Aus der Poliklinik für Zahn-,Mund- und Kieferheilkunde
der Heinrich-Heine-Universität,
Düsseldorf

Direktor: Universitätsprofessor Dr. J. Becker

Proliferations-, Differenzierungs- und Adhäsionsverhalten osteogener Zelllinien auf unterschiedlichen Knochenersatzmaterialien

Dissertation:

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Karina Friesen

2006

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

gez.: Univ.-Prof. Dr. W. H.-M. Raab
Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. J. Becker
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. A. Herforth

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	9
1.1	Einführung	9
1.1.1	Historie	9
1.1.2	Methoden der Knochenregeneration	10
1.1.3	Osteogenese	10
1.1.4	Osteokonduktion	10
1.1.5	Osteoinduktion	11
1.2	Tissue engineering	11
1.3	Einteilung der Knochenersatzmaterialien	14
1.3.1	Autogene Knochentransplantate	15
1.3.2	Allogene Knochenersatzmaterialien	16
1.3.3	Xenogene Knochenersatzmaterialien	18
1.3.4	Alloplastische Knochenersatzmaterialien	19
1.4	Anforderungen an Knochenersatzmaterialien	21
1.4.1	Auszug einiger auf dem Markt befindlicher KEM	22
1.5	Problemstellung und Ziele der Arbeit	23
2.	Material und Methoden	25
2.1	Experimentelle Untersuchungen	25
2.2	Verwendete Materialien	25
2.2.1	Auswahl der Knochenersatzmaterialien	25
2.2.2	Zellen und Zellkultur	28
2.2.3	Verwendete Zellen	28
2.2.4	Zellkulturreagenzien	29
2.2.5	Nachweismaterialien und Gebrauchslösungen	29
2.2.6	Geräte und Zellkulturzubehör	30
2.3	Zellkultur	31
2.3.1	Kultivierung der Zellen	31

2.3.2 Passagieren der Zellen 32
2.3.3 Zählen und Einfrieren von Zellen 32
2.3.4 Auftauen von Zellen 34
2.4 Charakterisierung primärer Osteoblasten und Osteosarkomzellen 34
2.4.1 Kontrolle der Spezifität der primären Osteoblasten mittels PCR und Immunhistologie 34
2.4.2 Methode der RNA-Isolation mit primären Osteoblasten 34
2.4.3 Methode der Reversen Transkriptase (C-DNA Synthese) mit primären Osteoblasten 35
2.4.4 Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) 36
2.4.5 Osteocalcin-Polymerase Kettenreaktion (Osteocalcin-PCR) 36
2.4.6 Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte 38
2.5 Immunhistochemischer Osteocalcinnachweis von Osteosarkomzellen und primären Osteoblasten 38
2.5.1 Bestimmung der eingesetzten KEM-Menge 39
2.5.2 Beweis der Proportionalität 40
2.5.3 Ausschluss etwaiger Verfälschungen der Messungen im Hauptversuch durch KEM 40
2.5.4 pH-Wert-Messungen 40
2.6 Hauptversuche 41
2.6.1 Adenosintriphosphat (ATP)-Biolumineszenz 41
2.6.2 Hauptversuch ATP-Assay mit den fünf Knochenersatzmaterialien 42
2.6.3 Potentielle Zytotoxizität der Knochenersatzmaterialien 42
2.6.4 Statistik 43
2.7 Osteocalcin-ELISA 43
2.7.1 Vorbereitung für den Osteocalcin-ELISA 44
2.7.2 Hauptversuch Osteocalcin-ELISA 45
2.8 Aktivität der Alkalischen Phosphatase (AP) 45
2.8.1 Hauptversuch Alkalische Phosphatase 46
2.9 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung 47
2.9.1 Hauptversuch: Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der Zellmorphologie anhand von SaOs-2-Zellen 47

3. Ergebnisse 48
3.1 Ergebnisse der Vorversuche 48
3.1.1 Standardisierung der ATP-Messung 48
3.1.2 Überprüfung der KEM ohne Zellen auf Beeinflussung der Lumineszenzwerte 49
3.1.3 pH-Wert-Messungen 50
3.1.4 Überprüfung der primären Osteoblasten mittels Osteocalcin und HPRT-Expression 51
3.1.5 Nachweis der Osteocalcinsynthese bei SaOs-Zellen und primären Osteoblasten 52
3.2 Hauptergebnisse 53
3.2.1 ATP-Assay 53
3.2.2 ATP-Assay mit SaOs-Zellen 53
3.2.3 ATP-Assay mit primären Osteoblasten 54
3.2.4 ATP-Assay mit Knochenmarkstammzellen 55
3.3 U-937 Zellen auf den jeweiligen Knochenersatzmaterialien 56
3.4 Nachweis der ALP (Alkalische Phosphatase)-Aktivität 57
3.5 Ergebnisse der rasterelektronenmikroskopischen Auswertung 60

4. Diskussion 63
4.3 Methodenkritik 69
4.4 Geweberegeneration (Tissue engineering) 70

5. Schlussfolgerung 72

6. Zusammenfassung 73

7. Literaturverzeichnis 74

Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1: Nomenklatur der Knochenimplantate und-transplantate 14

Tabelle 2: Entnahmestellen von autogenen Knochentransplantaten für zahnmedizinische Interventionen 16

Tabelle 3: Klassifikationen der Biomaterialien nach dem Reaktionsmodus des knöchernden Lagers (Osborn, Newesely, 1980) 19

Tabelle 4: Eigenschaften der Kalziumphosphate modifiziert nach Schlickewei und Paul (1991) & Misch und Dietsh (1993) 20

Tabelle 5: Anforderungen an Knochenersatzmaterialien 21

Tabelle 6: Auszug einiger auf dem Markt befindlicher Knochen-ersatzmaterialien 22

Tabelle 7: Übersichtstabelle der Hauptversuche 25

Tabelle 8: Auflistung der in der Studie verwendeten Knochen-ersatzmaterialien 26

Tabelle 9: Mastermix für die Reverse Transkriptase 35

Tabelle 10: Mastermix für die Osteocalcin-PCR 37

Tabelle 11: PCR-Programm 37

Tabelle 12: Mengenangabe der Knochenersatzmaterialien 39

Tabelle 13: Übersichtstabelle der Hauptversuche 41

Tabelle 14: Standardverdünnung für OC-ELISA 44

Tabelle 15: Aufsteigende Konzentrationsreihe der SaOs-Zellen 48

Tabelle 16: pH-Wert-Messungen, Tag 1 und Tag 8 50

Tabelle 17: Nachweis der Alkalischen Phosphatase der drei Zelllinien auf den KEM 57

Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1: Autologe Gewebetransplantation mit Tissue Engineering (Grafik Arbeitsgruppe Tissue engineering der Charité Berlin; mit freundlicher Genehmigung) 12
Abb. 2: Zählfeld einer Neubauer-Zählkammer 33
Abb. 3: Osteocalcin und HPRT-Expression 51
Abb. 4: Osteocalcinsynthese von primären Osteoblasten 52
Abb. 5: ALP-Aktivität der Zellkontrolle von Osteosarkomzellen positiv; Negativkontrolle rechts unten im Bildrand 58
Abb. 6: ALP-Aktivität der Zellkontrolle von primären Osteoblasten positiv; Negativkontrolle rechts unten im Bildrand 58
Abb. 7: ALP-Aktivität der Zellkontrolle von Knochenmarkstammzellen positiv; Negativkontrolle rechts unten im Bildrand 59
Abb. 8: Zytologische Anfärbung für Alkalische Phosphatase in der humanen osteoblastenähnlichen Zellkultur auf Cerasorb 59
Abb. 9: REM Aufnahme: Zellkontrolle (500fache Vergrößerung) 60
Abb. 10: REM Aufnahme: Osteoinductal (500fache Vergrößerung) 60
Abb. 11: REM Aufnahme: Bio-Oss Spongiosa (500fache Vergrößerung) 61
Abb. 12: REM Aufnahme: Bio-Oss Collagen (500fache Vergrößerung) 61
Abb. 13: REM Aufnahme: P-15 (500fache Vergrößerung) 62
Abb. 14: REM Aufnahme: Cerasorb (1000fache Vergrößerung) 62

Verzeichnis der Diagramme

Diagramm 1: ATP-Standardkurve 48

Diagramm 2: Überprüfung der KEM auf Eigenlumineszenz 49

Diagramm 3: ATP-Assay mit SaOs auf KEM 53

Diagramm 4: ATP-Assay mit primären Osteoblasten auf KEM 54

Diagramm 5: ATP-Assay mit Knochenmarkstammzellen auf KEM 55

Diagramm 6: Nichtadhärente U-937 Zellen auf KEM 56

1. Einleitung

1.1 Einführung

Knochendefekte im menschlichen Körper entstehen durch Traumen, durch Tumore beziehungsweise deren Resektion, durch operative Eingriffe infolge entzündlicher Prozesse oder durch kongenitale Fehlbildungen.
In der Zahnheilkunde kommt es vor allem bei parodontalen Erkrankungen zu entzündlich bedingtem Knochenabbau, so dass heute besonders im Rahmen parodontologisch-regenerativer und implantologischer Maßnahmen augmentative Verfahren routinemäßig zur Anwendung kommen. Auch eine generalisierte altersbedingte Atrophie des Alveolarkammes und Knochendefekte als Folge von Traumata, chirurgischen Tumorentfernungen etc. werden in der chirurgischen Praxis mit Hilfe augmentativer Therapiemethoden behandelt (Garg 1999). Es besteht daher das ständige Bestreben, geeignete Ersatzmaterialien zur möglichst vollständigen Wiederherstellung zu finden. In den letzten Jahren wurden große Fortschritte auf dem Gebiet der Biomaterialien erzielt (De Boer H. 1989). Verbesserte Materialeigenschaften führten dazu, dass heute neben der autogenen Transplantation allogene, xenogene und alloplastische Knochenersatzmaterialien routinemäßig zum Einsatz kommen (Yildirim et al. 2000a). Je nach Materialherkunft kann bei synthetischer Herstellung von Knochenersatzmaterialien und bei biologischem Ursprung von Knochenmaterialien gesprochen werden. Dementsprechend ändert sich auch die Nomenklatur bei der Insertion des Materials: Der Einsatz von biologischen Materialien wird als Transplantation, der von synthetischen Produkten als Implantation bezeichnet.

1.1.1 Historie

Bereits frühzeitig wurden auf dem Gebiet der Zahnmedizin Versuche unternommen, Materialien verschiedenster Art (Elfenbein; Walrosszähne und Holz) als Ersatz für fehlende Zähne oder bei Knochenverlust zu implantieren (LeGeros, LeGeros 1997).
So wurde im Jahr 1931 bei Ausgrabungen in Honduras ein Unterkieferfragment aus der Zeit der Mayas, um 600 Jahre nach Christus gefunden. In diesem Unterkiefer waren drei fehlende untere Schneidezähne durch zahnförmige, in den Knochen eingesetzte Muschelstücke ersetzt. Röntgenaufnahmen wiesen nach, dass zwei der Muschelstücke

knöchern inkorporiert waren. Dies sind bislang die erst beschriebenen anorganischen Implantate, die je in menschliches Knochengewebe implantiert wurden (Ring 1997).
Durch die intensive Zusammenarbeit vieler naturwissenschaftlichen Disziplinen und zunehmendem Interesse der chemisch-pharmazeutischen Industrie wurden in den letzten Jahrzehnten erfolgreiche medizinische, werkstoffkundliche und materialtechnische Fortschritte erzielt. Diese erlauben das Implantieren von nicht-autogenem Ersatzmaterial für viele Indikationsstellungen alternativ oder in Kombination mit autogenen Transplantaten.

1.1.2 Methoden der Knochenregeneration

Grundsätzlich gibt es drei verschiedene Mechanismen zur Bildung von neuem Knochengewebe (Kübler 1997; 1998):

1.1.3 Osteogenese

Die **Osteogenese** setzt eine Übertragung von knochenbildenden Zellen, den Osteoblasten bzw. deren Vorläuferzellen im Rahmen autogener Transplantation voraus.
Da es sich um vitales Material mit lebendigen Osteoblasten handelt, können diese proliferieren und die Knochenentwicklung aktivieren, bzw. das Knochenwachstum beschleunigen.

1.1.4 Osteokonduktion

Bei der **Osteokonduktion** werden schon vorhandene ortständige Osteoblasten stimuliert und lösen eine Osteogenese aus (Feifel 1996). Der Mechanismus der Osteogenese durch Osteokonduktion läuft in den Poren von Knochenersatzmaterialien ab, die in einen Knochendefekt eingebracht werden. Das Vorhandensein von porösen Strukturen erlaubt ein Einsprossen von Gefäßen und damit verbunden eine vom Lagergewebe ausgehende Knochenneubildung ohne vorhergehende vollständige Resorption. Bezüglich der Morphologie stellt dabei die natürliche Spongiosa die Idealstruktur dar (Schenk 1994).

1.1.5 Osteoinduktion

Neben den oben genannten Mechanismen der Osteogenese und der Osteokonduktion existiert noch ein weiterer Prozess, der eine knöcherne Regeneration begünstigen kann: die **Osteoinduktion.** Es wird vermutet, dass sogenannte „Bone Morphogenetic Proteins“ (BMP) osteoinduktive Proteine darstellen, die als nichtkollagene Bestandteile in der Knochenmatrix vorhanden sind und aus dieser diffundieren können (Kübler 1997; Urist 1989).
Bei der Osteoinduktion stimuliert das Implantat – dies kann z.B. ein mit BMP angereichertes alloplastisches Knochenersatzmaterial sein – die Differenzierung von Stammzellen in knochenbildende Zellen im Lagergewebe. Das Trägermaterial dient dabei für die Osteogenese zusätzlich als Leitstruktur und wirkt als osteokonduktiver Kofaktor.

1.2 Tissue engineering

Tissue Engineering bedeutet soviel wie "Gewebekonstruktion" oder "Zell- und Gewebetechnik". Hierbei werden die Zellen einem Patienten entnommen, für ihre Vermehrung in einem speziellen Labor kultiviert und danach wieder in denselben Patienten zurück verpflanzt. Im Vordergrund stehen Osteoblasten, Chondrozyten und Keratozyten. Den Begriff des Tissue Engineering verwendeten erstmals 1987 Vertreter der US-amerikanischen National Science Foundation (NSF) in Washington, DC. Ein Jahr später wurde auf der ersten (von der NSF veranstalteten) Konferenz zum Tissue Engineering in Lake Tahoe, Kalifornien, folgende Definition geprägt:

„Tissue Engineering ist die Anwendung der Prinzipien und Methoden der Ingenieur- und Lebenswissenschaften für das grundlegende Verständnis der Wechselwirkung von Struktur und Funktion normalen und kranken Gewebes sowie zur Entwicklung von biologischem Gewebe-Ersatz zur Rekonstruktion, dem Erhalt oder der Verbesserung der Gewebefunktionen".

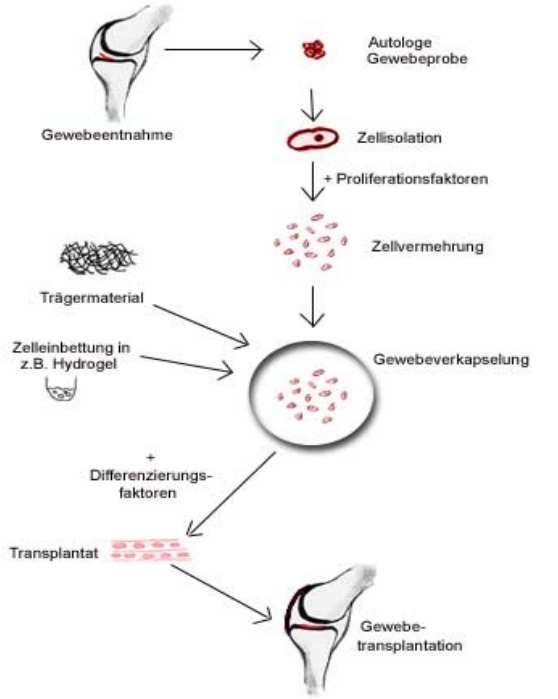

Abb. 1: Autogene Gewebetransplantation mit Tissue Engineering;
(Grafik Arbeitsgruppe Tissue engineering der Charité Berlin,
mit freundlicher Genehmigung)

Ziel des Tissue engineering ist es, erkranktes Gewebe zu heilen, zu rekonstruieren oder in seiner Funktion zu unterstützen. Im Regelfall stammen die Zellen vom Patienten selbst (autogene Zellen).

Diese vergleichsweise junge Technik hat in den letzten Jahren deutliche Fortschritte bei der Herstellung von artifiziellen Geweben gemacht. Tatsache ist dennoch, dass bislang viele der künstlich hergestellten Konstrukte noch keine ausreichende Qualität aufweisen. Eine erfolgreiche Anwendung des Tissue engineering setzt voraus, dass den proliferierenden Zellen ein dreidimensionales Gerüst zur Verfügung steht, das der Struktur der extrazellulären Matrix (ECM) humaner Gewebe entspricht. In der extrazellulären Matrix befinden sich mitunter Wachstumsfaktoren, die nicht nur für Wachstum und Entwicklung, sondern auch während Umbauprozessen und Reparaturvorgängen eine wesentliche Rolle spielen (Lauer 2002).

In-vivo stellt die extrazelluläre Matrix, die von Zellen abgesondert wird und eine fädige Struktur aufweist, das Gerüst dar, an das sich die Zellen anheften können. Die extrazelluläre Matrix ist also jeweils Teil des spezifischen Umfelds eines Gewebes und muss deshalb als ein wichtiger Differenzierungsfaktor beachtet werden. Fehlt die spezifische Matrix, so können die Zellen oftmals nicht ihre volle Syntheseleistung erbringen.

Kultivierte Leberparenchymzellen z.B. zeigen nur einen Bruchteil ihrer ursprünglichen Entgiftungsleistung, Pankreasinselzellen verlernen ihre Fähigkeit zur Insulinsynthese, Nierenepithelien verlieren ihre typischen Transportfunktionen und Knorpel- bzw. Knochenkonstrukte bilden eine kaum belastbare extrazelluläre Matrix. Zudem kommt es häufig vor, dass atypische Proteine von den kultivierten Gewebekonstrukten gebildet werden. Diese können bei der medizinischen Anwendung Entzündungen und Abstoßungsreaktionen hervorrufen.

Die Behandlung mittels Tissue engineering wird in der Zukunft eine Option für Knochendefekte jeglicher Art darstellen, dessen Ziel es ist herauszufinden, wie funktionelles Gewebe in Kultur generiert und dabei die Ausbildung funktioneller Eigenschaften experimentell gesteuert werden kann (Delloye et al 2003).

1.3 Einteilung der Knochenersatzmaterialien

In den letzten Jahren hat die Anzahl von erhältlichen Knochenersatzmaterialien in Europa stark zugenommen. Diese Entwicklung hängt unter anderem mit dem Trend zur minimal-invasiven Chirurgie zusammen (Delloye et al. 2003). Die Knochenersatzmaterialien werden terminologisch nach ihrer Herkunft in autogene, allogene, xenogene und alloplastische Knochentransplantate und Knochenimplantate unterschieden:

Autogenes Knochentransplantat	Verpflanzung innerhalb desselben Individuums, wie z.B. intraoral oder extraoral an anderer Stelle entnommener Knochen
Isogenes Knochentransplantat	Transplantation zwischen histokompatiblen Individuen gleicher Spezies (Zwillinge)
Allogenes Knochenimplantat	Verpflanzung zwischen Individuen derselben Spezies. Meistens handelt es sich um physikalisch und chemisch in seiner Struktur veränderten, konservierten humanen Spenderknochen
Xenogenes Knochenimplantat	Verpflanzung zwischen Individuen verschiedener Spezies, z.B. bovine Hydoxylapatite
Alloplastisches Implantat	Vollsynthetisch hergestelltes Biomaterial bzw. ausgiebige physikalische und/oder chemische Bearbeitung xenogener (speziesfremder) Gewebearten oder Gewebeauszüge (Gerüstbausteine), z.B. α-, β-Tricalciumphosphate
Phykogenes Knochenersatzmaterial	Hydroxylapatit aus 100% anorganischem Kalziumphosphat, wovon 95% als Apatit vorliegen; Ausgangsmaterial sind kalkinkrustierende Meeresalgen

Tabelle 1: Nomenklatur der Knochenimplantate und -transplantate

1.3.1 Autogene Knochentransplantate

Die Verpflanzung von körpereigenen knochenbildenden Zellen im Rahmen von autogenen Knochentransplantationen stellt derzeit den „goldenen Standard“ dar, an dem sich alle Alternativverfahren messen lassen müssen (Kübler und Würzler 2002).
Die Hauptvorteile der autogenen Knochentransplantation liegen in der guten Annahmebereitschaft des Organismus sowie der Vermeidung übertragbarer Infektionen. Die zellulären Bestandteile der autogenen Knochentransplantate können unter geeigneten Voraussetzungen zumindest für einen gewissen Zeitraum überleben und sich am Knochenaufbau beteiligen (Reuther und Bill 1991).
Die Verfügbarkeit autogener Knochentransplantate ist jedoch begrenzt und erfordert einen Zweiteingriff zur Transplantathebung. Außerdem birgt der operative Eingriff für den Patienten zusätzliche Risiken: Schmerzen, Hämatombildung und Infektionsrisiken limitieren die Anwendung. Gleichzeitig stellen längere Operations- und Narkosedauer bei umfangreichen rekonstruktiven Eingriffen erhebliche Belastungen für den Patienten dar und erhöhen das Operationsrisiko (Behrens et al 2001). Beckenspongiosa und
-mark haben das größte osteogene Potential. Es werden jedoch nicht nur die stimulierenden Zellen der Knochenneubildung (Osteoblasten) transplantiert, sondern auch resorptive und phagozytierende Zellen, sog. Osteoklasten, die regelmäßig zu Resorptionen und Ankylosen an den Wurzeloberflächen führen. Ein weiterer unerwünschter Effekt ist die deutliche Eigenresorption der Spongiosa des Beckenkamms, so dass das Knochenvolumen der Transplantate sich reduziert (Friedman 1998a, Spallek & Deschner 1995). Bei großen knöchernen Defekten ist der Einsatz von autogenen Knochentransplantaten jedoch allen alternativen Knochenersatzmaterialien vorzuziehen und ist daher nach wie vor Mittel der ersten Wahl (Misch, Dietsh 1993; Schliephake et al. 1997). Bereits nach einer 4-wöchigen Einheilphase kann hierbei von einer knöchernen Integration des Transplantates ausgegangen werden.

Intraoraler Knochen	Extraoraler Knochen
- **umliegender Alveolarkamm (OP-Gebiet)** - **Gaumen** - **Tuberbereich** - **Retromolarbereich (kortikospongiöser Knochen)** - **Kinnregion** - **Unterkiefersymphyse** - **Unterkieferrand** - **Zahnloser Kieferabschnitt** - **Extraktionsalveole** - **Linguale/laterale Kortikalis**	- Beckenkamm (erstmals 1968, Spongiosa und Mark) - Schädelkalotte - Mikrovaskulär: Beckenkamm, Schulterblatt (Skapula), Unterarm (Radius), Wadenbein (Fibula)

Tabelle 2: Entnahmestellen von autogenen Knochentransplantaten für zahnmedizinische Interventionen (Buns 1995; Spallek & Deschner 1995; Hausamen 1995, Koeck & Wagner 1996)

1.3.2 Allogene Knochenersatzmaterialien

Die allogene Knochentransplantation erfolgt zwischen genetisch unterschiedlichen Individuen der gleichen Spezies (Kloss, Neukam 1999). Je nach Art der Vorbehandlung des meist von Leichen gewonnenen Knochens können drei Klassifizierungen allogener Knochentransplantate voneinander unterschieden werden: **gefrorener, gefriergetrockneter** und **demineralisierter, gefriergetrockneter** Knochen (Misch, Dietsh 1993).

