Universität Ulm
Klinik für Orthopädie
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Heiko Reichel

Untersuchungen zur Besiedelung eines neuen Knochenersatzmaterials mit humanen multipotenten mesenchymalen Stromazellen

Dissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

Maria Koch
geb. in Kempten (Allgäu)
2008

Amtierender Dekan: Prof. Dr. med. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Brenner

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Ignatius

Tag der Promotion: 16.07.2009

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis ____ *III*

1. Einleitung ____ *1*

1.1 Biomaterialien für Knochenersatz und Tissue Engineering ____ **1**

1.2 Multipotente mesenchymale Stromazellen ____ **10**

1.3 Fragestellung und Zielsetzung ____ **13**

2. Material und Methoden ____ *14*

2.1 Material ____ **14**

2.1.1 Patientenkollektiv ____ 14

2.1.2 Chemikalien und Kits ____ 14

2.1.3 Geräte und Materialien ____ 16

2.1.4 Wachstumsfaktoren ____ 18

2.1.5 Zellkulturmedium und Zusätze ____ 18

2.1.6 Fixier-, Färbe- und Pufferlösungen ____ 19

2.1.7 Primer ____ 21

2.1.8 Knochenersatzmaterialien ____ 22

2.2 Methoden ____ **24**

2.2.1 Zellkultivierung von humanen multipotenten mesenchymalen Stromazellen und humanen Osteoblasten ____ 24

2.2.2 RNA-Isolation ____ 27

2.2.3 Reverse Transkription ____ 28

2.2.4 Polymerase-Ketten-Reaktion ____ 29

2.2.5 Agarose-Gelelektrophorese ____ 29

2.2.6 Relative Quantifizierung- Quantitative „Realtime“-PCR ____ 30

2.2.7 Rasterelektronenmikroskopie ____ 31

2.2.8 Zellkernfärbung mit Toluidinblau O 0,1% für Lichtmikroskopie ____ 32

2.2.9 Alkalische-Phosphatase-Aktivitäts- und DNA-Mengenmessung ____ 33

2.2.10 Zellbesiedelung der Biomaterialen ____ 35

2.2.11 Toxizitätstest ____ 37

2.2.12 Statistische Auswertung ____ 38

3. Ergebnisse _____ *39*

3.1 Zellbesiedelung verschiedener Knochenersatzmaterialien mit humanen multipotenten mesenchymalen Stromazellen und humanen Osteoblasten _ 39

3.1.1 Gen- und Proteinexpression von osteogenen, Proliferations- und Apoptosemarkern _____ 40

3.1.2 Untersuchungen zur Induktion von Proliferation _____ 57

3.1.3 Untersuchungen zur Induktion von Apoptose _____ 64

3.2 Analyse der Besiedelbarkeit und Zellmigration auf dem neu entwickelten ITV-Knochenersatzmaterial _____ 66

3.3 Ansätze zur Optimierung der Besiedelung und Migration auf dem neuartigen ITV-Knochenersatzmaterial _____ 71

3.4 Untersuchungen zur Biokompatibilität des neu entwickelten ITV-Knochenersatzmaterials _____ 74

3.4.1 Induktion von Apoptose _____ 74

3.4.2 Einfluss auf Proliferation und Vitalität der kultivierten Zellen _____ 76

4. Diskussion _____ *77*

4.1 Vergleich der neuartigen ITV-Knochenersatzmaterialien mit bereits etablierten Knochenersatzmaterialien _____ 77

4.2 Differenzierbarkeit auf verschiedenen Knochenersatzmaterialien _____ 83

4.3 Biokompatibilität und Apoptose-Induktion _____ 88

5. Zusammenfassung _____ *92*

6. Literaturverzeichnis _____ *94*

Danksagung _____ *102*

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AP	Alkalische Phosphatase
Aqua demin.	demineralisiertes Wasser
Bax	Bcl-2-associated X-protein
BMP	bone morphogenic protein
bp	Basenpaar(e)
°C	Grad Celsius
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
cm^2	Quadratzentimeter
CO_2	Kohlendioxid
CT	threshold cycle
dd	delta delta
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
dMSZ	Differenzierte mesenchymale Stromazellen
dNTP	
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidium-Bromid
Fa.	Firma
FKS	fetales Kälberserum
g	Gramm
g_n	Normalfallbeschleunigung
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
h	Stunde(n)
H4	Histon 4
IE	Internationale Einheit(en)
ITV	Institut für Textil- und Verfahrenstechnik
IU	International Unit(s)

kGy	Kilo-Grey
l	Liter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	mikromolar
M	molar
mA	Milliampere
mg	Milligramm
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar
mMol	Millimol
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MSZ	Multipotente Mesenchymale Stromazellen
MW	Mittelwert
N	normal
NaCl	Natrium-Chlorid
Na_2EDTA	Natrium-Ethylendiamintetraessigsäure
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	nanomolar
OB	Osteoblasten
OC	Osteocalzin
Ost. DM	Osteogenes Differenzierungsmedium
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF (-AA, -BB, -AB)	platelet derived growth factor (-AA, -BB, -AB)
PDLLA	Poly-D,L-Laktid
PGA	Polyglycolid
pMol	Picomol
pNPP	p-Nitrophenylphosphat
PLGA	Polylaktid-co-glycolid

PLLA	Poly-L-Laktid
PLA	Polylaktid
REM	Rasterelektronenmikroskopie
rhPDGF-BB	rekombinant humaner platelet derived growth factor BB
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rotationen pro Minute
RQ	Relative Quantität
RT-PCR	Realtime- Polymerase-Kettenreaktion
Runx-2	runt-related transcription factor 2
SD	Standardabweichung
SDB	Knochen
SDS	Natrium Dodecylsulfat
STRO-1	
Tab.	Tabelle
TGF-β	Transformed growth factor β
TCP	Trikalziumphosphat
VEGF-A	Vascular endothelial growth factor A
$ZnCl_2$	Zinkchlorid

1. Einleitung

1.1 Biomaterialien für Knochenersatz und Tissue Engineering

In der Unfallchirurgie und Orthopädie werden Knochenersatzmaterialien benötigt, um Knochendefekte aufzufüllen, die aufgrund ihrer Größe ansonsten nicht heilen können. Obwohl die Selbstheilung von Knochenverletzungen unter konservativer und chirurgischer Therapie in der Mehrzahl der Fälle ausreichend ist, besteht in Europa bei ungefähr einer halben Million Operationen pro Jahr die Notwendigkeit des Knochenersatzes (Wirth u. Windhagen 2004). Die Bedeutung natürlicher und synthetischer Biomaterialien für Knochenersatz in der regenerativen Medizin beschränkt sich noch auf unter 10% der operativen Eingriffe, die ein Knochentransplantat erfordern, während über 90% dieser Operationen auf autologes oder allogenes Knochengewebe zurückgreifen (Boyce et al. 1999). Eine Befragung westdeutscher Knochenbanken ergab 1990, dass jährlich 71000 autologe und 25000 allogene Knochentransplantationen durchgeführt wurden, wobei Bedarf für weiteres Spendermaterial in 18000 Fällen vorhanden war (Jerosch et al. 1990). Das Gewebe bzw. die Materialien werden eingesetzt, um verloren gegangene knöcherne Strukturen zu ersetzen und um bestehende skeletale Einheiten sowie die Entstehung neuen Knochengewebes zu unterstützen (Burg et al. 2000). Es handelt sich beispielsweise um traumatische oder pathologische Frakturen, deren Bruchenden nicht zusammenwachsen, um durch Tumor, Infektion oder Osteoporose verloren gegangenes Knochengewebe, um genetisch bedingte skeletale Anomalien oder um Spondylodesen, bei denen operativ ein Wirbelsegment eingesteift wird (Heng et al. 2004, van Gallen et al. 2004).

Den Eigenschaften der dafür eingesetzten Materialien kommt dabei eine entscheidende Bedeutung zu, da sie Zell-Zell-Interaktionen, sowie die Bildung von Knochenextrazellulärmatrix und die strukturelle Unterstützung des beschädigten Gewebes ermöglichen müssen (Karageorgiou u. Kaplan 2005).

Synthetisches oder natürliches Knochenersatzmaterial muss gewisse Anforderungen erfüllen, um physiologisches Knochengewebe möglichst adäquat zu ersetzen und körpereigenes Knochenwachstum zu stimulieren (siehe Tab.1).

Tab.1: *Allgemeine Anforderungen an Knochenersatzmaterialien und Bewertung einzelner Knochenersatzmaterialien bezüglich dieser Kriterien.*

Anforderungen an Knochenersatzmaterial	α-/β-TCP	HA	PLLA	Kollagen
Osteokonduktivität	**+**	**+**	**-**	**+**
Osteoinduktion	**+**	**+**	**-**	**+**
Biokompatibilität	**+**	**+**	**+/-**	**+**
Biodegradation	langsam	langsam	schnell	schnell
Poreninterkonnektivität	**-**	**+**	**+**	**-**
Porosität	**+**	**+**	**+**	**-**
Mechanische Stabilität und Belastbarkeit	**+/-**	**-**	**-**	**-**
Sterilisierbarkeit	**+**	**+**	**+**	**-**

(TCP= Trikalziumphosphat; HA= Hydroxyapatit; PLLA= Poly-L-Laktid; + = erfüllt; - = nicht erfüllt; +/- = noch unklar)

Verschiedene zelluläre und azelluläre Ereignisse finden bei der Besiedelung eines dreidimensionalen Konstrukts (= „Scaffold“) und beim Kontakt von Zellen und Material statt. Die dabei obligat ablaufenden biologischen Reaktionen wie Proteinadsorptions-, Zellanhaftungs- und Adhäsionsphase hängen von den chemisch-physikalischen Eigenschaften und der Topographie des Materials ab und beruhen auf Substrat-Protein-Interaktionen zwischen Materialoberfläche und Zellen (Meyer et al. 2005). Entscheidend dabei ist die Integrin-vermittelte Zelladhäsion über intrazelluläres Zytoskelett und extrazelluläre Matrixproteine bzw. Mikrostruktur des Biomaterials (Kay et al. 2002, Zinger et al. 2004) (siehe Abb.1).

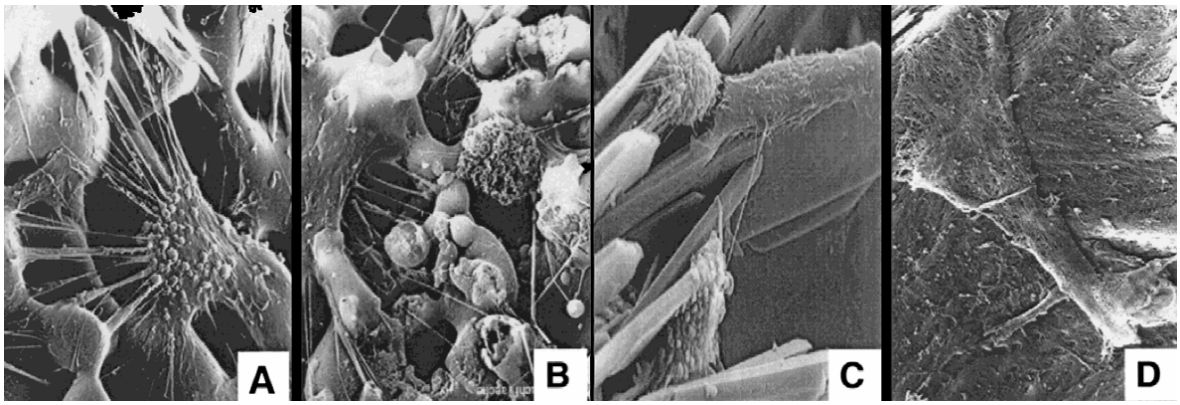


Abb.1: *Besiedelte „Scaffolds“ nach Frakturbehandlung. Zellen wurden über fünf Tage kultiviert. Typische Zellmorphologie und Kolonisation der Oberfläche. Die Poren der verschiedenen Konstrukte sind sichtbar. (**A**: Trikalziumphosphat, **B**: Bioglass, **C**: GB9N (Glaskeramik) und **D**: SDB (Knochen). (2000-fache Vergrößerung in REM) (Mayer-Wohlfahrt, The Journal of Bone and Mineral Research, 2001).*

Zellen mit niedriger Motilität bilden, verglichen mit motileren Zellen, starke fokale Kontakte aus. Maximale Migration wird bei durchschnittlich ausgeprägter Zellanhaftung erreicht, was wiederum mit einer niedrigeren osteogenen Differenzierungsrate korreliert (Meyer et al. 2005). Die Osteokonduktivität des Materials hängt folglich vom komplexen Zusammenspiel dieser Faktoren ab.

Um Proliferation und eine osteogene Differenzierung der Zellen zu evozieren, müssen osteoinduktive Stimuli vorhanden sein, z.B. in Form von Wachstums- oder Differenzierungsfaktoren oder durch die chemisch-physikalischen Materialeigenschaften (Fleming et al. 2000).

Biokompatibilität ist eine unverzichtbare Eigenschaft, um die Provokation von Entzündungsreaktionen, Immunogenität oder Zytotoxizität zu verhindern (Rezwan et al. 2006). Das Material sollte körpereigenen hydrolytischen oder enzymatischen Abbauprozessen unter Entstehung nicht-toxischer Produkte unterliegen. Die Freisetzung potentiell toxischer Binde- oder Lösungsmittel sowie anderer Chemikalien sollte ausgeschlossen werden können. (Sharma u. Elisseeff 2004).

Die Faktoren und der zeitliche Rahmen der Biodegradation sollten genau bekannt sein, um die Evaluation der Persistenz bioaktiver Substanzen und der veränderten mechanischen und chemisch-physikalischen Eigenschaften durch den Abbauprozess zu gewährleisten (Phillips et al. 2006). Eine indirekte Korrelation zwischen Ossifikationsprozessen und Materialresorption, wie sie eine Studie von Mastrogiacomo et al. für besiedelte, Silikon-stabilisierte Trikalziumphosphat-Biokeramiken nachweisen konnten, wäre wünschenswert. Sie zeigten, dass die Synthese und Sekretion von Knochenextrazellulärmatrix durch MSZ gegenüber der Implantatdegradation durch Osteoklasten in einem Verhältnis stand, das dem physiologischen Remodeling vergleichbar war (Mastrogiacomo et al. 2006a, Mastrogiacomo et al. 2007).

Der dreidimensionale „Scaffold“ sollte über komplette Interkonnektion und ausreichend Porosität verfügen, um von Gewebe durchbaut werden zu können und die Ernährung der Zellen an jeder Stelle des Konstruktes über Kulturmedium oder Vaskularisierung zu gewährleisten (Mastrogiacomo et al. 2006b, Mauney et al. 2004). Eine höhere Porosität führt zu vermehrtem Einwachsen von Knochengewebe und zur besseren Integration des Implantats, während bei niedrigerer Porosität osteogene Prozesse durch vermehrte Zellaggregation und verminderte Zellproliferation induziert werden. Die Porengröße sollte mindestens 100 µm, idealerweise aber über 300 µm betragen, um Ossifikation zu fördern und Vaskularisierung zu unterstützen. Eine obere Grenze sollte nicht überschritten werden,

um mechanische Stabilität und Integrität zu erhalten (Karageorgiou u. Kaplan 2005). Allerdings bleibt festzuhalten, dass selbst solide Biomaterialkonstrukte die mechanischen Eigenschaften von Compacta nur annähernd erreichen, wohingegen poröse Materialien physiologischem Knochen diesbezüglich deutlich unterlegen sind. Das Material sollte zudem problemlos sterilisierbar sein und in seiner Form den benötigten Abmessungen angepasst werden können (Rezwan et al. 2006).

Bei Knochenersatzmaterialien unterscheidet man prinzipiell natürliche von synthetischen und organische von anorganischen Materialien (Meyer et al. 2005) (siehe Abb.2, S.5).
Autologe und allogene Knochensubstanzen werden zu den natürlichen Knochenersatzstoffen gezählt. Autologer Knochen - meist aus dem Hüftkamm entnommen - führt nach wie vor zu den besten Erfolgen bei der Überbrückung knöcherner Defekte. Er ist aber in seiner Verfügbarkeit beschränkt und erfordert stets eine zweite operative Eingriffsstelle (Kim et al. 2006). Die Entnahme von autologer Spongiosa inklusive Knochenmark birgt demzufolge Risiken wie Beschädigung von Hautnerven oder Gefäßen, Infektion, chronische Schmerzen oder eine iliakale Fraktur. Bei circa 10% dieser Eingriffe treten Komplikationen an der Entnahmestelle auf (Fleming et al. 2000).
Die Verwendung allogenen Knochenmaterials aus Knochenbanken ist mit der Gefahr einer Infektion verbunden (Burg et al. 2000) sowie einer immunologisch bedingten Abstoßungsreaktion (Kim et al. 2006), da es sich um Knochengewebe eines anderen Individuums handelt. Zudem sind die Erfolge verglichen mit autologem Material schlechter und die Kosten höher (Saito u. Takaoka 2003).
Folglich setzt sich die medizinische Forschung intensiv mit der Suche nach alternativen Materialien auseinander, die entweder als Zusatz zu autologem Knochengewebe, dessen benötigte Menge reduzieren oder alleine zur Überbrückung des Defektes implantiert werden können (Eppley et al. 2005).
Der Großteil der anorganischen Komponenten von Knochengewebe besteht aus Hydroxyapatit (Hellmich u. Ulm 2003) neben quantitativ weniger entscheidenden Mengen an Carbonat und anorganischen Salzen. Typ-I-Kollagen macht den überwiegenden organischen Anteil aus, wobei zusätzlich nicht-kollagene Proteine wie Osteopontin, Osteocalcin und Bone Sialoprotein und Proteoglykane eine Rolle spielen (Heng et al. 2004, Young et al. 1992). Bestrebungen Materialien zu entwickeln, die Knochengewebe vorübergehend ersetzen können und die Regeneration des verloren gegangen Gewebes fördern, orientieren sich an den physiologischen Knochenbestandteilen.

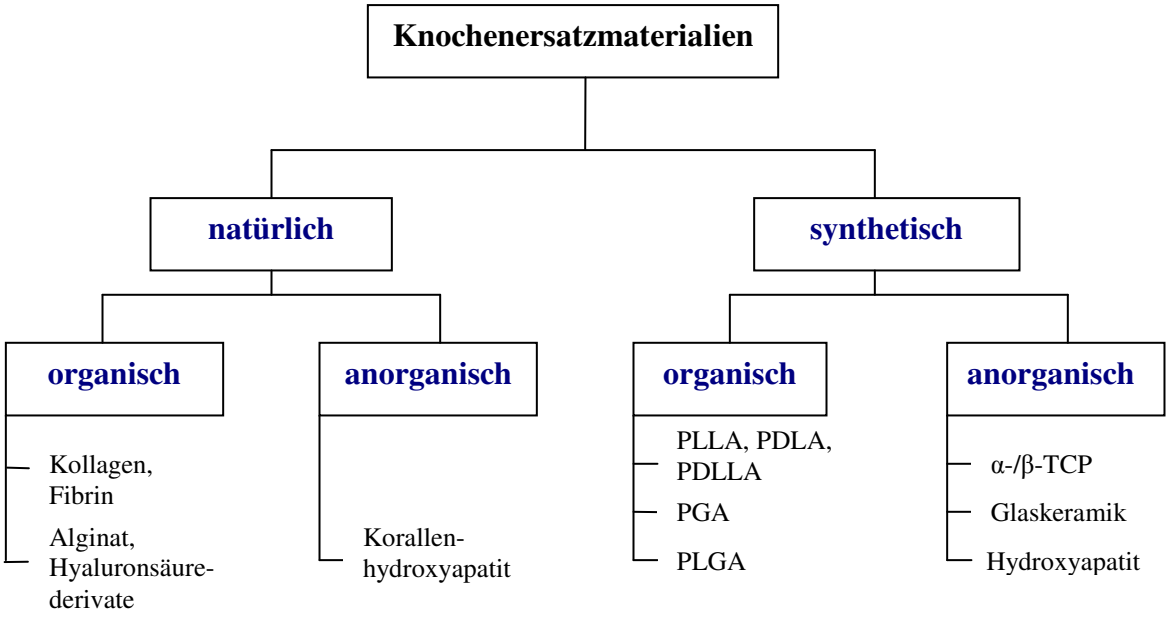


Abb.2: Klassifikation der verschiedenen Knochenersatzmaterialien. *Sie werden eingeteilt in natürliche und synthetische, sowie organische und anorganische Materialien. Als Beispiele wurden jeweils exemplarisch verschiedene Vertreter angegeben. PLLA=Poly-L-Laktid, PDLA=Poly-D-Laktid, PDLLA=Poly-D,L-Laktid, PGA=Polyglycolid, PLGA=Polylaktid-co-glycolid. (Schema erstellt nach Meyer et al. 2005)*

Natürliche Polymere wie die Polysaccharide Alginat oder Hyaluronsäure-Derivate oder die Proteinstrukturen Kollagen oder Fibrin verfügen über gute Biokompatibilität und Bioaktivität (Sharma u. Elisseeff 2004). So konnten Phillips J.E. et al. nachweisen, dass gentechnisch veränderte, Runx-2 exprimierende Fibroblasten auf Kollagenscheiben eine 10-fach höhere Mineralisierungsaktivität zeigen als auf synthetischen Polycaprolacton (PCL)- oder Polylactid-co-glycolid (PLGA)-Konstrukten (Phillips et al. 2006). Wird eine zellbindende Domäne des Typ-I-Kollagens, das P15-Peptid zur Funktionalisierung an die Oberflächenmoleküle einer anorganischen Knochenmineralmatrix gebunden, lässt sich damit sowohl die Zelladhäsion und die Expression der osteogenen Marker, Alkalische Phosphatase und Bone morphogenic proteins, als auch die Mineralisierungsvorgänge erhöhen (Nguyen et al. 2003). Allerdings genügt Kollagen als alleiniger Bestandteil von Knochenersatzmaterialien nicht den Anforderungen, da es einer zu schnellen biologischen Degradation unterliegt (Fleming et al. 2000, Meinel et al. 2004).

Synthetische Knochenersatzmaterialien umfassen biodegradierbare Polymermatrices und bioaktive Keramikphasen wie Glaskeramik oder verschiedene Kalziumphosphate.
Zu den biodegradierbaren Polymermatrices gehören unter anderen die gesättigten aliphatischen Polyester Polylaktid (PLA), Polyglycolid (PGA) und ihr Copolymer Polylactid-co-glycolid (PLGA). PLA existiert in drei Formen: L-PLA (PLLA), D-PLA

(PDLA) und ihr Racemat D, L-PLA (PDLLA). PLLA-Polymere bilden sich unter Abspaltung von Wasser in Veresterungsreaktionen (siehe Abb.3). Die Umkehrreaktion, die hydrolytische Esterspaltung lässt wieder saure PLLA-Monomere entstehen, die dann in körpereigenen biologischen Abbauprozessen wie dem Zitratzyklus zersetzt werden (Rezwan et al. 2006).

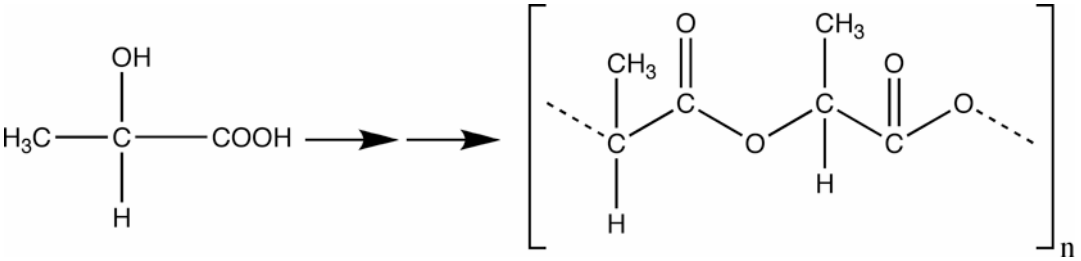


Abb.3: *PLLA-Monomere bilden im Rahmen von Polymerisationsreaktionen unter Abspaltung von H_2O PLLA-Homopolymere. PLLA=Poly-L-Laktid. (Hollinger u. Battistone 1986).*

Die Synthese von PLA, PGA oder PLGA bietet die Möglichkeit, Materialeigenschaften wie Porosität, Porengröße und Interkonnektion kontrollieren und gezielt beeinflussen zu können (Lickorish et al. 2007). Sie bieten zahlreiche Varianten, was die Konstruktion ihrer dreidimensionalen Form betrifft. Sie können als poröse Schäume, Fasernetze oder in Pulverform hergestellt werden. Außerdem sind sie potentiell einsetzbar als Freisetzungssysteme von Wachstumsfaktoren, Hormonen oder Arzneimitteln, da sie unter Konditionen prozessiert werden können, die keine Denaturierung von Proteinen zur Folge haben (Fleming et al. 2000).

PLLA-„Scaffolds“ verhalten sich allerdings weder in ausreichendem Maße osteokonduktiv noch osteoinduktiv. Die hydrophoben Oberflächeneigenschaften und die mögliche Anhäufung saurer Abbauprodukte dieser synthetischen Polymere schaffen ein suboptimales Mikroenvironment für Zellwachstum und –differenzierung (Phillips et al. 2006). Ein weiterer Nachteil der PLLA-Gerüste ist ihre fehlende mechanische Belastbarkeit (Rose u. Oreffo 2002). PLGA-Konstrukte lösten im Tierversuch nach Implantation eine akute Entzündungsreaktion mit fibrösem Exsudat und eine darauf folgende Bildung einer fibrovaskulären Kapsel mit chronischen Entzündungszellen im Sinne einer Fremdkörperreaktion um das Implantat aus. PLA als Basis für Osteosynthesematerialien wie Platten oder Schrauben lieferten keine überzeugenden Ergebnisse, da es zur Lockerung der Schrauben und Verformung der Platten durch Degradationsvorgänge kam, bevor die Frakturen stabil durchbaut waren (Hollinger u. Battistone 1986).

Die zweite große Gruppe synthetischer biodegradierbarer Biomaterialien bilden anorganische bioaktive Keramikmaterialien wie Trikalziumphosphate (TCP) oder Hydroxyapatit. Hydroxyapatit macht 60% des Gewichts von Knochen aus, so dass es, gemeinsam mit den Trikalziumphosphaten α- und β-TCP, die Hauptrolle bei der Forschung nach Knochenersatzmaterialien spielt (Rezwan et al. 2006). Diese Materialien haben die Eigenschaft gemein mit dem umgebenden Knochengewebe des Empfängers in Interaktion zu treten, an es zu binden und über eine hohe Biokompatibilität und Osteokonduktivität zu verfügen (Sharma u. Elisseeff 2004). Materialien, die auf Kalziumphosphaten basieren oder damit beschichtet sind, werden - verglichen mit Metallen oder unbeschichteten PLG-Konstrukten - besser an der Implantationsstelle integriert (Murphy et al. 2005). Die TCP-Resorptionszone ist durch eine hohe Kalzium- und Phosphatkonzentration gekennzeichnet, sowie die Anwesenheit von Osteoklasten. Diese Faktoren gelten als entscheidend für die Stimulation von Mineralisationsvorgängen und osteogener Differenzierung umgebender Zellen (Fleming et al. 2000). 30mm lange knöcherne Defekte der Mandibula von Kaninchen, die mit besiedelten β-TCP-Konstrukten überbrückt wurden, waren 32 Wochen nach Implantation komplett mit körpereigenem Knochengewebe durchbaut (Yuan et al. 2007). Allerdings wurde beschrieben, dass TCP über eine inkomplette Interkonnektivität verfügt, so dass vor der Resorption des Konstruktes keine Migration von osteogenen Zellen bis ins Innere des Gerüsts möglich ist (Fleming et al. 2000). Eine weitere mögliche Erklärung für die mangelnde Migration von Zellen in TCP-„Scaffolds“, ist das Vorliegen von Luftbläschen im Inneren der Prüfkörper, die die gleichmäßige Zell- und Mediumverteilung beeinträchtigen könnten (Wang et al. 2006).

Aktuelle Forschungsarbeiten im Bereich von Biomaterialien für Knochenersatz und Knochen „Tissue Engineering“ fokussieren die Herstellung und Erprobung von Kompositen, die aus der Kombination von zwei oder mehr Biomaterialien bestehen, da momentan kein bekanntes und erprobtes Material alleine die Anforderungen für zufrieden stellende Ergebnisse im Bereich des Knochenersatzes liefert (Lickorish et al. 2007, Lu et al. 2003).

Dabei können Vorteile synthetischer Polymere wie leichte Handhabung in der Herstellung und gute Biodegradierbarkeit mit denen anorganischer synthetischer Materialien wie bessere Bioaktivität und mechanische Belastbarkeit kombiniert werden (Rezwan et al. 2006). Die Erhöhung der Porosität von Kalziumphosphatmaterialien durch die Kombination mit organischen Polymeren kommt dadurch zustande, dass die Polymere schneller biologisch degradieren, während das makroporöse Kalziumphosphatgerüst

zurückbleibt. Dabei verfügt es jedoch über eine reduzierte mechanische Belastbarkeit (Link et al. 2006). Die Zugabe bioaktiver Keramiken zu synthetischen, bioresorbierbaren Polymeren hat einen Puffereffekt auf die freiwerdenden sauren Abbauprodukte des Polymeranteils und erhöht die Wasseradsorption des Konstrukts (Maquet et al. 2004). Folglich hofft man dadurch die Biokompatibilität der Polymere zu erhöhen und eine bessere Integration des Knochenersatzstoffes in das Empfängergewebe zu erreichen.

Natürliche und synthetische biodegradierbare Knochenersatzmaterialien finden als unbesiedelte Biomaterialien und als „Scaffolds“ für Zellen und Wachstumsfaktoren im Bereich des „Tissue Engineering“ Verwendung (Meyer et al. 2005). „Tissue Engineering“ soll einen funktionellen und biologisch aktiven Knochenersatz herstellen, der die Nachteile des Einsatz von autologen oder allogenen Materialien oder unbesiedelter Biomaterialien ausgleicht (Hee et al. 2006). Das „Tissue Engineering“ bezeichnet einen Forschungsbereich an der Schnittstelle zwischen Bio- und Materialwissenschaften (De Boer et al. 2006). Sein Ziel ist es, Gewebe und Organe mittels biotechnologischer Methoden nachzubilden oder zumindest in ihrer Funktion nachzuahmen. Es beinhaltet drei Elemente: einen „Scaffold“, lebende Zellen und die Kontrolle der Signaltransduktion.
Beim „Tissue Engineering“ des Knochens versucht man, ein dreidimensionales Gerüst aus einer biodegradierbaren Substanz zu schaffen, das mit autologen Zellen besiedelt werden kann und dessen Differenzierung, Proliferation und Migration durch die Gegenwart osteogener Wachstumsfaktoren, z.B. PDGF oder BMPs, beeinflusst wird (Kamakura et al. 2004, Li et al. 2005).

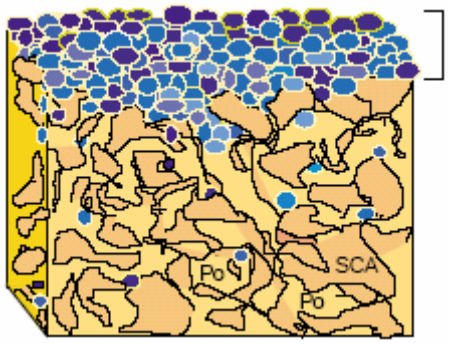


Abb.4: *Systematische Darstellung eines dreidimensionalen Konstruktes (orange), das mit Zellen (blau) besiedelt wurde. Die Zellen bilden mehrschichtige Zellaggregate auf der Oberfläche des „Scaffold“(SCA) und wachsen teilweise in die Poren (Po) ein (Sittinger et al. 2004).*

Neben Wachstumsfaktoren und Zytokinen kontrollieren Gene und mechanische Stimulation die Signaltransduktion und können Proliferation, Differenzierung und Matrixsynthese induzieren (Sharma u. Elisseeff 2004).

Humane multipotente mesenchymale Stromazellen oder humane Osteoblasten werden zunächst aus autologem Gewebe isoliert und kultiviert (Janssen et al. 2006). Durch die Kombination lebender Zellen, biologisch aktiver Moleküle und eines strukturellen „Scaffolds“ sollen Reparatur- und Regenerationsvorgänge des Gewebes unterstützt werden (Zhou et al. 2007). Die Kultivierung kann sowohl im Körper als auch im Labor erfolgen (Sharma u. Elisseeff 2004). Nach Implantation in der betroffenen Körperregion soll der „Scaffold“ von körpereigenem Gewebe durchbaut und schließlich abgebaut werden (Rezwan et al. 2006).

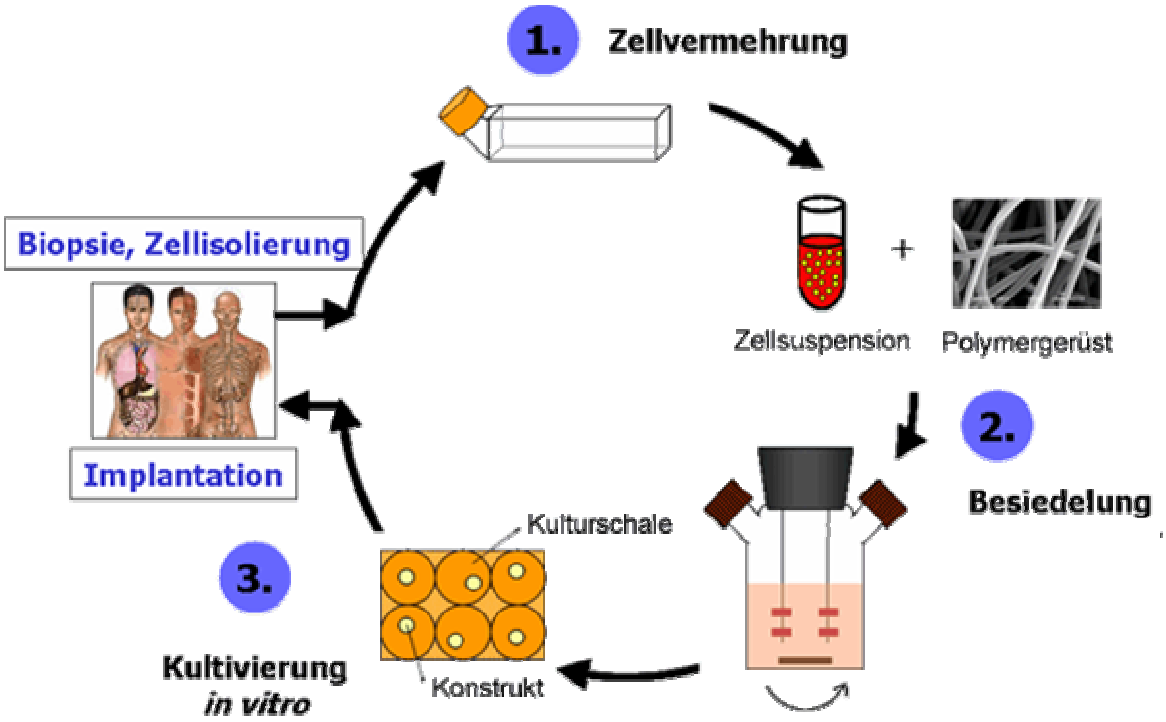


Abb.5: *Prinzipien des „Tissue Engineering“. Die Zellen werden aus körpereigenem Gewebe isoliert und kultiviert (1.). Nach Erreichen der erwünschten Zellzahl, werden die Zellen suspendiert und auf den „Scaffold“ übertragen (2.). Das besiedelte Konstrukt wird kultiviert, bevor es in die Zielregion implantiert wird (3.) (Lehrstuhl Pharmazeutische Technologie Prof. Dr. Achim Göpferich, Universität Regensburg, Fakultät Chemie & Pharmacie).*

Auf diese Art und Weise wird versucht die Eigenschaften autologen Knochengewebes zu imitieren, wobei das Konstrukt Osteokonduktivität, die biologisch aktiven Moleküle Osteoinduktion und die MSZ bzw. Osteoblasten Osteogenese gewährleisten sollen (Vaccaro 2002). Ein weiterer Vorteil beruht darauf, dass die mit autologem Zellmaterial besiedelten „Scaffolds“ nach der Implantation in die Zielregion nicht vom Immunsystem des Empfängers abgestoßen werden.

1.2 Multipotente mesenchymale Stromazellen

Humanes Knochenmark besteht aus drei Hauptzelltypen: Endothelzellen, hämatopoetische Stammzellen und Stromazellen (Tuan et al. 2003). Multipotente mesenchymale Stromazellen (MSZ) sind eine äußerst heterogene Zellpopulation aus adulten Stammzellen und Subpopulationen von mesenchymalen Progenitorzellen mit unterschiedlichem Differenzierungspotential (Heng et al. 2004, Long 2001). Progenitorzellen sind verglichen mit Stammzellen in ihrer Differenzierung bereits weiter fortgeschritten.

Die Gewinnung von multipotenten mesenchymalen Stromazellen kann aus Knochenmarkaspirat (Pittenger et al. 1999) oder aus trabekulärem Knochen erfolgen (Tuli et al. 2003 a, Tuli et al. 2003 b).

Adulten Stammzellen, zu denen multipotente mesenchymale Stromazellen gehören, fehlt die Totipotenz embryonaler Stammzellen, so dass ihre Differenzierung auf gewisse Zelltyplinien begrenzt bleibt. MSZ verfügen über die Fähigkeit zu proliferieren, wobei sie den undifferenzierten Zustand beibehalten oder die Differenzierung in mesenchymales Gewebe wie Fett, Knochen oder Knorpel einschlagen können (Li et al. 2005, Pittenger et al. 1999). Außerdem gibt es Hinweise, dass sich MSZ auch in neuronales (Kopen et al. 1999), kardiomuskuläres (Strauer et al. 2002), hepatisches (Petersen et al. 1999), mesangiales (Ito et al. 2001) und muskuläres (Ferrari et al. 1998) Gewebe entwickeln können (Tuan et al. 2003).

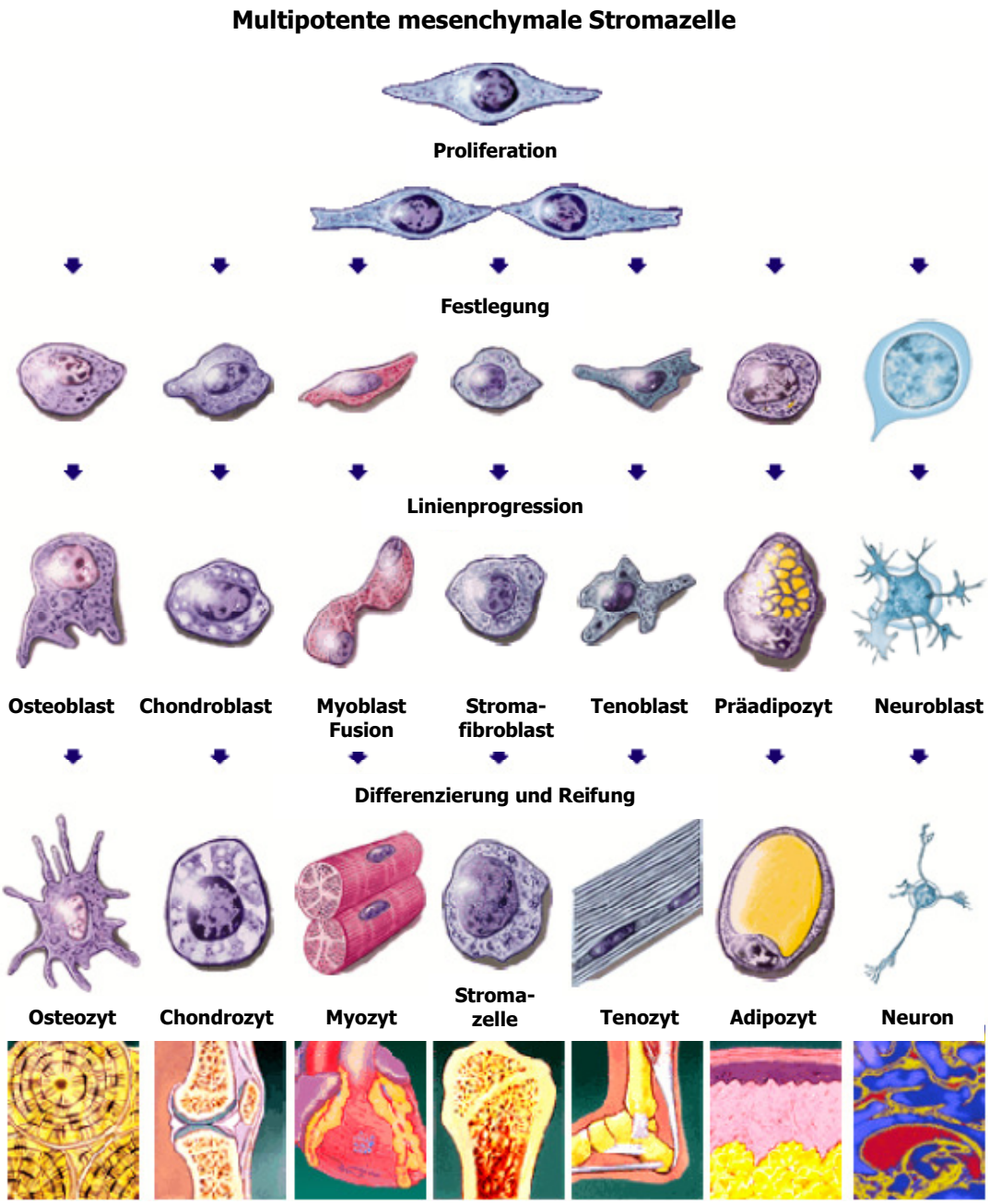


Abb.6: *Differenzierungsmöglichkeiten einer multipotenten mesenchymalen Stromazelle. Abbildung modifiziert nach Osiris Therapeutics.*

Multipotente mesenchymale Stromazellen spielen deshalb eine bedeutende Rolle bei physiologischen und pathologischen Prozessen im Knochengewebe. Dabei bestimmen lokal und systemisch freigesetzte Wachstumsfaktoren wie BMP-2, BMP-4, PDGF, TGF-β und VEGF-A, Hormone und Zytokine ihr Verhalten (Fiedler et al. 2002, Fiedler et al. 2005). PDGF-BB wirkt stärker chemotaktisch auf MSZ als seine Isoformen PDGF-AA und –AB und sorgt für die Rekrutierung von Progenitorzellen in Knochengewebe und ihre osteogene Differenzierung. MSZ exprimieren die gleichen PDGF-Rezeptorketten wie Osteoblasten, so dass PDGF für MSZ einen wichtigen Faktor im Zusammenhang mit Knochenbildung, „Remodeling“ und Frakturheilung darstellt (Fiedler et al. 2004).

