



universität
wien

DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„In-vitro-Charakterisierung neuer Polymer- und
Keramikmaterialien für Knochenersatzimplantate“

verfasst von / submitted by

Katharina Mechtler

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2017 / Vienna, 2017

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

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.

Die Arbeit wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch noch nicht veröffentlicht.

Wien, 2017

(Katharina Mechtler)

Danksagung

Die Entwicklung neuer Knochenersatzmaterialien ist ein sehr aktueller und spannender Forschungsbereich und ich möchte mich herzlich bei Herrn ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Oskar Hoffmann für die Gelegenheit bedanken, dieses Gebiet im Rahmen meiner Diplomarbeit näher kennenlernen zu dürfen. Bei den regelmäßigen Lab Meetings motivierte er uns Studenten, die Ergebnisse unserer Experimente zu hinterfragen und legte stets viel Wert auf eine gute Protokollführung. Auf diese Weise brachte er uns wesentliche Grundlagen des wissenschaftlichen Arbeitens näher.

Besonderer Dank gebührt Frau Mag. Carina Kamleitner, die mich tatkräftig bei der Planung und Umsetzung meiner Experimente unterstützte. Sie hatte jederzeit ein offenes Ohr für mich und dank ihrer hohen fachlichen und praktischen Kompetenz auch immer gute Ratschläge und Lösungsansätze parat.

Außerdem bin ich Frau Barbara Berger für die Einschulung in zahlreiche Arbeitstechniken rund um die Zellkultur sehr dankbar. Auch im weiteren Verlauf meiner Diplomarbeit war sie mir stets eine hilfreiche Ansprechpartnerin.

Dank schulde ich auch Herrn Peter Höflich, der mir vor allem durch seine große Hilfsbereitschaft das Arbeiten im Labor erleichterte.

Meinem Freund Christian möchte ich dafür danken, dass er mich immer wieder aufmuntert, wenn ich an etwas zweifle. Ein großes „Danke“ gebührt auch meiner Schwester Christina dafür, dass ich einfach immer auf sie zählen kann.

Vor allem aber danke ich meinen Eltern, die mir nicht nur mein Studium ermöglicht haben, sondern mich auch in allen anderen Situationen unermüdlich unterstützen.

Verwendete Abkürzungen

AgNO ₃	Silbernitrat
ALP	alkalische Phosphatase
ANOVA.....	Analysis of Variance
ARS.....	Alizarin Rot S
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
BMP.....	bone morphogenetic protein
Ca ²⁺	Calcium-Kation
CaCl ₂	Calciumchlorid
Cl ⁻	Chlorid
CO ₂	Kohlendioxid
DiFMUP	Difluoro-4-methylumbelliferylphosphat
EDTA.....	Ethylendiamintetraacetat
H.....	Heparin
HCO ₃ ⁻	Hydrogencarbonat
IL-6	Interleukin 6
K.....	Gruppe „Kulturmedium/ohne Disc“
KCl	Kaliumchlorid
Kd.....	Kontrollgruppe auf Deckglas
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
Kno.....	Knochen
Kp.....	Kontrollgruppe auf Plastik
LCM.....	Lactid-Caprolacton-Methacrylat

M-CSF Monozytenkolonien-stimulierender Faktor

Mg²⁺ Magnesium-Kation

MM Mineralisationsmedium; Gruppe „Mineralisationsmedium/ohne Disc“

MNGC multi-nucleated giant cell

Na₂HPO₄·2H₂O Natriumhydrogenphosphat Dihydrat

Na₂S₂O₃ Natriumthiosulfat

NaCl Natriumchlorid

NaOH Natriumhydroxid

NBT NitroBlue Tetrazolium

OB Osteoblast/Osteoblasten

OPG Osteoprotegerin

PBS Phosphatgepufferte Salzlösung

PGE₂ Prostaglandin E₂

RANKL receptor activator of NFκB-Ligand

RUNX2 Runt-related transcription factor 2

TCP Tricalciumphosphat

TiHA Titan-Hydroxyapatit

TNF-α Tumornekrosefaktor-alpha

TRAP tartratesistente saure Phosphatase

U Umdrehung

Wnt Wingless int

WST water soluble tetrazolium

α-MEM Minimal Essential Medium (MEM) Alpha Medium

β-GP β-Glycerophosphat

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung	3
Danksagung	5
Verwendete Abkürzungen.....	7
Inhaltsverzeichnis	9
Zielsetzung	12
1 Einleitung.....	13
1.1 Zelltypen im Knochen	13
1.1.1 Osteoblasten	13
1.1.2 Osteoklasten	14
1.1.3 Osteozyten	15
1.1.4 Saumzellen.....	15
1.1.5 Osteale Makrophagen	16
1.2 Knochenmodellierung und -remodellierung.....	16
1.2.1 Knochenmodellierung	16
1.2.2 Knochenremodellierung.....	16
1.3 Heilung von Knochenfrakturen.....	18
1.3.1 Vier-Phasen-Modell der Frakturheilung	18
1.3.1.1 Inflammation.....	18
1.3.1.2 Bildung eines weichen Kallus	18
1.3.1.3 Bildung eines harten, knöchernen Kallus.....	19
1.3.1.4 Knochenremodellierung.....	19
1.3.2 Anabolisch-katabolisches Modell der Frakturheilung	19
1.4 Knochenregeneration durch Bone Grafting.....	20
1.4.1 Natürliche Grafts.....	20
1.4.1.1 Autografts.....	20
1.4.1.2 Allografts	21
1.4.1.3 Xenografts.....	21
1.4.1.4 Demineralisierte Knochenmatrix.....	21
1.4.2 Biomaterialien.....	21
1.4.2.1 Erforderliche Eigenschaften von Biomaterialien.....	22
1.4.2.2 Arten von Materialien sowie deren Vor- und Nachteile	22
1.4.2.3 Tissue Engineering und Smarte Biomaterialien	24
1.4.2.4 Blick in die Zukunft: Bioprinting.....	25
1.4.3 Frakturheilung nach Implantation eines Biomaterials	26
2 Material und Methoden	28
2.1 Herstellung von Biomaterialien, Reagenzien und Nährmedien	31
2.1.1 Lactid-Caprolacton-Methacrylat-Discs (LCM-Discs).....	31

2.1.2	Titan-Hydroxyapatit-Discs (TiHA-Discs)	31
2.1.3	Bovine Knochenplättchen.....	32
2.1.4	Kulturmedium für Osteoblasten	32
2.1.5	Mineralisationsmedium.....	32
2.1.6	Kokulturmedium	32
2.1.7	Ascorbinsäure-Stammlösung (100x)	32
2.1.8	β -Glycerophosphat-Stammlösung (100x)	33
2.1.9	Phosphatgepufferte Salzlösung ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$	33
2.1.10	Phosphatgepufferte Salzlösung mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$	33
2.1.11	Milli-Q-Wasser.....	33
2.1.12	Formaldehydlösung, 3,7%.....	33
2.1.13	ALP-Waschpuffer	33
2.1.14	CyQUANT®-Lysispuffer, 1x.....	33
2.1.15	ALP-Puffer	34
2.1.16	DiFMUP-Lösung, 200 μM	34
2.1.17	CyQUANT®-Dye, 4x	34
2.1.18	Alizarin-Rot-S-Lösung (ARS-Lösung), 40 mM, pH 4,2.....	34
2.1.19	Cetylpyridiniumchloridlösung, 10%, in Phosphatpuffer	34
2.1.20	Phosphatpuffer, 10 mM, pH 7.....	34
2.1.21	Silbernitratlösung, 5%	35
2.1.22	Natriumthiosulfatlösung, 5%.....	35
2.1.23	TRAP-Puffer.....	35
2.1.24	TRAP-Färbelösung.....	35
2.1.25	TRAP-Substratlösung.....	35
2.1.26	TRAP-Standardlösung	35
2.1.27	Citratpuffer, 0,09 M, pH 4,8	35
2.1.28	TRAP-Stopplösung.....	36
2.1.29	Trypsin-EDTA-Lösung (1x).....	36
2.2	Methoden	36
2.2.1	Experimente mit primären Maus-Osteoblasten.....	36
2.2.1.1	Design der Experimente, Zellkultur (LCM-Discs).....	36
2.2.1.2	Design der Experimente, Zellkultur (TiHA-Discs).....	37
2.2.1.3	PrestoBlue®-Assay	38
2.2.1.4	WST-1-Assay.....	38
2.2.1.5	ALP-Färbung.....	39
2.2.1.6	ALP-Aktivitätsbestimmung aus dem Lysat, CyQUANT®-Assay..	39
2.2.1.7	Alizarin-Rot-S-Färbung (ARS-Färbung).....	40
2.2.1.8	Von-Kossa-Färbung	41

2.2.2	Kokultur von Maus-Osteoblasten und Maus-Osteoklasten.....	41
2.2.2.1	Design der Experimente, Zellkultur	41
2.2.2.2	TRAP-Färbung	43
2.2.2.3	Messung der TRAP-Aktivität.....	43
2.2.3	Optimieren der Zellaussaat auf TiHA-Discs	44
2.2.3.1	Welche Vorbehandlung der Discs ist am besten?.....	44
2.2.3.2	Wann hat sich eine konfluente Osteoblastenschicht gebildet?....	45
2.2.4	Statistische Auswertung	45
3	Resultate	46
3.1	In-vitro-Charakterisierung der LCM-Discs	46
3.1.1	Viabilität primärer Maus-Osteoblasten auf LCM-Discs.....	46
3.1.2	Differenzierung von Osteoblasten auf LCM-Discs.....	47
3.1.2.1	Aktivität der alkalischen Phosphatase.....	47
3.1.2.2	Mineralisationsfähigkeit der Osteoblasten	49
3.1.3	Kokultur von Maus-Osteoblasten und Maus-Osteoklasten auf LCM-Discs	51
3.1.3.1	Untersuchung der Entstehung von reifen Osteoklasten	51
3.1.3.2	Untersuchung der TRAP-Aktivität	52
3.2	In-vitro-Charakterisierung der TiHA-Discs.....	52
3.2.1	Viabilität primärer Maus-Osteoblasten auf TiHA-Discs.....	53
3.2.2	Optimierung der Osteoblastenaussaat auf die Discs	53
3.2.3	Kokultur von Maus-Osteoblasten und Maus-Osteoklasten auf TiHA-Discs	55
3.2.3.1	Untersuchung der TRAP-Aktivität.....	55
3.2.3.2	Untersuchung der Entstehung von reifen Osteoklasten	56
4	Diskussion und Conclusio.....	57
4.1	In-vitro-Charakterisierung der LCM-Discs	57
4.2	In-vitro-Charakterisierung der TiHA-Discs.....	61
5	Zusammenfassung	65
6	Abstract	66
7	Literaturverzeichnis.....	67
8	Abbildungsverzeichnis	72
9	Tabellenverzeichnis	74
10	Formelverzeichnis	74

Zielsetzung

Da die Transplantation von Eigen- oder Spenderknochen bei einer gravierenden Knochenverletzung zwar die Heilung beschleunigt, aber Nachteile wie eingeschränkte Verfügbarkeit und die Möglichkeit einer Krankheitsübertragung mit sich bringt, wird derzeit intensiv an Knochenersatzmaterialien geforscht. Diese Materialien müssen biokompatibel sein und im Idealfall sowohl das Anheften und die Differenzierung von Knochenzellen fördern als auch eine Art „Vorlage“ für neugeformte Knochenmatrix darstellen. Um die Tauglichkeit eines Materials als Knochenersatz zu überprüfen, werden meist zunächst In-vitro-Versuche in Zellkultursystemen unternommen.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit sollen mehrere Arten von Lactid-Caprolacton-Methacrylat-Discs und Titan-Hydroxyapatit-Discs durch In-vitro-Experimente charakterisiert werden. Hierzu soll der Einfluss der einzelnen Discs auf die Proliferation von primären Maus-Osteoblasten untersucht, sowie die Auswirkungen der Materialien auf die Differenzierungs- und Mineralsationsfähigkeit dieses Zelltyps beobachtet werden. Weiters sollen die Discs auch in einem Maus-Osteoblasten-Osteoklasten-Kokultursystem getestet werden, um festzustellen, inwiefern die Materialien das Entstehen von Osteoklasten beeinflussen.

So soll abgeschätzt werden, ob die Materialien geeignete Kandidaten für die Produktion von Scaffolds für als Knochenersatz dienende Biomaterialien darstellen könnten oder einer Verbesserung bedürfen.

1 Einleitung

Knochenfrakturen sind zumeist die Folge von Stürzen, Verkehrs- oder Sportunfällen. Krankheiten wie Osteoporose können das Risiko für eine Knochenverletzung zusätzlich erhöhen (Bigham-Sadegh und Oryan, 2015). Prinzipiell ist das Knochengewebe dazu befähigt, nach einer Fraktur von selbst auszuheilen. Wenn die Fraktur eine gewisse Größe überschreitet, ist dies nicht mehr möglich und es muss ein chirurgischer Eingriff erfolgen. Den Goldstandard stellt immer noch die Transplantation von Eigenknochen dar. Diese Methode hat jedoch auch einige Limitierungen, was die Entwicklung von Knochenersatzmaterialien nötig macht (Matassi et al., 2011). Um die Heilungschancen für die Patienten und Patientinnen zu verbessern, ist eine genaue Kenntnis der Funktionsweise des Knochengewebes und der Mechanismen der Knochenheilung nötig.

1.1 Zelltypen im Knochen

Wichtige Zelltypen im Knochengewebe sind Osteoblasten, Osteoklasten, Osteozyten, Saumzellen und osteale Makrophagen.

1.1.1 Osteoblasten

Die Vorläufer der Osteoblasten sind die mesenchymalen Stammzellen (Niedzwiedzki und Filipowska, 2015). Diese können sich auch zu Chondrozyten, Muskelzellen und Adipozyten ausdifferenzieren, wichtige Transkriptionsfaktoren während der Differenzierung zu Osteoblasten sind RUNX2 und Osterix. Reife Osteoblasten bilden Proteine der Knochenmatrix und setzen diese frei (Bellido et al., 2014). Den größten Anteil an diesen Proteinen macht Kollagen Typ I aus. Nach der Translation durch die Ribosomen wird dieses Protein im Endoplasmatischen Reticulum an den Aminosäuren Prolin und Lysin durch Hydroxylasen hydroxyliert, wofür unter anderem Ascorbinsäure nötig ist. Anschließend erfolgt die Bildung von Kollagen-Tripelhelices, die aus der Zelle ausgeschleust und danach vernetzt werden (Trackman, 2005). Neben Kollagen besteht die Proteinmatrix des Knochens unter anderem aus Osteopontin, Osteocalcin, Osteonektin, Proteoglykanen wie Heparinsulfat und Glykoproteinen wie Fibronectin. Die so gebildete Knochenmatrix wird danach von Osteoblasten durch die Einlagerung von Calciumcarbonat und Calciumphosphat mineralisiert (Burr und Akkus, 2014). Danach können aus den Osteoblasten die unten beschriebenen Osteozyten oder Saumzellen entstehen, oder der programmierte Zelltod wird eingeleitet.

Marker für reife Osteoblasten sind die alkalische Phosphatase (ALP), sowie die Mineralisationsfähigkeit der Zellen. Osteoblasten spielen eine entscheidende regulatorische Rolle im Knochenstoffwechsel, sie bilden das osteoklastenstimulierende Zytokin RANKL (receptor activator of NF κ B-Ligand), sowie Osteoprotegerin (OPG), das die Osteoklastogenese hemmt (Bellido et al., 2014).

1.1.2 Osteoklasten

Osteoklasten entstehen aus hämatopoietischen Stammzellen, sind also verwandt mit Monozyten und Makrophagen (Niedzwiedzki und Filipowska, 2015). Die Ausdifferenzierung erfolgt unter Einwirkung von M-CSF (macrophage colony stimulating factor) und RANKL, die besonders von Osteoblasten produziert werden (Takeyama et al., 2014). Auch Osteozyten stellen eine wichtige Quelle für M-CSF und RANKL dar (Bellido et al., 2014), sie produzieren zudem das Protein Sclerostin, das die Aktivität der Osteoblasten hemmt (Niedzwiedzki und Filipowska, 2015).

Zunächst ist M-CSF vor allem für die Entstehung von Präosteoklasten verantwortlich, die dann unter RANKL-Einwirkung zu mehrkernigen Osteoklasten fusionieren. Von einem reifen Osteoklasten spricht man, wenn die Zelle das Enzym TRAP (tartratresistente saure Phosphatase) exprimiert und mindestens drei Zellkerne besitzt. Wesentliche Aufgabe der Osteoklasten ist es, bestehende Knochenmatrix abzubauen (oft als Knochenresorption bezeichnet). Durch eine Umorganisation des Zytoskeletts können Osteoklasten den sogenannten Bürstensaum bilden (Abb. 1). Zwischen diesem und der Knochenoberfläche entsteht eine Resorptionslakune, die durch Ringe aus Aktin begrenzt und dicht abgeschlossen wird. Es erfolgt eine Ansäuerung der Lakune durch Protonenpumpen (H⁺/ATPase), die sich in der Zellmembran befinden. Die Protonen werden intrazellulär durch das Enzym Carboanhydrase gebildet. Zum Ladungsausgleich werden auch Cl⁻ Ionen in die Lakune transportiert, die zuvor über einen HCO₃⁻/Cl⁻ Antiporter in die Zelle gelangt sind. Durch die somit in der Lakune befindliche HCl wird der Hydroxyapatitanteil aus der Knochenmatrix herausgelöst, zurück bleiben die Matrixproteine, die danach durch vom Osteoklasten in die Lakune freigesetzte Enzyme (z.B. Cathepsin K) verdaut werden. Nach vollendeter Resorption erfolgt die Apoptose des Osteoklasten. Auf diese Weise tragen Osteoklasten zur Knochenremodellierung bei (Bellido et al., 2014).

Allerdings hat sich herausgestellt, dass Osteoklasten auch osteoanabole, die Differenzierung von Osteoblasten fördernde Faktoren freisetzen, wie etwa knochenmorphogenetische Proteine, die auch als bone morphogenetic proteins oder

BMPs bezeichnet werden (McCullough et al., 2007), Sphingosin-1-Phosphat und Wnt10b (Pederson et al., 2008). Somit sind sie auch an der Heilung von Frakturen, zum Beispiel nach der Implantation eines Biomaterials, beteiligt, wie in Kapitel 1.4.3 näher erläutert wird.

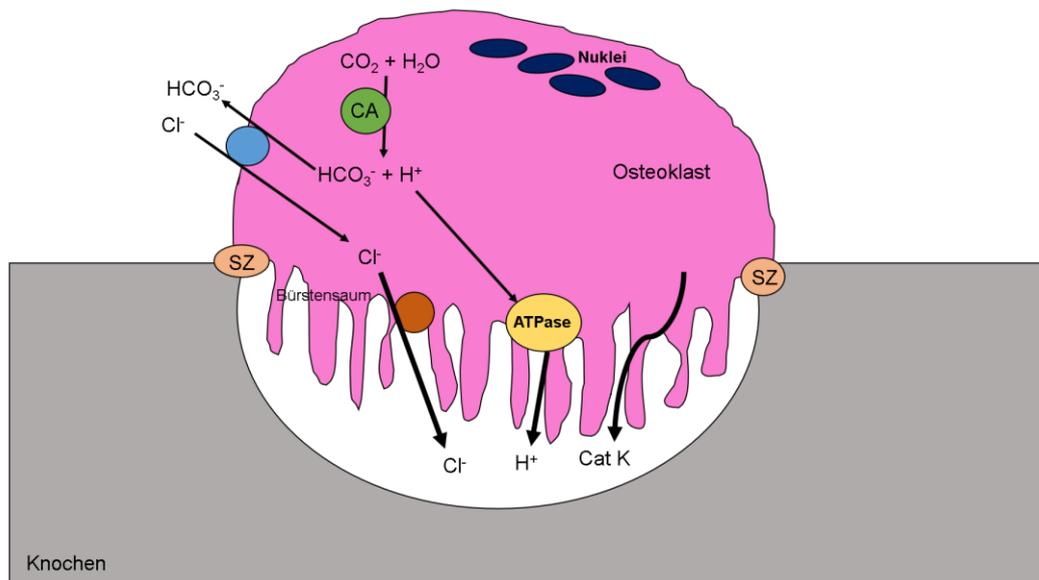


Abb. 1: Schematische Darstellung der Osteoklastenmorphologie und -funktion nach Bellido et al., 2014. Erklärung im Text. *Abkürzungen:* CA = Carboanhydrase, Cat K = Cathepsin K, SZ = sealing zone.

1.1.3 Osteozyten

Osteozyten sind Osteoblasten, die nach ihrer osteoanabolen Tätigkeit in der mineralisierten Knochenmatrix eingebettet bleiben und eine sternförmige Morphologie aufweisen (Bellido et al., 2014). Sie haben regulatorische Funktionen, antworten auf mechanische Reize und kontrollieren Knochenresorption und Knochenneubildung, indem sie Osteoblasten und Osteoklasten auf molekularer Ebene steuern. So können sie etwa auf Osteoklasten via RANKL und OPG einwirken und Sclerostin bilden, einen Inhibitor der Osteoblastenaktivität (Niedzwiedzki und Filipowska, 2015).

1.1.4 Saumzellen

Manche Osteoblasten wandeln sich nach Erfüllung ihrer Aufgabe der Mineralisation in abgeflachte Saumzellen um, die die Knochenoberfläche bedecken. Möglicherweise übernehmen sie Aufgaben in der Knochenremodellierung (Bellido et al., 2014). Sie müssen etwa die von ihnen bedeckte Knochenfläche erst freigeben, um den Osteoklasten darauf Zugriff zu verschaffen (Allen und Burr, 2014).

1.1.5 Osteale Makrophagen

Osteale Makrophagen wurden lange Zeit kaum untersucht, mittlerweile ist aber klargeworden, dass sie eine wichtige Rolle bei Knochenremodellierung und Heilung, auch im Zusammenhang mit Biomaterialien, spielen. Die genauen Aufgaben, die die ostealen Makrophagen dabei einnehmen, sind aber noch nicht restlos geklärt. In Knock-out-Tiermodellen wurde festgestellt, dass eine Depletion der ostealen Makrophagen zu reduzierter endochondraler und intramembranöser Knochenbildung führt. Im Falle einer Biomaterial-Implantation verliert das Material seine osteoinduktiven Eigenschaften (Miron und Bosshardt, 2016).

1.2 Knochenmodellierung und -remodellierung

1.2.1 Knochenmodellierung

Als Knochenmodellierung bezeichnet man entweder den Aufbau von Knochenmatrix durch Osteoblasten oder den Abbau der Matrix durch Osteoklasten. Im Gegensatz dazu arbeiten bei der Knochenremodellierung Osteoblasten und Osteoklasten gleichzeitig und gekoppelt an derselben Stelle. Modellierung dient etwa dazu, Knochenmasse an stark beanspruchten Stellen auf- und an weniger beanspruchten Stellen abzubauen. Vor allem während des Wachstums muss der Knochen ständig modelliert werden (Allen und Burr, 2014).

Auch osteale Makrophagen sind wahrscheinlich an der Modellierung beteiligt, ihre Rolle wird heute allerdings noch nicht genau verstanden, womöglich regulieren sie die Aktivität von Osteoblasten und Osteoklasten. In Knock-out-Tierversuchen konnte festgestellt werden, dass ohne diese spezifisch wirkenden Makrophagen das aufbauende Modellieren durch Osteoblasten drastisch reduziert wird (Miron und Bosshardt, 2016).

1.2.2 Knochenremodellierung

Im Rahmen der Knochenremodellierung wird Knochenmasse von Osteoklasten ab- und danach sofort von Osteoblasten neu aufgebaut. Auf diese Weise wird der Knochen ständig erneuert und Mikrotraumen werden ausgebessert. Wird das Kommunikationsnetz eines Osteozyten durch ein Mikrotrauma zerstört, so produziert dieser vor seiner Apoptose RANKL, der die Ausdifferenzierung von Osteoklasten fördert. Auf diese Weise könnten Osteozyten die Knochenremodellierung einleiten (Allen und Burr, 2014). Auch M-CSF wird von Osteozyten gebildet, via Sekretion von OPG sind sie auch zur Inhibition der Osteoklastenaktivität fähig. Weiters können Osteozyten Osteoblasten durch PGE₂-Sekretion stimulieren und durch Sclerostin

hemmen. Osteoblasten kommunizieren mit Osteoklasten mittels RANKL (Niedzwiedzki und Filipowska, 2015). Die Interaktionen der Knochenzellen bei der Knochenremodellierung sind in Abb. 2 schematisch dargestellt.