Da Interaktionen zwischen Empfängerzellen und Zellen des Transplantates nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden können, besteht die größte Gefahr hinsichtlich einer intravitalen Kontamination bei frisch gefrorenen Knochen (Hofmann, Lob 1991). Wie bei der Transfusion von Blut und Blutprodukten besteht auch bei der Transplantation von Knochen das Risiko der Übertragung von Viren, die schwerwiegende Erkrankungen beim Empfänger auslösen können. So konnte im zahnmedizinischen Bereich die Übertragung einer HIV-Infektion durch die Implantation von allogenem, gefrorenen Knochen nachgewiesen werden (Simonds et al. 1992). Von der Knochenspende auszuschließen sind Personen, bei denen jemals eine HBV-, HCV- oder HIV-Infektion nachgewiesen wurde. Sollte eine Transplantation ausnahmsweise bei einem immunsupprimierten Pati-

enten vorgenommen werden, muss bei dem Spender vorher eine Infektion mit dem Cytomegalievirus ausgeschlossen werden.
Es wurden mehrere Methoden entwickelt, die zu einer Reduktion der Antigenität des transferierten Knochens führen (Kloss, Neukam 1999):
Verfahren wie die Gefriertrocknung und die Demineralisation durch Säurebehandlung denaturieren die im Knochen vorhandenen, für die immunologischen Reaktionen im Empfänger verantwortlichen Proteine (Mellonig et al. 1992; Kübler et al. 1993; Hürzeler 1995). Bei der Herstellung von gefriergetrockneten Knochen wird der Spenderknochen in einem Gemisch aus Äthanol und Äthyläther entfettet und dehydriert. Im Anschluss wird die Knochenmatrix mit flüssigem Stickstoff gefroren und unter Umgehung der Flüssigkeitsphase getrocknet. Durch diesen Vorgang werden alle Zellen devitalisiert (Spallek, Deschner 1995).

Gefriergetrockneter Knochen kommt entweder entkalkt als demineralisierter, gefriergetrockneter Knochen (Demineralized Freeze-Dried Bone Allograft = DFDBA) oder nicht entkalt als mineralisierter, gefriergetrockneter Knochen (Freeze-Dried Bone Allograft = FDBA) zur klinischen Anwendung. Die osteokonduktive Eigenschaft von mineralisiertem, gefriergetrocknetem Knochen ist erwünscht. Ein osteoinduktives Potential durch knochenbildende Proteine, die zum Teil in mineralisch-organischen Komplexen gebunden sind, ist jedoch gering (Nevins, Mellonig 1992). Durch Extraktion mittels Salzsäure wird aus dem mineralisierten, gefriergetrockneten Knochen der demineralisierte gefriergetrocknete Knochen hergestellt. Durch den Demineralisationsvorgang soll unter anderem das BMP aus der Knochenmatrix freigesetzt und somit das osteogene Potenzial erhöht werden (Urist et al. 1973). Die Kombination von Demineralisation und Gefriertrocknung allogenen Knochens kann zudem das Risiko der Krankheitserregerübertragung und Allergisierung reduzieren (Ehmke und Flemmig 1998).

In der klinischen Anwendung hat der demineralisierte, gefriergetrocknete Knochen den mineralisierten, gefriergetrockneten weitgehend verdrängt (Claes 1993, Rehm 1993).
Konträre Studien bezüglich guter regenerativer Resultate mit DFDBA könnten in der nicht standardisierten Qualität der Transplantate begründet sein. So überprüfen kommerzielle Knochenbanken nicht die spezifische Menge enthaltener BMPs oder induktiver Fähigkeit ihrer auf dem Markt erhältlicher Allografts (Schwartz et al 1996).

Im Gegensatz zu Studien mit enttäuschenden Ergebnissen, konnten Reynolds und Bowers sechs Monate nach Auffüllung parodontaler Defekte mit DFDBA am Patienten eine knöcherne Einscheidung des Allografts nachweisen, was zumindest auf osteokonduktive Eigenschaften hindeutet (Reynolds und Bowers, 1996).

Pinholt et al. berichten von einer klinisch vermehrten bindegewebigen Einkapselung enossaler Implantate bei Insertion in mit allogenen Knochenersatzmaterialien aufgebauten Knochenarealen (Pinholt et al. 1994). Ein Indiz dafür ist die verminderte Erfolgsquote (65%) von Implantaten, die in mit demineralisierten, gefriergetrockneten, allogenen Knochen augmentierten Regionen eingesetzt wurden. Die Erfolgsquoten von Implantaten in autogenem Knochen waren demgegenüber mit 97% deutlich besser (Tolman 1995).

1.3.3 Xenogene Knochenersatzmaterialien

Xenogene Materialien stammen von einer genotypisch vom Menschen verschiedenen Spezies ab. Sie werden durch einen Deproteinierungsvorgang aus Tierknochen gewonnen. Die Erregerübertragung wird als extrem gering eingeschätzt, ist aber nicht bei allen Materialien vollständig auszuschließen. Xenogene Knochenersatzmaterialien bestehen überwiegend aus Hydroxylapatit, der im menschlichen Knochen vorherrschenden anorganischen Komponente.
Bovine Knochenersatzmaterialien werden aus Rinderknochen hergestellt, wobei sämtliche organische Bestandteile durch chemische und thermische Behandlungen entfernt werden. Ein Beispiel für ein solches Knochensubstitut ist Bio-Oss (Biomaterialien Geistlich, Wolhusen, Schweiz), ein Hydroxylapatit halbsynthetischen Ursprungs. Auch Tutogen zählt zu den verwendeten xenogenen Knochenersatzmaterialien, jedoch wird hier auf eine vollständige Deproteinisierung verzichtet und somit kein hundert prozentiger Schutz vor Infektionen garantiert.

1.3.4 Alloplastische Knochenersatzmaterialien

Die begrenzte Möglichkeit, Knochen in ausreichender Menge, ohne operativen Zweiteingriff und damit verbundene erhöhte gesundheitliche Risiken für den Patienten gewinnen zu können und die zusätzliche Gefahr übertragbarer Krankheiten führten letztendlich zur Suche nach synthetischen bzw. halbsynthetischen Knochenersatzmaterialien.

Synthetische Biomaterialien sind verfügbar als Hydroxylapatit (HA) [$CA_{10}(PO_4)_6(OH)_2$], Tricalciumphosphat (TCP) [$Ca_3(PO_4)_2$] und als Biphasisches Kalziumphosphat (BCP, d.h. einen Composit Werkstoff aus Hydroxylapatit und β-TCP). HA ist druckstabil und wird kaum resorbiert, während TCP schnell abgebaut wird und nicht druckfest ist. Die Partikelgröße und die Porosität, die chemische Struktur und die Zusammensetzung der Stoffe spielt bezüglich der Resorptionsrate eine große Rolle (Misch, Dietsh 1993). Die TCPs lassen sich hinsichtlich ihrer Kristallstruktur in α- und β-Tricalciumphosphate unterscheiden, wobei α-TCP aus β-TCP durch Erhitzen auf mehr als 1125 °C hergestellt wird. Da β-TCP die stabilere Phase bei Raumtemperatur ist, hat es eine geringere Löslichkeit als α-TCP (Le Geros 2001).

Biodynamik	Werkstoff	Reaktion des Implantatlagers	Implantat-Knochen-Interface
Biotolerant	Knochenzement Chirurgiestahl	Distanzosteogenese	Bindegewebe
Bioinert	Al_2O_3-Keramik Kohlefaserstoff Titan (z.B. Ti-Al_6-V_4)	Kontaktosteogenese	Direkter Verbund zwischen Knochen und Implantat
Bioaktiv	Kalziumphosphat-Keramiken	Verbundosteogenese	Chem. Verbund zwischen Knochen und Implantat

Tabelle 3: Klassifikationen der Biomaterialien nach dem Reaktionsmodus des knöchernen Lagers (Osborn, Newesely, 1980)

Als Biomaterialien werden Materialien bezeichnet, wenn sie in der Lage sind, mit biologischen Systemen zu agieren. Osborn und Newesely unterteilen diese Materialien entsprechend ihrer biologischen Aktivität in biotolerant, bioinert und bioaktiv (Osborn und Newesely 1980).

Biotolerante Implantate, wie z.B. Knochenzement und Chirurgiestahl werden bindegewebig eingeschieden. Bei Bildung von Bindegewebsmembranen zwischen Implantat und Knochen spricht man von Distanzosteogenese. Bioinerte Implantate (Aluminiumoxid, Zirkoniumoxid, Implantate aus Kunststoff und Titan) besitzen auf ihrer Oberfläche eine stabile Oxidschicht. Im orthotopen Lager kommt es zur direkten Verbindung zwischen Implantat und Knochen (Kontaktosteogenese). Es bildet sich üblicherweise keine interponierende Bindegewebsschicht, die Verzahnung ermöglicht eine Belastung mit hohen mechanischen Kräften.

Bioaktiv sind die Mineralstruktur des Knochens nachahmende Kalziumphosphatkeramiken (wie Hydroxylapatit, Trikalziumphosphat, Glaskeramiken), die im Organismus spezifische biologische Reaktionen auslösen. Durch Osteokonduktion entsteht eine chemische Bindung zwischen Implantat und Knochen (Le Geros 1988). Bioaktive Materialien zeigen neben einer positiven Interaktion mit lebendem Gewebe auch eine Differenzierung von Vorläuferzellen zu knochenbildenden Zellen (Kohal et al. 2001). Diese wird von Osborn und Newesely als Verbundosteogenese bezeichnet (Osborn, Newesely, 1980).

Zu den bioaktiven Keramiken, der größten Gruppe der alloplastischen Werkstoffe, gehören auch die Kalziumphosphatmaterialien HA und TCP (Tab.4).

Hydroxylapatit	**Trikalziumphosphat**
$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$	$Ca_3(PO_4)_2$
langsame Resorption	schnelle Resorption
Kalzium-Phosphat-Verhältnis 10:6	Kalzium-Phosphat-Verhältnis 3:2
Druckstabilität	geringe Druckstabilität

Tabelle 4: Eigenschaften der Kalziumphosphate modifiziert nach Schlickewei und Paul (1991), Misch und Dietsh (1993)

Allen genannten Materialien gemein ist der osteokonduktive Wirkungsmechanismus, der in der Ähnlichkeit der Materialmorphologie zur humanen Spongiosa begründet liegt. Eine osteoinduktive Wirkung der Kalziumphoshatkeramiken hat sich bislang nicht nachweisen lassen (Pettis et al. 1990).

1.4 Anforderungen an Knochenersatzmaterialien

Knochenersatzstoffe müssen einen gewissen Anforderungskatalog erfüllen, damit sie klinisch eingesetzt werden können:

UNABDINGBARE ANFORDERUNGEN	ALLGEMEINE ANFORDERUNGEN
- Keine lokale oder systemische Toxizität	- Uneingeschränkte Verfügbarkeit
- Gute Biokompatibilität	- Lagerungsfähigkeit
- Keine Kanzerogenität	- Kostengünstige Produktion
- Chemische Stabilität	
- Histokompatibilität	
- Keine Wirkungsunterschiede im Vergleich von Lang- und Kurzzeitimplantation	
- Sterilisierbarkeit	
WÜNSCHENSWERTE BIOMECHANISCHE, BIOCHEMISCHE UND MORPHOLOGISCHE ANFORDERUNGEN	
- Biomechanische und morphologische Eigenschaften wie Elastizitätsmodul, Biege- und Kompressionsfestigkeit sowie Makro- und Mikromorphologie entsprechend dem zu ersetzenden Knochengewebe	
- Osteokonduktive und/oder osteoinduktive Wirksamkeit	
- Biodegradierbarkeit analog zur Knochenneubildung	
- Fähigkeit zur schnellen Osseointegration	
- „ease of use“: einfache Handhabung	

Tabelle 5: Anforderungen an Knochenersatzmaterialien

Die klinisch eingesetzten biologischen Knochenmatrizes haben zum Teil ähnliche makro- und mikroporöse Strukturen wie die menschliche Spongiosa, z.B. Bio-Oss, Cerasorb, BioBase etc. Durch die weitmaschigen Poren wird das Einwachsen neuer Knochenformationen gefördert. Im weiteren Verlauf bauen Osteoblasten und Osteoklasten das Material um oder scheiden es in neue Knochenmatrix ein. Dies bezeichnet man als physiologisches Remodeling.

1.4.1 Auszug einiger der auf dem Markt befindlichen Knochenersatzstoffe:

Materialgruppe	Produkt	Hersteller/ Vertreiber
Hydroxylapatit	Osteograf N	Friadent GmbH, Mannheim
	Ostim	Heraeus Kulzer, Hanau
	Bio-Oss	Geistlich, Wollhusen, Schweiz
	Bio-Oss Collagen	Geistlich, Wollhusen, Schweiz
	Frios Algipore	Friadent GmbH, Mannheim
	Navigraft	Tutogen, Neunkirchen
α-Trikalziumphosphat	BioBase	Centerpulse, Freiburg
β-Trikalziumphosphat	Cerasorb	Curasan AG, Kleinostheim
	Fortoss Resorb/ Vital	Dr. Selbach, Hamburg
	Ceros TCP	Thommen Medical, Weil a. R.
	ChronOs	Mathys, Bochum
	K.S.I.-Tricalciumphosphat	K.S.I., Bad Nauheim
Ölige Calciumhydroxid-suspension	Osteoinductal	Osteoinductal Dietz GmbH, München

Tabelle 6: Auszug einiger auf dem Markt befindlicher Knochenersatzmaterialien

Erste Experimente mit Kalziumphosphatverbindungen für den synthetischen Knochenersatz wurden in den 70er Jahren unter Annäherung an die stöchiometrische Zusammensetzung der in humanem Knochen vorkommenden Verbindungen Hydroxylapatit (HA) und Trikalziumphosphat (TCP) durchgeführt (Refior et al. 1998).
Für alle Arten der Knochenersatzmaterialien gilt, dass die Partikelgröße des Materials einen Einfluss auf die Integration in das Gewebe hat.

Zu kleine Partikel (< 120 µm) werden phagozytiert und bieten somit nicht hinreichend lange eine Platzhalter- oder Leitstruktur für die physiologisch nachwachsenden Gewebeanteile. Die Größe der Partikel variiert je nach Hersteller zwischen 250 bis 2000 µm (Lynch 1999; Herstellerinformation 2000).
Das Oberflächenrelief der Partikel entscheidet über den knöchernen Einbau (bony ongrowth), die innere Struktur bestimmt den knöchernen Durchbau (bony ingrowth) des eingesetzten Materials. Letzteres ist nur bei porösen Substraten gut gewährleistet. In Bezug auf die Dimensionierung (Porengröße, Porenkonnektivität) stellt die natürliche Knochenspongiosa eine Idealstruktur dar, an der sich die Entwicklungen und Verbesserungen der Materialien ausrichten.

1.5 Problemstellung und Ziele der Arbeit

Aus den bisherigen Ausführungen wird deutlich, dass nach wie vor kein optimales Knochenersatzmaterial zur Behandlung knöcherner Defekte im Rahmen zahnärztlicher Eingriffe verfügbar ist. Es scheint jedoch gesichert, dass eine optimale Biokompatibilität, ein enger Verbund zwischen Knochen und Knochenersatzmaterialien und eine Wirkung als Leitschiene für den neuzubildenden Knochen Mindestvoraussetzungen für eine erfolgreiche therapeutische Anwendung darstellen.

Der klinische Erfolg eines Transplantates ist in erster Linie vom Wachstumsverhalten der Zellen in der direkten Umgebung an der Grenzfläche zwischen Implantat und Wirtsgewebe abhängig. Dabei spielen physikalische Eigenschaften der Knochenersatzmaterialien wie z.B. die chemischen und morphologischen Charakteristika der Oberfläche eine wesentliche Rolle. Diese spezifischen Eigenschaften eines Materials können an der Implantationsstelle zellvermittelte Abwehrreaktionen in Form von Entzündungsreaktionen hervorrufen. Die Abgabe von zytotoxischen und korrosiven Stoffen aus dem Implantationsmaterial kann zur Bildung von fibrösem Gewebe auf der Substratoberfläche führen. Daher ist ein direkter Knochen-Biomaterialverbund bei der klinischen Anwendung erstrebenswert (Yildirim 2002).

Eine neue Möglichkeit der Herstellung von Implantaten aus körpereigenen Bestandteilen eröffnet das so genannte „Tissue engineering“. Hierbei werden, wie bereits unter 1.2 erwähnt, dem Patienten im Rahmen einer Biopsie unter lokaler Anästhesie autogene

Zellen entnommen und im Zellkulturlabor vermehrt. Sobald eine ausreichende Proliferation von Zellen erreicht ist, wird ein dreidimensionales Trägergerüst („Scaffold“) mit den Zellen besiedelt und die Kultur mehrere Tage bis Wochen fortgesetzt. Das kultivierte Matrix-Zell-Konstrukt wird schließlich in den jeweiligen Hart- oder Weichgewebsdefekt desselben Patienten rücktransplantiert. In den folgend aufgeführten Untersuchungen stellen die nach bestimmten Kriterien ausgesuchten Biomaterialien das Trägergerüst dar, das die körpereigene extrazelluläre Matrix als Vorbild hat. Das mit Zellen besiedelte Grundgerüst verleiht dem Gewebe zunehmende Struktur und Stabilität und wird schrittweise abgebaut, so dass nach vollständiger Resorption des „Scaffolds“ nur das mittels Tissue engineering generierte Gewebe zurückbleibt (Vacanti et al. 1988; Langer et al. 1995).

In der vorliegenden Untersuchung soll das Wachstumsverhalten von Osteosarkomzellen, primären Osteoblasten und Knochenmarkstammzellen durch in-vitro Experimente auf fünf verschiedenen Knochenersatzmaterialien beobachtet werden. In diesem Zusammenhang wird verschiedenen Fragestellungen nachgegangen:

1) Wie verhalten sich Knochenersatzmaterialien unter den standardisierten Bedingungen eines in-vitro-Modells mit Osteosarkomzellen, primären Osteoblasten und Knochenmarkstammzellen bezüglich ihrer Biokompatibilität?

2) Ist das Wachstumsverhalten bzw. die Adhäsion der auf den Knochenersatzmaterialien kultivierten Zelltypen unterschiedlich?

3) Kann durch Kombination von alloplastischen Materialien mit Proteinsequenzen bzw. Reinkollagen eine Verbesserung der Zellproliferation erreicht werden?

4) Sind auch neuere Präparate in Pastenform für die Verwendung als Träger für Knochenzellen geeignet?

5) Sind die verschiedenen zu testenden Materialien in der Lage, eine osteoblastäre Differenzierung von Stammzellen zu induzieren?

2. Material und Methoden

2.1 Experimentelle Untersuchungen

Gegenstand der Studie war, das Wachstumsverhalten von primären Osteoblasten (Prim.-Osteos.), Osteosarkomzellen (SaOs-2-Zellen), sowie Knochenmarkstammzellen (KMS-Zellen) auf fünf gängigen Knochenersatzmaterialien zu untersuchen. Die Proliferation wurde mittels CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay (ATP-Assay), (Promega Corporation, Madison, USA) an t = 0, 3, 6, 10 und 14 Tagen gemessen. Die osteoblastäre Differenzierung wurde durch den Nachweis von Osteocalcin (OC) (Osteocalcin-ELISA; Gla-type Osteocalcin EIA KIT, TaKaRa, Göttingen) im Kulturüberstand der Zellen und einer histochemischen Anfärbung der Alkalischen Phosphatase (AP), ebenfalls an t = 0, 3, 6, 10 und 14 Tagen, überprüft. Zuletzt erfolgte nach t = 14 Tagen eine rasterelektronenmikroskopische (REM) Beurteilung der Zellmorphologie auf den genannten Biomaterialien.

	2 h	**3 d**	**6 d**	**10 d**	**14 d**
SaOs-2-Zellen, Prim.-Osteos., KMS-Zellen	ATP-Assay	ATP-Assay	ATP-Assay	ATP-Assay	ATP-Assay
SaOs-2-Zellen, Prim.-Osteos., KMS-Zellen	OC-ELISA	OC-ELISA	OC-ELISA	OC-ELISA	OC-ELISA
SaOs-2-Zellen, Prim.-Osteos., KMS-Zellen	AP	AP	AP	AP	AP
SaOs-2-Zellen					REM

Tabelle 7: Übersichttabelle der Hauptversuche

2.2 Verwendete Materialien

2.2.1 Auswahl der Knochenersatzmaterialien

In der vorliegenden Untersuchung wurden folgende fünf Knochenersatzmaterialien untersucht:

Material-klasse	Produkt	Hersteller	Partikel-größe	Material-ursprung
Alloplastisch	Cerasorb®	Curasan Pharma GmbH, Kleinostheim	1000-2000µm	β-Tricalcium-phosphat, phasenrein
	Osteoinductal®	Osteoinductal Dietz GmbH, München	Ölige Suspension	Kalzium-hydroxid Sus-pension und Schweineklau-enöl
Xenogen	Bio-Oss Spongiosa®	Geistlich Pharma AG, Wollhusen, Schweiz	1000-2000µm	Bovines Hydroxylapatit
	Bio-Oss Collagen®	Geistlich, Phar-ma AG, Wollhusen, Schweiz	Schwamm	Bovines Hydroxylapatit + 10% Kollagen
	PepGen P-15®	Ceramed Dental, L.L.C. Lakewood, USA	250-420µm	Bovines Hydro-xylapatit + P-15 (synthetisches Peptid aus 15 Aminosäuren)

Tabelle 8: Auflistung der in der Studie verwendeten Knochenersatzmaterialien

Cerasorb® als Vertreter der alloplastischen Knochenersatzmaterialien ist ein vollsynthetisch hergestelltes, resorbierbares Granulat aus β-Trikalziumphosphatkeramik. Es ist phasenrein und reagiert pH-neutral. Es ist vollständig resorbierbar und besitzt eine interkonnektierende Mikroporenstruktur. Cerasorb ist in vier verschiedenen Korngrößen erhältlich: 50-150 µm, 150-500 µm, 500-1000 µm, **1000-2000 µm**.

Osteoinductal® ist eine relativ neue auf dem Markt befindliche zahnärztlich-chirurgische Suspension aus Kalziumhydroxid und Schweineklauenöl (flüssige und feste Kohlenwasserstoffketten mit Glycerin veresterte Fettsäuren). Das alloplastische Knochenersatzmaterial ist laut Hersteller vollständig resorbierbar und ist als cremige Konsistenz (Osteoinductal I) oder knetbare Konsistenz (Osteoinductal II, Spezial) verfügbar. In dieser Studie wurde Osteoinductal I verwendet.

Das bovine **Bio-Oss®** ist eines der am häufigsten verwendeten Vertreter der xenogenen Knochenersatzmaterialien. Es besteht aus einer deproteinisierten, hitzesterilisierten, anorganischen Knochenmatrix mit weitmaschig interkonnektierender Porenstruktur. Es ist als Spongiosablock und als Spongiosa- bzw. Kortikalisgranulat in den Partikelgrößen 0,25-1,0 mm sowie **1-2 mm** erhältlich.

Das ebenfalls bovine **Bio-Oss Collagen®** besteht aus Bio-Oss Partikeln kombiniert mit 10% Kollagen. Das im Herstellungsverfahren sekundär zugefügte Kollagen soll den Zellen eine bessere Zelladhäsion ermöglichen.