Die osteogene Differenzierung einer adulten Stammzelle verläuft über mehrere Zwischenstufen der Zellentwicklung: (1) mesenchymale Stammzelle, (2) Osteoprogenitorzelle, (3) Prä-Osteoblast, (4) Osteoblast, (5) Osteozyt. Diese Phasen können allerdings nicht strikt voneinander getrennt werden sondern gehen fließend ineinander über (Heng et al. 2004; Long 2001). MSZ verfügen über zahlreiche Oberflächenantigene, die in Kombination zu ihrer Identifikation herangezogen werden können: aktiviertes Leukozyten-Zelladhäsionsmolekül (CD166), Hyaluronsäurerezeptor (CD44), interzelluläres Adhäsionsmolekül-1 (CD54), Tetraspan (CD9) und Thy-1 (CD90). Zudem gilt STRO-1 als anerkannter MSZ-Oberflächenmarker. Im Gegensatz dazu werden Antigene, die für die hämatopoetische Zelllinie typisch sind wie CD34 und CD45, nicht exprimiert (Chen et al. 2006, Fickert et al. 2004).

MSZ sind eine autologe Zellquelle mit proliferativen und regenerativen Eigenschaften, die dem „Tissue Engineering“ vor allem im muskuloskeletalen System eine Bandbreite an Möglichkeiten eröffnen (Sharma u. Elisseeff 2004). Die Fähigkeit humaner multipotenter mesenchymaler Stromazellen zur osteogenen Differenzierung unter Zugabe osteogener Stimuli, sowie ihre Eigenschaft, ihr Differenzierungspotential über drei Passagen aufrecht zu erhalten, sind im Bereich des „Tissue Engineering“ des Knochens entscheidend (Meinel et al. 2003).

1.3 Fragestellung und Zielsetzung

Im Rahmen des Kompetenznetzes Biomaterialien Baden-Württemberg soll die Möglichkeit untersucht werden, mittels „Tissue Engineering“ unter Verwendung von adulten multipotenten mesenchymalen Stromazellen einen Ersatz von Knochen, Sehnen und Bändern zu entwickeln.
In dem Teilprojekt „Knochenersatz“ wurden vom Institut für Textil- und Verfahrenstechnik in Denkendorf ein neu entwickeltes Biomaterial aus einem Gemisch von PLLA und β-TCP hergestellt. Würfelförmige Prüfkörper dieses Komposits wurden unserer Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt.

Ziel der Arbeit war es, eine Beurteilung des neu entwickelten Knochenersatzmaterials hinsichtlich seiner Eignung als Biomaterial im Bereich des Knochenersatz abzugeben.
Durch ihre Besiedelung mit humanen MSZ und humanen Osteoblasten sollte die Biokompatibilität und Osteokonduktivität untersucht werden. Vergleichend wurden bereits in der Anwendung befindliche Materialien herangezogen.
Zusätzlich sollte der Einfluss von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren auf die Zellpopulationen analysiert werden. Die Induktion einer Zellmigration durch Wachstumsfaktorgradienten sollte zur Verbesserung der dreidimensionalen Besiedlung führen.

Zunächst musste ein Versuchsaufbau etabliert werden, der die dreidimensionale Besiedelung der Prüfkörper mit MSZ und Osteoblasten und die Integration von Wachstumsfaktorgradienten in verschiedenen Kulturmedien ermöglichte.
Die Etablierung verschiedener Analyseverfahren war notwendig, um eine Besiedelung der neu entwickelten Konstrukte untersuchen zu können.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Patientenkollektiv

Die humanen multipotenten mesenchymalen Stromazellen wurden aus Knochenmarkaspiraten isoliert. Das Knochenmark wurde im Rahmen orthopädischer Operationen, die einen Zugriff zur Beckenspongiosa ermöglichen, wie z.B. Tripelosteotomien bei Hüftgelenksfehlstellung oder Knochenspanentnahme für Spondylodesen gewonnen.
Die bei Gelenkersatzoperationen abgetragenen Knochenfragmente wurden zur Isolation humaner Osteoblasten herangezogen.
Die Spender wurden vor dem Eingriff über die Entnahme vom Stationsarzt aufgeklärt und haben ihr Einverständnis in Übereinstimmung mit der Ethikkommission der Universität Ulm gegeben.
Das Patientenkollektiv bestand aus 16 Patienten, wovon 8 Frauen und 8 Männer waren. Das Alter der Spender lag zwischen 18 und 77 Jahren. Das Durchschnittsalter betrug 41 (+/- 22) Jahre.

2.1.2 Chemikalien und Kits

Amphothericin B (250 µg/ml)	Biochrom KG, Berlin
Aqua Spüllösung	DeltaSelect GmbH, Dreieich
Borsäure	Fluka Chemie AG, Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Taufkirchen
Bromphenolblau Natriumsalz	Fluka Chemie AG, Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Taufkirchen
Cacodylsäure Natriumsalz Trihydrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Casy®ton	Schärfe System GmbH, Reutlingen
Collagenase Sigma C-5138	Fluka Chemie AG, Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Taufkirchen
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Taufkirchen

Dexamethason (20 mg/ml)	Merck KgaA, Darmstadt
Dinatriumcarbonat	Merck KgaA, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck KgaA, Darmstadt
DMEM	Biochrom KG, Berlin
DNA-Leiter 100bp	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
D+ - Saccharose	Fluka Chemie AG, Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Taufkirchen
Essigsäure	Fluka Chemie AG, Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Taufkirchen
Ethanol (96%) absolut für Analyse	Riedel-de Haën, Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Taufkirchen
Ethidiumbromid wässrige Lösung	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Taufkirchen
Ficoll separation solution	Biochrom KG, Berlin
FKS	Biochrom KG, Berlin
Formaldehydlösung 37%	Merck KgaA, Darmstadt
Glutaraldehyd (50%), Fluka 49629	Fluka Chemie AG, Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Taufkirchen
Ham's F12 Medium (1x)	Biochrom KG, Berlin
HotStarTaq™ Master Mix Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Isopropanol 99%	Apotheke des Universitätsklinikum Ulm
Isotonische Kochsalzlösung 0,9%	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg
L-Glutamin (200 mM)	Biochrom KG, Berlin
Magnesiumchlorid	Merck KgaA, Darmstadt
Mercaptoethanol	Merck KgaA, Darmstadt
Na_2EDTA	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Taufkirchen
Natriumchlorid	Mallinckrodt Baker B.V., Deventer
Natriumdihydrogenphosphat	Merck KgaA, Darmstadt
Natriumhydroxid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Omniscript™ RT Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Papain 505 mg solid	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Taufkirchen

PBS-Dulbecco	Biochrom KG, Berlin
Penicillin/Streptomycin (10000U/10000µg/ml)	Biochrom KG, Berlin
Qia shredder™	Qiagen GmbH, Hilden
RNase-Inhibitor	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
RNeasy® Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
SeaKem LE Agarose	Cambrex Bio Science German Office, Apen
Sigma Fast™ p-Nitrophenylphosphate (pNPP) tablet sets	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Stammlösung Farbstoff Hoechst 33258 (1mg/ml)	Hoechst, Berlin
Sybr Green PCR Master Mix	Applera Deutschland GmbH, Darmstadt
Toluidinblau O	Merck KgaA, Darmstadt
Tris (=Tris[hydroxymethyl]aminomethan)	USB Corporation, Cleveland
Triton X	Merck KgaA, Darmstadt
Trypsin/EDTA 10x (0,5%/0,2%)	Biochrom KG, Berlin
Xylol	Mallinckrodt Baker B.V., Deventer
Zinkchlorid ($ZnCl_2$)	Fluka Chemie AG, Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Taufkirchen

2.1.3 Geräte und Materialien

Abi Prism Sequence Detection System-„TaqMan“	Applera Deutschland GmbH, Darmstadt
Cryovial® sterile, 2ml Caps	Simport, Beloeil QC
Cytoperm Brutschrank	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Digitalkamera EOS 300D Digital	Canon, Japan
Einmal-Küvetten, 1,5ml halbmicro	Brand GmbH+ Co., Wertheim
elektronische Waage Precisa 400 M	Altenrath GmbH, Wuppertal
Elektrophoresekammer	Biometra GmbH i.L., Göttingen
Falcon Petrischalen	BD Falcon, Heidelberg
Falcon-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	BD Falcon, Heidelberg
Falcon Zellkulturflasche (75 cm^2, 175 cm^2)	BD Falcon, Heidelberg

Filtereinheit FD 30/0,2 CA-S	Schleicher & Schuell GmbH, Dassel
Filtertips	Brand GmbH + Co., Wertheim
Fluorometer Model TK0100	Hoefer Scientific Instruments, San Francisco
Glass Fluorometry Cuvette	
Heiz- & Magnetrührplatte	Bender & Hohlbein, Zürich, Schweiz
Hera Safe Sterilbank	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Imagemaster VDS	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Kryoröhrchen Cellstar	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
MicroAmp Optical „96 well"-Reaktionsplatten	Applera Deutschland GmbH, Darmstadt
MicrotestTM Zellkulturplatten: „6 well", „12 well" und „96 well"	BD Falcon, Heidelberg
Mikroprozessor-pH-Meter	Knick, Mehring
Mikroskop Axiovert 35	Zeiss, Oberkochen
Mikrowellenprozessor H2500	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Pipette Pipetman (0,5-10 µl; 10-100 µl; 100-1000 µl)	Gilson International B.V., Bad Camberg
Pipettierhilfe „pipetus"	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co KG, Eberstadt
Reaktionsgefäße	Brand GmbH + Co., Wertheim
RobocyclerGradient 96	Stratagene Europe, Amsterdam
Spektrophotometer Ultro Spec 3000	Pharmacia Biotech, Cambridge, England
Stromgenerator	Biometra GmbH i.L., Göttingen
Trockenschrank	Memmert, Schwabach
Tuttnauer Tischautoklav 2540 EL	Systec GmbH Labor-Systemtechnik, Wellenberg
Vliesstoffkompressen NOBATOP8	NOBA Verbandmittel Danz GmbH & Co KG, Wetter
Vortex Genie 2	Bender & Hohlbein, Zürich, Schweiz
Wasserbad GFL 1083	Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel
Zellzähler- & Analysesystem Casy®1	Schärfe System GmbH, Reutlingen
Zentrifuge Allegra™ 64R	Beckman Coulter™, Palo Alto, CA, USA

2.1.4 Wachstumsfaktoren

Der verwendete Wachstumsfaktor rhPDGF-BB wurde von der Firma DPC Biermann, Bad Nauheim bezogen. Durch Verdünnung mit Aqua dest. wurde eine Stammlösung mit einer Konzentration von 10 µg/ml erhalten und bei -80°C gelagert. Einzelne Alliquots wurden vor Gebrauch mit DMEM (Leermedium) auf die Arbeitskonzentration von 100 ng/ml eingestellt.

2.1.5 Zellkulturmedium und Zusätze

Vollmedium

- 440 ml DMEM
- 50 ml FKS (30 min. bei 56°C inaktiviert)
- 5 ml Penicillin/Streptomycin (Stammlösung [10^4 IE/10^4 µg/ml] 1:100 verdünnt)
- 5 ml L-Glutamin (Stammlösung [200mM] 1:100 verdünnt)

osteogenes Differenzierungsmedium

- 440 ml DMEM
- 50 ml FKS (30 min. bei 56°C inaktiviert)
- 5 ml Penicillin/Streptomycin (Stammlösung [10^4 IE/10^4 µg/ml] 1:100 verdünnt)
- 5 ml L-Glutamin (Stammlösung [200mM] 1:100 verdünnt)
- 440 µl Vitamin C (50 µg/ml)
- 440 µl β-Glycerophosphat (21,6 mg/ml)
- 440 µl Dexamethason (20 ng/ml)

Kulturmedium für primäre Osteoblasten	• 435 ml Ham's F12 Medium (1x) • 50 ml FKS (30 min. bei 56°C inaktiviert) • 5 ml Penicillin/Streptomycin (Stammlösung [10^4 IE/10^4 µg/ml] 1:100 verdünnt) • 5 ml L-Glutamin (Stammlösung [200mM] 1:100 verdünnt) • 5 ml Amphothericin B (250 µg/ml)

2.1.6 Fixier-, Färbe- und Pufferlösungen

2.1.6.1 Formalin nach Lillie (pH 7,0)

- 4,0 g Natriumhydrogenphosphat und
- 6,5 g Dinatriumhydrogenphosphat in
- 900 ml Aqua dest. lösen
- 100 ml Formaldehyd (37%) zugeben

2.1.6.2 Fixierlösung für Elektronenmikroskopie

- 42,806 g Natriumcacodylat abwiegen und mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen
- 800 ml Aqua dest. zu 200 ml 1 N Salzsäure hinzufügen
- aus 900 ml Natriumcacodylat- und 40 ml Salzsäurelösung 0,2 M Cacodylatpuffer (pH 7,4) herstellen
- 10,52 ml der Natriumcacodylat-Salzsäurelösung in 500 ml Aqua dest. lösen
- mit 0,1 M Salzsäure pH-Wert von 7,2 einstellen
- 17,1 g Saccharose abwiegen und zu Natriumcacodylatpufferlösung hinzufügen
- 4 ml Glutaraldehyd (50%) mit 100 ml Cacodylat-Saccharose-Lösung versetzen

2.1.6.3 Toluidinblau O (0,1%)

- Abwiegen von 0,1 g Toluidinblau
- Abwiegen von 2,5 g Dinatriumcarbonat
- abgewogenes Toluidinblau und Dinatriumcarbonat in 100 ml Aqua dest. lösen

2.1.6.4 Bromphenolblaulösung (pH 8,0)

- Bromphenolblau Natriumsalz : 0,25 %
- D+ - Saccharose : 40 %
- Na_2 EDTA : 125 mMol

2.1.6.5 TBE-Puffer (pH 8,3)

- Tris-base : 108,0 g
- Borsäure : 55,0 g
- Na_2 EDTA : 9,3 g
- Mit Aqua dest. auf 10 l auffüllen

2.1.6.6 Lysispuffer 10x

Zusammensetzung:

- 0,1 mM Zinkchlorid ($ZnCl_2$)
- 1 mM Magnesiumchlorid ($MgCl_2$)
- 0,1% Triton X
- 20mM Tris

- 13,63 g $ZnCl_2$ abwiegen und in 100 ml Aqua dest. lösen; davon 100 µl für 10x Pufferlösung verwenden
- 0,2033g $MgCl_2$ abwiegen und $ZnCl_2$-Lösung zugeben
- 1 ml Triton X hinzu pipettieren
- 2,423 g Tris abwiegen und zur Lösung hinzugeben
- um 10x Lysispuffer zu erhalten, Lösung auf 100 ml mit Aqua dest. auffüllen; 10x Lysispuffer als Stammlösung in dieser Konzentration aufbewahren

2.1.6.7 Pufferlösung für Hoechst-Farbstoff

- Zusammensetzung:
  - 0,2 M Tris
  - 0,01 M Na_2EDTA
  - 1 M Natriumchlorid
- Chemikalien mischen und auf 500 ml mit Aqua dest. auffüllen ergibt Stammlösung 10x
- Arbeitspufferlösung durch Verdünnen der 10x-Stammlösung auf 1x-Pufferlösung mit Aqua dest. herstellen
- pH-Wert mit Natronlauge oder Essigsäure auf 7,4 einstellen

2.1.7 Primer

Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die bei der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) verwendeten Primer und ihre Sequenzen.

Tab. 2: *Eingesetzte Primer für RT-PCR*

Gen	**Datenbank-Nr.**	**Sequenz** 5' 3'
GAPDH	NM_002046	For: GAG TCC ACT GGC GTC TTC AC Rev: GGT GCT AAG CAG TTG GTG GT
AP	NM_00478	For: ACC TCG TTG ACA CCT GGA AG Rev: CCA CCA TCT CGG AGA GTG AC
OC	NM_199173	For: GGC AGC GAG GTA GTG AAG AG Rev: AGC AGA GCG ACA CCC TAG AC
Runx-2	NM_004348	For: GAT GGA GTG CCT GTG GAA AT Rev: AAC TTC CTC ACG GGT GTG TC
p53	NM_000546	For: CAG CCA AGT CTG TGA CTT GCA CGT AC Rev: CTA TGT CGA AAA GTG TTT CTG TCA TC
Bcl-2	NM_14745	For: GGT GGA GGA GCT CTT CAG G Rev: ACA GTT CCA CAA AGG CAT CC
c-Myc	NM_002467	For: TCC AGC TTG TAC CTG CAG GAT CTG A Rev: CCT CCA GCA GAA GGT GAT CCA GAC
c-Fos	NM_005252	For: AGA CAG ACC AAC TAG AAG ATG A Rev: AGC TCT GTG GCC ATG GGC CCC
Bax	XM_055954	For: AAC ATG GAG CTG CAG AGG AT Rev: CAG CCC ATG ATG GTT CTG AT
H4	NM_001034077	For: GGT GTG CTG AAG GTG TTC CT Rev: CTA GCC TCC GAA GCC GTA CA

(GAPDH = Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase, AP = alkalische Phosphatase, OC = Osteocalcin, Runx-2 = "runt-related transcription factor 2", Bax = Bcl-2-assoziiertes X-Protein, H4 = Histon 4, For = "forward", Rev = "reverse")

Die Primer für die quantitative „Realtime"-PCR wurden von der Arbeitsgruppe etabliert und übernommen.

Tab. 3: *Eingesetzte Primer für Taqman*

Gen	**Datenbank-Nr.**	**Primer-Sequenz** 5' 3'
Bcl-2	NM_14745	For: GGT GGA GGA GCT CTT CAG G Rev: ACA GTT CCA CAA AGG CAT CC
Bax	XM_055954	For: AAC ATG GAG CTG CAG AGG AT Rev: CAG CCC ATG ATG GTT CTG AT
18s rRNA	X 03205 851-F 915-R	For: CGC AGC TAG GAA TAA TGG AAT AGG Rev: CAT GGC CTC AGT TCC GAA A

(Bax = Bcl-2-assoziiertes X-Protein, For = "forward", Rev = "reverse")

2.1.8 Knochenersatzmaterialien

2.1.8.1 ITV-Prüfkörper

Bei dem untersuchten Knochenersatzmaterial handelte es sich um Schäume aus Poly-L-Laktidsäure (PLLA) und β-Trikalziumphosphat (β-TCP), die von dem Institut für Textil- und Verfahrenstechnik (ITV) in Denkendorf im Rahmen des Kompetenznetzes Biomaterialien Baden-Württemberg neu entwickelt wurden.

Die Arbeitsgruppe des Instituts für Textil- und Verfahrenstechnik Denkendorf stellte unterschiedliche Chargen her, die sich hinsichtlich ihrer chemischen Zusammensetzung unterschieden. Die Materialien bestanden aus PLLA und β-TCP im Verhältnis 1:1.

Die würfelförmigen Prüfkörper hatten eine Seitenlänge von 5x5x5 mm. Die Basisporosität betrug 90% und die Gesamtporosität 83%. Die Korngröße lag zwischen 150-500 µm. Die Knochenersatzmaterialien wurden gammasterilisiert (25kGy).

Die Prüfkörper verfügten laut ITV Denkendorf über interkonnektierende Porosität.

Abbildung 7 zeigt exemplarisch eine makroskopische Aufnahme der neu entwickelten ITV-Prüfkörper.

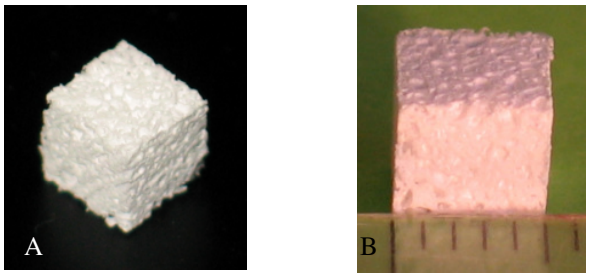


Abb. 7: *Makroskopische Aufnahmen eines ITV-Prüfkörpers aus PLLA und β-TCP. Die würfelförmigen Prüfkörper haben eine Seitenlänge von 5mm (B). ITV= Institut für Textil- und Verfahrenstechnik; PLLA= Poly-L-Laktid; TCP= Trikalziumphosphat*

Vom Institut für Textil- und Verfahrenstechnik Denkendorf wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der unbesiedelten Prüfkörper mitgeliefert (siehe Abb.8)

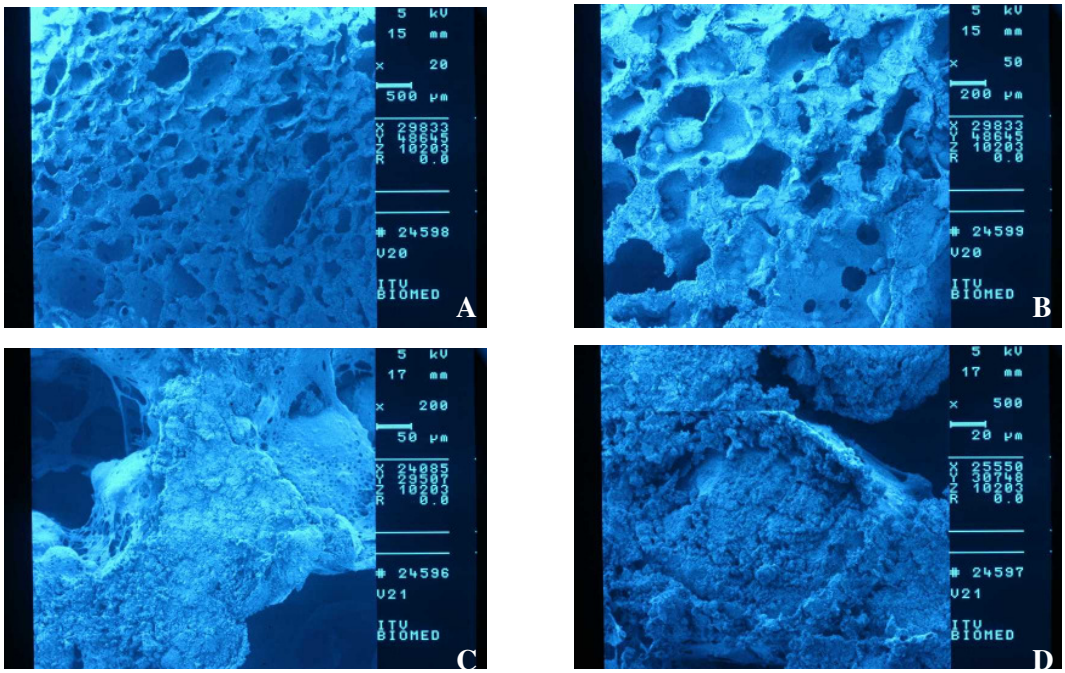


Abb.8: *Unbesiedelte Prüfkörper aus PLLA (Poly-L-Laktid) und β-TCP (Trikalziumphosphat) im Verhältnis 1:1. A) 20-fache Vergrößerung, B) 50-fache Vergrößerung, C) 200-fache Vergrößerung, D) 500-fache Vergrößerung*

2.1.8.2 Etablierte Knochenersatzmaterialien

Um die neuartigen porösen ITV-„Scaffolds“ adäquat hinsichtlich ihrer Eignung für das Knochen „Tissue Engineering“ beurteilen zu können, wurden die Experimente parallel mit etablierten Knochenersatzmaterialien durchgeführt.

Vergleichend wurden solide Cerasorb-Prüfkörper aus β-TCP ohne (Abb.9) und mit Bohrung besiedelt und analysiert.



Abb.9: *Solide Cerasorb-Prüfkörper aus β-TCP (Trikalziumphosphat) ohne Bohrung. Block mit 7x5x5mm Seitenlänge.*

Das Glaskeramikmaterial GB9N (Abb.10A/B), welches auf Kalzium-Alkaliorthophosphaten ($Ca_2KNa(PO_4)_2$) basiert, wurde ebenfalls zum Vergleich herangezogen. Außerdem wurden die verschiedenen Versuchsreihen mit α-TCP-Prüfkörpern durchgeführt.

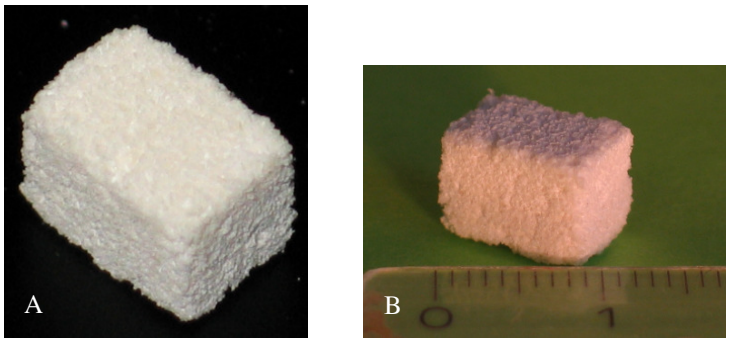


Abb.10A/B: *GB9N-Prüfkörper aus Glaskeramik mit Seitenlänge von 8x5x5mm.*

2.2 Methoden

2.2.1 Zelkultivierung von humanen multipotenten mesenchymalen Stromazellen und humanen Osteoblasten

2.2.1.1 Isolation humaner multipotenter mesenchymaler Stromazellen aus Knochenmarkaspirat

Die Isolation multipotenter mesenchymaler Stromazellen aus Knochenmarkaspirat erfolgte mittels eines Dichtegradienten, der mit Ficoll-Lösung (Biocoll separation solution, Fa. Biochrom KG, Berlin) der Dichte 1,077g/ml in einem sterilen Plastikröhrchen durch Zentrifugation vorher hergestellt worden war. Außerdem wurde ein Teil der Zellen durch selektive Adhärenz an Plastikoberflächen im Sinne einer Direkt-Ausplattier-Methode gewonnen (Pittenger et al. 1999).

Humane MSZ wurden aus Knochenmarkaspirat nach folgendem Protokoll isoliert:

- Zentrifugenröhrchen mit jeweils 8ml Ficoll Lösung 30 min. bei 4°C und 13000g_n zentrifugieren (der Gradient war für mehrere Stunden stabil und konnte bei 4°C aufbewahrt werden)
- Knochenmarkaspirat in eine Petrischale geben
- 1-2 ml Vollmedium aufpipettieren und mit 4-5 Pipettiervorgängen resuspendieren
- Ficoll-Gradient mit jeweils 2 ml Knochenmarksuspension pro Zentrifugenröhrchen langsam überschichten
- Zentrifugenröhrchen 30 min. bei 4 °C und 600 g_n zentrifugieren
- Petrischale mit 10 ml Vollmedium überschichten und bei 37°C, 5%CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit 24 h inkubieren (Direkt-Ausplattier-Methode)
- Überstand aus den Zentrifugenröhrchen abnehmen und in eine Zellkulturflasche (75 cm^2) pipettieren, die 12 ml Vollmedium enthielt; bei 37°C, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit 24 h inkubieren, MSZ setzen sich ab und werden am Flaschenboden adhärent
- Nach 24 h Medium aus der Petrischale bzw. Zellkulturflasche abnehmen und verwerfen
- Zellkulturgefäße mit PBS spülen bis makroskopisch keine nicht-adhärenten Zellen mehr zu sehen sind
- Pro Flasche 12 ml frisches Vollmedium hinzugeben
- Kultivierung bei 37°C, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit
- Mediumwechsel alle drei Tage

2.2.1.2 Isolation humaner Osteoblasten

Bei der Implantation von Totalendoprothesen des Kniegelenks werden Teile der Femurkondylen und das Tibiaplateau entfernt und durch die Prothese ersetzt. Die dabei anfallenden Knochenfragmente von Tibia und Femur konnten nach Zustimmung der Patienten zur Gewinnung humaner Osteoblasten verwendet werden:

- aus dem OP erhaltene Knochenteile mit isotonischer Kochsalzlösung 0,9% bedecken und maximal einen Tag bei 4°C lagern
- anschließend die Knochenstücke mit einem Luer in einer Nierenschale grob mechanisch zerkleinern
- knöcherne Einzelteilchen mit isotonischer Kochsalzlösung 0,9% ca. 2-3 mal waschen bis der Überstand klar bleibt
- die Knochenstückchen in einen sterilen Becher mit Deckel überführen, verschließen und wiegen; das Gewicht sollte mindestens 7-8 g betragen
- Herstellung einer 0,05% Collagenase-Lösung aus DMEM und Collagenase (Sigma C-5138): Collagenase abwiegen, in DMEM aufnehmen und sterilfiltrieren
- Spongiosastücke mit Collagenase-Lösung bedecken und 2 h bei 37°C, 5%CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit unter Rühren inkubieren
- nach 2 h Collagenase durch Abschütten des Überstands und 2-3-maliges Spülen mit DMEM auswaschen
- Spongiosastückchen auf mindestens zehn „6-well"-Platten mit jeweils 3-4-Knochenteilchen pro „well" aufteilen

- pro „well“ Zugabe von 3 ml Kulturmedium für primäre Osteoblasten (Herstellung siehe Kapitel 2 unter 2.1.5)
- Kultivierung der Primärkultur für ca. vier Wochen bei 37°C, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit
- Mediumwechsel alle drei Tage
- nach ca. vier Wochen und bei Konfluenz der am Boden der „well“-Platten adhärenten Zellen, Zellen trypsinieren (siehe Kapitel 2 unter 2.2.1.3) und weitere Kultivierung in Zellkulturflaschen (75 cm^2) unter der Bezeichnung als Passage 1

2.2.1.3 Passagierung von multipotenten mesenchymalen Stromazellen und Osteoblasten

Humane MSZ und humane Osteoblasten wurden unter denselben Bedingungen im Inkubationsschrank bei 37°C, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit in Vollmedium kultiviert. Im Lichtmikroskop wurde regelmäßig die Konfluenz in den Zellkulturgefäßen kontrolliert. Bei einer Konfluenz von 75% wurden die Zellen passagiert, um eine Differenzierung der humanen MSZ zu vermeiden und die Proliferation der Zellen zu ermöglichen.

Die Passagierung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- Medium aus den Zellkulturflaschen abpipettieren und verwerfen
- Zweimal mit je 10 ml PBS (im Wasserbad vorgewärmt) spülen
- 2 ml vorgewärmtes 1-fach konzentriertes Trypsin/EDTA (0,5%,0,2%) in Zellkulturflasche geben (Trypsin/EDTA 10x 0,5%/0,2% mit Aqua dest. im Verhältnis 1:9 verdünnen)
- Zellkulturgefäße bei 37°C, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit inkubieren
- Mikroskopische Kontrolle nach ca. 5 min.; waren nicht alle Zellen gelöst, wurde erneut inkubiert; die Inkubationszeit durfte 10 min. jedoch nicht überschreiten; das Lösen der Zellen konnte durch Klopfen des Zellkulturgefäßes an die Innenhand beschleunigt werden
- Trypsinlösung mit vorgewärmten Vollmedium inaktivieren; pro ml Trypsinlösung 2 ml Vollmedium hinzu pipettieren
- Zellsuspension komplett abnehmen und in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführen
- 10 min. bei 1000g_n und Raumtemperatur zentrifugieren
- Zellpellet mit Vollmedium durch mehrere Pipettiervorgänge resuspendieren
- Zellsuspension auf doppelt so viele Zellkulturflaschen (75 cm^2) mit je 12 ml Vollmedium zu gleichen Teilen aufteilen; Bezeichnung als nächst höhere Passage
- Inkubation bei 37°C, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit
- Mediumwechsel alle drei Tage

2.2.1.4 Zellzählung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde ein 100 µl Alliquot der Zellsuspension in 10 ml Casy®ton (Fa. Schärfe System GmbH, Reutlingen) überführt. Zur Durchführung der Messung wurde das Zellzähl- & Analysesystem Casy®1 der Fa. Schärfe System GmbH, Reut-

lingen benutzt. Die Größe der Zellen, die gezählt werden sollten, wurde in Abhängigkeit des Zelltyps eingestellt (Osteoblasten: 10,0-50 µm, MSZ: 12,5-50 µm).

2.2.2 RNA-Isolation

Die in einer Zelle vorliegende RNA gibt Aufschluss z.B. über den Zelltyp und ihren Differenzierungsgrad. Zur RNA-Isolation für die Genexpressionsanalyse wurde das RNeasy® Mini Kit der Fa. Qiagen GmbH, Hilden nach Herstelleranleitung benutzt. Die Abkürzungen der Puffer „RLT", „RW1" und „RPE" stammen vom Hersteller. Die genauere Zusammensetzung ist nicht bekannt.
Die Durchführung der Zelllyse zur Freisetzung der vorhandenen mRNA unterschied sich in Abhängigkeit des Versuchsaufbaus.

Die Versuche, die mit lysierten Prüfkörpern im Rahmen des Toxizitätstests durchgeführt wurden (siehe Kapitel 2 unter 2.2.11), erforderten zunächst eine Trypsinierung der adhärenten Zellen wie sie in Kapitel 2 unter 2.2.1.3 beschrieben wird. Weitere Schritte:

- Zellzählung entsprechend Kapitel 2 unter 2.2.2
- Je nach benötigter Zellzahl entsprechendes Alliquot der Zellsuspension in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführen und 5 min. mit 1000g_n zentrifugieren
- Überstand abnehmen und 600 µl Lysispuffer (10 µl Mercaptoethanol + 990 µl RLT-Puffer aus RNeasy® Mini Kit ergibt 1 ml Lysispuffer) aufpipettieren
- vorsichtige Resuspension des Zellpellets mit Lysispuffer ergibt Lysat

Bei den Versuchen mit intakten Prüfkörpern (siehe Kapitel 2 unter 2.2.10) wurde wie folgt vorgegangen:

- Voll- bzw. Differenzierungsmedium vorsichtig abnehmen
- Waschung der besiedelten Prüfkörper durch zweimalige Zugabe von PBS
- Prüfkörper in Abhängigkeit der Größe in 2 ml Cryovial®-Caps, 15 ml oder 50 ml Falcon-Röhrchen mittels steriler Pinzette überführen
- Zugabe von Lysispuffer (Volumen, das nötig war, um Prüfkörper komplett zu bedekken, wurde dokumentiert)

Das weitere Vorgehen entsprach sich bei allen Versuchsansätzen:

- Lysat in eine QIA shredder^{TM}-Säule pipettieren und 2 min. bei 13000 g_n zentrifugieren (bei Lysatvolumina über 700 µl Verwendung von mehreren QIA shredder^{TM}-Säulen für eine Probe)
- 70% Ethanol (Herstellung aus Ethanol 96% absolut und DEPC) dem Lysat zugeben (Volumen entsprechend verwendeter Menge an Lysispuffer) und durch mehrere Pipettiervorgänge vorsichtig mischen

- in RNeasy mini spin-Säule in 2 ml Sammeltube auftragen und 15 sec bei 13000 g_n und 4°C zentrifugieren
- Durchbruch im Sammelröhrchen entfernen
- Bei größeren Probenvolumina diesen Schritt mehrmals wiederholen bis gesamte Probenmenge filtriert wurde; dabei gleiche RNeasy mini spin-Säule für gleiche Probe verwenden
- 700 µl RW1-Puffer in RNeasy mini spin-Säule pipettieren und 15 sek. bei 13000 g_n und 4°C zentrifugieren
- RNeasy mini spin-Säule in neues 2 ml Sammeltube überführen; 500 µl RPE-Puffer in Säule pipettieren; 15 sek. bei 13000 g_n und 4°C zentrifugieren; Durchbruch entfernen
- nochmals 500 µl RPE-Puffer in Säule pipettieren und 15 sek. bei 13000 g_n und 4°C zentrifugieren; Durchbruch entfernen
- Erneut 1 min. bei 13000g_n und 4 °C zentrifugieren; RNeasy mini spin-Säule in 1,5 ml Sammeltube überführen
- 30 µl RNase-freies Wasser zur Elution direkt auf Membran der Säule pipettieren und 1 min. bei 13000 g_n und 4 °C zentrifugieren
- Säule entfernen und sofort auf Eis überführen
- Proben-RNA bei -80°C einfrieren

2.2.3 Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription wurde die aus der Zelle gewonnene mRNA in cDNA umgeschrieben. Zur cDNA-Gewinnung für die Genexpressionsanalyse wurde das Omniscript RT Kit der Fa. Qiagen GmbH, Hilden nach Anleitung des Herstellers benutzt:

- RNA und Reagenzien immer auf Eis stellen
- 12 µl der isolierten RNA zur Denaturierung bei 65°C inkubieren
- sofort auf Eis überführen
- RNase-Inhibitor verdünnen:
  - 1x RT-Puffer: 4 µl
  - RNAse-Inhibitor (50 units/µl): 1 µl
- Master-Mix ansetzen:
  - 10x RT-Puffer: 2 µl
  - dNTP-Mix (je 5 mM): 2 µl
  - Oligo-dT-Primer (20 µM): 1 µl
  - Random-Hexamer (0,1 mM): 1 µl
  - RNAse-Inhibitor (10 units/µl): 1 µl
  - Omniscript RT (4 units/µl): 1 µl
- vortexen
- 8 µl Master-Mix zur Probe hinzupipettieren
- vortexen und herunterzentrifugieren
- 60 min. bei 37°C im PCR-System Robocycler inkubieren (ohne Deckelheizung)
- 60 min. bei 42°C im PCR-System Robocycler inkubieren (ohne Deckelheizung)
- transkribierte cDNA mit 80 µl RNase-freiem Wasser auf 100 µl Gesamtvolumen einstellen
- cDNA bei -20°C einfrieren

2.2.4 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist ein Verfahren der Molekularbiologie, bei der selektiv bestimmte DNA-Abschnitte amplifiziert und die zwischen zwei synthetischen Oligonukleotiden gelegenen DNA-Sequenzen mittels DNA-Polymerase neu synthetisiert werden.

Für die Genexpressionsanalyse mit einer RT-PCR wurde das HotStar Taq Master Mix Kit der Fa. Qiagen GmbH, Hilden nach Anleitung des Herstellers benutzt.

- cDNA und Reagenzien immer auf Eis stellen
- Primer-Mischung aus 3'- und 5'-Stammlösung herstellen (100pMol/µl); dazu jeweils 10 µl der 3'- und 5'-Stammlösung und 80 µl RNase-freies Wasser mischen
- 2 µl cDNA, 1 µl Primer-Mix, 7 µl RNase-freies Wasser und 10 µl HotStar Taq™ Master Mix mischen
- Durchführung der PCR im PCR-System Robocycler mit folgendem Programm:
  - 15 min. bei 96°C
  - 32 Zyklen mit jeweils 1 min. bei 95°C, 1 min. bei 60°C, 1 min. bei 72°C
  - 20 min. bei 72°C
- PCR-Produkte im Kühlschrank aufbewahren oder bei -20°C einfrieren

2.2.5 Agarose-Gelelektrophorese

Mit der Agarose-Gelelektrophorese ist es möglich, geladene Partikel durch elektrischen Strom (Gleichstrom) zu transportieren, Substanzgemische im elektrischen Feld aufzutrennen und somit Nukleinsäuren biochemisch zu analysieren.

- TBE-Puffer herstellen (pH 8,3; siehe Kapitel 2 unter 2.1.6.5)
- Bromphenolblaulösung ansetzen (pH 8,0; siehe Kapitel 2 unter 2.1.6.4)
- Gel (2%) herstellen:
  - 1 g Agarose abwiegen
  - mit TBE-Puffer auf 50 ml auffüllen
  - aufkochen
  - auf Magnetkochplatte etwas abkühlen lassen
  - 2,5 µl Ethidiumbromid hinzupipettieren
  - Geltablett, Dichtungsstege und Kämme zusammensetzen; Gel eingießen
  - erkalten lassen
- Proben mit 5 µl Bromphenolblau 0,25% versetzen
- Geltablett mit erhärtetem Gel in mit TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer überführen; Kämme entfernen
- in linke äußerste Vertiefung 3 µl DNA-Leiter 100bp einpipettieren
- neben DNA-Leiter jeweils 5 µl Proben-Bromphenolblau-Gemisch in Vertiefungen einpipettieren
- Elektrophoresekammer an 120 Volt und 65 mA anschließen
- nach 30 min. Gel herausnehmen

Die DNA-Fragmente wurden mit dem Image-Master-Video-Analyse-Gerät (Pharmacia Biotech) mit der Software ImageMaster VDS ausgewertet. Anhand der Genexpressionsmuster kann der Differenzierungsgrad der untersuchten Zellen analysiert und verglichen werden.

