

Aus der Klinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. Norbert R. Kübler

**Biokompatibilität von dreidimensionalen
Knochenersatzmaterialien
mit humanen Vorläuferzellen**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Vorgelegt von

Anna Sine

2019

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

Gez:

Dekan/In:

Erstgutachter: Prof. Dr. Dr. Jörg Handschel

Zweitgutachterin: Prof. Dr. Michelle Ommerborn

„Der Zweifel ist der Beginn der Wissenschaft.

Wer nicht zweifelt, prüft nichts.

Wer nichts prüft, entdeckt nichts.

Wer nichts entdeckt, ist blind und bleibt blind.“

Teilhard de Chardin (1881-1955)

Meiner Familie gewidmet

Zusammenfassung

Die Überbrückung großer Knochendefekte stellt nach wie vor eine Herausforderung in der invasiven Humanmedizin und Zahnmedizin dar. Eine vielversprechende Alternative zur autologen Transplantation von Knochenmaterial bietet das osteogene *Tissue Engineering*. Hierbei wird ein extrakorporal hergestelltes Konstrukt aus einem Knochenersatzmaterial, geeigneten Zellen und Wachstumsfaktoren in einen Knochendefekt eingebracht.

Ziel dieser Studie war es, die Biokompatibilität von verschiedenen Knochenersatzmaterialien wie ICBM (*insoluble collagenous bone matrix*), BioOss® Collagen und NanoBone® mit humanen mesenchymalen Stammzellen aus Nabelschnurblut (unrestricted somatic stem cells = USSCs) zu untersuchen. Dazu wurden die Nabelschnurblutstammzellen auf den Biomaterialien ausgesät und anschließend einen und sieben Tage auf diesen kultiviert. Neben der Bestimmung des Attachments und der Proliferation der USSCs auf den Trägern durch CyQuant®-Assay am Tag eins und sieben, wurden zusätzlich die Ergebnisse aus Toxizitätsmessungen mittels CytoTox-ONE® als Maß für die Biokompatibilität dieser Scaffolds genommen. Für die morphologische und strukturelle Analyse der Knochenersatzmaterialien wurden Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen und eine μ -CT-Analyse der Materialien durchgeführt. Mit Hilfe von Lebendzell-Fluoreszenzmikroskopie konnte die Anwesenheit und die Position von lebenden Nabelschnurblutstammzellen auf einem Knochenersatzmaterial nach Färbung mit CellTracker Orange ermittelt werden.

Die Ergebnisse der CyQuant®-Analyse zeigen, dass das Zellattachment und die Proliferation der USSCs auf ICBM am besten waren, gefolgt von BioOss® Collagen. Auf dem rein synthetischen NanoBone® aus Hydroxylapatit (HA) ging die Zellzahl nach einer siebentägigen Kultivierung sogar leicht zurück. Diese Ergebnisse konnten durch Toxizitätsmessungen unterstützt werden. Hier zeigte sich ICBM als zellfreundlichste Matrix mit der geringsten Toxizität. Die anderen Materialien waren im Vergleich zu ICBM weniger zellfreundlich, wobei die Zelltoxizität insgesamt als gering zu verzeichnen war. Die strukturellen Eigenschaften für die Invasion und Proliferation der Zellen auf den Biomaterialien, die mittels REM und μ -CT ermittelt wurden, waren bei ICBM ebenfalls am besten.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass ICBM das Knochenersatzmaterial mit der besten Biokompatibilität von allen in dieser Studie untersuchten Materialien für das Tissue Engineering darstellt. Die Anwendung dieses Biomaterials kann die autologe Knochenentnahme und die damit verbundene Entnahmemorbidität bei den Patienten vermeiden. Die Etablierung dieses Scaffolds wird derzeit in zahlreichen *in vivo* Studien erforscht.

Summary

Treatment of large bone defects remains a challenge in the field of invasive human medicine and dentistry. A promising alternative to autologous bone grafting is osteogenic *tissue engineering*. In this procedure, an extracorporeal construct made of a bone replacement material, suitable cells and growth factors is introduced into a bone defect.

The aim of this study was to investigate the biocompatibility of various bone replacement materials such as ICBM (*insoluble collagenous bone matrix*), BioOss® Collagen and NanoBone® with unrestricted somatic stem cells (USSCs) from human umbilical cord blood. For this purpose, the stem cells from human umbilical cord blood were grown with the biomaterials and then cultivated for one to seven days. In addition to determining the attachment and proliferation of the USSCs on the slides using CyQuant® assay on day one and seven, the results from toxicity measurements using CytoTox-ONE® were also taken as a measure of the biocompatibility of these scaffolds. Scanning electron micrographs and μ -CT analysis of the materials were performed for morphological and structural analysis of the bone replacement materials. Live cell fluorescence microscopy was used to detect the presence and position of live umbilical cord blood stem cells in a bone substitute material after staining with CellTracker Orange.

The results of the CyQuant® analysis revealed the best outcome for cell attachment and proliferation of the USSCs on ICBM, followed by BioOss® collagen. The cell count slightly reduced after seven days of cultivation on the purely synthetic NanoBone® made from hydroxyapatite (HA). These results could be supported by toxicity measurements. Here, ICBM was the most cell-friendly matrix with the lowest toxicity. The other materials were less cell friendly compared to ICBM, with overall low cell toxicity. The structural characteristics of ICBM for cell invasion and proliferation on the biomaterials, as determined by SEM and μ -CT, were also the best.

In summary, ICBM is the most biocompatible bone replacement material of all the tissue engineering materials investigated in this study. The use of this biomaterial can avoid autologous bone graft harvesting and associated morbidity of harvesting in patients. The establishment of this scaffold is currently being researched *in numerous in vivo* studies.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
BMP	<i>Bone morphogenetic proteins</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CPD	<i>Critical Point Dryer</i>
CSD	<i>Critical Size Defect</i>
CSFD	<i>Critical Size Femur Defect</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethyl Sulphoxide
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	<i>Dullbecco's Phosphate-Buffered Saline</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
g	mittlere Erdbeschleunigung (≈9,81 m/s ²)
h	Stunden
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCL	Salzsäure
ICBM	<i>Insoluble Collagenous Bone Matrix</i>
kGy	KiloGray
LDH	Lactatdehydrogenase

M	Mol
mg	Milligramm
Min	Minuten
Mio.	Millionen
ml	Milliliter
mm	Millimeter
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NAD/H	Nicotinamidadenindinukleotid
nm	Nanometer
O ₂	Sauerstoff
p	p-Wert = Signifikanzwert
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pg	Pikogramm
PMMA	Polymethylenmethacrylat
REM	Rasterelektronenmikroskop
SiO ₂	Siliciumdioxid
TE	<i>Tissue Engineering</i>
USSC	<i>Unrestricted Somatic Stem Cell</i> (Nabelschnurblutstammzellen)

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Schematische Darstellung der Entwicklung eines Osteozyten aus einer mesenchymalen Stammzelle.
- Abb. 2: Schematische Darstellung einer Kollagenfibrille
- Abb. 3: Die essentielle Säulen des Tissue Engineering
- Abb. 4: Die drei wichtigsten Gruppen der Knochenersatzmaterialien
- Abb. 5: Übersicht über die synthetischen Knochenersatzmaterialien.
- Abb. 6: Überblick über die Eigenschaften der einzelnen Gruppen von Knochenersatzmaterialien.
- Abb. 7: Schematische Darstellung eines für diese Arbeit zugeschnittenen Biomaterialblocks.
- Abb. 8: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips von CytoTox-ONE®.
- Abb. 9: Rechenformel für die Ermittlung der Zytotoxizität eines Testkörpers mit CytoTox-ONE® nach Gebrauchsanweisung der Firma Promega®.
- Abb. 10: Proliferation von USSCs auf ICBM, BioOss® Collagen und NanoBone® mittels CyQuant®-Assay nach einer ein- und siebentägigen Inkubation der Stammzellen auf den Biomaterialien.
- Abb. 11: Darstellung der relativen Zytotoxizität der besiedelten Biomaterialien in Prozent (48-Stunden-Wert).
- Abb. 12 a), b): REM-Aufnahme eines ICBM vor der Zellbesiedlung.
- Abb. 13 a), b): REM-Aufnahme eines BioOss® Collagen vor der Zellbesiedlung.
- Abb. 14 a), b): REM-Aufnahme eines NanoBone® vor der Zellbesiedlung.
- Abb. 15: REM-Aufnahme eines ICBM mit USSC nach 7-tägiger Kultivierung.

- Abb. 16: REM-Aufnahme eines BioOss®-Collagen mit USSC nach 7-tägiger Kultivierung.
- Abb. 17: REM-Aufnahme eines NanoBone® mit USSC nach 7-tägiger Kultivierung.
- Abb. 18: Eine Fluoreszenzelektronenmikroskopische Aufnahme eines mit Celltracker™ Orange gefärbten USSCs auf NanoBone® nach einer 48-Stunden-Kultivierung. Aufnahme mit TX2-Filter.
- Abb. 19: Mikro-CT-Aufnahme eines 1x1x0,5 cm großen ICBM-Blocks.
- Abb. 20: Mikro-CT-Aufnahme eines 1x1x0,5 cm großen BioOss®-Collagen-Blocks.
- Abb. 21: Mikro-CT-Aufnahme eines 1x1x0,5 cm großen NanoBone®-Blocks.

Tabellenverzeichnis

Table 1: Fluoreszenzwerte von USSCs, die 1 Tag auf ICBM kultiviert wurden.

Table 2: Fluoreszenzwerte von USSCs, die 1 Tag auf BioOss® Collagen kultiviert wurden.

Table 3: Fluoreszenzwerte von USSCs, die 1 Tag auf NanoBone® kultiviert wurden.

Table 4: Fluoreszenzwerte von USSCs, die 7 Tage auf ICBM kultiviert wurden.

Table 5: Fluoreszenzwerte von USSCs, die 7 Tage auf BioOss® Collagen kultiviert wurden.

