

**Aus dem
Zentrum für Zahn -, Mund – und Kieferheilkunde
der
Heinrich – Heine – Universität Düsseldorf**

**Westdeutsche Kieferklinik
Poliklinik für Zahnärztliche Chirurgie und Aufnahme
Direktor : Univ. – Prof. Dr. J. Becker**

**In vitro – Untersuchung zur Proliferationsaktivität von osteogenen
Zellkulturen humanen Ursprungs auf verschiedenen
Knochenersatzmaterialien mittels ATP – Biolumineszenz – Messung**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich – Heine – Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Michael Volker Schmeing

2005

**Als Inauguraldissertation gedruckt
mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich – Heine – Universität
Düsseldorf**

gez.:

Dekan : Univ. – Prof. Dr. W. H. – M. Raab

Referent : Univ. – Prof. Dr. J. Becker

Korreferent : Univ. – Prof. Dr. A. Herforth

Meiner Familie
und
meinem langjährigen akademischen Lehrer,
Herrn Professor A. Herforth.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Allgemeiner Hintergrund	
1.1.1	Körpereigene Wundheilung und Knochenregeneration	
1.1.2	Prinzipien der gesteuerten Rekonstruktion und Regeneration von Knochengewebe	
1.1.3	Knochen – und Knochenersatzmaterialien	
1.2	Konkrete Fragestellung	
2	Material und Methoden	19
2.1	Material	19
2.1.1	Verwendete Zellen	
2.1.2	Verwendete Knochenersatzmaterialien	
2.1.3	Zellkulturreagenzien / Nachweismaterialien / Gerätschaften	
2.2	Methoden	23
2.2.1	Versuchsspezifische Vorbereitungen	
2.2.1.1	Charakterisierung und Identifizierung der primären Osteoblasten als osteoblastäre Zellen durch immunhistochemischen Nachweis von Osteocalcin (Ocal)	
2.2.1.2	Kulturverfahren der humanen Knochenzellen	
2.2.2	Hauptversuch	
2.2.2.1	Adenosintriphosphat (ATP) - Biolumineszenz	
2.2.2.2	Aktivität der Alkalischen Phosphatase (AP)	
2.2.2.3	Synthese von Osteocalcin (Ocal)	
2.2.2.4	Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der Zellmorphologie sowie Zelladhärenz (REM)	
2.2.2.5	Messung der pH – Werte	
2.2.3	Statistische Datenanalyse	

3	Ergebnisse	36
3.1	Versuchsspezifische Vorbereitungen	
3.1.1	Immunhistochemie von Osteocalcin (Ocal) zur Charakterisierung der primären Osteoblasten	
3.2	Hauptversuch	
3.2.1	ATP – Biolumineszenz	
3.2.1.1	Standardisierung der ATP – Messung	
3.2.1.2	ATP – Assays des Hauptversuches im Einzelnen	
3.2.1.3	Potentielle Zytotoxizität der Knochenersatzmaterialien / Adhärenzverhalten der Knochenzellen	
3.2.2	Histochemie der Alkalischen Phosphatase (AP)	
3.2.3	Osteocalcin (Ocal) – ELISA	
3.2.4	Auswertung der Rasterelektronenmikroskopie	
3.2.5	pH – Werte	
4	Epikritische Diskussion	64
5	Literatur	76
6	Tabellen und Abbildungen	92
7	Zusammenfassung (Abstract)	96
8	Danksagung	97
9	Curriculum vitae	98

1 Einleitung

1.1 Allgemeiner Hintergrund

1.1.1 Körpereigene Wundheilung und Knochenregeneration

Knochengewebe zeichnet sich zwar grundsätzlich durch eine gegebene Fähigkeit zur Eigenregeneration aus, jedoch unterliegt diese in natura dem vorrangigen biologischen Prinzip des möglichst schnellen sowie keimdichten Verschlusses eines jeden entstandenen Defektes, i.e. dass zunächst die Wiederherstellung der gegebenenfalls mitgeschädigten epithelialen Integrität im Vordergrund steht, welche per primam in der Regel etwa zehn bis vierzehn Tage in Anspruch nimmt.¹

Ausgangspunkt für den körpereigenen Heilungsprozess im Knochen selbst ist ein stabiles Blutkoagulum, in das Wachstumsfaktoren sezerniert werden, die ihrerseits aus aktivierten Thrombozyten, anderen Blutzellen und der verletzten Knochensubstanz stammen. Begleitet von einer üblichen entzündlichen Reaktion mit entsprechenden zellspezifischen Abtransport – und Umbauvorgängen erfolgt die Proliferation von einzelnen Osteoprogenitorzellen (OPC) aus angrenzenden Markhöhlen und dementsprechend die Bildung von Knochen, der dann langsam in den Defekt einwächst.^{2,3}

Die initiale Organisation des Blutkoagulums zu einem osteoiden, noch recht zellreichen und von Kollagenfibrillen durchsetzten " Keimgewebe " dauert dabei ungefähr vier bis sechs Wochen, die endgültige Formierung und komplette Ausreifung aber zu einer vollständig mineralisierten Knochenstruktur hin umfasst einen Zeitraum von vielen Monaten.⁴

Bei ausgedehnteren Defekten respektive mechanisch oder infektiös bedingtem Zerfall des Blutkoagulums bleiben die Grundprinzipien der Heilungsvorgänge in Form der exsudativen, resorptiven, proliferativen und reparativen Phasen zwar bestehen, doch tritt im Sinne der sogenannten sekundären Wundheilung eine zusätzliche deutliche Zeitverzögerung des

gesamten Konsolidierungsprozesses ein. Diese ist unter anderem darin begründet, dass sich hierbei die intermediäre Ausbildung und Umwandlung des obligatorischen Granulationsgewebes wesentlich aufwendiger gestaltet sowie die Reepithelisierung einer etwaigen äußeren Kontinuitätsunterbrechung während der komplexeren Entzündungsabläufe vorübergehend sistiert und erst abschließend vollendet wird.⁴

Da jenes Spontanheilungssystem seine Ressourcen allein aus den angrenzenden Knochenarealen bezieht, ist es also von entscheidender Bedeutung, welche Ausdehnung der knöcherner Defekt hat und wie er besonders hinsichtlich seiner Morphologie und Vaskularisation umschrieben ist.⁵

Häufig kommt es daher bei voluminösen, zu groß dimensionierten Knochendefekten (Critical Size Defect, CSD) mit massivem Gewebetrauma und / oder bei solchen, die von ihrer architektonischen Konfiguration her nicht durch ausreichende und eindeutige Wandbegrenzungen definiert sind, nur zu einer partiellen, in erster Linie die basalen Anteile betreffenden Wiederherstellung des ursprünglichen Zustandes, und zwar dies primär unabhängig von jedweder Zeitachse. Als weitere Ursachen für mögliche Komplikationen sind darüber hinaus eine mechanische Unruhe während der Regenerationsvorgänge sowie eine ungünstige Lokalisation des Defektes zu nennen.^{6,7}

Diese Beobachtungen und Überlegungen führten in der Medizin dazu, denjenigen Situationen mit neuen Ansätzen entgegenzutreten, in denen entweder die Tendenz zur Eigenheilung aufgrund der beschriebenen Umstände erkennbar unzureichend ist oder sich im Zuge des Heilungsprozesses eine Beeinträchtigung, schlimmstenfalls gar ein Verlust der Funktion des lädierten Bereiches mit nachfolgender Inaktivitätsatrophie zu etablieren droht.

1.1.2 Prinzipien der gesteuerten Rekonstruktion und Regeneration von Knochengewebe

Neben der Fixierung mit Elementen wie zum Beispiel metallischen Schrauben oder Platten bei Frakturen und der Applikation von reinen Barriere - Konstrukten wie etwa resorbierbaren / nicht resorbierbaren Membranen war der Gedanke grundlegend, einen entstandenen Knochendefekt zur Unterstützung und idealerweise Verbesserung der prinzipiell gegebenen physiologischen Heilungskapazität mit einem adäquaten Material zu rekonstruieren, um auf diesem Wege eine beschleunigte, kalkulierbare und komplette Wiederherstellung, i. e. eine etwaige restitutio ad integrum der betroffenen Gewebestrukturen zu erzielen.⁸

Der mögliche Indikationsbereich für ein solches Material liegt weit gestreut; er reicht von allgemeinmedizinisch relevanten Defektrekonstruktionen im Rahmen der Traumatologie, Tumorchirurgie oder chirurgischen Orthopädie bis hin zum Fachbereich der Zahnmedizin, hier insbesondere in der präprothetischen Chirurgie, der Implantologie und der Parodontologie.

Im Einzelnen sind diesbezüglich zum Beispiel die rekonstruktiv – regenerative Therapie von parodontalen infraalveolären / intraossären Läsionen und Furkationsbeteiligungen sowie die Versorgung von oralchirurgischen Defekten nach Extraktion, operativer Entfernung verlagertes Zähne oder etwa Zystektomie und umfangreicher Wurzelspitzenresektion zu nennen, darüber hinaus noch sowohl die aus implantologischer respektive präprothetischer Sicht indizierte Kieferkammaugmentation als auch Bodenelevation der Sinus Maxillares.⁹⁻¹¹

Im Sinne der Biomimetik sowie des Tissue Engineering, also naturwissenschaftlicher Fachrichtungen, welche die Erkenntnisse aus Medizin, Chirurgie, Molekular - / Zellbiologie u. a. mit dem Ziel zusammenführen, künstliches Gewebe zu kreieren, sind dementsprechend an ein potentielles Knochen- oder Knochenersatzmaterial diverse Anforderungen zu stellen.^{8,12}

Unter Berücksichtigung des anvisierten Einsatzbereiches und Einbeziehung gesonderter forensischer Aspekte gemäß Medizinproduktegesetz (MPG) lassen sich daraus folgende Eigenschaften formulieren, die es im Idealfall aufweisen müsste, als da wären :

Resorptions - / Substitutionsfähigkeit durch ortsständigen Knochen in definierter Zeit; Abstimmung der Resorptions - / Degradationsrate auf die Knochenneubildung; mögliche Unterstützung einer Regeneration parodontaler Gewebe; gleiches Verhalten bei Kurzzeit - und Langzeitimplantation; keine Kanzerogenität, Infektiosität und Zelltoxizität; keine Auslösung von Fremdkörperreaktionen; Sterilisierbarkeit.¹³⁻¹⁵ Aus logistisch - technischen Gründen sind zudem eine ausreichende Verfügbarkeit, eine problemlose Lagerfähigkeit, eine möglichst einfache klinische Handhabung und eine relativ kostengünstige Herstellung zu fordern.

Vom Grundsatz her dient ein Knochen - oder Knochenersatzmaterial primär immer zur Stabilisierung des Blutkoagulums und fungiert als Gerüst für die in den Defekt einwachsenden Knochenzellen bzw. deren Vorläuferzellen. Die Osteoblasten finden ihren Weg appositionell entlang dieser eingebrachten Matrix. Dabei kommt es zu einer Knochenneubildung. Je nach vorliegendem Regenerationsvolumen kann die schrittweise Besiedlung allerdings einen Zeitraum von mehreren Monaten benötigen. Bei ungünstigen Defektformen und Lokalisationen oder mechanischer Unruhe umfasst die knöcherne Regeneration in Analogie zum körpereigenen Reparaturprozedere unter Umständen sogar ebenfalls nur die basalen Anteile, während die übrigen Partikel des Knochenersatzmaterials bindegewebig eingeschieden werden.⁷ Die knöcherne Durchbauung des Regenerationsareals erfolgt somit unvollständig.

Knochen - bzw. Knochenersatzmaterialien weisen erhebliche Unterschiede bezüglich ihrer Oberflächenstruktur, Biokompatibilität, Porosität und ihres (bio -) chemischen Verhaltens auf.¹⁶ Untersuchungen konnten zeigen, dass die Degradation bzw. Resorption eines Biomaterials zum einen mittels hydrolytischer Halisterese (chemische Auflösung) und zum anderen

durch die Phagozytoseaktivität mehrkerniger Riesenzellen geschieht.¹⁵ Die Schwierigkeit besteht darin, diese Prozesse mit einer simultan verlaufenden Neubildung von Knochengewebe in Einklang zu bringen, was im Sinne einer idealen Kalkulierbarkeit zu postulieren wäre.¹⁵ Bei manchen Biomaterialien kommt es jedoch nur zu einer partiellen Resorption, sodass diese quasi als funktionelle Fremdkörper im neu gebildeten Knochen verbleiben.^{17,18} Des Weiteren wurden die Oberflächenbeschaffenheit und Partikelgröße von Knochen – und Knochenersatzmaterialien evaluiert, wobei eine poröse Oberfläche (Porengröße 100 – 150 μm) als Voraussetzung für das Einsprossen von Gefäß – und Knochenzellen gilt.¹⁹ Der Anteil der Poren am Gesamtvolumen wird prozentual angegeben und liegt bei verschiedenen Materialien in der Regel zwischen 30 und 60 %. Darüber hinaus ist für die knöcherne Integration der interpartikuläre Raum von Bedeutung. Dieser variiert je nach Morphologie und Art des Knochen – oder Knochenersatzmaterials und der Partikelgröße. In klinischen Studien wurde nachgewiesen, dass Partikelgrößen über 100 μm ausreichend Raum für einwachsende Gefäß – und Knochenzellen schaffen.²⁰

Die positive Gesamtsumme dieser Attribute ist ein Maß für die Effizienz und Qualität eines Biomaterials, wobei hinsichtlich seiner biologischen Wertigkeit eine absteigende Graduierung nach osteogenetischem, osteoinduktivem, osteostimulierendem, osteokonduktivem sowie rein osseointegrativem Wirkungsmechanismus erfolgt.^{21,22}

Um einer echten Osteogenese folgen zu können, muss ein Biomaterial vitale Osteoblasten enthalten, welche an der Empfängerstelle anwachsen und weiteren neuen Knochen bilden.

Osteoinduktive und osteostimulierende Effekte beruhen auf dem Vorhandensein von spezifischen, zu den Gewebemediatoren zu zählenden Polypeptiden und Proteinen.^{23,24} Diese regulieren die Schlüsselvorgänge der Gewebeformation wie Chemotaxis, Differenzierung, Proliferation und Synthese der extrazellulären Matrix, indem sie in autokriner (i.e. Zellen, die die Faktoren produzieren, reagieren auch auf diese) oder parakriner Weise (i.e. die Produktion der Faktoren durch einen Zelltyp beeinflusst einen

anderen Zelltyp) über entsprechende Rezeptoren ihre Wirkung auf ihre Zielzellen entfalten.²⁵ Dabei unterscheidet man innerhalb der biologisch aktiven Faktoren zwischen Signalmolekülen mit osteostimulierendem Effekt, welche die Zellproliferation lenken, und Signalmolekülen mit osteoinduktivem Effekt, die ihrerseits den Phänotyp von Zellen kontrollieren und eine Differenzierung mesenchymaler Vorläuferzellen zu Zellen mit spezifischen osteogenen Aufgaben steuern.^{2,26} Unter den erstgenannten sind die originären Wachstumsfaktoren zu subsumieren, wie zum Beispiel platelet – derived growth factors (PDGF), transforming growth factors - β (TGF - β), insulin - like growth factor (IGF - I und II) u. a., welche vorwiegend im aktivierten plättchenreichen Plasma (Platelet – rich Plasma, PRP) vorkommen; die zweiten bezeichnet man als Differenzierungsfaktoren, wie etwa die Bone Morphogenetic Proteins (BMPs), die besonders reich im Knochengewebe selbst anzutreffen sind.^{3,27}

Bei der Osteokonduktion, welche - von einem rein osseointegrativen Mechanismus, im Rahmen dessen der Organismus einen Fremdkörper als bioinert lediglich toleriert, einmal abgesehen - sozusagen einer biologisch orientierten Minimalanforderung an ein für den beschriebenen Einsatzbereich gedachtes Biomaterial entspricht, dient die inkorporierte Matrix de facto als passive Leitschiene für einwachsende Knochenzellen und soll nach Möglichkeit primär im Sinne eines Platzhalters in perfekter Weise mechanische Stabilität garantieren.¹²

1.1.3 Knochen – und Knochenersatzmaterialien

Die diversen zur Anwendung kommenden Knochen – und Knochenersatzmaterialien lassen sich grundsätzlich gemäß der Art ihres Ursprungs klassifizieren.

Dem autogenen, also vom selben Individuum stammenden Transplantat wohnt naturgemäß, gerade wenn die Knochenzellen vital erhalten werden können, ein authentisches osteogenes Potential inne. Es wird auch

heutzutage noch in der Regel als Goldstandard interpretiert.²⁸ Selbst im Falle, dass die Vitalfunktion der Osteoblasten stark eingeschränkt ist, kommen eindeutige osteostimulierende und osteoinduktive Eigenschaften zum Tragen.^{23,24}

Autogener Knochen wird als mono - oder bikortikales Blocktransplantat sowie durch entsprechende Aufbereitungstechniken zum Beispiel mittels Knochenmühlen in chipähnlicher Partikelform gewonnen.^{29,30} Eine neuere Methode besteht in der Verwendung eines als Kollektor fungierenden Knochenfilters, der dem jeweiligen Absaugsystem zwischengeschaltet wird und so unmittelbar die Sammlung feiner Knochenespäne ermöglicht.³¹

Dem körpereigenen Transplantat sind jedoch wiederum in verschiedener Hinsicht natürliche Grenzen gesetzt. Zum einen kann das erforderliche Knochenangebot in der Umgebung der betroffenen Defektregion nicht ausreichend sein und somit eine zusätzliche Entnahme an anderer Stelle notwendig werden lassen, mithin einen Eingriff also, welcher sich bisweilen in der Abwägung von möglichen operationsbedingten Komplikationen als unverhältnismäßig darstellt, zum anderen muss häufig trotz mittlerweile verfeinerter Methoden eine zumindest zu einem gewissen Grad auftretende Resorption des Transplantats mit begleitendem partiellen Volumenverlust in Kauf genommen werden.^{30,32}

Unter allogenen Implantaten sind Knochensubstanzen zu verstehen, die primär aus den langen Röhrenknochen von artgleichen, i.e. menschlichen Multiorganspendern gewonnen und in entsprechenden Knochenbanken aufbereitet und registriert werden.³³ Wegen des auch kommerziellen Vertriebes sind diese in spongiöser, kortikospongiöser oder kortikaler Form erhältlichen Biomaterialien theoretisch unlimitiert verfügbar. Es existieren eine mineralisierte sowie eine demineralisierte Version, Freeze dried bone allograft (FDBA) und Decalcified freeze dried bone allograft (DFDBA). Was die biologische Wertigkeit anbelangt, so wird der letztgenannten aufgrund der durch das Entfernen der anorganischen Bestandteile erfolgten Freilegung der organischen Knochenmatrix und dadurch Erleichterung der Diffusion von BMPs in das Implantatlager ein größeres osteoinduktives

Potential zugesprochen, welches sich je nach Alter des Spenders nochmals differenzieren lässt.^{34,35} Eine echte osteogene Wirkungsweise, wie sie beim autogenen Transplantat möglich ist, liegt allerdings nicht vor, sodass hier aus biologischer Sicht ein gewisser Kompromiss eingegangen werden muss. Im Hinblick auf etwaige Komplikationen ist grundsätzlich die Gefahr sowohl einer infektiösen als auch allergen - immunologischen Komponente zu erwägen. Obgleich die Anzahl der tatsächlich nachgewiesenen Fälle zum Beispiel einer HIV - Übertragung durch allogenen gefriergetrockneten Humanknochen nicht zuletzt durch vorherige Überprüfung der Spender, sorgfältige Auswahl der entnommenen Gewebe und adäquaten Aufbereitungsprozess zwar augenscheinlich sehr gering ist, sodass das Risiko diesbezüglich auf etwa 1 : 8 Mio. geschätzt wird, sollte dennoch eine gründliche Abwägung und bei positiver Entscheidung zur Verwendung eine ausführliche präoperative Aufklärung des Patienten mit Dokumentation geboten sein.^{36,37}

Von speziesfremder, in der Regel boviner Herkunft sind die xenogenen Knochentransplantate, welche in deproteinierter Form (deproteinized bovine bone material, DBBM) ebenfalls kommerziell zu beziehen sind. Historisch betrachtet ist hier als prominentester Vorläufer bzw. Vertreter dieser Biomaterialgruppe der Kieler Knochenspan zu nennen. Da im Zuge des Aufbereitungsprozesses eine annähernd vollständige Elimination der organischen Bestandteile erfolgt und daher auch die bereits beschriebenen osteoinduktiven Differenzierungsfaktoren verloren gehen, besitzen die xenogenen Materialien als fertige Produkte wahrscheinlich nur osteokonduktive Eigenschaften.^{38,39} Hinsichtlich ihrer Kristallstruktur, Porosität und inneren Oberfläche zeigen sie aber offensichtlich große morphologische Übereinstimmungen mit menschlichem Knochen, sodass aber das Osteokonduktivitätspotential als hoch einzustufen ist.⁴⁰ Dem Kriterium einer gleichmäßigen Substitution respektive Degradation scheinen sie allerdings trotz guter Osseointegration wegen überaus langsam ablaufender Abbauvorgänge lediglich unzulänglich gerecht zu werden.⁴¹

Unter forensischem Aspekt verdient besonders die Problematik Aufmerksamkeit, welche mit dem in den vergangenen Jahren wieder gehäuftem Auftreten von BSE in Rinderbeständen und der, daraus abgeleitet, noch immer nicht in Gänze geklärten Creutzfeld - Jakob - Erkrankung beim Menschen zusammenhängt. Trotz umfangreicher prophylaktischer Maßnahmen zur Inaktivierung etwaig vorhandener Prionen während des Herstellungsvorganges ist jedoch in der Realität ein, wenn auch als sehr gering einzuschätzendes, Restrisiko einer Infektion nicht komplett auszuschließen.^{42,43}

Die alloplastischen Knochenersatzmaterialien als letzte, zum Teil recht heterogene Gruppe werden entweder synthetisch hergestellt oder aus natürlichen Quellen gewonnen. Sie sind zwar allesamt nicht mit dem Risiko behaftet, Infektionserkrankungen zu übertragen, und gelten als biokompatibel, zeigen aber hinsichtlich ihrer resorptiven Eigenschaften und osteokonduktiven Potenz erhebliche Unterschiede.

Einer der Hauptrepräsentanten ist das synthetische Hydroxylapatit, welches insbesondere in der porösen Variante durch die dreidimensionale Ausrichtung seines sogenannten interkonnektierenden Porengefüges dem Trabekel - Hohlraum - System der natürlichen Knochenspongiosa sehr ähnelt.⁴⁴ Durch die auf diesem Wege erzielte innere Oberflächenvergrößerung wird die osseointegrative Durchwachsung gefördert. Zudem ist es eben diese poröse Form, bei der zumindest ein, wenngleich sehr verzögertes Resorptions - bzw. Degradationsverhalten beobachtet werden kann, während solides kompaktes Hydroxylapatit praktisch nicht resorbiert wird.⁴⁵ Die osteokonduktiven Eigenschaften stehen offenbar in Korrelation zu dem Maß an Vaskularisation des Lagergewebes, i.e. dass in schlecht gefäßversorgten Bereichen grundsätzlich die Gefahr einer lediglich bindegewebigen Einscheidung besteht.¹⁸

Aus dem Stützskelett bestimmter Korallen - oder Meeresalgenspezies werden nach Trocknung, Entfernung sämtlicher organischer Bestandteile und Sterilisation die sogenannten phytogenen Knochenersatzmaterialien wie zum Beispiel korallines Kalziumkarbonat oder Kalziumphosphat als

Hauptbestandteil des natürlichen Hydroxylapatits gewonnen. Mit einem ebenfalls interkonnektierenden Porengefüge und einer Aragonit ähnlichen Kristallstruktur besitzen diese eine im Tierexperiment nachgewiesene gute Biokompatibilität und die Fähigkeit zur von einer Knochenneubildung begleiteten vollständigen Resorption.⁴⁶

Die als bioaktive Gläser bezeichnete Stoffgruppe besteht aus synthetisch hergestellten Knochenersatzmaterialien, die auf einer Zusammensetzung verschiedener anorganischer Verbindungen basieren (45 % Siliziumdioxid, 24,5 % Calciumoxyd, 24,5 % Natriumoxyd, 6 % Phosphorpentoxid). Sie sind kommerziell in Partikelform erhältlich. Grund für das Attribut " bioaktiv " ist ihre Eigenschaft, beim Kontakt mit Knochen bzw. Gewebeflüssigkeit an der partikulären Oberfläche einen Ionenaustausch in Gang zu setzen. Dabei kommt es unter einem Anstieg des pH – Wertes auf etwa 10 zur Ablagerung einer siliziumreichen Gelschicht auf der Partikeloberfläche, welche wiederum eine Auflagerung einer Kalziumphosphatschicht nach sich zieht.^{47,48} Diese negativ aufgeladene Schicht führt in der Folge zur Etablierung einer Protein – bzw. Fibrinmatrix, wodurch undifferenzierte Zellen mit osteogenem Potential die Partikeloberfläche besiedeln und so eine multifokale Knochenneubildung auslösen können.⁴⁹ In vivo wurden die daraus resultierenden vielversprechenden Erwartungen jedoch bisher nicht oder nur unzureichend erfüllt, da in der Mehrzahl der Fälle lediglich eine bindegewebige Einscheidung zu konstatieren war.⁵⁰

Bei den synthetisch hergestellten, heutzutage weitestgehend phasenreinen Tricalciumphosphatkeramiken (TCP) stehen zwei lösliche Formen zur Wahl, das α - TCP und das β - TCP. Beide weisen ein interkonnektierendes Porengefüge auf, unterscheiden sich laut Herstellerinformation aber hinsichtlich des geometrischen Aufbaus der jeweiligen Einzelpartikel. Das polygonale α - TCP wandelt sich im Kontakt mit der Gewebeflüssigkeit zu einem gewissen Prozentsatz spontan in Hydroxylapatit um, weshalb es röntgenologisch auch nach Jahren noch am Implantationsort nachweisbar

sein kann, während das sphärische β - TCP annähernd vollständig resorbiert wird und somit seine Degradationsrate als besser einzustufen ist.^{51,52}

Knochenersatzmaterialien aus Kunststoff gibt es als primär nicht resorbierbare mikroporöse Partikel aus Polymethylmethacrylat (PMMA), zum Teil in Kombination mit Polyhydroxyethylmethacrylat (PHEMA) und einer Art Ummantelung durch Kalziumhydroxyd. Ihre Inkorporation wird zwar durchaus gut toleriert, doch verbleiben sie prinzipiell lebenslang als Fremdkörper, da der menschliche Organismus immunologisch weder über einen zellulären noch humoralen Weg verfügt, diese Materialien wirklich abzubauen.⁵³ Allerdings neigen manche solcher Polymere dazu, durch spontane Hydrolyse in organische Säuren zu zerfallen, welche dann den pH - Wert des Gewebes lokal zu einem sauren Milieu hin verschieben. Von Osteoblasten ist jedoch bekannt, dass sie bei niedrigen pH - Werten (eher) dedifferenzieren, während die osteoklastenabhängigen Knochenabbauprozesse zunehmend überwiegen.^{54,55} Somit erfolgt also ein Mechanismus, durch den die ursprünglich anvisierte Zielsetzung dieser Stoffgruppe als funktionelle Knochenersatzmaterialien sogar partiell konterkariert wird.

Schließlich ist noch das Kalziumsulfat (Gips) zu nennen, bei dem es sich um ein poröses, schnell resorbierbares und nach Sterilisation biokompatibles Knochenersatzmaterial handelt, mithin auch unter dem Namen " Plaster of Paris " bekannt.^{56,57}

Grundsätzlich lässt sich feststellen, dass sich zu den bereits in der Vergangenheit durchgeführten Unternehmungen, neben dem Einsatz der beschriebenen Einzelstoffe auch durch eine Mischung aus autogenem Knochen und synthetisch hergestellten Knochenersatzmaterialien verbesserte Resultate einer Defektheilung zu erzielen, mehr und mehr Therapieansätze gesellen, die im Sinne eines erweiterten Tissue Engineering zu interpretieren sind.⁵⁸

Darunter werden alle Bemühungen zusammengefasst, körpereigenes Knochengewebe zu regenerieren, indem geeignete Mediatoren (Signalmoleküle) und Matrices zur Inkorporation kombiniert werden.^{59,60}

Die biologisch aktiven Proteine und Polypeptide sollten diesbezüglich vom Trägermaterial gebunden sein, um einer unspezifischen enzymatischen Lyse vorzubeugen. Es ist zu erwarten, dass sie in Zukunft zunehmend auf rekombinante Wege, i. e. gentechnisch gewonnen werden und dann annähernd ubiquitär zur Verfügung stehen.