2.2.6 Relative Quantifizierung – Quantitative "Realtime"-PCR

Es wurde das Taqman-Gerät und das Sybr Green PCR Master Mix Kit der Fa. Applera Deutschland GmbH, Darmstadt, benutzt.
Eine endogene Kontrolle diente dabei zur Nivellierung der unterschiedlichen RNA-Mengen aufgrund unterschiedlicher Zellzahl. Damit lässt sich eine Aussage treffen, wie viel RNA der Zielgene in den Zellen vorhanden war, relativ zu einer als Kalibrator ausgewählten Probe. Als endogene Kontrolle wurde 18s rRNA eingesetzt. Als Kalibrator fungierte die relative Expression der Zielgene in den Zellen zum Zeitpunkt t_0.
Es wurde die Expression von Bax, Bcl-2 und 18s rRNA untersucht.
Die Konzentration der Primer-Stammlösung betrug 20 µM. Es wurde eine MicroAmp Optical 96-Well-Reaktionsplatte benutzt. Jeder Ansatz umfasste 25 µl.
Die Proben mit den zu untersuchenden verschiedenen Gen-Primern enthielten:

- 12,5 µl SYBR Green PCR Master Mix
- 1 µl Primer "forward" (20 µmol)
- 1 µl Primer "reverse" (20 µmol)
- 9,5 µl DEPC-Wasser
- 1 µl cDNA 1:10 verdünnt

Für die Proben mit dem „housekeeping"-Gen wurden folgende Komponenten verwendet:

- 12,5 µl SYBR Green PCR Master Mix
- 1 µl 18S-rRNA Primer forward (20 µmol)
- 1 µl 18S-rRNA Primer reverse (20 µmol)
- 9,5 µl DEPC-Wasser
- 1 µl cDNA 1:10 verdünnt

Jede cDNA wurde im Zweifachansatz analysiert. Zusätzlich wurde eine cDNA-freie Negativkontrolle mit jeweiligem Primer mitgeführt. Die Durchführung der quantitativen PCR erfolgte im Abi Prism Sequence Detection System-„TaqMan" nach folgendem dreistufigen Temperaturverlauf:

• Stufe 1:	50°C	02:00 Minuten	Zyklenzahl: 1
• Stufe 2:	95°C	10:00 Minuten	Zyklenzahl: 1
• Stufe 3:	95°C	00:15 Minuten	Zyklenzahl: 40
	60°C	01:00 Minuten	
• Dissoziation:	60 - > 95°C	20:00 Minuten	

Auswertung:

Da die Transkriptionsmenge von 18s rRNA konstant ist, wurden Unterschiede, die sich aufgrund der verschiedenen Zellzahl ergaben, durch die Software (ABI Prism 7000 SDS Software Version 1.1, Applera Deutschland GmbH, Darmstadt) herausgerechnet.

Die Werte ddCT und RQ wurden mithilfe der Software für die verschiedenen „templates" in Bezug zum t_0-Wert berechnet. Die Differenz der relativen Genexpression in den Zellen der verschiedenen Proben wurde graphisch aufgetragen.

2.2.7 Rasterelektronenmikroskopie

In der Rasterelektronenmikroskopie (REM) werden die Oberflächen des Probenmaterials mit einem Elektronenstrahl abgerastert.

Zunächst wurden die Prüfkörper nach folgendem Protokoll mit humanen multipotenten mesenchymalen Stromazellen besiedelt und kultiviert:

- Vorinkubation von sechs Prüfkörpern in DMEM (Leermedium) über 1 Woche
- Markierung der Unterseite durch Abschneiden der Ecken zur Festlegung der Ausrichtung
- Inkubation von drei „Scaffolds" in „96-well"-Platte mit je 150 µl rhPDGF-BB (100 ng/ml) für eine Stunde
- Trypsinieren von MSZ entsprechend Kapitel 2 unter 2.2.1.3
- Bestimmung der Zellzahl (siehe Kapitel 2 unter 2.2.1.4)
- Resuspension des Zellpellets in Vollmedium; Berechnung des benötigten Volumens an Vollmedium, so dass sich eine Konzentration von $5x10^5$ Zellen/ 30 µl Vollmedium ergab
- Überführung der drei in Wachstumsfaktor getränkten, sowie der drei neutralen Prüfkörper in frische „wells" der „96-well"-Platte unter Beachtung der markierten Unterseite
- Pipettieren von 30 µl Zellsuspension pro Prüfkörper
- Inkubation bei 37°C, 5% CO_2 und 95 % Luftfeuchtigkeit für zwei Stunden, um eine Adhärenz der Zellen auf dem Konstrukt zu gewährleisten
- Zugabe von 200 µl Vollmedium je „Scaffold"
- Kultivierung bei 37°C, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit für acht Tage

Es wurde eine Fixierlösung entsprechend Kapitel 2, 2.1.6.2 hergestellt. Das weitere Vorgehen beschrieb sich wie folgt:

- Verwerfen des Vollmediums der Versuchsansätze
- Dreimaliges Waschen der Prüfkörper in PBS
- Überführung der Prüfkörper in verschließbaren Glasbehälter
- Zugabe von Fixierlösung für Elektronenmikroskopie

Die Proben wurden in der Fixierlösung an die Abteilung für Elektronenmikroskopie der Universität Ulm übergeben, die freundlicherweise die weitere Aufbereitung für die REM-Aufnahmen durchführte. Nach Gefrierbruchtrocknung wurden die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zur Verfügung gestellt.

2.2.8 Zellkernfärbung mit Toluidinblau O 0,1% für Lichtmikroskopie

Bei einer Färbung der besiedelten Prüfkörper mit Toluidinblau O 0,1% (siehe Kapitel 2 unter 2.1.6.3) stellen sich die Zellkerne als basophile Strukturen blau dar und können dadurch im Lichtmikroskop identifiziert werden.

Nach längerem Aufbewahren der gesättigten Farbstofflösung muss sie vor Verwendung filtriert werden um die ausgefallenen Partikel zu entfernen.

Durchführung der Färbung:

- besiedelte Prüfkörper nach Versuchsende mit PBS waschen
- Unterseite der Prüfkörper durch Abschneiden von Ecken markieren
- Fixierung der Proben in Formalin nach Lillie (siehe Kapitel 2, 2.1.6.1)
- dreimaliges Waschen der fixierten Prüfkörper mit PBS
- Waschen mit Aqua dest.
- Schneiden von ca. 1mm dicken Querschnitten der würfelförmigen „Scaffolds“ mit Skalpell; ein Querschnitt enthält dabei sowohl Unter- als auch Oberseite und gibt somit Aufschluss über die Migrationsstrecke der Zellen (siehe Abb.11)

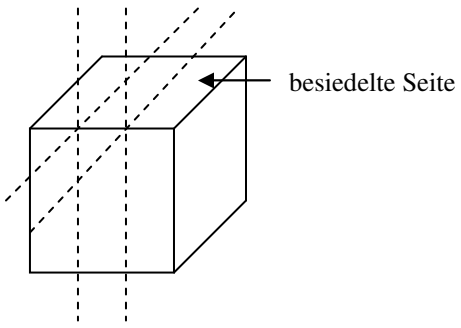


Abb.11: *Darstellung der Schnittebenen an den Prüfkörpern bei der Präparation für die Toluidinblau-Färbung*

- Bedeckung der Probenschnitte mit Toluidinblau-Farbstoff 0,1% und Inkubation darin über 30 min.
- Alkoholreihe zur Entfärbung des Knochenersatzmaterials, wobei der Farbstoff in den Zellen beständig war:
  - dreimal in 75% Isopropanol
  - einmal in 100% Isopropanol
- Schnitte bei Raumtemperatur trocknen lassen
- Betrachtung im Lichtmikroskop (STEMI SV8 der Fa. Zeiss, Oberkochen)
- Fotografieren der Schnitte mit Canon Digitalkamera EOS 300D

2.2.9 Alkalische-Phosphatase-Aktivitäts- und DNA-Mengenmessung

Über eine Bestimmung der vorhandenen DNA-Menge einer Probe lässt sich eine Aussage über die Proliferation der kultivierten Zellen treffen. Die photometrische Messung der Alkalischen-Phosphatase-Aktivität (AP-Aktivität) gibt Aufschluss über den Differenzierungsgrad der untersuchten Zellen auf Proteinebene. Die Enzymaktivität kann im Verhältnis zur DNA-Menge bestimmt werden (IU/ng).

Es wurde je ein Prüfkörper derselben Versuchsreihe für die beiden unterschiedlichen Messverfahren verwendet, da zunächst dieselbe Präparation der Probe erforderlich und eine Halbierung der Probe möglich war.

Die Proben wurden nach Versuchsende in PBS bei -80°C eingefroren.

Zunächst wurden die auf den „Scaffolds“ kultivierten Zellen lysiert (Herstellung Lysispuffer (10x) siehe Kapitel 2 unter 2.1.6.6). Dazu musste durch Verdünnung die Lysispuffer(1x)-Arbeitslösung frisch hergestellt werden:

- 10 ml Lysispuffer (10x) mit 90 ml Aqua dest. auf 100 ml Lysispuffer (1x) auffüllen
- Die erhaltene Lösung sollte einen pH-Wert von 10 aufweisen

Die besiedelten Prüfkörper wurden mit Hilfe des Homogenisators der Firma Braun zertrümmert, um alle Zellen aus den „Scaffolds“ in Lösung zu bringen. Dabei wurde wie folgt vorgegangen:

- aufgetaute Proben in neue Cryoröhrchen (Cryovial® sterile) überführen und vier Eisenkügelchen je Probe hinzugeben
- Röhrchen in Behälter mit flüssigem Stickstoff schockfrieren
- jeweils vier Cryoröhrchen im Homogenisator festschrauben
- Gerät mit 3000 rpm ("rounds per minute") starten und nach 30-60 sek. wieder stoppen
- bei erfolgreicher Zertrümmerung 1 ml Lysispuffer (1x) hinzupipettieren
- Lysat vortexen
- Probe bei $1000 g_n$ 10 min. zentrifugieren

- 500 µl des Probenüberstandes abpipettieren und für AP-Aktivitätsmessung in neues Cryoröhrchen überführen; restliches Lysat mit Sediment diente der DNA-Mengenmessung.

Für die AP-Aktivitätsbestimmung musste zunächst ein Substrat hergestellt werden, welches von dem Enzym unter photometrischer Aktivität umgesetzt werden konnte. Die zelluläre AP-Aktivität wurde mittels einer kinetischen Messung der Syntheserate von p-Nitrophenol aus p-Nitrophenolphosphat bestimmt. Hierzu wurde das Sigma Fast™ p-Nitrophenylphosphate (pNPP) tablet set der Firma Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim verwendet. Die AP-Aktivität wurde bei 405 nm gemessen.

- Reagenzien 30 min. bei 20°C inkubieren
- ein Päckchen Tris-Puffer aus Set in 20 ml Aqua dest. unter Rühren lösen
- ein Päckchen pNPP aus Set hinzugeben
- unter Rühren Aufbewahrung für 1-2 Stunden bei Raumtemperatur möglich
- Cryoröhrchen mit Lysat für AP-Aktivitätsmessung 1 min. bei $1000g_n$ zentrifugieren
- Photometer für kinetische AP-Aktivitätsmessung einstellen
- 100 µl Probe mit 900 µl Substrat in Einmal-Küvette durch einmaliges auf- und abpipettieren mischen
- Küvette in Lichtstrahl des Photometers stellen und Messung starten
- Ergebnis der Messung nach 4 min. ablesen
- bei jeder Probe zwei Messungen durchführen und daraus den Mittelwert bestimmen

Das Cryoröhrchen mit dem restlichen Lysat und dem Sediment wurde für die DNA-Mengenmessung verwendet.

- jeweils 500 µl Papain hinzugeben
- Probe vortexen
- Proben über Nacht im Trockenschrank bei 60°C inkubieren

Für die Färbung der DNA und anschließende Konzentrationsbestimmung im Fluorometer Model TK0100 (Fa. Hoefer Scientific Instruments, San Francisco) wurde die Stammlösung des Hoechst-Farbstoffs 33258 (1 mg/ml in Aqua dest.) auf die Arbeitskonzentration verdünnt. Hierzu wurde zunächst eine Pufferlösung entsprechend Kapitel 2 unter 2.1.6.7 hergestellt. Des Weiteren wurde wie folgt vorgegangen:

- Arbeitslösung des Farbstoffes mit erwünschter Konzentration von 0,2 µg Hoechst 33258 /ml Pufferlösung herstellen, das entspricht 10 µl Stammlösung /50 ml Pufferlösung; Erst unmittelbar vor Gebrauch lichtgeschützt mischen.
- DNA-Standard (Calf thymus DNA) mit PBS auf 10 µg DNA /ml verdünnen

Vor Beginn der Messung musste das Fluorometer kalibriert werden:

- Gerät mindestens 15 min. vor der Messung einschalten
- 1,75 ml Arbeitslösung und 180 µl PBS in die Küvette (Glass Fluorometry Cuvette) pipettieren

- Küvette in das Fluorometer stellen; dabei Küvette nur oben anfassen und Ausrichtung im Fluorometer beibehalten
- Deckel der Messkammer schließen und Fluoreszenzwert (Zero-Knopf) auf 000 einstellen
- 20 µl DNA-Standard in Kuvette pipettieren, mischen, Deckel schließen und mittels des Scale-Knopfes die Anzeige auf 103 setzen, was der DNA-Konzentration (µg/ml) in der Küvette entspricht
- Küvette aus der Kammer nehmen, mit Aqua dest. spülen und die Kallibrierung so lange wiederholen bis sich reproduzierbare Ergebnisse einstellen
- auf diese Weise das Gerät vor jeder Probenmessung auf 000 abgleichen

Anschließend wurden die Fluoreszenzwerte der Proben gemessen:

- Proben vor der Messung auf Raumtemperatur bringen
- Gerät mit 1,75 ml Farbstofflösung vor jeder Probenmessung auf 000 setzen
- 200 µl Zellprobe zu den 1,75 ml Farbstofflösung pipettieren, mischen, Deckel des Fluorometers schließen und relative Fluoreszenz ablesen
- Jede Probe wurde dreimal gemessen und daraus der Mittelwert bestimmt.

2.2.10 Zellbesiedelung der Biomaterialien

Es wurde ein Versuchsaufbau etabliert, der eine dreidimensionale Besiedelung der Knochenersatzmaterialien sowie die Integration eines Wachstumsfaktorgradienten innerhalb des Kultursystems ermöglichte.

Der Besiedelung der Prüfkörper musste ihre Inkubation in Leermedium über eine Woche vorangehen, um die aufgrund der Hydrophobie des Materials erschwerte Adhäsion der Zellen zu verbessern. Der Wachstumsfaktorgradient ging von einer sterilen Vliesstoffkompresse (NOBATOP8) am Boden der „well"-Platte aus, auf den der Wachstumsfaktor rhPDGF-BB pipettiert wurde (siehe Abb.12).

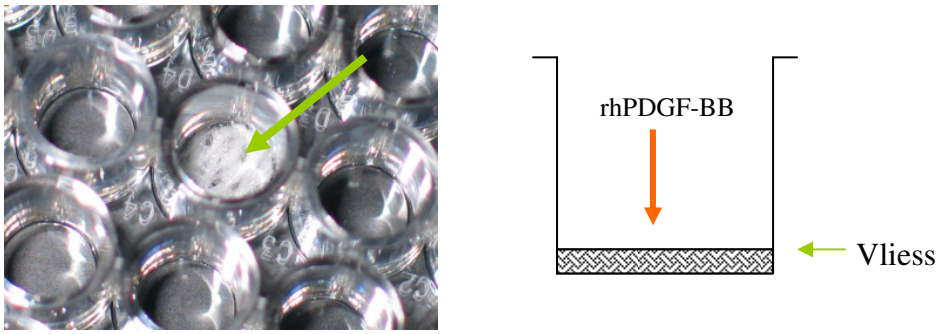


Abb.12: *„96-well"-Platte mit kreisrundem Vliessstoff (↗), der den Boden des Wells komplett bedeckt. Darauf werden 10µl des Wachstumsfaktor rhPDGF-BB (100ng/ml) pipettiert(↗). rhPDGF-BB= rekombinant humaner" Platelet Derived Growth Factor BB"*

Die Versuche mit den verschiedenen „Scaffolds“ wurden nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- Vliesstoffkompresse NOBATOP8 auf kreisrunde Form mit Durchmesser von 5 mm zuschneiden
- runde Vliesstoffe im Autoklaven bei 121°C und 1 bar Überdruck dampfsterilisieren
- je einen kreisförmigen Vliesstoff in ein „well“ einer „96-well“-Platte mit steriler Pinzette überführen (Abb.10)
- je nach Versuchsansatz 10 µl rhPDGF-BB (100 ng/ml) auf Vliesstoff pipettieren

Da die Prüfkörper im Zellkulturmedium Auftrieb erfuhren, wurden „96-well“-Platten verwendet, in denen die 5x5x5 mm großen Prüfkörper am Plattenboden fixiert blieben (siehe Abb.13).

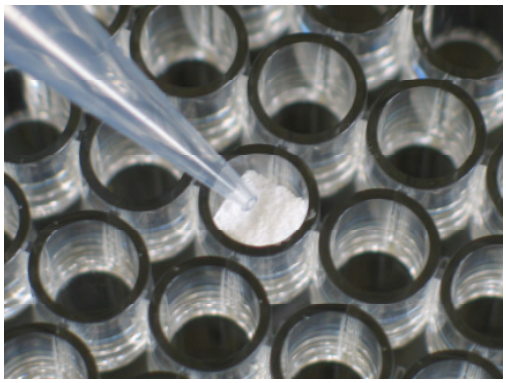


Abb.13: *In „well“ fixierter ITV-Prüfkörper. Auf den Vliessstoff wurde der Prüfkörper überführt und mit Zellen besiedelt. Er blieb auch nach Zugabe von Medium am Boden des „wells“ fixiert, da sein Diagonaldurchmesser dem „well“-Durchmesser entsprach. ITV= Institut für Textil- und Verfahrenstechnik.*

Bei der Besiedelung der Prüfkörper mit humanen MSZ bzw. humanen Osteoblasten wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

- Zellen trypsinieren entsprechend Kapitel 2 unter 2.2.1.3
- Zellzählung entsprechend Kapitel 2 unter 2.2.1.4 durchführen
- Zentrifugation der Zellsuspension bei 1000 g_n für 10 min.
- Zellpellet in Vollmedium resuspendieren; Menge an Vollmedium so bestimmen, dass 30 µl Zellsuspension 500000 Zellen enthalten
- je 30 µl Zellsuspension à 500000 Zellen auf Prüfkörper pipettieren
- Inkubation über 2 h bei 37 °C, 5 % CO_2 und 95 % Luftfeuchtigkeit
- 200 µl Voll- bzw. Differenzierungsmedium je nach Versuchsansatz hinzupipettieren
- Kultivierung bei 37 °C, 5 % CO_2 und 95 % Luftfeuchtigkeit für acht Tage

Prinzipiell wurden drei unterschiedliche Versuchsansätze durchgeführt (siehe Abb.14):

A) Kultivierung in Vollmedium ohne Zusatz von rhPDGF-BB

B) Kultivierung in Vollmedium mit Zusatz von 10µl rhPDGF-BB (100ng/ml)

C) Kultivierung in osteogenem Differenzierungsmedium mit 10µl rhPDGF-BB (100ng/ml)

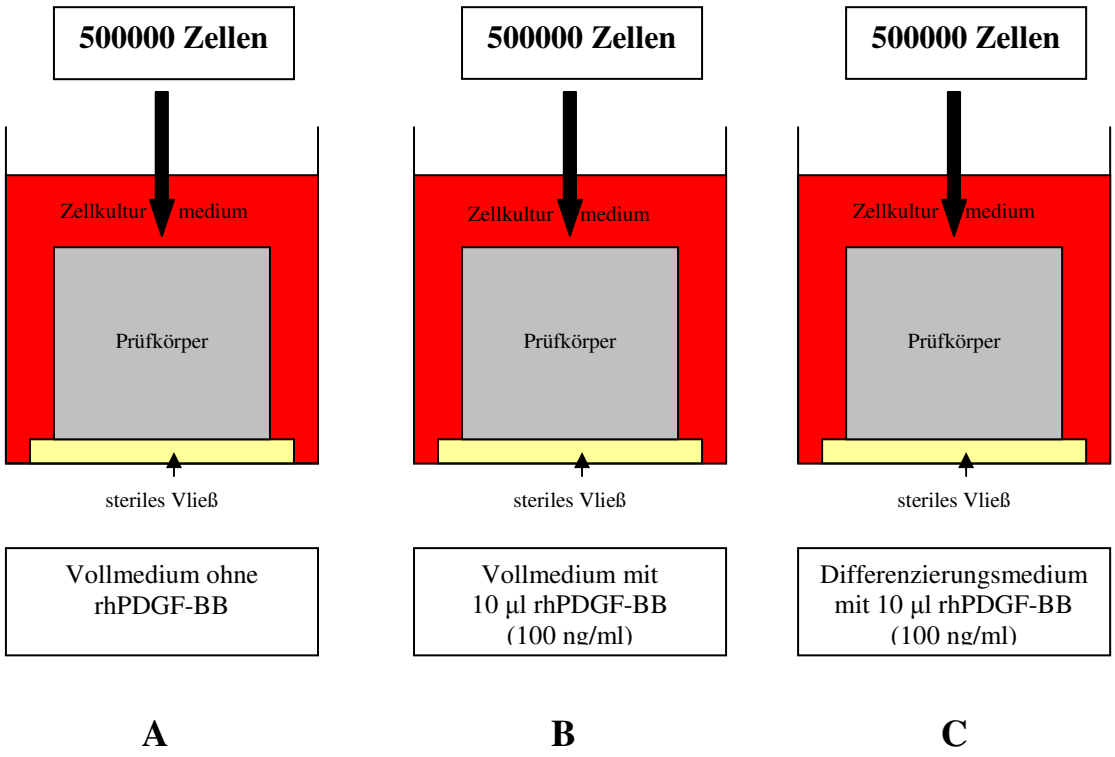


Abb.14: *Schematische Darstellung der verschiedenen Versuchsansätze.* ***A****) Kultivierung in Vollmedium ohne Zusatz von rhPDGF-BB,* ***B****) Kultivierung in Vollmedium mit Zusatz von 10 µl rhPDGF-BB (100 ng/ml),* ***C****) Kultivierung in osteogenem Differenzierungsmedium mit 10 µl rhPDGF-BB (100 ng/ml). rhPDGF-BB= rekombinant humaner „Platelet Derived Growth Factor BB“*

2.2.11 Toxizitätstest

Zur Analyse der Auswirkungen der neuartigen ITV-Knochenersatzmaterialien auf die Genexpression und die Vitalität der Zellen wurde ein Zellkulturmedium aus lysierten Prüfkörpern und Vollmedium hergestellt und humane MSZ darin kultiviert:

- Lysieren von drei Prüfkörpern in 200 µl Xylol
- Mischen der Xylol-Prüfkörper-Lösung mit 20 ml Vollmedium
- Kontrollmedium aus 200 µl Xylol und 20 ml Vollmedium herstellen
- Zellen trypsinieren entsprechend Kapitel 2 unter 2.2.1.3
- Zellzahlmessung durchführen entsprechend Kapitel 2 unter 2.2.1.4
- Zentrifugation bei 1000 g_n für 10 min.
- Resuspension des Zellpellet in Vollmedium
- 50000 Zellen pro „well“ in „12-well“-Platte pipettieren
- 1 ml Kontroll- bzw. Prüfkörpermedium pro „well“ hinzugeben
- Kultivierung über vier Tage bei 37 °C, 5 % CO_2 und 95 % Luftfeuchtigkeit
- Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität (siehe Kapitel 2, 2.2.1.4)
- Durchführung einer quantitativen “Realtime“-PCR (siehe Kapitel 2, 2.2.6)

2.2.12 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte ± Standardabweichungen dargestellt. Ein zweiseitiger Studentscher t-Test wurde durchgeführt, um statistisch signifikante Unterschiede zwischen experimentellen Bedingungen oder unterschiedlichen Zeitpunkten zu bestimmen. Ein Wert von $p< 0,05$ wurde als statistisch signifikant, $p< 0,01$ als statistisch hochsignifikant erachtet.

Zur Beurteilung des Einflusses der Hauptfaktoren „Zelltyp“ und „Prüfkörper“ wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse durchgeführt. Dabei stellte der Zelltyp den ersten Faktor dar, der in den Faktorstufen humane multipotente mesenchymale Stromazellen und humane Osteoblasten vorlag. Der zweite Einflussfaktor wurde durch die Kultivierung auf unterschiedlichen Prüfkörpern eingebracht in den Stufen Cerasorb-Konstrukte ohne Bohrung, Cerasorb-Konstrukte mit Bohrung, GB9N-Prüfkörper und ITV-Scaffolds. Durch Vergleich der Varianz der Beobachtungswerte innerhalb einer Faktorstufe und der Varianz der Mittelwerte zwischen den verschiedenen Faktorstufen wurde untersucht, ob die Faktoren einen signifikanten ($p<0,05$) bzw. hochsignifikanten ($p<0,01$) Einfluss auf die abhängige Variable (DNA-Menge und AP-Aktivität) ausüben.

3. Ergebnisse

3.1 Zellbesiedelung verschiedener Knochenersatzmaterialien mit humanen multipotenten mesenchymalen Stromazellen und humanen Osteoblasten

Es wurde ein Versuchsaufbau etabliert, der die dreidimensionale Besiedelung der verschiedenen Knochenersatzmaterialien ermöglichte. Die Besiedelung des vom ITV Denkendorf neu entwickelten Kompositmaterial aus PLLA und β-TCP mit Zellen erforderte eine längere Etablierungsphase für Versuchsaufbau und -durchführung, während die bereits in Anwendung befindlichen Knochenersatzmaterialien Cerasorb, GB9N-Glaskeramik und α-TCP gute Bedingungen bezüglich der Besiedelbarkeit lieferten.
Es wurde bei der Besiedelung aller Knochenersatzmaterialien nach demselben Versuchsprotokoll vorgegangen (siehe 2.2 unter 2.2.10).
Aufgrund der hydrophoben Oberfläche des neuen Knochenersatzmaterials, das die Adhäsion der in Medium suspendierten Zellen erschwerte, wurden die Prüfkörper vor Besiedelung eine Woche in Leermedium inkubiert. Eine Verbesserung der Adhäsion sollte zudem dadurch erzielt werden, dass die besiedelten Prüfkörper zwei Stunden inkubiert wurden, bevor das Kultivierungsmedium hinzu gegeben wurde.
Die Konstrukte des ITV Denkendorf erfuhren im Zellkulturmedium Auftrieb, so dass sie an der Oberfläche der Flüssigkeit schwammen. Um diese Eigenschaft, die durch das Vorliegen von Luftbläschen im Inneren der „Scaffolds“ erklärbar ist, zu kompensieren, wurden „96-well“-Platten für den Versuchsaufbau verwendet. Die würfelförmigen Konstrukte blieben am Boden der „well“-Platten, weil die Länge ihrer Diagonalen dem Durchmesser des „wells“ entsprach und sie somit durch die Seitenwände der „wells“ fixiert waren.
Auf einem Vliesstoff am Boden des „well“ wurden 10 µl des Wachstumsfaktors rhPDGF-BB (100 ng/ml) pipettiert. Durch die davon ausgehende absteigende Konzentration von rhPDGF-BB konnte in den jeweiligen „wells“ ein Wachstumsfaktorgradient etabliert werden. Dieser sollte in der Zellpopulation eine chemotaktische Migration, Proliferation und osteogene Differenzierung induzieren.

Die „Scaffolds“ wurden mit humanen Osteoblasten und multipotenten mesenchymalen Stromazellen (MSZ) verschiedener Passagen besiedelt (siehe Abb.15).

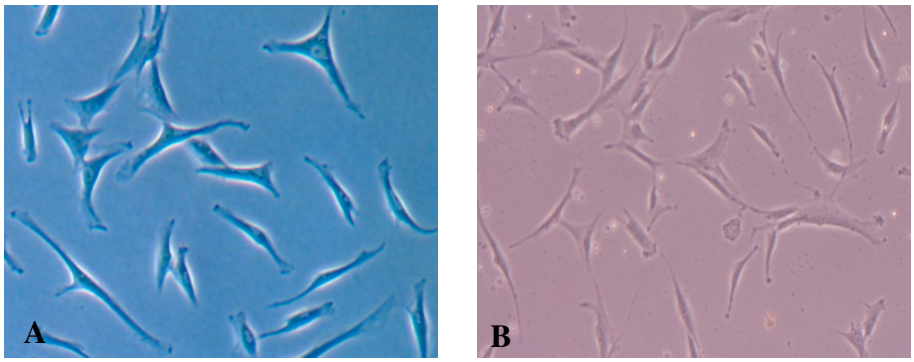


Abb.15: Zellmorphologie humaner multipotenter mesenchymaler Stromazellen (A) und humaner Osteoblasten (B). *Vor ihrer Besiedelung auf unterschiedliche Knochenersatzmaterialien wurden die Zellen in Vollmedium kultiviert.*

3.1.1 Gen- und Proteinexpression von osteogenen, Proliferations- und Apoptosemarkern

Die Genexpressionsanalyse von osteogenen, Proliferations- und Apoptosemarkern in RT-PCRs wurde herangezogen, um Differenzierbarkeit, Proliferation und Biokompatibilität der verschiedenen Knochenersatzmaterialien zu evaluieren.

Die Genexpression von Runx-2 (="runt-related transcription factor" 2), alkalischer Phosphatase (AP) und Osteocalcin (OC) weist auf das Stadium der osteogenen Differenzierung der kultivierten Zellen hin. Der Transkriptionsfaktor Runx-2 und das Enzym AP werden im Stadium der osteogenen Matrixsynthese vermehrt exprimiert, während die Expression von OC auf die Initiation von Mineralisierungsprozessen hindeutet. Eine Bestimmung der Expression des Histons H4 sollte Aufschluss über Anstieg, Stagnation oder Reduktion der Zellzahl nach Kultivierung auf den unterschiedlichen „Scaffolds" geben. Das Tumorsuppressorprotein p53 verhindert bei Vorliegen von DNA-Schäden einen Übergang der Zelle in die S-Phase des Zellzyklus und aktiviert pro-apoptotische Signalkaskaden. Seine Genexpression korreliert mit der Induktion von Apoptose. In einigen RT-PCRs wurde die Expression weiterer Gene untersucht, die in Zellen pro- oder antiapoptotische Prozesse induzieren. Die vermehrte Genexpression der Proto-Onkogene Bax und c-Myc weist auf verstärkte Transduktion in Apoptose einleitenden Signalkaskaden hin. Die Proto-Onkogene Bcl-2 und c-Fos fördern anti-apoptotische Prozesse bzw. verhindern die Aktivierung Apoptose induzierender Caspasen.

Die Bestimmung der Alkalischen Phosphatase-Enzymaktivität (AP-Aktivität) sollte auf Proteinebene Aufschluss über den Differenzierungsstatus der kultivierten Zellen geben.

Nach Besiedelung der neu entwickelten ITV-Prüfkörper aus β-TCP und PLLA mit humanen multipotenten mesenchymalen Stromazellen und achttägiger Kultivierung konnte selbst unter Wachstumsfaktorstimulus in osteogenem Differenzierungsmedium keine Expression von Osteocalcin und Alkalischer Phosphatase induziert werden. Die Expression von Runx-2 ging, verglichen mit dem Zeitpunkt t_0 bevor die Zellen auf den „Scaffold" überführt wurden, zurück. H4 wurde schwächer exprimiert, was auf eine Verringerung der Zellzahl schließen lässt. Die Expression von p53 nahm zu, wodurch eine verstärkte Apoptose angezeigt wurde (siehe Abb.16).

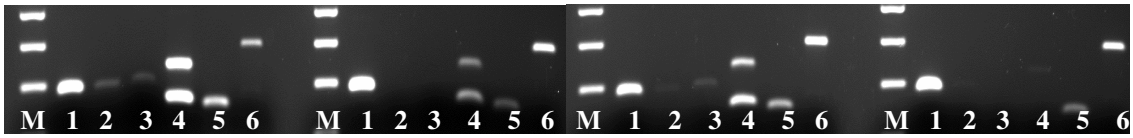


Abb.16: Expression osteogener, Proliferations- und Apoptosemarker in multipotenten mesenchymalen Stromazellen nach Kultivierung auf ITV-Knochenersatzmaterialien über acht Tage.
Die Expression der osteogenen Marker alkalische Phosphatase und Osteocalcin konnte in keinem der verschiedenen Versuchsansätze auf den ITV-„Scaffolds" in multipotenten mesenchymalen Stromazellen induziert werden (B: Vollmedium ohne Stimulus, C: Vollmedium mit rhPDGF-BB, D: osteogenes Differenzierungsmedium mit rhPDGF-BB). Die Expression des osteogenen Transkriptionsfaktors Runx-2 ging im Vergleich zum Zeitpunkt t_0 (A) zurück. Außerdem wurde H4 als Zellzahlmarker vermindert und p53 als Apoptosemarker verstärkt exprimiert. Genexpression von 1= Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH); 2= Alkalische Phosphatase (AP); 3= Osteocalcin (OC); 4=Runx-2; 5= Histon 4 (H4); 6= p53; M=100bp-Marker; rhPDGF-BB= rekombinant humaner „Platelet Derived Growth Factor"; ITV= Institut für Textil- und Verfahrenstechnik. EtBr-gefärbte 2%ige Agarose-Gele

Differenzierte MSZ (dMSZ), die vor Kultivierung auf dem neuen Knochenersatzmaterial AP, OC und Runx-2 exprimierten, dedifferenzierten und reduzierten bzw. arretierten die Expression osteogener Marker. Die Zugabe von rhPDGF-BB und osteogenem Differenzierungsmedium als proliferative und osteogene Stimuli konnte keine AP- und OC-Expression induzieren. Die konstante H4-Expression lies auf keine Änderung der Zellzahl pro Prüfkörper schließen. Die Expression von p53 war unverändert im Vergleich zum Status vor Versuchsbeginn (siehe Abb.17).

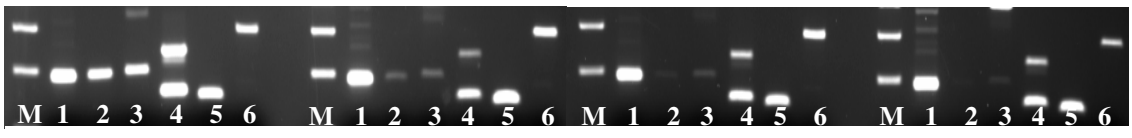


Abb.17: Differenzierungs- und Proliferationsstatus von differenzierten mesenchymalen Stromazellen vor (A) und nach Kolonisation auf den neuen ITV-Prüfkörpern ohne Stimulus (B), mit rhPDGF-BB (C) oder mit rhPDGF-BB und osteogenem Differenzierungsmedium (D).
Vor Besiedelung auf die ITV-Konstrukte exprimierten dMSZ die osteogenen Marker AP, OC und Runx-2 (A). Nach achttägiger Kultivierung auf den neuartigen „Scaffolds" aus Poly-L-Laktid und β-Trikalziumphosphat stellten die Zellen die Expression von AP und OC ein, während sich auch die Runx-2-Expression reduzierte. Die H4-Expression ging zurück, was auf eine Reduktion der Zellzahl hindeutete. Das Gen p53 wurde auf konstantem Niveau weiter exprimiert. 1= Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH); 2= Alkalische Phosphatase (AP); 3= Osteocalcin (OC); 4= Runx-2; 5= Histon 4 (H4); 6= p53; M=100bp-Marker; rhPDGF-BB= rekombinant humaner „Platelet Derived Growth Factor"; ITV= Institut für Textil- und Verfahrenstechnik. EtrBr-gefärbte 2%ige Agarose-Gele.

Das Genexpressionsmuster humaner Osteoblasten nach Kultivierung auf den neu entwickelten Prüfkörpern im Vergleich zu dem vor Versuchsbeginn zeigte, dass die osteogenen Marker unter Wachstums- und Differenzierungsfaktorstimulus in den Zellen weiter transkribiert wurden. Ohne osteogene Zusätze war ein Rückgang der Expression der osteogenen Markergene erkennbar. Die Expression des Zellzahlmarkers H4 ging bei Kultivierung auf den Konstrukten aus PLLA und β-TCP erneut zurück. Bei Stimulation mit Wachstumsfaktor in Vollmedium oder osteogenem Differenzierungsmedium wurde der Apoptosemarker p53 vermehrt exprimiert. Im Versuchsansatz mit reinem Vollmedium trat keine Veränderung im Vergleich zum Zeitpunkt t_0 auf (siehe Abb.18).

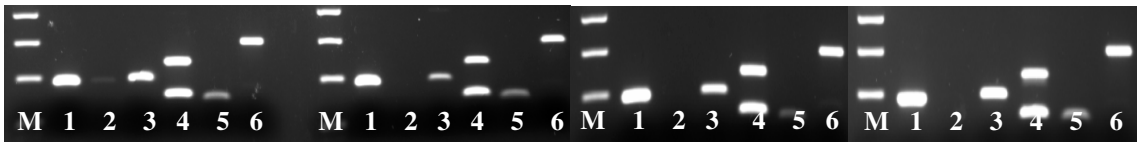


Abb.18: Genexpressionsmuster osteogener, Proliferations- und Apoptosemarker in humanen Osteoblasten nach Besiedelung und achttägiger Kultivierung auf ITV-Konstrukten im Vergleich zum Zeitpunkt t_0 (A) vor Besiedelung.

Unter rhPDGF-BB (C) bzw. rhPDGF-BB und osteogenem Differenzierungsmedium (D) blieb die Expression der osteogenen Marker OC und Runx-2 im Vergleich zum Zeitpunkt t_0 (A) stabil. Ohne osteogene Zusätze (B) wurden weniger RT-PCR-Produkte von OC und Runx-2 in den Agarose-Gelen detektierbar. H4 als Zellzahlmarker wurde nach Kultivierung auf den Knochenersatzmaterialien vermindert exprimiert. In den Versuchsansätzen mit proliferativen und osteogenen Stimuli konnte p53 als Apoptose-induzierender Faktor verstärkt nachgewiesen werden. 1= Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH); 2= Alkalische Phosphatase (AP); 3= Osteocalcin (OC); 4= Runx-2; 5= Histon 4 (H4); 6= p53; M=100bp-Marker; rhPDGF-BB= rekombinant humaner „Platelet Derived Growth Factor"; ITV= Institut für Textil- und Verfahrenstechnik. EtBr-gefärbte 2%ige Agarose-Gele.

Der Differenzierungsstatus humaner multipotenter mesenchymaler Stromazellen, differenzierter MSZ und humaner Osteoblasten auf den neu entwickelten Konstrukten wurde durch Bestimmung der Alkalischen Phosphatase-Aktivität (AP-Aktivität) auf Proteinebene in einem parallel durchgeführten Versuch untersucht.

Multipotente mesenchymale Stromazellen zeigten in Vollmedium mit rhPDGF-BB (0,03±0,04 IU/µg) sowie in osteogenem Differenzierungsmedium mit rhPDGF-BB (0,02±0,02 IU/µg) eine nicht signifikante Abnahme der AP-Aktivität verglichen mit dem Wert im Versuchsansatz ohne Stimulation (0,04±0,03 IU/µg) (n=3).

Bei differenzierten MSZ konnte durch die Zugabe von rhPDGF-BB in Vollmedium eine nicht signifikante Zunahme der AP-Aktivität von 0,03±0,02 IU/µg auf 0,04±0,04 IU/µg induziert werden. In osteogenem Differenzierungsmedium ging sie auf 0,03±0,02 IU/µg zurück (n=7).

Humane Osteoblasten steigerten die Enzymaktivität des osteogenen Markerenzyms unter Kultivierung mit rhPDGF-BB und osteogenem Differenzierungsmedium von 0,04±0,02

IU/µg in Vollmedium und 0,03±0,02 IU/µg in Vollmedium mit rhPDGF-BB auf 0,05±0,03 IU/µg (n=4). Die Unterschiede erreichten das Signifikanzniveau ($p<0,05$) nicht.

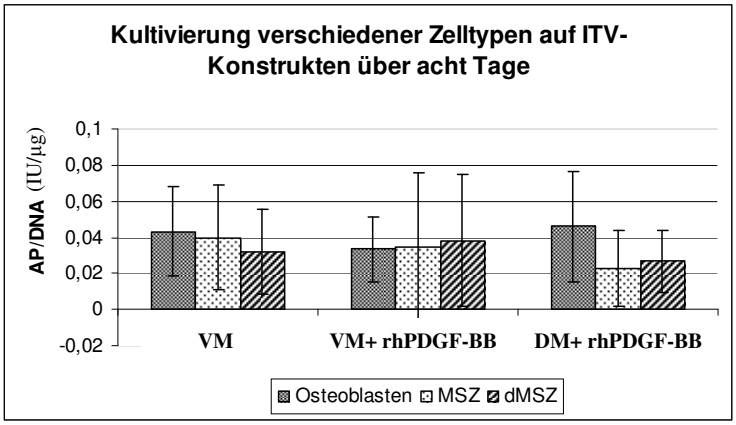


Abb.19: AP-Aktivität/DNA-Menge in Osteoblasten, MSZ und differenzierten MSZ nach achttägiger Kultivierung auf den neuen Knochenersatzmaterialien.
Bei Messung der AP-Aktivität waren keine signifikanten Unterschiede ($p<0,05$) zwischen den verschiedenen Versuchsansätzen bzw. Zelltypen nachweisbar. Osteoblasten zeigten einen Anstieg der AP-Aktivität bei Zugabe von rhPDGF-BB und osteogenem Differenzierungsmedium (n=4, MW±SD). MSZ wiesen sowohl unter rhPDGF-BB als auch in osteogenem Differenzierungsmedium eine geringere Enzymaktivität auf als in der Kultur ohne Stimulus (n=3, MW±SD). DMSZ zeigten bei Kultivierung in Vollmedium mit rhPDGF-BB die höchste AP-Aktivität (n=7, MW±SW). AP= Alkalische Phosphatase; VM= Vollmedium; DM= osteogenes Differenzierungsmedium; rhPDGF-BB= rekombinant humaner „Platelet Derived Growth Factor"; MSZ= multipotente mesenchymale Stromazellen; dMSZ= differenzierte mesenchymale Stromazellen; ITV= Institut für Textil- und Verfahrenstechnik

Zum Vergleich wurden Versuche und Analysen mit etablierten Knochenersatzmaterialien durchgeführt.

Cerasorb-„Scaffolds" aus β-TCP mit und ohne Bohrung wurden im gleichen Versuchsaufbau wie die ITV-Materialien mit humanen multipotenten mesenchymalen Stromazellen verschiedener Passagen und humanen Osteoblasten besiedelt und acht Tage kultiviert.