Table 6: Fluoreszenzwerte von USSCs, die 7 Tage auf NanoBone® kultiviert wurden.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Knochengewebe.....	2
1.2. Critical size defect.....	6
1.3. Tissue Engineering.....	7
1.4. Knochenersatzmaterialien.....	9
1.5. Ziel der Arbeit.....	13
2. Materialien und Methoden.....	15
2.1. Materialien.....	15
2.1.1. Zellen.....	15
2.1.2. Biomaterialien.....	15
2.1.3. Zellkulturen, Chemikalien.....	16
2.1.3.1. Zellkulturmedium.....	16
2.1.3.2. Einfriermedium.....	17
2.1.3.3. ICBM-Herstellung.....	17
2.1.3.4. CyQuant® Cell Proliferation Assay Kit.....	18
2.1.3.5. CytoTox-One®-Assay.....	18
2.1.3.6. CellTracker™ Fluorescent Dye (Green, Orange).....	19
2.1.3.7. Rasterelktronenmikroskopie.....	19
2.1.4. Geräte, Laborhilfsmittel.....	19
2.2. Methoden.....	22
2.2.1. Kultivierung der Zellen.....	22
2.2.2. Passagieren und Subkultivieren der Zellen.....	23
2.2.3. Zellzahlbestimmung.....	23
2.2.4. Kryokonservierung von Zellen.....	24
2.2.5. Herstellung von ICBM.....	25
2.2.6. Zuschneiden von NanoBone®-Blocks und BioOss®-Collagen-Blocks.....	27
2.2.7. Sterilisieren von Biomaterialien.....	27
2.2.8. Kultivierung der Zellen auf Biomaterialien.....	28
2.2.9. Messung der Zellproliferation mit Hilfe des CyQuant®-Assays.....	28
2.2.10. Rasterelektronenmikroskopie (REM).....	30
2.2.11. Mikro-Computertomographie.....	31

2.2.12. Zellvitalitätsassay (CytoTox-ONE®)	32
2.2.13. Lebendfärbung von Zellkulturen: CellTracker™ Vitalitätsfärbung (Orange)	34
2.2.14. Statistische Auswertung	35
3. Ergebnisse	36
3.1. Zellproliferation auf dreidimensionalen Trägermaterialien	36
3.2. Ergebnisse der Zytotoxizitätsanalyse mit CytoTox-One®	39
3.3. Ergebnisse der Rasterelektronenmikroskopie	41
3.4. Darstellung von vitalen Zellen auf den Biomaterialien	47
3.5. Ergebnisse der Mikro-Computertomografie	48
4. Diskussion	51
4.1. Auswahl der Zellen	51
4.2. Auswahl der Knochenersatzmaterialien	52
4.3. Proliferationsverhalten der USSCs	54
4.4. Rasterelektronenmikroskopie	55
4.5. Zelltoxizität	56
4.6. Lebendzell- Fluoreszenzmikroskopie	57
4.7. Mikro-CT-Analyse	57
5. Literaturverzeichnis	59
6. Danksagung	68

1. Einleitung

Der Einsatz von Knochenersatzmaterialien hat in der rekonstruktiven Chirurgie große Bedeutung, da sowohl durch traumatische, atrophische Ereignisse als auch durch Gewebeerstörung sich ausbreitender Tumore große Defekte von Hartgewebe mit einer starken Einschränkung der Lebensqualität einhergehen.

Trotz vielfältiger natürlicher Reparaturmechanismen können Defekte ab einer bestimmten Größe (*critical size defect* = CSD) ohne eine operative Intervention und ohne den Einsatz von Knochenersatzmaterialien nicht vollständig und regelrecht ausheilen (Hollinger und Kleinschmidt 1990; Schmitz und Hollinger 1986). Die Überbrückung dieser Knochendefekte stellt weiterhin ein klinisch relevantes und von Seiten der Forschung noch nicht gelöstes Problem dar (Schmidt-Rohlfing et al. 2009).

Als Goldstandard zur Behandlung solcher Defekte in der modernen Medizin wird auf Grund der optimalen immunologischen, knochenleitenden und knochenbildenden Eigenschaften der autologe Knochen (Autografts) eingesetzt (Schnettler et al. 2003; Pretorius et al. 2005). Die Probleme dieses Verfahrens sind die eingeschränkte Verfügbarkeit von körpereigener Spongiosa, besonders bei großen Defekten, und die mit dem Verfahren verbundene Entnahmemorbidity (Nkenke et al. 2004; Sasso et al. 2005). Das *Tissue Engineering* könnte an dieser Stelle ein elegantes Verfahren darstellen, um die limitierenden Faktoren bisheriger Methoden zur Förderung der Knochenregeneration zu umgehen.

Das *Tissue Engineering* ist ein Verfahren in dem ein extrakorporal *in vitro* hergestelltes Gewebe zur Wiederherstellung von Gewebekonstrukten verwendet wird. Die wichtigen Komponenten dieses Konzepts sind pluripotenten Stammzellen, Wachstumsfaktoren und eine geeignete dreidimensionale Matrix (*Scaffold*) (Bruder, S.P. und B.S. Fox, 1999). Nach der Kultivierung der lebens- und teilungsfähigen Stammzellen auf einem Zellträger wird dieser an eine benötigte Stelle transplantiert (Bianco, P. und P.G. Robey, 2001). *In vivo* wird anschließend durch zahlreiche Umbauvorgänge die Matrixsubstanz, die als

Leitstruktur für die Zellen dient, resorbiert und es bleibt ein generiertes Gewebe zurück.

Die Überbrückung von Hartgewebsdefekten durch dreidimensionale Knochenersatzmaterialien bietet erhebliche Vorteile, da die räumliche Struktur den Verhältnissen im nativen Knochen gut angepasst werden kann. Auch die Stabilität der Defektstelle wird günstig beeinflusst, da die Materialien mit ihrer Eigenstabilität intermediär zur Rekonstruktion der Knochenstruktur beitragen.

Die osteogene Differenzierung von Zellen auf zweidimensionalen Kollagengerüsten und anderen Biomaterialien wurde bisher auf molekularbiologischer wie auch auf histologischer Ebene in der Literatur beschrieben, um mit geeigneten Transplantaten diesem Problem zu begegnen (Naujoks et al., 2013). Die Fortschritte bei der Herstellung dreidimensionaler Gerüste aus denselben Materialien werfen nun die Frage auf, ob solche Zellen spezifisch auf diese Veränderung reagieren und andere Differenzierungsmuster aufweisen.

1.1. Knochengewebe

Das Knochengewebe ist ein hochspezialisiertes mesenchymales skelettbildendes Gewebe, das eine Schutz-, Stütz- und Speicherfunktion im Bauplan aller Wirbeltiere erfüllt. Es ist ein dynamisches Material, das sich ständig an die Belastungen des Körpers anpasst (Schünke, 2000). Zusätzlich bietet die Spongiosa der Röhren- und Plattenknochen einen idealen Ort für das rote blutbildende Knochenmark. Die äußere Substantia compacta bildet einen dichten Knochenmantel mit einer nur sehr geringen Porosität und macht etwa 80% des gesamten Körpergewichts aus. Sie umgibt den schwammartigen, porösen Innenraum, die Spongiosa, und bietet dem Knochen Stabilität (Eriksen EF et al., 1994). Die kollagenen Fasern gestatten dem Knochen sowohl die Eigenschaft der Zugfestigkeit, als auch von Dehnbarkeit. Die im Osteoid eingelagerten Mineralien verleihen dem Knochengewebe Druckfestigkeit. Das Zusammenspiel aus Kollagenfibrillen und Mineralien macht das Knochengewebe torsions- und biegefest.

Die Osteogenese der Wirbeltiere geht aus dem embryonalen Bindegewebe (Mesenchym) hervor und entwickelt sich auf zwei verschiedene Arten weiter. Bei der desmalen (direkten oder primären) Ossifikation entwickelt sich der Knochen direkt aus dem Mesenchym und findet sich als Knochen in der Schädelkalotte, im Gesichtsschädel und beim Schlüsselbein. Bei der direkten Osteogenese verdichten sich die Mesenchymzellen inselartig zu den sogenannten Ossifikationspunkten und differenzieren sich zu den Osteoblasten, die wiederum die Knochengrundsubstanz produzieren. Diesem Prozess folgt die Mineralisierung des Osteoids, wobei sich hauptsächlich die Mineralisierungen mit Kalzium und Phosphat zwischen den Kollagenfibrillen einlagern und damit die Osteoblasten zwischen den Verknöcherungspunkten einmauern. Aus den großen Osteoblasten entwickeln sich nun die kleinen runden Osteozyten (Michels und Neumann, 2007; Kühnel, 2008).

Bei der chondralen (indirekten oder sekundären) Ossifikation entwickelt sich zuerst aus dem Mesenchym ein Grundgerüst aus dem hyalinen Knorpel, das sogenannte Primordialskelett. Die mit den Blutgefäßen in den Knorpel eingewanderten Mesenchymzellen differenzieren sich zu den knorpelabbauenden Chondroklasten und knochenaufbauenden Osteoblasten, die sich später ebenfalls zu den Osteozyten entwickeln werden. Durch die zahlreichen Abbau-, Aufbau- und Mineralisierungsprozesse entsteht aus dem knorpeligen zellreichen und mineralarmen Knochenmodell ein vollständig entwickelter reifer Lamellenknochen (Michels und Neumann, 2007; Lüllmann-Rauch, 2009).

Hauptsächlich liegen im Knochen drei Zellarten vor, die sich aus undifferenzierten Mesenchymzellen oder mononukleären Blutmonozyten entwickeln: die Osteozyten, die Osteoblasten und die Osteoklasten.

Die Osteoblasten entwickeln sich aus den Präosteoblasten indem diese sich mitotisch teilen und sich differenzieren. Diese kleinen runden Zellen mit einem runden Zellkern liegen in unmittelbarer Nähe zu den funktionell ausgerichteten Knochen trabekeln und haben die Aufgabe organische Bestandteile der Knochenmatrix zu bilden. Erst wenn die Zellen in der Lage sind diese

unmineralisierte Grundsubstanz (Osteoid) zu produzieren, werden die Präosteoblasten zu Osteoblasten (Meyer and Wiesmann, 2006).

Nach der Mineralisierung dieser kollagenen organischen Knochengrundsubstanz, die etwa sechs Wochen dauert, differenzieren sich die Osteoblasten zu Osteozyten (Abb. 1.). Die Osteozyten, die in den konzentrisch angeordneten Lamellen liegen und für die weitere Lebensfähigkeit des Knochens zuständig sind, sorgen zusammen mit den knochenabbauenden Osteoklasten für das dynamische Gleichgewicht zwischen Knochenaufbau und Knochenabbau (Liebig, 1999).

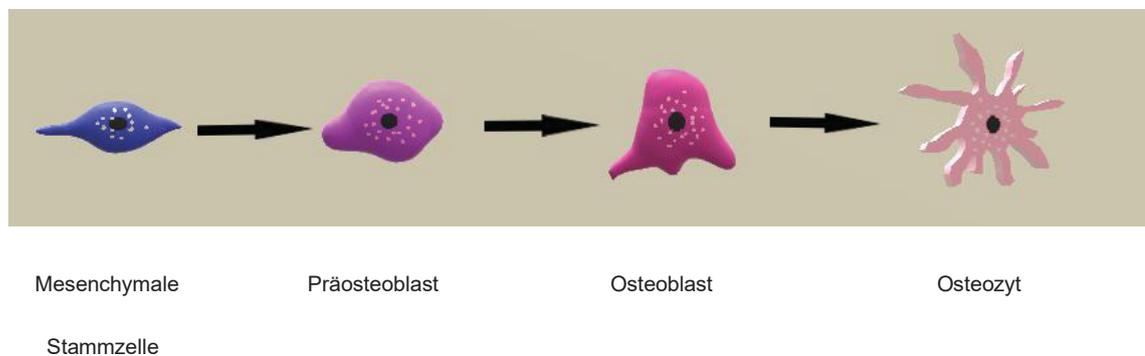


Abb. 1: Schematische Darstellung der Entwicklung eines Osteozyten aus einer mesenchymalen Stammzelle.