Osteale Makrophagen dürften auch im Rahmen des Remodellierens regulatorische Aufgaben übernehmen, etwa in der Aktivierung von Osteoblasten. Hierzu ist jedoch noch weitere Forschung nötig. Möglich ist auch, dass osteale Makrophagen in Apoptose befindliche Osteozyten und Mikrotraumen erkennen und mittels Osteoklastenaktivierung die Remodellierung fördern (Miron und Bosshardt, 2016).

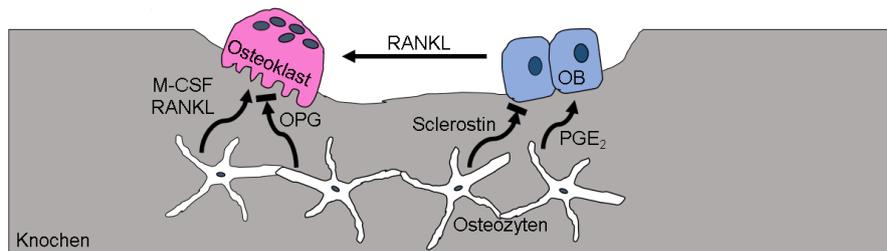


Abb. 2: Interaktion von Osteozyten, Osteoblasten und Osteoklasten während der Knochenremodellierung, nach Niedzwiedzki & Filipowska, 2015. Erklärungen im Text. *Abkürzungen:* M-CSF = Monozytenkolonien-stimulierender Faktor, RANKL = receptor activator of NFκB-Ligand, OPG = Osteoprotegerin, OB = Osteoblast, PGE₂ = Prostaglandin E₂.

Im Körper laufen gleichzeitig tausende von Remodellierungsprozessen ab. Ein Remodellierungsprozess kann in mehrere Abschnitte eingeteilt werden (Abb. 3): Im Rahmen der **Aktivierung** erfolgt die Rekrutierung von Osteoklastenvorläufern und deren Ausdifferenzierung zu reifen Osteoklasten. Es folgt die **Resorption**: Die Saumzellen weichen zurück, die Osteoklasten können sich an die Matrix anheften und diese abbauen. Danach kommt es genau dort zur **Umkehrung**, wo der Abbau durch die Osteoklasten endet und Osteoblasten mit dem Wiederaufbau der Knochenmatrix beginnen. Die regulatorischen Mechanismen hierzu sind noch nicht ganz geklärt. In der **Aufbauphase** bilden Osteoblasten eine Proteinmatrix und beginnen mit der Mineralisation. Manche gehen danach in die Apoptose, andere werden zu Osteozyten oder zu Saumzellen. Zu Beginn der **Ruhephase** ist die erneuerte Knochenmasse schließlich von Saumzellen umgeben. Die Mineralisation der Matrix wird im Laufe der Zeit noch fortgesetzt (Allen und Burr, 2014).

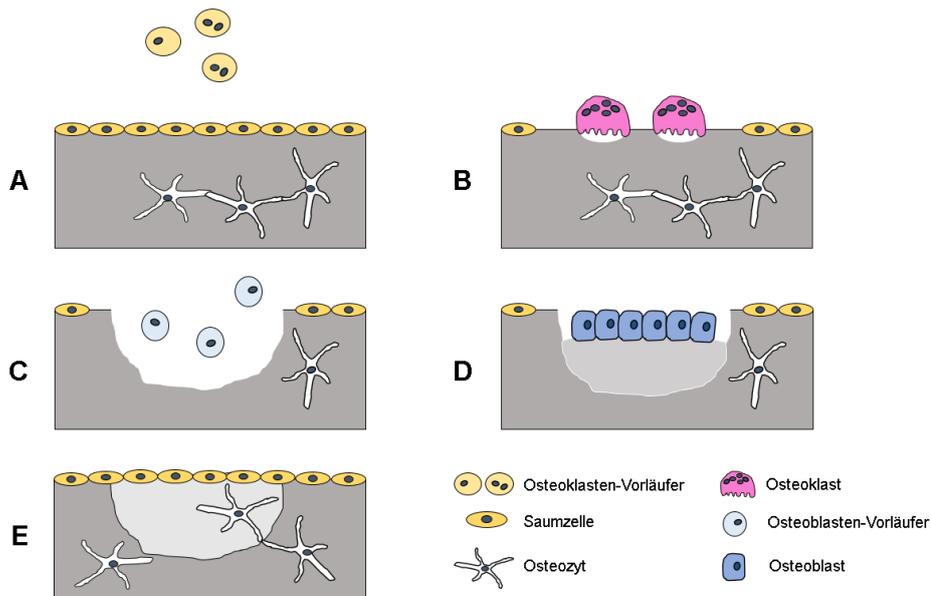


Abb. 3: Abschnitte des Prozesses der Knochenremodellierung.
A: Aktivierung, **B:** Resorption, **C:** Umkehrung, **D:** Aufbauphase, **E:** Ruhephase; nach Allen & Burr, 2014.
 Erklärungen im Text.

1.3 Heilung von Knochenfrakturen

1.3.1 Vier-Phasen-Modell der Frakturheilung

Klassischerweise wird die Frakturheilung in vier Phasen unterteilt: Inflammation, Bildung eines weichen Kallus, Bildung eines harten Kallus und Remodellierung (Schindeler et al., 2008).

1.3.1.1 Inflammation

Durch eine Fraktur wird nicht nur der Knochen, sondern auch das umliegende Gewebe beeinträchtigt, daher werden unspezifische Wundheilungsvorgänge aktiviert. Durch die bei der Fraktur entstandene Blutung entsteht ein Hämatom, das von Immunzellen infiltriert wird, die diverse Zytokine und Wachstumsfaktoren ausschütten (Schindeler et al., 2008). Diese können mesenchymale Vorläuferzellen rekrutieren und die Angiogenese fördern (Bigham-Sadegh und Oryan, 2015). Später wachsen Kapillaren ein und aus dem Hämatom entsteht Granulationsgewebe (Schindeler et al., 2008), wodurch ein leichter Gewinn an mechanischer Stabilität erzielt wird. Zu diesem Zeitpunkt gehen Schmerzen und Schwellung etwas zurück (Bigham-Sadegh und Oryan, 2015).

1.3.1.2 Bildung eines weichen Kallus

Bei den meisten Frakturen erfolgt die Heilung durch endochondrale Ossifikation. Hierbei differenzieren die mesenchymalen Stammzellen zunächst zu Chondrozyten aus, die große Mengen an Proteinen der extrazellulären Matrix bilden können,

beispielsweise Kollagen Typ II. Die Chondrozyten bilden den halbfesten „weichen“ Kallus, der eine Vorlage für den später entstehenden „harten“ Kallus darstellt. Der weiche Kallus wird von den Chondrozyten mineralisiert (Schindeler et al., 2008).

1.3.1.3 Bildung eines harten, knöchernen Kallus

Dieser Schritt wird auch „primäre Knochenbildung“ genannt. Durch hohe Osteoblastenaktivität erfolgt die Bildung einer mineralisierten Knochenmatrix auf Grundlage des weichen Kallus. Dieser harte Kallus ist noch unregelmäßig und wird auch als „Geflechtknochen“ bezeichnet.

Bei der intramembranösen Ossifikation differenzieren mesenchymale Stammzellen nicht wie bei der endochondralen Ossifikation zuerst zu Chondrozyten, sondern gleich zu Osteoblasten aus. Es kann hier somit ohne Aufbau eines weichen Kallus Geflechtknochen gebildet werden (Schindeler et al., 2008). Sowohl endochondrale als auch intramembranöse Knochenbildung spielen in der Embryonalentwicklung eine wichtige Rolle (Allen und Burr, 2014).

Nach Beendigung dieser Phase ist die Festigkeit und Steifheit des Knochens wieder provisorisch hergestellt (Bigham-Sadegh und Oryan, 2015).

1.3.1.4 Knochenremodellierung

Durch Remodellierung entsteht aus dem hartem Kallus oder Geflechtknochen kortikaler und/oder trabekulärer Knochen (Schindeler et al., 2008). Die Mechanismen hierzu wurden bereits in Kapitel 1.2.2 erläutert. Diese vierte Phase der Heilung kann bis zu 6-9 Jahre dauern (Bigham-Sadegh und Oryan, 2015).

1.3.2 Anabolisch-katabolisches Modell der Frakturheilung

Das anabolisch-katabolische Modell entspricht eher der Realität als das Vier-Phasen-Modell, denn die vier Phasen überlappen einander wesentlich, finden also durchaus zeitgleich statt. Nach der anabolisch-katabolischen Theorie wird das Ergebnis der Heilung als Gleichgewicht von anabolen und katabolen Prozessen dargestellt. Die kurz nach der Fraktur rekrutierten Zellen dienen der allgemeinen Abwehr von Gewebsverletzungen. Sie betreiben also den unspezifischen Anabolismus bzw. Katabolismus – den Auf- und Abbau des weichen Kallus. Im Rahmen der Bildung des Geflechtknochens und der Remodellierung findet dann der spezifische Anabolismus bzw. Katabolismus durch Osteoblasten und Osteoklasten statt (Schindeler et al., 2008). In Abb. 4 werden das Vier-Phasen-Modell und das anabolisch-katabolische Modell einander gegenübergestellt.

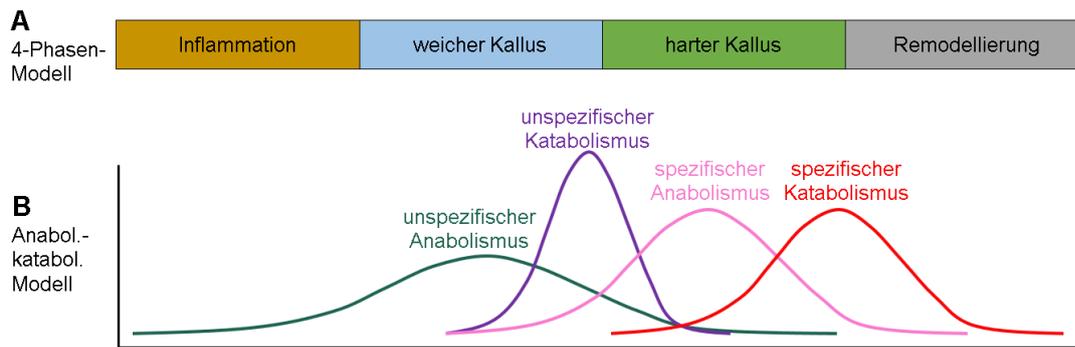


Abb. 4: Modelle zur Heilung von Knochenfrakturen; **A:** Vier-Phasen-Modell, **B:** Anabolisch-katabolisches Modell; nach Schindeler et al., 2008. Erklärungen im Text.

Möglicherweise gibt es zwei Arten von Osteoklasten, die bei der Frakturheilung eine Rolle spielen: Die ersten werden kurz nach der Bildung des weichen Kallus gebildet und tragen zu dessen Abbau bei, die anderen entstehen nach der Bildung des harten knöchernen Kallus und kommen bei der Remodellierung zum Einsatz (Takeyama et al., 2014).

Das Immunsystem spielt in der Frakturheilung wohl eine wichtige Rolle, denn auf jede Knochenverletzung folgt stets eine Entzündungsreaktion. In Experimenten mit immunodefizienten Mäusen wurde eine verzögerte endochondrale Ossifikation festgestellt. Findet eine übermäßig starke oder lang andauernde Inflammation statt, wird die Frakturheilung gestört (Rapp et al., 2016).

1.4 Knochenregeneration durch Bone Grafting

Nimmt der Knochendefekt eine gewisse Größe an, kann der Körper ihn nicht mehr selber heilen. Man spricht dann von einem Knochendefekt kritischer Größe (Kim et al., 2016). Die Heilung einer solchen Verletzung zu verbessern ist das Ziel der Knochenregeneration mittels Bone Grafting. Hierbei gibt es mehrere Strategien – zum einen natürliche Grafts wie Autografts, Allografts, Xenografts und demineralisierte Knochenmatrix, zum anderen Biomaterialien, die auf biologischen oder synthetischen Substanzen basieren (Bigham-Sadegh und Oryan, 2015).

1.4.1 Natürliche Grafts

1.4.1.1 Autografts

Nach wie vor ist der Goldstandard das autologe Bone Grafting, also die Transplantation von körpereigenem kortikalen oder trabekulären Knochen (Gomez-Barrena et al., 2015). Der große Vorteil daran ist, dass die drei Grundvoraussetzungen für Knochenbildung gegeben sind: osteogene

Vorläuferzellen, osteoinduktive Wachstumsfaktoren und eine osteoinduktive Matrix (Schieker et al., 2006). Allerdings sind die autologen Transplantate natürlich in ihrer Menge limitiert und es muss ein zweiter operativer Eingriff stattfinden, der dem Patienten bzw. der Patientin Schmerzen bereitet (Bigham-Sadegh und Oryan, 2015) und zu erhöhter Morbidität an der Entnahmestelle führt (Morelli et al., 2015).

1.4.1.2 Allografts

Bei der Knochenregeneration mit einem Allograft wird der zu behandelnden Person ein Transplantat aus Spenderknochen eingesetzt. Vorteilhaft an dieser Methode sind die guten osteokonduktiven Eigenschaften des Materials, allerdings kann es zur Übertragung von Krankheiten und zu einer Abwehrreaktion des Körpers gegen das fremde Transplantat kommen. Zudem sind Sterilisationsschritte und sorgfältige Konservierung nötig (Bigham-Sadegh und Oryan, 2015).

1.4.1.3 Xenografts

Im Falle von Xenografts stammt das Transplantat von einer anderen Spezies. Knochenmaterial von Rindern oder Pferden wurde bereits Menschen eingesetzt, hierbei muss jedoch die höhere Antigenität im Vergleich zu Allografts beachtet werden (Sonmez et al., 2017).

1.4.1.4 Demineralisierte Knochenmatrix

In demineralisierter Knochenmatrix sind nach wie vor osteoinduktive Faktoren vorhanden. Immunologisch aktive Faktoren werden bei der Herstellung extrahiert, daher ist keine Übertragung von Krankheiten möglich (Schieker et al., 2006).

1.4.2 Biomaterialien

Aufgrund der oben beschriebenen Einschränkungen der natürlichen Transplantate ist es notwendig, andere Materialien zu finden, die an ihrer Stelle in Knochendefekte kritischer Größe eingesetzt werden können. Daran wird seit einiger Zeit intensiv geforscht. Drei Grundvoraussetzungen für die Generation von Knochengewebe sind, wie bereits erwähnt, osteogene Vorläuferzellen, osteoinduktive Wachstumsfaktoren und eine osteokonduktive Matrix (Schieker et al., 2006). Während es bei Biomaterialien alleine vor allem darum geht, eine osteokonduktive Matrix zu bilden, werden beim Tissue Engineering (Kapitel 1.4.2.3.1) osteogene Vorläuferzellen und bei Smarten Biomaterialien (Kapitel 1.4.2.3.2) osteoinduktive Wachstumsfaktoren hinzugefügt.

Ein in einen Knochendefekt eingesetztes Biomaterial bildet eine temporäre Matrix für die Knochenneubildung und soll geeignete Bedingungen für die Entwicklung von

Knochengewebe liefern. Die Biomaterialien sollen die dreidimensionale Struktur des Knochens nachahmen. Außerdem können diese Matrizen (auch „Scaffolds“ genannt) zur Freisetzung von Arzneistoffen wie Antibiotika, Chemotherapeutika oder Wachstumsfaktoren verwendet werden (Matassi et al., 2011).

1.4.2.1 Erforderliche Eigenschaften von Biomaterialien

Die Entwicklung eines geeigneten Biomaterials ist ein komplexer Prozess, denn das Material muss einige Voraussetzungen erfüllen. Um Probleme nach der Implantation zu vermeiden, muss es biokompatibel sein: Es darf weder toxisch noch immunogen sein und soll keine Entzündungen hervorrufen (Matassi et al., 2011). Weiters muss es, ausgenommen bei Metallscaffolds, biodegradabel sein, denn es soll im Endeffekt abgebaut und durch neu entstandenes Knochengewebe ersetzt werden (Schieker et al., 2006). Da Knochen eine wichtige Stützfunktion erfüllen, muss das Scaffold ausreichend mechanisch stabil sein. Das Anhaften von Zellen und deren Wachstum soll vom Biomaterial gefördert werden, die Funktion differenzierter Zellen darf nicht beeinträchtigt werden. Ausreichende Porosität ist notwendig, um genügend Oberfläche für das Anhaften der Zellen und für die Bildung der extrazellulären Matrix zur Verfügung zu stellen (Matassi et al., 2011). Mikroporen mit weniger als 10 µm Durchmesser werden für das Einwachsen von Kapillaren benötigt, Makroporen zwischen 150 und 900 µm für die Nährstoffversorgung und den Abtransport von Abfallprodukten der Zellen (Schieker et al., 2006). Auch die Steifheit des Materials kann einen Einfluss auf dessen heilungsfördernde Wirkung haben (Chen et al., 2016). Die dreidimensionalen Scaffolds sollten möglichst an die Größe und Form des Knochendefekts angepasst sein. Von Vorteil sind auch röntgenopake Eigenschaften, die ein Unterscheiden des Materials vom Knochen im Rahmen einer Röntgenuntersuchung möglich machen (Schieker et al., 2006).

1.4.2.2 Arten von Materialien sowie deren Vor- und Nachteile

Derzeit gibt es vier große Gruppen von Biomaterialien, die bei Knochendefekten zum Einsatz kommen: Polymere, Keramikmaterialien, Metalle und kombinierte Materialien.

1.4.2.2.1 Polymere

Die Polymere lassen sich in natürliche und synthetische Materialien einteilen.

1.4.2.2.1.1 Natürliche Polymere

Zu den natürlichen Polymeren zählen beispielsweise Kollagen Typ I, Fibrin, Hyaluronsäure und Chitosan. Sie sind sehr gut biokompatibel und osteokonduktiv, dafür aber mechanisch vergleichsweise instabil (Matassi et al., 2011).

1.4.2.2.1.2 Synthetische Polymere

Zu den synthetischen Polymeren zählen unter anderem Polyanhydride, Polypropylenfumarat, Polycaprolacton, Polylactide und Polyglycolide (Matassi et al., 2011). Auch Kopolymere aus mehreren Substanzen werden eingesetzt. Ein Vorteil der synthetischen Polymere ist die Tatsache, dass sie wenig spröde sind (Morelli et al., 2015). Die einzelnen Materialien haben unterschiedliche physikalische und mechanische Eigenschaften, sie werden verschieden schnell und auf verschiedene Weise abgebaut. So kann das Biomaterial an die jeweiligen Bedürfnisse angepasst werden. Polyanhydride werden beispielsweise durch Erosion an der Oberfläche abgebaut, was sie für die kontinuierliche Freisetzung eines Wirkstoffes geeignet macht (Matassi et al., 2011). Nachteilig ist, dass hohe lokale Konzentrationen von entstehenden sauren Abbauprodukten das Zellwachstum auf den Scaffolds in vitro hemmen und in vivo zu Entzündungen führen können (Schieker et al., 2006).

1.4.2.2.2 *Keramikmaterialien*

Keramikmaterialien werden aus anorganischen, nicht metallischen Substanzen hergestellt, die kristalline Struktur aufweisen können. Eine positive Eigenschaft ist ihre hohe Druckfestigkeit, aber sie besitzen nur niedrige Duktilität, brechen also leicht beim Versuch, sie plastisch zu verformen (Matassi et al., 2011). Außerdem können sich entstandene Risse rasch ausbreiten (Correia et al., 2014). Diese Tatsachen führen zu einem leichteren Zersplittern des Implantats. Eingesetzt werden Calciumsulfate, bioaktives Glas und vor allem Calciumphosphate (Matassi et al., 2011). Unter den Calciumphosphaten werden vor allem Hydroxyapatit (HA) und Tricalciumphosphat (TCP) verwendet (Schieker et al., 2006). Vorteil vor allem von Calciumphosphaten ist ihre hohe Ähnlichkeit zu den in der Knochenmatrix enthaltenen Mineralien. Keramikmaterialien können nach Implantation eine vergleichsweise starke Biomaterial-Knochen-Bindung aufbauen. Proteine können gut an Calciumsulfatkeramik binden, wodurch sich dieses Material zum Einbringen von Wachstumsfaktoren anbietet. Keramikmaterialien können entweder als vorgeformte, feste Matrizen implantiert, oder in injizierbarer Form verabreicht werden, die im Körper aushärtet (Matassi et al., 2011).

1.4.2.2.2.1 Vorgefertigte, feste Keramikmaterialien

Die festen Matrizen können als Block, Granulat oder Pulver vorliegen und weisen meist eine knochenähnliche Porenstruktur auf. Eingesetzt werden sie, wenn die Größe des Knochendefekts vor der Operation abschätzbar ist (Matassi et al., 2011). Ist allerdings ein minimalinvasiver Eingriff erwünscht, so sind diese Materialien weniger geeignet (Low et al., 2010).

1.4.2.2.2 Injizierbare Keramikmaterialien

Die injizierbaren Keramikmaterialien härten erst im Körper aus, ihr großer Vorteil ist, dass sie sich perfekt an die Form des Defekts anpassen können und dass die Injektion durch einen kleinen Hautschnitt und somit minimalinvasiv möglich ist (Matassi et al., 2011). Zu erwähnen sind hier einerseits die Calciumphosphat-Zemente, das sind Mischungen verschiedener Calciumphosphate, die zunächst in Pulverform vorliegen und mit Wasser versetzt werden. Dadurch entsteht eine Paste, die in den Defekt eingebracht wird und dort aushärtet (Low et al., 2010). Für diese Zemente spricht vor allem ihre gute Biokompatibilität, allerdings ist ihre Zugfestigkeit gering, wodurch ihr Einsatz auf Stellen beschränkt ist, die kaum Gewicht tragen müssen (Ambard und Mueninghoff, 2006). Außer den Zementen kommen auch Kombinationen aus Keramik und Polymeren in injizierbarer Form zum Einsatz (Low et al., 2010). Die Vorteile dieser Zusammensetzung werden in Kapitel 1.4.2.2.4 erläutert.

1.4.2.2.3 Metalle

Metallscaffolds sind gut biokompatibel, sehr korrosionsresistent und lange haltbar, bioabbaubar sind diese Materialien allerdings nicht. Sie werden etwa für das Überziehen von Prothesen verwendet. Bei Metallimplantaten liegt nur eine schwache Biomaterial-Knochen-Bindung vor, weil an der Oberfläche der Materialien Oxide gebildet werden. Titanimplantate sind steifer als die sie umgebende Knochenmatrix, was zu einer nachträglichen Lockerung des Implantats führen kann (Matassi et al., 2011). Metallscaffolds bestehen meist aus Titan oder porösem Tantal (Bobyne et al., 1999).

1.4.2.2.4 Kombinierte Biomaterialien

Um die Eigenschaften des Implantats zu optimieren, werden auch Kombinationen der bereits aufgezählten Materialien eingesetzt. Beispielsweise werden Keramikmaterialien durch Zusatz von Polymeren weniger spröde, die Polymere gewinnen durch Keramikzusatz an Bioaktivität (Matassi et al., 2011). Ein Coating aus Hydroxyapatit kann die Integration eines Tantalimplantats in das Knochengewebe verbessern (Paganias et al., 2012).

1.4.2.3 Tissue Engineering und Smarte Biomaterialien

Nach der Implantation eines Biomaterials müssen erst körpereigene Zellen rekrutiert und Wachstumsfaktoren gebildet werden, um die Heilung des Defekts zu ermöglichen. Neuere Ansätze versuchen, die Implantate bereits vor der Operation mit

Zellen (Tissue Engineering) oder Wachstumsfaktoren (Smarte Biomaterialien) auszustatten (Matassi et al., 2011).

