



DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Apoptose und Nekrose von Knochenzellen auf
unterschiedlichen Biomaterialien

Verfasst von

Birgit Ursula Krancan

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Pharmazie

Betreuer:

ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Oskar
Hoffmann

Wien 2014

DANKSAGUNG

Zu allererst möchte ich jenen Menschen danken, die mir mein Zeit- und Arbeitsintensives Studium ermöglicht und immer an mich geglaubt haben: meiner Familie und meinen Freunden. Besonders meiner Mutter, meiner Schwester Lisa, meinem Großvater Reinhold und Peter Bernthaler, die mir während meiner Reise durch das schriftliche Arbeiten immer zur Seite standen und meiner Freundin Sin-Yeung Yoo, die immer Geduld mit mir und meinen vielen Fragen hatte.

Besonders möchte ich mich bei ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Oskar Hoffmann für die Möglichkeit bedanken, an diesem wirklich interessanten Thema zu arbeiten und ebenso für seine Betreuung meiner Arbeit.

Weiters möchte ich mich bei meinen Laborkolleginnen Corinna Nagelreiter und Barbara Stelzmüller bedanken, die mir den Einstieg in die Laborarbeit durch Ihre eigene Erfahrung erleichtert haben. Frau Barbara Berger danke ich für Ihre Unterstützung und Hilfe während meiner Labortätigkeiten, Herrn Peter Höflich für seine gute Laune, durch die ich mich immer wie zu Hause gefühlt habe.

INHALTSVERZEICHNIS:

1	EINLEITUNG	6
1.1	Theoretische Grundlagen.....	6
1.2	Fraktur und Heilung:.....	12
1.2.1	Indirekte Frakturheilung:.....	12
1.2.2	Direkte Frakturheilung:.....	15
1.3	Biomaterialien	15
1.3.1	Knochenersatzstoffe	16
1.3.2	Anforderung an Knochenersatz.....	16
1.3.3	Biokompatibilität und Bioaktivität	16
1.3.4	Belastungsstabilität	18
1.3.5	Eingesetzte Materialien.....	18
1.4	Zelltod	31
1.4.1	Die Apoptose	32
1.4.2	Nekrose	34
2	MATERIAL und METHODEN.....	37
2.1	Material	37
2.1.1	Kulturmedien.....	37
2.1.2	Verwendete Zellen	37
2.1.3	Liste verwendeter Geräte und verwendetem Material	37
2.1.4	Liste verwendeter Lösungen und Substanzen.....	40
2.2	Methoden.....	41
2.2.1	Verwendete Zellen	41
2.2.2	Osteoklasten:.....	41
2.2.3	Vorbereitung der Präparate.....	42
2.2.4	ELP.....	43
2.2.5	-TCP Tabletten.....	44
2.2.6	Vorinkubation	44
2.2.7	Osteoblastenaussaat	44

2.2.8	Zugabe von Substanzen:	44
2.2.9	Färbung-Fixierung-Einbettung.....	45
3	ERGEBNISSE.....	47
3.1.1	Auswertung der Osteoblasten:	47
3.1.2	Auswertung der Osteoklasten:	47
3.2	Ergebnisse der Osteoklasten	48
3.2.1	Verhalten von Osteoklasten auf Glas:	48
3.2.2	Verhalten von Osteoklasten auf -TCP-Presslingen:	52
3.2.3	Verhalten von Osteoklasten auf mit ELP beschichteten Deckgläsern:	55
3.3	Ergebnisse der Osteoblasten	59
3.3.1	Osteoblasten auf Glas:.....	59
3.3.2	Verhalten von Osteoblasten auf ELP:.....	62
3.3.3	Verhalten von Osteoblasten auf -TCP Presslingen:.....	65
3.3.4	Osteoblasten auf Biomaterial in einem 24/48/72 Stunden Experiment.....	67
4	DISKUSSION.....	73
4.1	Einleitung und Aufgabenstellung	73
4.2	Vorversuche:.....	73
4.3	Osteoklasten auf verschiedenen Biomaterialien:.....	74
4.3.1.1	Verhalten von Osteoklasten auf Glas: (=Kontrolle	74
4.3.2	Verhalten von Osteoklasten auf ELPs.	75
4.3.3	Verhalten von Osteoklasten auf -TCP-Presslingen:.....	75
4.4	Osteoblasten auf verschiedenen Biomaterialien:.....	77
4.4.1	Verhalten von Osteoblasten auf Glas (= Kontrolle):.....	77
4.4.2	Verhalten von Osteoblasten auf -TCP-Presslingen:	78
4.4.3	Verhalten von Osteoblasten auf ELPs:.....	79
4.5	Verwendung von Apoptosemarkern	81
4.5.1	Apoptosemarker und Osteoklasten	82
4.5.2	Apoptosemarker und Osteoblasten	83

5	ZUSAMMENFASSUNG	84
6	CONCLUSION	85
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	86
8	LITERATURVERZEICHNIS	88
9	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	90
10	TABELLENVERZEICHNIS	90
11	LEBENS LAUF	91

1 EINLEITUNG

1.1 Theoretische Grundlagen

Das menschliche Skelett besteht aus 223 Knochen. (Aumüller et al., 2001)
Knochen wird aus unbeweglichem mineralisierten Zellgewebe gebildet, welches dem Menschen eine passende mechanische Stütze bietet. Zu den Aufgaben des Skelettes zählen unter anderem der Schutz der inneren Organe, die Unterstützung der Fortbewegung, die Regulation der Kalziumhomeostase und in einigen Knochen die Hämatopoese. (Baroli 2009)

Hauptbestandteile des Knochens sind:

- a. Knochengrundsubstanz: bestehend aus anorganischen und organischen Anteilen sowie
- b. Zellen unterschiedlicher Funktion (Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten). (Aumüller, et al. 2001)

Ad a.) Knochengrundsubstanzen

Reife Knochengrundsubstanz besteht aus anorganischer Matrix, die neben anderen Mineralien hauptsächlich Hydroxylapatit enthält. Dies ist ein Komplexsalz, bestehend aus 50 % Phosphaten, 35 % Kalzium, 7 % Karbonaten und weiteren Mineralien. Weiterer Bestandteil der Knochengrundsubstanz ist die organische Matrix. Anteile der organischen Matrix sind:

- Die ungeformte Komponente mit Proteoglykanen und adhäsiven Glykoproteinen (hier Osteokalzin, Osteonektin, Osteopontin). Diese nicht-kollagenen Proteine haben eine wichtige Rolle und werden für die Modulation von Calcification und Zellreparatur, Zellhaftung, Bindung von Wachstumsfaktoren, Kollagenen, Heparin und anderen Molekülen gebraucht. In anderen Worten sie regulieren die Zelladhäsion, Migration, Proliferation, Differenzierung und den

programmierten Zelltod (Apoptose).%Aumüller, et al. 2001) Weiters dienen sie der geregelten Aktivierung von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und der Aktivierung interzellulärer Signale. Zusätzlich steuern sie während der Wundheilung Interaktionen zwischen Zellen und extrazellulären Matrixproteinen, den Prozess der Adhäsion Inflammation, Granulation, Gewebebildung und sRemodeling%a(Baroli 2009)

- sDie geformte Komponente, zu der die Fasern des Kollagentyps I gehören.%Aumüller, et al. 2001)

1.1.1.1 KNOCHENZELLEN

Die spezifischen Zellen des Knochen sind Osteoblast (bildet Osteoid), Osteozyt (in kalzifizierte Matrix eingemauerter Osteoblast), endostale Saumzelle (ruhender Osteoblast des Endost) und Osteoklast (knochenabbauende mehrkernige Riesenzelle).

Herkunft: Osteoblasten, Osteozyten und endostale Saumzellen leiten sich von mesenchymalen Vorläuferzellen (Osteoprogenitorzellen) ab, die im Rumpfbereich aus den Somiten (Sklerotom) ausgewandert sind. Im Schädelbereich entstehen Osteoprogenitorzellen zusätzlich noch aus Zellen der Neuralleiste und Prächordalplatte. Osteoklasten gehören zum mononukleären Phagozytensystem (MPS). (Drenckhahn und Benninghoff 2008) Mesenchymale Stammzellen (MSCs) findet man im Knochenmark, Periosteum, adiposen Gewebe, der Haut, Muskeln und in Gefäßen. Sie haben die festgelegte Anlage zur Differenzierung in Vorläufer von Fibroblasten, Osteoblasten, Chondrozyten, Adipocyten, Myocyten Stromazellen und andere Zellen. Die Differenzierung wird unterstützt durch das umgebende Umfeld (d.h. extrazelluläre Matrix, lösliche Proteine)

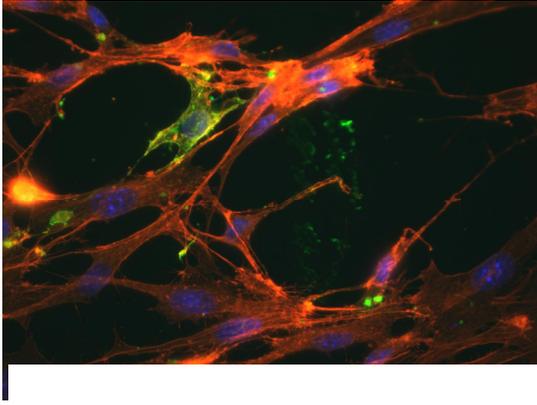


Abbildung 1: Osteoblasten auf einem Deckglas unter dem Fluoreszenzmikroskop. Die Zellkerne in blau, das Aktingerüst in rot und grün zeigt Zellen im frühem Stadium der Apoptose.

Zu den Knochenzellen gehören:

a. Osteoblasten (OB)

Die ausdifferenzierten Osteoblasten produzieren und sezernieren Proteine, die die Knochenmatrix bilden. Die Matrix wird anschließend von den OB gesteuert mineralisiert. Ein Hauptprodukt der knochenbildenden OB ist Kollagen Typ I. Diese polymeren Proteine werden

zunächst in der Form eines Vorläufers sezerniert, welcher Peptidverlängerungen an beiden, am Amino - terminalen - und am Carboxyl-Ende des Moleküls enthält. Die Propeptide werden proteolytisch entfernt. Es kommt zu einer weiteren Verarbeitung in reife, in sich verkettete Kollagen Typ I Moleküle, die sich dann zu einer Kollagenfaser zusammenbauen. Einzelne Kollagenmoleküle werden durch die Bildung von Pyridin-Quervernetzungen verbunden, die einzigartig für Knochen sind. Knochenformatierende OB synthetisieren eine Reihe andere Proteine, die in den Knochen eingearbeitet werden, einschließlich Osteocalcin und Osteonectin, die 40 - 50% der nicht kollagenen Proteine aus Knochen bilden. (Manolagas 2000)

Zusätzlich zur Bildung der Osteoidmatrix sind reife Osteoblasten wesentlich für den Mineralisierungsprozess, der Einlagerung von Hydroxylapatit in die Matrix verantwortlich. Es wird angenommen, dass OB die lokalen Konzentrationen von Kalzium und Phosphat regulieren, um die Bildung von Hydroxylapatit zu fördern.

OB exprimieren relativ hohe Mengen von alkalischer Phosphatase, die mit der äußeren Oberfläche der Plasmamembran verankert ist. Es wurde lange angenommen, dass die alkalische Phosphatase eine Rolle in der Knochenmineralisierung spielt. (Manolagas 2000)

b. Endostale Saumzelle (bone lining cell)

Die Oberfläche von normalen, ruhenden Knochen (d.h. Knochen, die keinen Umbau durchmachen) wird durch eine 1-2 µm dicke Schicht einer nicht mineralisierten Knochenmatrix abgedeckt. Auf dieser Schicht liegen flache, längliche Zellen. Diese Zellen werden Lining Cells genannt und entstehen aus OB. Die Umwandlung von OB zu Lining Cells stellt eines der Schicksale von OB dar, wenn diese ihre knochenbildende Funktion schon abgeschlossen haben. Ein anderer Entwicklungsweg der OB ist die oben genannte Umwandlung in Osteozyten in der Matrix. Osteoklasten sind nicht in der Lage, sich an der nicht mineralisierten Kollagen-Matrix anzuheften, welche die normale Knochenoberfläche umfasst. Daher können andere Zellen, wie z.B. Lining Cells Kollagenase sezernieren, welche diese Matrix entfernt, bevor sich Osteoklasten an den Knochen anheften. Es gibt die Hypothese, dass Osteoklasten-Vorläufer durch Signale der Lining Cells zu genau definierten Stellen im Knochen wandert. Diese Lining Cells werden durch Osteozyten dazu angeregt. Sie sind die einzigen Zellen, die die Notwendigkeit für die Umgestaltung zu einem bestimmten Zeitpunkt und Ort signalisieren können. (Manolagas 2000)

c. Osteozyten

Einige Osteoblasten werden innerhalb der Lakunen unter der mineralisierten Matrix begraben. Diese Zellen werden dann als Osteozyten bezeichnet und sind durch eine markante sternförmige Morphologie gekennzeichnet, welche an die dendritischen Netzwerke des Nervensystems erinnert. Osteozyten sind im Knochen am häufigsten vertreten. Es gibt zehnmal so viele Osteozyten als OB. Osteozyten werden regelmäßig in der gesamten mineralisierten Matrix verteilt, kommunizieren miteinander und mit den Zellen an der Knochenoberfläche. Eine Hypothese ist, dass die strategische Lage der Osteozyten diese zu ausgezeichneten Kandidaten für mechanosensorische Zellen macht, welche in der Lage sind, die Notwendigkeit für Knochenauf- und -abbau während der funktionellen Anpassung des Skelettes oder bei Mikroschäden zu erkennen, und in

beiden Fällen die richtigen Signale auszusenden, um eine entsprechende Antwort auszulösen. Osteozyten verändern offenbar die Richtung der interstellaren Flüssigkeitsströmung durch die Kanälchen (hergestellt durch mechanische Kräfte) und erkennen Veränderungen von Hormonspiegeln wie Östrogen und Glucocorticoide, welche das Überleben und die Zirkulation in derselben Flüssigkeit beeinflussen. Daher erhöht eine Störung des Osteozytennetzwerkes wahrscheinlich die Knochenbrüchigkeit. (Manolagas 2000)

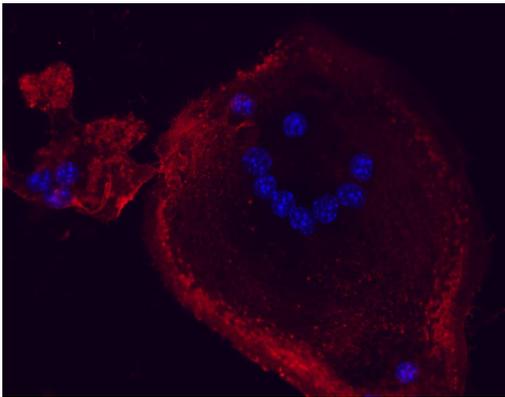


Abbildung 2: Osteoklast auf einem Deckglas. Die Zellkerne in Blau, man sieht sehr gut das es mehr als drei Zellkerne sind, die Aktinstruktur in Rot.

d. Osteoklasten (OC)

Reife Osteoklasten sind in der Regel große (50-100 µm Durchmesser) mehrkernige Zellen, mit reichlich Mitochondrien, zahlreichen Lysosomen und freien Ribosomen (Manolagas 2000). OC werden durch die Fusion von hämatopoetischen Zellen der Monozyten/Makrophagen-Linie gebildet. OC sind für die Resorption des Knochens verantwortlich. Eine erhöhte Aktivität dieser Zellen wird mit verschiedenen Knochenerkrankungen einschließlich postmenopausaler Osteoporose verbunden. Auf Adhäsion am Knochen werden OC polarisiert und reorganisieren ihr Zytoskelett und ihre Membran, um spezialisierte Bereiche zu bilden. Diese beinhalten die „Sealing zone“ (SZ), das ist ein dichter Ring aus F-Aktin-reichen Podosomen, die den „Ruffled Border“ (gekräuselte Domäne) begrenzen. (Itzstein et al., 2011) Dieses bemerkenswerteste morphologische Merkmal, die „Ruffled Border“ ist ein komplexes System von fingerförmigen Erhebungen an der Membran, deren Funktion die Vermittlung der Resorption der Knochenmatrix ist. Die SZ umfasst den Bereich der Anhaftung des OC zur Knochenoberfläche und dichtet einen gesonderten Bereich der Knochenoberfläche ab, der unterhalb der OC liegt und welcher danach aufgelöst wird. Die Fähigkeit der SZ, diesen Bereich der

Knochenoberfläche abzudichten, ermöglicht die Bildung einer Mikroumgebung für den resorptiven Prozess. Die mineralische Komponente der Matrix wird in der sauren Umgebung des Resorptionsortes gelöst, die durch die Wirkung einer ATP-Protonenpumpe (die sogenannte vakuolären H⁺ATPase) geschaffen wird, welche wiederum in der ruffled border liegt. Die Protein-Komponente der Matrix, wird hauptsächlich durch Matrixmetalloproteinasen und Cathepsine K, B und L Kollagen abgebaut. Die abgebauten Knochenmatrix - Komponenten liegen endocytisiert entlang der ruffled border innerhalb der Resorptionslagune und werden dann transcytosiert. Ein weiteres Merkmal der OC ist die Gegenwart hoher Mengen des Phosphohydrolase-Enzyms, Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP). Diese Funktion wird häufig zum Nachweis von OC in Knochenproben verwendet. (Manolagas 2000)

e. Knochenmarkszellen

Das Knochenmark ist der Ursprungsort von Hämatopoese bei Erwachsenen. Es umfasst das Mark des Stroma-Kompartiments und das hämatopoetische Zell-Kompartiment. Das Mark des Stroma-Kompartiments besteht aus Blutgefäßen, adipösen Zellen, Fibroblasten, Stroma-Zellen, endothelialen Gefäßzellen und Makrophagen. Diese produzieren Wachstumsfaktoren zur Unterstützung der Hämatopoese. Das Mark-Stroma-Kompartiment kommuniziert mit OB und OC. Im Vergleich dazu ist das hämatopoetische Zell-Kompartiment hoch vaskularisiert und besteht aus Stammzellen, Progenitorzellen und voll entwickelten Myeloid- und Lymphoidzell- sprogenies% (Baroli 2009)

Bei den Hauptprozessen der Knochenbildung, Erhaltung und Regeneration unterscheidet man zwischen intramembraner und endochondraler Ossifikation, Knochenbildung und Umbildung, sowie Knochenheilung. (Baroli 2009)

Dieser Prozess wird für die Entwicklung von normaler Knochenarchitektur gebraucht. Der Prozess der Knochenumbildung wird gebraucht, um dem Knochenzustand biomechanisch und metabolisch zu entsprechen und um

Mikrofrakturen zu reparieren. Knochenremodeling tritt überall im Leben auf und umfasst immer drei Phasen: Aktivierung, Knochenresorption und Knochenbildung, und Knochenmodeling und Remodeling. In dieser Reihenfolge vielleicht einfacher beschrieben als formende und reparierende Prozesse. (Baroli 2009)

1.2 Fraktur und Heilung:

Knochen besitzt die Fähigkeit zur Reparatur und Regeneration in Reaktion auf eine Verletzung oder chirurgische Behandlung. Beide Prozesse beinhalten eine komplexe Integration von Zellen, Wachstumsfaktoren und extrazellulärer Matrix. Es kommt zur Reparatur des verletzten Gewebes ohne zunehmendes Knochenvolumen. (Ai-Aql et al., 2008) Knochen ist eines der wenigen Gewebe, das ohne Bildung einer fasrigen Narbe heilen kann. (Marsell und Einhorn 2011)

Frakturheilung ist ein mehrstufiger Reparaturprozess, der komplexe und doch gut dirigierte Schritte enthält, welche als Reaktion auf eine Verletzung eingeleitet werden und welche schließlich in der Reparatur und Wiederherstellung des Knochens enden. (Ai-Aql et al., 2008)

1.2.1 Indirekte Frakturheilung:

Indirekte (sekundäre) Frakturheilung ist die häufigste Form der Frakturheilung, und besteht sowohl aus endochondraler und intramembranärer Knochenheilung. Es erfordert keine anatomische Reposition oder starre stabile Bedingungen. Im Gegenteil, es wird durch kleinste Bewegungen (smicromotion%) und Tragen von Gewichten verbessert. (Marsell und Einhorn 2011)

Die Mehrzahl von Frakturen heilt durch die Kombination von intramembranärer und endochondraler Ossifikation. Endochondrale Knochenbildung tritt in der Regel außerhalb der Knochenhaut in Regionen auf, die mechanisch weniger stabil und unmittelbar neben der Fraktur



Abbildung 3: Röntgenbilder des linken Fußes.
Gut ersichtlich; die Fraktur im Schien und Wadenbein.

sind, während intramembranöse Ossifikation innerhalb des Periosts an den proximalen und distalen Kanten des Kallus auftritt und einen harten Kallus bildet. Dieser ist eine Überbrückung von möglichen harten Kallusgebieten in der zentralen Bruchspalte, welche eine vorübergehende Stabilisierung bieten und dabei helfen, die biomechanischen Funktionen wieder zu erlangen. Die Reparatur selbst umfasst vier sich überlappende Phasen. Sie werden initiiert durch eine sofortige Entzündungsreaktion. (Ai-Aql et al., 2008) Unmittelbar nach dem Trauma wird ein Hämatom erzeugt, welches aus peripheren und intramedullären Blutzellen, sowie aus Knochenmarkszellen besteht. Die Verletzung initiiert eine entzündliche Reaktion, welche bewirkt, dass das Hämatom zwischen und um die Enden der Fraktur koaguliert. Dadurch bildet sich in der Medulla eine Vorlage für die Kallusbildung. Obwohl bekannt ist, dass inflammatorische Zytokine eine negative Wirkung auf die Knochenbildung besitzen, Verknöcherungen und andere Veränderungen bei längerer oder chronischer Expression auftreten, ist eine kurze und starke regulierte Sekretion von proinflammatorischen Molekülen nach der akuten Verletzung entscheidend für die Geweberegeneration. Diese entzündliche Reaktion startet in den ersten 24 Stunden und ist nach 7 Tagen beendet. (Marsell und Einhorn 2011) Nach der Bildung des primären Hämatoms wird ein fibrinreiches Granulationsgewebe geformt. Innerhalb dieses

Gewebes tritt eine endochondrale Formation zwischen den Enden der Fraktur und außerhalb der periostalen Seiten auf. Diese Regionen sind manchmal wenig stabil, und das knorpelige Gewebe bildet einen weichen Kallus, der dem Bruch eine stabile Struktur verleiht. Zur gleichen Zeit findet eine intramembranöse Ossifikation subperiostal statt, die direkt benachbart zu den distalen und proximalen Enden der Fraktur auftritt und einen harten Kallus erzeugt. Er ist eine Überbrückung des mittelharten Kallus, der der Fraktur eine semi-starre Struktur verleiht und somit Belastung erlaubt. Die Erzeugung dieses Kallusgewebes hängt von der Rekrutierung von mesenchymalen Stammzellen aus dem umgebenden Weichgewebe, Rinde, Periost und Knochenmark ab, wie auch von der systemischen Mobilisierung von Stammzellen von der hämatopoetischen Seite in das periphere Blut. Es ist eine molekulare Kaskade, welche die Produktion von Kollagen-I- und Kollagen-II-Matrix beinhaltet. Weiters sind mehrere Peptidsignalmoleküle daran beteiligt. Bei diesem Prozess zeigt sich, dass die Superfamilie des Transforming Growth Factor- (TGF-) von großer Bedeutung ist. Dieser Vorgang hat eine Dauer von 7- 9 Tagen. (Marsell und Einhorn 2011)

Obwohl der harte Kallus eine starre Struktur mit biomechanischer Stabilität besitzt, hat er noch nicht die vollständigen biomechanischen Eigenschaften der normalen Knochens. Um dies zu erreichen, wird eine zweite resorptive Phase der Frakturheilung initiiert, um dieses Mal den harten Kallus in eine Lamellenknochenstruktur mit einem zentralen Markraum umzugestalten. Dieser Prozess benötigt mindestens 3-4 Wochen. Der Umbauprozess wird durch ein Gleichgewicht zwischen Resorption des harten Kallus durch OC und das Aufbauen von Lamellenknochen durch OB durchgeführt. (Marsell und Einhorn 2011)

Die biologischen Prozesse, welche während dieser Stufen stattfinden, werden durch Signalmoleküle reguliert. Die Signalmoleküle werden in drei Gruppen eingeteilt: (1) Proinflammatorische Zytokine, (2) Transforming Growth Factor- -Superfamilienmitglieder (TGF-) und (3) angiogene Faktoren. Jede dieser Gruppen fördert sich überlappende biologische

Prozesse und dirigiert Wechselwirkungen zwischen den unterschiedlichen Zellpopulationen. (Ai-Aqi, et al. 2008)

1.2.2 Direkte Frakturheilung:

Direkte Heilung tritt gewöhnlich nicht bei den natürlichen Prozessen der Frakturheilung auf, da diese eine korrekte anatomische Reposition der Frakturrenden ohne Spaltbildung und eine stabile Fixierung erfordert. Allerdings ist diese Art der Heilung oft das primäre Ziel nach einer offenen Reposition und interner Fixation in der Chirurgie. Wenn diese Anforderungen erreicht werden, kann direkte Knochenheilung durch direkten Umbau zu Lamellenknochen, Haver'schen Kanälen und Blutgefäßen auftreten. Der Knochen muss von der einen Seite des Cortex mit dem Knochen auf der anderen Seite des Cortex vereinigt werden, um eine mechanische Kontinuität wieder herzustellen. Abhängig von der Spezies dauert es normalerweise zwischen ein paar Monaten bis zu einigen Jahren, bevor eine vollständige Heilung erreicht wird. (Marsell und Einhorn 2011)

1.3 Biomaterialien

Eine allgemeine Definition von Biomaterialien ist ein nicht lebensfähiges Material, das für den medizinischen Einsatz verwendet wird und mit einem biologischen System integriert wird. ~~nonviable material used in a medical device, intended to interact with biological systems~~ Wenn die Worte ~~verwendet für den medizinischen Einsatz~~ entfernt werden, bekommt diese Definition ein großes Angebot an Applikationen, welche alle eine Schnittstelle zwischen synthetischem oder modifiziertem natürlichem Material mit biologischem darstellen. Hier einige Implantate, die in medizinischer Verwendung sind: Brustimplantate, Zahnimplantate, Gelenke (Hüfte, Knie, Schulter), Stents etc. Mit dem Begriff Biomaterial haben wir eine multidimensionale Schnittfläche verschiedenster Wissenschaften: Chemie, Chemische Technologie, Werkstoffkunde, Mechanik, Biotechnologie, Biologie und Medizin, mit einem beträchtlichen Input von Ethikern, gesetzlich festgelegten Standards und Unternehmern. Das Feld unterliegt seit Beginn einem konstanten Wachstum und einem ständigen Einbringen von neuen Ideen und produktiven Branchen.

Die Oberflächenchemie und Topographie von Biomaterial sind wichtige Parameter, welche die Proteinadsorption, Zellinteraktion und die Immunantwort beeinflussen. (Ratner und Bryant 2004)

Besonderen Schwerpunkt möchte ich hier auf Knochenersatzstoffe legen.

