Barbara Berger, durch deren Hilfe und großes Praxiswissen es mir erst möglich wurde, meine Experimente richtig durchzuführen und durch deren viele Tricks und Ratschläge mir eine Reihe von Arbeiten deutlich leichter von der Hand gingen.

Auch Herrn Peter Höflich bin ich zu Dank verpflichtet, der immer ein nettes Wort für mich hatte und den Arbeitsalltag sehr lebendig und freundlich gehalten hat.

Und nicht zuletzt möchte ich jenen Menschen danken, die mir mein zeit- und arbeitsintensives Studium erst ermöglicht und immer an mich geglaubt haben: meiner Familie. Zu ihnen allen konnte ich immer kommen wenn mein Akku einmal leer war und ich Zuspruch brauchte.
Ihnen gebührt wohl mein größter Dank.

Liste der verwendeten Abkürzungen und Bezeichnungen

1α,25-$(OH)_2$-Vit. D_3	1α,25-Dihydroxy-Vitamin-D_3
BMP	bone morphogenetic protein
BSA	bovine serum albumin
$CaCl_2$	Calciumchlorid
DAPI	4‘,6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid
DCPD	Calciumhydrogenphosphat-dihydrat
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
$EtOH_{abs}$	Ethanol absolut
FCS hi	fetal calf serum, heat inactivated
FCS	fetal calf serum
HA	Hydroxyapatit
HCl	Salzsäure
IGF	insulin-like growth factor
IL-1	Interleukin-1
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
LAF	Laminar Air Flow
M-CSF	macrophage colony stimulating factor
Na_2HPO_4*2 H_2O	Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat
NaN_3	Natriumazid
NaOH	Natriumhydroxid
NF-κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NGS	natural goat serum
OPG	Osteoprotegerin
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBS	phosphate buffered saline
PTH	Parathormon
PTHrP	Parathormon related peptide
RANKL	receptor activator of NF-κB ligand
TCP	Tricalciumphosphat
TGF-β	transforming growth factor β
TNF-α	Tumor-Nekrosefaktor α
TRAP	tartrat-resistent acid phosphatase
α-MEM	α-minimum essential Medium

Inhaltsverzeichnis

Danksagung **5**

Liste der verwendeten Abkürzungen und Bezeichnungen **6**

Inhaltsverzeichnis **7**

Zielsetzung **11**

1 Einleitung **12**

1.1 Knochengewebe **12**

1.1.2 Osteoblasten 12

1.1.3 Osteoklasten 14

1.1.4 Osteozyten 16

1.1.5 Saumzellen 16

1.2 Knochentransplantate **16**

1.2.1 Eigentransplantate 17

1.2.2 Fremdtransplantate 17

1.2.3 Demineralisierte Knochenmatrix (DBM) 18

1.2.4 Synthetische Materialien zur Knochentransplantation 18

1.3 Bedeutung von Biomaterialien **18**

1.4 Anforderungen an Biomaterialien **19**

1.5 Einteilung von Biomaterialien **19**

1.5.1 Polymere 20

1.5.1.1 Polyurethane 20

1.5.1.2 Silikone 20

1.5.1.3 Fluorierte Biomaterialien 20

1.5.1.4 Acrylate 21

1.5.2 Metalle 21

1.5.2.1 Titan 21

1.5.2.2 Edelstahl 21

1.5.3 Keramik, Glas, Glas-Keramik, Hydroxylapatit 21

1.5.3.1 Calciumphosphat-Keramik 22

1.5.3.2 Resorbierbare Calciumphosphate 22

1.5.3.3 Knochenzemente aus Calciumphosphat 23

1.5.3.4 Hydroxylapatit 23

1.5.4 Abbaubare und resorbierbare Biomaterialien 24
Synthetische abbaubare Polyester 24
Andere synthetische abbaubare Polymere 24
Natürliche resorbierbare Polymere 24
1.5.5 Hydrogele 25
1.5.5.1 Gelatine 25
1.5.5.2 Pektin 28
1.5.6 Kompositmaterialien 29

2 Material und Methoden 30
2.1 Reagenzien, Material, Instrumente 30
2.2 Versuchsaufbau 34
2.3 Verwendete Zellen 35
2.3.1 Osteoblasten 35
2.3.1.1 Herstellung von PBS 35
2.3.1.2 Herstellung von Trypsin-EDTA 35
2.3.1.3 Vorgangsweise 35
2.3.2 Osteoklasten 35
2.4 Nährmedienbereitung 36
2.4.1 Hitzeinaktivierung von FCS 36
2.4.2 Nährmedium für Osteoblastenkultivierung 36
2.4.3 Nährmedium für Osteoklastenkultivierung 36
2.5 Entfernen der Osteoblastenschicht 36
2.6 Fixieren der Zellen 37
2.6.1 Herstellung von PBS mit Ca^{2+}/Mg^{2+} 37
2.6.2 Fixierlösung 37
2.6.3 Konservierungslösung 37
2.6.4 Vorgangsweise 37
2.7 TRAP-Färbung 37
2.7.1 TRAP-Puffer 38
2.7.2 Aceton-Alkohol-Lösung 38
2.7.3 Färbelösung 38
2.7.4 Vorgangsweise 38
2.8 Aktin-/DAPI-Färbung 39
2.8.1 Verdünnung der AlexaFluor®-Lösung 39
2.8.2 Herstellung des DAPI-Reagens 39
2.8.3 Vorgangsweise 39

2.9 Immunfluoreszenzmarkierung 40
2.9.1 Herstellung der Lösungen 40
2.9.2 Herstellung der Alkohol-Lösungen 40
2.9.3 Vorgangsweise 40
2.10 Kombination von Immunfluoreszenzmarkierung und Aktin-/DAPI-Färbung 41
2.11 Sterilisation der Deckgläser 41
2.12 Vorbereitung der Substanzen für die Beschichtungen 41
2.12.1 Gelatine- und Pektin-Lösungen 41
2.12.2 BSA-Lösung, Konzentration 5 mg/ml 41
2.12.3 Gelatine-TCP-Suspensionen 42
2.12.4 Glutardialdehyd-Lösung 42
2.13 Beschichtung der Deckgläser 42
2.13.1 Erwärmen der Gelatinelösungen und Gelatine-TCP-Suspensionen 42
2.13.2 Beschichtungsmethode ohne Verwendung von Crosslinker 42
2.13.3 Beschichtungsmethode unter Verwendung von Crosslinker 43
2.13.4 Vorinkubation mit BSA-Lösung 44
2.14 Statistische Auswertung der erhaltenen Daten 44

3 Ergebnisse 45
3.1 Vergleich der Effekte der Beschichtungen auf Osteoklasten im Detail 46
3.1.1 Gelatine Typ A, 300 g Bloom 46
3.1.1.1 TRAP+ Osteoklasten auf Beschichtungen ohne und mit TCP 46
3.1.1.2 Ergebnisse der Aktin-/DAPI-Färbung 48
3.1.1.3 Morphologie der gebildeten Osteoklasten 48
3.1.2 Gelatine Typ A, 90 – 110 g Bloom 51
3.1.2.1 TRAP+ Osteoklasten auf Beschichtungen ohne und mit TCP 51
3.1.2.2 Ergebnisse der Aktin-/DAPI-Färbung 52
3.1.2.3 Morphologie der gebildeten Osteoklasten 53
3.1.3 Gelatine Typ A, 300 g/90 – 110 g Bloom 55
3.1.3.1 TRAP+ Osteoklasten auf Beschichtungen ohne und mit TCP 55
3.1.3.2 Ergebnisse der Aktin-/DAPI-Färbung 56
3.1.4 Gelatine Typ B 57
3.1.4.1 TRAP-positive Osteoklasten 57
3.1.5 Gelatine Typ B/Typ A, 300 g Bloom 59
3.1.5.1 TRAP+ Osteoklasten auf Beschichtungen ohne und mit TCP 59

3.1.6 Gelatine Typ B/Typ A, 90 - 110 g Bloom 60
3.1.6.1 TRAP+ Osteoklasten auf Beschichtungen ohne und mit TCP.....60
3.1.7 Gelatine p.a.....62
3.1.7.1 TRAP+ Osteoklasten auf Beschichtungen ohne und mit TCP.....62
3.1.7.2 Ergebnisse der Aktin-/DAPI-Färbung 64
3.1.7.3 Morphologie der gebildeten Osteoklasten 64
3.1.8 Pektin 66
3.1.8.1 TRAP+ Osteoklasten auf Beschichtungen ohne und mit TCP.....66
3.1.8.2 Ergebnisse der Aktin-/DAPI-Färbung 66
3.1.8.3 Morphologie der gebildeten Osteoklasten 67
3.1.9 Gelatine p.a./Pektin 69
3.1.9.1 TRAP+ Osteoklasten auf Beschichtungen ohne und mit TCP.....69
3.1.9.2 Ergebnisse der Aktin-/DAPI-Färbung 70
3.1.9.3 Morphologie der gebildeten Osteoklasten 70
3.2 Überblick über TRAP+ OC auf allen Beschichtungstypen 72
3.2.1 Beschichtungen ohne TCP 72
3.2.2 Beschichtungen mit TCP.....75
3.3 Vergleich der TRAP+ OC auf Beschichtungen ohne und mit TCP... 78
3.4 Überblick über Ergebnisse der Aktin-/DAPI-Färbung 81
3.5 Mikroskopisches Analyse der Gelatine-TCP-Suspensionen 84
3.6 Immunfluoreszenzmarkierung 85
4 Diskussion..... 91
5 Zusammenfassung 97
6 Literaturverzeichnis 99
7 Abbildungsverzeichnis.....104
8 Tabellenverzeichnis.....108
9 Lebenslauf 109

Zielsetzung

Synthetische Knochentransplantate haben großen Nutzen zur Behebung von Knochenschäden, wie sie durch Frakturen, Krankheiten wie Knochentumoren und Infektionen entstehen können.
Gelatine stellt als denaturierte und daher weniger allergene Form von Kollagen, dem organischen Hauptbestandteil des Knochens, eine Alternative zu biologischem Material dar. Tricalciumphosphat kann in Biomaterialien den anorganischen Anteil des Knochens nachahmen, weswegen eine Kombination aus Gelatine und Tricalciumphosphat ein potentiell günstiges Biomaterial darstellt.
Ziel dieser Arbeit war daher die Untersuchung des Effekts von verschiedenen Gelatinetypen und Pektin alleine und in Kombination mit Tricalciumphosphat auf Osteoklastenbildung, sowie deren Zytoskelett und Kernmorphologie. Außerdem sollte die Wirkung der Beschichtungen auf zelluläre Funktionen wie Resorptionsprozesse, Zelladhäsion und Zell-Interaktion untersucht werden.
Die durch diese Arbeit gewonnenen Informationen können zur Entwicklung von Biomaterialen beitragen, die je nach Anwendung gezielt aus einem bestimmten Gelatinetyp aufgebaut sein können, der die Osteoklastenmorphologie und –anzahl und damit die Resorptionsrate je nach Anforderung beeinflusst.

1 Einleitung

1.1 Knochengewebe

Knochen ist ein stabiles, aber dennoch dynamisches Gewebe. Biochemisch ist es durch eine Mischung an anorganischen und organischen Elementen definiert (Kular et al., 2012).
Knochengewebe muss ständig gebildet, geformt und repariert werden, damit es seine strukturelle Integrität und seine Rolle im Mineralhaushalt aufrecht erhalten kann. Diesen Prozess des steten Knochenabbaus und -aufbaus nennt man „Bone remodelling" oder Knochenumbau. Dadurch wird die Knochenstruktur und –funktion im Erwachsenenalter maßgeblich reguliert (Boyle W, 2003), (Teitelbaum, 2000).
Der Knochenumbau ist ein komplexer Prozess, der von zwei Zelltypen gesteuert wird: von Osteoklasten und Osteoblasten (siehe Abbildung 2). Osteoklasten agieren dabei als resorptive Zellen und sind somit in der Bildung des Skeletts und der Regulation der Knochenmasse bedeutend, während Osteoblasten auf den Knochenaufbau spezialisiert sind. Osteoblasten synthetisieren Knochenmatrix, regulieren die Mineralisation des Knochens und können zu Osteozyten oder Saumzellen ausdifferenzieren (Kular et al., 2012).
Das zelluläre Zusammenspiel zwischen Aktivität von Osteoklasten und Osteoblasten wird zu einem großen Teil durch lokale und systemische Faktoren reguliert (Hill, 1998). Kommt es zu einem Ungleichgewicht entweder auf der Osteoklasten- oder Osteoblastenseite, hat dies eine Reihe von klinischen Krankheitsbildern zufolge, allen voran Osteopenie, Osteoporose und Osteopetrose (Kular et al., 2012).

1.1.2 Osteoblasten

Osteoblasten sind der einzige Zelltyp, der zur Knochenbildung befähigt ist. Sie stammen von mesenchymalen Zellen ab, die zu reifen Osteoblasten ausdifferenzieren können (Pittenger et al., 1999), (Dennis et al., 1999). Osteoblasten durchlaufen vier Reifungsstadien: Präosteoblasten, Osteoblasten, Osteozyten und Saumzellen (oder „bone lining cells") (Abbildung 1).

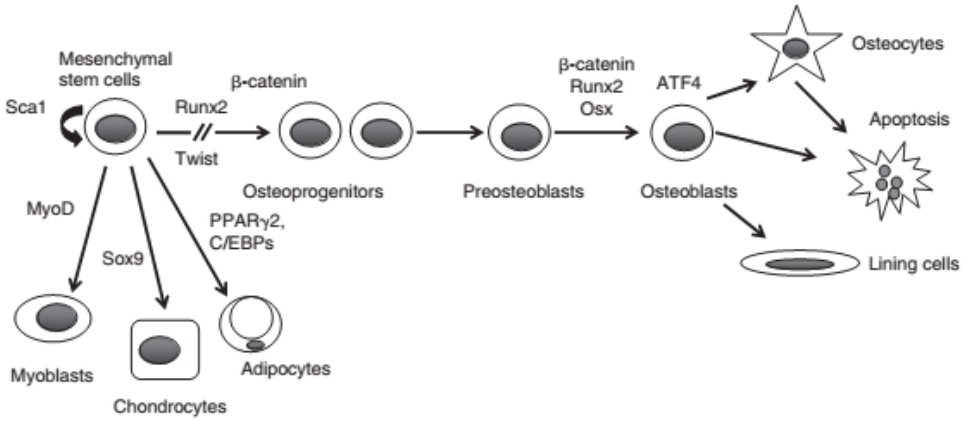


Abbildung 1: schematische Darstellung der Entwicklung von mesenchymalen Stammzellen zu Osteoblasten, Saumzellen und Osteozyten (Aubin, 2008)

Wenn die nötigen Stimuli vorhanden sind, können sich mesenchymale Stammzellen zu Präosteoblasten entwickeln. Histologisch gesehen sind diese Zellen Osteoblasten und werden auch durch die alkalische Phosphatase-Färbung angefärbt, ihnen fehlen jedoch einige Charakteristika gereifter Osteoblasten wie die Fähigkeit zur Bildung von mineralisiertem Gewebe (Aubin, 2008).

Aus den Präosteoblasten entwickeln sich reife Osteoblasten, die durch ihre kuboidale Form und hohe Expression von alkalischer Phosphatase gekennzeichnet sind. Sie befinden sich dort an der Knochenoberfläche, wo es aktiv zur Knochenbildung kommt und sezernieren Typ 1-Kollagen, den Grundbaustein von Knochen. Außerdem produzieren sie nicht-kollagenöse Proteine wie Osteocalcin und alkalische Phosphatase, die für die Bildung von mineralischer Substanz essentiell ist (Clarke, 2008).

Reife Osteoblasten können entweder in Apoptose gehen, weiter zu Osteozyten ausdifferenzieren oder zu inaktiven Saumzellen werden.

Wichtige Signalwege, die an der Osteoblastendifferenzierung und Knochenbildung beteiligt sind, sind unter anderem jene von TGF-β und BMP. Der TGF-β-Signalweg ist für die Aufrechterhaltung und Ausdifferenzierung von Osteoblastenvorläufern bedeutend und wird durch die Aktivierung von MAPKs („mitogen activated protein kinases") und den Smad-Signalweg reguliert (Derynck und Akhurst, 2007), (Matsunobu et al., 2009).

Der BMP-Signalweg ist ebenfalls von der Aktivierung von Smad abhängig. TGF-β- und BMP-Signalweg interagieren dabei miteinander, da TGF-β1 die durch BMP 2 induzierte Knochenbildung nach verstärkt (Tachi et al., 2011).

Da die primäre Funktion von Osteoblasten der Knochenaufbau ist, kommt ihnen sowohl in erstmaliger Knochenbildung, als auch im kontinuierlichen

Knochenwachstum und –umbau große Bedeutung zu. Der genaue Mechanismus der Mineralisation zur Knochenbildung ist unbekannt, jedoch wird angenommen, dass die Aktivität von alkalischer Phosphatase eine große Rolle dabei spielt (Wennberg et al., 2000).

Neben ihrer Aufgabe bei der Knochenbildung sind Osteoblasten auch bei der Differenzierung von Osteoklasten wichtig. Osteoblasten produzieren M-CSF, RANKL und OPG. Wie im folgenden Abschnitt erläutert wird, sind diese Faktoren für die Osteoklastenbildung und ihre Funktion essentiell. Zusätzlich steuern Osteoblasten auch die Wanderung von Osteoklastenvorläufern zur Knochenoberfläche durch Sekretion von Chemokinen wie Osteocalcin und Typ-1-Kollagen auf die Knochenmatrix (Malone et al., 1982). Bei der Knochenresorption durch Osteoklasten werden diese Substanzen wieder frei und locken dadurch mehr Osteoklasten an, was die Resorption erhöht.

Eine Vielzahl von Faktoren reguliert indirekt die Osteoklastogenese durch ihre Wirkung auf Osteoblasten, allen voran PTH, PTHrP, TNF-α, IL-1 und 1α,25-DiOH-Vit. D_3 (Ma et al., 2001), (Martin, 2005), (Horwood et al., 1998), (Ragab et al., 2002), (Suda et al., 1992). All diese Faktoren bewirken in Osteoblasten die Expression von RANKL, was wiederum die Osteoklastenbildung fördert.

1.1.3 **Osteoklasten**

Osteoklasten sind vielkernige Zellen, die durch Fusion von einkernigen Vorläufern der Monozyten-/Makrophagen-Familie durch Osteoklastogenese gebildet werden (Teitelbaum, 2000). Sie sind die bedeutendsten resorptiven Zellen der Knochen, und spielen eine zentrale Rolle in der Bildung des Skeletts und der Regulation seiner Masse.

Haben die Osteoklasten den Resorptionsort erreicht, kommt es durch Umstrukturierung des Zytoskeletts zur Polarisation und dadurch zu Veränderungen von verschiedenen Plasmamembrandomänen, zur Ausbildung der sogenannten „ruffled border" sowie einer „sealing"-Zone und einer Sekretionsdomäne (Li et al., 2006). Die „sealing"-Zone ist eine für Osteoklasten typische Struktur, welche die saure resorptive Umgebung vom Rest der Zelle abschirmt (Vaananen HK, 1995).

Ruffled borders und „sealing"-Zonen können nur in nicht-beweglichen Osteoklasten während der Resorptionsphase beobachtet werden und verschwinden im Lauf der Osteoklastenmigration (Li et al., 2006).

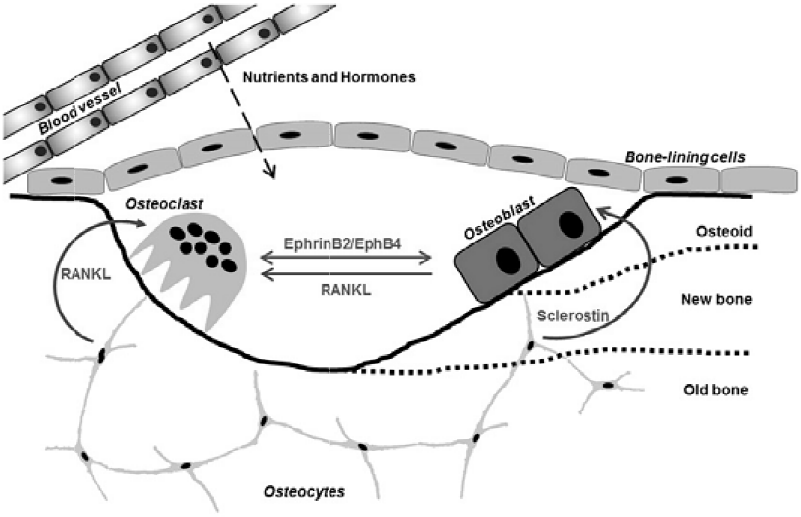


Abbildung 2: Interaktion zwischen Osteoklasten, Osteoblasten, Osteozyten, Saumzellen und endothelialen Zellen; (Kular et al., 2012)

Zur Osteoklastendifferenzierung und –fusion sind mehrere Schritte und eine Reihe von osteoklastogenen Faktoren erforderlich. Hämatopoietische Stammzellen entwickeln sich zu Osteoklastenvorläufern. Diese Vorläuferzellen benötigen zur weiteren Ausdifferenzierung die Anwesenheit von Wachstumsfaktoren, die entweder von stromalen Knochenmarkszellen, Osteoblasten oder T-Lymphozyten produziert werden (Udagawa et al., 1990). Zwei dieser für die Osteoklastogenese notwendigen Faktoren sind M-CSF und RANKL.

RANKL wird neben M-CSF ebenso von Osteoblasten, aber auch von T-Zellen und Endothelzellen produziert, ist essentiell für die Osteoklastenbildung und bindet an RANK. RANK befindet sich auf Osteoklasten und deren Vorläuferzellen (Lacey et al., 1998), (Burgess et al., 1999), (Xu et al., 2000). RANKL führt zur Ausbildung des Osteoklasten-Phänotyps von bereits durch M-CSF stimulierten Vorläuferzellen. In weiterer Folge exprimieren diese Zellen Substanzen, die für Osteoklasten spezifisch sind, wie beispielsweise TRAP („tartrate resistant acid phosphatase"). Werden die Präosteoklasten weiter durch M-CSF und RANKL stimuliert, fusionieren sie zu mehrkernigen Zellen. Von diesen Zellen werden für Osteoklasten spezifischere Substanzen wie der Calcitonin-Rezeptor und Cathepsin K produziert (Kular et al., 2012).

Die Aktivität von RANKL kann durch OPG, einem löslichen Rezeptor, antagonisiert werden (Mizuno et al., 1998). Durch Abfangen von RANKL durch OPG wird die Bindung von RANKL an seinen Rezeptor und damit in weiterer Folge die Osteoklasten-Differenzierung gehemmt (Kular et al., 2012).

1.1.4 Osteozyten

Die sternförmigen Osteozyten sind terminal ausdifferenzierte Osteoblasten, die zu einem Bestandteil der neu gebildeten Knochenmatrix werden (Bonewald, 2011). Sie liegen in der Lakune der neugebildeten Knochenmatrix und können dort sehr lange verbleiben, gehen letzten Endes dann aber in die Apoptose über. Sie sind räumlich voneinander getrennt, können aber Ausläufer bilden, über die sie sich untereinander und mit Saumzellen und Osteoblasten an der Knochenoberfläche verbinden (Dudley und Spiro, 1961), (Tanaka-Kamioka et al., 1998).
Die Hauptfunktion von Osteozyten scheint mit der Aufrechterhaltung der Knochenstruktur zusammenzuhängen, da sie wie eine Art „Mechano-Sensor" agieren. Sie können Informationen, die sie von Skelett und Muskeln erhalten, in biologische Informationen umwandeln (Cowin et al., 1991). So kommt es durch mechanische Kräfte auf das Skelett zum Aufbau von elektrischen Potentialen und in weiterer Folge wird der Flüssigkeitsstrom durch den Knochen entsprechend angepasst (Noonan et al., 1996), (Knothe Tate, 2003).
Kleine Schäden in der Knochenmatrix, die durch zu hohe Last auf den Körper oder pathologische Zustände entstehen kann, führen zur Apoptose der sie umgebenden Osteozyten, was zu erhöhtem Knochenumbau durch gesteigerte Produktion von RANKL und dadurch vermehrte Osteoklastenbildung führt (Tatsumi et al., 2007). Die kleinen Schäden können dadurch großflächig entfernt und durch neues Knochengewebe ersetzt werden.

1.1.5 Saumzellen

Ein Teil der Osteoblasten wandelt sich in Saumzellen oder „bone lining cells" um. Diese Zellen befinden sich an einem Großteil der Knochenoberfläche, die nicht remodelliert wird. Sie fungieren damit als Schutz gegen ungewollte Interaktion zwischen Osteoklastenvorläufern und der Knochenoberfläche (Kular et al., 2012).

1.2 Knochentransplantate

Knochenschäden können durch Einwirken von äußeren Kräften, also traumatischen Ereignissen, Entfernung großer Teile des Knochens aufgrund von Knochentumoren oder Infektionen oder Krankheiten wie Osteoporose entstehen.
Es handelt sich um Schäden von kritischem Ausmaß (oder „critical size defect"), wenn der Schaden 3 cm im Unterarm-, 5 cm im Oberschenkel- und 6 cm im Oberarmknochen ausmacht. Diese Schäden können es dann notwendig machen,

dass Knochentransplantate eingesetzt werden müssen, die die Lücke füllen und dem Skelett Halt geben oder dem Organismus helfen können, den Schaden zu reparieren (Calori et al., 2011).
Wichtige Begriffe im Zusammenhang mit Knochentransplantaten oder Ersatzstoffen von Knochentransplantaten sind „Osteoinduktivität", „Osteokonduktivität" und „Osteogenität".
Osteoinduktivität ist die Fähigkeit des Transplantats, aktiv die Knochenbildung zu stimulieren oder zu fördern (Urist, 1965).
Osteokonduktivität ist die Eigenschaft einer Gerüstsubstanz, welche die Kolonisation und das Einwachsen von neuen Knochenzellen und das Sprossen von Kapillaren durch seine dreidimensionale Struktur erlaubt. Osteokonduktivität wird dabei hauptsächlich von der Porosität des Gerüsts bestimmt (Burchardt, 1983) (LeGeros, 2002). Makroporen mit einem Durchmesser von mehr als 100 µm ermöglichen dabei das Knochenwachstum (Hench und Best, 2013).
Osteogenität beschreibt die Anwesenheit von knochenbildenden Zellen im Transplantat (Giannoudis et al., 2005).
Das optimale Knochenersatzmaterial sollte also osteokonduktiv, osteoinduktiv, osteogen sein, keine infektiösen Krankheiten übertragen, leicht verfügbar, biokompatibel und bioresorbierbar sein (Calori et al., 2011).

1.2.1 Eigentransplantate

Eigen- oder Autotransplantate sind der Goldstandard, um Knochendefekte zu heilen. Hierbei werden dem Patienten Knochenteile entnommen und an den Ort des Defektes transplantiert. Sie sind osteogen, osteoinduktiv und osteokonduktiv. Allerdings weist diese Methode den Nachteil auf, dass bei der Knochenentnahme post-operative Komplikationen und dadurch eine erhöhte Sterblichkeitsrate vorliegt (Calori et al., 2011).

1.2.2 Fremdtransplantate

Fremd- oder Allotransplantate können aus Leichnamen gewonnen werden. Sie sind per se osteoinduktiv, verlieren aber im Zuge der Sterilisation und Reinigung ihre osteogenen oder osteoinduktiven Eigenschaften. Im Vergleich zu Eigentransplantaten kommt es zu keinen Komplikationen beim Entnahmeprozess für den Patienten. Jedoch muss berücksichtigt werden, dass es zur Übertragung von Krankheiten und zur Abstoßungsreaktion kommen kann, da das Transplantat als "fremd" erkannt werden kann (Calori et al., 2011). Daher werden Allotransplantate

nur als zweite Wahl eingesetzt, beispielsweise wenn die Knochenschäden zu groß für Autotransplantate sind (Muruguan R, 2010).

1.2.3 Demineralisierte Knochenmatrix (DBM)

DBM wird durch Demineralisation von Fremdtransplantaten durch Säureextraktion gewonnen. Sie besteht aus Typ-1-Kollagen, nicht-kollagenösen Proteinen und osteoinduktiven Wachstumsfaktoren (BMP, TFG-β, IGF) (Einhorn et al., 1984). In Tierversuchen wurde gezeigt, dass sie osteoinduktiv sind, jedoch gibt es noch keine Studien an Menschen (Calori et al., 2011).

1.2.4 Synthetische Materialien zur Knochentransplantation

Unter diese Gruppe fallen Calciumphosphate oder Keramiken aus solchen wie Hydroxylapatit und Tricalciumphosphat, da ihre Strukturen ähnlich dem anorganischen Teil des menschlichen Knochens sind (Calori et al., 2011).
In den weiteren Abschnitten wird ausführlich auf diese Verbindungen eingegangen.

1.3 Bedeutung von Biomaterialien

Ein Biomaterial ist ein künstliches Material, das in medizinischen Produkten zum Zweck der Interaktion mit biologischen Systemen eingesetzt wird (Williams, 2009).
Im orthopädischen Bereich kommen sie vor allem als Hüft-, Knie- und Schultergelenksersatz, als Schrauben und Platten zur Knochenfixierung, Reparatur von Knochendefekten und als Knochenzemente zum Einsatz. Im kardiovaskulären Bereich werden künstliche Herzklappen, Herzschrittmacher, Katheter und Stents benötigt. Auch intraokuläre Linsen oder Kontaktlinsen in der Ophthalmologie werden als Biomaterialien definiert. (Ratner et al., 2013)

Die neueste Generation an Biomaterialien hat das Ziel, die Regeneration des geschädigten Gewebes zu stimulieren, sodass das Gewebe durch lebende Zellen ersetzt werden kann. Der Begriff „Tissue engineering" beschreibt dabei das Prinzip, lebende oder stimulierte endogene Zellen zu verwenden, um die Bildung oder Regeneration von Gewebe zu unterstützen und dadurch diagnostischen oder therapeutischen Nutzen zu erzielen (Freed et al., 2006), (Hunziker et al., 2006), (Ingber, 2010), (Hacker und Mikos, 2006).
Die Vorgangsweise besteht darin, Zellen auf einem Gerüst aus synthetischen Polymeren oder natürlichen Materialien wie beispielsweise Kollagen anzusiedeln.

Das Gewebe wird dann in vitro kultiviert, bis es reif genug ist um als Prothese in die gewünschte anatomische Position implantiert zu werden. Das Gerüst besteht üblicherweise aus einem porösen resorbierbaren Polymer, das auch modifiziert sein kann, um das Anwachsen von Zellen zu ermöglichen. (Ratner et al., 2013).

1.4 Anforderungen an Biomaterialien

Bei der Erforschung von Biomaterialien gibt es einige Punkte, die zu berücksichtigen sind, allen voran Toxikologie, Biokompatibilität, Entzündung und Heilung, mechanische und physikalische Anforderungen (Ratner et al., 2013).
Sofern es sich nicht um eine zielgerichtete Arzneiform wie Mikro- oder Nanopartikel mit Arzneistoffen gegen Krebszellen handelt, darf ein Biomaterial nicht toxisch sein. Oft kann es jedoch zum Austreten von toxischen Verbindungen aus dem Material kommen, was bei vielen Polymeren mit niedrigem Molgewicht vorkommt. Generell sollte ein Biomaterial nicht an Masse verlieren, außer es ist speziell für dieses Ziel geschaffen (Ratner et al., 2013).
Die Oberflächeneigenschaften eines Biomaterials bestimmen die Interaktion zwischen Material und Umgebung und daher auch, ob das implantierte Material vom Körper angenommen oder abgestoßen wird (Viney, 2013).
Bulkmaterialien müssen unabhängig von ihren Oberflächeneigenschaften weitere Charakteristika aufweisen, besonders mechanische Eigenschaften, die das Tragen von Lasten ohne Verformung oder sogar Zerstörung des Materials ermöglichen. Andere wichtige Eigenschaften des Bulkmaterials sind thermische Widerstandsfähigkeit und im Fall von ophthalmologischen Biomaterialien auch optische Eigenschaften wie Brechungsindex und Transparenz (Viney, 2013). Desweiteren muss ein Bulkmaterial auch Scher- und Zugkräften widerstehen können und darf bei Belastung nicht deformiert werden. Das Material muss von ausreichender Härte und Stabilität sein und auch eine gewisse Widerstandsfähigkeit gehen Brüche aufweisen.

1.5 Einteilung von Biomaterialien

Biomaterialien können in fünf Klassen eingeteilt werden: *synthetische Polymere* mit den Untergruppen der Polyurethane, Silikone, fluorierte Biomaterialien und Acrylate, außerdem *Metalle*, *Keramiken und Glas*, *abbaubare* bzw. *resorbierbare Biomaterialien*, *Hydrogele* und *Carbone* (Hoffman, 2013).

Es ist auch möglich, zwei verschiedene Materialien zu einem Kompositmaterial zu kombinieren, wie beispielsweise mit Hydroxylapatit-Partikeln verstärkte Polymilchsäure. Diese Kompositmaterialien bilden dann eine sechste Klasse von Biomaterialien, die hier separat angeführt werden (Hoffman, 2013).

1.5.1 **Polymere**

Ein Kennzeichen von Polymermolekülen ist ihr hohes Molekulargewicht.
Die einfachste Architektur ist die lineare Kettenform. Wenn sich die Ketten verschiedener Polymere zusammenlagern, wird ein Co-Polymer gebildet. Auch verzweigte Strukturen sind möglich, wenn es sich um ein Polymer mit längerer Hauptkette und kürzeren Seitenketten handelt. Einzelne Polymermoleküle bestehen dabei immer aus derselben grundsätzlichen Struktur, die sich wiederholt (Heath und Cooper, 2013).

1.5.1.1 *Polyurethane*

Polyurethane werden aufgrund ihrer mechanischen Eigenschaften, Stabilität und Biokompatibilität in der Medizin sehr häufig eingesetzt, zum Beispiel als Herzschrittmacher und Kunstherz (Heath und Cooper, 2013).

1.5.1.2 *Silikone*

Silikon-Elastomere können ihre Flexibilität über einen breiten Temperaturbereich aufrechterhalten, wodurch sie sowohl kalten, als auch sehr hohe Temperaturen, wie beispielsweise der Dampfsterilisation, ausgesetzt werden können. Sie sind permeabel für Gase und viele Arzneistoffe, und verfügen über hohe chemische Stabilität, sodass sie in vielen lange im Körper verbleibenden Implantaten eingesetzt werden können (Colas und Curtis, 2013).
Ihre Nachteile sind die geringe Reißfestigkeit und Anfälligkeit gegenüber stark basischen oder sauren Umgebungen, wie sie im Magen anzutreffen sind. Sie sind hydrophob und werden daher vom Körper rasch mit Proteinen überzogen, sodass sich während der Wundheilung eine Kapsel aus Narbengewebe um die Implantate bildet (Colas und Curtis, 2013).

1.5.1.3 *Fluorierte Biomaterialien*

Einige medizinisch eingesetzte Fluorpolymere sind Polytetrafluoroethylen (PTFE, Teflon™), Polyvinylidenfluorid (PVDF) und fluoriertes Ethylenpropylen (FEP).

Durch den Ersatz der Protonen in C-H- und C-C-Bindungen durch Fluoratome weisen Fluorpolymere sehr hohe thermische und chemische Stabilität auf. Je nachdem ob partiell oder vollständig fluorierte Polymere vorliegen, kommt es zur Ausprägung unterschiedlicher Eigenschaften; so verfügen partiell hydrogenierte Fluorpolymere über einen höheren Steifheitsgrad, vollständig fluorierte Polymere über höhere Temperaturbeständigkeit (Liu und Grainger, 2013).

1.5.1.4 *Acrylate*

Acrylate, die aus Methyl-Methacrylat (MMA) und Polymethyl-Methacrylat (PMMA) und zur Quervernetzung notwendigem Diemethacrylat bestehen, werden hauptsächlich in der Zahnmedizin eingesetzt (Antonucci und Dickens, 2013).
Beispiele für häufig eingesetzte Polymere sind auch Polyacrylamid (PA), Polymilchsäure (PLA), Polyethylen (PE), Polyvinylchlorid (PVC), Polyethylen-terephthalat (PET), Polyethylenglykol (PEG) und seine Derivate PEGDA und PEGDMA (Polyethylenglykoldiacrylat und –dimethacrylat).