1.4.2.3.1 Tissue Engineering

Beim Tissue Engineering werden der zu behandelnden Person Zellen, meist mesenchymale Stammzellen, entnommen. Diese müssen, um die erforderliche Zellzahl zu erhalten, ex vivo expandiert werden, danach werden sie auf das Biomaterial ausgesät. Anschließend wird das Material implantiert (Correia et al., 2014). Die im Biomaterial vorhandenen Zellen können nun einerseits selbst an der Entstehung von neuem Knochengewebe beteiligt sein, andererseits auch Wachstumsfaktoren abgeben, die andere Zellen dazu anregen, zum Ort der Fraktur zu migrieren und sich auszudifferenzieren (Jabbarzadeh et al., 2012). Präklinische Studien zeigen verbesserte Heilung gegenüber Biomaterialien ohne Zellen, allerdings gibt es bisher noch einige Limitationen, etwa die Frage, ob die mesenchymalen Stammzellen durch die Expansion ihre Eigenschaften zu stark verändern, sowie die zusätzlichen Risiken für die betroffene Person durch den zweiten operativen Eingriff und die vergleichsweise schwierige Sicherstellung eines sterilen Implantats (Matassi et al., 2011).

1.4.2.3.2 Smarte Biomaterialien

Smarte Biomaterialien sind Materialien ohne Zellen, die aber bioaktive Moleküle enthalten, die während des Abbaus des Materials im Körper kontinuierlich freigesetzt werden und die Regeneration des Knochengewebes fördern sollen. Klare Vorteile dieser Methode sind die bessere Sterilisierbarkeit der Materialien und deren Lagerungsfähigkeit und Haltbarkeit (Matassi et al., 2011). Beispiele für eingesetzte bioaktive Moleküle sind BMP-2 und BMP-7 (Correia et al., 2014).

1.4.2.4 Blick in die Zukunft: Bioprinting

Die Forschung am dreidimensionalen Bioprinting, einem neuen Ansatz im Bereich des Tissue Engineering, ist erst am Anfang, erste Erfolge in Tierversuchen wurden aber bereits verzeichnet (Kang et al., 2016). Der Knochendefekt wird zunächst mit einem bildgebenden Verfahren wie Magnetresonanztomographie oder Computertomographie untersucht, um die genaue Form des Defekts zu bestimmen (Zhang und Zhang, 2015). Mit einem 3D-Gewebe-Organ drucker wird das Implantat danach passgenau gedruckt, und zwar einerseits aus Polymeren, andererseits aus einem Hydrogel, das lebende Zellen beinhaltet (Kang et al., 2016).

1.4.3 Frakturheilung nach Implantation eines Biomaterials

Etwa 90 % der Forschung über die Fähigkeit von Biomaterialien, die Frakturheilung zu beschleunigen, beschäftigt sich mit Osteoblasten (Miron und Bosshardt, 2016). Dieser Ansatz wirkt naheliegend, weil dieser Zelltyp für den Aufbau einer Knochenmatrix und für deren Mineralisation zuständig ist. Andere Zelltypen, zum Beispiel Osteoklasten und Zellen des Immunsystems wie Makrophagen, wurden lange unterbewertet. Derzeit deuten die Forschungsergebnisse aber daraufhin, dass genau diese Zellen eine wesentliche Rolle nach der Implantation des Biomaterials spielen, sie sind auch die ersten Zellen, die mit dem Biomaterial in Berührung kommen (Miron und Bosshardt, 2016).

Proteine binden nach Implantation an das Biomaterial, Zellen können via Integrine an diese Proteine binden. Diese Bindung kann im Zellinneren Signalkaskaden auslösen (McNamara et al., 2010) und auf diese Weise könnten Zelldifferenzierung und Zellfunktion durch die Oberflächenbeschaffenheit mitbestimmt werden. Dies unterstreicht die Bedeutung der Topographie eines Materials für dessen Fähigkeit zur Förderung der Frakturheilung (Davison et al., 2015).

Monozyten heften sich möglicherweise rasch an das Biomaterial an und können durch Zytokine, die im Rahmen der gleichzeitig ablaufenden Inflammation freigesetzt werden, zur Ausdifferenzierung zu Makrophagen angeregt werden. Diese können anschließend, wieder durch Zytokineinwirkung, zu vielkernigen Riesenzellen (multi-nucleated giant cells, MNGCs) fusionieren. Welche Aufgabe die ostealen Makrophagen und MNGCs im weiteren Verlauf genau übernehmen, ist momentan Gegenstand der Forschung. Einerseits wurde postuliert, dass sie ähnliche Funktionen wie Osteoklasten haben, aber wesentliche Osteoklastenmarker wie TRAP oder RANK wurden an MNGCs nicht detektiert. MNGCs produzieren einige proinflammatorische Zytokine, wie IL-6 und TNF- α . Dennoch tragen sie nach derzeitigem Stand mehr zur Integration des Biomaterials als zu dessen Abstoßung bei. Nach dem Implantieren eines Biomaterials findet eine Akkumulation von Makrophagen statt, die eine Voraussetzung für Knochenneubildung ist, eventuell durch Kommunikation der Makrophagen mit Osteoblasten. Ungeklärt ist, wie lange sich diese Makrophagen und MNGCs am Biomaterial aufhalten (Miron und Bosshardt, 2016).

Man kann zwei verschiedene Typen von Makrophagen unterscheiden: M1 und M2. Während Makrophagen vom Typ M1 proinflammatorisch wirken, haben M2-Makrophagen antiinflammatorische, wundheilungsfördernde Eigenschaften (Miron

und Bosshardt, 2016). Bestimmte Eigenschaften eines Biomaterials, wie etwa die Oberflächenbeschaffenheit, beeinflussen die Differenzierung der Makrophagen zu den einzelnen Typen und somit deren Verhalten. Ein Ziel der derzeitigen Forschung ist es das Verhalten der Makrophagen gezielt zu modulieren, um die Knochenneubildung optimal fördern zu können. Hierzu müssen jedoch noch die zugrundeliegenden Mechanismen aufgeklärt werden (Graney et al., 2016).

Auch die Rolle von Osteoklasten in der Knochenneubildung ist noch nicht zur Gänze geklärt, Osteoklasten können jedoch, wie in Kapitel 1.1.2 beschrieben, osteoanabole Faktoren freisetzen und eine Depletion der Osteoklasten führt zum Ausbleiben von Knochenneubildung. Die Oberflächenbeschaffenheit eines Biomaterials beeinflusst die Differenzierungsfähigkeit von Osteoklasten (Davison et al., 2014).

2 Material und Methoden

Tabelle 1: verwendete Geräte

Name	Hersteller
Analysewaage, MC 210 P	Sartorius, Göttingen, Deutschland
CASY Zellzähler, Modell TT 150 µm	OLS OMNI Life Science, Bremen, Deutschland
Eismaschine, AF 103	Scotsman, Italien
ELISA-Reader, Multiskan MS	Labsystems, Finnland
Hochdruckdampfsterilisator, SX-300E	Tomy, Japan
Infinite 200 Pro Microplate Reader	Tecan, Schweiz
Inkubator, HERA cell 240	Heraeus, Deutschland
Isomet Low Speed Saw	Buehler, USA
Kamera ProgRes® Speed XTcore 5	Jenoptik, Deutschland
Keimarme Werkbank ET 130 KI.2	Ehret Reinraumtechnik, Deutschland
Kühl-/Gefrierkombi, Mediline LCexv 4010	Liebherr, Deutschland
Lichtmikroskop DIAPHOT 300	Nikon, Japan
Lichtmikroskop, H550S	Nikon TMS, Japan
Magnetrührer	Ikamag RCT, Janke & Kungel; MR 3001 K, Heidolph
Mikroliterpipetten	Eppendorf Research Pipetman, Gilson, Frankreich Finnpipette Digital ACL, Labsystems, Finnland
PC	HP, USA
pH-Meter, 713 pH Meter	Metrohm, Schweiz
Pinzetten	nicht bekannt
Pipetboy	IBS Integra Biosciences Pipetus, Hirschmann Laborgeräte
Pipettenspitzen	Greiner bio-one International, VWR International, Österreich
Scanner	SEIKO Epson Corporation, Japan
Schüttelwasserbad 1086	GFL, Deutschland
Schüttler Swip	Edmund Bühler, Deutschland
Tiefkühlschrank U535 Innova	New Brunswick, Eppendorf, Deutschland
Ultraschallbad, TRANSSONIC T 750	Elma, Deutschland
Vortex Genie 2	Bender & Hobein AG
Wasseraufbereitungsanlage Milli Q UF Plus	Merck Millipore, Deutschland
Zentrifugen	Sorvall RT7 Rotor RT-H250, Dupont Z 323 K, Hermle

Tabelle 2: verwendete Materialien

Material	Hersteller
24- und 96-Well Zellkulturplatten	Greiner bio-one International, Österreich
24-Well Suspensionskulturplatten	Greiner bio-one International, Österreich
96-Well Zellkulturplatte, schwarz	Greiner bio-one International, Österreich
96-Well Zellkulturplatte, schwarz, mit durchsichtigem Boden	Corning Incorporated, USA
Einmalkanülen, 27G	Henke Sass Wolf, Deutschland
Eterna Messpipetten Glas	Brand, Deutschland
Faltenfilter	Whatman, GE Healthcare, Großbritannien
Mikrotiterplatten, 96-Well	Greiner bio-one International, Österreich
Petrischalen (100 mm)	Greiner bio-one International, Österreich
Reaktionsgefäße, 1,5 ml	Eppendorf, Greiner bio-one International, Österreich
Skalpellklingen	Aesculap AG, Deutschland
Stanze, Hammer	nicht bekannt
Sterilfilter 0,22 µm	GE Walter & Process, USA
Transferpipetten	Greiner bio-one International, Österreich
Zellkultur-Deckgläser, 174950	Thermo Fisher Scientific, USA
Zentrifugenröhrchen	Cellstar Tubes, Greiner bio-one

Tabelle 3: verwendete Lösungen und Substanzen

Name	Hersteller	Referenz/Chargennummer
1,25-Dihydroxy-Vitamin D3	Hoffmann – La Roche, Basel, Schweiz	nicht bekannt
4-Nitrophenol Solution, 10 mM	Sigma-Aldrich	N76660, Lot. 108K6140
Aceton	Roth	CP40.3, Lot. 121164098
AgNO ₃	Sigma-Aldrich	S6506, Lot. MKBQ3322V
Alizarin Red S	Sigma-Aldrich	A5533, Lot. 030M1776
Ascorbinsäure	Merck	100468, Lot. 841F971227
CASYclean	Roche	05651786001, Lot. 10958300
CASYton	Roche	05651808001, Lot. 11689200
Cetylpyridiniumchlorid	Sigma-Aldrich	C9002, Lot. MKBQ9593V
Chloroform	Merck	2445, Lot. 9017087
Citronensäure	Sigma-Aldrich	C0759, Lot. SLBM0430V
CyQUANT® Cell Proliferation Assay Kit	Molecular Probes	C7026, Lot. 1698474
EDTA	Sigma-Aldrich	E-6758, Lot. 50K01315

Enzchek® Phosphatase Assay Kit	Molecular Probes	E12020, Lot. 1676476
Ethanol absolut, 99,9%	AustrAlco Handelsges.m.b.H	Lot. AAAH-5020-07025-010711
Fast Red Violet LB Salt	Sigma-Aldrich	F3381, Lot. MKBH6351V
Formaldehydlösung, 37%	Roth	CP10.1, Lot. 460163407
Formalinlösung, 10%, neutral gepuffert	Sigma-Aldrich	H T501128, Lot. SLBH1382V
Fötales Kälberserum (für Kokultur)	Gibco Life Technologies	10270-106, Lot. 41Q4297P
Fötales Kälberserum (für Osteoblasten)	Sigma-Aldrich	F7624, Lot. 084M3250
KCl	Affymetrix	20598, Lot. 70596
KH ₂ PO ₄	Merck	1.04873.1000, Lot. A531473438
MEM Alpha Medium	Gibco Life Technologies	1431514
N,N-Dimethylformamid	Sigma-Aldrich	D-4254, Lot. 67H0764
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	Merck	1.06580.1000, Lot. K33351980429
Na ₂ S ₂ O ₃	Sigma-Aldrich	217263, Lot. BCBK1826V
NaCl	Sigma-Aldrich	S-9625, Lot. 087K0182
Naphthol AS-MX Phosphat	Sigma-Aldrich	N4875, Lot. 061M5303V
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich	W302600, Lot. STBF1932V
Natriumhydroxid Plättchen	Merck	1.06498, Lot. B244798825
Nukleasefreies Wasser	Qiagen	129115
Phosphatase Substrate 40 mg Capsules	Sigma-Aldrich	P5744, Lot. 013K6015
PrestoBlue® Cell Viability Reagent	Invitrogen	A13261, Lot. 1632091A
Prostin	Upjohn	Prostin E2 5mg/0,5ml
SIGMAFAST® BCIP/NBT tablet	Sigma-Aldrich	B5655, Lot. SLBN0689V
Trypsin (1:250)	Gibco Life Technologies	27250-018, Lot.1038644
Tween 20	Sigma-Aldrich	P1379, Lot. 71K0085
WST-1 Reagens	Roche	Lot. 14310400
β-Glycerophosphat	Sigma-Aldrich	G5422, Lot. SLBL1201V

Tabelle 4: verwendete Tiere

Mäuse, Balb/c	Charles River Laboratories, Research Models and Services, Germany GmbH, 97633 Sulzfeld, Deutschland
---------------	---

2.1 Herstellung von Biomaterialien, Reagenzien und Nährmedien

2.1.1 Lactid-Caprolacton-Methacrylat-Discs (LCM-Discs)

Die Lactid-Caprolacton-Methacrylat-Discs (LCM-Discs) sind Polymerdiscs mit unterschiedlicher Zusammensetzung. Sie wurden im Rahmen des geförderten European Union Seventh Framework Programmes „InnovaBone“ hergestellt, um geeignete Kandidaten für die Herstellung von Scaffolds zu finden, die anschließend auch in vivo ausgetestet wurden.

Die Discs hatten einen Durchmesser von 5 mm und wurden mittels Photopolymerisation hergestellt. Die Zusammensetzung der verschiedenen Discs, genannt „LCM 3“, „LCM 3H“, „LCM 4“ und „LCM 6.1“, sowie deren Besonderheiten sind in Tabelle 5 aufgelistet.

	Verhältnis L:C	% M	Besonderheit
LCM 3	8:2	85	
LCM 3H	8:2	85	Heparin-Coating
LCM 4	9:1	90	
LCM 6.1	9:1	40	

Tabelle 5: Zusammensetzung und Besonderheiten der LCM-Discs.
Abkürzungen: L = Lactid, C = Caprolacton, M = Methacrylat, H = Heparin.

Die Sterilisation der Discs wurde durch Behandlung mit Gammastrahlung bei einer Energiedosis von 22,5-27,5 Gy durchgeführt (Mediscan GmbH, 4550 Kremsmünster, Österreich).

2.1.2 Titan-Hydroxyapatit-Discs (TiHA-Discs)

Die Titan-Hydroxyapatit-Discs wurden vom Team unseres Kooperationspartners Dr. Michele Iafisco, (Laboratory of Bioceramics and Biohybrid Composites, CNR – Institute of Science and Technology for Ceramics, 48018 Faenza, Italien) produziert und zur Testung zur Verfügung gestellt. Sie bestehen aus Hydroxyapatit und verschieden hohen Anteilen an Titan, nämlich 0%, 5%, 20% und 50%. Dementsprechend werden die verschiedenen TiHA-Discs in weiterer Folge als „TiHA 0%“, „TiHA 5%“, „TiHA 20%“ und „TiHA 50%“ bezeichnet. Der Durchmesser der TiHA-Discs betrug 9 mm, ihre Sterilität wurde durch Behandlung mit Gammastrahlung sichergestellt (Mediscan GmbH, 4550 Kremsmünster, Österreich), wobei die Energiedosis 22,5-27,5 Gy betrug.

2.1.3 Bovine Knochenplättchen

Für die Herstellung von bovinen Knochenplättchen wurden zerkleinerte, gereinigte Rinderknochen verwendet, die im Schlachthaus als Abfall anfallen. Die Knochenstückchen wurden mit der Isomet Low Speed Saw geschnitten, wobei die drehbare Skala für die Einstellung der Schnittdicke nach jedem Schnitt um zwei volle Umdrehungen weitergedreht wurde. Mittels Hammer und Stanze wurden anschließend runde Knochenplättchen mit 5 mm Durchmesser für die Versuche mit den LCM-Discs, bzw. 9 mm Durchmesser für die Versuche mit den TiHA-Discs ausgestanzt. Es erfolgten Waschschriffe im Ultraschallbad, zunächst in destilliertem Wasser, danach in 70% Ethanol. Zuletzt wurden die Knochenplättchen unter der keimarmen Werkbank mit UV-Licht behandelt, um Sterilität zu gewährleisten.

2.1.4 Kulturmedium für Osteoblasten

Als Kulturmedium für Osteoblasten wurde Minimum Essential Medium (MEM) Alpha Medium (α -MEM) mit 10% hitzeinaktiviertem fötalen Kälberserum und 1% Penicillin/Streptomycin-Lösung verwendet.

2.1.5 Mineralisationsmedium

Das Mineralisationsmedium bestand aus dem Kulturmedium, dem 50 $\mu\text{g/ml}$ Ascorbinsäure sowie 5 mmol/l β -Glycerophosphat (β -GP) zugesetzt wurden. Hierfür wurden für die einfachere Handhabung Standardlösungen von Ascorbinsäure und β -GP hergestellt.

2.1.6 Kokulturmedium

Das Kokulturmedium bestand aus α -MEM mit 10% nicht hitzeinaktiviertem fötalen Kälberserum und 1% Penicillin/Streptomycin-Lösung. 1,25-Dihydroxy-Vitamin D3 und PGE_2 wurden dem vorgewärmten Medium erst kurz vor Gebrauch in den Konzentrationen von 10^{-9} mol/l bzw. 10^{-6} mol/l zugesetzt.

2.1.7 Ascorbinsäure-Stammlösung (100x)

Um eine hundertfach konzentrierte Ascorbinsäure-Stammlösung herzustellen, wurden 50 mg Ascorbinsäure in 10 ml PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} gelöst und die Lösung unter der keimarmen Werkbank sterilfiltriert.

2.1.8 β -Glycerophosphat-Stammlösung (100x)

Für die hundertfach konzentrierte β -GP-Stammlösung wurden 2,16 g β -GP eingewogen und in 10 ml PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} gelöst. Anschließend erfolgte eine Sterilfiltration unter der keimarmen Werkbank.

2.1.9 Phosphatgepufferte Salzlösung ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$

Um phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} zu erhalten, wurde zunächst eine zehnfachkonzentrierte Lösung von PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} hergestellt. Hierfür wurden 2 g KCl, 2 g KH_2PO_4 , 80 g NaCl und 27,07 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ eingewogen und in 1 l bidestilliertem Wasser gelöst. Die Pufferlösung wurde auf 1x verdünnt, sterilfiltriert und bei 4°C gelagert.

2.1.10 Phosphatgepufferte Salzlösung mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$

Für die Herstellung von PBS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ wurden 2 g KCl, 2 g KH_2PO_4 , 1 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ und 80 g NaCl und 14,342 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in etwas bidestilliertem Wasser gelöst. 1 g CaCl_2 wurden in mit HCl etwas angesäuertem Wasser gelöst, dann wurden die Lösungen gemischt und mit bidestilliertem Wasser auf 1l aufgefüllt. Dies ergab eine 10x-Lösung, die auf 1x verdünnt wurde. Danach wurde der pH-Wert am pH-Meter durch Zutropfen von 5N NaOH auf 7,2 eingestellt.

2.1.11 Milli-Q-Wasser

Milli-Q-Wasser wurde mit der Milli Q UF Plus-Wasseraufbereitungsanlage von Millipore hergestellt.

2.1.12 Formaldehydlösung, 3,7%

Für die Herstellung der 3,7%igen Formaldehydlösung wurde 37%ige Formaldehydlösung unter dem Abzug im Verhältnis 1:10 mit PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} verdünnt.

2.1.13 ALP-Waschpuffer

Der ALP-Waschpuffer besteht aus 500 ml PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} , dem 250 μl Tween 20 zugesetzt wurden.

2.1.14 CyQUANT®-Lysispuffer, 1x

Der CyQUANT®-Lysispuffer (1x) wurde durch Verdünnen des CyQUANT®-Lysispuffers (20x) mit nukleasefreiem Wasser im Verhältnis 1:20 hergestellt.

2.1.15 ALP-Puffer

Dieser ALP-Puffer ist zweifachkonzentriert (2x), weil er während des Experimentes 1:1 verdünnt wird und somit dann die gewünschte Konzentration 1x hat.

Der ALP-Puffer (2x) stellt eine wässrige Lösung der Komponenten Glycin (200 mM), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (2 mM) und ZnCl_2 (2 mM) dar, die auf einen pH-Wert von 10,4 eingestellt und mit einem Röhrchen DiFMUP-Stammlösung (10 mM) pro 5 ml Puffer versetzt wurde.

2.1.16 DiFMUP-Lösung, 200 μM

Um eine 200 μM DiFMUP-Lösung zu erhalten, wurde die mit dem Kit gelieferte DiFMUP-Lösung (10 mM) mit ALP-Puffer im Verhältnis 1:50 verdünnt.

2.1.17 CyQUANT®-Dye, 4x

Durch 1:100-Verdünnung mit dem CyQUANT®-Lysispuffer wurde aus der CyQUANT®-Dye 400x die CyQUANT®-Dye 4x hergestellt.

2.1.18 Alizarin-Rot-S-Lösung (ARS-Lösung), 40 mM, pH 4,2

Für die Bereitung der 40 mM ARS-Lösung mit einem pH-Wert von 4,2 wurden zunächst 136,9 mg ARS eingewogen und in 10 ml Milli Q-Wasser gelöst, der pH-Wert wurde auf 4,2 eingestellt. Nach Filtration durch einen Faltenfilter wurde die Lösung bis zur Verwendung lichtgeschützt gelagert.

2.1.19 Cetylpyridiniumchloridlösung, 10%, in Phosphatpuffer

Um eine 10%ige Cetylpyridiniumchloridlösung zu erhalten, wurden 10 g Cetylpyridiniumchlorid eingewogen. Mit 10 mM Phosphatpuffer vom pH-Wert 7 wurde auf 100 ml aufgefüllt und das Cetylpyridiniumchlorid durch Erwärmen im Wasserbad in Lösung gebracht.

2.1.20 Phosphatpuffer, 10 mM, pH 7

Zunächst wurde 100 mM Phosphatpuffer aus „Lösung A“ und „Lösung B“ hergestellt.

Lösung A: 6,95 g KH_2PO_4 , gelöst in 250 ml Milli Q-Wasser

Lösung B: 8,91 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, gelöst in 250 ml Milli Q-Wasser

19,5 ml „Lösung A“ und 30,5 ml „Lösung B“ wurden gemischt und mit Milli Q-Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Dieser 100 mM Phosphatpuffer wurde nun im Verhältnis 1:10 mit Milli Q-Wasser verdünnt und auf den genauen pH-Wert von 7,0 eingestellt.

2.1.21 Silbernitratlösung, 5%

Für die Herstellung einer 5%igen Silbernitratlösung wurden 250 mg AgNO_3 in 4,75 ml Milli Q-Wasser gelöst.

2.1.22 Natriumthiosulfatlösung, 5%

Die 5%ige Natriumthiosulfatlösung wurde aus 250 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, gelöst in 4,75 ml Milli Q-Wasser, hergestellt.

2.1.23 TRAP-Puffer

Für die Herstellung des TRAP-Puffers wurden 108,88 g Natriumacetat in 20 ml destilliertem Wasser gelöst und mit 1M HCl auf einen pH-Wert von 5 eingestellt. Danach wurden 46,02 mg Natriumtartrat hinzugefügt.

2.1.24 TRAP-Färbelösung

Für die TRAP-Färbelösung wurden 9 mg Fast Red Violet LB Salt mit 15 ml TRAP-Puffer versetzt und 150 μl N-5000 wurden zugefügt, wobei N-5000 zuvor aus 1,5 mg Naphthol AS-MX Phosphat und 150 μl N,N-Dimethylformamid hergestellt wurde. Zum Lösen des Fast Red Violet LB Salts wurde die Färbelösung 5 Minuten lang im Ultraschallbad behandelt und anschließend lichtgeschützt gelagert.

2.1.25 TRAP-Substratlösung

Um die TRAP-Substratlösung herzustellen, wurde der Inhalt einer 40 mg p-Nitrophenylphosphat-Kapsel in 20 ml Citratpuffer gelöst.

2.1.26 TRAP-Standardlösung

Als TRAP-Standardlösung diente 0,05 mM p-Nitrophenollösung, die durch Verdünnen einer 10 mM p-Nitrophenollösung mit Stopplösung im Verhältnis 1:200 erhalten wurde.