1.3.1 Knochenersatzstoffe

1.3.2 Anforderung an Knochenersatz

Größere Knochendefekte, wie sie zum Beispiel bei komplexen Frakturen, Zysten oder Tumoren auftreten, können ab einer bestimmten kritischen Größe nicht mehr vom Körper ersetzt werden. Solche Defekte werden heute mit allogenen Spenderknochen oder Knochenersatzmaterialien aufgefüllt.

Mit der Auffüllung sollen zwei Ziele erreicht werden:

-Primärstabilität: Primär soll die Kontinuität des Knochens wiederhergestellt werden und dieser mechanisch belastbar sein.

-Resorbierbarkeit/Remodeling: Sekundär sollte der Ersatzstoff abgebaut und durch belastungsadäquat gebildeten körpereigenen Knochen ersetzt werden, der dem physiologischen Remodeling unterliegt. Ist ein Knochenersatzstoff nicht resorbierbar, so wird verlangt, dass das Einwachsen des umliegenden Knochengewebes zu dauerhafter Stabilität führt. (Niedhart und Niethard 1998)

1.3.3 Biokompatibilität und Bioaktivität

Abgesehen von Sterilität und Pyrogenfreiheit hängt die Verträglichkeit des Implantates sehr stark von anderen Faktoren ab. Direkt nach der Implantation lagern sich Blutproteine an der Oberfläche an, was die Zelladhäsion und folgende Immunantwort reguliert. (Baroli 2009) Wenn ein Biomaterial in einen Körper implantiert wird, kommt es zur Auslösung verschiedener Immunantworten als Reaktion auf einen Fremdkörper. Kurz, ein Biomaterial löst eine Reaktion aus, worauf sofort nichtspezifisches Protein auf dem Implantat adsorbiert. Jetzt adsorbieren viele verschiedene Proteine an die Oberfläche in natürlicher Konformation,

aber auch denaturiert. Nicht-spezifische Proteinadsorption kommt nicht im normalen physiologischen Prozess der Wundheilung vor. Diese nicht-spezifische Proteinadsorption kann der Auslöser für die Fremdkörperreaktion sein. Eine Anzahl verschiedener Zellen wie Monozyten, Leukozyten und Blutplättchen (Zellen, welche eine Schlüsselrolle in der normalen Wundheilung spielen), adhären an der Oberfläche des Biomaterials und können als Ergebnis zu einer *supregulation* von Zytokinen führen und nachträglich proinflammatorische Prozesse auslösen. Zusätzlich ist das Implantat signifikant größer als die adhären Makrophagen, welche den Körper durch Phagozytose vor Fremdkörpern schützen. Es folgt darauf eine chronische Entzündung an der Grenzfläche des Biomaterials, und die gescheiterten Makrophagen fusionieren zusammen zu einer multinucleären Fremdkörper-Riesenzelle, die oft für die Lebenszeit des Implantats andauert. Das Endstadium der Fremdkörperreaktion beinhaltet die Abschottung und Einrichtung eines blutgefäßlosen, kollagenen und fibrösen Gewebes, welches üblicherweise eine Schichtdicke von 50 - 200 μ m hat. (Ratner und Bryant 2004) Auch eine Degradation des Implantates bringt die Möglichkeit einer Fremdkörperreaktion mit sich. Knochenersatz aus Metall, Keramik und Polymeren kann korrodieren, resorbiert oder durch Hydrolyse abgebaut werden und die dadurch entstehenden Abbauprodukte toxikologisch bedenklich, also teratogen, mutagen, kanzerogen oder metabolisch beeinflussend sein, ganz abgesehen von der möglichen Verstärkung einer Immunantwort. (Baroli 2009) *s*Ruft das Material selbst weder immunogene noch toxische Reaktionen hervor, so gilt die Anforderung der Biokompatibilität als erfüllt. Bei bioinerten Materialien bleibt im Gegensatz zu bioaktiven immer eine Grenzschicht zwischen Knochen und Implantat bestehen. (Niedhart und Niethard 1998)

*s*Bioaktivität: Der Knochenersatzstoff soll mit dem körpereigenen Gewebe interagieren. Ziel ist eine Verbundosteogenese mit direktem Knocheneinwuchs ohne Bindegewebsschichten. Er soll zumindest osteokonduktiv, nach Möglichkeit osteoinduktiv oder -stimulierend sein.

Osteokonduktion bezeichnet die Fähigkeit, das Einwachsen von Kapillaren, perivaskulärem Gewebe und Knochenzellen in den Defektraum zu erleichtern, dies wird am besten erreicht durch ein interkonnektierendes Porensystem mit einer Porengröße von 150 - 450 μ m. Osteoinduktion ist die Umwandlung undifferenzierter mesenchymaler Vorläuferzellen in Osteoprogenitorzellen, der eine enchondrale Ossifikation folgt. Osteostimulation bezeichnet eine Anregung des Knochenstoffwechsels über eine Aktivierung von bereits differenzierten Knochenzellen. (Niedhart und Niethard 1998)

1.3.4 Belastungsstabilität

Knochentransplantate sollten eine adäquate mechanische Festigkeit aufweisen, um der Last standzuhalten, die gewöhnlich auch auf das umliegende natürliche Gewebe um das Implantat wirkt. Das erfordert den Schutz der Zellen vor Druck- und Zugkräften. Es darf unter Übertragung von Druck- und Zugkräften und durch Übertragung von mechanischen Signalen an der defekten Stelle in das Implantat oder die co-implantierten Zellen nicht versagen. Es ist auch wichtig, dass während des Abbaus des Knochentransplantats die Last nach und nach um das Transplantat zu sichern, indem durch Stimulation von Zellwachstum und eine funktionierende Zellfunktion und Proteinproduktion ein passender Ersatz entsteht. Oder in anderen Worten, als sicherer Ersatz durch ein angemessenes Knochengewebe. (Baroli 2009) Der Knochendefekt soll nach Auffüllung stabil, d.h. möglichst schnell vollbelastbar sein, Ermüdungsfrakturen sind auszuschließen. Die Biomechanik des Knochenersatzstoffes soll der des Knochens ähneln. (Niedhart und Niethard 1998)

Weiters spielen noch die Resorbierbarkeit und die Formbarkeit eine wichtige Rolle bei der Anforderung an Knochenersatzstoffe. (Niedhart und Niethard 1998)

1.3.5 Eingesetzte Materialien

Derzeit gilt die autologe Spongiosaplastik als Goldstandard da sie in den umgebenden Knochen integriert und damit die ursprüngliche Stabilität

erreicht wird. Zugleich unterliegt sie dem körpereigenen Remodeling, d.h. sie reagiert auf veränderte biomechanische Anforderungen entsprechend. Allerdings ist ein zweiter operativer Eingriff zur Entnahme mit allen Nachteilen wie Infekt, Hämatombildung und Nervenschädigung notwendig, der Vorrat an entnehmbarer Spongiosa ist limitiert. Die Komplikationsrate ist relativ hoch. Durch die Verwendung von Fremdspongiosa werden diese Nachteile umgangen. Fremdspongiosa muss jedoch, um die Übertragung von Erregern sowie serologische Unverträglichkeitsreaktionen zu vermeiden, sterilisiert werden. Dies führt zu einer Abschwächung der osteoinduktiven Potenz bei deutlich schlechteren biomechanischen Verhältnissen. Dieser unbefriedigende Goldstandard führte zu einer intensiven Suche nach dem idealen Knochenersatzstoff. (Niedhart und Niethard 1998)

Heutzutage werden zur Behandlung in der Therapie zur Stärkung von Knochen und Gelenken gewöhnlich autologe (vom selben Individuum stammend) und allogene (fremd entstanden) Transplantationen durch Verwendung von Autografts = autologes Transplantat und Allografts = allogenes Transplantat eingesetzt. (Baroli 2009)

Autogene Knochentransplantate gelten immer noch als der Goldstandard für Knochenersatz, vor allem weil sie ein Minimum an immunologischen Reaktionen, eine komplette Histokompatibilität und die besten osteokonduktiven, osteogenen und osteoinduktiven Eigenschaften besitzen. Autografts enthalten in der Regel lebensfähige osteogene Zellen sowie Knochenmatrixproteine und unterstützen das Knochenwachstum. Diese werden von durchblutenden und nicht-durchblutenden kortikalen und autologen Knochenmarkstransplantaten erhalten. Sie bieten strukturelle Unterstützung zu implantierten Geräten und bilden mechanisch effiziente Strukturen, wie sie in den umgebenden Knochen eingebaut sind. Weiters leiden sie unter Resorption, begrenzter Verfügbarkeit und Lebensfähigkeit. Autologe Spongiosa-Knochentransplantate enthalten mehr osteogene Eigenschaften im Vergleich zu kortikalen Knochentransplantaten, da das Vorhandensein

von Platz innerhalb ihrer Struktur die Diffusion von Nährstoffen und eine begrenzte Revaskularisierung ermöglicht. Spongiöse Transplantate sind ein guter Raumfüller, aber bieten keine erhebliche strukturelle Unterstützung. Da nur die OB und endostalen Zellen auf der Oberfläche des Transplantates die Transplantation überleben, wirkt ein spongiöses Transplantat hauptsächlich als ein osteokonduktives Substrat, welches wirkungsvoll das Einwachsen von neuen Blutgefäßen und die Infiltration von neuen OB und Osteoblastenvorläufern unterstützt. Eine Osteoprogenitorzelle ist jedoch eine Mesenchymzelle, welche die Fähigkeit erworben hat, Zellen mit osteogenen Fähigkeiten zu erstellen. Die Übertragung einer einzelnen Osteoprogenitorzelle kann, durch Generative (die Fähigkeit zur Vermehrung und Entwicklung), möglicherweise hunderte von OB produzieren und somit eine beträchtliche Menge an Knochen. Der prinzipielle Vorteil von autologen spongiösen Transplantaten ist das Potential, Osteoprogenitorzellen auf den Empfänger zu übertragen. Osteoinduktive Wirkstoffe wie α Bone Morphogenic Protein (BMP) haben unterschiedliche Fähigkeiten, die Transformation von mesenchymalen Zellen zu Osteoprogenitorzellen zu induzieren und erzeugen so Knochen. Ein spongiöses Transplantat bietet nicht sofort eine strukturelle Unterstützung, es integriert schnell und letztlich erreicht es eine Stärke, die einem kortikalen Transplantat entspricht und das innerhalb von sechs bis zwölf Wochen. Osteoinduktive Faktoren werden aus dem Transplantat während der resorptiven Verfahren freigesetzt, genauso werden Zytokine freigesetzt. Während der entzündlichen Phase kommt es somit auch zur Beeinflussung der Wundheilung, dies basiert alles nur auf Indizien, es ist noch nicht durch wissenschaftliche Dokumentation belegt worden. (Nandi et al., 2010)

Es wurde beobachtet, dass die Belastbarkeit betroffener Gliedmaßen früher bei Tieren mit Autotransplantaten zurückkehrt im Vergleich zu anderen verwendeten Knochentransplantaten. In einer experimentellen Studie mit Hunden wurde beobachtet, dass frische autogene Knochentransplantate schnell eingebaut wurden und osteoinduktive, osteokonduktive und osteogene Eigenschaften besitzen. Autologer

spongioser Knochen wird häufig aus dem Becken gewonnen, manchmal auch vom distalen Teil des Radius/Tibia. Dies wird weiterhin bei einer verzögerten Heilung von Frakturen der langen Röhrenknochen und zur Rekonstruktion von depressiven Frakturen am lateralen Tibiaplateau verwendet.

Autologe kortikale Transplantate haben wenig oder keine osteoinduktiven und meist osteokonduktive Eigenschaften, aber der überlebende OB bietet auch einige osteogene Eigenschaften. Nicht-vaskularisierte kortikale Transplantate bieten eine sofortige strukturelle Unterstützung, sie werden schwächer im Vergleich zu vaskularisierten kortikalen Transplantaten während der anfänglichen sechs Wochen nach der Transplantation als Ergebnis von Resorption und Revaskularisation. Vaskularisierte kortikale Transplantate heilen schneller an der Fremdkörper-Transplantat-Schnittstelle und deren Umbau ist ähnlich dem normalen Knochen. Im Gegenteil zu nicht-vaskularisierten Transplantaten werden sie keiner Resorption und Revaskularisation unterzogen und liefern deshalb das überlegene System während der ersten sechs Wochen.

Trotz ihrer anfänglichen Stärke müssen kortikale Transplantate noch unterstützt werden durch eine interne oder externe Fixation, um sie vor Frakturen zu schützen. Autologe kortikale Knochentransplantate sind eine gute Wahl bei segmentalen Defekten bei Knochen von >5-6 cm, welche eine längere Zeit für die Resorption benötigen, und ein Bruch am Transplantat kann erfolgen, wenn keine richtige Osteogenese vorhanden ist. Dabei ist zu beachten: Wenn Knochentransplantat in kleine Teilchen fragmentiert, wird sogar die Spongiosa getötet und kann nicht mehr osteogen sein. Die wichtigsten Vorteile der autologen spongiösen Transplantate sind ihre exzellente Erfolgsrate und ihr geringes Risiko von Übertragung von Krankheiten. Nachteile sind eine potentielle Morbidität an der Entnahmestelle, Verfügbarkeit in begrenzten Mengen und das Risiko von Wundinfektionen, erhöhter Blutverlust und eine verlängerte Zeit unter Anästhesie.

Der Ort der Transplantation spielt auch eine wichtige Rolle bei der Beeinflussung der Osteogenese. Resorption und Einsatz eines

Knochenimplantat in einem Skelett-Bett tritt schneller am Ende eines langen Knochens (spongiös) als in der Mitte des Schafts (kortikaler Knochen) auf. Genauer Kontakt zwischen einem kortikalen Knochenimplantat und seinem Bett ist äußerst notwendig. (Nandi, et al. 2010)

Allogene Knochenimplantate: Die Einschränkung bei der Beschaffung von Autotransplantaten für Knochenimplantationen kann man durch die Verwendung von allogenen Transplantaten überwinden. Allogene Knochenimplantate werden als Kadaver bezeichnet, erhalten von Spenderknochen und haben sowohl osteoinduktive (sie lassen BMP auf die Knochenzellen wirken) und osteokonduktive Eigenschaften, haben aber einen Mangel an osteogenen Eigenschaften aufgrund des Fehlens von lebensfähigen Zellen. Allerdings ist die Gewinnung und Konservierung von allogenen Transplantaten ein weiterer limitierender Faktor. Der große Vorteil der allogenen Knochen ist seine leichte Verfügbarkeit in verschiedenen Formen und Größen durch die Gewinnung aus Kadaverquellen. Es kommt zur Vermeidung der Notwendigkeit die Trägereinrichtungen zu opfern, und es entsteht keine Entnahmemorbidität. Dennoch gibt es einige Kontroversen über Vereinigung von allogenen Transplantatknochen mit der Übertragung von Infektionserregern, dieses wichtige Anliegen ist praktisch eliminiert durch Gewebeverarbeitung und Sterilisation.

Allogene Knochen sind in vielen Formen verfügbar: als demineralisierte Knochenmatrix, in Stückchen und spongiösen Chips, kortikospongiöse und kortikale Transplantate und als osteochondrale und Ganzkörper-Knochensegmente.(Nandi, et al. 2010)

Aufgrund der großen Anzahl an unterschiedlichen Biomaterialien wird hier nur eine Auswahl präsentiert.

1.3.5.1 Auf Keramik-basierende Knochenersatzmaterialien

Keramik-basierende Transplantate werden schon seit längerer Zeit verwendet. Verwendet werden vor allem Ersatzmaterialien, die auf

Kalziumphosphat basieren, wie beispielsweise Hydroxyapatit (HA) - Trikalziumphosphat (-TCP) und bioaktives Glas. (Nandi, et al. 2010) Die osteoinduktive Leistung von offenporiger CaP-Keramik variiert jedoch stark und wird durch die chemische Zusammensetzung und Struktur beeinflusst (z.B. Makroporosität, Mikroporosität, Konkavität, Oberfläche und Rauigkeit). (Chatterjea et al., 2013)

a) Calcium Hydroxyapatit (HA)

Hydroxyapatit ist eine biokompatible Keramik, die eine hochkristalline Form von Calciumphosphat aufweist und durch hochtemperierte Reaktionen hergestellt wird. Die nominelle Zusammensetzung dieser Mischung ist $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)(\text{OH})_2$. Die einzigartige Eigenschaft dieses Materials ist die chemische Ähnlichkeit mit dem mineralischen Anteil des Knochens; diese Ähnlichkeit wird durch sein osteokonduktives Potential und seine ausgezeichnete Biokompatibilität beschrieben. HA bietet eine Struktur oder ein Gerüst und kann so eine enge Schnittstelle mit den angrenzenden Knochen haben. HA fand begrenzte Anwendung bei der Behandlung von tragenden segmentalen Knochendefekten in den frühen Stadien der Implantationen.

HA hat sich etabliert als ein ausgezeichnetes Material für osteoinduktive Wachstumsfaktoren und osteogenen Zellpopulationen und dient als nützlicher bioaktive Carrier für die Zukunft. Die ideale Porengröße für eine Biokeramik sollte ähnlich der Spongiosa sein. (Nandi, et al. 2010)

Während der letzten Jahre wurden Anstrengungen unternommen, um in der Entwicklung befindliche Biokeramikmaterialien, ihre mechanischen und biologischen Eigenschaften sowie ihre Zytokompatibilität für den Einsatz in der Gewebetechnik zu verbessern. HA als synthetisches Material ist aufgrund seiner mäßig bis geringen Löslichkeit und seiner mechanischen Eigenschaften im Körper begrenzt. Es wurde HA, dem Mangan und/oder Zink zugesetzt wurde, als Knochenersatzmaterial ausprobiert, und das führte zu einer schnelleren Resorptionskinetik. (Nandi, et al. 2010)

b) Bioaktives Glas

Bioaktives Glas (Bioglas) wurde zuerst entwickelt. Dieses Glas ist biokompatibel, osteoinduktiv und bindet an Knochen ohne eine dazwischenliegende Bindegewebsschnittstelle. Dieses Material ist zum Auffüllen von Knochendefekten weit verbreitet gewesen, alleine und in Kombination mit autologer und allogener Spongiosaplastik. Bioglas ist hauptsächlich zusammengesetzt aus Siliziumdioxid, Natriumoxid, Kalziumoxid und Phosphat.

Die Knochenbindungsreaktionen nach langfristigen Implantationen sind Ergebnisse aus einer Folge von Reaktionen mit dem Glas und seiner Oberfläche. Diese biologische Apatitschicht ist teilweise durch Knochen ersetzt. Das Verhalten von bioaktiven Gläsern hängt von der Zusammensetzung des Glases, dem umgebenden pH, der Temperatur und von der Oberflächenbeschaffenheit auf dem Glas ab. Die Porosität bietet ein Gerüst, auf dem neu gebildeter Knochen nach vaskulärem Wachstum und Differenzierung der OB abgeschieden werden kann. Die Porosität von Glas profitiert auch bei der Resorption und Bioaktivität.

Bioaktives Glas wurde klinisch zum Wiederaufbau vom Mittelohr, als Füllmaterial in der Tumor-Chirurgie, zur Behandlung von parodontalen Knochendefekten, bei Verödung der Stirnhöhlen, bei der Reparatur von orbitalen Frakturen, in Lumbalfusionen und für den Wiederaufbau von Beckenkammdefekten nach Knochenentnahme verwendet. (Nandi, et al. 2010)

c) Kalzium Phosphat-Zement

Kalziumphosphatzement wurde vor mehr als drei Jahrzehnten als bioaktives Knochenersatzmaterial eingeführt. Als Paste oder injizierbares Kalziumphosphatzement bietet es den Vorteil, dass es bei der Anwendung bei Knochendefekten frei formbar und anpassungsfähig ist. Der Nachteil bei der Verwendung dieses Materials war, dass Nähe zum Wirtsknochen notwendig war, um Osteokonduktion zu erreichen. Selbst wenn dies erreicht ist, ist neues Knochenwachstum häufig stark eingeschränkt, weil das Material keine natürliche Osteoinduktion besitzt. Um diese Einschränkungen zu überwinden, wurde gezeigt, dass eine Reihe von verschiedenen von Knochen abgeleiteten Wachstumsfaktoren das

Knochenwachstum, Kollagensynthese und Frakturheilung in vitro und in vivo stimulieren. (Nandi, et al. 2010)

d) Trikalziumphosphat (TCP)

Wie Hydroxyapatit ist TCP bioabsorbierbar und biokompatibel. Die chemische Zusammensetzung und Kristallinität des Materials ähneln dem mineralischen Teil des Knochens. Die nominale Zusammensetzung von TCP ist $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Es existiert entweder in - oder -kristalliner Form. Die Geschwindigkeit des biologischen Abbaus ist höher im Vergleich zu HA. Die Abbaubarkeit erfolgt durch eine Kombination aus Auflösung und Resorption von OC.

TCP-Implantate stehen seit zwei Jahrzehnten als synthetische Knochenhohlraum-Füllstoffe in orthopädischer und zahnärztlicher Verwendung. Durch die kleine Partikelgröße und eine damit verbundene schwammartige Mikroporosität wird angenommen, dass die osteokonduktiven Eigenschaften verbessert sind und gleichzeitig eine rechtzeitige Resorption durch den Remodellingprozess fördern. (Nandi, et al. 2010)

e) Sonstige:

a. Korallen

Es wurde beobachtet, dass Korallen marine wirbellose Skelette haben, die eine ähnliche Struktur wie kortikale Knochen und Spongiosa mit interkonnektierender Porosität haben. Korallines HA wird mittels einer hydrothermalen Austauschmethode verarbeitet, wodurch das Korallenkalziumphosphat zu kristallinem HA umgewandelt wird und eine ähnliche Struktur wie humane Trabekelknochen aufweist. Die klinische Leistungsfähigkeit von autologen Spongiosatransplantaten und korallinen HA zeigen während der Befüllung von Knochenhöhlräumen und bei geschwächten Gelenksflächen in Tibiaplateaufrakturen ähnliches Verhalten. In jüngerer Zeit wurde korallines HA als Träger für einige vom Knochen abgeleitete Wachstumsfaktoren verwendet. Zur Vermeidung von Entnahmestellen-Morbidität kann korallines Hydroxyapatit-Granulat oder Blöcke von unterschiedlicher Größe verwendet werden, um methaphysäre Defekte nach Reduktion von geschwächten Gelenkssegmenten zu füllen. Korallen-Hydroxyapatit-Knochentransplantate scheinen ein klinisch

wirksamer Ersatz für den Einsatz bei Fuß-Verfahren zu sein, obwohl die langsame Resorption ein charakteristisches Merkmal des Transplantationsmaterials ohne Beeinträchtigung ist. Eine weitere Kontraindikation für den Einsatz dieses Materials sind Fugen auf den Oberflächen, diese würden es erlauben, dass das Transplantationsmaterial in die Fuge migriert. (Nandi, et al. 2010)

b. Chitosan und Schwammskelette

Chitosan und Schwammskelette haben sich als wirksame Biomaterialien für moderne Gewebetechnik bewiesen. Die Fülle und strukturelle Vielfalt der natürlichen marinen Schwammskelette und ihr Potential als multifunktionales Zell-leitendes und Zell-induktives Gerüst zusammen mit der kollagenen Zusammensetzung der Fasern zeigen eine vielversprechende neue Quelle von Gerüst für die Geweberegeneration.

Chitosan, ein natürliches Produkt, wird aus dem Polysaccharid Chitin (Aminopolysaccharid; eine Kombination aus Zucker und Protein) aus einer Fülle von Krustentieren wie Shrimps, Krebse, Hummer und andere Schalentiere gewonnen. Chitosan wäre ein effektives Material, um Knochendefekte aufgrund seiner Biokompatibilität zu reparieren. (Nandi, et al. 2010)

c. Metalle

Eine Vielzahl von porösen Metalloberflächen von Beschichtungen wurde als Oberfläche für das Einwachsen von Knochen, beim Einsatz bei Gelenkprothesen und als Ersatzteile an Knochen angewendet. Dazu gehören zum Beispiel gesinterte Kobalt-Chrom-Perlen und Titan-beschichtete Fasermetalle. Neue Techniken der Metallurgie schaffen metallische Matrices von viel größerer Porosität. Tantal kann zum Beispiel als metallische Schaumstruktur hergestellt werden, mit miteinander verbundenen Poren, welche ein außergewöhnlich schnelles und vollständiges Einwachsen ermöglichen. Hydroxyapatit-Beschichtung von Metalloberflächen verbessert das Einwachsen und direkte Verklebung des Knochens mit der porösen Oberfläche. Grundsätzlich können diese Beschichtungen auf Implantaten mit relativ einfacher Oberflächengestaltung unter übermäßig hohen Temperaturen verwendet werden. Das bedeutet aber, dass es schwierig ist, Implantate mit

komplexer Oberflächengestaltung (poröse Oberflächen) herzustellen, und dass keine biologisch aktiven Mittel während des Verarbeitungsvorganges hinzugefügt werden können. (Parikh 2002)

1.3.5.2 Polymere

a. Natürliche Polymere

Natürliche Polymere wurden verwendet, um die extrazelluläre Matrix des Knochens zu imitieren. Dieser Ansatz hat eine umfassende Literatur über die Nützlichkeit von Knochenersatzmaterialien wie Kollagen Typ I, Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat (wurde nie alleine verwendet) und deren Mischungen mit Keramik und anderen natürlichen Materialien produziert. Unter diesen wurde große Aufmerksamkeit auf Chitosan, Alginate, Gelatine, Seide und deren Verbindungen gerichtet. In jüngerer Zeit wurden Fibrinkleber-basierte Transplantate vorgeschlagen, basierend auf der Beobachtung, dass Fibringerinnsel in der initialen Phase des sekundären Heilungsprozesses auftreten. Fibrinkleber wurde alleine oder in Gegenwart von Zellen, Hydroxyapatit und anderer Keramikpartikel verwendet, oder mit reich an Blutplättchen und anderen Wachstumsfaktoren angereichertem Plasma mit vielversprechenden Ergebnissen eingesetzt.

Alle natürlichen Polymere sind biokompatibel, biologisch abbaubar und in der Lage, mit Zellen zu interagieren. Natürliche Polymere können aufgrund ihrer ähnlichen chemischen Struktur lösliche organische und anorganische Moleküle sein. Allerdings sind sie im Vergleich zu anderen Biomaterialien nicht stabil, welches ihren Einsatz in Kombination mit Keramik und / oder natürlichen oder synthetischen Polymeren rechtfertigt, um ihre mechanischen Eigenschaften zu verbessern. Darüber hinaus können natürliche Polymere Quellen für potenzielle Immunantworten und Infektionen aufgrund ihres tierischen Ursprungs sein. Schließlich können natürliche Polymere unter immanenten Chargenunterschieden leiden, und es ist schwierig, den Zeitverlauf Ihrer Abbauprodukte zu ändern. Diese Frage motivierte die Entwicklung von weniger antigenen Materialien, sowie der Atelokollagene oder die Verwendung von synthetischen Polymeren. (Baroli 2009)

b. Synthetische Polymere

Synthetische Polymere werden im großen Umfang für die Herstellung von Gerüsten, Gewebeersatz und Transplantaten bestimmungsgemäß für regenerative Prozesse verwendet. Den Vorteil der Verwendung von synthetischen Polymeren kann man wie folgt zusammenfassen: (i) Vermeidung von Infektionen oder Transfektionen, (ii) Vermeidung von Immunogenität, (iii) eine verbesserte Kontrolle über chemische Eigenschaften und (iv) biologische Abbaubarkeit.