1.5.2 **Metalle**

1.5.2.1 *Titan*

Titan und Titan-basierte Legierungen haben die Vorteile, dass sie nicht korrodieren und keine allergischen Reaktionen im Organismus auslösen. Unter den Biomaterialien aus Metallen werden sie vom Körper am besten toleriert. Es wird besonders in der Orthopädie eingesetzt, da ihre Elastizität unter allen Metallen noch am ehesten der des Knochens entspricht (Pandit et al., 2013).

1.5.2.2 *Edelstahl*

Obwohl viele Gruppen von Edelstahl und Edelstahl-Legierungen zur Verfügung stehen, können nur wenige aufgrund ausreichender Korrosionsbeständigkeit und mechanischer Stabilität langfristig im Körper eingesetzt werden. 316L ist die am häufigsten eingesetzte Legierung, jedoch existiert noch eine Vielzahl von anderen Legierungen mit größerer Korrosionsbeständigkeit (Andersen, 2013).

1.5.3 **Keramik, Glas, Glas-Keramik, Hydroxylapatit**

„Keramik" ist eine anorganische Phase, die durch thermische Behandlung und darauffolgendes Kühlen hergestellt wird. Im Falle von Calciumphosphat-Keramik

wird diese thermische Behandlung „sintern" genannt. Durch den Sintervorgang werden flüchtige Verbindungen entfernt, wodurch größere Kristalle und dadurch ein poröses, festes Material entsteht (Calori et al., 2011).
Beispiele für diese Gruppe sind einfach- und polykristallines Aluminiumoxid, Hydroxylapatit, bioaktives Glas, bioaktive Glas-Keramik, Calciumsulfat, Tricalciumphosphat und Calciumphosphat-Salze.
Unter „bioaktiver Keramik" versteht man in diesem Zusammenhang jene Substanzen, die eine Bindung mit Knochen eingehen. Bioaktive Substanzen können an ihrer Oberfläche eine biologisch aktive Schicht aus carboniertem Hydroxylapatit (HCA) ausbilden, die für die Bindung an umgebendes Gewebe verantwortlich ist (Hench und Best, 2013).

1.5.3.1 *Calciumphosphat-Keramik*

Knochen bestehen zu 25 % aus Wasser, 15 % aus organischen und 60 % anorganischen – mineralischen – Substanzen. Die mineralische Phase besteht dabei hauptsächlich aus Calcium- und Phosphat-Ionen mit Spuren von Magnesium-, Carbonat-, Hydroxyl-, Chlorid-, Fluor- und Citrat-Ionen.
Eine wichtige Eigenschaft von Calciumphosphat-Keramiken ist ihre Porosität, die durch Mikroporen (< 1 µm Durchmesser, durch unvollständige Sintervorgänge) und Makroporen (> 100 µm Durchmesser, ermöglichen Knochenwachstum) gegeben ist. (Hench und Best, 2013).
Nur wenige Calciumphosphat-Verbindungen können als Implantate verwendet werden, da ihre Löslichkeit und Hydrolysegeschwindigkeit mit sinkendem Calcium-Phosphat-Verhältnis steigt. Beispiele für Calciumphosphate mit unterschiedlichen Calcium-Phosphat-Verhältnissen sind Brushit (Ca:P 1:0, Dicalciumphosphat dihydrat), Whitlockite (Ca:P 1:1,43) und Tricalciumphosphat (Ca:P 1: 1,5; TCP). Tricalciumphosphat weist vier Polymorphismen auf: α, β, γ und super-α. Der γ-Zustand liegt bei hohem Druck vor, und der super-α-Zustand bei Temperaturen über 1500 °C. Daher ist der am häufigsten vorherrschende Zustand in Biokeramiken α- und β-TCP. Generell werden Calciumphosphate als osteokonduktiv bezeichnet (Calori et al., 2011).

1.5.3.2 *Resorbierbare Calciumphosphate*

Diese Substanzen können durch Einwirken des pH-Wertes der umliegenden Umgebung in andere Konfigurationen wie beispielsweise amorphes Calciumphosphat, Dicalciumphosphatdihydrat und Octacalciumphosphat entstehen.

Desweiteren kann es auch zum Zerfall des Calciumphosphats in kleine Partikel oder zur Phagozytose des Biomaterials kommen. Bei diesen Materialien kommt es also sowohl durch Osteoklasten, als auch durch chemische und enzymatische Einflüsse zur Resorption (Hench und Best, 2013).
Idealerweise sollte ein Knochenersatzmaterial vom Körper resorbiert werden, wenn seine Aufgabe als Gerüstsubstanz für neuen Knochen erfüllt ist. Allerdings muss bei einem resorbierbaren Implantat auch auf die Resorptionsrate geachtet werden, da sie auf die Regenerationsrate des Gewebes abgestimmt werden muss. Wenn die Löslichkeit des gewählten Calciumphosphats nämlich höher ist als die Regenerationsrate, kann das Biomaterial den Defekt im Knochen nicht ausfüllen. Wie bereits erwähnt, steigt die Zerfallsrate mit sinkendem Ca:P-Verhältnis und daher wird Tricalciumphosphat mit einem Verhältnis von 1:1,5 schneller resorbiert als Hydroxylapatit (Hench und Best, 2013).

1.5.3.3 *Knochenzemente aus Calciumphosphat*

Diese können z.B. aus α-TCP oder Dicalciumphosphat und einer geeigneten flüssigen Phase bestehen, um den Zement anzurühren und bieten die Möglichkeit, in situ geformt oder injiziert zu werden (Hench und Best, 2013). Sie bilden eine Paste, die am Anwendungsort durch exotherme Reaktion aushärtet. Im Unterschied zu Keramik weist ihre feste Phase eingeschränkte Porosität auf (Calori et al., 2011). Es wurde gezeigt, dass Zemente eine biologische Antwort ähnlich der von Knochen hervorrufen (Bohner, 2001).

1.5.3.4 *Hydroxylapatit*

Die größte Komponente der mineralischen Phase des Knochens ist Hydroxylapatit ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$), weswegen viele verschiedene Methoden zur Produktion von synthetischem Hydroxylapatit entwickelt wurden. Das Verhältnis von Calcium zu Phosphat beträgt in Hydroxylapatit 1:1,67. Ein Vorteil von Hydroxylapatit ist seine Bioaktivität und Fähigkeit zur Osteoinduktion (Hench und Best, 2013).
Die klinische Anwendung von Keramiken aus Calciumphosphat ist auf Knochentransplantate limitiert, die das Körpergewicht nicht tragen müssen („non weight-bearing"). Dies kommt von der relativ geringen mechanischen Stabilität und Zähigkeit von Calciumphosphat-Keramiken. Aus diesem Grund werden metallische Implantate mit Calciumphosphat-Beschichtungen überzogen (Hench und Best, 2013).

1.5.4 **Abbaubare und resorbierbare Biomaterialien**

Oft ist es notwendig, dass Implantate nur temporär im Körper verbleiben, wie beispielsweise bei Nahtmaterial, Fixiermaterial für orthopädische Operationen oder Gerüstsubstanzen für Eigengewebe. Hier sind abbaubare Polymere von großem Interesse, da sie nicht wieder operativ entfernt werden müssen und dadurch keine neue Wunde entsteht. Andererseits haben abbaubare Substanzen den Nachteil, dass die Toxizität ihrer Abbauprodukte genau untersucht werden muss (Treiser et al., 2013).

Synthetische abbaubare Polyester wie Polyglycolsäure (PGA), Polymilchsäure (PLA) und deren Copolymere, Polyhydroxybutyrate (PHB) und Polyhydroxyvalerate (PHV) werden als künstliche Membranen, als zielgerichtete Arzneiformen, in orthopädischen Aufgabestellungen, Hautersatz und medizinische Klammern eingesetzt (Treiser et al., 2013).

Andere synthetische abbaubare Polymere wie Polyanhydride, Polycyanoacrylate, Polyorthoester (POE) und Polypropylenfumarate (PPF) kommen hauptsächlich als zielgerichtete Arzneiformen zur Anwendung (Treiser et al., 2013).

Natürliche resorbierbare Polymere werden ebenfalls eingesetzt, allen voran Kollagen. Kollagen hat hierbei vielfältige Einsatzmöglichkeiten: als künstliche Haut, als Beschichtungen zur Verbesserung der Zelladhäsion, in Orthopädie, Wundheilung und Hämostase. Auch Fibrinogen und Fibrin können als Klebstoff zum Wundverschluss eingesetzt werden. ELPs („elastin-like peptides"; elastinähnliche Peptide) werden als Beschichtungen von vaskulären Transplantaten verwendet, Gelatine als Grundsubstanz von Kapseln zur oralen Einnahme von Arzneistoffen und zur Stillung von Blutungen.

Aus Hyaluronsäure werden künstliche Knochentransplantate oder Synovialflüssigkeit erzeugt (Treiser et al., 2013).

Polyglycolsäure und Polymilchsäure und ihre Copolymere sind momentan die am besten untersuchten und am häufigsten eingesetzten synthetischen abbaubaren Polymere. PGA ist dabei der einfachste lineare aliphatische Polyester und war das erste synthetische, bioabbaubare Nahtmaterial, wobei es seine mechanische Stärke rasch verliert (Herrmann et al., 1970). Um ein breiteres Anwendungsspektrum von PGA zu ermöglichen, wurden in die Seitenketten PLA-Moleküle eingeführt, was zu einer Erhöhung der Hydrophobizität und damit zu langsamerer Hydrolyse im Vergleich zu PGA führt (Treiser et al., 2013).

1.5.5 **Hydrogele**

Hydrogele weisen einen hohen Wasseranteil auf. Sie bestehen aus polymeren Strukturen, die als mit Wasser gequollene Gele durch verschiedene Mechanismen wie Wasserstoffbrücken, ionische Wechselwirkungen, oder physikalischen Kontakt der einzelnen Polymerketten zusammengehalten werden. Wenn der Anteil an Wassermolekülen innerhalb und außerdem der Hydrogele gleich ist, befindet sich die Substanz im Gleichgewichtszustand (Peppas und Hoffman, 2013).
Viele natürliche Polymere wie Kollagen, Gelatine, Fibrin, Pektin, Heparin und Hyaluronsäure können genützt werden, um Hydrogele zu bilden (Peppas und Hoffman, 2013).
Biomedizinisch eingesetzte Hydrogele sind Polyvinylaalkohol (PVA)-Hydrogele, Polyhydroxyethylmethacrylat (PHEMA)-Hydrogele, Polyethylenglykol (PEG)-Hydrogele und die bereits genannten PGA- und PLA-Hydrogele, bzw. ihre Copolymere.
Generell ist eine bedeutende Applikation von Hydrogelen die Ophthalmologie; so sind Hydrogele aufgrund ihrer guten refraktiven Eigenschaften ein idealer Baustoff von Kontaktlinsen. Auch als zielgerichtete Arzneiformen werden sie eingesetzt, da es bei Kontakt mit Wasser zum Aufquellen der Substanzen und dadurch zur Freigabe von Arzneistoffen aus den Hydrogelen kommt (Peppas und Hoffman, 2013).

1.5.5.1 *Gelatine*

Gelatine ist eine lösliche Proteinverbindung, die durch partielle Hydrolyse aus Kollagen gewonnen wird und daher die denaturierte Form von Kollagen darstellt (Abbildung 3). Kollagen wiederum ist ein faserartiges Protein und der proteinöse Hauptbestandteil in Knochen, Knorpeln und Haut. Daher bestimmen Quelle, Alter des Tieres und Typ des Kollagens die Eigenschaften der gewonnenen Gelatine (Johnston-Banks, 1990).

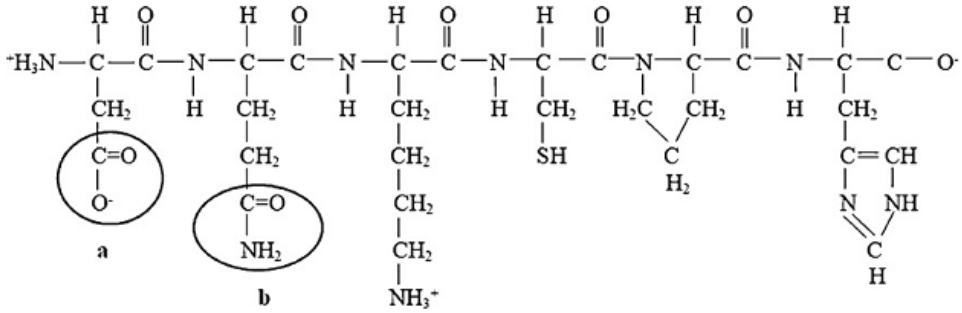


Abbildung 3: Primärstruktur von Gelatine (Suarasan et al., 2013)

Kollagenmoleküle bestehen aus drei Ketten, die in einer Dreifach-Helix verdrillt sind. Diese Struktur wird hauptsächlich durch inter- und intramolekulare Wasserstoffbrücken stabilisiert und ist das Produkt der kontinuierlichen Wiederholung einer Glycin-X-Y-Sequenz, wobei X größtenteils Prolin und Y größtenteils Hydroxyprolin darstellt (Asghar und Henrickson, 1982).

Die bedeutendsten zur Gewinnung von Gelatine herangezogenen Quellen sind Schweineschwarten, Rinderhaut, und Schweine- und Rinderknochen. Grundsätzlich sind aus Kollagen je nach Vorbehandlung zwei Typen von Gelatine synthetisierbar, die man als Typ A-Gelatine mit einem isoelektrischen Punkt bei pH 8-9 und Typ B-Gelatine mit einem isoelektrischen Punkt bei pH 4-5 bezeichnet. Typ A-Gelatine wird durch saure, Typ B-Gelatine durch basische Vorbehandlung gewonnen (Gómez-Guillén et al., 2011).

Neben grundsätzlichen physikochemischen Eigenschaften wie Löslichkeit, Transparenz, Färbung, Geruch und Geschmack, sind die Hauptkennzeichen zur Charakterisierung der Qualität von Gelatine ihre Gelstärke und thermische Stabilität wie Gelier- und Schmelztemperaturen. Zur Messung der Gelstärke wird der sogenannte „Bloom-Test" herangezogen, der einem definierten Protokoll folgt, um bei einer bestimmten Gelatine-Konzentration (6,67 %), Temperatur (10 °C) und Alterungszeit (17 h) die Gelstärke misst, die dann in Gramm als Bloom-Wert ausgedrückt wird und die Gelierkraft beschreibt. Je höher der Bloom-Wert, umso höher ist die Gelierkraft der Gelatine (Wainewright, 1977).

Der Geliervorgang von Gelatine und auch das dadurch gebildete Netzwerk unterscheiden sich deutlich von Kollagen (Djabourov, 1993). Die Gelbildung von Kollagen wird durch Veränderungen in Ionenstärke, pH und Temperatur ausgelöst. Zunächst lagern sich in einer lag-Phase die Dimere und Trimere zusammen. Dann erfolgt die mikrofibrilläre Aggregation durch seitliche Anlagerung von Untereinheiten bis ein Gleichgewichtszustand erreicht ist. Zu diesem

selbstständigen „Zusammenbau" von Kollagen Typ 1 kommt es, wenn die Temperatur von 20 auf 28 °C erhöht wird (Gómez-Guillén et al., 2011).
Im Gegensatz dazu erfolgt bei Gelatine die genau umgekehrte Reaktion. Der Geliervorgang für Kollagen und Gelatine ist thermoreversibel, aber in unterschiedliche Richtungen: Kollagen-Gele schmelzen bei Senken der Temperatur, während Gelatine-Gele bei Erhöhung der Temperatur schmelzen (Gómez-Guillén et al., 2011).

Da Gelatine in wässriger Lösung löslich ist, muss sie für langfristige medizinische Anwendungen kovalent quervernetzt werden. In Wasser bilden sich dann Gelatine-Hydrogele, die durch Unlöslichkeit in Wasser und Hydrophilie gekennzeichnet sind und bis zu einem Gleichgewichtszustand aufquellen können, während sie ihre grundsätzliche Form erhalten. Die dafür eingesetzten chemischen Quervernetzer oder Crosslinker sind entweder kleine bifunktionelle Moleküle oder polyfunktionelle Makromoleküle wie Glutardialdehyd (Bigi et al., 2001). Quervernetzung durch Glutardialdehyd führt zur Reaktion von freien Aminogruppen von Lysin oder Hydroxylysin mit den Aldehydgruppen von Glutardialdehyd (Abbildung **4**) (Olde Damink LHH, 1995). Der Erfolg von einer Vielzahl an Implantaten mit durch Glutardialdehyd quervernetzter Gelatine hat gezeigt, dass Glutardialdehyd klinisch eingesetzt werden kann und viele Vorteile hat, obwohl mehrfach von der Zytotoxizität von Glutardialdehyd berichtet wurde (Jayakrishnan und Jameela, 1996).

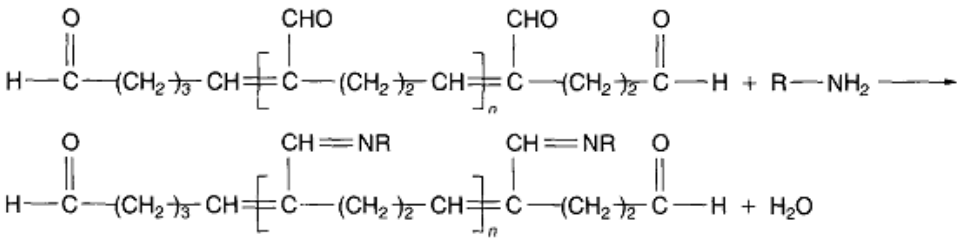


Abbildung 4: Reaktion von polymerisiertem Glutardialdehyd mit primären Aminen (Jayakrishnan und Jameela, 1996)

Daher wurden andere Substanzen wie Carbodiimide, Epoxide, Zitronensäure, Glyceraldehyd und Genipin, ein pflanzliches Iridoid, auf ihre Fähigkeit zur Quervernetzung kollagenbasierter Materialien getestet (Kuijpers AJ, 1999), (Inoue et al., 2010), (Vandelli et al., 2001), (Zeeman et al., 1999). Teilweise sind diese Substanzen Glutardialdehyd aufgrund geringerer Zytotoxizität vorzuziehen, sie

können jedoch Kollagen nicht so gut stabilisieren wie Glutardialdehyd (Sung et al., 1999), (Rault I, 1996). Die Biokompatibilität von durch Glutardialdehyd quervernetztem Material erhöht werden, indem die Glutardialdehyd-Konzentration verringert wird.

Kompositmaterialien, die aus Gelatine-Mikro- oder Nanosphären bestehen, die in eine Matrix eingebettet werden, könnten in Zukunft zum Transport diverser Arzneistoffe und Wachstumsfaktoren direkt an den Implantationsort eingesetzt werden.
Es wurde bereits gezeigt, dass der Einsatz von Gelatine-Mikropartikeln beispielsweise zum Transport von Antibiotika wie Mitomycin C und Cytostatika wie 5-Fluorouracil, möglich ist (Oner und Groves, 1993).
Auch die Verkapselung verschiedener Wachstumsfaktoren wie TGF-β (Holland et al., 2005), (Holland et al., 2007), (Park et al., 2007a), IGF-1 (Holland et al., 2007), (Pham et al., 2008), BMP-2 (Patel et al., 2008b), (Patel et al., 2008a), (Patel et al., 2008c) und VEGF (Patel et al., 2008a), (Patel et al., 2008c) in Gelatine-Mikrosphären zum Einsatz bei Knorpeldefekten wurde bereits erforscht.

1.5.5.2 *Pektin*

Pektin ist ein Polysaccharid, das in der Mittellamelle von Früchten und Gemüse vorkommt. Wie Abbildung 5 zeigt, besteht Pektin aus Homogalacturonan (HG) und Rhamnogalacturonan. Homogalacturonan besteht wiederum aus einem linear verknüpften Homopolymer von α(1-4) verknüpften D-Galacturonsäure-Molekülen, die an der C-6–Carboxylgruppe mit Methylgruppen verestert oder acetyliert sein können (Vincken et al., 2003).

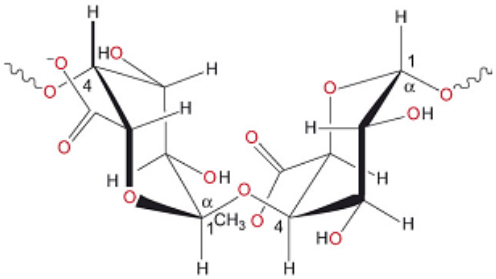


Abbildung 5: Struktur von Pektin (Le Gall et al., 2006)

Die Ausbildung von Komplexen zwischen den Carboxylgruppen von Pektin und divalenten Ionen kann zur Quervernetzung und damit zur Gelbildung führen. Wie

gezeigt wurde, können Gele aus Pektin die Aggregation von Calciumphosphat und Hydroxylapatit bewirken; solche Hydroxylapatit/Pektin-Gele weisen ähnliche mechanische Eigenschaften wie menschliche Knochensubstanz auf (Ichibouji T, 2008).

1.5.6 **Kompositmaterialien**

Das Wort „Komposit" bedeutet „aus zwei oder mehreren unterschiedlichen Teilen bestehend". Komposite bestehen daher üblicherweise aus einer oder mehreren nicht-zusammenhängenden Phasen, die in eine zusammenhängende Phase, eine Matrix, eingebettet sind (Migliaresi, 2013).
Grundsätzlich können die bereits genannten Substanzen daher untereinander kombiniert und auf diese Weise ein Kompositmaterial hergestellt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Reagenzien, Material, Instrumente

Tabelle 1: Reagenzien

Substanzname	Hersteller	Chargennummer
1α,25-Dihydroxy-vitamin-D_3 Stammlösung, Konz.: 1 x 10^{-5} M	Hoffmann LaRoche, Nutley, New Jersey	
4‘,6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid	Sigma-Aldrich GmbH, Österreich	3267 Lot#59A3960
Aceton, p.a.	Fluka	00570 Lot#43200
Albumin, bovine, Fraction V; 96 – 99% Albumin [Cohn Fraction V, JACS, 68, 459 (1946)]	Sigma-Aldrich GmbH, Österreich	A-4503 Lot#28F-0982
Alexa Fluor® 546 Phalloidin	Molecular Probes	A-22283 Lot#05B2-2
Alexa Fluor® 633 F(ab‘)2 fragment of goat anti-rabbit IgG (H+L) 2 mg/ml	Molecular Probes	A-21070 Lot#1008802
Anti-Integrin beta 3 Antikörper (ab47584) 1 mg/ml	abcam	3509322
$CaCl_2$, Anhydrid, approx. 97 %	Sigma-Aldrich Handels GmbH, Österreich	C-4901 Lot#53H0617
CASYton	Roche Diagnostics GmbH, Österreich	05651808001 Lot#11686500
Kollagenase from Clostridium histolyticum, Typ 1	Sigma-Aldrich GmbH, Österreich	9001-12-1 Lot#95H6843
Coomassie brilliant blue, G-250	Merck	Nr. 15444
Dimethylsulfoxid, DMSO	Sigma-Aldrich GmbH, Österreich	D-8879 Lot#99H3655
Dinatrium-hydrogenphosphat-Dihydrat, p.a.	Merck GmbH, Österreich	1.06580.1000 Lot#K33351980429
Dispase, Typ 1	Sigma-Aldrich GmbH, Österreich	D-4818 Lot#75K5639
Essigsäure, 100 % (Eisessig)	Merck GmbH,	63.

	Österreich	Lot#K17216063
Ethanol absolut, 99,9 %, p.a.	AustrAlco Österreichische Handels-GmbH	AAAH-5020-07025-010711
Ethylendiamintetraessigsäure, Anhydrid, appr. 99 %	Sigma-Aldrich GmbH, Österreich	E-6758 Lot#50K01315
Fast red violet LB salt, technical grade	Sigma-Aldrich GmbH, Österreich	F-3381 Lot#038K3721
Fetal Calf serum, FCS	Life Technologies Bio Whittaker	10270-106 Lot#41Q4297P 14-601F Lot#5SB0004
Flüssiger Stickstoff	TU Wien, Österreich	
Formaldehydlösung, 37 %, Ph. Eur	Roth	CP10.1 Lot#460103407
Gelatin from bovine skin, gel strength 225 g Bloom, Type B;	Sigma-Aldrich GmbH, Österreich	G9382 Lot#051M0012V
Gelatin from porcine skin, gel strength 300 g Bloom, Type A	Sigma-Aldrich GmbH, Österreich	G2500 Lot#SLBB0914V
Gelatin from porcine skin, gel strength 90 - 110 g Bloom, Type A	Sigma-Aldrich GmbH, Österreich	G6144 Lot#BCBF3362V
Gelatin bovine, Typ B,granular	ACROS organics	410875000 Lot#A0313412
Glutardialdehyd, 25 % in Wasser	Fluka	49633 Lot#75600
Kaliumdihydrogenhosphat, p.a.	Merck GmbH, Österreich	1.04873.1000 Lot#A531473438
KCl p.a.	Merck GmbH, Österreich	1.04936.1000 Lot#K33076636428
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Sigma-Aldrich, Handels GmbH, Österreich	M-0250 Lot#43H0301
MEM Alpha Medium, + Ribonucleosides + Deoxyribonucleosides	Life Technologies	11900-073 Lot#1097450
Methanol p.a.	Merck GmbH,	1.06009

	Österreich	Lot#K20478409
N,N-Dimethylformamid	Sigma-Aldrich GmbH, Österreich	D4254 Lot#67H0764
Naphthol AS-MX Phosphat, > 99% (HPLC)	Sigma-Aldrich GmbH, Österreich	N5000 Lot#048K5309
Natrium Acetat Trihydrat	Sigma-Aldrich GmbH, Österreich	S-8625 Lot#67H0568
Natriumazid	Sigma-Aldrich Handels GmbH, Österreich	S-8032 Lot#94H2685
Natriumhydroxid Plätzchen, p.a.	Merck GmbH, Österreich	1.06498. Lot#B244798825
Natrium-Tartrat Dihydrat	Sigma-Aldrich GmbH, Österreich	S-8640 Lot#82H06941
Natural Goat Serum	Life Sciences	
Pectin, pract.	ACROS organics	416862500 Lot#A0274911
Penicillin/Streptomycin-Lösung, 10000 µg/ml	Biochrom AG, Germany	A 2213 Lot#330 FF
Prostin E_2 Konzentrat, 5 mg/0,5 ml , Stocklösung 1 mM (Verwendung 1:1000), Endkonz.: 1 x 10^{-6} M	Pfizer	5Q9817 Lot#P09610
Salzsäure, rauchend, 37 %	Merck GmbH, Österreich	84422 Lot# 52700 54305C02
Saponin from Saponaria Species	Sigma-Aldrich Handels GmbH, Österreich	S-2149 Lot#50H25021
Tissue tek	O.C.T. Compound	0708810014 Lot#2009-04
Tri-Calciumphosphat reinst, Ph. Eur.	AppliChem	7758-87-4 Lot#1J002688
Trypsin (1:250) Pulver	Life Technologies	27250-018 Lot#1038644

Tabelle 2: Material

Name	Hersteller
24-well-Kulturplatten, tissue culture treated	Iwaki® Cell biology Nunc Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA
Deckgläser, rund, Ø 12 mm	VWR International, Österreich
Reaktionsgefäße „Eppendorf" 1,5 ml	Eppendorf AG, Deutschland
Reaktionsgefäße „Eppendorf" 2 ml	Eppendorf AG, Deutschland
Kryoröhrchen	Greiner ® Bio-One International AG, Österreich
Messpipetten, Glas	Brand, Deutschland
Mikropipetten	Gilson ® Inc, WI, USA Labsystems Finnpipette, Finnland
Mr. Frosty ® Freezing Container	Thermo Fisher Scientific wissenschaftliche Geräte GmbH, Österreich
Parafilm M	American National Can Company
Petrischalen	Sterilin, Bibby Sterilin Ltd., UK
Pipettenspitzen	VWR International, Österreich Greiner ® Bio-One International AG, Österreich
Sterile Einweg-Kunststoffpipetten	Costar ® Corning Life Sciences, MA, USA
Zentrifugenröhrchen, 20 ml	Greiner ® Bio-One International AG, Österreich
Zentrifugenröhrchen, 50 ml	Greiner ® Bio-One International AG, Österreich

Tabelle 3: Geräte

Name	Hersteller
Analysenwaagen	GFL 3032, Sartorius MC 210 P, Sartorius
Autoklav	TOMY SX-300E High pressure steam sterilizer
CASY Zellzähler	Schärfe Systems, Deutschland
Digitalkameras für Mikroskope	XM10, Olympus, Japan D 5100, Nikon, Japan
Eismaschine	AF103, Scotsman Ice Systems, USA
Fluoreszenzmikroskop	BX 51, Olympus
Inkubator	HERA cell 240, Kendro
Lampe für Fluoreszenzmikroskop	X-Cite Series, 120 PC, Exfo
Lichtmikroskope	TMS, Nikon, Japan

	Diaphot 300, Nikon, Japan
Magnetrührer	Ikamag RCT, Janke & Kunkel, Deutschland
pH-Meter	713 Metrohm, Schweiz
Pipetboy Pipettierhilfe	Integra Biosciences
Schüttelinkubator	GFL 2032, Heraeus instruments, Deutschland
Sterilwerkbank (Laminar Air Flow)	Ehret Labor- und Pharmatechnik, Deutschland
Trockenschrank (zur Hitzesterilisation)	WTB
Ultraschallbad	Transsonic 570, Elma
Vortex	AG Vortex Genie, Bender
Wasserbad	GFL 1086, Aigner
Zentrifuge	Z323 K, Hermle

2.2 Versuchsaufbau

Um den Einfluss verschiedener Gelatine-, Pektin- und Gelatine-TCP-Beschichtungen auf Osteoklasten zu untersuchen, wurden Deckgläser mit den gewünschten Biomaterialien beschichtet, diese in Zellkulturplatten gelegt und anschließend ein Maus-Cokultur-System durchgeführt.

Die im Lauf der Cokultur entstandenen Osteoklasten wurden dann je nach Fragestellung getestet: die *Morphologie* der Osteoklasten wurde mittels Aktin-/DAPI-Färbung und Dreifachfärbung mit Aktin-/DAPI-Färbung und Immunfluoreszenzmarkierung untersucht, die *Anzahl* der gebildeten Osteoklasten mittels TRAP-Färbung.

Für jeden Beschichtungstyp und auch die Kontrollgruppen wurden jeweils Triplikate untersucht. Als Positivkontrolle dienten jeweils unbeschichtete Deckgläser und im Falle der TRAP-Färbung zusätzlich Wells ohne Deckgläser als weitere Positivkontrolle. Außerdem wurde jeweils eine Gruppe mit einer BSA-Beschichtung getestet, welche die Adsorption von Proteinen an die Kulturoberflächen verhindern sollte. In dieser Gruppe sollte es durch die beeinträchtigte Zelladhäsion zu geringerer Osteoklastenbildung kommen, jedoch hatte BSA in den durchgeführten Experimenten nur geringen Effekt auf die Osteoklastenanzahl.

Um die erhaltenen Ergebnisse zu verifizieren, wurde jedes Experiment wiederholt. Im Falle einer großen Abweichung zwischen den Ergebnissen zweier verschiedener Experimente wurde der Versuch ein drittes Mal wiederholt.

2.3 Verwendete Zellen

2.3.1 Osteoblasten

Die zur Durchführung einer Cokultur benötigten Osteoblasten wurden aus Kalvarien neugeborener Mäuse gewonnen.

2.3.1.1 *Herstellung von PBS*

Zur Herstellung einer zehnfach konzentrierten Stammlösung wurden 2 g KCl, 2 g KH_2PO_4, 80 g NaCl und 27,07 g Na_2HPO_4 * 2 H_2O eingewogen und in bidestilliertem Wasser gelöst.
Bei Bedarf konnte diese Lösung mit bidestilliertem Wasser verdünnt und danach sterilfiltriert werden. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

2.3.1.2 *Herstellung von Trypsin-EDTA*

Es wurde eine zehnfach konzentrierte Stammlösung hergestellt, die bei Bedarf mit PBS verdünnt wurde.
Zur Herstellung dieser Lösung wurde Trypsin in bidestilliertem Wasser eingewogen und gelöst. EDTA und NaCl wurden zugefügt und erneut der pH-Wert auf einen Bereich von 7,4-7,6 eingestellt. Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei –20°C gelagert.

2.3.1.3 *Vorgangsweise*

Die Kalvarien wurden dazu in einer Enzymlösung aus Kollagenase und Dispase verdaut und nach mehreren Zentrifugations- und Resuspendierungsschritten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen trypsinisiert, mit PBS gewaschen und in einer Petrischale mit α-MEM verdünnt.
Nach neuerlicher Inkubation wurden die so gewonnen Osteoblasten wieder trypsinisiert, gewaschen und zentrifugiert. Anschließend konnte das erhaltene Zellpellet nach Zählen der Zellzahl durch Resuspendieren in Einfriermedium überführt und in flüssigem Stickstoff eingefroren werden.

2.3.2 Osteoklasten

Die verwendeten Osteoklasten wurden durch ein Cokultur-System gewonnen. Diese Methode ist an die in den „Bone Research Protocols" beschriebene Methode angelehnt (Itzstein Cecile, 2012).

Bei einer Zelldichte von 4,0 x 10^6 Zellen/Platte (= 1,65 x 10^5 Zellen/cm^2) waren in mehreren Experimenten nur wenige sehr kleine Osteoklasten vorhanden, weshalb eine Zelldichte von 8,0 x 10^6 Zellen/Platte (= 3,3 x 10^5 Zellen/cm^2) in die entsprechenden Zellkulturplatten ausgesät und inkubiert wurde.
Sechs Stunden später wurde das Knochenmark der Hinterbeine von Mäusen isoliert. Das Medium der zuvor ausgesäten Osteoblasten wurde aus den Wells entfernt und isolierte Knochenmarksuspension zugegeben.
Anschließend wurde mit 1α,25-$(OH)_2$-Vit. D_3 und PGE_2 versetztes Medium hinzugefügt und für 120 Stunden inkubiert. Jeden zweiten Tag wurde ein Medientausch durchgeführt, wobei auch hier das Medium mit 1α,25-$(OH)_2$-Vit. D_3 und PGE_2 versetzt war.
Nach Ende der Kultur wurden entweder erst nach Herunterwaschen des Osteoblastenlayers (siehe Punkt 2.5) oder unmittelbar nach Kulturende die Zellen fixiert.

2.4 Nährmedienbereitung

2.4.1 Hitzeinaktivierung von FCS

Fötales Kälberserum wurde im Wasserbad erwärmt. Dadurch kommt es zur Denaturierung von Enzymen wie beispielsweise Komponenten des Komplementsystems, die ansonsten zu Antigen-Antikörper-Komplexen reagieren würden (Giard, 1987).

2.4.2 Nährmedium für Osteoblastenkultivierung

α-MEM wurde mit 10 % hitzeinaktiviertem FCS und 1 % Penicillin-/Streptomycin-lösung versetzt.

2.4.3 Nährmedium für Osteoklastenkultivierung

α-MEM wurde mit 10 % FCS und 1 % Penicillin-/Streptomycinlösung versetzt.

2.5 Entfernen der Osteoblastenschicht

Um eine bessere Darstellung der Osteoklasten für Aktin-/DAPI-Färbung und Immunfluoreszenz zu erreichen, kann die Osteoblastenschicht nach Beendigung der Kulturdauer vor dem Fixieren mit Formaldehyd vorsichtig abgelöst werden. Dazu

wurde kreisförmig PBS in die Wells der Kulturplatten zugegeben, die Osteoblastenschicht dadurch abgewaschen und danach abgesaugt.
Diesem Schritt folgte in der Regel die Fixierung der Zellen.