Mehrere Untersuchungen konnten dabei aufzeigen, dass die Menge und Struktur des neugebildeten Knochens und der zeitliche Verlauf der Knocheninduktion weniger von der Art (BMPs und / oder PRP – Faktoren) der Zusätze, als vielmehr in signifikanter Weise vom jeweilig verwendeten Carriersystem (Trägermatrix) abhängig sind.⁶¹⁻⁶³

Somit stellen, neben (tier -) experimentellen und klinischen Studien, weiterhin in vitro – Untersuchungen (Zell – und Gewebekulturen) ein probates Verfahren dar, zum Verständnis der Interaktionen von Osteoblasten mit Knochenersatzmaterialien und zur Selektion geeigneter Biomatrizes im Hinblick auf neuere Anwendungsformen beizutragen.⁶⁴

1.2 Konkrete Fragestellung

Zielsetzung der durchgeführten in vitro – Untersuchung war es, die Wirkung von fünf verschiedenen Knochenersatzmaterialien auf das Wachstumsverhalten menschlicher Knochenzellen zu evaluieren. Zur besseren Vergleichsmöglichkeit und Objektivierbarkeit wurden mehrere Biomaterialien in Bezug auf dieselben humanen Zelllinien (Populationen von drei Zelltypen) getestet.

Dabei kamen Zellkulturen von osteoblastenähnlichen SAOS-2 Zellen, primären Osteoblasten und pluripotenten Knochenmarkstammzellen (KMS) zum Einsatz. Als Knochenersatzmaterialien dienten zwei Repräsentanten der xenogenen Untergruppe (Navigraft[®], PepGen P - 15[®]) und drei Vertreter der alloplastischen Untergruppe (Frios Algipore[®], BioBase[®], Ostim[®]).

Im Rahmen der methodischen Parameter wurden die Zellproliferation durch ATP - Biolumineszenz - Messung, des weiteren als biochemische Marker die Aktivität der Alkalischen Phosphatase (AP) und die Synthese von Osteocalcin (Ocal) sowie partiell die Zellmorphologie und Zelladhärenz mittels Rasterelektronenmikroskop (REM) und die pH - Werte der Kulturansätze erhoben.

Zum einen galt es herauszufinden, ob diese Parameter im Vergleich zur entsprechenden Zellkontrolle auf einer Polystyroloberfläche allein tatsächlich veränderte, im Sinne einer erhöhten und beschleunigten Wachstumsaktivität zu interpretierende Werte aufweisen, wenn die Zugabe eines Knochenersatzmaterials erfolgt. Zum anderen stand im Mittelpunkt der Betrachtung, inwiefern sich möglicherweise signifikante Unterschiede hinsichtlich der Proliferations - respektive Differenzierungstendenz der drei osteoblastären Zelltypen in Abhängigkeit vom jeweilig verwendeten Biomaterial zeigen. Dies ließe gegebenenfalls bestimmte Rückschlüsse auf die Qualität der osteokonduktiven Eigenschaften und somit die biologische Potenz der einzelnen Knochenersatzmaterialien auch in vivo zu.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verwendete Zellen

In der vorliegenden Studie wurden folgende Zelltypen, jeweils humanen Ursprungs, untersucht.

- a) SAOS-2 Zellen : Osteosarkom - Zelllinie (" osteoblast - like- cells "), ACC Nr. 243; Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig
- b) Primäre Osteoblasten aus Kieferkammknochen : Gemäß Ethikkommission der Med. Fakultät der Heinrich - Heine - Universität Düsseldorf, Studiennummer 2505, " Verwendung von mittels Knochenfilter gewonnenen Knochenespänen aus oralchirurgischen Eingriffen "
- c) Knochenmarkstammzellen (KMS) : Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika (ITZ), Prof. Dr. Wernet, PD Dr. Kögler, Universitätsklinikum Düsseldorf ⁶⁵
- d) U-937 Zellen : Myelo - monozytäre Zellen, nicht adhärent in Suspension, ACC Nr. 5; Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig

2.1.2 Verwendete Knochenersatzmaterialien (KEM)

In der vorliegenden Studie wurden folgende fünf Biomaterialien untersucht.

- a) Navigraft[®] : Hydroxylapatit bovinen Ursprungs in Granulatform, Partikelgröße 1000 - 2000 µm; Tutogen Medical GmbH, Neunkirchen a. Br.

- b) PepGen P – 15[®] : Hydroxylapatit bovinen Ursprungs in Granulatform, dem ein synthetisches, aus 15 Aminosäuren bestehendes kollagenoides Peptid zugesetzt ist, Partikelgröße 250 – 420 µm; Friadent GmbH, Mannheim
- c) Frios Algipore[®] : natürliches phytogenes Hydroxylapatit mit 100 % anorganischen Kalziumphosphatanteil in Granulatform, Partikelgröße 1000 – 2000 µm; Friadent GmbH, Mannheim
- d) BioBase[®] : synthetisches, phasenreines α - Trikalziumphosphat in Granulatform, Partikelgröße 500 – 1400 µm; Centerpulse Biovision GmbH, Freiburg
- e) Ostim[®] : synthetisches, phasenreines, ungesintertes und nanokristallines Hydroxylapatit in wässriger Pastenform; Heraeus Kulzer GmbH & Co. KG, Hanau

2.1.3 Zellkulturreagenzien / Nachweismaterialien / Gerätschaften

- DMEM – Medium 1g / l Glucose Art. Nr. 21885 – 025; Gibco, Karlsruhe
- Fötale Kälberserum (FKS) Art. Nr. 10270 – 106; Gibco, Karlsruhe
- Penicillin Streptomycin Lösung 10000 U / ml Art. Nr. 15140148; Gibco, Karlsruhe
- DMSO D 2650; Sigma – Aldrich, Taufkirchen
- EDTA (Versen) 1 % Art. Nr. L2113; Biochrom AG, Berlin
- PBS Art. Nr. 14190094; Gibco, Karlsruhe
- Trypanblau Lösung 0,4 % Art. Nr. 15250 – 061; Gibco, Karlsruhe
- 4 % Paraformaldehyd (mit Methanol stabilisiert) CHB 6452038; Otto Fischer GmbH, Saarbrücken
- 30 % Wasserstoffperoxid; Carl Roth GmbH, Karlsruhe
- Peroxidase Blocking Reagent Dako S 2001; DakoCytomation, Hamburg
- Protein Block Serum – free Reagent Dako X 0909; DakoCytomation, Hamburg

- Antibody Diluent with background reducing components Dako S 3022; DakoCytomation, Hamburg
- Spezifischer Anti – Osteocalcin – AK, Mouse IgG 1, 1mg / ml Acris BM 2002; DPC Biermann, Bad Nauheim
- Negativ – Kontrolle : Mouse IgG 1 Dako X 0931; DakoCytomation, Hamburg
- Sekundärer AK Anti – Goat, Mouse, Rabbit IgGs (biotiniliert) Dako E 0453; DakoCytomation, Hamburg
- Peroxidase – Conjugated Streptavidin Dako P 0397; DakoCytomation, Hamburg
- AEC Substrate – Chromogen System Dako K 3464; DakoCytomation, Hamburg
- Hämatoxylin Dako S 2020; DaKoCytomation, Hamburg
- Crystal Mount Aqueous Mounting Medium Sigma C0612; Sigma – Aldrich, Taufkirchen
- ATP – Assay Cell Titer – Glo Luminescent Cell Viability; Promega GmbH, Mannheim
- Alkalische Phosphatase Sigma 86R AP Leucocyte Kit; Sigma – Aldrich, Taufkirchen
- Levamisol Sigma L – 9756; Sigma – Aldrich, Taufkirchen
- Osteocalcin Elisa, Gla – Type Osteocalcin EIA Kit, TaKaRa Art. Nr. MK 111; Mo Bi Tec, Göttingen
- 4 % Glutaraldehyd; Carl Roth GmbH, Karlsruhe
- Ethanol (> 99,9 %); Carl Roth GmbH, Karlsruhe
- Hexamethyldisilazan (HMDS); Carl Roth GmbH, Karlsruhe
- Zellkulturflaschen; Nunc, Wiesbaden
- Kryo Tubes; Nunc, Wiesbaden
- Culture Slides (aus Polystyrol); Nunc, Wiesbaden
- NBS – Platten; Corning GmbH, Wiesbaden
- Well Platten (24er / 96er); Nunc, Wiesbaden
- Membranen / Membranhalter; Nunc, Wiesbaden
- Reaktionsgefäße; Eppendorf, Hamburg

- Deckgläser; Menzel – Gläser, Braunschweig
- Pipetten, 10 – 200 µl; Eppendorf, Hamburg
- Pipettierspitzen; Eppendorf, Hamburg
- Waage ED 200; Shimadzu GmbH, Duisburg
- Tischzentrifuge Heraeus Biofuge A; Heraeus Kulzer GmbH & Co. KG, Hanau
- Autoklav; Westima – Moller KG, Köln
- Brutschrank CO₂ – Auto – Zero; Heraeus Kulzer GmbH & Co. KG, Hanau
- Neubauer – Zählkammer; VWR International, Darmstadt
- Lichtgeschützte, feuchte Kammer (Eigenbau)
- Durchlichtmikroskop Olympus BX 50; Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
- Photokamerasystem Olympus Color View III; Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
- Luminometer Top Count; Canberra Packard GmbH, Dreieich
- ELISA – Reader Emax; Molecular Devices GmbH, Ismaning / München
- Low Voltage Cool Sputter Coater (mit Goldelektrode) S 150 B; BOC Edwards GmbH, Kirchheim
- Rasterelektronenmikroskop Zeiss DSM 950; Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
- pH – Meter Hydrus 300; Fisher Scientific GmbH, Schwerte

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchsspezifische Vorbereitungen

Bevor der eigentliche Hauptversuch mit den Knochenersatzmaterialien durchgeführt werden konnte, mussten die zur Verfügung stehenden Zellen in Kultur gebracht werden. Während die SAOS-2 Zellen sowie die Knochenmarkstammzellen bereits als solche identifiziert vorlagen, war darüber hinaus bezüglich der primären Osteoblasten zunächst noch eine vorherige Charakterisierung erforderlich.

Dazu wurden die tiefgefrorenen Zellen im Wasserbad aufgetaut und jeweils mit 10 ml des hergestellten Vollmediums (90 % DMEM – Medium, 10 % FKS; additiv : 1 % Penicillin / Streptomycin) für 8 min. bei 800 RPM zentrifugiert. Das nach der Zentrifugation erhaltene Zellpellet wurde in 1 – 2 ml Medium resuspendiert und in Zellkulturflaschen überführt. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Der Mediumwechsel erfolgte grundsätzlich alle 2 – 3 Tage (Mo., Mi., Fr.).

2.2.1.1 Charakterisierung und Identifizierung der primären Osteoblasten als osteoblastäre Zellen durch immunhistochemischen Nachweis von Osteocalcin (Ocal)

Osteocalcin (Ocal), auch " bone gla protein " genannt, ist ein kleines Protein (49 Aminosäuren), das neben Odontoblasten und hypertrophierenden Chondrozyten in erster Linie von reifen Osteoblasten während der Matrixmineralisationsphase synthetisiert wird. Sein Nachweis dient als Charakterisierungs – und Differenzierungsmerkmal für osteoblastäre Zellen.⁶⁶⁻⁶⁸ Es ist nach dem Typ I – Kollagen das quantitativ bedeutendste, non - kollagene Protein der organischen Matrix.^{69,70} Charakteristisch sind zum einen die drei γ - Carboxy – Glutaminsäuren (Gla), die in der sogenannten " Gla – Helix " eine kompakte, calciumabhängige α – helikale

Konformation einnehmen. Zum anderen ist das sogenannte COOH - terminale " β - Faltblatt " für die chemotaktische Aktivität gegenüber Monozyten, den mutmaßlichen Vorläuferzellen der Osteoklasten, verantwortlich.^{66,71} Vitamin K - abhängig kommt es im Knochen zu einer direkten Interaktion zwischen Hydroxylapatit und Gla - Resten des Osteocalcins. Somit verbleibt der Hauptanteil des synthetisierten Ocal in der Knochenmatrix. Ein kleiner Part wird ins Blut abgegeben, wo es jedoch einer raschen proteolytischen Biodegradation unterliegt.⁷²

Zum hier angewandten immunhistochemischen Nachweis wurden die Zellen auf Culture Slides mit einem finalen Volumen von 1 ml angezchtet.⁷³ Nach 1, 3, 6 Tagen wurden der Zellüberstand genommen, die Zellen mit phosphate - buffered saline (PBS; ph - Wert 7,4) gewaschen, mittels 4 % Paraformaldehyd bei 4 ° C 10 min. in PBS fixiert und anschließend wieder in PBS gewaschen. Fortan mussten die Zellen für die weiteren Schritte in einer lichtgeschützten, feuchten Kammer aufbewahrt werden. Die Culture Slide Kammern wurden in den nachfolgenden Arbeitsgängen mit 350 μ l Volumen befüllt. Zunächst erfolgte mit 1 % H₂O₂ in PBS bei Raumtemperatur (RT) über 5 - 10 min der Block der endogenen Peroxidase. Nach nochmaligem Waschen in PBS wurden ebenfalls bei RT über 15 min die unspezifischen Bindungsstellen mit dem Protein - Block Serum - free Reagent belegt.

Nun kam es zur Inkubation der dementsprechend vorbehandelten Zellen mit den verschiedenen Antikörpern, die ihrerseits jeweils in Antibody Diluent verdünnt wurden. Als erstes wurden die Zellen mit dem primären Ocal - Antikörper (Verdünnung 1 : 50) über mindestens 60 min. bei RT inkubiert. Als Negativ - Kontrolle wurde unspezifisches Mouse IgG1 in der gleichen Verdünnung zugesetzt. Dann erfolgte nach zwischenzeitlichem Waschen in PBS ebenfalls über 60 min. bei RT die Inkubation mit dem sekundären Antikörper, Anti - Goat, Mouse, Rabbit IgGs, (biotiniliert; Verdünnung 1 : 60). Im Anschluss wurden die Zellen erneut in PBS gewaschen und wieder für 15 min. bei RT inkubiert, nun mit Peroxidase - Conjugated Streptavidin (Verdünnung 1 : 300). Die Culture Slides wurden dreimal mit PBS gewaschen und mit dem AEC Substrate - Chromogen System für

5 – 30 min. unter mikroskopischer Kontrolle bei RT inkubiert. Anschließend wurde erneut mit PBS gewaschen. Die entsprechende Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte für 1 – 2 min. mit Hämatoxylin. Die Zellen wurden mit Leitungswasser differenziert. Die Culture Slides wurden mit Crystal Mount Aqueous Mounting Medium eingedeckelt.

2.2.1.2 Kulturverfahren der humanen Knochenzellen

Mit dem Ziel, eine für die Versuche ausreichende Zellzahl zu erhalten, wurden die Osteoblasten bis kurz vor Erreichen der Konfluenz gezüchtet. Das Splitintervall betrug in der Regel 7 Tage. Die Zellen wurden nun mit EDTA / PBS passagiert. Dazu wurden das Medium abgesaugt und die Flaschen mit PBS gespült. EDTA in einer finalen Konzentration von 0,1 g / l wurde hinzugegeben und die entstandene Mischung für 5 - 15 min. im Brutschrank inkubiert. Nach Kontrolle des durch Calciumentzug aus den Zellen anzustrebenden Ablösungszustandes wurden die Zellkulturflaschen ein – bis zweimal geklopft, um die Zellen vollständig vom Boden abzulösen. Die Zellsuspension wurde mit PBS nachgespült und in den Zellüberstand eingefüllt. Danach wurden die Zellen mit dem Zellüberstand in ein Zentrifugenröhrchen gegeben und 8 min. zentrifugiert. Nach Überprüfung des Zellpellets wurde der Überstand abgesaugt und im Falle des Splitvorganges mit Vollmedium resuspendiert, in Zellkulturflaschen eingefüllt und nach mikroskopischer Beurteilung in den Brutschrank gelegt. Für das Einfrieren von Zellen erfolgte ein dem Splitten ähnliches Prozedere, nur dass die Zellen, nachdem sie zentrifugiert worden waren, gezählt wurden. Der Überstand wurde nach der Zentrifugierung abgesaugt und den Zellen 1 ml frisches Medium zugesetzt. Anschließend wurde gut durchgemischt. Der Farbstoff, der das Zählen der Zellen ermöglichte, war in diesem Falle Trypanblau. Zur Zählung wurden 50 µl Zellsuspension in einem Mischungsverhältnis von 1 : 1 mit Trypanblau gemischt und vorsichtig auf die Zählkammer pipetiert. Die Zellen wurden über den aus sechzehn

Quadraten zusammengesetzten Großquadraten in den Ecken des Zählfeldes unter dem Mikroskop ausgezählt. Die Ränder der Großquadrate waren beim Typ " improved " durch Dreifachlinien markiert. In jedem Quadrat wurden Zellen mitgezählt, die auf der jeweiligen linken oder oberen Linie lagen. Zellen auf der rechten oder unteren Linie wurden nicht berücksichtigt. Während das Zytoplasma vitaler Zellen hell durchscheinend imponierte, füllten sich abgestorbene Zellen mit dem mit dem zugesetzten Trypanblau und erschienen daher dunkler. Die Vitalität sollte bei größer oder gleich 95 % liegen.

Der daraus errechnete Mittelwert, multipliziert mit 10^4 und dem Verdünnungsfaktor, ergibt die Zellzahl pro ml. Die absolute Zellzahl ist das Produkt aus Zellzahl pro ml und dem Gesamtvolumen.

Nachdem die Zellzahl errechnet und die Kryo Tubes mit der Anzahl beschriftet worden waren, wurde die Zellkultur mit einem definierten Vollmediumvolumen resuspendiert und in die Kryo Tubes eingefüllt. Das Freeze - Medium (40 % Vollmedium, 40 % FKS, 20 % DMSO) wurde im Verhältnis von 1 : 1 den Zellen hinzugefügt und gut durchgemischt. Danach erfolgte das Einfrieren auf minus 80 °C. Für eine längere Lagerfähigkeit überführte man die gefrorenen Zellen nach einem Tag in flüssigen Stickstoff. Zum Auftauen wurden die Zellen aus dem flüssigen Stickstoff entnommen. Um unter anderem die toxische Wirkung der Schutzmittel nicht zur Entfaltung kommen zu lassen, wurde ein relativ schneller Auftauvorgang bevorzugt, ohne jedoch wiederum die Zellen zu überhitzen. Nun musste gewährleistet werden, dass das DMSO wieder vollständig ausgewaschen würde. Dazu wurden die aufgetauten Zellkulturen mit Vollmedium suspendiert und im Anschluss für 8 min. zentrifugiert. Nach Überprüfung des Zellpellets wurde der Überstand abgesaugt, erneut mit Vollmedium suspendiert und zentrifugiert. Danach wurden die Zellpellets in einer definierten Menge Vollmedium resuspendiert, auf Zellkultur - Flaschen ausgesät und im Brutschrank inkubiert.

2.2.2 Hauptversuch

2.2.2.1 Adenosintriphosphat (ATP) – Biolumineszenz

Adenosintriphosphat (ATP) ist der zentrale Energieüberträger im Zellstoffwechsel. Es wird unter enzymatischer Vermittlung der in der Mitochondrienmembran angesiedelten H^+ - ATPsynthase gewonnen. Diese koppelt einen transmembranen Protonentransport, durch den im Rahmen der Atmungskette Energie freigesetzt wird, mit der Anbindung eines weiteren Phosphatmoleküls an Adenosindiphosphat (ADP). Das entstandene ATP zerfällt leicht wieder und gibt dabei die seinerseits gespeicherte Energie an diejenigen biochemischen Reaktionen ab, welche gerade im Zellstoffwechsel benötigt werden (Muskelbewegung, Biosynthesen, Ionentransport an Membranen etc.). Es lässt sich somit als Hauptindikator des zellulären Energiestoffwechsels interpretieren, der u. a. auch zum Erhalt der Zellmembranen selbst von entscheidender Bedeutung ist. Ein Absinken des ATP – Niveaus führt demzufolge sowohl zu einer verminderten Zellaktivität als auch zu einer veränderten Zellmorphologie.⁷⁴⁻⁷⁶

Das Biolumineszenz – Verfahren basiert auf dem sogenannten Luciferin – Luciferase – System. Luciferasen sind in der Lage, in einer entsprechenden biochemischen Reaktion unter Zugabe von ATP (Energie) und Sauerstoff die Umwandlung, i.e. die oxidative Decarboxylierung von Luciferin zu Oxyluciferin zu katalysieren. Das dabei emittierte (Kalt -) Licht kann als Signal gemessen werden und ist proportional zur vorliegenden ATP - Konzentration. Die quantitative Menge des ATP wiederum korreliert direkt mit der Anzahl an vitalen und metabolisch aktiven Zellen, die sich in Kultur befinden. Als Quelle für die Luciferase - Enzyme können sowohl Gesamtextrakte aus den Licht - emittierenden Organen, firely lanterns, als auch gereinigte Komponenten von Photinus pyralis, dem Glühwürmchen, dienen.⁷⁷

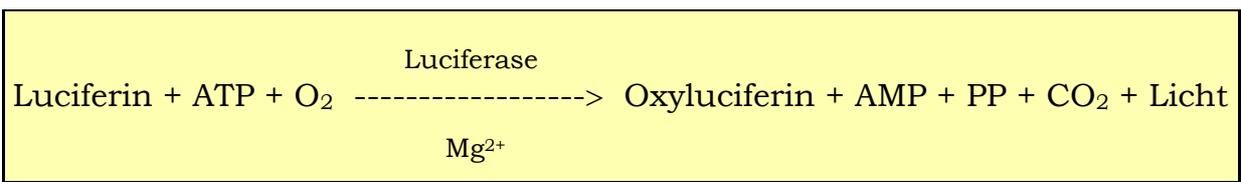


Abbildung 1 Schema der Reaktionsgleichung des Luciferin – Luciferase – Systems

Im durchgeführten Versuch kam der Cell Titer – Glo™ Luminescent Cell Viability Assay zur Anwendung.⁷⁸ Nach Bestimmung der Höhe des durch die Mediumkontrolle induzierten Grundsignals, Erhebung der Standardkurven (progrediente Zunahme des ATP – Signals bei steigender Zellzahl) und Ausschluss einer etwaigen Eigenlumineszenz der Biomatrizes selbst wurden die fünf Knochenersatzmaterialien auf einer 96 Well – Platte mit den drei Zelllinien zum Ansatz gebracht.

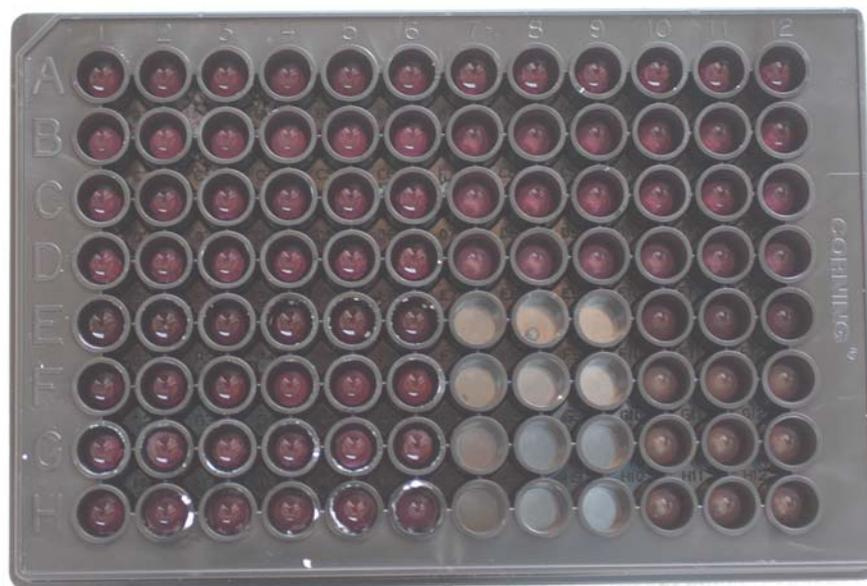


Abbildung 2 96 Well – Platte mit Ansätzen

Je Knochenersatzmaterial, Zellkontrolle sowie Mediumkontrolle wurden 6 Wells belegt. Die eingesetzte Zellzahl betrug 10^4 Zellen (50 μ l

Zellsuspension) pro Well. Die Biomaterialien bedeckten einheitlich den Boden der Wells. Zur Portionierung diente ein (standardisiertes) Schäufelchen. Beim in flüssiger Pastenform vorliegenden Ostim entsprach dies einer Menge von 2,5 mm des Spritzenvolumens.

Tabelle 1 Mengenangaben der verwendeten Knochenersatzmaterialien

Knochenersatz – material	Gewicht in mg			Mittelwert in mg	Standard – abweichung
Navigraft	29,3	28,7	26,4	28,1	1,3
PepGen P - 15	27,1	33,3	32,2	30,9	2,7
Frios Algipore	23,4	30,0	24,5	26,0	2,9
Biobase	25,2	25,6	26,0	25,6	0,3
Ostim	89,4	93,8	88,6	90,6	2,3

Nachdem die Knochenersatzmaterialien in die Wells gegeben worden waren, wurden PBS dazupipetiert und im Sinne einer Äquilibrierung die Ansätze zwei Stunden stehen gelassen. Anschließend wurde PBS wieder entnommen und 150 µl Medium dazugegeben. Die jeweilige Zelllinie wurde gezählt und die Zellsuspension vorbereitet. Dann wurde jeweils 50 µl Zellsuspension zugefügt, sodass daraus ein finales Gesamtvolumen von 200 µl pro Well für das ATP – Assay resultierte. Die Messungen erfolgten an den fünf Tagen 0, 3, 6, 10, 14 unter Zugabe von jeweils 100 µl Cell Titer - Glo™, nachdem zuvor das alte Medium abgesaugt und 100 µl neues Medium nachgefüllt worden waren. Die 96 Well – Platte wurde daraufhin für 10 min. vor Licht geschützt bei RT inkubiert. Abschließend wurde das Lichtsignal über 1 Sekunde pro Well mittels eines Luminometers gemessen. Für die Messung am Tage 0 wurden lediglich 50 µl Medium, 50 µl Zellsuspension und 100 µl Cell Titer Glo vorgelegt.

Um hinsichtlich einer etwaigen Einflussnahme durch ausgeprägte adhärenente Eigenschaften der Knochenzellen einerseits und durch eine potentielle Toxizität der Knochenersatzmaterialien andererseits eine adäquate

Interpretationsgrundlage für die gemessenen Signalwerte zu schaffen, wurden zum einen auch die U-937 Zellen, also nicht adhärente myelo – monozytäre Zellen, und zum anderen die Knochenzellen auf neuartigen NBS (Non Binding Surface) - Platten in gleicher Weise mit den Biomaterialien zum Ansatz gebracht und ebenfalls die Lumineszenzen erfasst.