Biologischer Abbau wird durch Einführung von hydrolysierbaren chemischen Bindungen zwischen polymeren Untereinheiten erreicht. Darunter sind Ester, Ether-Ester und Anhydride am gebräuchlichsten. Die Abbaurate ist daher invers und korreliert mit der Energie der chemischen Bindungen. Außerdem sollte eine große Aufmerksamkeit auf die biologischen Abbaumechanismen gerichtet werden, Polymere werden durch Masse leichter abbaubar. Sie werden durch Stabilitätseinbußen herabgesetzt und sind in der Regel hydrophil.

Wenn sie als makroporöse Transplantate hergestellt werden, werden ihre mechanischen Eigenschaften wie zum Beispiel Stabilitätseinbußen verringert. Durch Oberflächenerosionen, welche allgemein hydrophobe Mechanismen sind, und stetigen Abbau von Volumen werden Polymere abgewertet. Doch durch eine einfache Strategie, nämlich durch Einsatz von Polymermischungen, können mechanische und stabilitätssenkende Eigenschaften verändert werden. Die Nutzung von polymeren Knochenersatzmaterialien hat jedoch einige Nachteile, dazu gehören: (i) Produktion von toxischen Abbauprodukten, (ii) Erzeugung von Wasserstoff-Ionen an der Implantatstelle (häufige Nebenwirkung von Polyester), (iii) Induktion von chronischen Entzündungen an der Implantatstelle, (iv) niedrige Clearance und (v) schlechte biologische Aktivität. Verwendete Polymere sind zum Beispiel Polymilchsäure, Polymilchsäure-Polyglykolsäure-Copolymer, Polyethylenglykolverbindungen, Polyanhydride und photopolymerisierbare Derivate. (Baroli 2009)

Eine detailliertere Beschreibung der einzelnen Polymere würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen, allerdings möchte ich einige zusätzliche Kommentare zu einem in meiner Arbeit vorkommenden Polymer machen.

Ein häufiges Hindernis bei der Gestaltung optimaler Biomaterialien für viele Anwendungen ist die Schwierigkeit, dass mehrere und oft konkurrierende Design-Ziele in einer Strategie vereint werden sollen. Zum Beispiel: Synthetische Polymere sind oft biokompatibel, aber ihnen fehlt der Einsatz bei Zelladhäsion und Zellwachstum. Das hat zu der Notwendigkeit einer Änderung von vielen Materialien mit biologisch aktiven Sequenzen bzw. Faktoren geführt. Umgekehrt leiten sich die natürlich vorkommenden Polymere aus extrazellulären Matrixproteinen ab, und bieten so den Vorteil der biologischen Signalgebung, aber ihre antigenen und physikalischen Eigenschaften sind schwieriger zu modulieren als bei synthetischen Polymeren.

Menschliches Elastin bietet einzigartige physikalische Eigenschaften des Bindegewebes, in welchen es gefunden wurde (Haut, Bänder, Arterien, etc.), es verleiht sowohl Kraft wie auch Dehnbarkeit. Elastin enthält zwei Hauptdomänen: Eine stark hydrophobe und eine Vernetzungsdomäne, die dem Gewebe seine mechanischen Eigenschaften geben, und zur gleichen Zeit ermöglichen sie eine Vernetzung mit benachbarten Molekülen. Eine Vielzahl von Polymeren sind neu für Gewebetechniken synthetisiert worden, mit menschlichen Elastin-Sequenzen als Bausteine und mit dem Ziel, eine präzise Steuerung der physikalischen und funktionalen Eigenschaften des Polypeptids auf der genetischen Ebene oder durch chemische Synthese zu ermöglichen. Eine Klasse von künstlich repetitiven Polypeptiden, die sich von Elastin ableiten, sind Elastin-like-Polypeptides (ELPs). Das sind Polymere des Pentapeptidmotivs VPGVG, welches über Arten hinweg beobachtet wurde. ELPs sind thermisch ansprechend und durchlaufen einen reversiblen inversen Temperatur-Phasenübergang, wodurch ELP-Moleküle sich selbst hydrophob verbinden. Mit einem Anstieg der Temperatur über eine charakteristische Übergangstemperatur bildet es eine hochviskose Flüssigkeit, welche als Koazervat bezeichnet wird. Die Übergangstemperatur ist abhängig von ELP-Molekulargewicht und Konzentration. Die Übergangstemperaturen der ELPs folgen der Hofmeister-Reihe nahezu perfekt, wenn auch viel geringere Konzentrationen verwendet werden als bei Proteinen, und

bieten eine rationales und berechenbares Verfahren, um isotherm den Phasenübergang eines ELPs durch Zugabe von Salz auszulösen. (Nettles et al., 2010)

ELPs sind attraktiv für Gewebekulturen aus mindestens fünf wichtigen Gründen: Erstens, weil ELPs genetisch codiert werden können: Ihre Synthese eines synthetischen Gens in einem heterologen Wirt (z.B. Bakterien oder eukaryotische Zellen) ermöglicht eine vollständige Kontrolle über die Aminosäuresequenzen und das Molekulargewicht. Zwei Variablen, die nicht einfach und genau zu steuern sind in synthetischen Polymeren. Zweitens, ELPs können leicht auf Plasmide übertragen und in E.Coli expremiert werden, mit relativ hohen Ausbeuten. Das macht sie auch attraktiv für Gewebetechnikanwendungen, wo oft große Mengen an Polymeren erforderlich sind. Drittens, sie können leicht aus E.Coli- und anderen Zelllysaten mit Hilfe eines diskontinuierlichen Verfahrens (Batch-Verfahren) durch Ausnützen des Temperatur-Phasenübergangs gereinigt werden. Viertens, ELPs können so konstruiert werden, dass sie sich den viskoselastischen Eigenschaften von nativen Elastin beim Vernetzen annähern. Fünftens, sie sind biokompatibel, biologisch abbaubar und nicht immunogen.

Die Temperaturempfindlichkeit von ELPs kann bei Gewebetechnikapplikationen, welche in injizierbaren Formulierungen von Biomaterialien als Anwendung profitieren, genutzt werden und kann aber auch genutzt werden, um eine feste Matrix nach der Defektfüllung zu bilden. Die inhärenten Eigenschaften des thermischen Übergangs von ELP bieten einen natürlichen Auslöser für Koazervation, und die Reversibilität des Phasenübergangs ermöglicht das Wiederherstellen des ELPs bei Anwendungen, wo ein Gerüst-freies Ergebnis gewünscht wird. ELPs können auch entworfen werden, um mit einem biokompatiblen Vernetzer gemischt zu werden, welcher auch von der Temperatur oder anderen äußeren Reizen ausgelöst werden kann, um ein mechanisch stabiles Gerüst nach der Vernetzung zu bilden. Diese Funktionen ermöglichen ELP-Lösungen, biokompatibel mit Zellen oder anderen bioaktiven Faktoren vor der Gelierung vermischt und in eine Defektstelle injiziert zu werden. Aufgrund dieser Funktion kann ein mechanisch

funktionelles Gerüst nach der Implantation gebildet werden. Dadurch entfällt die Verzögerung verbunden mit einigen anderen implantierbaren Gerüsten, die erst nach Einleitung von Bildung neuen Gewebes mechanisch robust sind. In dem Bemühen, die Eigenschaften von ELPs für eine Vielzahl von Anwendungen weiter zu optimieren, wurden sie in einer Vielzahl von Weisen verarbeitet, um Gele, Filme, Schäume und Fasern zu bilden. (Nettles, et al. 2010)

ELPs, die aus dem Polypeptidmotiv VPGXG zusammengesetzt sind, werden in vivo langsam abgebaut, und ihre Abbaugeschwindigkeit kann weiter abgestimmt werden durch die explizierte Einbeziehung der Stellen der spezifischen Proteaseansätze innerhalb der ELP-Sequenz. ELPs sind nicht zelladhäsiv, aber sie unterstützen die zelluläre Lebensfähigkeit und den Phänotyp von Zellen, die nicht am Substrat haften müssen, obwohl trivial (unbedeutend) aber auch zelladhäsive Peptidsequenzen in ELPs eingebaut werden können, falls dies erforderlich ist. ELPs sind besonders attraktiv für die Wiederherstellung von Zellen und Zellschichten für gerüstfreie Gewebetechnikapplikationen durch die Ausnutzung ihres inversen Temperatur-Phasenübergangs. ELPs sind auch attraktiver als Copolymere, deren thermische und nicht klebende Eigenschaften als einzigartige Eigenschaft zu den Fähigkeiten des Polymers beitragen. (Nettles, et al. 2010)

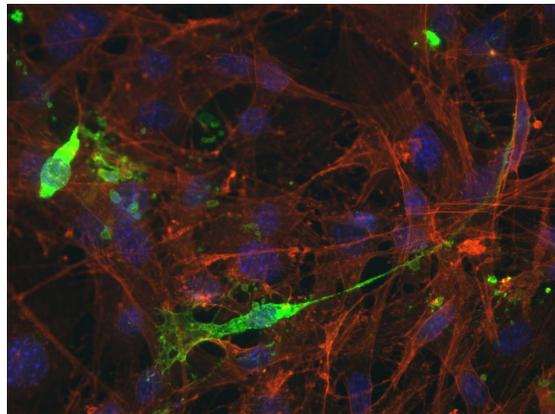
1.4 Zelltod

Trotz der großen Bedeutung dieses Prozesses sind die zugrunde liegenden Mechanismen des Zelltods noch weitgehend unverstanden. In der neuen Literatur wird der Zelltod durch zwei alternative, unterschiedliche Begriffe beschrieben, als Apoptose, eine programmierte, „managed“-Form des Zelltodes und Nekrose, eine ungeordnete und zufällige Form des zellulären Sterbens. Wobei man zwischen a) das Verfahren, bei dem Zellen sterben, der Zelltod und b) die Änderung, der sich Zellen und Gewebe unterziehen, nachdem die Zellen sterben, unterscheidet. Nur das letztere Verfahren kann man als Nekrose bezeichnen, und stellt einen „no return“-Prozess im Leben der Zelle dar.

Zelltod ist Teil des normalen Entwicklungs-Reifungszyklus, und ist die Komponente der Reaktionsmuster von lebendem Gewebe zu xenobiotischen Mitteln (d.h. Mikroorganismen und Chemikalien) und endogener Modulatoren wie Entzündung und Durchblutungsstörungen. Der Zelltod ist eine wichtige Variable in der Entwicklung von Krebs, Krebsprävention und Krebstherapie. (Kanduc et al., 2002)

1.4.1 Die Apoptose

Apoptose beinhaltet ein dynamisches Zusammenspiel mehrerer Moleküle mit auf- und ab-regulatorischen Eigenschaften. Stimulation der proapoptotischen Moleküle oder Hemmung anti-apoptotischer Faktoren sind abhängig vom Zelltyp und einer Form von Angriff auf die Zelle. Es ist unwahrscheinlich, dass die Aktivierung oder Inaktivierung einer einzelnen Komponente das endgültige Schicksal der Zelle so verändert und zur Apoptose führt.



In der klassischen Form von Apoptose kommt es in der Zelle zur Aktivierung des Zelltodes durch ausführende proteolytische Enzyme, welche Cysteinyl-Aspartat spezifische Protease

Abbildung 4: : Osteoblasten auf einem Deckglas. Die grün gefärbten Zellen zeigen Apoptose in einem frühen Stadium. Blau sind wieder die Zellkerne und rot das Aktingerüst von gesunden Zellen.

(Caspase) genannt werden. Caspasen sind gruppiert als Initiator-Caspasen (8 und 10) und Ausführungs-Caspasen (3, 6 und 7). Aktivierung der Ausführenden-Caspasen erfolgt über Apoptose Typ 1 und/oder Typ 2.

1.4.1.1 Apoptose Typ 1:

Der extrinsische Weg oder der Todesrezeptorweg der Apoptose wird durch die Bindung von dem TNF-Ligand zum TNF (Tumor Nekrosis Faktor)-Rezeptor, der TRAIL-Ligand (TNF-related apoptosis Inducing Ligand) zu DR4 und DR5-Rezeptor, oder der FasL Ligand zum Fas-Rezeptor eingeleitet. Diese Assoziation führt zur Einstellung der Anschlussmoleküle wie FADD oder TRADD, was zur Aktivierung von

Initiator-Caspase 8 und 10 führt, was wiederum die Ausführung-Caspasen 3, 6 und 7 aktiviert - den Höhepunkt in der Apoptose.

1.4.1.2 Apoptose Typ 2:

Der intrinsische oder mitochondriale Signalweg wird durch die Freisetzung von Cytochrom C aus dem mitochondrialen Intermembranraum in das Zytosol aktiviert. Einmal freigesetzt, interagiert Cytochrom C mit Apaf-1, ATP und Pro-Caspase 9, die Apoptosome bilden. Die Apoptosomen spalten und aktivieren Caspase 9. Die Aktivierung von Caspase 9 ohne Beteiligung von Apoptosomen wurde ebenfalls beschrieben.

Die Permeabilität der Membran der Mitochondrien auf Cytochrom C wird durch das relative Verhältnis von pro-apoptotischen und anti-apoptotischen Mediatoren bestimmt. Wenn pro-apoptotische Moleküle BAX und/oder Bak aus dem mitochondrialen Intermembranraum verlagert werden, kommt es zu einer Nettozunahme von Cytochrom C, welche zur Verfügung steht, um die Apoptosomen zu bilden. Pro-apoptotische Moleküle wie BAX oder Bak vermitteln Effekte, durch die es zur Veränderung der mitochondrialen Membranpermeabilität kommt. Ein weiterer Vorschlag für den Mechanismus der Wirkung von BAX oder Bak ist, dass sie zu einer erheblichen Konformationsänderung in der Spannung führen und einen Anionenkanal (VDAC) bilden, so dass große Proteine passieren können. Kopplung von pro-apoptotischen Molekülen mit anti-apoptotischen Faktoren (d.h. Bcl-2, Bcl-xL und Mcl-1) neutralisieren ihre anti-apoptotischen Aktionen. Dabei bestimmt das relative Verhältnis der pro-apoptotischen und anti-apoptotischen Mediatoren die relative Menge von Cytochrom C, welche zur Verfügung steht, um Apoptosome bilden.

Der mitochondriale Weg führt auch zur Stimulation von Apoptose durch die Freisetzung von SMAC/DAIBLO und Omi/HTRA-2. Die Rolle dieser Faktoren ist es, die Aktivierung von Inhibitoren der Apoptose (IAP) wie cIAP1, cIAP2 und XIAP zu neutralisieren.

Synthese und/oder Aktivierung von IAPs geschehen unter der Kontrolle von Transkriptionsfaktor Nuklear Faktor kappa B (NF B). NF B liegt im

Cytosol als inaktive NF B subunits (p50 und/oder p65) vor, die durch Translokation in den Zellkern wandern. Phosphorylierung führt zur Ubiquitierung und anschließendem Abbau von I B, welche entweder eine oder beide Einheiten von NF B befreit. NF B (p50 und/oder p65) transloziert dann in den Zellkern, wo es die Transkription von IAPs initiiert.

Kommunikation zwischen Apoptose Typ 1 und Typ 2 kann in verschiedenen Stadien auftreten. Aktivierung von Caspase 8 ist das Ergebnis durch die Stimulation von Bid, was dazu führt, dass Cytochrom C freigesetzt wird und Apoptosome aktiviert werden (in Typ 2-Zellen). Ähnlich ist die nachgeschaltete Stimulation von Caspase 6, die zur Aktivierung von Caspase 8 führt. Es wurden auch andere Mechanismen der Apoptose beschrieben, welche unabhängig von der Caspase-Kaskade sind. Diese Mechanismen können Proteasen umfassen, Apoptose-induzierende Faktoren (AIF), Endonuklease G, Calpaine und Kathepsine. AIF wird in das Cytosol aus dem mitochondrialen Intermembranraum freigesetzt, wo er mit Cyclophilin A eine DNAase wird. Sobald einmal Umbau im Zellkern eintritt, wird DNA Fragmentierung eingeleitet.

Es stehen mehrere Studien zur Verfügung, um festzustellen, ob die Zellen den programmierten Zelltod durchlaufen oder Nekrose. Das Studium der Apoptose kann in vielfältiger Weise aufgeteilt werden: 1) Zeitlicher Verlauf: früh versus spät; 2) extrinsischer versus intrinsischer Weg; 3) Aufgeteilt auf Nukleus, Zytosol, Mitochondrien, Zellmembran. (Huerta et al., 2007)

1.4.2 Nekrose

Morphologischer nekrotischer Zelltod und Nekrose bezieht sich auf einen Gewinn an Zellvolumen, Schwellung der Organellen, eine Ruptur der Plasmamembran und den anschließenden Verlust des intrazellulären Inhaltes. Zahlreiche Mediatoren, Organellen und zelluläre Prozesse werden mit dem nekrotischen Zelltod in Verbindung gebracht, aber es ist noch unklar, wie sie miteinander verbunden sind. Biochemisches Verhalten der Apoptose, wie Aktivierung von spezifischen Proteasen und oligonucleosomaler DNA-Fragmentierung kann kaum in nekrotischen Zellen passieren. Nekrose wie Apoptose kann als eine Form der Ausführungsphase des programmierten Zelltodes in Betracht gezogen

werden. Allerdings sind sowohl die Folgen des nekrotischen als auch des apoptotischen Zelltodes für den gesamten Organismus sehr unterschiedlich. Im Falle der Nekrose kann eine entzündliche Reaktion durch zytosolische Bestandteile verursacht werden, welche in den interzellulären Raum durch die beschädigte Zellmembran fließen. Bei der Apoptose sind diese Produkte sicher in Makrophagen isoliert. Eine Störung der feinen Balance zwischen Nekrose und Apoptose kann ein zentrales Element in der Entwicklung von einigen Krankheiten sein. Die Begriffe „programmierte Nekrose“ oder „Necroptosis“ betonen ein gewisses Maß an Regulierung und molekularem Mechanismus in diesem Todesprozess. (Chaabane et al., 2013)

Unter rauen Bedingungen wie Stress durch Detergentien oder Gefrieren und Auftauen von Zellen sterben diese durch einen nicht-regulierten, schlecht definierten Prozess, die Nekrose. Jedoch im Widerspruch zur klassischen Lehrbuchvorstellung, dass es lediglich eine zufällige Folge von nicht physiologischem Stress ist, könnte Nekrose sowohl in Bezug auf ihren Kurs und ihr Auftreten programmiert werden. Die Kaskade von Ereignissen legt nahe, dass es einen programmierten Verlauf der Ereignisse (d.h. wie Nekrose sich manifestiert) innerhalb der nekrotischen, sterbenden Zelle gibt.

Erstens kann Nekrose während der Entwicklung auftreten (d.h. der Tod von Chondrozyten steuert das Längenwachstum der Knochen) und bei Erwachsenen während der Gewebemöostase (z.B. in Darmepithelzellen). Zweitens, Nekrose kann durch die Besetzung bestimmter Plasmamembran-Rezeptoren durch ihre physiologischen Liganden ausgelöst werden. Diese Beobachtung impliziert, dass spezifische Signalwege miteinander verbunden sind und zur Induktion von anderen Arten von Zelltod führen. Drittens, Anfälligkeit für den nekrotischen Tod kann durch genetische und epigenetische Faktoren reguliert werden. Viertens, die Hemmung einiger Enzyme und Prozesse spielen eine aktive und entscheidende Rolle bei diesem tödlichen Prozess. Fünftens, Hemmung von Caspasen (die oft für die morphologische Manifestation der Apoptose erforderlich ist) kann das

morphologische Erscheinungsbild des Zelltodes ändern. (Golstein und Kroemer 2007)

Um ein besseres Verständnis für das Verhalten von Knochenzellen auf Biomaterialien zu erhalten, befasst sich diese Arbeit mit der letzten Phase des Zellzyklus, der Apoptose und Nekrose von OB und OC auf unterschiedlichen Biomaterialien.

2 MATERIAL und METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Kulturmedien

Das verwendete α MEM beziehungsweise β MEM besteht aus α MEM mit 10 %, (in einzelnen Experimenten 5 % FCS), sowie 1 % P/S, um eine Kontamination des Mediums während der Lagerung oder der Kultur zu verhindern. Im Rahmen der durchgeführten Experimente wurde hitzeinaktiviertes FCS verwendet. Das Medium zur Herstellung der ELP-Lösung enthielt kein FCS, sondern nur 1 % P/S zusätzlich zu den Inhaltsstoffen des α MEM.

2.1.2 Verwendete Zellen

2.1.2.1 Osteoblasten:

Die in den Experimenten verwendeten OB stammen aus den Calvarien 1-3 Tage alter Mäuse.

2.1.2.2 Knochenmarkszellen

Osteoklastengewinnung aus einer Co-Kultur: es wurden zu einer bereits bestehenden Mäuse-Osteoblasten-Kultur das Knochenmark aus Femur und Tibia der Hinterbeine von Mäusen zugesetzt und mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ und PGE_2 kultiviert.

2.1.2.3 Osteoklasten

Für eine Kultur von OC und Knochenmarkszellen ohne vorangegangene Kultur von OB wurden die OC aus den Extremitäten wenige Tage alter Kaninchen gewonnen.

2.1.3 Liste verwendeter Geräte und verwendetem Material

Analysenwaage	Sartorius
Autoklav	SX-300E, Tomy Digital Biology, Japan
Computer	Power Macintosh

	PC (Windows)
Cover Slips (22x22 mm, 12 mm Ø)	Menzel-Gläser, Deutschland Assistant, Glaswarenfabrik Karl Hecht KG, Deutschland
Cryogenic vials	Becton Dickinson, USA
Eppendorf-Gefäße	Firma Eppendorf
Eppendorf Zentrifuge	Eppendorf Zentrifuge 5415 C, Eppendorf, Deutschland
Glaspipetten 5 ml, 10 ml, 20 ml, 25 ml	FA: Brand, Deutschland
Inkubatoren	FA Kendro HERA cell 240, USA
Inkubierschrank	Heraeus instruments BFL 3032
Kameras	Olympus XM10, Japan(fluorescence) Olympus DP25, Japan FA Zeiss: AxioCam MRm
Kleber	Fixo Gum, Marabu, Deutschland
Knochensäge Isomet	Firma Buehler Isomet low speed saw, USA
Kulturplatten (6-well)	FA: Nunc, Dänemark
Kulturplatten (12-well)	FA: Greiner, Bio-One, Deutschland
Kulturplatten (96-well)	FA: Iwaki, Japan
Mikroskope	Nikon TMS No3.02318, Japan BX51, Olympus, Japan ZEISS LSM 510, Deutschland
Magnetrührer	Ikamag®RCT, Janke&Kunkel, Deutschland

Mikropipetten	Labsystems
Parafilm $\text{SM}\%$	American National Can Group, USA
Pasteurpipetten	Copan, Italien
Petrischalen	Sterilin, Bibby Sterilin Ltd., U.K. Iwaki, Japan
pH-Meter	FA: Inula Metrohm 713 pH Meter, Schweiz
Pipetboy	Integra Biosciences
Plastikpipetten 10 ml	Costar, Corning Incorporated, USA
Polystyrene tubes, 5 ml	Becton Dickinson, Falcon®, USA
Sägeblatt	Firma Buehler Diamond wafering blade/series 15 HC diamond, USA
Schüttler	Swip, Edmund Bühler, Deutschland
Silicon	GE Bayer Silicones, USA
Sterile Kunststoffpipette	Costar, USA
Sterile Werkbank (Laminar Air Flow)	FA: Ehret Labor- und Pharmatechnik, Deutschland
Transferpipette	Sterilin, siehe oben
Trockenschrank (Dg Sterilisierung)	WTC, Binder, Germany
Ultraschallbad	FA: Elma Transsonic 570, Deutschland
Vortexmischer	FA: Bender & Hobein AG Vortex Genie 2TM, Schweiz
Waage	MC 210 P Sartorius, Österreich
Wasserbad	FA: Aigner GFL 1086, Deutschland
Zentrifuge	Hermle Z 323K, Bartelt, Österreich

	SORVALL®RT7, Sorvall, USA
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	FA: Greiner, Greiner Bio-One Deutschland Becton Dickinson, USA

2.1.4 Liste verwendeter Lösungen und Substanzen

Alexa Fluor 488	Invitrogen
Alexa Fluor 546	Invitrogen
Alkohol 70% (EtOH 70%)	Sigma
Alkohol absolut	Sigma
Annexin V Apoptose Kit	Vybrant Lot.72B2-1, Molecular Probes
Annexin V Apoptose Detektion Kit FITC	Lot 60593000; ebioscience
DAPI-Stocklösung	Sigma
Doxorubicin	ChNr.40126101, EBEWE Pharma
Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma
Formaldehyd 37%	Sigma
Matrigel	BD Biosciences
MTS-Reagens	Promega
NaN ₃ 500x	Sigma
Natronlauge (NaOH)	Sigma
Pamidronate (AREDIA)	Ciba-Geigy, Schweiz
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Gibco BRL, USA
Phosphate buffered saline (PBS)	Eigenherstellung
Protein-Bestimmung Kit Bio-Rad	Bio Rad

Salzsäure HCl 1m	Fluka
Silicon grease	Wacker-Chemie, Deutschland
Sodium borate	Sigma, USA
-MEM	Firma Gibco

2.2 Methoden

2.2.1 Verwendete Zellen

2.2.1.1 Osteoblastenisolierung

Die verwendeten OB wurden aus den Calvarien oder bis zu drei Tage alter Mäuse gewonnen. Zunächst wurden dafür die Calvarien der Tiere gewonnen und anschließend in einer Collagenase-Dispase-Lösung bei gut 37° Celsius verdaut. Mehrere Fraktionen dieser Enzymlösung wurden gesammelt, vereinigt und nach einer Zentrifugation in -MEM mit 10 % FCS hi in Petrischalen ausgesät. Nach 24 Stunden Inkubation erfolgte ein Mediumtausch, nach insgesamt 48 Stunden Inkubation wurden die Zellen mit Hilfe von Trypsin von den Petrischalen abgelöst und auf mehrere Petrischalen aufgeteilt, um eine größere Zahl an Zellen zu erhalten. Nach weiteren 48 Stunden Inkubation wurden die Zellen erneut abgelöst und in einem speziellen Einfriermedium, welches auch DMSO enthält, bei -80° Celsius zwischengelagert, bevor sie in kleinen Portionen in flüssigen Stickstoff eingefroren wurden. (nach Laborprotokoll)

Zur Verwendung wurden die Zellen im Wasserbad aufgetaut, mit α -MEM + 10 % FCS versetzt und damit auf das Volumen verdünnt, welches zur Aussaat benötigt wird. Diese Zellsuspension wurde dann auf die vorbereiteten Präparate aufgebracht und diese anschließend bei 37° Celsius und 5 % CO₂ inkubiert.