2.6 Fixieren der Zellen

2.6.1 Herstellung von PBS mit Ca^{2+}/Mg^{2+}

Es wurde eine zehnfach konzentrierte Stammlösung hergestellt, dazu wurden 2 g KCl, 2 g KH_2PO_4, 1 g $MgCl_2$ * 6 H_2O, 80 g NaCl und 14 g Na_2HPO_4 * 2 H_2O eingewogen und in demineralisiertem Wasser gelöst. Der pH-Wert wurde auf 2-3 eingestellt, dann $CaCl_2$ zugegeben und mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt.
Bei Bedarf konnte diese Stammlösung verdünnt und dann auf einen pH-Wert von 7,2 eingestellt werden. Die Lösung wurde bei 4 °C gelagert.

2.6.2 Fixierlösung

37 % Formaldehyd wurde mit PBS mit Ca^{2+}/Mg^{2+} zu einer 3,7 % Formaldehyd-Lösung verdünnt.

2.6.3 Konservierungslösung

Zur Herstellung dieser Lösung ist die Zugabe von Natriumazid zu PBS mit Ca^{2+}/Mg^{2+} notwendig.

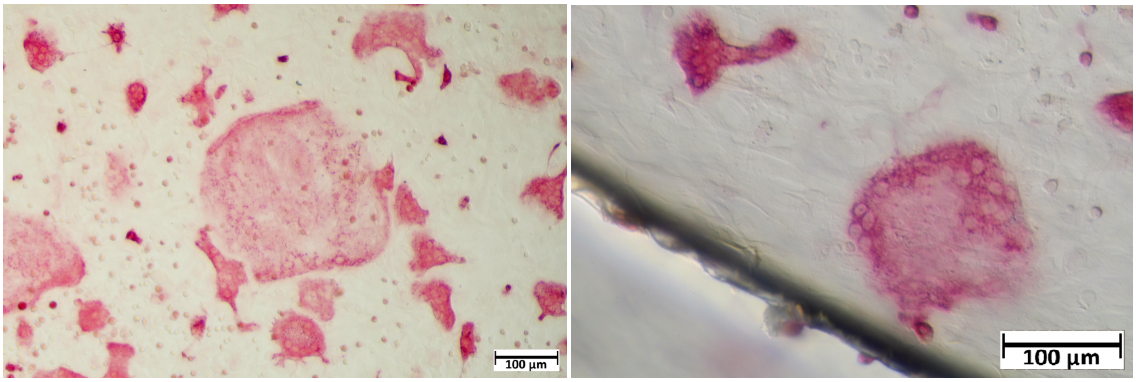
2.6.4 Vorgangsweise

Zunächst wurde jedes Well mit warmem PBS mit Ca^{2+}/Mg^{2+} gewaschen und anschließend mit Fixierlösung versetzt. Die Lösung wurde entfernt und ein erneuter Fixierungsschritt vorgenommen. Schließlich wurde nach weiterem Waschen mit PBS mit Ca^{2+}/Mg^{2+} Konservierungslösung zugegeben. Die so fixierten Kulturplatten konnten bei 4 °C gelagert werden.

2.7 TRAP-Färbung

Die TRAP-Färbung ist eine einfache, schnelle und günstige Methode, um die entstandenen Osteoklasten sichtbar zu machen. Allerdings ist sie nicht spezifisch, da auch andere Zellen hämatopoietischen Ursprungs dieses Enzym bilden.

Osteoklasten wurden dann als solche gezählt, wenn sie TRAP-positiv waren und mindestens drei Zellkerne aufwiesen (Walsh et al., 2003).



Abbildungen 6 und 7: Mäuse-Osteoklasten auf Glas nach TRAP-Färbung mit deutlich sichtbaren Zellkernen

2.7.1 TRAP-Puffer

Für Bereitung des TRAP-Puffers wurde Natriumacetat in bidestilliertem Wasser gelöst, dann der pH-Wert auf 5 eingestellt und Natriumtartrat zugegeben. Die Lösung wurde auf Vorrat hergestellt und bei 4 °C gelagert.

2.7.2 Aceton-Alkohol-Lösung

$EtOH_{abs}$ und Aceton wurden zu gleichen Teilen gemischt.

2.7.3 Färbelösung

Die Lösung wurde für jede TRAP-Färbung frisch bereitet. TRAP-Puffer wurde mit einer Lösung aus Naphthol AS-MX Phosphat in N,N-Dimethylformamid versetzt und dann Fast Red Violet LB Salz zugegeben. Die Färbelösung wurde im Ultraschallbad belassen, bis die Substanzen gelöst waren.
Bis zum Gebrauch war darauf zu achten, dass die Lösung lichtgeschützt aufbewahrt wurde.

2.7.4 Vorgangsweise

Die fixierten Osteoklasten (siehe Punkt 2.6) wurden mit TRAP-Puffer bei 37°C vorinkubiert. Dann wurden die Zellen mit einer Mischung aus Aceton und absolutem Alkohol behandelt. Nach kurzem Trocknen wurde die Färbelösung hinzugefügt und

die Kulturplatten erneut bebrütet. Die Farbintensität konnte dabei unter dem Mikroskop kontrolliert werden.
Abschließend wurde die Färbelösung entfernt, mit bidestilliertem Wasser gewaschen und die Kulturplatten in PBS mit Ca^{2+}/Mg^{2+} und Natriumazid (siehe Konservierungslösung Punkt 2.6.3) gelagert.
Zur Auswertung der Färbung wurden die TRAP-positiven Osteoklasten unter dem Lichtmikroskop ausgezählt.

2.8 Aktin-/DAPI-Färbung

Durch die Aktin-Färbung wird der von den Osteoklasten gebildete Aktinring angefärbt, die DAPI-Färbung führt hingegen zur Färbung der Zellkerne. Beide Strukturelemente können nach der Färbung durch Fluoreszenzmikroskopie untersucht werden.

2.8.1 Verdünnung der AlexaFluor®-Lösung

Für die Aktinfärbung wurde zunächst das Lösungsmittel von AlexaFluor® Phalloidin 546 abgedampft. Das nun trockene Reagens wurde in PBS mit Ca^{2+}/Mg^{2+} gelöst und bis zum Gebrauch unter Lichtschutz aufbewahrt.

2.8.2 Herstellung des DAPI-Reagens

Für die DAPI-Färbung wurden die DAPI-Stammlösung mit PBS mit Ca^{2+}/Mg^{2+} unter Lichtschutz verdünnt.

2.8.3 Vorgangsweise

Die Färbungen wurden soweit wie möglich unter Lichtausschluss durchgeführt. Dazu wurde eine Metallbox mit Parafilm ausgekleidet und die Deckgläser mit den fixierten Zellen in eiskaltes Aceton gelegt. Nach Entnahme und Trockentupfen der Deckgläser wurde die AlexaFluor® Phalloidinlösung (siehe Punkt 2.8.1) aufgetragen und unter Lichtschutz bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Waschen mit PBS mit Ca^{2+}/Mg^{2+} ist die Aktinfärbung abgeschlossen.
Um die DAPI-Färbung durchzuführen, wurden dieselben Deckgläser mit DAPI-Verdünnung bedeckt und inkubiert. Es folgten erneut Waschschritte, dann wurden die Deckgläser mit der Zellseite nach unten auf einen Objektträger mit einem kleinen Tropfen „tissue-tek"-Feuchthaltemittel gelegt. Zur Fixierung wurde die Kante des Deckglases mit handelsüblichem transparenten Nagellack abgedichtet.

Die so präparierten Deckgläser wurden unter Lichtschutz bei 4 °C bis zum Abtrocknen des Nagellacks gelagert.

2.9 Immunfluoreszenzmarkierung

2.9.1 Herstellung der Lösungen

Die benötigten Ethanol-Lösungen wurden durch Verdünnung von $EtOH_{abs}$ mit bidestilliertem Wasser hergestellt.
Lösung 1 war eine Lösung von PBS mit Ca^{2+}/Mg^{2+} mit BSA und Saponin. Sie wurde immer frisch hergestellt, *Lösung 2* bestand aus NGS und Lösung 1, *Lösung 3* enthielt den primären Antikörper (Anti Integrin β_3-Antikörper), der im Verhältnis 1:100 mit NGS und Lösung 1 verdünnt wurde. *Lösung 4* enthielt den sekundären Antikörper (AlexaFluor® 633 Anti-Rabbit IgG), der im Verhältnis 1:50 mit Lösung 1 und NGS verdünnt wurde.

2.9.2 Herstellung der Alkohol-Lösungen

$EtOH_{abs}$ wurde mit bidestilliertem Wasser so verdünnt, dass die gewünschte Konzentration erreicht wurde.

2.9.3 Vorgangsweise

Die fixierten Zellen wurden zunächst einer Reihe von Dehydratationsschritten durch Waschen mit Alkohollösungen der folgenden Konzentrationen unterzogen: 40%, 70%, 80%, 90%, 100%, 90%, 80%, 70%, 40%.
Anschließend wurde jedes Well mit PBS mit Ca^{2+}/Mg^{2+} gewaschen und danach *Lösung 1* zugegeben. Die Flüssigkeit wurde entfernt, die Deckgläser auf Parafilm gelegt und dann *Lösung 2* zugegeben. Nach Inkubation unter Lichtausschuss bei Raumtemperatur wurden die Deckgläser getrocknet, danach wurde *Lösung 3* (primärer Antikörper) aufgetragen und erneut unter Lichtausschuss bei Raumtemperatur inkubiert. Die Deckgläser wurden mit *Lösung 1* gewaschen, danach *Lösung 4* (sekundärer Antikörper) aufgetragen und erneut bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert.
Zuletzt wurden die Deckgläser mit PBS mit Ca^{2+}/Mg^{2+} und bidestilliertem Wasser gewaschen, dann wie im Falle der Aktin-/DAPI-Färbung auf Objektträgern präpariert.

2.10 Kombination von Immunfluoreszenzmarkierung und Aktin-/DAPI-Färbung

Um beide Färbemethoden mit demselben Deckglas durchzuführen, wurde zunächst wie unter Punkt 2.9 beschrieben die Inkubation mit primärem und sekundärem Antikörper durchgeführt.
Danach wurde im Anschluss an die Wasch-Schritte und vor dem Präparieren der Deckgläser auf den Objektträgern die Aktin-/DAPI-Färbung wie unter Punkt 2.8 beschrieben durchgeführt.

2.11 Sterilisation der Deckgläser

Die benötigten Deckgläser wurden über Nacht in $EtOH_{abs}$ gelegt und dann in einer mit Papiertüchern ausgelegte Metallbox gegeben. Wenn eine größere Anzahl an Deckgläsern vorbereitet wurde, wurden mehrere Lagen von Deckgläsern durch Papiertücher getrennt. Die Metallbox wurde anschließend im Hitzeschrank sterilisiert.
Zur Entnahme der Deckgläser wurde die Box unter dem LAF geöffnet und die Deckgläser mit einer sterilen Pinzette entnommen.

2.12 Vorbereitung der Substanzen für die Beschichtungen

2.12.1 Gelatine- und Pektin-Lösungen

Die zu untersuchenden Gelatine-Typen bzw. Pektin wurden in Glasflaschen eingewogen. Je nach gewünschter Konzentration wurde bidestilliertes Wasser hinzugefügt, die Flaschen verschlossen, leicht geschwenkt und danach im Autoklaven sterilisiert.
Nach Abkühlen auf Raumtemperatur waren die Lösungen gebrauchsfertig oder konnten bis zum Gebrauch im Kühlschrank aufbewahrt werden. Die Lösungen wurden nicht länger als einen Monat verwendet, um Kontaminationen zu vermeiden.

2.12.2 BSA-Lösung, Konzentration 5 mg/ml

Rinderalbumin wurde mit Wägepapier in ein Zentrifugenröhrchen eingewogen. Im LAF wurde steriles PBS mit Ca^{2+}/Mg^{2+} zugefügt. Das Röhrchen wurde im Schüttelinkubator sanft geschüttelt und anschließend im LAF sterilfiltriert.

Die Lösung konnte bei 4 °C bis zum Gebrauch gelagert werden.

2.12.3 Gelatine-TCP-Suspensionen

Es wurden jeweils Suspensionen mit 5 % Gelatine-Lösungen und 3 % TCP verwendet.
Dazu wurde die entsprechende Menge an Gelatine in Glasflaschen eingewogen und TCP zugewogen. Anschließend konnte mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt werden. Nach dem Autoklavieren wurde durch Schwenken eine möglichst gleichmäßige Verteilung des TCP erreicht.
Die heißen Suspensionen wurden entweder zur sofortigen Verwendung bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Schwenken abgekühlt bis sie lauwarm waren, oder bei Raumtemperatur erkalten gelassen und dann bei 4 °C zur späteren Verwendung aufbewahrt. Die Suspensionen wurden nicht länger als einen Monat verwendet, um Kontaminationen zu vermeiden.

2.12.4 Glutardialdehyd-Lösung

Als Crosslinker wurde Glutardialdehyd in einer Konzentration von 1 % eingesetzt.
Diese Stammlösung wurde durch Verdünnen von 25 % Glutardialdehyd mit PBS hergestellt. Die so bereitete Lösung wurde anschließend unter dem LAF in ein steriles Gefäß sterilfiltriert und bis zum Gebrauch bei 4 °C gelagert.

2.13 Beschichtung der Deckgläser

2.13.1 Erwärmen der Gelatinelösungen und Gelatine-TCP-Suspensionen

Sofern die Substanzen nicht gleich nach dem Autoklavieren zur Herstellung der Beschichtungen verwendet werden, mussten sie vor Verwendung im Schüttelinkubator wieder verflüssigt werden.

2.13.2 Beschichtungsmethode ohne Verwendung von Crosslinker

Das richtige Auftragevolumen ist bei der Beschichtung essentiell. Ein zu großes Volumen führt zum Aufwölben der trockenen Beschichtungen. Je kleiner das Volumen, umso besser haften die Beschichtungen an den Deckgläsern, weswegen für die Versuche 40 µl der entsprechenden Lösungen pro Deckglas aufgetragen wurden.

Nach Herstellung der entsprechenden Gelatinelösungen wurden die sterilen Deckgläser unter dem LAF auf Parafilm gelegt und jeweils 40 µl der gewünschten Gelatine- oder Pektinlösungen aufpipettiert.
Die Deckgläser verblieben bei eingeschaltetem LAF, bis die Beschichtungen getrocknet waren, danach konnten sie in 24-Well-Kulturplatten transferiert werden, um für die Versuche verwendet zu werden.

2.13.3 **Beschichtungsmethode unter Verwendung von Crosslinker**

Um zu verhindern, dass TCP während der Kultur aus den Gelatinefilmen herausgewaschen wird und um stabile Gelatine-TCP-Beschichtungen herzustellen, musste ein Crosslinker eingesetzt werden.
Nach mehreren Experimenten mit verschiedenen Crosslinkern wie UV-Bestrahlung, Glutardialdehyd und Genipin fiel die Wahl auf Glutardialdehyd. Diese Substanz wurde aus folgenden Gründen den anderen getesteten Crosslinkern vorgezogen: Genipin führte zu einer intensiven Blaufärbung der Beschichtungen, was das Auszählen der TRAP-positiven Osteoklasten erschwerte. Außerdem kam es bei den mit Genipin quervernetzten Beschichtungen sehr schnell zum Ablösen, Einrollen und Aufschwimmen, was bei Glutardialdeyhd weniger der Fall war. Das Quervernetzen mit UV-Strahlung hingegen zeigte nicht den gewünschten Effekt.
Aus der Literatur ging hervor, dass 1 % Glutardialdehyd nicht zytotoxisch ist (Bigi et al., 2001), was in den durchgeführten Experimenten auch bestätigt werden konnte.
Zur Beschichtung mit Gelatine-TCP-Suspensionen wurde zunächst wie bei der Beschichtung ohne Crosslinker vorgegangen. Nach dem Trocknen wurde danach jeweils Glutardialdehyd-Lösung aufpipettiert. Hier war darauf zu achten, dass die Beschichtungen nicht mit der Pipettenspitze berührt werden, da sie sonst verkratzen und sich in weiterer Folge während nachfolgenden Betreuungsschritten der Kultur leicht lösen. Zur Quervernetzung wurden die Deckgläser in geschlossenen Petrischalen bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in die 24-Well-Platten überführt. Nach dem Quervernetzen kam es zu einer leichten Orangefärbung der Beschichtungen.
Um den noch vorhandenen Glutardialdehyd zu entfernen, wurde jedes Well mehrmals mit PBS und mit sterilem bidestilliertem Wasser gewaschen. Nach Zugabe von α-MEM in jedes Well wurden die Platten vorinkubiert.

2.13.4 **Vorinkubation mit BSA-Lösung**

Als Kontrollgruppe wurde bei jedem Experiment auch eine „Beschichtung" mit BSA vorbereitet. Dazu wurde jeweils ein Deckglas in Wells einer 24-Well-Platte gelegt und dann BSA-Lösung (siehe Punkt 2.12.2) aufgetragen. Die Platte wurde inkubiert und BSA anschließend wieder abgesaugt. Danach wurde mit PBS gewaschen.
Sofern die Kulturplatte nicht gleich zur Verwendung kam, wurde sie bei 4 °C aufbewahrt.

2.14 Statistische Auswertung der erhaltenen Daten

Die Ergebnisse der Osteoklasten-Zählung wurden mit dem Programm „StatView" ausgewertet.
Zur Berechnung der p-Werte wurde ein Fisher PLSD-Test (protected least significant difference) für 95 %, 99 % und 99,9 % durchgeführt, was jeweils $p<0,05$, $p<0,01$ und $p<0,001$ entspricht.
Die Zellzahlen variierten teilweise, sodass diese Werte normiert wurden. Dafür wurden die Osteoklastenzahlen der Triplikate gemittelt und die Einzelwerte durch den Mittelwert dividiert.
Mit dem Programm „Prism" wurden die erhaltenen Ergebnisse anschließend grafisch dargestellt.

3 Ergebnisse

Um eine statistisch relevante Aussage über die erhobenen Daten treffen zu können, wurde jeder Beschichtungstyp in Triplikaten untersucht. Als Positivkontrolle wurden jeweils drei unbeschichtete Deckgläser und drei Wells ohne Deckgläser verwendet. Es wurde auch jeweils eine Gruppe mit BSA beschichteten Deckgläsern untersucht.
Bei Auswerten der TRAP-Färbung wurden die gebildeten Osteoklasten in Wells ohne Deckgläser nicht unter dem Mikroskop ausgezählt, da die ausgezählte Fläche der Wells größer war als die der Deckgläser und somit kein Vergleich gezogen werden kann.

Die Osteoklasten wurden mittels TRAP-Färbung quantifiziert. Da die Ergebnisse nach Durchführung von zwei Experimenten differierten, wurde das Experiment ein drittes Mal wiederholt. Die Morphologie der Osteoklasten wurde anhand der Aktin-/DAPI-Färbung durch Zählen der Osteoklasten insgesamt und Osteoklasten mit Aktinringen und anschließendem Errechnen des Anteils von Osteoklasten mit Aktinringen beurteilt. Außerdem wurde eine Immunfluoreszenzmarkierung durchgeführt; dadurch konnte beurteilt werden, ob der Beschichtungstyp Einfluss auf das Protein Integrin-β_3 in den Osteoklasten hatte.

Um die Ergebnisse besser zu veranschaulichen und da die Anzahl an Osteoklasten zwischen den durchgeführten drei Experimenten unterschiedlich war, wurde bei Experimenten mit Verwendung von Beschichtungen ohne TCP die Anzahl der gezählten Osteoklasten normiert und als Prozentwerte angegeben. Dafür wurde der Mittelwert der Kontrollgruppe ermittelt und jede Zellzahl durch diesen dividiert.

Für die Gelatine-TCP-Beschichtungen konnten aufgrund der starken Eigenfluoreszenz der Beschichtungen keine Immunfluoreszenzmarkierungen durchgeführt werden.

Die Osteoklastenzahlen, die aus den Experimenten der Aktin-/DAPI-Färbung hervorgingen, ermöglichten absolut gesehen keine quantitative Auswertung. Der Grund dafür ist, dass der Osteoblastenlayer im Unterschied zur TRAP-Färbung vor Durchführung der Aktin-/DAPI-Färbung abgelöst wurde. Dabei wurde eine undefinierte Anzahl an Osteoklasten ebenfalls abgewaschen.

Allerdings ist der Anteil an Aktinringen in Relation zur Gesamtzahl der verbliebenen Osteoklasten aussagekräftig, weswegen bei der Auswertung der Ergebnisse besonders auf diese Daten Augenmerk gelegt wurde.

3.1 Vergleich der Effekte der Beschichtungen auf Osteoklasten im Detail

Bei Betrachtung der Ergebnisse der Aktin-/DAPI-Färbung wurde deutlich, dass eine Vorinkubation mit BSA die Gesamtzahl an Osteoklasten verringert hat. Im Vergleich zur Kontrollgruppe war jedoch der prozentuelle Anteil an Aktinringen signifikant um ein Vielfaches höher ($p<0,001$ für Experiment 2). Diesen Trend zeigte auch Experiment 1, jedoch nicht mit statistischer Signifikanz.

Unter den Abschnitten 3.2, 3.3 und 3.4 sind die Ergebnisse noch einmal zusammengefasst, um den Vergleich aller Beschichtungen und Fragestellungen zu ermöglichen.
Tabelle 4, Tabelle 6 und Tabelle 7 auf den Seiten 74, 78 und 83 zeigen alle erhobenen Daten im Vergleich.

3.1.1 Gelatine Typ A, 300 g Bloom

Es wurden Gelatinelösungen mit einer Konzentration von 5 % Gelatine Typ A, 300 g Bloom zur Herstellung der Beschichtungen verwendet.
Im Falle der Beschichtungen mit TCP wurden Suspensionen mit 3 % TCP verwendet.

3.1.1.1 *TRAP+ Osteoklasten auf Beschichtungen ohne und mit TCP*

Die Kultivierung von Osteoklasten auf Beschichtungen dieses Gelatine-Typs ohne TCP zeigte, dass die Anzahl an gebildeten Osteoklasten im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen (unbeschichtetes Deckglas und BSA-Lösung) bei allen drei durchgeführten Experimenten signifikant ($p<0,001$) um etwa 50 % verringert wurde (Abbildung 8).

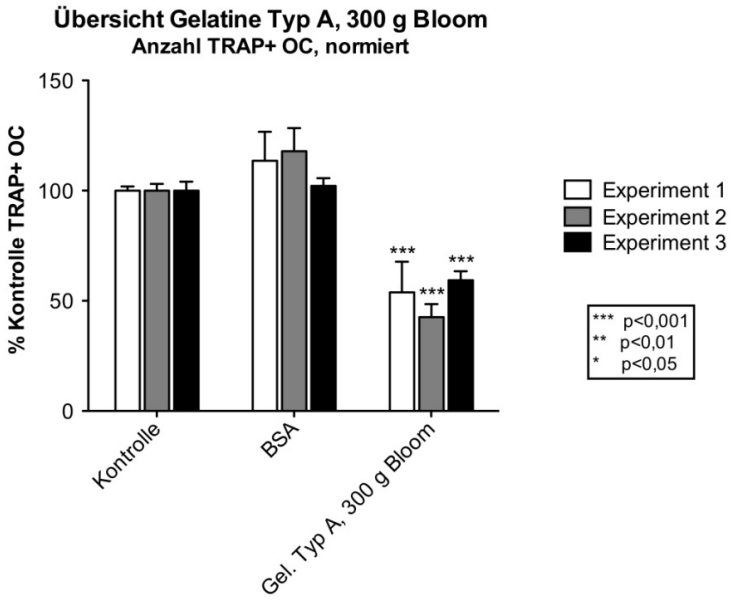


Abbildung 8: Effekt der Beschichtung mit 5 % Gelatine Typ A, 300 g Bloom auf Osteoklastenbildung (Mittelwert Anzahl TRAP+ OC in Kontrollgruppe: Experiment 1: 1499,33 OC, Experiment 2: 1626,33 OC, Experiment 3: 3100,33 OC)

Im Falle der Ansiedelung von Osteoklasten auf Beschichtungen mit TCP zeigte sich in beiden Experimenten mit hoher Signifikanz (p<0,001) eine stärkere Verringerung als ohne TCP auf etwa 30 % im Vergleich zu den Kontrollgruppen (Abbildung 9).

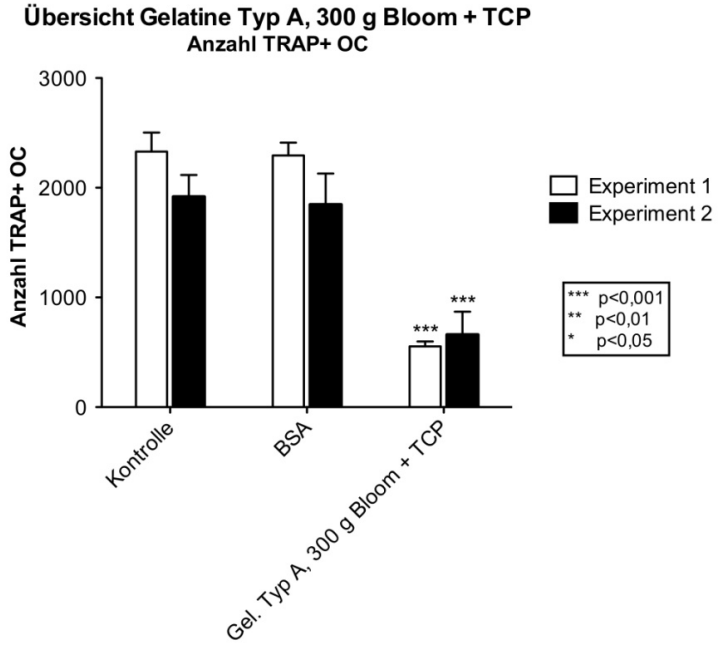


Abbildung 9: Effekt der Beschichtung mit Suspension von 5 % Gelatine Typ A, 300 g Bloom und 3 % TCP auf Osteoklastenbildung Ergebnisse der Aktin-/DAPI-Färbung

3.1.1.2 *Ergebnisse der Aktin-/DAPI-Färbung*

Bei der Gruppe mit Gelatinebeschichtungen vom Typ A, 300 g Bloom waren im Vergleich zur Kontrollgruppe in Experiment 2 die Anzahl und der Anteil an Aktinringen signifikant verringert ($p<0,01$ bzw. $p<0,05$), während sich bei Experiment 1 kein statistisch relevanter Unterschied zeigte (Abbildung 10).

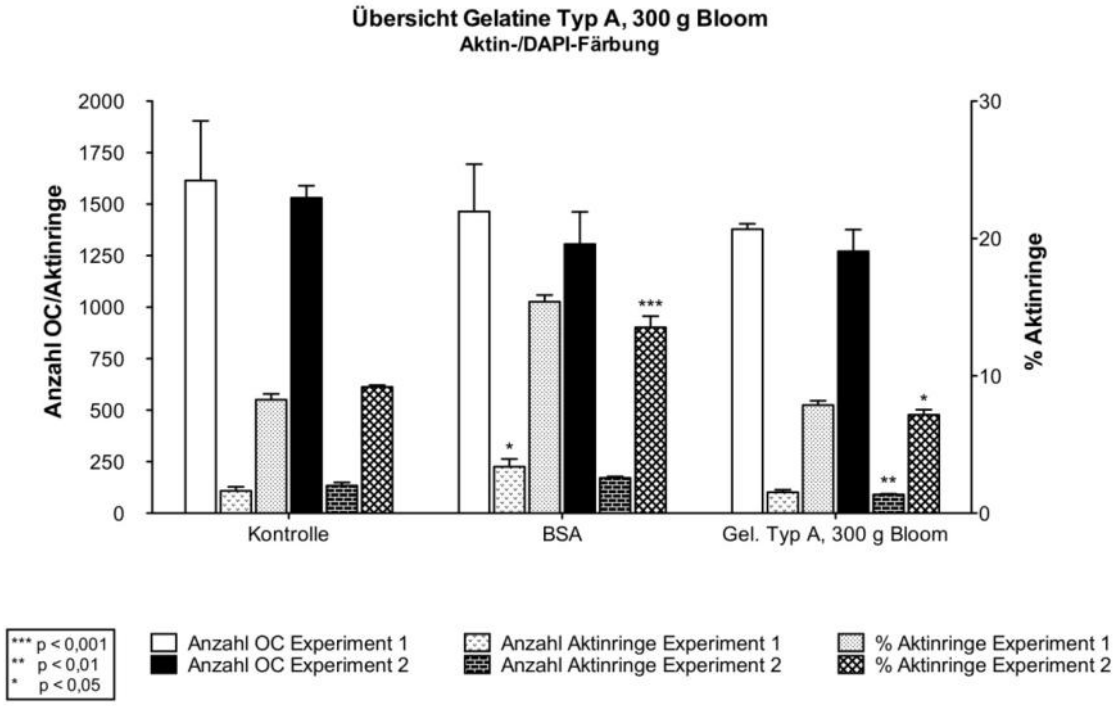


Abbildung 10: Effekt der Beschichtung mit 5 % Gelatine Typ A, 300 g Bloom auf Ausbildung von Aktinringen

3.1.1.3 *Morphologie der gebildeten Osteoklasten*

Aus dem mikroskopischen Bild der Aktin-DAPI-Färbung geht im Vergleich zur Kontrollgruppe hervor, dass das Aktin weniger intensiv gefärbt war, jedoch zeigten viele Osteoklasten mehrere Aktinringe pro Zelle, was in der Kontrollgruppe nicht der Fall war (siehe Abbildung 13).

Die entstandenen Osteoklasten waren kleiner als in der Kontrollgruppe, bildeten jedoch mehrere Ausläufer.

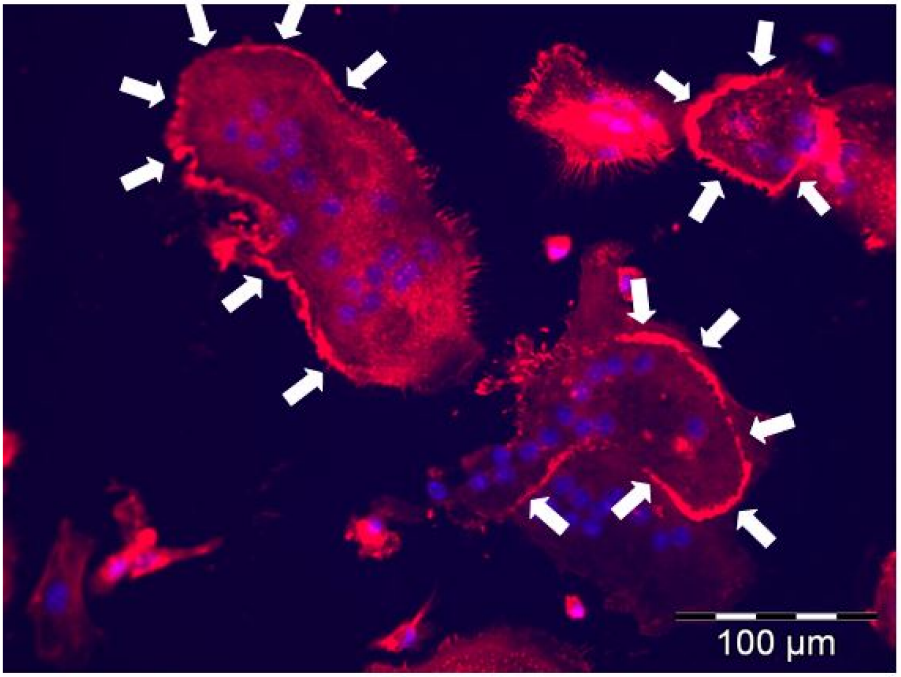


Abbildung 11: Mäuse-Osteoklasten auf unbeschichtetem Deckglas (**Kontrollgruppe**); deutlich sichtbare Aktinringe (Pfeile), durch DAPI angefärbte Zellkerne (blau), durch AlexaFluor® Phalloidin 546 gefärbtes Aktin (rot);

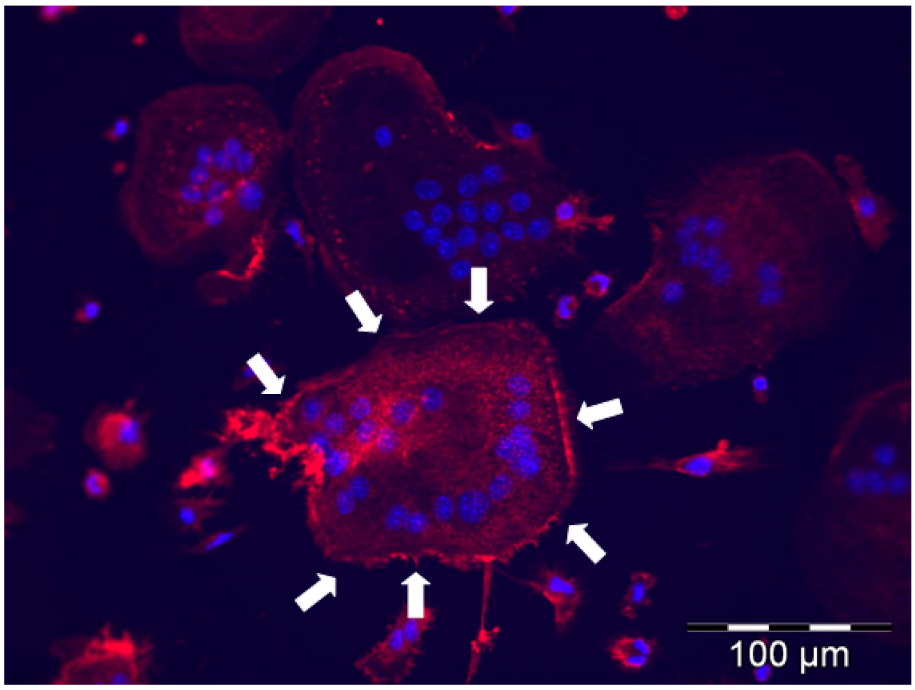
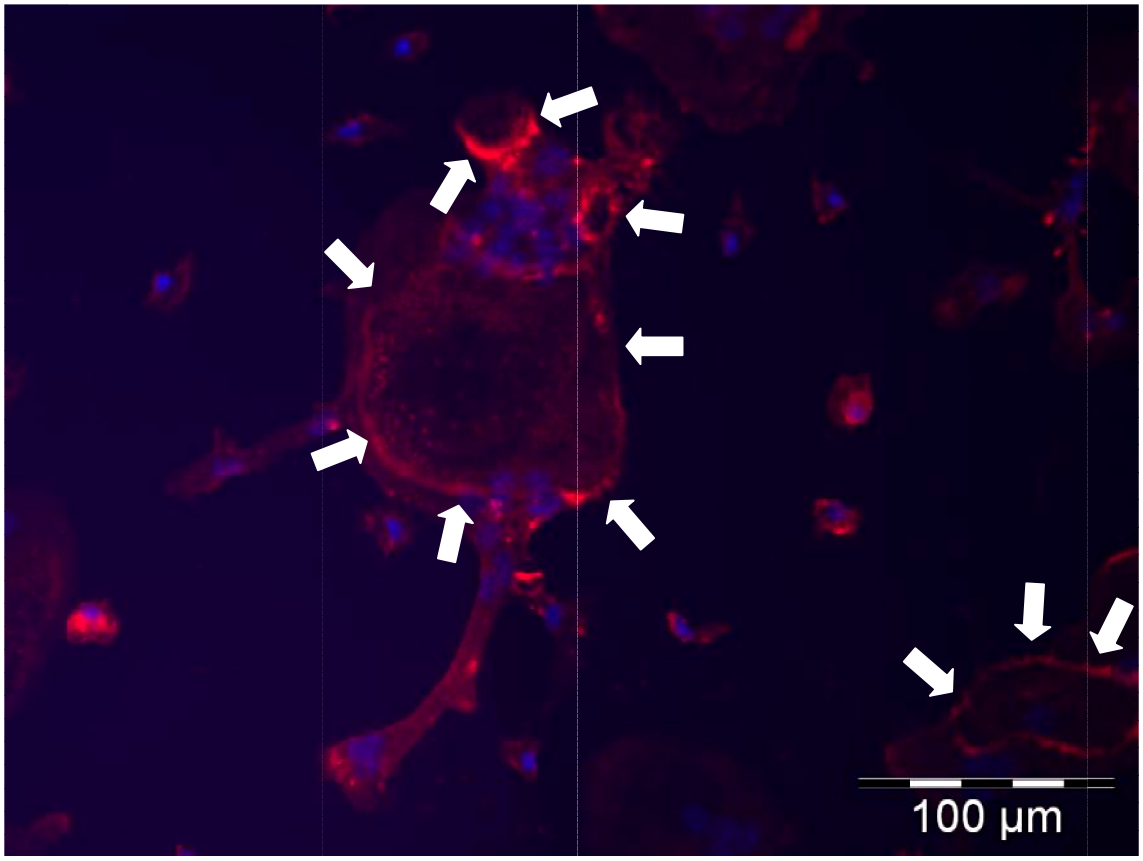


Abbildung 12: Mäuse-Osteoklasten auf Beschichtung mit **BSA**; mit deutlich sichtbarem Aktinring (Pfeile), durch DAPI angefärbte Zellkerne (blau), durch AlexaFluor® Phalloidin 546 gefärbtes Aktin (rot); Im Vergleich zur Kontrollgruppe (unbeschichtetes Deckglas) ist Aktin deutlich schwächer gefärbt, die Osteoklasten sind runder, regelmäßiger und etwas größer, die Aktinringe sind weniger stark ausgeprägt



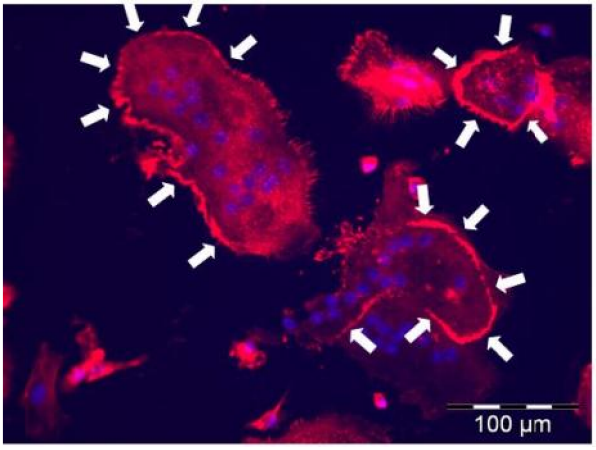


Abbildung 13: Mäuse-Osteoklasten auf Beschichtung mit **Gelatine Typ A, 300 g Bloom**; mit mehreren deutlich sichtbaren Aktinringen pro Zelle (Pfeile), durch DAPI angefärbte Zellkerne (blau), durch AlexaFluor® Phalloidin 546 gefärbtes Aktin (rot);
Im Vergleich zur Kontrollgruppe (rechts) sind die Aktinringe schwächer gefärbt;

3.1.2 **Gelatine Typ A, 90 – 110 g Bloom**

Es wurden Gelatinelösungen mit einer Konzentration von 5 % Gelatine Typ A, 90 - 110 g Bloom zur Herstellung der Beschichtungen verwendet.
Im Falle der Beschichtungen mit TCP wurden Suspensionen mit 3 % TCP verwendet.