2.2.2.2 Aktivität der Alkalischen Phosphatase (AP)

Die alkalische Phosphatase (AP) gehört mit ihren Isoenzymen in Leber, Knochen, Niere, Intestinum und Plazenta zu einer komplexen Gruppe von Proteinen, die durch einen carboxyterminalen Glykanphosphatidylinositol – Anker an die extrazelluläre Oberfläche von Zellmembranen geheftet sind.⁷⁹ Den AP – Isoenzymen der Leber und des Knochens liegt das gleiche Gen zugrunde; sie unterscheiden sich lediglich im Grad der posttranslationalen Glykosylierung. Die (knochenspezifische) alkalische Phosphatase wird von Osteoblasten als zweite Stufe deren Reifung während der Knochenneubildung in großen Mengen produziert und ist an der Plasmamembran lokalisiert. Durch die Phospholipase C und D wird das ursprünglich als Homotetramer vorliegende Glykoprotein prozessiert und als Dimer in den Blutkreislauf abgegeben. Das im Serum zirkulierende Dimer besitzt zwei aktive Seiten, wovon jede zwei Zink – Atome und ein Magnesium - Atom aufweist.⁶⁶ Ihre grundsätzliche Funktion als Marker des Knochenaufbaus erweist sich zwar zum Beispiel aufgrund der transient erhöhten Werte während der kindlichen Wachstumsphasen als evident, die genauen Mechanismen für ihre Beteiligung im Mineralisationsprozess aber sind noch nicht in Gänze bekannt.⁸⁰ Im Detail werden verschiedene Möglichkeiten der Wirkungsweise diskutiert, als da wären : ein Anstieg der lokalen Konzentration von anorganischem Phosphat; die Zerstörung lokaler Inhibitoren des Knochenkristallwachstums; der Transport von Phosphat; als calciumbindendes Protein, als Calcium / Magnesium – ATPase oder als tyrosinspezifische Phosphoproteinphosphatase.⁸¹ Unstrittig lässt sich jedenfalls festhalten, dass die alkalische Phosphatase durch die Verwendung

in einer Vielzahl von wissenschaftlichen Arbeiten als der am häufigsten genutzte biochemische Index für die osteoblastische Aktivität dient.⁸²⁻⁸⁷

Die AP ist in der Lage, die hydrolytische Spaltung von (Mono -) Phosphateestern zu katalysieren.⁸⁸ Diese Spaltprodukte lassen sich mittels zyto - / histochemischen Nachweises durch den Zusatz bestimmter Farbstoffe (Fast Red Violet Substrate System) als rote Pigmente sichtbar machen.⁸⁹

Im vorliegenden Versuch wurden die Zellen (10^4 Zellen pro Einzelkammer) auf ein finales Volumen von 1 ml auf Tissue - Culture - Slides ausgesät und in Kultur gehalten. Die Knochenersatzmaterialien wurden in 8er Chamber Slides gegeben, wobei je Biomaterial zwei Chambers gefüllt wurden. Nach 3, 6, 10, 14 Tagen wurden jeweils der Zellüberstand abgesaugt, die Zellen für 5 min. in PBS gewaschen, über etwa 35 sec. in 4 % Formaldehyd fixiert und anschließend dreimal mit Aqua dest. gewaschen. Nun wurde die Herstellung der Färbelösung vorgenommen. Dazu wurden 22,2 µl Natrium Nitrite Solution und 22,2 µl FRV - Alkaline Solution gut gemischt, danach 1 ml Aqua dest. sowie 22,2 µl Naphtol AS - BI Alkaline Solution hinzugegeben. Diese Färbelösung wurde den Zellen zugesetzt und für 15 min. bei RT inkubiert, bis ausreichend Färbung mikroskopisch sichtbar war. Bevor die Kammerseiten abgetrennt wurden, wurde erneut mit Aqua dest. durchgewaschen. Die entsprechende Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte durch Hematoxylin über 2 min. und darauffolgender Differenzierung mit Leitungswasser. Im Sinne einer Negativkontrolle diente zur Blockade der endogenen AP als spezifischer Hemmstoff das Levamisol. Abschließend wurden die Culture Slides in Sigma Crystal Mount Aqueous Mounting Medium eingedeckelt.

2.2.2.3 Synthese von Osteocalcin (Ocal)

Wie bereits ausgeführt, stellt die Osteocalcin (Ocal) - Synthese einen Indikator für die Gesamtaktivität von knochenformierenden Zellen dar.⁶⁸ Zum Nachweis des Ocal wurde ein ELISA (Enzyme - linked immunosorbent assay) vom zweiseitigen Sandwich - Typ verwendet. Bei allen ELISAs handelt es sich um eine klassische Reaktion der Solid Phase Teste, i.e. dass mit enzymmarkierten Antigenen die entsprechenden Antikörper respektive im umgekehrten Falle die jeweiligen Antigene nachgewiesen werden. Das mittels eines ELISA - Readers gemessene Signal der Nachweisreaktion der enzymmarkierten Strukturen ist dabei direkt proportional zur Konzentration der korrespondierenden Gegenstrukturen.⁹⁰

Beim hier verwendeten Gla - Osteocalcin ELISA Kit wurde zu dem auf der Mikrotiterplatte festgebundenen Ocal - Antikörper die Antigen - Lösung gegeben und inkubiert. Nach Entfernen von überschüssigem Antigen wurden nun enzymmarkierte, spezifische und mit Peroxidase gekoppelte AK zugefügt. Die Peroxidase setzt dabei das Substrat x um, welches in einer Farbentwicklung blau imponiert. Durch Abstoppen der Enzymreaktion mittels H_2SO_4 wird das blaue Farbsignal in ein gelbes umgewandelt, das entsprechend bei einer Wellenlänge von 450 nm messbar ist.

Vorbereitend auf den Ocal - ELISA wurde während des ATP - Assays an den Messtagen 3, 6, 10, 14 der Überstand der Wells abpipetiert, in markierte Eppendorf - Tubes gegeben und eingefroren. Diejenigen Proben, welche bei den Ergebnissen der ATP - Biolumineszenz eine zu große Standardabweichung aufwiesen, blieben dabei unberücksichtigt. Die sechs Proben eines Knochenersatzmaterials mit der zu bestimmenden Zelllinie wurden auf drei Eppendorf - Tubes verteilt. Für den ELISA wurden zwei Lösungen (Solution 1 und Solution 2) hergestellt. Für die Solution 1 wurde die Antibody - POD - Lösung in 11 ml Aqua dest. rekonstituiert und unter zwischenzeitlichem vorsichtigen Schütteln für 10 min. stehen gelassen. Pro Streifen (8 Wells) wurden ca. 1 ml benötigt. Für die Solution 2 wiederum wurde die Standard - Lösung (16 ng Gla - Osteocalcin pro ml) in 1 ml Aqua

dest. rekonstituiert und ebenfalls unter intermediärem Schütteln für 10 min. stehen gelassen. Bezüglich der ersten Lösung erfolgte eine Aliquotierung à 1,5 ml, für die zweite à 250 µl. Beide wurden danach bei minus 30 °C tiefgefroren.

Tabelle 2 Verdünnungsreihe der Standardlösung

Konzentration Ausgangslsg. ng / ml	Volumen Ausgangslsg. µl	Vol. Sample Diluent µl	Gesamtvolumen µl	Finale Konz. ng / ml
16	240	240	460	8
8	240	240	460	4
4	240	240	460	2
2	240	240	460	1
1	240	240	460	0,5
0,5	140	140	260	0,25

Als Stopplösung wurde 1 N H₂SO₄ verwendet.

100 µl Probe bzw. Standard (Solution 2) wurden innerhalb von 5 min. in die Wells pipetiert. Die Platte wurde dann mit Folie abgedeckt und für zwei Stunden bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Probelösung entfernt und die Platte respektive die Wells dreimal mit ca. 400 µl PBS gewaschen. Zwischen den Waschsritten wurde die Platte jeweils gut ausgeklopft, besonders nach dem letzten. Nun wurden 100 µl der Antibody – POD – Lösung (Solution 1) zugegeben und die Platte abermals mit Folie abgedeckt. Die Inkubationszeit betrug eine Stunde bei RT. Im Anschluss wurden die Antibody – POD – Lösung entfernt und die Platte bzw. Wells ebenfalls mit ca. 400 µl PBS gewaschen. Jetzt erfolgte die Zugabe von 100 µl Substrat – Lösung und eine Inkubation über 15 min. bei RT. Zuletzt wurde 100 µl der Stopplösung hinzugegeben und vorsichtig durchgemischt. Die Messung

mittels ELISA – Reader erfolgte bei einer Absorption von 450 nm Wellenlänge. Das entsprechende Signal war ca. 60 min. lang stabil.

2.2.2.4 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der Zellmorphologie sowie Zelladhärenz (REM)

Das Rasterelektronenmikroskop (REM) bietet die Möglichkeit, Oberflächen massiver Präparate abzubilden. Dabei wird in einer Vakuumkammer die Probenoberfläche mit einem gebündelten Elektronenstrahl abgerastert. Das Relief der Probenoberfläche bewirkt eine charakteristische Reflexion der Elektronen. Durch die auf diesem Wege entstehenden Sekundärsignale wird die Helligkeitsmodulation einer Bildschirnröhre gesteuert, auf welcher dann ein Abbild der entsprechenden Probenoberfläche entsteht.⁹¹

Hinsichtlich der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung wurden zusätzliche Ansätze vorbereitet und nach einer Kulturdauer von 3, 6, 10, 14 Tagen für das weitere Prozedere präpariert. In einer 24 Well Platte wurden dazu Polycarbonat Membranen eingesetzt. Pro Knochenersatzmaterial wurden zwei Wells benötigt. Jedes Well hatte ein Flüssigkeitsvolumen von 300 µl. Jede Probe wurde dreimal mit PBS gespült und anschließend mit Hilfe von 4 % Glutardialdehyd in 0,15 M PBS (pH – Wert 7,4) bei RT für 30 min. fixiert. Daraufhin erfolgte erneut eine Spülung mit der Pufferlösung über 15 min. Die Ansätze wurden nun mit Ethanol in aufsteigender Konzentration (40 % / 50 % / 60 % / 70 % / 80 % / 90 % / 100 %) dehydriert und zum Abschluss in Hexamethyldisilazan (HMDS) getrocknet. Die so aufbereiteten Materialproben wurden auf einen Projektträger geklebt und mittels eines Low Voltage Cool Sputter Coater mit Gold (Verbrauchselektrode) in einer Schichtdicke von 30 nm bedampft.

2.2.2.5 Messung der pH – Werte

Für die aus einem Organismus isolierten Zellen muss unter in vitro – Bedingungen eine Umgebung geschaffen werden, welche Proliferation, Wachstum sowie gegebenenfalls sogar auch Differenzierung und Ausübung von typischen Zellfunktionen ermöglicht und i.d.R. mit einem pH – Wert von idealerweise 7,2 bis 7,4 verbunden ist.^{74,75}

Um den Einfluss der jeweiligen Knochenersatzmaterialien auf das Milieu der Kulturen zu evaluieren, wurden die Biomaterialien, wie bereits oben beschrieben, portioniert in Wells gegeben, mit 200 µl PBS befüllt und nach zwei Stunden entnommen. Der pH – Wert im PBS wurde dann mit einer speziellen Elektrode bestimmt.

2.2.3 Statistische Datenanalyse

Die statistische Analyse erfolgte mittels des Softwarepaketes SPSS 12.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). Dabei wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen für jeden Parameter pro Prüfkörper errechnet. Zur Untersuchung der Signifikanz der in den Proliferationsassays beobachteten Unterschiede kam aufgrund des geringen Parallelansatzes ($n = 6$) der Mann – Whitney - Test für ungepaarte Stichproben zur Anwendung. Dieser erfolgte hinsichtlich der SAOS-2 Zellen, primären Osteoblasten und Knochenmarkstammzellen anhand der Tage 0 und 6 (1. Zeitabschnitt) sowie der Tage 6 und 14 (2. Zeitabschnitt). Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt.

3 Ergebnisse

In der vorliegenden Studie erfolgte eine primär biochemische sowie ergänzende morphologische Analyse der Zellkulturansätze auf den Biomatrizes.

Dabei sind die entsprechenden Versuchsergebnisse in Analogie zu den beschriebenen Methoden dargestellt.

3.1 Versuchsspezifische Vorbereitungen

3.1.1 Immunhistochemie von Osteocalcin (Ocal) zur Charakterisierung der primären Osteoblasten

In den aus Kieferknochen auswachsenden Zellen konnte auf immunhistochemischem Wege eine Synthese von Osteocalcin (Ocal) nachgewiesen werden. Somit waren diese erfolgreich als osteoblastäre Zellen identifiziert.

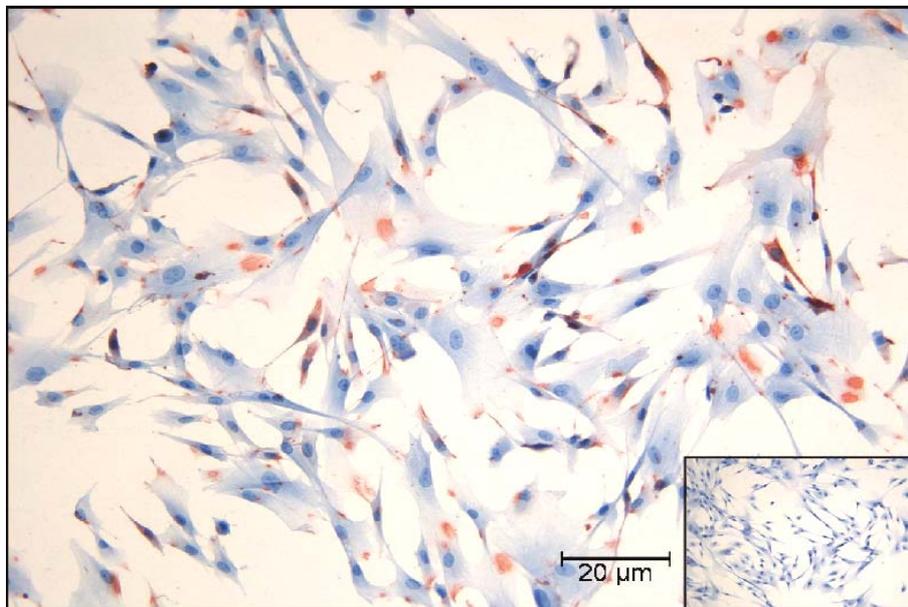


Abbildung 3 Immunhistochemische Färbung Ocal, prim. Osteoblasten, Tag 3; Negativkontrolle unten rechts

3.2 Hauptversuch

3.2.1 ATP - Biolumineszenz

3.2.1.1 Standardisierung der ATP – Messung

SAOS-2 Zellen in aufsteigender Zellkonzentration (ohne KEM)

Mittels der SAOS-2 Zellen wurde eine ATP – Standardkurve ermittelt. Die Zellen wurden dafür in einer aufsteigenden Konzentrationsreihe auf der Kontrolloberfläche Polystyrol ausgesät.

Der ATP - Gehalt der Kulturen wurde für Zellkonzentrationen von $0,1 \times 10^4$ Zellen/well, $0,5 \times 10^4$ Zellen/well, 1×10^4 Zellen/well, $1,5 \times 10^4$ Zellen/well, 2×10^4 Zellen/well, $2,5 \times 10^4$ Zellen/well, 3×10^4 Zellen/well, $3,5 \times 10^4$ Zellen/well, 4×10^4 Zellen/well, $4,5 \times 10^4$ Zellen/well und 5×10^4 Zellen/well gemessen.

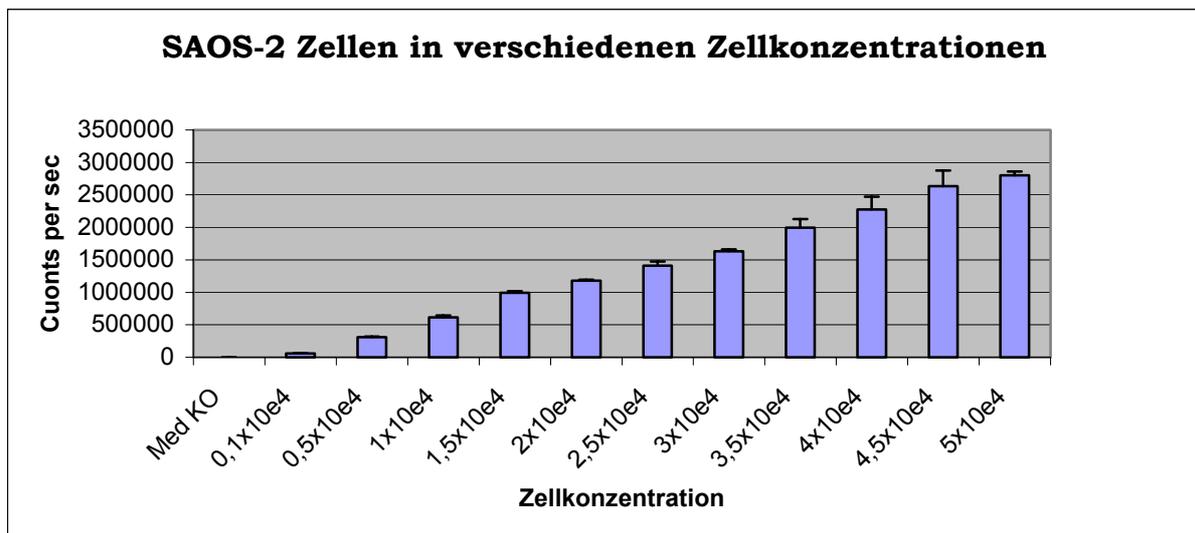


Abbildung 4 ATP – Standardkurve der SAOS-2 Zellen

Das Diagramm zeigt einen kontinuierlichen Anstieg des Signals bei Erhöhung der Zellzahl. Die entsprechenden Messungen erfolgten nach zwei

Stunden. Mittelwerte und Standardabweichungen ergaben sich aus jeweils sechs Ansätzen.

Überprüfung der Knochenersatzmaterialien ohne Zellen auf Eigenlumineszenz

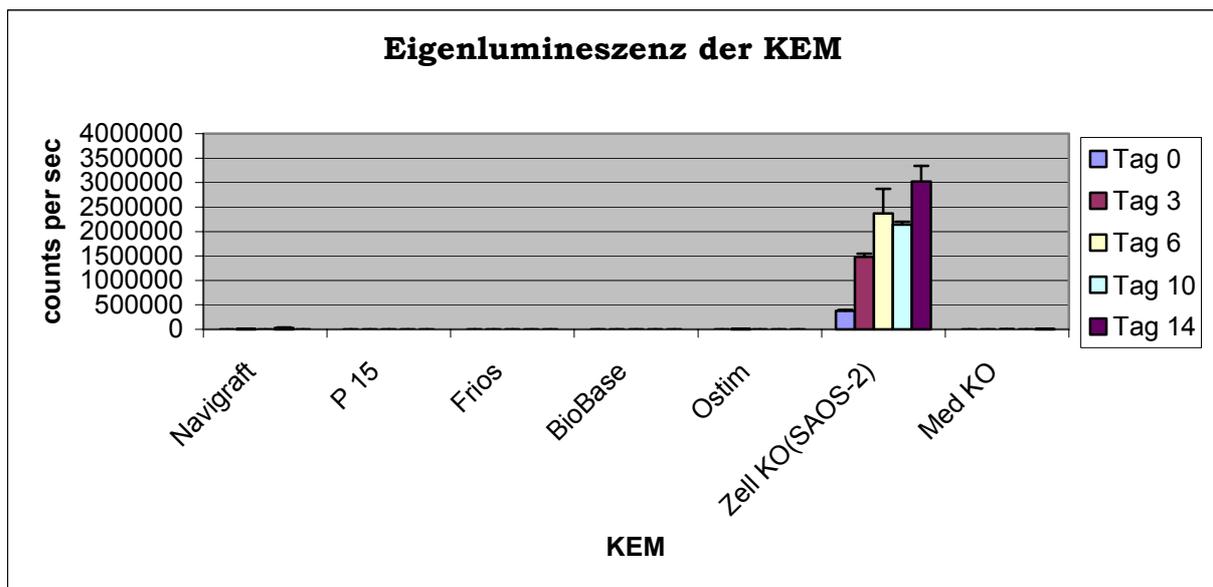


Abbildung 5 Eigenlumineszenz der Knochenersatzmaterialien

Eine etwaige Einfluss nehmende Eigenlumineszenz der Knochenersatzmaterialien konnte lediglich in vernachlässigbarer Größenordnung nachgewiesen werden. Die Zellkontrolle wurde mit den Osteosarkomzellen durchgeführt. Mittelwerte und Standardabweichungen ergaben sich aus jeweils sechs Ansätzen.

SAOS-2 Zellen in aufsteigender Zellkonzentration auf den Knochenersatzmaterialien

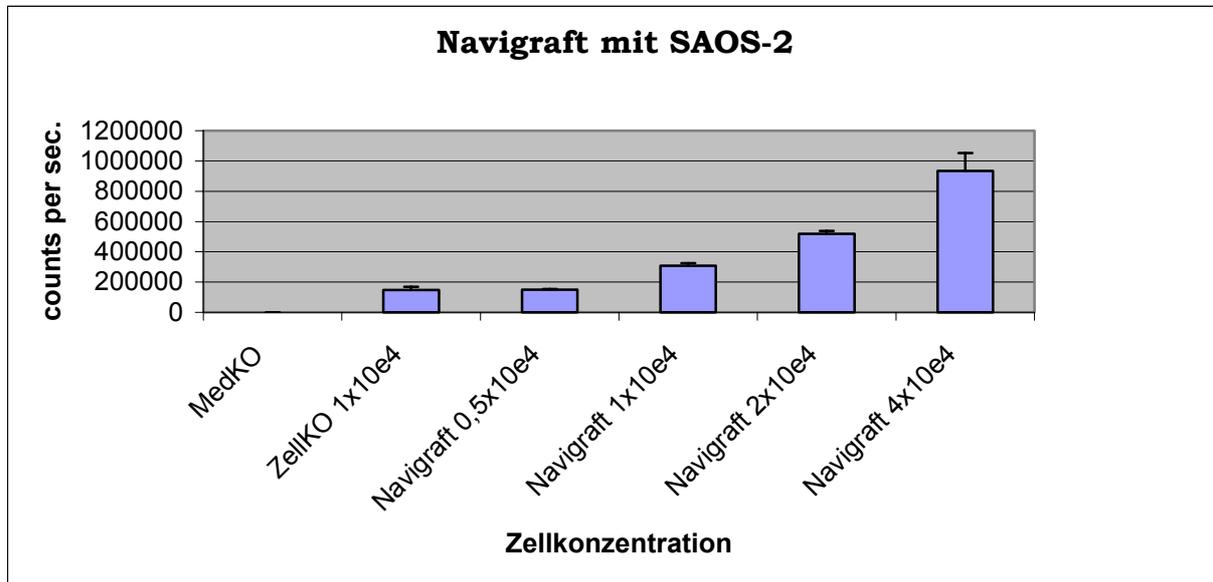


Abbildung 6 Verkürzte ATP – Messreihe mit Navigraft auf SAOS-2 Zellen

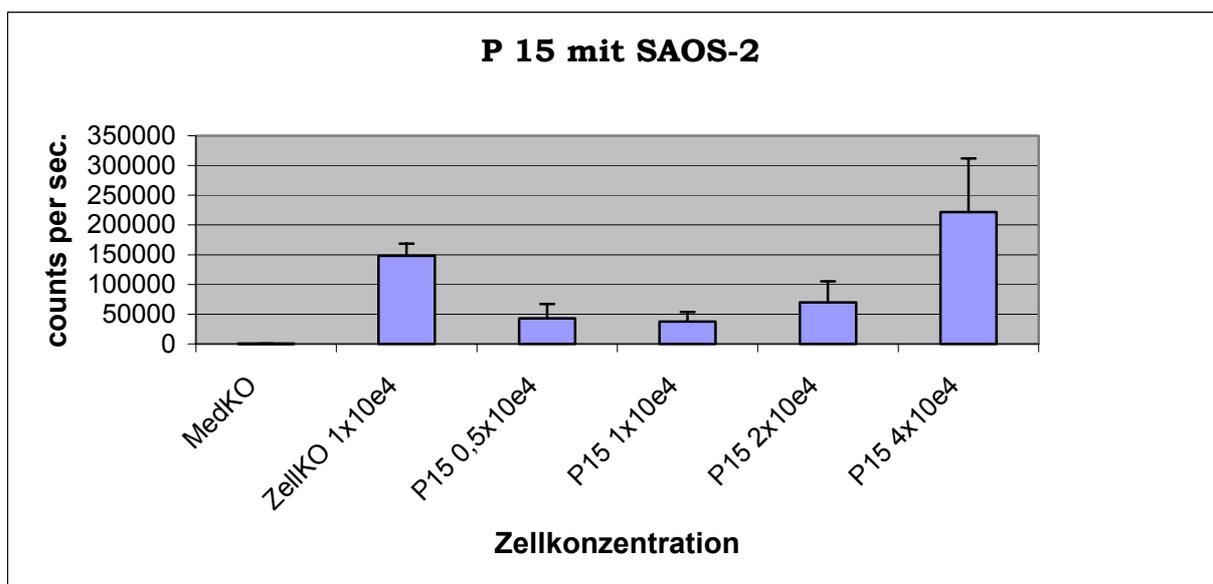


Abbildung 7 Verkürzte ATP – Messreihe mit PepGen P – 15 auf SAOS-2 Zellen

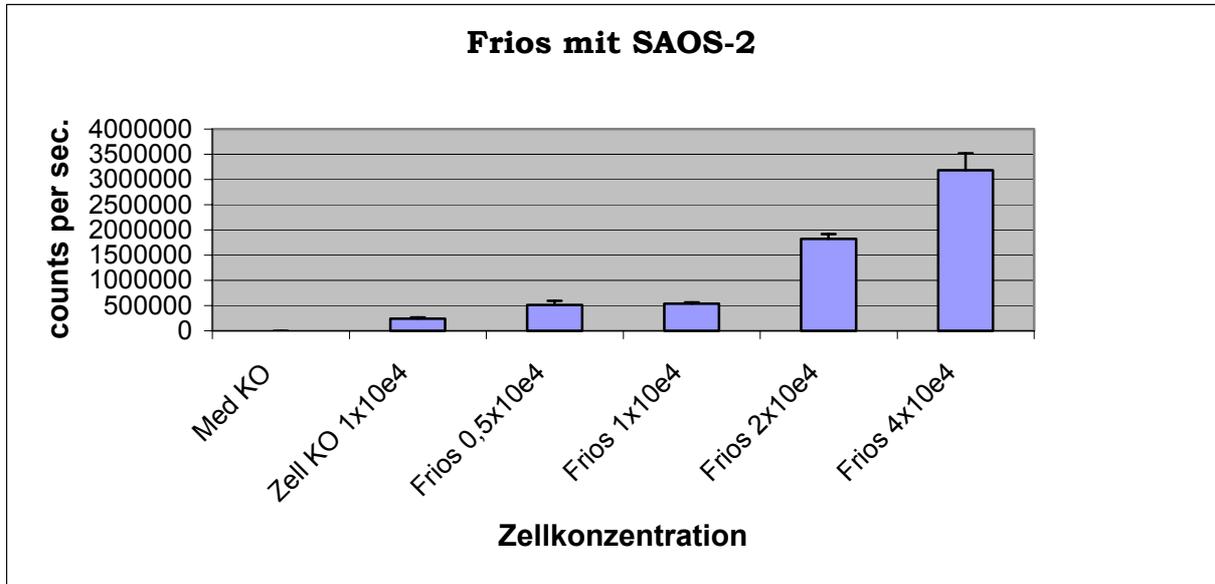


Abbildung 8 Verkürzte ATP - Messreihe mit Frios Algipore auf SAOS-2 Zellen

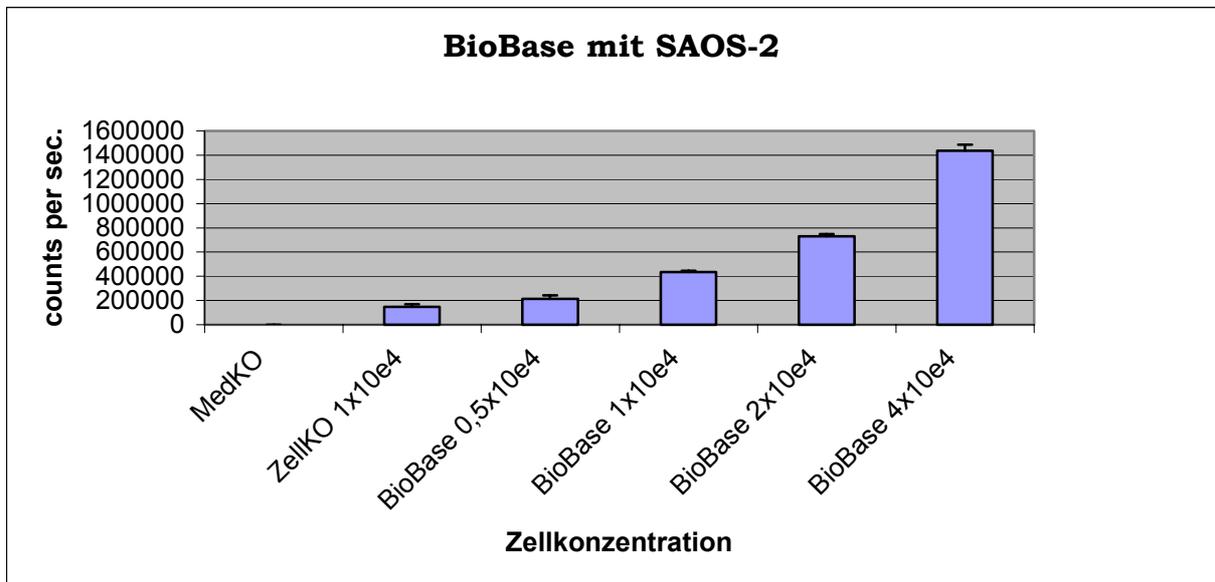


Abbildung 9 Verkürzte ATP - Messreihe mit BioBase auf SAOS-2 Zellen

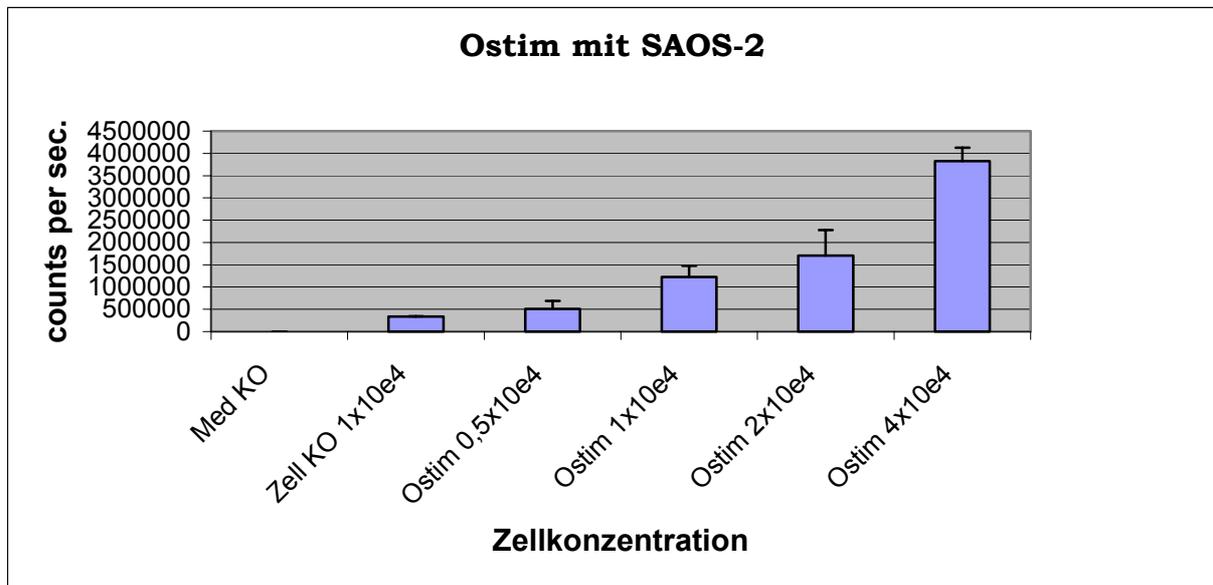


Abbildung 10 Verkürzte ATP - Messreihe mit Ostim auf SAOS-2 Zellen

Wie die Abbildungen verdeutlichen, stieg mit zunehmender Zellkonzentration auch der ATP - Gehalt der Zellkulturen auf den ausgewählten Knochenersatzmaterialien.