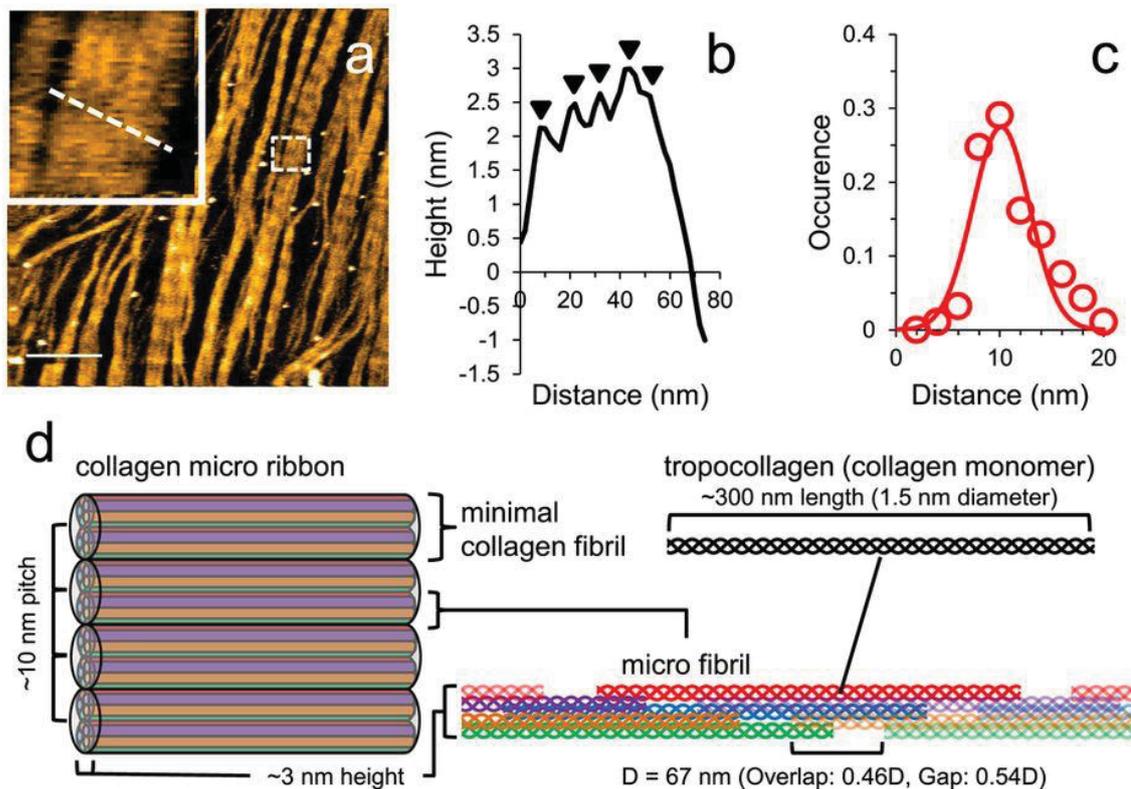
Knochenzellen, die von einer hämatopoetischen Zelle abstammen und eine resorptive Funktion haben, sind die Osteoklasten. Diese großen ein- und mehrkernigen Zellen liegen in Resorptionslakunen des Knochens, den sogenannten Howship-Lakunen, und sind in der Lage mit ihren sauren Phosphatasen und proteolytischen Enzymen die verkalkte Knochensubstanz zu resorbieren.

Der vollständig entwickelte Knochen setzt sich aus einem kompakten und einem spongiösen Gewebe zusammen und wird innen und außen von schützenden und nutritiv wirkenden Knochenhäuten, dem Periost und Endost, ausgekleidet. Insgesamt besteht es aus zwei verschiedenen Phasen: zu 65 Prozent aus einer anorganischen festen Phase aus Calcium-Hydroxylapatit und zu 35 Prozent aus einer organischen Phase aus Kollagenfibrillen. Dieser organische Anteil des Knochens setzt sich zum größten Teil (90%) aus Kollagen Typ I aber auch aus

Proteoglykanen, Glykosaminoglykanen, Lipiden, Kohlenhydraten und nichtkollagenen Proteinen (Rohen, 2000; Epple, 2003).

Die Kollagenfasern bilden ein dreidimensionales Netzwerk, das sich in seiner Struktur und Ordnung je nach Knochenart (Geflechtknochen oder Lamellenknochen) unterscheidet. Dieses Netzwerk dient als Leitstruktur bei der Mineralisierung des Knochens.

Der mineralische Anteil des Knochens besteht aus nanokristalinem Hydroxylapatit, der zu den biologischen Apatiten gehört und als einziges Kalziumphosphat bei dem physiologischen pH-Wert im menschlichen Körper stabil bleibt. Apatite beinhalten eine hohe Konzentration an einfach negativgeladenen Fremdionen, die sie jederzeit frei austauschen können (Wopenka and Pasteris, 2005). Zu den wichtigsten Fremdionen gehören Calcium (34,8%), Phosphor (15,2%), Carbonat (4-6%), Natrium (0,9%), Magnesium (0,72%), Chlorid (0,13%), Kalium (0,03%) und Fluorid (0,03%). Daneben beinhaltet das Knochengewebe einige Spurenelemente wie Eisen, Kupfer, Zink und Barium. Einen überwiegenden Anteil im menschlichen Knochen nimmt ein Calcium-defizitäres Hydroxylapatit mit einer chemischen Formel $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ ein (LeGeros, 1991; Dorozhkin et al., 2002). Diese Apatitkristalle ordnen sich längs der Kollagenfibrillen ein oder liegen in diesen und sind von einer Hülle aus proteoglykanreicher Matrix umgeben (Abb. 2.). Dieses Zusammenspiel von organischen und anorganischen Verbindungen verleiht dem Knochen seine Stabilität, Härte und Funktion (Liebich, 1999).



(a) HS-AFM-Bild eines Kollagen-Mikrobands, zusammengesetzt aus Typ I-Kollagen aus dem Rattenschwanz. Der durch gestrichelte Linie hervorgehobener Bereich zeigt fünf vertikal liegende Kollagenfibrillen. Scanfläche, $1000 \times 1000 \text{ nm}^2$ mit 500×500 Pixeln; Bar, 200 nm; Z-Skala, 5 nm. (b) Höhenprofil entlang der gestrichelten Linie entlang der Kollagenfibrille aus dem Bild (a). Die Peaks werden durch Pfeile angezeigt. (c) Verteilung des Abstandes zwischen Kollagenfibrillen in einem Kollagenmikroband. (d) Schematische Darstellung Kollagenfibrille. Aus diesem Schema wird die Anzahl der Kollagenmonomere auf 2975 pro Quadratmillimeter geschätzt.

Abb. 2: Schematische Darstellung einer Kollagenfibrille nach Takahiro W.N. (Takahiro W.N. et al., 2016).

1.2. Critical size defect

Critical size defect (CSD) ist der kleinste intraossäre Defekt, der während der Lebenszeit eines Tieres nicht ohne eine Intervention spontan heilen kann (Spicer, P. et al., 2012). CSD wird in der Forschung als Negativkontrolle verwendet um die Wirkung einer Intervention in Form von Implantaten, Knochenersatzmaterialien oder wachstumsfördernde Faktoren zu untersuchen (Schmitz JP, Hollinger JO, 1986).

Diese Größe eines CSD unterscheidet sich je nach Spezies, Stamm des Tieres, Rasse, Alters, Geschlechts, Größe und der Lokalisation des Knochendefekts

(Gugala Z. und Gogolewski S., 1999; Schmitz J.P., 1986). Am häufigsten wird eine Ratte als Versuchstier für das CSD genommen, genauer ihr Femurknochen (*critical size femur defect* = CSFD). Die Angaben zum CSFD variieren beträchtlich von Studie zu Studie und ermöglichen keine genaue Feststellung für die Größe des *Critical size defects*. Jäger et al. definieren einen 4 mm großen Defekt am Femur als CSFD (Jäger et al., 2005), Drosse et al. bezeichnete einen Knochendefekt von 6 mm als CSFD (Drosse I. et al., 2008; ZHAO et al., 2009), bei Tölle wird er mit 8 mm (Tölle H. et al., 2011) und bei Vögelin ein Defekt von 1 cm Größe angegeben (Vögelin E. et al., 2005).

Ein weiteres Tiermodell mit einer ähnlichen Dimension, Knochenstruktur und den mechanischen Eigenschaften wie ein Mensch ist das Schaf (Gerhart et al., 1993; Martini, 2001). Es wird die Tibia des Tieres bevorzugt als Untersuchungsobjekt genommen. An der Diaphyse der Tibia gilt ein Defekt als CSD bei 10 Prozent der Knochenlänge, oder wenn der Defekt das 1 bis 1,5-fache des Knochendurchmessers ausmacht (Wippermann und Kniesch, 1994; Schönberger, 2009).

1.3. Tissue Engineering

Das *Tissue Engineering* (TE) ist ein interdisziplinäres Verfahren mit dem Ziel ein Substitut eines Gewebes zu entwickeln, das die Funktionen und Eigenschaften des zu ersetzenden Gewebes unterstützt oder übernimmt (Langer R., Vacanti J.P., 1993). Der Begriff *Tissue Engineering* wurde schon im Jahr 1987 von der *National Science Foundation* definiert und vereint Prinzipien, Methoden und Erkenntnisse der Materialforschung, Physik, Biologie, Medizin und Embryologie. Eine der ersten wissenschaftlichen Arbeiten, die den Begriff *Tissue Engineering* geprägt hat, war die Publikation von Wolter und Meyer im Jahr 1984, die die Entwicklung eines Cornea-Implantats aus Polymethylenmethacrylat (PMMA) und epithelähnlichen Zellen beschreibt (Wolter und Meyer, 1984). Heute wird *Tissue Engineering* in unterschiedlichen medizinischen Fachrichtungen genutzt um zahlreiche Gewebearten wie Haut, Knochen, Knorpel, Herzklappen und Gefäße herzustellen.

Die drei grundlegenden Säulen des TE sind die pluripotenten Stammzellen, die Wachstumsfaktoren und eine geeignete dreidimensionale Matrix (Scaffold)

(Bruder, S.P. und B.S. Fox, 1999) (Abb. 3.). Diese werden ja nach Anforderung an das benötigte Substitut optimal aufeinander abgestimmt und kombiniert.