PepGen P-15® ist ein reines, poröses Hydroxylapatit bovinen Ursprungs, welches die vollsynthetisch hergestellte Aminosäurekette P-15 enthält. Es handelt sich um Polypeptid-Alpha-Ketten, aus deren Verdrillung das sog. Prokollagen (eine Vorstufe von Kollagen) entsteht. Die Sequenz P-15 soll den für die Zellbindung verantwortlichen Bereich enthalten. Die PepGen-Partikel verfügen über eine interkonnektierende Porenstruktur, sind abgerundet und haben eine Größe von **250-420 µm**.

Kontrolle: Bei allen Versuchsansätzen wurden als Positivkontrolle die Zellen auf Zellkulturschalen aus Polystyrol kultiviert.

2.2.2 Zellen und Zellkultur

2.2.3 Verwendete Zellen

SaOs-2-Zellen: Osteosarkomzellen, “osteoblast-like-cells“, ACC Nr. 243, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig.
Diese Form von immortalisierten Knochenzellen sind für ein Screening Verfahren besonders gut geeignet, weil sie eine sehr anspruchslose und schnelle Zellkulturanzucht erlauben und aufgrund ihrer sarkomatiösen Herkunft keinen Passagierveränderungen unterliegen.

Primäre Osteoblasten aus Kieferkammknochen: charakterisiert mittels PCR und Immunhistologie als Osteoblasten (Chiriac et al. 2005).
Die Osteoblasten sind aus Knochenspänen gewonnene Knochenzellen und werden als Primärkultur bezeichnet. Mithilfe der in-vitro Kultur mit Osteoblasten kann die Biokompatibiltät eines Knochenersatzmaterials überprüft werden, ohne dass Interferenzen mit systemischen Faktoren, wie sie in-vivo vorhanden sind, auftreten (Tsuang et al. 1997). Die in-vitro Kultur mit einer reinen Osteoblastenpopulation scheint hinsichtlich der klinischen Aussagekraft einige Vorteile zu besitzen (Trentz et al. 1998), da die Knochenmatrixproduktion von diesem Zelltyp ausgeht.

Knochenmarkstammzellen (KMS): Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika (ITZ) Prof. Dr. Wernet, PD Frau Dr. Kögler, Universitätsklinikum, Düsseldorf.
Mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark können unter geeigneten Kulturbedingungen in-vitro zu Knochen-, Knorpel-, Fett- und Muskelgewebe differenzieren. Dieser interessante Aspekt lässt hinsichtlich unserer Studie auf die osteoinduktiven Eigenschaften von Knochenersatzmaterialien rückschließen. Die Funktion dieser Zellkultur ist innerhalb dieser Arbeit ein besonderes Augenmerk zu widmen.

U-937 Zellen: Suspensionszellen, die zur Reihe der Myelo-Monozytären Zelllinien gehört. ACC Nr. 5; Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig.
Diese Suspensionszellen sind nicht adhärent und brauchen daher für ihre Proliferation keine Anheftung an einer Oberfläche. Der Teilungsgrad dieser Zelllinie ist sehr hoch.

Sie dienen der Überprüfung löslicher zytotoxischer Bestandteile in den Knochenersatzmaterialien.

2.2.4 Zellkulturreagenzien

- DMEM 1g/l Glucose Gibco, Karlsruhe; Art. Nr. 21885-025
- Fetales Kälberserum (FKS) Gibco, Karlsruhe; Art. Nr. 10270-106
- Penicillin Streptomycin Lösung 10000U/ml Gibco, Karlsruhe; Art. Nr. 15140148+
- DMSO Sigma; Sigma-Aldrich, Taufkirchen
- EDTA (Versen) 1% Biochrom AG, Berlin; Art. Nr. L2113
- PBS Gibco, Karlsruhe; Art. Nr. 14190094

2.2.5 Nachweismaterialien und Gebrauchslösungen

- Osteocalcin-ELISA, Gla-Type Osteocalcin EIA Kit, TaKaRa, Art. Nr. MK111, Mo Bi Tec, Göttingen
- Alkalische Phosphatase, Sigma 86R AP Leukocyte Kit, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
- Levamisol, Sigma L-9756, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
- ATP-Assay, Cell Titer-GloLuminescent Cell Viability Kit, Art. Nr. C-7026, Promega GmbH, Mannheim
- Promega SV Total RNA Isolation System, Kat. Nr. Z3100
- Promega Reverse Transcription System, Kat. Nr. A-3500
- Neubauer-Zählkammer, VWR International, Darmstadt
- DMSO Sigma; Sigma-Aldrich, Taufkirchen
- Trypanblau-Lösung 0,4% Gibco, Karlsruhe; Art Nr. 15250-061
- 4% Paraformaldehyd (mit Methanol stabilisiert) CHB 6452038; Otto Fischer GmbH, Saarbrücken
- 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 IgG1, 1mg/ml Acris BM 2002;

DPC Biemann, Bad Nauheim
- Negativ-Kontrolle: Mouse IgG1 Dako X 0931; DakoCytomation, Hamburg
- Sekundär AK: Anti-Goat, Mouse, Rabbit IgGs, biotiniliert DAKO E 0453; Dako-Cytomation, Hamburg
- Peroxidase-Conjugated Streptavidin DAKO P 0397; DakoCytomation, Hamburg
- AEC Substrate-Chromogen System, DAKO K 3464; DakoCytomation, Hamburg
- Hematoxylin Dako S 2020; DakoCytomation, Hamburg
- Crystal Mount Aqueous Mounting Medium Sigma C 0612; Sigma-Aldrich, Taufkirchen
- 4% Glutaraldehyd; Carl Roth GmbH, Karlsruhe
- Ethanol(>99,9%); Carl Roth GmbH, Karlsruhe
- Hexamethyldisilazan (HMDS); Carl Roth GmbH, Karlsruhe
- Agarose-Gel (2%)
- TrisAcetat EDTA (TAE-Puffer)

2.2.6 Geräte und Zellkulturzubehör

- Durchlichtmikroskop Olympus BX 50; Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
- Photokamerasystem Olympus Color View III; Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
- LuminometerTop Count; Canberra Packard GmbH, Dreieich
- ELISA-Reader Emax; Molecular Devices GmbH, Ismaning/ München
- Pipetten, 10-200µl; Eppendorf, Hamburg
- Pipettierspitzen; Eppendorf, Hamburg
- Rnase freie Eppendorf Tubes; Eppendorf, Hamburg
- Autoklav; Westima-Moller KG, Köln
- MIDI 1-Elektrophoresekammer, N 576.1; Roth, Karlsruhe
- Power Supply 835 Elektrophorese-Stromversorger; A 545; Roth, Karlsruhe
- Magnetrührer REO, 9699.1; Roth, Karlsruhe
- Mikroprozessor pH-Meter Hydrus 300; Fisher Scientific GmbH, Schwerte
- Thermocycler/Thermoblock
- Tischzentrifuge Heraeus Biofuge A; Heraeus Kulzer GmbH & Co. KG, Hanau
- Waage ED 200; Shiamadzu GmbH, Duisburg

- Zellkulturflaschen; Nunc, Wiesbaden
- Kryo Tubes; Nunc, Wiesbaden
- Culture Slides (aus Polysterol); Nunc, Wiesbaden
- Non-binding Plates, Corning Costa
- Wellplatten (24er/96er); Nunc, Wiesbaden
- Membranen/ Membranhalter; Nunc, Wiesbaden
- Reaktionsgefäße; Eppendorf, Hamburg
- Deckgläser, Menzel-Gläser, Braunschweig
- Brutschrank CO2-Auto-Zero; Heraeus Kulzer GmbH & Co.KG, Hanau
- Lichtgeschützte feuchte Kammer (Eigenbau)
- Low Voltage Cool Sputter Coater (mit Goldelektrode)
- Rasterelektronenmikroskop Zeiss DSM 950; Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
- Mikrowellengerät, Siemens

2.3 Zellkultur

2.3.1 Kultivierung der Zellen

Die tiefgefrorenen Zellen wurden im Wasserbad aufgetaut, 10 ml Vollmedium wurden zugegeben und 8 min bei 200 g zentrifugiert. Für alle Zelllinien wurde das gleiche Vollmedium verwendet.

Vollmedium:
- 90% DMEM low Glucose
- 1% Penicillin/Streptomycin
- 10% fetales Kälberserum (FKS)

Das nach der Zentrifugation erhaltene Zellpellet wurde in 1-2 ml Medium resuspendiert und in Zellkulturflaschen überführt.
Mit dem Ziel, eine für die Versuche ausreichende Zellzahl zu erhalten, wurden die Zellen jeweils bis kurz vor Erreichen der Konfluenz unter standardisierten Bedingungen (37 °C/ 5,5% CO2/ 100% Luftfeuchtigkeit) vermehrt. Der Mediumwechsel erfolgte alle 2 bis 3 Tage. Zur Charakterisierung wurden die Zellen mittels Osteocalcin PCR überprüft.

2.3.2 Passagieren der Zellen

Das Splitintervall betrug in der Regel 7 Tage. Die Zellen wurden mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS; pH-Wert von 7,2-7,4) und EDTA, final 0,1%, passagiert. Zuvor wurde das Medium abgesaugt, die Zellkulturflaschen mit PBS gespült, die EDTA Lösung hinzugegeben und anschließend für 20 min im Brutschrank inkubiert. Nach mikroskopischer Kontrolle des Ablösungszustandes, wurde die Zellkulturflasche bewegt, um die adhärenten Zellen vom Boden zu lösen. Die Zellsuspension wurde mit PBS nachgespült und die Spüllösung ebenfalls in den Zellüberstand eingefüllt. Danach wurden die Zellen erneut für 8 min zentrifugiert.
Nach Überprüfung des Zellpellets wurde der Überstand abgesaugt und im Falle des Splittvorgangs mit Vollmedium resuspendiert, in Zellkulturflaschen eingefüllt und nach mikroskopischer Beurteilung erneut im Brutschrank inkubiert.

2.3.3 Zählen und Einfrieren von Zellen

Für das Einfrieren von Zellen erfolgte das Prozedere ähnlich wie beim Passagieren der Zellen, nur dass die Zellen nach Zentrifugation gezählt wurden. Der Überstand wurde nach der Zentrifugation abgesaugt und den Zellen 1 ml frisches Medium zugesetzt. Der Farbstoff, der das Zählen der Zellen ermöglichte, war Trypanblau. In einem 1:1 Mischverhältnis wurden 50 µl Zellsuspension mit 50 µl Trypanblau gemischt, und auf die Neubauer-Zählkammer pipetiert und gezählt.

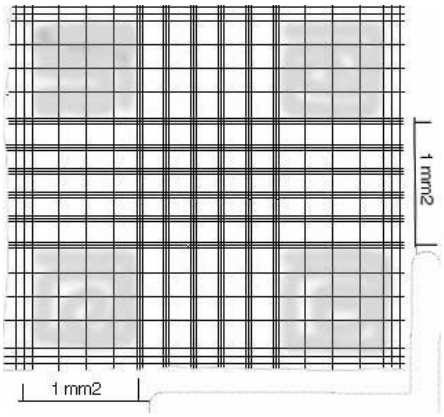

Abb. 2: Zählfeld einer Neubauer-Zählkammer

Die Zellen wurden über den aus sechzehn Quadraten zusammengesetzten Großquadraten in den Ecken des Zählfeldes ausgezählt. Die Ränder der Großquadrate sind beim

Typ "improved" durch Dreifachlinien markiert. In jedem Quadrat wurden Zellen mitgezählt, die auf der jeweiligen linken oder oberen Linie liegen; Zellen auf der rechten oder der unteren Linie wurden nicht mitgezählt. Das Zytoplasma vitaler Zellen war hell durchscheinend, abgestorbene Zellen füllten sich mit dem zugesetzten Azofarbstoff Trypanblau und erschienen daher dunkler. Die Vitalität war größer oder gleich 95%.
Der aus 16 Quadranten daraus errechnete Mittelwert multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor, multipliziert mit 10^4, ergab die Zellzahl pro ml. Die absolute Zellzahl war das Ergebnis aus Zellzahl pro ml multipliziert mit dem Gesamtvolumen.
Nachdem die Zellzahl errechnet und die Kryo-Tubes mit der Anzahl beschriftet, wurde die Zellkultur mit einem definierten Vollmediumvolumen resuspendiert und in Kryo-Tubes eingefüllt. Die Zellen wurden 1:1 mit Freeze-Medium gemischt und bei -80 °C eingefroren. Für eine längere Lagerfähigkeit wurden die Zellen nach einem Tag in flüssigen Stickstoff überführt.

Freeze Medium:
- 20% DMSO
- 50% FKS
- 40% Vollmedium

2.3.4 Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden aus dem flüssigem Stickstoff entnommen und aufgetaut. Anschließend wurde die aufgetaute Zellsuspension mit Vollmedium suspendiert und für 8 min zentrifugiert und der Überstand abipettiert. Nach Überprüfen des Zellpellets wurde die Zellsuspension in einer definierten Menge Vollmedium resuspendiert, auf ZK-Flaschen ausgesät und im Brutschrank inkubiert.

2.4 Charakterisierung primärer Osteoblasten und Osteosarkomzellen

2.4.1 Kontrolle der Spezifität der primären Osteoblasten mittels PCR und Immunhistologie

2.4.2 Methode der RNA-Isolation mit primären Osteoblasten

Für die RNA-Isolation waren mindestens $4x10^5$ Zellen notwendig. Das Zellvolumen wurde im Eppendorf-Cap zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abpipettiert. Die Zellen wurden mit 175 µl RNA-Lysis Puffer lysiert, resuspendiert und gemischt.

Nach Zugabe von 350 µl SV RNA Dilution Buffer wurde die Lösung auf dem Heizblock bei 70 °C für 3 min inkubiert. Die ausgefällten Proteine wurden bei 12-14.000 g für 10 min bei RT zentrifugiert und der Überstand mit 200 µl Ethanol gemischt. Die Lösung wurde auf die Säule (Spin Column) gegeben und wiederum bei 12-14000 g für 1 min bei RT zentrifugiert. Die Durchflusslösung wurde verworfen und 600 µl SV RNA Wash Solution (+ Ethanol) zugegeben und erneut zentrifugiert. Zu der DNA Entfernung wurde 50 µl eines vorher fertiggestellten Dnase-Mix zugegeben und für 15 min bei 20-25 °C inkubiert.

DNase Mix : - 40 µl Core Puffer
- 5 µl $MnCl_2$
- 5 µl DNAse I Enzym

Der DNA-Verdau wurde mit 200 µl SV DNase Stop Solution (+ Ethanol) abgestoppt, zentrifugiert und die Durchflusslösung verworfen. 600 µl SV RNA Wash Solution

(+ Ethanol) wurden zugegeben, zentrifugiert und die Durchflusslösung verworfen.
Es wurde erneut mit 250 µl SV RNA Wash Solution (+ Ethanol) gewaschen und zentrifugiert. Die Durchflusslösung wurde verworfen. Im letzten Schritt wurde die RNA mit 35 µl Nuclease-Free Water zentrifugiert. Die Durchflusslösung wurde von der Säule eluiert und erneut zentrifugiert. Die RNA wurde bei -80 °C gelagert.

2.4.3 Methode der Reversen Transkriptase (C-DNA Synthese) mit primären Osteoblasten

Bei diesem als Reverse Transkription (RT) bezeichneten Prozess, dient die isolierte RNA als Matrize für die Synthese eines doppelsträngigen Nukleinsäurebereiches, der durch die Reaktion von Oligonukleotiden (Oligo dT) mit dem im RNA-Strang vorhandenen polyadenylierten Bereich (Poly A-Schwanz) entsteht.

9,4 µl RNA wurden in 0,2 ml PCR-Tubes gegeben und für 10 min bei 70 °C im Heizblock denaturiert und danach sofort auf Eis abgekühlt. Der zuvor hergestellte Mastermix bestand aus:

Mastermix	**Finale Konzentration**
4 µl $MgCl_2$ (2,5 mM)	5 mM
2 µl RT-Puffer (10 x)	1 x
2 µl dNTP-Mix (10 mM)	1 mM
1 µl Rnasin Rnase-Inhibitor 1 U/µl	1 U
1 µl Oligo$(dT)_{15}$ Primer (0,5 µg/µl)	0,025 µg/µl
0,6 µl AMV Reverse Transcriptase (250/µl)	15 U
Gesamtvolumen	**10,6 µl**

Tabelle 9: Mastermix für die Reverse Transkriptase

Der Mastermix wurde zu den Tubes mit der RNA-Lösung dazugegeben, gevortext und für 30 min bei 43 °C inkubiert. Danach wurde der Mix bei -20 °C gelagert.

2.4.4 Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Zur Analyse der mRNA-Expression wurde eine Methode verwendet, die die Reverse Transkription (RT) mit der Polymerasekettenreaktion (PCR) verbindet. Hierbei wird die mRNA durch die Reverse Transkriptase in eine komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben, die dann als Template für die nachfolgende PCR dient.

Bei der von Mullis (1987) entwickelten Methode der PCR handelt es sich um eine enzymatische DNA-Vervielfältigung, bei der in-vitro in mehreren Schritten spezifische Primer (Oligonukleotide) entlang der Matrizen-DNA verlängert werden, so dass Nukleotidstränge definierter Länge und Sequenz angereichert werden. Die Temperatur des Thermoblocks wechselt dabei periodisch, so dass die entstandenen DNA-Doppelstränge wieder denaturiert werden, die Primer sich erneut an die Einzelstränge anlagern und diese verlängern können. Bei dieser Methode wird die Hitzestabilität des Enzyms Taq-Polymerase, welches aus dem Bakterium Thermophilus aquaticus isoliert wurde, ausgenutzt, dessen Temperaturoptimum über 70 °C liegt. Bei jedem Reaktionszyklus, bestehend aus Denaturierung, Primeranlagerung und Auffüllreaktion, kommt es zu einer exponentiellen, etwa 10^6-10^7fachen Anreicherung dieser durch die Primer flankierten DNA-Fragmente (Mullis und Faloona 1987).
Nach gelelektrophoretischer Auftrennung des Reaktionsgemisches sind die amplifizierten DNA-Fragmente als Banden vor dem Hintergrund der nicht amplifizierten DNA-Bereiche zu erkennen.

2.4.5 Osteocalcin-Polymerase Kettenreaktion (Osteocalcin-PCR)

Zur Amplifizierung der Osteocalcin DNA-Fragmente der neu synthetisierten cDNA wurde eine PCR durchgeführt.

Primer-Sequenzen für humanes Osteocalcin:

forward: CCA AGC AGG AGG GCA GCG AGG TAG TGA
reverse: CAG GGC AAG GGC AAG GGG AAG AAG AA

Die Produktgröße betrug 277bp.
Die zu dem Reaktionsgemisch einzusetzenden Mengen der einzelnen Komponenten:

Komponente	Menge Konzentrationen	Stamm-lösung	Verd.-Faktor	Master-mix (25 µ)
cDNA-Matrize	1 µg RNA entspricht: ->cDNA/25 µl			1-3 µl
Primer F	0,5 µM	50 µM	1:100	0,25 µl
Primer R	0,5 µM	50 µM	1:100	0,25 µl
DNTPs	0,2 mM	10 mM	1:50	0,5 µl
$MgCl_2$	2,5 mM	25 mM	1:10	2,5 µl
Taq-Polymerase Promega Art.Nr.11302505	1 Unit	5 U/µl	1:125	Hot-Start 2,5 µl
Promega Reaktionspuffer Art.Nr.10275043	1 x	10 x	1:10	2,5 µl

Tabelle 10: Mastermix für die Osteocalcin-PCR

Zu dem Reaktionsgemisch wurden 1-3 µl der synthetisierten cDNA zugegeben.

Schritt- Nr.	Bezeichnung	Temperatur (°C)	Zeit (Min)
1	Denaturierung	95	3
2	Denaturierung	94	0´30
3	Primer-Hybridisierung	55	0´30
4	Primer-Extension	72	1
	Wiederholung der Schritte 2 bis 4	33x	
5	Primer-Extension	72	10
6	Abkühlung und Lagerung	4	

Tabelle 11: PCR-Programm

Die DNA wurde für 3 min bei 95 °C denaturiert, der anschließende Reaktionszyklus aus Denaturierung, Primer-Anhybridisierung und Verlängerung wurde entsprechend der Primer-spezifischen Zyklenzahl wiederholt (siehe Tabelle 10). Abschließend wurde das PCR–Gemisch inkubiert und dann gelelektrophoretisch aufgetrennt. Als interne Kontrolle wurde eine HPRT-PCR, welches als Housekeeping-Gen diente, durchgeführt.

2.4.6 Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte

Zur elektrophoretischen Trennung der amplifizierten PCR-Produkte wurde ein 2%iges Agarose-Gel (1 g Agarose, 50 ml TAE-Puffer) verwendet, welches mit 1 µl Ethidiumbromid versetzt wurde. Je 25 µl der PCR-Proben wurden mit 5 µl eines Auftragepuffers gemischt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophoresekammer war mit 50fach verdünntem TAE-Puffer [Gebrauchslösung: 0,04 mol/l Trisacetat, 0,001 mol/l EDTA; Konzentrierte Stammlösung: 242 g Trisbase, 57,1 ml Eisessig, 100 ml 0,5 mol/l EDTA (pH 8,0)] gefüllt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 120V und 50mA für 20 min. Im UV-Transluminator wurden die entstandenen Banden sichtbar gemacht und dokumentiert.

2.5 Immunhistochemischer Osteocalcinnachweis von Osteosarkomzellen und primären Osteoblasten

Die Zellen (SaOs-2-Zellen und primäre Osteoblasten) wurden in Culture Slides mit einem finalen Volumen von 1 ml angezüchtet. Nach t = 1, 3, und 6 Tagen wurde der Zellüberstand genommen, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 4%igem Paraformaldehyd (PFA) in PBS für 10 min bei 4 °C fixiert. Alle weiteren Schritte erfolgten in einer feuchten Kammer bei RT. Die Culture Slide Kammern wurden in den nachfolgenden Arbeitsgängen mit 350 µl Volumen befüllt.

Nach einem dreimaligen Waschschritt mit PBS wurde die endogene Peroxidase mit 1% H_2O_2 in PBS geblockt und für 5-10 min inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und die unspezifischen Bindungsstellen mit Protein Block Serum-free Reagent für 15 min geblockt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem primären Osteocalcin Antikörper (AK) (1:50) in Antibody Diluent für mindestens 60 min.

Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde der sekundäre Antikörper, Anti-Goat, Mouse, Rabbit IgGs, biotiniliert (1:60) in AK-Verdünnungslösung für mindestens 60 min aufgetragen. Es folgte ein dreimaliger Waschschritt mit PBS und Zugabe von Peroxidase-Conjugated Streptavidin (1:300) verdünnt in Antibody Diluent für 15 min.
Die Culture Slides wurden dreimal mit PBS gewaschen und mit AEC Substrate-Chromogen System für 5-30 min unter mikroskopischer Kontrolle bei RT inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit PBS gewaschen.

Die Gegenfärbung erfolgte mit Gill`s Hämatoxilin. Die Zellen wurden mit Leitungswasser differenziert. Die Culture Slides wurden mit Kaisers Glyceringelantine Merck eingedeckelt und für ca. 12 Sekunden ohne Metalldeckel in der Mikrowelle bei 800 Watt erhitzt.

2.5.1 Bestimmung der eingesetzten KEM-Menge

Im Vorfeld wurde die mg-Menge der einzusetzenden KEM festgelegt (siehe Tabelle 9).