Die Konzentration der Zellkontrolle betrug 1×10^4 Zellen. Es war zu beobachten, dass die ATP - Werte derjenigen Kulturen, in denen die gleiche Konzentration wie in der Zellkontrolle verwendet wurde, zusammen mit einem Biomaterial tendentiell höher ausfielen als die der Zellkontrolle auf Polystyrol allein.

Eine Ursache hierfür könnte darin liegen, dass die Knochenersatzmaterialien - in unterschiedlicher Ausprägung - eine zusätzliche Reflexion der Lumineszenzsignale der Zellen verursachen. Dementsprechend müsste bei einer adäquaten Interpretation der Diagramme grundsätzlich eine Art "Hintergrund" in Abzug gebracht werden.

Die Tatsache, dass bezüglich von PepGen P - 15 zunächst hinsichtlich kleinerer Zellkonzentrationen der gemessene ATP - Gehalt remittierte, scheint dadurch begründet zu sein, dass hier anfänglich die

Lumineszenzsignale der Zellen vom Knochenersatzmaterial selbst überdeckt und somit abgeschwächt wurden.

Diese in Abhängigkeit von der jeweilig verwendeten Matrix unterschiedlichen Messwerte des ATP – Signals machen darüber hinaus ersichtlich, warum im Rahmen des Hauptversuches trotz identischer Zellzahl ein variierender, individueller Ausgangswert der einzelnen Knochenersatzmaterialien vorlag.

Die Messungen erfolgten nach zwei Stunden. Mittelwerte und Standardabweichungen ergaben sich aus jeweils drei Ansätzen.

3.2.1.2 ATP – Assays des Hauptversuches im Einzelnen

Die ATP - Messungen der drei Zelllinien erfolgten auf fünf Knochenersatzmaterialien.

Ausgewertet und dargestellt wurden im Folgenden zum einen die Lumineszenzen der Zelllinienkulturen über die Zeit für jedes Knochenersatzmaterial im Einzelnen und zum anderen die Lumineszenzen der Zellkulturen auf den Knochenersatzmaterialien über die Zeit für jede Zelllinie im Einzelnen. Um die oben beschriebenen Unterschiede hinsichtlich der für die jeweiligen KEM ermittelten Ausgangssignale zu eliminieren und somit einen besseren Vergleich der Matrizes untereinander zu gewährleisten, erfolgte innerhalb der für jede Zelllinie separat erstellten Diagramme (siehe im Folgenden Abbildungen 17 – 19) die Berechnung einer gemeinsamen Baseline der Größe 1. Dazu wurden sämtliche Messwerte eines jeden KEM durch den entsprechenden individuellen Ausgangswert des KEM dividiert und der y – Achse als Einheit der Proliferationsquotient zugeordnet.

Die Messungen wurden an den fünf Tagen 0, 3, 6, 10, 14 vorgenommen. Mittelwerte und Standardabweichungen ergaben sich aus jeweils sechs Ansätzen. Die statistische Auswertung erfolgte, wie beschrieben, anhand der Tage 0 und 6 (1. Zeitabschnitt) sowie der Tage 6 und 14 (2. Zeitabschnitt).

ATP - Assay mit den Zelllinien (ohne KEM)

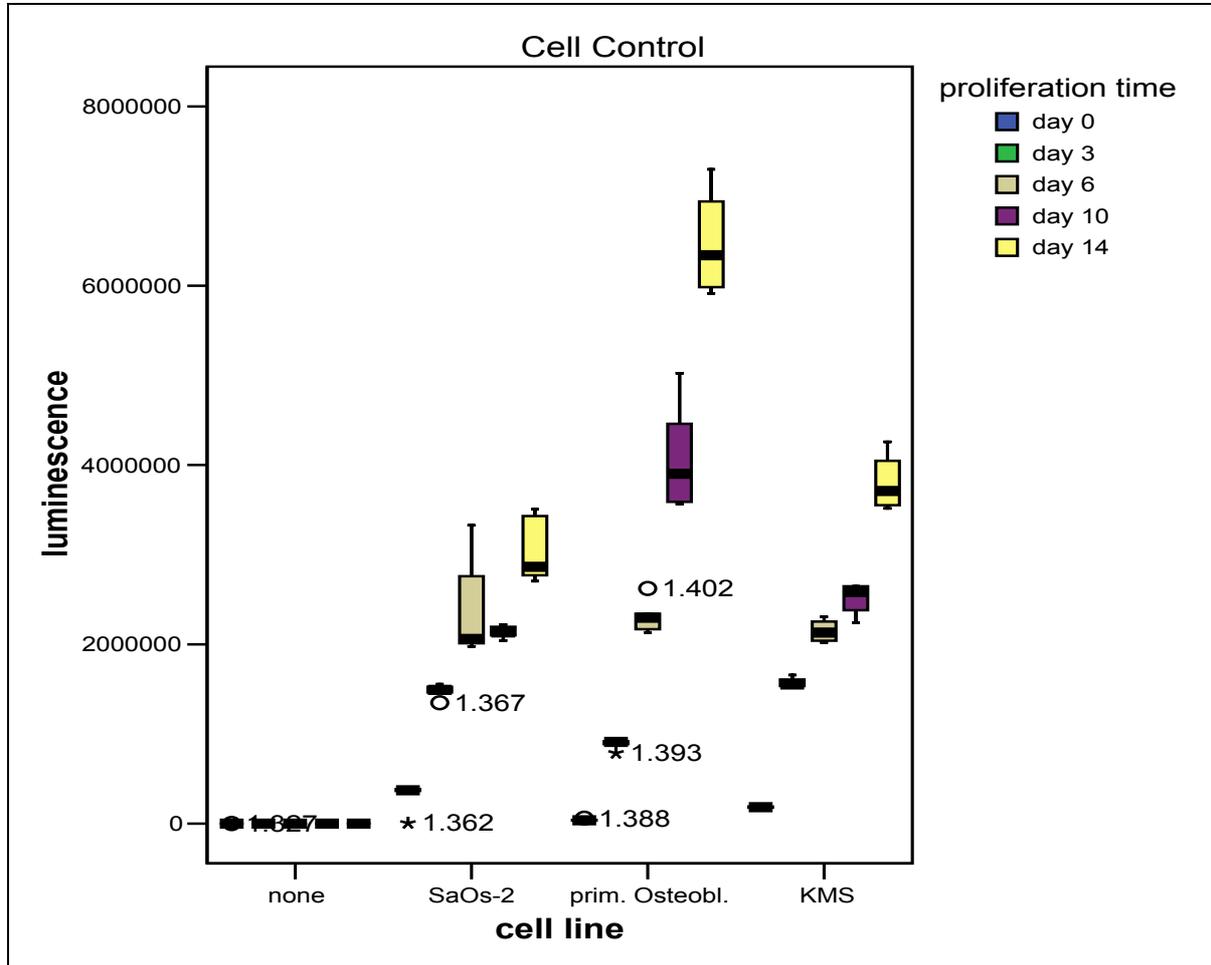


Abbildung 11 ATP – Messung mit den Zellkontrollen der Zelllinien

Der ATP - Gehalt der jeweiligen Zellkontrolle ohne KEM auf Polystyrol alleine stieg bei den drei Zelllinien proportional zur Zeit deutlich an. Die statistische Signifikanz der zu beobachtenden Unterschiede betrug bezüglich der SAOS-2 Zellen, prim. Osteoblasten und KMS in beiden Zeitabschnitten jeweils $p < 0,05$ und lag damit unterhalb des festgelegten Niveaus.

ATP – Assay mit Navigraft®

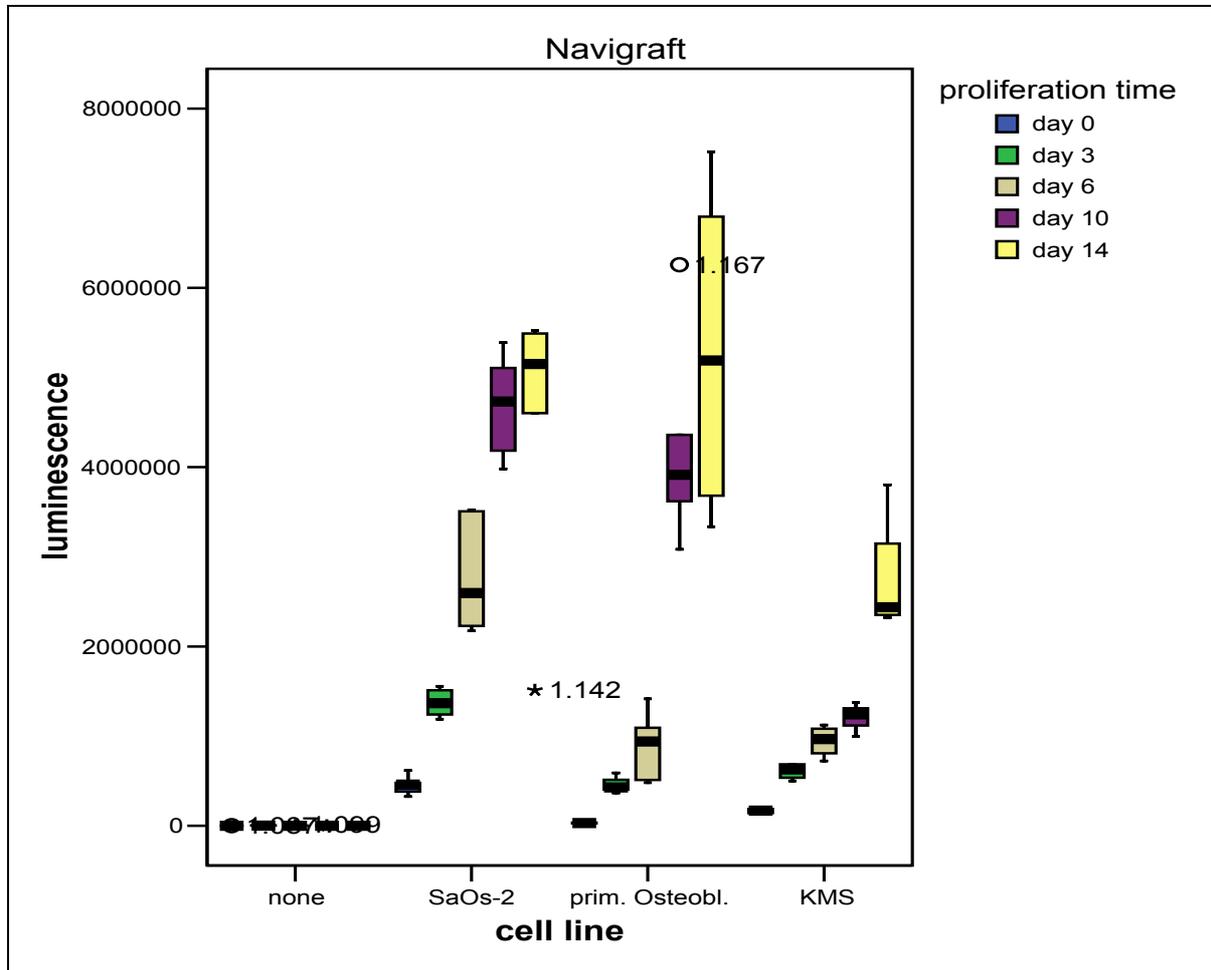


Abbildung 12 ATP – Messung mit Navigraft®

Bei allen drei Zelllinien war in der Proportionalität zur Zeit ein annähernd progredienter Anstieg des ATP – Gehaltes zu konstatieren. Im Rahmen der statistischen Auswertung lag die Signifikanz bezüglich der SAOS-2 Zellen allerdings lediglich im 1. Zeitabschnitt, für die prim. Osteoblasten sowie KMS jedoch in beiden Zeitabschnitten jeweils bei $p < 0,05$ und unterschritt damit das festgelegte Niveau.

ATP – Assay mit PepGen P - 15®

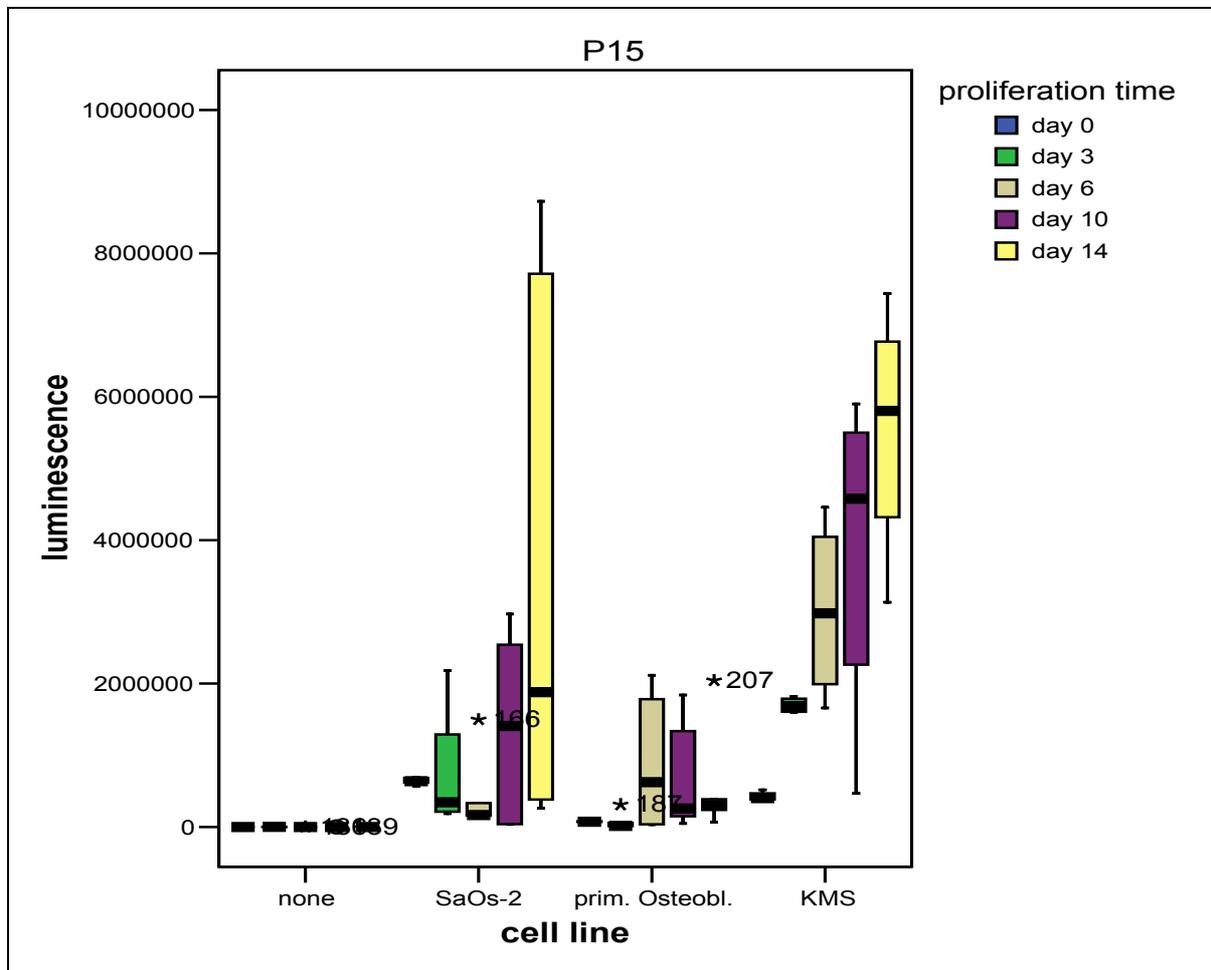


Abbildung 13 ATP – Messung mit PepGen P – 15®

Sowohl die Osteosarkomzell- als auch die Knochenmarkstammzellkulturen nahmen im zeitlichen Verlauf insgesamt deutlich an Zellzahl zu. Bezüglich der primären Osteoblasten war dagegen nach transientem Anstieg am Tag 6 ein ungefähr konstanter Endwert im Vergleich zu Tag 0 zu vermerken. Hinsichtlich der statistischen Auswertung erreichten allerdings die SAOS-2 Zellen wegen ihres Rückgangs zu Beginn lediglich im 2. Zeitabschnitt und die KMS wiederum nur im 1. Zeitabschnitt das festgelegte Signifikanzniveau von $p < 0,05$, während ansonsten $p > 0,05$ war.

ATP – Assay mit Frios Algipore®

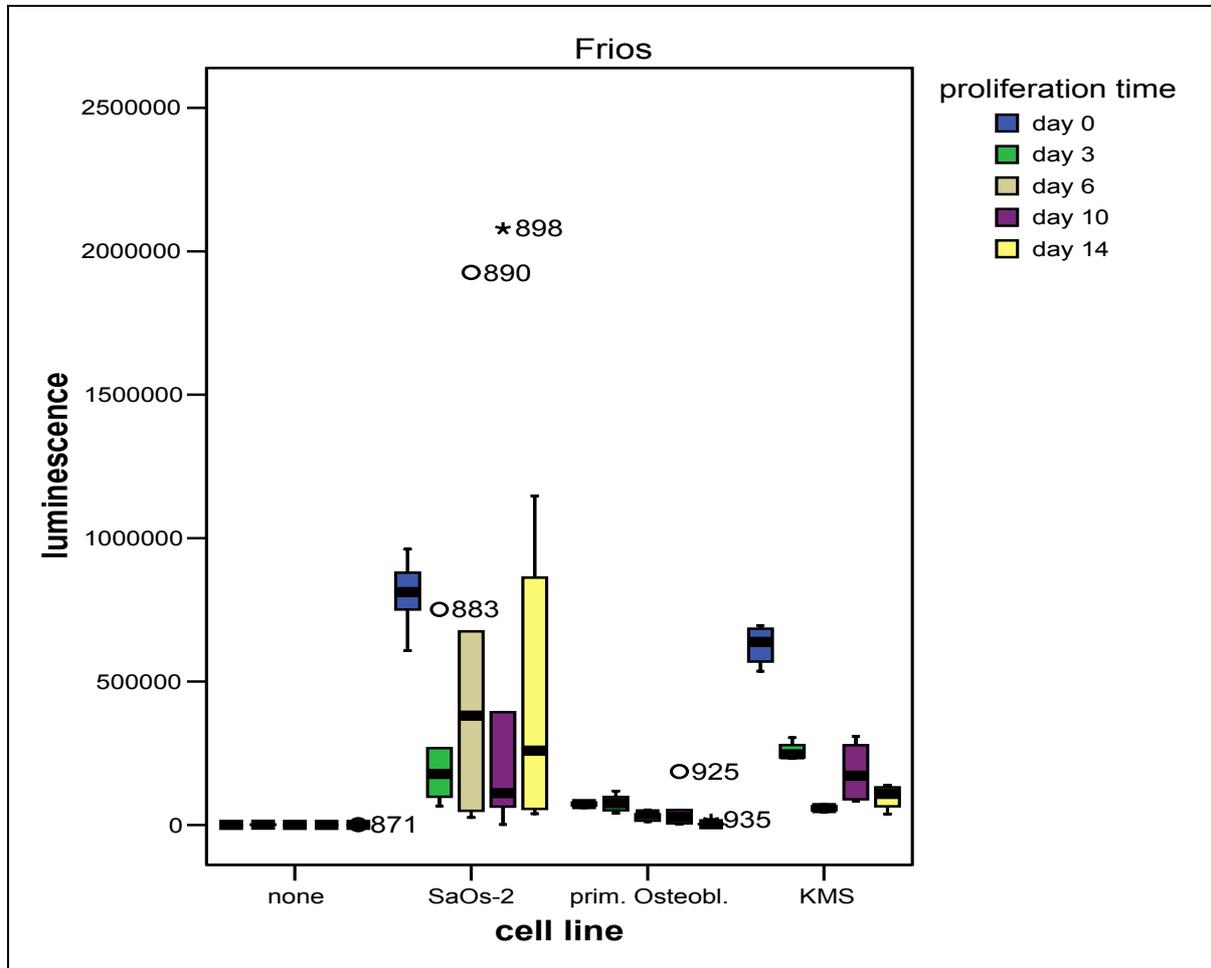


Abbildung 14 ATP – Messung mit Frios Algipore®

Bei sämtlichen drei Zelllinien war im Vergleich zum Ausgangswert ein erheblicher Abfall des ATP – Gehaltes über die Zeit zu verzeichnen. Während die Zellzahlen der prim. Osteoblasten durchweg progredient sanken, fiel bezüglich der SAOS-2 Zellen sowie der KMS besonders ein Rückgang bis zum Tage 6 auf, der sich dann im 2. Zeitabschnitt sogar wieder auf einem leicht erhöhten Level stabilisierte. Die statistische Signifikanz ergab für die SAOS-2 Zellen ein Niveau von $p > 0,05$, für die prim. Osteoblasten in beiden Zeitabschnitten und für die KMS im 1. Zeitabschnitt von $p < 0,05$.

ATP – Assay mit BioBase®

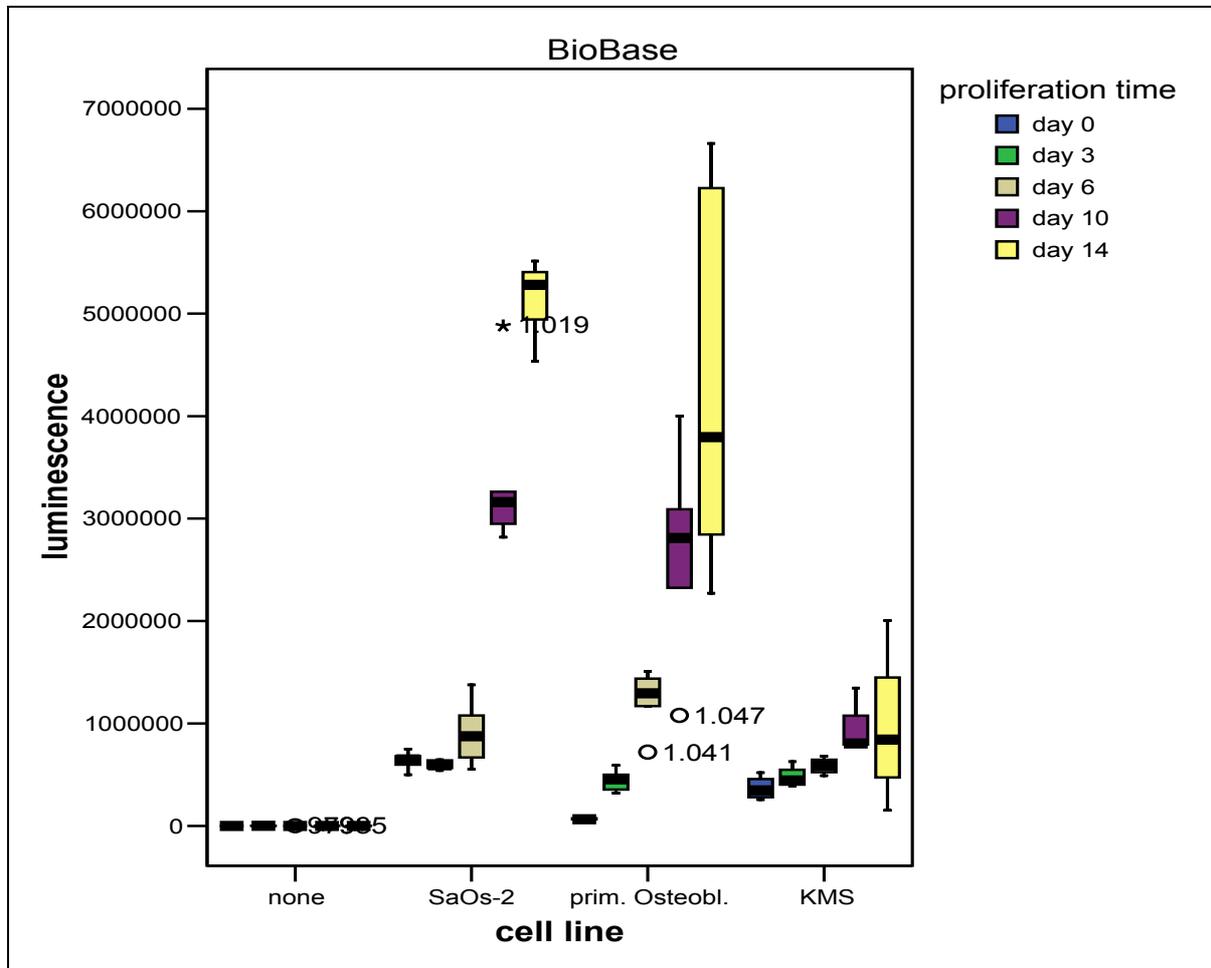


Abbildung 15 ATP – Messung mit BioBase®

Während die Zellzahlen der primären Osteoblasten im zeitlichen Verlauf nahezu progressiv anstiegen, war bezüglich des ATP – Gehaltes der Osteosarkomzellen erst von Tag 6 an eine deutliche, die Knochenmarkstammzellen betreffend insgesamt nur eine relativ gering ausgeprägte Zunahme desselben zu verzeichnen. Die statistische Signifikanz betrug für die SAOS-2 Zellen nur im 2. Zeitabschnitt sowie für die prim. Osteoblasten in beiden Zeitabschnitten $p < 0,05$, für die KMS jeweils $p > 0,05$.