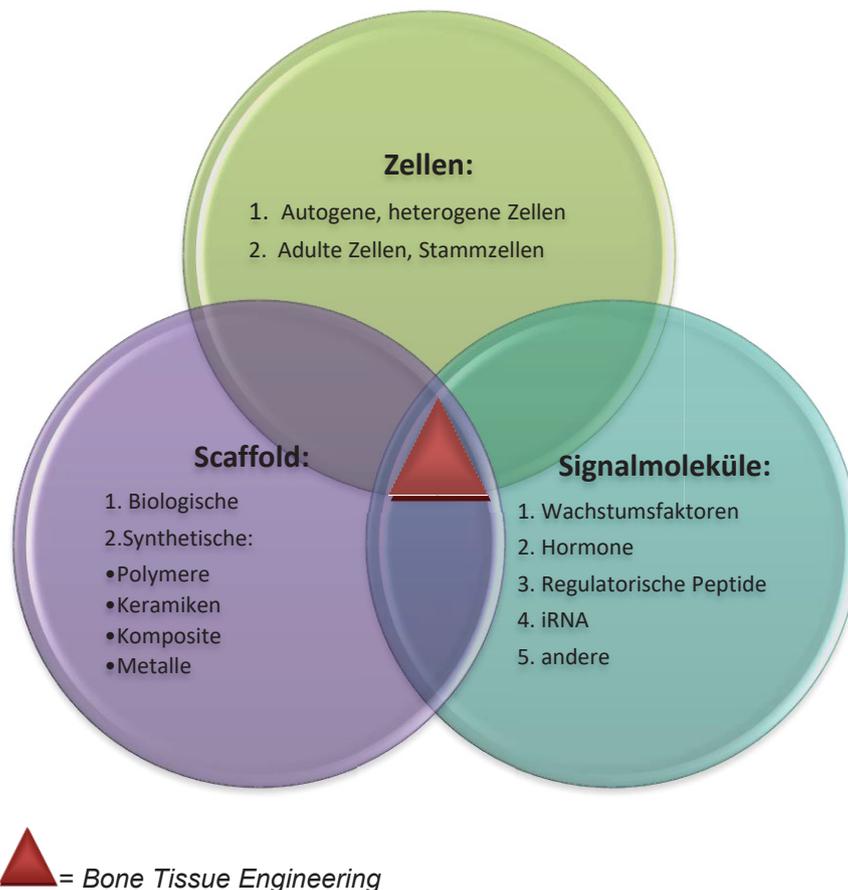


Abb. 3.: Die essentielle Säulen des *Tissue Engineering* nach Carvalho (Carvalho et al., 2013)

Hierbei werden Zellen auf ein artifizielles Trägermaterial (Scaffold) aufgebracht und mit Signalmolekülen, meist Wachstumsfaktoren, versetzt (Bianco, P. und P.G. Robey, 2001). Dabei induzieren die bioaktiven Moleküle Proliferation, Differenzierung und metabolische Aktivität der Zellen. In der dreidimensionalen Matrix können sich die Zellen anhaften und vermehren, außerdem bietet das Scaffold ein stabiles Gerüst bei der Implantation (Carvalho et al., 2013).

Das Prinzip des *Tissue Engineering* kann man unter anderem am menschlichen Knochengewebe anwenden. Durch traumatische, atrophische Ereignisse als auch durch Gewebeerstörung sich ausbreitender Tumore entstehen oft große Defekte im Weichteilgewebe und den Knochen, die mit einer starken Einschränkung der Lebensqualität des Patienten einhergehen. Während die

Entwicklung von vitalem Hautersatz oder autologen Knorpeltransplantaten sehr weit entwickelt ist, stellt die Herstellung von artifiziellem Knochen weiterhin eine Herausforderung dar.

Ziel des *Tissue Engineering* am knöchernen Skelett ist die Neubildung und die Heilung des Knochengewebes zu fördern, eine mechanische Belastbarkeit zu bieten und die Knochenheilung sowohl quantitativ, als auch qualitativ positiv zu beeinflussen (Rueger, 1998). Eine große Bedeutung haben die eingesetzten Matrixmaterialien (Handschel et al., 2002). Diese sollen hohen Anforderungen im klinischen Einsatz entsprechen: sie sollen Stabilität bieten, den Zellen und Gefäßen als Grundgerüst dienen und die Möglichkeit bieten in ihnen einzusplassen und eine dreidimensionale homogen durchwachsene Struktur zu bilden. Außerdem sollen die Knochenersatzmaterialien das Knochenwachstum und die Zellteilung fördern (Sittinger et al., 2001). Die Biokompatibilität nimmt beim *Tissue Engineering* eine tragende Rolle ein und ist eine Grundvoraussetzung für die abstoßungsfreie Integration des Implantats in dem umliegenden Gewebe (Schnurer et al., 2003).

Die bioaktiven Knochenersatzmaterialien sollen zudem osteogene, osteokonduktive und osteoinduktive Eigenschaften aufweisen. Osteogen ist ein Implantat, wenn es die Fähigkeit hat Knochen zu produzieren (Harris et al., 2004). Diese Aufgabe wird beim TE zum Beispiel von mesenchymalen Stammzellen (MSC) übernommen. Osteokonduktive Ersatzmaterialien dienen dem von außen einwachsenden neuen Knochengewebe als Leitstruktur und überbrücken mechanisch den Substanzdefekt (Albrektsson et al., 2001). Die osteoinduktiven Implantate locken undifferenzierte Stammzellen mit Wachstumsfaktoren wie BMPs an und stimulieren deren Umwandlung in knochenbildende Zellen (Hogan, 1996; Reddi, 2000).

1.4. Knochenersatzmaterialien

Seitdem die Menschheit existiert, beschäftigt sie sich mit der Therapie der Knochendefekte, wie zum Beispiel Knochenfrakturen. Ein optimal funktionierendes Skelett ermöglicht zu jeder Zeit damals nicht nur eine gute Lebensqualität, sondern ist durchaus überlebenswichtig. Bis zum Ende des 19.

Jahrhunderts wurden Frakturen konservativ durch Reposition und Ruhigstellung behandelt. Mit der Entwicklung von Röntgenstrahlen, Narkose und Asepsis etablierte sich die operative Frakturstabilisierung in der Humanmedizin. Heute werden zur Therapie der Knochendefekte neben Osteosynthese und Endoprothetik auch Knochenersatzmaterialien benutzt, die vor allem eine Behandlung von komplizierten ossären Substanzverlusten ermöglichen (Frauendorf W., 2007; Ruegger JM., 1998). Den Grundstein für die Entwicklung dieser Ersatzstoffe legten schon um das Jahr 1890 Barth und Ollier durch zahlreiche Tierexperimente.

Als Knochenersatzmaterialien werden alle nicht-körperigen Substanzen, die knöcherne Defekte auffüllen und das biologische Gerüst mit allen seinen Funktionen ersetzen, zusammengefasst. Die Anforderungen variieren im Einzelnen sehr stark in Abhängigkeit von der Lokalisation des Defektes sowie von der mechanischen Beanspruchung des Knochens.

Grundlegend sollen die Knochenersatzmaterialien folgende Anforderungen erfüllen: Biokompatibilität, mechanische Stabilität, Osteogenität, Osteoinduktivität, Osteokonduktivität (Klein M.O., 2010; Schnurer et al., 2003). Des Weiteren sollen die Matrices in mechanischen, strukturellen und physikalischen Eigenschaften dem ursprünglichen Hartgewebe ähneln (Green 2008; Klein M.O. 2010). Sie sollen biodegradierbar sein und sich im selben Maß abbauen wie das Gewebe zum Remodeling braucht. Sie sollen steril für die Implantation vorliegen und einfach in der Anwendbarkeit sein. Dabei beeinflusst die Porosität des Materials, seine Oberflächenbeschaffenheit und Topografie der Matrix entscheidend die Knochenneubildung innerhalb des Implantats (Wintermantel et al., 1999).

Als dreidimensionale Matrix werden diverse Knochenersatzstoffe aus organischen und anorganischen Materialien erprobt. Um eine Übersicht in die Vielfalt dieser Substanzen zu gestatten hat Rueger bereits 1992 versucht die Materialien nach ihrem Ursprung, wie zum Beispiel Ausgangsverbindungen oder Herstellungsverfahren einzuteilen (Rueger J.M., 1992). Die folgende Abbildung gibt eine Übersicht über die wichtigsten Gruppen der Knochenersatzstoffe heute (Abb. 4.).

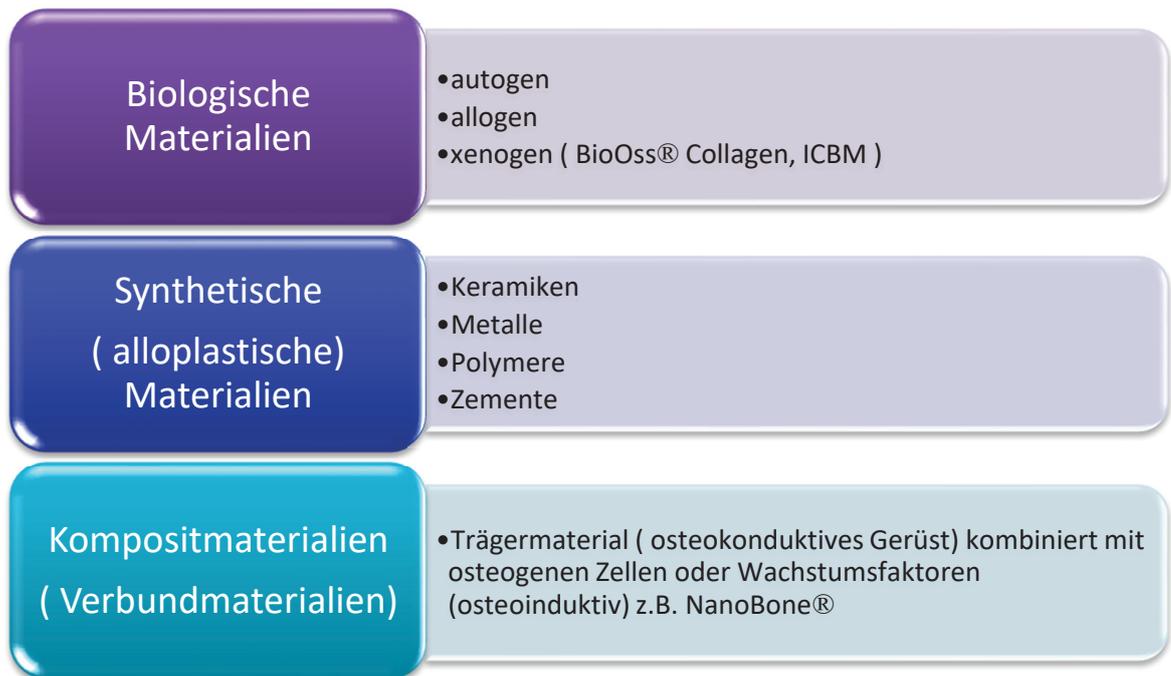


Abb. 4: Die drei wichtigsten Gruppen der Knochenersatzmaterialien

nach Smeets, R. et al., 2010.