Es wurde soviel KEM in ein Well gefüllt, dass sie einheitlich den Boden der Wells bedeckten. Diese Menge wurde anschließend ausgewogen, um das eingesetzte KEM Volumen in mg bestimmen zu können.

Knocheneratz-material	Gewicht in mg			Mittelwert in mg	Standard-abweichung
Cerasorb	40,7	58,9	48,0	49,2	9,2
Osteoinductal	25,9	25,6	14,8	22,1	5,2
Bio-Oss Spongiosa	15,4	16,1	19,1	16,9	1,6
Bio-Oss Collagen	19,9	17,7	20,5	19,4	1,2
PepGen P-15	27,1	33,3	32,2	30,9	2,7

Tabelle 12: Mengenangabe der Knochenersatzmaterialien

2.5.2 Beweis der Proportionalität

Für die im Hauptversuch durchgeführten Messungen des ATP-Gehaltes der Zellen wurde einleitend eine ATP-Standardkurve erhoben. Die Osteosarkomzellen wurden hierfür in einer aufsteigenden Konzentrationsreihe ausgesät und das emittierte ATP-Signal unmittelbar daraufhin gemessen.

2.5.3 Ausschluss etwaiger Verfälschungen der Messungen im Hauptversuch durch KEM

Die Messungen eines Signals durch eventuelle Eigenlumineszenz der Biomaterialien erfolgte ohne Zellen an t = 5 Zeitpunkten. Hier wurde die Höhe des durch die Mediumkontrolle induzierten Grundsignals bestimmt und eine etwaige Eigenlumineszenz der KEM ausgeschlossen.

2.5.4 pH-Wert-Messungen

Für die aus einem Organismus isolierten Zellen muss unter in-vitro-Bedingungen eine Umgebung geschaffen werden, die Proliferation, Wachstum, und ggf. Differenzierung und Ausübung von typischen Zellfunktionen erlaubt. Der pH-Wert, der im Idealfall für nahezu alle Zellen bei 7,2-7,4 liegt, wurde überprüft um den Einfluss der KEM auf den pH-Wert zu bestimmen. Dazu wurden die in Tabelle 9 beschriebene Menge an KEM in Wells gegeben, mit 200 µl PBS befüllt, nach 2 h entnommen und der pH-Wert im PBS mit einer pH-Elektrode bestimmt.

2.6 Hauptversuche

Auf der Basis der, den Vorversuchen zugrunde liegenden Ergebnisse, wurden im Hauptversuch folgende Parameter zu unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt:

1. ATP-Gehalt mit Hilfe des ATP-Assays (n = 6)
2. Osteocalcin (OC)-ELISA (n = 6)
3. Alkalische Phosphatase (AP) (n = 3)
4. REM (n = 3)

	2 h	**3 d**	**6 d**	**10 d**	**14 d**
SaOs-2-Zellen, Prim.-Osteos., KMS-Zellen	ATP-Assay	ATP-Assay	ATP-Assay	ATP-Assay	ATP-Assay
SaOs-2-Zellen, Prim.-Osteos., KMS-Zellen	OC-ELISA	OC-ELISA	OC-ELISA	OC-ELISA	OC-ELISA
SaOs-2-Zellen, Prim.-Osteos., KMS-Zellen	AP	AP	AP	AP	AP
SaOs-2-Zellen					REM

Tabelle 13: Übersichttabelle der Hauptversuche

2.6.1 Adenosintriphosphat (ATP)-Biolumineszenz

Der CellTiter-Glo™Luminescent Cell Viability Assay bestimmt die Konzentration von ATP in den Zellen, die mit der Anzahl metabolisch aktiver Zellen korreliert. Das Verfahren basiert auf eine Luziferase beschleunigte Reaktion von Luciferin und ATP. Luciferasen sind in der Lage, in einer Biolumineszenzreaktion die Umwandlung von bestimmten Substraten unter Zugabe von Luciferin zu katalysieren; dabei wird Adenosintriphosphat (ATP) in Adenosinmonophosphat (AMP) umgewandelt. Das Lichtsignal ist proportional zur ATP-Menge, das wiederum proportional zur Anzahl der Zellen in der Kultur ist. Messungen erfolgten am Tag 0, 3, 6, 10 und 14.

2.6.2 Hauptversuch ATP-Assay mit den fünf Knochenersatzmaterialien

Der Hauptversuch wurde mit allen fünf oben genannten Knochenersatzmaterialien für drei Zelllinien durchgeführt. Der Versuchsansatz für die Osteosarkomzellen, primären Osteoblasten und Knochenmarkstammzellen erfolgte an fünf Zeitpunkten: t = 0, t = 3, t = 6, t = 10, t = 14. Die eingesetzte Zellzahl betrug $1x10^4$ Zellen pro Well einer 96 Well Platte mit einem Gesamtvolumen von 200 µl. Pro Knochenersatzmaterial, Zellkontrolle und Mediumkontrolle wurden n = 6 Wells belegt. Der Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage. Die Knochenersatzmaterialien wurden wie in den Vorversuchen bestimmt, portioniert und in die jeweiligen Wells unter Zugabe von PBS eingebracht. Nach zwei Stunden wurde PBS wieder entnommen und 150 µl Medium dazugegeben. Die für den Versuch bestimmte Zelllinie wurde gezählt und die Zellsuspension vorbereitet.
$1x10^4$ Zellen in 50 µl Medium wurden dazugegeben. An den entsprechenden Messtagen wurde das Medium abgesaugt, 100 µl neues Medium aufgefüllt und 100 µl CellTiterGlo dazugegeben. Der Ansatz wurde 10 min lichtgeschützt bei RT inkubiert.
Das Lichtsignal wurde in 1 Sekunde pro Well in einem Zählgerät gemessen.
Für die Tag 0 Messung wurden lediglich 50 µl Medium vorgelegt, 50 µl Zellsuspension und 100 µl CellTiterGlo.

2.6.3 Potentielle Zytotoxizität der Knochenersatzmaterialien

Zur Überprüfung einer eventuell von den KEM ausgehende Zytotoxizität, welche nicht mit der Oberflächenbeschaffenheit des Materials zusammenhängt, wurden Suspensionszellen verwendet, die sich ohne Anheftung an Oberflächen vermehren. Die Messungen hierfür erfolgten an Tag 0 und Tag 3. Die verwendete Suspensionskultur kann aufgrund ihres spezifischen Proliferationsverhaltens eine Aussage über von den KEM ausgehende lösliche Noxen treffen.

2.6.4 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mittels des Softwarepaketes SPSS 12.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) und dem Tabellenkalkulationsprogramm Excell (Microsoft). Dabei wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen für jeden Parameter pro Prüfkörper errechnet. Zur Untersuchung der Signifikanz der beobachteten Unterschiede kamen Varianzanalysen (ANOVA) zur Anwendung. Das Signifikanzniveau wurde auf $p<0,05$ festgelegt; hierbei wurde $p<0,05$ als signifikant, $p<0,01$ als hochsignifikant und $p<0,001$ als höchst signifikant eingestuft.

2.7 Osteocalcin-ELISA (Enzym linked immuno sorbent assay)

Osteocalcin (OC) ist ein Vitamin K abhängiges, Calcium bindendes Protein, das ausschließlich von Osteoblasten und Odontoblasten produziert wird.
Die Produktion von Osteocalcin kann daher zur Charakterisierung der Zellen als Osteoblasten dienen.

Der Gla-Osteocalcin-ELISA Kit (Gla-type Osteocalcin EIA Kit Manual, TaKaRa, Göttingen) basiert auf der Sandwich Methode (Zweischrittassay).
Zu dem auf der Mikrotiterplatte festgebundenen Osteocalcin-Antikörper wird die Antigen Lösung, entweder die zu testende Probe oder Standard Gla-Osteocalcin, zugegeben und inkubiert. Das Substrat O-Phenylendiamin wird zugegeben und von der Peroxidase zu Tetramethylbenzidin umgesetzt, das sich in einer Farbentwicklung blau zeigt. Durch Abstoppen der Enzymreaktion mit H_2SO_4 wird das blaue Farbsignal in ein gelbes, das bei 450 nm messbar ist, umgewandelt.
Mit einem zweiten ebenfalls gegen das Antigen gerichteten Antikörper, der mit einem Enzym Peroxidase markiert ist, wird das am ersten Antikörper gebundene Antigen markiert. Das gemessene Signal ist direkt proportional der Antigen-Konzentration der Probe.

2.7.1 Vorbereitungen für den Osteocalcin-ELISA

Solution 1:

Rekonstitution von Antibody-POD-Lsg. (Vial 2) in 11 ml destilliertem Wasser, 10 min stehen lassen, zwischendurch vorsichtig schütteln, aliquotieren à 1,5 ml und tieffrieren bei -30 °C; Pro Streifen (8 Wells) wurde ca. 1 ml benötigt.

Solution 2:

Rekonstitution von Standard (Vial 3) in 1 ml destilliertem Wasser, 10 min stehen lassen, zwischendurch vorsichtig schütteln, aliquotieren à 250 µl und tieffrieren bei -30 °C. Der Standard enthält 16 ng Gla-Osteocalcin/ml.

Standard-Verdünnung:

Der Standard (Solution 2) enthält 16 ng Gla-Osteocalcin/ml.

Konz. Ausgangslsg. ng/ml	Vol. Ausgangslsg. µl	Vol. Diluent Sample 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

Tabelle 14: Standardverdünnung für OC-ELISA

Stopplösung:

1 N H_2SO_4

100 µl Probe bzw. Standard (Solution 2) wurden innerhalb von fünf Minuten in die Wells pipettiert. Die Platte wurde dann mit Folie abgedeckt und für zwei Stunden bei Raumtemperatur (20-25 °C) inkubiert. Danach wurde die Probelösung entfernt und die Platte, bzw. die Wells 3 x mit ca. 400 µl PBS gewaschen. 100 µl der Antibody-POD-Lsg. wurden (Solution 1) zugegeben und die Platte mit Folie abgedeckt. Die Inkubation betrug 1

Stunde bei Raumtemperatur. Die Antibody-POD-Lsg. wurde anschließend entfernt und danach mit ca. 400 µl PBS gewaschen.
100 µl Substrat-Lsg. wurden zugegeben und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Für den letzten Schritt wurde 100 µl der Stop-Lösung (1 N H_2SO_4) dazugegeben und vorsichtig gemischt.
Die Messung erfolgte bei einer Absorption von 450nm, das Signal ist ca. 60 Minuten lang stabil.

2.7.2 Hauptversuch Osteocalcin-ELISA

Vorbereitend für den OC-ELISA wurde während des ATP-Assays an den Messtagen (t = 0, 3, 6, 10 und 14) der Überstand der Wells abpipettiert, in markierte Eppendorf-Tubes gegeben und eingefroren. Dabei wurden die Überstände der 6-fachen Ansätze gepoolt.

2.8 Aktivität der Alkalischen Phosphatase (AP)

Der Nachweis der Alkalischen Phosphatase (ALP) gilt als der geläufigste spezifische Marker für ausdifferenzierte Osteoblasten. Die Osteoblasten weisen ca. das 100fache an ALP-Aktivität gegenüber Zellen aus anderen Geweben auf (Rodan et al. 1988).
Der Nachweis, dass es sich bei den zu untersuchenden Primärkulturen um Osteoblasten handelt, wurde enzymhistochemisch durch den Nachweis der alkalischen Phosphatase geführt. Die alkalische Phosphatase ist ein zellmembrangebundenes Glykoproteinenzym und wird von den Osteoblasten während der Knochenneubildung in großen Mengen produziert.

Bereits im Jahre 1923 wurde dem Enzym eine Rolle im Knochenstoffwechsel zugeschrieben (Robinson 1923). Es soll Phosphattransferase-Reaktionen katalysieren und an der Akkumulation von Phosphationen in der Kollagenmatrix durch Hydrolyse organischer Phosphate beteiligt sein, womit der Mineralisationsprozess initiiert wird (Beertsen, van den Bos 1992).
Somit dient AP als osteoblastischer Differenzierungsmarker und seine Quantifizierung ermöglicht eine genauere Bestimmung des Differenzierungsprozess in-vitro.

2.8.1 Hauptversuch Alkalische Phosphatase

Für den Nachweis der Alkalischen Phosphatase (AP) wurde das “Fast Red Substrate System“ der Firma Sigma verwendet. AP katalysiert die hydrolytische Spaltung von Phosphorsäureestern. Die Spaltprodukte werden durch den Zusatz von Fast Red als rotes Pigment sichtbar gemacht (Young 1990).

Die Zellen wurden mit einer Dichte von 10.000 Zellen pro Einzelkammer auf ein finales Volumen von 1 ml auf die Tissue-Culture Slides mit den Biomaterialien ausgesät und über einen Zeitraum t in Kultur gehalten. Die KEM wurden in 8er Chamber Slides gegeben, wobei zwei Chambers pro KEM gefüllt wurden. Die Zellen wurden mit einem Endvolumen von 300 µl pro Chamber dazupipettiert. Nach t = 3, 6, 10 und 14 Tagen wurde der Zellüberstand abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen.

Zum Nachweis der Alkalischen Phosphatase wurde folgende Färbelösung hergestellt:

- 22,2 µl Sodium Nitrite Solution
- 22,2 µl FRV-Alkaline Solution
- 1 ml Aqua dest.
- 22,2 µl Naphtol AS-BI Alkaline Solution

Die Zellen wurden einmal in PBS gewaschen und dann für 30-40 sec in 4% Formaldehyd fixiert. Es erfolgte ein dreimaliges Waschen mit Aqua dest.. Danach wurde die Färbelösung zugesetzt und für 15 min inkubiert, bis ausreichend Färbung mikroskopisch sichtbar war. Bevor die Kammerseiten abgetrennt wurden, wurde dreimal mit Aqua dest. gewaschen. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hematoxilin für 2 min und darauffolgender Differenzierung mit Leitungswasser. Zum Schluss wurden die Culture Slides in Sigma Crystal Mount Aqueous Mounting Medium eingedeckelt.

2.9 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung

Die Morphologie der Zellen auf den Knochenersatzmaterialien wurde im Rastelektronenmikroskop (REM) untersucht. Das REM bietet die Möglichkeit, Oberflächen massiver Präparate abzubilden. In einer Vakuumkammer wird die Probenoberfläche mit einem gebündelten Elektronenstrahl abgerastert. Das Relief der Probenoberfläche bewirkt eine charakteristische Reflexion der Elektronen. Durch die so entstehenden Sekundärsignale wird die Helligkeitsmodulation einer Bildschirmröhre gesteuert, auf der ein Abbild der Probenoberfläche entsteht.

2.9.1 Hauptversuch: Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der Zellmorphologie von SaOs-2-Zellen

Für die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung wurden zusätzlich Ansätze vorbereitet und nach einer Kulturdauer von t = 14 Tagen für das weitere Vorgehen präpariert.
In einer 24 Well Platte wurden Polycarbonat Membranen eingesetzt. Pro KEM wurden zwei Wells benötigt, mit einem Flüssigkeitsvolumen von je 300 µl.
Jede Probe wurde dreifach mit 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,2, gespült und anschließend mit Hilfe von 3%igem Glutaraldehyd in 0,1 M Natriumphosphatpuffer durch Inkubation bei 4 °C für 15 min fixiert. Darauf folgte erneut eine dreimalige Spülung mit Natriumphosphatpuffer. Die Ansätze wurden anschließend mit Aceton in aufsteigender Konzentration (10% / 50% / 70% / 90%) dehydriert und zum Abschluss dreimal für jeweils 15 min in absolutem Aceton gewaschen. Die Trocknung der Proben erfolgte bei Raumtemperatur nach zweimaliger 5-minütiger Inkubation mit 100%igem Dexamethyldisilizane (DMSO). Die so aufbereiteten Knochenersatzmaterialien wurden auf einem Projektträger aufgeklebt und mittels eines Low Voltage Cool Sputter Coater mit Gold in einer Schichtdicke von 30 nm bedampft. Die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung wurde mit dem Rasterelektronenmikroskop Zeiss DSM 950 unter den Vergrößerungsstufen 200, 500 und 1000 durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der Vorversuche

Im Vorfeld der vorliegenden Studie wurden Daten erhoben, die eine Grundlage für die Hauptergebnisse darstellen.

3.1.1 Standardisierung der ATP-Messung

Die ATP-Standardkurve wurde mit SaOs-Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden hierfür in einer aufsteigenden Konzentrationsreihe ausgesät.
Der ATP Gehalt wird für:

$0{,}1 \times 10^4$	$0{,}5 \times 10^4$	1×10^4	$1{,}5 \times 10^4$
2×10^4	$2{,}5 \times 10^4$	3×10^4	$3{,}5 \times 10^4$
4×10^4	$4{,}5 \times 10^4$	5×10^4	

Tabelle 15: Aufsteigende Konzentrationsreihe der SaOs-Zellen

Zellen/ Well gemessen.

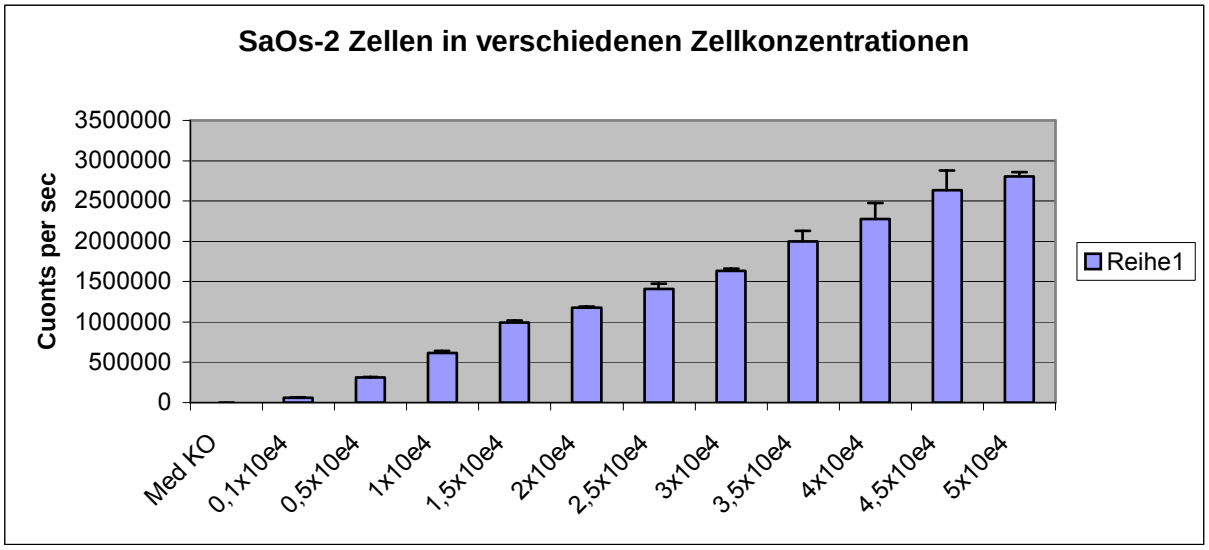

Diagramm 1: ATP-Standardkurve

Das Diagramm zeigt einen proportionalen Anstieg des Signals bei Erhöhung der Zellzahl. Es lässt sich über die Steigung der Geraden ein ATP-Koeffizient von ~1520000 Counts*s^{-1}/10^4 Zellen errechnen. Das empfangene Lumineszenzsignal ist der Zellzahl proportional und kann somit für den Hauptversuch ohne weitere Umrechnung als Maß für die Zellzahl verwendet werden.

3.1.2 Überprüfung der KEM ohne Zellen auf Beeinflussung der Lumineszenzwerte

Die Methode zur Eigenlumineszenzmessung der KEM wird in Kapitel 2.7 beschrieben.

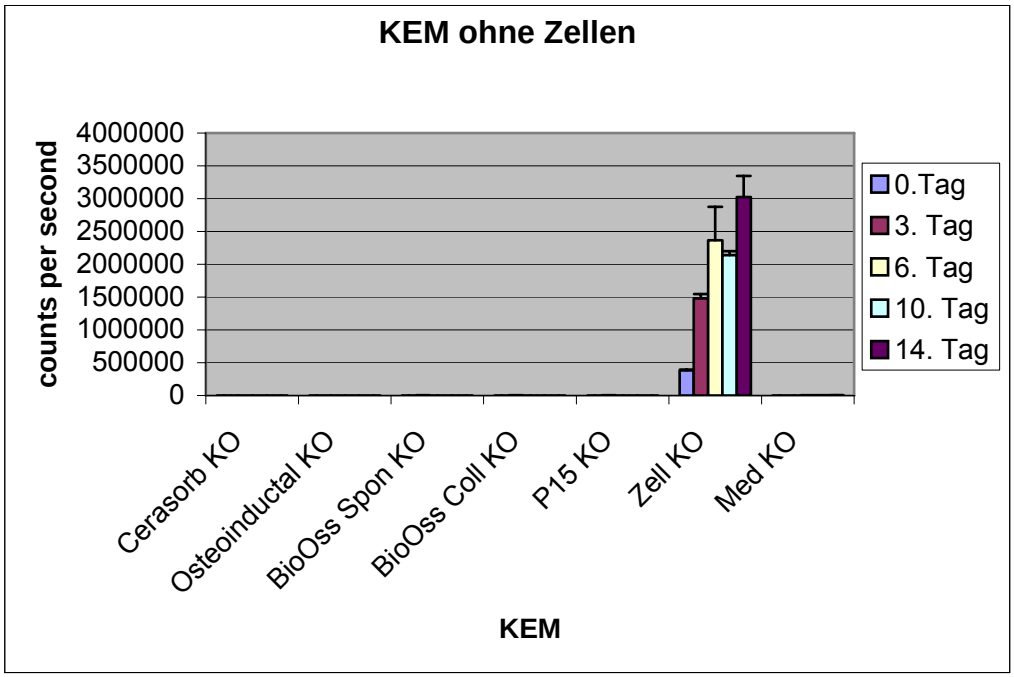

Diagramm 2: Überprüfung der KEM auf Eigenlumineszenz

Die Abbildung zeigt, dass von den Knochenersatzmaterialien zu keinem Zeitpunkt ein Lumineszenzwert hervorgeht, der die Messwerte mit Zellinkubation maßgeblich beeinflusst. Die Zellkontrolle zeigt über die Zeit einen ansteigenden ATP-Gehalt. Mittelwerte und Standardabweichungen ergaben sich aus jeweils sechs Ansätzen.

3.1.3 pH-Wert-Messungen

Während der Versuchsansätze wurde der pH-Wert am Tag 1 und Tag 8 gemessen.

KEM	pH-Werte	
	Tag 1	**Tag 8**
Cerasorb	7,75	7,77
Osteoinductal	7,81	7,83
Bio-Oss Spongiosa	7,75	7,71
Bio-Oss Collagen	7,73	7,84
PepGen P-15	7,83	7,83
Zell KO	7,71	7,86
Med KO	7,70	7,70

Tabelle 16: pH-Wert-Messungen, Tag 1 und Tag 8

Alle Messungen liegen im Normbereich, welcher bei 7,7 ± 0,2 (Standardmedium) anzusiedeln sind.

3.1.4 Überprüfung der primären Osteoblasten mittels Osteocalcin und HPRT-Expression

Darstellung der RT-PCR Produkte auf 2%igem Agarosegel.