ATP – Assay mit Ostim®

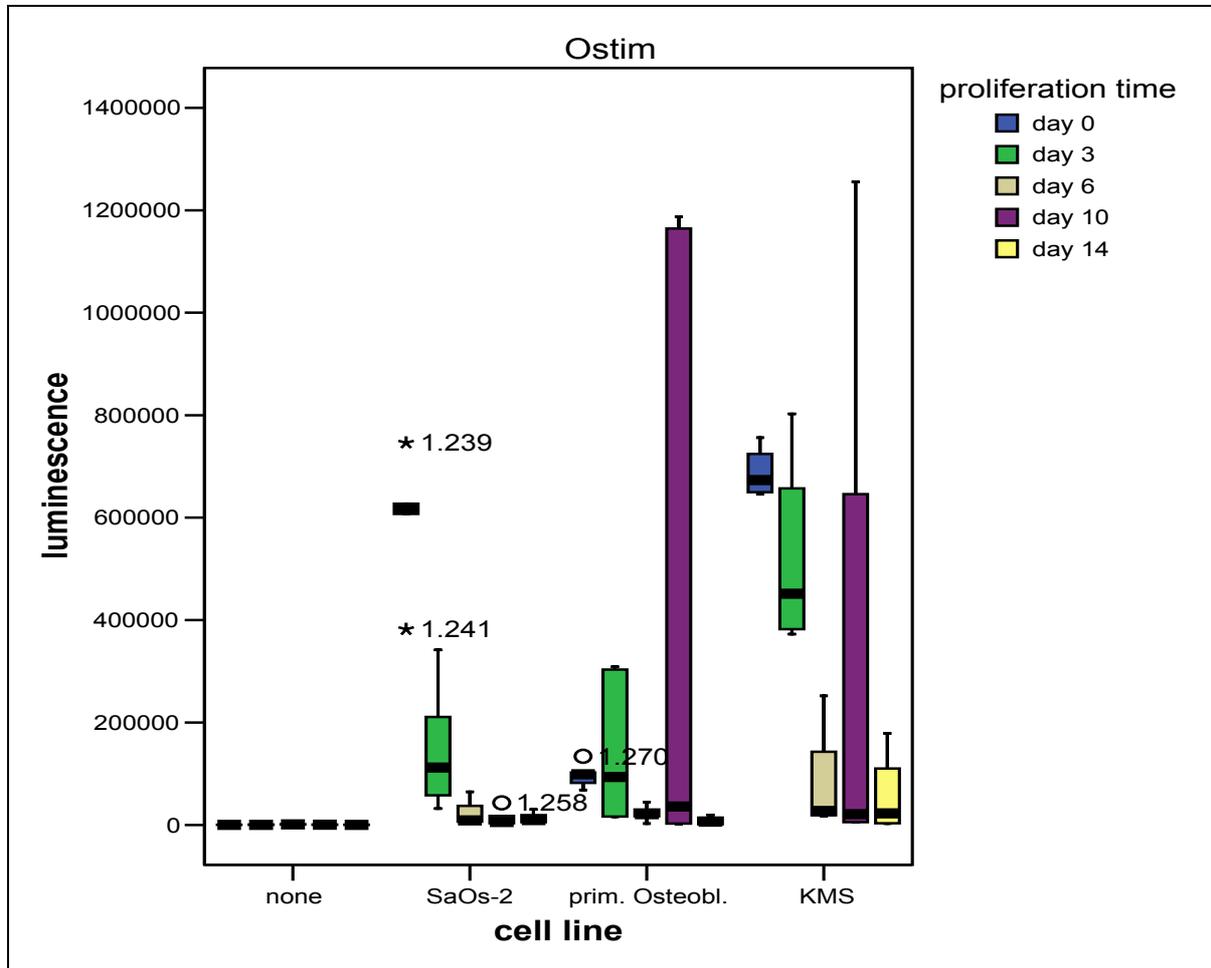


Abbildung 16 ATP – Messung mit Ostim®

Bei allen drei Zelllinien war besonders von Tag 0 zu Tag 6 ein ausgeprägtes und deutliches Absinken des ATP – Gehaltes festzustellen, welcher im zeitlichen Verlauf gar langsam gegen Null tendierte. Die statistische Auswertung ergab für die SAOS-2 Zellen, prim. Osteoblasten und KMS im 1. Zeitabschnitt ein Signifikanzniveau von jeweils $p < 0,05$, im 2. Zeitabschnitt von $p > 0,05$.

ATP – Assay mit SAOS-2 Zellen

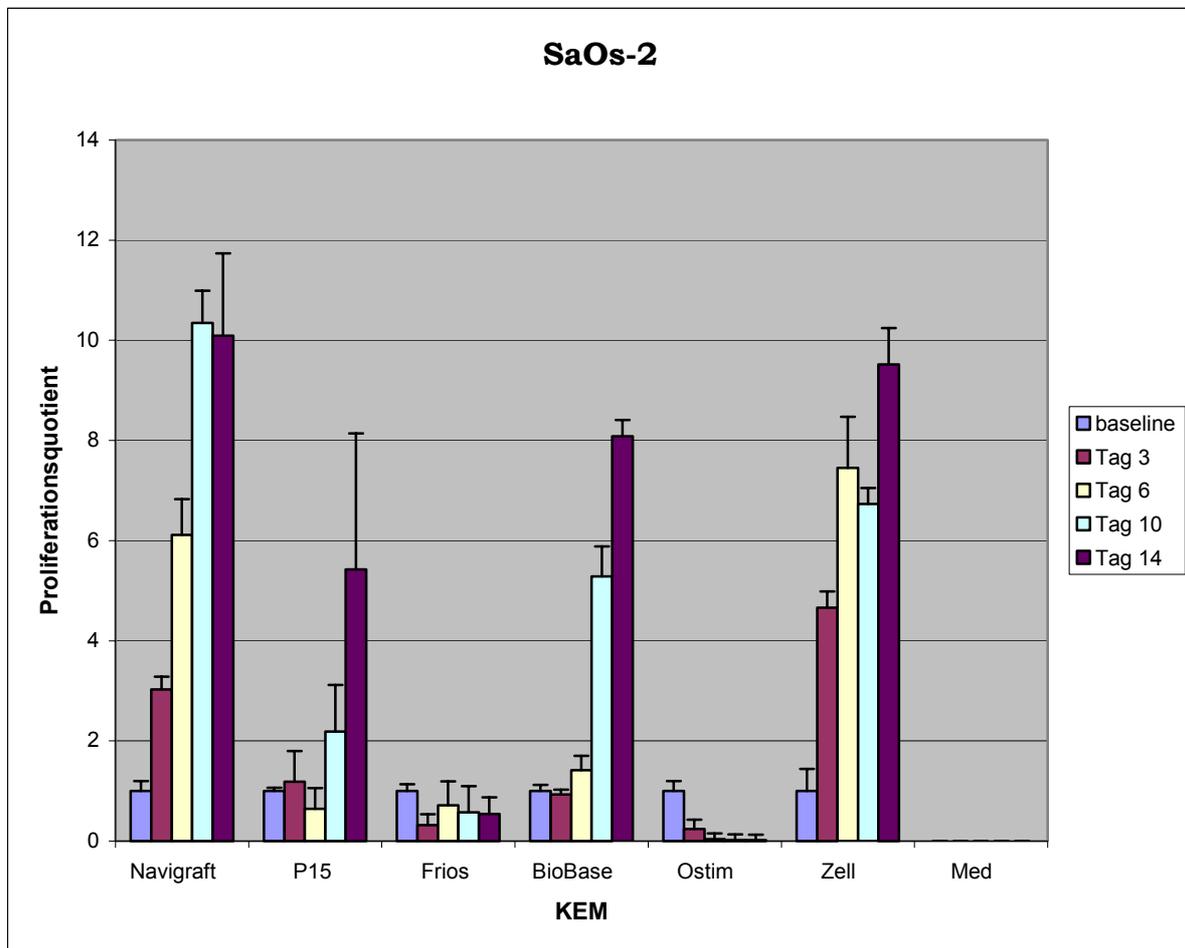


Abbildung 17 ATP – Messung mit SAOS-2 Zellen auf Knochenersatzmaterialien

Auf Navigraft war eine deutliche Zunahme der Zellzahlen der Osteosarkomzellen besonders bis zum Tag 6, auf BioBase besonders ab Tag 6 zu verzeichnen. Mit einem leichten Rückgang zum zeitlichen Beginn zeigten auch die auf PepGen P - 15 gemessenen Lumineszenzen eine signifikante Anstiegstendenz im 2. Zeitabschnitt. Auf Frios und noch eindrucksvoller auf Ostim kam es insgesamt zu einem ausgeprägten Absinken des ATP – Gehaltes innerhalb des Kulturzeitraumes.

ATP – Assay mit primären Osteoblasten

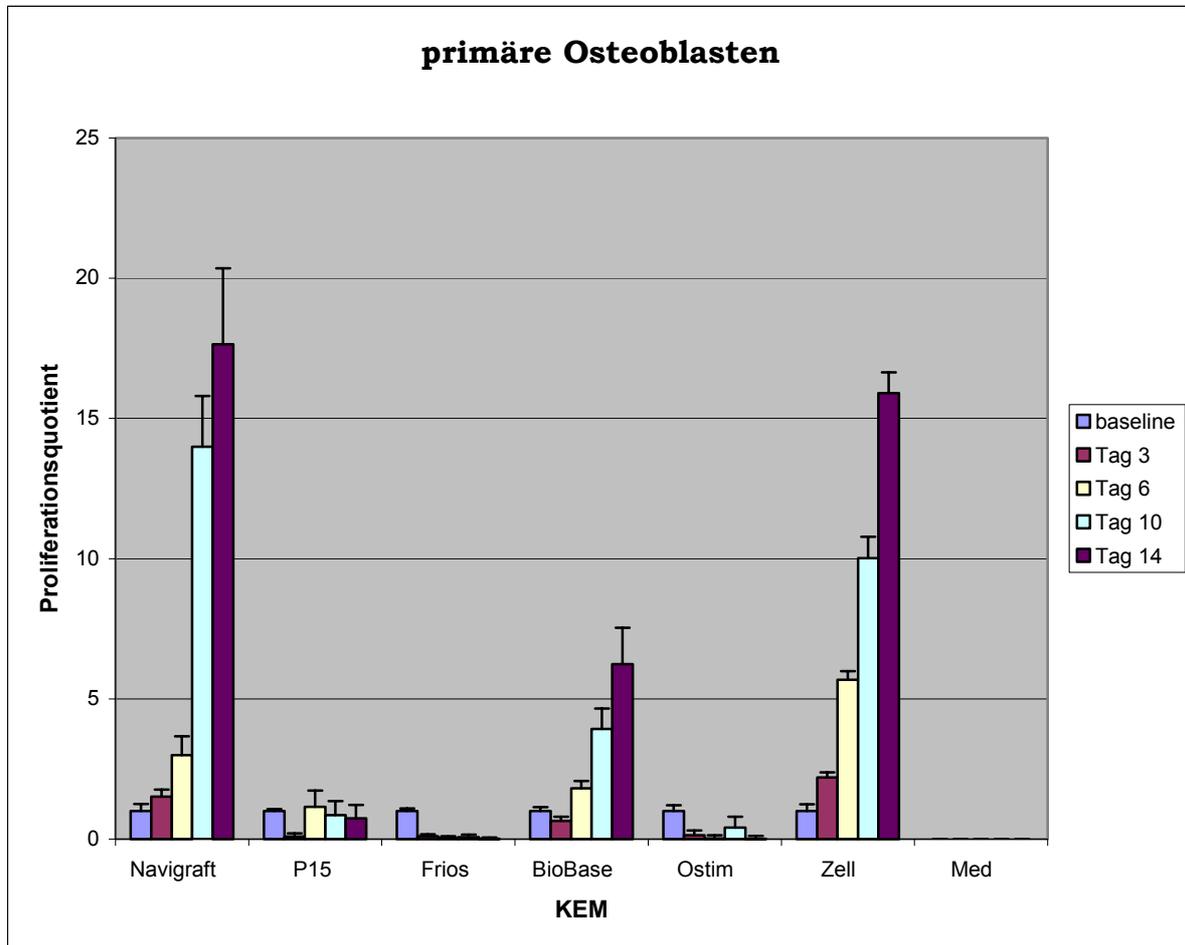


Abbildung 18 ATP - Messung mit prim. Osteoblasten auf Knochenersatzmaterialien

Auf Navigraft und auf BioBase stieg der ATP – Gehalt innerhalb der Zellkulturen der primären Osteoblasten über die Zeit signifikant an. Die Anzahl an metabolisch aktiven Zellen fiel auf Frios und auf Ostim, hier besonders bis zum Tag 6, jeweils in signifikanter Weise ab, um letztendlich gar gegen Null zu tendieren. Bei PepGen P – 15 entsprach der Endwert ungefähr dem Niveau des Ausgangswertes, wobei es intermediär sowohl zu einem Anstieg als auch zu einem erneuten Absinken des ATP – Gehaltes kam.

ATP – Assay mit Knochenmarkstammzellen

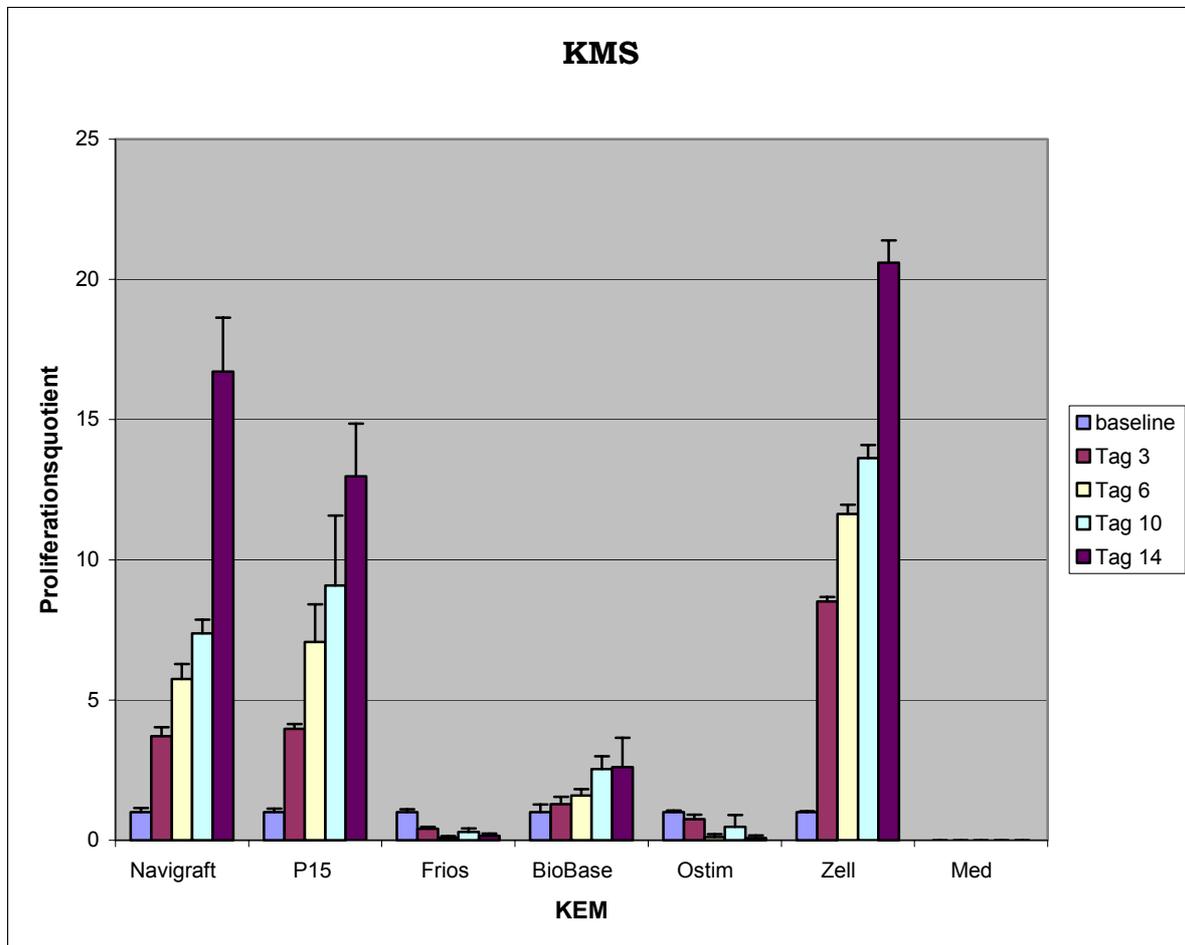


Abbildung 19 ATP - Messung mit KMS auf Knochenersatzmaterialien

Sowohl auf Navigraft als auch auf PepGen P –15, hier jedoch primär bis zum Tag 6, kam es zu einem nachgewiesenermaßen signifikanten Anstieg des ATP – Gehaltes in der Zellkultur der Knochenmarkstammzellen. Bei BioBase war zwar ebenfalls eine Zunahme der Lumineszenzsignale zu konstatieren, diese erwies sich jedoch insgesamt als weniger eindrucksvoll und somit in beiden Zeitabschnitten als nicht statistisch signifikant. Auf Frios und noch ausgeprägter, weil gegen Null tendierend, auf Ostim sank die Anzahl an metabolisch aktiven Zellen über die Zeit deutlich ab.

3.2.1.3 Potentielle Zytotoxizität der Knochenersatzmaterialien / Adhärenzverhalten der Knochenzellen

Im Rahmen dieser beiden Versuchsansätze bestand das Anliegen darin, hinsichtlich einer geeigneten Interpretationsgrundlage für die gemessenen ATP - Werte zum einen nochmals der Frage nachzugehen, ob tatsächlich und, wenn ja, warum in manchen Fällen die Zellen in den Kulturen abstarben. Zum anderen sollte ein grundsätzlicher Klärungsversuch unternommen werden, den etwaigen Einfluss des adhärenenten Wachstumsmusters der Osteoblasten bezüglich der Größenordnung der resultierenden Lumineszenzsignale zu beleuchten. Auch hier wurde analog zu den die Abbildungen 17 – 19 betreffenden Erläuterungen eine gemeinsame Baseline für die KEM zugrunde gelegt.

Zytotoxizität

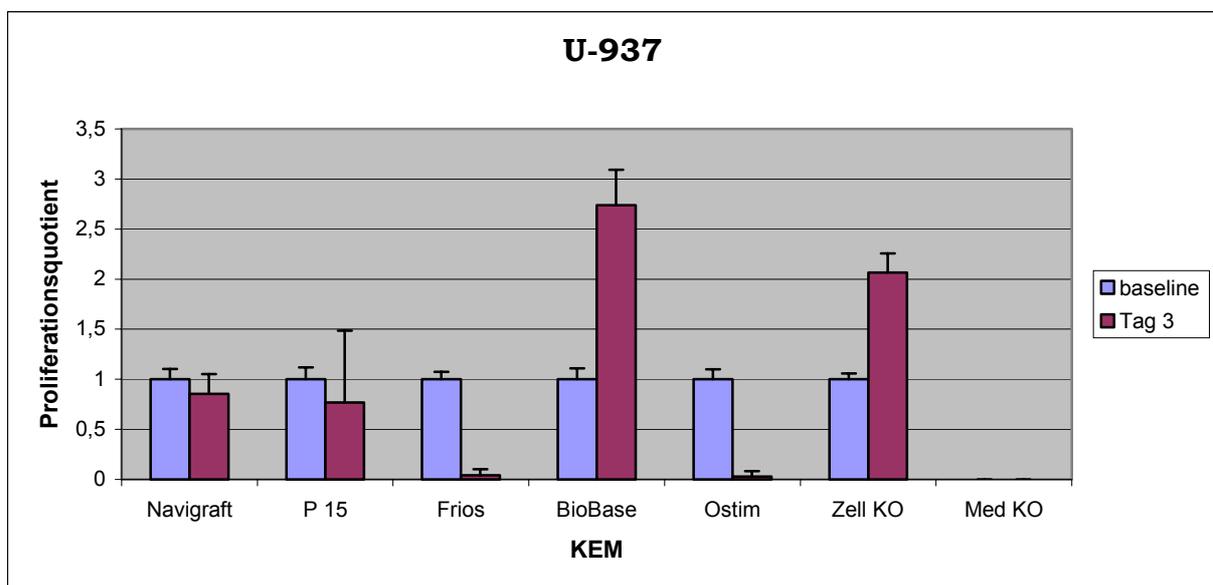


Abbildung 20 Nicht adhärenente U-937 Zellen auf den Knochenersatzmaterialien

In diesem Teilversuch sollte eruiert werden, ob die Knochenersatzmaterialien ein ungestörtes Wachstum der nicht adhärenenten myelo – monozytären Zellen

gestatteten oder etwa gegebenenfalls irgendeinen Einfluss auf die Zellkultur ausübten.

Offensichtlich schien es derart zu sein, dass die Vitalität der U-937 Zellen in Anwesenheit von Frios Aligpore und Ostim nachhaltig beeinträchtigt war. Somit war ein gewisses Maß an einer von diesen beiden Biomaterialien ausgehenden Zytotoxizität in vitro nicht auszuschließen. Auf den übrigen Trägermatrizes konnte ein weitestgehend unauffälliges, auf BioBase sogar ein im Vergleich zur Zellkontrolle nochmals erhöhtes Zellwachstum auf der Polystyroloberfläche festgestellt werden.

Die Messungen wurden an zwei Tagen (0, 3) vorgenommen. Mittelwerte und Standardabweichungen ergaben sich aus jeweils sechs Ansätzen.

Adhärenzverhalten

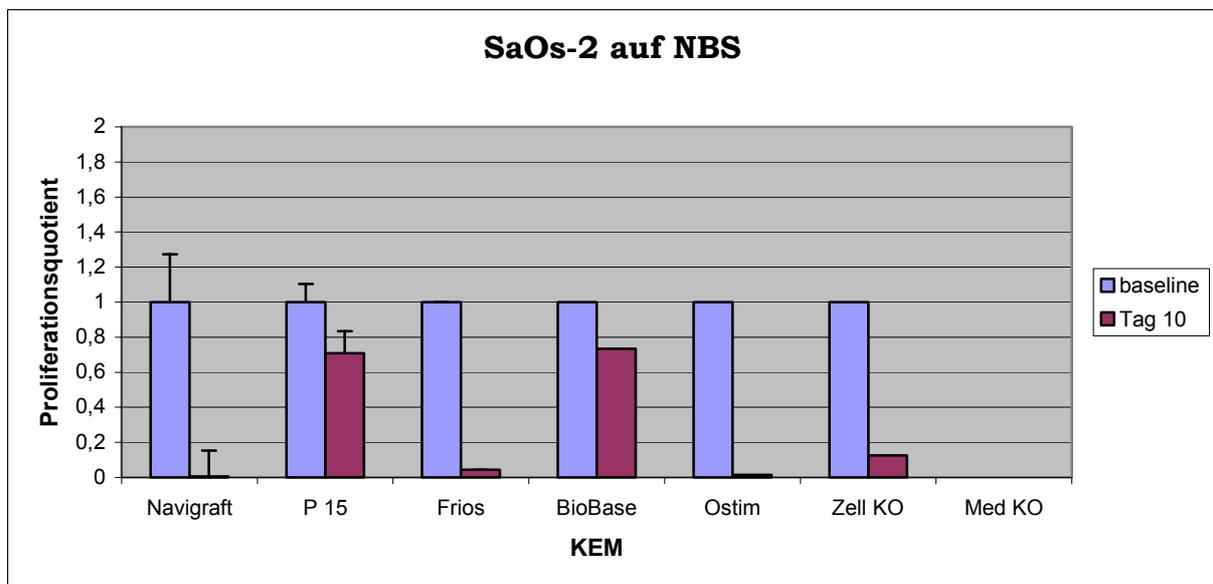


Abbildung 21 SAOS-2 Zellen mit Knochenersatzmaterialien auf NBS - Platten

In diesem Teilversuch wurde den obligat adhären wachsenden Knochenzellen bewusst die Option entzogen, sich auch auf den Kulturschalen anzusiedeln. Da eine Proliferation nur bei Adhärenz stattfindet, sollten die gemessenen ATP - Lumineszenzen durch die

Verwendung von neuartigen NBS (Non Binding Surface) - Platten rein auf diejenigen Zellen zurückzuführen sein, welche sich auf den Knochenersatzmaterialien anlagern konnten. Die Tatsache, dass die Anzahl an lebenden Zellen in der Zellkontrolle allein im Laufe der Zeit deutlich remittierte, war somit für ansonsten adhärent wachsende Osteosarkomzellen zu erwarten. Offenkundig konnten sich dementsprechend hier die Knochenzellen sowohl auf PepGen P – 15 als auch auf BioBase erfolgreich anheften, während es ihnen auf Frios Algiopore und Ostim nicht gelang. Auf Navigraft war überraschenderweise und wider Erwarten kein Adhärenzverhalten der SAOS-2 Zellen nachzuweisen.

Die Messungen wurden an zwei Tagen (0, 10) vorgenommen. Mittelwerte und Standardabweichungen ergaben sich aus jeweils sechs Ansätzen.

3.2.2 Histochemie der Alkalischen Phosphatase (AP)

Die histomorphologische Auswertung der Zellschnitte erfolgte mit den jeweiligen Zelllinien für den 10. Messtag, da die Zellen an den vorherigen Tagen teilweise konfluent und zu dicht erschienen.

In der nachfolgenden Tabelle sind die entsprechenden Resultate der durchgeführten Lichtmikroskopie zusammengetragen.

Tabelle 3 AP – Färbung der Zelllinien mit den Knochenersatzmaterialien (*)

	Zellkontrolle	Navigraft	P 15	Frios	BioBase	Ostim
SAOS-2	++	++	+(+)	(+)	++	(+)
Primäre Osteoblasten	++	+(+)	+	(+)	+	(+)
KMS	++	++	-	-	+	-

(*) Die Anzahl der + - Zeichen entspricht in Abstufung der Intensität der AP - Färbung, unabhängig von der Anzahl an Zellen. In Klammern gesetzte Zeichen besagen, dass die entsprechende Intensitätsstufe nur grenzwertig erreicht wurde.

Wie der Tabelle zu entnehmen ist, zeigten sowohl die Osteosarkomzellen als auch die primären Osteoblasten mit den Knochenersatzmaterialien eine positive AP - Färbung. Dabei hoben sich besonders Navigraft, BioBase und mit leichter Einschränkung PepGen P - 15 durch eine recht ausgeprägte Intensität hervor. Auf Frios Aligpore und auf Ostim war dagegen sogar nur bei vereinzelten Zellen eine grenzwertige Anfärbung festzustellen, so dass hier das Differenzierungsverhalten als (deutlich) eingeschränkt angesehen werden musste.

Bei den Knochenmarkstammzellen wiesen ausschließlich Navigraft und BioBase eine AP - Färbung auf. Der Logik folgend schien also auf den übrigen Trägermatrizes keine osteogene Differenzierung der KMS erfolgt zu sein, wobei es schon ein wenig verwunderte, warum für PepGen P - 15 in Anbetracht der sonst recht guten Ergebnisse in den ATP - Assays keine positive Wertung zu verzeichnen war.

Die zudem erstaunliche Tatsache, dass die Zellkontrolle der Knochenmarkstammzellen allein eine durchaus intensive AP - Färbung offenbarte, konnte nach Rücksprache mit dem Institut für Transplantationsdiagnostik der Universität Düsseldorf (Frau PD Dr. Kögler) eruiert werden und sei darauf zurückzuführen, dass sich jene gemäß verschiedener erfolgter Beobachtungen tatsächlich partiell bereits spontan zu osteoblastären Zellen differenzierten.

Auf den nachfolgenden Abbildungen sind zum einen die jeweiligen Zellkontrollen (SAOS-2, primäre Osteoblasten und KMS) allein und zum anderen zwei exemplarisch ausgewählte Knochenersatzmaterialien mit der entsprechenden Zelllinie (KMS auf Navigraft und SAOS-2 auf BioBase) zur Veranschaulichung dargestellt.