Undifferenzierte MSZ, die vor ihrer Kolonisation auf dem Knochenersatzmaterial Runx-2, aber weder AP noch OC exprimierten, wiesen nach Kultvierung auf den β-TCP-Konstrukten mit Bohrung RT-PCR-Produkte von OC in den Agarose-Gelen auf. Diese osteogene Differenzierung wurde in allen Versuchsansätzen mit und ohne proliferative und osteogene Stimuli induziert. Die Expression des Zellzahlmarkers H4 zeigte nach Kultivierung auf den Cerasorb-Konstrukten eine stärkere Ausprägung als vor Versuchsbeginn. Die pro-apoptotisch wirkenden Gene p53 und c-Myc wurden auf den β-TCP-„Scaffolds" vermehrt exprimiert, während das ebenfalls Apoptose-induzierende Gen Bax keine Expressionsänderung aufwies. Der Anti-Apoptosemarker Bcl-2 zeigte eine Zunahme der Expression, was auf eine Inhibition apoptotischer Signaltransduktionswege hindeutete. Die Transkription des „early response gene" c-Fos, das ebenfalls anti-apoptotisch Wirkung aufweist und als Pro-

liferationsmarker der frühen Phase der osteogenen Differenzierung gilt, wurde eingestellt (siehe Abb.20).

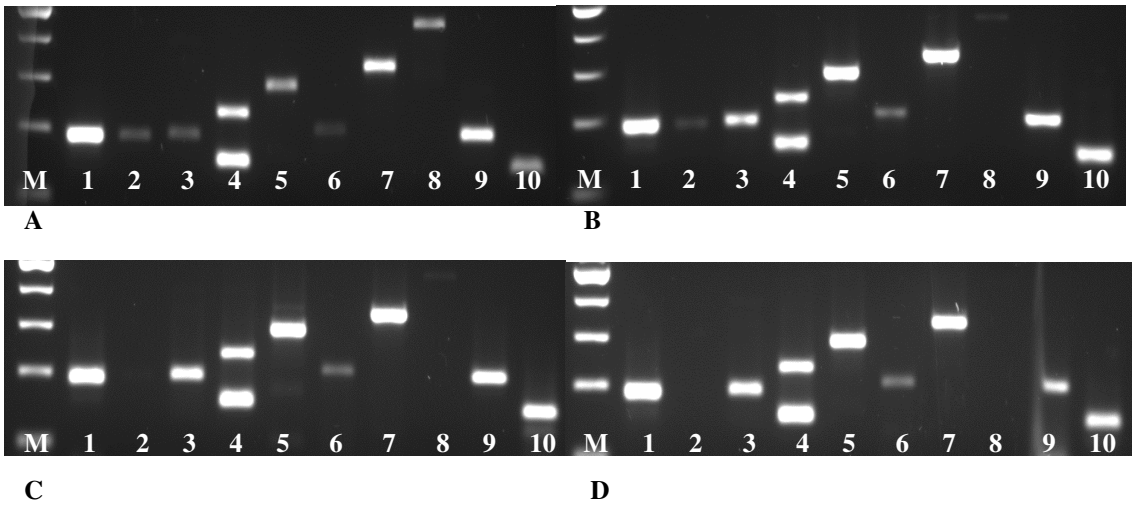


Abb.20: Genexpressionsmuster osteogener, Proliferations- und Apoptosemarker in multipotenten mesenchymalen Stromazellen nach Kolonisation auf Cerasorb-Konstrukten.
MSZ (A) wurden auf Cerasorb (β-Trikalziumphosphat)-Konstrukten in Vollmedium ohne osteogenen Zusatz (B), in Vollmedium mit rhPDGF-BB (C) und in osteogenem Differenzierungsmedium mit rhPDGF-BB (D) kultiviert. In allen Versuchsansätzen (B, C, D) setzte eine osteogene Differenzierung ein, die vor Versuchsbeginn (A) nicht nachweisbar war. Die Runx-2-Expression zeigte keine Veränderung. Die apoptotisch wirkenden Gene p53 und c-Myc wurden nach Besiedelung vermehrt exprimiert. Die Expression des Apoptose induzierenden Gens Bax blieb konstant. Bcl-2 als anti-apoptotischer Marker war nach Versuchsende vermehrt nachweisbar. Die Expression des proliferativ wirkenden Gens c-Fos lag unterhalb der Detektionsgrenze. 1= Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH); 2= Alkalische Phosphatase (AP); 3= Osteocalcin (OC); 4= Runx-2; 5= p53; 6= Bcl-2; 7= c-Myc; 8= c-Fos; 9= Bcl-2-assoziiertes X-Protein (Bax); 10= Histon4 (H4); M=100bp-Marker; rhPDGF-BB= rekombinant humaner „Platelet Derived Growth Factor". EtBr-gefärbte 2%ige Agarose-Gele.

AP-exprimierende, differenzierte MSZ wiesen nach Kultivierung auf Cerasorb-Prüfkörpern weiter mRNA von alkalischer Phosphatase auf. Die Osteocalcin-Expression nahm in den Versuchsansätzen mit und ohne osteogene und proliferative Stimuli zu. Runx-2 wurde auf konstantem Niveau weiter transkribiert. Der Zellzahlmarker H4 wurde verglichen mit dem Status in den Zellen vor Besiedelung unter dem Einfluss von rhPDGF-BB auf den „Scaffolds" vermehrt exprimiert. Bei den Apoptosemarkern p53, c-Myc und Bax war keine Änderung bezüglich der Genexpression nachweisbar. Die Expression des anti-apoptotisch wirkenden Oncogens Bcl-2 nahm zu, während die von c-Fos unterhalb der Detektionsgrenze lag (siehe Abb.21).

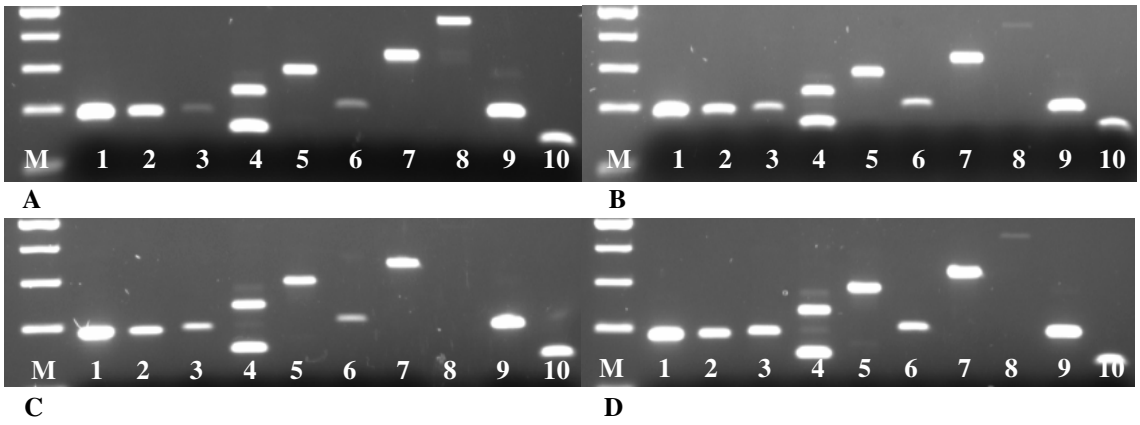


Abb.21: Genexpression von osteogenen, Proliferations- und Apoptosemarkern in differenzierten MSZ vor (A) und nach Kultivierung auf Cerasorb-Prüfkörpern ohne Stimuli (B), mit rhPDGF-BB (C) sowie mit rhPDGF-BB in osteogenem Differenzierungsmedium (D).

Die AP-Expression blieb konstant und eine OC-Expression wurde induziert. Die RT-PCR-Produkte in den Agarose-Gelen deutete auf eine Progression der osteogenen Differenzierung unter den osteogenen und proliferativen Stiumuli (C, D) hin. Runx-2 wurde auf konstantem Niveau weiter exprimiert. Die H4-Bande war nach Kultivierung in rhPDGF-BB und Vollmedium (C) und in rhPDGF-BB und osteogenem Differenzierungsmedium (D) stärker ausgeprägt als in Vollmedium ohne Zusätze (B), was auf eine Erhöhung der Zellzahl hindeutete. P53, c-Myc und Bax als Apoptosemarker zeigten keine Änderung der Genexpression. Bcl-2 wurde vermehrt exprimiert, während c-Fos nach Versuchsende in der RT-PCR nicht mehr nachweisbar war. (1= Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH); 2= Alkalische Phosphatase (AP); 3= Osteocalcin (OC); 4= Runx-2; 5= p53; 6= Bcl-2; 7= c-Myc; 8= c-Fos; 9= Bcl-2-assoziiertes X-Protein (Bax); 10= Histon4 (H4); M=100bp-Marker; rhPDGF-BB= rekombinant humaner „Platelet Derived Growth Factor"; MSZ= multipotente mesenchymale Stromazellen. EtBr-gefärbte 2%ige Agarose-Gele.

Humane Osteoblasten zeigten nach Kultivierung auf den Cerasorb-Konstrukten wenig Veränderung in ihrem Genexpressionsmuster. Die osteogenen Marker AP, OC und Runx-2 waren vor und nach Besiedelung in allen Versuchsansätzen deutlich nachweisbar. Die H4-Expression blieb auf konstant hohem Niveau, woraus Rückschlüsse auf die Zellzahl gemacht werden können. Die RT-PCR-Produkte der apoptotisch wirkenden Oncogene p53, c-Myc und Bax blieben nach Versuchsende in den Agarosegelen nachweisbar. Die Expression des Anti-Apoptosemarkers Bcl-2 stieg an, während c-Fos, als ebenfalls anti-apoptotisch wirkendes Gen der frühen osteogenen Differenzierung, weder vor noch nach Kultivierung auf den „Scaffolds" nachweisbar war (siehe Abb.22).

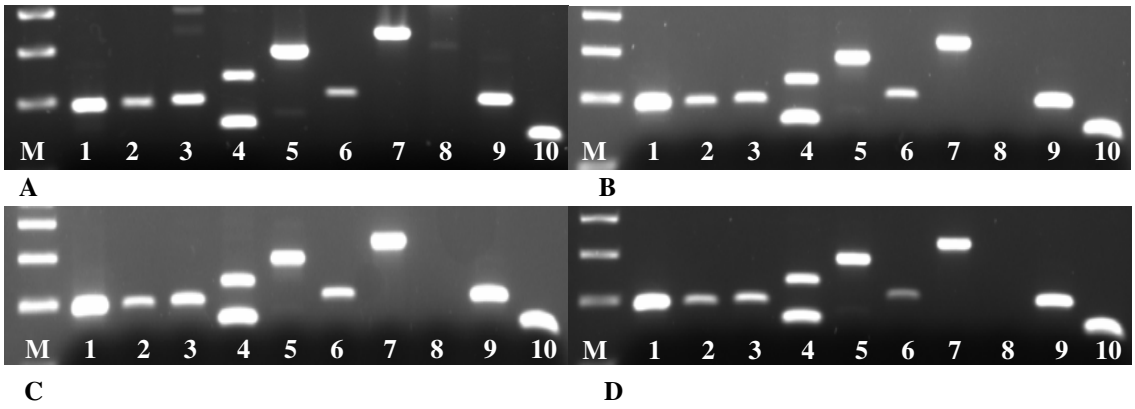


Abb.22: Bestimmung der Genexpression osteogener, Proliferations- und Apoptosemarker in humanen Osteoblasten vor (A) und nach Kolonisation auf Cerasorb-Konstrukten ohne Stimuli (B), mit rhPDGF-BB (C) und mit rhPDGF-BB in osteogenem Differenzierungsmedium (D).

Nach Kultivierung humaner Osteoblasten auf den Cerasorb-Prüfkörpern waren die RT-PCR-Produkte von AP, OC und Runx-2 stark ausgeprägt nachweisbar. Die Zugabe von rhPDGF-BB in Vollmedium (C) bzw. in osteogenes Differenzierungsmedium (D) erbrachte keine Veränderung im Vergleich zur Kultivierung in reinem Vollmedium (B). Die H4-Expression war gleich bleibend hoch. Die Apoptose-induzierenden Gene p53, c-Myc und Bax wurden vor und nach Besiedelung exprimiert. Das anti-apoptotisch wirkende Gen Bcl-2 wurde nach Kultivierung vermehrt exprimiert. Die c-Fos-Expression war vor und nach dem Versuch unterhalb der Detektionsgrenze. 1= Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH); 2= Alkalische Phosphatase (AP); 3= Osteocalcin (OC); 4= Runx-2; 5= p53; 6=Bcl-2; 7= c-Myc; 8= c-Fos; 9= Bcl-2-assoziiertes X-Protein (Bax); 10= Histon4 (H4); M=100bp-Marker; rhPDGF-BB= rekombinant humaner „Platelet Derived Growth Factor". EtBr-gefärbte 2%ige Agarose-Gele.

Die AP-Aktivität multipotenter mesenchymaler Stromazellen bezogen auf die DNA-Menge zeigte auf den Cerasorb-Gerüsten mit Bohrung kaum signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Kultivierungsbedingungen und Zelltypen.

Unter Stimulation mit rhPDGF-BB in Vollmedium kam es bei MSZ zu einem Anstieg der AP-Aktivität von 0,03±0,02 IU/µg in reinem Vollmedium ohne Zusatz auf 0,035±0,01 IU/µg. Der Einfluss von osteogenem Differenzierungsmedium bewirkte eine weitere Zunahme auf 0,04±0,01 IU/µg. Die Unterschiede erreichten das Signifikanzniveau ($p<0,05$) nicht. Auf den Cerasorb-Konstrukten ohne Bohrung konnte unter rhPDGF-BB in Vollmedium für MSZ eine signifikante Reduktion der AP-Aktivität von 0,02±0,01 IU/µg auf 0,01±0,005 IU/µg ($p=0,01$) nachgewiesen werden. Die AP-Aktivität von MSZ, die in Gegenwart von rhPDGF-BB und osteogenem Differenzierungsmedium auf den soliden Cerasorb-„Scaffolds" kultiviert wurden, lag bei 0,01±0,002 IU/µg. Der Unterschied zum Versuchsansatz ohne Stimuli erreichte hierbei das Signifikanzniveau ($p<0,05$) nicht ($p=0,09$).

Die Zugabe von rhPDGF-BB und Vollmedium induzierte bei Osteoblasten auf den Cerasorb-„Scaffolds" mit Bohrung einen Rückgang der AP-Aktivität von 0,04±0,01 IU/µg auf 0,03±0,01 IU/µg. Unter proliferativen und osteogenen Stimuli stieg sie auf 0,05±0,02 IU/µg an. Im Versuchsansatz mit Osteoblasten konnte kein Wert für den Ansatz mit Vollmedium ohne Wachstumsfaktor auf dem Prüfkörper ohne Bohrung bestimmt werden. Die

Zugabe von osteogenem Differenzierungsmedium führte hier zu einem Rückgang der Enzymaktivität von 0,04±0,01 IU/µg auf 0,02±0,001 IU/µg. Keiner dieser beschriebenen Differenzen erreichte das Signifikanzniveau ($p<0,05$).

Osteoblasten synthetisierten in nahezu allen Versuchsansätzen mehr alkalische Phosphatase als MSZ. Bei den Cerasorb-Konstrukten ohne Bohrung war der Unterschied in der AP-Aktivität zwischen MSZ und Osteoblasten in den Ansätzen mit Wachstumsfaktorstimulus statistisch signifikant ($p=0,04$). Bei Kultivierung in osteogenem Differenzierungsmedium unterschied sie sich auf hoch signifikantem Niveau ($p=0,01$).

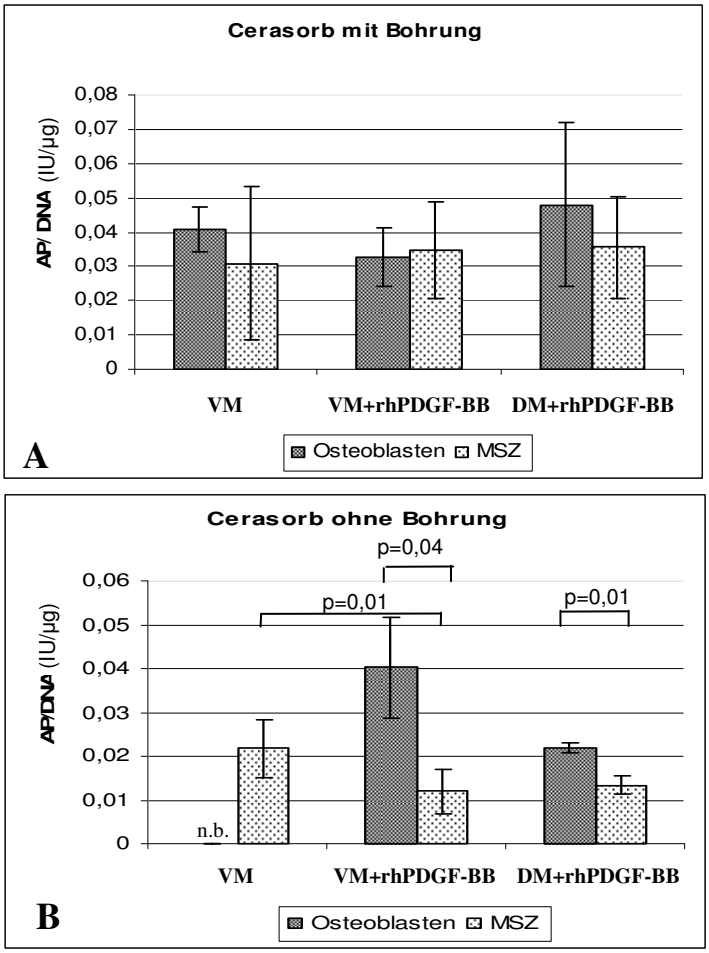


Abb.23: AP-Aktivität in Osteoblasten und MSZ auf Cerasorb-Konstrukten mit (A) und ohne Bohrung (B). *Bei der Bestimmung der AP-Aktivität von Osteoblasten und MSZ auf den Cerasorb-„Scaffolds" mit Bohrung zeigten sich zwischen den verschiedenen Kultivierungsbedingungen und Zelltypen keine signifikanten Unterschiede ($p>0,05$). Auf den Konstrukten ohne Bohrung wurde in MSZ durch die Zugabe von rhPDGF-BB in Vollmedium ein signifikanter Rückgang der AP-Aktivität induziert ($p=0,01$). Auf den Cerasorb-Prüfkörpern ohne Bohrung konnten zudem in Osteoblasten unter Wachstumsfaktorstimulus signifikant bzw. hochsignifikant höhere AP-Aktivitäten nachgewiesen werden als in MSZ. (n=3, MW±SD). n.b.= nicht bestimmbar; AP= Alkalische Phosphatase; VM= Vollmedium; DM= osteogenes Differenzierungsmedium; MSZ= multipotente mesenchymale Stromazellen; rhPDGF-BB= rekombinant humaner „Platelet Derived Growth Factor".*

Zudem wurden Knochenersatzmaterialien aus α-TCP zum Vergleich herangezogen und in einem identischen Versuchsansatz untersucht.

MSZ nach Kultivierung auf α-TCP-„Scaffolds“ stellten im Versuchsansatz ohne proliferative und osteogene Stimuli die Expression der osteogenen Marker AP und OC ein. Runx-2 wurde weiter exprimiert. Unter dem Einfluss der Wachstums- und Differenzierungsfaktoren konnte die osteogene Differenzierung aufrecht erhalten bzw. verstärkt werden, was am Nachweis von RT-PCR-Produkten von AP, OC und Runx-2 in den Agarose-Gelen erkennbar war. Die Expression des Zellzahlmarkers H4 und der Apoptosemarker p53, c-Myc und Bax ging in Vollmedium zurück. Bei Zugabe des Wachstumsfaktors blieb sie konstant. Die Expression der anti-apoptotisch wirkenden Gene Bcl-2 und c-Fos lag in allen Versuchsansätzen nach acht Tagen unter der Detektionsgrenze (siehe Abb.24).

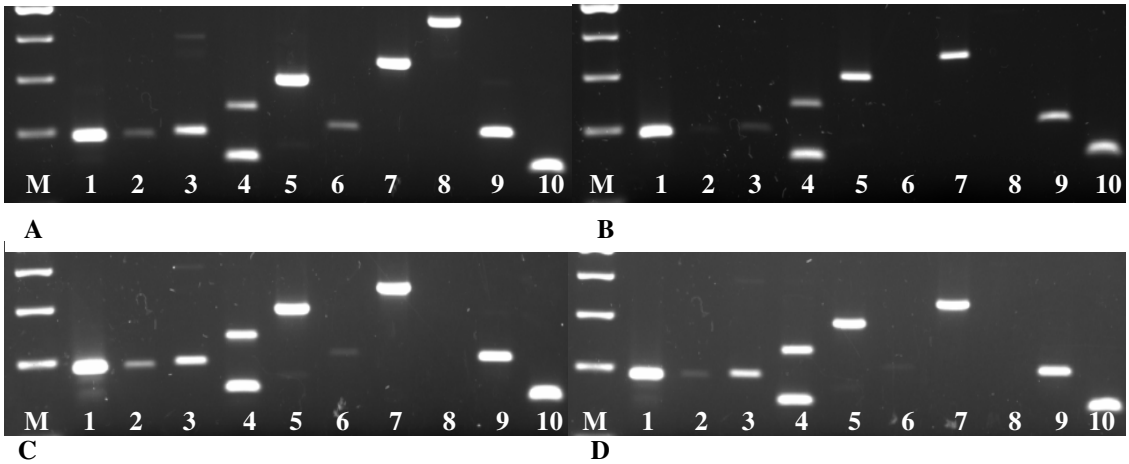


Abb.24: Genexpressionsmuster von osteogenen, Proliferations- und Apoptosemarker in multipotenten mesenchymalen Stromazellen vor (A) und nach Kultivierung auf α-TCP (Trikalziumphosphat) ohne Stimuli (B), mit rhPDGF-BB (C) und mit rhPDGF-BB in osteogenem Differenzierungsmedium (D).
Die AP- und OC-Expression, die vor Versuchsbeginn nachweisbar war (A), lag in MSZ nach Kolonisation auf α-TCP in Vollmedium (B) unterhalb der Detektionsgrenze. Unter rhPDGF-BB in Vollmedium (C) und in osteogenem Differenzierungsmedium (D) sind AP- und OC-Expression induzierbar. Die Expression von Runx-2 war unter allen Kultivierungsbedingungen nachweisbar. Die RT-PCR-Produkte des Zellzahlmarkers H4 waren in Vollmedium ohne Zusätze (B) vermindert, unter Wachstumsfaktorstimulus (C, D) verstärkt in den Agarose-Gelen nachweisbar. Die Apoptosemarker p53, c-Myc und Bax wurden auf α-TCP in allen Versuchsansätzen exprimiert. Die Expression der Anti-Apoptosemarker Bcl-2 und c-Fos war vor Versuchsbeginn in der RT-PCR nachweisbar. Nach Versuchsende lag sie unterhalb der Detektionsgrenze. 1= Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH); 2= Alkalische Phosphatase (AP); 3= Osteocalcin (OC); 4= Runx-2; 5= p53; 6= Bcl-2; 7= c-Myc; 8= c-Fos; 9= bcl-2-assoziiertes X-Protein (Bax); 10= Histon4 (H4); M=100bp-Marker; MSZ= multipotente mesenchymale Stromazellen; rhPDGF-BB= rekombinant humaner „Platelet Derived Growth Factor“. EtBr-gefärbte 2%ige Agarose-Gele.

Die osteogene Differenzierung humaner Osteoblasten konnte auf α-TCP unter rhPDGF-BB in osteogenem Differenzierungsmedium aufrechterhalten werden. In dem Versuchsansatz ohne osteogene Stimuli war ein Rückgang der AP-, OC- und Runx-2-Expression zu beobachten. Bei Kultivierung ohne Wachstumsfaktor ging die Zellzahl zurück, was an der verminderten H4-Expression erkennbar war. Unter Stimulation mit rhPDGF-BB nahm sie zu. Der Apoptosemarkers p53 war in allen Versuchsansätzen nachweisbar. Die Expression der Apoptosemarker c-Myc und Bax reduzierte sich bei den auf α-TCP kultivierten Zellen.

Bcl-2 und c-Fos als Anti-Apoptosemarker wurden vor Besiedelung in den Zellen exprimiert. Nach Versuchsende konnten in den Agarose-Gelen keine RT-PCR-Produkte von Bcl-2 und c-Fos detektiert werden (siehe Abb.25).

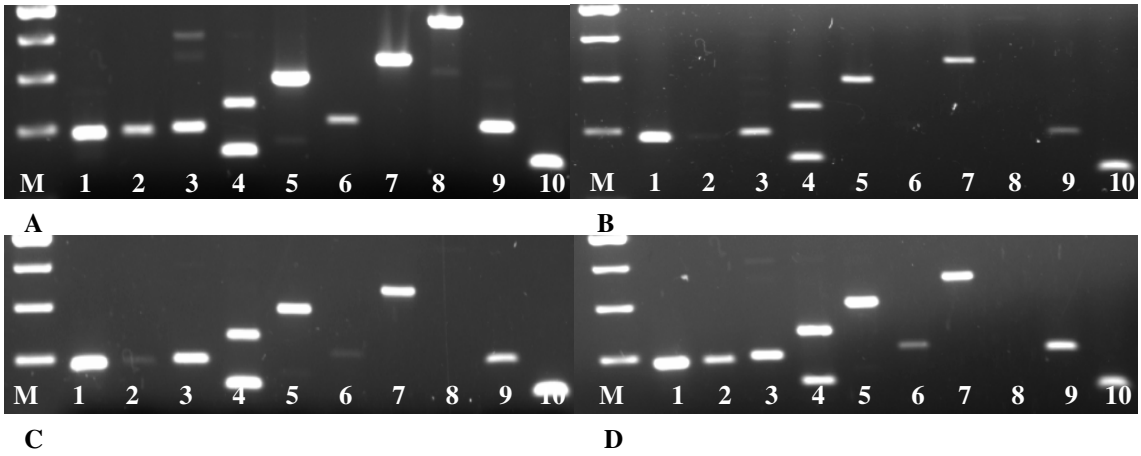


Abb.25: Genexpressionsmuster osteogener, Proliferations- und Apoptosemarker in humanen Osteoblasten vor (A) und nach Kultivierung auf α-TCP (Trikalziumphosphat) ohne Stimuli (B), mit rhPDGF-BB (C) und mit rhPDGF-BB in osteogenem Differenzierungsmedium (D).

Humane Osteoblasten, die vor ihrer Besiedelung auf α-TCP AP, OC und Runx-2 exprimierten (A), reduzierten die Expression der osteogenen Marker bei Kultivierung in Vollmedium (B). Unter Einfluss des Wachstumsfaktors in Voll- (C) und Differenzierungsmedium (D) war die Expression der osteogenen Marker vergleichbar der vor Versuchsbeginn. H4 als Zellzahlmarker war in allen Versuchsansätzen nachweisbar. Bei Kultivierung in Vollmedium ohne Zusatz und in Differenzierungsmedium mit rhPDGF-BB war in den Agarose-Gelen weniger RT-PCR-Produkt von H4 detektierbar. Die p53-Expression war vor und nach Kultivierung unter Einfluss von rhPDGF-BB nachweisbar. Im Versuchsansatz ohne Stimulation war sie schwächer ausgeprägt. Die untersuchten Apoptosemarker c-Myc und Bax wurden nach Kultivierung auf α-TCP vermindert exprimiert. Die Expression der anti-apoptotischen Gene Bcl-2 und c-Fos lag unterhalb der Detektionsgrenze. 1= Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH); 2= Alkalische Phosphatase (AP); 3= Osteocalcin (OC); 4= Runx-2; 5= p53; 6= Bcl-2; 7= c-Myc; 8= c-Fos; 9= Bcl-2-assoziiertes X-Protein (Bax); 10= Histon4 (H4); M=100bp-Marker; rhPDGF-BB= rekombinant humaner „Platelet Derived Growth Factor". EtBr-gefärbte 2%ige Agarose-Gele.

Bei den Konstrukten aus α-TCP gelang keine Bestimmung der AP-Enzymaktivität.

Es wurden zudem Versuche mit GB9N-„Scaffolds" durchgeführt. Es war bei den Versuchen mit diesen Prüfkörpern nicht möglich, von den darauf kultivierten Zellen mRNA zu isolieren, so dass hiervon keine RT-PCR-Ergebnisse vorliegen.

Die Analyse der AP-Enzymaktivität ergab, dass bei Kultivierung von Osteoblasten auf GB9N-„Scaffolds" aus Glaskeramik durch die Zugabe von rhPDGF-BB und osteogenem Differenzierungsmedium eine Zunahme der AP-Aktivität von 0,01±0,002 IU/µg im Ansatz ohne Stimulation auf 0,01±0,003 IU/µg erzielt werden konnte. Unter rhPDGF-BB ging die osteoblastäre AP-Aktivität in Vollmedium auf 0,004±0,001 IU/µg zurück. MSZ reduzierten die AP-Aktivität in Gegenwart der osteogenen Zusätze. Die Zellen wiesen auf den Konstrukten in reinem Vollmedium eine AP-Aktivität von 0,01±0,01 IU/µg auf. Bei Zugabe von rhPDGF-BB ging sie auf 0,01 ±0,01 IU/µg zurück. In osteogenem Differenzie-

rungsmedium mit Wachstumsfaktor lag sie bei 0,01±0,01 IU/µg. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Kultivierungsbedingungen und Zelltypen erreichten das Signifikanzniveau ($p<0,05$) nicht.

Im Gegensatz zu den ITV- und den Cerasorb-Konstrukten wurden auf GB9N-Prüfkörpern in MSZ höhere AP-Aktivitäten induziert als in Osteoblasten.

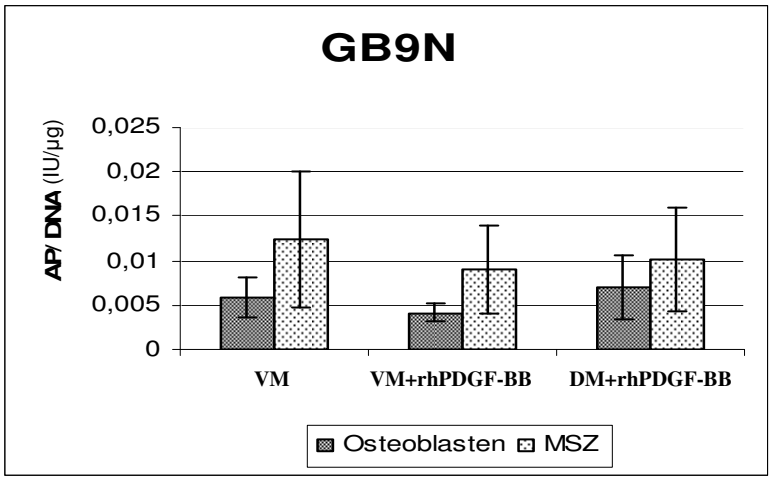


Abb.26: AP-Aktivität in Osteoblasten und MSZ nach Kultivierung auf GB9N-„Scaffolds".
In Osteoblasten konnte auf den Prüfkörpern durch Zugabe von rhPDGF-BB und osteogenem Differenzierungsmedium eine Zunahme der AP-Aktivität induziert werden, während in MSZ die Enzymaktivität unter dem Einfluss der osteogenen Zusätze zurückging. Insgesamt konnten in MSZ auf den GB9N-Konstrukten höhere AP-Aktivitäten induziert werden als in Osteoblasten. Die Unterschiede erreichten das Signifikanzniveau ($p<0,05$) nicht (n=3, MW±SD). AP= Alkalische Phosphatase; VM= Vollmedium; DM=osteogenes Differenzierungsmedium; MSZ= multipotente mesenchymale Stromazellen; rhPDGF-BB= rekombinant humaner „Platelet Derived Growth Factor"

Mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholung wurde in den verschiedenen Versuchsansätzen jeweils der Einfluss des Hauptfaktors „Prüfkörper" sowie des Hauptfaktors „Zelltyp" untersucht.

Dabei konnte bezüglich der AP-Aktivität festgestellt werden, dass der Faktor „Zelltyp" keinen signifikanten ($p>0,05$) Einfluss ausübt. Die p-Werte lagen im Versuchsansatz mit Vollmedium bei 0,82, mit Vollmedium plus Wachstumsfaktor bei 0,57 und mit Differenzierungsmedium und rhPDGF-BB bei 0,17 beim Vergleich von Osteoblasten und MSZ.

Der Hauptfaktor „Prüfkörper" hat bei Kultivierung in Vollmedium ohne Wachstumsfaktor ($p=0,03$), sowie in osteogenem Differenzierungsmedium mit rhPDGF-BB ($p=0,01$) einen signifikanten Einfluss auf die AP-Aktivität. Im Versuchsansatz mit Vollmedium und Wachstumsfaktor erreichte der Einfluss des Hauptfaktors „Prüfkörper" das Signifikanzniveau ($p<0,05$) nicht ($p=0,07$).

Die Durchführung des Studentschen t-Tests wies zahlreiche signifikante bzw. hochsignifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen „Scaffolds" nach.

Die Prüfkörper aus GB9N induzierten bei den darauf kultivierten Zellen die geringste AP-Aktivität bei der höchsten vorhandenen DNA-Menge (Vgl. Abb.36) (siehe Abb.28). Hochsignifikante Unterschiede ($p<0,01$) ergaben sich in der AP-Aktivität bei Besiedelung mit Osteoblasten zwischen GB9N- und Cerasorb-Prüfkörpern ohne Bohrung bei Kultivierung mit rhPDGF-BB in Vollmedium ($p=0,01$) sowie in osteogenem Differenzierungsmedium ($p=0,002$). Zwischen den GB9N-Konstrukten und den Cerasorb-Materialien mit Bohrung wurden signifikante bzw. hochsignifikante Unterschiede für Osteoblasten in allen Versuchsansätzen detektiert (Vollmedium ohne Zusätze: $p=0,001$, Vollmedium mit rhPDGF-BB: $p=0,004$, Differenzierungsmedium mit rhPDGF-BB: $p=0,04$). Weniger stark ausgeprägt stellten sich die Differenzen zwischen dem Glaskeramikmaterial und den neuen Knochenersatzmaterialien bei Besiedelung mit Osteoblasten dar. Das Signifikanzniveau ($p<0,05$) wurde bei Kultivierung in Vollmedium mit rhPDGF-BB erreicht ($p=0,05$), während sich in Vollmedium ohne zusätzlichen Stimulus ($p=0,053$) und in osteogenem Differenzierungsmedium ($p=0,08$) keine signifikanten Unterschiede ergaben. Zwischen den Cerasorb-„Scaffolds“ und den neu entwickelten ITV-Konstrukten waren keine signifikanten Unterschiede in der AP-Aktivität der darauf kultivierten Osteoblasten detektierbar.
Bei Besiedelung mit MSZ konnte in der AP-Aktivität bei Kultivierung in Vollmedium mit rhPDGF-BB zwischen GB9N- und Cerasorb-„Scaffolds“ mit Bohrung ein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p=0,04$). Bei den gleichen Prüfkörpern wurde im Versuchsansatz mit osteogenem Differenzierungsmedium und Wachstumsfaktor das Signifikanzniveau ($p<0,05$) nicht erreicht ($p=0,0507$). Bei Besiedelung mit MSZ induzierte die verschiedene Form der Cerasorb-Konstrukte einen größeren Unterschied in der AP-Aktivität als bei Besiedelung mit Osteoblasten. Das Signifikanzniveau ($p<0,05$) wurde unter dem Einfluss von rhPDGF-BB in Vollmedium ($p=0,055$) und in osteogenem Differenzierungsmedium ($p=0,06$) beinahe erreicht.

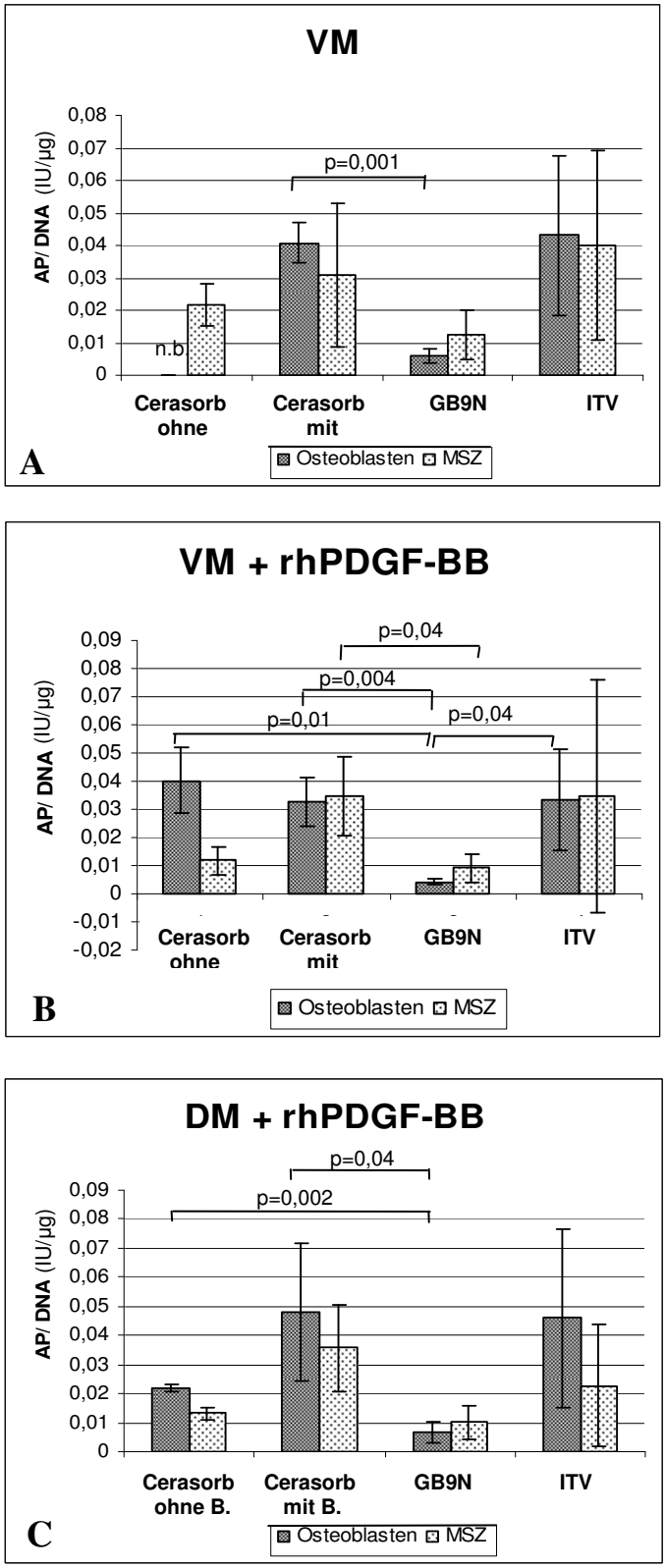
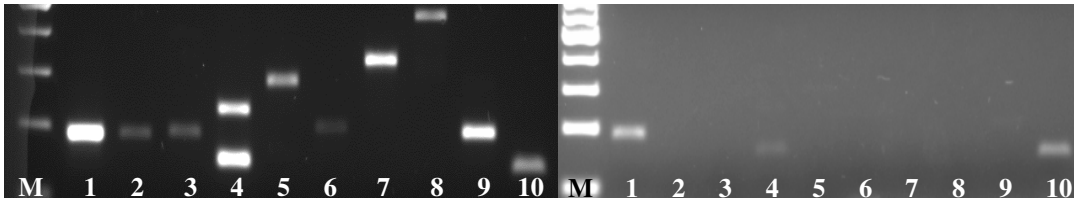


Abb.27: AP-Aktivität in Osteoblasten und MSZ auf verschiedenen Knochenersatzmaterialien nach achttägiger Kultivierung.

Die geringste AP-Aktivität konnte bei beiden Zelltypen in allen Versuchsansätzen (A-C) auf den GB9N-Prüfkörpern nachgewiesen werden, die sich vor allem bei Besiedelung mit Osteoblasten in mehren Versuchsansätzen signifikant ($p<0,05$) bzw. hochsignifikant ($p<0,01$) von den Cerasorb- und ITV-Materialien unterschieden. (Cerasorb ohne/ Cerasorb mit/ GB9N/ ITV (MSZ): n=3, MW±SD; Cerasorb ohne/ Cerasorb mit/ GB9N (OB): n=3; MW±SD; ITV (OB): n=4; MW±SD). AP= Alkalische Phosphatase; B= Bohrung; VM= Vollmedium; DM= osteogenes Differenzierungsmedium; MSZ= multipotente mesenchymale Stromazellen; rhPDGF-BB= rekombinant humaner „Platelet Derived Growth Factor“

Außerdem wurde ein Experiment mit den neuen Knochenersatzmaterialien über eine längere Versuchsdauer durchgeführt. MSZ und Osteoblasten wurden auf den Konstrukten in Vollmedium oder in osteogenem Differenzierungsmedium über 14 Tage kultiviert.
Bei der Besiedelung der neu entwickelten „Scaffolds“ aus β-TCP und PLLA mit multipotenten mesenchymalen Stromazellen konnte nach 14-tägiger Kultivierung mit Vollmedium in der RT-PCR noch eine schwache Expression von GAPDH, Runx-2 und H4 nachgewiesen werden. Die restlichen untersuchten osteogenen, Proliferations- und Apoptose-Marker wurden unterhalb der Detektionsgrenze exprimiert (siehe Abb.28).



A **B**

Abb.28: Genexpression in MSZ nach 14-tägiger Kultivierung auf ITV- „Scaffolds“ aus PLLA und β-TCP.
Nach 14-tägiger Kultivierung auf den ITV-Materialien stellten MSZ die Expression aller untersuchten Gene mit Ausnahme von GAPDH und H4 in Vollmedium (B) ein, während vor Versuchsbeginn die Expression verschiedener Gene nachweisbar waren (A). 1= Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH); 2= Alkalische Phosphatase (AP); 3= Osteocalcin (OC); 4= Runx-2; 5= p53; 6= Bcl-2; 7= c-Myc; 8= c-Fos; 9= Bcl-2-assoziiertes X-Protein (Bax); 10= Histon4 (H4); MSZ= multipotente mesenchymale Stromazellen; M=100bp-Marker; PLLA= Poly-L-Laktid; TCP= Trikalziumphosphat; rhPDGF-BB= rekombinant humaner „Platelet Derived Growth Factor“; ITV= Institut für Textil- und Verfahrenstechnik. EtBr-gefärbte 2%ige Agarose-Gele.