3.1.2.1 *TRAP+ Osteoklasten auf Beschichtungen ohne und mit TCP*

Die Kultivierung von Osteoklasten auf Beschichtungen dieses Gelatine-Typs ohne TCP zeigte, dass die Anzahl an gebildeten Osteoklasten im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen (unbeschichtetes Deckglas und BSA-Lösung) bei allen drei durchgeführten Experimenten signifikant (p<0,001) auf sehr stark verringert wurde (Abbildung 14).

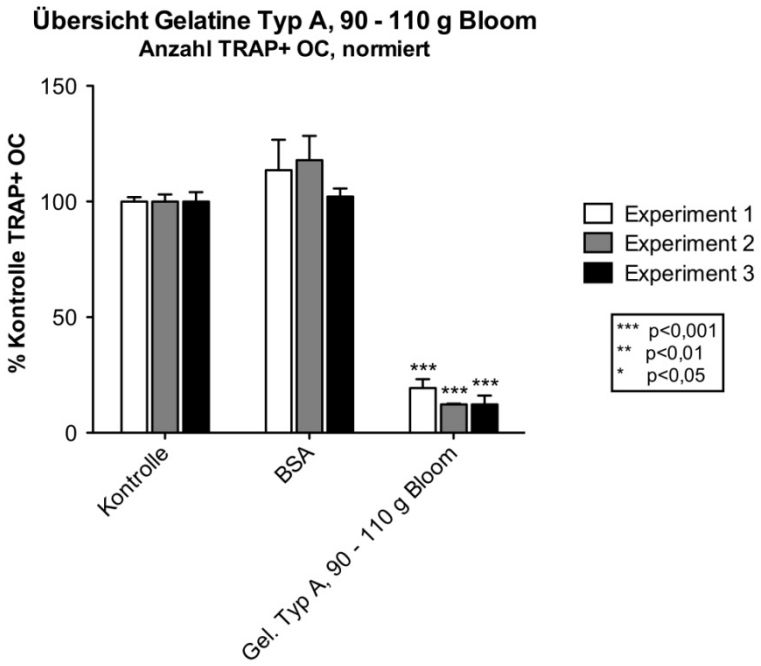


Abbildung 14: Effekt der Beschichtung mit 5 % Gelatine Typ A, 90 – 110 g Bloom auf Osteoklastenbildung (Mittelwert Anzahl TRAP+ OC in Kontrollgruppe: Experiment 1: 1499,33 OC, Experiment 2: 1626,33 OC, Experiment 3: 3100,33 OC)

Im Falle der Ansiedelung von Osteoklasten auf Beschichtungen mit TCP zeigte sich mit hoher Signifikanz (p<0,001) eine weniger ausgeprägte Erniedrigung der Anzahl an TRAP+ Osteoklasten als ohne TCP (Abbildung 15).

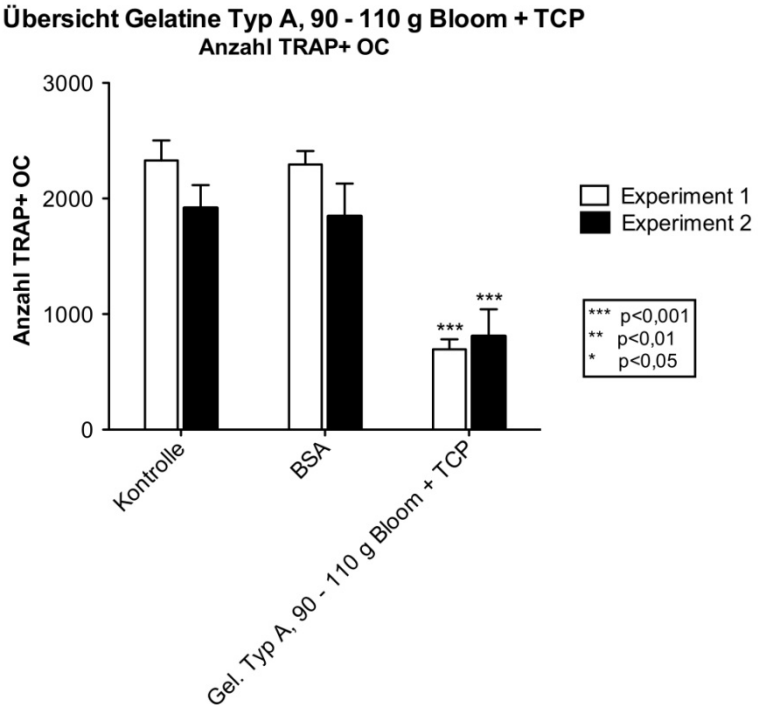


Abbildung 15: Effekt der Beschichtung mit Suspension von 5 % Gelatine Typ A, 90 – 110 g Bloom und 3 % TCP auf Osteoklastenbildung *Ergebnisse der Aktin-/DAPI-Färbung*

Aus der Aktin-/DAPI-Färbung ging hervor, dass der Anteil an Osteoklasten mit Aktinringen im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen mit hoher Signifikanz ($p<0,001$) in beiden Experimenten stark anstieg und bei etwa 20 % lag.
Im Fall von Experiment 1 war auch die Gesamtzahl an Aktinringen signifikant erhöht. Beschichtungen mit diesem Typ Gelatine brachten von allen verwendeten Beschichtungen den höchsten Anteil an Aktinringen hervor, siehe dazu Abbildung 16.

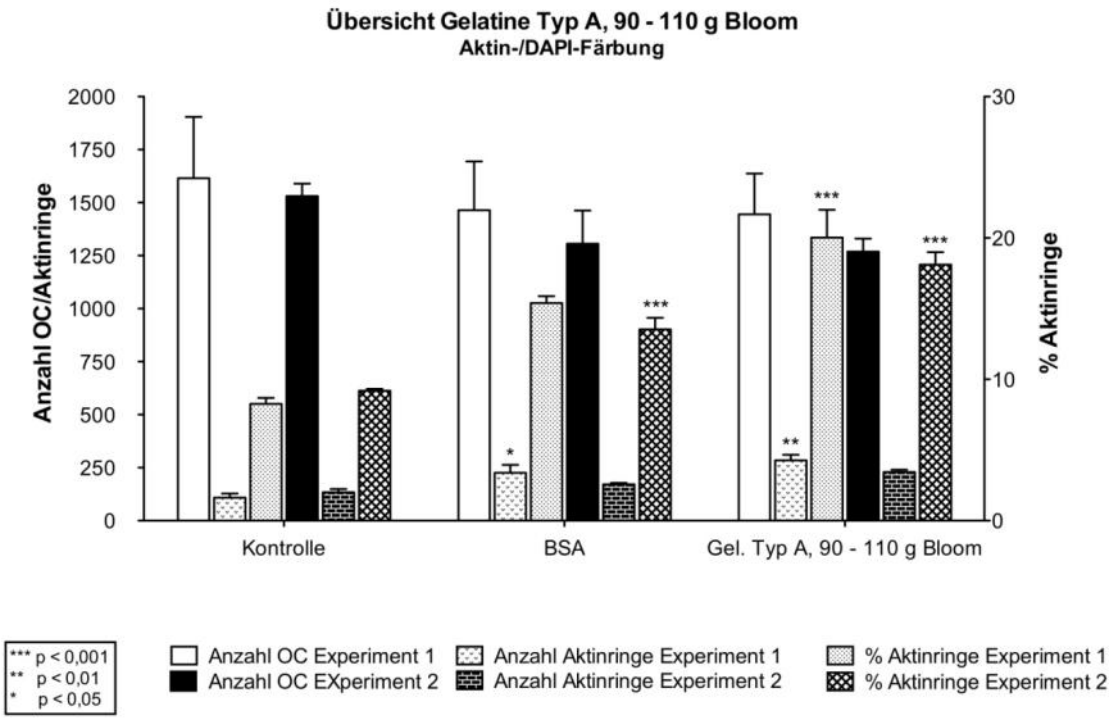


Abbildung 16: Effekt der Beschichtung mit 5 % Gelatine Typ A, 90 - 110 g Bloom auf Ausbildung von Aktinringen

3.1.2.3 *Morphologie der gebildeten Osteoklasten*

Die Osteoklasten waren in diesem Fall kleiner und runder als in der Kontrollgruppe, und das vorhandene Aktin weniger intensiv gefärbt. Es wurden jedoch auch Osteoklasten gefunden, die eher verzweigt und dadurch länglicher und schmäler waren. Allgemein lässt sich sagen, dass sich die Ausprägung beider Gestalten etwa die Waage hielt, was sich auch in der Immunfluoreszenzmarkierung bestätigte (siehe dazu 3.6).

Die vorhandenen Aktinringe waren im Vergleich zur allgemein schwächeren Färbung des Aktin jedoch intensiver, sodass sich ein sehr kontrastreiches Bild mit zarten, sehr schmalen Aktinringen zeigte. Sofern Aktinringe vorhanden waren, zeigten sich diese als fast vollständig ausgeprägt (siehe Abbildung 17).

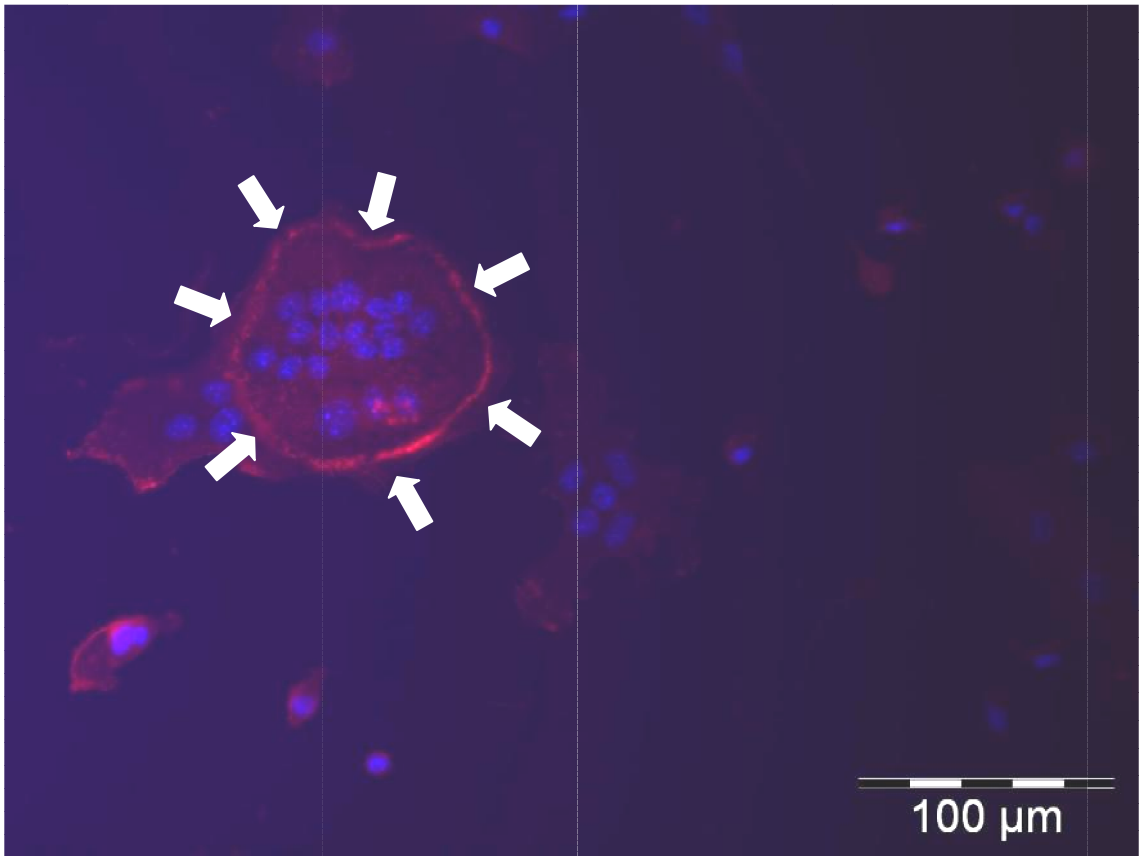
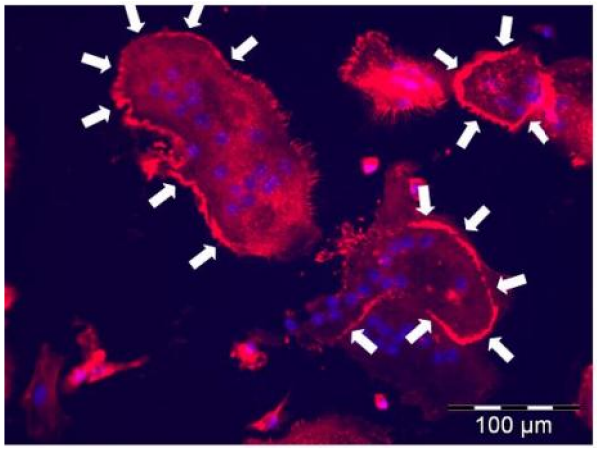


Abbildung 17: Mäuse-Osteoklasten auf Beschichtung mit **Gelatine Typ A, 90 - 110 g Bloom**; deutlich sichtbarer Aktinring (Pfeile), durch DAPI angefärbte Zellkerne (blau), durch AlexaFluor® Phalloidin 546 gefärbtes Aktin (rot);

Im Vergleich zur Kontrollgruppe (rechts) ist Aktin deutlich schwächer gefärbt;



3.1.3 **Gelatine Typ A, 300 g/90 – 110 g Bloom**

Es wurden Gelatinelösungen mit einer Konzentration von 5 % Gelatine Typ A, 300 g/90 – 110 g Bloom zur Herstellung der Beschichtungen verwendet.
Im Falle der Beschichtungen mit TCP wurden Suspensionen mit 3 % TCP verwendet.

3.1.3.1 *TRAP+ Osteoklasten auf Beschichtungen ohne und mit TCP*

Eine Beschichtung mit diesem Gelatinetyp ohne TCP hatte in allen durchgeführten Experimenten einen hemmenden Effekt auf die Osteoklastenbildung.
Wie aus Abbildung 18 hervorgeht, wurden im Fall von Experiment 1 und 3 nur sehr wenige Osteoklasten gezählt, während in Experiment 2 gar keine Osteoklasten vorhanden waren. Diese Ergebnisse hatten hohe statistische Signifikanz (p<0,001).

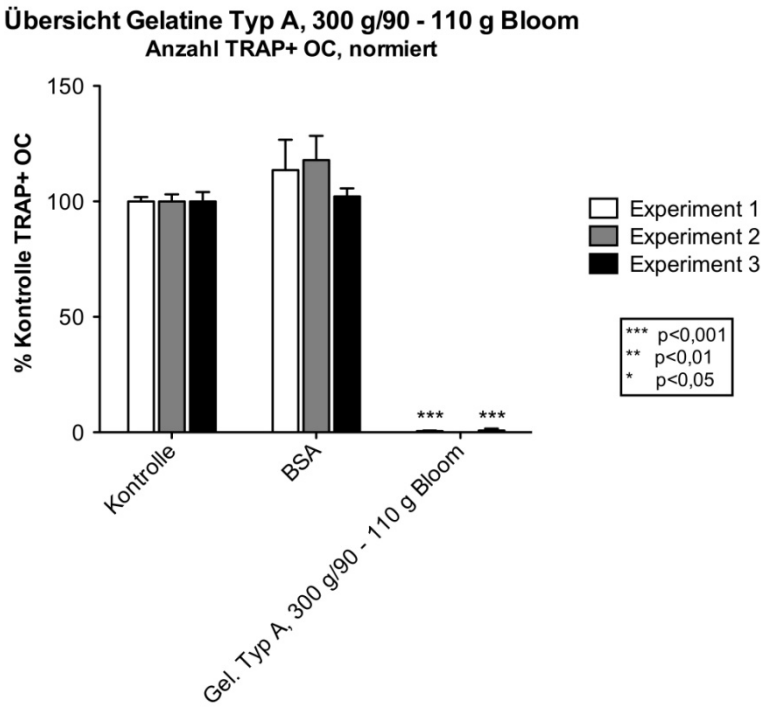


Abbildung 18: Effekt der Beschichtung mit 5 % Gelatine Typ A, 300 g/90 – 110 g Bloom auf Osteoklastenbildung (Mittelwert Anzahl TRAP+ OC in Kontrollgruppe: Experiment 1: 1499,33 OC, Experiment 2: 1626,33 OC, Experiment 3: 3100,33 OC)

Bei Beschichtung mit einer Suspension aus diesen beiden Gelatinetypen und TCP wurde ebenfalls die Osteoklastenanzahl in beiden Experimenten stark verringert, jedoch nicht gänzlich gehemmt. Auch diese Ergebnisse weisen hohe statistische Signifikanz auf (p<0,001, siehe dazu Abbildung 19).

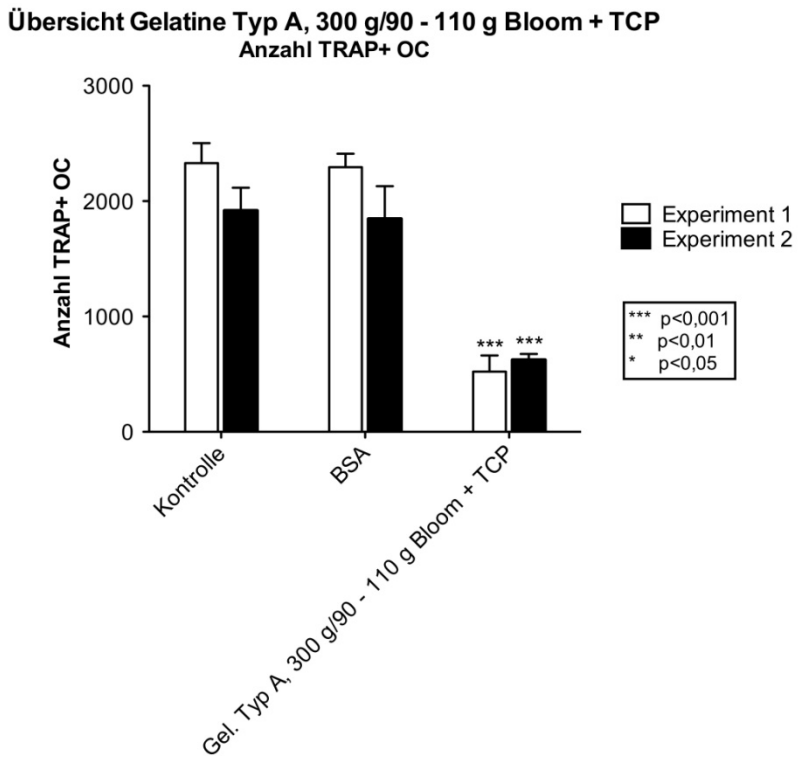


Abbildung 19: Effekt der Beschichtung mit Suspension von 5 % Gelatine Typ A, 300 g/90 – 110 g Bloom und 3 % TCP auf Osteoklastenbildung

3.1.3.2 *Ergebnisse der Aktin-/DAPI-Färbung*

Wie bereits aus der Auszählung der TRAP-Färbung ersichtlich war, bildeten sich auf diesem Beschichtungstyp nur sehr wenige bis gar keine Osteoklasten.
Auch bei der Auswertung der Aktin-/DAPI-Färbung konnten auf den Deckgläsern in beiden Experimenten keine Osteoklasten gefunden werden (Abbildung 20).
Aus diesem Grund konnte auch die Morphologie der Osteoklasten nicht untersucht werden.

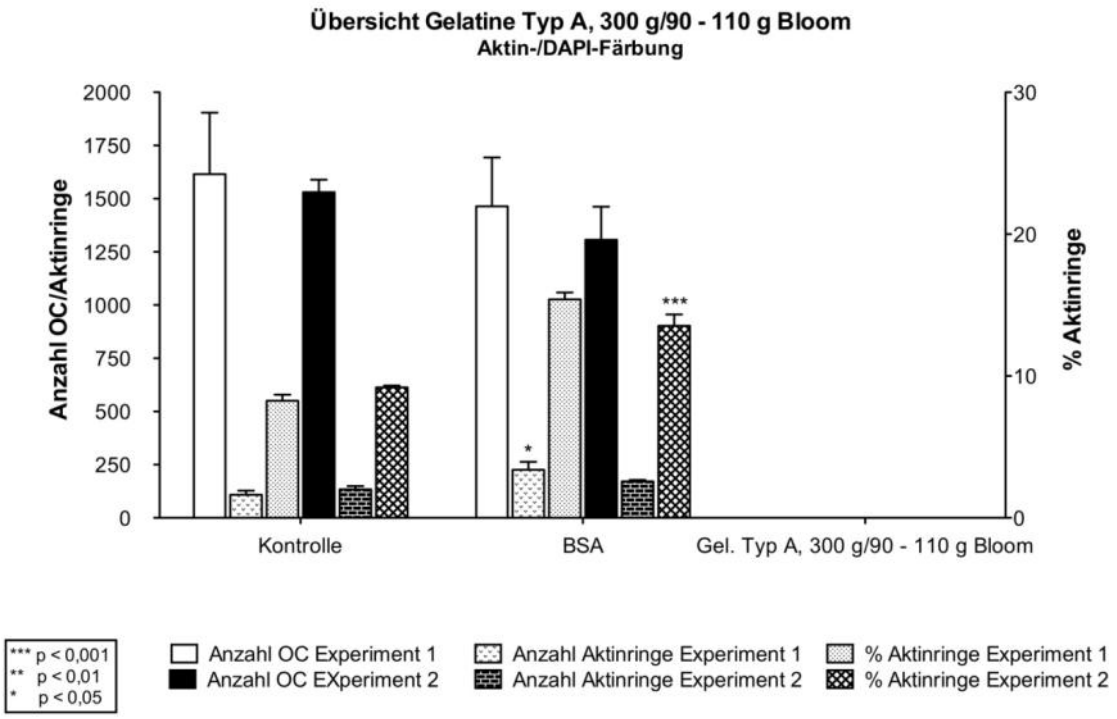


Abbildung 20: Effekt der Beschichtung mit 5 % Gelatine Typ A, 300 g/90 - 110 g Bloom auf Ausbildung von Aktinringen

3.1.4 **Gelatine Typ B**

Es wurden Gelatinelösungen mit einer Konzentration von 5 % Gelatine Typ B zur Herstellung der Beschichtungen verwendet.
Im Falle der Beschichtungen mit TCP wurden Suspensionen mit 3 % TCP verwendet.

3.1.4.1 *TRAP-positive Osteoklasten*

Wie in Abbildung 21 ersichtlich, zeigte sich bei Beschichtung mit Gelatine Typ B ohne Zusatz von TCP eine gänzliche Unterdrückung der Osteoklastenbildung in allen drei durchgeführten Experimenten. Aus diesem Grund wurde von diesem Gelatinetyp keine Aktin-/DAPI-Färbung durchgeführt und es liegen keine Resultate bezüglich der Morphologie der Osteoklasten vor.

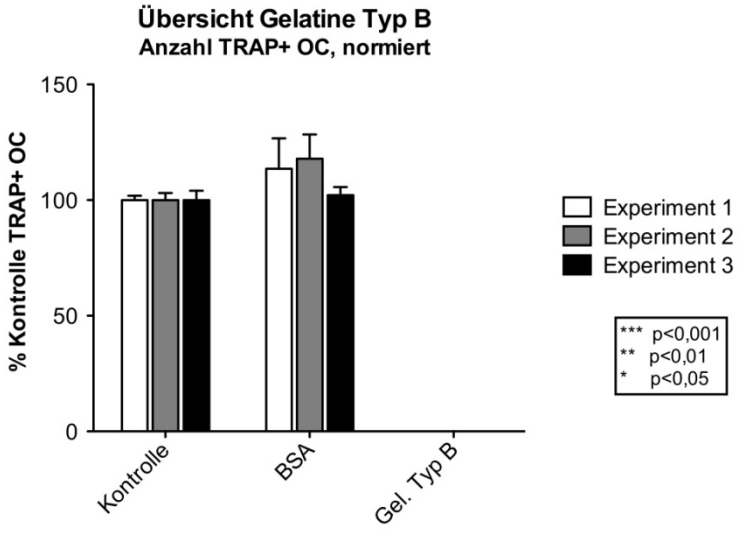


Abbildung 21: Effekt der Beschichtung mit 5 % Gelatine Typ B auf Osteoklastenbildung (Mittelwert Anzahl TRAP+ OC in Kontrollgruppe: Experiment 1: 1499,33 OC, Experiment 2: 1626,33 OC, Experiment 3: 3100,33 OC)

Bei Beschichtung mit einer Suspension aus Gelatine Typ B und TCP wurde die Osteoklastenbildung ebenfalls beeinträchtigt, jedoch nicht vollständig verhindert. Dieser Effekt trat in beiden Experimenten mit hoher Signifikanz ($p<0,001$) auf (Abbildung 22).

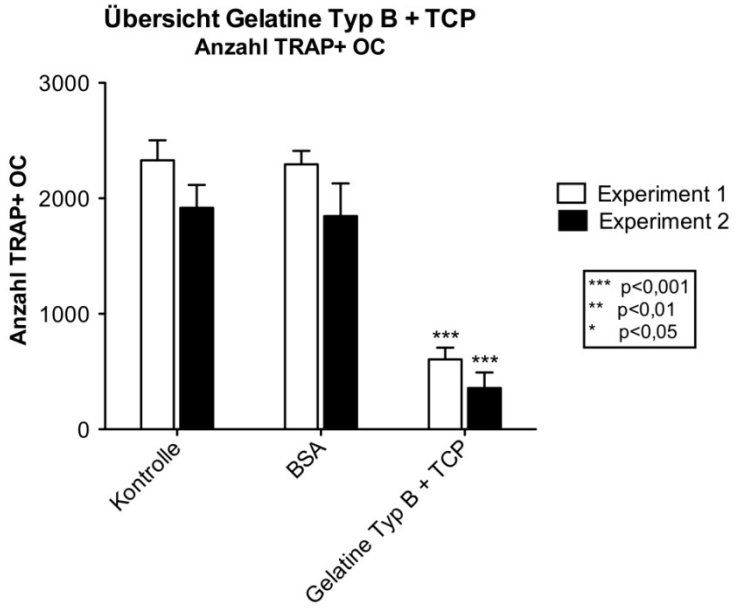


Abbildung 22: Effekt der Beschichtung mit Suspension von 5 % Gelatine Typ B und 3 % TCP auf Osteoklastenbildung

3.1.5 **Gelatine Typ B/Typ A, 300 g Bloom**

Es wurden Gelatinelösungen mit einer Konzentration von 5 % Gelatine Typ B/Typ A, 300 g Bloom zur Herstellung der Beschichtungen verwendet.
Im Falle der Beschichtungen mit TCP wurden Suspensionen mit 3 % TCP verwendet.

3.1.5.1 *TRAP+ Osteoklasten auf Beschichtungen ohne und mit TCP*

Wie auch bei alleiniger Verwendung von Gelatine Typ B zeigte sich in allen drei Experimenten eine vollständige Hemmung der Osteoklastenbildung, siehe dazu Abbildung 23.
Es wurde daher auch von dieser Gruppe keine Aktin-/DAPI-Färbung durchgeführt.

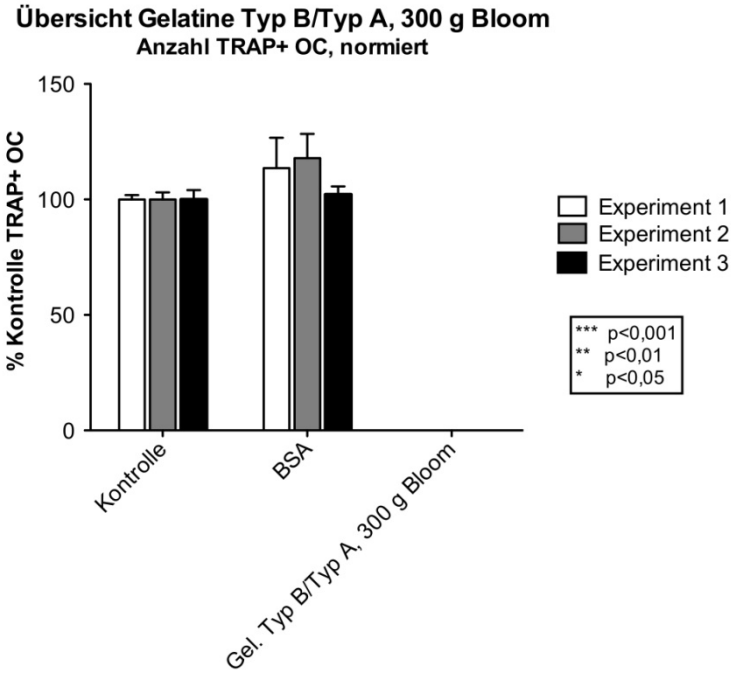


Abbildung 23: Effekt der Beschichtung mit 5 % Gelatine Typ B/Typ A, 300 g Bloom auf Osteoklastenbildung (Mittelwert Anzahl TRAP+ OC in Kontrollgruppe: Experiment 1: 1499,33 OC, Experiment 2: 1626,33 OC, Experiment 3: 3100,33 OC)

Die Beschichtung mit einer Suspension von Gelatine Typ B/Typ A, 300 g Bloom und TCP hatte einen ähnliche Effekt wie Verwendung von Gelatine Typ B und TCP: es kam auch hier mit hoher Signifikanz ($p<0,001$) in beiden Experimenten zur deutlichen Erniedrigung der Osteoklastenanzahl, aber zu keiner vollständigen Hemmung (Abbildung 24).

Es wurden dabei etwas weniger Osteoklasten gezählt als unter Verwendung von Gelatine Typ B alleine und TCP.

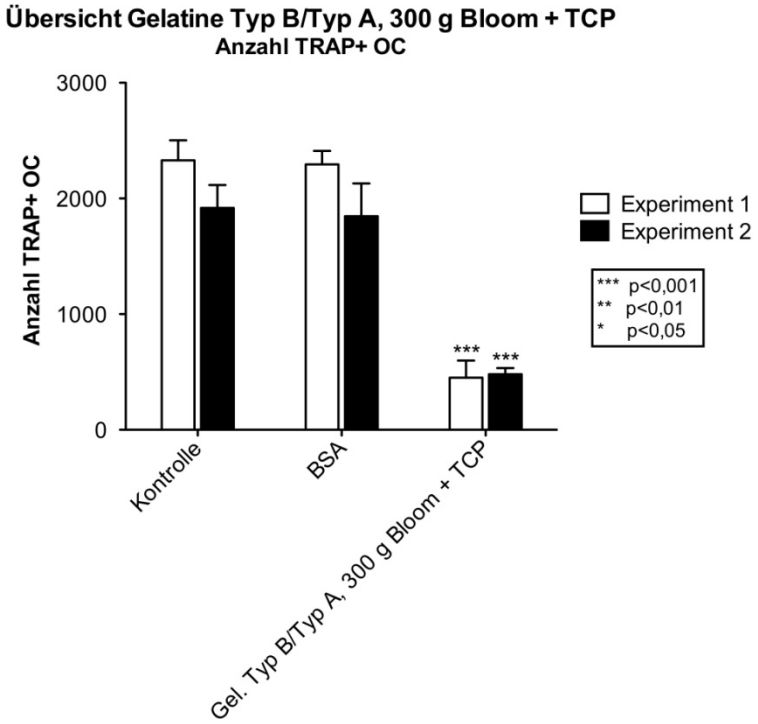


Abbildung 24: Effekt der Beschichtung mit Suspension von 5 % Gelatine Typ B/Typ A, 300 g Bloom und 3 % TCP auf Osteoklastenbildung

3.1.6 Gelatine Typ B/Typ A, 90 - 110 g Bloom

Es wurden Gelatinelösungen mit einer Konzentration von 5 % Gelatine Typ B/Typ A, 90 – 110 g Bloom zur Herstellung der Beschichtungen verwendet.
Im Falle der Beschichtungen mit TCP wurden Suspensionen mit 3 % TCP verwendet.

3.1.6.1 *TRAP+ Osteoklasten auf Beschichtungen ohne und mit TCP*

Unter Verwendung einer Beschichtung aus Gelatine Typ B gemischt mit Typ A, 90 – 110 g Bloom kam es ohne TCP wie bei den anderen Experimenten unter Verwendung von Gelatine Typ B zur Unterdrückung der Osteoklastenbildung (Abbildung 25), sodass diese Gruppe nicht für die Durchführung einer Aktin-/DAPI-Färbung herangezogen wurde.