2.2.2 Osteoklasten:

2.2.2.1 Isolierung und Aussaat von Knochenmarkszellen

Vor der Aussaat von Knochenmarkszellen wurden zuvor OB auf den Präparaten für die Dauer eines Tages kultiviert. Die für die Co-Kultur

verwendeten Knochenmarkszellen (BMCs) entstammen dem Knochenmark, das aus Femur und Tibia von Mäusen ausgespült wurde. Die verwendeten Mäuse waren dabei jünger als sechs Monate. Die BMCs wurden zentrifugiert, danach resuspendiert und anschließend auf das Volumen verdünnt, das zur Aussaat notwendig war. Nach der Aussaat wurden die Präparate bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert, und nach Fertigstellung eines Mediums mit 1,25(OH)₂D₃ und PGE₂, mit diesem versetzt und anschließend bis zum Tag 5 inkubiert, wobei jeden zweiten Tag ein Mediumtausch vorgenommen wurde.

2.2.2.2 Kultivierung von Osteoklasten aus Kaninchenknochen

Die 2-3 Tage alten Kaninchen wurden mit Ether betäubt und danach schmerzfrei getötet. Femur und Tibia aller vier Extremitäten wurden für die Zellisolation verwendet. Die gereinigten Knochen wurden im Medium mit einer Schere 2 min. zerkleinert. Das überständige Medium wurde gesammelt und frisches Medium zugegeben. Dieser Schritt wurde noch zweimal wiederholt, um die Zellen aus dem Knochengewebe zu lösen. Zum Abschluss wurden die vorhandenen Knochenfragmente noch 30 sec. gevortext. Die Zellsuspension wurde anschließend bei 600 Umdrehungen pro Minute, 5 min. lang bei 4° Celsius zentrifugiert, das Medium abgesaugt, das Pellet aufgeklopft und mit -MEM + 5 % FCS auf das benötigte Volumen für die Aussaat verdünnt und auf Deckgläsern ausgesät und vorinkubiert. Danach wurden die Präparate in Kulturplatten gelegt, Es folgte ein weiterer Waschschrift. Danach wurden sie in - MEM + 5 % FCS für 2 Tage bei 37°Celsius und 5 % CO₂ kultiviert. (nach Laborprotokoll)

2.2.3 Vorbereitung der Präparate

Alle nachführenden Arbeiten wurden nach den im Labor verwendeten Methoden ausgeführt.

2.2.3.1 Deckgläser

Handelsübliche Deckgläser wurden über Nacht in reinem Ethanol vergällt sterilisiert. Die so vorbereiteten Deckgläser wurden verschlossen gelagert und unter dem Laminar Air Flow zu Beginn des Experiments steril entnommen.

2.2.3.2 Knochenplättchen

Gereinigte Rinderknochen wurden mit einer Knochensäge in 300 µm dicke Scheiben geschnitten, danach mit dem Messer zerkleinert. Um ein Brüchigwerden der Knochen zu verhindern, wurden die Scheiben und die Knochenstücke bis zum Abschluss des Schneidevorganges in dH₂O gelegt. Anschließend wurden die zurechtgeschnittenen Plättchen dreimal in dH₂O für 5 Minuten im Ultraschallbad. Danach wurden diese noch einmal mit 70 % Ethanol für 5 Minuten im Ultraschallbad gewaschen.

Jetzt wurden die Knochenplättchen in reinem Ethanol eingelegt, danach unter dem Laminar Air Flow mit UV-Licht bestrahlt. Anschließend wurden die Knochenplättchen in einer für das Experiment angedachten Kulturplatte fixiert.

2.2.4 ELP

2.2.4.1 Herstellen der ELP-Lösung: (nach Laborprotokoll)

Eine Teilmenge des lyophilisierten und bei -25°C gelagerten Proteins wurde steril entnommen und gewogen. Anschließend wurde mit Medium aufgefüllt, das nur aus α-MEM mit 1% Penicillin/Streptomycin bestand. Zur Suspendierung des Proteins wurde gevortext und anschließend bei 4°C gelagert, damit sich das Protein über Nacht lösen konnte. Vor der Verwendung wurde sichergestellt, dass die Lösung klar ist und keine ungelösten Bestandteile mehr vorhanden sind. Die Lösung wurde bei 4°C gelagert und konnte so für mehrere Experimente verwendet werden.

2.2.4.2 Herstellung von Beschichtung auf Deckgläsern:

Zur Beschichtung von zuvor sterilisierten Deckgläsern wurde die ELP-Lösung auf Eis gelagert und Pipettenspitzen, die mit dem Material in Berührung kommen, ebenfalls vorgekühlt. Unter diesen Bedingungen wurde eine Schicht ELP auf Deckgläser aufgetragen, die in einer Petrischale auf sterilem Parafilm lagen, wobei die Menge an aufgetragener ELP-Lösung bei etwa 100 µl/100 cm² lag. Anschließend wurde die Petrischale verschlossen und für 2 Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde der überstehenden Lösung

erlaubt, abzufließen, die Deckgläser mit Beschichtung zweimal mit PBS steril gewaschen und mit BSA-Lösung versetzt, deren Konzentration bei 5 mg/ml lag und die zuvor eine Stunde auf 70°C erhitzt worden war, sowie anschließend steril filtriert. Nach weiterer Inkubation für zwei Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ wurde erneut zweimal mit PBS steril gewaschen und die derart präparierten Deckgläser im Anschluss mit Medium vorinkubiert. Zur Beschichtung der Böden von Well-Platten wurde in gleicher Weise verfahren. Die Lösungen wurden jedoch direkt auf die Well-Platten aufgebracht und diese inkubiert.

2.2.5 -TCP Tabletten

Für die Herstellung wurden 350 mg -TCP-Pulver eingewogen und mit Hilfe einer hydraulischen Presse zur Herstellung von Presslingen verarbeitet. Das Sintern der Presslinge bei verschiedenen Temperaturen wurde freundlicherweise durch Gerald Zimmer (Fa. Baxter) durchgeführt.

2.2.6 Vorinkubation

Bevor eine Aussaat von Zellen auf den Präparaten erfolgte, wurden diese im Falle von OB in -MEM + 10 % FCS für 24 Stunden, bei ELPs für eine Stunde im Inkubator bei 37° C und 5 % CO₂ vorinkubiert.

Für Osteoklastenkultur: Deckgläser und ELPs über Nacht, -TCB Tabletten sogar 48 Stunden in -MEM + 5 % FCS im Inkubator bei 37° C und 5 % CO₂ vorinkubiert. Osteoblastenaussaat

Ein aus dem Stickstofftank entnommenes Kryoröhrchen mit OB wurde im Wasserbad vorsichtig aufgetaut. Anschließend wurde die Zellsuspension in einen kleinen Teil des -MEM + 10 % FCS Mediums übertragen und mit dem restlichen benötigten Volumen an Medium aufgefüllt, und diese Suspension dann ausgesät.

2.2.8 Zugabe von Substanzen:

Osteoblasten: Nach einer Inkubation von 24 Stunden wurde Doxorubicin in zwei unterschiedlichen Dosen zugesetzt, um jeweils eine Endkonzentration von 0,1 µM und 1 µM zu erhalten (Stammlösung: 1 mM).

Osteoklasten: Nach einer Stunde Inkubation wurde Doxorubicin wie bei den OB zugegeben, weiters Pamidronat, Endkonzentration von 10^{-4} M.

2.2.9 Färbung-Fixierung-Einbettung

2.2.9.1 Annexin V . Apoptose Detektion Kit FITC

Zur Annexin-V-Färbung selbst: Für den zur Verfügung stehenden Kit gab es nur eine Anleitung für FAX und ELISA. Durch Umlegen des FAX-Protokolls gelang es, eine Methode für unsere Zwecke zu entwickeln. Sie ist auf verschiedene Zellen anwendbar und reproduzierbar.

Nach der Inkubation wurden die Präparate mit kaltem PBS einmal gewaschen, danach mit Annexin-Binding-Puffer (1X) einmal gewaschen. Nach dem Waschen wurden Präparate auf Parafilm in eine Metallbox gelegt. Jetzt erfolgte das Auftragen von 100/50 μ l Annexin . Binding-Puffer (1X), des 5 μ l Annexin V Konjugates und 10 μ l Propidiumjodid (PJ), anschließend 15 min Inkubation bei Raumtemperatur unter Lichtschutz. Danach nochmaliges Waschen mit Annexin-Binding-Puffer.

2.2.9.2 Zellfixierung

Zur Fixierung der behandelten Zellen wurden diese in 3,7 % Formaldehyd-Lösung einmal 3 min und anschließend einmal 10 min eingelegt und anschließend mit PBS gewaschen.

2.2.9.3 Färbung der DNA mit DAPI

Die gewaschenen Präparate wurden mit Aceton, die ELPs mit Triton X-100 0,1 % überschichtet, um die Membran der zuvor fixierten Zellen zu permeabilisieren. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Präparate in die mit Hilfe einer DAPI-Stocklösung hergestellte Färbelösung eingelegt und bei 37°C 15 min unter Lichtschutz inkubiert. Anschließend erfolgten Waschschriffe mit PBS und dH₂O.

2.2.9.4 Einbettung der Präparate

Nach den erfolgten Färbungen wurden die Präparate in Einbettungsmittel eingebettet und unter dem Schutz eines Deckglases auf einen Objektträger aufgelegt. Die Ränder des Deckglases wurden anschließend mit Kleber verschlossen, um ein Austrocknen des Einbettungsmittels zu

verhindern. Handelte es sich bei dem Präparat selbst um ein Deckglas, so wurde dieses mit der zellbehafteten Seite zu der Oberfläche des Objektträgers hin gewandt eingebettet und ebenfalls mit Kleber gesichert. Die Objektträger mit den Präparaten exklusive der ELPs wurden anschließend unter Lichtschutz bei 4°C gelagert. Die Objektträger mit ELPs wurden bei Raumtemperatur gelagert, um die Stabilität des ELPs nicht zu gefährden.

3 ERGEBNISSE

Die Auswertung erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop.

Durch die Färbungen Annexin-V und PJ, die eine Unterscheidung zwischen Apoptose und Nekrose ermöglichen sollten, musste beim Zählen der Zellen und auch bei der Bewertung der Form auf andere Parameter als der Aktin-eingefärbten Oberfläche zurückgegriffen werden. Denn die zur Verfügung stehenden Aktin-Färbungen hätten entweder die grüne Annexin V-Färbung oder die rote PJ-Färbung überlagert. Aus diesem Grund wurde beschlossen, die Zellkerne mit DAPI zu färben und über die Zellkerne die Zellen zu zählen. Das stellte bei OB kein Problem dar, war jedoch eine gewisse Herausforderung bei den OC. Durch vorangegangene Schulung und Beobachtungen von OC war das Erkennen dieser Anhand der Zellkernform und Lage in der Folge kein Problem. Weiters wurde die Morphologie der Zellen beobachtet und auch unter den verschiedenen Biomaterialien verglichen.

Die Annexin V-Färbung war nicht immer eindeutig oder nur sehr gering.

3.1.1 Auswertung der Osteoblasten:

Von jedem Deckglas, jedem mit ELP beschichteten Deckglas und jedem -TCP-Pressling wurden fünf Bilder gemacht, eines aus dem Zentrum und eines von jeder Seite. Von jedem Bild wurde die Gesamtzahl der Zellen gezählt, der Anteil der mit Annexin gefärbten und der Anteil der mit PJ gefärbten Zellen.

3.1.2 Auswertung der Osteoklasten:

Aufgrund der geringen Anzahl der Zellen und auch der ungleichmäßigen Verteilung und der Vielzahl von anderen Zellen musste eine modifizierte Methode zur Auszählung verwendet werden. Jedes Deckglas, die mit ELP beschichteten Deckgläser und jeder -TCP-Pressling wurde unter dem Fluoreszenzmikroskop manuell analysiert.

3.2 Ergebnisse der Osteoklasten

Zur Untersuchung des Apoptoseverhaltens von OC auf verschiedenen Biomaterialien wurde in einem ersten Vorversuch der Apoptose-Kit am Mäuse-Co-Kultur-Modell getestet. Die Färbung erfolgte erst nach der Fixierung der Zellen auf dem Objektträger. Unter dem Fluoreszenzmikroskop zeigten sich OC. Es war keine Apoptose/Nekrose-Färbung sichtbar. Aufgrund weiterer Literaturrecherchen wurde beschlossen, die Apoptose-Färbung vor der Fixierung durchzuführen. Das wurde im nächsten Vorversuch erfolgreich durchgeführt. Es zeigte sich jedoch, dass die Anzahl der OC und OB in diesem Modell sehr hoch war. Aufgrund der hohen Zellzahl war es nicht möglich, die Färbung einer bestimmten Zelle zuzuordnen. Aus diesem Grund wurde beim nächsten Experiment der gleiche Versuchsaufbau mit dem Modell der Kaninchenosteoklasten untersucht. Weiters zeigte sich, dass eine Aktin-Färbung sich schwer bis gar nicht mit PJ kombinieren ließ. PJ war in Gegenwart von gefärbten Aktinstrukturen nicht sichtbar. So wurde beschlossen, die Zellen anhand ihrer Zellkerne zu identifizieren und keine Aktin-Färbung zu machen.

3.2.1 Verhalten von Osteoklasten auf Glas:

OC aus wenige Tagen alten Kaninchen konnten gut auf unbeschichteten Deckgläsern kultiviert werden. Die OC auf den Deckgläsern waren sehr groß, und zeigten normale Morphologie. Im Rahmen des Experiments wurden drei Gruppen miteinander verglichen. Die erste Gruppe enthielt unbehandelte OC (Kontrollgruppe). Der zweiten Gruppe waren OC, die mit 0,1 M Doxorubicin und die dritte Gruppe waren OC, die mit 1 M Doxorubicin wurden.

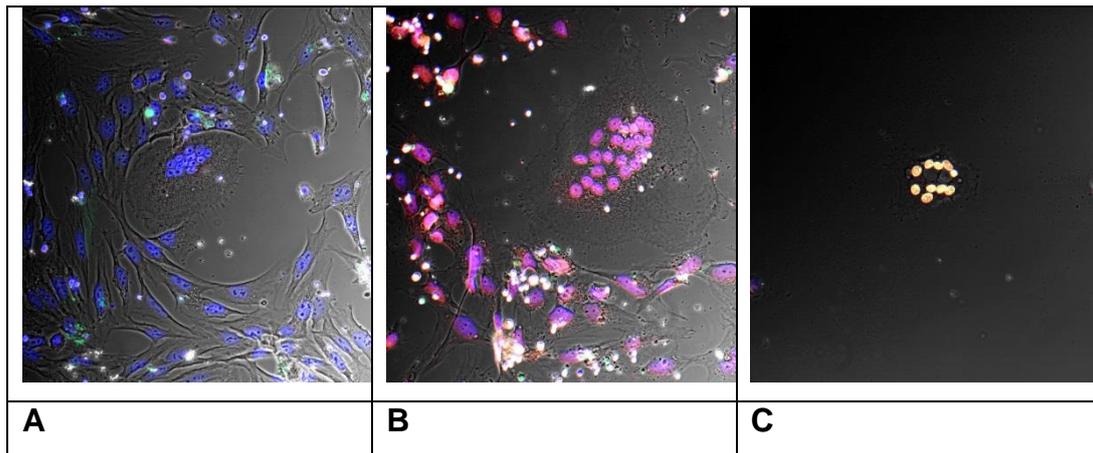


Abbildung 5: Osteoklasten auf Glas unter einem Konfokalmikroskop mit einer Vergrößerung von 25x nach 48 Stunden.

Das Bild A zeigt einen OC auf einem Deckglas unter normalen Bedingungen ohne Zusatz. Bild B zeigt OC auf Deckglas mit Zusatz von 0,1 μM Doxorubicin zum Medium. Bild C zeigt einen OC mit Zusatz von 1 μM Doxorubicin zum Medium. In Bild A sieht man sehr gut die gefärbten Kerne mit DAPI und die Zellverteilung auf dem Deckglas. Im Bild B sieht man violette Kerne mit einer Kombination der blauen DAPI-Färbung und der roten PJ-Färbung. Auch sieht man, dass nicht nur die OC, sondern auch die restlichen Zellen auf dem Deckglas von der Kernfärbung betroffen sind. Die Oberfläche scheint aber vergleichbar mit jener der Kontrollgruppe. Im Bild C sieht man die leuchtend roten Kerne des OC mit der PJ-Färbung. Die Färbung ist so intensiv, dass die DAPI-Färbung überdeckt wird. Die Oberfläche ist stark reduziert, sie umgibt nur noch die Zellkerne. Es sind keine weiteren Zellen auf dem Deckglas zu sehen.

Unbehandelte Deckgläser zeigten eine hohe Zelldichte, wobei die Identifizierung der OC über die Zellkerne stattfand (ab drei Kernen wurde er als OC gewertet). Die Kerne waren auf Glas gut zu erkennen. Weiters konnte die Morphologie der Zellen über Durchlicht kontrolliert werden.

Die Kontrollgruppe auf Glas war die einzige Gruppe, wo sich nicht-gefärbte OC befanden. Nur eine geringe Zahl der OC der Kontrollgruppe wies eine reine Apoptose-Färbung durch Annexin auf. Der Großteil der OC wies eine Nekrose-Färbung auf. Das Bild der Nekrose-Färbung zeigte nicht immer eindeutige Ergebnisse. Aus diesem Grund wurde zwischen drei Szenarien differenziert:

Beobachtung Eins: Die Zellen waren, wie in der Anleitung beschrieben, mit PJ gefärbt, wobei sich die Färbung vor allem auf die Zelloberfläche bezog.

Beobachtung Zwei: Alleinige Färbung der Zellkerne durch PJ. nachgewiesen.

Beobachtung Drei: Gefärbte Kerne und/oder Zellstrukturen mit PJ und

zusätzlich eine Annexin V-Färbung .

Es waren alle drei Szenarien als nekrotisch zu werten.

Die Anzahl der OC wurde besonders in der Gruppe mit 1 μM Doxorubicin reduziert. Die Zellen waren stark deformiert, die Zellkerne waren miteinander verschmolzen oder unterschieden sich in ihrer Morphologie sehr wesentlich von gesunden Zellen. Bei den meisten OC der Gruppe 2 waren die Zellkerne tiefrot durch PJ. In der ersten Phase der Untersuchungen wurden nur Bilder gemacht und diese ausgewertet. Um eine quantitative Aussage zu erhalten, wurde in der nächsten Phase der Arbeiten mit OC die Zahl der OC auf jedem Glas ausgezählt und den einzelnen Färbungen zugeordnet.

In Experiment 15 wurden OC auf den drei Biomaterialien ausgesetzt und in drei Gruppen unterteilt: eine Kontrollgruppe ohne Zusätze im Nährmedium, Gruppe 1 wurde 0,1 μM Doxorubicin ins Nährmedium zugegeben und Gruppe 2 wurde 1 μM Doxorubicin dem Nährmedium zugesetzt. Es wurden nach 24 und nach 48 Stunden Auswertungen gemacht. Jedes einzelne Objekt wurde händisch mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops ausgezählt. Dieses Experiment wurde einmal wiederholt. Die bisherigen Resultate wurden durch dieses Experiment bestätigt.

	ZELLEN	PJ-KERNE		Annexin+PJ		Probidium Jodid		ANNEXIN		keine Färbung
	DAPI	n	%	n	%	n	%	n	%	
Dgl.24h										
K1	223	8	3,59%	73	32,74%	120	53,81%	0	0,00%	22
K2	266	1	0,38%	153	57,52%	93	34,96%	1	0,38%	18
Doxo02,1	123	49	39,48%	65	52,85%	9	7,32%	0	0,00%	0
Doxo02,2	176	49	27,84%	65	36,93%	9	5,11%	0	0,00%	0
Doxo2,1	108	28	25,93%	50	46,30%	30	27,78%	0	0,00%	0
Doxo2,2	83	20	24,10%	38	45,78%	25	30,12%	0	0,00%	0
Dgl.48h										
K1	393	0	0,00%	163	41,48%	152	38,68%	2	0,51%	76
K2	662	0	0,00%	389	58,76%	238	35,95%	1	0,15%	39
Doxo02,1	123	31	25,20%	74	60,16%	18	14,63%	0	0,00%	0
Doxo02,2	156	25	16,03%	107	68,59%	24	15,38%	0	0,00%	0
Doxo2,1	20	10	50,00%	6	30,00%	4	20,00%	0	0,00%	0
Doxo2,2	22	8	36,36%	8	36,36%	6	27,27%	0	0,00%	0

Tabelle 1: Anzahl der Osteoklasten in Apoptose und Nekrose auf Glas.

K steht für Kontrolle (Kontrollgruppe), Doxo02 steht für Doxorubicin 01 μM = Gruppe1 und Doxo2 für 1 μM Doxorubicin = Gruppe2, 1 und 2 Deckglas Nummer 1 und 2 der jeweiligen Gruppe. Man erkennt sehr gut, dass es . wenn auch nur gering . Zellen ohne Färbung gab. Die Zahl der Zellen in den Kontrollgruppen ist von 24 h nach 48 h deutlich gestiegen. In Gruppe 1 ist die Zahl gleich geblieben und in Gruppe 2 weiter gesunken. Die Prozente beziehen sich immer auf die Summe der Zellen in der ersten Spalte. (Bezogen auf die K1, finden wir 8 Zellen, wo die Kerne eine PJ-Färbung aufweisen von 223 Zellen gesamt, das sind 3,59 %.)

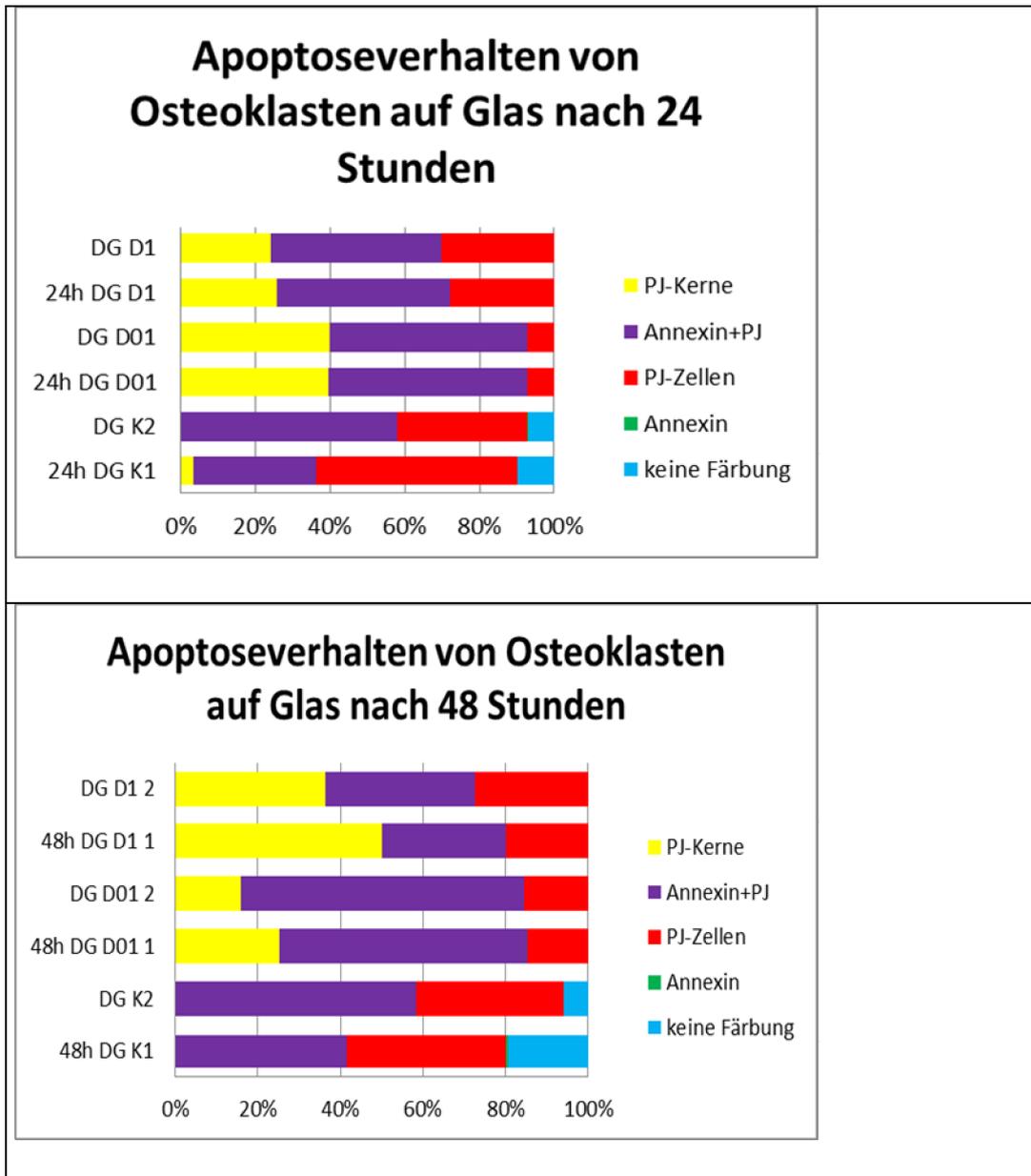


Abbildung 6: Apoptoseverhalten von Osteoklasten auf Glas nach 24 und 48 Stunden.

Sowohl nach 24 h wie auch nach 48 h sieht man bei Gruppe1 die Zunahme der PJ-gefärbten Kerne und es kam zu Abnahme der PJ-gefärbten OC. Die Anzahl der Zellen, welche eine Doppelfärbung aufwiesen, blieb annähernd gleich. Es gab keine OC mit einer reinen Annexin-Färbung. Legende: K1, K2 = Kontrollgruppen, DG steht für Deckglas, D01 ist Doxorubicin 0,1 μM = Gruppe1, D1 für Doxorubicin 1 μM = Gruppe2, 1 und 2 = Deckglas Nummer 1 und 2 der jeweiligen Gruppe.

3.2.2 Verhalten von Osteoklasten auf -TCP-Presslingen:

Bei Experiment 7 erschien die Zahl der OC auf -TCP-Presslingen geringer als auf Glas. Der Großteil der Zellen wies eine PJ-Färbung auf, die sich über die gesamte Zelloberfläche verteilte. Die Morphologie der OC war vergleichbar mit jener auf Deckgläsern mit dem einzigen Unterschied, dass sie kleiner waren.

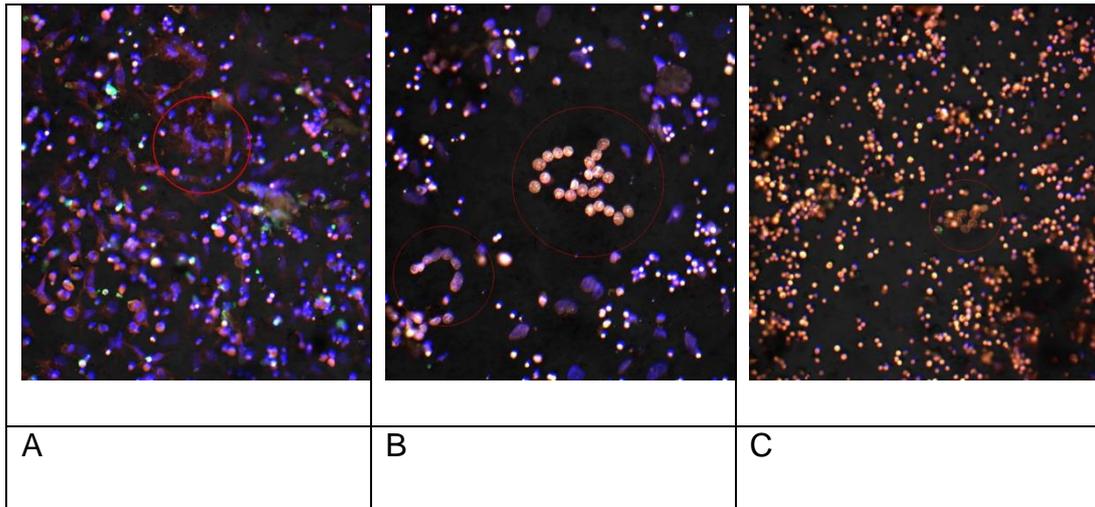


Abbildung 7: Osteoklasten auf -TCP-Presslingen nach 48 Stunden unter einem Konfokalmikroskop mit Vergrößerung 25x.