Humane Osteoblasten zeigten nach 14-tägiger Kultivierung auf dem neuen Knochenersatzmaterial ein ähnliches Verhalten wie humane MSZ. Es konnte eine deutliche GAPDH-Expression nachgewiesen werden. Die Expression der übrigen untersuchten Genmarker lag bei Kultivierung ohne osteogene Stimuli unterhalb der Detektionsgrenze. Bei Kultivierung in osteogenem Differenzierungsmedium konnte noch eine schwache Runx-2-, c-Myc- und H4-Expression detektiert werden, die jedoch verglichen mit der Expression vor Versuchsbeginn deutlich herabreguliert wurde (siehe Abb.29).

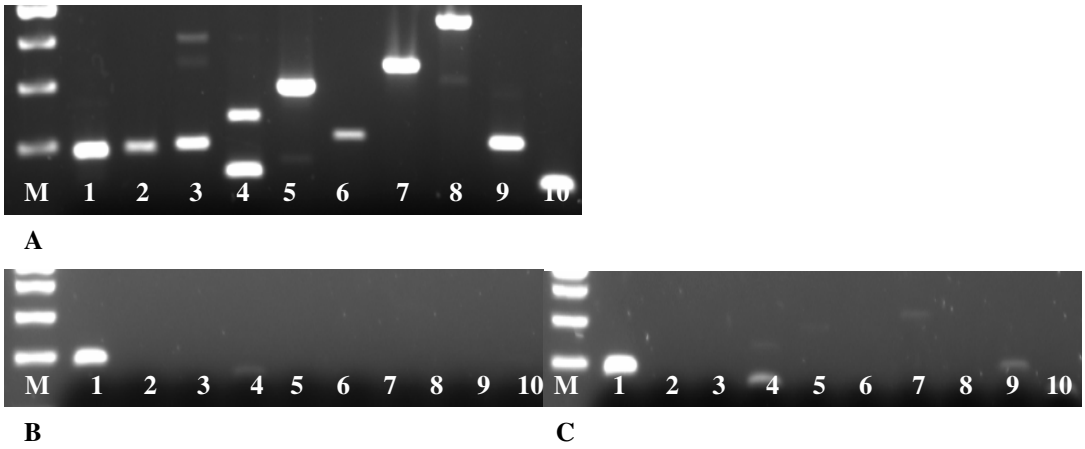


Abb.29: Genexpression in humanen Osteoblasten vor (A) und nach 14-tägiger Kultivierung auf den neuen Knochenersatzmaterialien in Voll- (B) bzw. Differenzierungsmedium (C).
Osteoblasten wurden in Vollmedium (B) oder osteogenem Differenzierungsmedium (C) kultiviert. Die RT-PCR-Analysen wiesen in beiden Kulturmedien nach 14 Tagen nur noch mRNA von GAPDH nach. Die Expression der übrigen untersuchten Gene -mit Ausnahme einer schwach detektierbaren Runx-2-Expression- wurde unter die Detektionsgrenze herabreguliert. Die Apoptosemarker c-Myc und Bax wurden in Differenzierungsmedium auf niedrigem Niveau weiter exprimiert. 1= Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH); 2= Alkalische Phosphatase (AP); 3= Osteocalcin (OC); 4= Runx-2; 5= p53; 6= Bcl-2; 7= c-Myc; 8= c-Fos; 9= Bcl-2-assoziiertes X-Protein (Bax); 10= Histon4 (H4); M=100bp-Marker. EtBr-gefärbte 2%ige Agarose-Gele.

Die AP-Aktivität nach 14-tägiger Kultivierung auf den ITV-„Scaffolds“ in Vollmedium war bei MSZ geringer als nach acht Tagen, bei Osteoblasten blieb sie konstant.

Osteogenes Differenzierungsmedium induzierte nach 14-tägiger Kultivierung in MSZ (0,04±0,02 IU/µg) und Osteoblasten (0,07±0,001 IU/µg) eine höhere Enzymaktivität im Vergleich zur Kultivierung in Vollmedium (MSZ: 0,03±0,01 IU/µg; OB: 0,04±0,01 IU/µg). Die Differenz der AP-Aktivitäten zwischen den verschiedenen Kulturmedien erreichte für MSZ beinahe das Signifikanzniveau ($p=0,06$).

Bei Osteoblasten waren verglichen mit MSZ höhere Enzymaktivitäten nachweisbar. Die Unterschiede erreichten das Signifikanzniveau nicht ($p>0,05$).

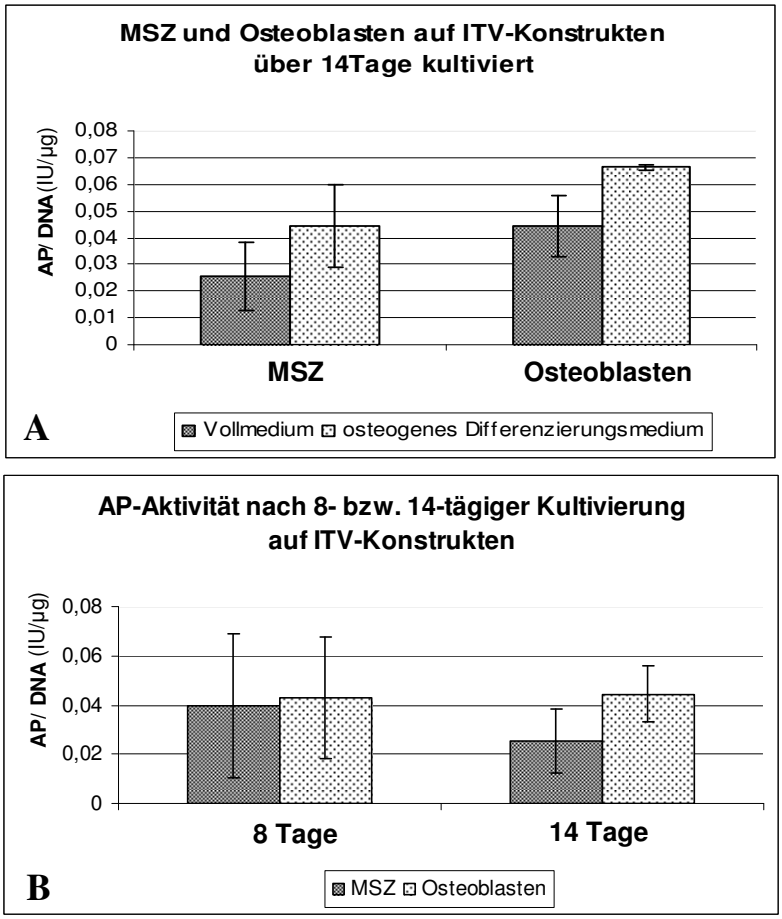


Abb.30: A: AP-Aktivität in MSZ und Osteoblasten nach 14-tägiger Kultivierung in Vollmedium bzw. osteogenem Differenzierungsmedium. *Die Zugabe von osteogenem Differenzierungsmedium führte zu einer bei MSZ fast signifikanten (p=0,06) Zunahme der AP-Aktivität. Osteoblasten wiesen höhere AP-Aktivitäten auf als MSZ. (n=2, Mittelwert ± Standardabweichung).*
B: Vergleich der AP-Aktivität nach acht und 14 Tagen bei Kultivierung in Vollmedium auf den ITV-Materialien. *Die AP-Aktivitäten lagen bei MSZ nach 14 Tagen unter den Werten nach acht Tagen, bei Osteoblasten blieb die Enzymaktivität konstant. AP= Alkalische Phosphatase; MSZ= multipotente mesenchymale Stromazellen; ITV= Institut für Textil- und Verfahrenstechnik.*

In einem vergleichenden Experiment wurden etablierte Knochenersatzmaterialien unter den gleichen Bedingungen über 14 Tage kultiviert und anschließend hinsichtlich ihrer Genexpression analysiert.

Nach 14-tägiger Kultivierung konnte in humanen Osteoblasten auf Spongiosa eine deutliche AP- und OC-Expression in der RT-PCR nachgewiesen werden. Die Expression des osteogenen Transkriptionsfaktors Runx-2 und des Zellzahlmarkers H4 wurde bei Kultivierung auf Spongiosa heraufreguliert. Das apoptotisch wirkende Gen p53 wurde bei Versuchsende vermindert exprimiert. In MSZ konnte auf Spongiosa eine Progression der osteogenen Differenzierung im Sinne einer Abnahme der AP- und einer Zunahme der OC-Expression nachgewiesen werden. Die Expression von p53 und H4 blieb unbeeinflusst.

Die osteogene Differenzierung humaner Osteoblasten und MSZ war auf den Cerasorb-„Scaffolds“ mit und ohne Bohrung nach 14-tägiger Kultivierung progredient und korre-

lierte mit einer deutlicheren OC- und schwächeren AP-Expression. Die RT-PCR-Produkte des Transkriptionsfaktors Runx-2 waren auf den Cerasorb-Konstrukten in den Agarose-Gelen nur schwach nachweisbar. Der Zellzahlmarker H4 wurde nach Versuchsende verstärkt exprimiert und wies somit auf eine Zunahme der Zellzahl auf den „Scaffolds" aus β-TCP hin. Die p53-Expression blieb auf den Cerasorb-Prüfkörpern mit Bohrung unbeeinflusst, während sie auf den gleichen Materialien ohne Bohrung zurückging.

Nach Kultivierung auf α-TCP war bei humanen Osteoblasten und MSZ ebenfalls eine veränderte Genexpression mit verminderter AP- und verstärkter OC-Transkription erkennbar. Die Expression des Transkriptionsfaktors Runx-2 wies keine Veränderung auf. H4 als Zellzahlmarker war nach Versuchsende vermehrt nachweisbar, während das apoptotisch wirkende Gen p53 in Osteoblasten auf α-TCP vermindert und in MSZ unverändert weiter exprimiert wurde (siehe Abb.31).

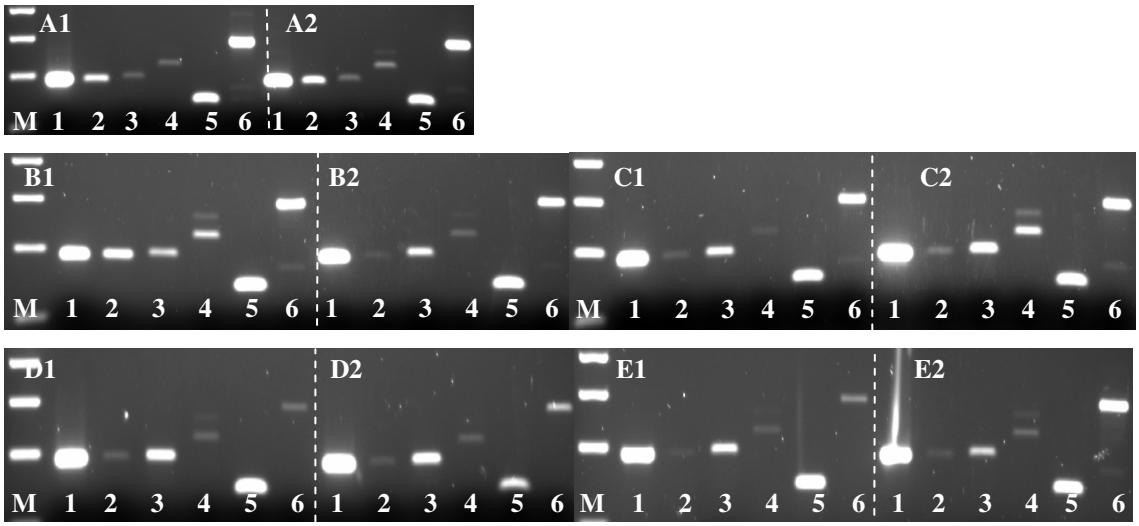


Abb.31: Genexpression humaner Osteoblasten (A1-E1) und MSZ (A2-E2) vor Besiedelung (A) und nach 14-tägiger Kultivierung auf verschiedenen Knochenersatzmaterialien (B, C, D,E).

Osteoblasten exprimierten auf Spongiosa (B1) verglichen mit dem Zeitpunkt t_0 (A1) verstärkt AP, OC und Runx-2. Die OC-Expression wurde in MSZ auf Spongiosa (B2) heraufreguliert, die AP- und Runx-2-Expression blieb unbeeinflusst. Bei beiden Zelltypen wurde der Zellzahlmarker H4 vermehrt exprimiert, was auf eine Erhöhung der Zellzahl hinwies. Die p53-Expression wies keine Veränderung auf. Auf den Cerasorb-Konstrukten mit (C) und ohne (D) Bohrung zeigten Osteoblasten (C1, D1) und MSZ (C2, D2) eine verminderte AP- und eine verstärkte OC-Expression. RT-PCR-Produkte des Transkriptionsfaktors Runx-2 waren in den Agarose-Gelen vermindert detektierbar. Der Zellzahlmarker H4 wurde vermehrt, der Apoptose-Marker p53 unverändert exprimiert. Osteoblasten (E1) und MSZ (E2) wiesen nach Kultivierung auf α-TCP (E) vermehrt mRNA von Osteocalcin und weniger mRNA von alkalischer Phosphatase auf. Es war bei beiden Zelltypen kein Transkriptionsprodukt von Runx-2 nachweisbar. Die H4-Expression nahm zu. Das Gen p53 wurde auf α-TCP in Ostoblasten weniger und in MSZ gleich bleibend exprimiert. 1= Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH); 2= Alkalische Phosphatase (AP); 3= Osteocalcin (OC); 4= Runx-2; 5= H4; 6= p53; MSZ= multipotente mesenchymale Stromazellen; M=100bp-Marker; TCP= Trikalziumphosphat. EtBr-gefärbte 2%ige Agarose-Gele.

3.1.2 Untersuchungen zur Induktion von Proliferation

Um das Proliferationsverhalten verschiedener Zelltypen auf den neu entwickelten ITV-Prüfkörpern im Vergleich zu etablierten Knochenersatzmaterialien zu untersuchen, wurde eine fluorometrische DNA-Mengenbestimmung durchgeführt (siehe Kapitel 2 unter 2.2.9).
Die höchsten DNA-Konzentrationen wurden nach achttägiger Kultivierung in den Ansätzen mit undifferenzierten MSZ erreicht. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Zelltypen auf den ITV-„Scaffolds“ erreichten jedoch im ungepaarten t-test nicht das Signifikanzniveau von $p<0,05$.
Der Wachstumsfaktor rhPDGF-BB induzierte bei Osteoblasten in Vollmedium auf den ITV-„Scaffolds“ eine stärkere Proliferation erkennbar an einer höheren messbaren DNA-Konzentration (166,17±142,71µg/ml) als bei Kultivierung ohne osteogenen Stimulus (112,25±84,04µg/ml). In osteogenem Differenzierungsmedium zeigte sich eine Reduktion der DNA-Menge (124,83±107,74µg/ml) verglichen mit dem Ergebnis in Vollmedium mit rhPDGF-BB. Die Unterschiede erreichten das Signifikanzniveau von $p<0,05$ nicht.
Bei multipotenten mesenchymalen Stromazellen konnte durch Zugabe von rhPDGF-BB ebenfalls ein Anstieg der DNA-Menge von 208,67±143,06µg/ml auf 246,89± 190,13ng/ml induziert werden. In osteogenem Differenzierungsmedium war bei diesem Zelltyp die höchste DNA-Konzentration messbar (308±180,50µg/ml).
Die Zugabe von rhPDGF-BB führte in Vollmedium (170,52±97,55µg/ml) und in osteogenem Differenzierungsmedium (148,62±55,66µg/ml) bei differenzierten MSZ auf den Knochenersatzmaterialien aus PLLA und β-TCP zu einer Abnahme der Zellzahl -erkennbar an einer geringeren nachweisbaren DNA-Menge- im Vergleich zu dem Versuchsansatz ohne Stimulation (186,57±88,92µg/ml). Die Reduktion der DNA-Konzentration unter dem Einfluss von rhPDGF-BB und osteogenem Differenzierungsmedium war signifikant ($p=0,045$) gegenüber dem Ergebnis bei Kultivierung ohne zusätzlichen Stimulus.

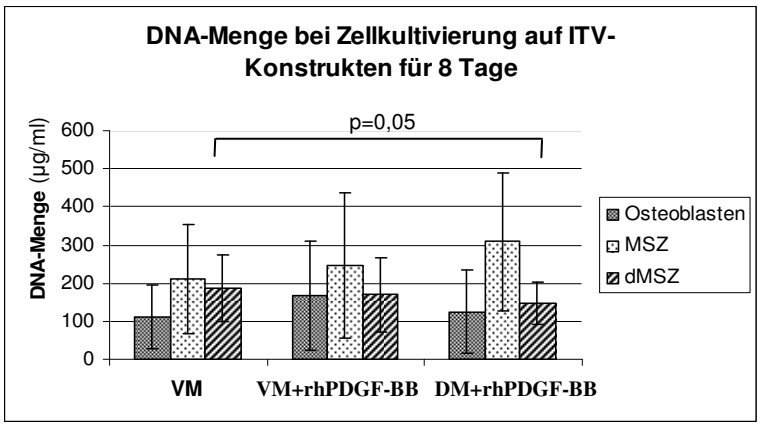


Abb.32: DNA-Menge verschiedener Zelltypen nach achttägiger Kultivierung auf ITV-Knochenersatzmaterialien.
Eine signifikante Reduktion der DNA-Menge konnte bei Kultivierung von differenzierten MSZ in osteogenem Differenzierungsmedium mit rhPDGF-BB verglichen mit der gemessenen DNA-Menge in Vollmedium ohne Stimuli nachgewiesen werden. (Osteoblasten n=4, MSZ n=3, dMSZ n=7, MW±SD). MSZ= multipotente mesenchymale Stromazellen; dMSZ= differenzierte mesenchymale Stromazellen; VM= Vollmedium; DM= Differenzierungsmedium; rhPDGF-BB= rekombinant humaner „Platelet Derived Growth Factor"; ITV= Institut für Textil- und Verfahrenstechnik.

Zum Vergleich wurden etablierte Knochenersatzmaterialien mit multipotenten mesenchymalen Stromazellen und Osteoblasten besiedelt und die nach Versuchsende messbaren DNA-Konzentrationen analysiert.

Die Kultivierung von Osteoblasten und MSZ auf Cerasorb-„Scaffolds" mit Bohrung unter den verschiedenen Kultivierungsbedingungen führte zu keiner signifikanten Änderung der gemessenen DNA-Menge (Osteoblasten: ohne Stimulation 70,22±4,60µg/ml, mit rhPDGF-BB 70,44±8,93µg/ml, mit rhPDGF-BB und osteogenem Differenzierungsmedium 65,89± 5,47µg/ml; MSZ: ohne Stimulation 104,5±32,81µg/ml, mit rhPDGF-BB 107,22± 8,17µg/ml, mit rhPDGF-BB und osteogenem Differenzierungsmedium 104,89± 22,80µg/ml). Unter rhPDGF-BB konnte bezüglich der gemessenen DNA-Konzentrationen zwischen den beiden verschiedenen Zelltypen ein hochsignifikanter Unterschied (p=0,0049) detektiert werden. In den übrigen Ansätzen konnte dieselbe Tendenz aber kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden.

Die Cerasorb-Konstrukte ohne Bohrung induzierten bei den darauf kultivierten Zellen keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Zelltypen oder den unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen. Die DNA-Konzentration von MSZ auf den Konstrukten lag in reinem Vollmedium bei 167,63±18,97µg/ml, in Vollmedium mit rhPDGF-BB bei 172,71±34,82µg/ml und in Differenzierungsmedium mit rhPDGF-BB bei 172,88± 25,16µg/ml. Osteoblasten erreichten DNA-Mengen von 154±39,24µg/ml in Vollmedium, 143,71±29,49µg/ml in Vollmedium mit rhPDGF-BB und 146,43±13,79µg/ml unter osteogenen und proliferativen Stimuli.

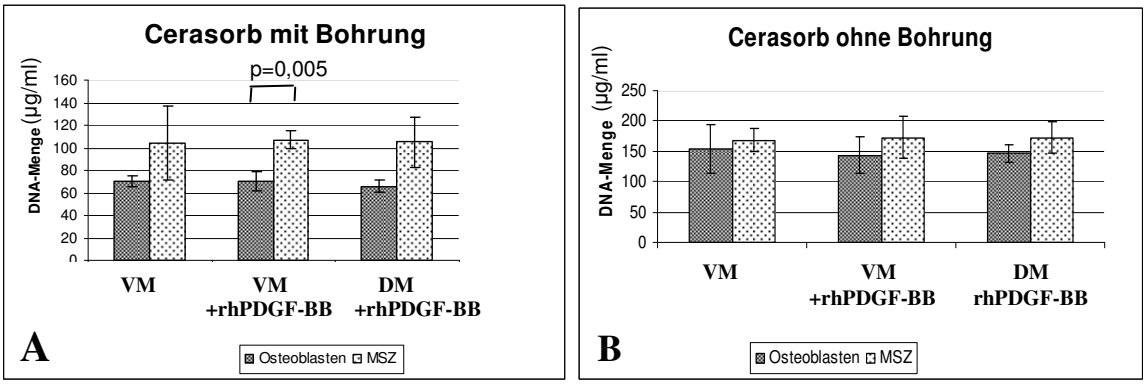


Abb.33: DNA-Konzentrationen von MSZ und Osteoblasten nach Kultivierung auf Cerasorb-„Scaffolds" mit (A) und ohne (B) Bohrung.

Die gemessenen DNA-Mengen waren von der Zugabe von rhPDGF-BB und/oder osteogenem Differenzierungsmedium auf beiden Prüfkörpern unbeeinflusst. Für MSZ konnten höhere DNA-Konzentrationen nachgewiesen werden als bei Besiedelung mit Osteoblasten. Auf den Konstrukten ohne Bohrung wurde eine stärkere zelluläre Proliferation induziert, erkennbar an den höheren nachweisbaren DNA-Konzentrationen. (n=3, MW±SD). MSZ= multipotente mesenchymale Stromazellen; VM= Vollmedium; DM= osteogenes Differenzierungsmedium; rhPDGF-BB= rekombinant humaner „Platelet Derived Growth Factor"

Das Knochenersatzmaterial GB9N aus Glaskeramik wurde nach der Kultivierung mit humanen MSZ und Osteoblasten im Hinblick auf die isolierten DNA-Menge analysiert. Die GB9N-Konstrukte induzierten bei den darauf kultivierten Zellen keine signifikanten Unterschiede bezüglich der zellulären Proliferation zwischen den verschiedenen Kultivierungsbedingungen (p>0,05). Bei Besiedelung mit MSZ lag die DNA-Konzentration in Vollmedium bei 383,33±124,92µg/ml, unter Wachstumsfaktorstimulus bei 362,33± 88,76µg/ml und unter Wachstums- und Differenzierungsfaktoren bei 382,11± 89,62µg/ml. Bei der Kultivierung von Osteoblasten auf den GB9N-Konstrukten wurde unter rhPDGF-BB in osteogenem Differenzierungsmedium ein Rückgang der DNA-Konzentration von 677,33±133,52µg/ml in Vollmedium, bzw. 652,78±107,19µg/ml in Vollmedium mit rhPDGF-BB auf 506±122,64µg/ml induziert.

Osteoblasten proliferierten auf den GB9N-„Scaffolds" stärker als multipotente mesenchymale Stromazellen. Die Differenz der DNA-Konzentrationen von Osteoblasten und MSZ nach Versuchsende erreichte bei Kultivierung auf diesen Konstrukten in Vollmedium mit rhPDGF-BB das Signifikanzniveau (p=0,03) (siehe Abb.34).

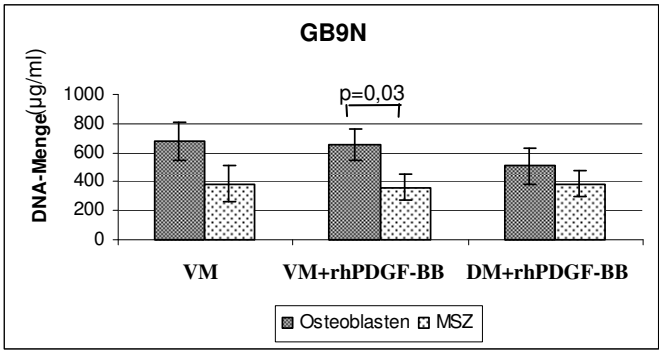


Abb.34: DNA-Konzentrationen von Osteoblasten und MSZ nach Kultivierung auf GB9N-Konstrukten. *Proliferative und osteogene Stimuli induzierten bei Osteoblasten und MSZ nach Besiedelung auf GB9N-„Scaffolds" keine signifikanten Unterschiede bezüglich der gemessenen DNA-Konzentrationen. Unter rhPDGF-Stimulus konnte auf den Glaskeramikkonstrukten für Osteoblasten eine signifikant höhere Zellzahl nachgewiesen werden als für MSZ (p=0,03). (n=3, MW±SD). MSZ= multipotente mesenchymale Stromazellen; VM= Vollmedium; DM=osteogenes Differenzierungsmedium; rhPDGF-BB= rekombinant humaner „Platelet Derived Growth Factor".*

Vergleicht man die verschiedenen Knochenersatzmaterialien bezüglich der isolierten DNA-Konzentrationen der darauf kultivierten Zellen, konnte gezeigt werden, dass auf allen Prüfkörpern - mit Ausnahme der GB9N-Konstrukte - MSZ stärker proliferierten als Osteoblasten.

In einer zweifaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholung konnte jedoch in den verschiedenen Versuchsansätzen kein signifikanter Einfluss des Hauptfaktors „Zelltyp" auf die DNA-Konzentration nachgewiesen werden. Für den Hauptfaktor „Prüfkörper" konnte gezeigt werden, dass er bezüglich der DNA-Konzentration bei Zellkultivierung in Vollmedium ohne Wachstumsfaktor ($p=6,3*10^{-6}$) sowie in osteogenem Differenzierungsmedium mit Wachstumsfaktor (p=0,0002) hochsignifikante Unterschiede induzierte.

Auf Cerasorb-Prüfkörpern ohne Bohrung erreichten MSZ höhere Zellzahlen als auf den gleichen Materialien mit Bohrung. Die Unterschiede erreichten in den Ansätzen mit Vollmedium ohne bzw. mit Wachstumsfaktor beinahe das Signifikanzniveau (p=0,06 bzw. p=0,07). Bei Kultivierung von MSZ unter osteogenen und proliferativen Stimuli konnten auf den Cerasorb-„Scaffolds" ohne Bohrung signifikant höhere DNA-Konzentrationen als auf den Prüfkörpern ohne Bohrung gemessen werden (p=0,03).

Die gleichen Tendenzen zeigten sich bei der Besiedelung dieser Konstrukte mit Osteoblasten. Signifikante Unterschiede ergaben sich hierbei zwischen den verschieden geformten „Scaffolds" aus demselben Biomaterial bei Kultivierung mit Osteoblasten in Vollmedium ohne bzw. mit rhPDGF-BB (p=0,04 bzw. p=0,03). Unter Wachstums- und Differenzierungsfaktoren konnte ein hochsignifikanter Unterschied der gemessenen DNA-Konzentrationen nachgewiesen werden (p=0,0002).

Vergleicht man die gemessenen DNA-Konzentrationen für Osteoblasten und MSZ auf GB9N-Konstrukten mit denen auf den übrigen „Scaffolds“, so konnte gezeigt werden, dass auf GB9N die höchsten Zellzahlen erreicht und somit die stärkste Proliferation induziert wurde. Bei Kultivierung von MSZ auf GB9N unter proliferativen und osteogenen Stimuli ergaben sich signifikant höhere DNA-Konzentrationen ($p=0,03$) als auf den Cerasorb-Konstrukten ohne Bohrung unter denselben Versuchsbedingungen. Die Unterschiede zwischen diesen Prüfkörpern erreichten bezüglich der DNA-Menge in Vollmedium ohne bzw. mit Wachstumsfaktor das Signifikanzniveau nicht ($p=0,06$ bzw. $p=0,06$). Bei Kultivierung mit Osteoblasten konnten unter allen Versuchsbedingungen hochsignifikante Unterschiede in den DNA-Konzentrationen zwischen den Glaskeramikmaterialien und den Cerasorb-Konstrukten ohne Lochmuster nachgewiesen werden (ohne Stimulation: $p=0,01$; mit rhPDGF-BB: $p=0,002$; mit rhPDGF-BB und osteogenem Differenzierungsmedium: $p=0,01$).

Der Unterschied der bei Besiedelung mit MSZ nachweisbaren DNA-Konzentrationen zwischen Cerasorb-„Scaffolds“ mit Bohrung und den GB9N-Prüfkörpern erreichte in allen Versuchsansätzen das Signifikanzniveau $p<0,05$ (ohne Stimulation: $p=0,03$; mit rhPDGF-BB: $p=0,01$; mit rhPDGF-BB und osteogenem Differenzierungsmedium: $p=0,01$). Bei Besiedelung mit Osteoblasten waren die Unterschiede zwischen diesen „Scaffolds“ hochsignifikant (ohne Stimulation: $p=0,002$; mit rhPDGF-BB: $p=0,001$; mit rhPDGF-BB und osteogenem Differenzierungsmedium: $p=0,004$).

Die GB9N-Prüfkörper induzierten bei den darauf kultivierten Osteoblasten eine stärkere Proliferation als die ITV-Konstrukte, was an den höheren DNA-Konzentrationen erkennbar war. Die Unterschiede der DNA-Konzentrationen zwischen den verglichenen Biomaterialien waren hochsignifikant und erreichten in Vollmedium einen p-Wert von 0,002, bei Kultivierung unter Wachstumsfaktorstimulus war $p=0,007$ und in osteogenem Differenzierungsmedium mit rhPDGF-BB lag der p-Wert bei 0,009. Bei Besiedelung mit multipotenten mesenchymalen Stromazellen konnten zwischen diesen beiden Knochenersatzmaterialien keine signifikanten Differenzen der gemessenen DNA-Konzentrationen nachgewiesen werden ($p>0,05$).

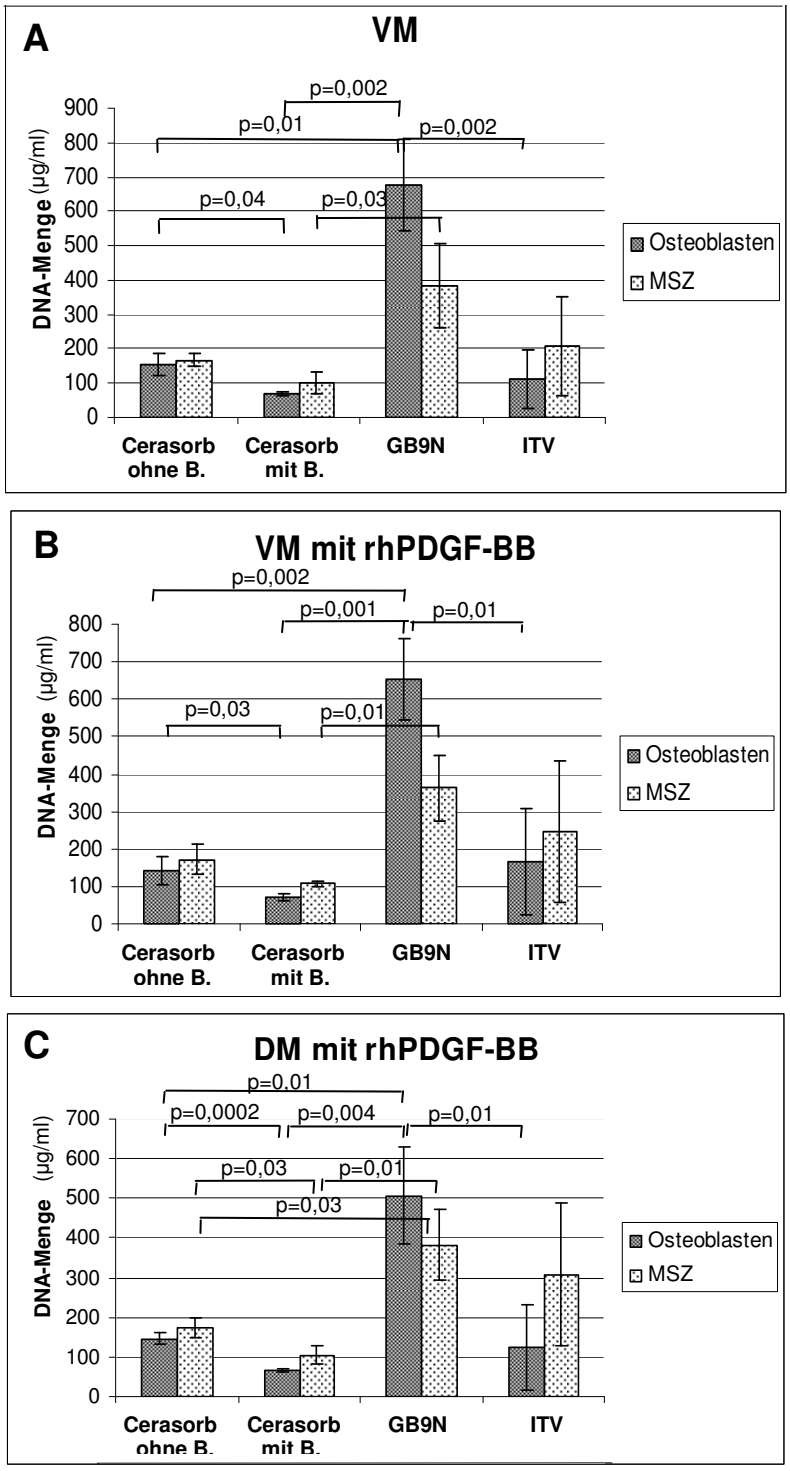


Abb.35: DNA-Konzentrationen von MSZ und Osteoblasten nach achttägiger Kultivierung auf verschiedenen Knochenersatzmaterialien.

*GB9N-Konstrukte unterschieden sich bezüglich der darauf messbaren DNA-Konzentrationen von MSZ und Osteoblasten von den übrigen Prüfkörpern. Es konnten unter den verschiedenen Kultivierungsbedingungen (**A**: ohne Stimuli; **B**: mit rhPDGF-BB; **C**: mit rhPDGF-BB und osteogenem Differenzierungsmedium) zahlreiche signifikante bzw. hochsignifikante Unterschiede detektiert werden. Mit Ausnahme der GB9N-Konstrukte wurden auf allen übrigen untersuchten Knochenersatzmaterialien von humanen MSZ höhere Proliferationsraten erreicht als von humanen Osteoblasten. (MW±SD). MSZ= multipotente mesenchymale Stromazellen; VM= Vollmedium; DM= Differenzierungsmedium; rhPDGF-BB= rekombinant humaner „Platelet Derived Growth Factor"; B= Bohrung; ITV= Institut für Textil- und Verfahrenstechnik.*

In einem weiteren Versuch wurden humane multipotente mesenchymale Stromazellen und humane Osteoblasten in Vollmedium und in osteogenem Differenzierungsmedium über 14 Tage auf den neuartigen ITV-Knochenersatzmaterialien kultiviert. In den Versuchsansätzen ohne Differenzierungsfaktoren wurde eine stärkere Proliferation induziert als in osteogenem Differenzierungsmedium erkennbar an den gemessenen DNA-Konzentrationen. Bei Besiedelung von MSZ auf die ITV-Konstrukte konnten nach 14-tägiger Versuchsdauer sowohl mit als auch ohne osteogene Stimuli höhere DNA-Konzentrationen nachgewiesen werden als von Osteoblasten. Die Unterschiede erreichten das Signifikanzniveau ($p<0,05$) nicht. Verglichen mit den DNA-Mengenergebnissen nach achttägiger Versuchsdauer (Vgl. Abb.26) kam es nach 14 Tagen Zellkultivierung auf den neu entwickelten „Scaffolds“ zu einer Reduktion der Zellzahl (siehe Abb.36).

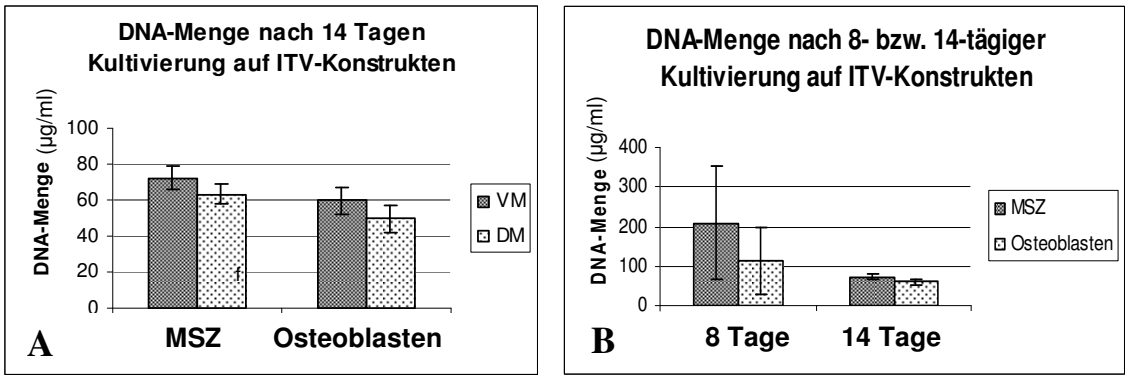


Abb.36: DNA-Konzentrationen von MSZ und Osteoblasten nach Kultivierung auf den neu entwickelten ITV- Prüfkörpern über 14 Tage in Vollmedium oder osteogenem Differenzierungsmedium.
MSZ erreichten höhere DNA-Konzentrationen als Osteoblasten. Beide Zelltypen proliferierten in Vollmedium stärker als in osteogenem Differenzierungsmedium (A). Die Gesamt-DNA-Mengen waren in Vollmedium nach 14 Tagen geringer als nach acht Tagen (B). (n=2, MW±SD). MSZ= multipotente mesenchymale Stromazellen; VM= Vollmedium; DM= osteogenes Differenzierungsmedium; ITV= Institut für Textil- und Verfahrenstechnik.

In einem Vergleichsexperiment wurden MSZ und Osteoblasten auf den verschiedenen bereits etablierten Knochenersatzmaterialien über 14 Tage kultiviert. Auch nach der längeren Versuchsdauer induzierten die GB9N-„Scaffolds“ die stärkste Proliferation erkennbar an den höchsten gemessenen DNA-Konzentrationen auf diesen Konstrukten. Auf allen untersuchten Prüfkörpern konnten nach 14-tägiger Kultivierung mit Osteoblasten oder MSZ höhere DNA-Mengen nachgewiesen werden als auf den neu entwickelten ITV-Konstrukten nach derselben Versuchsdauer (siehe Abb.36). Zudem kam es bei allen Materialien zu einer Zunahme der DNA-Konzentrationen der kultivierten Zellen verglichen mit den Ergebnissen nach acht Tagen, wohingegen bei den neuen Prüfkörpern nach 14-tägiger Kultivierung niedrigere DNA-Konzentrationen von MSZ und Osteoblasten nachweisbar waren als nach acht Tagen. Es handelte sich bei den Ergebnissen der Zellbesiedelung der etab-

lierten Konstrukte über 14 Tage allerdings um Ergebnisse eines Einzelexperimentes, das folglich nur eine Tendenz anzeigen kann. Wiederholungen konnten aufgrund der begrenzten Anzahl an Prüfkörpern nicht durchgeführt werden.

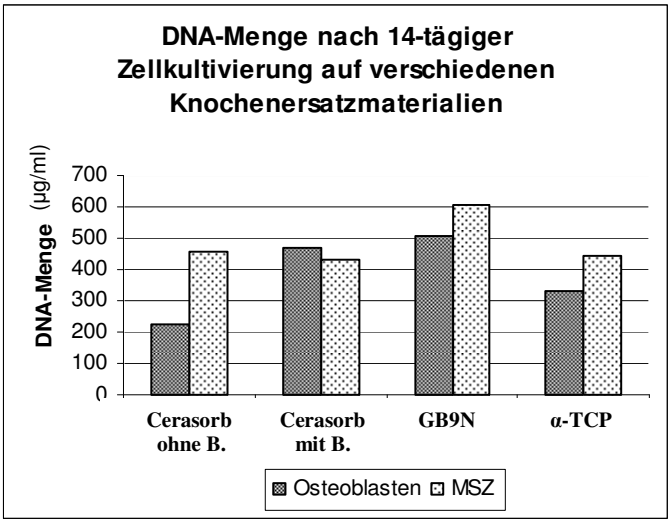


Abb.37: DNA-Konzentrationen auf verschiedenen Knochenersatzmaterialien nach 14-tägiger Kultivierung mit MSZ oder Osteoblasten.
Die höchsten Zellzahlen wurden auf den GB9N-Prüfkörpern erreicht. Beide Zelltypen wiesen nach der längeren Versuchsdauer in diesen Einzelexperimenten auf den hier untersuchten etablierten Knochenersatzmaterialien höhere DNA-Konzentrationen auf als auf den ITV-Konstrukten (Vgl. Abb.36). (n=1). MSZ= multipotente mesenchymale Stromazellen; B.= Bohrung; ITV= Institut für Textil- und Verfahrenstechnik; TCP= Trikalziumphosphat.