2.1.27 Citratpuffer, 0,09 M, pH 4,8

Der Citratpuffer, 0,09 M, pH 4,8 wurde aus „Lösung 1“ und „Lösung 2“ hergestellt:

Lösung 1: 18,91 g Citronensäure, gelöst in 1l Wasser

Lösung 2: 26,46 g Natriumcitrat, gelöst in 1l Wasser

Es wurden 630 ml von Lösung 1 und 370 ml von Lösung 2 gemischt und der pH-Wert durch Zusatz von Lösung 1 (senkt den pH) bzw. Lösung 2 (erhöht den pH) auf 4,8

eingestellt. Nach Konservierung des Puffers durch Zusatz weniger Tropfen Chloroform wurde er bei 0-5 °C gelagert.

2.1.28 TRAP-Stopplösung

Als TRAP-Stopplösung diente 0,5 N NaOH. Sie wurde durch Auflösen von 2 g NaOH in 100 ml Milli Q-Wasser erhalten.

2.1.29 Trypsin-EDTA-Lösung (1x)

Zunächst wurde eine zehnfachkonzentrierte Trypsin-EDTA-Lösung hergestellt, indem 0,155 g EDTA, 0,50 g Trypsin und 0,90 g NaCl in destilliertem Wasser gelöst wurden. Dann wurde die Lösung mit NaOH auf einen pH-Wert zwischen 7,4 und 7,6 eingestellt und unter der keimarmen Werkbank sterilfiltriert. Vor dem Gebrauch wurde die Lösung mit PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} im Verhältnis 1:10 verdünnt, um eine 1x-Lösung zu erhalten.

2.2 Methoden

2.2.1 Experimente mit primären Maus-Osteoblasten

Die für die Experimente verwendeten Osteoblasten stammen aus Mäusecalvarien und wurden nach einem modifizierten Protokoll aus den „Bone Research Protocols“ isoliert (Bakker und Klein-Nulend, 2012). Sie standen bereits, in flüssigem Stickstoff eingefroren, zur Verwendung bereit.

2.2.1.1 Design der Experimente, Zellkultur (LCM-Discs)

Für die In-vitro-Charakterisierung der Discs wurden primäre Maus-Osteoblasten 14 Tage lang auf den Discs kultiviert, wobei sie ab dem Tag nach der Aussaat ein die Mineralisation förderndes Medium („Mineralisationsmedium“) erhielten. Zusätzlich gab es zwei Kontrollen im leeren Well, ohne Discs: eine positive Kontrolle mit Mineralisationsmedium („Mineralisationsmedium/ohne Disc“) und eine negative Kontrolle mit normalem Kulturmedium („Kulturmedium/ohne Disc“). Um die Viabilität der Zellen zu untersuchen, wurde am Tag 1, 3, 7, 10 und 14 der PrestoBlue®-Assay durchgeführt. Zur Beurteilung der Differenzierung der Osteoblasten erfolgten die ALP-Färbung und die ALP-Aktivitätsmessung am Tag 7. Das Mineralisationsvermögen der Zellen wurde am Tag 14 durch die ARS-Färbung und die Von-Kossa-Färbung getestet. Diese Methoden werden nachfolgend beschrieben.

Der Versuchsaufbau wird in Abb. 5 veranschaulicht, die Zusammensetzung der verwendeten Nährmedien ist in Kapitel 2.1 detailliert aufgelistet. Am Tag -2 wurden

die LCM-Discs in den Wells einer 96-Well-Platte (beschichtet für Zellkultur) platziert und Kulturmedium in alle Wells, auch in die der Gruppen ohne Discs, pipettiert. Es erfolgte eine Vorinkubation über Nacht bei 37°C und 5% CO₂. Am Tag -1 wurden die primären Maus-Osteoblasten in einer Konzentration von 65100 Zellen pro 96 Wells in Kulturmedium ausgesät und über Nacht wiederum inkubiert. Ab Tag 0 wurde, außer in der „Kulturmedium/ohne Disc“, das Kulturmedium gegen Mineralisationsmedium ausgetauscht. Medienwechsel wurden alle 2-3 Tage durchgeführt. Das β-GP im Mineralisationsmedium dient hierbei als Phosphatquelle, um das Einlagern von Calciumphosphat zu ermöglichen, während die zugesetzte Ascorbinsäure im Rahmen der Kollagensynthese für die Hydroxylierung von Aminosäuren benötigt wird (Trackman, 2005).

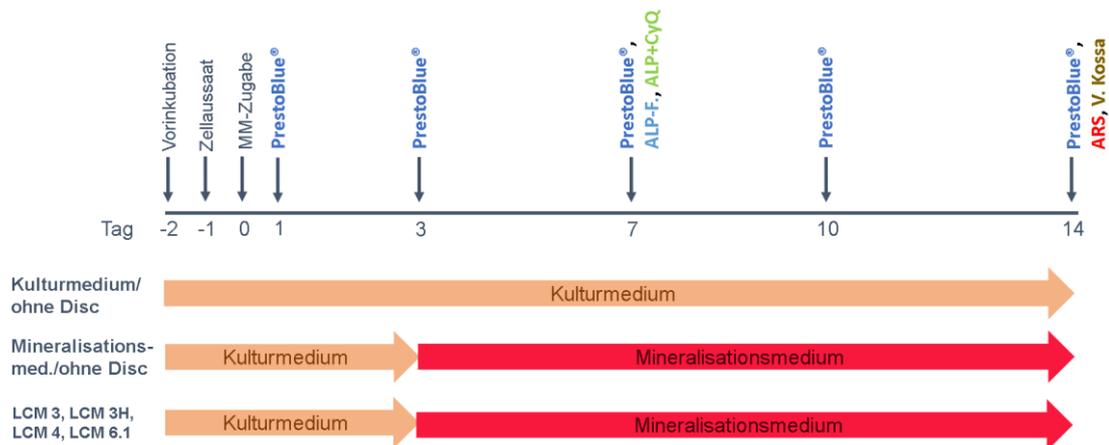


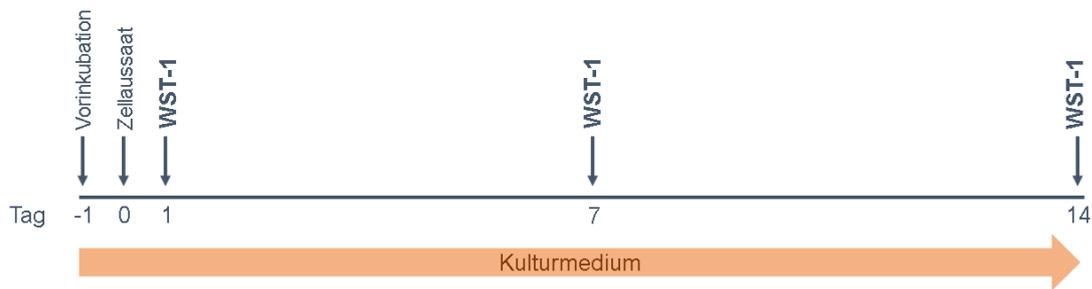
Abb. 5: Übersicht über den Aufbau der Osteoblastenexperimente auf LCM-Discs.

Abkürzungen: MM = Mineralisationsmedium, ALP-F. = Färbung der alkalischen Phosphatase, ALP+CyQ = Bestimmung der alkalischen Phosphatase und CyQUANT®-Assay, ARS = Alizarin-Rot-S-Färbung.

2.2.1.2 Design der Experimente, Zellkultur (TiHA-Discs)

Für die Untersuchung der Viabilität von Osteoblasten auf den TiHA-Discs wurden WST-1-Assays an den Tagen 1, 7 und 14 geplant. Als Kontrollen dienten Knochenplättchen und für Zellkultur beschichtete Deckgläser, die wie die TiHA-Discs einen Tag lang bei 37°C und 5% CO₂ in Kulturmedium in 24-Well-Suspensionskulturplatten vorinkubiert wurden. Nach dieser Vorinkubation wurde das Medium entfernt und primäre Maus-Osteoblasten wurden durch Drop-Seeding auf die Materialien ausgesät, in einer Konzentration von 33333 Zellen/cm² (Huang et al., 2010). Es wurde zunächst nur tropfenweise Zellsuspension auf den Discs, Knochenplättchen und Deckgläsern verteilt. Nach 30 Minuten bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Wells mit warmem Kulturmedium auf je 500 µl aufgefüllt und die Inkubation wurde fortgesetzt. Das Design der Experimente wird in Abb. 6

veranschaulicht. Für die Beurteilung der Zellviabilität war der WST-1-Assay am Tag 1, 7 und 14 geplant.



Experimentelle Gruppen: zellkulturbeschichtetes Deckglas, Knochenplättchen, TiHA 0%, TiHA 5%, TiHA 20%, TiHA 50%

Abb. 6: Übersicht über den Aufbau der Osteoblastenexperimente auf den TiHA-Discs.
Abkürzungen: WST-1 = WST-1-Assay.

2.2.1.3 PrestoBlue®-Assay

Im Cytosol lebender, metabolisch aktiver Zellen herrschen reduzierende Bedingungen. Das PrestoBlue®-Reagens enthält den blauen Farbstoff Resazurin, der ins Cytosol eindringen kann und dort zum roten Fluoreszenzfarbstoff Resorufin reduziert wird, der durch Fluorimetrie vermessen werden kann und dessen Konzentration in der Probe direkt proportional zur Zahl der metabolisch aktiven Zellen ist (LifeTechnologies, 2010).

Das PrestoBlue®-Reagens wird zehnfach konzentriert (10x) geliefert. Unter Lichtschutz wurde das entsprechende Volumen des Reagens ins Kulturmedium pipettiert, sodass die Arbeitskonzentration von 1x erreicht wurde. Anschließend wurde die Zellkulturplatte 10 Minuten lang bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Der Überstand wurde in eine schwarze Zellkulturplatte mit durchsichtigem Boden übergeführt, den Zellen wurde frisches Kulturmedium zugegeben und danach bis zum nächsten PrestoBlue®-Assay weiterkultiviert. Die schwarze Platte wurde, inklusive Leerwert, fluorimetrisch bei 560 nm Exzitations- und 590 nm Emissionswellenlänge vermessen. Durchgeführt wurde der PrestoBlue®-Assay am Tag 1, 3, 7, 10 und 14.

2.2.1.4 WST-1-Assay

WST-1 (water soluble tetrazolium 1) ist ein Tetrazoliumsalz, das durch mitochondriale Dehydrogenasen zu einem Formazan gespalten werden kann. Bei größerer Zahl an lebenden Zellen ist auch die Dehydrogenaseaktivität höher, weswegen man aus der gemessenen Konzentration des gebildeten Formazans auf die Viabilität der Zellen schließen kann. Diese Konzentration kann spektrophotometrisch bei 440 nm vermessen werden (BioVision, 2013).

Für die Durchführung des Assays wurden jeweils 50 µl des WST-1-Reagens in die im Well befindlichen 500 µl Medium pipettiert. Danach erfolgte eine dreistündige Inkubation bei 37°C und 5% CO₂. Der Überstand wurde anschließend in kleine Reaktionsgefäße übergeführt, die Zellen zweimal mit warmem PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ gewaschen, mit frischem Kulturmedium versetzt und weiterkultiviert. Die entnommenen Überstände wurden gevortext, in Mikrotiterplatten pipettiert und die Absorption bei 440 nm vermessen. Es wurden auch Kontrollmessungen ohne Zellen durchgeführt.

2.2.1.5 ALP-Färbung

Die Phosphatgruppe des 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphats (BCIP) wird durch die ALP abgespalten, das entstehende Intermediat dimerisiert und gleichzeitig wird NitroBlue Tetrazolium (NBT) zu einem unlöslichen blauen Diformazan reduziert (Sigma-Aldrich, 2008). Mittels der ALP-Färbung wurden die Osteoblasten am Tag 7 analysiert.

Die SIGMAFAST™ BCIP®/NBT-Tablette wurde bei Raumtemperatur in 10 ml Milli-Q-Wasser gelöst, diese Färbelösung wurde lichtgeschützt gelagert. Die Fixierung der Zellen erfolgte nach dem Waschen mit PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ mit 3,7% Formaldehydlösung für die Dauer einer Minute. Anschließend wurde mit ALP-Waschpuffer gewaschen und die Zellen danach zehn Minuten lang mit der Färbelösung unter Lichtschutz behandelt. Abschließend folgte noch ein Waschschrift mit ALP-Waschpuffer.

2.2.1.6 ALP-Aktivitätsbestimmung aus dem Lysat, CyQUANT®-Assay

Um die Aktivität der ALP auf die Osteoblasten-Zellzahl beziehen zu können, wurden die ALP-Aktivitätsbestimmung und der CyQUANT®-Assay am Tag 7 gleichzeitig durchgeführt.

Difluoro-4-methylumbelliferylphosphat (DfMUP) stellt ein Substrat der ALP dar, die ALP kann die Phosphatgruppe dieser Verbindung abspalten. Das entstehende 6,8-Difluoro-7-hydroxy-4-methyl-coumarin kann fluorimetrisch vermessen werden, und zwar bei einer Exzitations- bzw. Emissionswellenlänge von 358 nm bzw. 455 nm (MolecularProbes, 2004).

Der CyQUANT®-Assay beruht auf einem Fluoreszenzfarbstoff namens CyQUANT®GR dye, dessen Fluoreszenz nach Bindung an zelluläre Nukleinsäuren eines Zelllysats stark verstärkt wird (MolecularProbes, 2006).

Für diese beiden Assays wurden die Zellkulturplatten am Tag 7 mit PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} gewaschen und danach bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ tiefgefroren. Nach dem Auftauen wurden die Zellen mit CyQUANT®-Lysispuffer (1x) lysiert und danach zentrifugiert.

Für die ALP-Aktivitätsbestimmung wurde dem Zelllysat $200\text{ }\mu\text{M}$ DiFMUP-Lösung zugegeben und die Platte 15 Minuten lang bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Zu den Lysaten für den CyQUANT®-Assay wurde CyQUANT®-Dye (4x) hinzugefügt. Es folgte eine fünfminütige Inkubation bei Raumtemperatur. Die anschließende Vermessung erfolgte fluorimetrisch bei einer Exzitationswellenlänge von 358 nm und einer Emissionswellenlänge von 455 nm (ALP-Aktivitätsbestimmung), bzw. 480 nm und 520 nm (CyQUANT®-Assay).

Um die Fluoreszenzintensität im Falle des CyQUANT®-Assays mit der Zellzahl in Verbindung setzen zu können, wurde der Assay mit Zellsuspensionen bekannter Zellzahl durchgeführt und eine Standardkurve erstellt. Für die ALP-Aktivitätsbestimmung wurde auch eine Verdünnungsreihe der im Kit befindlichen 6,8-Difluoro-7-hydroxy-4-methyl-coumarin-Stammlösung, verdünnt mit einer 1:1-Mischung aus ALP-Puffer und CyQUANT®-Lysispuffer, vermessen.

Die ALP-Aktivität bezogen auf die Zellzahl wurde in $\mu\text{mol ALP pro } 1 \cdot 10^4$ Zellen angegeben.

2.2.1.7 Alizarin-Rot-S-Färbung (ARS-Färbung)

Der Farbstoff Alizarin Rot S (ARS) kann Ca^{2+} binden, daher kann aus dem ARS-Gehalt einer Probe auf ihren Calciumgehalt und damit auf die Mineralisationsfähigkeit der Osteoblasten geschlossen werden (Puchtler et al., 1969). Nach der Färbung wird der Farbstoff mit Cetylpyridiniumchlorid extrahiert und spektrophotometrisch quantifiziert. Die Durchführung dieser Färbung an den Osteoblastenkulturen erfolgte am Tag 14.

Nach einem Waschschrift mit PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} erfolgte die Fixierung der Zellen mit 10% neutral gepufferter Formalinlösung. Gefärbt wurde anschließend 10 Minuten lang bei Raumtemperatur und unter Schütteln mit ARS-Lösung (40 mM , $\text{pH } 4,2$). Danach wurde mehrmals mit Milli-Q-Wasser und schließlich mit PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} gewaschen.

Für die Quantifizierung wurde das PBS entfernt, 10% Cetylpyridiniumchloridlösung (in Phosphatpuffer, $\text{pH } 7$) zugegeben und 15 Minuten lang inkubiert. Die Überstände wurden mit der 10% Cetylpyridiniumchloridlösung verdünnt und die Absorption bei 520 nm vermessen. Außerdem wurde eine ARS-Standardkurve durch Vermessen

einer Verdünnungsreihe der 40 mM ARS-Lösung in Cetylpyridiniumchloridlösung erstellt und für die Bestimmung des ARS-Gehaltes der Proben herangezogen.

2.2.1.8 Von-Kossa-Färbung

Die Von-Kossa-Färbung dient dem Nachweis von Phosphat (Puchtler et al., 1969), wobei hier davon ausgegangen wird, dass es sich um Calciumphosphat handelt, denn die Anwesenheit von Calcium wird durch die ARS-Färbung bewiesen. Die von Kossa-Färbung wurde, wie die ARS-Färbung, am Tag 14 durchgeführt.

Durch Zugabe von Silbernitratlösung wird Calcium durch Silber ersetzt. Durch die Behandlung mit UV-Licht werden die Silberionen danach zu metallischem Silber reduziert und die Stellen, an denen Phosphat vorhanden ist, erscheinen schwarz (BioGenex, 2015).

Vor der Färbung wurde das Zelllayer mit PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} gewaschen, mit 10% neutral gepufferter Formalinlösung fixiert und danach an der Luft komplett getrocknet. Anschließend wurden die Zellen eine Stunde lang unter UV-Licht mit 5% AgNO_3 -Lösung behandelt. Es erfolgten Waschschrte mit 5% Natriumthiosulfatlösung und Milli-Q-Wasser.

2.2.2 Kokultur von Maus-Osteoblasten und Maus-Osteoklasten

Um das Verhalten von Osteoklasten auf den Discs beurteilen zu können, wurden primäre Maus-Osteoblasten gemeinsam mit Osteoklasten auf den Discs kultiviert. Als Kontrollgruppen dienten leere, zellkulturbeschichtete Wells (LCM-Discs) bzw. zellkulturbeschichtete Deckgläser (TiHA-Discs), sowie Plättchen aus Rinderknochen, auf denen die Zellen wie auf den Discs kultiviert wurden.

Für die Kokultur werden zunächst primäre Maus-Osteoblasten ausgesät und einen Tag lang kultiviert. Danach erfolgt die Aussaat von Knochenmark aus Mäuseknochen auf die Osteoblastenschicht. Durch Zusatz von 1,25-Dihydroxy-Vitamin D₃ und Prostaglandin E₂ (PGE₂) im Kulturmedium werden die Osteoblasten angeregt, M-CSF und RANKL zu bilden. Diese Faktoren fördern das Entstehen von Osteoklasten aus ihren Vorläufern im Knochenmark (Itzstein und van 't Hof, 2012).

2.2.2.1 Design der Experimente, Zellkultur

Knochenplättchen und LCM-Discs wurden in den jeweiligen Wells einer 96-Well-Platte platziert und in Kulturmedium über Nacht vorinkubiert (37°C, 5% CO₂). In den Experimenten mit TiHA-Discs wurden 24-Well-Suspensionskulturplatten verwendet, weder Discs, noch Knochenplättchen, noch Deckgläser wurden vorinkubiert.

Am Tag 0 erfolgte die Aussaat der primären Maus-Osteoblasten in Kulturmedium, wie in Kapitel 2.2.1.1 (LCM-Discs) bzw. in Kapitel 2.2.1.2 (TiHA-Discs) beschrieben. Für die Knochenmarkisolation und das Aussäen der isolierten Zellen am Tag 1 wurde Knochenmark-Medium hergestellt. Für die Gewinnung des Knochenmarks wurden Balb/c-Mäuse herangezogen und es wurde nach einem Protokoll von Cecile Itzstein und Robert J. van 't Hof gearbeitet (Itzstein und van 't Hof, 2012). Die erhaltene Zellsuspension wurde zentrifugiert und das Zellpellet in Knochenmark-Medium resuspendiert.

Das Kulturmedium wurde von den Osteoblasten entfernt, bevor pro Well 0,4 ml der Knochenmark-Zellsuspension auf die Osteoblasten ausgesät wurden. Die aus einer Maus gewonnenen Knochenmarkzellen wurden auf eine Zellkulturplatte verteilt.

Nach der Aussaat wurde in jedes Well 0,1 ml Knochenmark-Medium pipettiert, dem davor Vitamin D3 und PGE₂ in derartigen Konzentrationen zugesetzt wurden, dass die Endkonzentration in der Zellkultur für Vitamin D3 $1 \cdot 10^{-9}$ mol/l und für PGE₂ $1 \cdot 10^{-6}$ mol/l betragen.



Experimentelle Gruppen:

LCM-Experimente: zellkulturbeschichtetes Well, Knochenplättchen, LCM 3, LCM 3H, LCM 4, LCM 6.1

TiHA-Experimente: zellkulturbeschichtetes Deckglas, Knochenplättchen, TiHA 0%, TiHA 5%, TiHA 20%, TiHA 50%

Abb. 7: Übersicht über den Aufbau der Kokultur-Experimente.

Abkürzungen: OB = Osteoblasten, Kno-Mark = Knochenmark.

Jeden zweiten Tag wurde ein Medienwechsel durchgeführt, wobei nur etwa zwei Drittel des alten Mediums abgenommen wurden, um die nicht adhärenen Knochenmarkzellen nicht zu entfernen. Vitamin D3 und PGE₂ wurden dabei jedes Mal frisch zugesetzt. Am Tag 7 fanden TRAP-Aktivitätsmessung und TRAP-Färbung statt. In Abb. 7 ist der Aufbau der Kokultur-Experimente nochmals zusammengefasst.

2.2.2.2 TRAP-Färbung

TRAP spaltet die Phosphatgruppe von substituierten Naphthol-AS-Phosphaten ab, das Produkt dieser Reaktion kann mit Diazoniumsalzen zu einem Farbstoff reagieren (Sigma-Aldrich, 2014). In den hier beschriebenen Experimenten wurde Naphthol AS-MX Phosphat verwendet, als Diazoniumsalz diente das Fast Red Violet LB Salt. Durchgeführt wurde die TRAP-Färbung jeweils am Tag 7.

Nachdem die Zellen mit PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} gewaschen wurden, wurde die Fixierung mit 3,7% Formaldehydlösung durchgeführt. Es folgten Waschschrte mit PBS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ und eine 30-minütige Inkubation in TRAP-Puffer bei 37°C und 5% CO_2 .

Der TRAP-Puffer wurde entfernt und die Zellen einer Mischung von Aceton und Ethanol im Verhältnis 1:1 ausgesetzt. Nach dem Abnehmen derselben wurden die Zelllayer an der Luft getrocknet. Die Inkubation mit der Färbelösung wurde zehn Minuten lang bei 37°C und 5% CO_2 vorgenommen, danach wurde ein Waschschrte mit Milli-Q-Wasser durchgeführt. Unter dem Mikroskop wurden diejenigen Zellen als reife Osteoklasten gewertet, die eine rosarote Färbung sowie mindestens drei Zellkerne aufwiesen (Bellido et al., 2014).

2.2.2.3 Messung der TRAP-Aktivität

Das Enzym TRAP kann die Phosphatgruppe des zugegebenen Substrates, p-Nitrophenylphosphat, abspalten. Die Reaktion wird im Alkalischen gestoppt und p-Nitrophenolat kann bei 405 nm spektrophotometrisch vermessen werden. Seine Konzentration ist direkt proportional zur TRAP-Aktivität (Lee et al., 2008). Ermittelt wurde die TRAP-Aktivität am Tag 7.