Bild A zeigt OC auf -TCP-Presslingen ohne Zusatz, die Kontrollgruppe. Bild B zeigt OC auf -TCP-Presslingen mit Zugabe von 0,1 µM Doxorubicin. Bild C zeigt OC auf -TCP-Presslingen mit Zugabe von 1 µM Doxorubicin. In Bild A sieht man im roten Kreis den OC und eine teilweise PJ-Färbung. Die Kerne sind durch DAPI blau gefärbt. Auch sieht man, dass die anderen Zellen ebenfalls eine PJ-Färbung zeigen. In Bild B sieht man in den roten Kreisen zwei OC: Im größeren sieht man, dass die Zellkerne eine rote PJ-Färbung aufweisen, auch Zellkerne der umliegenden Zellen zeigen Anzeichen von violetter Färbung. In Bild C sieht man im roten Kreis einen OC. Seine Kerne sind vollkommen PJ-gefärbt. Über das Objekt verteilt sind rote und blaue Kügelchen.

Diese Ergebnisse wurden in 2 weiteren Experimenten quantitativ bestätigt. Als repräsentatives Ergebnis werden hier die Resultate aus Experiment 15 dargestellt.

	ZELLEN	PJ-KERNE		Annexin+PJ		Probidium Jodid		ANNEXIN	
	DAPI	n	%	n	%	n	%	n	%
Tablette 24h									
K1	126	1	0,79%	52	41,27%	73	57,94%	0	0,00%
K2	119	7	5,88%	39	32,77%	73	61,34%	0	0,00%
Doxo01,1	101	23	22,77%	50	49,50%	28	27,72%	0	0,00%
Doxo01,2	93	26	27,96%	44	47,31%	23	24,73%	0	0,00%
Doxo1,1	70	19	27,14%	28	40,00%	23	32,86%	0	0,00%
Doxo1,2	61	14	22,95%	21	34,43%	26	42,62%	0	0,00%
Tablette 48h									
K1	199	2	1,01%	86	43,22%	112	56,28%	0	0,00%
K2	143	5	3,50%	50	34,97%	88	61,54%	0	0,00%
Doxo01,1	38	10	26,32%	21	55,26%	7	18,42%	0	0,00%
Doxo01,2	52	17	32,69%	19	36,54%	16	30,77%	0	0,00%
Doxo1,1	25	8	32,00%	12	48,00%	5	20,00%	0	0,00%
Doxo1,2	15	6	40,00%	6	40,00%	3	20,00%	0	0,00%

Tabelle 2: Anzahl der Osteoklasten in Apoptose und Nekrose auf -TCP-Presslingen

K steht für Kontrolle (Kontrollgruppe), Doxo02 steht für Doxorubicin 01 μM = Gruppe1 und Doxo2 für 1 μM Doxorubicin = Gruppe 2,1 und 2 = TCP-Pressling Nummer 1 und 2 der jeweiligen Gruppe.

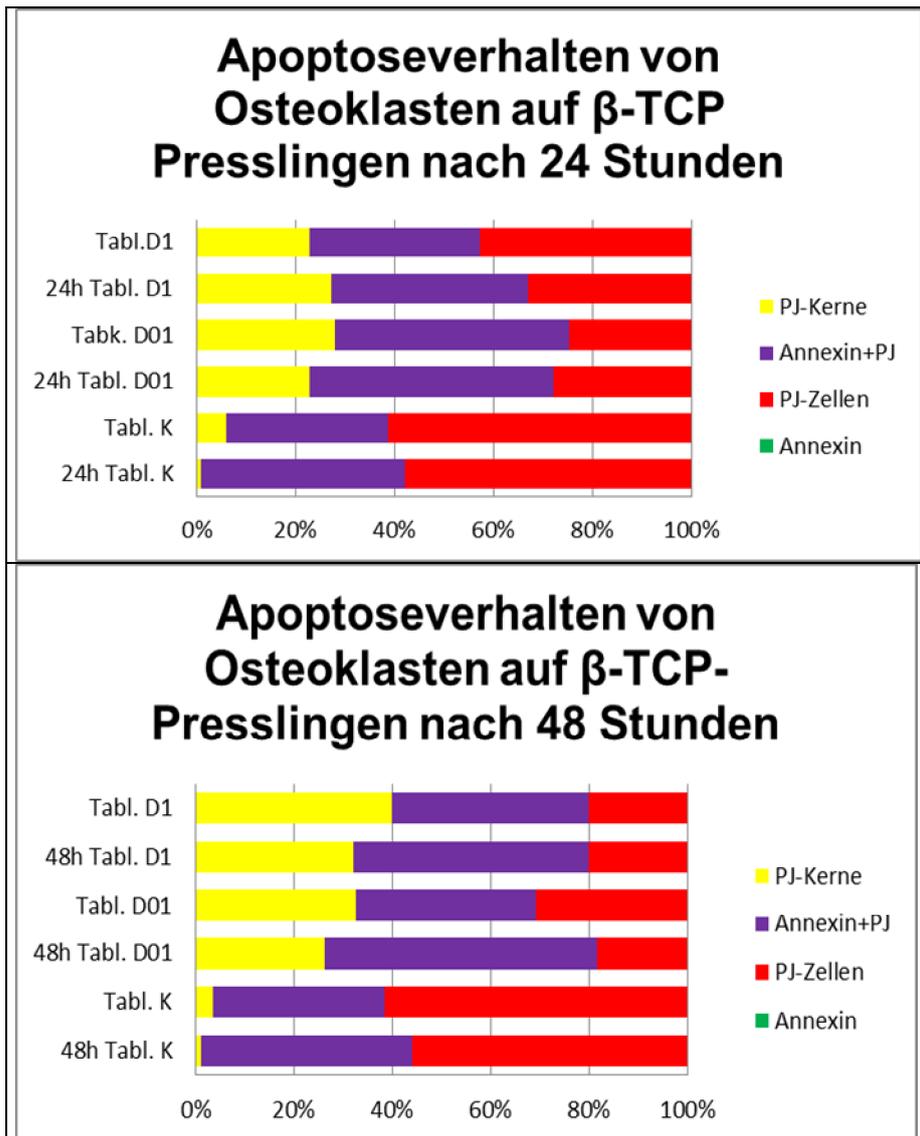


Abbildung 8: Apoptoseverhalten von Osteoklasten auf β -TCP-Presslingen nach 24 und 48 Stunden.

Sowohl nach 24 h wie auch nach 48 h sieht man bei Gruppe 1 die Zunahme der PJ-gefärbten Kerne und es kam zu Abnahme der PJ-gefärbten OC. Die Anzahl der Zellen, welche eine Doppelfärbung aufwiesen, blieb annähernd gleich. Es gab keine OC mit einer reinen Annexin-Färbung. Legende: K steht für die Kontrollgruppe, Tabl. steht für β -TCP-Pressling, D01 ist Doxorubicin 0,1 μ M = Gruppe 1, D1 für Doxorubicin 1 μ M = Gruppe 2, 1 und 2 TCP-Pressling Nummer 1 und 2 der jeweiligen Gruppe.

3.2.3 Verhalten von Osteoklasten auf mit ELP beschichteten

Deckgläsern:

Im Vergleich zu den OC auf Glas waren die OC auf ELP kleiner und lagen nicht planar in einer Ebene. Die Anzahl der Zellen war im Vergleich zu Glas geringer. Auch war die Färbung viel schwächer, besonders DAPI war nur schwer auf den ELPs zu identifizieren. Weiters wurden hier in keiner Gruppe nicht-färbbare OC gefunden, alle zeigten . wenn auch nur

schwach . eine nekrotische Färbung.

	ZELLEN	PJ-KERNE		Annexin+PJ		ProbidiumJodid		ANNEXIN	
	DAPI	n	%	n	%	n	%	n	%
ELP 24h									
K1	299	5	1,68%	84	28,28%	208	70,03%	0	0,00%
K2	318	9	2,83%	73	22,96%	236	74,21%	0	0,00%
Doxo01,1	99	14	14,14%	51	51,52%	34	34,34%	0	0,00%
Doxo01,2	174	5	2,87%	117	67,24%	52	29,89%	0	0,00%
Doxo1,1	114	59	51,75%	55	48,25%	0	0,00%	0	0,00%
Doxo1,2	83	24	28,92%	30	36,14%	29	34,94%	0	0,00%
ELP48h									
K1	339	2	0,59%	103	30,38%	223	65,78%	1	0,00%
K2	139	12	8,63%	63	45,32%	64	46,04%	0	0,00%
Doxo01,1	118	25	21,19%	68	57,63%	25	21,19%	0	0,00%
Doxo01,2	37	7	18,92%	28	75,68%	2	5,40%	0	0,00%
Doxo1,1	54	20	37,04%	31	57,41%	3	5,56%	0	0,00%
Doxo1,2	52	24	46,15%	28	53,85%	0	0,00%	0	0,00%

Tabelle 3: Anzahl der Osteoklasten in Apoptose und Nekrose auf mit ELP beschichteten Deckgläsern.

Legende: K steht für Kontrolle (Kontrollgruppe), Doxo02 steht für Doxorubicin 01 µM = Gruppe1 und Doxo2 für 1 µM Doxorubicin = Gruppe2, 1 und 2 = ELP-Deckglas Nummer 1 und 2 der jeweiligen Gruppe.

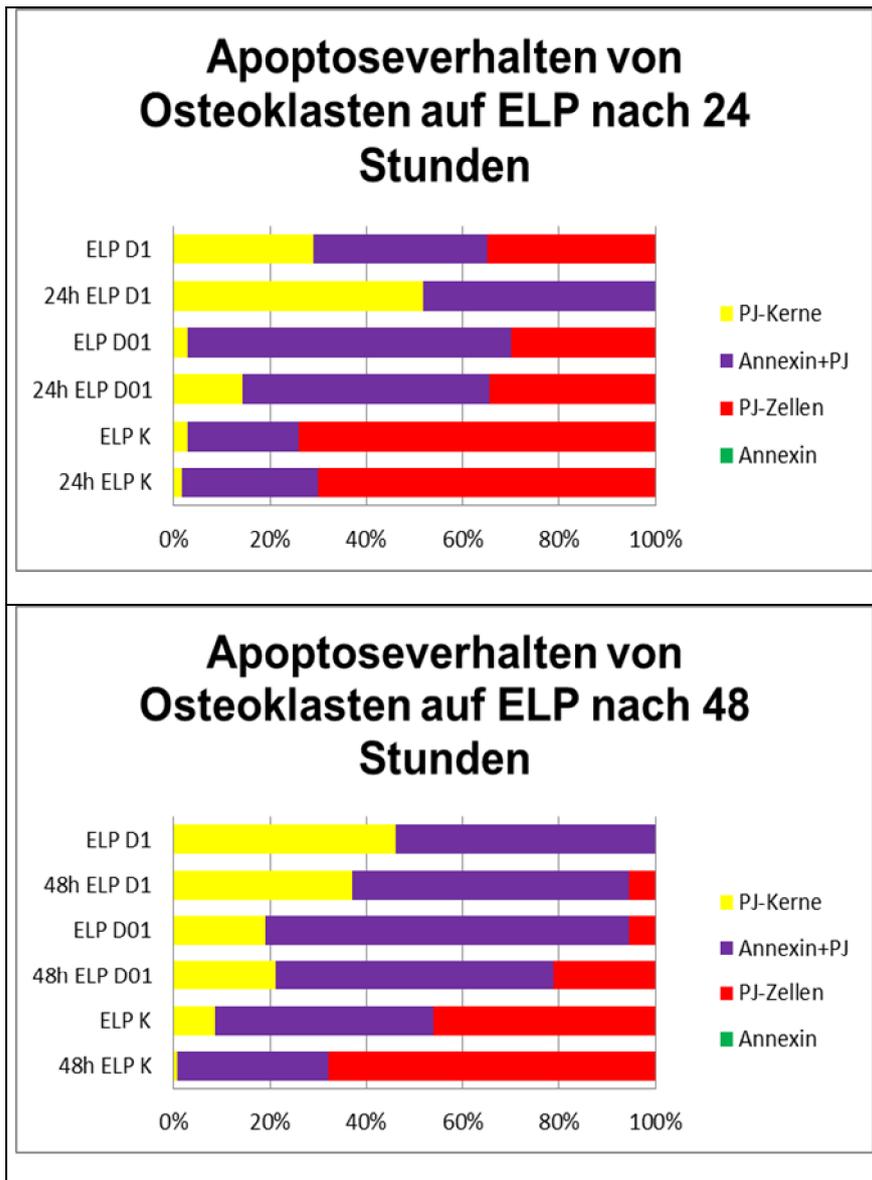


Abbildung 9: Apoptoseverhalten von Osteoklasten auf ELP beschichteten Deckgläsern nach 24 und 48 Stunden.

Es gab keine nicht-gefärbten und keine Annexin-gefärbten OC. Man erkennt sehr gut, dass die Ergebnisse zum Teil stark variieren. Nach 48 h sah man die Abnahme der PJ-gefärbten OC und die Zunahme der OC mit PJ-gefärbten Zellen. Legende: K steht für die Kontrollgruppe, ELP steht für Elastin like Protein beschichtete Deckgläsern, D01 ist Doxorubicin 0,1 μM = Gruppe 1, D1 für Doxorubicin 1 μM = Gruppe 2 und 1 und 2 ELP-Deckglas Nummer 1 und 2 der jeweiligen Gruppe.

Die Ergebnisse der Experimente 15 und 16 variierten sehr stark, was klar in

Abbildung 10 dargestellt ist. Es war sehr schwer, eine eindeutige Aussage über das Ergebnis von OC auf ELP zu treffen. Aufgrund dessen, dass keine Annexin V-gefärbten Zellen zu finden waren kann man vermuten, dass

alle OC auf ELP nekrotisch waren.

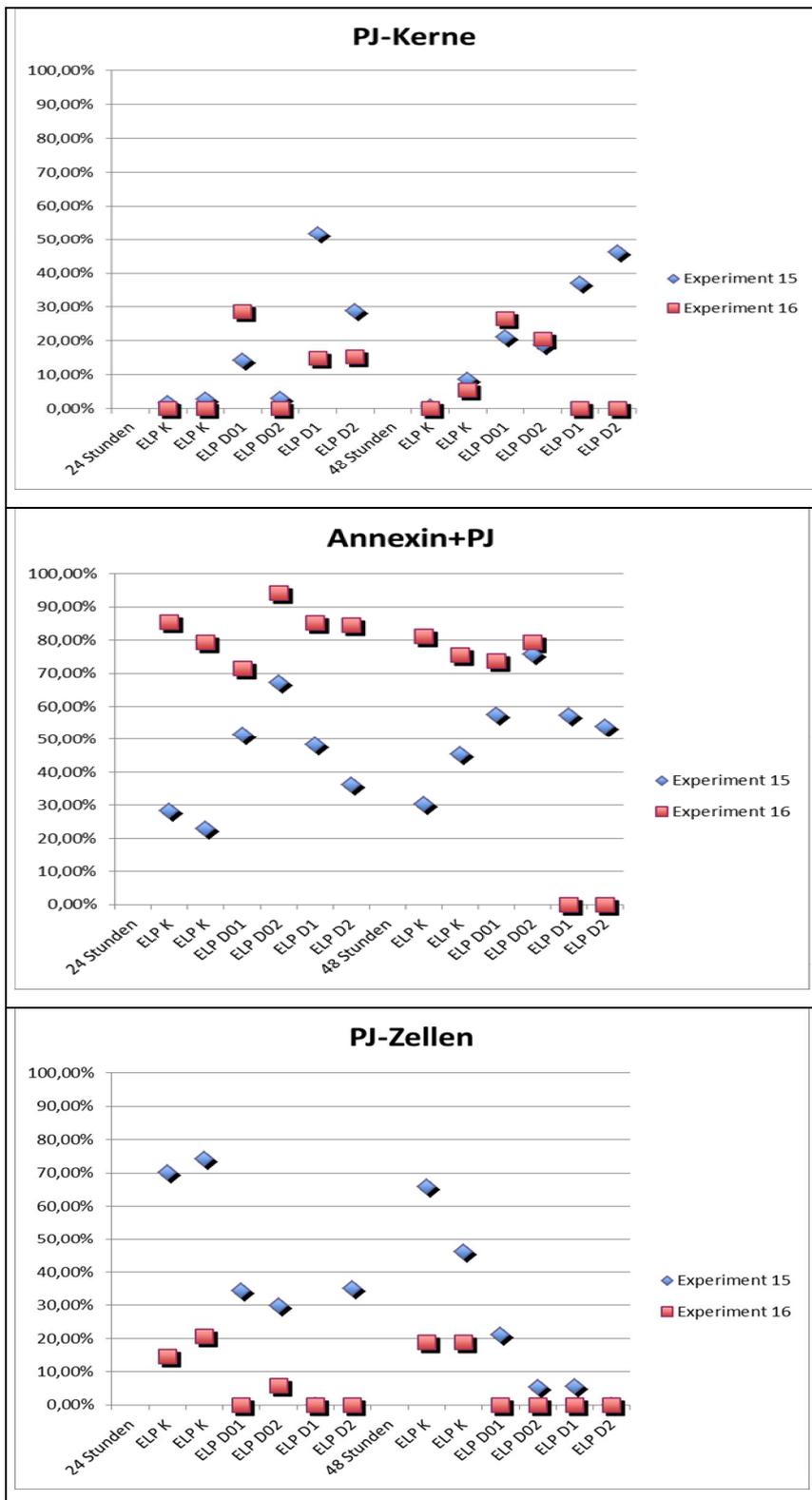


Abbildung 10: Darstellung der Variabilität der Apoptose und Nekrose von Osteoklasten auf ELP.

Die Graphen stellen die Ergebnisse von Experiment 15 und Experiment 16 nebeneinander dar. In allen drei möglichen Szenarien von Nekrose liegt eine starke unterschiedliche Verteilung vor

Im selben Experiment wurde die Wirkung zwischen Pamidronat und Doxorubicin verglichen. Doxorubicin wirkte relativ rasch auf alle Zellen, führte zu einer Deformation der Zellen, besonders in hohen Konzentrationen und zu einer eindeutigen Reduktion der Zellzahl. Man sah eine deutlich vorwiegende nekrotische Färbung aller Zellen. Weiters fand man über die Objekte verteilt sehr viele Zellkernfragmente. Bei einer Konzentration von 1 μM Doxorubicin fand man nach 48 Stunden kaum noch intakte Zellen. Sie lagen entweder vorwiegend deformiert oder fragmentiert vor, oder erschienen als riesige Klumpen aufgrund von Zellverschmelzung. Die Anzahl der OC bei der Zugabe von Pamidronat war deutlich gesunken. Die OC wiesen auch bei Pamidronat eine nekrotische Färbung auf. Doch zeigten sie keine Veränderung in ihrer Morphologie.

3.3 Ergebnisse der Osteoblasten

3.3.1 Osteoblasten auf Glas:

Die OB zeigten eine gleichmäßige Verteilung, die zum Rand des Präparates hin abnahm. In der Kontrollgruppe wiesen die OB eine gesunde Morphologie auf, Die Zellkerne waren groß und gesund. Nach drei Tagen war kaum Apoptose oder Nekrose beobachtbar, wie in der Abbildung 15 zu sehen ist. Es gab Anzeichen, dass bei einigen Zellen der natürliche Zelltod in Form von Apoptose gerade einsetzte. Durch Doxorubicin ließ sich eine deutliche Abnahme der Apoptose und eine deutliche Zunahme der Nekrose erkennen.

Es wurde hier wieder in drei Gruppen unterteilt: Kontrollgruppe, Gruppe 1, diese enthielt eine Konzentration von 0,1 μM Doxorubicin und Gruppe 2, diese enthielt eine Konzentration von 1 μM Doxorubicin. In Gruppe 1 gab es noch Spuren einer Annexin-Färbung, die jedoch nicht mehr in der Gruppe 2 zu finden waren. In Gruppe 1 stieg die Anzahl der PJ-Zellen. In Gruppe 2 stieg zusätzlich noch die Zahl der Osteoblasten mit PJ-gefärbten Zellen. Die OB, welche eine Doppelfärbung aufwiesen, fand man in Gruppe 1 und Gruppe 2, sie zeigten aber keinen wesentlichen Anstieg. Es gab eine geringe Reduktion in der Anzahl der OB zwischen der Kontrollgruppe und den Gruppen mit Doxorubicin. Die Morphologie der OB

bei der zweiten Gruppe zeigte, dass die Zellkerne im Vergleich zur Kontrollgruppe kleiner waren, teilweise waren sie sogar ausgefranst oder halbmondförmig. Zusätzlich zeigte sich bei den Zellen, die eine Doppelfärbung aufwiesen, keine vollständige Färbung, sondern nur eine Färbung von Oberflächensegmenten. Auch trat die Apoptose nicht vereinzelt oder gleichmäßig verteilt auf, sondern zum Großteil regional begrenzt.

	KERNE		PJ-Kerne		Annexin+PJ		Probidium Jodid		Annexin	
	DAPI	n	%	n	%	n	%	n	%	
DG K1										
1	98	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	
2	68	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	2	2,94%	
3	76	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	5	6,58%	
4	63	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	
5	65	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	3	4,62%	
Summe	370	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	10	2,70%	
DG K2										
1	63	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	4	6,35%	
2	111	0	0,00%	2	1,80%	0	0,00%	5	4,50%	
3	90	0	0,00%	4	4,44%	0	0,00%	0	0,00%	
4	101	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	7	6,93%	
5	75	0	0,00%	2	2,67%	0	0,00%	0	0,00%	
Summe	440	0	0,00%	8	1,82%	0	0,00%	16	3,64%	
DG Doxo02-1										
1	87	0	0,00%	4	4,60%	83	95,40%	0	0,00%	
2	64	0	0,00%	4	6,25%	31	48,44%	0	0,00%	
3	49	14	28,57%	4	8,16%	14	28,57%	0	0,00%	
4	55	8	14,55%	6	10,91%	0	0,00%	0	0,00%	
5	82	0	0,00%	4	4,88%	14	17,07%	1	1,22%	
Summe	337	22	6,53%	22	6,53%	142	42,14%	1	0,30%	
DG Doxo02-2										
1	40	0	0,00%	2	5,00%	0	0,00%	6	15,00%	
2	36	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	2	5,56%	
3	50	0	0,00%	4	8,00%	12	24,00%	0	0,00%	
4	45	0	0,00%	6	13,33%	5	11,11%	0	0,00%	
5	60	0	0,00%	5	8,33%	3	5,00%	0	0,00%	
Summe	231	0	0,00%	17	7,36%	20	8,66%	8	3,46%	
DG Doxo2-1										
1	43	0	0,00%	5	11,63%	38	88,37%	0	0,00%	
2	46	24	52,17%	0	0,00%	22	47,83%	0	0,00%	
3	31	19	61,29%	0	0,00%	12	38,71%	0	0,00%	
4	39	20	51,28%	3	7,69%	16	41,03%	0	0,00%	
5	42	22	52,38%	8	19,05%	12	28,57%	0	0,00%	
Summe	201	85	42,29%	16	7,96%	100	49,75%	0	0,00%	
DG Doxo2-2										
1	37	15	40,54%	7	18,92%	15	40,54%	0	0,00%	
2	40	26	65%	7	17,50%	7	17,50%	0	0,00%	
3	62	38	61,29%	8	12,90%	16	25,81%	0	0,00%	
4	41	24	58,54%	10	24,39%	7	17,07%	0	0,00%	
5	34	12	35,29%	0	0,00%	22	64,71%	0	0,00%	
Summe	214	115	53,74%	32	14,95%	67	31,31%	0	0,00%	

Tabelle 4: Osteoblasten in Apoptose und Nekrose auf Glas.

Von jedem Deckglas aus Experiment 11 wurden fünf Bilder gemacht. Die einzelnen Reihen von 1-5 zeigen die Anzahl der OB auf dem jeweiligen Bild den einzelnen Färbungen zugeordnet. In der zweiten Spalte werden die Prozent der einzelnen Färbungen auf den einzelnen Bildern gezeigt. In der Reihe sSumme%der einzelnen Deckgläser findet man immer die Summe der Zellen der fünf Bilder und die Prozente der Summe auf die Gesamtzahl. Legende: K steht für die Kontrollgruppe, DG steht für Deckglas, Doxo steht für Doxorubicin 01 für 0,1 µM Doxorubicin und 1 für 1 µM Doxorubicin.

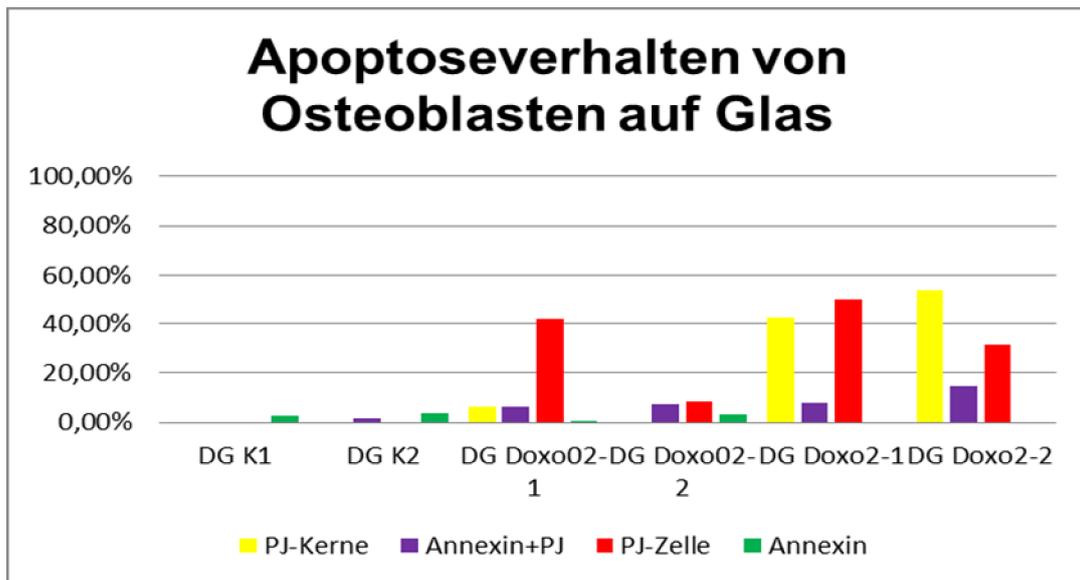


Abbildung 11: Apoptose von Osteoblasten auf Glas.