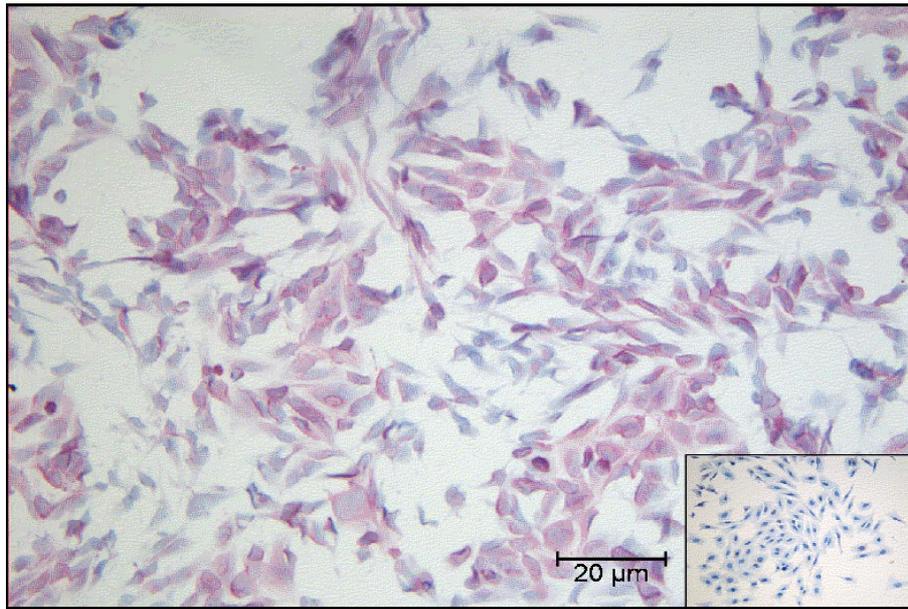


Abbildung 22 Histochemische Färbung AP, Zellkontrolle SAOS-2 Zellen, Tag 10; Negativkontrolle unten rechts

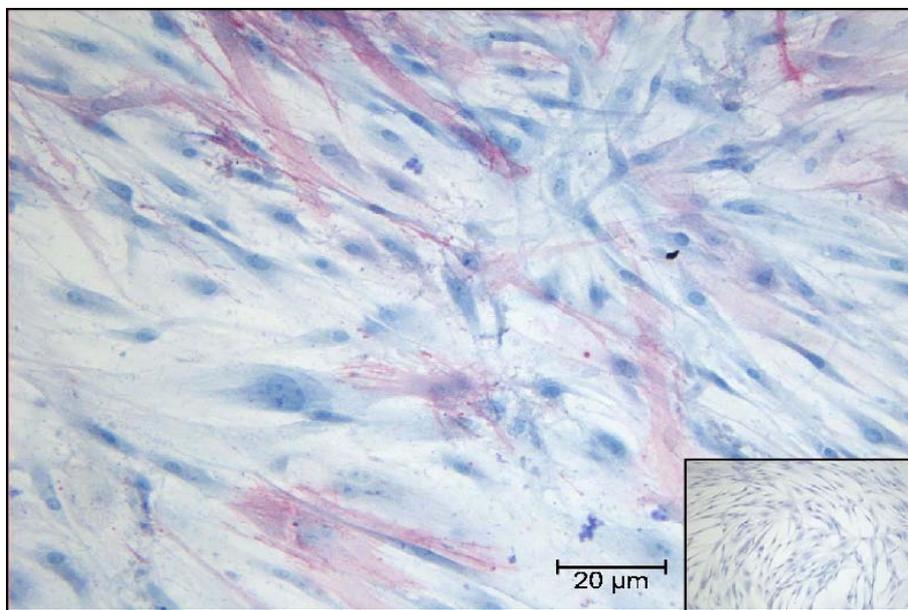


Abbildung 23 Histochemische Färbung AP, Zellkontrolle prim. Osteoblasten, Tag 10; Negativkontrolle unten rechts

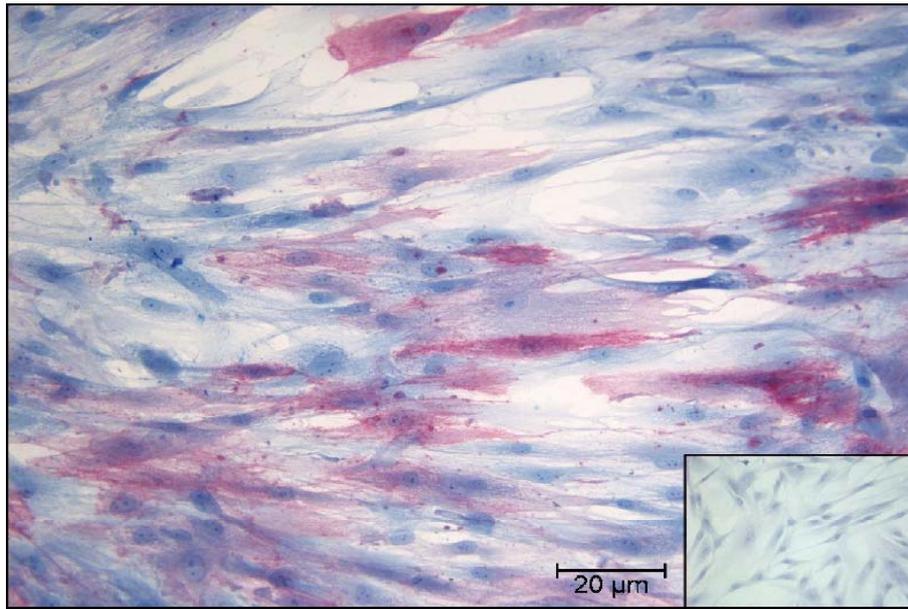


Abbildung 24 Histochemische Färbung AP, Zellkontrolle KMS, Tag 10;
Negativkontrolle unten rechts

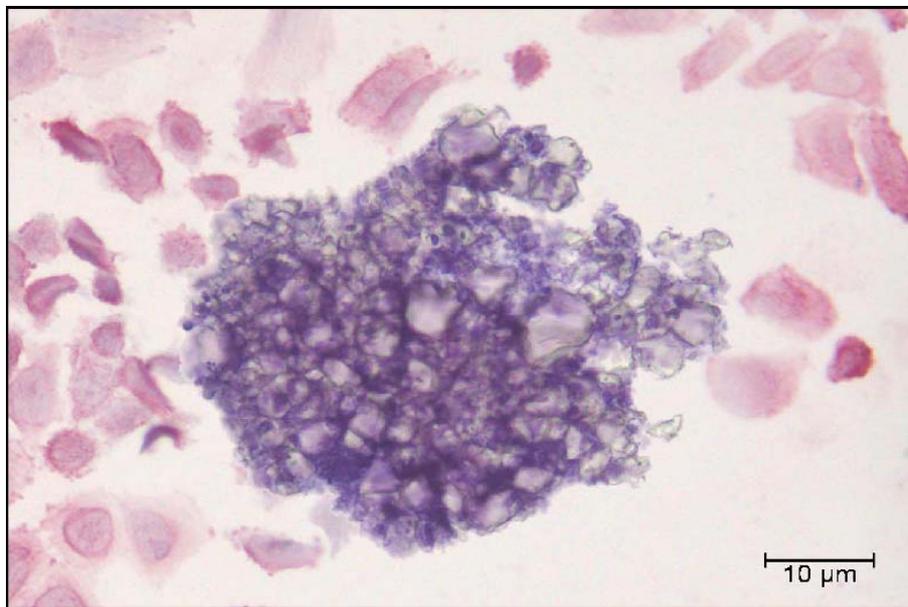


Abbildung 25 Histochemische Färbung AP, SAOS-2 Zellen auf
BioBase®, Tag 10 (exemplarisch)

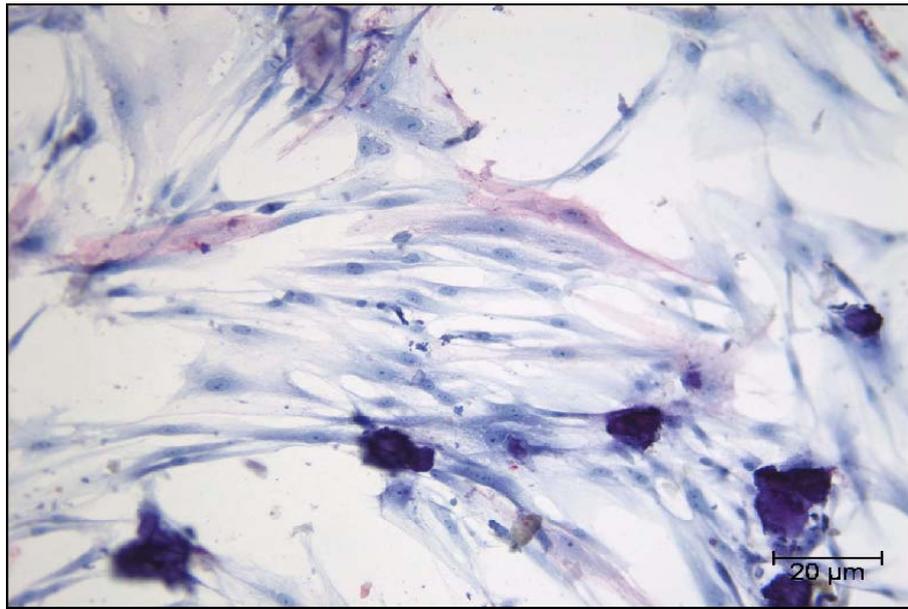


Abbildung 26 Histochemische Färbung AP, KMS auf Navigraft®, Tag 10
(exemplarisch)

3.2.3 Osteocalcin (Ocal) – ELISA

Bedauerlicherweise ist an dieser Stelle zu konstatieren, dass die Versuche bezüglich des osteoblastären Differenzierungsmarkers Osteocalcin mittels ELISA – Verfahrens zu keinerlei Ergebnissen geführt haben, die eine wissenschaftlich begründete Aussage zuließen.

Die Problematik bestand hierbei im Wesentlichen darin, dass das im fötalen Kälberserum (FKS, welches neben anderen Mediumbestandteil ist) befindliche bovine Ocal bei den Messungen zugleich ebenso miterfasst wurde, obgleich laut expliziter Herstellerangabe der verwendete ELISA – Test spezifisch für humanes Ocal in Zellkulturüberständen gedacht sei.

Dadurch bedingt stellten sich insgesamt verfälschte, extrem erhöhte Werte ein, die auch durch das mögliche in Abzug Bringen eines bestimmten " Sockelbetrages " nicht adäquat modifiziert und interpretiert werden konnten. Auch wenn der hier zum Einsatz gekommene ELISA sicherlich von besonders ausgeprägter Sensitivität war, so ist doch im Rahmen von in Zellkulturen anhand ELISA – Methodik ermittelten Osteocalcinresultaten

diese offenkundig grundsätzliche Problematik in der Retrospektive genauso wie zukünftig stets mitzubedenken.

3.2.4 Auswertung der Rasterelektronenmikroskopie

Die rasterelektronenmikroskopische Auswertung hinsichtlich der Zellmorphologie sowie Zelladhärenz wurde für die hergestellten Präparate am 10. Tag vorgenommen. Zur Anschauung diente als Zelllinie die SAOS-2 – Kultur. Im Folgenden sind zum einen die Zellkontrolle allein und zum anderen die Zellen mit jeweils einem entsprechenden Knochenersatzmaterial dargestellt.

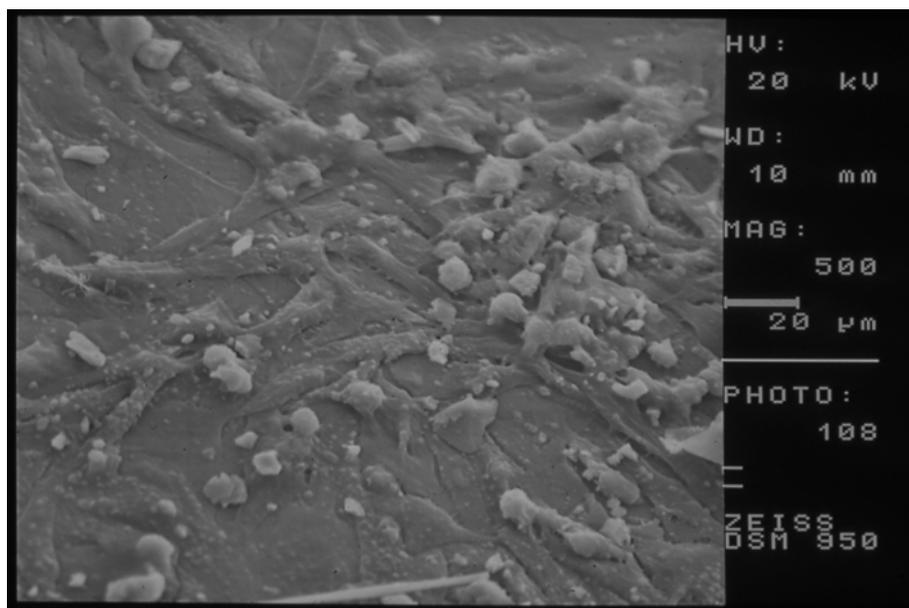


Abbildung 27 REM – Darstellung, Zellkontrolle SAOS-2, Tag 10

Die Zellkontrolle zeigt zahlreiche Osteosarkomzellen in offensichtlich gutem Zustand, welche sich teilweise mit ihren Ausläufern überlappen.

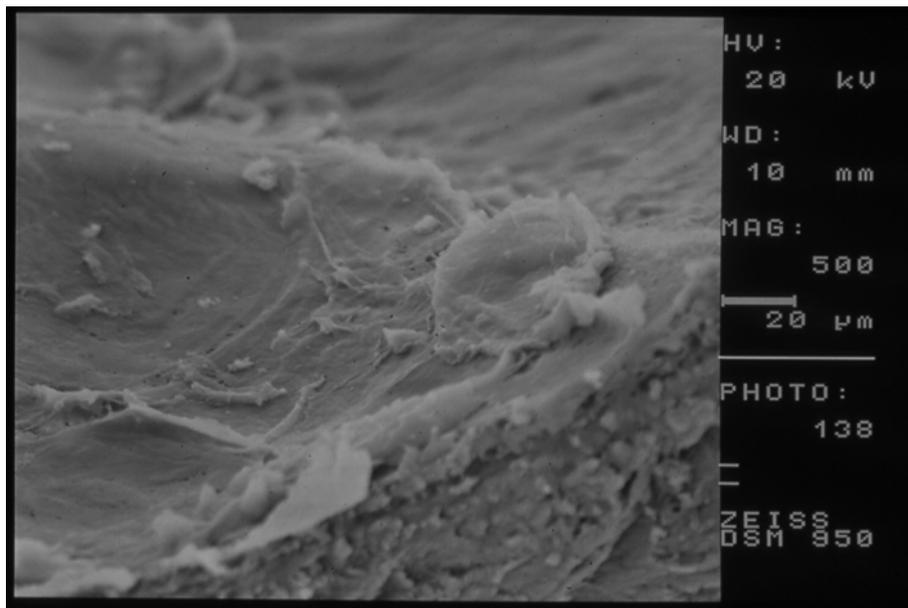


Abbildung 28 REM – Darstellung, SAOS-2 Zellen auf Navigraft®, Tag 10

Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt mit einigen Osteosarkomzellen, die wegen ihrer relativ flachen Gestalt auf einen guten Zustand schließen lassen und dem Navigraft adhärent aufsitzen.

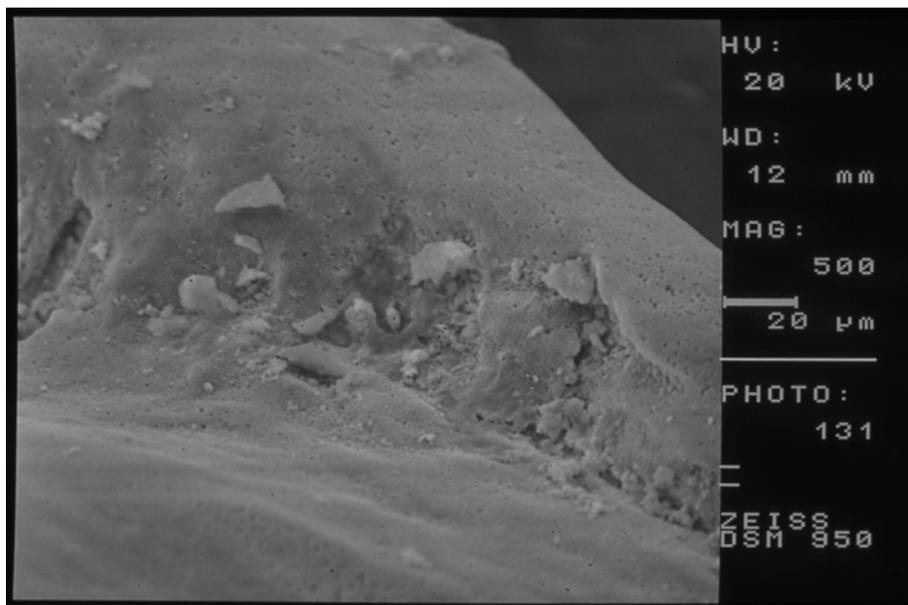


Abbildung 29 REM – Darstellung, SAOS-2 Zellen auf PepGen P - 15®, Tag 10

Die Abbildung zeigt mehrere Osteosarkomzellen, welche als Ausdruck ihres offensichtlich guten Zustandes eine recht flache Morphologie aufweisen und sich in Adhärenz zum PepGen P – 15 befinden.

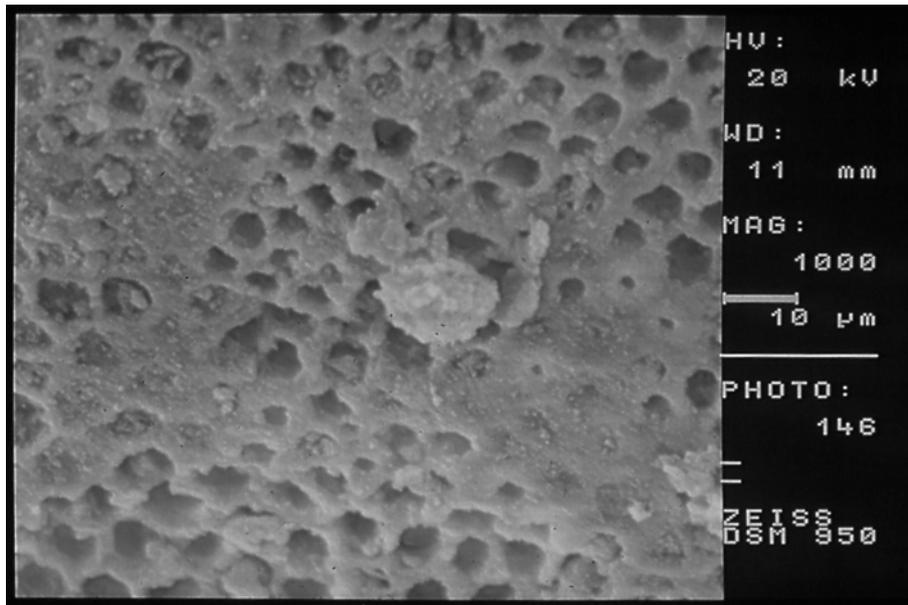


Abbildung 30 REM – Darstellung, SAOS-2 Zellen auf Frios Algipore®, Tag 10

Die Abbildung zeigt eine Osteosarkomzelle auf Frios Algipore, welche jedoch aufgrund ihres eher kugeligen Erscheinungsbildes zum einen auf einen relativ schlechten Zustand schließen lässt und zum anderen praktisch kaum ein Adhärenzverhalten offenbart.

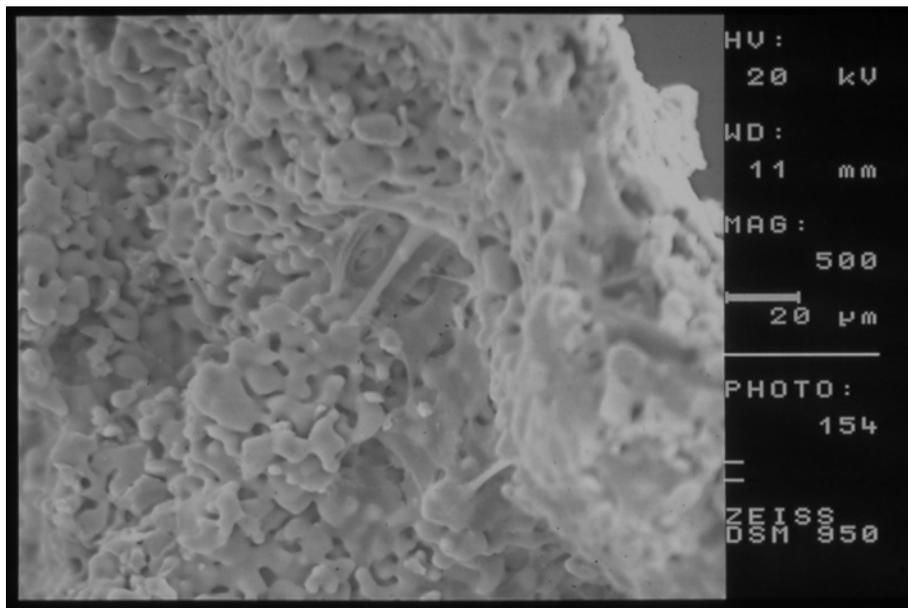


Abbildung 31 REM – Darstellung, SAOS-2 Zellen auf BioBase®, Tag 10

Die Abbildung zeigt viele Osteosarkomzellen von recht flacher Gestalt und damit gutem Zustand, die das BioBase in ausgeprägt adhärenter Weise besiedeln.

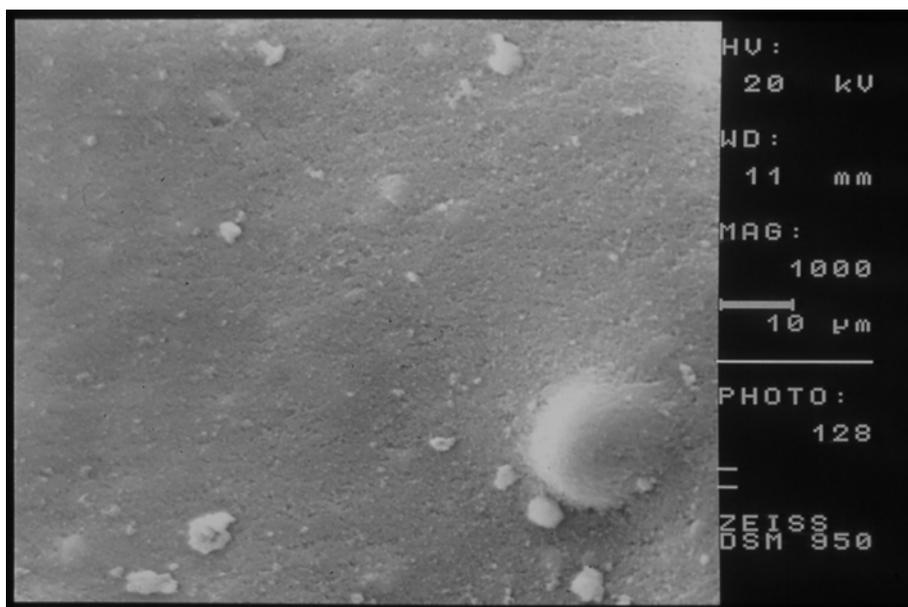


Abbildung 32 REM – Darstellung, SAOS-2 Zellen auf Ostim®, Tag 10

Die Abbildung zeigt keinerlei Osteosarkomzellen. Die Oberfläche des Ostim gleicht insgesamt einer ebenen und feinporigen Kraterlandschaft.

3.2.5 pH – Werte

Während der Versuchsansätze wurden die pH - Werte an den Tagen 1 und 8 gemessen.

Tabelle 4 ph – Werte; Tag 1 und Tag 8

Knochenersatzmaterialien	pH – Wert	
	Tag 1	Tag 8
Navigraft	7,73	7,77
PepGen P - 15	7,83	7,83
Frios Algipore	7,74	7,81
BioBase	7,73	7,76
Ostim	7,79	7,81
Zellkontrolle	7,71	7,86
Mediumkontrolle	7,70	7,43

Wie der Tabelle zu entnehmen ist, lagen die pH – Werte – obgleich sämtlich geringgradig alkalisch – im Normbereich.

4 Epikritische Diskussion

Bereits in einer Vielzahl von in vitro – Studien wurden das Wachstumsverhalten und die Interaktionen von osteoblastären Zellen mit Knochenersatzmaterialien anhand diverser biochemischer Methoden evaluiert, häufig jedoch allerdings entweder mit nur einer stofflichen Gruppe als Trägermatrix oder lediglich an einer (zum Teil artfremden, i. e. von Tieren stammenden) Zelllinie.⁹²⁻⁹⁶

Die Besonderheit der vorliegenden Untersuchung bestand darin, dass zugleich fünf repräsentative Biomaterialien mit Populationen von drei ausnahmslos humanen, osteogenen Zelltypen in Ansatz gebracht und getestet wurden. Infolge der dadurch bedingt insgesamt recht komplexen Anlage der Studie sollte demnach weitestgehend sichergestellt werden, dass die entsprechenden Resultate zum einen untereinander objektiv verglichen, zum zweiten unter Berücksichtigung der Ergebnisse anderer Untersuchungen besser eingeordnet werden können und zum dritten einen bereits tendentiell in die Zukunft gerichteten Ausblick herbeizuführen vermögen.

Neben der hauptsächlichen Beurteilung einer reinen Proliferationstendenz der Zellen dominierten mithin auch der Gedanke sowie das Streben danach, durch die Verwendung von sich in ihrem Differenzierungsgrad unterscheidenden Zelltypen eine nochmals subtilere Betrachtungsweise der Thematik zu ermöglichen. Dabei dienten die standardmäßig eingesetzten Osteosarkomzellen sozusagen als Grundlage eines Bewertungsmaßstabes für das jeweilige biomaterialeigene Osteokonduktivitätspotential, während die differenzierten, primären Osteoblasten als eine qualitativ fundiertere und aussagekräftigere osteogene Zellkultur im Hinblick auf die Proliferationsversuche anzusehen waren. Trotz der bisweilen aufgrund einer deutlich höheren Empfindlichkeit erschwerten Kulturbedingungen sind es allerdings gerade die adulten Knochenmarkstammzellen (in der Literatur allgemein als sogenannte mesenchymal stem cells, MSC, beschrieben), denen ein ausgesprochen interessanter Aspekt innewohnt. Dieser basiert auf

der mittlerweile anerkannten Hypothese, dass neben rein hämatopoetischen Zellen vereinzelt auch pluripotente Teilpopulationen im Knochenmark existieren, die in der Lage sind, sich in Myo -, Adipo -, Chondro - oder Osteoblasten zu differenzieren.⁹⁷⁻⁹⁹

Ihre innerhalb dieser Arbeit angedachte Funktion als eine Zellkultur, an der die osteokonduktiven Eigenschaften von Knochenersatzmaterialien überprüft wurden, ließe sich somit um den Gedanken erweitern, sie technischerseits mittels Punktion in Form eines Zellaspirats zu gewinnen und anschließend auf einer adäquaten Trägermatrix sozusagen als potentiell osteogenes " Knochenersatzmaterial " selbst zur Regeneration eines Defektes einzusetzen. Dieses zunächst experimentell - theoretische Ansinnen erfuhr bereits in Zügen eine beginnende Umsetzung in der Praxis. Im Rahmen der sogenannten heterotopen, autologen Stammzelltherapie konnten beispielsweise in der Orthopädischen Klinik der Heinrich - Heine - Universität Düsseldorf anhand zweier klinischer Studien offensichtlich erste Erfolge verbucht und die Effektivität des Verfahrens demonstriert werden.¹⁰⁰ Insbesondere die noch ungeklärten Fragen zur Immunogenität sowie zu einer eventuell zu berücksichtigenden neoplastischen Entdifferenzierung der transplantierten Zellen machen jedoch allem Anschein nach eine Reihe weiterer Forschungen notwendig, bevor man diesbezüglich von einer Art Standardtherapiemöglichkeit wird ausgehen können.

Ein nochmals größeres Potential an etwaig medizinisch zu nutzendem Differenzierungsverhalten weisen nach Ansicht der Wissenschaft frühkindliche Stammzellen aus dem Nabelschnurblut auf.¹⁰¹ Sie scheinen darüber hinaus durch eine erhöhte Proliferationskapazität gekennzeichnet zu sein und eine entsprechend längere Lebensdauer zu besitzen.¹⁰² Es wäre daher durchaus überlegenswert, diese Zellart in zukünftigen, auf der vorliegenden Untersuchung aufbauenden Studien ebenfalls mit in das Versuchsdesign einzubinden.

Hinsichtlich der getroffenen Auswahl der hier zum Einsatz gebrachten methodischen Verfahren sowie biochemischen Markern ist zu erwähnen,

dass diese a priori aus einer kritischen Abwägung der aktuell labortechnisch zur Verfügung stehenden Optionen herrührte.

Was die Erfassung der metabolischen Aktivität der Zellen im eigentlichen Hauptversuch betraf, wurde einem ATP – Determination Kit der Vorzug gegeben.¹⁰³ Da, wie bereits ausgeführt, die Anwesenheit von Adenosintriphosphat einen Marker für " Leben " darstellt, bestand somit eine probate Möglichkeit von hoher Sensitivität, sowohl die Menge an Zellen in einer Population als auch ihr Proliferationsverhalten in einem Ansatz zu messen. Dadurch konnte auf getrennte Testverfahren verzichtet werden, die sonst üblicherweise in Form von Viability -, Cytotoxicity – oder Proliferation – Assays einzeln Anwendung finden.^{104,105}

Die im Rahmen der Vorversuche aufgetretenen Beobachtungen, dass - trotz keinerlei von den Knochenersatzmaterialien selbst ausgehenden Eigenlumineszenz - die Zellkulturen zusammen mit einer Trägermatrix im Verhältnis zu den Kontrollkulturen der gleichen Zellkonzentration allein mit Ausnahme des PepGen P -15® tendentiell leicht erhöhte Signalwerte aufwiesen, gaben keinen Anlass dazu, die Lumineszenzmessung als Prozedere an sich in Frage zu stellen. Obwohl dieses wahrscheinlich auf eine zum Teil zusätzliche Reflexion zurückzuführende Phänomen interpretativ zwar vom Grundsatz her nur im Sinne eines in Abzug zu bringenden " Hintergrundes " einzuordnen war, wurde hier dennoch insgesamt mit einiger Zurückhaltung eher eine relative als eine absolute Benennung der entsprechenden Zahlenwerte vorgenommen. Bei den zunächst vergleichsweise leicht erniedrigten Werten des PepGen P – 15® war davon auszugehen, dass es versuchstechnisch zu einer initialen Überdeckung der Zellen mit dem Biomaterial kam und daraus eine Abschwächung der Lumineszenzsignale resultierte.