Für die Messung der TRAP-Aktivität wurden Substratlösung und Probelösung im Verhältnis 1:1 30 Minuten lang bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert, bevor Stopplösung zugegeben wurde. Die spektrophotometrische Messung erfolgte bei 405 nm, als Standard wurde 0,05 mM p-Nitrophenollösung vermessen. Eine TRAP-Einheit hydrolysiert 1 μmol p-Nitrophenylphosphat pro Minute, bei pH 4,8 und 37°C . Zur Berechnung der Einheiten in den Proben wurde folgende Formel herangezogen:

$$\text{Einheiten/ml} = \frac{(A_{\text{Probe}} - A_{\text{Leerwert}}) \cdot 0,05 \cdot 0,3 \cdot VF}{A_{\text{Standard}} \cdot t}$$

Formel 1: Berechnung der TRAP-Einheiten pro ml Probe

- A_{Probe}Absorption der Probe
- A_{Leerwert}.....Absorption des Leerwertes
- 0.05Konzentration (µmol/ml) der p-Nitrophenol-Standardlösung
- 0.3Gesamtvolumen pro well (0.3ml)
- VFVerdünnungsfaktor der Probe (=1)
- A_{Standard}Absorption der Standardlösung
- TInkubationszeit (min)
- (Sigma-Aldrich)

2.2.3 Optimieren der Zellaussaat auf TiHA-Discs

Für das Funktionieren der Kokultur-Experimente (siehe Kapitel 2.2.2) sind gute Kulturbedingungen für Osteoblasten nötig, da diese sonst M-CSF und RANKL in zu geringer Menge produzieren und sich keine Osteoklasten bilden können. Daher war es notwendig, die Zellaussaat auf die TiHA-Discs zu optimieren, wobei herausgefunden werden sollte, ob, und wenn ja, wie lange die TiHA-Discs vor der Osteoblastenaussaat im Kulturmedium vorinkubiert werden sollen, sowie wie lange es dauert, bis sich auf den Discs eine konfluente Osteoblastenschicht gebildet hat.

2.2.3.1 Welche Vorbehandlung der Discs ist am besten?

Um diese Frage zu beantworten, wurden vier verschiedene Arten der Vorbehandlung an den Discs „TiHA 0%“ durchgeführt (Tabelle 6).

Gruppenbezeichnung	Vorbehandlung
„24h“	24-stündige Inkubation in Kulturmedium
„3h“	3-stündige Inkubation in Kulturmedium
„waschen“	Einmaliges Waschen mit Kulturmedium
„keine“	Keine Vorbehandlung

Tabelle 6: Beschreibung der im Rahmen der Optimierung der Zellaussaat auf TiHA-Discs getesteten Varianten der Vorbehandlung.

Nach der jeweiligen Vorbehandlung wurden primäre Maus-Osteoblasten auf die Discs mittels Drop-Seeding in einer Zelldichte von 114000 Zellen/cm² ausgesät. Dafür wurde eine 24-Well-Suspensionskulturplatte verwendet. Am Tag nach der Zellaussaat wurde die Effizienz der Aussaat ermittelt, hierfür wurde folgende Formel herangezogen (Sobral et al., 2011):

$$\text{Effizienz d. Zellaussaat (\%)} = \frac{\text{lebende Zellen auf der Disk}^*}{\text{lebende Zellen auf der Disk und im Well}^*}$$

Formel 2: Berechnung der Effizienz der Zellaussaat (Sobral et al., 2011)

* pro ml Zellsuspension

So soll ermittelt werden, wie viel Prozent der lebenden Zellen sich tatsächlich an den Discs anheften. Die Zahl der lebenden Zellen auf der Disc bzw. im Well wurde durch Trypsinisierung und Zählen der Zellen bestimmt. Hierfür wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ gewaschen und drei Minuten lang mit 200 µl Trypsin-EDTA-Lösung pro Well inkubiert. Die entstehende Zellsuspension wurde dann mit dem CASY Zellzähler analysiert und die Anzahl der lebenden Zellen pro ml berechnet.

2.2.3.2 Wann hat sich eine konfluente Osteoblastenschicht gebildet?

Osteoblasten wurden gleichzeitig auf in Suspensionskulturplatten befindliche TiHA-Discs, Knochenplättchen und zellkulturbeschichtete Deckgläser ausgesät, parallel wurden sie auch in einer zellkulturbeschichteten Platte kultiviert. Die Dichte betrug 114000 Zellen/cm², die Zellen wurden regelmäßig unter dem Lichtmikroskop betrachtet. Zum Zeitpunkt, an dem die Zellen auf den zellkulturbeschichteten Deckgläsern und in der zellkulturbeschichteten Platte konfluent waren, wurden die Zellen wie in Abschnitt 2.2.3.1 beschrieben trypsinisiert und gezählt. Anschließend wurde die ermittelte Zellzahl/cm² auf den Discs mit derjenigen auf den beschichteten Deckgläsern und in den beschichteten Platten verglichen. So sollte festgestellt werden, ob die Zellen auch auf den Discs bereits konfluent waren. Außerdem wurde der Unterschied zwischen den Dichten auf den verschiedenen Materialien und der angestrebten Zieldichte von 114000 Zellen/cm² untersucht.

2.2.4 Statistische Auswertung

Sämtliche Berechnungen wurden in Microsoft Excel durchgeführt, zur statistischen Analyse und zur grafischen Darstellung wurde Prism Version 5.0c herangezogen. Um die einzelnen experimentellen Gruppen untereinander zu vergleichen, wurde zunächst eine einfache Varianzanalyse (ONE-WAY ANOVA) durchgeführt. Hierbei wird die Nullhypothese, die Mittelwerte der Gesamtheiten seien alle gleich, überprüft, indem zwei Schätzer für die Varianz miteinander verglichen werden. Sind sie zu unterschiedlich, wird die Nullhypothese verworfen, die Mittelwerte sind also nicht alle gleich (Ross, 2006). In diesem Fall wurden die einzelnen Gruppen noch mittels Tukey-post-hoc-Test untereinander verglichen, um die Signifikanz der Unterschiede zu beurteilen.

3 Resultate

3.1 In-vitro-Charakterisierung der LCM-Discs

3.1.1 Viabilität primärer Maus-Osteoblasten auf LCM-Discs

Um die Viabilität der primären Maus-Osteoblasten auf den LCM-Discs beurteilen zu können, wurde am Tag 1, 3, 7, 10 und 14 der PrestoBlue®-Assay durchgeführt, bei jeder Gruppe wurde der Mittelwert von Tag 1 gleich eins gesetzt. In der Gruppe „Kulturmedium/ohne Disc“ stieg die Viabilität bis zum Tag 14 an, in der Gruppe „Mineralisationsmedium/ohne Disc“ stieg sie bis Tag 3 und fiel danach bis Tag 14 wieder auf das Ausgangsniveau ab (Abb. 8).

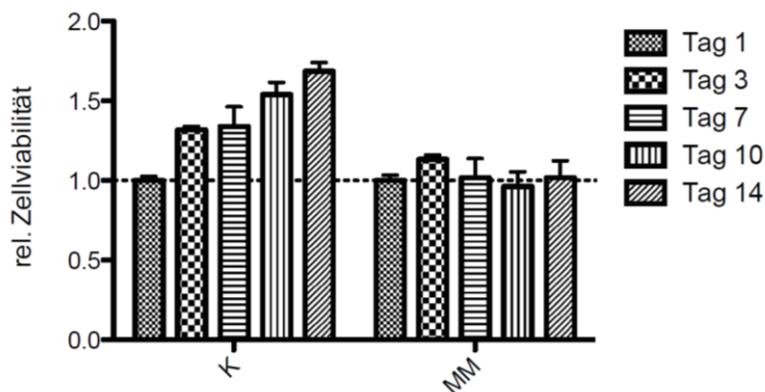


Abb. 8: Viabilität von primären Maus-Osteoblasten kultiviert in Kulturmedium bzw. Mineralisationsmedium an den Tagen 1, 3, 7, 10 und 14.

Die Balken stellen die im Rahmen des PrestoBlue®-Assays gemessene Konzentration des entstandenen fluoreszierenden Produktes dar, wobei der Mittelwert von Tag 1 gleich 1 gesetzt wurde; 3 Experimente à n=3 pro Gruppe.

Abkürzungen: K = „Kulturmedium/ohne Disc“: Osteoblasten kultiviert im leeren Well in Kulturmedium, MM = „Mineralisationsmedium/ohne Disc“: Osteoblasten kultiviert im leeren Well in Mineralisationsmedium.

In den Gruppen „LCM 3“ und „LCM 3H“ war ein Anstieg der Viabilität bis Tag 7 ersichtlich, es folgte ein Abfall, der bei „LCM 3“ stärker ausgeprägt war als bei „LCM 3H“ (Abb. 9). Die Zellviabilität in den Gruppen „LCM 4“ und „LCM 6.1“ stieg bis Tag 3 und fiel danach bis Tag 14 bis zum Ausgangsniveau ab.

Vergleicht man die absoluten Werte der Zellviabilität der Disc-Gruppen von Tag 1 (Abb. 10A), so war der Wert der Gruppe „LCM 3H“ signifikant niedriger als der der Gruppe „LCM 4“ und der Gruppe „LCM 6.1“. Am Tag 7 (Abb. 10B) war der Wert der Gruppe „LCM 3H“ noch immer geringer als die Werte der anderen Disc-Gruppen, allerdings war dieser Unterschied nicht mehr signifikant.

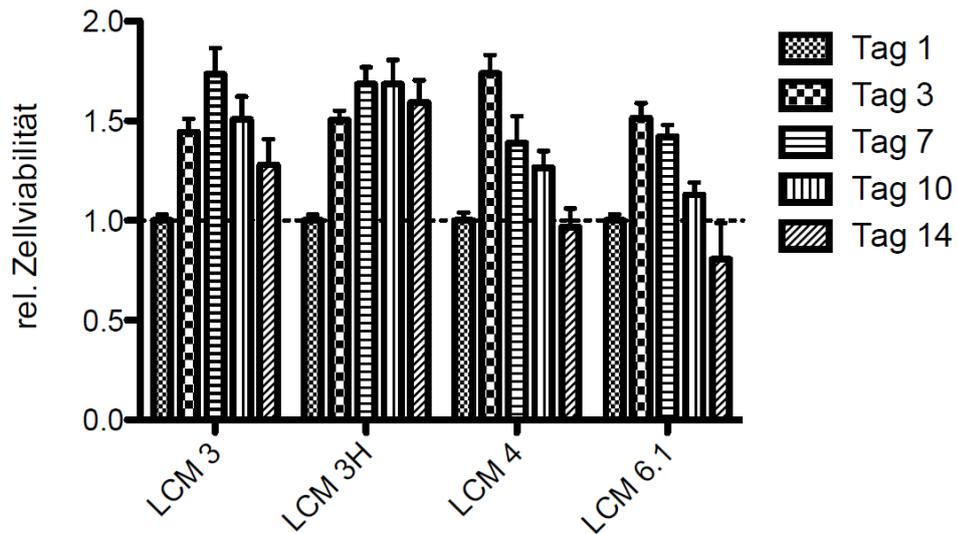


Abb. 9: Viabilität von primären Maus-Osteoblasten auf den Discs „LCM 3“, „LCM 3H“, „LCM 4“ und „LCM 6.1“ an den Tagen 1, 3, 7, 10 und 14. Die Balken stellen die im Rahmen des PrestoBlue®-Assays gemessene Konzentration des entstandenen fluoreszierenden Produktes dar, wobei der Mittelwert von Tag 1 gleich 1 gesetzt wurde; 3 Experimente à n = 3 pro Gruppe.

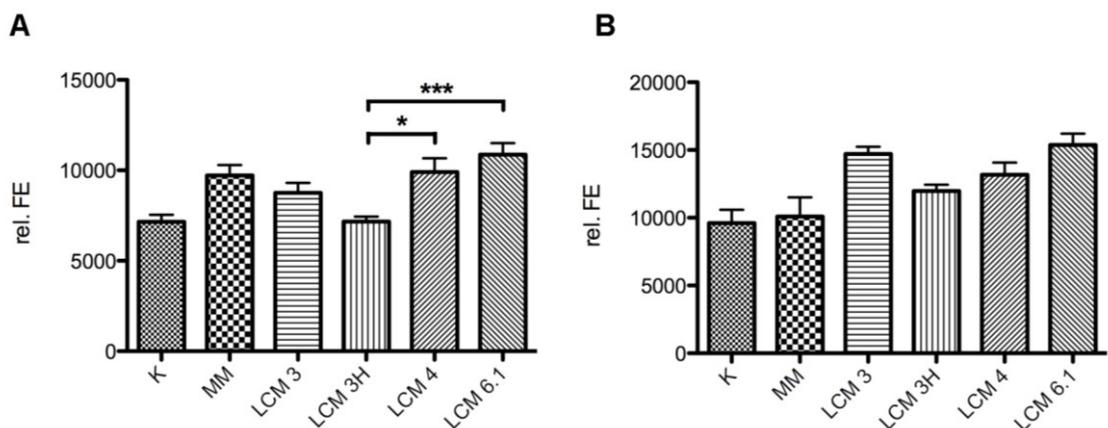


Abb. 10: Viabilität von primären Maus-Osteoblasten kultiviert in Kulturmedium, Mineralisationsmedium und auf den Discs „LCM 3“, „LCM 3H“, „LCM 4“ und „LCM 6.1“ am Tag 1 (A) bzw. am Tag 7 (B). Die Balken stellen die im Rahmen des PrestoBlue®-Assays gemessene Konzentration des entstandenen fluoreszierenden Produktes dar, angegeben in relativen Fluoreszenzeinheiten (rel. FE); 3 Experimente à n = 3 pro Gruppe.
Abkürzungen: K = „Kulturmedium/ohne Disc“: Osteoblasten kultiviert im leeren Well in Kulturmedium, MM = „Mineralisationsmedium/ohne Disc“: Osteoblasten kultiviert im leeren Well in Mineralisationsmedium.
 * Wert von „LCM 3H“ signifikant niedriger als von „LCM 4“ ($p < 0,05$); *** Wert von „LCM 3H“ signifikant niedriger als von „LCM 6.1“ ($p < 0,001$);

3.1.2 Differenzierung von Osteoblasten auf LCM-Discs

3.1.2.1 Aktivität der alkalischen Phosphatase

Die Gruppe „Kulturmedium/ohne Disc“ war nach der ALP-Färbung am Tag 7 nur schwach gefärbt (Abb. 11A), die Gruppe „Mineralisationsmedium/ohne Disc“ hingegen sehr intensiv. Die Gruppen „LCM 3“, „LCM 4“ und „LCM 6.1“ waren gefärbt,

allerdings bei weitem nicht so intensiv wie die Gruppe „Mineralisationsmedium/ohne Disc“ und nur wenig stärker als die Gruppe „Kulturmedium/ohne Disc“.

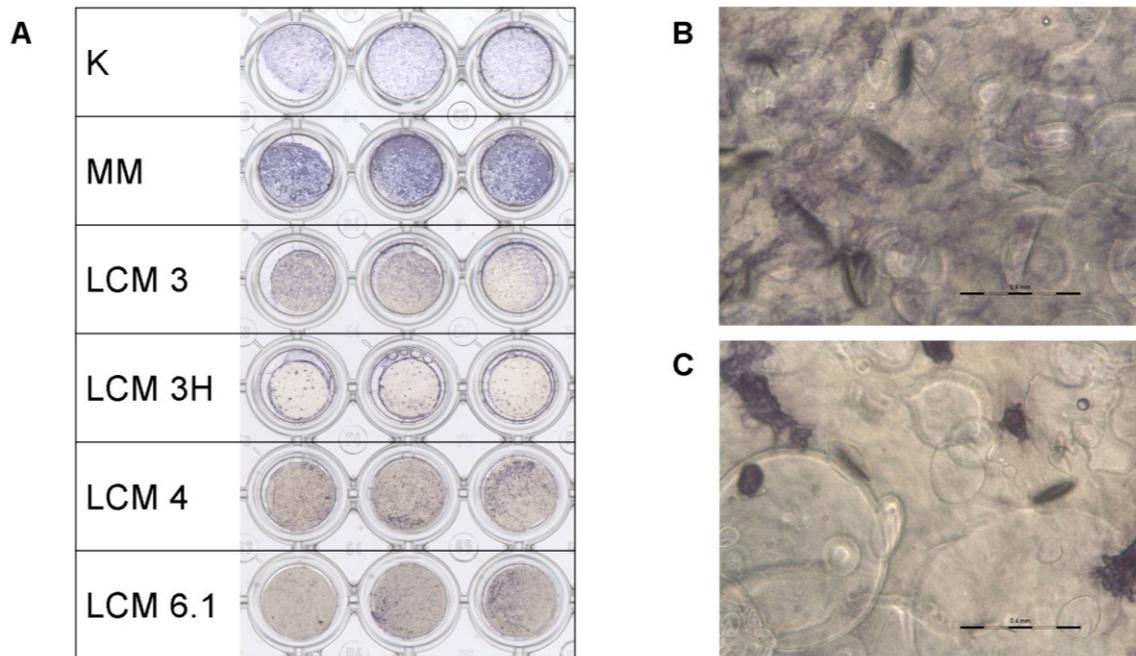


Abb. 11: ALP-Aktivität von primären Maus-Osteoblasten in den Gruppen ohne Discs und auf den Discs „LCM 3“, „LCM 3H“, „LCM 4“ und „LCM 6.1“ am Tag 7, ermittelt durch ALP-Färbung.

A: Scan der Zellkulturplatte nach Durchführung der Färbung.

B: Repräsentativer Ausschnitt aus einem Well der Gruppe „LCM 3“ nach erfolgter Färbung; Länge des Balkens: 0,4 mm.

C: Repräsentativer Ausschnitt aus einem Well der Gruppe „LCM 3H“ nach erfolgter Färbung; Länge des Balkens: 0,4 mm.

Abkürzungen: K = „Kulturmedium/ohne Disc“: Osteoblasten kultiviert im leeren Well in Kulturmedium, MM = „Mineralisationsmedium/ohne Disc“: Osteoblasten kultiviert im leeren Well in Mineralisationsmedium.

Die Gruppe „LCM 3H“ war schwer mit den anderen zu vergleichen, denn hier befanden sich die Zellen entlang von Strängen und in Aggregaten (Abb. 11C). In den anderen Gruppen, wie etwa „LCM 3“, waren sie regelmäßig verteilt (Abb. 11B). An den Stellen der Discs „LCM 3H“, an denen sich Zellen befanden, war die Färbung sehr intensiv, in den Zwischenräumen hingegen kaum sichtbar.

Neben der Färbung wurde, ebenfalls am Tag 7, die ALP-Aktivität bestimmt und auf die Zellzahl bezogen. Die Zellzahl, die mittels CyQUANT®-Assay ermittelt wurde, war in allen Wells ähnlich (Abb. 12A).

Die ALP-Aktivität im Lysat der Gruppe „Kulturmedium/ohne Disc“ war wesentlich geringer als im Lysat der Gruppe „Mineralisationsmedium/ohne Disc“ (Abb. 12B). In den Gruppen „LCM 3“, „LCM 4“ und „LCM 6.1“ wurde eine geringere, in der Gruppe „LCM 3H“ eine höhere Aktivität als in der Gruppe „Mineralisationsmedium/ohne Disc“ gemessen, diese Unterschiede sind allerdings nicht signifikant. Die Aktivität der ALP

war jedoch in der Gruppe „LCM 3H“ signifikant höher als in den Gruppen „LCM 3“, „LCM 4“ und „LCM 6.1“.

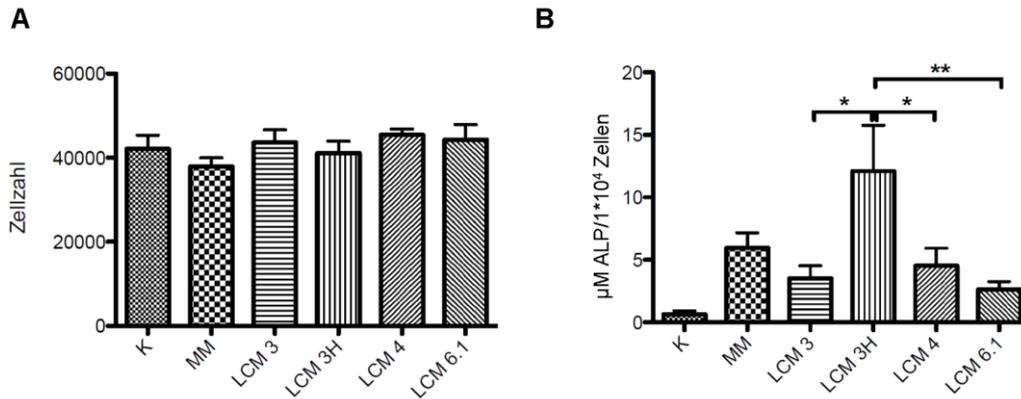


Abb. 12: Zellzahl (A) und ALP-Aktivität (B) von primären Maus-Osteoblasten in Kulturmedium, Mineralisationsmedium und auf den Discs „LCM 3“, „LCM 3H“, „LCM 4“ und „LCM 6.1“ am Tag 7.

A: Ergebnisse des CyQUANT®-Assays: Die Balken stellen die ermittelte Zellzahl in den Wells dar; 1 Experiment à n = 3 pro Gruppe.

B: Ergebnisse der ALP-Aktivitätsbestimmung: Die Balken repräsentieren die ermittelte Konzentration der ALP bezogen auf die Zellzahl; 2 Experimente à n = 3 pro Gruppe.

Abkürzungen: K = „Kulturmedium/ohne Disc“: Osteoblasten kultiviert im leeren Well in Kulturmedium, MM bzw. MM = „Mineralisationsmedium/ohne Disc“: Osteoblasten kultiviert im leeren Well in Mineralisationsmedium.

* Wert von „LCM 3H“ signifikant höher als von „LCM 3“ und „LCM 4“ (p < 0,05); ** Wert von „LCM 3H“ signifikant höher als von „LCM 6.1“ (p < 0,01)

3.1.2.2 Mineralisationsfähigkeit der Osteoblasten

Die Mineralisationsfähigkeit der Osteoblasten auf den Discs wurde mittels ARS-Färbung ermittelt. Der Calciumgehalt und somit die Mineralisationsfähigkeit war bei den Osteoblasten der Gruppe „Kulturmedium/ohne Disc“ deutlich geringer als bei jenen der Gruppe „Mineralisationsmedium/ohne Disc“ (Abb. 13). Während der Calciumgehalt der Gruppen „LCM 3“ und „LCM 3H“ nicht signifikant von dem der Gruppe „Mineralisationsmedium/ohne Disc“ abwich, war er in den Gruppen „LCM 4“ und „LCM 6.1“ signifikant höher.

Bei der Von-Kossa-Färbung wurde keine Färbung in der Gruppe „Kulturmedium/ohne Disc“, dafür eine intensive Färbung in der Gruppe „Mineralisationsmedium/ohne Disc“ festgestellt (Abb. 14). Die Gruppen „LCM 3“ und „LCM 3H“ zeigten nur schwache Färbung, wobei die Zellen auf den Discs „LCM 3H“, wie schon bei ALP- und ARS-Färbung beobachtet, wieder in Strängen angeordnet waren. Eine deutliche Färbung trat auf den Discs „LCM 4“ und „LCM 6.1“ auf.

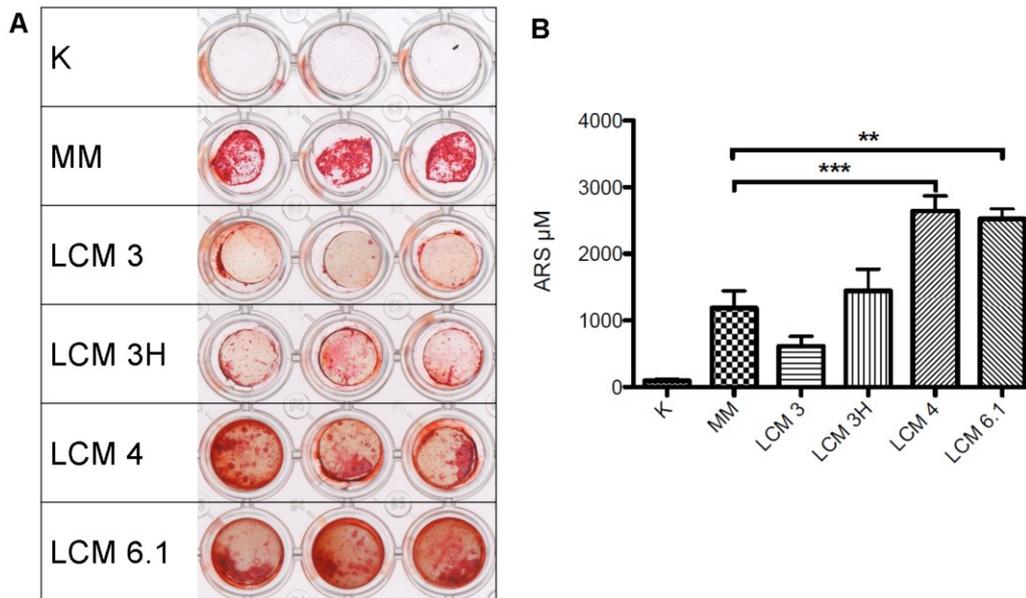


Abb. 13: Mineralisationsfähigkeit der primären Maus-Osteoblasten in Kulturmedium, Mineralisationsmedium und auf den Discs „LCM 3“, „LCM 3H“, „LCM 4“ und „LCM 6.1“ am Tag 14, ermittelt durch die ARS-Färbung.