Die Werte sind die Prozente der einzelnen Summen der einzelnen Gruppen. DG-K = Kontrollgruppe auf Deckglas, DG-Doxo02 = Gruppe 1 Doxorubicin 0,1 μM auf Deckglas, DG Doxo2 = Gruppe 2 Doxorubicin 1 μM auf Deckglas. 1 und 2 = Deckglas Nummer 1 und 2 der jeweiligen Gruppe.

3.3.2 Verhalten von Osteoblasten auf ELP:

Unter dem Fluoreszenzmikroskop sah man keine vollständigen scharfen Ebenen. Durch die nicht-planare Oberfläche hatte man Eindruck, die OB wären in das Material hineingewachsen. Die Färbung war viel schwerer zu erkennen, sie war viel schwächer als bei den anderen Biomaterialien. Die auf ELP kultivierten OB waren schwächer eingefärbt. Die OB wiesen keine gleichmäßige Verteilung auf dem ELP auf. In der Kontrollgruppe gab es OB, die Zellkerne schienen kleiner zu sein, zeigten aber sonst eine normale Morphologie. Schon in der Kontrollgruppe wiesen deutlich mehr OB eine positive Zellfärbung auf als auf Glas.

	KERNE		PJ-Kerne		Annexin+PJ		Probidium Jodid		Annexin	
	DAPI	n	%	n	%	n	%	n	%	
ELP K										
1	38	0	0,00%	6	15,79%	15	39,47%	0	0,00%	
2	40	0	0,00%	0	0,00%	23	0,00%	0	0,00%	
3	39	0	0,00%	7	17,95%	13	33,33%	0	0,00%	
4	45	0	0,00%	7	15,56%	19	42,22%	0	0,00%	
5	34	0	0,00%	8	23,53%	16	47,06%	0	0,00%	
Summe	196	0	0,00%	28	14,29%	86	43,88%	0	0,00%	
ELP K										
1	39	0	0,00%	7	15,79%	18	46,15%	0	0,00%	
2	58	0	0,00%	3	5,17%	17	29,31%	0	0,00%	
3	31	0	0,00%	0	0,00%	13	41,94%	0	0,00%	
4	39	0	0,00%	0	0,00%	9	23,08%	0	0,00%	
5	43	0	0,00%	0	0,00%	22	51,16%	0	0,00%	
Summe	210	0	0,00%	10	4,76%	79	37,62%	0	0,00%	
ELP K										
1	45	0	0,00%	3	15,79%	42	93,33%	0	0,00%	
2	48	0	0,00%	3	6,25%	45	93,75%	0	0,00%	
3	33	0	0,00%	2	6,06%	31	93,94%	0	0,00%	
4	37	0	0,00%	4	10,81%	33	89,19%	0	0,00%	
5	59	0	0,00%	5	8,47%	54	91,53%	0	0,00%	
Summe	222	0	0,00%	17	7,66%	205	92,34%	0	0,00%	
ELP Doxo02										
1	22	0	0,00%	4	18,18%	18	81,82%	0	0,00%	
2	19	0	0%	3	15,79%	16	84,21%	0	0,00%	
3	20	0	0,00%	1	5,00%	19	95,00%	0	0,00%	
4	26	0	0,00%	9	34,62%	17	65,38%	0	0,00%	
5	18	0	0,00%	1	6%	17	94,44%	0	0,00%	
Summe	105	0	0,00%	18	17,14%	87	82,86%	0	0,00%	
ELP Doxo02										
1	29	0	0,00%	4	13,79%	18	62,07%	0	0,00%	
2	19	0	0%	3	15,79%	16	84,21%	0	0,00%	
3	37	0	0,00%	1	2,70%	36	97,30%	0	0,00%	
4	20	0	0,00%	9	45,00%	11	55,00%	0	0,00%	
5	20	0	0,00%	1	5%	19	95,00%	0	0,00%	
Summe	125	0	0,00%	18	14,40%	100	80,00%	0	0,00%	
ELP Doxo1										
1	5	0	0,00%	0	0,00%	5	100,00%	0	0,00%	
2	7	0	0%	0	0,00%	7	100%	0	0,00%	
3	4	0	0,00%	0	0,00%	4	100,00%	0	0,00%	
4	7	0	0,00%	0	0,00%	7	100%	0	0,00%	
5	25	0	0%	0	0,00%	25	100%	0	0,00%	
Summe	48	0	0,00%	0	0,00%	48	100,00%	0	0,00%	
ELP Doxo1										
1	12	0	0,00%	3	25,00%	9	75,00%	0	0,00%	
2	66	50	76%	0	0,00%	16	24%	0	0,00%	
3	15	11	73,33%	0	0,00%	4	26,67%	0	0,00%	
4	19	6	31,58%	8	42,11%	5	26%	0	0,00%	
5	22	6	27%	6	27,27%	10	45%	0	0,00%	
Summe	134	73	54,48%	17	12,69%	44	32,84%	0	0,00%	
ELP Doxo1										
1	16	6	37,50%	11	68,75%	5	31,25%	0	0,00%	
2	23	8	35%	8	34,78%	7	30%	0	0,00%	
3	30	17	56,67%	0	0,00%	4	13,33%	0	0,00%	
4	11	2	18,18%	0	0,00%	9	82%	0	0,00%	
5	17	4	24%	7	41,18%	6	35%	0	0,00%	
Summe	97	37	38,14%	26	26,80%	31	31,96%	0	0,00%	

Tabelle 5: Osteoblasten in Apoptose und Nekrose auf ELP beschichteten Deckgläsern.

Von jedem Deckglas aus Experiment 12 wurden fünf Bilder gemacht. Die einzelnen Reihen von 1-5 zeigen die Anzahl der OB auf dem jeweiligen Bild den einzelnen Färbungen zugeordnet. In der Reihe sSumme%der einzelnen Deckgläser findet man immer die Summe der Zellen der fünf Bilder und die Prozente der Summe auf die Gesamtzahl. Legende: K steht für die Kontrollgruppe, ELP steht für mit ELP beschichtetes Deckglas, Doxo steht für Doxorubicin 01 für 0,1 μM Doxorubicin und 1 für 1 μM Doxorubicin, 1 und 2 = ELP-Deckglas Nummer 1 und 2 der jeweiligen Gruppe.

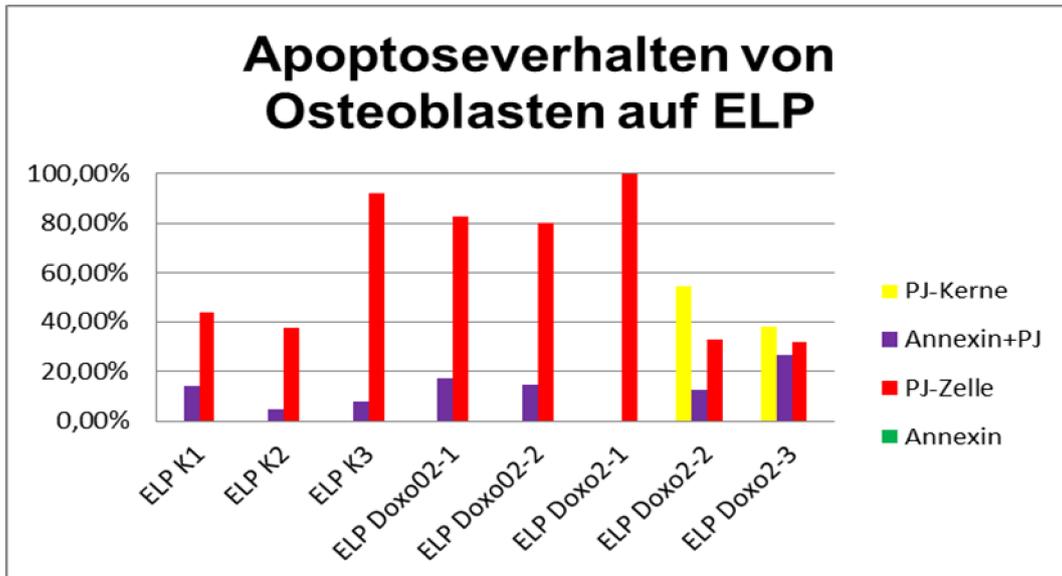


Abbildung 12: Apoptose und Nekrose von Osteoblasten auf ELP-beschichteten Deckgläsern.

Die Werte sind die Prozente der einzelnen Summen der einzelnen Gruppen. Man erkennt deutlich, dass die meisten gefärbten OB eine PJ-Färbung aufwiesen. In Gruppe 2 ist die Anzahl der OB, die eine PJ-Färbung aufwiesen, deutlich geringer; dafür fand man in der zweiten Gruppe einen deutlichen Anstieg von OB, welche nur eine PJ-Kernfärbung zeigten. ELP-K = Kontrollgruppe auf ELP-beschichtetem Deckglas, ELP-Doxo02 = Gruppe 1 Doxorubicin 0,1 μM auf mit ELP beschichtetem Deckglas, ELP Doxo2 = Gruppe 2 Doxorubicin 1 μM auf mit ELP beschichtetem Deckglas, 1 und 2 = ELP-Deckglas Nummer 1 und 2 der jeweiligen Gruppe.

In Experiment 12 war keine Annexin-Färbung zu beobachten. Es fand also keine reine Apoptose statt. Die meisten OB zeigten nur eine PJ-Färbung, also Nekrose. Zusätzlich zeigte ein Teil der OB eine Doppelfärbung. Durch die Zugabe von Doxorubicin wurde die Zahl der OB deutlich reduziert. Vor allem in der ersten Gruppe mit 0,1 μM Doxorubicin zeigten die OB fast nur reine Nekrose. Unter 20 % der Zellen zeigten eine Doppelfärbung. Die Morphologie der Zellkerne erschien noch normal, obwohl alle restlichen Kerne eine PJ-färbung aufwiesen. Bei der zweiten Gruppe mit 1 μM Doxorubicin war die Zahl der Zellen mit alleiniger Nekrose deutlich gesunken, während die Anzahl der doppelgefärbten Zellen leicht gestiegen war. Die Anzahl der OB, die eine PJ-Färbung zeigten, wurde ersetzt durch OB, die eine PJ-Färbung der Kerne aufwiesen.

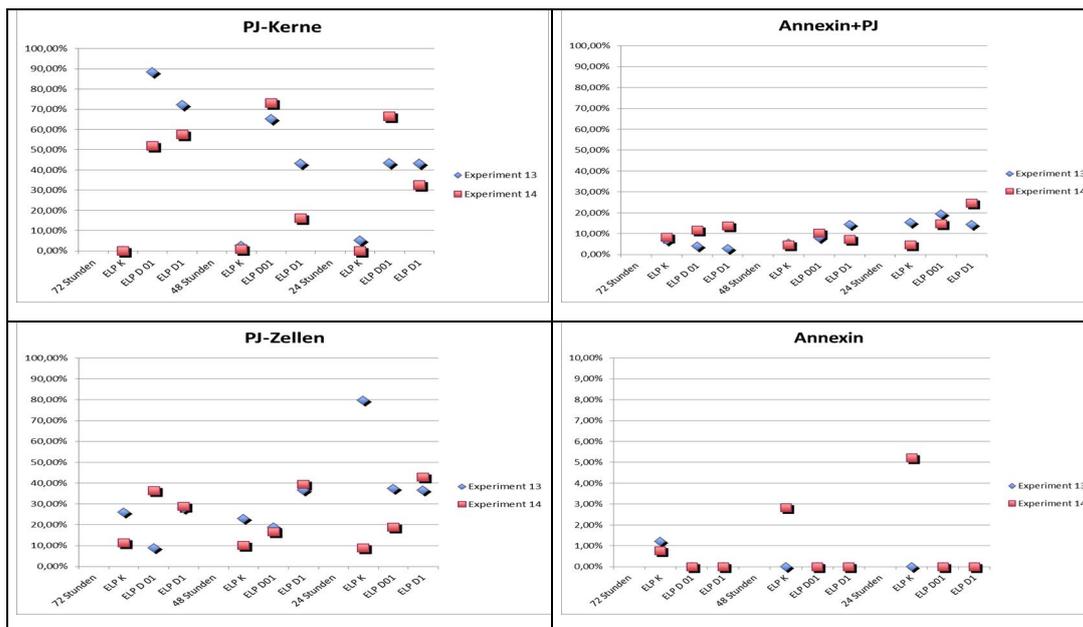


Abbildung 13: Darstellung der Variabilität von Apoptose und Nekrose von Osteoblasten auf ELP.

Die Graphen stellen die Ergebnisse von Experiment 13 und Experiment 14 nebeneinander. Man sieht sehr gut, dass in allen vier möglichen Szenarien eine starke unterschiedliche Verteilung vorliegt. Besonders gut sieht man das bei den PJ-Kernen und den PJ-Zellen. Die Annexin V und PJ gefärbten Zellen sind die einzige Gruppe die halbwegs vergleichbare Ergebnisse zeigen. Weiters zeigten sich auch Annexin V gefärbte Zellen.

Das morphologische Bild zeigte keine einheitliche Morphologie, manche Zellen schienen total zerstört und manche total normal.

3.3.3 Verhalten von Osteoblasten auf -TCP Presslingen:

Alle OB auf den -TCP-Presslingen waren durchgehend PJ-gefärbt, alle Zellen waren nekrotisch. Die einzelnen Gruppen unterschieden sich im Wesentlichen nur in der Zellzahl, der Zellmorphologie und der Anzahl an OB, die zusätzlich zur PJ-Färbung eine Annexinfärbung aufwiesen. In der Kontrollgruppe war die Zahl der Zellen vergleichbar der Zahl der OB auf ELP beschichteten Deckgläsern, genauso die Zellgröße. OB präsentierten eine normale Morphologie, gut beobachtbar durch die durchgehende PJ-Färbung. Die erste Gruppe mit 0,1 M Doxorubicin zeigte die erwartete Reduktion der Zellzahl, wobei die Morphologie eindeutige Zeichen von Abbau aufwies. Die Anzahl an OB mit zusätzlicher Annexinfärbung war deutlich gestiegen. In der zweiten Gruppe mit 1 M Doxorubicin setzte sich dieses Verhalten fort. Die Anzahl der Zellen war weiter

zurückgegangen, sie sind deutlich kleiner geworden oder zeigten Anzeichen von Verfall. Die Zahl der OB mit zusätzlicher Annexinfärbung war weiter gestiegen. Diese Ergebnisse werden anhand des repräsentativen Experiment 12 gezeigt.

	KERNE		PJ-Kerne		Annexin+PJ		Probidium Jodid		Annexin	
	DAPI	n	%	n	%	n	%	n	%	
TB K1										
1	46	0	0,00%	4	8,69%	42	91,31%	0	0,00%	
2	40	0	0,00%	6	15,00%	34	85,00%	0	0,00%	
3	58	0	0,00%	3	5,17%	55	94,83%	0	0,00%	
4	52	0	0,00%	0	0,00%	52	100,00%	0	0,00%	
5	56	0	0,00%	7	12,50%	49	87,50%	0	0,00%	
Summe	252	0	0,00%	20	7,94%	232	92,06%	0	0,00%	
TB K2										
1	99	0	0,00%	17	17,17%	82	82,83%	0	0,00%	
2	81	0	0,00%	12	14,81%	69	85,19%	0	0,00%	
3	49	0	0,00%	9	18,37%	40	81,63%	0	0,00%	
4	73	0	0,00%	9	12,33%	64	87,67%	0	0,00%	
5	34	0	0,00%	5	14,71%	29	85,29%	0	0,00%	
Summe	336	0	0,00%	52	15,48%	284	84,52%	0	0,00%	
TB Doxo02										
1	20	0	0,00%	6	30,00%	14	70,00%	0	0,00%	
2	21	0	0%	21	100,00%	0	0,00%	0	0,00%	
3	26	0	0,00%	5	19,23%	21	80,77%	0	0,00%	
4	40	0	0,00%	15	37,50%	25	62,50%	0	0,00%	
5	38	0	0,00%	5	13%	33	87,00%	0	0,00%	
Summe	145	0	0,00%	52	35,86%	93	64,14%	0	0,00%	
TB Doxo02										
1	42	0	0,00%	35	83,33%	7	16,67%	0	0,00%	
2	20	0	0%	7	35,00%	13	65,00%	0	0,00%	
3	31	0	0,00%	0	0,00%	31	100,00%	0	0,00%	
4	30	0	0,00%	15	50,00%	15	50,00%	0	0,00%	
5	29	0	0,00%	25	86%	4	14,00%	0	0,00%	
Summe	152	0	0,00%	82	53,95%	70	46,05%	0	0,00%	
TB Doxo2										
1	20	0	0,00%	3	15,00%	17	85,00%	0	0,00%	
2	17	0	0,00%	4	23,53%	13	76,47%	0	0,00%	
3	24	0	0,00%	0	0,00%	24	100,00%	0	0,00%	
4	8	0	0,00%	0	0,00%	8	100,00%	0	0,00%	
5	29	0	0,00%	23	79,31%	6	20,69%	0	0,00%	
Summe	98	0	0,00%	30	30,61%	68	69,39%	0	0,00%	

Tabelle 6: Osteoblasten in Apoptose und Nekrose auf -TCP-Presslingen.

Von jedem -TCP-Pressling aus Experiment 12 wurden fünf Bilder gemacht. Die einzelnen Reihen von 1-5 zeigen die Anzahl der OB auf dem jeweiligen Bild den einzelnen Färbungen zugeordnet. In der Reihe „Summe“ der einzelnen -TCP-Presslingen findet man immer die Summe der Zellen der fünf Bilder und die Prozente der Summe auf die Gesamtzahl. TB steht für -TCP-Pressling, Doxo steht für Doxorubicin 01 für 0,1 µM Doxorubicin und 1 für 1 µM Doxorubicin.

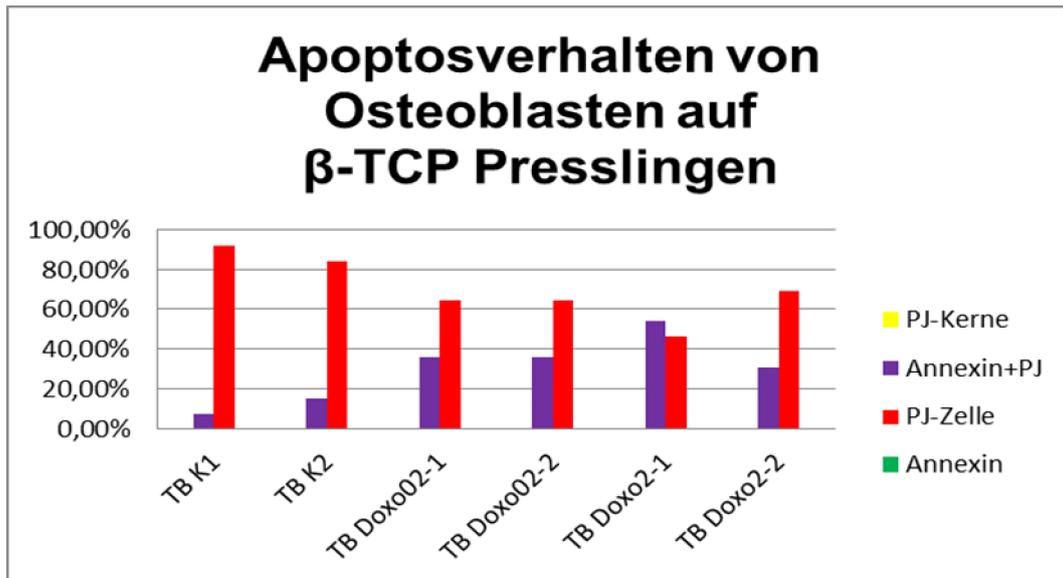


Abbildung 14: Apoptose und Nekrose von Osteoblasten auf β -TCP-Presslingen. Die Werte sind als Prozente der einzelnen Summen der einzelnen Gruppen aus Experiment 12 dargestellt. TB-K = Kontrollgruppe auf β -TCP-Presslingen, TB-Doxo02 = Gruppe1 Doxorubicin 0,1 μ M auf β -TCP-Presslingen, TB Doxo2 = Gruppe 2 Doxorubicin 1 μ M auf β -TCP-Presslingen, 1 und 2 = β -TCP-Pressling Nummer 1 und 2 der jeweiligen Gruppe.

3.3.4 Osteoblasten auf Biomaterial in einem 24/48/72 Stunden Experiment

Bei einem weiteren Experiment wurde das Apoptose-/Nekroseverhalten von OB in einem Abstand von 24/48/72 Stunden beobachtet. Das Verhalten der OB auf Glas zeigte kaum Unterschiede zu den bisherigen Ergebnissen. In der Kontrollgruppe waren nach 24 Stunden OB vorhanden, die Zellkerne waren gleichmäßig verteilt, vereinzelt zeigte sich eine Verfärbung. Nach 48 Stunden war die Zellzahl gestiegen, die Zellkerne waren groß und gesund. Einige OB waren Annexin-gefärbt. Nach 72 Stunden hat sich die Zellzahl weiter erhöht, wobei die Zellkerne jetzt wieder kleiner waren. Auch hier fand kaum eine Färbung der OB statt.

Die erste Gruppe enthielt 0,1 μ M Doxorubicin. Nach 24 Stunden waren fast so viele Zellen vorhanden wie in der Kontrollgruppe, vereinzelt zeigten OB Anzeichen von Färbung, wobei bei der Färbung vor allem die Kerne betroffen waren. Nach 48 Stunden waren vor allem die Kerne PJ-gefärbt. Nur wenige Zellen waren vollständig PJ-gefärbt oder es gab zusätzlich zu der Zellkernfärbung der OB eine Annexinfärbung. Nach 72 Stunden waren weniger Zellen vorhanden als zuvor. Die Zellkerne waren im Vergleich zur Kontrollgruppe relativ groß. Die Anzahl der OB, welche PJ-gefärbte

Zellkerne in Kombination mit Annexinoberflächenfärbung aufwiesen, war fast verdoppelt. Die zweite Gruppe enthielt 1 μ M Doxorubicin. Nach 24 Stunden waren noch viele OB vorhanden. Viele Zellkerne wiesen eine PJ-Färbung auf, wobei im Vergleich zur Kontrollgruppe und ersten Gruppe eine hohe Zahl an OB eine PJ-Färbung aufwiesen. Weiters wurde beobachtet, dass die Morphologie der Zellkerne nicht sehr angegriffen war. Nach 48 Stunden waren weniger OB vorhanden. Die Zellkerne wiesen eine leichte Deformierung auf, wobei alle Zellkerne PJ-gefärbt waren. Es zeigten sich vereinzelt Spuren einer Annexinfärbung. Nach 72 Stunden waren nur noch wenige OB vorhanden. Alle Zellkerne wiesen eine Veränderung in der Zellkernmorphologie auf.

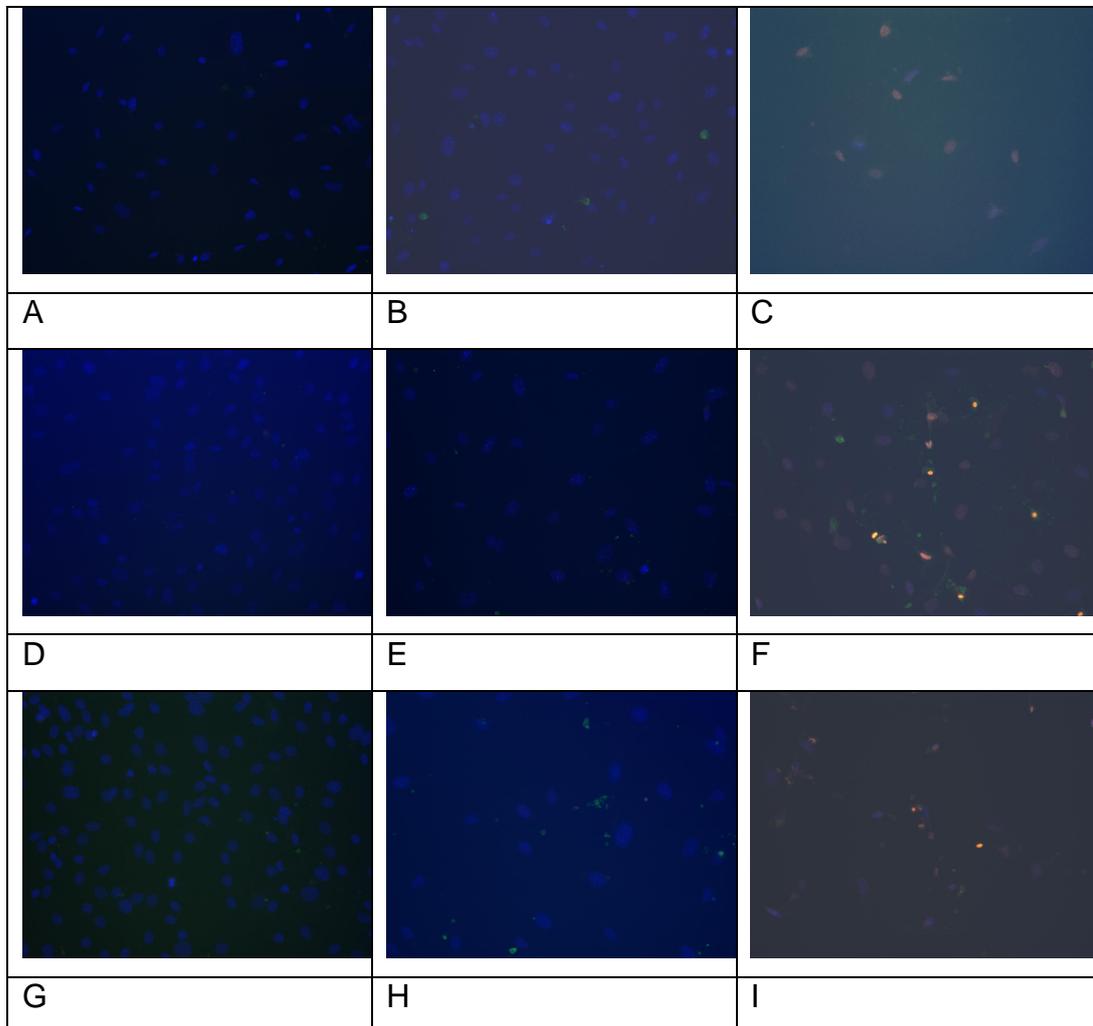


Abbildung 15: Osteoblasten auf Glas nach 24/48/72 Stunden unter einem Fluoreszenzmikroskop (Vergrößerung 25x). Bild A zeigt OB auf einem Deckglas ohne Zusatz, eine Kontrolle nach 24 h. Bild B zeigt OB auf einem Deckglas nach 24 h mit einem Zusatz von 0,1 μ M Doxorubicin, Gruppe 1. Bild C zeigt OB auf einem Deckglas nach 24 h mit einem Zusatz von 1 μ M Doxorubicin, Gruppe 2. Bild D zeigt die Kontrollgruppe nach 48 h, Bild E Gruppe 1 nach 48 h und Bild F Gruppe 2 nach 48 h. Bild G ist die Kontrollgruppe nach 72 h, Bild H ist Gruppe 1 nach 72 h und Bild I Gruppe 2 nach 72 h.