3.1.3 Untersuchungen zur Induktion von Apoptose

Die bisher dargelegten Ergebnisse lieferten Hinweise für eine eingeschränkte Biokompatibilität der ITV-„Scaffolds“. Als Indikatoren für eine mögliche Apoptose-Induktion durch die neu entwickelten ITV-Knochenersatzmaterialien aus β-TCP und PLLA bei den darauf kolonisierten Zellen wurden die Apoptosemarker p53, c-Myc und Bax sowie die anti-apoptotisch wirkenden Gene Bcl-2 und c-Fos in weiteren RT-PCRs analysiert.
Die Transkription und Translation von c-Fos in MSZ in der dritten Passage sank nach Kultivierung auf den neuen ITV-Prüfkörpern mit rhPDGF-BB unter die Detektionsgrenze. Die parallel dazu induzierte Dedifferenzierung der MSZ erkennbar an reduzierter AP- und OC-Expression zeigte, dass der Rückgang der c-Fos-Expression nicht durch Progression der osteogenen Differenzierung verursacht wurde. Der Apoptosemarker Bax wurde konstant weiter exprimiert, wobei das Bax-inhibitorisch wirkende Bcl-2 unter der Nachweisgrenze exprimiert wurde. Die Expression von p53 und c-Myc wurde herunter reguliert. H4 als Marker für die Zellzahl wurde nach Versuchsende deutlich weniger exprimiert.

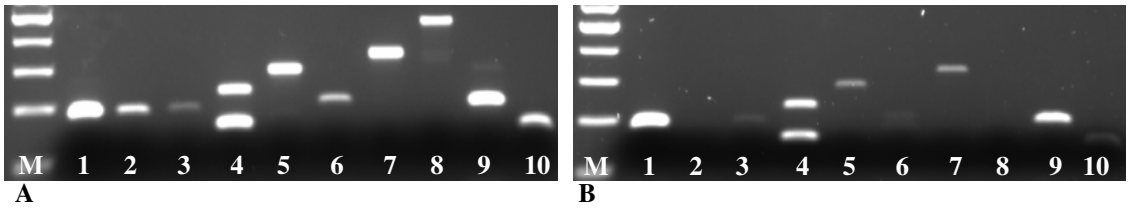


Abb.38: Genexpressionsmuster von Apoptose-induzierenden sowie anti-apoptotisch wirkenden Genen in MSZ vor (A) und nach achttägiger Kultivierung auf den ITV-„Scaffolds" unter rhPDGF-BB (B).
Die Expression des anti-apoptotisch wirkenden Gens Bcl-2 lag nach Versuchsende unter der Nachweisgrenze, während das Apoptose-induzierende Gen Bax weiter nachweisbar war. Die Expression von H4 ist nur noch schwach detektierbar. Der Rückgang der c-Fos-Expression unter die Detektionsgrenze fand nicht im Rahmen einer progredienten osteogenen Differenzierung statt, da an der reduzierten AP- und OC-Expression nach Versuchsende eine Dedifferenzierung der Zellen erkennbar war. Genexpression von 1= Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH); 2= Alkalische Phosphatase (AP); 3= Osteocalcin (OC); 4= Runx-2; 5= p53; 6= Bcl-2; 7= c-Myc; 8= c-Fos; 9= Bcl-2-assoziiertes X-Protein (Bax); 10= Histon4 (H4); MSZ= multipotente mesenchymale Stromazellen; rhPDGF-BB= rekombinant humaner „Platelet Derived Growth Factor"; M=100bp-Marker; ITV= Institut für Textil- und Verfahrenstechnik. EtBr-gefärbte 2%ige Agarose-Gele.

Bei Kolonisation von weiter differenzierten MSZ auf den ITV-„Scaffolds" wurden in den Agarose-Gelen keine RT-PCR-Produkte von c-Fos mehr detektiert. Wiederum war an der reduzierten OC-Expression ein Rückgang der osteogenen Differenzierung der MSZ nachweisbar. Die Expression von Bax konnte unter allen Versuchsbedingungen detektiert werden, während keine mRNA des Bax-inhibierenden Bcl-2 nachgewiesen werden konnte. RT-PCR-Produkte von p53 und c-Myc waren in allen Agarose-Gelen vorhanden.

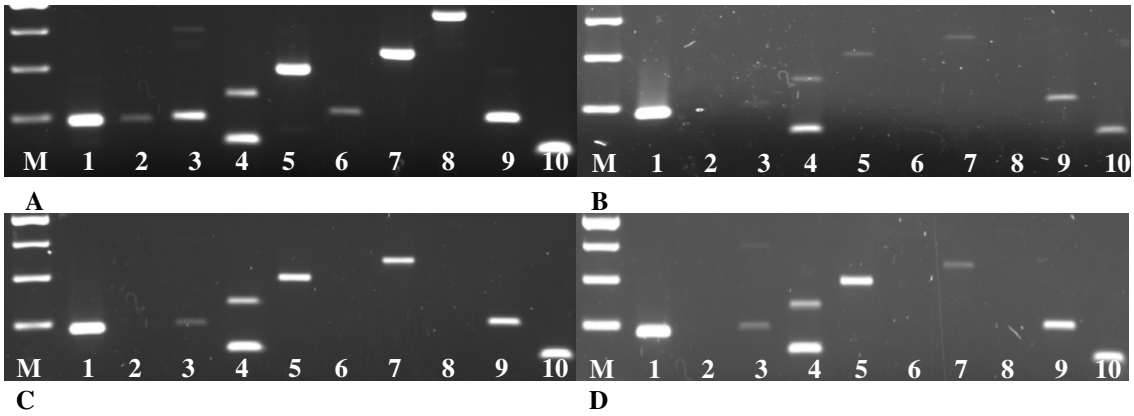
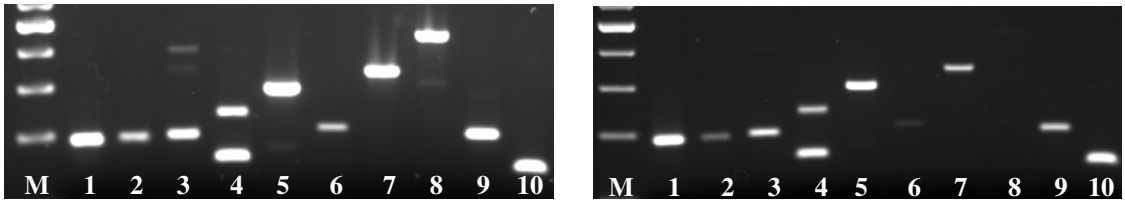


Abb.39: Expression von Apoptosemarkern in differenzierten MSZ vor Besiedelung auf die Knochenersatzmaterialien aus PLLA und β-TCP (A), sowie nach achttägiger Kultivierung in Vollmedium (B), in Vollmedium mit rhPDGF-BB (C) und in osteogenem Differenzierungsmedium mit rhPDGF-BB (D).
Die Expression des anti-apoptotischen Markers c-Fos lag nach acht Tagen unterhalb der Detektionsgrenze, wobei dies nicht mit einer progredienten osteogenen Differenzierung korrelierte, da OC- und AP-Expression gleichzeitig rückläufig waren. Die Expression des Apoptosemarkers Bax blieb in allen Versuchsansätzen nachweisbar. Das Gen Bcl-2 mit Bax-inhibitorischer Wirkung wurde dagegen unterhalb der Detektionsgrenze exprimiert. RT-PCR-Produkte von c-Myc und p53 waren in den Agarose-Gelen vorhanden. 1= Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH); 2= Alkalische Phosphatase (AP); 3= Osteocalcin (OC); 4= Runx-2; 5= p53; 6= Bcl-2; 7= c-Myc; 8= c-Fos; 9= Bcl-2-assoziiertes X-Protein (Bax); 10= Histon4 (H4); MSZ= multipotente mesenchymale Stromazellen; PLLA= Poly-L-Laktid; TCP= Trikalziumphosphat; rhPDGF-BB= rekombinant humaner „Platelet Derived Growth Factor"; TCP= Trikalziumphosphat; M=100bp-Marker. EtBr-gefärbte 2%ige Agarose-Gele.

Die Besiedelung der ITV-Konstrukte mit humanen Osteoblasten führte zur Reduktion der c-Fos-Expression unterhalb der Nachweisgrenze. Der Differenzierungsstatus der Zellen war rückläufig - erkennbar an verringerter AP- und OC-Expression. MRNA von p53, c-Myc und Bax war nachweisbar. Die Transkription und Translation des anti-apoptotisch wirkenden Bcl-2 lag unter der Detektionsgrenze.



A **B**

Abb.40: Genexpression von Apoptosemarkern in humanen Osteoblasten vor (A) und nach (B) Besiedelung auf ITV-Konstrukte und Kultivierung in osteogenem Differenzierungsmedium mit rhPDGF-BB.
Die c-Fos-Expression lag nach Versuchsende unterhalb der Detektionsgrenze, wobei die reduzierte AP- und OC-Expression gleichzeitig auf eine rückläufige osteogene Differenzierung hinwies. Der Anti-Apoptosemarker Bcl-2 wurde nur noch schwach exprimiert. Die Expression der Apoptose-induzierenden Gene p53, c-Myc und Bax war weiterhin nachweisbar. Genexpression von 1= Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH); 2= Alkalische Phosphatase (AP); 3= Osteocalcin (OC); 4= Runx-2; 5= p53; 6= Bcl-2; 7= c-Myc; 8= c-Fos; 9= Bcl-2-assoziiertes X-Protein (Bax); 10= Histon4 (H4); ITV= Institut für Textil- und Verfahrenstechnik; rhPDGF-BB= rekombinant humaner „Platelet Derived Growth Factor“ M=100bp-Marker. EtBr-gefärbte 2%ige Agarose-Gele.

3.2 Analyse der Besiedelbarkeit und Zellmigration auf dem neu entwickelten ITV-Knochenersatzmaterial

Die Elektronenmikroskopie als die in der Biomaterialienforschung übliche Darstellungsmethode war bei den neu entwickelten Kompositmaterialien aus PLLA und β-TCP mit den gängigen Aufbereitungsmethoden Kritisch-Punkt-, Glycerin- oder Lufttrocknung nicht durchführbar. Es war mit diesen Methoden nicht möglich die Besiedelung nachzuweisen und zu analysieren. Die „Scaffolds“ deformierten sich und destruierten dabei die Zellmembran und das Zytoskelett der kultivierten Zellen, so dass mit Ausnahme einzelner Aufnahmen (siehe Abb.42) keine intakten Zellen auf den Konstrukten detektiert werden konnten (siehe Abb.41).

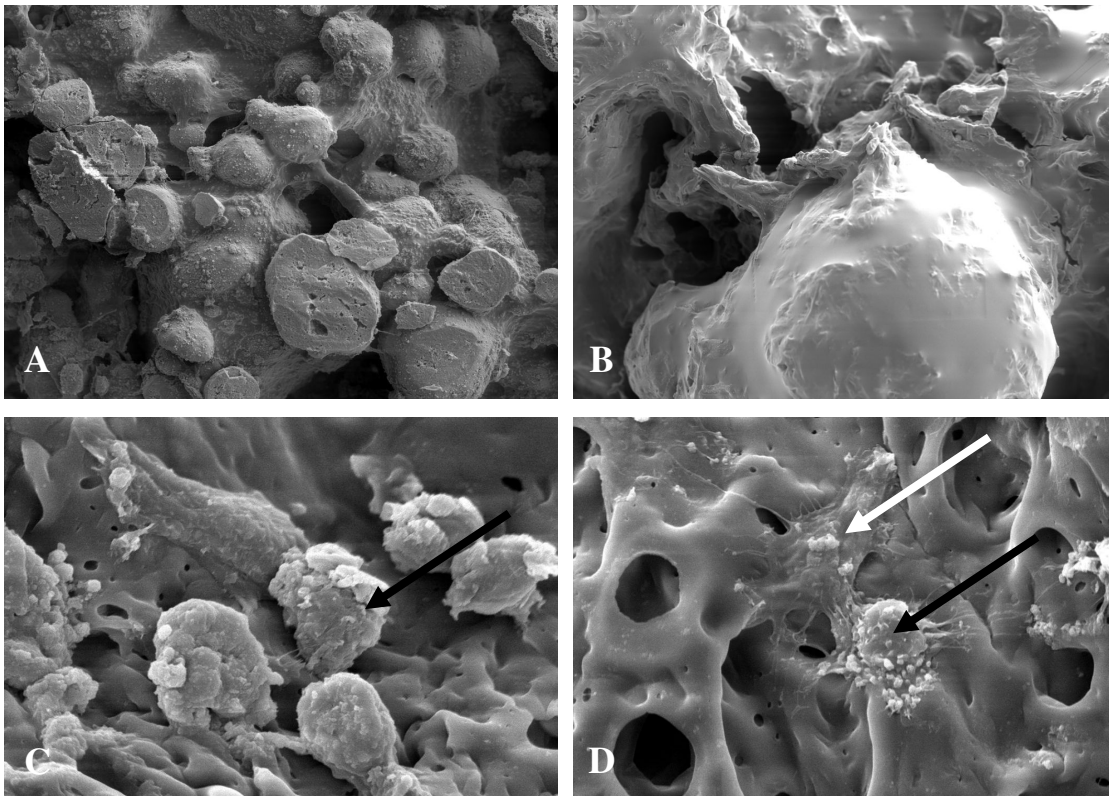


Abb.41: REM-Aufnahmen der neu entwickelten Knochenersatzmaterialien aus PLLA (Poly-L-Laktid) und ß-TCP (Trikalziumphosphat) nach Kritisch-Punkt- (A, B) bzw. Lufttrocknung (C, D).
Deformierte Prüfkörper, die keine Poren mehr aufwiesen und deren ursprüngliche Struktur deformiert war (Vergleiche 2.1.8, Abb.8). Zellen konnten nicht oder nur in destruiertem Zustand detektiert werden (weiße Pfeile). ß-TCP-Partikel waren erkennbar (schwarze Pfeile). (Aufnahmen in 200-facher Vergrößerung).

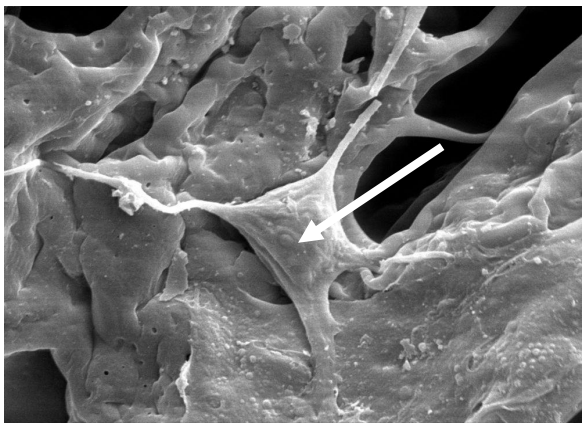


Abb.42: REM-Aufnahme eines ITV-Konstruktes nach Lufttrocknung.
Eine adhärente Zelle mit erhaltener Zellmembran und Zytoskelett (Pfeil) ist auf dem deformierten Prüfkörper erkennbar. ITV= Institut für Textil- und Verfahrenstechnik. (Aufnahmen in 2000-facher Vergrößerung).

Da die klassischen Aufbereitungsmethoden für die Elektronenmikroskopie bei den ITV-„Scaffolds“ nicht durchführbar waren, wurden einzelne Konstrukte mittels Gefrierbruchtrocknung konserviert und anschließend analysiert. Mit dieser Methodik konnte an einigen Prüfkörpern die Besiedelung nachgewiesen werden. Zellen und Biomaterial blieben in ihrer Struktur erhalten. Bei der Gefrierbruchtrocknung kann methodisch bedingt die Migrationsstrecke der Zellen nicht bestimmt werden. Es zeigten sich nach achttägiger Kultivie-

rung adhärente Zellen auf der Oberfläche der Konstrukte (siehe Abb. 43A). In den tieferen Bereichen der „Scaffolds“ waren nur vereinzelte Zellen detektierbar (siehe Abb.43B). Die inneren Areale der würfelförmigen „Scaffolds“ blieben unbesiedelt (siehe Abb.44).

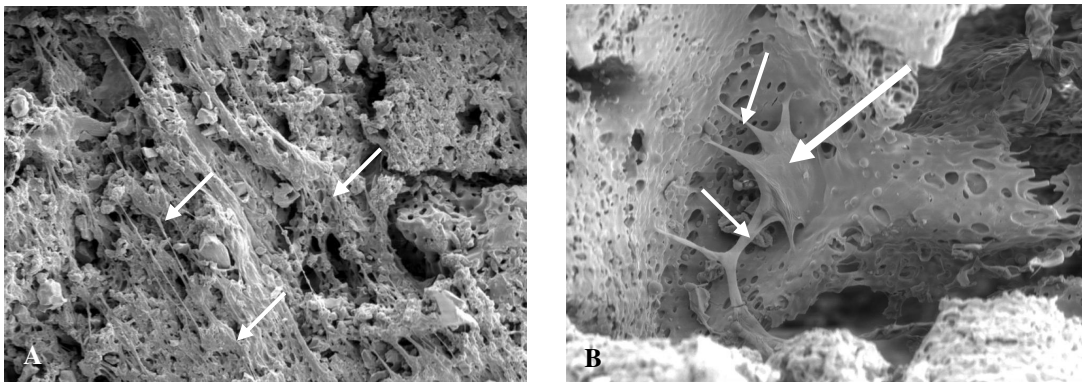


Abb.43: REM-Aufnahmen von besiedelten ITV-Prüfkörpern aus PLLA (Poly-L-Laktid) und β-TCP (Trikalziumphosphat) nach Gefrierbruchtrocknung.
A: *Nachweis adhärenter Zellen (Pfeile) an der Oberfläche eines „Scaffolds“.* ***B:*** *Einzelne Zelle (großer Pfeil) adhäriert über Filopodien (kleine Pfeile) in tieferer Schicht des Knochenersatzmaterialkonstrukts. ITV= Institut für Textil- und Verfahrenstechnik. (Aufnahmen in 500-facher Vergrößerung).*

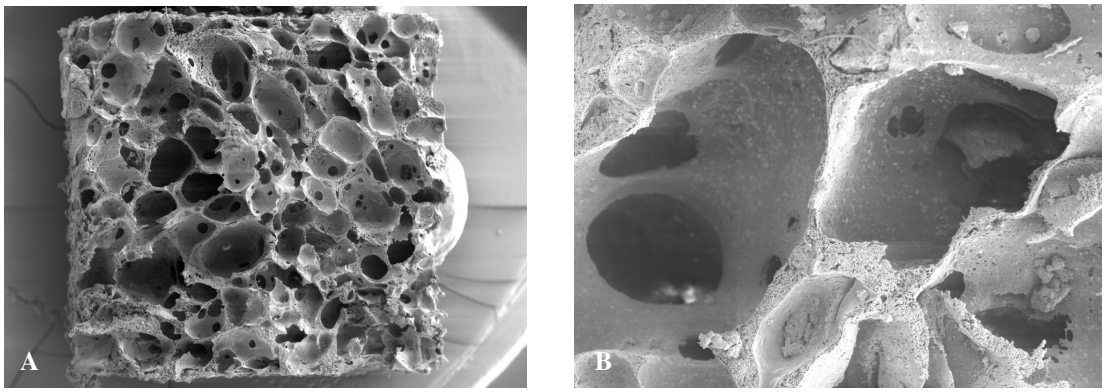


Abb.44: REM-Aufnahme eines ITV-Konstruktes nach Gefrierbruchtrocknung.
A*: Auf der Innenseite des gebrochenen Prüfkörpers konnten keine Zellen nachgewiesen werden. Die Aufnahme zeigte einen in seiner Struktur erhaltenen Prüfkörper (Aufnahme in 19-facher Vergrößerung).* ***B****: Bei stärkerer Vergrößerung waren keine Zellen im Inneren des „Scaffolds“ detektierbar (500-fache Vergrößerung). Die Aufnahmen dokumentierten Interkonnektivität und Makroporosität des Materials. ITV= Institut für Textil- und Verfahrenstechnik.*

Um die Besiedelung und Migrationsstrecke auf den neu entwickelten ITV-„Scaffolds“ zu untersuchen, wurde eine Färbetechnik mit Toluidinblau O 0,1% (siehe 2.2 unter 2.2.8) etabliert, bei der die basophilen Strukturen der Zellkerne angefärbt wurden. Um die Validität der Methode nachzuweisen, wurde sie auch bei besiedelten Cerasorb-Konstrukten angewendet und der gelungene Zellnachweis dokumentiert (siehe Abb.45).

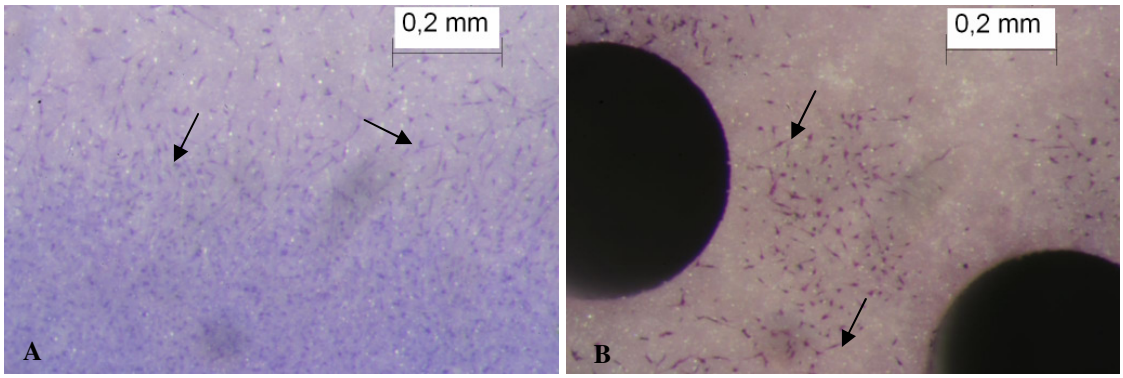


Abb.45: Lichtmikroskopische Aufnahmen von besiedelten und Toluidinblau O 0,1% gefärbten Cerasorb-Prüfkörper ohne (A) und mit (B) Bohrung*. Durch die Färbung sind blau gefärbte Zellen erkennbar (Pfeile).*

Die Färbung der neuen Knochenersatzmaterialien aus β-TCP und PLLA mit Toluidinblau O 0,1% zeigte an ihrer Oberfläche eine gleichmäßige Besiedelung mit Zellen (siehe Abb.46).

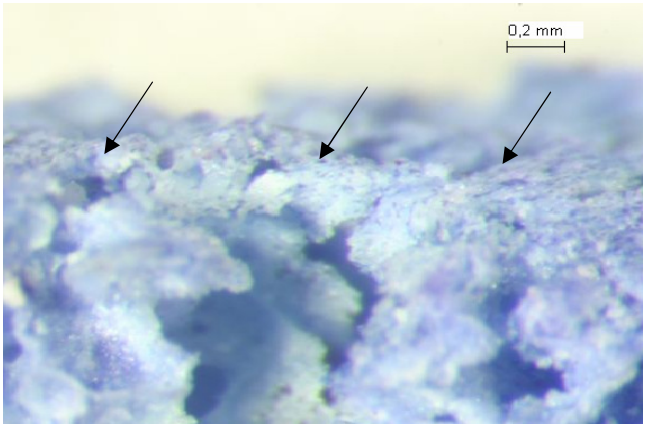


Abb.46: Lichtmikroskopische Aufnahme der Oberfläche eines Konstrukts aus β-TCP und PLLA.
Die Toluidinblau gefärbten Zellen bilden einen gleichmäßigen und dichten Zellrasen (Pfeile). TCP= Trikalziumphosphat; PLLA= Poly-L-Laktid.

Bei der Färbung und lichtmikroskopischen Inspektion tieferer Schichten der neuen ITV-Materialien stellte sich heraus, dass die Prüfköper nach achttägiger Kultivierung nur oberflächlich besiedelt waren. Eine Besiedelung zentraler Bereiche sowie die angestrebte, gleichmäßige dreidimensionale Besiedelung der „Scaffolds“ waren nicht nachweisbar. Die Färbung erbrachte keinen Zellnachweis im Inneren der Konstrukte, so dass davon auszugehen ist, dass nach achttägiger Zellkultivierung auf den Prüfkörpern keine ausreichende Migration induziert wurde (siehe Abb.47).

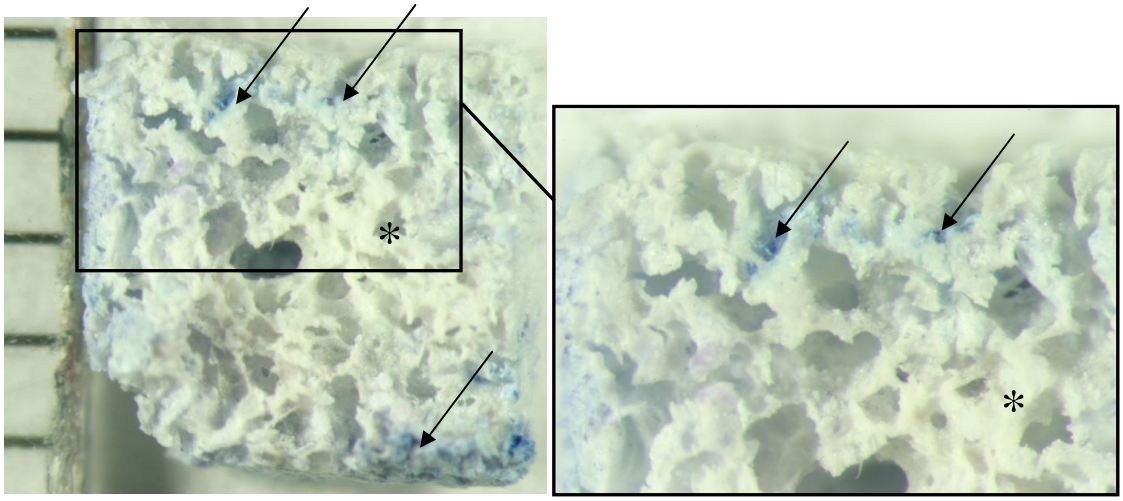


Abb.47: Lichtmikroskopische Aufnahme eines mit multipotenten mesenchymalen Stromazellen (MSZ) besiedelten und Toluidinblau gefärbten Prüfkörpers aus ß-TCP (Trikalziumphosphat) und PLLA (Poly-L-Laktid). *MSZ stellten sich blau dar und waren nur an der „Scaffold"-Oberfläche nachweisbar (Pfeile). Die zentralen Bereiche waren unbesiedelt (*).*

Auch die Kultivierung mit humanen Osteoblasten führte zu keiner verbesserten Besiedelung und Zellmigration. Bei der Toluidinblau-Färbung lies sich lediglich ein dünner und oberflächlicher Zellrasen nachweisen, während eine Zellmigration bis ins Innere der „Scaffolds" wiederum ausblieb (siehe Abb.48).

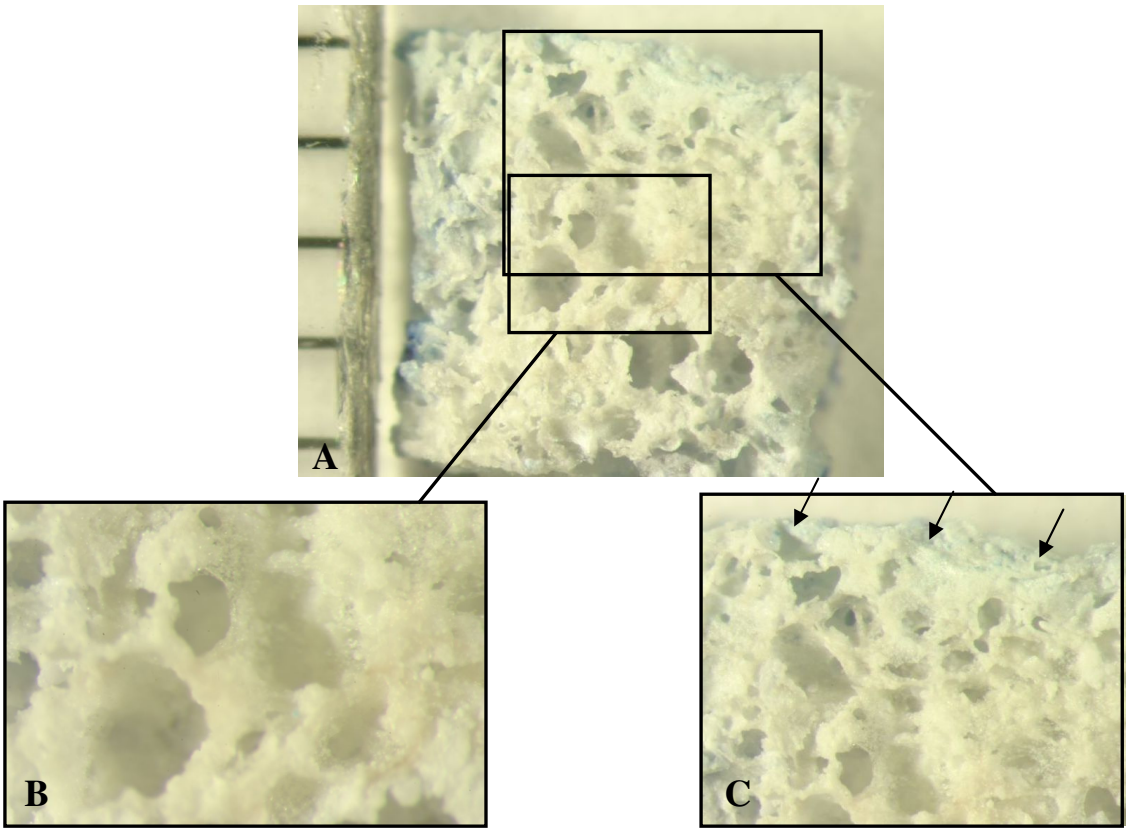


Abb.48: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Toluidinblau-gefärbten ITV-„Scaffolds".
Die ITV-Knochenersatzmaterialien wurden mit humanen Osteoblasten besiedelt. Die Überblickaufnahme zeigte einen dünnen Zellrasen an der Oberfläche (A). In der Vergrößerung zeigt sich die ausbleibende Migration in zentrale Bereiche (B). Bei stärkerer Vergrößerung waren Zellen an der Oberfläche detektierbar (Pfeile) (C). ITV= Institut für Textil- und Verfahrenstechnik.

3.3 Ansätze zur Optimierung der Besiedelung und Migration auf dem neuartigen ITV-Knochenersatzmaterial

Die Etablierung eines Wachstumsfaktorgradienten von rhPDGF-BB (100ng/ml) sollte die Besiedelung der neuen Knochenersatzmaterialien optimieren und durch Chemotaxis eine gerichtete Migration der humanen multipotenten mesenchymalen Stromazellen und humanen Osteoblasten induzieren. Trotz chemotaktischem Stimulus wurden dreidimensionale Besiedelung sowie Zellmigration in das neuartige Kompositbiomaterial nicht verbessert. Vereinzelt konnten Zellen in tieferen Schichten der „Scaffolds“ detektiert werden, jedoch waren die zentralen Bereiche stets unbesiedelt (siehe Abb.49).

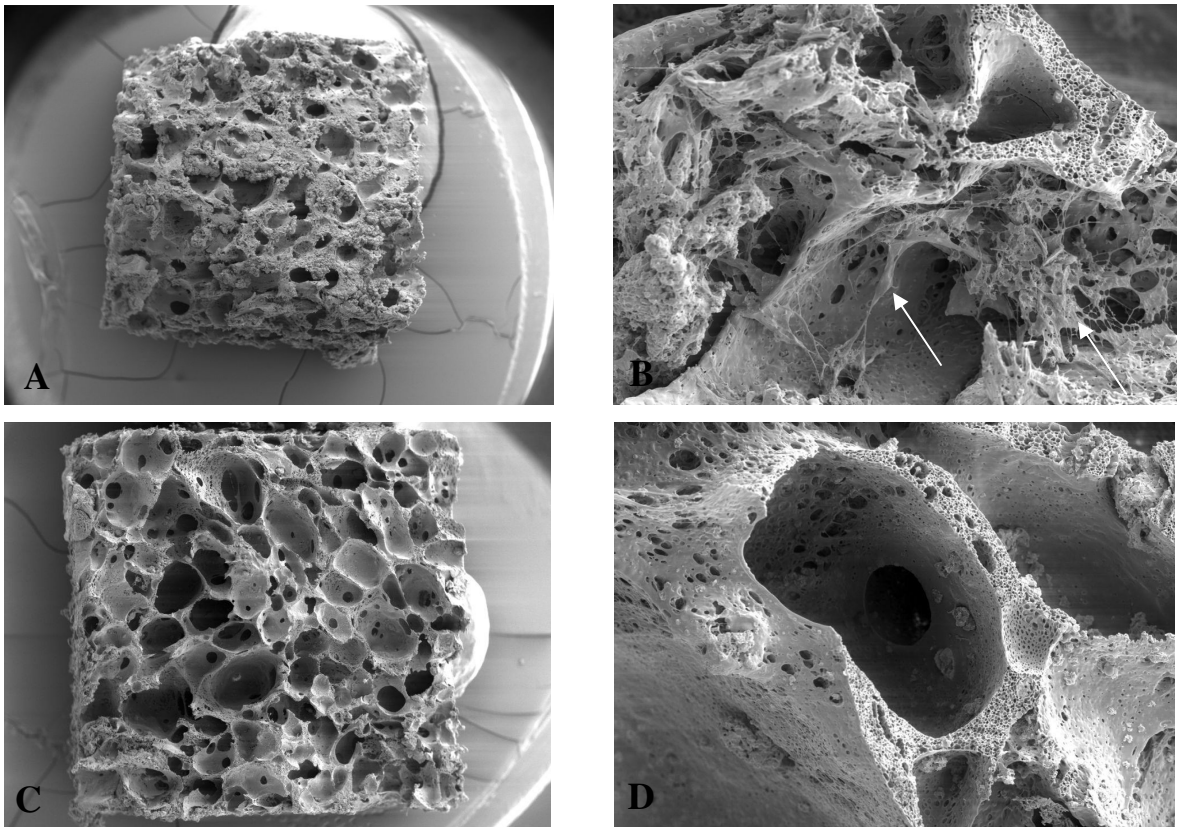


Abb.49: REM-Aufnahmen mit MSZ besiedelter und unter rhPDGF-BB kultivierter ITV-Konstrukte nach Gefrierbruchtrocknung.
Durch die Zugabe des chemotaktischen Stimulus konnten bei einzelnen Konstrukten aus β-TCP (Trikalziumphosphat) und PLLA (Poly-L-Laktid) einige Zellen in tieferen Schichten nachgewiesen werden (Pfeile) (A, B). Trotzdem blieben die zentralen Bereiche der „Scaffolds“ unbesiedelt (C, D). MSZ= multipotente mesenchymale Stromazellen; rhPDGF-BB= rekombinant humaner „Platelet Derived Growth Factor“; ITV= Institut für Textil- und Verfahrenstechnik.

Auch die Toluidinblau-Färbung konnte keine durch rhPDGF-BB induzierte, verbesserte Migration der MSZ in die „Scaffolds“ nachweisen (siehe Abb.50).

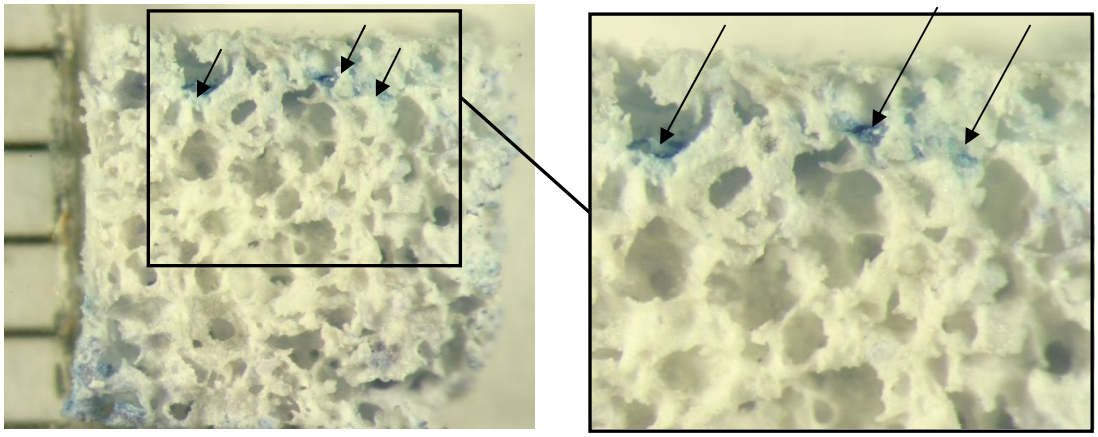


Abb.50: Lichtmikroskopische Aufnahmen der „Scaffolds“ aus PLLA und β-TCP mit Toluidinblau-gefärbten multipotenten mesenchymalen Stromazellen (Pfeile). *Die Zellen wurden unter rhPDGF-BB auf den ITV-Konstrukten kultiviert. Es zeigte sich keine verbesserte Migration der Zellen in zentrale Bereiche der Prüfkörper verglichen mit den Aufnahmen ohne chemotaktischen Stimulus (vgl. Abb.50). PLLA= Poly-L-Laktid; rhPDGF-BB= rekombinant humaner „Platelet Derived Growth Factor“; TCP= Trikalziumphosphat.*

Die mit humanen Osteoblasten besiedelten „Scaffolds“ schienen, bei geringer Vergrößerung unter rhPDGF-BB eine verbesserte Zellmigration in die Prüfkörper aufzuweisen (siehe Abb.51A). Bei stärkerer Vergrößerung zeigte sich jedoch, dass es sich bei den angefärbten Strukturen nur in den oberflächlichen Schichten um Zellen handelte (siehe Abb.51B). Die Anfärbung weiterer Strukturen ließ sich durch eine Reaktion des basischen Farbstoffs mit aziden Rückständen auf dem Material erklären (siehe Abb.51C).

Zudem zeigten sich in den mikroskopischen Aufnahmen Areale, die scheinbar keine Verbindung zu den benachbarten Poren aufwiesen. In den umliegenden Bereichen waren erneut unspezifische Farbstoffreaktionen mit aziden Rückständen oder Materialkomponenten nachweisbar. In dem markierten, abgeschlossenen Bereich schien jedoch keine Akkumulation von basophilen Stoffwechsel- oder Materialrückständen stattgefunden zu haben (siehe Abb.52). Die Bereiche waren möglicherweise von der Mediumdiffusion ausgeschlossen.

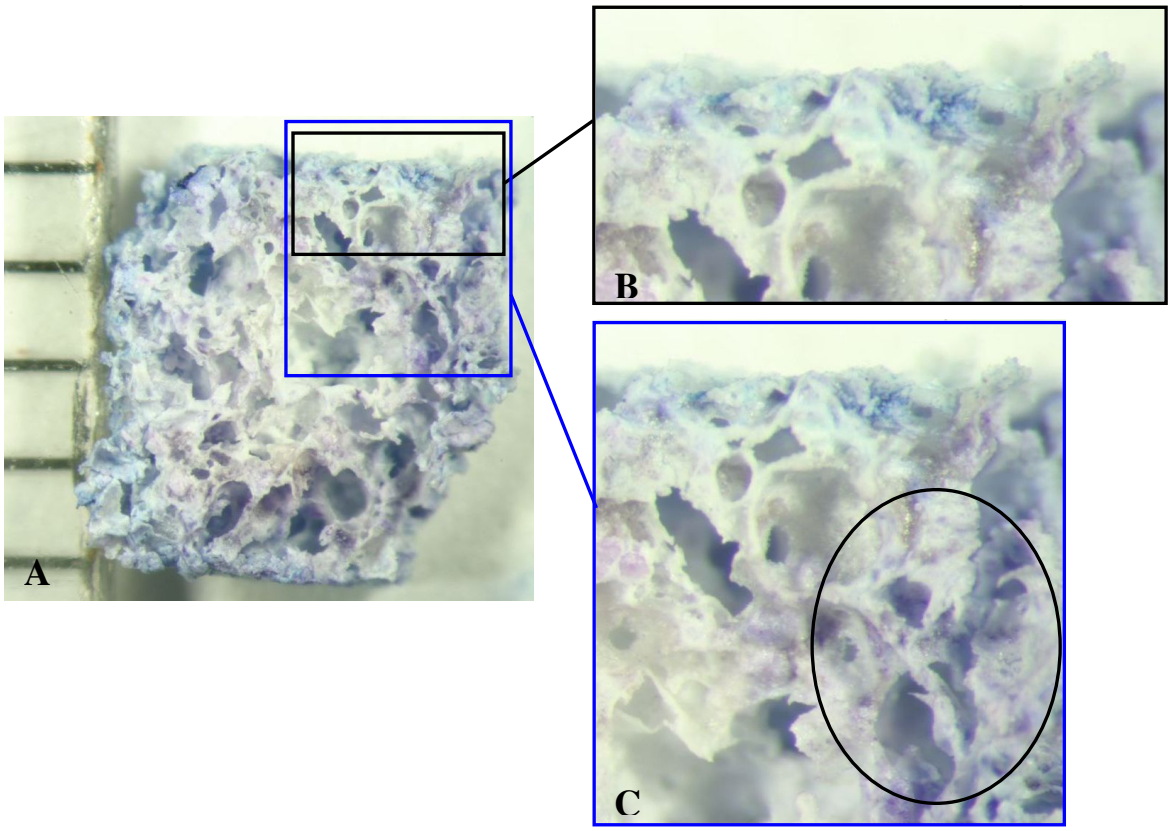


Abb.51: Lichtmikroskopische Aufnahmen mit Osteoblasten besiedelter und Toluidinblau gefärbter Prüfkörper aus PLLA (Poly-L-Laktid) und β-TCP (Trikalziumphosphat).
Die neu entwickelten Knochenersatzmaterialien wurden mit humanen Osteoblasten besiedelt und unter rhPDGF-BB kultiviert. Die Übersichtsaufnahme zeigte eine scheinbare Verbesserung der Zellmigration im Vergleich mit dem Versuchsansatz ohne rhPDGF-BB (Vgl. Abb.48) (A). Durch die stärkere Vergrößerung konnte nachgewiesen werden, dass sich die Besiedelung weiterhin auf die oberflächlichen Materialschichten beschränkte (Pfeil in B). Die Blaufärbung weiterer Prüfkörperareale wurde durch unspezifische Reaktionen zwischen Farbstoff und Materialkomponenten oder Rückständen von Stoffwechselmetaboliten induziert (Markierung in C). rhPDGF-BB= rekombinant humaner „Platelet Derived Growth Factor“.