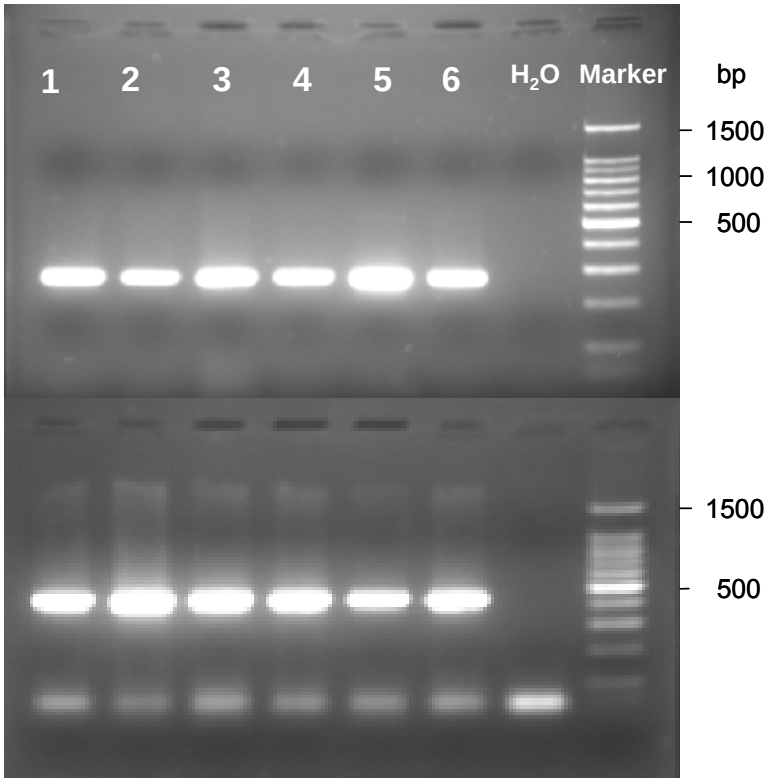

Abb. 3: Osteocalcin und HPRT-Expression (Chiriac et al., 2005)

Im oberen Teil befinden sich die Banden für das knochenmarkerspezifische Osteocalcin bei 277bp. Sie ist bei allen Proben eindeutig als Bande zu identifizieren; bei der Negativkontrolle (H_2O) ist mit Ausnahme der Flussmittelfront keine Bande ersichtlich. Im unteren Teil befindet sich das Housekeeping Gen HPRT mit einer PCR Produktgröße von 439bp, welches als Expressionskontrolle eingesetzt wurde und ebenfalls bei allen Proben nachgewiesen werden konnte.

Die aus den Knochenspänen auswachsenden Zellen konnten damit eindeutig als Osteoblasten charakterisiert werden.

3.1.5 Nachweis der Osteocalcinsynthese bei SaOs-Zellen und primären Osteoblasten

In der vorliegenden Studie konnte zu allen Untersuchungszeitpunkten (t = 1, 3 und 6) eine Synthese von Osteocalcin durch die SaOs-Zellen und die primären Osteoblasten immunhistochemisch festgestellt werden (1-6).
Die Osteocalcinsynthese zeigt sich durch die bräunliche Anfärbung des Zytoplasmas, die sowohl bei den Osteosarkomzellen als auch bei den primären Osteoblasten deutlich zu erkennen ist.

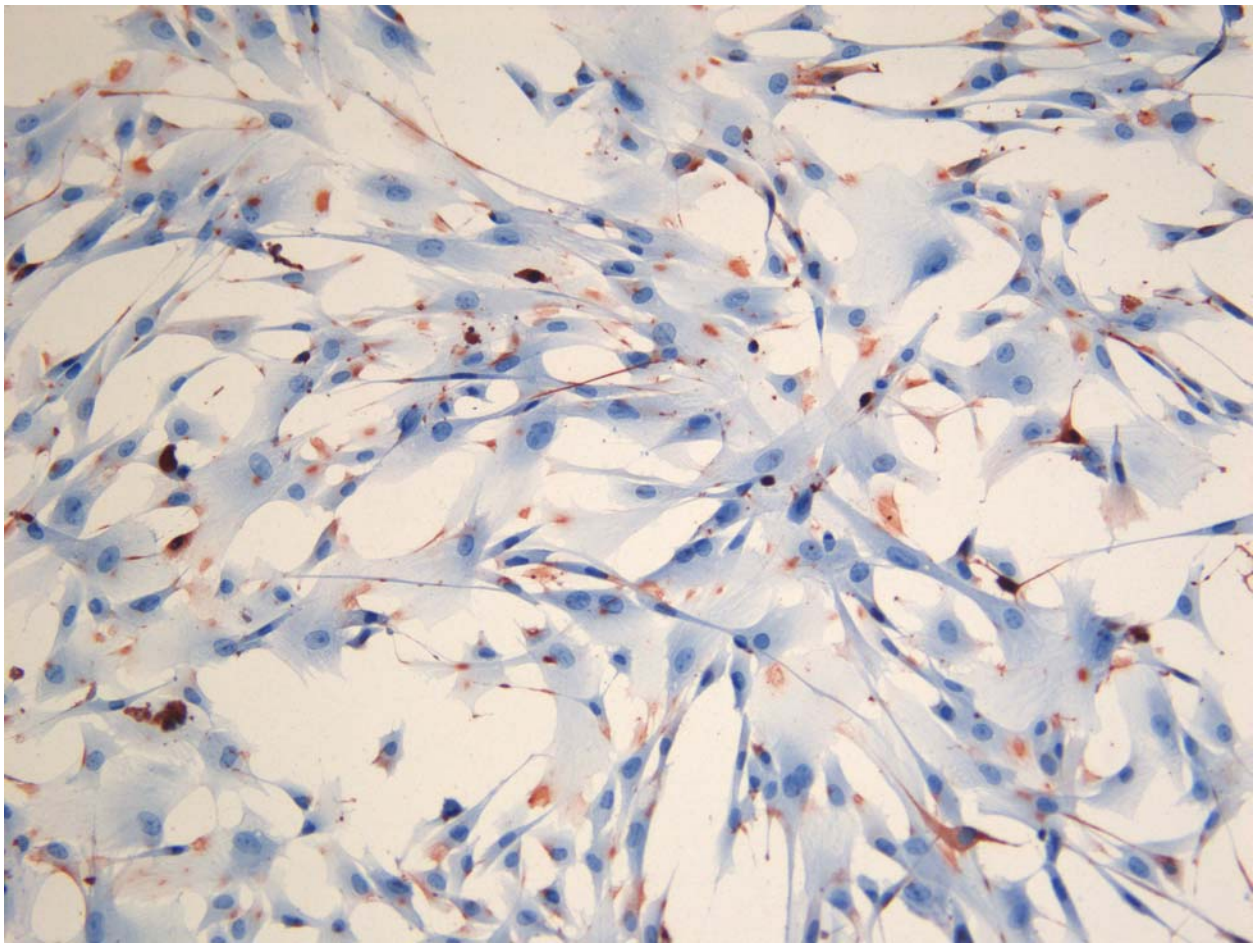

Abb. 4: Osteocalcinsynthese von primären Osteoblasten

Somit konnten diese erfolgreich als osteoblastäre Zellen identifiziert werden.

3.2 Hauptergebnisse

3.2.1 ATP-Assay

Die ATP-Messungen erfolgten für jeweils fünf Knochenersatzmaterialien, einer Positivkontrolle (Culture dish) und einer Negativkontrolle (keine Zellen).

Zur besseren Vergleichbarkeit der einzelnen Zelllinien auf den verschiedenen Knochenersatzmaterialien wurde im folgenden die initiale Zellkonzentration der Zellen auf den jeweiligen Materialien gleich eins gesetzt und für jedes Material und jede Zelllinie ein individueller Proliferationsfaktor berechnet.

3.2.2 ATP-Assay SaOs-Zellen

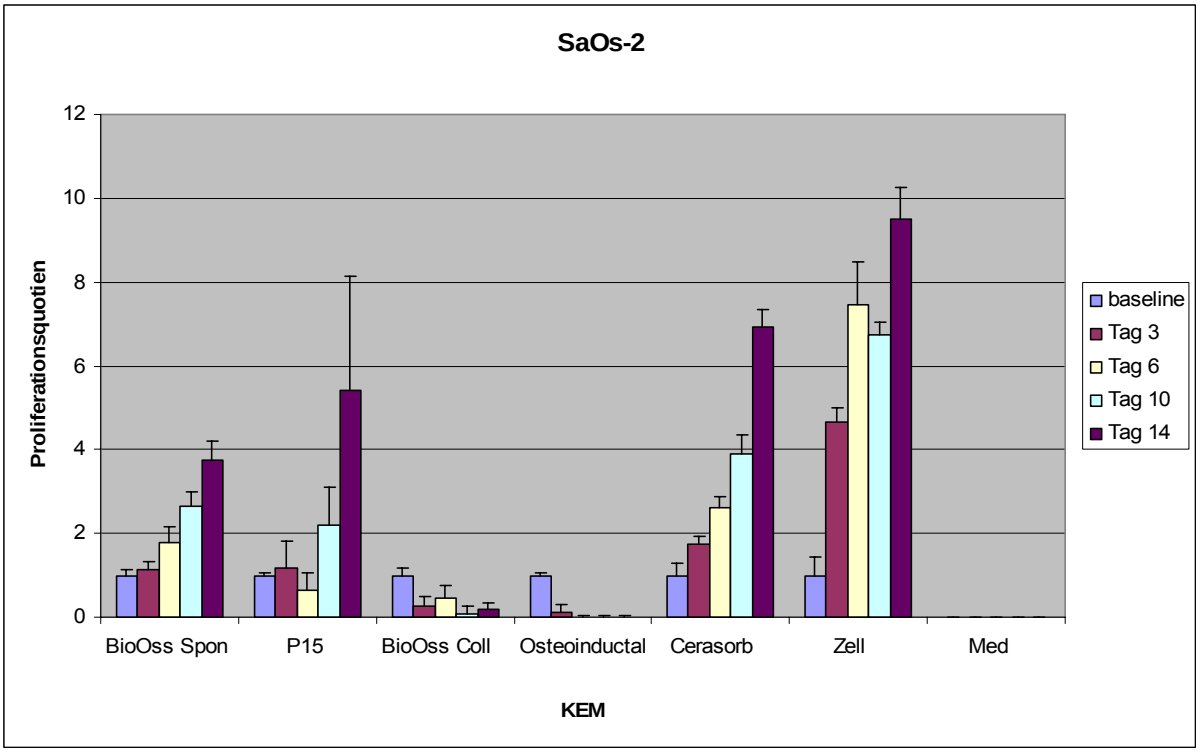

Diagramm 3: ATP-Assay mit SaOs auf KEM

Die Grafik zeigt, dass SaOs-Zellen auf Cerasorb, auf Bio-Oss Spongiosa und auf P15 eine signfikante Zunahme der Zellzahl über die Zeit annehmen ($p<0,05$, ANOVA). SaOs-Zellen auf Bio-Oss Collagen und Osteoinductal nehmen während des Beobachtungszeitraumes signifikant ab und fallen am Ende der Messreihe (Tag 14) gegen null

ab (p<0,05, ANOVA). Der ATP-Gehalt der Zellkontrolle steigt über die Zeit an und misst den höchsten Proliferationsindex.

3.2.3 ATP-Assay Primäre Osteoblasten

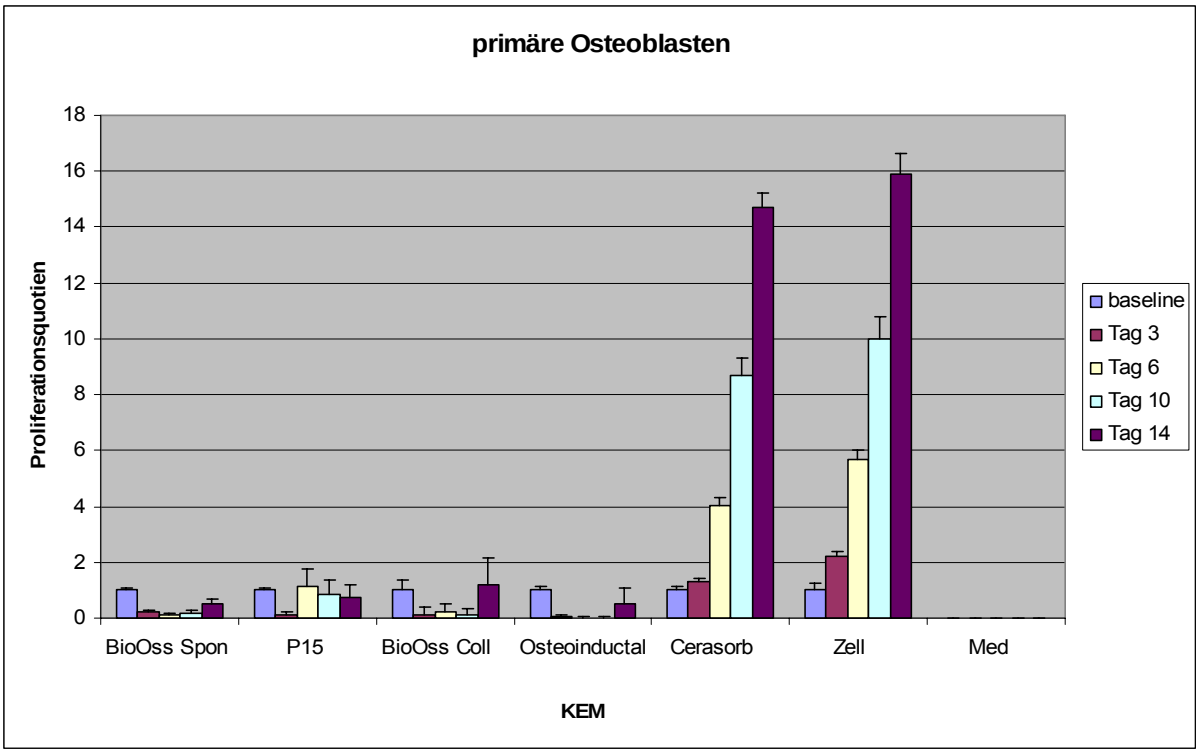

Diagramm 4: ATP-Assay mit primären Osteoblasten auf KEM

Das Diagramm zeigt den Proliferationsquotienten der primären Osteoblasten auf den Biomaterialien. Cerasorb ist das einzige Knochenersatzmaterial, auf dem die Zellen einen signifikanten Anstieg über die gesamte Studiendauer aufweisen (p<0,05, ANOVA). Die Zellzahl auf Cerasorb ist an allen fünf Messtagen vergleichbar zur Zellkontrolle. Die primären Osteoblasten zeigen auf Bio-Oss Spongiosa, P15, Bio-Oss Collagen und Osteoinductal einen signifikanten Abfall der Zellzahl über die Zeit. Auf Bio-Oss Spongiosa, Bio-Oss Collagen und Osteoinductal fällt die Zellzahl an Tag 3, 6 und zehn gegen null ab. Tag 14 zeigt auf allen drei KEM eine steigende Tendenz der Zellen, bzw. einen leichte Zunahme der Zellzahl. Auf P15 sinkt die Zellzahl im Vergleich zur baseline gegen null, zeigt an Tag 6 wiederum einen Anstieg und steigt über die Werte der baseline. Tag 10 und Tag 14 zeigen jedoch einen signifikanten Abfall der Zellzahl.
Sowohl auf Cerasorb als auch auf der Zellkontrolle sind signifikant mehr Zellen als bei allen anderen Präparaten. Auf Bio-Oss Spongiosa, Bio-Oss Collagen und Osteoinductal

ließ sich keine Veränderung der Zellzahl feststellen, wenngleich hier an Tag 14 eine sehr hohe Streubreite der Messwerte zu beobachten war.

3.2.4 ATP-Assay Knochenmarkstammzellen

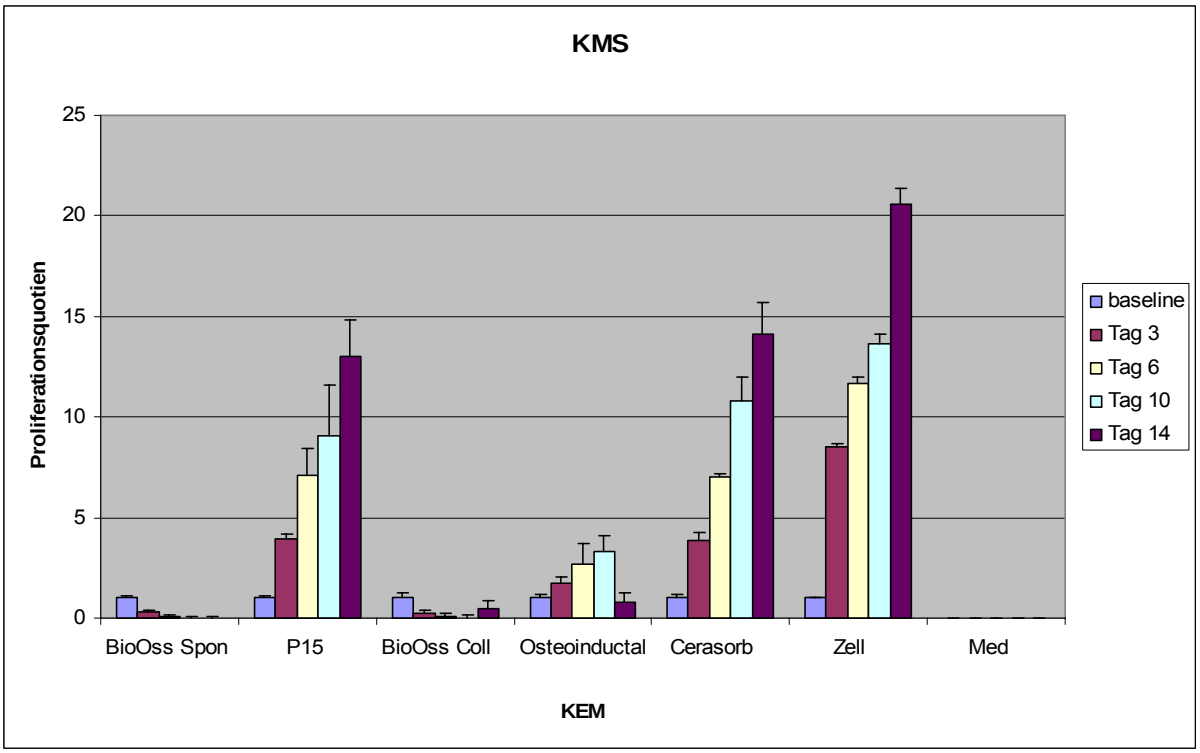

Diagramm 5: ATP-Assay mit Knochenmarkstammzellen auf KEM

Die Knochenmarkstammzellen lassen über die Zeit, neben der Zellkontrolle, einen signifikanten Anstieg der Zellzahl auf P-15 und Cerasorb erkennen ($p<0,05$, ANOVA). Hierbei ist die Zellkontrolle den Cerasorb und P-15 Werten signifikant überlegen ($p<0,05$, ANOVA). Die KMS-Zellen zeigen auf Osteoinductal einen moderaten Anstieg mit Abfall an Tag 14; der Anstieg der Messwerte war jedoch zu keinem Zeitpunkt statistisch signifikant ($p>0,05$, ANOVA). Bio-Oss Spongiosa und Bio-Oss Collagen zeigen einen signifikanten Abfall über die Zeit ($p<0,05$, ANOVA).

Zusammenfassend lassen sich für alle drei Zelllinien Cerasorb und P-15 mit der signifikant höchsten Zellzahl darstellen. Auf Bio-Oss Spongiosa zeigen nur die SaOs-Zellen einen signifikanten Anstieg der Messwerte über die Zeit. Die primären Osteoblasten und die SaOs-Zellen nehmen im Beobachtungszeitraum auf Bio-Oss Collagen und Osteoinductal signifikant ab. Die KMS-Zellen zeigen auf Bio-Oss Collagen keine Zunahme der

Zellzahl, während bei Osteoinductal die Zellzahl zunächst zunimmt, aber an Tag 14 signifikant abfällt.

3.3 U-937 Zellen auf den jeweiligen Knochenersatzmaterialien

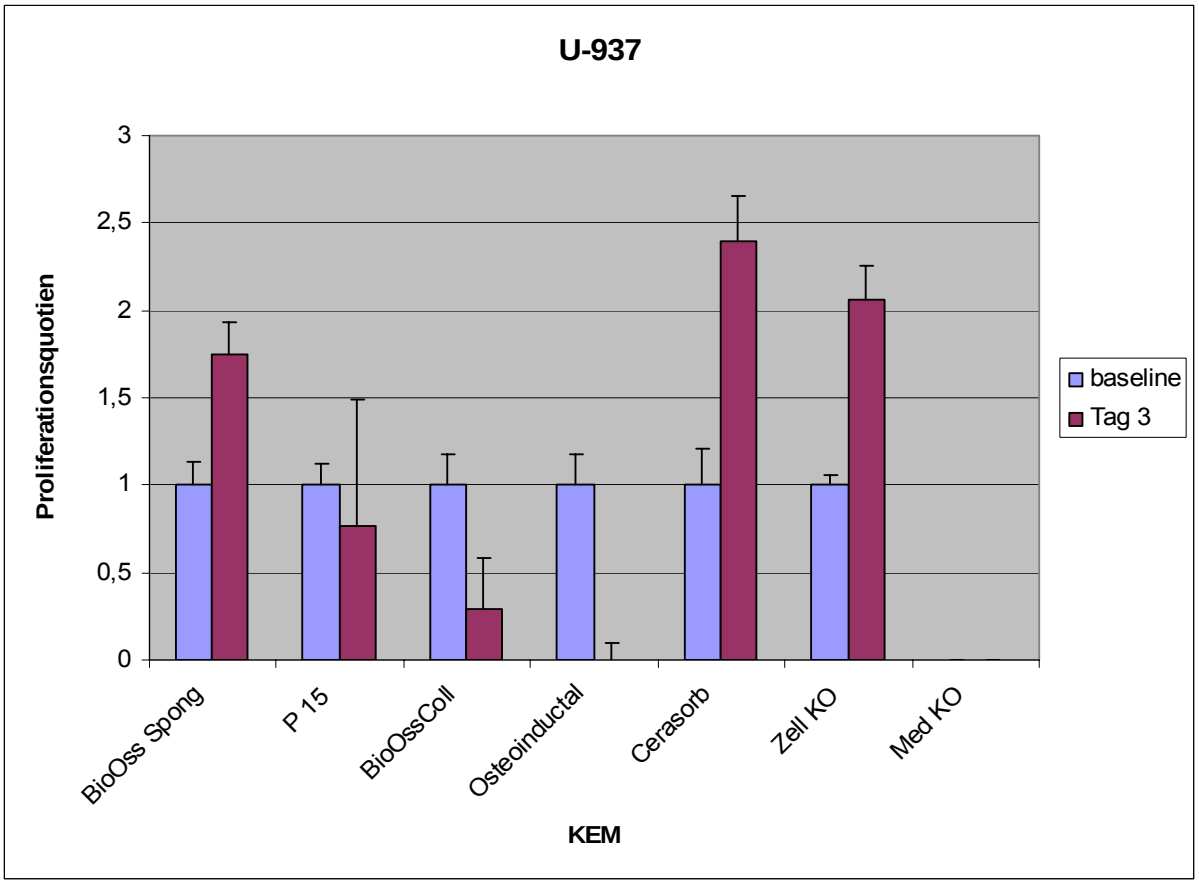

Diagramm 6: Nichtadhärente U-937 Zellen auf KEM

In diesem Teilversuch wurde das Wachstumsverhalten der nichtadhärenten Myelo-Monozytären Zelllinie auf den bisher verwendeten Biomaterialien überprüft.
Sowohl Cerasorb als auch die Zellkontrolle, sowie Bio-Oss Spongiosa zeigen einen hochsignifikanten Anstieg der Zellzahl ($p<0,01$). P-15 zeigt keine signifikante Veränderung der Zellzahl über die Zeit. Während die Zellzahl in Anwesenheit von Bio-Oss Collagen signifikant abnahm, sind bei Osteoinductal an Tag 3 keine Zellen mehr nachweisbar.