Das Verhalten der OB auf mit ELP beschichteten Deckgläsern war schwerer zu identifizieren. Die Färbung war auf den beschichteten Deckgläsern viel schwächer, besonders davon betroffen war die Zellkernfärbung mit DAPI. Doch auch hier entsprachen die Ergebnisse den vorhergehenden Experimenten.

In der Kontrollgruppe waren die OB nach 24 Stunden unbeeinträchtigt. Sie sahen aber eher klein aus. Es gab vereinzelt Zellen, die Apoptose und Nekrose aufwiesen. Nach 48 Stunden war die Zahl der OB in der Kontrollgruppe deutlich erhöht. Die Zellkerne waren kleiner im Vergleich zu Zellen auf Glas ohne Beschichtung. Nur wenige Zellen wiesen eine Färbung auf. Nach 72 Stunden war die Zellzahl deutlich angestiegen. Die Zellkerne zeigten eine normale Morphologie. Vereinzelt fand man große Kerne. Die meisten waren aber eher klein. Auch hier fand man nur vereinzelt Zellen, die Apoptose und Nekrose aufzeigten.

Die erste Gruppe enthielt $0,1 \text{ M}$ Doxorubicin. Nach 24 Stunden war die Zellzahl schon deutlich niedriger. Die Morphologie zeigte eine leichte Veränderung. Alle Zellkerne wiesen eine PJ-Färbung auf. Es waren weniger OB vollständig PJ-gefärbt als solche vorhanden, die zusätzlich eine Annexinfärbung aufwiesen. Nach 48 Stunden war die Anzahl der OB schon deutlich gesunken, auch war die Morphologie der Zellkerne verändert. Fast alle Zellkerne wiesen eine PJ-Färbung auf, manche hatten zusätzlich eine Annexinfärbung. Nach 72 Stunden war die Osteoblastenzahl weiter gesunken. Mehr OB zeigten eine PJ-Färbung und auch die Zahl der OB mit einer Annexinfärbung in Kombination mit einer PJ-Kernfärbung war deutlich höher.

Die zweite Gruppe enthielt 1 M . Schon nach 24 Stunden waren weniger Zellen vorhanden. Ein große Zahl der OB war PJ-gefärbt, ebenso ein Großteil der Zellkerne. Nach 48 Stunden zeigte die Morphologie der Zellkerne schon eine Veränderung oder wies Spuren von Verfall auf. Alle Zellkerne wiesen eine PJ-Färbung auf. Die Zahl der Zellen, die zusätzlich PJ-gefärbt waren, war deutlich angestiegen, wie auch die Zahl der Zellen, die eine zusätzliche Annexinfärbung von Oberflächensegmenten aufwiesen. Nach 72 Stunden war die Zahl der OB noch weiter gesunken. Die Zellkerne waren klein und zeigten eindeutige Zeichen von Verfall. Die

Anzahl der PJ-gefärbten Zellen hatte sich weiter erhöht. Alle Zellkerne wiesen eine PJ-Färbung auf. Die Zahl der zusätzlich mit Annexin gefärbten OB war wieder gesunken.

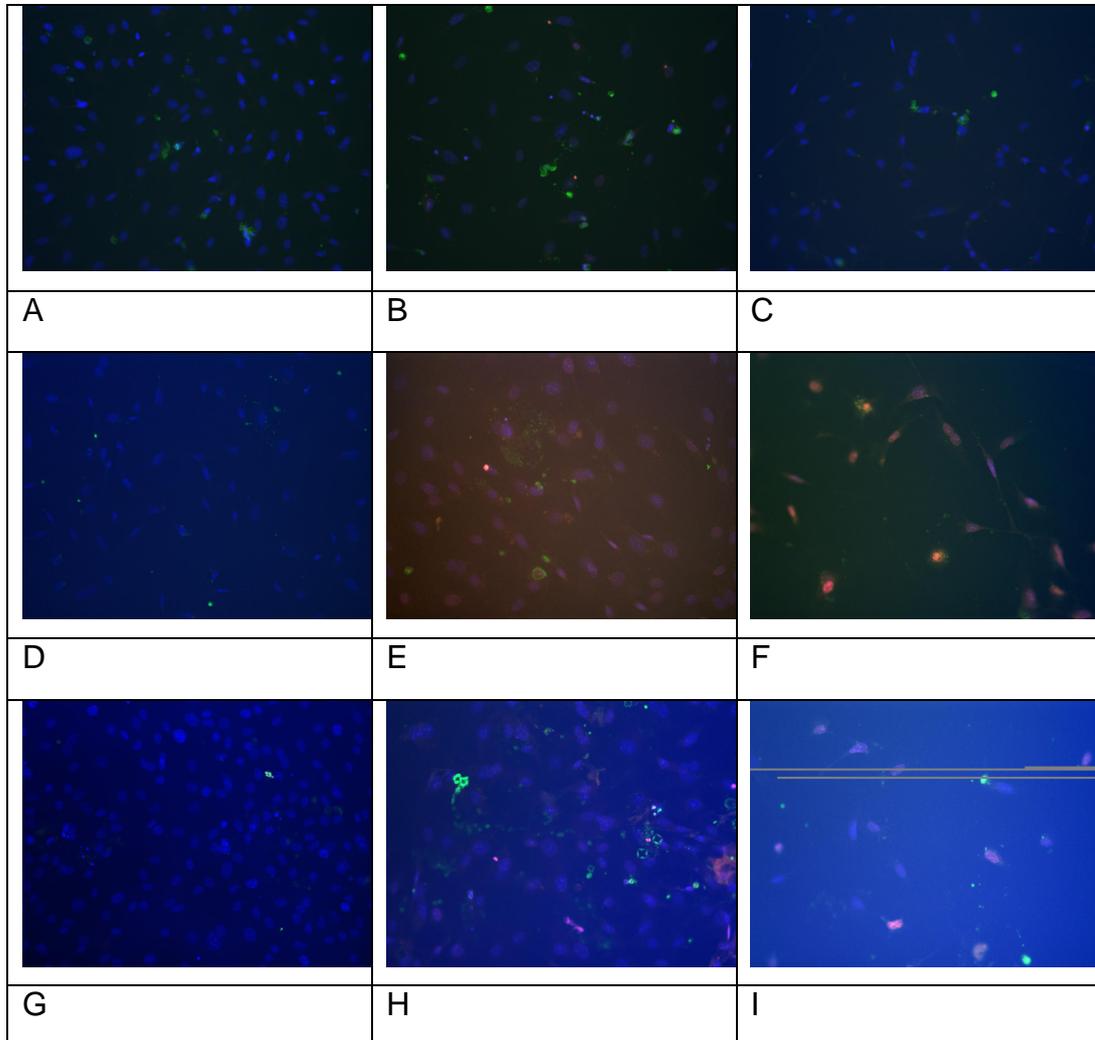


Abbildung 16: Osteoblasten auf ELP nach 24/48/72 Stunden.

Bild A zeigt die Kontrollgruppe nach 24 Stunden, Bild B zeigt Gruppe 1 (Zugabe von 0,1 μM Doxorubicin) nach 24 h und Bild C zeigt Gruppe 2 (Zugabe von 1 μM Doxorubicin) nach 24 h auf ELP. Bild D zeigt die Kontrollgruppe nach 48 h, Bild E Gruppe 1 nach 48 h und Bild F Gruppe 2 nach 48 h auf ELP. Bild G zeigt die Kontrollgruppe nach 72 h, Bild H Gruppe 1 nach 72 h und Bild I Gruppe 2 nach 72 h auf ELP.

Auch das Verhalten der OB auf -TCP-Presslingen ergänzte die vorangegangenen Ergebnisse. Alle OB ließen eine flächendeckende PJ-Färbung erkennen. Die Kontrollgruppe nach 24 Stunden wies eine gesunde Morphologie auf. Die Zellkerne waren eher klein, aber gesund. Es kam zu einzelnen Färbungen mit Annexin auf Oberflächensegmenten. Nach 48 Stunden war die Zellzahl deutlich gestiegen. Die Zellkerne waren

rund und von normaler Morphologie. Auch hier sah man Fragmentfärbungen mit Annexin. Nach 72 Stunden war die Anzahl der OB weiter gestiegen. Die Verteilung der Zellen war gleichmäßig und die Zellen zeigten eine normale Morphologie. Die Zahl der OB mit Annexin hatte sich kaum verändert.

Die erste Gruppe enthielt 0,1 M Doxorubicin. Nach 24 Stunden war die Zellzahl leicht zurückgegangen. Die vorhandene Annexinfärbung war räumlich begrenzt und nicht gleichmäßig verteilt. Nach 48 Stunden hat sich die Anzahl der OB reduziert. Die Zahl der Zellen mit Annexinfärbung war kaum angestiegen. Nach 72 Stunden war die Zellzahl weiter gesunken, während sich die Zellzahl der OB mit Annexinfärbung kaum verändert hat.

Die zweite Gruppe enthielt 1 M Doxorubicin. Nach 24 Stunden war die Zahl der Zellen deutlich reduziert. Die OB waren kleiner im Vergleich zur Kontrollgruppe. Es gab Zellen, die zusätzlich eine Annexinfärbung auf Oberflächensegmenten aufwiesen. Nach 48 Stunden war die Anzahl der OB weiter gesunken. Die Morphologie der OB wies eine Veränderung auf.

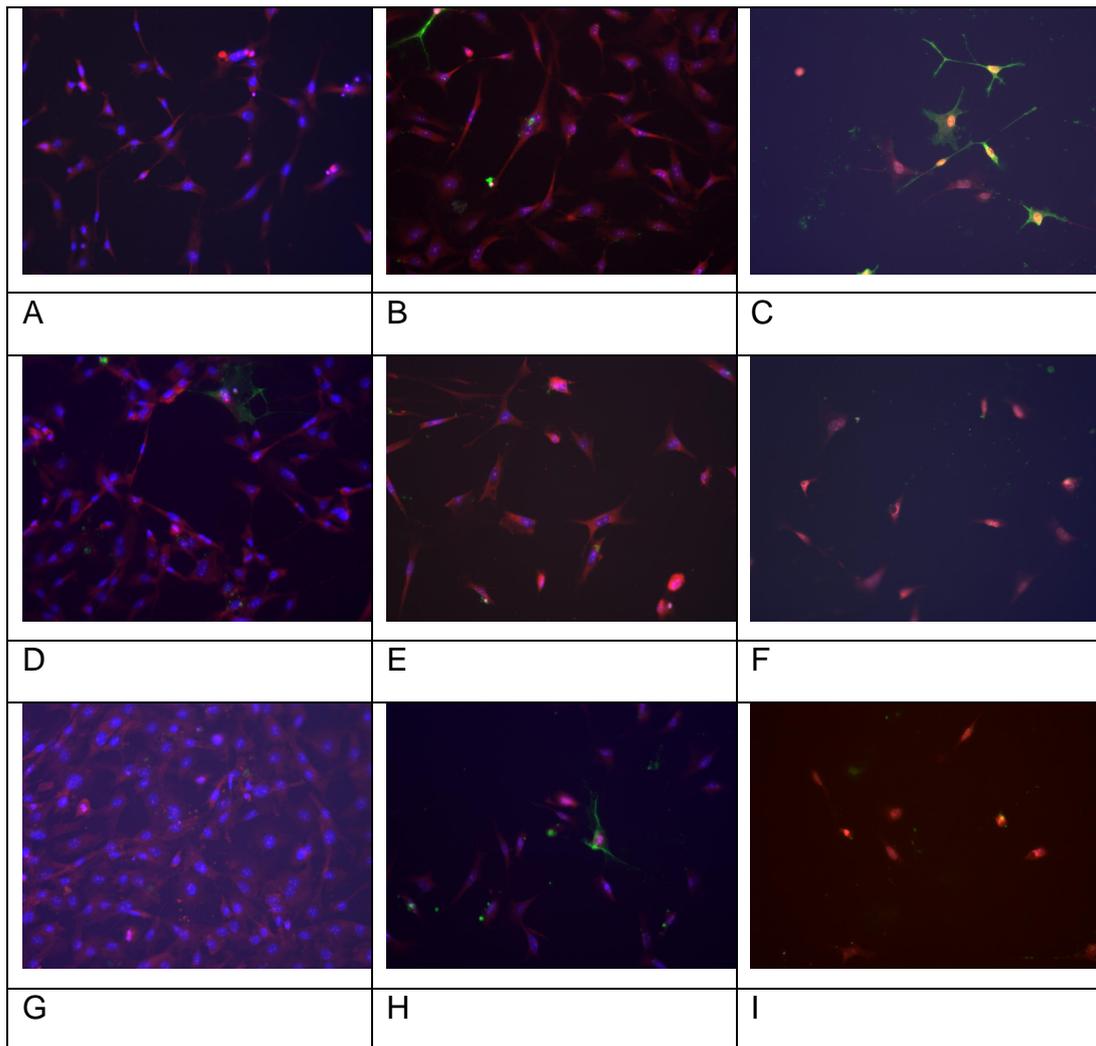


Abbildung 17: Osteoblasten auf -TCP-Presslingen nach 24/48/72 Stunden.

Bild A zeigt die Kontrollgruppe nach 24 h, Bild B Gruppe 1 (Zugabe von 0,1 μM Doxorubicin) nach 24 h und Bild C Gruppe 2 (Zugabe von 1 μM Doxorubicin) nach 24 h auf -TCP-Presslingen. Bild D zeigt die Kontrollgruppe nach 48 h, Bild E Gruppe 1 nach 48 h und Bild F Gruppe 2 nach 48 h auf -TCP-Presslingen. Bild G zeigt die Kontrollgruppe nach 72 h, Bild H Gruppe 1 nach 72 h und Bild I Gruppe 2 nach 72 h auf -TCP-Presslingen.

4 DISKUSSION

4.1 Einleitung und Aufgabenstellung

In der Medizin wird seit Jahren versucht, mit biologischen und synthetischen Knochenersatzmaterialien Defekte am Knochen zu behandeln. Zu beachten ist, dass der Aufbau bzw. die Dichte der Knochen stark von der Art der Knochenzellen abhängig ist.

Das Ziel meiner Arbeit war es, einen Überblick über das Verhalten der Knochenzellen auf Biomaterialien zu schaffen. Die Einflüsse dieser Biomaterialien auf die Einleitung von Apoptose und Nekrose bei OB und OC wurden untersucht.

Als Biomaterialien wurden Glas, -TCP und ELP beschichtete Deckgläser verwendet. Glas und -TCP sind schon seit längerem in Verwendung, ELP seit kürzerer Zeit.

Um experimentell Apoptose und Nekrose zu induzieren, wurde Doxorubicin, welches in der Chemotherapie Anwendung findet, bei OC und OB verwendet, Pamidronat nur bei OC. Doxorubicin ist ein Chemotherapeutikum, Pamidronat hingegen ist ein Vertreter der Bisphosphonate, die ihren Einsatz bei der Osteoporosetherapie finden. Sie wirken spezifisch auf die OC.

4.2 Vorversuche:

Begonnen wurde mit einem Modell der klassischen Osteoklasten-Co-Kultur aus Mäusezellen. Die Zuordnung der Annexin/PJ-Färbung der OB und OC konnte kaum bis gar nicht durchgeführt werden, weil die Anzahl der Zellen aufgrund der Reifezeit, welche die OC benötigten, zu hoch war. Aus diesem Grund schied die Anwendung der Co-Kultur zum Austesten aus, und es wurde zur Beobachtung des Verhaltens von OC auf Biomaterialien die Gewinnung der OC aus Kaninchen herangezogen. Denn aufgrund einer anderen Art der Gewinnung der OC konnte man die Anzahl der Zellen leichter beeinflussen.

Ein weiteres Experiment zeigte, dass, wenn die Annexin/PJ-Färbung erst nach der Fixierung der Zellen stattfand, es zu einer Verteilung der Färbung über das gesamte Präparat kam. Dadurch konnten keine Aussagen über Erfolg oder Misserfolg der Versuchsreihe getroffen werden. Durch Expression von chimären Proteinen war es möglich, Annexinkerne mit einem grün fluoreszierenden Protein zu fusionieren. Dadurch konnte die Verteilung in lebenden Zellen sichtbar gemacht werden. So wurde das Problem umgangen, dass in fixierten Zellen die Annexinverteilung in Fixierungs- und Permeabilisierungspuffer stattfindet. (Gerke und Moss 2002) Ergebnisse konnten durch Änderung des experimentellen Aufbaus in Bezug auf die Färbung der lebenden Zellen und durch die nachträgliche Fixierung erzielt werden.

4.3 Osteoklasten auf verschiedenen Biomaterialien:

4.3.1.1 Verhalten von Osteoklasten auf Glas: (=Kontrolle)

Im Vergleich zu anderen Biomaterialien breiteten sich die OC auf Glas relativ breit aus. Drei Gruppen wurden dabei unterschieden: 0,1 M Doxorubicin wurde in die erste Gruppe, 1 M Doxorubicin in die zweite Gruppe jeweils zum Nährmedium und nur das Nährmedium in die Kontrollgruppe zugegeben. Die Zellzahl der Kontrollgruppe nahm innerhalb der 48 Stunden erwartungsgemäß aufgrund keiner negativen äußeren Einflüsse zu, in der ersten und zweiten Gruppe erwartungsgemäß aufgrund der negativen äußeren Einflüsse ab. Es wurde versucht, durch Annexin/PJ-Färbung die Anzahl von Zellen in Apoptose und Nekrose zu unterscheiden.

Hier werden drei Szenarien differenziert:

Szenarium Eins: Die Zellen sind mit PJ gefärbt, die Färbung vor allem auf die Zelloberfläche bezog.

Szenarium Zwei: Alleinige Färbung der Zellkerne durch PJ.

Szenarium Drei: Gefärbte Kerne und/oder Zellstrukturen mit PJ und zusätzlich eine Annexin V -Färbung.

Nach bisherigen Erkenntnissen aus der Literatur waren alle drei Szenarien

als nekrotisch zu werten.

Nach Huerta et al. tritt Apoptose in einer fortlaufenden Weise auf. Die ersten morphologischen Veränderungen treten bei der Zellmembran auf. Es kommt zur Abnahme der Zell-Zell-Adhäsion und zu einer Veränderung der zytosolischen und mitochondrialen Proteine, die letztendlich zu einer nuklearen Veränderung führen. (Huerta, et al. 2007) Das könnte ein Grund für die unterschiedlichen Arten von Färbungen sein. Die einzelnen Szenarien zeigten die einzelnen Phasen des eintretenden Zelltodes, in denen sich die einzelnen Zellen befanden.

4.3.2 Verhalten von Osteoklasten auf ELPs.

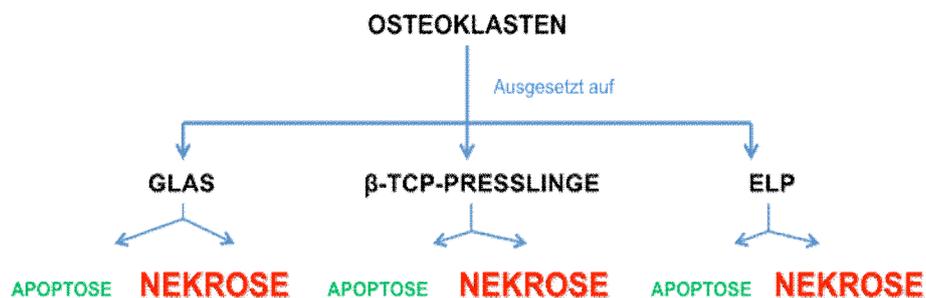
Im Vergleich zu den OC auf Glas zeigte sich bei den ELPs ein ganz anderes Bild. Durch die unebene, nicht sehr gleichmäßige Oberfläche lagen die Zellen nicht plan auf, und sie konnten sich dementsprechend auch nicht so weit ausdehnen wie auf den Deckgläsern. Durch die nicht plane Lage der Zellen war es schwer, scharfe Konturen für die ganze Zelle zu bekommen. Auch hier konnte man schön die Reduktion der Zellen nach der Zugabe von den zwei Konzentrationen Doxorubicin und auch den Einfluss der Zeit (24/48 Stunden) beobachten. Unerwarteterweise waren alle Zellen mehr oder weniger PJ-gefärbt, der Großteil der Zellen wies eine eindeutige Zellkernfärbung mit PJ auf. Es wurde keine reine Annexin V-Färbung, also der Nachweis auf alleinige Apoptose, gefunden. Bei Doxorubicin waren ziemlich idente Ergebnisse zu beobachten. Die Zahl der doppelgefärbten Zellen war bei der ersten Gruppe um einiges höher als in der zweiten Gruppe. Möglicherweise dadurch erklärt, dass die niedrigere Dosis langsamer einwirkte und so langsamer zum Zelltod führte als die hohe Dosis, bei der die Zellen schneller starben und nicht mehr vorhanden waren. Apoptotische Prozesse werden über die Aktivierung der Caspase-Kaskade definiert, Nekrose läuft unabhängig davon ab. (Huerta, et al. 2007) Dies lässt den Schluss zu, dass Nekrose einfach viel schneller eingeleitet werden kann als die Abläufe der Apoptose.

4.3.3 Verhalten von Osteoklasten auf -TCP-Presslingen:

Die -TCP-Presslinge zeigten eine sehr interessante Färbung. Der Großteil aller OC war vollständig PJ-gefärbt. Es zeigte sich meist eine

intensive Färbung, die über die gesamte Zelloberfläche ging. Man bekam ein gutes Bild über die Oberfläche, Form und Größe der Zellen. Zusammengefasst: die OC wiesen wie erwartet auf den Deckgläsern die beste Lebensfähigkeit auf. Denn nur auf diesen Objekten wurden auch nicht-gefärbte OC gefunden, also Zellen, von denen man annehmen konnte, dass sie weder nekrotisch noch apoptotisch waren. Zusätzlich wurde im Vergleich zu den anderen Biomaterialien auch eine deutlich höhere durchschnittliche Osteoklastenzellzahl beobachtet. Die Gründe für eine geringere Überlebensfähigkeit der OC im Vergleich zu Glas könnten vielfältig sein. Ein möglicher Grund dafür könnte die Resorption der unterschiedlichen Biomaterialien sein. Es könnte aber auch an der unebenen Oberfläche liegen.

Die nächste Figur zeigt eine kurze Zusammenfassung der Ergebnisse von OC auf den drei verwendeten Biomaterialien.



In einem Pilotversuch wurde die Wirkung zwischen Pamidronat und Doxorubicin auf Deckgläsern nach 48 Stunden verglichen. Wie bereits festgestellt, griff Doxorubicin relativ rasch alle Zellen an. Man konnte eine eindeutige Reduktion der Zellzahl erkennen. Weiters kam es vor allem bei einer Konzentration von 1 μM Doxorubicin zu einer Deformation der Zellen. Bei 0,1 μM Doxorubicin sah man eine deutliche vorwiegend nekrotische Färbung aller Zellen, wobei sich die Wirkung nicht nur auf die OC begrenzte. Weiters fand man über die Objekte verteilt sehr viele Zellkernfragmente, also Reste oder Teile von Zellen, deren Herkunft nicht mehr feststellbar war. Man sah, dass es durch die Wirkung von Doxorubicin zu einer drastischen Reduktion sämtlicher Zellen auf dem Objekt kam.

Basierend auf der Hauptwirkung der Bisphosphonate, welches ein inhibierendes Verhalten auf OC aufweist (Tanaka et al., 2006), wurde Pamidronat eingesetzt. Die Anzahl der OC war eindeutig geringer, auch gab es hier eindeutige Anzeichen einer reinen Nekrose auf OC. Weder die OC selbst, noch die Zellen um die OC herum wiesen Deformationen von Zellkernen oder der Zelloberfläche auf. Zusammenfassend kann man sagen, dass Doxorubicin eine stark inhibierende Wirkung auf die Zahl der Zellen aufwies, Pamidronat wirkte spezifisch auf OC.

4.4 Osteoblasten auf verschiedenen Biomaterialien:

Auch hier wurden wieder Deckgläser, -TCP und ELP als Biomaterialien verwendet.

4.4.1 Verhalten von Osteoblasten auf Glas (= Kontrolle):

Aus jahrelanger Erfahrung war schon bekannt, dass die OB auf den einfachen Deckgläsern eine gute Lebensfähigkeit aufweisen. Erwartungsgemäß sahen die Zellen in der Kontrollgruppe, unbehandelt, gesund aus. Die Deckgläser waren vom Zentrum aus sehr dicht besiedelt, mit gleichmäßiger Verteilung, aber mit einer abnehmenden Zellzahl zum Rand hin. Die Zellkerne waren scharfkantig und groß. Nach drei Tagen zeigte sich bei der Färbung kaum Anzeichen von Apoptose oder Nekrose. Man sah, dass es bei vereinzelt Zellen gerade zum Einsetzen von Apoptose und / oder Nekrose gekommen war. Es gab vereinzelt Objekte, wo Apoptose zu sehen war. Diese fand dann aber großflächig, fast klusterartig statt. Es stellte sich heraus, dass nie eine einzelne Zelle von Apoptose betroffen war, sondern meist lokal begrenzt auf mehrere.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden OB mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen von Doxorubicin behandelt. Bei Doxorubicin 0,1 μM waren noch Verhältnismäßig viele Zellen vorhanden, welche aber schon Anzeichen von Nekrose zeigten. Die Zellkerne wiesen durch die Kombination der DAPI (blau) und PJ-Färbung (rot) eine meist intensive violette Färbung auf. Bei Doxorubicin 1 μM waren wie erwartet weitaus weniger Zellen vorhanden, die Zahl hatte sich um die Hälfte verringert. Es

gab hier keine Anzeichen für eine reine Apoptose, eine Annexin-Färbung gab es nur in Kombination mit PJ-gefärbten Zellkernen, was uns darauf hinweist, dass Nekrose vorliegt.

4.4.2 Verhalten von Osteoblasten auf β -TCP-Presslingen:

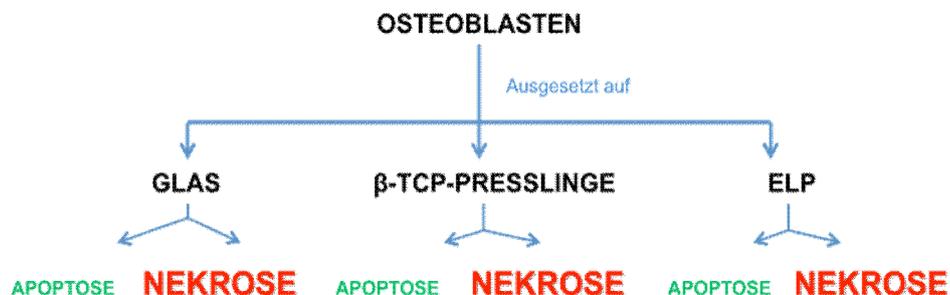
α - und β -TCP zeigten in einer in vitro-Studie eine hohe Lebensfähigkeit für OB und erlaubten Zellproliferation an der Zelloberfläche. (Herten et al., 2009) Das Arbeiten mit OB auf β -TCP-Presslingen lieferte ein unerwartetes Ergebnis: Sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der Substanzgruppe zeigten alle OB durch die Kombination mit DAPI eine tiefrote Oberflächenfärbung und violette Zellkerne. Bis auf die Rotfärbung gab es keine wesentlichen Unterschiede zur Kontrollgruppe auf Glas. Die Interpretation daraus wäre, dass alle OB als nekrotisch zu werten wären.