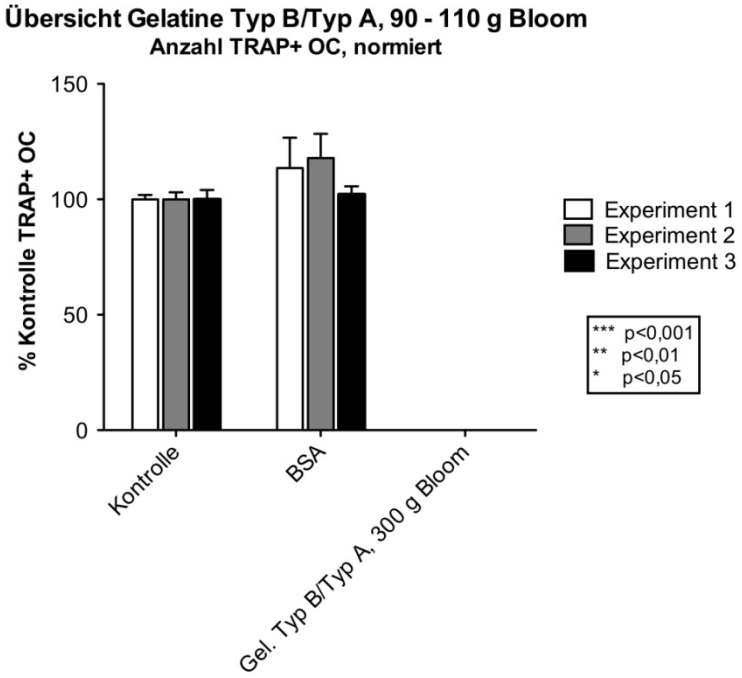


Abbildung 25: Effekt der Beschichtung mit 5 % Gelatine Typ B/Typ A, 90 - 110 g Bloom auf Osteoklastenbildung (Mittelwert Anzahl TRAP+ OC in Kontrollgruppe: Experiment 1: 1499,33 OC, Experiment 2: 1626,33 OC, Experiment 3: 3100,33 OC)

Bei Verwendung dieser Gelatinetypen als Suspension mit TCP wurde, wie in Abbildung 26 dargestellt, die Osteoklastenbildung ebenfalls in beiden Experimenten mit hoher Signifikanz ($p<0,001$) stark eingeschränkt.
Im Vergleich zu Mischungen von Gelatine Typ B mit anderen Gelatinetypen trat hier unter Verwendung der Beschichtung als Suspension mit TCP die größte Reduktion, also die niedrigsten Osteoklastenzahlen, auf.

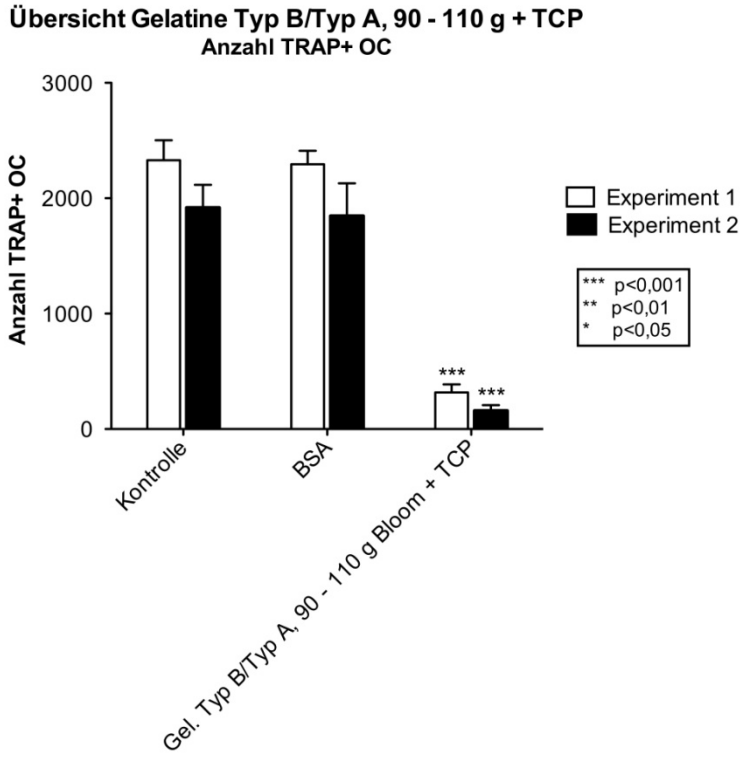


Abbildung 26: Effekt der Beschichtung mit Suspension von 5 % Gelatine Typ B/Typ A, 90 – 110 g Bloom und 3 % TCP auf Osteoklastenbildung

3.1.7 **Gelatine p.a.**

Es wurden Gelatinelösungen mit einer Konzentration von 5 % Gelatine p.a. zur Herstellung der Beschichtungen verwendet.
Im Falle der Beschichtungen mit TCP wurden Suspensionen mit 3 % TCP verwendet.

3.1.7.1 *TRAP+ Osteoklasten auf Beschichtungen ohne und mit TCP*

Unter Verwendung von Gelatine p.a. ohne TCP zeigte sich in Experiment 1 eine leichte Erhöhung der Osteoklastenanzahl, die jedoch nicht statistisch signifikant war.
In Experiment 2 und 3 wurde ersichtlich, dass die Anzahl an Osteoklasten reduziert wurde. Diese Ergebnisse waren in beiden Experimenten signifikant, wobei die Signifikanz in Experiment 3 am höchsten war ($p<0,001$). Desweiteren war die Verringerung der Osteoklastenzahl in Experiment 3 am höchsten, siehe dazu auch Abbildung 27.

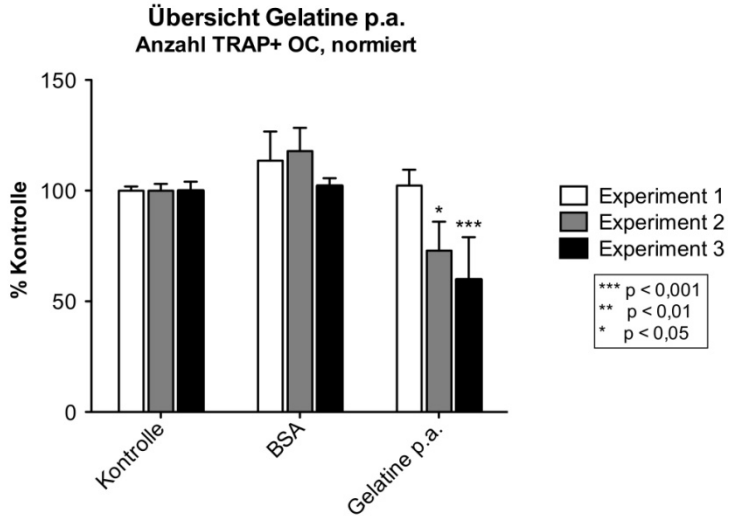


Abbildung 27: Effekt der Beschichtung mit 5 % Gelatine p.a. auf Osteoklastenbildung (Mittelwert Anzahl TRAP+ OC in Kontrollgruppe: Experiment 1: 1499,33 OC, Experiment 2: 1626,33 OC, Experiment 3: 3100,33 OC)

Bei Beschichtungen bestehend aus Gelatine p.a. und TCP trat ebenfalls eine Erniedrigung der Osteoklastenzahlen im Vergleich zu den Kontrollgruppen auf, die höher war als unter Verwendung ohne TCP (Abbildung 28). Dieser Effekt trat für beide Experimente mit hoher Signifikanz (p<0,001) auf.

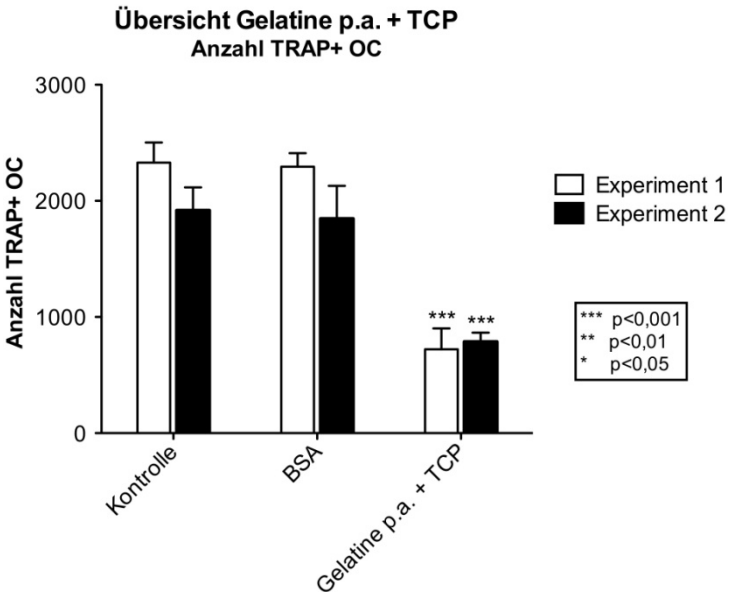


Abbildung 28: Effekt der Beschichtung mit Suspension von 5 % Gelatine p.a. und 3 % TCP auf Osteoklastenbildung

3.1.7.2 *Ergebnisse der Aktin-/DAPI-Färbung*

Während es sowohl in Experiment 1 , als auch in Experiment 2 zu einer signifikanten Verringerung der Osteoklastenanzahl kam, blieb der prozentuelle Anteil an Aktinringen im Vergleich zur Kontrolle in etwa gleich. Diese beiden Ergebnisse wiesen jedoch keine statistische Signifikanz auf (Abbildung 29).

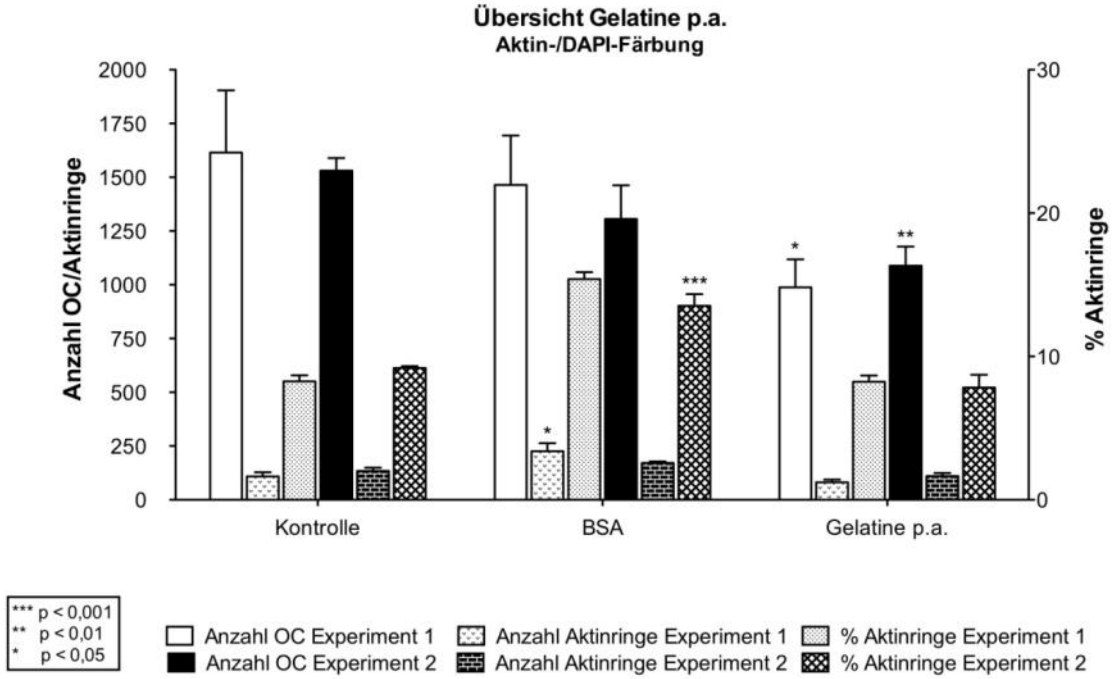


Abbildung 29: Effekt der Beschichtung mit 5 % Gelatine p.a. auf Ausbildung von Aktinringen

3.1.7.3 *Morphologie der gebildeten Osteoklasten*

Verglichen mit der Kontrollgruppe waren die Osteoklasten sehr groß und langgezogen und wiesen dementsprechend viele Zellkerne auf. Die Aktinringe waren schwächer ausgeprägt und dünner (Abbildung 30).

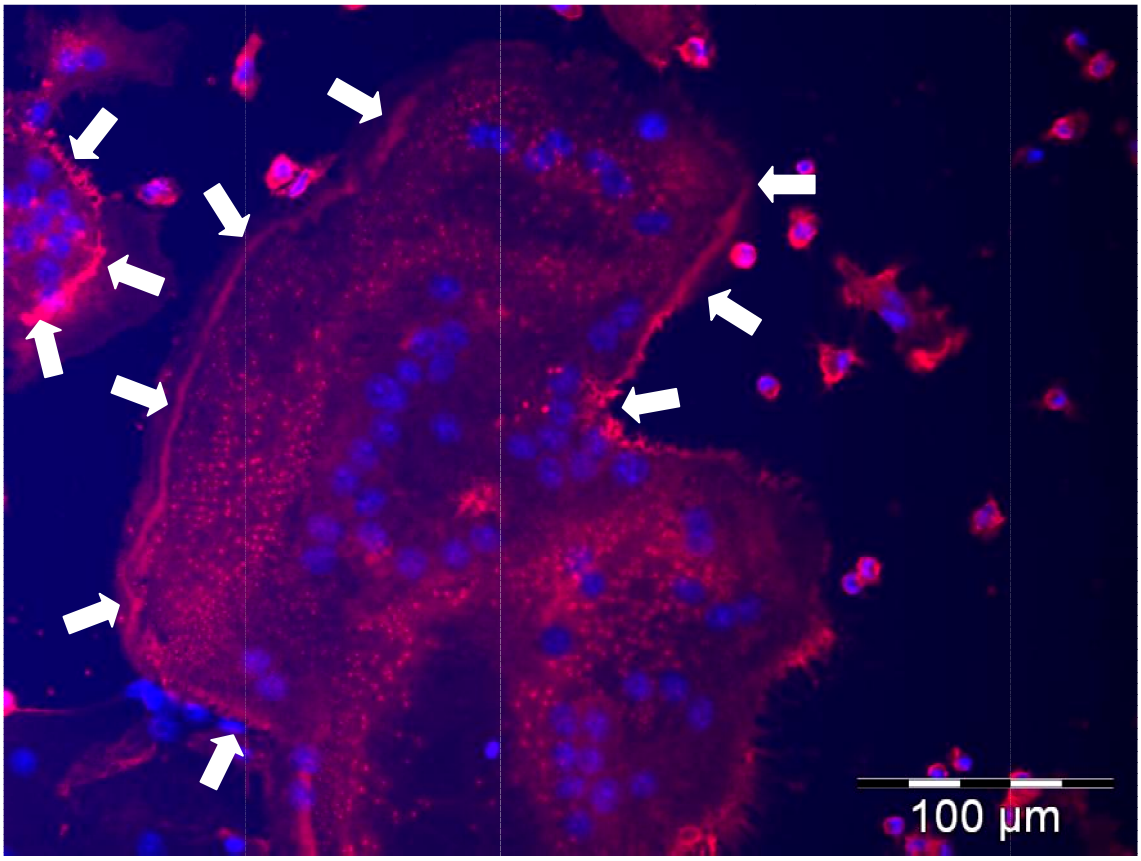
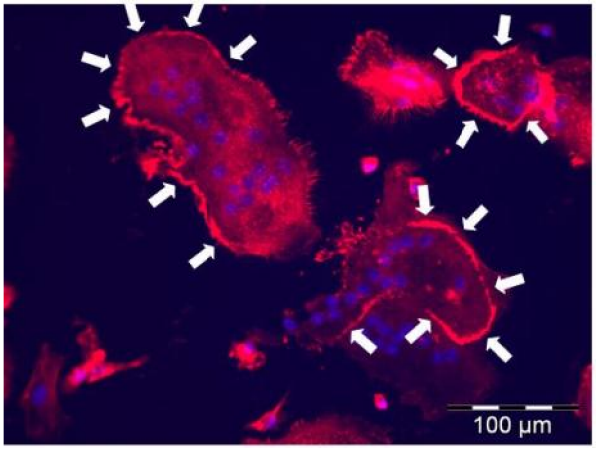


Abbildung 30: großer Mäuse-Osteoklast auf Beschichtung mit **Gelatine p.a**. mit deutlich sichtbarem Aktinring (Pfeile), durch DAPI angefärbte Zellkerne (blau), durch AlexaFluor® Phalloidin 546 gefärbtes Aktin (rot);



Im Vergleich zur Kontrollgruppe (rechts) ist der Osteoklast sehr groß, die Aktinringe sind schwächer ausgeprägt und schmäler;

3.1.8 **Pektin**

Es wurden Gelatinelösungen mit einer Konzentration von 5 % Pektin zur Herstellung der Beschichtungen verwendet.
Da für diesen Beschichtungstyp kein geeigneter Crosslinker gefunden werden konnte und Pektin aufgrund seiner Struktur nicht mit Glutardialdehyd quervernetzt werden kann, liegen keine Daten zu Beschichtungen aus Suspensionen von Pektin und TCP vor.

3.1.8.1 *TRAP+ Osteoklasten auf Beschichtungen ohne und mit TCP*

In Experiment 1, 2 und 3 konnte festgestellt werden, dass die Anzahl an Osteoklasten auf Beschichtungen mit Pektin ohne TCP reduziert wurde.
Wie Abbildung 31 zeigt, war diese Reduktion im Fall von Experiment 1 und 2 schwächer ausgeprägt als bei Experiment 3 und wies keine statistische Signifikanz auf. Experiment 3 zeigte jedoch mit hoher Signifikanz (p<0,001) eine starke Verringerung.

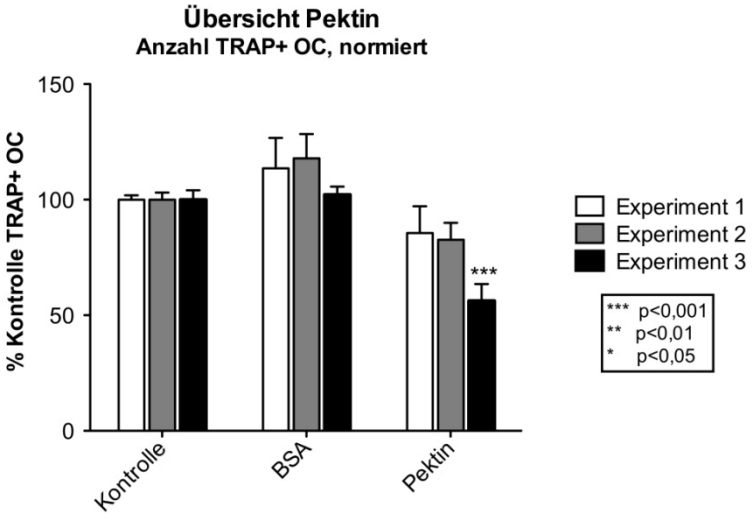


Abbildung 31: Effekt der Beschichtung mit 5 % Pektin auf Osteoklastenbildung (Mittelwert Anzahl TRAP+ OC in Kontrollgruppe: Experiment 1: 1499,33 OC, Experiment 2: 1626,33 OC, Experiment 3: 3100,33 OC)

3.1.8.2 *Ergebnisse der Aktin-/DAPI-Färbung*

Die Aktin-/DAPI-Färbung ergab keine Resultate mit statistischer Signifikanz, Es zeigte sich in beiden Experimenten außer einer Verringerung der Osteoklastenzahl keine bedeutenden Unterschiede verglichen mit der Kontrollgruppe (Abbildung 32).

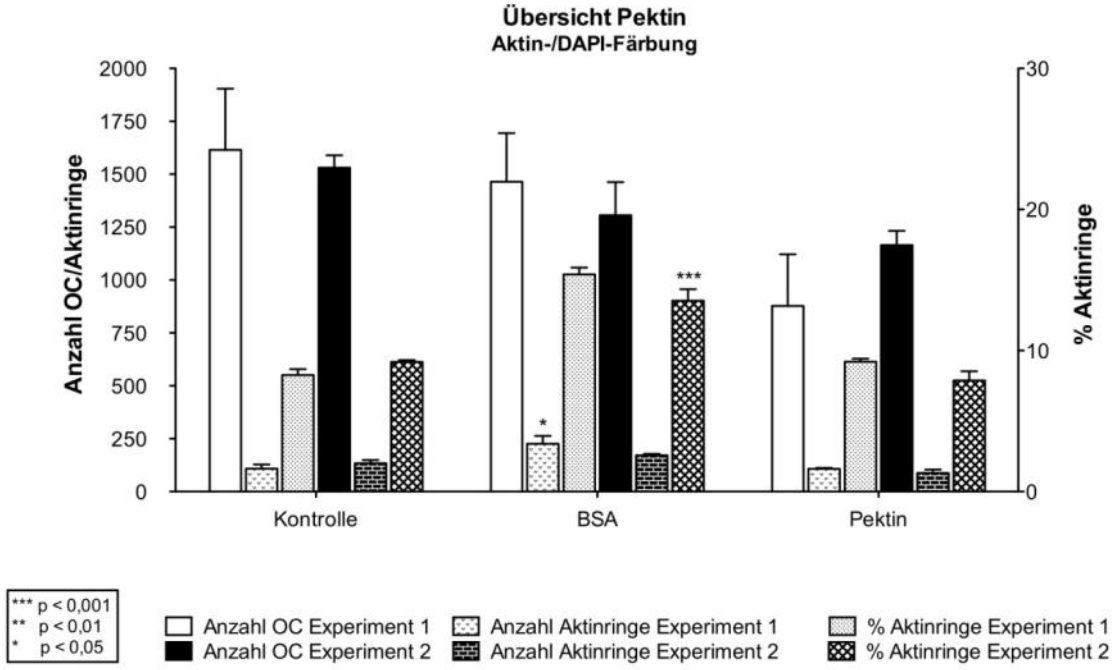
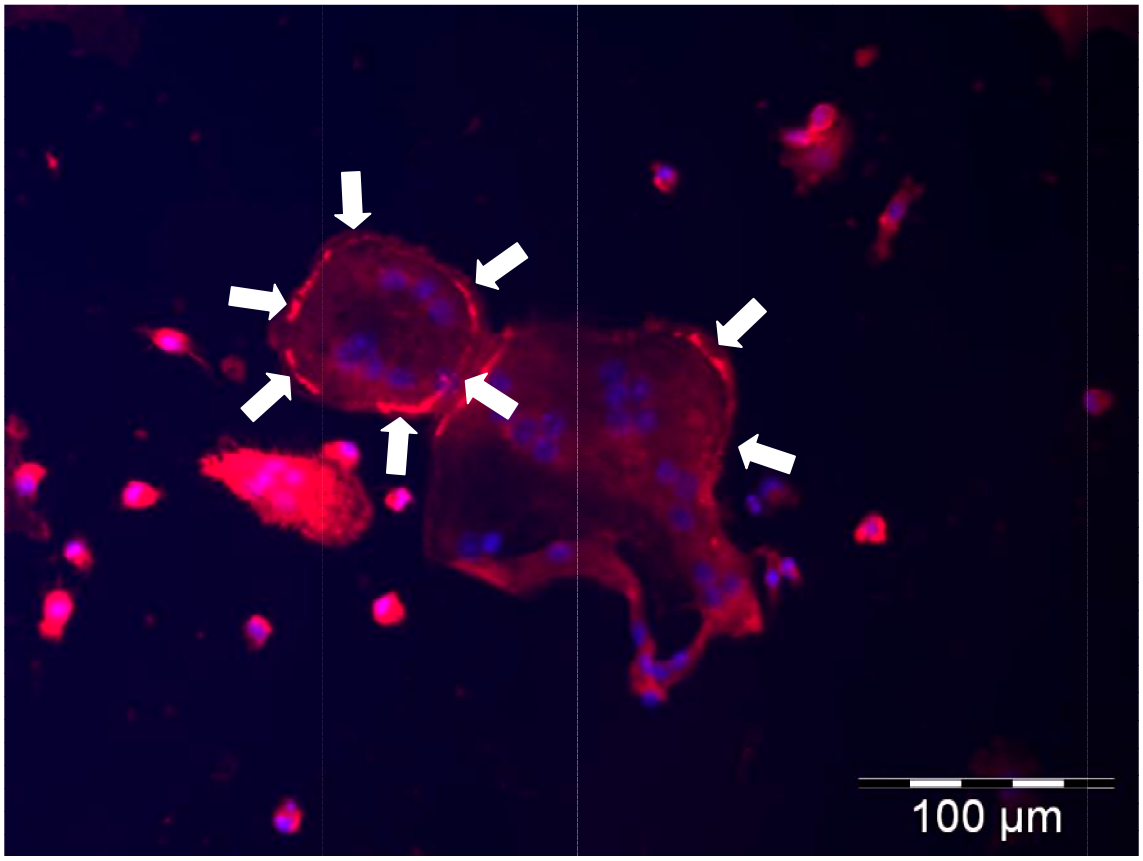


Abbildung 32: Effekt der Beschichtung mit 5 % Pektin auf Ausbildung von Aktinringen

3.1.8.3 *Morphologie der gebildeten Osteoklasten*

Wie in Abbildung 33 dargestellt, zeigte das mikroskopische Bild schmälere und zartere Aktinringe, die gleichmäßiger erschienen als in der Kontrollgruppe.
Die Gestalt der Osteoklasten war eher rundlich und regelmäßig, die Zelloberfläche weniger intensiv gefärbt als in der Kontrollgruppe.



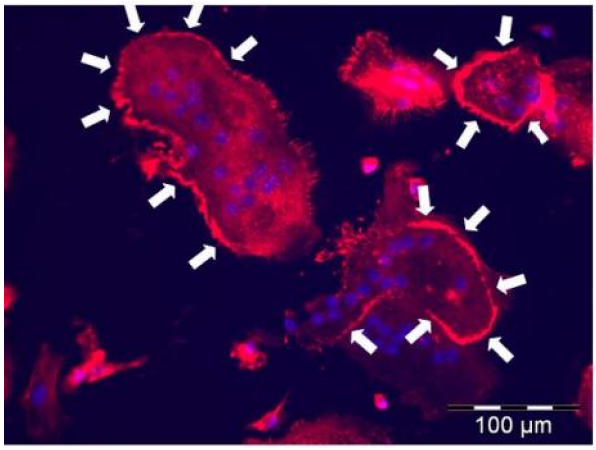


Abbildung 33: großer Mäuse-Osteoklast auf Beschichtung mit **Pektin**; deutlich sichtbar ist ein fast vollständig ausgeprägter Aktinring (Pfeile), durch DAPI angefärbte Zellkerne (blau), durch AlexaFluor® Phalloidin 546 gefärbtes Aktin (rot); Teile des Osteoklasts beginnen bereits, sich vom Deckglas zu lösen
Die gebildeten Aktinringe sind im Vergleich zur Kontrollgruppe (rechts) schmäler, jedoch weniger „gezackt".

3.1.9 **Gelatine p.a./Pektin**

Es wurden Gelatinelösungen mit einer Konzentration von 5 % Gelatine p.a./Pektin zur Herstellung der Beschichtungen verwendet.
Im Falle der Beschichtungen mit TCP wurden Suspensionen mit 3 % TCP verwendet.
Da für die Quervernetzung von Pektin kein geeigneter Crosslinker gefunden werden konnte und Pektin aufgrund seiner Struktur nicht mit Glutardialdehyd quervernetzt werden kann, liegen keine Daten zu Beschichtungen aus Suspensionen von Pektin und TCP vor.

3.1.9.1 *TRAP+ Osteoklasten auf Beschichtungen ohne und mit TCP*

Im Vergleich zur Kontrolle zeigte sich in Beschichtungen von Gelatine p.a. und Pektin ohne TCP-Zusatz eine Verringerung der Osteoklastenanzahl. Für Experiment 2 und 3 waren diese Ergebnisse statistisch signifikant ($p<0,05$ und $p<0,001$), wie auch in Abbildung 34 dargestellt.

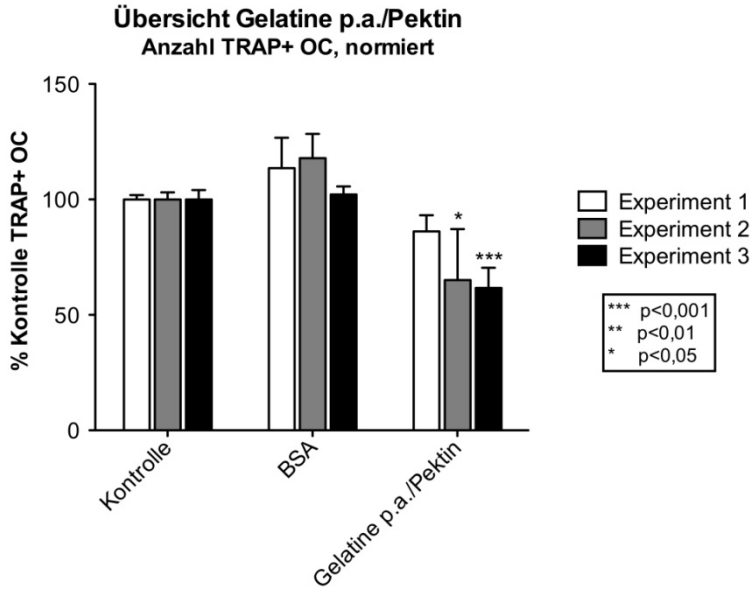


Abbildung 34: Effekt der Beschichtung mit 5 % Gelatine p.a./Pektin auf Osteoklastenbildung (Mittelwert Anzahl TRAP+ OC in Kontrollgruppe: Experiment 1: 1499,33 OC, Experiment 2: 1626,33 OC, Experiment 3: 3100,33 OC)

3.1.9.2 *Ergebnisse der Aktin-/DAPI-Färbung*

Die Auszählung der Osteoklasten nach Aktin-/DAPI-Färbung ergab eine leichte Erhöhung im Vergleich zu den Kontrollgruppen, jedoch nicht mit statistischer Signifikanz.

Experiment 2 zeigte, dass der prozentuelle Anteil an Aktinringen mit statistischer Signifikanz ($p<0,01$) im Vergleich zur Kontrolle leicht verringert war (Abbildung 35).

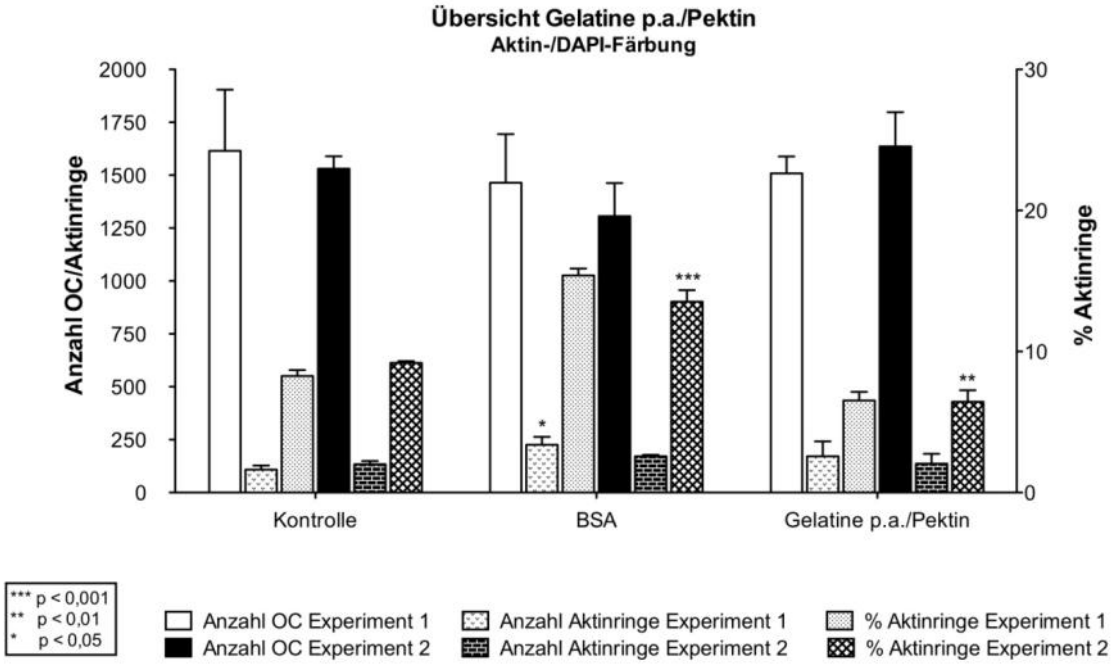


Abbildung 35: Effekt der Beschichtung mit 5 % Gelatine p.a./Pektin auf Ausbildung von Aktinringen

3.1.9.3 *Morphologie der gebildeten Osteoklasten*

Das mikroskopische Bild ergab, dass die Osteoklasten von ähnlicher Gestalt wie in der Kontrollgruppe waren (Abbildung 36).

Die Aktinringe wiesen ähnliche Intensität und Breite auf. Außerdem zeigten die Osteoklasten kleine „Füße" oder „Wimpern", was von einer Schrumpfung der Osteoklasten während der Fixierung kommen kann. Diese Beobachtung wurde auch bei der Dreifachfärbung im Zuge der Immunfluoreszenmarkierung gemacht (Abbildung 46).

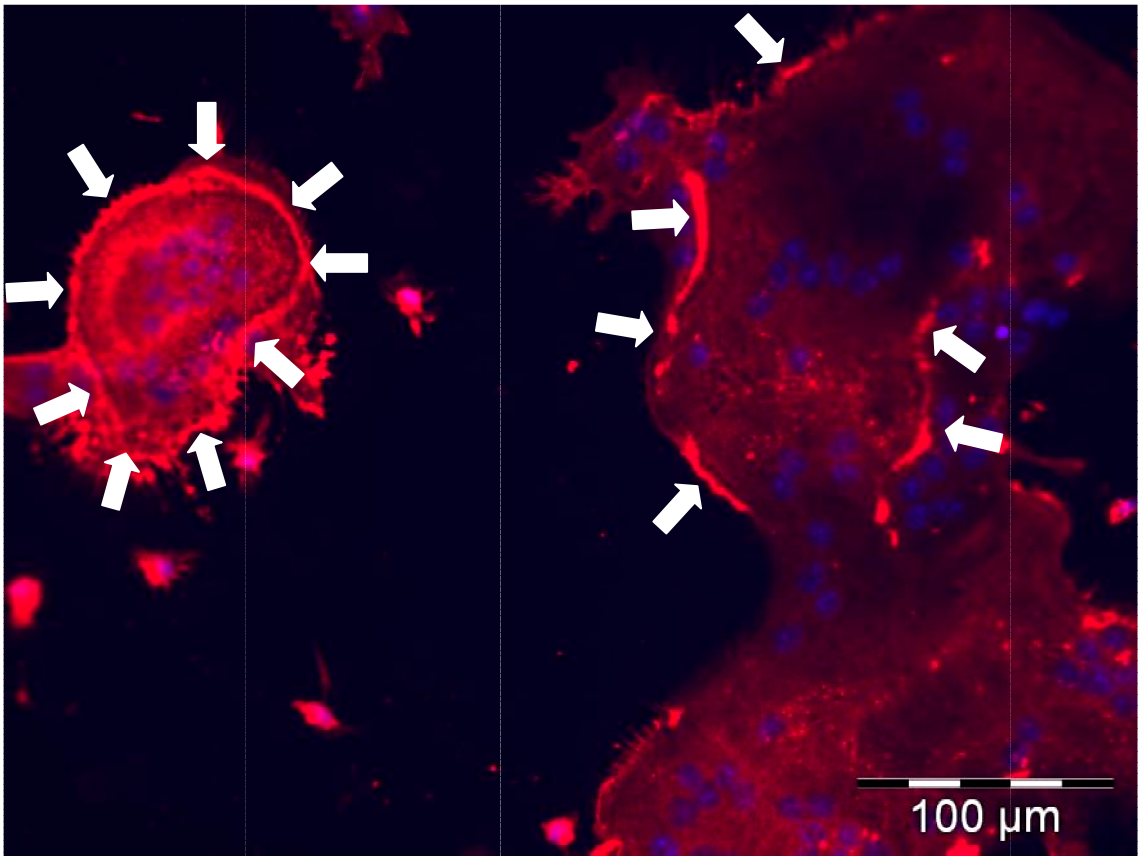
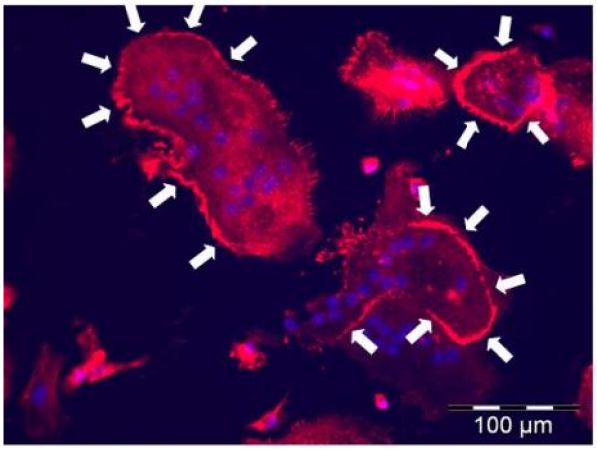


Abbildung 36: zwei Mäuse-Osteoklasten auf Beschichtung mit **Gelatine p.a./Pektin**; deutlich sichtbar ist ein vollständig ausgeprägter Aktinring beim kleineren und ein teilweise ausgeprägter Aktinring beim größeren Osteoklasten (Pfeile), durch DAPI angefärbte Zellkerne (blau), durch AlexaFluor® Phalloidin 546 gefärbtes Aktin (rot);



3.2 Überblick über TRAP+ OC auf allen Beschichtungstypen

3.2.1 Beschichtungen ohne TCP

Abbildung 37 zeigt einen Gesamtübersicht über die Experimente 1, 2 und 3 und soll einen Eindruck über die Anzahl an TRAP+ Osteoklasten im Vergleich ermöglichen.
Die Werte sind wie auch in den Einzeldiagrammen normiert dargestellt und beziehen sich auf den Mittelwert der Kontrollgruppe (unbeschichtetes Deckglas).