Die Biologischen Ersatzmaterialien werden in autogene (vom selben Individuum), allogene (von derselben Spezies) und xenogene (von einer anderen Spezies) Gruppen eingeteilt. Diese Einteilung formulierte und belegte durch zahlreiche Tierexperimente als erster Louis Ollier 1867 und gründete die sogenannte *Vital School* der Knochentransplantation (Müller-Mai, 2003).

Anders als bei autologen Knochentransplantaten, z.B. Spongiosa aus dem Beckenkamm, bergen allogene (vom Lebend- oder Totspender) und xenogene Materialien die Gefahr der Krankheitsübertragung und der Antigenität. Um diese Risiken zu verhindern werden die Spendermaterialien entweder bestrahlt oder chemisch oder thermisch aufwendig aufbereitet (Zimmermann, G. und Moghaddam A., 2011). Durch diese Vorbehandlung gehen osteoinduktive und osteogene Eigenschaften eines Knochentransplantats zum größten Teil verloren, während die Osteokonduktivität noch erhalten bleibt.

Eine Ausnahme stellt die Demineralisierte Knochenmatrix (DBM) da. Es konnte nachgewiesen werden, dass diese dekalzifizierte und sterilisierte Kollagenmatrix von humanen Knochen Spendern nicht nur osteokonduktive, sondern osteo- und chondroinduktive Eigenschaften besitzt (Rueger J.M., 1998; Fleming J.E., 2000).

Die zum größten Teil aus Hydroxylapatit bestehenden xenogenen Knochenersatzmaterialien aus tierischen Knochen, Meeresalgen und Korallen haben durch ihre physikalisch-chemisch-biologischen Eigenschaften eine starke Ähnlichkeit zum humanen Knochen. Je nach Produkt und Hersteller können sie tierische Kollagen enthalten, die Osteoinduktion und Osteogenität verbessern, allerdings auch die Gefahr einer Infektion oder von allergischen Reaktionen beherbergen.

In der nächsten großen Gruppe der synthetischen (alloplastischen) Knochenersatzmaterialien unterscheidet man (Abb. 5):

Keramiken	<ul style="list-style-type: none"> • Biogläser • Tricalciumphosphat • Hydroxylapatite • Glasionomere
Metalle	<ul style="list-style-type: none"> • Titan
Polymere	<ul style="list-style-type: none"> • Polymethylmethacrylat • Polylaktide/Polyglykoide • Co-Polymere
Zemente	<ul style="list-style-type: none"> • Kalziumphosphatzement

Abb. 5: Übersicht über die synthetischen Knochenersatzmaterialien (Smeets R, Kolk A, 2010).

Die Materialien sind in unterschiedlichen Größen, Porositäten, chemischen Strukturen und Zusammensetzungen verfügbar. Diese Eigenschaften spielen bei der Osteokonduktivität und der Resorptionsrate eine große Rolle (Misch, Dietsch, 1993, Eweida A., 2017) und können den jeweiligen Anwendungsansprüchen angepasst werden. Während das Hydroxylapatit druckstabil ist und kaum vom Körper resorbiert wird, wird das Tricalciumphosphat schnell resorbiert, es bietet jedoch keine Druckstabilität.

Kompositmaterialien bestehen aus einem Trägermaterial das mit osteogenen Zellen besiedelt oder mit Wachstumsfaktoren versetzt sind. Damit können sie sowohl osteokonduktive, als auch osteoinduktive und/oder osteogene Eigenschaften aufweisen. Es gibt zahlreiche Möglichkeiten, die organischen und

anorganischen Komponenten miteinander zu kombinieren: mit einem Gemisch aus Kollagen, Knochenmark und Keramik konnten Cornell und Lane bis 90 Prozent der in der Studie untersuchten Knochendefekte überbrücken (Cornell C. N., Lane J. M., 1992). Damit stellen die Kompositmaterialien ein sehr effektives und nahezu optimales Knochenersatzmaterial dar (Buchholz R. W., 2002).

	Osteokonduktion	Osteoinduktion	Osteogenität
Autologe Transplantate	ja	ja	ja
Allogene Implantate	ja	ja/nein	nein
Xenogene Implantate	ja	nein	nein
Synthetische Implantate	ja	nein	nein
Kompositmaterialien	ja	ja/nein	ja/nein

Abb. 6: Überblick über die Eigenschaften der einzelnen Gruppen von Knochenersatzmaterialien

1.5. Ziel der Arbeit

Das *Tissue Engineering* ist ein relativ junges Forschungsgebiet, dessen Einsatz und dessen immer größer werdendes Spektrum sich in der klinischen Routine der Medizin und Zahnmedizin stets erweitert. Trotz der rasanten Entwicklung dieses alternativen Therapieverfahrens und der Dynamik der publizierten Studien in den letzten Jahren, gibt es noch viele Bereiche, in denen sich offene Fragen aufwerfen.

Der Schwerpunkt der klinischen Umsetzung der regenerativen Therapien betrifft zurzeit allem voran das mesenchymale Gewebe, besonders Knochen und Knorpel (Handschel et al., 2006; Caplan, 2007). Hier besteht die Problematik, dass noch kein geeignetes Knochenersatzmaterial existiert, welches alle Anforderungen an Biokompatibilität, mechanische Belastbarkeit, Adaptation und Resorption erfüllt.

Die *in vitro* Entwicklung des Knochenersatzes bietet vielversprechende Perspektiven in der Human- und Zahnmedizin. Neben der Entwicklung der hierfür benötigten Zelllinien und Wachstumsfaktoren kommt den Trägermaterialien eine

entscheidende Bedeutung zu. Diese Studie soll die Erkenntnisse über die Eigenschaften einiger gängiger Knochenersatzmaterialien erörtern.

Eine für das *Tissue Engineering* besonders gut geeignete Zellart sind die USSCs (Bosch J., 2013). Das Ziel dieser Untersuchung ist daher die Evaluierung der *in vitro* Biokompatibilität dieser vielversprechenden Zellen mit den ausgewählten Biomaterialien.

In dieser Studie wird die Biokompatibilität von ICBM (insoluble collagenous bone matrix), BioOss® Collagen (biologisches Material aus Spongiosagranulat) und porcinem Kollagen und NanoBone® (Verbundmaterial aus nanokristalinem Hydroxylapatit und Kieselgel SiO₂) mit humanen Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut (USSC) (Handschel et al., 2010) untersucht, welche in der Lage sind in die osteogene Linie zu differenzieren. (Naujoks et al., 2011; Kogler G et al., 2006) Dabei sollte eine Einsetzbarkeit dieser unbedenklichen Zellart in der Zukunft überprüft werden, denn trotz der positiven Eigenschaften der verfügbaren Biomaterialien reicht die proliferative Aktivität des umgebenden Implantatlagers bei den meisten Patienten nicht für eine optimale Heilung aus. Die Verfügbarkeit von implantierbarem, biologisch aktivem Knochenersatzmaterial, das bereits mit Zellen vorbesiedelt ist, könnte die Heilung von knöchernen Defekten deutlich verbessern.

2. Materialien und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Zellen:

Für die Untersuchung zur osteogenen Differenzierung von Nabelschnurblutstammzellen (USSC) auf dreidimensionalen Trägermaterialien synthetischer und natürlicher Herkunft wurden die USSC vom Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Prof. Dr. rer. nat. G. Kögler, Leiterin der José Carreras Stammzellbank Düsseldorf) zur Verfügung gestellt. Die Nabelschnurblutstammzellen wurden unter strengen Anforderungen und jeweils mit dem Einverständnis der Mutter unmittelbar nach der Abnabelung aus der Nabelschnurvene entnommen (Kögler et al., 1996) und in einem speziellen Verfahren im Labor des Instituts verarbeitet. Die Studie ist unter der laufenden Nummer 2975 von der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf als ethisch unbedenklich eingestuft worden. Die Verwendungskriterien der Zellen wurden in den Richtlinien der Bundesärztekammer vorgeschrieben.

2.1.2. Biomaterialien:

2.1.2.1. ICBM (*insoluble collagenous bone matrix*).

- Hergestellt in eigenem Labor aus Rinder-Femurknochen (siehe 2.2.5.)

2.1.2.2. Nano Bone®

- als Block aus 76% nanokristallinem Hydroxylapatit und 24% Kieselgel (SiO₂). Firma Geistlich Biomaterials, Wolhusen, Schweiz

2.1.2.3. BioOss® Collagen

- als Block aus Spongiosagranulat und 10% porcinem Kollagen.
Firma Geistlich Biomaterials, Wolhusen, Schweiz

Die Materialien Nano Bone® und BioOSS® Collagen wurden freundlicherweise von der Firma Geistlich Biomaterials für diese Untersuchung zur Verfügung gestellt.

2.1.3. Zellkulturen und Chemikalien:

2.1.3.1. Zellkulturmedium:

Name	Firma	Ort	Land
Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium (DMEM) mit 1 g Glukose, ohne L-Glutamin	Lonza	Verviers	Belgien
Dulbecco`s Phosphate-Buffered Saline (DPBS)	Invitrogen GmbH	Karlsruhe	Deutschland
Fetal calf serum 42% (FCS) Sera ES	PAN Biotech GmbH	Aidenbach	Deutschland
L-Glutamin (200mM)	Biochrom	Berlin	Deutschland
Penicillin/Streptomycin (10000U/10000µg/ml)	Biochrom	Berlin	Deutschland
Trypsin (2,5 %)	Lonza	Verviers	Belgien

Zusammensetzung und Zubereitung siehe 2.2.1

2.1.3.2. Einfriermedium:

Name	Firma	Ort	Land
Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium (DMEM) mit 1 g Glukose, ohne L-Glutamin (BE 12-707F)	Lonza	Verviers	Belgien
Fetal calf serum 42% (FCS) Sera ES	PAN Biotech GmbH	Aidenbach	Deutschland
Dimethyl Sulphoxide (DMSO) Hybrid-Max	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim	Deutschland

Genauere Rezeptur siehe 2.2.4.

2.1.3.3. ICBM-Herstellung:

Name	Firma	Ort	Land
Aqua destillata	Gibco life technologies	Darmstadt	Deutschland
Chloroform	MerkKGaA	Darmstadt	Deutschland
Guanidine hydrochloride	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim	Deutschland
Methanol	Merk KGaA	Darmstadt	Deutschland
Salzsäure (HCl) 37% rauchend	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe	Deutschland
Sodium chloride (NaCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim	Deutschland

Tris(hydroxymethyl)aminomethan Hydrochlorid (Tris HCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim	Deutschland
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe	Deutschland

Anleitung zur Herstellung siehe 2.2.5.