3.4 Nachweis der ALP (Alkalische Phosphatase)-Aktivität

Die histomorphologische Auswertung der Zellschnitte wurde mit den jeweiligen Zelllinien für den 10. Messtag ausgewertet. In Abhängigkeit vom Alterungsprozess der Zellen nahm die Anfärbbarkeit wieder ab.
Die Anzahl der Plus Zeichen gibt die Intensität der AP-Färbung wieder, unabhängig von der Anzahl der Zellen. Die in Klammern gesetzten Plus Zeichen besagen dass die Intensität nur grenzwertig erreicht ist.

KEM		AP-Positiv	
	Osteosarkomzellen	Primäre Osteoblasten	Knochenmark-stammzellen
Cerasorb	**++(+)**	**+**	**+**
Osteoinductal	**n.b.**	**+**	**+**
Bio-Oss Spongiosa	**++**	**-**	**-**
Bio-Oss Collagen	**++**	**-**	**-**
P15	**+(+)**	**+**	**+**
Zellkontrolle	**+++**	**+++**	**+++**

Tabelle 17: Nachweis der Alkalischen Phosphatase der drei Zelllinien auf den KEM

Auf Cerasorb, P-15 und der Zellkontrolle wurde bei allen drei Zelllinien die alkalische Phosphatase nachgewiesen. Auf Bio-Oss Spongiosa und Bio-Oss Collagen zeigen nur die Osteosarkomzellen eine ALP-Aktivität. In Anwesenheit von Osteoinductal sind sowohl die primären Osteoblasten als auch die Knochenmarkstammzellen mit der alkalischen Phosphatase angefärbt.

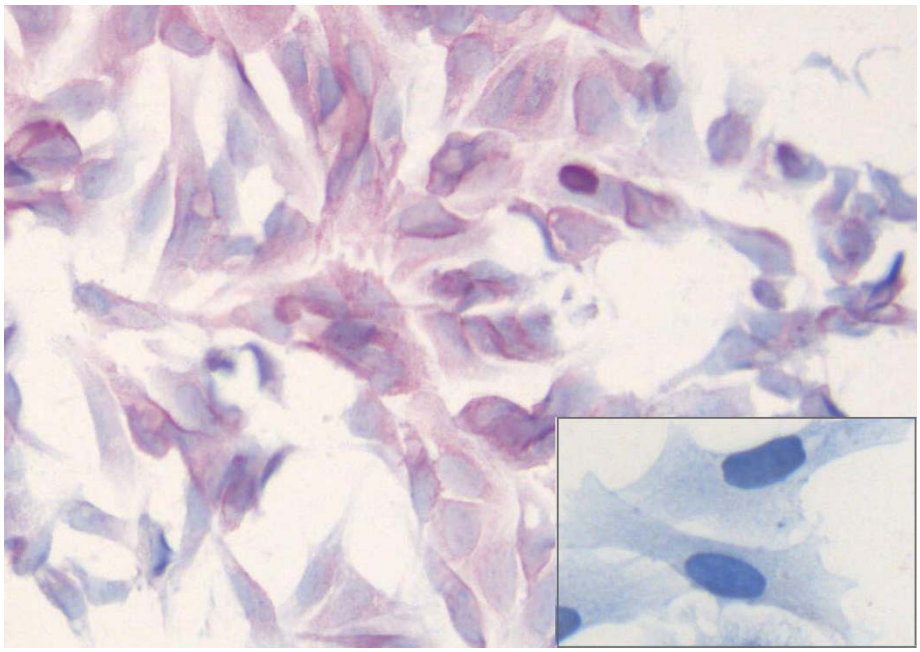

Abb. 5: ALP-Aktivität der Zellkontrolle von Osteosarkomzellen positiv; Negativkontrolle rechts unten im Bildrand.

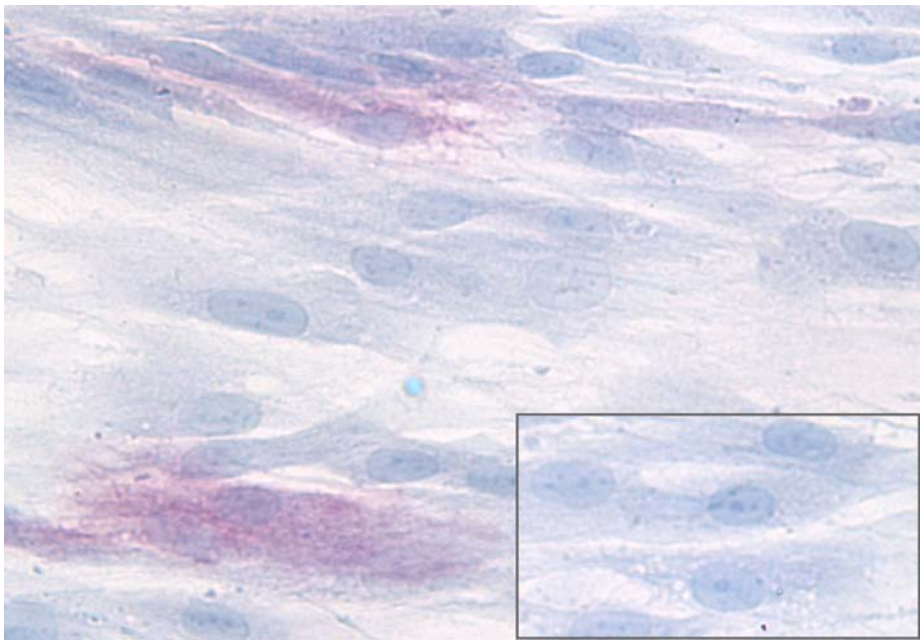

Abb 6: ALP-Aktivität der Zellkontrolle von primären Osteoblasten positiv; Negativkontrolle rechts unten im Bildrand.

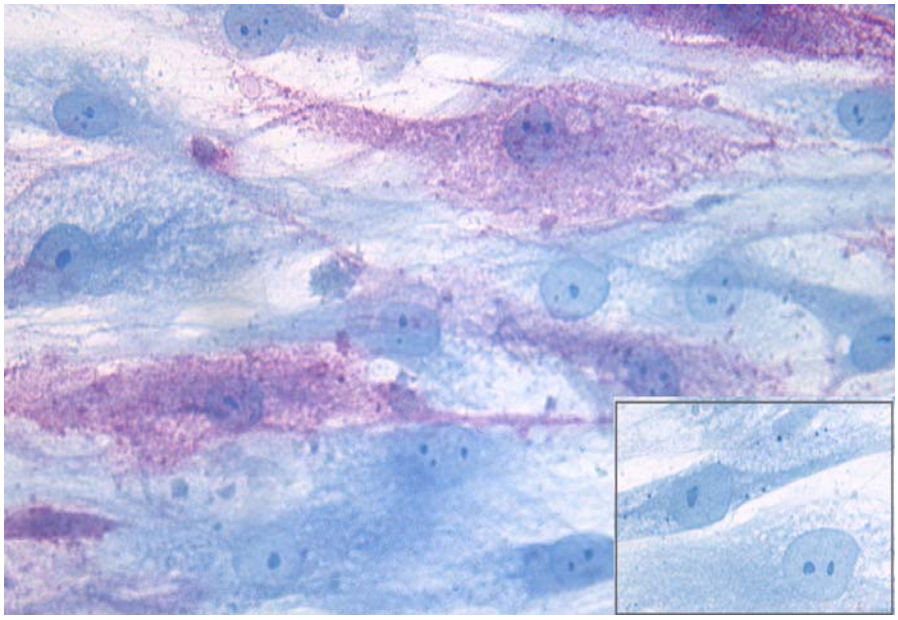

Abb. 7: ALP-Aktivität der Zellkontrolle von Knochenmarkstammzellen positiv; Negativkontrolle rechts unten im Bildrand.

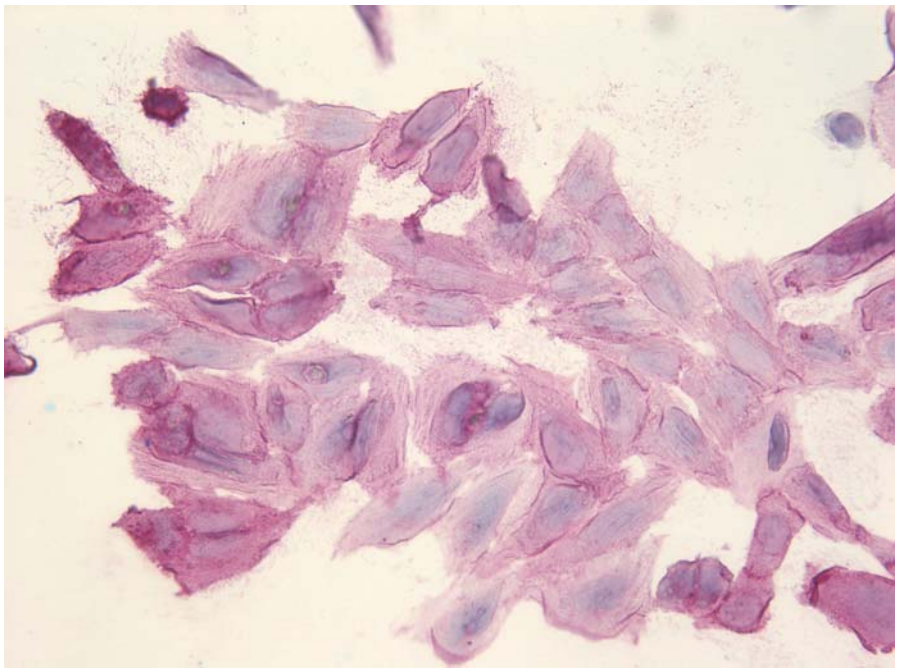

Abb. 8: Zytologische Anfärbung für Alkalische Phosphatase in der humanen osteoblastenähnlichen Zellkultur auf Cerasorb.

3.5 Ergebnisse der rasterelektronenmikroskopischen Auswertung

Die Zellkontrolle verdeutlicht bei 500facher Vergrößerung die Zellform der einzelnen SaOs-2-Zellen. Die vornehmlich flachen Zellen besitzen zahlreiche, stark verzweigte Cytoplasma-Fortsätze, mit denen sie untereinander in Verbindung stehen und Kontakt mit der Materialoberfläche aufweisen.

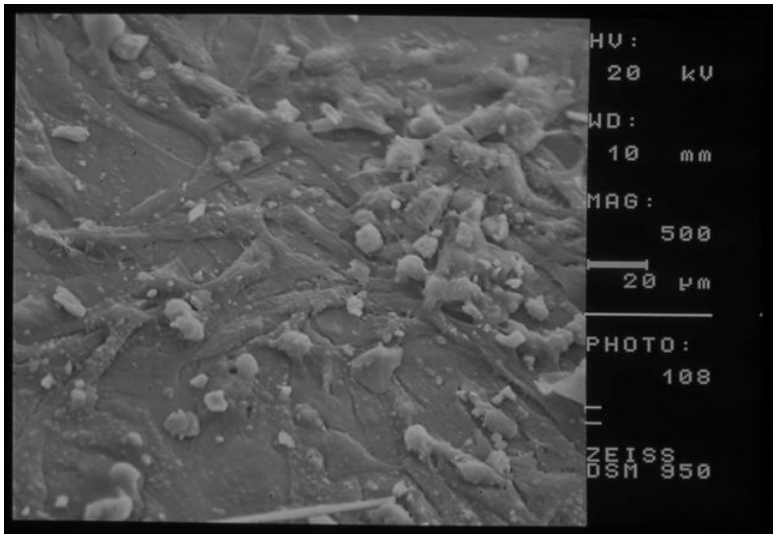

Abb. 9: REM Aufnahme: Zellkontrolle (500fache Vergrößerung)

Unter 500facher rasterelektronenmikroskopischer Vergrößerung sind keine Zellen auf Osteoinductal zu erkennen. Die Oberfläche ist bedeckt von nicht identifizierbaren Partikeln, die wahrscheinlich aus der Ausfällung des pastenförmigen Materials in der Aufbereitung herrühren.

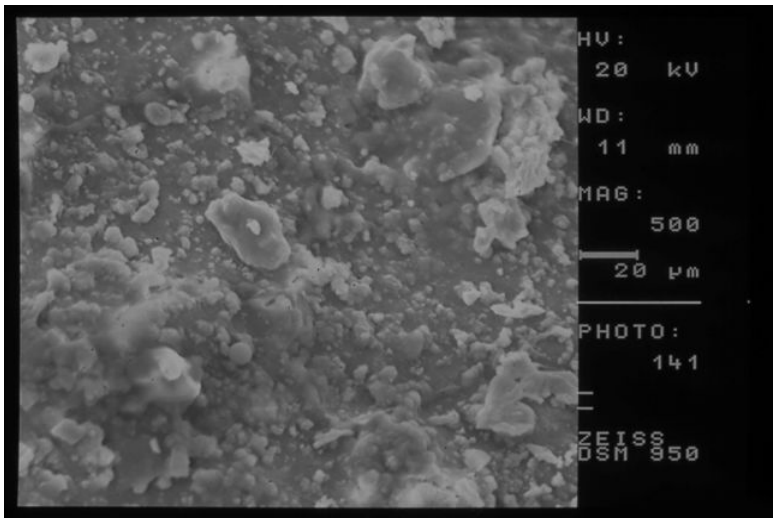

Abb. 10: REM Aufnahme: Osteoinductal (500fache Vergrößerung)

Bio-Oss Spongiosa zeigt in einer 500fachen rasterelektronen-mikroskopischen Vergrößerung vereinzelte Zellen, die abgerundet sind und keine osteoblasten-typische Zellmorphologie zeigen.

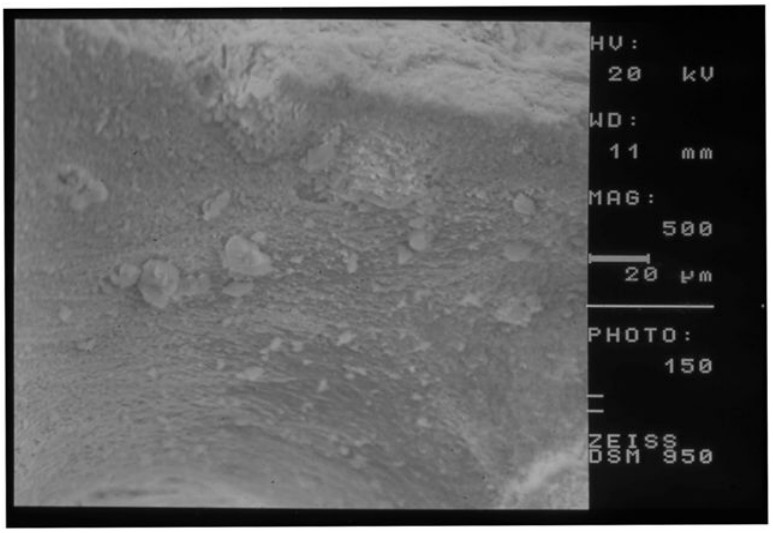

Abb. 11: REM Aufnahme: Bio-Oss Spongiosa (500fache Vergrößerung)

Ebenso wie auf Bio-Oss Spongiosa sind auf der 500fachen Vergrößerung des KEM, Bio-Oss Collagen, nur vereinzelt Zellen zu erkennen. Sie erscheinen abgekugelt und sitzen der Oberfläche auf. Die Oberfläche des KEM erscheint durch die Vernetzung mit Kollagen deutlich rauer als Bio-Oss.

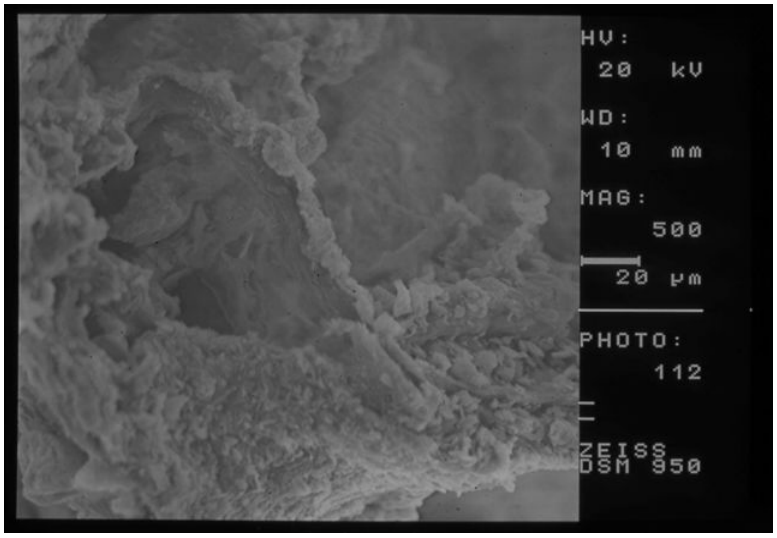

Abb. 12: REM Aufnahme: Bio-Oss Collagen (500fache Vergrößerung)

Das morphologische Erscheinungsbild der Zellen auf P-15 stellt sich unter 500facher Vergrößerung ebenfalls abgerundet und mit dem KEM unter Kontakt stehend, dar.

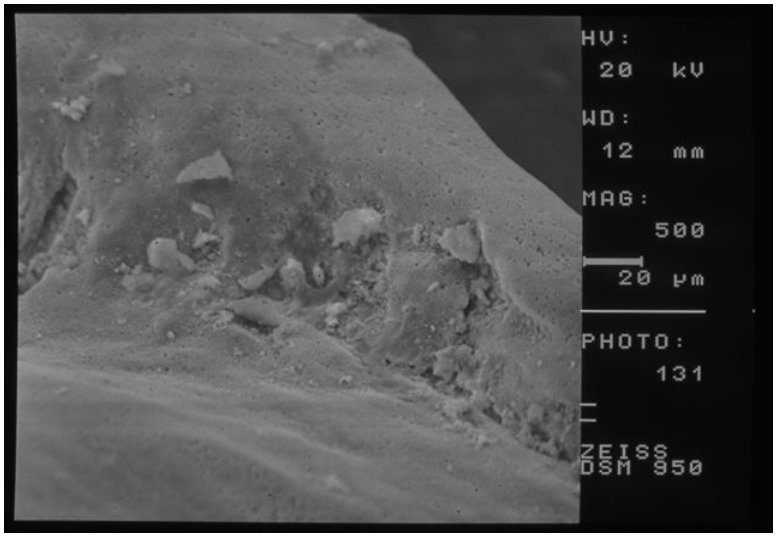

Abb. 13: REM Aufnahme: P-15
(500fache Vergrößerung)

Unter 1000facher raster-elektronenmikroskopischen Vergrößerung sind einige abgerundete SaOs-2-Zellen deutlich auf den einzelnen Cerasorb-Partikeln zu erkennen.

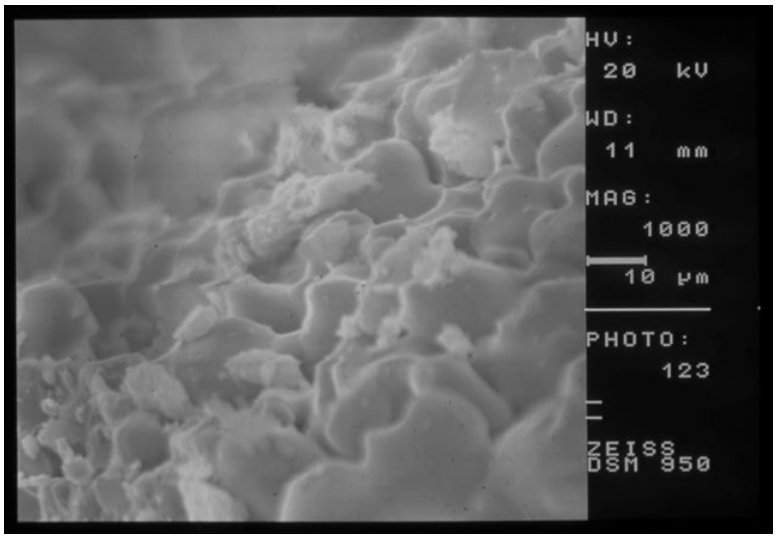

Abb.14: REM Aufnahme: Cerasorb
(1000fache Vergrößerung)

4. Diskussion

In der vorliegenden Untersuchung wurden Knochenersatzmaterialien aus unterschiedlichen Stoffgruppen durch Kultivierung mit Osteosarkomzellen, primären Osteoblasten und Knochenmarkstammzellen getestet. Durch anerkannte Testverfahren sollte eine Aussage über die Vitalität und den Differenzierungsgrad der jeweiligen humanen osteogenen Zelltypen auf den KEM getroffen werden. Weiterhin wurden alle Materialien durch Kultivierung mit nicht-adhaerenten Zellen auf lösliche zytotoxische Bestandteile überprüft.
Die Interaktion von Zellkulturen mit verschiedenen Biomaterialien wurde bereits in zahlreichen in-vitro Studien untersucht (Seitzer et al. 1995, Zambonin et al. 1997, Yeh et al. 1998 a, b; Açil et al. 2000). Hierbei hat sich vor allem die Osteoblasten-Zellkultur als Modell zur Biokompatibilitätsprüfung von Knochenersatzmaterialien bewährt. Açil et al. untersuchten das Wachstum und die Synthese von extrazellulärer Matrix (ECM) humaner Osteoblasten auf einem hochporösem Knochenmineral. Die Studie demonstrierte eine exzellente Biokompatibilität auf dem natürlichen Knochenmineral in einem dreidimensionalen Zellkultursystem. Dies lässt auf ein gutes Knochenwachstum im Sinne des Tissue engineering rückschließen (Roggendorf et al. 1986, Açil et al. 1999).

Zur Durchführung unserer Studie wurden fünf unterschiedliche Biomaterialien untersucht, die in der klinischen Routine der Zahnheilkunde zunehmend Anwendung finden. Diese Biomaterialien unterscheiden sich in ihrer Herkunft, Größe, Porengröße und Zusammensetzung. Drei dieser Biomaterialien sind bovinen Ursprungs, wobei P-15 (Dentsply Friadent CeraMed), ein poröses anorganisches Hydroxylapatit (Partikelgröße: 250-420 µm), ein synthetisches Bindungspeptid (P-15: Bindungsdomäne in der Alpha-1-Kette des Typ-1-Kollagens) besitzt (Bhatnagar et al. 1999; Qian et al. 1996). Im Unterschied dazu handelt es sich bei Bio-Oss um ein rein anorganisches Hydroxylapatit bovinen Ursprungs ohne Bindungspeptid. Die zwei weiteren zu testenden Materialien alloplastischen Ursprungs unterscheiden sich nicht nur in Ihrer Herkunft als vielmehr in ihrer Konsistenz. Zum einen handelt es sich um Cerasorb, ein phasenreines β-Tricalciumphosphat mit einer Partikelgröße von 1000-2000 µm und zum anderen um Osteoinductal, eine ölige Suspension aus einem Gemisch aus Kalziumhydroxid und Schweineklauenöl.

Die Implantation von Knochenersatzmaterialien in ein Empfängergebiet ruft in-vivo zahlreiche, komplexe biologische Reaktionen hervor. Diese Vielzahl an Abläufen erschwert die Beurteilung der Zellantwort eines einzelnen Zelltyps. Aus diesem Grund stellt ein in-vitro Experiment wie unseres ein ideales Modell dar, um bestimmte Zellarten selektiv zu untersuchen (Malik et al. 1992).