A: Scan der Zellkulturplatte nach erfolgter Färbung.

B: Die Balken geben die gemessene Konzentration des Farbstoffs nach Extraktion an; 2 Experimente à n = 3 pro Gruppe.

Abkürzungen: K = „Kulturmedium/ohne Disc“: Osteoblasten kultiviert im leeren Well in Kulturmedium, MM = „Mineralisationsmedium/ohne Disc“: Osteoblasten kultiviert im leeren Well in Mineralisationsmedium.

** Wert von „LCM 6.1“ signifikant höher als von „MM“ ($p < 0,01$); *** Wert von „LCM 4“ signifikant höher als von „MM“ ($p < 0,001$).

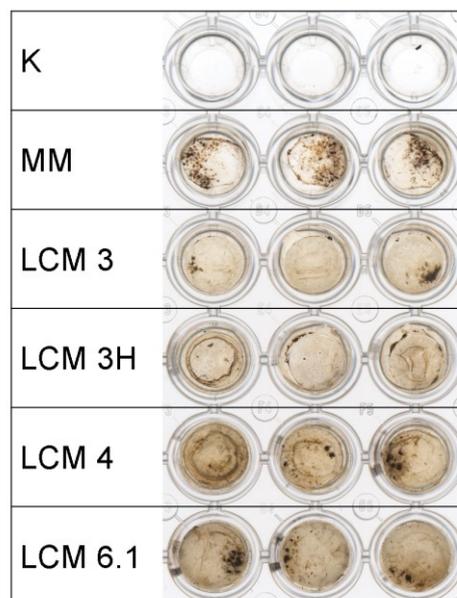


Abb. 14: Mineralisationsfähigkeit der primären Maus-Osteoblasten in Kulturmedium, Mineralisationsmedium und auf den Discs „LCM 3“, „LCM 3H“, „LCM 4“ und „LCM 6.1“ am Tag 14, ermittelt durch die Von-Kossa-Färbung. Zu sehen ist ein Scan der Zellkulturplatte nach erfolgter Färbung.

Abkürzungen: K = „Kulturmedium/ohne Disc“: Osteoblasten kultiviert im leeren Well in Kulturmedium, MM = „Mineralisationsmedium/ohne Disc“: Osteoblasten kultiviert im leeren Well in Mineralisationsmedium.

3.1.3 Kokultur von Maus-Osteoblasten und Maus-Osteoklasten auf LCM-Discs

Bei den Kokultur-Experimenten ist die Kontrollgruppe im leeren, für Zellkultur beschichteten Well, wohl kaum direkt mit den Disc- und Knochenplättchengruppen vergleichbar, weil die Bedingungen für die Osteoblasten auf den unterschiedlichen Materialien sehr verschieden sind. Da aber das Entstehen der Osteoklasten von den Osteoblasten abhängt, kann man nur Gruppen mit ähnlichen Bedingungen für die Osteoblasten direkt miteinander vergleichen. Die Kontrolle im leeren Well dient hier also nur dazu, sicherzugehen, dass das Modell prinzipiell funktioniert hat. Bei der Analyse der Ergebnisse wurde daher nicht der Unterschied zur Kontrollgruppe verglichen, sondern die Unterschiede zwischen den Disc-Gruppen bzw. der Knochen-Gruppe.

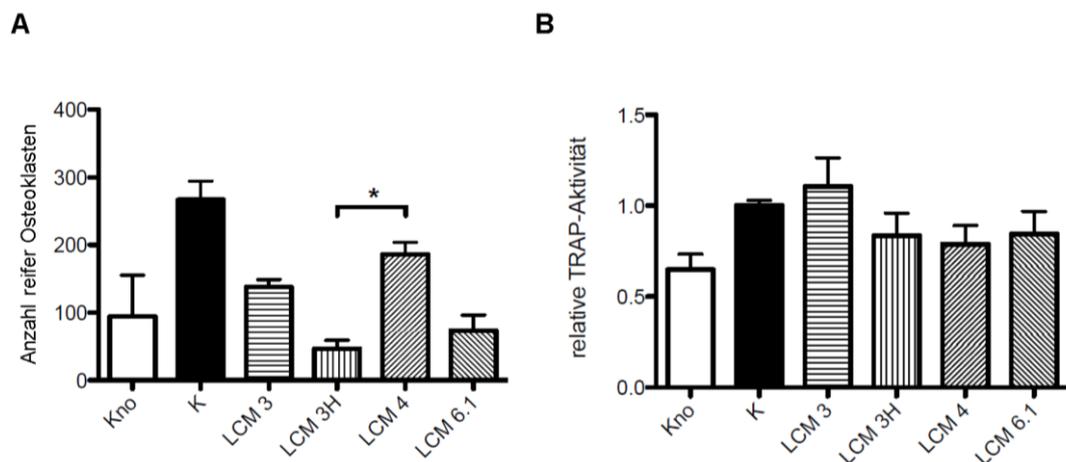


Abb. 15: Anzahl reifer Osteoklasten und TRAP-Aktivität am Tag 7 einer Kokultur von Maus-Osteoblasten und -osteoklasten auf Knochen, im zellkulturbeschichteten Well und auf den Discs „LCM 3“, „LCM 3H“, „LCM 4“ und „LCM 6.1“.

A: Anzahl reifer Osteoklasten in den einzelnen Gruppen, ermittelt durch TRAP-Färbung und Zählen der Zellen unter dem Mikroskop. Die Balken repräsentieren die ermittelte Anzahl an reifen Osteoklasten, wobei ein reifer Osteoklast als TRAP-positive Zelle mit mindestens drei Kernen definiert wurde (Bellido et al., 2014); 2 Experimente à n = 3 pro Gruppe.

B: Relative TRAP-Aktivität: Die Balken zeigen die berechnete Konzentration von TRAP-Einheiten, wobei der Wert der Kontrollgruppe „K“ (Kokultur im zellkulturbeschichteten Well) gleich 1 gesetzt wurde; 4 Experimente à n = 3 pro Gruppe.

Abkürzungen: Kno = Kontrollgruppe: Kokultur auf Knochenplättchen, K = Kontrollgruppe: Kokultur im zellkulturbeschichteten Well, TRAP = tartratesistente saure Phosphatase.

* Wert von „LCM 4“ signifikant höher als von „LCM 3H“ ($p < 0,05$).

3.1.3.1 Untersuchung der Entstehung von reifen Osteoklasten

Nach der Durchführung der TRAP-Färbung am Tag 7 der Kokultur wurden die reifen Osteoklasten unter dem Mikroskop gezählt. In der Gruppe „LCM 4“ ließ sich eine signifikant höhere Zahl an reifen Osteoklasten als in der Gruppe „LCM 3H“ erkennen. Sonst gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Abb. 15A). Die in Abb. 16 gezeigten Fotos stellen repräsentative Ausschnitte der Wells aus den

jeweiligen Gruppen dar. Es ist zu sehen, dass, wie schon bei den Osteoblastenfärbungen beschrieben, die Zellen auf den Discs „LCM 3H“ in Strängen angeordnet waren.

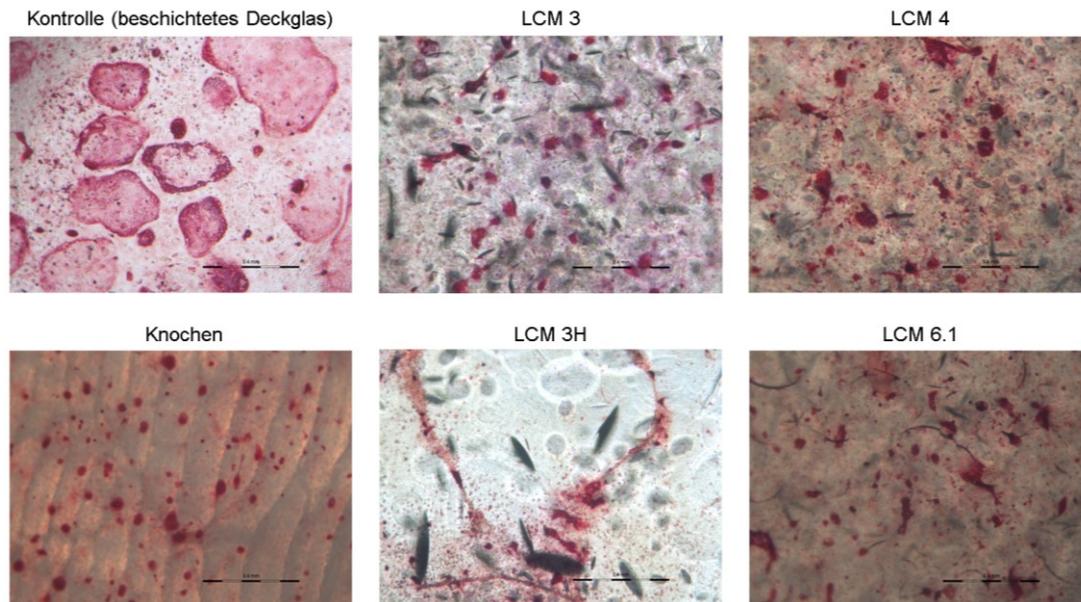


Abb. 16: Repräsentative Ausschnitte nach der TRAP-Färbung am Tag 7, im Rahmen eines Kokulturrexperiments in den Kontrollgruppen und auf den Discs „LCM 3“, „LCM 4“ und „LCM 6.1“. Länge des Balkens: 0,4 mm.

3.1.3.2 Untersuchung der TRAP-Aktivität

Bei der TRAP-Aktivitätsbestimmung am Tag 7 konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt werden (Abb. 15B).

3.2 In-vitro-Charakterisierung der TiHA-Discs

Die Oberfläche der TiHA-Discs war im Vergleich zu jener der LCM-Discs hydrophober: Nach dem Auftropfen des Mediums im Rahmen des Drop-Seedings zerflossen die Tropfen auf den TiHA-Discs gar nicht. Auf den Knochenplättchen und den Zellkultur-Deckgläsern verteilte sich der Tropfen hingegen gut über die gesamte Oberfläche.

Auffallend während der Experimente war, dass sich das Medium in den Gruppen „TiHA 5%“, „TiHA 20%“ und „TiHA 50%“ während der Kultur gelb färbte, was einen sauren pH-Wert anzeigt (Abb. 17).

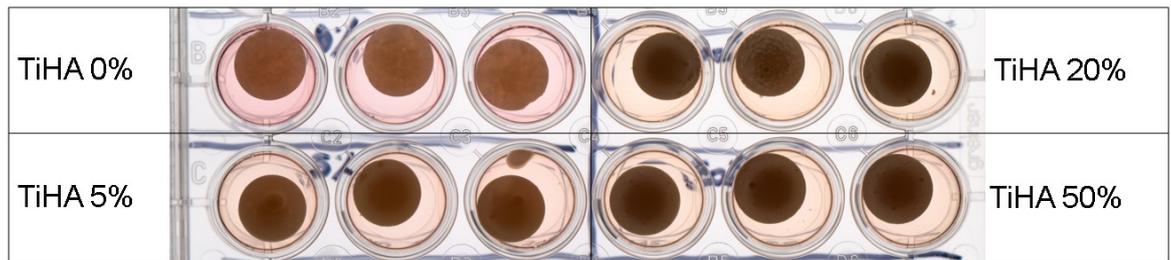


Abb. 17: Scan der Zellkulturplatte während der Vorinkubation: „TiHA 0%“, „TiHA 5%“, „TiHA 20%“ und „TiHA 50%“-Discs in Kulturmedium nach 24 Stunden Inkubation bei 37°C und 5% CO₂.
Anmerkung: Der dunkle Fleck in Well 3 der Gruppe „TiHA 5%“ ist ein abgesplitteter Teil der Disc.

3.2.1 Viabilität primärer Maus-Osteoblasten auf TiHA-Discs

Im Rahmen des WST-1-Viabilitätstests wurde am Tag 1 eine signifikant niedrigere Viabilität in den TiHA-Gruppen und der Knochengruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe auf zellkulturbehandeltem Plastik festgestellt (Abb. 18). Allerdings waren die Werte der Zellen auf den TiHA-Discs noch stärker reduziert. Daran änderte sich auch bis Tag 7 nichts, woraufhin das Experiment aufgrund der Annahme, dass die Zellen auf den Discs abgestorben waren, abgebrochen werden musste und eine Optimierung der Osteoblastenaussaat notwendig wurde.

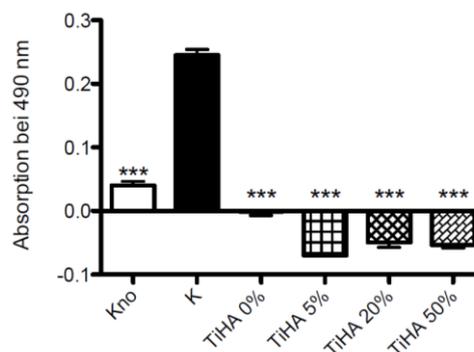


Abb. 18: Zellviabilität von primären Maus-Osteoblasten auf zellkulturbeschichteten Deckgläsern, Knochen und auf den Discs „TiHA 0%“, „TiHA 5%“, „TiHA 20%“ und „TiHA 50%“ am Tag 1, ermittelt mit dem WST-1-Test.

Die Balken repräsentieren die Absorption der Proben bei 490 nm; 1 Experiment à n=3 pro Gruppe.

Abkürzungen: Kno = Knochen: Osteoblasten kultiviert auf Knochenplättchen, K = Kontrollgruppe: Osteoblasten kultiviert auf zellkulturbeschichteten Deckgläsern

*** Wert signifikant niedriger als in der Gruppe „K“ (p < 0,001).

3.2.2 Optimierung der Osteoblastenaussaat auf die Discs

Zunächst wurde untersucht, welche Art von Vorbehandlung der Discs die höchste Effizienz in der Zellaussaat zur Folge hat. Hierfür wurden Discs der Gruppe „TiHA 0%“ verschieden vorbehandelt (Tabelle 7).

Die Effizienz der Zellaussaat wurde am Tag 1 bestimmt, zwischen den einzelnen Arten der Vorbehandlung konnten in zwei Experimenten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Abb. 19). Die höchste Effizienz wurde ohne

Vorbehandlung erzielt, daher wurde diese Vorgehensweise für die weiteren Untersuchungen ausgewählt.

Gruppenbezeichnung	Vorbehandlung
„24h“	24-stündige Inkubation in Kulturmedium
„3h“	3-stündige Inkubation in Kulturmedium
„waschen“	Einmaliges Waschen mit Kulturmedium
„keine“	Keine Vorbehandlung

Tabelle 7: Beschreibung der im Rahmen der Optimierung der Zellaussaat auf TiHA-Discs getesteten Varianten der Vorbehandlung.

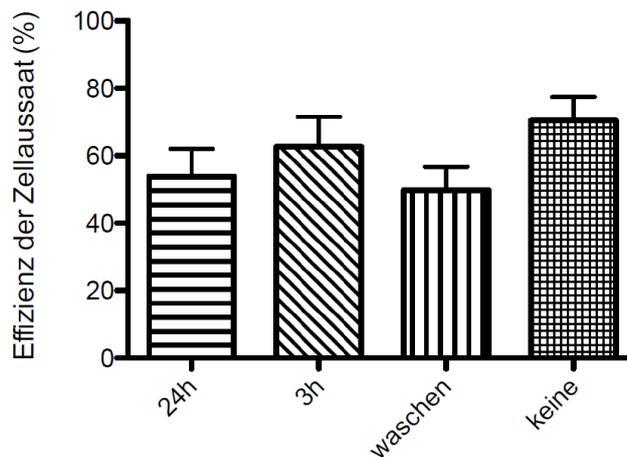


Abb. 19: Effizienz der Aussaat von primären Maus-Osteoblasten auf Discs der Gruppe „TiHA 0%“, nach verschiedenen Arten der Vorbehandlung (vgl. Tabelle 7).

Die Balken geben die Effizienz der Zellaussaat an, die wie in Formel 2 in Kapitel 2.2.3.1 angegeben berechnet wurde; 2 Experimente à n=3 pro Gruppe.

Abkürzungen: 24h: 24-stündige Vorinkubation der Discs in Kulturmedium, bei 37°C und 5% CO₂, 3h: dreistündige Vorinkubation der Discs in Kulturmedium, bei 37°C und 5% CO₂, waschen: einmaliges Waschen der Discs in Kulturmedium, keine: keine Vorbehandlung.

Nachfolgend war es das Ziel, den Zeitpunkt zu bestimmen, an dem die Osteoblasten auf den TiHA-Discs konfluent sind. Da die Zellen in der Kontrollgruppe auf zellkulturbeschichtetem Plastik bereits am Tag 1 konfluent waren (Abb. 20A), wurden die Zelldichten auf den Discs zu diesem Zeitpunkt gemessen und mit der angestrebten Zieldichte von 114000 Zellen/cm² verglichen. Für ein preliminäres Experiment wurden aus Gründen der Materialknappheit die Discs des oben beschriebenen abgebrochenen WST-1-Experiments mit PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ gewaschen, getrocknet und wiederverwendet. In diesem Experiment konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der angestrebten Zieldichte und der Dichte der Osteoblasten in den einzelnen Discgruppen festgestellt werden (Abb. 20B).

Bei der Wiederholung des Experiments mit frischen Discs war jedoch die ermittelte Osteoblastendichte auf den Discs „TiHA 0%“, „TiHA 5%“ und „TiHA 20%“ signifikant geringer als die angestrebte Dichte von 114000 Zellen/cm² (Abb. 20C). Zu erwähnen

ist, dass auch die Dichte der Osteoblasten auf zellkulturbeschichtetem Plastik deutlich unter der angestrebten Dichte lag, allerdings war dieser Unterschied nicht signifikant.

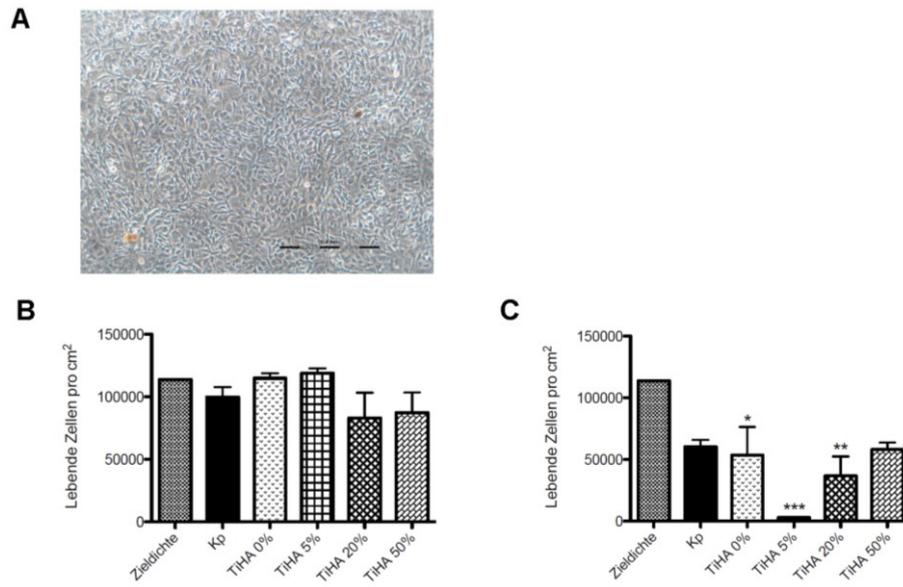


Abb. 20: Zelldichte von primären Maus-Osteoblasten in Kulturmedium, Mineralisationsmedium und auf den Discs „TiHA 0%“, „TiHA 5%“, „TiHA 20%“ und „TiHA 50%“ am Tag 1.

A: repräsentativer Ausschnitt von Osteoblasten kultiviert im zellkulturbeschichteten Well am Tag 1; Länge des Balkens: 0,4 mm.

B und C: Zelldichte in den einzelnen Gruppen; die Balken stellen die Zahl der lebenden Zellen pro cm² dar. In B wurden die Discs 7 Tage lang vorinkubiert und vor der Zellaussaat getrocknet, in C wurden frische, nicht vorinkubierte Discs verwendet; jeweils 1 Experiment à n=3 pro Gruppe.

Abkürzungen: Kp = Kontrollgruppe Plastik: Osteoblasten kultiviert im zellkulturbeschichteten Well.

* Wert signifikant niedriger als Zieldichte ($p < 0,05$); ** Wert signifikant niedriger als Zieldichte ($p < 0,01$);

*** Wert signifikant niedriger als Zieldichte ($p < 0,001$).

3.2.3 Kokultur von Maus-Osteoblasten und Maus-Osteoklasten auf TiHA-Discs

3.2.3.1 Untersuchung der TRAP-Aktivität

Im Vergleich zur Kontrolle am zellkulturbeschichteten Deckglas war die TRAP-Aktivität am Tag 7 in der Knochen-Gruppe etwa gleich hoch, in den TiHA-Gruppen jedoch signifikant reduziert (Abb. 21A). Bei einem weiteren Experiment, bei dem die Discs vor der Osteoblastenaussaat drei Tage lang in Zellkulturmedium vorinkubiert worden waren, war die TRAP-Aktivität auf den Discs zwar noch immer signifikant niedriger als in der Kontrolle, aber höher als ohne Vorinkubation (Abb. 21B).

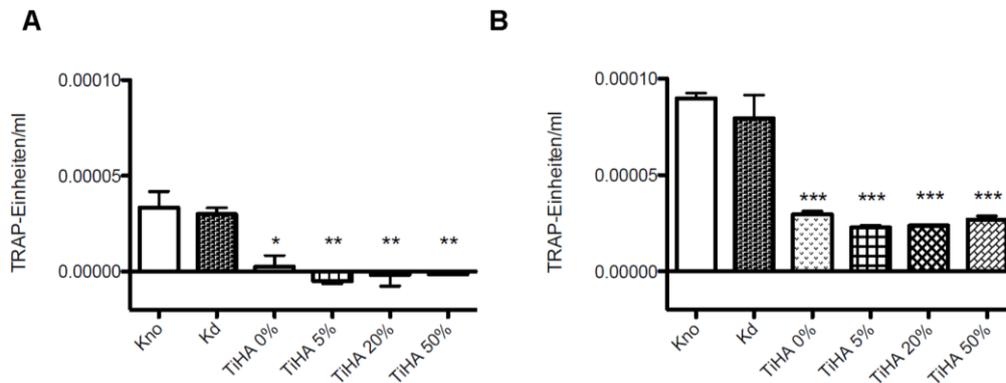


Abb. 21: TRAP-Aktivität von Maus-Osteoklasten aus Kokultur auf Knochen, zellkulturbeschichtetem Deckglas und auf den Discs „TiHA 0%“, „TiHA 5%“, „TiHA 20%“ und „TiHA 50%“ am Tag 7.

Die Balken zeigen die Zahl der TRAP-Einheiten pro ml, berechnet nach Formel 1 in Kapitel 2.2.2.3.

A: TRAP-Aktivität am Tag 7 auf frischen, nicht vorinkubierten Discs; 1 Experiment à n = 3 pro Gruppe.

B: TRAP-Aktivität am Tag 7 auf Discs, die drei Tage lang in Kulturmedium vorinkubiert wurden; 1 Experiment à n = 3 pro Gruppe.

Abkürzungen: Kno = Kontrollgruppe Knochen: Kokultur von Maus-Osteoblasten und Osteoklasten auf Knochenplättchen, Kd = Kontrollgruppe Deckglas: Kokultur von Maus-Osteoblasten und Osteoklasten auf zellkulturbeschichteten Deckgläsern.

* Wert signifikant niedriger als in „Kd“ (p < 0,05); ** Wert signifikant niedriger als in „Kd“ (p < 0,01); *** Wert signifikant niedriger als in „Kd“ (p < 0,001).

3.2.3.2 Untersuchung der Entstehung von reifen Osteoklasten

Am Tag 7 wurde außerdem eine TRAP-Färbung durchgeführt. Ohne Vorinkubation konnten auf den TiHA-Discs kaum reife Osteoklasten entstehen, es wurde daher vor der Osteoblastenaussaat eine dreitägige Vorinkubation der Discs in Kulturmedium (37°C, 5% CO₂) durchgeführt. Die Anzahl reifer Osteoklasten auf Knochen unterschied sich im Vergleich zu jener am beschichteten Deckglas nicht, auf den Discs entstanden signifikant weniger reife Osteoklasten als am Deckglas (Abb. 22).