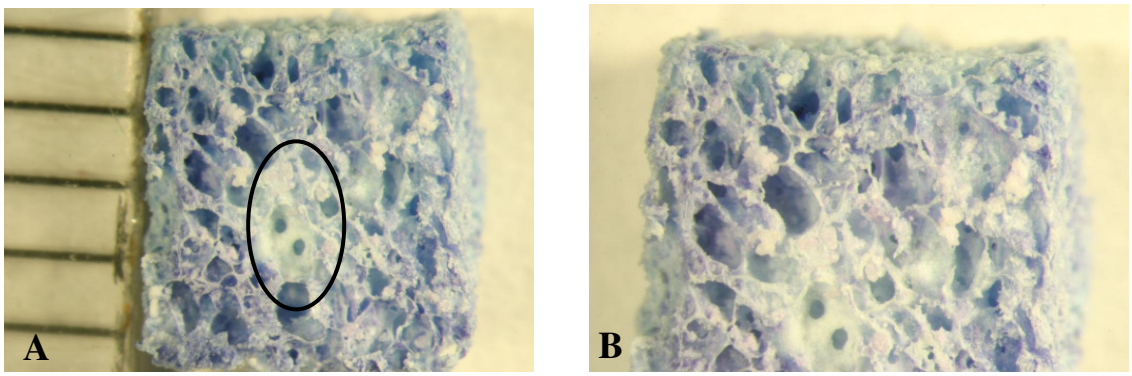


Abb.52: Lichtmikroskopische Aufnahme eines Toluidinblau gefärbten Prüfkörpers.
Es waren Areale detektierbar, die nicht angefärbt wurden und scheinbar keine Verbindung zu den umliegenden Poren aufwiesen (Markierung in A). In diesem Bereich war auch in der stärker vergrößerten Aufnahme (B) keine unspezifische Reaktion zwischen basischem Farbstoff und aziden Material- oder Stoffwechselrückständen nachweisbar. Daraus konnte geschlossen werden, dass die Bereiche von der Mediumdiffusion ausgeschlossen waren und die „Scaffolds“ somit über keine komplette Interkonnektivität verfügten.

3.4 Untersuchungen zur Biokompatibilität des neu entwickelten ITV-Knochenersatzmaterials

Nachdem die Analyse der Apoptosemarker in den RT-PCRs Hinweise auf eine verstärkte Induktion von Apoptose auf den neu entwickelten Knochenersatzmaterialien lieferte, wurde ein weiteres Experiment etabliert, um die Biokompatibilität des Kompositmaterials zu untersuchen. Es wurden würfelförmige ITV-„Scaffolds“ mittels Xylol lysiert und in Vollmedium gelöst. Mit diesem Medium (Prüfmedium) wurden multipotente mesenchymale Stromazellen über vier Tage kultiviert. In einem Kontrollexperiment wurden MSZ in Vollmedium, das die gleiche Menge Xylol enthielt (Kontrollmedium), über vier Tage kultiviert (siehe 2.2 unter 2.2.11).

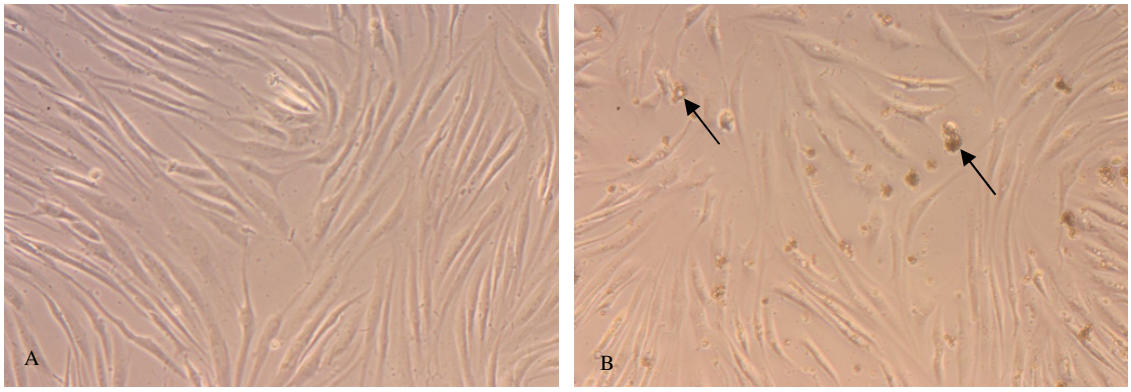


Abb.53: Lichtmikroskopische Aufnahmen von multipotenten mesenchymalen Stromazellen (MSZ) in Zellkultur. *MSZ nach vier Tagen Zellkultur in Kontrollmedium (= Vollmedium + Xylol) und Prüfmedium (= Vollmedium + in Xylol lysierte ITV-Prüfkörper).* ***A:*** *Im Kontrollmedium zeigten die MSZ ihre spindelförmige Gestalt und bildeten einen dichten Zellverbund.* ***B:*** *Im Prüfmedium ist die Zellpopulation weniger dicht, weist aber dennoch die für MSZ typische Zellform auf. Nicht gelöste Materialbestandteile liegen zwischen den Zellen (Pfeile). (Aufnahmen in 10-facher Vergrößerung).*

3.4.1 Induktion von Apoptose

Semi-quantitative RT-PCRs wiesen in MSZ bei Kultivierung in Nährmedium mit und ohne lysierte ITV-„Scaffolds“ mRNA der Apoptosemarker Bax und p53 nach. Die Genexpression von c-Myc wurde unter keiner der Kultivierungsbedingungen induziert. Die Expression des Bax-inhibierenden Gens Bcl-2 war in dem Kulturmedium mit den lysierten Prüfkörpern niedriger als im Kontrollmedium. Das anti-apoptotisch wirkende Gen c-Fos wurde im Prüfmedium unterhalb der Detektionsgrenze exprimiert, während seine Expression im Kontrollmedium nachweisbar war (siehe Abb.54).

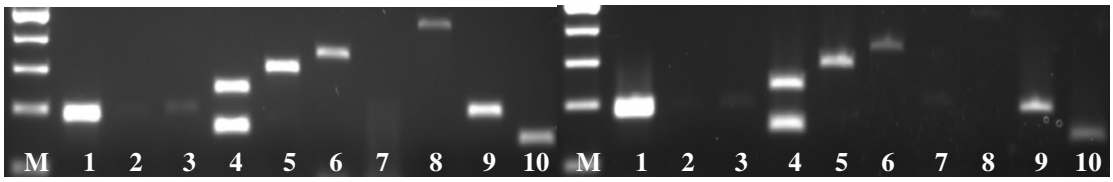


Abb.54: Genexpression von Apoptosemarkern in MSZ nach Kultivierung in Kontrollmedium aus Vollmedium und Xylol (A) bzw. in Prüfmedium aus Vollmedium mit lysierten ITV-Konstrukten (B).
Die Apoptose-induzierenden Gene Bax und p53 wurden in MSZ in beiden Kulturmedien exprimiert. Das Bax-inhibierende Gen Bcl-2 wurde unter Einfluss der lysierten ITV-„Scaffolds" vermindert exprimiert, was auf vermehrte Bax-induzierte Apoptose schließen lässt. Die Expression des anti-apoptotischen Markers c-Fos lag im Prüfmedium unter der Nachweisgrenze, während sie im Kontrollmedium detektiert werden konnte. Genexpression von 1= Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH); 2= Alkalische Phosphatase (AP); 3= Osteocalcin (OC); 4= Runx-2; 5= p53; 6= Bcl-2; 7= c-Myc; 8= c-Fos; 9= Bcl-2-assoziiertes X-Protein (Bax); 10= Histon4 (H4); MSZ= multipotente mesenchymale Stromazellen; M=100bp-Marker; ITV= Institut für Textil- und Verfahrenstechnik. EtBr-gefärbte 2%ige Agarose-Gele.

Die Heterodimerisierung des Bcl-2-Proteins mit dem Bax-Protein verhindert die Aktivierung einer Bax-induzierten Signalkaskade, die in der Initiation apoptotischer Prozesse resultiert. In quantitativen Realtime PCR-Analysen sollte deshalb die relative Änderung der Bax- und Bcl-2-Expression bezogen auf den Zeitpunkt t_0 zwischen den verschiedenen Kulturmedien bestimmt werden. Es zeigte sich, dass in MSZ, die unter dem Einfluss der lysierten Prüfkörper kultiviert wurden, quantitativ mehr mRNA von Bax synthetisiert wurde als in der MSZ-Zellpopulation im Kontrollmedium. Die Expression des Bax-inhibierenden Bcl-2 wurde unter dem Einfluss der lysierten Knochenersatzmaterialien herunterreguliert. Die relative Änderung der Bax- und Bcl-2-Genexpression zwischen Prüf- und Kontrollmedium zeigte, dass im Medium mit den lysierten ITV-Konstrukten weniger Bcl-2 und mehr Bax exprimiert wurde (siehe Abb.55). Da diese Experimente aufgrund fehlender Prüfkörper nur in einer kleinen Fallzahl (n=5; eine Kontrolle mit jeweils einem Ansatz) ermittelt werden konnten, können diese Daten nur erste Anhaltswerte sein.

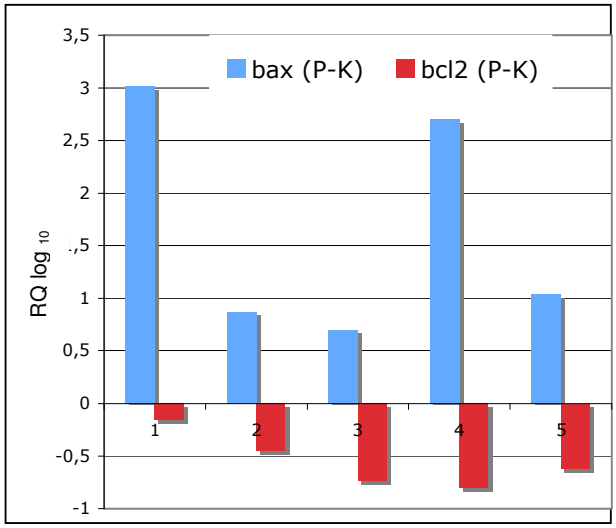


Abb.55: Relative Quantifizierung von Bax und bcl2 in MSZ.
Dargestellt sind die relativen Änderungen der Genexpression innerhalb der Proben abzüglich der Expression in den Kontrollen (n=5). Die jeweilige Expression wurde bezogen auf die Expression zum Zeitpunkt t_0. Ein positiver Wert deutet auf eine Steigerung der Expression hin, ein negativer Wert entspricht einer Verringerung. P=Proben; K=Kontrolle; MSZ= multipotente mesenchymale Stromazellen; Bax= bcl-2-assoziiertes X-Protein; bcl2=" b-cell lymphoma 2".

3.4.2 Einfluss auf Proliferation und Vitalität der kultivierten Zellen

Nach Versuchsende wurden Vitalzellzahl und Vitalität der in Kontroll- und der in Prüfmedium kultivierten Zellen mit einem Zellzahlmessgerät bestimmt. Es wurden fünf Versuchsansätze mit MSZ verschiedener Spender durchgeführt und aus den Ergebnissen für Vitalzellzahl und Vitalität die Mittelwerte sowie Standardabweichung bestimmt. Die durchschnittliche Vitalzellzahl bei Kultivierung im Kontrollmedium betrug $3{,}48 \times 10^5$, während die Vitalzellzahl im Prüfmedium $1{,}76 \times 10^5$ erreichte. Die Vitalität der Zellen im Kontrollmedium lag bei 82,83%, die Vitalität im Prüfmedium bei 71,14%. Die Unterschiede erreichten das Signifikanzniveau nicht ($p>0{,}05$).

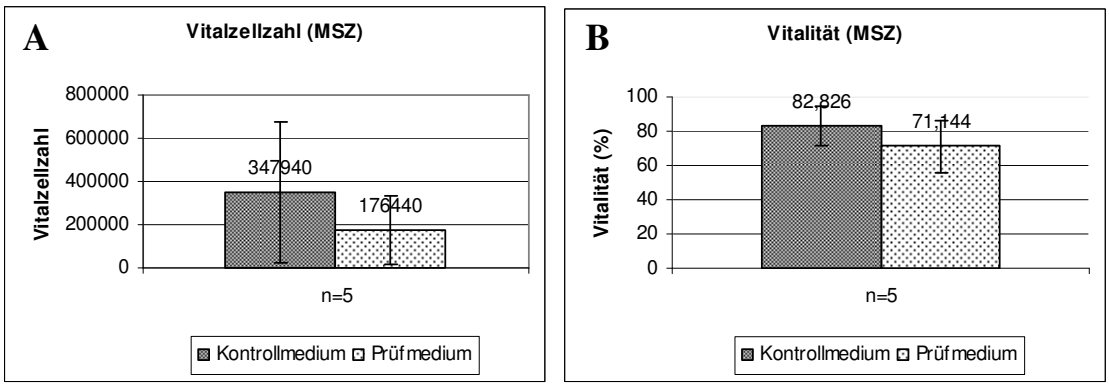


Abb.56: Vitalzellzahl (A) und Vitalität (B) von multipotenten mesenchymalen Stromazellen (MSZ) nach Kultivierung in Kontroll- bzw. Prüfmedium über vier Tage. Die durchschnittliche Vitalzellzahl lag mit $3{,}48 \times 10^5$ im Kontrollmedium über der Vitalzellzahl von $1{,}76 \times 10^5$ im Prüfmedium. Die Vitalität war ebenfalls im Kontrollmedium (82,83%) höher als im Prüfmedium (71,14%). (n=5, Mittelwert ± Standardabweichung).

4. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Eignung eines vom Institut für Textil- und Verfahrenstechnik (ITV) Denkendorf neu entwickelten Kompositbiomaterials aus PLLA und β-TCP für den Ersatz von Knochengewebe zu untersuchen. Diese Kooperation ist ein Projekt im „Kompetenznetz Biomaterialien Baden-Württemberg“. Durch die Besiedelung der neuartigen „Scaffolds“ mit humanen multipotenten mesenchymalen Stromazellen sowie humanen Osteoblasten und die Verwendung von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren sollte im Rahmen des „Tissue Engineering“ von Knochen die osteoinduktive und osteokonduktive Potenz des neuartigen Konstruktes verbessert werden. Zum Vergleich wurden verschiedene etablierte Knochenersatzmaterialien in den identischen Kultivierungsbedingungen untersucht und hinsichtlich derselben Kriterien evaluiert.
Physikalisch-chemische und topographische Oberflächeneigenschaften der verschiedenen „Scaffolds“ sollten bei Kontakt mit humanen Zellen die Zelladhäsion ermöglichen. Durch die stattfindenden Zell-Zell- sowie Zell-Matrix-Interaktionen werden Veränderungen in der Signaltransduktion mit Auswirkungen auf Gen- und Proteinexpression evoziert. Die Induktion von Migration und osteogener Differenzierung der Zellen gilt als Voraussetzung eines Biomaterials für den Ersatz von Knochengewebe.
Die dargestellten Ergebnisse liefern wichtige Hinweise über die Eigenschaften verschiedener Biomaterialien bezüglich der Induktion von Zellmigration, Zelldifferenzierung und Zellproliferation. Es wurden Erkenntnisse über die Biokompatibilität der untersuchten Knochenersatzmaterialien gewonnen.

1.1 Vergleich der neuartigen ITV-Knochenersatzmaterialien mit bereits etablierten Knochenersatzmaterialien

Biomaterialien aus Trikalziumphosphat (TCP) haben eine gute Biokompatibilität, aber den Nachteil eines langsamen Degradationsverhaltens (Koepp et al. 2004). Die Herstellung eines TCP-PLLA-Kompositmaterials durch das ITV Denkendorf sollte diese ungünstige Materialeigenschaft kompensieren. PLLA findet bereits in Naht- und Plattenosteosynthesematerialien Anwendung und zeichnet sich durch eine rasche biologische Degradation über Esterhydrolyse aus. Im Tricarbonsäurezyklus können die entstandenen Monomere physiologisch abgebaut werden. Synthetische Polymere aus PLLA verfügen über eine va-

riable Prozessierbarkeit und sind in Form poröser Schäume, als Fasernetze oder Pulver verfügbar (Fleming et al. 2000, Likorish et al. 2007, Rezwan et al. 2006). Durch die Kombination eines rasch degradierenden Polymers mit TCP wird eine höhergradige Porosität als bei reinen Polymermaterialien ermöglicht, da das langsamer abbaubare anorganische Kalziumphosphat eine ausreichende mechanische Stabilität gewährleistet.

Die vom ITV Denkendorf zur Verfügung gestellten würfelförmigen TCP-PLLA-Schäume boten die Möglichkeit, durch zelluläre Besiedelung der „Scaffolds" ein dreidimensionales Zellkultursystem zu etablieren. Marker des osteoblastären Phänotyps werden in Zellen bei Kultivierung im 3D-Modell verstärkt exprimiert. Im Vergleich zur Monolayerkultur wird zudem die Synthese und Sekretion von extrazellulären Matrixmineralisierungsproteinen vermehrt stimuliert. Die ITV-Knochenersatzmaterialien mit einer Kantenlänge von 5mm sollen eine Gesamtporosität von 83% bei einer Korngröße von 150-500µm aufweisen. Dadurch wären bei kompletter Poreninterkonnektivität die Vorraussetzungen für ausreichende Mediumdiffusion innerhalb des „Scaffolds" ohne die Applikation eines Perfusionssystems erfüllt. Makro- (>50µm) und Mikroporosität (<10µm) sowie Poreninterkonnektivität sind zudem entscheidende Parameter für die Zellmigration, Zellproliferation und Osteokonduktiviät eines Knochenersatzmaterials (Link et al. 2006, Wang et al. 2006). Die in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen nachweisbare Mikroporosität der neuartigen „Scaffolds" resultiert in einer größeren Oberfläche für Proteinadsorptionsprozesse zur Stimulation der Sekretion osteogener Matrixmineralisierungsproteine. Die makroporösen Strukturen würden eine beschleunigte Zellmigration in die neuartigen Prüfkörper ermöglichen (Karageorgiou u. Kaplan 2005). Diese Materialeigenschaften bieten prinzipiell gute Voraussetzung für die Induktion von Osteogenese und die Integration des Biomaterials an der Implantationsstelle. Durch die hohe Porosität der neuen ITV-Konstrukte haben sie zudem eine geringere Masse als die vergleichend beurteilten soliden Cerasorb-Materialien oder die weniger porösen GB9N- und α-TCP-Prüfkörper.

Die Besiedelung der neuen „Scaffolds" mit in Medium suspendierten Zellen legte hydrophobe Eigenschaften des neuen Knochenersatzmaterials offen, die durch die einwöchige Vorinkubation der Prüfkörper in Leermedium nicht kompensiert werden konnten. Die geringe Oberflächenpolarität von PLLA ist bedingt durch seine Methylgruppen und reduziert bei der Besiedelung mit Zellen das „cellular attachment" als Voraussetzung für Zelladhäsion und Zellmigration (Meyer et al. 2005). Daraus könnten eine ungleichmäßige Verteilung der Zellen auf dem Konstrukt sowie eine verminderte Zell-Matrix-Interaktion über integrale Membranproteine resultieren. Zelluläre Motilität, Migration und Differenzierung

würden durch veränderte Signaltransduktion und transmembranären Stofftransport vermindert induziert werden (Hee et al. 2006, Janssen et al. 2006, Meyer et al. 2005, Zhou et al. 2007).

In einer kollaborierenden Arbeitsgruppe wurden mechanische Stabilitätstests durchgeführt, um die elastische Verformbarkeit des neu entwickelten Knochenersatzmaterials zu überprüfen. Dabei wurde beobachtet, dass die „Scaffolds“ unter mechanischer Belastung eine plastische Verformung vollzogen, die sich nach Belastungsende nicht zurückbildete (Ignatius et al. 2006 persönliche Mitteilung).

Die neuartigen ITV-Prüfkörper erwiesen sich in der Aufbereitung für die Elektronenmikroskopie als labil. Luft-, Glycerin- und Kritisch-Punkt-Trocknung waren nicht durchführbar, da sich die Prüfkörper dabei deformierten und kein Nachweis von Zellen möglich war. Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei der Etablierung einer Sterilisationstechnik für Polymermaterialien in einer anderen Arbeitsgruppe gemacht. Hohe Temperaturen oder Druck führten zur morphologischen Degeneration der untersuchten PLGA-Substrate (Holy et al. 2001). Es ist bekannt, dass die hydrolytische PLLA-Degradation von Faktoren wie Temperatur, Pufferkapazität, pH, Ionenstärke und der speziellen Prozessierung der Konstrukte abhängt. Es bestehen Unterschiede in der chemischen Zusammensetzung, molaren Masse und Orientierung der Polymerketten zwischen verschiedenen PLLA-„Scaffolds“ (Rezwan et al. 2006). Mittels Gefrierbruchtrocknung gelang die elektronenmikroskopische Darstellung der besiedelten ITV-„Scaffolds“. Bei dieser Technik konnte zwar - methodisch bedingt- die Migrationsstrecke der Zellen in das Konstrukt nicht bestimmt werden, aber es war damit möglich, adhärierte Zellen auf dem Material nachzuweisen und zu beurteilen.

Die licht- und elektronenmikroskopischen Aufnahmen wiesen an der Oberfläche der neuen ITV-„Scaffolds“ einen Zellrasen nach, der Zell-Zell- sowie Zell-Matrix-Interaktionen ermöglichte. In tieferen Schichten der neuartigen Knochenersatzmaterialien aus β-TCP und PLLA konnten nur vereinzelt Zellen detektiert werden. Die zentralen Bereiche blieben unbesiedelt. Einige mikroskopische Aufnahmen deuteten darauf hin, dass in den Konstrukten abgeschlossene Areale vorlagen, wodurch die vollständige Interkonnektivität des Komposits in Frage gestellt war. Es ist beschrieben, dass TCP-Blöcke über keine komplette Interkonnektivität verfügen und deshalb vor ihrer Degradation nicht vollkommen von osteogenen Zellen durchbaut werden konnten (Fleming et al. 2000). Neben der eingeschränkten Migration könnte eine inkomplette Poreninterkonnektivität auch Limitationen bezüglich der Mediumperfusion bedingen. Eine maximale zelluläre Vitalität erfordert die ausreichende Versorgung mit Sauerstoff, Glukose und Aminosäuren. Stoffwechselmetabo-

lite, die bei Akkumulation potentiell toxische Auswirkungen auf die Zellen haben, müssen abdiffundieren können. Komplette Interkonnektivität sowie ausreichende Makroporosität (Porengröße >300µm) gelten zudem als Voraussetzung für Vaskularisierungsprozesse (Karageorgiou u. Kaplan 2005).
Wang et al. konnten bei Applikation eines Niederdrucksystems nachweisen, dass aus TCP-Prüfkörpern beträchtliche Mengen an Luftbläschen austraten (Wang et al. 2006). Im Prüfkörper eingeschlossene Luftbläschen würden zudem erklären, dass die Konstrukte bei der Versuchsdurchführung im Medium Auftrieb erfuhren. Die einwöchige Vorinkubation der „Scaffolds“ in Leermedium änderte diese physikalische Eigenschaft nicht. Diese Beobachtung würde die These bestätigen, dass innerhalb der Konstrukte vom Umgebungsmilieu abgetrennte Areale vorlagen. Die Toluidinblaufärbung der besiedelten Prüfkörper lieferte ebenfalls entsprechende Hinweise.

Um die Migration und Verteilung der Zellen in den neu entwickelten „Scaffolds“ zu verbessern, wurde in dem Versuchsaufbau ein Gradient des Wachstumsfaktors rhPDGF-BB etabliert. In einem Knochendefekt wird die Knochenneubildung bei mechanischem Stress, Veränderungen im Sauerstoffgehalt oder Verlust der vaskulären Versorgung über zahlreiche Zytokine und Wachstumsfaktoren initiiert. Verschiedene PDGF-Isoformen werden initial von degranulierenden Plättchen im Frakturhämatom freigesetzt und wirken auf multipotente mesenchymale Stromazellen proliferativ und chemotaktisch (Barnes et al. 1999). Nash et al. konnten im Kaninchenmodell folgendes nachweisen: Osteotomien der Tibia, die mit PDGF enthaltenden Kollagenen ostoesynthetisch versorgt wurden, unterschieden sich 28 Tage nach OP bezüglich der Belastbarkeit nicht signifikant von der nichtoperierten Gegenseite. Die Defekte, die nur mit Kollagenen aufgefüllt wurden, waren signifikant weniger belastbar (Nash et al. 1994). Humanes rhPDGF-BB ist von entscheidender Bedeutung für die Rekrutierung von MSZ während der Osteogenese und dem Knochenremodeling (Fiedler et al. 2004). Die chemotaktische Antwort der Zellen konnte bei einer Wachstumsfaktorkonzentration von 1 ng/ml induziert werden, sodass die hier verwendete Konzentration von 100 ng/ml rhPDGF-BB ausreichend war (Fiedler et al. 2002).
In den licht- und elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnte keine verbesserte Zellmigration in die neuartigen „Scaffolds“ durch die Applikation des Wachstumsfaktors beobachtet werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die ITV-Konstrukte durch ungünstige physikalisch-chemische oder morphologische Materialeigenschaften Zellmi-

gration verhindern. Für weitergehende Experimente bezüglich der Zellmigration standen nicht genügend Prüfkörper zur Verfügung.

Die fluorometrische DNA-Mengenbestimmung mit einem fluoreszierenden, in DNA-interkalierenden Farbstoff gab Aufschluss über die Proliferationsaktivität von differenzierten und multipotenten mesenchymalen Stromazellen sowie Osteoblasten auf den unterschiedlichen Knochenersatzmaterialien.

In den vorliegenden Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass die Zugabe des Wachstumsfaktors rhPDGF-BB für undifferenzierte MSZ und Osteoblasten auf den neu entwickelten Konstrukten keine signifikante Änderung der Proliferation bewirkte. Bei Kultivierung differenzierter MSZ unter proliferativen und osteogenen Stimuli zeigte sich eine signifikant ($p<0,05$) geringere Zellzahl als ohne die Faktoren. In dieser Analyse unterschieden sich die gemessenen DNA-Mengen bei Kultivierung von Zellen auf den ITV-Kompositmaterialien nach acht Tagen nicht signifikant von den Resultaten der Cerasorb-Knochenersatzmaterialien aus β-TCP. Wenn die PLLA-Komponente des ITV-„Scaffolds“ als ein wesentlicher Unterschied zwischen den beiden Prüfkörpern angesehen wird, stimmen die Ergebnisse mit den Resultaten von Hee et al. überein. Diese Arbeitsgruppe verglich β-TCP- mit PLLA-„Scaffolds“ und konnte zeigen, dass nach sieben Tagen Kultivierung auf beiden Konstrukten ähnlich hohe DNA-Mengen nachweisbar waren. Es wurden zusätzlich Analysen der DNA-Konzentrationen am Tag zwei sowie am Tag 21 nach Besiedelung durchgeführt. Diese wiesen nach, dass die DNA-Mengen auf PLLA am zweiten Tag signifikant höher als auf dem Keramikmaterial waren und danach kontinuierlich abnahmen. Die Zellzahl auf β-TCP war nach dreiwöchiger Kultivierung maximal und signifikant höher als auf PLLA (Hee et al. 2006). Im Hinblick auf die weiteren Ergebnisse muss zudem bedacht werden, dass der verwendete DNA-Farbstoff keine Differenzierung zwischen vitalen und apoptotischen Zellen ermöglichte.

Aufgrund der begrenzten Anzahl an Prüfkörpern konnten nur zwei Versuchsreihen mit den ITV-„Scaffolds“ über eine Dauer von 14 Tagen durchgeführt werden. Hierbei zeigte sich bei der längeren Kultivierung der Zellen auf den neuen Prüfkörpern ein Rückgang der Gesamt-DNA-Menge im Vergleich mit den nach acht Tagen gemessenen Resultaten. In vergleichenden Einzelexperimenten mit den etablierten Knochenersatzmaterialien konnten auf diesen nach 14 Tagen höhere DNA-Mengen nachgewiesen werden als nach acht Tagen. Die beschriebenen Resultate können nur als Tendenzen gewertet werden, korrelieren jedoch mit den Ergebnissen von Hee et al. (Hee et al. 2006).

Bei der DNA-Mengenmessung nach Kultivierung auf den Cerasorb-Konstrukten fiel auf, dass die Form und makroskopische Struktur der „Scaffolds“ Einfluss auf das Proliferationsverhalten der Zellen hatte. Auf den Prüfkörpern ohne die makroskopische Bohrung wurden höhere DNA-Mengen der Zellpopulationen gemessen als auf den „Scaffolds“ mit Bohrung. Die Unterschiede erreichten bei Besiedelung mit Osteoblasten in allen Versuchsansätzen ein signifikantes ($p<0,05$) bzw. hochsignifikantes ($p<0,01$) Niveau. Die gemessenen DNA-Mengen für multipotente mesenchymale Stromazellen auf den „Scaffolds“ ohne Bohrung waren im Ansatz mit Wachstumsfaktor und Differenzierungsmedium signifikant höher als auf den Konstrukten mit Bohrung. In den übrigen Versuchsansätzen wurde das Signifikanzniveau nicht erreicht ($p=0,0617$ bzw. $p=0,0698$). Dieses Ergebnis bestätigt die Bedeutung der Oberflächentopographie (Größe, Form, Oberflächenbeschaffenheit) von Prüfkörpern als wichtigen Parameter für die Induktion zellulärer Migrations-, Differenzierungs- und Proliferationsprozesse. Die topographische Makro-, Mikro- und Nanostruktur des Biomaterials interagiert mit integralen Membranproteinen und determiniert die zytoskelettale Zellstruktur. Daraus resultieren Veränderungen in Zellform und -orientierung sowie im Zellmetabolismus (Meyer et al. 2005).

Bei Kultivierung von Osteoblasten auf GB9N-Glaskeramikkonstrukten wurden die höchsten DNA-Konzentrationen induziert. Diese unterschieden sich in fast allen Versuchsansätzen von den übrigen Knochenersatzmaterialien auf signifikantem ($p<0,05$) bzw. hochsignifikantem ($p<0,01$) Niveau. Ein ähnliches Ergebnis erzielten Knabe et al. Sie konnten nach 21 Tagen Kultivierung von Zellen auf verschiedenen Knochenersatzmaterialien auf GB9 die höchsten Zellzahlen nachweisen (Knabe et al. 2004). In einer weiteren Arbeit verglich diese Forschungsgruppe verschiedene Glaskeramikmaterialien mit TCP und fand heraus, dass alle Materialien osteogene Differenzierung und Proliferation mindestens in gleichem Maße wie TCP induzierten. Dabei konnten auf GB9N sowohl die höchsten Zellzahlen als auch die stärkste zelluläre Expression osteogener Markergene nachgewiesen werden (Knabe et al. 2005). Experimente bezüglich der Biokompatibilität von TCP und GB9N ergaben, dass beide Materialien keinen zytotoxischen Einfluss auf Zellen ausübten (Ignatius et al. 2001).

1.2 Differenzierbarkeit auf verschiedenen Knochenersatzmaterialien

Um die Osteoinduktion der verschiedenen Knochenersatzmaterialien zu analysieren, wurde der Differenzierungsstatus der darauf kultivierten Zellen auf Gen- und Proteinexpressionsebene untersucht.
Verschiedene osteogene Markergene geben Aufschluss über den Differenzierungsstatus einer Knochenzelle. Die Analyse ihrer Expressionsprofile liefert Hinweise auf das Vorhandensein osteogener Zellen. Präosteoblasten befinden sich im proliferativen Stadium und sind gekennzeichnet durch die Genexpression von Histonen und c-Fos. In Osteoblasten und Präosteozyten kann mRNA von alkalischer Phosphatase und Runx-2 als Indikator für osteogene Matrixsynthese nachgewiesen werden. Osteozyten exprimieren Osteocalcin als Matrixmineralisierungsprotein (Fleming et al. 2000, Long 2001, Owen et al. 1990). Die Expression des Histons H4 ermöglicht einen Vergleich der Zellzahl vor und nach Kultivierung auf den verschiedenen „Scaffolds“. P53 fungiert als ein „target“-Gen bei der Induktion von Apoptose und wird in Zellen mit DNA-Schaden vermehrt exprimiert.

Undifferenzierte multipotente mesenchymale Stromazellen exprimierten auf den neuen Knochenersatzmaterialien aus β-TCP und PLLA weder alkalische Phosphatase noch Osteocalcin. Die Expression des frühen osteogenen Transkriptionsfaktors Runx-2 ging zurück. In differenzierten MSZ und Osteoblasten konnte nach Versuchsende eine reduzierte Expression der osteogenen Marker nachgewiesen werden. Die Expression des Zellzahlmarkers H4 und des Apoptosemarkers p53 lieferten Hinweise auf eine Abnahme der Zellzahl sowie eine forcierte Apoptose-Induktion in multipotenten, mesenchymalen Stromazellen und Osteoblasten nach Kultivierung auf den neuartigen Konstrukten. Die Kombination von TCP und PLLA in dem neu entwickelten Kompositmaterial sollte die durch die Polymerdegradation induzierte Freisetzung saurer Metabolite und konsekutive pH-Wertabnahme kompensieren. In mehreren publizierten Studien wurden bereits Unterschiede zwischen den beiden Kompositkomponenten PLLA und β-TCP bezüglich Osteokonduktivität und –induktivität sowie Biokompatibilität nachgewiesen. Hee et al. verglichen dreidimensionale „Scaffolds“ aus β-TCP und PLLA. In Zellen, die auf β-TCP-Blöcken kultiviert wurden, konnte eine stärkere Expression der osteogenen Markergene alkalische Phosphatase, Osteopontin und Osteocalcin induziert werden als bei Besiedelung auf PLLA-Konstrukten. Die Abnahme des pH-Wertes in dem Zellkultursystem war bei Zellkultivierung auf β-TCP signifikant niedriger (Hee et al. 2006). Kalziumphosphat verfügt

als Biomaterial über höhere Osteokonduktivität und –induktivität und forciert somit die Synthese osteogener Matrix (Rezwan et al. 2006, Krebsbach et al. 1997). Die molekularbiologische Analyse der Genexpression in MSZ und Osteoblasten auf den ITV-„Scaffolds“ nach 14-tägiger Versuchsdauer zeigte eine Expression der verschiedenen osteogenen, Proliferations- und Apoptosemarker unterhalb der Detektionsgrenze. Die zum Vergleich herangezogenen etablierten Knochenersatzmaterialien wiesen nach der längeren Kultivierungsdauer eine weitere Progression der osteogenen Differenzierung in den Genexpressionsprofilen der kultivierten Zellen auf. Diese Ergebnisse deuteten auf eine eingeschränkte Biokompatibilität des neuartigen Knochenersatzmaterials hin und wurden in einer weiteren Versuchsreihe näher untersucht (weitere Aspekte bezüglich der Biokompatibilität unter 4.3).

Neben der Genexpression wurde die AP-Enzymaktivität der kultivierten Zellen auf den neu entwickelten ITV-Konstrukten bestimmt, um den Grad der osteogenen Differenzierung auf Proteinebene zu beurteilen. Die alkalische Phosphatase ist ein Enzym, das von Osteoblasten synthetisiert wird. Durch die Degradation von anorganischem Pyrophosphat stellt es lokal die für die Mineralisierung von Knochen ausreichenden Konzentrationen von Phosphationen und anorganischem Pyrophosphat bereit. Es konnte eine Diskrepanz der Ergebnisse der Analyse der Proteinexpression mit den Resultaten der Genexpressionsanalyse von AP in den Zellen auf den ITV-„Scaffolds“ beobachtet werden. Erklärbar ist dieser Unterschied damit, dass die Translation der mRNA in das Protein zeitlich verzögert stattfindet. Dieser Effekt wird dadurch verstärkt, dass mRNA über eine kürzere Halbwertszeit verfügt als Proteine und somit schneller degradiert wird. Bei der AP-Aktivitätsanalyse kann eine enzymatische Reaktion noch messbar sein, obwohl die Genexpression bereits eingestellt wurde (Knabe et al. 2004). Es ist bekannt, dass MSZ unter den osteogenen Stimuli β-Glycerophosphat, Ascorbat und Dexamethason die Transkription osteogener Markergene und die Proteinbiosynthese von alkalischer Phosphatase steigern (Duan et al. 2006, Li et al. 2005, Murphy et al. 2005, Ogura et al. 2004). Bei Kultivierung der Zellen auf den neuartigen Knochenersatzmaterialien blieb die Osteoinduktion unter diesen osteogenen Stimuli jedoch aus. Es zeigten sich bei MSZ und Osteoblasten keine signifikanten Unterschiede in der AP-Aktivitätsanalyse zwischen den verschiedenen Versuchsansätzen.

Die vergleichend beurteilten Cerasorb-Knochenersatzmaterialien aus β-TCP bestätigten die positiven Ergebnisse anderer Studien mit besiedelten β-TCP-„Scaffolds“, die die osteoinduktive Potenz dieses Biomaterials nachwiesen (Dieudonné et al. 2002, Fleming et al.

2000, Gotterbarm et al. 2006, Hee et al. 2006, Koepp et al. 2004, Krebsbach et al. 1997). Bei MSZ und Osteoblasten war in der molekularbiologischen Analyse eine Induktion bzw. Progression osteogener Differenzierungsprozesse auf den Cerasorbmaterialien nachweisbar. Die in den Experimenten ohne Wachstumsfaktor oder Differenzierungsmedium beobachtete progrediente osteogene Differenzierung in multipotenten mesenchymalen Stromazellen bestätigte die osteoinduktive Potenz von β-TCP. Das zelluläre Differenzierungspotential ist hierbei mitentscheidend. Hee et al. konnten bei Kultivierung von Fibroblasten auf β-TCP Osteoinduktion nur unter dem Einfluss von osteogenem Differenzierungsmedium nachweisen (Hee et al. 2006). Krebsbach et al. bezeichneten das osteoinduktive Potential von TCP als permissiv, weil in MSZ osteogene Differenzierung auch in Abwesenheit osteogener Stimuli stattfindet (Krebsbach et al. 1997). Die molekularbiologische Analyse genetischer Marker für Gesamt-DNA und Proliferation von differenzierten und multipotenten mesenchymalen Stromazellen sowie Osteoblasten nach Kultivierung auf Cerasorb-Konstrukten weist auf eine Zunahme der Zellzahl sowie die Induktion von zellulären Proliferationsprozessen hin. Mit diesen Resultaten korrelieren Ergebnisse von Gotterbarm et al., die ein TCP/Kollagen-Komposit untersuchten. Sie zeigten, dass im TCP-Anteil nach sechs Wochen osteosynthetische Vorgänge einsetzten und nach 52 Wochen ein kompletter Ersatz durch neugebildetes Knochengewebe stattgefunden hatte (Gotterbarm et al. 2006). Ähnliche Ergebnisse erzielten Koepp et al., die im Schafmodell nachwiesen, dass mittels Cerasorb-Prüfkörpern stabilisierte Frakturen sechs und zwölf Monate nach Implantation signifikant belastbarer waren als die nicht-operierte Gegenseite (Koepp et al. 2004).

Die Bestimmung der AP-Aktivität zeigte auf den Cerasorb-Konstrukten in allen Versuchsansätzen höhere Werte für Osteoblasten als für MSZ. Dieses Ergebnis stimmt mit den dargelegten Genexpressionsanalysen des Enzyms in Osteoblasten und MSZ überein. Es ergaben sich signifikante ($p<0,05$) und hochsignifikante ($p<0,01$) Unterschiede zwischen MSZ und Osteoblasten auf den Cerasorb-Prüfkörpern ohne Bohrung unter dem Einfluss der Wachstums- und osteogenen Differenzierungsfaktoren. RhPDGF-BB als proliferativer Stimulus führte auf den „Scaffolds“ ohne Bohrung zu einem signifikanten Rückgang der AP-Aktivität ($p=0,01$) in MSZ. Der Wachstumsfaktor könnte in den MSZ eine Progression der osteogenen Differenzierung mit reduzierter AP-Aktivität induziert haben. Die AP-Aktivität geht während der zellulären osteogenen Differenzierung nach einem anfänglichen Maximum zurück, sobald die Knochenzellen die Knochenmatrixsynthese reduzieren und Mineralisierungsprozesse initiieren (Murphy et al. 2005). Die AP-Aktivität in MSZ unter

Einfluss von rhPDGF-BB und osteogenem Differenzierungsmedium lag in dem Experiment mit den Cerasorb-„Scaffolds“ ohne Bohrung auf ähnlichem Niveau. Die Differenz zum gemessenen AP-Aktivitätswert bei Kultivierung ohne Stimuli erreichte das Signifikanzniveau nicht (p=0,0857).
Es wurden zudem „Scaffolds“ aus α-TCP zum Vergleich mit den anderen Knochenersatzmaterialien herangezogen. Unter osteogenen und proliferativen Stimuli konnten in MSZ und Osteoblasten die Expression osteogener Markergene induziert werden. α-TCP verfügt über weniger osteoinduktives Potential als β-TCP. Osteogene Differenzierung war nur unter den Wachstums- und Differenzierungsfaktoren nachweisbar. Die H4-Expression deutete auf eine Zunahme der DNA-Menge in der Zellpopulation unter dem Einfluss des Wachstumsfaktors auf α-TCP hin. Die Expression des Zellzahlmarkers und der proliferativen Marker Bcl-2 und c-Fos wurde bei Kultivierung ohne zusätzlichen Stimulus herunter reguliert. Gleichzeitig konnten weniger RT-PCR-Produkte der untersuchten Apoptosemarker c-Myc, p53 und Bax in den Agarose-Gelen detektiert werden. Das Ergebnis muss somit nicht als Hinweis für vermehrt induzierte Apoptose gewertet werden. Ignatius et al. wiesen nach, dass α- und β-TCP über eine beiderseits hohe Biokompatibilität verfügten (Ignatius et al. 2001).