Im Hinblick auf die Auswahl der weiteren Parameter wurde bewusst auf eine Erhebung der sogenannten Prokollagen – I – Propeptide (" Extensionspeptide "; PICP / PINP), welche von Osteoblasten während ihrer ersten Reifungsstufe exprimiert werden, verzichtet, da ihre Spezifität als Indikatoren einer Zelldifferenzierung und Knochenneubildung im

Gegensatz zur hier untersuchten Alkalischen Phosphatase (Osteoblasten der zweiten Reifungsstufe) und zum Osteocalcin (vollständig ausgereifte osteoblastäre Zellen) wissenschaftlich nach wie vor umstritten ist.¹⁰⁶

So wünschenswert und wichtig es erschien, die im erst recht fortgeschrittenen zeitlichen Verlauf stattfindende Synthese von Ocal zu beleuchten, so sehr muss an dieser Stelle noch einmal betont werden, wie unbefriedigend die Tatsache war und ist, dass aufgrund der dem zum Einsatz gebrachten ELISA – Kit innewohnenden, leider zu spät bemerkten FKS – Problematik, i. e. der Miterfassung des im Zellkulturmedium vorhandenen bovinen Osteocalcins und damit extrem erhöhten Messwerte, diesbezüglich wissenschaftlich begründete Aussagen unmöglich gemacht wurden. Als ausweichende Option böte sich mitunter eine serumfreie Anzucht der Zellen an, wobei es allerdings zu berücksichtigen gälte, dass ohne fötales Kälberserum keine Proliferation von Knochenmarkstammzellen erfolgt. Eine gegebenenfalls aus den gemachten Erfahrungen allgemein abzuleitende Relevanz für die objektive Interpretation und Bewertung von mittels ELISA – Methodiken erzielten Ocal – Werten vieler anderer Studien in der Retrospektive soll hier nur am Rande Erwähnung finden. Etwaige Schlussfolgerungen und modifizierte Betrachtungsweisen wären demnach entsprechend umfangreich angelegten und fundierten Vergleichsuntersuchungen in Verantwortung zu überlassen und gegebenenfalls im Anschluss daran einer kritischen Diskussion zuzuführen. Die in Ergänzung zum eigentlichen ATP – Hauptassay durchgeführten Teilversuche mit den NBS – Plates zur Abklärung einer materialtechnischen Zytotoxizität / Biokompatibilität einerseits und den nicht adhärenenten U-937 Zellen zur Einschätzung des zellbedingten Adhärenzverhaltens andererseits skizzierten letztendlich beide Seiten ein - und derselben Medaille, indem konsequent die Möglichkeit einer Zelladhärenz sowie das reine Zellwachstum auf den Biomaterialien selbst beurteilt wurden. Auch wenn sich dabei die Kultivierung der Zellkontrolle aufwendiger gestaltet und in vivo sicherlich dadurch bedingt, dass ein realer Knochendefekt eine weitaus komplexere biologische Struktur aufweist und beispielsweise das Einbringen eines

Knochenersatzmaterials in Anwesenheit des (zudem osteogene Faktoren beinhaltenden) Serums im Blutkoagulum stets mit einer Hydrierung einhergeht, etwas andere " Rahmenbedingungen " vorherrschen, wäre es hinsichtlich einer Einflussnahme durch die materialspezifischen Eigenschaften der entsprechenden Trägermatrizes auf (bio -) chemischer Ebene dennoch von Wichtigkeit, eben nur diejenigen Interaktionen quantitativ wie qualitativ zu bestimmen, welche auf einem unmittelbaren Kontakt der Zellen mit jenen beruhen. Dieser Gedanke sollte in der Prospektive dazu ermutigen, im Rahmen einer weiterführenden Studie einmal ausschließlich diese neuartigen Non Binding Surface – Plates durchgängig zum Einsatz kommen zu lassen.

Während die Ergebnisse von ohnehin obligaten, allerdings rein physikochemischen Analysen zwar zweifelsohne eine grundlegende Hilfestellung beim Verständnis bieten und stets als materialkundliche Basisinformationen zu berücksichtigen sind, könnte jedoch somit zukünftig ein darüber hinaus reichender Beitrag in der Form geleistet werden, anhand von eben auf den NBS – Plates erforschten Zellkulturen bereits in vitro vorweg besser Materialattribute herauszufiltern, die wohlmöglich als Zytotoxizitätspotential in Betracht kommen könnten, bevor gegebenenfalls in vivo entweder entsprechende Situationen (eventuell durch die komplexen, biologischen Mechanismen kaschiert) unbemerkt blieben oder sogar erst infolge eines nicht erwartungsgemäß eintretenden Behandlungserfolges nach ursächlichen Gründen gesucht würde.¹⁰⁷

Hinsichtlich der morphologischen Eigenschaften sind die Ausprägung der kristallinen Struktur und das Vorliegen eines der natürlichen Knochenspongiosa ähnlichen Trabekel – Hohlraum – Systems von großer Bedeutung für das osteokonduktive Potential einer Trägermatrix, wobei die Architektur innerhalb eines Zellträgers derart gestaltet sein sollte, dass in vitro ein guter Zu – und Abfluss des Kulturmediums sowie in vivo eine schnelle Vaskularisierung erfolgen kann.^{40,108}

Zur exakteren Beurteilung der aus den ATP – Assays gewonnenen Proliferationsaktivitäten der Zellkulturen auf den entsprechenden Matrizes

wurde der Versuch unternommen, den jeweiligen Messgrößen im Vergleich zu den als Referenz dienenden Zellkontrollen allein eine Stufe an biologischer Wertigkeit zuzuordnen.

Wie bereits ausführlich in der Einleitung dargestellt, erfolgt prinzipiell eine Graduierung im Sinne eines osteogenetischen, osteoinduktiven, osteostimulierenden, osteokonduktiven und rein osseointegrativen Mechanismus.²¹ Dabei sind in Bezug auf die hier getesteten Knochenersatzmaterialien, welche zum Teil der xenogenen und zum Teil der alloplastischen Untergruppe angehören, eine mögliche Osteogenese sowie eine echte Osteoinduktion per definitionem von vorneherein aus biologischer Sicht auszuschließen, während eine reine Osseointegration sozusagen das unterste Ende der Skala repräsentiert und einer eigentlich nur unzulänglichen und nicht befriedigenden Materialqualität entspräche. Hinsichtlich der Begriffsbestimmung war das Proliferationsverhalten der osteogenen Zellen primärer Gegenstand der Betrachtung innerhalb der ATP - Assays und also entsprechend mit dem Maß des Osteokonduktivitätspotentials zu belegen. Ein etwaiges weitergehendes Differenzierungsvermögen der Zellpopulationen wäre dagegen demnach unter zusätzlicher und besonderer Berücksichtigung der Ergebnisse der Histochemie der Alkalischen Phosphatase mit dem Terminus der Osteostimulation zu umschreiben.

Da die Zellkontrollen der Osteosarkomzellen, der primären Osteoblasten und der adulten Knochenmarkstammzellen jeweils in signifikanter Weise einen progredienten Anstieg der Lumineszenzen und somit des ATP - Gehaltes über die Zeit zeigten, konnte man davon ausgehen, dass die Ansätze kulturtechnischerseits einwandfrei gelungen waren und berechtigterweise als eine Art Referenzwert für das Ausmaß an proliferativer Aktivität fungierten.

Ausgewertet und dargestellt wurden grundsätzlich zum einen die Lumineszenzen der Zelllinienkulturen über die Zeit für jedes Knochenersatzmaterial im Einzelnen und zum anderen die Lumineszenzen der Zellkulturen auf den Knochenersatzmaterialien über die Zeit für jede

Zelllinie im Einzelnen. Zur besseren Vergleichsmöglichkeit der Knochenersatzmaterialien untereinander erfolgte daher innerhalb der pro Zelllinie erstellten Diagramme die Berechnung einer gemeinsamen Baseline, indem sämtliche Messwerte eines jeden KEM durch den entsprechenden individuellen Ausgangswert des KEM dividiert wurden und die y – Achse als Einheit den Proliferationsquotienten zugeordnet bekam.

Anhand der ermittelten Lumineszenzen war zu beobachten, dass sowohl Frios Algipore® als auch Ostim® eine Proliferation der im Zusammenhang mit den NBS – Platten – Teilversuchen verwendeten SAOS-2 Zellen sowie der als U-937 Zellen deklarierten myelo – monozytären Zellen offensichtlich nicht nur kaum gestatteten, sondern der ATP – Gehalt als Marker für metabolische Aktivität in den jeweiligen Zellkulturen am zweiten Messtag signifikant abfiel und schließlich gar gegen Null tendierte.

Das phytogene Hydroxylapatitpräparat Frios Algipore® weist hinsichtlich seiner morphologischen Eigenschaften nur ein mäßiges, das synthetische und ungesinterte Ostim® wegen seiner zugunsten einer verbesserten Resorptionsfähigkeit entwickelten sogenannten Nanotechnologie praktisch kein dreidimensionales Leitschienengefüge auf.¹⁰⁷ Demnach wäre eine integrative Besiedlung beider durch osteogene Zellen wahrscheinlich prinzipiell als beeinträchtigt anzusehen; ob dieses strukturelle " Handicap " allein jedoch zwangsläufig dazu führen muss, dass Zellen deshalb in vitro auf jenen nicht oder nur bedingt lebensfähig sind, ist allerdings zumindest in Zweifel zu ziehen. Somit lässt sich bis zu einer endgültigen Klärung der Thematik ein gewisses Maß an einer von diesen beiden Knochenersatzmaterialien ausgehenden, zusätzlichen Zytotoxizität trotz neutraler pH – Werte nicht gänzlich wegdiskutieren.

Ein weiterer, nicht unentscheidender Verdachtsmoment begründet sich in der Tatsache, dass bei Frios Algipore® und Ostim® insgesamt und unabhängig davon, auf welcher der drei osteogenen Zelllinien sie getestet wurden, auch in den proliferationsbezogenen ATP – Assays des Hauptversuches auf herkömmlichen, also eine Zelladhärenz zulassenden Well Platten im zeitlichen Verlauf kaum noch Lumineszenzsignale zu

erfassen waren. Vergleichbares galt für die mittels histochemischer Färbung vollzogene Beurteilung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase als ausgewiesenes Differenzierungsmerkmal, im Rahmen derer in beiden Fällen für die SAOS-2 Zellen und primären Osteoblasten nur an vereinzelt Zellen jeweils grenzwertig positive und bei den Knochenmarkstammzellen gar keine Nachweise erbracht werden konnten. Dies ist umso bemerkenswerter, da ja für sämtliche untersuchte Biomaterialien Zellkulturen der jeweils selben Zelllinien Verwendung fanden und hierdurch annähernd gleiche Voraussetzungen bzw. Ausgangsbedingungen für die Kulturansätze geschaffen wurden. Zuletzt zeigten auch die REM – Bilder der Osteosarkomzellkulturen – sofern überhaupt – nur Zellen von eher kugeligem Erscheinungsbild, die auf einen (relativ) schlechten Zustand schließen ließen, da sie praktisch kein Adhärenzverhalten offenbarten.

In der Konsequenz muss ein möglicher osteostimulierender Effekt seitens dieser beiden Knochenersatzmaterialien demnach komplett negiert werden. Trotz der in den Spätphasen nachweisbaren, minimalen Wachstumsaktivität der SAOS-2 Zellen und der KMS zumindest auf Frios Algipore® ist das hier offenbarte osteokonduktive Potential in der Gesamtbetrachtung dennoch als nur sehr mäßig und unterdurchschnittlich zu beschreiben; gesichert kann im Rahmen einer angemessenen kritischen Wertung der vorliegenden Studienergebnisse vielmehr sogar nur von einem tendentiell rein osseointegrativen Wirkungsmechanismus ausgegangen werden.

Somit ist zu konstatieren, dass die ansonsten durchaus optimistisch stimmenden, jedoch fast ausschließlich in vivo respektive tierexperimentell ermittelten Resultate von Frios Algipore® und Ostim® in der vorliegenden Untersuchung in vitro nicht bestätigt werden konnten.^{46,109-111}

Es soll jedoch an dieser Stelle und in diesem Kontext nicht unerwähnt bleiben, dass zumindest Frios Algipore® offensichtlich imstande war, in einer anderen, recht aktuellen in vitro – Untersuchung positivere Einschätzungen nach sich zu ziehen, dort allerdings unter der Verwendung eines alternativen Viability – Assays, welcher die metabolische Aktivität von Zellen anhand der Reduktion des Tetrazoliumsalzes WST – 1 zu Formazan mittels eines

ELISA – Readers bestimmt.⁶⁴ Bezüglich des Ostim® liegen derzeit überhaupt noch keine auf breiter Dokumentationsbasis evidenten Daten vor.¹¹²

Die drei übrigen Knochenersatzmaterialien Navigraft®, PepGen P - 15® und BioBase® offerierten prinzipiell durchweg gute Wirkungseinflüsse auf das Wachstumsverhalten der osteogenen Zellkulturen, die anhand der Osteosarkomzellkultur auch rasterelektronenmikroskopisch in der Form bestätigt werden konnten, als dass die Zellen aufgrund ihres doch deutlichen Adhärenzverhaltens jeweils von relativ flacher Gestalt waren und somit auf einen guten Zustand schließen ließen.

Der theoretische Hintergrund für die das PepGen P - 15® betreffende Technologie, ein bovines Hydroxylapatit (konkret : Osteograf®) mit einer Sequenz aus 15 Aminosäuren zu kombinieren, die in natura dem Abschnitt 766 bis 780 der alpha – Kette des sogenannten Typ I – Kollagens entspricht, besteht darin, eben diesen als Bindungsdomäne für Osteoprogenitorzellen (OPC) erforschten und bekannten Bereich des extrazellulären Proteins auf synthetischem Wege zu imitieren, um so den kompletten Regenerationsmechanismus zu beschleunigen.¹¹³

Die diesbezüglich in der vorliegenden Studie ermittelten Lumineszenzsignale brachten sowohl in der Spätphase bei den SAOS-2 Zellen als auch besonders auf den adulten Knochenmarkstammzellen ein recht hohes und signifikantes Proliferationsverhalten innerhalb der Kulturen zum Vorschein, welches nur etwas unter dem Referenzwert der Zellkontrollen allein rangierte. Allerdings konnten die zum einen aus der allgemeinen Theorie, zum anderen aus den gewonnenen Resultaten der ATP – Assays erwachsenden Erwartungen im Hinblick auf eine etwaig induzierte Zelldifferenzierung beim histochemischen Nachweis der Aktivität der Alkalischen Phosphatase (AP) gerade für die Knochenmarkstammzellen nicht adäquat untermauert werden.

Hinsichtlich des unstrittig vorhandenen guten Osteokonduktivitätspotentials von PepGen P - 15® in der verwendeten partikulär - porösen Version fanden somit die Beobachtungen manch anderer Untersuchungen zur positiven Einflussnahme auf die Proliferationsrate von osteoblastären Zellen zwar eine

eindeutige Bestätigung, zusätzliche Effekte im Sinne einer echten osteostimulierenden Tendenz waren aber hier – wenn überhaupt - nur in äußerst schwach ausgeprägter Form in vitro nachzuweisen.^{64,114} Dementsprechend ist der Frage nach einem prinzipiellen Vorteil von synthetischen Peptidzusätzen auf das Wirkvermögen von (bovinen) Knochenersatzmaterialien bis auf Weiteres eher mit einiger Zurückhaltung zu begegnen.

Das in der durchgeführten Untersuchung getestete alpha – Tricalciumphosphat – Präparat BioBase® offerierte innerhalb der ATP – Assays sowohl auf den Osteosarkomzellen als auch mit leichter Einschränkung auf den primären Osteoblasten ein Maß ein Lumineszenz, welches in seiner Signifikanz ungefähr dem der jeweiligen Zellkontrollen nahe kam. Allein auf den Kulturen der adulten Knochenmarkstammzellen fiel die Proliferationsaktivität im zeitlichen Verlauf geringer aus. Demnach liegt diesbezüglich die Schlussfolgerung nahe, dass seitens des BioBase® seine Funktion als Leitschienenstruktur umso besser ausgeübt werden kann, je stärker die beteiligten osteogenen Zellkulturen bereits differenziert sind. Nichtsdestotrotz ist auch hier das aus der in vitro - Situation abzuleitende Osteokonduktivitätspotential insgesamt als durchaus hoch einzustufen, eine Einschätzung, die von diversen anderen Studien in Übereinstimmung geteilt wird.^{115,116}

Hinsichtlich eines möglichen osteostimulierenden Effektes, welcher sich aus den positiven Resultaten des Nachweises der Alkalischen Phosphatase insbesondere auf den pluripotenten, noch undifferenzierten Knochenmarkstammzellen entlehnen ließe, ist darauf zu verweisen, dass Aussagen hier bewusst nur unter gewissem Vorbehalt zu tätigen sind, da nach Angaben des Institutes für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika der Universität Düsseldorf zum Teil bereits spontane Ausdifferenzierungstendenzen (wie auch hier geschehen) seitens der verwendeten MSC beobachtet werden konnten. De facto erscheint jedoch ein derartiges osteostimulierendes Potential eines alpha – Tricalciumphosphat – Präparates wie BioBase® nicht als gänzlich ausgeschlossen.¹¹⁷

Auf vergleichbar hohem, eventuell nochmals geringfügig gesteigertem Niveau bewegten sich die Ergebnisse der Proliferations – und Differenzierungsraten für das abschließend zu nennende Knochenersatzmaterial Navigraft®. Als xenogenes Hydroxylapatit bovinen Ursprungs, bei dem partiell die mineralisierte Kollagenmatrix bewahrt wurde, wies es im Rahmen der ATP – Lumineszenz – Messungen auf sämtlichen drei osteogenen Kulturen im zeitlichen Verlauf eine signifikante Progredienz an metabolischer Zellaktivität auf, die im Großen und Ganzen derjenigen der als Referenz dienenden Zellkontrollen entsprach, auf den SAOS-2 Zellen und primären Osteoblasten diese sogar ein wenig überragte. Nicht zuletzt aufgrund der die Morphologie betreffenden, nachgewiesenermaßen ausgeprägten Ähnlichkeit mit der menschlichen Knochenstruktur gestattete Navigraft® in vitro also durchweg hohe Zellproliferationsraten, die im Sinne eines sehr guten Osteokonduktivitätspotential dieser Matrix zu interpretieren sind. Warum allerdings auf den NBS – Platten keine Adhärenztendenz der Osteosarkomzellen festzustellen war, konnte nicht eruiert werden und bleibt somit bis auf Weiteres unbeantwortet.

Wiederum unter Berücksichtigung und Einbeziehung des beobachteten Phänomens, dass sich pluripotente Knochenmarkstammzellen bisweilen spontan zu osteoblastären Zellen differenzieren, zeugt jedoch der auf jeder Zelllinie stets stark positiv gelungene histochemische Nachweis der Aktivität der Alkalischen Phosphatase von einem offensichtlich realiter vorhandenen, gewissen Maß an osteostimulierender Wirkung des Navigraft®.

Da in den vergangenen Jahren zunehmend eine Fokussierung auf die Erforschung und Bewertung alternativer, rein synthetischer Biomaterialien zum rekonstruktiv – regenerativen Knochenersatz stattfand, datieren adäquate detaillierte Vergleichsstudien, die sämtlich mit den hier gemachten Erfahrungen in etwa überein kommen, diesbezüglich primär aus den späten Neunziger Jahren des letzten Jahrhunderts.¹¹⁸⁻¹²⁰

Gerade im Hinblick auf die eingangs angesprochenen zukünftigen Einsatzbereiche im Rahmen des erweiterten Tissue Engineering, welches zunehmend eine Kombination aus Knochenersatzmaterial mit

(rekombinanten) osteogenen Faktoren avisiert, sind also dementsprechend nicht zuletzt aufgrund der Summe ihrer an dieser Stelle gezeigten Eigenschaften zunächst im Besonderen das Navigraft®, das BioBase® und mit leichter Einschränkung ebenso das PepGen P - 15® als geeignete " Füllstoffe mit Leitschienenfunktion " respektive als potentielle Trägermatrizes zu empfehlen.¹²¹

Unter streng forensischem Gesichtspunkt bedarf es allerdings hinsichtlich der den bovinen Bestandteilen innewohnenden, quasi intrinsischen Problematik seitens des Navigraft® und des PepGen P - 15® nach wie vor des Hinweises darauf, dass, obgleich umfangreiche Anstrengungen zur Inaktivierung etwaiger Prionen (BSE / Creutzfeld – Jakob - Erkrankung) unternommen werden, ein zwar minimales, aber prinzipielles Restrisiko einer Infektion per se nicht komplett zu negieren ist.⁴²

Im Sinne eines abschließenden Resümés bleibt demnach festzuhalten, dass einmal mehr – sozusagen aller gewonnenen Erkenntnisse zum Trotz - auf eindrucksvolle Art und Weise die Notwendigkeit und Sinnhaftigkeit von voraussichtlich zahlreichen weiteren Untersuchungen unterstrichen und verdeutlicht werden konnte, im Rahmen derer noch diverse Aspekte bezüglich der Interaktionen von osteoblastären Zellen mit Knochenersatzmaterialien zu eruieren sind, um sich sukzessive und mit Bedacht einer fundierten und wirklich evidenzbasierten Therapie knöcherner Defekte in der (Zahn -) medizin erfolgreich zu nähern.

5 **Literatur**

1. Stern, K. S., Malhotra, R. : Epithelization. In : Cohen, I. K., Degelmann, R., Lundblad, W. J. (Eds.) : Wound healing : biochemical and clinical aspects. Saunders, Philadelphia (1992)
2. Thiede, A., Debus, E. S. : Wundheilung. In : Berchtold, R., Hamelmann, H., Peiper, H. – J., Bruch, H. P., Trentz, O. (Hrsg.) : Chirurgie. Urban & Fischer, München – Jena (2001)
3. Clark, R. A F. : The molecular and cellular biology of wound repair. Plenum Press, New York (1996)
4. Grimm, G. : Wundlehre. In : Schwenzer, N., Grimm, G. (Hrsg.) : Zahn – Mund – Kiefer – Heilkunde, Band 1, Georg Thieme Verlag Stuttgart – New York (1988)
5. Martin, P. : Woundhealing – aiming for perfect skin regeneration. Science 276, 75 (1997)
6. Anderson, H. C. : Mechanism of mineral formation in bone. Lab Invest 60, 320 – 330 (1989)
7. Wikesjo, U. M., Selvig, K. A. : Periodontal wound healing and regeneration. Periodontol 2000 19, 21 (1999)
8. Brekke, E., Toth, J. M. : Principles of Tissue Engineering applied to programmable osteogenesis. J Biomed Mat Res : Applied Biomaterials, 43 (4), 380 – 398 (1998)
9. Brown, K. L., Cruess, R. L. : Bone and cartilage transplantation in

- orthopaedic surgery : A review. J Bone Joint Surg 64 A, 270 – 279
(1982)
10. Damien, C. J., Parsons, J. R. : Bone graft and bone substitutes: A review of current technology and applications. J Appl Biomater 2, 187 – 208
(1991)
 11. Habal, M. B., Reddi, A. H. : Different forms of bone grafts. In : Habal, M. B., Reddi, A. H., (Eds.) : Bone grafts and bone substitutes. Saunders, Philadelphia (1992)
 12. Vogelín, E., Jones, N. F., Huang, J. I., Brekke, J. H., Toth, J. M. : Practical illustrations in Tissue Engineering : Surgical considerations relevant to the implantation of osteoinductive devices. Tissue Engineering 6 (4), 441 – 460 (2000)
 13. Deutsch, E., Lippert, H. – D., Ratzel, R. : Medizinproduktegesetz (MPG), Carl Heymann, Köln – Berlin – Bonn – München (2002)
 14. Bock, T., Schlegel, K. A., Schultze – Mosgau, S., Wiltfang, J., Neukam, F. W. : Forensische Fragen bei der Verwendung von Knochenersatzmaterialien. DZZ Supplement zur Jahrestagung der AG Kieferchirurgie (2000)
 15. Lüthkehermölle, W. : Biomaterialien für die Knochenregeneration. In : Wintermantel, E., Ha, S. W. : Medizintechnik mit biokompatiblen Werkstoffen und Verfahren. Springer, Berlin – Heidelberg – New York (2002)
 16. Acil, Y., Schilde, K., Terheyden, T., Jepsen, S. : Biokompatibilität von sechs verschiedenen Knochenersatzmaterialien in der Osteoblastenzellkultur. Osteologic 8, 89 – 90 (1999)

17. Reynolds, M. A., Bowers, G. M. : Fate of demineralized freeze – dried bone allografts in human intrabony defects. J Periodontol 67, 150 (1996)
18. Ganeles, J., Listgarten, M. A., Evian, C. I. : Ultrastructure of durapatite – periodontal tissue interface in human intrabony defects. J Periodontol 57, 133 (1986)
19. Gauthier, O., Bouler, J. M., Aguado, E., Pilet, P., Daculsi, G. : Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics : influence of macropore diameter and macroporosity percentage on bone ingrowth. Biomaterials 19, 133 (1998)
20. Nasr, H. F., Aichelmann – Reidy, M. E., Yukna, R. A. : Bone and bone substitutes. Periodontol 2000 19, 74 (1999)
21. Albrektsson, T., Johansson, C. : Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. Eur Spine J 10, 96 – 101 (2001)
22. Glowacki, J., Kaban, L. B., Murray, J. E., Folkman, J., Mulliken, J. B. : Application of the biological principle of induced osteogenesis for craniofacial defects. Lancet 1, 956 – 962 (1981)
23. Neukam, F. W., Buser, D. : Implantate bei unzureichendem Knochenangebot. In : Koeck, B., Wagner, W. (Hrsg.) : Implantologie (PdZ – Studienausgabe). Urban & Fischer, München – Stuttgart – Jena - Lübeck – Ulm (1999)
24. von Arx, T., Cochran, D. L., Hermann, J. S., Schenk, R. K., Buser, D. : Lateral ridge augmentation using different bone fillers and barrier membrane application. A histologic and histomorphometric pilot study in the canine mandible. Clin Oral Impl Res 12, 260 (2001)

25. Cochran, D. L., Wozney, J. M. : Biological mediators for periodontal regeneration. *Periodontol 2000* 19, 40 – 58 (1999)

26. Jepsen, S., Terheyden, H. : Growth Factors and Morphogenetic Proteins in periodontal regeneration. *J Parodontologie D ´ Implantologie Orale* 20 (3), 289 – 314 (2000)

27. Woodley, D. T., Bachmann, P. M., Okeefe, E. J. : The role of matrix components in human keratinocyte re – epithelization. In : Barbul, A., Caldwell, M. D., Eaglestein, W. H. (Eds.) : Clinical and experimental approaches to dermal and epidermal repair. Normal and chronic wounds. Wiley, New York (1991)

28. Yaszemski, M. J., Payne, R. G., Hayes, W. C., Langer, R., Mikos, A. C. : Evolution of bone transplantation : molecular, cellular and tissue strategies to engineer human bone. *J Biomed Mater Res* 17, 175 – 185 (1996)

29. Erpenstein, H., Diedrich, P., Borchard, R. : Preparation of autogenous bone grafts in two different bone mills. *Int J Periodontics Restorative Dent* 21, 609 (2001)

30. Schliephake, H.: Entnahmetechniken autogener Knochentransplantate. Teil I : Spenderareale im Kopf – Hals – Bereich. *Implantologie* 2, 317 (1994)

31. Chiriac, G., Hertel, M., Rothamel, D., Becker, J. : Einsatz eines Knochenfilters zur Gewinnung autologer Knochentransplantate. *Oralchirurgie Journal* 2, 31 – 35 (2004)

32. Pallesen, L., Schou, S., Aaboe, M., Horting – Hansen, E., Nattestad, A., Melsen, F. : Influence of particle size of autogenous bone grafts on the