2.1.3.4. CyQuant® Cell Proliferation Assay Kit

Name	Firma	Ort	Land
CyQuant® GR reagent	Invitrogen GmbH	Karlsruhe	Deutschland
Cell-lysis buffer	Invitrogen GmbH	Karlsruhe	Deutschland
λ-DNA standard 100µg/ml	Invitrogen GmbH	Karlsruhe	Deutschland
Dulbecco`s Phosphate-Buffered Saline (DPBS)	Invitrogen GmbH	Karlsruhe	Deutschland

Vorgehen im Einzelnen siehe 2.2.9.

2.1.3.6. CytoTox-One® Homogeneous Membrane Integrity Assay:

Assay Buffer	Promega	Madison	USA
Substrate Mix	Promega	Madison	USA
Stop Solution	Promega	Madison	USA
Lysis Solution	Promega	Madison	USA

Vorgehen siehe 2.2.14.

2.1.3.7. CellTracker™ Fluorescent Green und Orange:

Cell Tracker Reagent Orange and Green	Lonza	Verviers	Belgien
Dimethyl Sulphoxide (DMSO) Hybrid-Max	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim	Deutschland
Dulbecco`s Phosphate-Buffered Saline (DPBS)	Invitrogen GmbH	Karlsruhe	Deutschland

Vorgehen im Einzelnen siehe 2.2.15.

2.1.3.8. Rasterelektronenmikroskopie:

Glutaraldehyd 2,5%	Merck KGaA	Darmstadt	Deutschland
Dullbecco`s Phosphate-Buffered Saline (DPBS)	Invitrogen GmbH	Karlsruhe	Deutschland
Aceton, getrocknet	Merck KGaA	Darmstadt	Deutschland

Vorgehen siehe 2.2.12.

2.1.4. Geräte, Laborhilfsmittel:

Name	Firma	Ort	Land
Autoklav D-65	Systec GmbH	Wettenberg	Deutschland
Tecan Genios	Tecan	Männedorf	Schweiz
Tecan infinite M200	Tecan	Männedorf	Schweiz
BioPhotometer 6131	Eppendorf AG	Hamburg	Deutschland
Brutschrank Cytoperm 2 Heracell240	Heraeus Holding GmbH	Hanau	Deutschland
Critical Point Dryer CPD 030	BAL-TEC	Balzers	Fürstentum Lichtenstein
Dampfstrahlgerät DS100	Harnisch & Rieth GmbH	Winterbach	Deutschland

Deckgläser für Mikroskopie, 24 x 50 mm	Engelbrecht Medizin- & Labortechnik GmbH	Edermünde	Deutschland
Scanning Electron Microscope S-3000N	Hitachi High- Technologies Europe GmbH	Krefeld	Deutschland
Gefrierschränke	Liebherr	Ochsenhausen	Deutschland
Hedströmfeilen H, Größe 060	Komet Dental	Lemgo	Deutschland
Küvetten UV-etten	Eppendorf AG	Hamburg	Deutschland
Kühlschränke	Liebherr	Ochsenhausen	Deutschland
Magnetrührstäbe	Thermo Fisher Scientific	Waltham (MA)	USA
Mikropipette Research	Eppendorf AG	Wesseling- Erzdorf	Deutschland
Mikroskop DM5000 B	Leica Microsystems	Wetzlar	Deutschland
Mikrotom Blades (Low Profile) Leica	Leica Microsystems	Wetzlar	Deutschland
Multiwellzellkulturplatte n (24, 96 Well)	Greiner bio-one GmbH	Frickenhausen	Deutschland
Neubauerzählkammer, Improved	Assistant	Sondheim	Deutschland
Parafilm "M"	Pechiney Plastic Packaging, INC.	Chicago	USA
Pipettenspitzen TipOne (0,1-10; 1-100; 200, 101-1000 µl)	Starlab GmbH	Ahrensburg	Deutschland
Pinzette	Hammacher	Solingen	Deutschland

Pipettierhelfer accu-jet pro	Brand	Wertheim	Deutschland
Cell Scraperm steril	Greiner bio-one GmbH	Frickenhausen	Deutschland
Skalpell	Feather®	Osaka	Japan
Sputter Coater 108 auto	Cressington	Warford	Großbritannien
Sterilbank HeraSafe	Heraeus Holding GmbH	Hanau	Deutschland
Stickstofftank Arpege 170	Air Liquide	Paris	Frankreich
Nitril-Handschuhe	Ansell	Brüssel	Belgien
Serum-Pipetten	Costar Corning	New York	USA
Vinitex Airflow Abzug nach DIN EN 14175	Vinitex Laboreinrichtungen GmbH und CO KG	Coswig	Deutschland
Wasserbad	Köttermann Systemlabor	Uetze/Hänigsen	Deutschland
Zellkulturflasche (25, 75 cm ²)	Greiner bio-one GmbH	Frickenhausen	Deutschland
Zentrifuge Multifuge 1S-R	Heraeus Holding GmbH	Hanau	Deutschland
Zentrifugenröhrchen Falcon (15, 50 ml)	Becton Dickinson Labware	Franklin Lakes (NJ)	USA

2.2. Methoden

2.2.1. Kultivierung der Zellen

Für die Untersuchung zur osteogenen Differenzierung wurden humane Nabelschnurstammzellen vom Institut für Transplantationsdiagnostik der Heinrich-Heine- Universität Düsseldorf durch Frau Prof. Dr. G. Kögler zur Verfügung gestellt. Die humanen Nabelschnurstammzellen wurden durch José Carreras Stammzellbank gewonnen, kultiviert und kryokonserviert. Die Zellen wurden bei -190°C in Kryo-Röhrchen zu je 1×10^6 Zellen im flüssigen Stickstoff gelagert.

Für die Versuche mussten die Zellen erst in einem Zellkulturmedium kultiviert werden. Für das Medium wurden 350ml DMEM mit 150ml FCS, 5ml L-Glutamin und 5ml Penicillin/Streptomycin versetzt. Die tiefgefrorenen Nabelschnurblutstammzellen wurden im Kryo-Röhrchen im 37°C warmen Wasserbad soweit erwärmt, bis nur noch ein kleines Eisklumpchen erkennbar war.

Die Zellen wurden anschließend in ein Falcon-Tube mit 9 ml kalten Medium überführt und 7 min bei 4°C und 15000 Umdrehungen zentrifugiert und somit vom Einfriermedium befreit. Anschließend wurde das Medium vorsichtig abpipettiert und das Pellet in 15 ml 37°C -warmen Medium aufgenommen und suspendiert. Diese Zellsuspension wurde auf eine 75 cm^2 Zellkulturflasche ausgebracht und im Inkubator bei 37°C , $5\% \text{CO}_2$, $21\% \text{O}_2$ und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach circa 24 Stunden wurde das Medium in den Zellkulturflaschen durch frisches, auf 37°C vorgewärmtes Medium ersetzt. Hierdurch wurden die Reste zugrunde gegangener Zellen beim Auftauprozess und die Reste des Einfriermediums endgültig entfernt.

Die Nabelschnurblutstammzellen wurden wie oben beschrieben als USSC 18 der Passage 8 kultiviert, bei einer Konfluenz unter 80% gesplittet und anschließend bis zur Durchführung der Versuche bei -80°C in einem Gefrierschrank eingefroren. Für die Untersuchungen in dieser Studie wurden 30 Mio. USSC 18 der Passage 9 kultiviert und nur diese benutzt, um gleiche Voraussetzungen bei allen Versuchen und allen Trägermaterialien zu ermöglichen.

2.2.2. Passagieren und Splitten der Zellen

Die undifferenzierten USSC wurden alle 3 bis 4 Tage subkultiviert. Um ihren undifferenzierten Zustand zu erhalten, müssen die Zellen bei einer Konfluenz von 80% gesplittet werden. Dafür wurde das Medium aus den Zellkulturflaschen abgenommen und die Zellen mit 15 ml PBS gewaschen, anschließend erneut mit 15 ml PBS bedeckt und 7 min bei 37°C in einem Brutschrank inkubiert. Darauffolgend wurde die PBS-Lösung abgenommen, 7 ml 0,25%iges Trypsin zu den Zellen hinzugefügt und 8 min lang in einem Brutschrank bei 37°C erneut inkubiert. Für die verwendete Trypsin-Lösung wurden 5 ml 2,5%iges Trypsin mit 45ml PBS in einem Falcon-Tube verdünnt. Nach der Inkubationszeit wurde die Trypsinwirkung durch die Zugabe von 8 ml Zellkulturmedium, mit 30% FCS-Gehalt gestoppt. Um noch am Brutflaschenboden adhärente USSC zu lösen, wurde ein Cell-Scraper zu Hilfe genommen und die Zellen wurden vorsichtig vom Flaschenboden abgetragen. Die Zellen wurden als Suspension aufgenommen und 7 Min lang bei 4°C und 1500 Umdrehungen abzentrifugiert und somit von Trypsin befreit. Anschließend wurde USSC im aufgewärmten Zellkulturmedium aufgenommen, suspendiert und je nach Grad der Konfluenz mit einem Faktor von 1:3 oder 1:4 in neue Brutflaschen ausplattiert.

2.2.3. Zellzahlbestimmung

Mittels Neubauer-Zählkammer wurde die Zahl der Zellen in einer Suspension bestimmt.

Für die lichtmikroskopische Zellzahlbestimmung wurden 50 µl Zellsuspension und 50 µl Trypanblau in einer Kammer einer 96-well-Kammer gut miteinander vermischt und anschließend in eine zur Zählung mit Deckglas vorbereiteten Neubauer-Zählkammer eingebracht. Die Färbung mit anionischem Trypanblau ermöglicht es tote von lebenden Zellen zu unterscheiden, weil nur die toten Zellen und das Medium, indem sich die Zellen befinden, blau angefärbt werden. Lebende Zelle mit intakter Membran erscheinen hell leuchtend unter dem Lichtmikroskop und weisen keine Blaufärbung auf.

Auf der Grundplatte der Neubauer-Zählkammer sind Strichmarkierungen aufgetragen, die mit dem bekannten Abstand der Glasfläche den Raum zwischen dem Deckgläschen und der Grundplatte definiert. Zählt man die Zellen, die sich in diesem Raum befinden, kann man aus deren Zahl und dem bekannten Volumen des Raumes Rückschlüsse auf die die Anzahl der Zellen in der Zellsuspension ziehen.