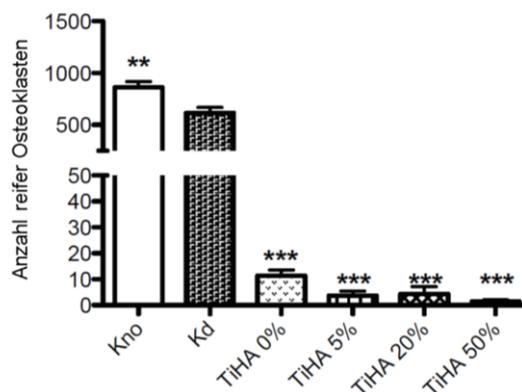


Abb. 22: Reife Maus-Osteoklasten aus Kokultur mit Maus-Osteoblasten auf Knochen, zellkulturbeschichtetem Deckglas und auf den Discs „TiHA 0%“, „TiHA 5%“, „TiHA 20%“ und „TiHA 50%“ am Tag 7, ermittelt durch TRAP-Färbung und Zählen der Zellen unter dem Mikroskop.

Die Balken repräsentieren die Anzahl an reifen Osteoklasten, wobei ein reifer Osteoklast als TRAP-positive Zelle mit mindestens drei Kernen definiert wurde (Bellido et al., 2014); 1 Experiment à n = 3 pro Gruppe.

Abkürzungen: Kno = Kontrollgruppe Knochen: Kokultur von Maus-Osteoblasten und Osteoklasten auf Knochenplättchen, Kd = Kontrollgruppe Deckglas: Kokultur von Maus-Osteoblasten und Osteoklasten auf zellkulturbeschichteten Deckgläsern.

** Wert signifikant höher als in „Kd“ (p < 0,01); *** Wert signifikant niedriger als in „Kd“ (p < 0,001).

4 Diskussion und Conclusio

Die Zielsetzung dieser Arbeit war die In-vitro-Charakterisierung der LCM- bzw. TiHA-Discs durch Beurteilung der Viabilität und Differenzierungsfähigkeit von primären Maus-Osteoblasten auf den Discs, sowie durch Analyse der Entstehung von Osteoklasten auf den Discs im Kokulturmodell mit Osteoblasten.

4.1 In-vitro-Charakterisierung der LCM-Discs

Die Viabilität der Osteoblasten auf den LCM-Discs wurde am Tag 1, 3, 7, 10 und 14 mit dem PrestoBlue®-Assay bestimmt. In Abb. 8 und Abb. 9 wurde der Mittelwert von Tag 1 jeder Gruppe gleich 1 gesetzt. Durch diese Normierung kann der Verlauf der Zellviabilität in den verschiedenen Gruppen verglichen werden, unabhängig von der Zellzahl auf den Discs. So kann der Einfluss der Discs auf die Zellproliferation untersucht werden.

In der Gruppe „Kulturmedium/ohne Disc“ proliferierten die Zellen kontinuierlich bis zu Tag 14, bei Zugabe von Mineralisationsmedium folgte auf eine anfängliche Proliferation (bis Tag 3-7) eine vermehrte Differenzierung der Osteoblasten und eher wenig Proliferation, wodurch die Viabilität der Zellen abnahm. Da die LCM-Gruppen auch mit Mineralisationsmedium behandelt wurden, ist hier auch derselbe Trend wie in der Gruppe „Mineralisationsmedium/ohne Disc“ erkennbar.

Wird nun nicht auf den Mittelwert von Tag 1 normiert, sondern vergleicht man die absolute Zellviabilität der verschiedenen experimentellen Gruppen zu einem bestimmten Zeitpunkt (Abb. 10), so lässt sich vermuten, dass die Osteoblasten an der Oberfläche der Discs „LCM 3H“ weniger gut haften als auf jener der anderen Discs, denn hier war die Zellviabilität am Tag 1 signifikant niedriger als auf „LCM 4“ und „LCM 6.1“. Allerdings wurde dieses Defizit bis zu Tag 7 durch Proliferation aufgeholt, sodass dann kein signifikanter Unterschied zu den anderen Gruppen sichtbar war.

Für die Analyse der Differenzierungsfähigkeit der Osteoblasten auf den einzelnen Discs wurden einerseits die ALP-Färbung und die ALP-Aktivitätsbestimmung am Tag 7 durchgeführt, andererseits wurde die Mineralisationsfähigkeit der Zellen am Tag 14 mittels ARS-Färbung und Von-Kossa-Färbung bewertet.

Die ALP ist ein vielverwendeter Differenzierungsmarker für Osteoblasten (Wang et al., 2015). Anhand der Gruppen ohne Discs ist ersichtlich, dass das Experiment prinzipiell funktionierte, denn die Färbung war in der Gruppe „Mineralisationsmedium/ohne Disc“ viel intensiver als in der Gruppe

„Kulturmedium/ohne Disc“. Dies entspricht auch den Ergebnissen der Gruppen ohne Discs bei der ALP-Aktivitätsbestimmung. Auch die Resultate der ALP-Aktivitätsbestimmung der Gruppen „LCM 3“, „LCM 4“ und „LCM 6.1“ stimmen mit denen der ALP-Färbung überein: Die ALP-Konzentrationen dieser LCM-Gruppen lagen etwas unter denen der Gruppe „Mineralisationsmedium/ohne Disc“.

Der Wert der Gruppe „LCM 3H“ war allerdings signifikant höher als jener der anderen LCM-Gruppen, was die Analyse der Färbung mit dem Auge nicht sofort vermuten ließ. Möglicherweise wird das Auge durch die Anordnung der Zellen in Strängen getäuscht, denn dadurch entstehen große ungefärbte Zwischenräume zwischen den intensiv gefärbten Stellen.

Wären weniger Zellen auf den Discs „LCM 3H“ als auf den anderen Discs, könnte das die flächenmäßig geringe, aber sehr intensive Färbung und die hohe ALP-Konzentration erklären. Hierzu können die Analysen des CyQUANT®-Assays und des PrestoBlue®-Assays herangezogen werden. Laut PrestoBlue®-Assay existierte nur am Tag 1 eine signifikant niedrigere Zellviabilität in der Gruppe „LCM 3H“, verglichen mit „LCM 4“ und „LCM 6.1“. Am Tag 7, an dem auch die ALP-Aktivitätsbestimmung durchgeführt wurde, war diese Signifikanz jedoch nicht mehr gegeben. Auch im CyQUANT®-Assay konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Zellzahl gefunden werden. Tendenziell war aber die Zellzahl in der Gruppe „LCM 3H“ am geringsten.

Zu klären wäre auch, ob das Heparin-Coating mit der ALP-Aktivitätsbestimmung interferiert. Es könnte die ALP-Aktivitätsbestimmung mit „LCM 3“ und „LCM 3H“, jeweils ohne Zellen, durchgeführt werden. Danach müsste analysiert werden, ob der resultierende Wert der Gruppe „LCM 3H“ von vornherein höher ist als bei „LCM 3“.

Die Discs „LCM 3H“ wurden mit dem Heparin-Coating versehen, um die Adhäsion von Zellen an der Discoberfläche zu fördern. Diese Eigenschaft von Heparin wird auch in der Literatur erwähnt (Gumusderelioglu und Aday, 2011). Außerdem erhöht Heparin die Aktivität des osteoanabolen Proteins BMP-2, wie unter anderem eine Studie an Zellen der Maus-Osteoblasten-Zelllinie MC3T3 E1 zeigte: Die ALP-Färbung der Zellen war bei Behandlung mit BMP-2 und Heparin intensiver als bei Behandlung mit BMP-2 alleine (Takada et al., 2003).

Eine höhere ALP-Aktivität durch Heparin-Coating wurde laut Literatur bei MC3T3-E1-Zellen (Maus-Osteoblastenzelllinie) auf Chitosan-Scaffolds am Tag 15 und 21 beobachtet (Gumusderelioglu und Aday, 2011). Allerdings erklärt diese Tatsache nicht, wieso in der Gruppe „LCM 3H“ nur die ALP-Aktivität laut ALP-

Aktivitätsbestimmung so hoch war und die ALP-Färbung in der Gruppe „LCM 3H“ nicht dementsprechend intensiver war als in der Gruppe „LCM 3“.

Außerdem gibt es auch Berichte, wonach Heparin die Proliferation und Mineralisationsfähigkeit von osteoblastenähnlichen Zellen hemmen kann, zum Beispiel in Experimenten mit der Zelllinie Saos-2 (Hausser und Brenner, 2004). Hier wurde eine inhibitorische Wirkung bei hohen Dosen von Heparin beobachtet, während niedrige Dosen keine Beeinträchtigung der Zellen zur Folge hatten.

Die ARS-Färbung, die häufig für die Beurteilung der Differenzierung und Mineralisationsfähigkeit der Osteoblasten verwendet wird (Saito et al., 2014), bestätigt, dass Osteoblasten in der Gruppe „Mineralisationsmedium/ohne Disc“ deutlich stärker differenziert waren als in der Gruppe „Kulturmedium/ohne Disc“. Die Färbung und somit auch die Mineralisationsfähigkeit war in der Gruppe „Mineralisationsmedium/ohne Disc“ deutlich höher als in der Gruppe „Kulturmedium/ohne Disc“. Die Werte der Gruppen „LCM 4“ und „LCM 6.1“ waren signifikant höher als die von „Mineralisationsmedium/ohne Disc“, was eine Übereinstimmung mit dem PrestoBlue®-Assay vermuten lässt: Dass die Abnahme der Viabilität ab Tag 3 in den Gruppen „LCM 4“ und „LCM 6.1“ noch stärker war als bei „LCM 3“ und „LCM 3H“, könnte daran liegen, dass in diesen Gruppen eine noch ausgeprägtere Differenzierung stattgefunden hat als in den Gruppen „LCM 3“ und „LCM 3H“.

Die Ergebnisse der ARS-Färbung werden durch die Von-Kossa-Färbung bestätigt. Mit der Von-Kossa-Färbung kann deponiertes Calciumphosphat angefärbt und somit eine Mineralisation nachgewiesen werden (Sa et al., 2016). Auch hier waren die Osteoblasten auf den Discs „LCM 4“ und „LCM 6.1“ deutlich stärker zur Mineralisation befähigt als auf den Discs „LCM 3“ und „LCM 3H“.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Osteoblasten auf „LCM 4“ und „LCM 6.1“ besser ausdifferenziert waren als auf den Discs „LCM 3“ und „LCM 3H“. Dies wurde mittels ALP-Färbung, ARS-Färbung und Von-Kossa-Färbung gezeigt. Einzig bei der ALP-Aktivitätsbestimmung war der Wert der Discs „LCM 3H“ signifikant höher als der aller anderen LCM-Discs. Trotzdem sprechen die Osteoblastenexperimente an den LCM-Discs insgesamt für den Einsatz der Discs „LCM 4“ oder „LCM 6.1“ als Scaffolds im Rahmen der Frakturheilung, weil sie die Differenzierung von Osteoblasten stärker fördern als die Discs „LCM 3“ oder „LCM 3H“.

Anzumerken ist, dass die Discs „LCM 4“ und „LCM 6.1“ deutlich härter beschaffen sind als die Discs „LCM 3“ und „LCM 3H“, die recht biegsam und flexibel und daher besser einsetzbar sind. Von den Osteoblasten wurden offenbar die härteren Varianten der LCM-Discs bevorzugt. In in der Literatur beschriebenen Experimenten mit humanen Osteoblasten auf Polymerdiscs mit unterschiedlicher Steifheit fand auf steiferen Materialien eine vermehrte Expression von osteoblastentypischen Genen statt (Olivares-Navarrete et al., 2017), was die in den hier beschriebenen Versuchen angestellten Beobachtungen zusätzlich untermauert.

Bei allen Färbungen war auffällig, dass die Zellen auf den Discs „LCM 3H“ anders angeordnet waren als auf den übrigen LCM-Discs. Während die Osteoblasten in den Gruppen „LCM 3“, „LCM 4“ und „LCM 6.1“ relativ regelmäßig über die ganze Discoberfläche verteilt waren, waren sie auf den Discs „LCM 3H“ nur entlang von Strängen und in Aggregaten angeordnet. Die Vermutung, dass dieses Verhalten durch das Coating der Discs „LCM 3H“ mit Heparin verursacht wird, liegt nahe. Tatsächlich wurden bereits ähnliche Veränderungen der Zellanordnung in Gegenwart von Heparin beschrieben: Bei der Präadipozyten-Zelllinie 3T3L1 wurde unter Einwirkung von Heparin eine vermehrte Bildung von Zellaggregaten und -klumpen beobachtet, die mit steigender Dosis stärker ausgeprägt war. Die Autoren der Publikation führen diese Beobachtung auf durch Heparin geschwächte Zell-Matrix-Interaktionen zurück (Luo et al., 2008).

TRAP stellt einen Marker dar, der häufig für den Nachweis dient, dass die Zelldifferenzierung Richtung Osteoklasten gelenkt wurde (Heinemann et al., 2011). Betrachtet man die TRAP-Färbung, so ist ersichtlich, dass die Discs „LCM 4“ am geeignetsten für das Entstehen von reifen Osteoklasten sind, gefolgt von „LCM 3“, die Gruppen „LCM 6.1“ und vor allem „LCM 3H“ schneiden schlechter ab. Bei der TRAP-Aktivität gab es allerdings keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Diese Tatsache lässt vermuten, dass es zwar in allen Gruppen zum Entstehen von TRAP-positiven Osteoklastenvorstufen kam und daher die TRAP-Aktivität überall ähnlich war, in den Gruppen „LCM 3“ und vor allem „LCM 4“ jedoch mehr Vorstufen fusionierten und dadurch mehr reife Osteoklasten entstanden.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Discs „LCM 4“ und „LCM 6.1“ in den Osteoblastenexperimenten am besten abschnitten und für die Osteoklastogenese die Discs „LCM 3“ und „LCM 4“ am geeignetsten waren. Daher gehen die Discs „LCM 4“ aus diesen Experimenten als die vielversprechendsten Kandidaten für Scaffolds, die in defekte Stellen des Knochens eingesetzt werden können, hervor. Der Nachteil der Discs „LCM 4“ in der Praxis ist allerdings ihre geringe Biegsamkeit. Ein weiches

Material hat den Vorteil, dass es einfacher in die defekte Stelle eingesetzt werden kann. Daher wurden für weiterführende In-vivo-Experimente als Kompromiss die Discs „LCM 3“ ausgewählt.

4.2 In-vitro-Charakterisierung der TiHA-Discs

Die Viabilität von Osteoblasten auf den TiHA-Discs wurde mit dem WST-1-Viabilitätstest ermittelt. Die TiHA-Discs schienen jedoch einen sehr negativen Einfluss auf die Zellviabilität zu haben – bereits am Tag 1 waren die Werte äußerst stark reduziert und blieben das auch im weiteren Verlauf, woraus geschlossen wurde, dass die Osteoblasten abgestorben waren. Daher wurde versucht, die Zellaussaat auf die Discs zu optimieren, um die Discs doch noch an Osteoblasten austesten zu können.

Man könnte annehmen, dass Zellen sich an vorbefeuchtete und daher besser benetzbare Discs leichter anheften können als an trockene. Es wurde beispielweise berichtet, dass humane Stromazellen des Knochenmarks auf besser benetzbaren Polymermaterialien in höherem Ausmaß adhäreren als auf weniger benetzbaren (Kim et al., 2007). Um einen eventuellen Effekt einer Vorbefeuchtung der Discs vor der Zellaussaat zu untersuchen, wurden verschieden lange Disc-Vorbehandlungen mit Kulturmedium ausgetestet. Wie bereits beschrieben stellte sich jedoch heraus, dass die Discs vor der Aussaat, um eine möglichst hohe Effizienz der Zellaussaat erzielen zu können, am besten gar keiner Vorbehandlung unterzogen werden sollten.

Für das folgende Experiment, das zum Ziel hatte, den Zeitpunkt zu bestimmen, an dem Konfluenz der Osteoblasten auf den Discs gegeben ist, wurden allerdings die Discs aus dem WST-1-Experiment wiederverwendet. Da die Zellen, wie bereits erläutert, während des WST-1-Experiments abgestorben waren, wurden die Discs nur mit PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} gereinigt, danach getrocknet und wiederverwendet. Sie wurden also direkt vor der erneuten Zellaussaat nicht befeuchtet, befanden sich aber während des WST-1-Experiments bereits sieben Tage lang in Kulturmedium, was ihre Eigenschaften verändert haben könnte. Aus Mangel an Discs zu diesem Zeitpunkt wurden sie aber dennoch wiederverwendet. Auf diesen Discs konnte die erwünschte Zieldichte an Zellen am Tag 1 nach der Aussaat erreicht werden.

Bei der Wiederholung dieses Experiments mit frischen, noch nicht verwendeten Discs war jedoch die Dichte der Osteoblasten auf „TiHA 0%“, „TiHA 5%“ und „TiHA 20%“ sogar signifikant niedriger als die angestrebte Zieldichte von 114000 Zellen/cm². Allerdings schienen sich die Zellen in diesem Experiment generell schlechter anzuheften und weniger zu proliferieren, denn auch in der Kontrollgruppe am

zellkulturbeschichteten Plastik wurde die angestrebte Dichte nicht erreicht. Die ermittelte Dichte war hier jedoch nicht signifikant niedriger als die angestrebte Dichte. Die Ergebnisse des WST-1-Experiments und der nachfolgend beschriebenen Kokultorexperimente deuten aber eher darauf hin, dass die Beschaffenheit der TiHA-Discs der Grund für die niedrige Zelldichte war und nicht die sich anscheinend weniger gut anheftenden und weniger stark proliferierenden Zellen im eben beschriebenen Experiment.

Alle TiHA-Discs, auch diejenigen mit 0% Titan, schnitten in den Kokultorexperimenten sehr schlecht ab: Die TRAP-Aktivität war auf „TiHA 5%“, „TiHA 20%“ und „TiHA 50%“ stark reduziert und reife Osteoklasten waren auf den Discs kaum zu finden, während die Kokultur an sich gut funktionierte, wie die Werte der Kontrollgruppen auf Knochen und zellkulturbeschichtetem Deckglas beweisen. Die kaum vorhandene Osteoklastogenese könnte dadurch verursacht worden sein, dass die Osteoblasten auf den Discs nicht optimale Bedingungen vorfanden und dadurch kaum M-CSF und RANKL bilden konnten.

Während der Kultur wurde festgestellt, dass der pH-Wert des Mediums in den Wells aller Titan enthaltenden Discs sank. Ein Absinken des pH-Wertes könnte auch eine Kontamination der Kultur, beispielsweise mit Pilzen, zur Ursache haben. Allerdings ist dabei das Medium meistens auch getrübt, was hier nicht der Fall war. Außerdem war diese Senkung des pH-Wertes nur bei den Discs „TiHA 5%“, „TiHA 20%“ und „TiHA 50%“ zu beobachten, nicht jedoch bei „TiHA 0%“ und den Kontrollen. Vor allem in den Kontrollen konnte keine Einschränkung der Zellproliferation oder Zelldifferenzierung festgestellt werden. Da sich eine Kontamination oft auf viele Wells einer Platte ausbreiten kann, es aber ein recht großer Zufall sein muss, dass immer nur die Wells mit Titan enthaltenden Discs betroffen waren, kann eine Kontamination mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

Eine andere mögliche Erklärung für den pH-Abfall im Medium wäre das Herauslösen einer sauren Komponente aus den Discs. In der Literatur lassen sich Berichte über pH-Wert-Senkung des Mediums durch Hydroxyapatit finden. Durch den geänderten pH-Wert wird auch die Menge an auf der Discoberfläche adsorbierten Proteinen beeinflusst (Sharpe et al., 1997). Es wäre vorstellbar, dass dies auch Auswirkungen auf die Fähigkeit der Zellen, sich auf den Discs anzuheften, hat. In Experimenten mit Ratten-Osteoblasten auf Calciumphosphat-Materialien und kombinierten Materialien aus Calciumphosphat und Kollagen, bei denen der pH-Wert des Kulturmediums auch durch die Biomaterialien sank, wurde festgestellt, dass Osteoblasten unter diesen Umständen in ihrer Proliferations- und Differenzierungsfähigkeit beeinträchtigt

werden. Selbst wenn sich die Zellen nicht direkt auf den genannten Materialien, sondern nur gemeinsam mit diesen im selben Medium befanden, war eine Hemmung der Proliferation und Differenzierung zu erkennen (Hempel et al., 2004). Eine verstärkte Apoptose der Osteoblasten wurde in diesen Publikationen aber nicht beschrieben (Brandao-Burch et al., 2005).

Der starke pH-Wert-Abfall wurde allerdings nur bei den Titan enthaltenden Discs beobachtet, nicht aber bei „TiHA 0%“. Trotzdem schnitten die Discs „TiHA 0%“ in den Experimenten nicht besser ab als die übrigen TiHA-Discs.

Dass eine saure Komponente aus den Discs herausgelöst wird und die Osteoblasten in ihrer Proliferation und Differenzierung hemmt, könnte erklären, warum die Zelldichte auf den wiederverwerteten Discs des WST-1-Experiments höher war als auf frischen Discs. Um dieser Vermutung näher auf den Grund zu gehen, wurde ein Kokultorexperiment mit Discs durchgeführt, die vor der Zellaussaat drei Tage lang in Kulturmedium vorinkubiert wurden. Es sollte sich während der Vorinkubation möglichst viel dieser sauren Komponente herauslösen, die Zellen wurden dann in frischem Medium ausgesät und waren somit einer geringeren Konzentration der Substanz ausgesetzt. Hier war die TRAP-Aktivität in den Disc-Gruppen zwar noch immer signifikant geringer als in den Kontrollgruppen, aber die Werte waren höher als ohne Vorinkubation, was ein Hinweis darauf sein kann, dass die Theorie um die herausgelöste saure Komponente stimmt.

Die genaue Beschaffenheit der TiHA-Discs sowie das Herstellungsverfahren sind unserer Arbeitsgruppe nicht zugänglich, die Discs werden von einem Kooperationspartner hergestellt (Kapitel 2.1.2). Somit können nur bedingt Vorschläge für die Verbesserung der TiHA-Discs gemacht werden.

Einerseits könnte versucht werden, die Zusammensetzung der Discs so zu verändern, dass es zu keiner Ansäuerung des Mediums mehr kommt. Ist dies nicht möglich, so besteht auch die Option, die Oberfläche der Discs für Osteoblasten attraktiver zu machen, sodass sie sich, dem niedrigen pH-Wert zum Trotz, besser an die Discs anheften können. Dies kann eventuell durch ein Coating erreicht werden. Laut Literatur eignen sich für Hydroxyapatit-Materialien etwa Natriumalginat- oder Chitosan-Coatings (Dubnika et al., 2012). Auch das Anbringen von Kollagen auf der Oberfläche von Calciumphosphat-Discs fördert das Anheften von Zellen und die Ausdifferenzierung von Osteoblasten (Yang et al., 2016). Für Titanoberflächen gibt es zum Beispiel die Möglichkeit, sie mit einem Silika-Sol-Gel-Coating zu versehen und so die Osteoinduktivität zu steigern (Lara-Sáez et al., 2014). Da die TiHA-Discs

sowohl einen Titan- als auch einen Hydroxyapatitanteil haben, müsste ausprobiert werden, welche Arten von Coatings für diese Discs geeignet sind.

Die Beschaffenheit der Discoberfläche ist wesentlich, die Art ihrer Nanostruktur beeinflusst das Differenzierungsverhalten der Osteoblasten (Huang et al., 2016). Weiters fördern miteinander vernetzte Poren die Osteoblasten-Differenzierung und auch die Benetzbarkeit der Oberfläche ist ein weiterer Parameter, der das Anhaften und die Ausdifferenzierung der Zellen beeinflusst, wobei sich Osteoblasten eher auf hydrophilen als auf hydrophoben Oberflächen ausdifferenzieren (Zhang et al., 2014). Wie bereits in Kapitel 3.2 beschrieben, weisen die TiHA-Discs eine hydrophobere Oberfläche auf als die LCM-Discs. Möglicherweise ist dies also auch ein Grund für das schlechte Anheften der Osteoblasten auf den TiHA-Discs.