- early stages of bone regeneration : A histologic and stereologic study in rabbit clavarium. *Int J Oral Maxillofac Implants* 17, 498 (2002)
33. Friedlander, G. : Current concepts review bone banking. *J Bone Joint Surg* 63, 307 – 311 (1982)
 34. Zhang, M., Powers, R. M., Jr., Wolfinbarger, L., Jr. : Effect(s) of the demineralization process on the osteoinductivity of demineralized bone matrix. *J Periodontol* 68, 1085 (1997)
 35. Schwartz, Z., Somers, A., Mellonig, J. T., Carnes, D., Jr., Dean, D., Cochran, D. L., Boyan, B. : Ability of commercial demineralized freeze - dried bone allograft to induce new bone formation is depending on donor age but not gender. *J Periodontol* 69, 470 (1998)
 36. Buck, B. E., Malinin, T. I. : Human bone and tissue allografts. Preparation and safety. *Clin Orthop*, 8 (1994)
 37. Mellonig, J. T., Prewett, A. B., Moyer, M. P. : HIV inactivation in a bone allograft. *J Periodontol* 63, 979 (1992)
 38. Hammerle, C. H., Chiantella, G. C., Karring, T., Lang, N. P. : The effect of a deproteinized bovine bone mineral on bone regeneration around titanium dental implants. *Clin Oral Implants Res* 9, 151 (1998)
 39. Artzi, Z.: Coronal ridge augmentation in the absence of bilateral bony plates around a pathologically denuded implant surface. *Int J Periodontics Restorative Dent* 20, 191 (2000)
 40. Jensen, S. S., Aaboe, M., Pinholt, E. M., Hjørtting – Hansen, E., Melsen, F., Ruyter, I. E. : Tissue reaction and material characteristics of four bone substitutes. *Int J Oral Maxillofac Implants* 11, 55 (1996)

41. Berglundh, T., Lindhe, J.: Healing around implants placed in bone defects treated with Bio – Oss. An experimental study in the dog. Clin Oral Implants Res 8, 117 (1997)

42. Wenz, B. P. M. : Sicherheit natürlicher Knochenersatzmaterialien. Parodontologie 12, 289 (2001)

43. Sogal, A., Tofe, A. J. : Risk assessment of bovine spongiform encephalopathy transmission through bone graft material derived from bovine bone used for dental applications. J Periodontol 70, 1053 (1999)

44. Osborn, J. F.: Extension alveoloplasty (II). New surgical procedures for the treatment of alveolar collapse and residual alveolar ridge atrophy. Die Alveolar – Extensions – Plastik (II). Neue Operationsverfahren zur Behandlung des alveolaren Kollapses und der gradartigen Alveolarfortsatzatrophie. Quintessenz 36, 239 (1985)

45. Ogilvie, A., Frank, R. M., Benque, E. P., Gineste, M., Heughebaert, M., Hemmerle, J. : The biocompatibility of hydroxyapatite implanted in the human periodontium. J Periodontol Res 22, 270 (1987)

46. Ouhayoun, J. P., Shabana, A. : Histological evaluation of natural coral skeleton as a grafting material in miniature swine mandible. J Mater Medicine 3, 222 (1992)

47. Xynos, I. D., Edgar, A. J., Buttery, L. D., Hench, L. L., Polak, J. M. : Ionic products of bioactive glass dissolution increase proliferation of human osteoblasts and induce insulin – like growth factors II mRNA expression and protein synthesis. Biochem Biophys Res Commun 276 (2), 461 – 465 (2000)

48. Leonor, J. B., Ito, A., Onuma, K., Kanzaki, N., Zhong, Z. P.,

- Greenspan, D. : In situ study of partially crystallized Bioglass and hydroxylapatite in vitro bioactivity using atomic force microscopy. J Biomed Mater Res 62, 82 – 88 (2002)
49. Xynos, I. D., Hukkanen, M. V., Batten, J. J., Buttery, L. D., Hench, L.L., Polak, J. M. : Bioglass 45S5 stimulates osteoblast turnover and enhances bone formation in vitro : implications and applications for bone tissue engineering. Calcif Tissue Int 67 (4), 321 – 329 (2000)
50. Nevins, M. L., Camelo, M., Nevins, M., King, C. J., Oringer, R. J., Schenk, R. K., Fiorellini, J. P. : Human histologic evaluation of bioactive ceramic in the treatment of periodontal osseous defects. Int J Periodontics Restorative Dent 20, 458 (2000)
51. Trisi, P., Walter, R., Rebaudi, A., Flore, P.: Histologic effect of purephase beta tri – calcium – phosphate on bone regeneration in human artificial jawbone defects. Int J Periodontics Restorative 23 (1), 69 - 77 (2003)
52. Wiltfang, J., Merten, H. A., Schlegel, K. A., Schultze – Mosgau, S., Kloss, F. R., Rupprecht, S., Kessler, P. : Degradation characteristics of alpha and beta tri – calcium - phosphate (TCP) in minipigs. J Biomed Mater Res 63, 115 (2002)
53. Stahl, S. S., Froum, S. J., Tarnow, D. : Human clinical and histologic responses to the placement of HTR polymer particles in 11 intrabony lesions. J Periodontol 61, 269 (1990)
54. Amling, M., Delling, G. : Zellbiologie des Osteoklasten und molekulare Mechanismen der Knochenresorption. Pathologie Band 17, 358 – 367 (1996)

55. Linhart, W., Lehmann, W., Sommerfeldt, D. W., Schwarz, K., Peters, F., Epple, M., Amling, M., Rueger, J. M. : Untersuchungen zur osteoblastenspezifischen Biokompatibilitätsprüfung unterschiedlicher Knochenersatzmaterialien. Osteologie Band 9, Supplement 1, 4 (2000)

56. Kim, C. K., Chai, J. K., Cho, K. S., Choi, S. H. : Effect of calcium sulphate on the healing of periodontal intrabony defects. Int Dent J 48, 330 (1998)

57. Shaffer, C. D., App, G. R. : The use of plaster of paris in treating intrabony periodontal defects in humans. J Periodontol 42, 685 (1971)

58. Schlegel, K. A., Kloss, F. R., Schultze – Mosgau, S., Neukam, F. W., Wiltfang, J. : Tierexperimentelle Untersuchung zum Einfluss verschiedener Thrombozytenkonzentrate auf die Defektregeneration mit autogenem Knochen und Kombination von autogenem Knochen und Knochenersatzmaterialien (Biogran[®] und Algipore[®]). Mikroradiographische Ergebnisbewertung. Mund Kiefer Gesichts Chir 7 (2), 112 – 118 (2003)

59. Lynch, S. E., Buser, D., Hernandez, R. A., Weber, H. P., Stich, H., Fox, C. H., Williams, R. C. : Effects of the platelet – derived growth factor / insulin – like growth factor – I combination on bone regeneration around titanium dental implants. Results of a pilot study in beagle dogs. J Periodontol 62, 710 – 716 (1991)

60. Ripamonti, U., Heliotis, M., van den Heever, B., Reddi, A. H. : Bone morphogenetic proteins induce periodontal regeneration in the baboon (Papio ursinus). J Periodont Res 68, 761 – 767 (1994)

61. Jepsen, S., Terheyden, H., Vogler, S., Tucker, M., Rueger, D. : Mandibular augmentation by recombinant human osteogenic

- protein – 1. J Clin Periodontol 24, 870 (1997)
62. Terheyden, H., Jepsen, S., Vogler, S., Tucker, M., Rueger, D. C. : Recombinant human osteogenic protein – 1 (rhBMP – 7) in the rat mandibular augmentation model : differences in bone morphology are dependent on the type of carrier. Mund Kiefer Gesichts Chir 1, 272 – 275 (1997)
63. Terheyden, H., Oehlert, C., Jepsen, S. : The time course of bone induction by human osteogenic protein – 1 using different delivery systems. J Clin Periodontol 27 (Supplement 1), 67 (2000)
64. Kubler, A., Neugebauer, J., Oh, J. H., Scheer, M., Zoller, J. E. : Growth and proliferation of human osteoblasts on different bone graft substitutes : an in vitro study. Impl Dent 13 (2), 171 – 179 (2004)
65. Kögler, G., Sensken, S., Airey, J. A., Trapp, T., Müschen, M., Feldhahn, N., Liedtke, S., Sorg, R. V., Fischer, J., Rosenbaum, C., Greschat, S., Knipper, A., Bender, J., Degistirici, O., Gao, J., Caplan, I., Colletti, J., Almeida – Porada, G., Muller, H. W., Zanjani, E., Wernet, P. : A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. J Exp Med 200 (2), 123 – 135 (2004)
66. Gundberg, C. M. : Biochemical markers of bone formation. Clin Lab Med 20, 489 – 501 (2001)
67. Caillot – Augusseau, A., Lafage – Proust, M. H., Soler, C., Dubois, F., Alexandre, C. : Bone formation and resorption biological markers in cosmonauts during and after a 180 – day spaceflight (Euromir 95). Clin Chem 44, 578 – 585 (1998)

68. Delmas, P. D. : Bone gla – protein (Osteocalcin) : A spezific marker for the study of metabolic bone disease. In : Cecchetti, M., Segre, G. (Eds.) : Calcitropic hormones and calcium metabolism. International Congress Series 679, Excerpta Medica Amsterdam, 19 – 28 (1996)
69. Garnero, P., Delmas, P. D. : Bone markers. Baillieres Clin Rheumatol 11, 517 – 537 (1997)
70. Vergnaud, P., Garnero, P., Meunier, P. J., Breart, G., Kamihagi, K., Delmas, P. D. : Undercarboxylated osteocalcin measured with a specific immunoassay predicts hip fracture in elderly women : The EPIDOS Study. J Clin Endocrinol Metab 82, 719 – 724 (1997)
71. Hauschka, P. V. : Osteocalcin : The vitamin K – dependent Ca^{2+} - binding protein of bone matrix. Haemostasis 16, 258 – 271 (1986)
72. Cormier, C. : Markers of bone metabolism. Curr Opin Rheumatol 7, 243 – 248 (1995)
73. Sternberger, L. A. : In : Immunocytochemistry. Wiley, New York (1979)
74. Markl, J., Campbell, N. A., Reece, J. B. : Biologie. 6. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg – Berlin – Oxford (2003)
75. Schmidt, R. F., Lang, F., Thews, G. : Physiologie des Menschen. 29. Auflage, Springer Verlag, Berlin – Heidelberg – New York (2004)
76. Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L. : Biochemie. 5. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg – Berlin – Oxford (2003)

77. Bergmeyer, H. – U.: Methoden der enzymatischen Analyse. Verlag Chemie GmbH, Weinheim / Bergstraße (1962)
78. Wesierska – Gadek, J., Wojciechowski, J. : Celltiter - Glo® Assay : Application for assessing direct cytotoxicity and for determining cell proliferation. Cell Notes Issue 6, 13 - 15 (2003)
79. Low, M. G, Saltiel, A. R. : Structural and functional roles of glycosylphosphatidylinositol in membranes. Science 239, 268 – 275 (1988)
80. Eyre, D. R. : Biochemical markers of bone turnover. In : Favus, M. J. et al. (Eds.) : Primer on the metabolic diseases and disorders of mineral metabolism. Lippincott – Raven, Philadelphia, 114 – 119 (1996)
81. Whyte, M. P. : Hypophosphatasia and the role of alkaline phosphatase in skeletal mineralization. Endocr Rev 15, 439 – 461 (1994)
82. Wlodarski, K. H., Reddi, A. H. : Alkaline phosphatase as a marker of osteoinductive cells. Calcif Tissue Int 39, 382 – 385 (1986)
83. Ljunghall, S., Lindh, E. : Assessment of bone turnover with biochemical markers. J Int Med 225, 219 – 220 (1989)
84. Piattelli, A., Scarano, A., Corigliano, M., Piattelli, M. : Effects of alkaline phosphatase on bone healing around plasma – sprayed titanium implants. A pilot study in rabbits. Biomaterials 17, 1443 – 1449 (1996)
85. Bessho, K., Tagawa, T., Murata, M. : Analysis of Bone Morphogenetic Protein (BMP) derived from human and bovine matrix.

Clin Orthop 268, 226 – 234 (1991)

86. Yazdi, M., Bernick, S., Paule, W. J., Nimni, M. E. : Postmortem degradation of demineralized bone matrix osteoinductive potential. Clin Orthop 262, 281 – 285 (1991)
87. Kasten, P., Luginbühl, R., Vogel, J., Niemeyer, P., Weiss, S., van Griensven, M., Krettek, C., Bohner, M., Bosch, U., Tonak, M. : Induktion von Knochengewebe auf unterschiedlichen Matrices : Eine In - vitro - und In - vivo - Pilotstudie in der SCID Maus. Z Orthop Ihre Grenzgeb, 467 – 475 (2004)
88. Pfeilschifter, J. : Bone metabolism and the parameters of its activity. Internist 31, 727 – 736 (1990)
89. Young, D. S. (Ed.) : Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests. 3rd ed., AACC Press, Washington / DC (1990)
90. Wollenberger, U., Renneberg, R., Bier, F. F., Scheller, F. W. : Analytische Biochemie. Wiley – VCH Verlag, Weinheim – Berlin – New York (2003)
91. Flegler, S. L. , Heckman, J. W. , Klomparens, K. L. : Elektronenmikroskopie : Grundlagen, Methoden, Anwendungen. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg – Berlin – Oxford (1995)
92. Nolan, P. C., Nicholas, R. M., Mulholland, B. J., Mollan, R. A. Wilson, D. J. : Culture of human osteoblasts on demineralised human bone : Possible means of graft enhancement. J Bone Joint Surg 74, 284 – 286 (1992)
93. Norio, K., Shigeo, N., Motoki, S., Yoshiro, S., Ichiro, I. : Bone formation

- by cells from femur cultured among threedimensionally arranged hydroxyapatite granules. *J Biomed Mater Res* 37 (1), 1 – 8 (1997)
94. Fricain, J. C., Bareille, R., Ulysse, F., Dupuy, B., Amedee, J. : Evaluation of proliferation and protein expression of human bone marrow cells cultured on coral crystallized in the aragonite or calcite form. *J Biomed Mater Res* 42 (1), 96 – 102 (1998)
95. Knabe, C., Driessens, F. C. M., Planell, J. A., Gildenhaar, R., Berger, G., Reif, D., Fitzner, R., Radlanski, R. J., Gross, U. : Evaluation of calcium Phosphates and experimental calcium phosphate bone cements using osteogenic cultures. *J Biomed Mater Res* 52, 498 – 508 (2000)
96. Aybar, B., Bilir, A., Akcakaya, H., Ceyhan, T. : Effects of tricalcium phosphate bone graft materials on primary cultures of osteoblast cells in vitro. *Clin Oral Implants Res* 15 (1), 119 – 125 (2004)
97. Caplan, A. I. : Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 9, 641 – 650 (1991)
98. Gretchen, V. : Can old cells learn new tricks. *Science* 287, 1418 – 1419 (2000)
99. Krause, D. S., Theise, N. D., Collector, M. I., Henegariu, O., Hwang, S., Gardner, R., Neutzel, S., Sharkis, S. : Multi – organ, multi – lineage engraftment by a single bone marrow – derived stem cell. *Cell* 105, 369 – 377 (2001)
100. Jäger, M., Wild, A., Krauspe, R. : Pluripotente mesenchymale

Stammzellen und Osteogenese (II) : Biomaterialien und klinische Anwendung. Osteologie 11 (2), 78 – 87 (2002)

101. Migliaccio, G., Migliaccio, A. R., Petti, S., Mavilio, F., Russo, G., Lazarro, D., Testa, U., Marinucci, M., Peschle, C. : Human embryonic hemopoiesis. Kinetics of progenitors and precursors underlying the yolk sac – liver – transition. J Clin Inv 78, 51 – 60 (1986)
102. Vaziri, H, Dragowska, W., Allsopp, R. C., Thomas, T. E., Harley, C. B., Lansdorp, P. M. : Evidence for a mitotic clock in human hemopoietic stem cells : loss of telometric DNA with age. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 91, 9857 – 9860 (1994)
103. Riss, T., O'Brien, M., Moravec, R. : Choosing the right cell – based assay for your research. Cell Notes 6, 6 – 12 (2003)
104. Hannah, R., Beck, M., Moravec, R., Riss, T. : CellTiter Glo™ Luminescent Cell Viability Assay : A sensitive and rapid method for determining viability. Cell Notes 2, 11 – 13 (2001)
105. Arduengo, M. : CellTiter Glo™ Luminescent Cell Viability Assay for cytotoxicity and cell proliferation studies. Cell Notes 5, 15 – 17 (2003)
106. Kasperk, C., Ziegler, R. : Knochenstoffwechsel. In : Thomas, L. (Hrsg.) : Labor und Diagnose. 5. Auflage, Th – Books (2003)
107. Tadic, D., Epple, M. : A thorough physicochemical characterisation of 14 calcium phosphate – based bone substitution materials in comparison to natural bone. Biomaterials 25, 987 – 994 (2004)
108. Anselme, K. : Osteoblast adhesion on biomaterials. Biomaterials 21, 667 – 681 (2000)

109. Schopper, C., Moser, D., Sabbas, A., Spassova, E., Goriwoda, W., Lagogiannis, G., Yerit, K., Watzinger, F., König, F., Donath, K., Ewers, R. : The Fluorohydroxyapatite (FHA) Frios Algipore® is a suitable biomaterial for the reconstruction of severely atrophic human maxillae. In review – Clinical Oral Implants Research 2003
110. Zuev, V., Dmitrieva, L., Pankratov, A., Filatova, N. : The comparative characteristics of stimulators of reparative osteogenesis in the treatment of periodontal diseases. Stomatologia (Mosk.) 75 (5), 31- 34 (2003)
111. Thorwarth, W. M., Schlegel, K. A., Srouf, S., Schultze – Mosgau, S., Wiltfang, J. : Untersuchung zur knöchernen Regeneration ossärer Defekte unter Anwendung eines nanopartikulären Hydroxylapatits (Ostim®). Implantologie 1, 21 – 32 (2004)
112. Wenz, B., Koch, J. : Natürliches Knochenmaterial ist umfassend dokumentiert. Medline – Recherche zu Knochenersatzmaterialien. Dent Implantol 8 (1), 6 – 12 (2004)
113. Valentin, A. H., Weber, J. : Receptor technology – cell binding to P – 15 : a new method of regenerating bone quickly and safely – preliminary histomorphometrical and mechanical results in sinus floor augmentations. Keio J Med 53 (3), 166 – 171 (2004)
114. Trasatti, C., Spears, R., Gutmann, J. L., Opperman, L. A. : Increased Tgf – beta 1 production by rat osteoblasts in the presence of PepGen P – 15 in vitro. J Endod 30 (4), 213 – 217 (2004)
115. Mayr – Wohlfahrt, U., Fiedler, J., Gunther, K. P., Puhl, W., Kessler, S. : Proliferation and differentiation rates of a human osteoblast – like cell line (SAOS-2) in contact with different bone substitute materials. J Biomed Mater Res 57 (1), 132 – 139 (2001)

116. Niemeyer, P., Krause, U., Fellenberg, J., Kasten, P., Seckinger, A., Ho, A. D., Simank, H. – G. : Evaluation of mineralized collagen and alpha – tricalciumphosphate as scaffolds for tissue engineering of bone using human mesenchymal stem cells. *Cells Tissues Organs* 177, 68 – 78 (2004)
117. Spitzer, R. – S., Perka, C., Lindenhayn, K., Zippel, H. : Matrix engineering for osteogenic differentiation of rabbit periosteal cells using alpha – tricalcium phosphate particles in a three – dimensional fibrin culture. *J Biomed Mater Res* 59 (4), 690 – 696 (2001)
118. Torricelli, P., Fini, M., Rocca, M., Giavaresi, G., Giardino, R. : Xenogenic demineralized bone matrix : osteoinduction and influence of associated skeletal defects in heterotopic bone formation in rats. *Int Orthop* 23 (3), 178 –181 (1999)
119. Baslé, M. F., Grizon, F., Pascaretti, C., Lesourd, M., Chappard, D. : Shape and orientation of osteoblast – like cells (SAOS-2) are influenced by collagen fibers in xenogenic bone biomaterial. *J Biomed Mater Res* 40 (3), 350 –357 (1998)
120. Matsumoto, T., Kawakami, M., Kuribayashi, K., Takenaka, T., Minamide, A., Tamaki, T. : Effects of sintered bovine bone on cell proliferation, collagen synthesis and osteoblastic expression in MC3T3 – E1 osteoblast – like cells. *J Orthop Res* 17 (4), 586 –592 (1999)
121. Damien, C. J., Parsons, J. R. : Bone graft and bone graft substitutes : A review of current technology and applications. *Journal of Applied Biomaterials* 2 (3), 187 – 208 (2004)

6 Tabellen und Abbildungen

Tabelle 1 :	
Mengenangaben der verwendeten Knochenersatzmaterialien	29
Tabelle 2 :	
Verdünnungsreihe der Standardlösung	33
Tabelle 3 :	
AP – Färbung der Zelllinien mit den Knochenersatzmaterialien	54 / 55
Tabelle 4 :	
pH – Werte; Tag 1 und Tag 8	63
Abbildung 1 :	
Schema der Reaktionsgleichung des Luciferin – Luciferase – Systems	28
Abbildung 2 :	
96 Well –Platte mit Ansätzen	28
Abbildung 3 :	
Immunhistochemische Färbung Ocal, prim. Osteoblasten, Tag 3; Negativkontrolle unten rechts	36
Abbildung 4 :	
ATP – Standardkurve der SAOS-2 Zellen	37
Abbildung 5 :	
Eigenlumineszenz der Knochenersatzmaterialien	38
Abbildung 6 :	
Verkürzte ATP – " Standardreihe " mit Navigraft auf SAOS-2 Zellen	39

Abbildung 7 :	
Verkürzte ATP – " Standardreihe " mit PepGen P – 15 auf SAOS-2 Zellen .	39
Abbildung 8 :	
Verkürzte ATP – " Standardreihe " mit Frios auf SAOS-2 Zellen	40
Abbildung 9 :	
Verkürzte ATP – " Standardreihe " mit BioBase auf SAOS-2 Zellen	40
Abbildung 10 :	
Verkürzte ATP – " Standardreihe " mit Ostim auf SAOS-2 Zellen	41
Abbildung 11 :	
ATP – Messung mit den Zellkontrollen der Zelllinien	43
Abbildung 12 :	
ATP – Messung mit Navigraft®	44
Abbildung 13 :	
ATP – Messung mit PepGen P – 15®	45
Abbildung 14 :	
ATP – Messung mit Frios Algipore®	46
Abbildung 15 :	
ATP – Messung mit BioBase®	47
Abbildung 16 :	
ATP – Messung mit Ostim®	48
Abbildung 17 :	
ATP – Messung mit SAOS-2 Zellen auf Knochenersatzmaterialien	49
Abbildung 18 :	
ATP – Messung mit prim. Osteoblasten auf Knochenersatzmaterialien	50

Abbildung 19 :	
ATP – Messung mit KMS auf Knochenersatzmaterialien	51
Abbildung 20 :	
Nichtadhärente U-937 Zellen auf den Knochenersatzmaterialien	52
Abbildung 21 :	
SAOS-2 Zellen mit Knochenersatzmaterialien auf NSB – Platten	53
Abbildung 22 :	
Histochemische Färbung AP, Zellkontrolle SAOS-2 Zellen, Tag 10; Negativkontrolle unten rechts	56
Abbildung 23 :	
Histochemische Färbung AP, Zellkontrolle prim. Osteoblasten, Tag 10; Negativkontrolle unten rechts	56
Abbildung 24 :	
Histochemische Färbung AP, Zellkontrolle KMS, Tag 10; Negativkontrolle unten rechts	57
Abbildung 25 :	
Histochemische Färbung AP, SAOS-2 Zellen auf BioBase®, Tag 10 (exemplarisch)	57
Abbildung 26 :	
Histochemische Färbung AP, KMS auf Navigraft®, Tag 10 (exemplarisch)	58
Abbildung 27 :	
REM – Darstellung, Zellkontrolle SAOS-2, Tag 10	59
Abbildung 28 :	
REM – Darstellung, SAOS-2 Zellen auf Navigraft®, Tag 10	60

Abbildung 29 :
REM – Darstellung, SAOS-2 Zellen auf PepGen P - 15®, Tag 1060

Abbildung 30 :
REM – Darstellung, SAOS-2 Zellen auf Frios Algipore®, Tag 10 61

Abbildung 31 :
REM – Darstellung, SAOS-2 Zellen auf BioBase®, Tag 10 62

Abbildung 32 :
REM – Darstellung, SAOS-2 Zellen auf Ostim®, Tag 10 62

7 Zusammenfassung (Abstract)

Das Anliegen der durchgeführten in vitro – Studie war es, das Wachstumsverhalten und die Proliferationsaktivität von humanen osteogenen Zellkulturen auf verschiedenen Knochenersatzmaterialien zu evaluieren.

Dabei kamen sich in ihrem Differenzierungsgrad unterscheidende Zelllinien von osteoblastenähnlichen SAOS-2 Zellen, primären Osteoblasten aus Kieferkammknochen und adulten Knochenmarkstammzellen zum Einsatz. Seitens der fünf verwendeten Trägermatrizes wurden die Wirkungsweisen und Effekte von bovinem Hydroxylapatit (Navigraft®), bovinem Hydroxylapatit mit einem synthetischen kollagenoiden Peptid (PepGen P - 15®), phytohemem Hydroxylapatit (Frios Algipore®), alpha – Tricalciumphosphat (BioBase®) und synthetischem, ungesintertem und nanokristallinem Hydroxylapatit (Ostim®) untersucht.

Die Lebendigkeit respektive die Proliferation der Zellen (CellTiter - Glo™ Luminescent Cell Viability Assay) wurde nach jeweils 0, 3, 6, 10 und 14 Tagen ermittelt. Die entsprechenden Zellkontrollen allein erfolgten auf einer Polystyroloberfläche. Als weitere methodische Parameter dienten an denselben Messtagen die Alkalische Phosphatase (AP) als frühzeitiger Marker des Knochenstoffwechsels und das Osteocalcin (Ocal) als später Indikator einer Differenzierungstendenz. Die Zellkulturen wurden hinsichtlich ihrer osteoblastären Eigenschaften und Zellmorphologie primär mittels eines Lichtmikroskopes beurteilt. Die humanen Knochenzelllinien zeigten in Abhängigkeit vom jeweilig verwendeten Knochenersatzmaterial eine unterschiedliche Proliferationsaktivität. Die höchsten Proliferations – sowie Differenzierungsraten konnten bei Navigraft® und BioBase® nachgewiesen werden, gefolgt von PepGen P –15®. Frios Algipore® und Ostim® offerierten hier das mit Abstand am geringsten einzuschätzende, aus der in vitro – Situation abgeleitete Osteokonduktivitätspotential. Eine weitere Bestätigung fanden diese Resultate anhand der partiell zusätzlich unternommenen rasterelektronenmikroskopischen Auswertung.

8 Danksagung

Ohne dass ich sämtliche Persönlichkeiten im Einzelnen mit Namen hervorheben möchte , ist es mir doch ein ausgesprochenes Herzensanliegen, unter besonderer Nennung von Herrn Prof. Dr. J. Becker als meinen primären " Doktorvater " und Frau Dr. M. Herten als stets kompetente Ansprechpartnerin für grundlegende biologische Fragen all denen in persönlicher Verbundenheit zu danken, die - ein jeder nach seinen besten Möglichkeiten - auf unermüdliche Weise an der Entstehung, intensiven und geduldigen Betreuung sowie erfolgreichen Bewältigung dieses Projektes mitgewirkt haben.

9 Curriculum vitae

Name : Schmeing
Vorname : Michael Volker
Geburtsdatum : 13. Juli 1970
Geburtsort : Recklinghausen
Familienstand : verheiratet;
Ehefrau Gabriella Csaba, Sohn Lukács
Konfession : Katholisch
Eltern : Karin Schmeing, geb. Koczwarra
Dr. Volker Schmeing

Schulbildung :

1977 – 1981 Städt. Gem. Grundschule, Wattenscheid - Höntrop
1981 – 1990 Gymnasium am Ostring, Bochum
1990 Abitur

Hochschulbildung :

1990 – 1992 Studium der Zahnheilkunde an der RWTH Aachen
1993 – 1998 Studium der Zahnheilkunde an der Heinrich –
Heine – Universität Düsseldorf
1998 Staatsexamen im Fach der Zahnheilkunde an der
Heinrich – Heine – Universität Düsseldorf

Beruflicher Werdegang :

1998 – 1999 Weiterbildungsassistent in der Zahnarztpraxis

1999 – 2005

Dr. V. Schmeing, Herten / Westf.

Assistenz Zahnarzt in der Poliklinik für
Parodontologie, Direktor Univ. – Prof. Dr. A.
Herforth, Westdeutsche Kieferklinik,
Universitätsklinikum Düsseldorf