Mit Hilfe des CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay, Promega war es möglich, zum einen das Proliferationsverhalten der drei Zelllinien zu bestimmen und im Zusammenhang damit die Biokompatibilität der eingesetzten Knochenersatzmaterialien zu überprüfen. Die stärkste Proliferation zeigten die Zellen bei Adhäsion an Cerasorb, gefolgt von P-15 und Bio-Oss Spongiosa. Das Zellwachstum auf Cerasorb war für alle Zelltypen vergleichbar mit der Zellkontrolle (Polystyroloberfläche). Obwohl eine große Anzahl an Zellen auf jedes Knochensubstitut ausgesät worden war, konnte verhältnismäßig wenig Zellwachstum auf den Materialien Osteoinductal und Bio-Oss Collagen festgestellt werden. Auch auf dem Biomaterial Bio-Oss Spongiosa wuchsen sowohl die primären Osteoblasten als auch die KMS vergleichbar wenig.

Das ß-TCP Cerasorb zeigte bei allen untersuchten KEM die höchsten Proliferationsindices. Dies lässt sich zum einem durch die im REM beobachtete große Oberfläche der Granulate und zum anderem durch die poröse Morphologie des KEM erklären. Die hohen Osteocalcinwerte als auch der nachfolgende Teilversuch mit Suspensionszellen lassen Cerasorb ebenfalls als ein gutes Trägermaterial einstufen. Auch die starke Proliferation der U-937-Zelllinien lässt in diesem Zusammenhang auf eine sehr gute Biokompatibilität schließen. Auch die Degradation von β-TCP durch chemische Lösungen führte in Versuchen nicht zu einer Änderung des pH-Wertes in Richtung zytotoxischer oder nichtphysiologischer Werte (Klein et al. 1984). Die vorliegenden Ergebnisse scheinen diese Hypothese zu unterstützen.

Klinisch betrachtet berichten Trisi et al. von einer erfolgreichen Einheilung und Knochenformation eines ß-Tricalciumphosphates (Cerasorb) in menschlichen artifiziellen Kieferknochendefekten (Trisi et al. 2003). Szabo et al. verglich autogenen Knochen mit einem ß-Tricalciumphosphat in ein und demselben Patienten. Die Ergebnisse zeigten, dass sowohl der Einsatz autogenen Knochens als auch des KEM eine ähnlich gute Knochen-

formation aufwiesen. Somit ist Cerasorb auch ohne Anwesenheit von autogenem Knochen als ein geeignetes Ersatzmaterial zu betrachten (Szabo et al. 2001).
Die Versuche mit den Suspensionszellen ließen auch ein erhöhtes Zellwachstum in Anwesenheit von **Bio-Oss Spongiosa** verzeichnen. Auch die primären Osteoblasten zeigten eine signifikante Zunahme der Zellzahl über die Zeit, obgleich die anderen Zelllinien eher geringe Proliferationstendenzen auf den Granulaten vorwiesen. In anderen Studien ließ sich bereits nachweisen, dass Bio-Oss für die Knochenbildung eine hoch osteokonduktive Oberfläche (>90 m^2/g) bietet und als osteokonduktives Ersatzmaterial reizlos einheilt (Jensen et al. 1996). Im hochauflösenden REM lassen sich zudem kleine und kompakte Nanokristalle nachweisen, welche auch im menschlichen Knochen vorzufinden sind. Ebenso beeinflussen Parameter wie Porosität, Oberflächenbeschaffenheit und chemische Zusammensetzung des Materials die Aktivität von Zellen sowie den Regenerationsprozess als Ganzes. Diese gewonnenen Erkenntnisse im Hinblick auf die Biokompatibilität der getesteten Trägermaterialien ergänzen die Untersuchungen anderer Autoren. Stephan et al. (1999) beschrieben die erfolgreiche Adhäsion und Proliferation von neonatalen Zellen auf dem natürlichen Knochenmineral Bio-Oss in partikulärer Form. Açil et al. beschrieb 2000 in einer seiner Studien mit primären Osteoblasten die exzellente Biokompatibilität von Bio-Oss in einem dreidimensionalen Zellkultursystem und folglich auch das Wachstumspotential in humanem Knochen im Sinne des Tissue engineering (Stephan et al. 1999, Açil et al. 1999, 2000, 2002). Auch Zahlreiche in-vivo Studien belegen die Eignung dieses Trägermaterials. In einer aktuellen Studie beschreiben Scarano et al. die Osseointegration in einer Sinusbodenaugmentation mit Bio-Oss. Es ließen sich enge, direkte Kontakte zwischen Knochen und Implantat ohne Einlagerung von Partikeln des KEM feststellen. Eine langsame Resorption der Trägerpartikel gefährdet den Autoren zufolge somit nicht die Osseointegration des Implantates (Scarano et al. 2004).
Das ebenfalls zu testende **Bio-Oss Collagen** unterscheidet sich von Bio-Oss Spongiosa lediglich durch den Zusatz von 10% porcinem Kollagen und seiner Darreichungsform. Die Darreichungsform als schwammartiger Block soll ein einfaches Handling und den Zusammenhalt der Spongiosa Partikel gewährleisten. Zudem soll eine optimalere Volumenstabilität gewährleistet sein. Die Zellzahl variierte jedoch stark zu der von Bio-Oss Spongiosa. Sowohl die KMS-Zellen als auch die SaOs-2-Zellen nahmen im Verlauf der Messtage auf Bio-Oss Collagen ab. Die ebenfalls abnehmende Zahl der Suspensionszellen legt jedoch die Vermutung nahe, dass den Zellen in Anwesenheit des Trä-

germaterials durch eventuell toxische Bestandteile eine Anheftung und Proliferation erschwert wird. Hierdurch lassen sich auch die im Vergleich zu Bio-Oss Spongiosa eher schlechteren Ergebnisse erklären, welche offenbar in Zusammenhang mit der Kollagenbeschichtung zu sehen sind.

Das Knochenersatzmaterial **P-15** als Hydroxylapatit, welches mit dem zellbindenden Peptid P-15 beschichtet ist, zeigte neben Cerasorb und Bio-Oss Spongiosa ebenfalls einen Anstieg der SaOs- und der KMS-Zellen über die Zeit. Laut Hersteller werden Osteoblastenstammzellen durch das Peptid P-15 gebunden, welches zu einer Differenzierung und Proliferation, analog des natürlich-physiologischen Mechanismus führt. Während im Organismus nur wenige P-15 Sequenzen verfügbar sind, sollen durch übermäßige Darbietung der Bindungsdomäne deutlich mehr Osteoblastenstammzellen aktiviert werden, was eine verstärkte und beschleunigte Knochenregeneration bewirkt. Das natürliche Regenerationspotenzial des Körpers soll somit maximal genutzt und die Knochenregeneration optimiert werden. Die Kultur der Suspensionszellen in Anwesenheit von P-15 zeigte nur geringe Beeinflussung der Proliferationsindices.

Qian und Bathnagar (1996) fanden heraus, dass das Peptid P-15 als Alternative zu bovinem Kollagen die Adhäsion von Osteoblasten auf der Materialoberfläche fördert. Diese These konnte in der vorliegenden in-vitro-Untersuchung bestätigt werden, da in unserer Studie vor allem die KMS-Zellen und die SaOs-Zellen einen deutlichen Anstieg der Zellzahl erkennen ließen (Qian und Bathnagar 1996).

Osteoinductal, welches als einziges getestetes KEM zu den pastenähnlichen Darreichungsformen zählt, zeigte die schlechtesten Resultate. Bei allen drei Zelllinien nahm die Zellzahl signifikant ab. Der nachfolgende Teilversuch mit Suspensionszellen bestätigte die Annahme, dass dies unter anderem in einer eventuell von der Trägermatrize ausgehenden zellulären Toxizität begründet liegen könnte. Klinisch fanden auch Kohal et al. in einer Pilotstudie an Beagle Hunden heraus, dass Osteoinductal als Kalziumhydroxidpaste einen schädlichen Effekt bei der Wundheilung und Osseointegration von Implantaten besitzt und somit bei Implantatsetzungen nicht zu empfehlen ist (Kohal et al., 1997).

Die im Ergebnisteil dargestellte Tabelle und Bilddarstellungen der Alkalischen Posphatase (ALP)-Auswertungen zeigen zum einem in Tabellenformat die histomorphologischen Auswertungen der Zelllinien auf den KEM und zum anderen Abbildungen, auf denen die rötliche Anfärbung der Osteoblasten der drei Zellkontrollen mit der jeweiligen Negativkontrolle und die osteoblastenähnliche Zellkultur auf Cerasorb abgebildet sind. Bei allen drei Zelltypen auf der Zellkontrolle, Cerasorb und P-15 konnte der Nachweis dieses Enzyms erbracht werden, d.h. die Zellen differenzierten in Anwesenheit der o.g. KEM zu Osteoblasten. Auf Bio-Oss Spongiosa und Bio-Oss Collagen konnten nur die SaOs-2-Zellen als Osteoblasten identifiziert werden. Auf Osteoinductal hingegen wurden die primären Osteoblasten und die Knochenmarkstammzellen als solche identifiziert. Es wird in diesem Zusammenhang vermutet, dass die von den Osteoblasten gebildete alkalische Phosphatase bei der Mineralisation des Knochens eine bedeutende Rolle spielt (Açil et al. 1999, 2002).
Trentz et al. (1997) konnte in einer in-vitro Untersuchung nachweisen, dass die Synthese der alkalischen Phosphatase auf dem bovinen Hydroxylapatit signifikant erniedrigt war. Sowohl die primären Osteoblasten als auch die Knochenmarkstammzellen zeigten in unserer Studie ebenfalls einen ähnlich niedrigen Wert auf Bio-Oss.

Bei den rasterelektronischen Auswertungen waren die Zellen auf Cerasorb, Bio-Oss Spongiosa und Bio-Oss Collagen dichter aufgelagert als auf P-15. Die Zellen überspannten im Vergleich zu der Zellkontrolle nicht die tiefer liegenden Mikroporositäten. Der elektronenmikroskopisch erkennbare bessere Verbund der Zellen mit der Polycarbonatoberfläche der Zellkontrolle kann an der großflächigen, glatten Oberfläche liegen, die eine enge Anlagerung der Zellen ermöglicht. Eine mögliche Erklärung für die fehlende Zellproliferation auf einigen Knochenersatzmaterialien könnte der Effekt der Biodegradation der KEM sein. Knochenersatzmaterialien können mittels eines chemischen Lösungsprozesses oder anhand einer zellvermittelten Resorption degradiert werden (Cheung, Tofe 1993). Weiteren Steigerungen der Zellproliferation sind aufgrund der Zellkontaktinhibition und der fehlenden Vaskularisation Grenzen gesetzt (Malekzadeh et al. 1998).

Als Voraussetzung für die geplanten Untersuchungen konnten die primären Osteoblasten hinsichtlich ihrer osteoblastären Eigenschaft charakterisiert werden. Mittels

PCR und einem immunhistochemischen Osteocalcinnachweis wurde die Zelltypisierung durchgeführt. Das Ergebnis der Vorversuche bestätigte unsere Annahme einer Osteoblasten-ähnlichen Zellkultur. Die Knochenmarkstammzellen waren bereits vom Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika (ITZ) als solche identifiziert. Die SaOs-2-Zellen als auch die U-937 Zellen erhielten wir von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen in Braunschweig.
Um eine Proliferation von Zellen in Kultur zu ermöglichen, müssen verschiedene allgemeine Wachstumsfaktoren im Zellkulturmedium vorliegen. Dies wurde in der vorliegenden experimentellen Arbeit durch die Zugabe von fetalem Kälberserum (FKS) erreicht. FKS enthält ein Gemisch verschiedener Hormone, Nährstoffe und Vitamine, die das Wachstum und die Differenzierung der Zellen beeinflussen.

Der Prozess der Zelladhäsion auf der Oberfläche der Knochenersatzmaterialien vollzieht sich nach Grinell (1978) anhand verschiedener Schritte:

1. Absorption von Serumproteinen auf der Oberfläche der Knochenersatzmaterialien
2. Kontakt der abgerundeten Osteoblasten mit dem Substitut
3. Attachment der Zellen mit dem Substrat
4. Ausbreitung der Zellen auf dem Knochenersatzmaterial

Ein besonderes Interesse galt den Knochenmarkstammzellen, die in der Literatur allgemein als mesenchymal stem cells (MSC) beschrieben sind.
Diese sogenannten mesenchymalen Progenitorzellen aus dem Knochenmark können unter geeigneten Kulturbedingungen in-vitro zu Knochen-, Knorpel-, Fett- und Muskelgewebe differenzieren (Pittenger et al. 1999). Kassem et al. beschrieb bereits 1991 die Formation von primären Osteoblasten aus Knochenmarkstammzellkulturen (Kassem et al. 1991).
Die in dieser Untersuchung verwendeten Zelllinien wiesen beträchtliche Unterschiede hinsichtlich des Wachstums, ihrer Differenzierung und der Zelladhäsion auf den zu testenden Knochenersatzmaterialien auf. Während die SaOs-2-Zellen auf Cerasorb, Bio-Oss Spongiosa und P-15 gut proliferierten, zeigten sich deutliche Unterschiede im Wachstum der KMS und der primären Osteoblasten. Die SaOs-2-Zellen zeigten als einzige Zelllinie ein erhöhtes Lumineszenzsignal auf Bio-Oss Spongiosa und proliferierten insgesamt besser auf den Knochenersatzmaterialien als die anderen beiden verwende-

ten Zelllinien. Bei allen drei Zelltypen konnte Alkalische Phosphatase als Marker für Osteoblasten nachgewiesen werden. Dies wiederum bestätigt die Differenzierungsmotivation der eingesetzten mesenchymalen Stammzellen unter geeigneten Bedingungen in Knochenzellen.

4.1 Methodenkritik

Die Auswahl der hier zum Einsatz gebrachten methodischen Verfahren resultierten aus einer kritischen Abwägung der labortechnischen Möglichkeiten. Es bleibt zu berücksichtigen, dass bei einer in-vitro Kultivierung von Zellen andere Gegebenheiten vorherrschen als unter in-vivo-Bedingungen. In einer Monolayerkultur unter in-vitro-Bedingungen kann weniger extrazelluläre Matrix nachgewiesen werden (Zambonin et al. 1997; Açil et al. 2000). Die Zusammensetzung und Organisation der Extrazellulärmatrix beeinflusst ihrerseits die Proliferation und Differenzierung von Zellen und hat somit einen entscheidenden Einfluss auf die physikalischen und biochemischen Eigenschaften eines Gewebes (Seyedin 1983).

Ursprünglich evaluierte Testverfahren, wie der Osteocalcin-ELISA, mussten aufgrund erhöhter, nicht adäquat interpretierbarer Werte außer Acht gelassen werden. Die Problematik lag in dem im Medium enthaltenden fetalen Kälberserum (FKS). Es kam hierbei zu einer Kreuzreaktion zwischen dem im FKS befindlichen bovinen Osteocalcin und der eingesetzten ELISA-Platte, obgleich laut Herstellerangabe der verwendete ELISA-Test spezifisch für humanes Osteocalcin gedacht war. Dadurch ergaben sich insgesamt verfälschte Werte, die nicht adäquat interpretiert werden konnten. Zukünftig ist daher im Rahmen von humanen Osteocalcinmessungen mittels einer ELISA-Methodik diese grundsätzliche Problematik mit zu berrücksichtigen.

Die alkalische Phosphatase-Aktivität, welche zusätzlich gemessen wurde, ist eine der meist gebräuchlichsten biochemischen Marker für osteoblastische Knochenformation. Somit ist die alkalische Phosphatase ein spezifischer Marker für die Osteoblastendifferenzierung. Die Expression der alkalischen Phosphatase gilt in der Kultur der humanen Osteoblasten als eines der Hauptmerkmale zur Spezifizierung der Zellen. Dennoch lassen sich nie alle Zellen einer Kultur anfärben. In der Fachliteratur schwanken die Werte

der sich anfärbenden Zellen zwischen 20% und 50%, abhängig von der Zellzyklusphase der Osteoblasten (Robey, Termine 1985; Wergedal et al. 1992; Stringa et al. 1995).

Die Adhäsion eines Osteoblasten an der Oberfläche eines Substrats allein sagt noch nichts über die Kompatibilität mit einem Werkstoff aus, die zur Differenzierung und Mineralisation der Osteoblasten führt. Obwohl humane osteoblastenähnliche Zellen nach 24-stündiger Kultur zahlenmäßig am besten auf Glas hafteten, war die Kalzifizierung auf diesem Material am geringsten (Ahmad et al. 1999). Demzufolge ist die Anzahl der an der Oberfläche haftenden Zellen und die Phosphataseaktivität nicht in Korrelation mit dem späteren Kalzifizierungsgrad zu setzen. Um verlässliche Aussagen über Zell-Substrat-Interaktionen treffen zu können, sind daher Langzeituntersuchungen empfehlenswert.

4.2 Geweberegeneration (Tissue engineering)

Ein besonderes Augenmerk lag hinsichtlich des Tissue engineering auf den in unserer Studie getesteten Knochenmarkstammzellen. Aus autogenen Zellen sollen hierbei in Kombination mit unterschiedlichen Scaffolds Transplantate erzeugt werden. So könnte man die mittels Punktion in Form eines Zellaspirats gewonnenen Knochenmarkstammzellen auf einer adäquaten Trägermatrix einsetzen, um so eine in-vitro-Herstellung von Ersatzgeweben und Organen zur Verbesserung bzw. Aufrechterhaltung der Funktion von erkranktem oder zerstörtem Gewebe zu erzielen. Nachdem gewebstypische Zellen isoliert werden, vollzieht sich die weitere Zellvermehrung auf biologisch abbaubaren Trägergerüsten („Scaffolds“), auf denen die Zellen über mehrere Tage bis Wochen kultiviert werden, um diese anschließend in den jeweiligen Hart- oder Weichgewebsdefekt zu transplantieren. Dabei erscheint es elementar, dass deren Degradations- und Resorptionskinetik auf das zu regenerierende Gewebe abgestimmt ist. Vorteil dieser Methode ist die Vermeidung jeglicher Abstoßungsreaktionen. Das heutige Tissue engineering-Verfahren arbeitet mit dreidimensionalen Trägergerüsten, deren Aufbau der körpereigenen extrazellulären Matrix gleicht. Diese sogenannten Scaffolds fördern durch ihre dreidimensionale Struktur unter anderem auch die essentiellen Differenzierungseigenschaften der in-vitro gezüchteten Zellen während der Proliferationsphase (Ewers et al. 2003).

Die Regeneration eines Defektes mittels der sogenannten heterotopen autologen Stammzelltherapie, wie sie beispielweise in der Orthopädischen Klinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf anhand klinischer Studien demonstriert wurde (Jäger et al. 2002) und in unserer Studie durch die Versuchsreihen mit Knochenmarkstammzellen untersucht wird, lässt Fragen offen. Weitere Forschungen hinsichtlich der Immunogenität sowie einer eventuell zu berücksichtigenden neoplastischen Entdifferenzierung der transplantierten Zellen sind notwendig, bevor man diesbezüglich von einer Standardtherapiemöglichkeit ausgehen kann.

Bei den von uns verwendeten Materialien handelt es sich mit Ausnahme von einem Biomaterial (Osteoinductal) um dreidimensionale Trägergerüste, die die körpereigene extrazelluläre Matrix zum Vorbild haben. Diese weisen einen großen Oberflächen-Volumen-Quotienten auf und erlauben die Einsprossung von Gefäßen, um die Ernährbarkeit der Osteoblasten in der Zellkulturphase, aber auch insbesondere nach einer Transplantation sicherzustellen. Dadurch wird nicht nur eine gute Zelladhäsion gewährleistet, sondern auch eine erfolgreiche Anwendung des Tissue engineering. Durch die Isolation, Kultivierung und Applikation mit einem Trägermaterial könnte die vollständige und langfristig anhaltende Rekonstruktion von Knochendefekten, die derzeit mit der klassischen gesteuerten Geweberegeneration (GTR) in manchen Fällen nur bedingt behandelbar waren, deutlich verbessert werden (Hutmacher und Lauer 2002).

5. Schlussfolgerung

Die in dieser Studie getesteten Materialien zeigen alle – mit Ausnahme von Osteoinductal – eine mehr oder weniger gute Proliferationstendenz der getesteten Zelllinien auf ihrer Oberfläche. Sowohl in der Gruppe der alloplastischen, als auch in der Gruppe der xenogenen Knochenersatzmaterialien stach kein Material besonders hervor. Damit erwiesen sich weder die allogenen, noch die xenogenen Knochensubstitute generell als überlegen. Der Ursprung des Knochenersatzmaterials ist demnach kein entscheidender Faktor für die Erfolgswahrscheinlichkeit.

Durch Kontrollexperimente mit nicht-adhaerenten Zellen ließ sich zeigen, dass die eher geringen Proliferationswerte bei Bio-Oss Spongiosa nicht auf zytotoxische lösliche Bestandteile zurückzuführen sind. Dies scheint eher ein Problem der primären Zellanheftung zu sein, was unter anderem in der im Herstellungsprozess enthaltenen Sinterung begründet liegen könnte. Auch Cerasorb zeigte keine Beeinflussung der Zellproliferation durch lösliche Bestandteile. Es ließ sich jedoch feststellen, dass eine Kombination mit Proteinen (Bio-Oss Collagen) oder kurzkettigen Proteinsequenzen (P-15) auf zellulärer Ebene keine Vorteile hinsichtlich der Anlagerung und Proliferation von osteoblastären Zelllinien bringt. Osteoinductal als einziges pastenförmiges Knochenersatzmaterial scheint auf zellulärer Ebene zumindest in diesem Modell einen negativen Einfluss auf die natürliche Zellphysiologie osteoblastärer Zelllinien zu unterhalten.

Diese in-vitro Beobachtungen können nicht zwangsweise auf die in-vivo Situation übertragen werden. Weiterführende tierexperimentelle und klinische Untersuchungen der verwendeten Werkstoffe und der Knochenmarkstammzellen hinsichtlich der Stammzelltherapie sollten sich daher anschließen.

6. Zusammenfassung

In den vorliegenden Untersuchungen wurde das Proliferations-, Differenzierungs- und Adhäsionsverhalten osteogener Zelllinien auf unterschiedlichen Knochenersatzmaterialien getestet. Hierbei wurden Osteosarkomzellen, primäre Osteoblasten sowie Knochenmarkstammzellen auf fünf Knochenersatzmaterialien alloplastischen (Cerasorb, Osteoinductal) und xenogenen (Bio-Oss Spongiosa, Bio-Oss Collagen und P-15) Ursprungs mittels eines in-vitro Modells kultiviert.

Nach Inkubation der Zellen auf den zu testenden Materialien wurde nach 2 Stunden sowie 3, 6, 10 und 14 Tagen eine Überprüfung der Zellzahl mittels ATP-Proliferationsassay durchgeführt. Auf Basis dieser Daten wurden individuelle Proliferationsindices berechnet, welche der statistischen Auswertung dienten. Eine nicht adhärente U-937-Kultur diente der Überprüfung von eventuell in den KEM enthaltenen löslichen zytotoxischen Bestandteilen. Zur weiteren Interpretation kamen zudem ein Osteocalcin-ELISA, histomorphologische Auswertungen der alkalischen Phosphatase-Aktivität sowie eine rasterelektronenmikroskopische Betrachtung der KEM zum Einsatz.