Eine mögliche Erklärung dafür wäre der Einfluss der Temperatur. Die Arbeit von Tanimoto Y. et al. zeigte, dass die Sintertemperatur einen entscheidenden Einfluss auf die physikalischen Eigenschaften von TCP hat. Mit zunehmender Temperatur nimmt die Härte von TCP zu und es kommt zu einer Veränderung der Kristallformen. Dementsprechend ist die Wahl der richtigen Temperatur ein wichtiger Faktor für eine erfolgreiche Anwendung. (Tanimoto und Nishiyama 2008) Zusätzlich könnte die Mikrostruktur bzw. die Porosität von β -TCP einen Einfluss auf die Aktivität und das Verhalten von Knochenzellen ausüben. Das wurde von Okuda et al. in einer In vivo-Studie bewiesen. (Okuda et al., 2007) Im Vergleich zu den Deckgläsern sahen die OB und ihre Zellkerne kleiner aus, die Zellzahl hingegen war annähernd ident. Weiters könnte durch das Oberflächenprofil des Biomaterials Einfluss auf das Zellwachstum und die Zellorientierung genommen werden. (Khakbaznejad et al., 2004) In dieser Arbeit wurde deutlich gezeigt, dass im Vergleich zur glatten die gerillte Oberfläche OB zum Wachstum anregt. Im Gegensatz zu den Studienergebnissen (Jang et al., 2013), (Homaeigohar et al., 2008) konnte dies in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden.

4.4.3 Verhalten von Osteoblasten auf ELPs:

In einer Versuchsanordnung mit wiederum drei Gruppen zeigte es sich, dass wie erwartet die OB in der Kontrollgruppe gesund waren. Auch die Anzahl der OB war vergleichbar mit der Anzahl der OB auf den β -TCP-Presslingen. Im Vergleich zu den Kontrollgruppen der anderen Biomaterialien waren vermehrt gefärbte Zellen vorhanden. Die Zellen selbst wiesen unterschiedliche Zustände auf: Vollkommen gesunde Zellen oder OB waren neben vollkommen oder zum Teil zerstörten Zellen zu finden. In der Aufsicht konnte ein Teil der OB scharf und ein anderer Teil derselben Zelle aufgrund der Dreidimensionalität / Beobachtungstiefe nur unscharf wahrgenommen werden. Es scheint, dass die ELPs keine glatte Oberfläche hatten oder die OB vielleicht in die Oberfläche hinein wuchsen. Das ist gut in Abbildung 12 zu sehen. Weiters schien es, als würde das Biomaterial die Färbung beeinflussen. Im Vergleich zu den anderen Biomaterialien war die Färbung deutlich schwächer.

In der nachfolgenden Figur sind die Ergebnisse der OB auf den drei verwendeten Biomaterialien kurz zusammengefasst.



Im Rahmen dieser Arbeit wurde noch ein weiterer Versuchsaufbau unternommen: Die drei oben genannten Gruppen (eine Kontrollgruppe, die erste Gruppe mit 0,1 M Doxorubicin und zweite Gruppe mit 1 M Doxorubicin) wieder auf die Biomaterialien aufgetragen und die OB nach 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden untersucht wurden.

Nach 24 Stunden zeigte sich kein wesentlicher Unterschied in der Osteoblastenanzahl auf allen drei Biomaterialien.

4.4.3.1 Verhalten von Osteoblasten auf Glas:

Die OB auf Glas zeigten eine gleichmäßige Verteilung. Bei 0,1 μM Doxorubicin hatten die Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe morphologisch kaum Unterschiede, die Zellzahl war aber deutlich reduziert. Bei 1 μM Doxorubicin zeigte sich zusätzlich zur Reduktion der Zellzahl eine Veränderung in der Morphologie. Siehe Abbildung 13: Diese Ergebnisse entsprachen den Erwartungen.

4.4.3.2 Verhalten von Osteoblasten auf -TCP-Presslingen:

Hier waren alle OB PJ-gefärbt. Siehe Abbildung 15. Laut Definition waren alle nekrotisch, obwohl ihre sonstige Morphologie gesund erschien. Im Vergleich zu den OB auf Glas wirkten sie auf den -TCP-Presslingen kleiner. Bei diesem Experiment zeigte sich nach 72 Stunden bei 1 μM Doxorubicin die Zelloberfläche fast auf die Größe des Zellkerns geschrumpft. Der gewünschte toxische Effekt von Doxorubicin zum Einleiten von Apoptose und Nekrose war eingetreten.

4.4.3.3 Verhalten von Osteoblasten auf ELPs:

Zum Unterschied zu den Zellen auf Glas und auf den -TCP-Presslingen zeigte sich nach nur 24 Stunden ein morphologischer Unterschied: Schon bei 0,1 μM Doxorubicin, zeigten die OB von Beginn an eine Veränderung im Aussehen wie auch bei 1 μM Doxorubicin. (Siehe Abbildung 14) Die im Vergleich auf Glas deutlich höhere Anzahl an nekrotischen Zelle lässt darauf schließen, dass reines ELP keinen protektiven Effekt gegen äußere Einflüsse aufweist.

Abschließend kann man sagen, dass Glas als Biomaterial eigentlich ein idealer Boden für OB darstellt. Die Zellen am Glas verteilen sich gleichmäßig und gut. Durch äußere Einflüsse kam es sehr wohl zu den erwarteten Auswirkungen auf die OB, doch waren diese im Vergleich zu anderen Biomaterialien nicht so intensiv und schnell. Wenn wir ELP als Biomaterial hernahmen, hatten wir im Vergleich zum Glas keine ebene Oberfläche, dadurch kam es zu keiner gleichmäßigen Verteilung der OB. Im 24/48/72 Stunden-Experiment zeigte sich schon nach 24 Stunden durch äußere Einflüsse eine Veränderung der morphologischen Struktur von OB. Auch zeigten hier die OB scheinbar früher nekrotische Anzeichen

als die OB auf Glas. Anscheinend hatte ELP zwar keinen negativen Einfluss auf die OB selbst, doch schien es die Zellen auch nicht positiv zu unterstützen, um sich gegen negative äußere Einflüsse wehren zu können.

Die -TCP-Presslinge brachten durch die durchgängige und vollständige Färbung durch PJ ein nicht erwartetes Ergebnis. Dazu wären aber weitere Versuchsreihen nötig, um zu klären, wie solche Ergebnisse zu Stande kommen. Wie in vorherigen Arbeiten meiner KollegInnen festgestellt wurde, spielt die Porengröße der -TCP-Presslinge eine entscheidende Rolle bei der Adhäsion und Lebensdauer der Knochenzellen. Vielleicht hat die Porengröße einen weitaus größeren Einfluss auf die Knochenzellen als bisher angenommen, vor allem auf OB.

4.5 Verwendung von Apoptosemarkern

Es wurde nachgewiesen, dass es zu einer starken Fluoreszenz kommt, wenn der Fluoreszenzfarbstoff PJ an DNA bindet. Auch färbte er nur nicht-lebensfähige Zellen. So wäre eine Messung durch Durchflusszytometrie eine ideale Methode, um zwischen gefärbten und nicht-gefärbten Zellen zu unterscheiden. Um ein besseres Bild über den Zelltod von OB auf Biomaterialien zu erhalten, war PJ zu unspezifisch. Annexin V-Assays beruhen auf der Beobachtung, dass sich während der Induktion der Apoptose Phosphatidylserin (PS) von der inneren Oberfläche zur äußeren Oberfläche der Plasmamembran verlagert. Dieses frühe Ereignis während der Apoptose ermöglicht den Fresszellen eine Erkennung, um diese apoptotischen Zellen zu eliminieren, ohne dass proteolytische Enzyme der apoptotischen Zellen auslaufen können. Auch dieser Fluoreszenzfarbstoff wäre hervorragend für eine Durchflusszytometrie geeignet. Es wurde jedoch festgestellt, dass Annexin-V sehr unspezifisch zwischen Apoptose und Nekrose unterscheidet. Aus diesem Grund wird empfohlen, Annexin-V mit einem DNA-bindenden Farbstoff, wie z.B. PJ, zu kombinieren. (Huerta, et al. 2007)

In dieser Arbeit wurde auch untersucht, ob sich Annexin V und PJ als Apoptose- und Nekrosemarker eignen. Es zeigte sich, dass man beide Fluoreszenzfarbstoffen in vitro anwenden kann. Bei Ergebnissen auf den

81

-TCP-Presslingen kann man Annexin-V bzw. PJ den einzelnen Zellen sehr gut zuordnen, aber das ist nicht auf jedem Biomaterial so. Weiters spielt es eine Rolle, in welcher Phase des Zelltodes sich die Zelle befindet. So ist Annexin-V ein Marker für die frühe Phase der Apoptose. (Huerta, et al. 2007) Im Rahmen dieser Arbeit kam es also eher selten vor, dass sich OB und OC während der Auswertung in der frühen Phasen des Zelltodes befanden. So wären Apoptosemarker, welche spätere Phasen des Zelltodes zeigen, weitaus besser.

Huerta et al. empfiehlt, nicht nur einen Assay zur Bestimmung des Zelltodes zu verwenden sondern, immer zwei oder mehrere voneinander unabhängige Methoden, da handelsübliche Kits Vor- und Nachteile haben. Als Beispiel wird eine mikroskopische Beobachtung von morphologischen Veränderungen in Kombination mit zwei unabhängigen DNA-Fragmentierungs-Assays vorgeschlagen, um Apoptose zu definieren. (Huerta, et al. 2007)

4.5.1 Apoptosemarker und Osteoklasten

Aufgrund der Sensibilität und Größe können manche technischen Hilfsmittel wie z.B. ein Durchflusszytometer nur schwer bis gar nicht angewendet werden. Daher ist das Arbeiten unter dem Fluoreszenzmikroskop durchaus Mittel der Wahl. Zur Bestimmung der Apoptose gilt das Elektronenmikroskop als Gold-Standard. (Huerta, et al. 2007) Um spezifisch Apoptose zu bestimmen, wäre in weiteren Experimenten ein Marker für die Caspase-Kaskade empfehlenswert. Zum Beispiel könnten spezifische monoclonale Antikörper gegen aktivierte Caspase 3 zusätzlich zum Fluoreszenzmikroskop bei Western- oder Immunohistochemischen Analysen verwendet werden. (Huerta, et al. 2007). Die Caspase-Kaskade wird nur bei Apoptose aktiviert und würde so einen spezifischen Apoptosemarker stellen. Weiters wäre es sicher interessant, zwischen frühem und spätem Stadium der Apoptose zu unterscheiden, um festzustellen, welcher Grad der Apoptose auf dem Biomaterial vorliegt. Zu wissen, wie schnell die Apoptose auf dem jeweiligen Biomaterial abläuft, kann meiner Meinung nach Vorteile bei zukünftigen Experimenten bringen, wenn man z.B. feststellen möchte, ob

und wie Substanzen auf OC einwirken.

4.5.2 Apoptosemarker und Osteoblasten

Durch die Verwendung von Durchflusszytometrie könnte jede einzelne Zelle sowie deren Fluoreszenzmarkierung quantifiziert werden, und - besonders wenn die Fluoreszenz noch nicht vollständig ist - richtig zugeordnet werden. Annexin-V und PJ können problemlos dafür verwendet werden. Doch auch für OB wäre ein zusätzlicher Apoptosemarker wie z.B. für die Ausführungs-Caspasen 3 oder 7 ideal, um unabhängige aber vergleichbare Ergebnisse für Apoptose zu erhalten. Meiner Meinung nach würde das Arbeiten mit einem Durchflusszytometer die Ergebnisse durch Eliminierung der subjektiven Einschätzung besser reproduzierbar machen. Auch bringt meiner Ansicht nach die Verwendung von DNA-Fragmentierungskits (Huerta, et al. 2007) Vorteile, da man auch bei den OB einen Überblick über den Zeitverlauf der Apoptose bekommt. Mit zusätzlichen Daten könnte man standardisierte Protokolle erstellen, welche auf die verschiedensten Biomaterialien angewendet werden könnten und leicht vergleichbar wären.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass Biomaterialien wie -TCP und ELP keinen positiven Einfluss auf das hinauszögern der Apoptose durch äußere Einflüsse haben. Zur Optimierung der Biomaterialien laufen zur Zeit weitere Studien.

Die Ergebnisse dieser Arbeit führten zu neuen Erkenntnissen im Bereich des Wachstums und Überlebens von OC und OB auf schon bekannten Biomaterialien. Die Resultate zeigten ein neues Bild im Rahmen der Biomaterialien. Um jedoch ein noch detaillierteres Bild zu erhalten, wären weitere Wissenschaftliche Arbeiten zu diesem Thema notwendig.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Der Einsatz von Knochenersatzmaterialien zur Unterstützung von Frakturheilungen nimmt stetig zu. Da der Heilungsprozess vom Zusammenspiel von Osteoklasten und Osteoblasten abhängt, erscheint es notwendig das Verhalten dieser Zellen auf den angewendeten Biomaterialien zu untersuchen.

In Rahmen dieser Diplomarbeit wurde das Apoptose- und Nekroseverhalten von Osteoblasten und Osteoklasten auf drei unterschiedlichen Biomaterialien -TCP und Elastin-like Polymere (ELP) untersucht und mit Glas verglichen. Dabei wurden Kaninchen-Osteoklasten auf den verschiedenen Biomaterialien ausgesetzt und nach 24 und 48 Stunden mit Annexin V und Propidium . Jodid (PJ) eingefärbt. In diesem Fall sollte Annexin V apoptotische Zellen und PJ nekrotische Zellen markieren. Diese wurden mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops ausgewertet. Um Apoptose/Nekrose besser zu erkennen, wurde mit Doxorubicin als zellschädigender Kontrollsubstanz verglichen. Mit demselben Versuchsaufbau wurden auch Osteoblasten aus einer Mäuse-Zell-Linie untersucht.

Bei Osteoblasten handelt es sich um Apoptose-empfindliche Zellen, was durch diese Studie bestätigt werden konnte. Es zeigten sich kaum Zellen, die weder Apoptose noch Nekrose aufwiesen. Der Großteil der Zellen wies Nekrose auf. Die Osteoblasten zeigten im Vergleich zu den Osteoklasten eine stärkere Widerstandsfähigkeit gegen die Biomaterialien. Osteoblasten zeigten auf Glas die geringsten Apoptose- und Nekrosewerte, ELP zeigte sehr unterschiedliche Ergebnisse zwischen den einzelnen Experimenten. -TCP zeigte ein völlig unerwartetes Ergebnis: Alle Zellen wiesen von Anfang an eine vollständige PJ-Färbung, also Nekrose auf. Annexin V und PJ als alleinige Apoptose- und Nekrose-Marker reichten leider nicht aus, um ein vollständiges Bild von Nekrose und Apoptose von Osteoblasten und Osteoklasten auf verschiedenen Biomaterialien zu erhalten.

6 CONCLUSION

The use of bone replacement materials to support fracture healing is on the rise. Because the healing process is dependent on the interaction between osteoclast and osteoblast, it appears necessary to study the behaviour of these cells on the applied biomaterial.

In this thesis, the apoptosis and necrosis behaviour of osteoblasts and osteoclasts was examined on different biomaterials -TCP and Elastin-like polymer (ELP) and compared with glass. Therefore isolated osteoclasts were exposed to the various biomaterials, stained after 24 and 48 hours, with Annexin V and Propidium iodid (PJ) and analysed using a fluorescence microscope. To better estimate apoptosis / necrosis, groups were compared with Doxorubicin. With the same experimental set-up, osteoblasts from a murine cell line were examined only after 72 hours.

This study provides further evidence that osteoblasts are apoptosis-sensitive cells. It was difficult to find cells that showed either apoptosis or necrosis. Most of the cells showed necrosis. In comparison to the osteoclasts, osteoblasts showed greater capability of resistance against biomaterials. Osteoblasts on glass showed the lowest values of apoptosis and necrosis, ELP showed very different results between the individual experiments. -TCP revealed completely unexpected results: all cells showed a complete PJ staining from the beginning, which indicated necrosis. Unfortunately, Annexin V and PJ as the only apoptosis and necrosis markers were not enough, to get a complete picture of necrosis and apoptosis of osteoblast and osteoclast on different biomaterials.

7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

1,25(OH) ₂ D ₃	1,25-Dihydroxy-Vitamin D ₃
AIF	Apoptose induzierender Faktor
Bak	Ein Gen das durch Aktivierung den Apoptosesignalweg aktiviert.
BAX	Protein der Bcl-2 Genfamilie
BMC	Bone Marrow Cells, Knochenmarkszellen
BMP	Bone-morphogenetic-Protein
BRU	Bone remodeling unit
BSA	Bovine Serum Albumin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dH ₂ O	Bidestilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DOX	Doxorubicin
Doxo	Doxorubicin
E.Coli	Escherichia Coli
ELP	Elastin-like Protein
EtOH 70%/abs	Ethylalkohol 70 % oder absolut
FA	Firma
FADD	Fas-Associated protein with Death Domain
FCS	Fetales Kälberserum
HA	Hydroxylapatit
Hcl	Salzsäure
H ₂ O	Wasser
IAP	Inhibitor der Apoptose
IL-1, IL-2, IL-3,..	Interlaukin-1, Interleukin-2,ö
LAF	Laminar Air Flow
LPS	Lipopolsaccharide
M-CSF	Macrophage colony stimulating factor
MMP	Matrixmetalloproteinase

MPS	Mononukleares Phagozytensystem
MSCs	Mesenchymale Stammzellen
NaOH	Natronlauge
NF B	Transkriptionsfaktor: Nuklearer Faktor Kappa B
OB	Osteoblasten
OC	Osteoklasten
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBS	Phosphate buffered saline
PEG	Polyethylenglykol
PES	Phenazinethosulfat
PGE	Prostaglandin
PGs	Prostaglandine
PJ	Propidium Jodid
PS	Phosphatidylserin
PLGA	Poly-(milchsäure-glykolsäure)
PTH	Parathormon
RANKL	Receptor Activator of NF B Ligand
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
TCP	Trikalziumphosphat
TGF-	Transforming Growth Faktor-beta
TRAIL	Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand
TFE	Trifluorethanol
TNF	Tumornekrosefaktor
TRADD	Tumor necrosis factor receptor typ-1-associated Death Domain protein
-MEM	-Minimum essential Medium

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Ai-Aql ZS, Alagl AS, Graves DT, Gerstenfeld LC, Einhorn TA 2008 Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis. *J Dent Res* **87**(2):107-18.
- Aumüller G, Aust G, Doll A, Engele J, Schmidt W 2001 Anatomie. In: Bob A, Bob K (eds.) MLP Duale Reihe. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Baroli B 2009 From natural bone grafts to tissue engineering therapeutics: Brainstorming on pharmaceutical formulative requirements and challenges. *J Pharm Sci* **98**(4):1317-75.
- Chaabane W, User SD, El-Gazzah M, Jaksik R, Sajjadi E, Rzeszowska-Wolny J, Los MJ 2013 Autophagy, apoptosis, mitoptosis and necrosis: interdependence between those pathways and effects on cancer. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **61**(1):43-58.
- Chatterjea A, Van Der Stok J, Danoux CB, Yuan H, Habibovic P, Van Blitterswijk CA, Weinans H, De Boer J 2013 Inflammatory response and bone healing capacity of two porous calcium phosphate ceramics in critical size cortical bone defects. *J Biomed Mater Res A*.
- Drenckhahn D, Benninghoff 2008 Allgemeine Gewebelehre. In: Drenckhahn D (ed.) ANATOMIE, Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie, Band 1, vol. 17. ELSEVIER München, Urban&Fischer Verlag, München, pp 94-205.
- Golstein P, Kroemer G 2007 Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci* **32**(1):37-43.
- Herten M, Rothamel D, Schwarz F, Friesen K, Koegler G, Becker J 2009 Surface- and nonsurface-dependent in vitro effects of bone substitutes on cell viability. *Clin Oral Investig* **13**(2):149-55.
- Homaeigohar S, Shokrgozar MA, Khavandi A, Sadi AY 2008 In vitro biological evaluation of beta-TCP/HDPE--A novel orthopedic composite: a survey using human osteoblast and fibroblast bone cells. *J Biomed Mater Res A* **84**(2):491-9.
- Huerta S, Goulet EJ, Huerta-Yepez S, Livingston EH 2007 Screening and detection of apoptosis. *J Surg Res* **139**(1):143-56.
- Itzstein C, Coxon FP, Rogers MJ 2011 The regulation of osteoclast function and bone resorption by small GTPases. *Small GTPases* **2**(3):117-130.

- Jang CH, Cho YB, Yeo MG, Kim GH 2013 Mastoid obliteration using three-dimensional composite scaffolds consisting of polycaprolactone/beta-tricalcium phosphate/collagen nanofibers: an in vitro and in vivo study. *Macromol Biosci* **13**(5):660-8.
- Kanduc D, Mittelman A, Serpico R, Sinigaglia E, Sinha AA, Natale C, Santacroce R, Di Corcia MG, Lucchese A, Dini L, Pani P, Santacroce S, Simone S, Bucci R, Farber E 2002 Cell death: apoptosis versus necrosis (review). *Int J Oncol* **21**(1):165-70.
- Manolagas SC 2000 Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* **21**(2):115-37.
- Marsell R, Einhorn TA 2011 The biology of fracture healing. *Injury* **42**(6):551-5.
- Nandi SK, Roy S, Mukherjee P, Kundu B, De DK, Basu D 2010 Orthopaedic applications of bone graft & graft substitutes: a review. *Indian J Med Res* **132**:15-30.
- Nettles DL, Chilkoti A, Setton LA 2010 Applications of elastin-like polypeptides in tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev* **62**(15):1479-85.
- Niedhart C, Niethard F 1998 Klinische Anforderungen an Knochenersatzstoffe. In: Puhl W (ed.) *Bioceramics in Orthopaedics-New Application*. Ferdinand Enke, Stuttgart, pp 46-50.
- Parikh SN 2002 Bone graft substitutes: past, present, future. *J Postgrad Med* **48**(2):142-8.
- Ratner BD, Bryant SJ 2004 Biomaterials: where we have been and where we are going. *Annu Rev Biomed Eng* **6**:41-75.
- Tanaka S, Miyazaki T, Fukuda A, Akiyama T, Kadono Y, Wakeyama H, Kono S, Hoshikawa S, Nakamura M, Ohshima Y, Hikita A, Nakamura I, Nakamura K 2006 Molecular mechanism of the life and death of the osteoclast. *Ann N Y Acad Sci* **1068**:180-6.
- Tanimoto Y, Nishiyama N 2008 Preparation and physical properties of tricalcium phosphate laminates for bone-tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* **85**(2):427-33.

9 ABILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Osteoblasten auf einem Deckglas unter dem Fluoreszenzmikroskop. Die Zellkerne in blau, das Aktgerüst in rot und grün zeigt Zellen im frühem Stadium der Apoptose.....	8
Abbildung 2: Osteoklast auf einem Deckglas. Die Zellkerne in Blau, man sieht sehr gut das es mehr als drei Zellkerne sind, die Aktinstruktur in Rot.....	10
Abbildung 3: Röntgenbilder des linken Fußes.....	13
Abbildung 4: : Osteoblasten auf einem Deckglas. Die grün gefärbten Zellen zeigen Apoptose in einem frühen Stadium. Blau sind wieder die Zellkerne und rot das Aktgerüst von gesunden Zellen.....	32
Abbildung 5: Osteoklasten auf Glas unter einem Konfokalenmikroskop mit einer Vergrößerung von 25x nach 48 Stunden.....	49
Abbildung 6: Apoptoseverhalten von Osteoklasten auf Glas nach 24 und 48 Stunden. ..	52
Abbildung 7: Osteoklasten auf -TCP-Presslingen nach 48 Stunden unter einem Konfokalenmikroskop mit Vergrößerung 25x.....	53
Abbildung 8: Apoptoseverhalten von Osteoklasten auf -TCP-Presslingen nach 24 und 48 Stunden.....	55
Abbildung 9: Apoptoseverhalten von Osteoklasten auf ELP beschichteten Deckgläsern nach 24 und 48 Stunden.....	57
Abbildung 10: Darstellung der Variabilität der Apoptose und Nekrose von Osteoklasten auf ELP.....	58
Abbildung 11: Apoptose von Osteoblasten auf Glas.....	62
Abbildung 12: Apoptose und Nekrose von Osteoblasten auf ELP-beschichteten Deckgläsern.....	64
Abbildung 13: Darstellung der Variabilität von Apoptose und Nekrose von Osteoblasten auf ELP.....	65
Abbildung 14: Apoptose und Nekrose von Osteoblasten auf -TCP-Presslingen.....	67
Abbildung 15: Osteoblasten auf Glas nach 24/48/72 Stunden unter einem Fluoreszenzmikroskop (Vergrößerung 25x).....	68
Abbildung 16: Osteoblasten auf ELP nach 24/48/72 Stunden.....	70
Abbildung 17: Osteoblasten auf -TCP-Presslingen nach 24/48/72 Stunden.....	72

10 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Anzahl der Osteoklasten in Apoptose und Nekrose auf Glas.....	51
Tabelle 2: Anzahl der Osteoklasten in Apoptose und Nekrose auf -TCP-Presslingen...	54
Tabelle 3: Anzahl der Osteoklasten in Apoptose und Nekrose auf mit ELP beschichteten Deckgläsern.....	56
Tabelle 4: Osteoblasten in Apoptose und Nekrose auf Glas.....	61
Tabelle 5: Osteoblasten in Apoptose und Nekrose auf ELP beschichteten Deckgläsern.....	63
Tabelle 6: Osteoblasten in Apoptose und Nekrose auf -TCP-Presslingen.....	66

11 LEBENSLAUF

Birgit Ursula Krancan

geboren am 7. Mai 1985, Wien

Ausbildung

Seit Oktober 2003	Studium der Pharmazie, Universität Wien
1995-2003	Gymnasium und Realgymnasium, Albertgasse 18-22, 1080 Wien
1991-1995	Volkschule, Stiftgasse 37, 1070 Wien

Arbeitserfahrung

01.08.2013-31.08.2013	Maria Troster Apotheke zum Hl. Ulrich, Burggasse 22,1070 Wien
01.08.2012-31.08.2012	Maria Troster Apotheke zum Hl. Ulrich, Burggasse 22,1070 Wien
Seit 01.09.2010	Mitarbeit in der Ordination Dr Peter Krancan Leithastr. 25, 1200 Wien
01.08.201-31.08.2010	Maria Troster Apotheke zum Hl. Ulrich, Burggasse 22,1070 Wien
01.08.2009-31.08.2009	Maria Troster Apotheke zum Hl. Ulrich, Burggasse 22,1070 Wien
01.07.2008-31.08.2008	Praktikum bei Firma Baxter Department: Immunology Industriestr.72, 1220 Wien
01.07.2006-30.09.2007	Leonhardus Apotheke Höchstädtplatz 1,1200 Wien
03.07.2004-29.07.2004	Maria Troster Apotheke zum Hl. Ulrich, Burggasse 22,1070 Wien

Fähigkeiten

Sprachen	Deutsch (Muttersprache), Englisch
Führerschein	PKW
EDV	Maschinenschreiben, MS Office (Word, Excel, Power Point)

Interessen

Lesen, Musik und Kultur, Reisen, Sport, Kreatives Arbeiten, Familie und Freunde