Wie bereits in den vorangegangenen Abschnitten erläutert, zeigte die Vorinkubation mit BSA eine Erhöhung der Anzahl an TRAP+ Osteoklasten im Vergleich zur Kontrollgruppe, wobei diese Ergebnisse in keinem der drei durchgeführten Experimente statistisch signifikant waren. Die Anzahl an TRAP+ OC wurde bei den Beschichtungen mit Gelatine Typ B am deutlichsten reduziert, da es hier zu einer vollständigen Hemmung der Osteoklastenbildung kam.
Beschichtung mit Gelatine Typ A, 300 g/90 – 110 g Bloom führte ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion der Osteoklasten. Beschichtungen mit Gelatine p.a. und Pektin zeigten zwar auch eine Verringerung der Osteoklastenzahl, jedoch war diese nicht so ausgeprägt wie bei Beschichtungen mit Gelatine von Typ A und Typ B. Die Ergebnisse aus Experiment 3 hatten bei Beschichtung mit Gelatine p.a. und Pektin einzeln und in Kombination hohe Signifikanz ($p<0,001$).

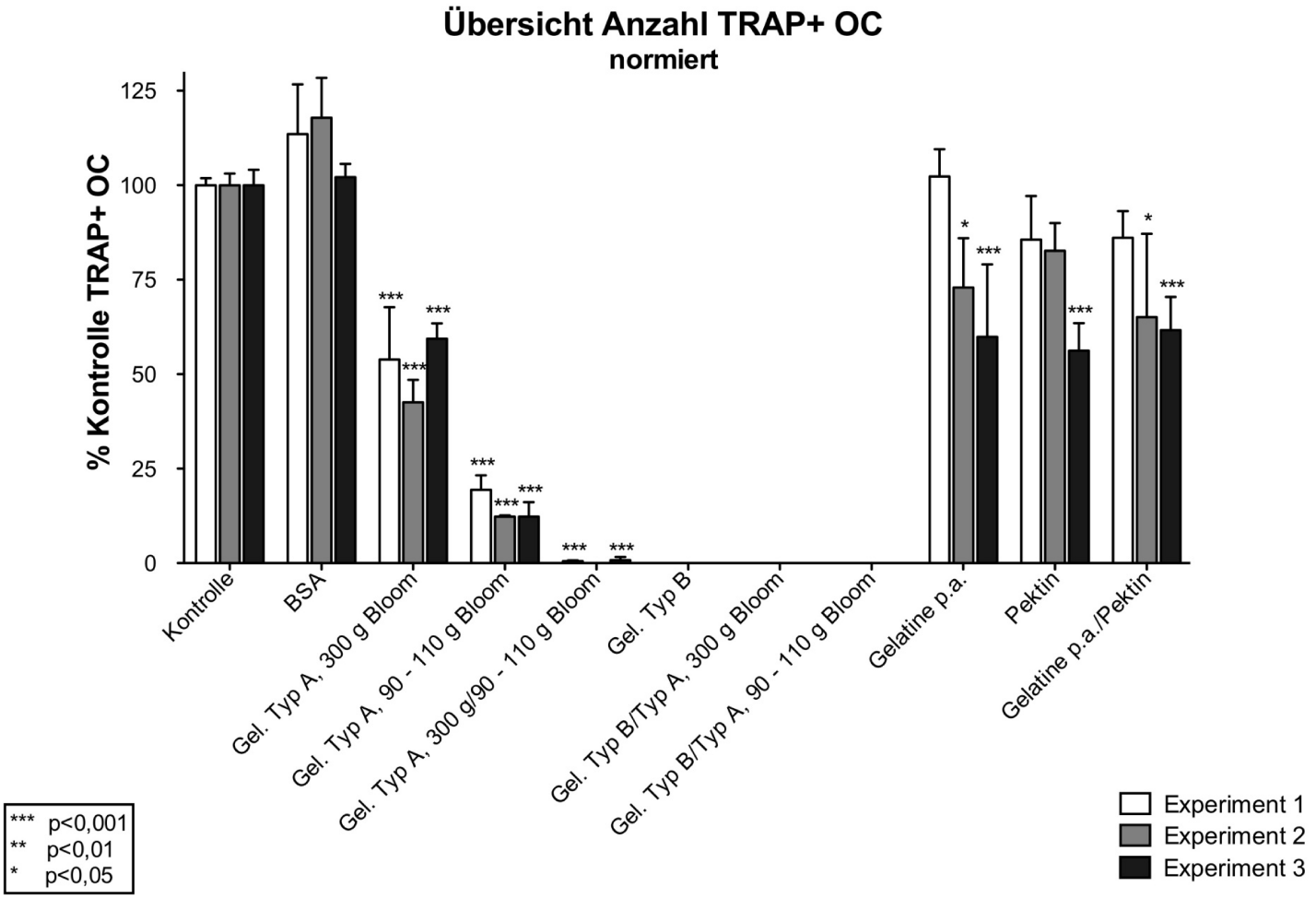


Abbildung 37: Übersicht über TRAP+ OC auf Gelatine-/Pektinbeschichtungen ohne TCP (Kontrollgruppe Mittelwerte OC-Anzahl: Experiment 1: 1499,33 OC, Experiment 2: 1626,33 OC, Experiment 3: 3100,33 OC)

Tabelle 4: Mittelwert der % an TRAP+ OC auf Gelatine-/Pektinbeschichtungen (n = 3), normiert auf Kontrolle

	% TRAP+ OC normiert (Mittelwert ± SEM)		
	Experiment 1	*Experiment 2*	*Experiment 3*
Kontrolle	100,00 ± 1,89	100,00 ± 3,09	100,00 ± 4,11
BSA	113,54 ± 13,15	117,85 ± 10,54	102,17 ± 3,46
Gelatine Typ A, 300 g Bloom	53,87 ± 13,86	42,57 ± 5,93	59,38 ± 4,06
Gelatine Typ A, 90 – 110 g Bloom	19,39 ± 3,83	12,32 ± 0,30	12,31 ± 3,81
Gelatine Typ A, 300g/90 – 110 g Bloom	0,51 ± 0,26	0,00 ± 0,00	0,82 ± 0,82
Gelatine Typ B	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Gelatine Typ B/Typ A, 300 g Bloom	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
GelatineTyp B/Typ A, 90 – 110 g Bloom	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Gelatine p.a.	102,33 ± 7,18	72,95 ± 13,06	59,88 ± 19,16
Pektin	85,62 ± 11,56	82,66 ± 7,32	56,23 ± 7,27
Gelatine p.a./Pektin	86,13 ± 701	65,10 ± 22,08	61,66 ± 8,76

Tabelle 5: Absolutwerte TRAP+ OC auf Gelatine-/Pektinbeschichtungen (n = 3)

	TRAP+ OC (Mittelwert ± SEM)		
	Experiment 1	*Experiment 2*	*Experiment 3*
Kontrolle	1499,33 ± 28,263	1626,33 ± 50,30	3100,33 ± 127,36
BSA	1702,33 ± 197,10	1916,67 ± 171,47	3167,67 ± 107,16
Gelatine Typ A, 300 g Bloom	807,67 ± 207,82	692,33 ± 96,42	1841,00 ± 125,69
Gelatine Typ A, 90 – 110 g Bloom	290,67 ± 57,46	200,33 ± 4,91	381,67 ± 118,08
Gelatine Typ A, 300g/90 – 110 g Bloom	7,67 ± 3,84	0,00 ± 0,00	25,33 ± 25,33
Gelatine Typ B	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Gelatine Typ B/Typ A, 300 g Bloom	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
GelatineTyp B/Typ A, 90 – 110 g Bloom	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Gelatine p.a.	1534,33 ± 107,64	1186,33 ± 212,33	1856,33 ± 594,01
Pektin	1283,67 ± 173,24	1344,33 ± 119,02	1743,33 ± 225,44
Gelatine p.a./Pektin	1291,33 ± 105,17	1058,67 ± 359,06	1911,67 ± 271,42

3.2.2 **Beschichtungen mit TCP**

Im Vergleich zu den Kontrollgruppen kam es bei allen Beschichtungen zu einer signifikanten Verringerung der Anzahl an TRAP+ Osteoklasten. Die Ergebnisse aus Experiment 1 und 2 haben dabei hohe statistische Signifikanz ($p<0,001$).

Abbildung 38 zeigt dabei den Trend der Effekte der Beschichtungen mit TCP auf die Zellen. Während es bei Gelatine Typ B/Typ A, 90 – 110 g zur größten Verringerung der Anzahl an TRAP+ OC kam, waren die Zellzahlen unter Beschichtung mit Gelatine Typ A, 90 – 110 g am höchsten.

Gelatine Typ B führt sowohl alleine als auch in Kombination mit Gelatine Typ A unterschiedlicher Gelstärke zur größten Reduktion der Anzahl an TRAP+ OC.

In Anbetracht der hohen Zellzahl in den Kontrollgruppen haben alle Beschichtungstypen als TCP-Suspension großen Effekt auf die Osteoklastenbildung. Keine der getesteten Beschichtungen sticht hier in Hinblick der Zellzahl hervor.

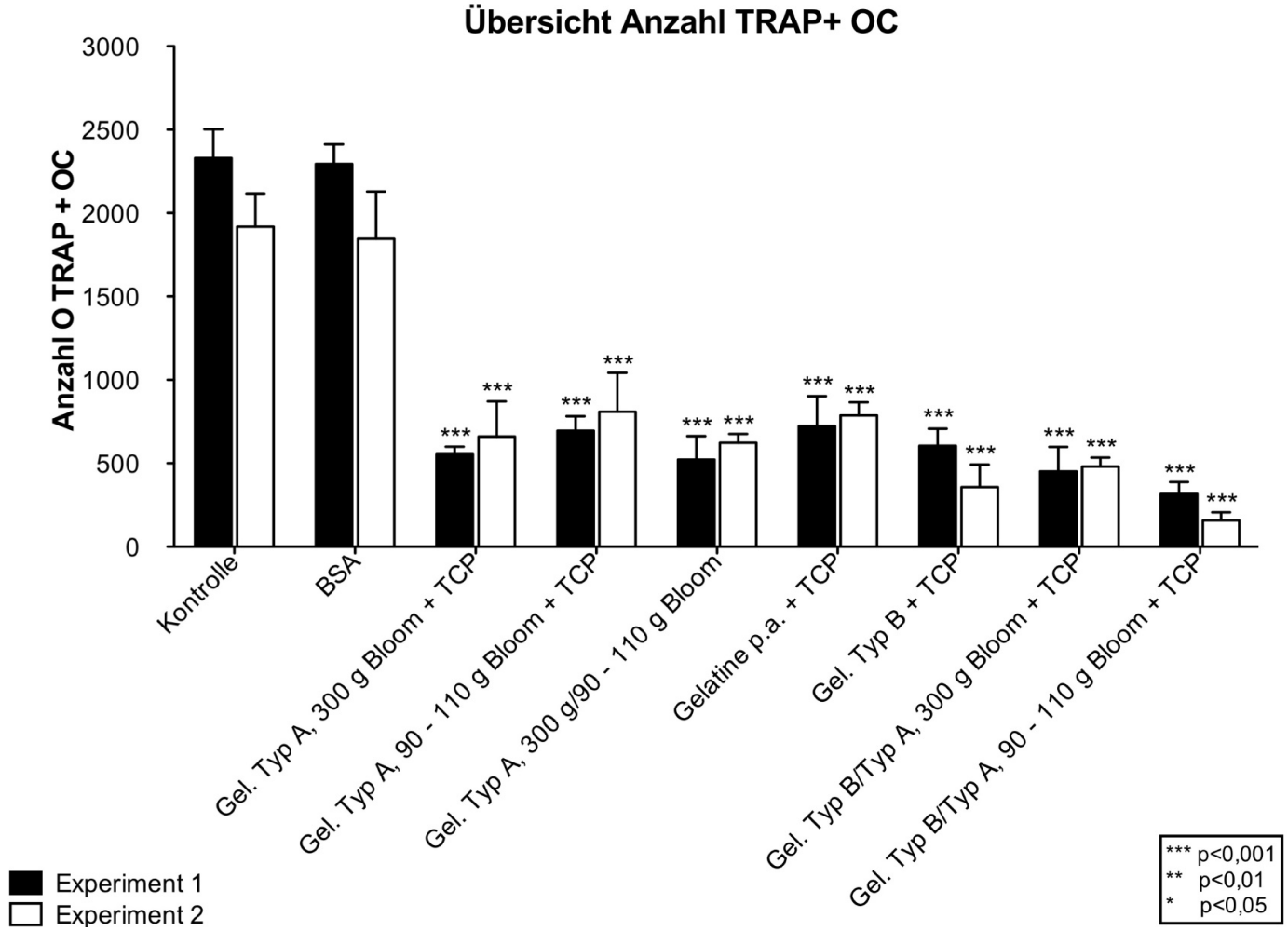


Abbildung 38: Übersicht über TRAP+ OC auf Gelatine-TCP-Beschichtungen

Tabelle 6: Übersicht über Anzahl an TRAP+ OC auf Gelatine-TCP-Beschichtungen (n = 3)

	TRAP+ OC (Mean ± SEM)	
	Experiment 1	*Experiment 2*
Kontrolle	2329,33 ± 173,81	1918,33 ± 198,42
BSA	2294,67 ± 117,00	1846,33 ± 283,22
Gelatine Typ A, 300 g Bloom + TCP	553,67 ± 45,95	659,67 ± 211,33
Gelatine Typ A, 90 – 110 g Bloom + TCP	695,33 ± 85,96	809,33 ± 233,31
Gelatine Typ A, 300 g/90 – 110 g Bloom + TCP	522,00 ± 140,23	623,67 ± 52,26
Gelatine p.a. + TCP	722,67 ± 179,57	786,67 ± 79,00
Gelatine Typ B + TCP	604,67 ± 102,37	357,33 ± 134,48
Gelatine Typ B/Typ A, 300 g Bloom + TCP	451,33 ± 146,67	480,33 ± 53,75
Gelatine Typ B/Typ A, 90 – 110 g Bloom +TCP	316,67 ± 70,34	158,33 ± 48,31

3.3 Vergleich der TRAP+ OC auf Beschichtungen ohne und mit TCP

Abbildung 39 verdeutlicht die Unterschiede in der Anzahl der Osteoklasten zwischen Beschichtungen ohne Verwendung von TCP, also dem Beschichten durch Gelatine-, bzw. Pektin-Lösungen und als Gelatine-TCP-Suspensionen.
Um die Übersichtlichkeit zu erhöhen, wurden Kontroll- und BSA-Gruppe aus dem Diagramm entfernt. Der Mittelwert der TRAP+ OC (± SEM) betrug für die Kontrollgruppe in Experiment 1 2329,33 (± 173,81) und in Experiment 2 1918,33 (± 198,42), für die BSA-Gruppe in Experiment 1 2294,67 (± 117,00) und in Experiment 2 1846,33 (± 283,22).

Hier ist noch einmal zu sehen, dass es unter Verwendung von Gelatinelösungen von Typ B ohne TCP zu einer Hemmung der Osteoklastenbildung kam, unter Verwendung von Gelatine-TCP-Suspensionen jedoch nicht.

Außerdem ist dem Diagramm zu entnehmen, dass zwar alle getesteten Beschichtungen grundsätzlich zu einer Reduktion der Anzahl an TRAP+ Osteoklasten führten, Gelatine p.a. jedoch den schwächsten inhibierenden Effekt aufwies. Im Vergleich zur Beschichtung mit Suspension von Gelatine p.a. und TCP schien sich dieser Effekt wieder ins Gegenteil umzukehren, da dieser Beschichtungstyp die geringste Anzahl an Osteoklasten hervorbrachte.

Bemerkenswert ist auch der Effekt der TCP-Zugabe zu Gelatine Typ A, 300 g/90 – 110 g Bloom und besonders Gelatine Typ B alleine und in Kombination mit anderen Gelatinetypen: während ohne Verwendung von TCP kaum bzw. keine Osteoklasten vorhanden waren, führte die Beschichtung mit TCP-Suspensionen zur Erhöhung der Osteoklastenanzahl. Im Falle von Gelatine Typ B-TCP kam es dann unter allen getesteten TCP-Beschichtungen sogar zu den höchsten Osteoklastenzahlen.

Alle gewonnenen Ergebnisse wiesen hohe statistische Signifikanz auf ($p<0,001$).

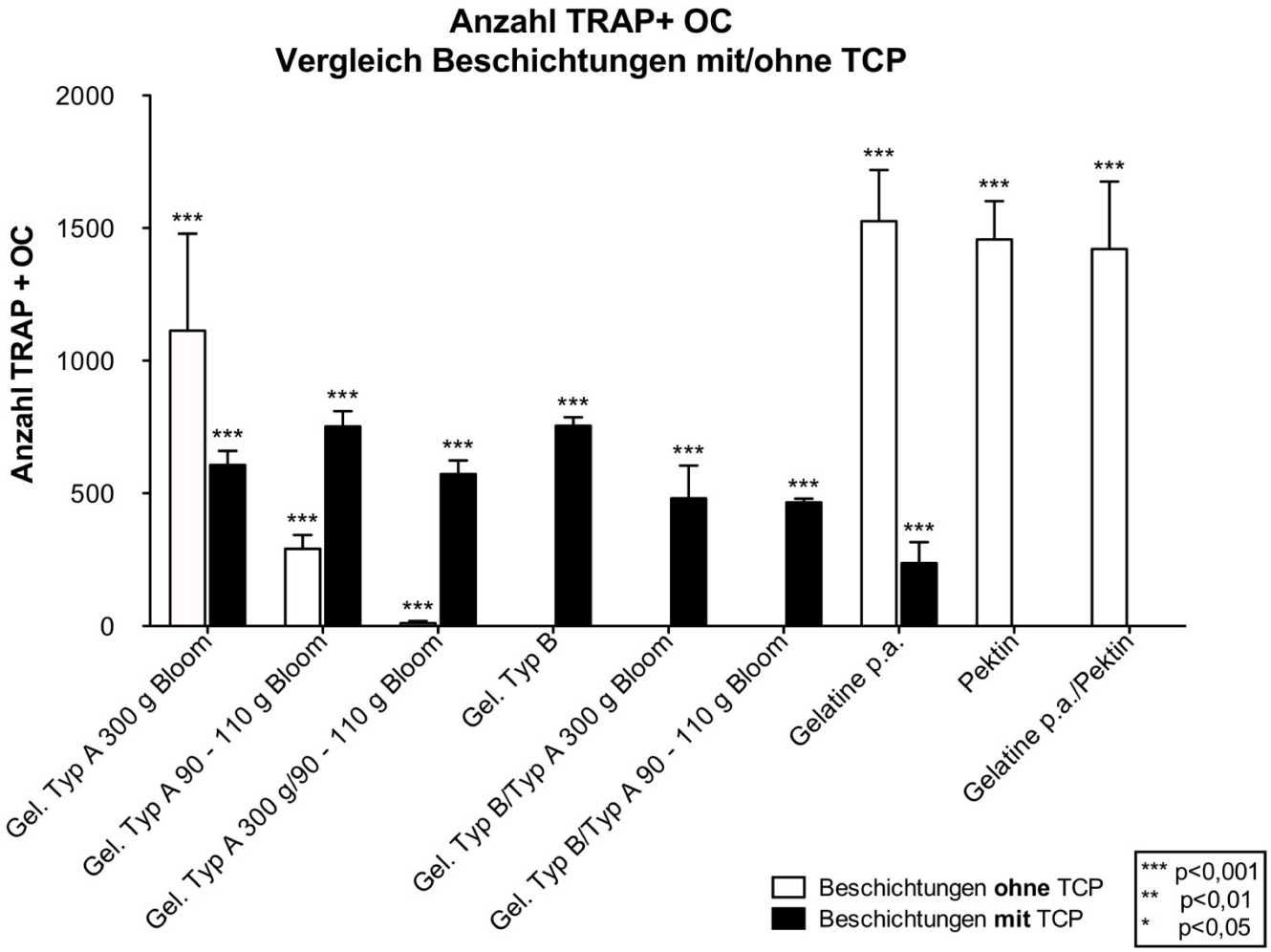


Abbildung 39: Vergleich der Anzahl TRAP+ OC auf Beschichtungen mit und ohne TCP

3.4 Überblick über Ergebnisse der Aktin-/DAPI-Färbung

In Abbildung 40 wurden die Kontroll- und BSA-Gruppe zur besseren Übersichtlichkeit nicht angeführt. Die entsprechenden Werte sind aus Tabelle 7 zu entnehmen.
Wie Abbildung 40 zeigt, kam es bei Beschichtung mit Gelatine Typ A, 90 – 110 g Bloom mit hoher Signifikanz ($p<0,001$ für Experiment 1 und 2) zur Ausbildung der meisten Aktinringe, mit Gelatine p.a. in Kombination mit Pektin beschichtete Deckgläser wiesen den geringsten Anteil an Aktinringen, aber die höchsten Osteoklastenzahlen auf.

Gelatine Typ A, 90 – 110 g Bloom führte, neben der Beschichtung mit Gelatine p.a. und Pektin, zur zweithöchsten Osteoklastenanzahl. Die Vermutung liegt nahe, dass Osteoklasten auf diesen Beschichtungen, möglicherweise auch durch den hohen Anteil an Aktinringen, besser an der Oberfläche haften konnten und nicht so leicht weggewaschen werden konnten wie in anderen Gruppen.

Die Beschichtung mit einer Kombination aus Gelatine Typ A 300 g/90 – 110 g Bloom brachte in beiden Experimenten keine Osteoklasten hervor; dieser Trend machte sich bereits bei der TRAP-Färbung in allen drei Experimenten bemerkbar .

Gelatine p.a., Typ A 300 g Bloom und Pektin waren eher indifferente Gruppen, die keine bemerkenswerten Effekte auf die Ausprägung der Aktinringe hatten.

An dieser Stelle sei noch einmal der Einfluss von mit BSA vorinkubierten Deckgläsern auf die Anzahl an Aktinringe in der BSA-Gruppe erwähnt: es kam hierbei bei Experiment 2 zu einer signifikanten Erhöhung des prozentuellen Anteils an Aktinringen.

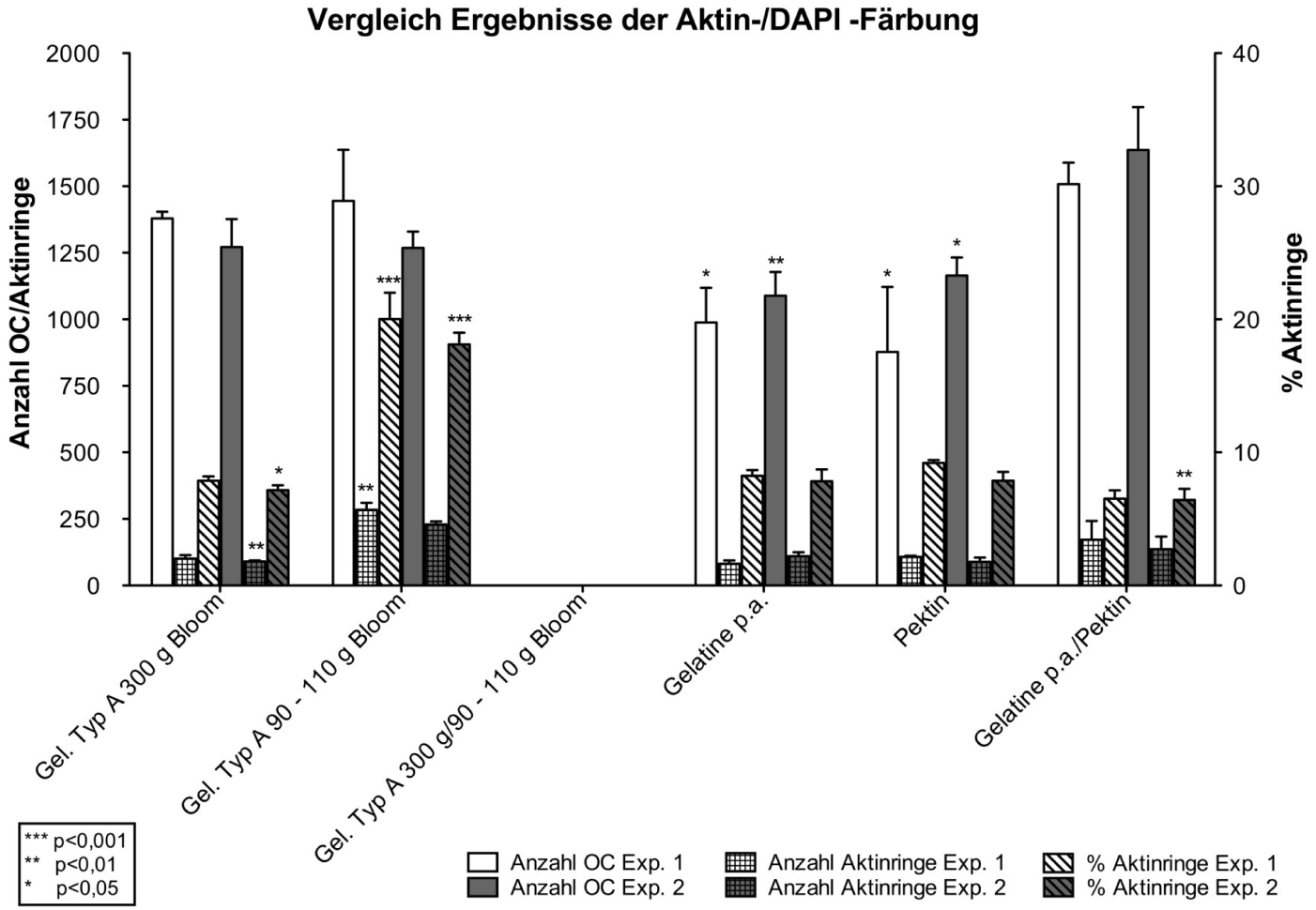


Abbildung 40: Anzahl an OC, Aktinringen und % Aktinringe auf Gelatine-/Pektinbeschichtungen im direkten Vergleich

Tabelle 7: Übersicht über Anzahl an OC, Aktinringe und % Aktinringe auf Gelatine-/Pektinbeschichtungen (n = 3)

	Anzahl OC (Mittelwert ± SEM)		**Anzahl Aktinringe** (Mittelwert ± SEM)		**% Aktinringe** (Mittelwert ± SEM)	
	Exp. 1	*Exp. 2*	*Exp. 1*	*Exp. 2*	*Exp. 1*	*Exp. 2*
Kontrolle	1615,33 ± 288,84	1530,67 ± 58,90	108,67 ± 19,34	134,33 ± 15,07	8,26 ± 0,43	9,20 ± 0,12
BSA	1464,67 ± 229,26	1306,67 ± 156,24	225,67 ± 37,68	171,33 ± 6,64 ±	15,40 ± 0,49	13,54 ± 0,81
Gelatine Typ A, 300 g Bloom	1378,67 ± 25,98	1271,33 ± 105,30	101,33 ± 12,35	90,33 ± 4,06	7,87 ± 0,32	7,16 ± 0,38
Gelatine Typ A, 90 – 110 g Bloom	1445,33 ± 191,92	1268,67 ± 60,99	284,67 ± 26,30	229,33 ± 11,32	20,03 ± 1,97	18,12 ± 0,87
Gelatine Typ A, 300 g/90 – 110 g Bloom	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Gelatine p.a.	988,33 ± 130,14	1088,67 ± 88,76	81,67 ± 12,68	110,33 ± 14,50	8,24 ± 0,43	7,83 ± 0,89
Pektin	877,33 ± 224,31	1164,67 ± 67,43	107,33 ± 4,63	88,33 ± 16,17	9,21 ± 0,21	7,88 ± 0,65
Gelatine p.a./Pektin	1508,33 ± 80,21	1636,33 ± 161,37	171,33 ± 70,86	136,33 ± 47,27	6,52 ± 0,62	6,43 ± 0,82

3.5 Mikroskopisches Analyse der Gelatine-TCP-Suspensionen

Nach dem Fixieren und Färben wurden die Beschichtungen vor dem Auszählen der Osteoklasten in Wells einer neuen 24-Well-Platte gelegt und dabei umgedreht. So konnte sichergestellt werden, dass die gezählten Osteoklasten tatsächlich auf den Beschichtungen und nicht auf dem Plastik der Kulturplatten vorhanden waren, was die Ergebnisse verfälscht hätte.

Die TRAP+ Osteoklasten waren auf TCP-Suspensionen viel kleiner als auf Beschichtungen ohne TCP. Sie hatten kaum mehr als vier Kerne. Abbildung 41 zeigt einen Osteoklast mit vermutlich acht Kernen.
Die fotografische Darstellung der Osteoklasten erwies sich hierbei als äußerst schwierig, da die Oberfläche der Beschichtungen dunkel und sehr uneben war. Bei Betrachtung mit dem Auge war es durch ständiges Nachjustieren des Feintriebs möglich, die Kerne der Osteoklasten zweifelsfrei zu identifizieren und dadurch die angefärbten Zellen auszuzählen. Leider war es nicht möglich, dies auch auf den Fotos zufriedenstellend festzuhalten.

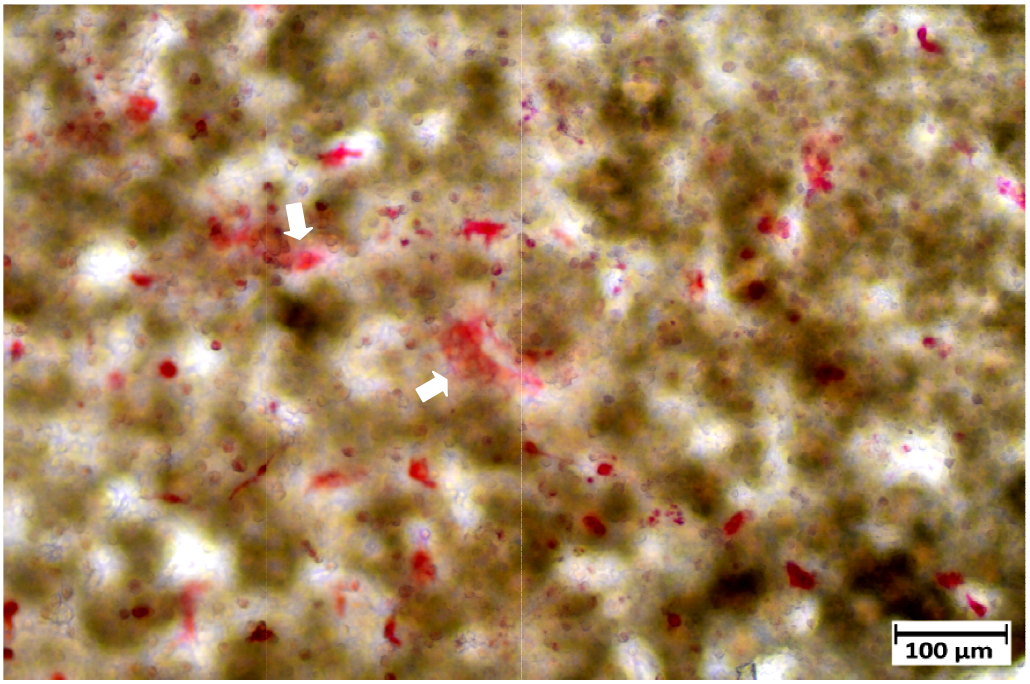


Abbildung 41: Mäuse-Osteoklasten auf Gelatine Typ A, 300 g Bloom-TCP-Beschichtung (Pfeil)

Die Gestalt der Osteoklasten unterschied sich auch deutlich von jener auf Beschichtungen ohne TCP. Die meisten Osteoklasten lagen nicht zweidimensional in

der Ebene, sondern oftmals zwischen den „Tälern und Schluchten" der Beschichtung. Abbildung 42 zeigt einen vielkernigen Osteoklast mit einigen Ausläufern und viele kleine TRAP+ Zellen, die jedoch nicht eindeutig als Osteoklasten identifiziert werden konnten, da die Zellkerne nicht sichtbar sind.

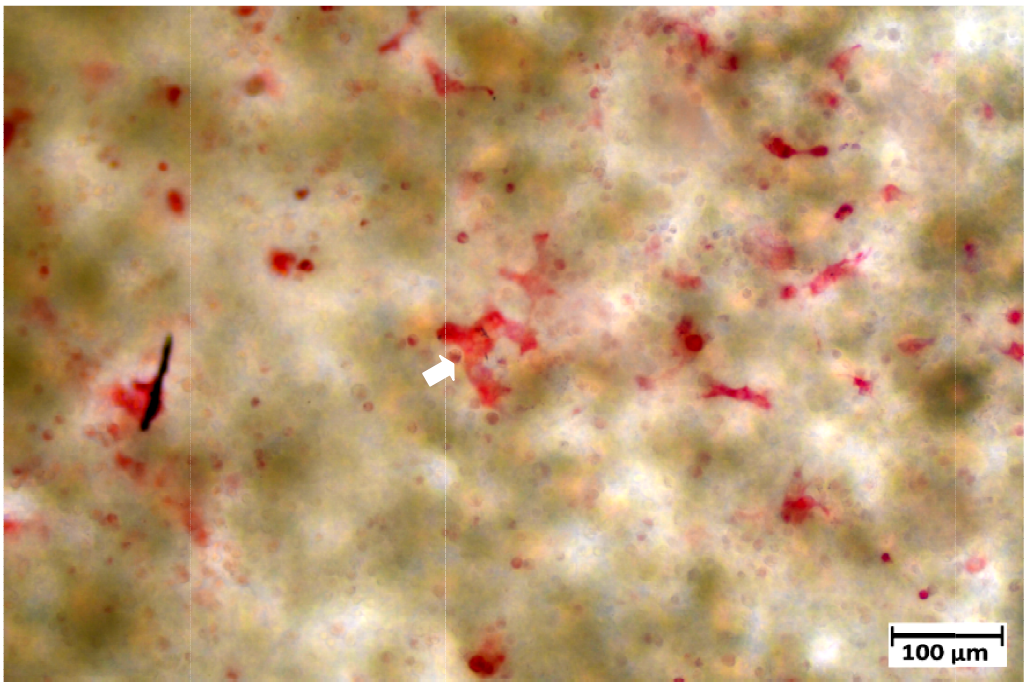


Abbildung 42: Mäuse-Osteoklast auf Gelatine Typ A, 90 – 110 g Bloom-TCP-Beschichtung (Pfeil)

3.6 Immunfluoreszenzmarkierung

Für die Immunfluoreszenzmarkierung wurden drei Gruppen an Beschichtungen ausgewählt, die sich in vorangegangenen Experimenten in der Anzahl ihrer Aktinringe stark unterschieden: Gelatine Typ A, 90 - 110 g Bloom wies in diesen Experimenten den höchsten Prozentsatz an Aktinringen auf (etwa 19 %), Gelatine p.a. in Kombination mit Pektin den niedrigsten (etwa 6,5 %). Gelatine p.a. alleine zeigte einen etwas höheren Prozentsatz an Aktinringen als in Kombination mit Pektin (etwa 8,5 %).