Nach der Analyse der hier beschriebenen Experimente lässt sich also darauf schließen, dass die TiHA-Discs in dieser Form für die In-vitro-Austestung an Osteoblasten und damit auch in der Kokultur noch nicht geeignet sind und verbessert werden müssen.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden die Lactid-Caprolacton-Methacrylat-Discs „LCM 3“, „LCM 3H“, „LCM 4“ und „LCM 6.1“, sowie die Titan-Hydroxyapatit-Discs „TiHA 0%“, „TiHA 5%“, „TiHA 20%“ und „TiHA 50%“ in vitro an primären Maus-Osteoblasten und in einem Maus-Osteoblasten-Osteoklasten-Kokultursystem ausgetestet. Es sollte der Einfluss der Materialien auf die Proliferations- und Differenzierungsfähigkeit der Osteoblasten bzw. Osteoklasten untersucht werden, um Hinweise zu erhalten, ob sie als Knochenersatzmaterialien geeignet sein könnten.

Während einer zweiwöchigen Kultur von Osteoblasten auf den Discs wurden mehrmals PrestoBlue®- bzw. WST-1-Zellviabilitätstests durchgeführt. Die Expression des Osteoblastenmarkers ALP wurde am Tag 7 durch ALP-Färbung und Bestimmung der ALP-Aktivität untersucht. Am Tag 14 wurde etwaige Mineralisation durch ARS-Färbung und Von-Kossa-Färbung detektiert. Bei den Kokultur-Experimenten wurde am Tag 7 eine TRAP-Färbung bzw. TRAP-Aktivitätsbestimmung durchgeführt.

Auf den LCM-Discs proliferierten die Osteoblasten bis Tag 3-7, gefolgt von vermehrter Differenzierung. Das Ergebnis der ALP-Aktivitätsbestimmung war bei den Discs „LCM 3H“ signifikant höher als das der anderen LCM-Discs, bei denen keine signifikanten Unterschiede festgestellt wurden. Allerdings waren die Zellen bei den Heparin-coateten „LCM 3H“ ungleichmäßig und in Aggregaten angeordnet. Laut ARS-Färbung wurde nur auf „LCM 4“ und „LCM 6.1“ durch die Osteoblasten signifikant mehr Mineral eingelagert als in einer Kontrolle von mit Mineralisationsmedium behandelten Zellen. Diese Ergebnisse wurden mittels Von-Kossa-Färbung bestätigt. Die meisten reifen Osteoklasten entstanden auf „LCM 4“, gefolgt von „LCM 3“. Bei der TRAP-Aktivität gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Auf den TiHA-Discs waren die Messwerte des WST-1-Tests stark reduziert, die Osteoblasten starben ab. Am Ende der Kokultur-Experimente waren kaum reife Osteoklasten detektierbar, möglicherweise aufgrund des Fehlens von differenzierten Osteoblasten. Die TiHA-Discs senkten den pH-Wert des Kulturmediums.

Diese Ergebnisse zeigen, dass unter den LCM-Discs „LCM 4“ sowohl für Osteoblasten als auch für Osteoklasten gut verträglich ist und deren Differenzierung fördert. Da die Discs „LCM 3“ aber biegsamer und besser im Knochendefekt platzierbar sind und in vitro ebenfalls nicht schlecht abschneiden, wurde „LCM 3“ für die In-vivo-Testung ausgewählt. Die TiHA-Discs sind für Osteoblasten nicht gut verträglich und müssen daher noch optimiert werden.

6 Abstract

In this diploma thesis, the lactide-caprolactone-methacrylate discs “LCM 3”, “LCM 3H”, “LCM 4” and “LCM 6.1” and the titanium-hydroxyapatite discs “TiHA 0%”, “TiHA 5%”, “TiHA 20%” and “TiHA 50%” were tested in primary mouse osteoblast culture and in a mouse osteoblast-osteoclast coculture model. The aim was to investigate the discs’ impact on osteoblast proliferation and differentiation and on osteoclast formation, to have an idea whether these materials could be used as bone substitutes.

During a two-week culture period, osteoblast proliferation on the discs was measured via PrestoBlue® assay or WST-1 assay at several points in time. Osteoblast differentiation was analyzed by performing ALP staining and ALP activity assay on day 7 and by investigating mineralization via ARS staining and Von Kossa staining on day 14. Coculture experiments were evaluated on day 7 by TRAP staining and TRAP activity assay.

Osteoblasts were proliferating on LCM discs until day 3-7, followed by differentiation. ALP activity on “LCM 3H” was significantly higher than on all other LCM discs. No significant differences have been detected between these other groups. It has to be mentioned that osteoblasts on “LCM 3H” discs were not regularly distributed like on the other discs, but were organized in strands and aggregates. ARS staining showed significantly more mineralization on “LCM 4” and “LCM 6.1” than in a control group treated with mineralization medium, which was confirmed by Von Kossa staining. The highest number of mature osteoclasts was detected on “LCM 4”, followed by “LCM 3”. There were no significant differences in TRAP activity between the discs, though.

Cell viability of osteoblasts was, according to the WST-1 assay, already reduced on TiHA discs on day 1, the cells died on the discs. At the end of the coculture experiments, almost no mature osteoclasts were detected on the discs, maybe due to the lack of differentiated osteoblasts. Furthermore, the discs lowered the culture medium’s pH.

To sum up, among the LCM discs, especially “LCM 4” seems to be compatible with both osteoblasts and osteoclasts. Since “LCM 3” discs are more flexible and thus easier to handle during implantation, “LCM 3” and not “LCM 4” was chosen for further in vivo testing. The TiHA discs did not prove compatible with osteoblasts and need further optimization.

7 Literaturverzeichnis

- Allen MR, Burr DB. Bone Modeling and Remodeling. In: Burr DB, Allen MR, editors. Basic and Applied Bone Biology: Elsevier Inc.; 2014. p. 75-90. retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/book/9780124160156>
- Ambard AJ, Mueninghoff L. Calcium phosphate cement: review of mechanical and biological properties. *J Prosthodont.* 2006;15(5):321-8.
- Bakker AD, Klein-Nulend J. Osteoblast Isolation from Murine Calvaria and Long Bones. In: Helfrich MH, Ralston SH, editors. Bone Research Protocols, Methods in Molecular Biology. 816: Springer Science+Business Media; 2012. p. 19-29.
- Bellido T, Plotkin LI, Bruzzaniti A. Bone Cells. In: Burr DB, Allen MR, editors. Basic and Applied Bone Biology Elsevier Inc.; 2014. p. 27-45. retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/book/9780124160156>
- Bigam-Sadegh A, Oryan A. Basic concepts regarding fracture healing and the current options and future directions in managing bone fractures. *Int Wound J.* 2015;12(3):238-47.
- BioGenex. SPECIAL STAINS - von Kossa Stain Cat. No. SS045-50K. 2015; retrieved 2.9.2016, from <http://biogenex.com/us/applications/special-stains/special-stains-controls/von-kossa-stain-manual-use-only.html/>
- BioVision. Quick Cell Proliferation Colorimetric Assay Kit. 2013; retrieved 05.09.2016, from <http://www.biovision.com/manuals/K302.pdf>
- Bobyn JD, Stackpool GJ, Hacking SA, Tanzer M, Krygier JJ. Characteristics of bone ingrowth and interface mechanics of a new porous tantalum biomaterial. *J Bone Joint Surg Br.* 1999;81(5):907-14.
- Brandao-Burch A, Utting JC, Orriss IR, Arnett TR. Acidosis inhibits bone formation by osteoblasts in vitro by preventing mineralization. *Calcif Tissue Int.* 2005;77(3):167-74.
- Burr DB, Akkus O. Bone Morphology and Organization. In: Burr DB, Allen MR, editors. Basic and Applied Bone Biology: Elsevier Inc.; 2014. p. 3-25. retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/book/9780124160156>
- Chen G, Yang L, Lv Y. Cell-free scaffolds with different stiffness but same microstructure promote bone regeneration in rabbit large bone defect model. *J Biomed Mater Res A.* 2016;104(4):833-41.
- Correia SI, Pereira H, Silva-Correia J, et al. Current concepts: tissue engineering and regenerative medicine applications in the ankle joint. *J R Soc Interface.* 2014;11(92):20130784.
- Davison NL, Gamblin AL, Layrolle P, Yuan H, de Bruijn JD, Barrere-de Groot F. Liposomal clodronate inhibition of osteoclastogenesis and osteoinduction by submicrostructured beta-tricalcium phosphate. *Biomaterials.* 2014;35(19):5088-97.
- Davison NL, Su J, Yuan H, van den Beucken JJ, de Bruijn JD, Barrere-de Groot F. Influence of surface microstructure and chemistry on osteoinduction and

- osteoclastogenesis by biphasic calcium phosphate discs. *Eur Cell Mater.* 2015;29:314-29.
- Dubnika A, Loca D, Berzina-Cimdina L. Functionalized hydroxyapatite scaffolds coated with sodium alginate and chitosan for controlled drug delivery. *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences.* 2012;61(3):193–9.
- Gomez-Barrena E, Rosset P, Lozano D, Stanovici J, Ermthaller C, Gerbhard F. Bone fracture healing: cell therapy in delayed unions and nonunions. *Bone.* 2015;70:93-101.
- Graney PL, Roohani-Esfahani SI, Zreiqat H, Spiller KL. In vitro response of macrophages to ceramic scaffolds used for bone regeneration. *J R Soc Interface.* 2016;13(120).
- Gumusderelioglu M, Aday S. Heparin-functionalized chitosan scaffolds for bone tissue engineering. *Carbohydr Res.* 2011;346(5):606-13.
- Hausser HJ, Brenner RE. Low doses and high doses of heparin have different effects on osteoblast-like Saos-2 cells in vitro. *J Cell Biochem.* 2004;91(5):1062-73.
- Heinemann C, Heinemann S, Worch H, Hanke T. Development of an osteoblast/osteoclast co-culture derived by human bone marrow stromal cells and human monocytes for biomaterials testing. *Eur Cell Mater.* 2011;21:80-93.
- Hempel U, Reinstorf A, Poppe M, et al. Proliferation and differentiation of osteoblasts on Biocement D modified with collagen type I and citric acid. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2004;71(1):130-43.
- Huang J, Best SM, Bonfield W, Buckland T. Development and characterization of titanium-containing hydroxyapatite for medical applications. *Acta Biomater.* 2010;6(1):241-9.
- Huang Q, Elkhooly TA, Liu X, et al. Effects of hierarchical micro/nano-topographies on the morphology, proliferation and differentiation of osteoblast-like cells. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2016;145:37-45.
- Itzstein C, van 't Hof RJ. Osteoclast Formation in Mouse Co-cultures. In: Helfrich MH, Ralston SH, editors. *Bone Research Protocols, Methods in Molecular Biology.* 816: Springer Science+Business Media; 2012. p. 177-86.
- Jabbarzadeh E, Blanchette J, Shazly T, Khademhosseini A, Camci-Unal G, Laurencin CT. Vascularization of Biomaterials for Bone Tissue Engineering: Current Approaches and Major Challenges. *Current Angiogenesis.* 2012;1(3):180-91.
- Kang HW, Lee SJ, Ko IK, Kengla C, Yoo JJ, Atala A. A 3D bioprinting system to produce human-scale tissue constructs with structural integrity. *Nat Biotechnol.* 2016;34(3):312-9.
- Kim MS, Shin YN, Cho MH, et al. Adhesion behavior of human bone marrow stromal cells on differentially wetttable polymer surfaces. *Tissue Eng.* 2007;13(8):2095-103.
- Kim RW, Kim JH, Moon SY. Effect of hydroxyapatite on critical-sized defect. *Maxillofac Plast Reconstr Surg.* 2016;38(1):26.

- Lara-Sáez I, Martínez-Ibáñez M, Pallá-Rubio B, et al. In vivo study of gelatine functionalized hybrid sol-gel coatings for titanium implants. *Clinical Oral Implants Research*. 2014;25(Suppl. 10):270.
- Lee HB, Alam MR, Seol JW, Kim NS. Tartrate-resistant acid phosphatase, matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in early stages of canine osteoarthritis. *Veterinari Medicina*. 2008;53:214–20.
- LifeTechnologies. PrestoBlue® Cell Viability Reagent Frequently Asked Questions. 2010; retrieved 02.09.2016, from <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/PrestoBlueFAQ.pdf>
- Low KL, Tan SH, Zein SH, Roether JA, Mourino V, Boccaccini AR. Calcium phosphate-based composites as injectable bone substitute materials. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2010;94(1):273-86.
- Luo W, Shitaye H, Friedman M, et al. Disruption of cell-matrix interactions by heparin enhances mesenchymal progenitor adipocyte differentiation. *Exp Cell Res*. 2008;314(18):3382-91.
- Matassi F, Nistri L, Chicon Paez D, Innocenti M. New biomaterials for bone regeneration. *Clin Cases Miner Bone Metab*. 2011;8(1):21-4.
- McCullough KA, Waits CA, Garimella R, Tague SE, Sipe JB, Anderson HC. Immunohistochemical localization of bone morphogenetic proteins (BMPs) 2, 4, 6, and 7 during induced heterotopic bone formation. *J Orthop Res*. 2007;25(4):465-72.
- McNamara LE, McMurray RJ, Biggs MJ, Kantawong F, Oreffo RO, Dalby MJ. Nanotopographical control of stem cell differentiation. *J Tissue Eng*. 2010;2010:120623.
- Miron RJ, Bosshardt DD. OsteoMacs: Key players around bone biomaterials. *Biomaterials*. 2016;82:1-19.
- MolecularProbes. CyQUANT® Cell Proliferation Assay Kit. 2006; retrieved 05.09.2016, from <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp07026.pdf>
- MolecularProbes. EnzChek® Phosphatase Assay Kit (E12020). 2004; retrieved 05.09.2016, from <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp12020.pdf>
- Morelli S, Salerno S, Holopainen J, Ritala M, De Bartolo L. Osteogenic and osteoclastogenic differentiation of co-cultured cells in polylactic acid-nanohydroxyapatite fiber scaffolds. *J Biotechnol*. 2015;204:53-62.
- Niedzwiedzki T, Filipowska J. Bone remodeling in the context of cellular and systemic regulation: the role of osteocytes and the nervous system. *J Mol Endocrinol*. 2015;55(2):R23-36.
- Olivares-Navarrete R, Lee EM, Smith K, et al. Substrate Stiffness Controls Osteoblastic and Chondrocytic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells without Exogenous Stimuli. *PLoS One*. 2017;12(1):e0170312.

- Pagianas CG, Tsakotos GA, Koutsostathis SD, Macheras GA. Osseous integration in porous tantalum implants. *Indian J Orthop.* 2012;46(5):505-13.
- Pederson L, Ruan M, Westendorf JJ, Khosla S, Oursler MJ. Regulation of bone formation by osteoclasts involves Wnt/BMP signaling and the chemokine sphingosine-1-phosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(52):20764-9.
- Puchtler H, Meloan SN, Terry MS. On the history and mechanism of alizarin and alizarin red S stains for calcium. *J Histochem Cytochem.* 1969;17(2):110-24.
- Rapp AE, Bindl R, Recknagel S, et al. Fracture Healing Is Delayed in Immunodeficient NOD/scidIL2Rgammacnull Mice. *PLoS One.* 2016;11(2):e0147465.
- Ross SM. *Statistik für Ingenieure und Naturwissenschaftler.* 3 ed: Elsevier GmbH; 2006.
- Sa MA, Ribeiro HJ, Valverde TM, et al. Single-walled carbon nanotubes functionalized with sodium hyaluronate enhance bone mineralization. *Braz J Med Biol Res.* 2016;49(2):e4888.
- Saito M, Karakida T, Yamamoto R, et al. Differentiation potential of osteoblast from cultured C2C12 cells on zirconia disk. *Dent Mater J.* 2014;33(2):275-83.
- Schieker M, Seitz H, Drosse I, Seitz S, Mutschler W. Biomaterials as Scaffold for Bone Tissue Engineering. *European Journal of Trauma.* 2006;32:114–24.
- Schindeler A, McDonald MM, Bokko P, Little DG. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Semin Cell Dev Biol.* 2008;19(5):459-66.
- Sharpe JR, Sammons RL, Marquis PM. Effect of pH on protein adsorption to hydroxyapatite and tricalcium phosphate ceramics. *Biomaterials.* 1997;18(6):471-6.
- Sigma-Aldrich. Acid Phosphatase, Leukocyte (Procedure No. 387). 2014; retrieved 21.03.2017, from http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/General_Information/1/387.pdf
- Sigma-Aldrich. Colorimetric Alkaline Phosphatase and Peroxidase Substrate Detection Systems. 2008; retrieved 02.09.2016, from <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/articles/biofiles/volume3.4a6/Colorimetric-Alkaline-Phosphatase-and-Peroxidase-Substrate-Detection-Systems.pdf>
- Sigma-Aldrich. Product Information Acid Phosphatase Assay Kit. retrieved 02.09.2016, from <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Bulletin/cs0740bul.pdf>
- Sobral JM, Caridade SG, Sousa RA, Mano JF, Reis RL. Three-dimensional plotted scaffolds with controlled pore size gradients: Effect of scaffold geometry on mechanical performance and cell seeding efficiency. *Acta Biomater.* 2011;7(3):1009-18.
- Sonmez MM, Armagan R, Ugurlar M, Eren T. Allografts versus Equine Xenografts in Calcaneal Fracture Repair. *J Foot Ankle Surg.* 2017.

- Takada T, Katagiri T, Ifuku M, et al. Sulfated polysaccharides enhance the biological activities of bone morphogenetic proteins. *J Biol Chem*. 2003;278(44):43229-35.
- Takeyama K, Chatani M, Takano Y, Kudo A. In-vivo imaging of the fracture healing in medaka revealed two types of osteoclasts before and after the callus formation by osteoblasts. *Dev Biol*. 2014;394(2):292-304.
- Trackman PC. Diverse biological functions of extracellular collagen processing enzymes. *J Cell Biochem*. 2005;96(5):927-37.
- Wang G, Zhang X, Yu B, Ren K. Gliotoxin potentiates osteoblast differentiation by inhibiting nuclear factor-kappaB signaling. *Mol Med Rep*. 2015;12(1):877-84.
- Yang DJ, Jeon JH, Lee SY, et al. Effects of Collagen Grafting on Cell Behaviors in BCP Scaffold with Interconnected Pore Structure. *Biomater Res*. 2016;20:3.
- Zhang BG, Myers DE, Wallace GG, Brandt M, Choong PF. Bioactive coatings for orthopaedic implants-recent trends in development of implant coatings. *Int J Mol Sci*. 2014;15(7):11878-921.
- Zhang X, Zhang Y. Tissue Engineering Applications of Three-Dimensional Bioprinting. *Cell Biochem Biophys*. 2015;72(3):777-82.

8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der Osteoklastenmorphologie und -funktion nach Bellido et al., 2014.....	15
Abb. 2: Interaktion von Osteozyten, Osteoblasten und Osteoklasten während der Knochenremodellierung, nach Niedzwiedzki & Filipowska, 2015.....	17
Abb. 3: Abschnitte des Prozesses der Knochenremodellierung.....	18
Abb. 4: Modelle zur Heilung von Knochenfrakturen; A: Vier-Phasen-Modell, B: Anabolisch-katabolisches Modell; nach Schindeler et al, 2008.....	20
Abb. 5: Übersicht über den Aufbau der Osteoblastenexperimente auf LCM-Discs.	37
Abb. 6: Übersicht über den Aufbau der Osteoblastenexperimente auf den TiHA-Discs.....	38
Abb. 7: Übersicht über den Aufbau der Kokultur-Experimente.....	42
Abb. 8: Viabilität von primären Maus-Osteoblasten kultiviert in Kulturmedium bzw. Mineralisationsmedium an den Tagen 1, 3, 7, 10 und 14.....	46
Abb. 9: Viabilität von primären Maus-Osteoblasten auf den Discs „LCM 3“, „LCM 3H“, „LCM 4“ und „LCM 6.1“ an den Tagen 1, 3, 7, 10 und 14.....	47
Abb. 10: Viabilität von primären Maus-Osteoblasten kultiviert in Kulturmedium, Mineralisationsmedium und auf den Discs „LCM 3“, „LCM 3H“, „LCM 4“ und „LCM 6.1“ am Tag 1 (A) bzw. am Tag 7 (B).....	47
Abb. 11: ALP-Aktivität von primären Maus-Osteoblasten in den Gruppen ohne Discs und auf den Discs „LCM 3“, „LCM 3H“, „LCM 4“ und „LCM 6.1“ am Tag 7, ermittelt durch ALP-Färbung.....	48
Abb. 12: Zellzahl (A) und ALP-Aktivität (B) von primären Maus-Osteoblasten in Kulturmedium, Mineralisationsmedium und auf den Discs „LCM 3“, „LCM 3H“, „LCM 4“ und „LCM 6.1“ am Tag 7.....	49
Abb. 13: Mineralisationsfähigkeit der primären Maus-Osteoblasten in Kulturmedium, Mineralisationsmedium und auf den Discs „LCM 3“, „LCM 3H“, „LCM 4“ und „LCM 6.1“ am Tag 14, ermittelt durch die ARS-Färbung.....	50
Abb. 14: Mineralisationsfähigkeit der primären Maus-Osteoblasten in Kulturmedium, Mineralisationsmedium und auf den Discs „LCM 3“, „LCM 3H“, „LCM 4“ und „LCM 6.1“ am Tag 14, ermittelt durch die Von-Kossa-Färbung. Zu sehen ist ein Scan der Zellkulturplatte nach erfolgter Färbung.....	50
Abb. 15: Anzahl reifer Osteoklasten und TRAP-Aktivität am Tag 7 einer Kokultur von Maus-Osteoblasten und -osteoklasten auf Knochen, im zellkulturbeschichteten Well und auf den Discs „LCM 3“, „LCM 3H“, „LCM 4“ und „LCM 6.1“.....	51

Abb. 16: Repräsentative Ausschnitte nach der TRAP-Färbung am Tag 7, im Rahmen eines Kokulturrexperiments in den Kontrollgruppen und auf den Discs „LCM 3“, „LCM 4“ und „LCM 6.1“	52
Abb. 17: Scan der Zellkulturplatte während der Vorinkubation: „TiHA 0%“- , „TiHA 5%“- , „TiHA 20%“- und „TiHA 50%“-Discs in Kulturmedium nach 24 Stunden Inkubation bei 37°C und 5% CO ₂	53
Abb. 18: Zellviabilität von primären Maus-Osteoblasten auf zellkulturbeschichteten Deckgläsern, Knochen und auf den Discs „TiHA 0%“, „TiHA 5%“, „TiHA 20%“ und „TiHA 50%“ am Tag 1, ermittelt mit dem WST-1-Test.	53
Abb. 19: Effizienz der Aussaat von primären Maus-Osteoblasten auf Discs der Gruppe „TiHA 0%“, nach verschiedenen Arten der Vorbehandlung (vgl. Tabelle 7).	54
Abb. 20: Zelldichte von primären Maus-Osteoblasten in Kulturmedium, Mineralisationsmedium und auf den Discs „TiHA 0%“, „TiHA 5%“, „TiHA 20%“ und „TiHA 50%“ am Tag 1.	55
Abb. 21: TRAP-Aktivität von Maus-Osteoklasten aus Kokultur auf Knochen, zellkulturbeschichtetem Deckglas und auf den Discs „TiHA 0%“, „TiHA 5%“, „TiHA 20%“ und „TiHA 50%“ am Tag 7.	56
Abb. 22: Reife Maus-Osteoklasten aus Kokultur mit Maus-Osteoblasten auf Knochen, zellkulturbeschichtetem Deckglas und auf den Discs „TiHA 0%“, „TiHA 5%“, „TiHA 20%“ und „TiHA 50%“ am Tag 7, ermittelt durch TRAP-Färbung und Zählen der Zellen unter dem Mikroskop.....	56

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: verwendete Geräte	28
Tabelle 2: verwendete Materialien	29
Tabelle 3: verwendete Lösungen und Substanzen	29
Tabelle 4: verwendete Tiere	30
Tabelle 5: Zusammensetzung und Besonderheiten der LCM-Discs.....	31
Tabelle 6: Beschreibung der im Rahmen der Optimierung der Zellaussaat auf TiHA-Discs getesteten Varianten der Vorbehandlung.....	44
Tabelle 7: Beschreibung der im Rahmen der Optimierung der Zellaussaat auf TiHA-Discs getesteten Varianten der Vorbehandlung.....	54

10 Formelverzeichnis

Formel 1: Berechnung der TRAP-Einheiten pro ml Probe	44
Formel 2: Berechnung der Effizienz der Zellaussaat (Sobral et al., 2011).....	45