Bei der Zellzahlbestimmung wurden unter Lichtmikroskop Zellen in 4 Gruppenquadranten, bestehend jeweils aus 16 Kleinquadranten mit einem Volumen von $0,1\text{mm}^3$ ($0,1\mu\text{l}$) ausgezählt und davon der Mittelwert genommen. Dabei wurden die Zellen auf der unteren und der linken Seitenlinien der Kammerabgrenzung gezählt. Mit folgender Formel wurde die Anzahl der Zellen ermittelt:

$$\text{Gesamtzellzahl} = \text{Anzahl der Zellen (ermittelter Mittelwert)} \times 2 \times 10^4 \times \text{ml}$$

Bei der Rechnung wurde die Verdünnung der Zellsuspension und des Trypan-Blau von 1:1 berücksichtigt, weshalb die ermittelte Zellzahl mit 2 multipliziert wurde. Da das Volumen in einem Großquadrant $0,1\mu\text{l}$ beträgt, wird bei der Rechnung die ermittelte Anzahl der Zellen mit dem Faktor 10^4 multipliziert, um die Zellzahl pro Milliliter zu erhalten. Um auf die Gesamtzellzahl zu kommen, muss das Ergebnis mit dem Gesamtvolumen der vorliegenden Zellsuspension multipliziert werden.

2.2.4. Kryokonservierung von Zellen

Durch die Kryokonservierung ist es möglich Zellen für längere Zeit zu bevorraten und bei Bedarf diese ohne Schäden aufzutauen und in Zellversuchen einzusetzen. Für die Versuche in dieser Dissertation wurden 30 Millionen USSC 18 p9 kultiviert und anschließend bei -80°C kryokonserviert.

Die Zellen wurden von den Zellkulturflaschen wie in 2.2. beschrieben geerntet und 7 Min lang bei 4°C und 1500 Umdrehungen abzentrifugiert. Anschließend wurde den Zellen eine DMEM-FCS-Lösung in einem Verhältnis von 4:5 hinzugegeben, die Zellen dort suspendiert und anschließend wie in Kapitel 2.3.

beschrieben gezählt. Normalerweise werden 1×10^6 Zellen in einem Kryoröhrchen in einem Milliliter Einfriermedium kryokonserviert. Daher soll die Zellsuspension 1×10^6 Zellen in 900µl Lösung beinhalten, da für das Einfriermedium noch 100µl DMSO hinzugegeben werden.

Da DMSO die Zellen beim Einfrieren nicht nur vor Eiskristallen, die die Zellen und die Zellorganellen zerstören können, schützt, sondern auch bei Raumtemperatur zytotoxische Eigenschaften hat, soll diese Substanz erst zum Schluss hinzugegeben werden. Dafür werden 100µl DMSO in ein Kryoröhrchen vorgelegt und kurz vor dem Einfrieren mit 900µl Zellsuspension vermengt.

2.2.5. Herstellung von ICBM

Die ICBM (*insoluble collagenous bone matrix*) wurden in eigenem Labor aus Rinder-Femurknochen hergestellt. Aus dem Femurknochen wurde nur die aus feinen Trabekeln bestehende Spongiosa benötigt, die im Inneren des Knochens unter der Kortikalis liegt und das blutbildende System in sich birgt. Der schwammartige Bälkchenknochen bietet dank seiner Matrix eine große, physiologische Oberfläche, die sich besonders gut als Nische für die verankerungsabhängigen Zellen, wie Nabelschnurstammzellen, eignet. Die Herstellung der ICBM erfolgte in Anlehnung an die Patentschrift von Kuberasampath und Ridge (Kuberasampath and Ridge, 1992), modifiziert nach einem etablierten Verfahren (Depprich et al., 2005; Würzler, 2004).

Als Erstes wurden die bei -80°C eingefrorenen Knochen in 1 cm dicke Scheiben mit der Bandsäge geschnitten. Die Knochen sollten vor diesem Vorgang mindestens 24 Stunden bei -80°C durchfrieren, damit sie beim Sägen nicht durch die Reibungshitze geschädigt werden. Die Muskelansätze, Periost und Kompakta werden ebenfalls mit einer Säge entfernt, somit blieben etwa 1 cm dicke Spongiosascheiben, die weiterbearbeitet wurden. Anschließend wurden die Spongiosa mit Wasserdampf von grobem Fett und Knochenmark gereinigt.

Um die kleinsten Fettteilchen aus dem Knochen zu entfernen, wurden die Spongiosapräparate dreimalig in eine Chloroform-Methanol-Lösung im

Verhältnis von 3:1 für jeweils 24 Stunden unter ständigem Rühren eingelegt. Alle drei Durchläufe wurden unter dem Abzug durchgeführt.

Nach dem Entfetten wurden die Präparate 30 Minuten lang unter ständigem Rühren mit Aqua dest. gewaschen.

Die entfettete und gewaschene Spongiosa konnte nun gebleicht werden. Dafür wurde sie in 3% H₂O₂ für ca. 15 Min eingelegt und anschließend 30 min in Aqua dest. gewaschen und auf Löschpapier luftgetrocknet.

Für die Demineralisierung wurden die Spongiosascheiben dreimalig in 0,5 M HCl-Lösung für jeweils 90 Minuten unter ständigem Rühren und unter dem Abzug eingelegt. Anschließend wurde 30 Min lang unter ständigem Rühren in Aqua dest. die Salzsäure weitgehend herausgewaschen.

Die gewaschenen, entmineralisierten und entfetteten Präparate wurden als nächstes mit einem Skalpell auf die gewünschte Größe zugeschnitten. Die Maße wurden so gewählt, dass man alle in dieser Arbeit getesteten Trägermaterialien, BioOss®-Collagen, NanoBone® und ICBM auf eine Einheitsgröße bringen konnte, nämlich 1 cm lang, 1 cm breit und 0,5 cm hoch (Abb.7.).

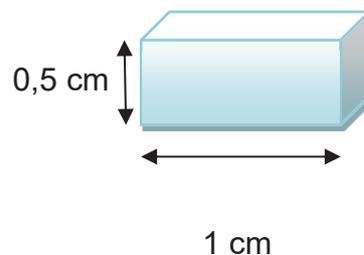


Abb. 7: Schematische Darstellung eines für diese Arbeit zugeschnittenen Biomaterialblocks. Alle Trägermatrizes hatten eine Einheitsgröße.

Die Inaktivierung löslicher, osteoinduktiver Matrixproteine erfolgte durch Zugabe von 1l 4M Guanidin-HCl/50mM Tris-HCl (Trishydroxymethylaminmethan-Puffer) mit einem pH-Wert von 7,0 zu den Spongiosakörperchen. Die Einwirkzeit betrug bei ständigem Rühren bei 4°C (im Kühlschrank) 16 Stunden. Der Behälter wurde mit Parafilm "M" abgedichtet.

Danach wurden die ICBM-Testkörperchen durch zweimaliges Einlegen in 50mM Tris-HCl/ 150mM NaCl mit pH 7,0 bei 4°C 4 Stunden lang unter Rühren

gewaschen. Der Reagenzbehälter wurde ebenfalls in Kühlschrank gestellt und die Öffnung mit Parafilm "M" abgeklebt.

Anschließend wurden die fertigen ICBM-Testkörperchen 30 min in Aqua dest. gewaschen und 24 Stunden lang im Wärmeschrank bei 37 °C getrocknet.

2.2.6. Zuschneiden von NanoBone®-Blocks und BioOss®-Kollagen-Blocks

Die Träger wurden vor dem Versuch auf eine Einheitsgröße gebracht, um für alle getesteten Biomaterialien die gleichen Ausgangskriterien zu sichern. Zur Ermittlung der Zuschnittsgröße wurden der handelsübliche NanoBone®-Block und der handelsübliche BioOss®-Kollagen-Block ausgemessen. Diese wurden dann auf eine Einheitsgröße von 1x1x0,5 cm zugeschnitten. Bei diesen Maßen war das Verhältnis von Materialgewinn zu Abfall am günstigsten. Der BioOss-Kollagen-Block wurde mit einem Skalpell zugeschnitten, für den NanoBone-Block hat sich eine Hedströmfeile Größe 060 als hilfreich erwiesen.

2.2.7. Sterilisieren von Biomaterialien

Für die Arbeit mit Zellkulturen stellen eine keimfreie Umgebung und keimfreie Arbeitsmaterialien eine wichtige Voraussetzung dar. Um diese zu erreichen wurden die Biomaterialien durch Gamma-Bestrahlung bei 25 kGy sterilisiert. Zu diesem Zweck wurden die jeweiligen Testkörperchen in Falcon-Tubes mit 5 Stück je Tube portioniert und bei Fa. Gamma-Service Produktbestrahlung GmbH mit der angegebenen Dosis bestrahlt.

2.2.8. Kultivierung der Zellen auf Biomaterialien

Zuerst wurden die Träger zum Äquilibrieren für 48 Stunden in Zellkulturmedium gelegt. In den 48 Stunden wurde das Medium dreimalig gewechselt, bis dieses sich durch den pH-Umschlag nicht mehr verfärbt hat.

Anschließend wurden die Testmaterialien in 24 Well-Platten gelegt, mit 500 µl Medium, in dem sich ca. 500.000 Zellen befanden, und 1 ml Medium ohne Zellen versetzt und 24 Stunden unter den oben genannten Bedingungen in einem Brutschrank kultiviert. Für die Testung der Anheftungseffizienz der Zellen wurde die eine Hälfte der Prüfkörper nach 24 Stunden mittels CyQuant®-Assay analysiert. Die restlichen Träger wurden in neue 24 Well-Platten überführt, damit nicht an den Träger gebundene Zellen keinen Einfluss auf die Testergebnisse nehmen. Die so umgesetzten Träger wurden weitere 6 Tage kultiviert, wobei jeden zweiten Tag das Medium in den Wells gewechselt wurde. Nach insgesamt sieben Tagen wurde die Proliferation der Zellen auf diesen Trägern mittels CyQuant®-Assay untersucht.

2.2.9. CyQuant®-Assay

Die Anheftungseffizienz und die Proliferation der USSC 18 auf den Trägermaterialien wurde mittels CyQuant®-Assay überprüft. Diese Methode ist sowohl schnell durchführbar als auch hoch sensitiv und wird daher sowohl für Studien, als auch und in Routineuntersuchungen genutzt. Diese fluoreszenzbasierte Methode beruht auf der Einlagerung des Farbstoffs (CyQuant® GR dye) in die Nukleinsäure der lysierten Zellen, der anschließend mithilfe der Fluoreszenzintensität im Fluorometer gemessen wird. Die emittierte Wellenlänge der mit dem Farbstoff besetzten DNA-Sequenz ist 420-520nm. Diese quantifizierbare Lichtemission korreliert wiederum linear mit der Zellzahl in einem Bereich von 50-50.000 Zellen (Jones et al., 2001).

Der zusätzliche Vorteil dieses Testverfahrens ist, dass es auch an vorher eingefrorenen Proben angewendet werden kann, da bei dem Einfrieren zwar die Zellmembran zugrunde geht, die Dann jedoch erhalten bleibt. Der CyQuant®-

Assay bietet folglich keine Aussage über die Stoffwechselaktivität der untersuchten Zellen.