Es war ein deutlicher Zusammenhang der Anzahl an Aktinringen zwischen den für die Dreifachfärbung ausgewählten Gruppen und bisherigen Experimenten zur Aktin-/DAPI-Färbung zu erkennen.
Auch die Morphologie der gefärbten Osteoklasten entspricht den bisherigen Ergebnissen:

Während in der Kontrollgruppe eher rundliche und unverzweigte Osteoklasten zu finden waren, waren die Osteoklasten bei *Gelatine Typ A, 90 – 110 g Bloom* neben rundlicher Gestalt auch stark verzweigt und bildeten viele Ausläufer.
Die Osteoklasten auf *Gelatine p.a.* waren größer als jene in den anderen Gruppen und bildeten teilweise mehrere Aktinringe aus, jedoch waren insgesamt wenige Osteoklasten dieser Morphologie zu finden. Generell waren die Osteoklasten unregelmäßig und langgezogen.
Osteoklasten auf Beschichtungen aus *Gelatine p.a. und Pektin* zeigten kleine „Ausbuchtungen" und „Haare". Möglicherweise entstanden diese Strukturen durch Schrumpfung der Osteoklasten während des Fixierens. Jedenfalls war kein Integrin β_3 darin lokalisiert.

Integrin β_3 ist entgegen der Vermutungen nicht in hoher Intensität mit den Aktinringen co-lokalisiert, obwohl dort eine schwache Färbung auftritt, sondern scheint über die gesamte Zelloberfläche verteilt zu sein. Eine intensive Färbung innerhalb der Zellkerne lässt vermuten, dass Integrin β_3 in den gefärbten Osteoklasten in höherer Konzentration in den Zellkernen lokalisiert ist, die Lokalisation ist jedoch diskussionswürdig und wird daher unter dem Abschnitt „Diskussion" ausführlich erläutert.
Bezüglich der Lokalisation von Integrin β_3 gibt es innerhalb der hier ausgewählten Gruppen keine signifikanten Unterschiede oder Auffälligkeiten, weswegen daraus gefolgert wird, dass auch in den restlichen, bei vorangegangenen Experimenten eher indifferenten Gruppen, kein Unterschied zu sehen sein wird.
Der Vollständigkeit und Anschaulichkeit halber seien hier einige Fotos von Osteoklasten der ausgewählten Gruppen angeführt:

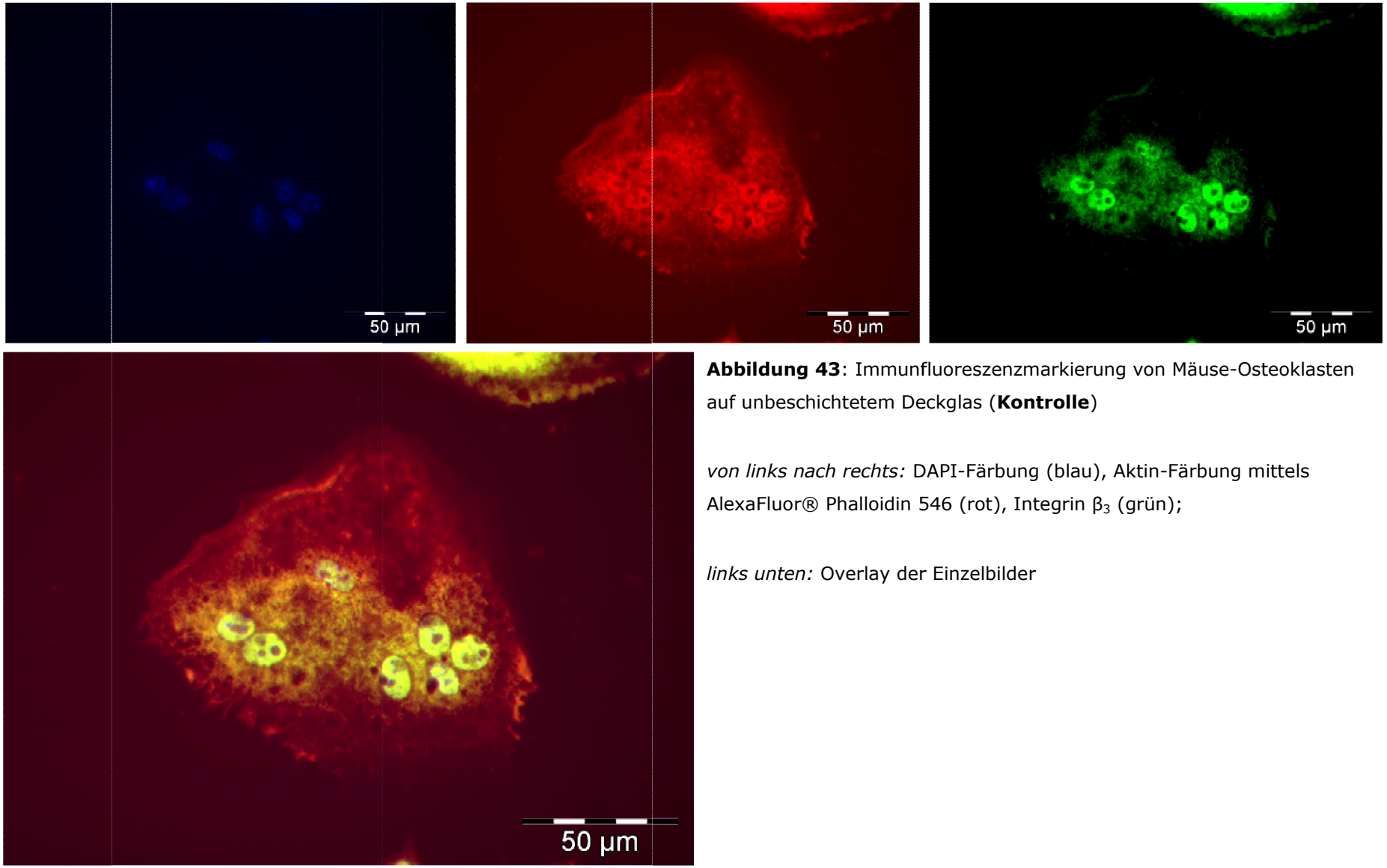


Abbildung 43: Immunfluoreszenzmarkierung von Mäuse-Osteoklasten auf unbeschichtetem Deckglas (**Kontrolle**)

von links nach rechts: DAPI-Färbung (blau), Aktin-Färbung mittels AlexaFluor® Phalloidin 546 (rot), Integrin β_3 (grün);

links unten: Overlay der Einzelbilder

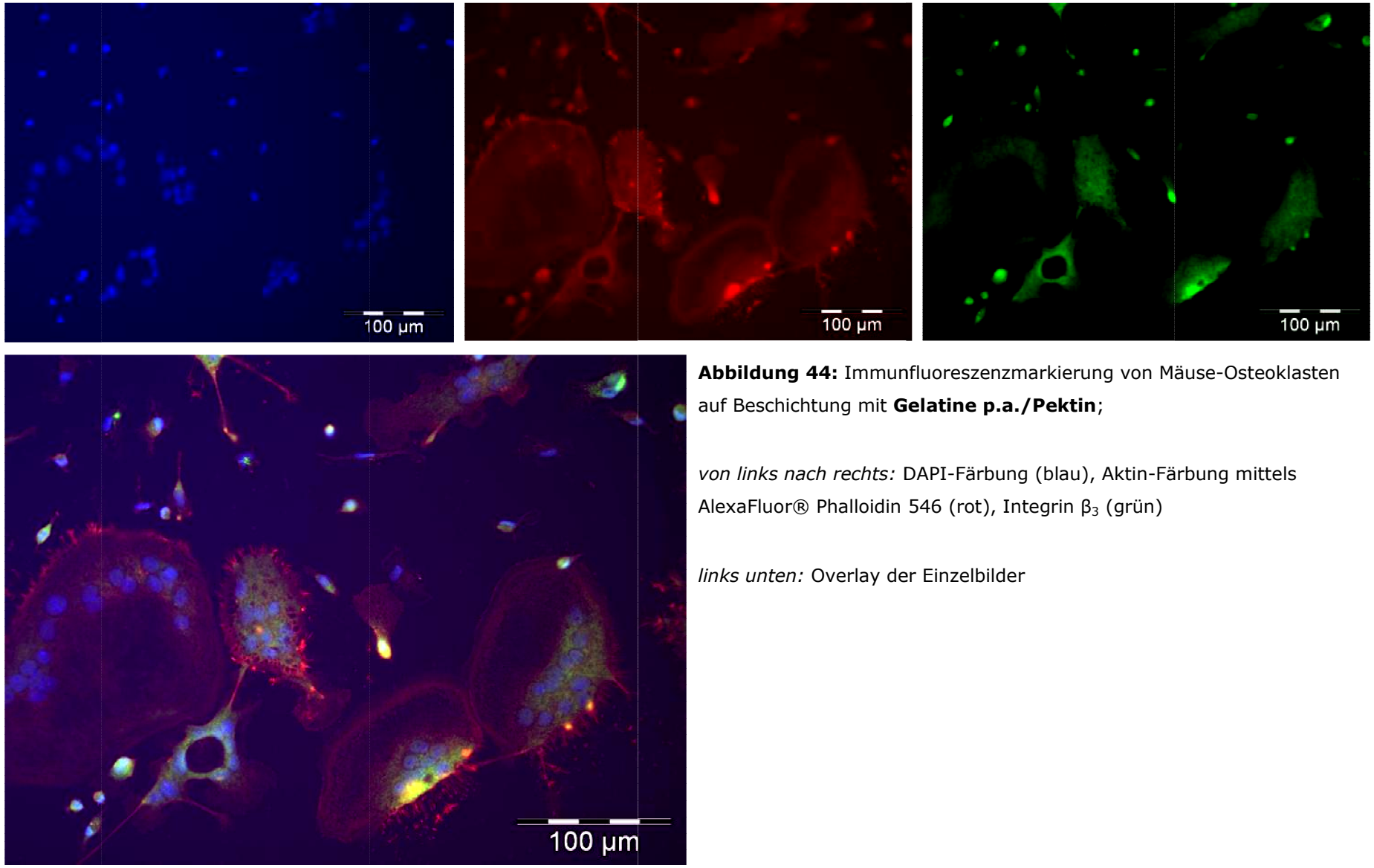


Abbildung 44: Immunfluoreszenzmarkierung von Mäuse-Osteoklasten auf Beschichtung mit **Gelatine p.a./Pektin**;

von links nach rechts: DAPI-Färbung (blau), Aktin-Färbung mittels AlexaFluor® Phalloidin 546 (rot), Integrin β_3 (grün)

links unten: Overlay der Einzelbilder

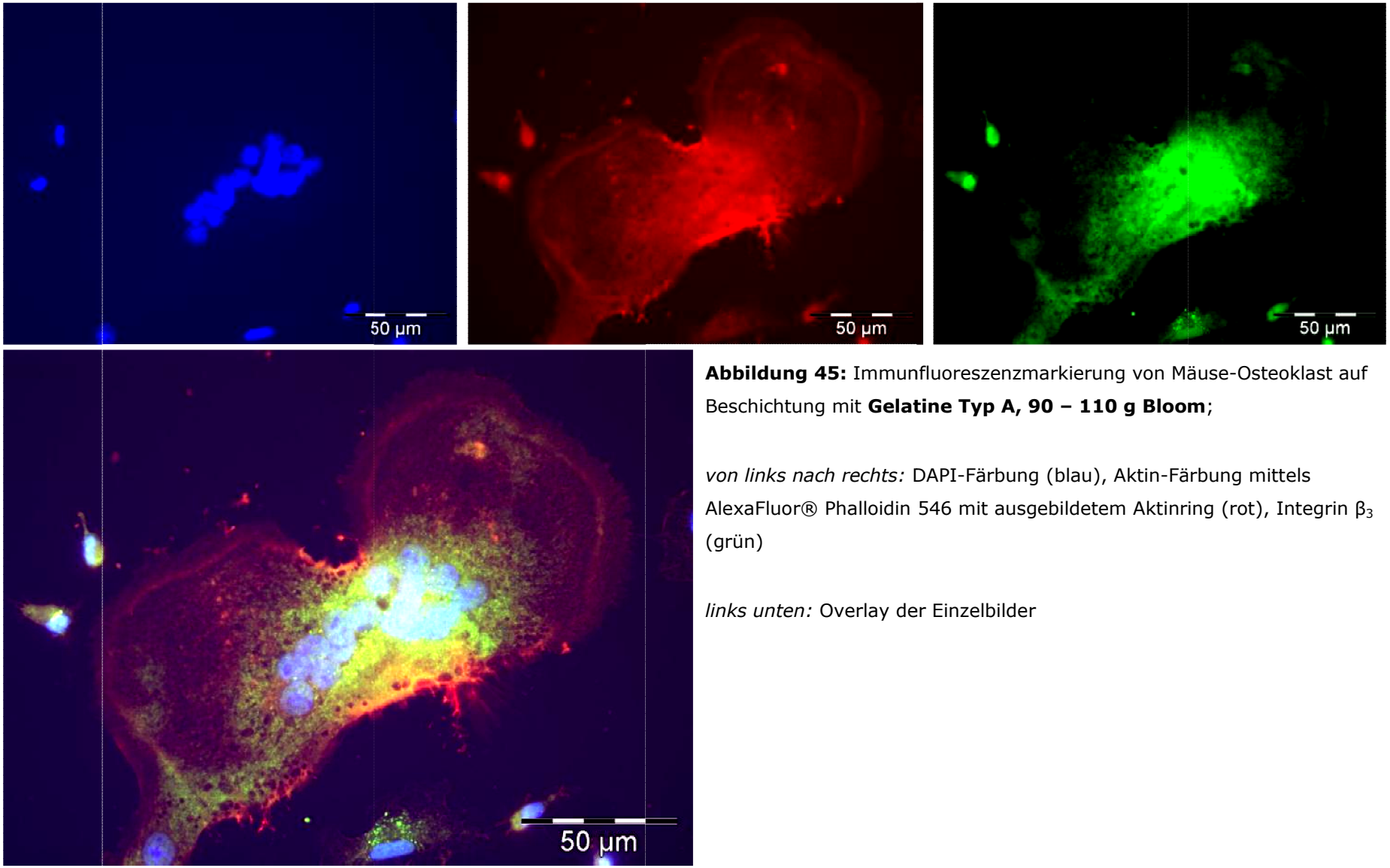


Abbildung 45: Immunfluoreszenzmarkierung von Mäuse-Osteoklast auf Beschichtung mit **Gelatine Typ A, 90 – 110 g Bloom**;

von links nach rechts: DAPI-Färbung (blau), Aktin-Färbung mittels AlexaFluor® Phalloidin 546 mit ausgebildetem Aktinring (rot), Integrin β_3 (grün)

links unten: Overlay der Einzelbilder

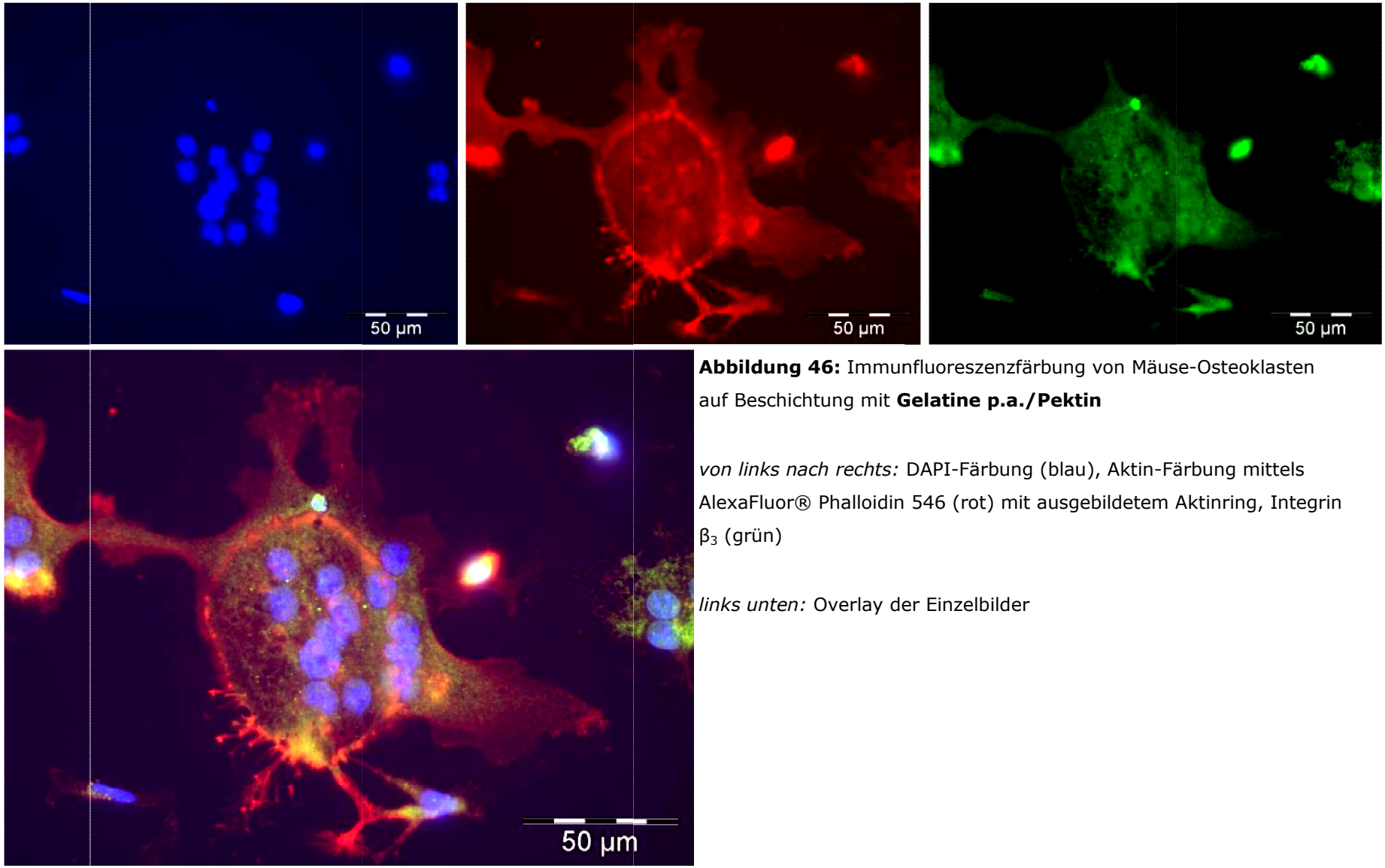


Abbildung 46: Immunfluoreszenzfärbung von Mäuse-Osteoklasten auf Beschichtung mit **Gelatine p.a./Pektin**

von links nach rechts: DAPI-Färbung (blau), Aktin-Färbung mittels AlexaFluor® Phalloidin 546 (rot) mit ausgebildetem Aktinring, Integrin β_3 (grün)

links unten: Overlay der Einzelbilder

4 Diskussion

Im Zuge dieser Arbeit wurde der Einfluss von Gelatine verschiedenen Ursprungs und Pektin sowohl alleine, als auch als Suspension mit TCP, auf Osteoklastenbildung, Zytoskelett und Kernmorphologie der gebildeten Osteoklasten, Resorptionsrate und Adhäsion mit dem Beschichtungsmaterial untersucht.
Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass eine hohe Zahl an Osteoklasten nicht zwingend auf ein geeignetes Biomaterial schließen lässt, da die Balance zwischen Knochenbildung und –resorption von weit mehr Faktoren als nur der Osteoklastenbildung abhängt.

Die Deckgläser wurden vor Durchführung der weiteren Experimente zu Testzwecken mit Gelatine beschichtet und nach Inkubation mit Coomassie-Blue-Färbung gefärbt, um zu beurteilen, ob Gelatine auf Deckgläsern haften bleibt und die Herstellung einer Beschichtung auf diese Weise überhaupt möglich ist. Es zeigte sich dabei eine Blaufärbung der Deckgläser im Vergleich zu einem unbeschichteten Deckglas, sodass für alle folgenden Experimente diese Beschichtungsmethode gewählt wurde.
Allerdings ist aufgrund der Wasserlöslichkeit von Gelatine in der Wärme denkbar, dass die Beschichtungen im Laufe der Kultur heruntergewaschen wurden, zumal auch bei Verwendung der Gelatine-TCP-Suspensionen beobachtet wurde, dass TCP während der Kultur nicht in der Beschichtung verbleibt.
Trotz allem konnte in den hier angeführten Ergebnissen ein eindeutiger Einfluss der Beschichtungen auf die Osteoklastenbildung und –morphologie festgestellt werden. Welcher Anteil der Gelatinebeschichtungen, bzw. welche –konzentration, während der Kultur im Nährmedium noch vorhanden war, wurde noch nicht bestimmt. Generell ist der Wirkmechanismus von Gelatine auf die Entwicklung von Osteoklasten noch nicht geklärt.

Da die Osteoklasten durch ein Cokultur-System gebildet wurden, ist immer auch der Einfluss der Beschichtungen auf die Osteoblasten zu berücksichtigen. Das mikroskopische Bild der Osteoblasten nach dem Aussäen und während der Kultur zeigte auch in Gruppen mit fehlender Osteoklastenbildung keine Auffälligkeiten, und das Zellwachstum erschien wie jenes der Kontrollgruppe; jedoch ist denkbar, dass manche Beschichtungen Einfluss auf die Bildung von Substanzen wie RANKL und M-CSF haben. Wenn diese Faktoren von Osteoblasten nicht gebildet werden können,

hat dies die eine Verminderung oder sogar ein Ausbleiben der Osteoklastenbildung zur Folge.
Die Abweichungen in der Anzahl der TRAP-positiven Osteoklasten unter dem Einfluss verschiedener Substrate zwischen den Experimenten könnte unter anderem damit zusammenhängen, dass das verwendete Knochenmark und die ausgesäten Osteoblasten Schwankungen bezüglich ihrer Fähigkeit zur Osteoklastenbildung aufwiesen, wobei der allgemeine Trend der Ergebnisse immer ähnlich war.

Gelatine Typ A, 90 – 110 g Bloom scheint den inhibitorischen Einfluss von Gelatine Typ A, 300 g Bloom zu verstärken, sodass es in Mischungen dieser beiden Stoffe zu einer nahezu vollständigen Hemmung der Osteoklastenbildung kommt. Ob beide Gelatinetypen über eine Art „Synergismus" auf Osteoklasten oder andere Zelltypen verfügen, konnte durch Literaturrecherchen jedoch nicht in Erfahrung gebracht werden. Ein Grund für die vergleichsweise geringe Anzahl und Größe der Osteoklasten auf Gelatine-TCP-Beschichtungen (Abbildung 41) könnte sein, dass Ca^{2+} während der Inkubation aus den Beschichtungen herausgelöst wurde und dadurch Osteoklasten apoptotisch wurden. Ca^{2+} ist neben PO_4^{3-} in der Lage, dosisabhängig die Apoptose von Kaninchen-Osteoklasten zu regulieren, was auch im Zuge der DAPI-Färbung an der Fragmentierung der Zellkerne zu sehen ist (Nielsen et al., 2007).
In diesem Zusammenhang wäre die Durchführung eine DAPI-Färbung der Osteoklastenzellkerne auf Gelatine-TCP-Beschichtungen interessant, um diese Vermutung zu bestätigen. Da die TCP-Beschichtungen eine hohe Eigenfluoreszenz aufwiesen, konnte jedoch mit den zur Verfügung stehenden Instrumenten keine Aktin-/DAPI-Färbung mit diesen Beschichtungen ausgewertet werden.
Um ein Auswaschen von Ca^{2+} ins Nährmedium und dadurch dessen zytotoxischen Effekt auf Osteoklasten zu verhindern, könnte die Konzentration des Crosslinkers erhöht oder eine gänzlich andere Substanz zur Quervernetzung eingesetzt werden. Es wäre denkbar, dass dann auch größere Unterschiede zwischen den einzelnen Gelatinetypen in Kombination mit TCP sichtbar werden, sodass eine konkrete Aussage und Schlussfolgerung bezüglich der Eignung als Biomaterial gezogen werden kann.
Die Tatsache, dass im Fall von Gelatine Typ B ohne TCP keine Osteoklasten vorhanden waren, unter Zugabe von TCP jedoch schon (Abbildung 37 und Abbildung **38**), könnte auf einer Veränderung der Oberflächenstruktur der Beschichtungen beruhen. Durch das hinzugefügte TCP wird die Oberfläche der Beschichtung womöglich rauer. Es wurde in bisherigen in vitro-Studien gezeigt,

dass die Zellzahlen von durch Cokultur generierten Osteoklasten zumindest auf rauerem Hydroxylapatit höher war als auf einer glatteren Oberfläche (Costa-Rodrigues et al., 2012), was auch hier der Fall sein könnte.
Um diese Vermutung abzuklären, wäre eine Analyse der Oberflächenstruktur der Gelatine-TCP-Beschichtungen erforderlich.

Die Osteoklastenzahlen, die aus den Experimenten der Aktin-/DAPI-Färbung hervorgingen, ermöglichten absolut gesehen keine quantitative Auswertung. Der Grund dafür ist, dass die Osteoblastenschicht im Unterschied zur TRAP-Färbung vor Durchführung der Aktin-/DAPI-Färbung heruntergelöst wurde. Dabei wurde eine undefinierte Anzahl an Osteoklasten ebenfalls abgelöst.
Allerdings ist der Anteil an Aktinringen in Relation zur Gesamtzahl der verbliebenen Osteoklasten aussagekräftig.

Bezüglich der Lokalisation von Integrin β_3 wurde vor Durchführung der Experimente erwartet, dass dieses Adhäsionsprotein jeweils mit dem Aktinring der resorbierenden Osteoklasten co-lokalisiert ist. In den durchgeführten Dreifachfärbungen wurde jedoch in vier untersuchten Gruppen (Kontrollgruppe, Gelatine Typ A, 90 – 110 g Bloom, Gelatine p.a., Gelatine p.a./Pektin) keine solche Co-Lokalisation beobachtet.
Aus der Literatur geht hervor, dass Integrin $\alpha_v\beta_3$ in zwei verschiedenen Konformationen vorliegt (Xiong et al., 2001), in einer basalen und einer aktivierten Form, die jeweils unterschiedliche Funktionen ausüben (Faccio et al., 1998). In nicht-resorbierenden Osteoklasten akkumuliert die aktivierte Form in den beweglichen Bereichen der Cytoplasmamembran. Während der Resorption ist diese Form jedoch in der ruffled border vorhanden, während die basale Form in der „sealing"-Zone lokalisiert ist. Desweiteren modulieren Wachstumsfaktoren wie „human growth factor" (HGF) und M-CSF die Konformation von $\alpha_v\beta_3$ in Osteoklasten, so kommt es beispielsweise bei Vorinkubation mit M-CSF zu einer Verlagerung von Integrin $\alpha_v\beta_3$ von den Podosomen weg hin zur Cytoplasmamembran (Faccio et al., 2002).
Faccio und Mitarbeiter (Faccio et al., 2002) haben mittels Immunfluoreszenzmarkierung und Aktinfärbung gezeigt, dass $\alpha_v\beta_3$ in resorbierenden Osteoklasten nicht mit dem Aktinring co-lokalisiert, sondern auf der Zelloberfläche verteilt ist (siehe Abbildung 47A). Nach Zusatz von HGF kam es zur Konformationsänderung des Integrins, sodass dieses nach Detektion mit dem Antikörper AP5 in filopodienähnlichen Ausläufern sichtbar wurde (Abbildung 47D).

$\alpha_v\beta_3$ war dann hauptsächlich in der Zellperipherie, etwas außerhalb des Aktinrings in der „sealing"-Zone lokalisiert. Erst dann war eine teilweise Colokalisation zwischen Integrin und Aktinring vorhanden (Abbildung 47F, Doppelpfeile). Nach längerer Inkubation mit HGF gelang auch der Nachweis von Integrin $\alpha_v\beta_3$ in den Lamellipodien (Faccio et al., 2002).

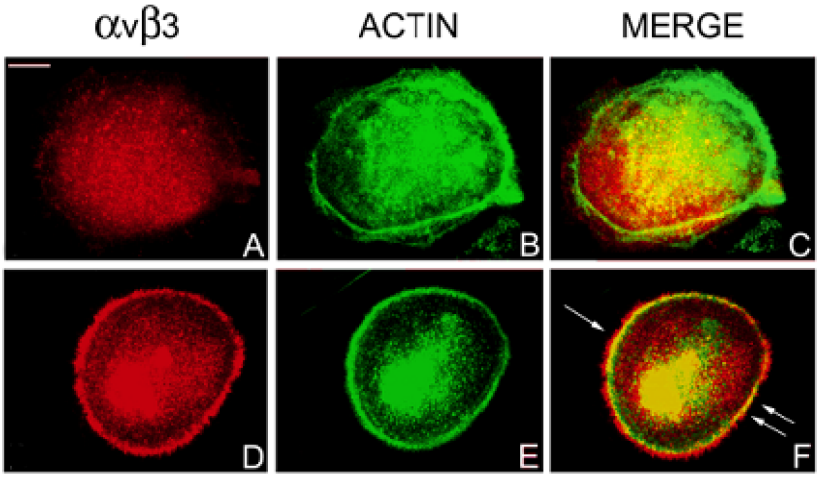


Abbildung 47: Immunfluoreszenz von $\alpha_v\beta_3$ in humanen Osteoklasten (*rot*: $\alpha_v\beta_3$, *grün*: Aktin); ohne (A-C) und mit (D-F) Stimulation durch HGF (Faccio et al., 2002);

Wie in Abbildung 48 ersichtlich ist, ergaben die durchgeführten Experimente ein ähnliches mikroskopisches Bild wie Abbildung 47A, B und C. Dies legt die Vermutung nahe, dass der Nachweis der Lokalisation von Integrin $\alpha_v\beta_3$ mit dem hier eingesetzten Integrin β_3-Antikörper auch in diesem Fall konformationsabhängig ist.

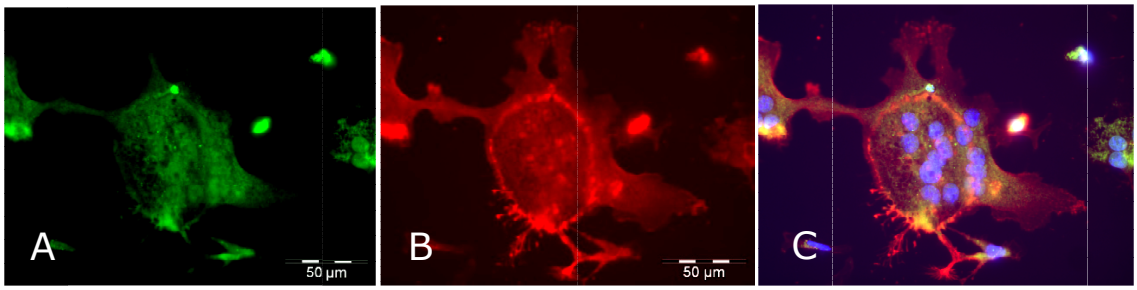


Abbildung 48: Mäuse-Osteoklast (*grün*: $\alpha_v\beta_3$, rot: Aktin); Immunfluoreszenz (A), Aktinfärbung (B), Overlay der beiden Färbungen (C)

Welche der getesteten Gelatine-, bzw. Pektintypen für ein neues Biomaterial am geeignetsten wäre, ist gegenwärtig schwierig zu beantworten, da hierfür erst weitere Frage beantwortet werden müssen. Bei keiner der Beschichtungen hat sich die Zahl der TRAP-positiven Osteoklasten auf mehr als die in den Kontrollgruppen erhöht. Lediglich auf Gelatine Typ A, 90 – 110 g Bloom wurde ein größerer

Prozentsatz an Aktin im Vergleich zur Kontrollgruppe gefunden (Abbildung 16), was auf eine erhöhte Resorptionsrate auf dieser Beschichtung schließen lässt. Falls ein Kompositmaterial aus diesem Gelatinetyp und resorbierbarem TCP eingesetzt wird, würde es vermutlich im Vergleich zu echtem Knochen zu einer erhöhten Resorptionsrate durch Osteoklasten kommen. Ist zusätzlich die Resorptionsrate des Kompositmaterials selbst zu hoch gewählt, könnte es zum frühzeitigen Abbau des Implantats durch Osteoklasten in vivo kommen. Das würde den Einsatz als Knochenimplantat fraglich machen.
Handelt es sich beim benötigten Biomaterial jedoch um eines, das nur kurz im Körper verbleiben, also rasch resorbiert werden soll, wäre gerade eine hohe Anzahl an Osteoklasten auf diesem Material wünschenswert. Der Einsatz von Gelatine Typ A, 90 - 110 g Bloom wäre also bei kleinen Defekten, die rasch durch körpereigenes Gewebe ersetzt werden, denkbar. Andererseits könnte eine Mischung aus Gelatine p.a. und Pektin durch den geringen Anteil an Aktinringen als Implantat in der Zahnmedizin eingesetzt werden, da die hier verwendeten Materialien lange im Körper verbleiben und daher nur langsam resorbiert werden sollen.
Die Beurteilung einer Substanz hinsichtlich ihrer Eignung als Biomaterial ist also maßgeblich durch die gestellten Anforderungen bedingt.

Wenn der optimale Gelatine-Typ, die optimale Konzentration an TCP und Crosslinker gefunden werden kann, ist eine Einbettung von Gelatine-TCP-Mikrosphären, eventuell auch mit Antibiotika, Zytostatika oder Wachstumsfaktoren imprägniert, in eine geeignete Matrix möglich. Daraus ließe sich ein Bulkmaterial produzieren, aus dem dann potentiell ein biomimetisches Implantat hergestellt werden könnte. Allerdings ist es notwendig, jeden dieser Einzelschritte erst in vitro und dann in vivo zu überprüfen, da einerseits Toxizität der Materialien ausgeschlossen werden und auch weitere Fragen, allen voran die Knochenbildung durch Osteoblasten, auf dem Biomaterial beantwortet werden müssen. Gerade Untersuchungen zum Knochenaufbau auf den hier untersuchten Biomaterialien durch Osteoblasten sind relevant, da erst durch diese Informationen konkretere Schlussfolgerungen einer gemeinsamen Wirkungsweise von Osteoblasten und Osteoklasten möglich sind.
Es wäre auch denkbar, dass das Zellverhalten auf Mikrosphären bzw. auf einem Bulkmaterial anders ist als auf einer nahezu zweidimensionalen Gelatinebeschichtung. Auch muss das Bulkmaterial im Endeffekt die grundlegenden Anforderungen bezüglich Toxizität, Stabilität und Biokompatibilität erfüllen, sodass

noch eine Reihe an Experimenten im Lauf der weiteren Entwicklung durchgeführt werden muss.

Gelatine ist als denaturierte Form von Kollagen im Vergleich zu diesem weniger allergen und daher als organischer Bestandteil von biomimetischen Materialien gut geeignet. Da es bei Implantaten, insbesondere im Fall von Metallen, zu Abstoßungsreaktionen kommen kann, wäre eine Beschichtung von Metallen mit Gelatine-TCP-Suspensionen denkbar, sodass die Immunogenität solcher Implantate verringert werden könnte. Es wurden bereits Metalle mit Calciumphosphat überzogen (Sun et al., 2001), (Heimann, 2006) und dadurch ihre mechanische Stabilität verbessert, sodass prinzipiell die Herstellung von mit Gelatine-TCP-Suspensionen überzogenen Implantaten denkbar wäre.
Gelatine wird in der Biomedizin häufig als Kapsel, Mikrosphäre, Verbandmaterial und dreidimensionale Gerüstsubstanz zur Geweberegeneration vor allem von Blutgefäßen eingesetzt. Ein großer Vorteil ist die vollständige Abbaubarkeit in vivo und die fehlende Antigenität im Vergleich zu Kollagen (Bigi et al., 2002).