Alle drei Zelllinien zeigten auf Cerasorb und P-15 die signifikant höchsten Proliferationsfaktoren. Auf Bio-Oss Spongiosa ließen nur die Osteosarkomzellen auf einen signifikanten Anstieg der Messwerte über die Zeit rückschließen. Die Knochenersatzmaterialien Bio-Oss Collagen und besonders Osteoinductal zeigten vergleichsweise wenig Zellwachstum. Durch Kontrollexperimente mit nicht adhärenten Zellen (U 937) konnte zudem gezeigt werden, dass das Wachstumsverhalten der Zellen hauptsächlich auf die Oberflächenbeschaffenheit der einzelnen KEM zurückzuführen war und im Falle von Bio-Oss Spongiosa anders als bei Osteoinductal nicht auf das Vorhandensein zytotoxischer Inhaltsstoffe beruhte. Diese Resultate klassifizieren somit vor allem Cerasorb, P-15 und Bio-Oss Spongiosa als adäquate Knochenersatzmaterialien.

Unter Berücksichtigung der eingeschränkten Übertragbarkeit der in-vitro Ergebnisse ließ sich schlussfolgern, dass alle untersuchten Knochenersatzmaterialien mit Ausnahme von Osteoinductal und Bio-Oss Collagen als Scaffolds für proliferierende Zellen aus autologen Knochenspänen zur Knochenregeneration geeignet sind. Eine Kombination mit Proteinen (Bio-Oss Collagen) oder kurzkettigen Proteinsequenzen (P-15) scheint zumindest auf zellkultureller Ebene keine Vorteile hinsichtlich der Anlagerung und Proliferation von osteoblastären Zelllinien zu bringen.

7. Literaturverzeichnis

1. Garg, A.K.: Grafting materials in repair and restoration. In: Lynch, S.E.; Genco, R.J.; Marx, R.E. (eds.): Tissue Engineering. Applications in maxillofacial surgery and periodontics. Illinois, Quintessence, 83-102 (1999).

2. De Boer H.: Early research on bone transplantation. In: Aebi M.I., Regazzoni P. (Hrsg) Bone transplantation. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1989: 7-19.

3. Yildirim M., Spiekermann H., Biesterfeld S, Edelhoff D.: Maxillary sinus augmentation using xenogenic bone substitute material Bio-Oss in combination with venous blood. A histologic and histomorphometric study in humans. Clin Oral Impl Res 11, 217-229 (2000a).

4. Le Geros R.Z., LeGeros J.P.: Bone substitute materials and their properties. In: Schnettler R., Markgraf E.: Knochenersatzmaterialien und Wachstumsfaktoren. Thieme, Stuttgart-New York, 12-18 (1997).

5. Ring M.E.: Geschichte der Zahnmedizin. Könemann-Verlag, Köln (1997).

6. Kübler N.R.: Osteoinduktion und –reparation. Mund Kiefer Gesichtschir 1:2-25 (1997)

7. Kübler N.R.: Knochenregeneration durch Osteoinduktion. Dtsch Zahnärztl Z 53, 834-843 (1998).

8. Feifel H.: Osteoinduktion und Osteokonduktion –Therapie des Knochendefektes mit Proteinen und xenogenem Knochen. Dtsch Zahnärztl Z 51, 144-155 (1996).

9. Schenk R.K.: Bone Regeneration: Biological Basis. In: Buser D., Dahlin C., Schenk R.K.: Guided Bone Regeneration in Implant Dentistry. Quintessence, Chicago, Berlin, London, 49 (1994).

10. Urist M.R.: Bone Morphogenetic protein induced bone formation and the bone – bone marrow consortium. In: Aebi M., Regazzoni P. (Hrsg): Bone transplantation, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1989: 185-197.

11. Lauer G., Implantologie 2002; 10/2: 159-174.

12. Delloye C., Cnockaert N., Cornu O.: Bone substitutes in 2003: An overview; Acta Orthopaedica Belgica, Vol. 69-1-2003.

13. Kübler N.R., Würzler K.: Bone morphogenetic proteins, Implantologie 6, 177-192 (2002).

14. Reuther J.F., Bill J.S.: Plastische- und wiederherstellende Mund- Kiefer und Gesichtschirurgie. In: Horch H.H. (Hrsg.): Praxis der Zahnheilkunde 10/2, Mund-, Kiefer-, Gesichtschirugie II, Urban & Schwarzenberg, München, 329-365 (1991).

15. Behrens E., Kreusch Th., Jonas S., Silbernagel E.: Komplikationen bei und nach Knochenentnahme aus dem Beckenkamm. Dtsch Zahnärztl Z 56, 66-68 (2001).

16. Friedman A.: Osteologiekongreß in Venedig vom 14. bis 16. Mai 1989. Paradontol.; 3: 275-289 (1998a).

17. Spallek H., Deschner J.: Glossar der Grundbegriffe für die Praxis. Knochentransplantation und Implantation. Parodontol. 1995; 4: 331-336.

18. Misch C.E., Dietsh F.: Bone-grafting materials in implant dentistry. Impl Dent; 2:158-167 (1993).

19. Schliephake H., Neukam F.W., Wichmann M., Hausamen J.E.: Langzeitergebnisse osteointegrierter Schraubenimplantate in Kombination mit Osteoplastiken. Z Zahnärztl Implantol 13, 73-78 (1997).

20. Buns C.E.: Parodontologie - 13 Jahre GTR. Bericht über die 70. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Parodontologie vom 8. bis 9. September 1995 in Bremen. Schweiz. Monatsschr. Zahnmed.; 105: 1469-1472 (1995).

21. Hausamen J.E.: Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie. Kirschnersche allgemeine und spezielle Operationslehre. Springer-Verlag, 71-89, Berlin 1995.

22. Koeck B., Wagner W.: Praxis der Zahnheilkunde, Band 13, Implantologie; Diedrich P., Heidemann D., Horch H.H., Koeck B. (Hrsg.), Urban & Schwarzenberg: 1-218, München 1996.

23. Kloss F.R., Neukam F.W.: Rekonstruktive Knochenchirurgie. Methoden der letzten 15 Jahre. Z Zahnärztl Implantol 15, 33-43 (1999).

24. Hofmann G.O., Lob G.: Knochenbanken und allogene Knochentransplantation beim Menschen. In: Huggler A.H., Kuner E.H.: Hefte zur Unfallheilkunde 216, 35-44 (1991).

25. Simonds R.J., Holmberg S.D., Hurwitz R.L.: Transmission of human deficiency virus type 1 from a seronegative organ and tissue donor. N Engl J Med 326, 726-732 (1992).

26. Mellonig J.T., Prewett A.B., Moyer M.P.: HIV inactivation in a bone allograft. J Periodontol 63, 979-983 (1992).

27. Kübler N.R., Reuther J., Kirchner T., Priessnitz B., Sebald W.: Osteoinductive morphologic, and biomechanical properties of autolyzed, antigen-extracted, allogenic human bone. J Oral Maxillofac Surg 51, 1346-1357 (1993).

28. Hürzeler M.B.: Versorgung der augmentierten Kieferhöhle mit implantatgetragenem Zahnersatz. Eine tierexperimentelle und klinische Studie. Habilitationsschrift. Freiburg (1995).

29. Nevins M., Mellonig J.T.: Enhancement of the damaged edentulous ridge to receive dental implants: a combination of allograft and the GORE-TEX membrane. Int J Periodontol Rest Dent 12, 97-111 (1992).

30. Urist M.R.; Iwata H.; Ceccotti P.L.; Dorfman R.L.; Boyd S.D.; McDoWell R.M.; Chien C.: Bone morphogenesis in implants of insoluble bone gelantin. Proc Natl Acad Sci USA 70, 3511-3515 (1973).

31. Ehmke B., Flemmig T.F.: Knochen und Knochenersatzmaterialien zur parodontalen Regeneration. Gemeinsame Stellungnahme der Deutschen Gesellschaft für Parodontologie (DGP) und der Deutschen Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten (GDZMK). 1-3; (1998).

32. Claes L.: Stellenwert allogener Knochenbank aus klinischer und hygienischer Sicht. Hefte zur Unfallchirurgie 232, 251-255 (1993).

33. Rehm H.E.: Alternativen zum allogenen Knochenersatz. Hefte zur Unfallchirurgie 232, 255-260 (1993).

34. Schwartz Z., Mellonig J.T., Carnes D.L. Jr., et al.: Ability of commercial demineralized freeze-dried bone allograft to induce new bone formation. Periodontol.; 67:918-926 (1996).

35. Reynolds M.A.; Bowers G.M.: Fate of demineralized freeze-dried bone allografts in human intrabony defects. J Periodontol 67, 150-157 (1996).

36. Pinholt E.M.; Haanaes H.R.; Donath K.; Bang G.: Titanium implant insertion into dog alveolar ridges augmented by allogenic material. Clin Oral Impl Res 5, 213-219 (1994).

37. Tolman D.E.: Reconstructive procedures with endosseous implants in grafted bone: a review of the literature. Int J Oral Maxillofac Implants. 1995 May-Jun;10(3):275-94.

38. LeGeros R.Z.: Formation and transformation of calcium phosphates: relevance to vascular calcification. Z Kardiol.;90 Suppl 3:116-24 (2001).

39. Osborn J.F.; Newesely H.: The material science of calcium phophate ceramic. Biomaterials 1, 108-111 (1980).

40. LeGeros R.Z.: Calcium phosphate materials in restorative dentistry: a review. Adv Dent Res 2, 164-180 (1988).

41. Kohal R.-J., Cassellas J., Dennison D.K., Caffesse R.G., Z Zahnärztl Implantol 17;3, 103ff (2001).

42. Schlickewei W.; Paul C.: Experimentelle Untersuchung zum Knochenersatz mit bovinem Apatit. In: Huggler A.H.: Kuner E.H. (Hrsg.): Aktueller Stand beim Knochenersatz. Hefte zur Unfallheilkunde 59-69 (1991).

43. Pettis Y.G.; Kaban L.B.; Glowacki J.: Tissue response to composite ceramic hydroxyapatite/ demineralized bone implants. J Oral Maxillofac Surg 48, 1068-1074 (1990).

44. Refior H.J., Hackenbroch M., Wirth C.J.: Knochenersatzstoffe. Orthopäde; 2: 71-79 (1998).

45. Lynch S.E., Genco R.J., Marx R.E.: Tissue engineering: applications in maxillofacial surgery and periodontics. Quintessence books; 86-99 (1999).

46. Herstellerinformationen: Informationsblätter der Firmen Biora GmbH, Bad Homburg; Curasan Pharma GmbH, Kleinostheim; Geistlich Biomaterials, Baden-Baden; Oraltronics, Bremen, (2000).

47. Yildirim M., Präimplantologische Knochenregeneration unter besonderer Berücksichtigung der Verwendung von Knochenersatzmaterialien: Ergebnisse experimenteller und klinischer Untersuchungen, Habilitation (2002).

48. Vacanti J.P., Morse M.A., Saltzman W.M., Domb A.J., Perez-Atayde A., Langer R.: Selective cell transplantation using bioabsorbable artificial polymers as matrices. J Ped Surg; 23: 3-9 (1988).

49. Langer R., Vacanti J.P., Vacanti C., Atala A., Freed L.E., Vunjak-Novakovic G.: Tissue engineering: Biomedical applications. Tissue Eng; 1/2 151-161 (1995).

50. Chiriac G.S.D., Herten M., Rothamel D., Becker J.: Autologe Knochenspantransplantation: Einfluss des Knochenfilters auf die Vitalität der Osteoblasten. Arbeitsgemeinschaft für Kieferchirurgie; DGZMK (2004).

51. Tsuang Y.H.; Lin F.H.; Sun J.S.; Hang Y.S.; Liu H.C.: In vitro cell behavior of osteoblasts on Pyrost bone substitute. Anatom Rec 247, 164-169 (1997).

52. Trentz O.A.; Platz A.; Helmy N.; Trentz O.: Interactions of osteoblast cells to titanium, steel and hydroxyapatite implants. Swiss Surg 4, 203-209 (1998).

53. Mullis K.B., Faloona F.: Specific synthesis of DNA in-vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol 155: 335-350, 1987

54. Rodan G.A.; Heath J.K.; Yoon K.; Noda M.; Rodan S.: Diversity of the osteoblastic phenotype. In: Cell and Molecular Biology of Vertebrate Hard Tissue (Evered D.; Harnett S., Hrsg.), John Wiley & Sons, Chichester, New York, 78-91 (1988).

55. Robinson R.: The possible significance of hexosephosphoric esters in ossificaton. Biochem J 27, 286-293 (1923).

56. Beertsen W.; van den Bos T.: Alkaline phosphatase induces the mineralization of sheets of collagen implanted subcutaneously in the rat. J Clin Invest 89, 1974-1980 (1992).

57. Young D.S.(Ed.): Effects of Drugs on clinical Laboratory Tests 3rd ed., AACC Press, Washington/DC (1990).

58. Seitzer U.; Bätge B.; Açil Y.; Müller K.: Transforming growth factor β-1 influences lysyl hydroxylation of collagen I and reduces steady-state levels of lysyl hydroxylase mRNA in human osteoblast like cells. Eur J Clin Inves 25, 959-966 (1995).

59. Zambonin G.; Grano M.; Verrier S.; Bareille R.; Dard M.; Amédéé J.: Osteoprogenitor cells from human bone marrow isolation, characterization and colonization of a natural bone mineral ceramic, In: Schnettler H.; Markgraf E.; editors. Knochenersatzmaterialien und Wachstumsfaktoren. New York: Georg Thieme Verlag, S. 92-99 (1997).

60. Yeh L.C.; Betchel K.P.; Lee J.C.: Inhibition of BMP receptor synthesis by antisense oligonucleotides attenuates OP-1 action in primary cultures of fetal rat calvaria cells. J Bone Miner Res 13, 1870-1879 (1998 a).

61. Yeh L.C.; Adamo M.L.; Duan C.; Lee J.C.: Osteogenic protein – 1 regulates insulin-like growth factor – I (IGF-I), IGF-II and IGF-binding protein-5 (IGFBP-5) gene expression in fetal rat calvaria cells by different mechanisms. J Cell Physiol 175, 78-88 (1998 b).

62. Açil Y.; Terheyden H.; Dunsche A.; Fleiner B.; Jepsen S.: Three dimensional cultivation of human osteoblast-like cells on highly porous natural bone mineral. J Biomed Mater Res 51, 703-710 (2000).

63. Roggendorf W.; Strunz V.; Gross U.M.: Osteoblasten-Zellkulturen. Z Zahnärztl Implantol II, 197-202 (1986).

64. Açil Y.; Schilde K.; Terheyden T.; Jepsen S.: Biokompatibilität von sechs verschiedenen Knochenersatzmaterialien in der Osteoblastenzellkultur. Osteologie 8, 89-90 (1999).

65. Bhatnagar R.S.; Qian J.J.; Wedrychowska A.; Sadeghi M.; Wu Y.M.; Smith N.: Design of biomimetic habitats for tissue engineering with P-15, a syhthetic peptide analogue of collagen. Tissue Eng 5: 53-56 (1999).

66. Qian J.J.; Bhatnagar R.S.: Enhanced cell attachment to anorganic bone mineral in the presence of a syhthetic peptide related to collagen. J Biomed Mater Res 31: 545-554 (1996).

67. Malik M.A.; Bizios P.R.; Doremus R.H.: Osteoblasts on hydroxylapatite, alumina and bone surfaces in-vitro: Morphology during the first 2 h of attachment. Biomaterials 13, 123-128 (1992).

68. Trisi P.; Rao W.; Rebaudi A.; Fiore P.: Histologic effect of pure-phase beta-tricalcium phosphate on bone regeneration in human artificial jawbone defects. Int J Periodontics Restorative Dent. 2003 Feb;23(1):69-77.

69. Szabo G.; Suba Z.; Hrabak K.; Barabas J.; Nemeth Z.: Autogenous bone versus ß-tricalcium phosphate graft alone for bilateral sinus elevations (2- and 3- dimensional computed tomographic, histologic and histomorphometric evaluations): preliminary results. Int J Oral Maxillofac Implants 16, 681-692 (2001).

70. Jensen S.S.; Merete A.; Pinholt E.M.; Hjørting-Hansen E.; Melsen F.; Ruyter E.: Tissue Reaction and Material Characteristics of four Bone Substitutes. Int J Oral Maxillofac Implants, 11: 55-66 (1996).

71. Stephan E.B.; Jiang D.; Lynch S.; Bush P.; Dziak R.: Anorganic bovine bone support osteoblastic cell attachment and proliferation. J Periodontol 70, 364-369 (1999).

72. Açil Y., Springer N.G., Broek V., Terheyden H., Jepsen S.: Effects of bone morphogenetic protein-7 stimulation on osteoblasts cultured on different biomaterials. J Cell Biochem 86, 90-98 (2002).

73. Scarano A.; Pecora G.; Piatelli M.; Piatelli A.: Osseointegration in a Sinus augmented with bovine porous bone mineral: Histological results in an Implant retrieved 4 years after Insertion. A case report. J Periodontol., 75: 1161-1166 (2004).

74. Kohal R.J.; Hurzeler M.B.; Schneider S.R.; Riede U.N.; Caffesse R.G.:The effect of a calcium hydroxide paste on wound healing and osseointegration of dental implants. A pilot study in beagle dogs. Clin Oral Implants Res. Oct;8(5):375-85 (1997).

75. Trentz O.A.; Zellweger R.; Amgwerd M.G.: Testung von Knochenimplantaten auf Zelllinien und humanen Osteoblasten. Unfallchirurg. 100, 30-43 (1997).

76. Cheung H.S.; Tofe A.J.: Mechanism of cell growth on calcium phophate particles: role of cell-mediated dissolution of calcium phophate matrix. STP Pharma Sciences 3: 51-55 (1993).

77. Malekzadeh R.; Hollinger J.Q.; Buck D.; Adam D.F.; McAllister B.S.: Isolation of human osteoblast-like cells and in-vitro amplification for tissue engeneering. J Periodontol. 69, 1256-1262 (1998).

78. Grinell F.: Cellular adhesiveness and extracellular substrate. Int Rev Cytol 53, 65-129 (1978).

79. Pittenger M.F.; Mackay A.M.; Beck S.C.; Jaiswal R.K.; Douglas R.; Mosca J.D.; Moorman M.A.; Simonetti D.W.; Craig S.; Marshak D.R.: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science. Apr 2;284(5411):143-7 (1999).

80. Kassem M.; Risteli L.; Mosekilde L.; Melsen F.; Eridsen E.F.: Formation of osteoblast-like cells from human mononuclear bone marrow cultures. APMIS. Mar;99(3):269-74 (1991).

81. Seyedin S.M.; Thompson A.Y.; Rosen D.M.; Piez K.A.: In-vitro induction of cartilage-specific macromolecules by a bone extract. J Cell Biol. Dec;97(6):1950-3 (1983).

82. Robey P.R.; Termine J.D.: Human bone cells in-vitro. CalcifTissueInt 37, 453-460 (1985).

83. Wergedal J.E.; Matsuyama T.; Strong D.D.: Differentiation of normal human bone cells by transforming growth factor-β and 1,25$(OH)_2$Vitamin D3. Metabolism 41, 42-48 (1992).

84. Stringa E.; Filanti C.; Giunciuglio D.; Albini A.; Manduca P.: Osteoblastic cells from rat long bone: characterization of their differentiation in culture. Bone 16, 663-670 (1995).

85. Ahmad M.; McCarthy M.; Gronowicz G.: An in-vitro model for mineralization of human osteoblast-like cells on implant materials. Biomaterials 20, 211-220 (1999).

86. Ewers R.; Turhani D.; Item C.B.; Kapral D.; Thurnher D.; Cvikl B.; Weissenböck M.; Erovic B.M.; Lauer G.: “Bioengineered Knochen-Produktion” - Aktuelle Anwendungen in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie; Z Zahnärztl Impl., 19(4), (2003).

87. Jäger M.; Wild A.; Krauspe R.: Pluripotente mesenchymale Stammzellen und Osteogenese (II): Biomaterialien und klinische Anwendung. Osteologie 11 (2), 78–87 (2002).

88. Hutmacher D.W.; Lauer G.: Basic Science and Clinical Trends of Tissue Engineering in Oral and Maxillofacial Surgery. Implantologie; 10/2: 143-156 (2002).

89. Klein C.P.A.T.; Driessen A.A.; De Groot K.: Relationship between the degradation behaviour of calcium phosphate ceramics and their physical-chemical characteristics and ultrastructural geometry. Biomaterials 5, 157-160 (1984).

Danksagung

Die Danksagung wollte ich ganz zum Schluss schreiben und ich hatte mir während dieser 1/12 Jahre immer wieder ausgemalt, was für ein Gefühl das sein muss endlich angekommen zu sein. Zwischendurch war ich auch immer wieder verzweifelt und fragte mich beizeiten, ob jemand meine Arbeit überhaupt mal zu Gesicht bekommen würde. Dass ich also an diesem Punkt angekommen bin, verdanke ich vor allem Professor Dr. Jürgen Becker, der es mir ermöglichte die vorliegende Dissertation anzufertigen, Dr. Daniel Rothamel, Dr. Monika Herten und Brigitte Beck.

Daniel, ich hoffe du weißt, wie unterstützend und motivierend Du besonders in dieser letzten Phase der Anfertigung warst und mich mit Deiner Geduld und Hilfsbereitschaft aufgebaut und wieder und wieder den Ehrgeiz in mir geweckt hast. Ohne dich wäre ich nicht da, wo ich jetzt mit meiner Promotion stehe. Du warst nicht nur mein Betreuer, sondern auch mein guter Freund. Danke dir.

Besonders möchte ich mich auch bei Euch, Monika und Brigitte, bedanken. Ich glaube nicht, dass ich mich irgendwo anders so gut aufgehoben gefühlt hätte. Ihr habt mich nicht nur in die Labortätigkeiten eingewiesen, sondern mich auch in Eurer Gemeinschaft aufgenommen. Ich hab mich sehr wohl bei Euch gefühlt und bin jetzt gewappnet für jegliche weitere experimentelle Studien und wissenschaftliche Arbeiten.

Alle weiteren Dankeschöne gehen an all diejenigen, die sich mein Genörgel anhören mussten, denen ich von Zeit zu Zeit absagen musste, und die meine Hochs und Tiefs mit Freude, Geduld und gutem Zureden erwidert haben. Um nur einige an dieser Stelle zu nennen: Danke Mama, danke Papa, Dani, Patti, Pilli, Jan M., Jan F., Ines, Amanda, Sara, Sandra, Sabrina, Kim und Uli!

Ja, liebe Eltern und ich muss gestehen, auch ohne Euch wäre ich nicht so schnell - sowohl zeitlich als auch nervlich - an dem vermeintlichem Ziel angekommen. Ich werde die wöchentlichen Nachfragen, wie ich denn vorankomme und wann ich denn endlich fertig bin, vermissen...Danke!!
Und ein bisschen Stolz bin ich zudem auch auf mich.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Karina Friesen
Geburtsdatum:	07.04.1979
Geburtsort:	Wuppertal
Staatsangehörigkeit:	Deutsch
Familienstand:	Ledig

Ausbildungsdaten:

1985-1989	Grundschule Bochum-Linden
1989-1995	Theodor-Körner-Gymnasium, Bochum
1995-1996	Stowe-boarding-school, England, Austauschjahr
1996-1998	Theodor-Körner-Gymnasium, Abitur

Universitäre Ausbildung:

1998	Beginn des Studiums der Zahnheilkunde an der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
1999	Naturwissenschaftliche Vorprüfung
2001	Zahnärztliche Vorprüfung
2003	Staatsexamen

Berufstätigkeit:

Jan 2004-Dez 2004	Ausbildungsassistentin in der Praxis Dr. B. Siepmann in Plettenburg
Seit Jan 2005	Weiterbildungsassistentin in der Kieferorthopädischen Gemeinschaftspraxis, Dr. K. Friesen, P. Bleifuß, Dr. M. Hahn in Moers