Die Messung der AP-Aktivität von Zellen nach Kultivierung auf dem Glaskeramikmaterial GB9N zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Zelltypen und Kultivierungsbedingungen. In der Messung der AP-Aktivität ergaben sich für Osteoblasten in Gegenwart der verschiedenen Stimuli auf den GB9N-„Scaffolds“ signifikant bzw. hochsignifikant niedrigere Werte der AP-Aktivität als auf den übrigen Knochenersatzmaterialien. Knabe et al. wiesen für GB9-Konstrukte nach, dass darauf kultivierte Zellen bereits am dritten Tag hohe Mengen Ostoeopontin, Osteocalcin und Osteonektin als Indikatoren der späten osteogenen Differenzierung exprimierten und sich in der Phase der Matrixmineralisierung befanden (Knabe et al. 2004). Dies würde erklären, warum die AP-Synthese als Indikator der Matrixsynthesephase nach achttägiger Versuchsdauer herunterreguliert wurde. Knabe et al. verglichen GB9N und verschiedene andere Glaskeramikmaterialien mit TCP. Sie fanden heraus, dass GB9N bei den darauf kultivierten Zellen eine stärkere osteogene Differenzierung induzierte als TCP. MSZ exprimierten nach drei Tagen Kultivierung auf den verschiedenen untersuchten „Scaffolds“ auf GB9 signifikant höhere Mengen an mRNA für Kollagen 1, AP, Osteopontin, OC und Osteonectin als auf TCP oder dem anderen in der Studie untersuchten Glaskeramikmaterial G14 (Knabe et al. 2005). Das

kristalline Kalzium-Alkaliorthophosphatmaterial GB9N verfügt über eine höhere Löslichkeit und eine schnellere Biodegradation als TCP (Knabe et al. 2004). Ignatius et al. konnten in einer Studie zeigen, dass das Glaskeramikmaterial GB1a zytotoxische Effekte durch die lokal erhöhte Konzentration an Phosphat-, Natrium- und Kaliumionen provozierte. Es wurde nachgewiesen, dass durch chemische Oberflächenmodifikation der Glaskeramikkonstrukte GB1a, GB14 und GB9 die schnelle Biodegradation und die Ionenfreisetzung reduziert werden konnte und der pH-Wert im Zellkultursystem konstant blieb. Das oberflächenneu-tralisierte Biomaterial GB9N wies die gleiche Biokompatibilität auf wie α- und β-TCP und lieferte keinen Hinweis auf die Provokation eines Zellschadens (Ignatius et al. 2001). Zudem induzierten Glaskeramikmaterialien in anderen Studien bereits in geringen Konzentrationen angiogenetische Prozesse (Leach et al. 2006).

Eine zweifaktorielle Varianzanalyse zeigte sowohl bezüglich der AP-Aktivität als auch im Hinblick auf die isolierten DNA-Mengen der Zellen einen signifikanten bzw. hochsignifikanten Einfluss des Hauptfaktors „Prüfkörper“ bei Kultivierung ohne Stimuli sowie unter Wachstums- und Differenzierungsfaktoren. Unter rhPDGF-BB in Vollmedium induzierte der Hauptfaktor „Prüfkörper“ in den Zellen einen fast signifikanten Unterschied in der gemessenen AP-Aktivität ($p=0,066$). Es konnte die entscheidende Bedeutung von Substratsignalen verschiedener Knochenersatzmaterialien auf den Phänotyp und Proliferationsverhalten von multipotenten mesenchymalen Stromazellen und Osteoblasten bestätigt werden (Murphy et al. 2005). Physikalisch-chemische und topographische Materialeigenschaften sind von entscheidender Bedeutung. Die Art und Menge lokal freigesetzter Ionen aus dem Konstrukt beeinflusst das chemische Milieu. Die Zelladhäsion über Integrinrezeptoren an der Materialoberfläche aktiviert oder inaktiviert intrazelluläre Signalkaskaden. Sie induziert dadurch in Abhängigkeit der Oberflächeneigenschaften des Materials Proliferations-, Apoptose- oder Differenzierungsprozesse und bedingt somit Unterschiede in Gen- und Proteinexpression (Meyer et al. 2005). Zudem verfügen unterschiedliche Zelltypen über verschiedene Integrin-Rezeptoren und intrazelluläre Signaltransduktionswege, die durch die extrazellulären Faktoren aktiviert werden können (Knabe et al. 2004). In der durchgeführten Varianzanalyse der AP-Aktivität und der DNA-Menge auf den unterschiedlichen „Scaffolds“ konnte jedoch kein statistisch signifikanter Einfluss des Hauptfaktors „Zelltyp“ nachgewiesen werden.

1.3 Biokompatibilität und Apoptose-Induktion

Die Genexpressionsanalyse verschiedener Zellzahl-, Proliferations- und Apoptosemarker in semi-quantitativen RT-PCRs lieferte Hinweise für eine eingeschränkte Biokompatibilität des neuartigen ITV-Knochenersatzmaterials. Es wurde die Expression der Apoptosemarker c-Myc, Bax und p53 sowie der anti-apoptotisch wirkenden Gene c-Fos und Bcl-2 in den Zellen untersucht, die auf den neu entwickelten „Scaffolds" kultiviert wurden. Die Expression des Histons H4 korreliert mit der vorhandenen DNA-Menge, aus der die Zellzahl abgeleitet werden kann.

Das Proto-Onkogen c-Myc kodiert einen Transkriptionsfaktor, der eine entscheidende Rolle für Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose spielt. Eine Dysregulation bzw. eine Überexpression führt zu vermehrter Apoptose (Albihn et al. 2006, Kalra u. Kumar 2004, Yuen et al. 2001). Die Einleitung von Apoptose über c-Myc ist assoziiert mit der Induktion verschiedener „target"-Gene wie Bax und p53 und kann gleichzeitig eine verminderte Expression von c-Fos bewirken. Das Tumor-Suppressor-Gen p53 induziert wiederum die Aktivierung verschiedener „target"-Gene darunter Bax (Zhao et al. 2000). Eine Aktivierung von c-Myc ohne konsekutive Expression von p53 bewirkt bei ruhenden Zellen einen Wiedereintritt in den Zellzyklus. Bei gleichzeitiger Aktivierung des Tumor-Suppressor-Gens p53 wird Apoptose initiiert (Hermeking und Eick 1994). Bei den durchgeführten Experimenten korrelierte die Expression von c-Myc in den Zellen stets mit der Expression von p53 und Bax. Eine Expression dieser Zielgene kann somit als ein Hinweis auf die Induktion apoptotischer Prozesse in der Zelle gewertet werden.

Der Transkriptionsfaktor c-Fos bildet mit dem Transkriptionsfaktor c-Jun das Heterodimer AP-1, welches unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren wie PDGF oder EGF (Epidermal Growth Factor) zur Proliferation von Zellen führt. Das c-Fos-Gen wird als „early response gene" in Osteoprogenitorzellen und periostalem Gewebe aber nicht in reifen Osteoblasten exprimiert (Long 2001). Nach Kultivierung von Zellen auf den neu entwickelten ITV-„Scaffolds" war in den RT-PCRs ein Rückgang der c-Fos-Expression unter die Detektionsgrenze nachweisbar, wobei dieser – im Unterschied zu den Cerasorb-Konstrukten - nicht mit osteogener Differenzierung korrelierte. Die verminderte zelluläre Expression des anti-apoptotischen Markers c-Fos bei Kolonisation auf den neuartigen Biomaterialien fand nicht im Rahmen einer progredienten osteogenen Differenzierung der Zellen statt. Sie deutete auf die Induktion von Apoptose in den Zellen hin. Die Reduktion der H4-Expression in den verschiedenen Zelltypen bestätigt zudem, dass bei Zellkultivierung auf den neuen Knochenersatzmaterialien aus β-TCP und PLLA die Zellzahl zurückging.

In den semi-quantitativen RT-PCRs deutete sich nach Kultivierung auf den ITV-Prüfkörpern in der zellulären Genexpression ein verringertes Bcl-2/Bax-Verhältnis an. Bcl-2 und Bax sind Proteine der Bcl-2-Familie. Über eine Bax/Bcl-2-Heterodimerisierung inhibiert Bcl-2 die Bax-Autoaktivierung und reduziert somit die Bax-induzierte, Apoptose einleitende Cytochrom c-Freisetzung aus dem Mitochondrium. Das Verhältnis dieser beiden Proto-Onkogene zueinander bestimmt die Anfälligkeit einer Zelle gegenüber Apoptose-induzierenden Prozessen. Dazu gehören extrazelluläre Signalproteine aus der TNF-Familie, die an integrale Todesrezeptoren binden, und intrazelluläre Faktoren wie DNA-Schaden, Hypoxie oder Anstieg der zellulären Kalziumkonzentration (Diaz et al. 1997, Gross et al.1999, Polster et al. 2001, Tan et al. 2006). Die Proteine der Bcl-2-Familie sind entscheidende Faktoren in der Regulation von Apoptosevorgängen (Upreti et al. 2006). Bcl-2 verhindert zudem c-Myc-induzierte Apoptose (Wagner et al. 1993).

Zur weiteren Beurteilung der Biokompatibilität wurde ein Toxizitätstest etabliert, der den Einfluss des neu entwickelten Biomaterials auf Proliferation, Apoptose und Vitalität von multipotenten mesenchymalen Stromazellen untersuchen sollte. Verglichen wurden quantitative Genexpressionsanalysen von Bax und Bcl-2 und Zellzahl- sowie Zellvitalitätsmessungen. Zellen wurden dabei entweder in normalem Vollmedium oder in einem Nährmedium kultiviert, das lysierte ITV-„Scaffolds“ enthielt. Die Analyse der relativen Quantifizierung der Genexpression von Bax und Bcl-2 in MSZ in den verschiedenen Kulturmedien zeigte, dass die lysierten ITV-Prüfkörper verstärkte Bax- und verminderte Bcl-2-Expression in den Zellen provozierten. Es konnte nachgewiesen werden, dass unter dem Einfluss der lysierten neuen Knochenersatzmaterialien in multipotenten mesenchymalen Stromazellen vermehrt Apoptose induziert wurde. Die Ergebnisse der Zellzahl- und Zellvitalitätsmessung ergaben, dass es in Gegenwart der lysierten Prüfkörper aus PLLA und β-TCP und der dabei freigesetzten Metabolite zu einer Abnahme der Zellzahl und Zellvitalität der damit kultivierten Zellen kam.

Toxische Wirkungen auf die kultivierten Zellen könnten von den Kompositkomponenten ausgegangen sein. Für PLLA-Polymere wurden in mehreren Studien cytotoxische Wirkungen nachgewiesen (Fleming et al. 2000, Likorish et al. 2007, Phillips et al. 2006, Rezwan et al. 2006, Saito u. Takaoka 2003). Verschiedene Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass die schnelle Degradation und konsekutive Akkumulation saurer Abbauprodukte von PLLA-Polymeren zu einer chronischen Entzündungsreaktion führten. Diese kann ursächlich für die fehlende Osteoinduktion und Biokompatibilität sein. Die Polymerdegradations-

produkte provozieren neben einer Abnahme des Gewebe-pH-Wertes eine Fremdkörperreaktion, die zur Chronifizierung der initialen, akuten Entzündung führt. Das Granulationsgewebe besteht aus fibrösem Gewebe mit chronischen Entzündungszellen und Polymerfragmenten. Die Fremdkörperreaktion kann innerhalb von 72 Stunden einsetzen und Zellvitalität und -differenzierung beeinträchtigen (Fleming et al. 2000, Rezwan et al. 2006, Saito u. Takaoka 2003). Ignatius und Claes fanden heraus, dass die Konzentration der Polymerdegradationsprodukte mit der Toxizität des PLLA-Biomaterials korreliert, auch wenn der pH-Wert im Kultursystem bei der Versuchsdurchführung konstant gehalten wurde (Ignatius u. Claes 1996). β-TCP gilt als Material mit hoher Biokompatibilität und Osteokonduktivität (Dieudonné et al. 2002, Fleming et al. 2000, Gotterbarm et al. 2006, Hee et al. 2006, Krebsbach et al. 1997, Rezwan et al. 2006). Die Experimente mit den Cerasorb-„Scaffolds" konnten die osteoinduktive Potenz von β-TCP bestätigen und lieferten keinen Hinweis auf eine vermehrte Apoptose-Induktion in den darauf kultivierten Zellen.

Es gibt verschiedene Studien über Kompositmaterialien aus Polymer- und Keramikbestandteilen. Likorish et al. konnten nachweisen, dass Prüfkörper aus dem Polymer PLGA mit inkorporierten Kalziumphosphatpartikeln eine stärkere Entzündungsreaktion durch Entstehung saurer Metabolite auslösten, als PLGA/Kalziumphosphat-„Scaffolds" mit Kalziumphosphatpartikeln an der Oberfläche. Die Kalziumphosphatbeschichtung verbesserte zudem die Zelladhäsion und führte zu einer verbesserten Integration des Knochenersatzmaterials. Die PLGA-Konstrukte ohne Kalziumphosphatbeschichtung führten nach Implantation im Tierversuch zur Bildung einer fibrovaskulären Kapsel mit Fremdkörperriesenzellen um das Implantat (Likorish et al. 2007). Jung et al. zeigten, dass auf reinen PLA-Materialien weniger Zellen adhärierten, die eine geringere Proliferation aufwiesen, als auf Prüfkörpern aus PLA und Kalziummetaphosphat (Jung et al. 2005). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die PLLA-Komponente des neuartigen ITV-Knochenersatzmaterials für die nachgewiesene Apoptoseinduktion und die mangelnde Osteokonduktivität und Osteoinduktivität ursächlich ist.

Ein weiterer kausaler Faktor für die eingeschränkte Biokompatibilität könnte eine inkomplette Interkonnektivität der „Scaffolds" sein, durch die es zu heterogener Degradation und konsekutiver Akkumulation potentiell toxischer Abbauprodukte kommen könnte. Daraus würde zudem eine Minderversorgung von Zellen resultieren, die von der Mediumperfusion ausgeschlossen sind (siehe auch 4.1).

Die Prozessierung von biodegradierbaren Polymeren erfordert die Verwendung von organischen Lösungsmitteln, deren Rückstände bei mangelnder Interkonnektivität in den abge-

schlossenen Arealen persistieren könnten. Es gibt zahlreiche Studien, die sich mit alternativen Aufbereitungsmöglichkeiten in der Herstellung dieser Biomaterialen beschäftigten, um die potentiell cytotoxischen Wirkungen von zurückgebliebenen Lösungsmitteln in den Prüfkörpern zu eliminieren (Harris et al. 1998, Lee et al. 2004, Kim et al. 2006).

Durch die Kombination der Kompositkomponenten des neu entwickelten ITV-Knochenersatzmaterials wurde neben der Mikro- und Makroporosität eine Optimierung der Degradationskinetik, der Osteokonduktivität und des Kulturmilieus angestrebt.
Die Besiedelung des neuartigen Biomaterials wurde durch die mangelnde Oberflächenpolarität erschwert. Daraus resultierte eine limitierte Zelladhäsion und Zellmigration auf den „Scaffolds“. Die mikroskopischen Aufnahmen lieferten zudem Hinweise auf eine inkomplette Interkonnektivität der Poren, die die Mediumdiffusion einschränken könnte.
Der Vergleich mit den etablierten Knochenersatzmaterialien zeigte Unterschiede zwischen den verschiedenen Biomaterialien. Die soliden Cerasorb-Konstrukte aus β-TCP wiesen eine geringere Porosität und höhere Masse als die ITV-Kompositmaterialien auf. Bezüglich des osteoinduktiven Potentials sind die Cerasorb-„Scaffolds“ den neu entwickelten Prüfkörpern überlegen. Dieses Resultat lässt vermuten, dass die PLLA-Komponente des neuen Biomaterials die osteoinduktive Potenz von β-TCP limitierte. In einem Toxizitätstest konnte nachgewiesen werden, dass die Bestandteile des ITV-Knochenersatzmaterials zu vermehrter Apoptose-Induktion in Zellen führten und Zellzahl und –vitalität reduzierten. Verschiedene andere Studien sowie der Vergleich mit den Cerasorb-Prüfkörpern stützt die Hypothese, dass ein durch die PLLA-Degradationsprodukte provoziertes ungünstiges chemisches Milieu einen kausalen Faktor für die Apoptose-Induktion darstellte.

5. Zusammenfassung

Bei großen Knochendefekten beispielsweise im Rahmen von Traumen, Infektionen oder Knochentumoren steht autologe Spongiosa nicht in ausreichender Menge zur Verfügung, um den Verlust an Knochengewebe zu ersetzen. Ein für den Ersatz von Knochengewebe geeignetes, synthetisches Biomaterial unterliegt dieser Einschränkung nicht. Zudem könnte dadurch eine Morbidität an der Entnahmestelle sowie das Risiko eines zweiten operativen Eingriffs vermieden werden. Innerhalb des „Kompetenznetzes Biomaterialien Baden-Württemberg“ wurde vom Institut für Textil- und Verfahrenstechnik (ITV) Denkendorf ein neuartiges Kompositmaterial aus Poly-L-Laktidsäure (PLLA) und β-Trikalziumphosphat (β-TCP) entwickelt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte dieses neuartige Material bezüglich seiner Eignung für den Ersatz von Knochengewebe getestet werden.

Vom ITV wurden würfelförmige „Scaffolds“ des neuen Materials zur Verfügung gestellt. Diese wurden in einem dreidimensionalen Kultursystem mit humanen multipotenten mesenchymalen Stromazellen (MSZ) und humanen Osteoblasten besiedelt und unter Einfluss verschiedener proliferativer und osteogener Stimuli kultiviert. Als Referenzmaterialien wurden einige bereits in der klinischen Anwendung befindliche Knochenersatzmaterialien, namentlich Cerasorb (β-TCP), GB9N-Glaskeramik und α-TCP (α-Trikalziumphosphat) in einem entsprechenden Zellkultursystem vergleichend analysiert. Durch den Einsatz von rhPDGF-BB (rekombinant humaner „platelet derived growth factor“) als Wachstumsfaktor und eines etablierten osteogenen Differenzierungsmediums wurde Proliferation, Migration und Differenzierung der Zellen auf den unterschiedlichen Konstrukten induziert. Hinsichtlich dieser Kriterien wurden molekularbiologische Genexpressionsanalysen sowie photometrische Enzymaktivitätsmessungen und fluorometrische DNA-Mengenbestimmungen durchgeführt, um eine Beurteilung und einen Vergleich der verschiedenen Biomaterialien zu ermöglichen. In licht- und elektronenmikroskopischen Aufnahmen gelangen die Analyse der Zellmigration auf dem neuartigen Kompositbiomaterial, sowie die Darstellung der Makro- und Mikroporosität. Ein weiterer Aspekt der Arbeit betraf die Beurteilung der Biokompatibilität dieses neu entwickelten Knochenersatzmaterials. Relative Quantifizierung von "Realtime“-PCRs (Polymerase-Kettenreaktionen) zeigten die Expressionsänderung pro- und anti-apoptotisch wirkender Gene unter dem Einfluss der ITV-Konstrukte.

Die Besiedelung des neuartigen Biomaterials wurde durch die mangelnde Oberflächenpolarität erschwert, welche die Zelladhäsion einschränkte. Die licht- und elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten eine oberflächliche zelluläre Besiedelung der „Scaffolds“

ohne Zellmigration in tiefere Areale. Sie lieferten zudem Hinweise auf eine inkomplette Interkonnektivität der Poren, die eine Mediumdiffusion einschränken könnte. In "Real-time"-PCRs konnte für MSZ auf den ITV-Knochenersatzmaterialien nachgewiesen werden, dass selbst unter osteogenen und proliferativen Stimuli keine Expression der untersuchten osteogenen Markergene induziert werden konnte. Eine Dedifferenzierung von Osteoblasten auf den neuartigen Konstrukten konnte lediglich unter rhPDGF-BB und osteogenem Differenzierungsmedium verhindert werden. In beiden Zelltypen wurde eine verminderte Expression des Histon H4 nachgewiesen, was auf einen Rückgang der Zellzahl bei Kultivierung auf den ITV-„Scaffolds" schließen ließ. Die Genexpressionsanalysen von Zellen, die auf Cerasorb-Prüfkörpern kultiviert wurden, wiesen das osteoinduktive Potential dieses Knochenersatzmaterials nach. Auf α-TCP-Prüfkörpern konnte in MSZ osteogene Differenzierung durch die Zugabe von rhPDGF-BB induziert werden. Die Bestimmung der DNA-Menge zeigte, dass die Proliferationsrate von MSZ und Osteoblasten auf den Glaskeramikmaterialien GB9N signifikant höher war als auf den ITV- und Cerasorb-Konstrukten. Gleichzeitig wurde in den Zellen auf den GB9N-Prüfkörpern die geringste AP-Aktivität nachgewiesen. Mittels zweifaktorieller Varianzanalyse konnte belegt werden, dass der Hauptfaktor „Prüfkörper" sowohl auf die DNA-Menge als auch auf die AP-Aktivität einen signifikanten Einfluss ausübte. Durch die Etablierung eines Toxizitätstests konnte in quantitativen RT-PCR-Analysen gezeigt werden, dass Bestandteile des neuartigen Knochenersatzmaterials eine vermehrte Expression des pro-apoptotischen Gens Bax sowie eine verminderte Expression des anti-apoptotischen Gens Bcl-2 bewirkten, was als Hinweis für die Induktion von Apoptose gedeutet werden kann.

Der Vergleich mit anderen Studien über PLLA- und β-TCP-Konstrukte sowie die Ergebnisse der Cerasorb-Prüfkörper bestätigen die Annahme, dass die PLLA-Komponente des Kompositbiomaterials die osteoinduktive Potenz von β-TCP limitiert. Ein durch die PLLA-Degradationsprodukte provoziertes ungünstiges chemisches Milieu könnte einen kausalen Faktor für die nachgewiesene Apoptose-Induktion darstellen. Das neuartige Knochenersatzmaterial ist den vergleichend untersuchten, etablierten Biomaterialien bezüglich Osteoinduktion und Biokompatibilität unterlegen. Eine klinische Verwendung des ITV-Kompositmaterials erscheint ohne weitere Modifikationen der Materialkomponenten und Herstellungsprozesse sowie der chemisch-physikalischen Eigenschaften nicht ratsam und bedarf weiterer Untersuchungen. Die Optimierung der Biodegradation von β-TCP-„Scaffolds" bleibt Gegenstand in der Biomaterialienforschung und im Tissue Engineering.

6. Literaturverzeichnis

1. Albihn A, Loven J, Ohlsson J, Osorio LM, Henriksson M: c-Myc-dependent etoposide-induced apoptosis involves activation of Bax and caspases, and PKCdelta signaling. J Cell Biochem 98: 1597-1614 (2006)

2. Barnes GL, Kostenuik PJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA: Growth factor regulation of fracture repair. J Bone Miner Res 14: 1805-1815 (1999)

3. Boyce T, Edwards J, Scarborough N: Allograft bone. The influence of processing on safety and performance. Orthop Clin North Am 30: 571-581 (1999)

4. Burg KJ, Porter S, Kellam JF: Biomaterial developments for bone tissue engineering. Biomaterials 21: 2347-2359 (2000)

5. Chen X, Xu H, Wan C, McCaigue M, Li G: Bioreactor expansion of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Stem Cells 24: 2052-2059 (2006)

6. de Boer J, van Blitterswijk C, Lowik C: Bioluminescent imaging: emerging technology for non-invasive imaging of bone tissue engineering. Biomaterials 27: 1851-1858 (2006)

7. Diaz JL, Oltersdorf T, Horne W, McConnell M, Wilson G, Weeks S, Garcia T, Fritz LC: A common binding site mediates heterodimerization and homodimerization of Bcl-2 family members. J Biol Chem 272: 11350-11355 (1997)

8. Dieudonne SC, van den Dolder J, de Ruijter JE, Paldan H, Peltola T, van 't Hof MA, Happonen RP, Jansen JA: Osteoblast differentiation of bone marrow stromal cells cultured on silica gel and sol-gel-derived titania. Biomaterials 23: 3041-3051 (2002)

9. Duan RP, Wu L, Lin YF, Liu L, Tian W: [The gene expression patterns of bone-marrow mesenchymal stem cells under different osteogenic induction]. Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban 37: 856-859 (2006)

10. Eppley BL, Pietrzak WS, Blanton MW: Allograft and alloplastic bone substitutes: a review of science and technology for the craniomaxillofacial surgeon. J Craniofac Surg 16: 981-989 (2005)

11. Falconnet D, Csucs G, Grandin HM, Textor M: Surface engineering approaches to micropattern surfaces for cell-based assays. Biomaterials 27: 3044-3063 (2006)

12. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F: Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. Science 279: 1528-1530 (1998)

13. Fickert S, Fiedler J, Brenner RE: Identification of subpopulations with characteristics of mesenchymal progenitor cells from human osteoarthritic cartilage using triple staining for cell surface markers. Arthritis Res Ther 6: R422-432 (2004)

14. Fiedler J, Roderer G, Gunther KP, Brenner RE: BMP-2, BMP-4, and PDGF-bb stimulate chemotactic migration of primary human mesenchymal progenitor cells. J Cell Biochem 87: 305-312 (2002)

15. Fiedler J, Etzel N, Brenner RE: To go or not to go: Migration of human mesenchymal progenitor cells stimulated by isoforms of PDGF. J Cell Biochem 93: 990-998 (2004)

16. Fiedler J, Leucht F, Waltenberger J, Dehio C, Brenner RE: VEGF-A and PlGF-1 stimulate chemotactic migration of human mesenchymal progenitor cells. Biochem Biophys Res Commun 334: 561-568 (2005)

17. Fleming JE, Jr., Cornell CN, Muschler GF: Bone cells and matrices in orthopedic tissue engineering. Orthop Clin North Am 31: 357-374 (2000)

18. Gotterbarm T, Richter W, Jung M, Berardi Vilei S, Mainil-Varlet P, Yamashita T, Breusch SJ: An in vivo study of a growth-factor enhanced, cell free, two-layered collagen-tricalcium phosphate in deep osteochondral defects. Biomaterials 27: 3387-3395 (2006)

19. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ: BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. Genes Dev 13: 1899-1911 (1999)

20. Harris LD, Kim BS, Mooney DJ: Open pore biodegradable matrices formed with gas foaming. J Biomed Mater Res 42: 396-402 (1998)

21. Hee CK, Jonikas MA, Nicoll SB: Influence of three-dimensional scaffold on the expression of osteogenic differentiation markers by human dermal fibroblasts. Biomaterials 27: 875-884 (2006)

22. Hellmich C, Ulm FJ: Average hydroxyapatite concentration is uniform in the extracollagenous ultrastructure of mineralized tissues: evidence at the 1-10-microm scale. Biomech Model Mechanobiol 2: 21-36 (2003)

23. Heng BC, Cao T, Stanton LW, Robson P, Olsen B: Strategies for directing the differentiation of stem cells into the osteogenic lineage in vitro. J Bone Miner Res 19: 1379-1394 (2004)

24. Hermeking H, Eick D: Mediation of c-Myc-induced apoptosis by p53. Science 265: 2091-2093 (1994)

25. Hollinger JO, Battistone GC: Biodegradable bone repair materials. Synthetic polymers and ceramics. Clin Orthop Relat Res 290-305 (1986)

26. Holy CE, Cheng C, Davies JE, Shoichet MS: Optimizing the sterilization of PLGA scaffolds for use in tissue engineering. Biomaterials 22: 25-31 (2001)

27. Ignatius AA, Claes LE: In vitro biocompatibility of bioresorbable polymers: poly(L, DL-lactide) and poly(L-lactide-co-glycolide). Biomaterials 17: 831-839 (1996)

28. Ignatius AA, Schmidt C, Kaspar D, Claes LE: In vitro biocompatibility of resorbable experimental glass ceramics for bone substitutes. J Biomed Mater Res 55: 285-294 (2001)

29. Ignatius AA (2006) persönliche Mitteilung

30. Ito T, Suzuki A, Okabe M, Imai E, Hori M: Application of bone marrow-derived stem cells in experimental nephrology. Exp Nephrol 9: 444-450 (2001)

31. Janssen FW, Oostra J, Oorschot A, van Blitterswijk CA: A perfusion bioreactor system capable of producing clinically relevant volumes of tissue-engineered bone: in vivo bone formation showing proof of concept. Biomaterials 27: 315-323 (2006)

32. Jerosch J, Castro WH, Granrath M, Rosin H: [Bone banks in the FRG. Results of a survey]. Unfallchirurg 93: 334-338 (1990)

33. Jung Y, Kim SS, Kim YH, Kim SH, Kim BS, Kim S, Choi CY, Kim SH: A poly(lactic acid)/calcium metaphosphate composite for bone tissue engineering. Biomaterials 26: 6314-6322 (2005)

34. Kalra N, Kumar V: c-Fos is a mediator of the c-myc-induced apoptotic signaling in serum-deprived hepatoma cells via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. J Biol Chem 279: 25313-25319 (2004)

35. Kamakura S, Nakajo S, Suzuki O, Sasano Y: New scaffold for recombinant human bone morphogenetic protein-2. J Biomed Mater Res A 71: 299-307 (2004)

36. Karageorgiou V, Kaplan D: Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. Biomaterials 26: 5474-5491 (2005)

37. Kay S, Thapa A, Haberstroh KM, Webster TJ: Nanostructured polymer/nanophase ceramic composites enhance osteoblast and chondrocyte adhesion. Tissue Eng 8: 753-761 (2002)

38. Kim SS, Sun Park M, Jeon O, Yong Choi C, Kim BS: Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. Biomaterials 27: 1399-1409 (2006)

39. Knabe C, Berger G, Gildenhaar R, Meyer J, Howlett CR, Markovic B, Zreiqat H: Effect of rapidly resorbable calcium phosphates and a calcium phosphate bone cement on the expression of bone-related genes and proteins in vitro. J Biomed Mater Res A 69: 145-154 (2004)

40. Knabe C, Stiller M, Berger G, Reif D, Gildenhaar R, Howlett CR, Zreiqat H: The effect of bioactive glass ceramics on the expression of bone-related genes and proteins in vitro. Clin Oral Implants Res 16: 119-127 (2005)

41. Koepp HE, Schorlemmer S, Kessler S, Brenner RE, Claes L, Gunther KP, Ignatius AA: Biocompatibility and osseointegration of beta-TCP: histomorphological and biomechanical studies in a weight-bearing sheep model. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 70: 209-217 (2004)

42. Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG: Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. Proc Natl Acad Sci U S A 96: 10711-10716 (1999)

43. Krebsbach PH, Kuznetsov SA, Satomura K, Emmons RV, Rowe DW, Robey PG: Bone formation in vivo: comparison of osteogenesis by transplanted mouse and human marrow stromal fibroblasts. Transplantation 63: 1059-1069 (1997)

44. Leach JK, Kaigler D, Wang Z, Krebsbach PH, Mooney DJ: Coating of VEGF-releasing scaffolds with bioactive glass for angiogenesis and bone regeneration. Biomaterials 27: 3249-3255 (2006)

45. Lee SH, Kim BS, Kim SH, Kang SW, Kim YH: Thermally produced biodegradable scaffolds for cartilage tissue engineering. Macromol Biosci 4: 802-810 (2004)

46. Li WJ, Tuli R, Huang X, Laquerriere P, Tuan RS: Multilineage differentiation of human mesenchymal stem cells in a three-dimensional nanofibrous scaffold. Biomaterials 26: 5158-5166 (2005)

47. Lickorish D, Guan L, Davies JE: A three-phase, fully resorbable, polyester/calcium phosphate scaffold for bone tissue engineering: Evolution of scaffold design. Biomaterials 28: 1495-1502 (2007)

48. Link DP, van den Dolder J, Jurgens WJ, Wolke JG, Jansen JA: Mechanical evaluation of implanted calcium phosphate cement incorporated with PLGA microparticles. Biomaterials 27: 4941-4947 (2006)

49. Long MW: Osteogenesis and bone-marrow-derived cells. Blood Cells Mol Dis 27: 677-690 (2001)

50. Lu HH, El-Amin SF, Scott KD, Laurencin CT: Three-dimensional, bioactive, biodegradable, polymer-bioactive glass composite scaffolds with improved mechanical properties support collagen synthesis and mineralization of human osteoblast-like cells in vitro. J Biomed Mater Res A 64: 465-474 (2003)

51. Maquet V, Boccaccini AR, Pravata L, Notingher I, Jerome R: Porous poly(alpha-hydroxyacid)/Bioglass composite scaffolds for bone tissue engineering. I: Preparation and in vitro characterisation. Biomaterials 25: 4185-4194 (2004)

52. Mastrogiacomo M, Corsi A, Francioso E, Di Comite M, Monetti F, Scaglione S, Favia A, Crovace A, Bianco P, Cancedda R: Reconstruction of extensive long bone defects in sheep using resorbable bioceramics based on silicon stabilized tricalcium phosphate. Tissue Eng 12: 1261-1273 (2006)

53. Mastrogiacomo M, Scaglione S, Martinetti R, Dolcini L, Beltrame F, Cancedda R, Quarto R: Role of scaffold internal structure on in vivo bone formation in macroporous calcium phosphate bioceramics. Biomaterials 27: 3230-3237 (2006)

54. Mastrogiacomo M, Papadimitropoulos A, Cedola A, Peyrin F, Giannoni P, Pearce SG, Alini M, Giannini C, Guagliardi A, Cancedda R: Engineering of bone using bone marrow stromal cells and a silicon-stabilized tricalcium phosphate bioceramic: evidence for a coupling between bone formation and scaffold resorption. Biomaterials 28: 1376-1384 (2007)

55. Mauney JR, Blumberg J, Pirun M, Volloch V, Vunjak-Novakovic G, Kaplan DL: Osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells on partially demineralized bone scaffolds in vitro. Tissue Eng 10: 81-92 (2004)

56. Meinel L, Karageorgiou V, Fajardo R, Snyder B, Shinde-Patil V, Zichner L, Kaplan D, Langer R, Vunjak-Novakovic G: Bone tissue engineering using human mesenchymal stem cells: effects of scaffold material and medium flow. Ann Biomed Eng 32: 112-122 (2004)

57. Meyer U, Buchter A, Wiesmann HP, Joos U, Jones DB: Basic reactions of osteoblasts on structured material surfaces. Eur Cell Mater 9: 39-49 (2005)

58. Murphy WL, Hsiong S, Richardson TP, Simmons CA, Mooney DJ: Effects of a bone-like mineral film on phenotype of adult human mesenchymal stem cells in vitro. Biomaterials 26: 303-310 (2005)

59. Nash TJ, Howlett CR, Martin C, Steele J, Johnson KA, Hicklin DJ: Effect of platelet-derived growth factor on tibial osteotomies in rabbits. Bone 15: 203-208 (1994)

60. Nguyen H, Qian JJ, Bhatnagar RS, Li S: Enhanced cell attachment and osteoblastic activity by P-15 peptide-coated matrix in hydrogels. Biochem Biophys Res Commun 311: 179-186 (2003)

61. Ogura N, Kawada M, Chang WJ, Zhang Q, Lee SY, Kondoh T, Abiko Y: Differentiation of the human mesenchymal stem cells derived from bone marrow and enhancement of cell attachment by fibronectin. J Oral Sci 46: 207-213 (2004)

62. Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, Barone LM, Wilming L, Tassinari MS, Kennedy MB, Pockwinse S, Lian JB, Stein GS: Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. J Cell Physiol 143: 420-430 (1990)

63. Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP: Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. Science 284: 1168-1170 (1999)

64. Phillips JE, Hutmacher DW, Guldberg RE, Garcia AJ: Mineralization capacity of Runx2/Cbfa1-genetically engineered fibroblasts is scaffold dependent. Biomaterials 27: 5535-5545 (2006)

65. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 284: 143-147 (1999)

66. Polster BM, Kinnally KW, Fiskum G: BH3 death domain peptide induces cell type-selective mitochondrial outer membrane permeability. J Biol Chem 276: 37887-37894 (2001)

67. Rezwan K, Chen QZ, Blaker JJ, Boccaccini AR: Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. Biomaterials 27: 3413-3431 (2006)

68. Rose FR, Oreffo RO: Bone tissue engineering: hope vs hype. Biochem Biophys Res Commun 292: 1-7 (2002)

69. Saito N, Takaoka K: New synthetic biodegradable polymers as BMP carriers for bone tissue engineering. Biomaterials 24: 2287-2293 (2003)

70. Sharma B, Elisseeff JH: Engineering structurally organized cartilage and bone tissues. Ann Biomed Eng 32: 148-159 (2004)

71. Sittinger M, Hutmacher DW, Risbud MV: Current strategies for cell delivery in cartilage and bone regeneration. Curr Opin Biotechnol 15: 411-418 (2004)

72. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Kostering M, Hernandez A, Sorg RV, Kogler G, Wernet P: Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. Circulation 106: 1913-1918 (2002)

73. Sun JS, Tsuang YH, Liao CJ, Liu HC, Hang YS, Lin FH: The effects of calcium phosphate particles on the growth of osteoblasts. J Biomed Mater Res 37: 324-334 (1997)

74. Tan C, Dlugosz PJ, Peng J, Zhang Z, Lapolla SM, Plafker SM, Andrews DW, Lin J: Auto-activation of the apoptosis protein Bax increases mitochondrial membrane permeability and is inhibited by Bcl-2. J Biol Chem 281: 14764-14775 (2006)

75. Tuan RS, Boland G, Tuli R: Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. Arthritis Res Ther 5: 32-45 (2003)

76. Tuli R, Seghatoleslami MR, Tuli S, Wang ML, Hozack WJ, Manner PA, Danielson KG, Tuan RS: A simple, high-yield method for obtaining multipotential mesenchymal progenitor cells from trabecular bone. Mol Biotechnol 23: 37-49 (2003)

77. Tuli R, Tuli S, Nandi S, Wang ML, Alexander PG, Haleem-Smith H, Hozack WJ, Manner PA, Danielson KG, Tuan RS: Characterization of multipotential mesenchymal progenitor cells derived from human trabecular bone. Stem Cells 21: 681-693 (2003)

78. Upreti M, Lyle CS, Skaug B, Du L, Chambers TC: Vinblastine-induced apoptosis is mediated by discrete alterations in subcellular location, oligomeric structure, and activation status of specific Bcl-2 family members. J Biol Chem 281: 15941-15950 (2006)

79. Vaccaro AR: The role of the osteoconductive scaffold in synthetic bone graft. Orthopedics 25: s571-578 (2002)

80. van Gaalen SM, Dhert WJ, van den Muysenberg A, Oner FC, van Blitterswijk C, verbout AJ, de Bruijn JD: Bone tissue engineering for spine fusion: an

experimental study on ectopic and orthotopic implants in rats. Tissue Eng 10: 231-239 (2004)

81. Wagner AJ, Small MB, Hay N: Myc-mediated apoptosis is blocked by ectopic expression of Bcl-2. Mol Cell Biol 13: 2432-2440 (1993)

82. Wang J, Asou Y, Sekiya I, Sotome S, Orii H, Shinomiya K: Enhancement of tissue engineered bone formation by a low pressure system improving cell seeding and medium perfusion into a porous scaffold. Biomaterials 27: 2738-2746 (2006)

83. Wirth CJ, Windhagen H: [New technologies in tissue engineering. Visions of an unlimited bone generation without problems]. Orthopade 33: 1335-1337 (2004)

84. Young MF, Kerr JM, Ibaraki K, Heegaard AM, Robey PG: Structure, expression, and regulation of the major noncollagenous matrix proteins of bone. Clin Orthop Relat Res 275-294 (1992)

85. Yuan J, Cui L, Zhang WJ, Liu W, Cao Y: Repair of canine mandibular bone defects with bone marrow stromal cells and porous beta-tricalcium phosphate. Biomaterials 28: 1005-1013 (2007)

86. Yuen MF, Wu PC, Lai VC, Lau JY, Lai CL: Expression of c-Myc, c-Fos, and c-jun in hepatocellular carcinoma. Cancer 91: 106-112 (2001)

87. Zhao H, Jin S, Fan F, Fan W, Tong T, Zhan Q: Activation of the transcription factor Oct-1 in response to DNA damage. Cancer Res 60: 6276-6280 (2000)

88. Zhou Y, Chen F, Ho ST, Woodruff MA, Lim TM, Hutmacher DW: Combined marrow stromal cell-sheet techniques and high-strength biodegradable composite scaffolds for engineered functional bone grafts. Biomaterials 28: 814-824 (2007)

89. Zinger O, Anselme K, Denzer A, Habersetzer P, Wieland M, Jeanfils J, Hardouin P, Landolt D: Time-dependent morphology and adhesion of osteoblastic cells on titanium model surfaces featuring scale-resolved topography. Biomaterials 25: 2695-2711 (2004)

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir durch ihre finanzielle Unterstützung mein Studium ermöglichten. Sie und meine Geschwister Barbara und Maximilian standen mir zudem in jeglicher Situation bei Seite, in der ich menschlichen Beistand benötigte und hatten stets ein offenes Ohr für meine Probleme und Sorgen. Mit ihrer liebevollen Fürsorge nach meinem Unfall konnte ich die nötige Geduld und Kraft aufbringen.

Für die ausgezeichnete, freundliche und geduldige Betreuung möchte ich Herrn Dr. rer.nat. Jörg Fiedler danken. Durch die gute Zusammenarbeit war ich bei aufkommenden Problemen nie auf mich allein gestellt, sondern konnte auf seinen fachkundigen Rat zählen - Danke Jörg!
Frau Christiane Schulz, Herrn Giovanni Ravalli, Frau Dipl. biol. Helga Joos und Frau Dr. rer.nat. Leslie Heckmann boten mir durch ihre praktische Anleitung und Hilfe bei der Laborarbeit unverzichtbare Unterstützung.
Alle erwähnten Mitarbeiter schafften eine herzliche Atmosphäre in der Abteilung, so dass trotz aller Schwierigkeiten und nötigen Anstrengungen, die Arbeit immer Spaß und Freude bereitete.

Herrn Prof. Brenner bin ich für die Ermöglichung meiner Promotionsarbeit in seiner Abteilung sowie für seine Bereitschaft, mich als mein Doktorvater zu betreuen, sehr dankbar.