Die durch diese Arbeit erhaltenen Ergebnisse sind insofern von Nutzen, als der Einfluss von Gelatinetypen unterschiedlicher Gelstärke und Ursprungs auf Osteoklasten in dieser Form bisher noch nicht untersucht wurde. Auch wurde durch diese Arbeit der direkte Vergleich der Gelatinetypen untereinander, sowohl alleine als auch in Kombination mit TCP, ermöglicht. Es wurde dabei eine Vielzahl von Fragestellungen abgedeckt, allen voran der Einfluss von Gelatine auf die Resorptionsrate durch Osteoklasten und deren Zelladhäsion, beides grundlegende Parameter zur Entwicklung neuer Biomaterialien. Außerdem wurde gezeigt, dass der Zusatz von TCP zu Gelatine großen Einfluss auf die Osteoklastenbildung hat und dass verschiedene Gelatinetypen die Morphologie und Anzahl der Osteoklasten maßgeblich beeinflussen.
Die gewonnenen Informationen ermöglichen es daher, je nach Applikationsart des Biomaterials und vor allem gewünschter Resorptionsrate, gezielt und selektiv den passenden Gelatinetyp zu wählen. Dadurch kann die Resorptionsrate des Biomaterials in gewisser Hinsicht gesteuert und in weiterer Folge sichergestellt werden, dass der passende Gelatinetyp als organischer Anteil für ein biomimetisches Kompositmaterial eingesetzt wird.

5 Zusammenfassung

Synthetische Knochentransplantate haben großen Nutzen zur Behebung von Knochenschäden bei kritischer Größe, wie sie durch Frakturen, Krankheiten wie Knochentumoren und Infektionen oder kongenitale Zustände entstehen können.
Gelatine stellt als denaturierte und daher weniger allergene Form von Kollagen, dem organischen Hauptbestandteil des Knochens, eine Alternative zu biologischem Material dar. Tricalciumphosphat kann in Biomaterialien den anorganischen Anteil des Knochens nachahmen, weswegen eine Kombination aus Gelatine und Tricalciumphosphat ein ideales Biomaterial darstellt. Um ein Kompositmaterial aus verschiedenen Gelatinetypen und Tricalciumphosphat herzustellen, musste Gelatine mit Glutardialdehyd kovalent quervernetzt werden.
Nach Beschichtung von Deckgläsern mit den gewünschten Gelatine- oder und Pektinlösungen, bzw. Gelatine-Tricalciumphosphat-Suspensionen, wurden diese Materialien an Osteoklasten untersucht. Der Einfluss dieser Biomaterialen auf die Osteoklastenanzahl wurde mittels TRAP-Färbung und anschließender Zellzählung der TRAP-positiven Osteoklasten unter dem Lichtmikroskop bestimmt. Zur Beurteilung des Zytoskeletts und der Kernmorphologie wurde eine Aktin-/DAPI-Färbung durchgeführt. Desweiteren wurde eine Fluoreszenzmarkierung mit Integrin β_3-Antikörper durchgeführt, um auch die Lokalisation des Adhäsionsproteins Integrin β_3 unter Einfluss verschiedener Beschichtungen zu untersuchen.

Alle Gelatinetypen führten zu einer Reduktion der Osteoklastenanzahl, wobei Gelatine Typ B alleine und in Kombination mit anderen Gelatinetypen die Osteoklastenbildung in allen durchgeführten Experimenten vollständig hemmte. Bei Zusatz von Tricalciumphosphat zu Gelatine Typ B kam es nur noch zu Verringerung der Osteoklastenzahl, aber nicht zu vollständiger Reduktion. Gelatine p.a. und Pektin zeigten den geringsten inhibitorischen Effekt, Gelatine Typ A 300 g/90 - 110 g Bloom schienen eine Art „Synergismus" bezüglich Hemmung der Osteklastenbildung zu haben, da es in dieser Gruppe zu einer stärkeren Hemmung kam, als in Gruppen unter Verwendung der Reinsubstanzen.

Generell waren bei Tricalciumphosphat-Zusatz die entstandenen Osteoklasten kleiner als ohne Tricalciumphosphat und auch die Zellzahl war geringer. Die verschiedenen Gelatinetypen hatten dabei kaum Einfluss auf die Zellzahl, wobei

Gelatine Typ B die höchste Osteoklastenzahl aller Gelatine-Tricalciumphosphat-Beschichtungen aufwies.

Bei der Aktin-/DAPI-Färbung zeigten Osteoklasten auf Beschichtung mit Gelatine Typ A, 90 – 110 g Bloom den höchsten Anteil an Aktinringen, während sich alle anderen Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe eher indifferent verhielten. Besonders im Falle der Beschichtung mit Gelatine Typ A, 300 g Bloom waren oft mehrere Aktinringe pro Osteoklast vorhanden, das Aktingerüst jedoch weniger intensiv gefärbt.
Beschichtungen mit Gelatine p.a. und Pektin führten zur Bildung großer Osteoklasten mit entsprechend vielen Zellkernen, Mischungen aus beiden Substanzen hatten jedoch wenig Effekt auf die Zellmorphologie.

Bezüglich der Lokalisation von Integrin β_3 konnte in den untersuchten Gruppen (Gelatine Typ A 90 – 110 g Bloom, Gelatine p.a., Gelatine p.a./Pektin) im Vergleich zur Kontrollgruppe kein Unterschied festgestellt werden.

6 Literaturverzeichnis

Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.

Andersen PJ 2013 B - Stainless Steels. In: Buddy DR, Allan SH, Frederick JS, Jack E. LemonsA2 - Buddy D. Ratner ASHFJS, et al. (eds.) Biomaterials Science (Third Edition). Academic Press, pp 124-127.

Antonucci J, Dickens S 2013 D - Acrylics. In: Buddy DR, Allan SH, Frederick JS, Jack E. LemonsA2 - Buddy D. Ratner ASHFJS, et al. (eds.) Biomaterials Science (Third Edition). Academic Press, pp 103-111.

Asghar A, Henrickson RL 1982 Chemical, biochemical, functional, and nutritional characteristics of collagen in food systems. Adv Food Res **28:**231-372.

Aubin JE 2008 Chapter 4 - Mesenchymal Stem Cells and Osteoblast Differentiation. In: John PB, Lawrence GR, T. John MartinA2 - John P. Bilezikian LGR, Martin TJ (eds.) Principles of Bone Biology (Third Edition). Academic Press, San Diego, pp 85-107.

Bigi A, Cojazzi G, Panzavolta S, Roveri N, et al. 2002 Stabilization of gelatin films by crosslinking with genipin. Biomaterials **23**(24)**:**4827-4832.

Bigi A, Cojazzi G, Panzavolta S, Rubini K, et al. 2001 Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking. Biomaterials **22**(8)**:**763-768.

Bohner M 2001 Physical and chemical aspects of calcium phosphates used in spinal surgery. Eur Spine J **10 Suppl 2:**S114-21.

Bonewald LF 2011 The amazing osteocyte. J Bone Miner Res **26**(2)**:**229-38.

Boyle W SW, Lacey DL 2003 Osteoclast differentiation and activation. Nature **423**.

Burchardt H 1983 The biology of bone graft repair. Clinical orthopaedics and related research (174)**:**28-42.

Burgess TL, Qian Y, Kaufman S, Ring BD, et al. 1999 The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. J Cell Biol **145**(3)**:**527-38.

Calori GM, Mazza E, Colombo M, Ripamonti C 2011 The use of bone-graft substitutes in large bone defects: Any specific needs? Injury **42, Supplement 2**(0)**:**S56-S63.

Clarke B 2008 Normal bone anatomy and physiology. Clin J Am Soc Nephrol **3 Suppl 3:**S131-9.

Colas A, Curtis J 2013 B - Silicones. In: Buddy DR, Allan SH, Frederick JS, Jack E. LemonsA2 - Buddy D. Ratner ASHFJS, et al. (eds.) Biomaterials Science (Third Edition). Academic Press, pp 82-91.

Costa-Rodrigues J, Fernandes A, Lopes MA, Fernandes MH 2012 Hydroxyapatite surface roughness: Complex modulation of the osteoclastogenesis of human precursor cells. Acta Biomaterialia **8**(3)**:**1137-1145.

Cowin SC, Moss-Salentijn L, Moss ML 1991 Candidates for the mechanosensory system in bone. J Biomech Eng **113**(2)**:**191-7.

Dennis JE, Merriam A, Awadallah A, Yoo JU, et al. 1999 A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse. J Bone Miner Res **14**(5)**:**700-9.

Derynck R, Akhurst RJ 2007 Differentiation plasticity regulated by TGF-beta family proteins in development and disease. Nat Cell Biol **9**(9)**:**1000-4.

Djabourov M, Bonnet, N., Kaplan, H., Favard, N., Favard, P., Lechaire, J. P. 1993 3D analysis of gelatin gel networks from transmission electron microscopy imaging. Journal De Physique II **3:**611-624.
Dudley HR, Spiro D 1961 THE FINE STRUCTURE OF BONE CELLS. J Biophys Biochem Cytol **11**(3)**:**627-49.
Einhorn TA, Lane JM, Burstein AH, Kopman CR, et al. 1984 The healing of segmental bone defects induced by demineralized bone matrix. A radiographic and biomechanical study. J Bone Joint Surg Am **66**(2)**:**274-9.
Faccio R, Grano M, Colucci S, Villa A, et al. 2002 Localization and possible role of two different alpha v beta 3 integrin conformations in resting and resorbing osteoclasts. Journal of cell science **115**(Pt 14)**:**2919-29.
Faccio R, Grano M, Colucci S, Zallone AZ, et al. 1998 Activation of alphav beta3 integrin on human osteoclast-like cells stimulates adhesion and migration in response to osteopontin. Biochem Biophys Res Commun **249**(2)**:**522-5.
Freed LE, Guilak F, Guo XE, Gray ML, et al. 2006 Advanced tools for tissue engineering: scaffolds, bioreactors, and signaling. Tissue Eng **12**(12)**:**3285-305.
Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E 2005 Bone substitutes: An update. Injury **36**(3, Supplement)**:**S20-S27.
Giard DJ 1987 Routine heat inactivation of serum reduces its capacity to promote cell attachment. In Vitro Cell Dev Biol **23**(10)**:**691-7.
Gómez-Guillén MC, Giménez B, López-Caballero ME, Montero MP 2011 Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. Food Hydrocolloids **25**(8)**:**1813-1827.
Hacker MC, Mikos AG 2006 Trends in tissue engineering research. Tissue Eng **12**(8)**:**2049-57.
Heath DE, Cooper SL 2013 Chapter I.2.2 - Polymers: Basic Principles. In: Buddy DR, Allan SH, Frederick JS, Jack E. LemonsA2 - Buddy D. Ratner ASHFJS, et al. (eds.) Biomaterials Science (Third Edition). Academic Press, pp 64-79.
Heimann RB 2006 Thermal spraying of biomaterials. Surface and Coatings Technology **201**(5)**:**2012-2019.
Hench LL, Best SM 2013 Chapter I.2.4 - Ceramics, Glasses, and Glass-Ceramics: Basic Principles. In: Buddy DR, Allan SH, Frederick JS, Jack E. LemonsA2 - Buddy D. Ratner ASHFJS, et al. (eds.) Biomaterials Science (Third Edition). Academic Press, pp 128-151.
Herrmann JB, Kelly RJ, Higgins GA 1970 Polyglycolic acid sutures. Laboratory and clinical evaluation of a new absorbable suture material. Arch Surg **100**(4)**:**486-90.
Hill P 1998 Bone remodelling. British Journal of Orthodontics **25:**101-7.
Hoffman AS 2013 Chapter I.2.1 - Introduction: The Diversity and Versatility of Biomaterials. In: Buddy DR, Allan SH, Frederick JS, Jack E. LemonsA2 - Buddy D. Ratner ASHFJS, et al. (eds.) Biomaterials Science (Third Edition). Academic Press, pp 63-64.
Holland TA, Bodde EWH, Cuijpers VMJI, Baggett LS, et al. 2007 Degradable hydrogel scaffolds for in vivo delivery of single and dual growth factors in cartilage repair. Osteoarthritis and Cartilage **15**(2)**:**187-197.
Holland TA, Tabata Y, Mikos AG 2005 Dual growth factor delivery from degradable oligo(poly(ethylene glycol) fumarate) hydrogel scaffolds for cartilage tissue engineering. Journal of Controlled Release **101**(1–3)**:**111-125.
Horwood NJ, Elliott J, Martin TJ, Gillespie MT 1998 Osteotropic agents regulate the expression of osteoclast differentiation factor and osteoprotegerin in osteoblastic stromal cells. Endocrinology **139**(11)**:**4743-6.
Hunziker E, Spector M, Libera J, Gertzman A, et al. 2006 Translation from research to applications. Tissue Eng **12**(12)**:**3341-64.

Ichibouji T MT, Ishida E, Ashizuka M, Sugino A, Ohtsuki C, Kuramoto K 2008 Evaluation of apatite-forming ability and mechanical property of pectin hydrogels. Journal of the Ceramic Society of Japan **116**(1)**:**74-78.
Ingber DE 2010 From cellular mechanotransduction to biologically inspired engineering: 2009 Pritzker Award Lecture, BMES Annual Meeting October 10, 2009. Ann Biomed Eng **38**(3)**:**1148-61.
Inoue M, Sasaki M, Taguchi T 2010 Unusual degradation behavior of citric acid-crosslinked gelatin in vitro and in vivo. Polymer Degradation and Stability **95**(10)**:**2088-2092.
Itzstein Cecile vtHR 2012 Osteoclast Formation in Mouse Co-cultures. Bone Research Protocols, Second Edition**:**177-190.
Jayakrishnan A, Jameela SR 1996 Glutaraldehyde as a fixative in bioprostheses and drug delivery matrices. Biomaterials **17**(5)**:**471-484.
Johnston-Banks FAIPHE 1990 Gelatin. Food Gels**:**223-289.
Knothe Tate ML 2003 "Whither flows the fluid in bone?" An osteocyte's perspective. J Biomech **36**(10)**:**1409-24.
Kuijpers AJ EG, Feijen J, De Smedt SC, Meyvis TKL, Demeester J, Krijgsveld J, Zaat SAJ, Dankert J. 1999 Characterization of the network structure of carbodiimide cross-linked
gelatin gels. Macromolecules **32:**3325-33.
Kular J, Tickner J, Chim SM, Xu J 2012 An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level. Clinical Biochemistry **45**(12)**:**863-873.
Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, et al. 1998 Osteoprotegerin Ligand Is a Cytokine that Regulates Osteoclast Differentiation and Activation. Cell **93**(2)**:**165-176.
Le Gall B, Taran F, Renault D, Wilk JC, et al. 2006 Comparison of Prussian blue and apple-pectin efficacy on 137Cs decorporation in rats. Biochimie **88**(11)**:**1837-1841.
LeGeros RZ 2002 Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. Clinical orthopaedics and related research (395)**:**81-98.
Li Z, Kong K, Qi W 2006 Osteoclast and its roles in calcium metabolism and bone development and remodeling. Biochemical and Biophysical Research Communications **343**(2)**:**345-350.
Liu F, Grainger DW 2013 C - Fluorinated Biomaterials. In: Buddy DR, Allan SH, Frederick JS, Jack E. LemonsA2 - Buddy D. Ratner ASHFJS, et al. (eds.) Biomaterials Science (Third Edition). Academic Press, pp 92-103.
Ma YL, Cain RL, Halladay DL, Yang X, et al. 2001 Catabolic effects of continuous human PTH (1--38) in vivo is associated with sustained stimulation of RANKL and inhibition of osteoprotegerin and gene-associated bone formation. Endocrinology **142**(9)**:**4047-54.
Malone JD, Teitelbaum SL, Griffin GL, Senior RM, et al. 1982 Recruitment of osteoclast precursors by purified bone matrix constituents. J Cell Biol **92**(1)**:**227-30.
Martin TJ 2005 Osteoblast-derived PTHrP is a physiological regulator of bone formation. J Clin Invest **115**(9)**:**2322-4.
Matsunobu T, Torigoe K, Ishikawa M, de Vega S, et al. 2009 Critical roles of the TGF-beta type I receptor ALK5 in perichondrial formation and function, cartilage integrity, and osteoblast differentiation during growth plate development. Dev Biol **332**(2)**:**325-38.
Migliaresi C 2013 Chapter I.2.9 - Composites. In: Buddy DR, Allan SH, Frederick JS, Jack E. LemonsA2 - Buddy D. Ratner ASHFJS, et al. (eds.) Biomaterials Science (Third Edition). Academic Press, pp 223-241.
Mizuno A, Amizuka N, Irie K, Murakami A, et al. 1998 Severe osteoporosis in mice lacking osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin. Biochem Biophys Res Commun **247**(3)**:**610-5.

Muruguan R LS, Ramakrishna S, Molnar P, Huang ZM, Kotaki M, Rao KP, Hickman JJ 2010 Skeletal Regenerative Nanobiomaterials. In: Hussain NS, Santos JD (eds.). Biomaterials for Bone Regenerative Medicine**:**1-34.
Nielsen RH, Karsdal MA, Sørensen MG, Dziegiel MH, et al. 2007 Dissolution of the inorganic phase of bone leading to release of calcium regulates osteoclast survival. Biochemical and Biophysical Research Communications **360**(4)**:**834-839.
Noonan KJ, Stevens JW, Tammi R, Tammi M, et al. 1996 Spatial distribution of CD44 and hyaluronan in the proximal tibia of the growing rat. J Orthop Res **14**(4)**:**573-81.
Olde Damink LHH DP, van Luyn MJA, van Wachem PB, Nieuwenhuis P, Feijen J 1995 Glutaraldehyde as a crosslinking agent for collagen-based biomaterials. Journal of Material Science: Material Medicine **6:**460-72.
Oner L, Groves MJ 1993 Optimization of conditions for preparing 2- to 5-micron-range gelatin microparticles by using chilled dehydration agents. Pharm Res **10**(4)**:**621-6.
Pandit A, Planell J, Navarro M 2013 A - Titanium and Nitinol (NiTi). In: Buddy DR, Allan SH, Frederick JS, Jack E. LemonsA2 - Buddy D. Ratner ASHFJS, et al. (eds.) Biomaterials Science (Third Edition). Academic Press, pp 120-124.
Park H, Temenoff JS, Tabata Y, Caplan AI, et al. 2007a Injectable biodegradable hydrogel composites for rabbit marrow mesenchymal stem cell and growth factor delivery for cartilage tissue engineering. Biomaterials **28**(21)**:**3217-27.
Patel ZS, Ueda H, Yamamoto M, Tabata Y, et al. 2008a In vitro and in vivo release of vascular endothelial growth factor from gelatin microparticles and biodegradable composite scaffolds. Pharm Res **25**(10)**:**2370-8.
Patel ZS, Yamamoto M, Ueda H, Tabata Y, et al. 2008b Biodegradable gelatin microparticles as delivery systems for the controlled release of bone morphogenetic protein-2. Acta Biomaterialia **4**(5)**:**1126-1138.
Patel ZS, Young S, Tabata Y, Jansen JA, et al. 2008c Dual delivery of an angiogenic and an osteogenic growth factor for bone regeneration in a critical size defect model. Bone **43**(5)**:**931-940.
Peppas NA, Hoffman AS 2013 Chapter I.2.5 - Hydrogels. In: Buddy DR, Allan SH, Frederick JS, Jack E. LemonsA2 - Buddy D. Ratner ASHFJS, et al. (eds.) Biomaterials Science (Third Edition). Academic Press, pp 166-179.
Pham QP, Kurtis Kasper F, Scott Baggett L, Raphael RM, et al. 2008 The influence of an in vitro generated bone-like extracellular matrix on osteoblastic gene expression of marrow stromal cells. Biomaterials **29**(18)**:**2729-2739.
Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, et al. 1999 Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science **284**(5411)**:**143-7.
Ragab AA, Nalepka JL, Bi Y, Greenfield EM 2002 Cytokines synergistically induce osteoclast differentiation: support by immortalized or normal calvarial cells. Am J Physiol Cell Physiol **283**(3)**:**C679-87.
Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE 2013 Introduction - Biomaterials Science: An Evolving, Multidisciplinary Endeavor. In: Buddy DR, Allan SH, Frederick JS, Jack E. LemonsA2 - Buddy D. Ratner ASHFJS, et al. (eds.) Biomaterials Science (Third Edition). Academic Press, pp xxv-xxxix.
Rault I FV, Herbage D, Abdul-Malak N, Huc A 1996 Evaluation of different chemical methods for cross-linking collagen gel, films and sponges. Journal of Material Science: Material Medicine **7:**215-21.
Suarasan S, Focsan M, Maniu D, Astilean S 2013 Gelatin–nanogold bioconjugates as effective plasmonic platforms for SERS detection and tagging. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces **103**(0)**:**475-481.
Suda T, Takahashi N, Martin TJ 1992 Modulation of osteoclast differentiation. Endocr Rev **13**(1)**:**66-80.

Sun L, Berndt CC, Gross KA, Kucuk A 2001 Material fundamentals and clinical performance of plasma-sprayed hydroxyapatite coatings: a review. J Biomed Mater Res **58**(5)**:**570-92.
Sung HW, Huang DM, Chang WH, Huang RN, et al. 1999 Evaluation of gelatin hydrogel crosslinked with various crosslinking agents as bioadhesives: in vitro study. J Biomed Mater Res **46**(4)**:**520-30.
Tachi K, Takami M, Sato H, Mochizuki A, et al. 2011 Enhancement of bone morphogenetic protein-2-induced ectopic bone formation by transforming growth factor-beta1. Tissue Eng Part A **17**(5-6)**:**597-606.
Tanaka-Kamioka K, Kamioka H, Ris H, Lim SS 1998 Osteocyte shape is dependent on actin filaments and osteocyte processes are unique actin-rich projections. J Bone Miner Res **13**(10)**:**1555-68.
Tatsumi S, Ishii K, Amizuka N, Li M, et al. 2007 Targeted ablation of osteocytes induces osteoporosis with defective mechanotransduction. Cell Metab **5**(6)**:**464-75.
Teitelbaum S 2000 Bone Resorption by Osteoclasts. Science **289:**1504-1508.
Treiser M, Abramson S, Langer R, Kohn J 2013 Chapter I.2.6 - Degradable and Resorbable Biomaterials. In: Buddy DR, Allan SH, Frederick JS, Jack E. LemonsA2 - Buddy D. Ratner ASHFJS, et al. (eds.) Biomaterials Science (Third Edition). Academic Press, pp 179-195.
Udagawa N, Takahashi N, Akatsu T, Tanaka H, et al. 1990 Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells. Proc Natl Acad Sci U S A **87**(18)**:**7260-4.
Urist MR 1965 Bone: formation by autoinduction. Science **150**(3698)**:**893-9.
Vaananen HK HM 1995 The osteoclast clear zone is a specialized cell-extracellular matrix adhesion structure. Journal of Scell Cience **108:**2729–32.
Vandelli MA, Rivasi F, Guerra P, Forni F, et al. 2001 Gelatin microspheres crosslinked with d,l-glyceraldehyde as a potential drug delivery system: preparation, characterisation, in vitro and in vivo studies. International Journal of Pharmaceutics **215**(1–2)**:**175-184.
Vincken JP, Schols HA, Oomen RJ, McCann MC, et al. 2003 If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. Plant Physiol **132**(4)**:**1781-9.
Viney C 2013 Chapter I.1.3 - Bulk Properties of Materials. In: Buddy DR, Allan SH, Frederick JS, Jack E. LemonsA2 - Buddy D. Ratner ASHFJS, et al. (eds.) Biomaterials Science (Third Edition). Academic Press, pp 9-21.
Wainewright FW 1977 Physical tests for gelatin and gelatin products. The science and technology of gelatin**:**507 - 534.
Walsh NC, Cahill M, Carninci P, Kawai J, et al. 2003 Multiple tissue-specific promoters control expression of the murine tartrate-resistant acid phosphatase gene. Gene **307**(0)**:**111-123.
Wennberg C, Hessle L, Lundberg P, Mauro S, et al. 2000 Functional characterization of osteoblasts and osteoclasts from alkaline phosphatase knockout mice. J Bone Miner Res **15**(10)**:**1879-88.
Williams DF 2009 On the nature of biomaterials. Biomaterials **30**(30)**:**5897-5909.
Xiong JP, Stehle T, Diefenbach B, Zhang R, et al. 2001 Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3. Science (New York, N.Y.) **294**(5541)**:**339-45.
Xu J, Tan JW, Huang L, Gao XH, et al. 2000 Cloning, sequencing, and functional characterization of the rat homologue of receptor activator of NF-kappaB ligand. J Bone Miner Res **15**(11)**:**2178-86.
Zeeman R, Dijkstra PJ, van Wachem PB, van Luyn MJA, et al. 1999 Successive epoxy and carbodiimide cross-linking of dermal sheep collagen. Biomaterials **20**(10)**:**921-931.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: schematische Darstellung der Entwicklung von mesenchymalen Stammzellen zu Osteoblasten, Saumzellen und Osteozyten (Aubin, 2008) 13
Abbildung 2: Interaktion zwischen Osteoklasten, Osteoblasten, Osteozyten, Saumzellen und endothelialen Zellen; (Kular et al., 2012) 15
Abbildung 3: Primärstruktur von Gelatine (Suarasan et al., 2013) 26
Abbildung 4: Reaktion von polymerisiertem Glutardialdehyd mit primären Aminen (Jayakrishnan und Jameela, 1996) 27
Abbildung 5: Struktur von Pektin (Le Gall et al., 2006).....28
Abbildungen 6 und 7: Mäuse-Osteoklasten auf Glas nach TRAP-Färbung mit deutlich sichtbaren Zellkernen.....38
Abbildung 8: Effekt der Beschichtung mit 5 % Gelatine Typ A, 300 g Bloom auf Osteoklastenbildung (Mittelwert Anzahl TRAP+ OC in Kontrollgruppe: Experiment 1: 1499,33 OC, Experiment 2: 1626,33 OC, Experiment 3: 3100,33 OC).....47
Abbildung 9: Effekt der Beschichtung mit Suspension von 5 % Gelatine Typ A, 300 g Bloom und 3 % TCP auf Osteoklastenbildung Ergebnisse der Aktin-/DAPI-Färbung 47
Abbildung 10: Effekt der Beschichtung mit 5 % Gelatine Typ A, 300 g Bloom auf Ausbildung von Aktinringen 48
Abbildung 11: Mäuse-Osteoklasten auf unbeschichtetem Deckglas (**Kontrollgruppe**); deutlich sichtbare Aktinringe (Pfeile), durch DAPI angefärbte Zellkerne (blau), durch AlexaFluor® Phalloidin 546 gefärbtes Aktin (rot);.....49
Abbildung 12: Mäuse-Osteoklasten auf Beschichtung mit **BSA**; mit deutlich sichtbarem Aktinring (Pfeile), durch DAPI angefärbte Zellkerne (blau), durch AlexaFluor® Phalloidin 546 gefärbtes Aktin (rot); Im Vergleich zur Kontrollgruppe (unbeschichtetes Deckglas) ist Aktin deutlich schwächer gefärbt, die Osteoklasten sind runder, regelmäßiger und etwas größer, die Aktinringe sind weniger stark ausgeprägt 49
Abbildung 13: Mäuse-Osteoklasten auf Beschichtung mit **Gelatine Typ A, 300 g Bloom**; mit mehreren deutlich sichtbaren Aktinringen pro Zelle (Pfeile), durch DAPI angefärbte Zellkerne (blau), durch AlexaFluor® Phalloidin 546 gefärbtes Aktin (rot); 50

Abbildung 14: Effekt der Beschichtung mit 5 % Gelatine Typ A, 90 – 110 g Bloom auf Osteoklastenbildung (Mittelwert Anzahl TRAP+ OC in Kontrollgruppe: Experiment 1: 1499,33 OC, Experiment 2: 1626,33 OC, Experiment 3: 3100,33 OC).....51
Abbildung 15: Effekt der Beschichtung mit Suspension von 5 % Gelatine Typ A, 90 – 110 g Bloom und 3 % TCP auf Osteoklastenbildung.....52
Abbildung 16: Effekt der Beschichtung mit 5 % Gelatine Typ A, 90 - 110 g Bloom auf Ausbildung von Aktinringen 53
Abbildung 17: Mäuse-Osteoklasten auf Beschichtung mit **Gelatine Typ A, 90 - 110 g Bloom**; deutlich sichtbarer Aktinring (Pfeile), durch DAPI angefärbte Zellkerne (blau), durch AlexaFluor® Phalloidin 546 gefärbtes Aktin (rot);.....54
Abbildung 18: Effekt der Beschichtung mit 5 % Gelatine Typ A, 300 g/90 – 110 g Bloom auf Osteoklastenbildung (Mittelwert Anzahl TRAP+ OC in Kontrollgruppe: Experiment 1: 1499,33 OC, Experiment 2: 1626,33 OC, Experiment 3: 3100,33 OC).....55
Abbildung 19: Effekt der Beschichtung mit Suspension von 5 % Gelatine Typ A, 300 g/90 – 110 g Bloom und 3 % TCP auf Osteoklastenbildung.....56
Abbildung 20: Effekt der Beschichtung mit 5 % Gelatine Typ A, 300 g/90 - 110 g Bloom auf Ausbildung von Aktinringen 57
Abbildung 21: Effekt der Beschichtung mit 5 % Gelatine Typ B auf Osteoklastenbildung (Mittelwert Anzahl TRAP+ OC in Kontrollgruppe: Experiment 1: 1499,33 OC, Experiment 2: 1626,33 OC, Experiment 3: 3100,33 OC).....58
Abbildung 22: Effekt der Beschichtung mit Suspension von 5 % Gelatine Typ B und 3 % TCP auf Osteoklastenbildung 58
Abbildung 23: Effekt der Beschichtung mit 5 % Gelatine Typ B/Typ A, 300 g Bloom auf Osteoklastenbildung (Mittelwert Anzahl TRAP+ OC in Kontrollgruppe: Experiment 1: 1499,33 OC, Experiment 2: 1626,33 OC, Experiment 3: 3100,33 OC).....59
Abbildung 24: Effekt der Beschichtung mit Suspension von 5 % Gelatine Typ B/Typ A, 300 g Bloom und 3 % TCP auf Osteoklastenbildung 60
Abbildung 25: Effekt der Beschichtung mit 5 % Gelatine Typ B/Typ A, 90 - 110 g Bloom auf Osteoklastenbildung (Mittelwert Anzahl TRAP+ OC in Kontrollgruppe: Experiment 1: 1499,33 OC, Experiment 2: 1626,33 OC, Experiment 3: 3100,33 OC).....61
Abbildung 26: Effekt der Beschichtung mit Suspension von 5 % Gelatine Typ B/Typ A, 90 – 110 g Bloom und 3 % TCP auf Osteoklastenbildung 62

Abbildung 27: Effekt der Beschichtung mit 5 % Gelatine p.a. auf Osteoklastenbildung (Mittelwert Anzahl TRAP+ OC in Kontrollgruppe: Experiment 1: 1499,33 OC, Experiment 2: 1626,33 OC, Experiment 3: 3100,33 OC).....63
Abbildung 28: Effekt der Beschichtung mit Suspension von 5 % Gelatine p.a. und 3 % TCP auf Osteoklastenbildung 63
Abbildung 29: Effekt der Beschichtung mit 5 % Gelatine p.a. auf Ausbildung von Aktinringen 64
Abbildung 30: großer Mäuse-Osteoklast auf Beschichtung mit **Gelatine p.a**. mit deutlich sichtbarem Aktinring (Pfeile), durch DAPI angefärbte Zellkerne (blau), durch AlexaFluor® Phalloidin 546 gefärbtes Aktin (rot); 65
Abbildung 31: Effekt der Beschichtung mit 5 % Pektin auf Osteoklastenbildung (Mittelwert Anzahl TRAP+ OC in Kontrollgruppe: Experiment 1: 1499,33 OC, Experiment 2: 1626,33 OC, Experiment 3: 3100,33 OC) 66
Abbildung 32: Effekt der Beschichtung mit 5 % Pektin auf Ausbildung von Aktinringen 67
Abbildung 33: großer Mäuse-Osteoklast auf Beschichtung mit **Pektin**; deutlich sichtbar ist ein fast vollständig ausgeprägter Aktinring (Pfeile), durch DAPI angefärbte Zellkerne (blau), durch AlexaFluor® Phalloidin 546 gefärbtes Aktin (rot); Teile des Osteoklasts beginnen bereits, sich vom Deckglas zu lösen 68
Abbildung 34: Effekt der Beschichtung mit 5 % Gelatine p.a./Pektin auf Osteoklastenbildung (Mittelwert Anzahl TRAP+ OC in Kontrollgruppe: Experiment 1: 1499,33 OC, Experiment 2: 1626,33 OC, Experiment 3: 3100,33 OC).....69
Abbildung 35: Effekt der Beschichtung mit 5 % Gelatine p.a./Pektin auf Ausbildung von Aktinringen 70
Abbildung 36: zwei Mäuse-Osteoklasten auf Beschichtung mit **Gelatine p.a./Pektin**; deutlich sichtbar ist ein vollständig ausgeprägter Aktinring beim kleineren und ein teilweise ausgeprägter Aktinring beim größeren Osteoklasten (Pfeile), durch DAPI angefärbte Zellkerne (blau), durch AlexaFluor® Phalloidin 546 gefärbtes Aktin (rot); 71
Abbildung 37: Übersicht über TRAP+ OC auf Gelatine-/Pektinbeschichtungen ohne TCP (Kontrollgruppe Mittelwerte OC-Anzahl: Experiment 1: 1499,33 OC, Experiment 2: 1626,33 OC, Experiment 3: 3100,33 OC) 73
Abbildung 38: Übersicht über TRAP+ OC auf Gelatine-TCP-Beschichtungen 77
Abbildung 39: Vergleich der Anzahl TRAP+ OC auf Beschichtungen mit und ohne TCP 80
Abbildung 40: Anzahl an OC, Aktinringen und % Aktinringe auf Gelatine-/Pektinbeschichtungen im direkten Vergleich 82

Abbildung 41: Mäuse-Osteoklasten auf Gelatine Typ A, 300 g Bloom-TCP-Beschichtung (Pfeil) 84
Abbildung 42: Mäuse-Osteoklast auf Gelatine Typ A, 90 – 110 g Bloom-TCP-Beschichtung (Pfeil) 85
Abbildung 43: Immunfluoreszenzmarkierung von Mäuse-Osteoklasten auf unbeschichtetem Deckglas (**Kontrolle**) 87
Abbildung 44: Immunfluoreszenzmarkierung von Mäuse-Osteoklasten auf Beschichtung mit **Gelatine p.a./Pektin**; 88
Abbildung 45: Immunfluoreszenzmarkierung von Mäuse-Osteoklast auf Beschichtung mit **Gelatine Typ A, 90 – 110 g Bloom**;.....89
Abbildung 46: Immunfluoreszenzfärbung von Mäuse-Osteoklasten auf Beschichtung mit **Gelatine p.a./Pektin** 90
Abbildung 47: Immunfluoreszenz von $\alpha_v\beta_3$ in humanen Osteoklasten (*rot*: $\alpha_v\beta_3$, *grün*: Aktin); ohne (A-C) und mit (D-F) Stimulation durch HGF (Faccio et al., 2002); 94
Abbildung 48: Mäuse-Osteoklast (*grün*: $\alpha_v\beta_3$, rot: Aktin); Immunfluoreszenz (A), Aktinfärbung (B), Overlay der beiden Färbungen (C).....94

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Reagenzien 30
Tabelle 2: Material 33
Tabelle 3: Geräte 33
Tabelle 4: Mittelwert der % an TRAP+ OC auf Gelatine-/Pektinbeschichtungen (n = 3), normiert auf Kontrolle 74
Tabelle 5: Absolutwerte TRAP+ OC auf Gelatine-/Pektinbeschichtungen (n = 3)..75
Tabelle 6: Übersicht über Anzahl an TRAP+ OC auf Gelatine-TCP-Beschichtungen (n = 3).....78
Tabelle 7: Übersicht über Anzahl an OC, Aktinringe und % Aktinringe auf Gelatine-/Pektinbeschichtungen (n = 3) 83

9 Lebenslauf

Name	Verena Kimla	
Schulbildung	09/1993 – 06/1996	Volksschule Plainfeld, Salzburg
	09/1996 – 06/1997	Volksschule Trumau, Niederösterreich
	09/1997 – 06/2001	Bundesgymnasium Rosasgasse, 1120 Wien
	09/2002 – 06/2006	HBLVA für chemische Industrie Rosensteingasse, Schwerpunkt Biochemie, Bio- und Gentechnologie, 1170 Wien
	10/2006 – 2/2007	Studium der Verfahrenstechnik, Technische Universität Wien
	03/2007 – 06/2013	Diplomstudium Pharmazie, Universität Wien