Die Proben wurden gemäß dem Protokoll des Herstellers analysiert:

Als erstes wurden unmittelbar vor dem Versuch die im Kit enthaltenden Reagenzien schonend auf Eis aufgetaut und anschließend Arbeitsverdünnungen daraus hergestellt. Zur Lyse der Zellen oder falls erforderlich zur Verdünnung der Meßproben wurde die 20-fach konzentrierte Cell Lysis Buffer Stock-Solution mit PBS zur Arbeitslösung verdünnt. Das 400-fach konzentrierte Färbereagenz CyQuant® GR wurde ebenfalls in dieser Arbeitslösung verdünnt.

Die vor dem Versuch bei - 80°C eingefrorenen mit den USSC 18 besetzten Biomaterialien von Tag 1 und Tag 7 tauten bei Raumtemperatur einige Minuten lang auf. Folgend wurde jeder Tube, in dem sich jeweils ein Träger befand, mit 1 ml Zelllyse-Puffer versetzt und mittels Vortexgerät gründlich vermischt. 500 µl dieser Suspension wurden in 1,5 ml-Tube überführt und 7 Minuten lang bei 1500 Umdrehungen abzentrifugiert. Dadurch setzten sich die mitaufgenommenen, nicht löslichen Partikel der Testmaterialien, besonders die von BioOss® Collagen, am Boden des Tubes ab und konnten somit nicht das Ergebnis des CyQuants® beeinflussen. 300 µl der abzentrifugierten Suspension wurden aufgenommen und in ein 2ml-Tube überführt, wo sie mit 300 µl der farbstoffhaltigen Lösung gründlich vermischt wurde. 200 µl dieser Suspension wurden anschließend in eine 96-Well-Platte gegeben. Jede Messplatte wurde zur Kalibrierung des DNA-Fluoreszenz-Signals mit einer Verdünnungsreihe eines λ-DNA-Standards ausgestattet.

Für die Eichgerade wurden die Nabelschnurstammzellen (USSC18) 3 Tage kultiviert, geerntet und mithilfe der Neubauerzählkammer genau gezählt. Diese Zellen wurden mit dem Kit enthaltenen Reagenzien nach Anleitung gelöst, die DNA dadurch gefärbt und in einer Verdünnungsreihe aus 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 und 40 Tausend Zellen in eine 96-Well-Platte pipettiert. Anschließend wurde jedes Well auf 200 µl mit dem Reagenz aufgefüllt.

Parallel dazu wurde eine Verdünnungsreihe aus der im Kit enthaltener λ-DNA erstellt. Die Verdünnungsschritte waren 5, 10, 25, 50, 100, 150 und 200 Tausend

Pikogramm DNA. Die DNA-Lösung wurde wie die Zellsuspension mit dem Reagenz versehen und 200µl dieser Suspension in die gleiche 96-Well-Platte aufgefüllt.

Aus den mithilfe von Tecan Genios gemessenen Fluoreszenzwerten wurde mit dem Programm Excel® für die USSC 18 und λ-DNA eine Regressionsgerade erstellt und die Steigung der Geraden durch eine Gleichung beschrieben. Mithilfe dieser Gleichungen konnte jetzt einer bestimmten λ-DNA-Menge eine bestimmte Zellzahl zugewiesen werden. Für die späteren CyQuant®-Versuche wurde stets die λ-DNA-Lösung als Referenz verwendet, da hiermit die Schwankungen und Fehler von Zellzählungen an jeweils frischem Referenzmaterial umgangen werden können.

2.2.10. Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Mit einem Rasterelektronenmikroskop kann man im Gegensatz zu einem Lichtmikroskop geeignete Gegenstände und Oberflächen um das bis zu 100.000-fache vergrößern und diese auch plastisch darstellen. Dabei tastet das Rasterelektronenmikroskop mit sehr fein gebündeltem Elektronenstrahl, der in einer Elektronenquelle aus Wolfram erzeugt wurde, eine Oberfläche ab. Dieser Vorgang löst ein Austreten der Sekundärelektronen aus dem Objekt heraus, die anschließend von einem Detektor aufgefangen werden. Am Detektor entstehende Lichtblitze erzeugen ein elektrisches Signal, welches auf den Bildschirm des Monitors übertragen wird. Aus der Intensität des Stroms und dem Neigungswinkel der Objektoberfläche zum Detektor werden plastische Abbildungen des Objekts errechnet.

Vor dem Versuch müssen biologische Proben speziell aufbereitet werden, da in rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen nur leitende Objekte dargestellt werden können. Dafür werden die Trägermaterialien fixiert, entwässert, getrocknet und leitfähig gemacht.

Nach sieben Tagen Kultivierung der Biomaterialien mit USSC 18 werden diese in 2,5%igem Glutardialdehyd in 0,1 M PBS für 3 Stunden fixiert. Anschließend

folgte eine Dehydrierung der Proben in einer aufsteigender Acetonreihe in 50, 70, 80, 90 und 3 mal in 100igem, getrocknetem Aceton, um eine Zerstörung der Proben durch Ausdehnung des Wassers im Vakuum, welches in der Rasterkammer herrscht, zu verhindern. Für die Verdünnung von Aceton wurde Aqua destillata benutzt. In jedem dieser Verdünnungsschritte verweilten die Proben 1 Stunde. Getrocknet wurden die Biomaterialien in einem Critical Point Dryer (CPD) 030. Hier wurde in mehreren Schritten das getrocknete Aceton gegen flüssiges CO₂ ausgetauscht. Durch das Halten der Temperatur über dem kritischen Punkt und Minderung des Druckes in der Kammer wird sowohl die Verdampfung als auch die Verdunstung der Flüssigkeit in der Probe umgangen. Dadurch ist es möglich das Kollabieren von Probendetails durch entstehende Oberflächenspannungen zu verhindern.

Um die Proben für den Elektronenstrahl leitend zu machen, wurde im Sputter Coater 108 ein Metallfilm aus Gold auf die Biomaterialien aufgedampft. Dafür wurden die Proben mit einem klebenden Kohleplättchen auf einem Probenteller fixiert und in die Sputterkammer gegeben. Abwechselnd wurde in der Probenkammer zweimal Vakuum geschaffen und die Kammer anschließend mit Argon gefüllt. Dieses Arbeitsgas hilft bei der Freisetzung der Goldionen aus der Kathode nach dem Anlegen einer elektrischen Spannung. Die Goldionen schlugen sich als reaktives Plasma auf dem Probenkörper nieder. Mit einer dünnen Goldschicht präpariert konnten die Proben nun im Rasterelektronenmikroskop untersucht werden.

2.2.11. Micro-Computertomographie

Um die Struktur und Porosität der Biomaterialien visualisieren und berechnen zu können, wurde in Kooperation mit Prof. Dr. Hans-Peter Wiesmann (Institut für Werkstoffwissenschaft, Technische Universität Dresden) eine Mikro-Computertomographie der Trägermaterialien durchgeführt. Dafür wurde ein Micro-XCT von Xradia® verwendet, ein laborbasiertes Röntgentomographiesystem mit der höchsten Auflösung bis zu 0,7 µm und der Möglichkeit Proben mit einem sehr hohen Kontrast in einem 3D-Bild darzustellen.

Für die Analyse wurden die Biomaterialien innerhalb des Scanners befestigt und in der gewünschten Stellung positioniert. Anschließend wurden die Proben mit einem Röntgenstrahl bestrahlt und die ermittelten Werte in ein Rechensystem übertragen. Aus diesen Werten wurde mit einem speziell entwickelten Softwaresystem die Massendichteverteilung der Biomaterialien berechnet und in 3D-Bildern grafisch dargestellt.

2.2.12. Zellvitalitätsassay

Zur Bestimmung der Zellvitalität und der toxischen Auswirkung eines Testverfahrens auf die Zellkultur wurde CytoTox-ONE® Homogeneous Membrane Integrity Assay verwendet. Es handelt sich um ein fluorometrisches Verfahren zur Abschätzung der Anzahl der lebensfähigen Zellen in einer Zellkultur. Die beschädigten Zellen setzen durch ihre Membran Lactat-Dehydrogenase (LDH) in das Zellmedium frei. Durch ein gekoppeltes enzymatisches Verfahren wird Resazurin in eine fluoreszierende Verbindung Resorufin überführt und dieser anschließend bei 560-590 nm im Fluorometer gemessen (Abb. 8). Die Menge der erzeugten Fluoreszenz ist proportional zur Zahl der lysierten Zellen in einem 96-Well-Format. Da die verwendeten Reagenzien des Assays die gesunden Zellen nicht zerstören, kann eine Mischpopulation aus gesunden und geschädigten Zellen getestet werden.

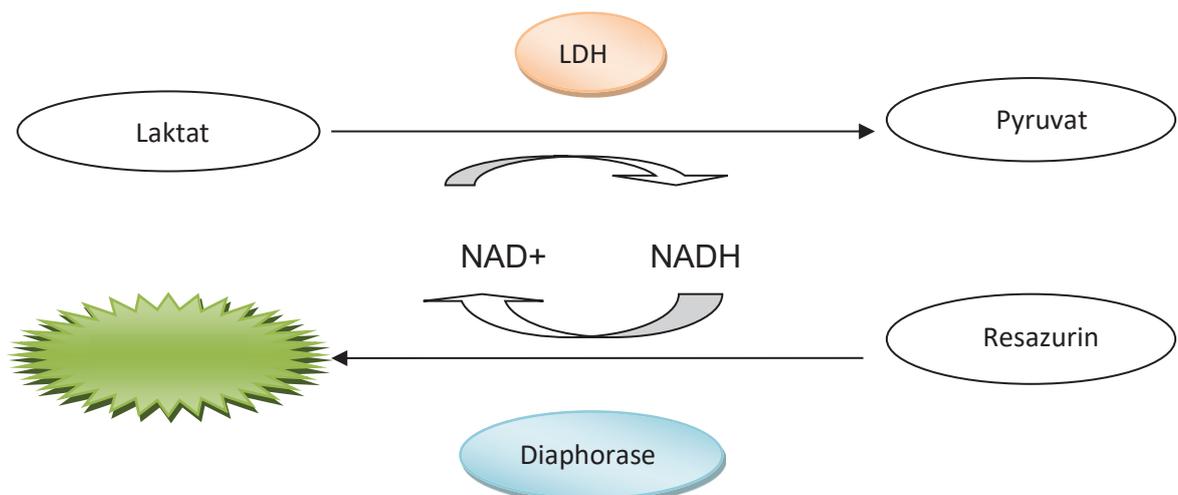


Abb. 8: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips von CytoTox-ONE®.

Für das Experiment wurden ICBM, NanoBone® und BioOss®-Kollagen mit 500.000 Zellen besiedelt und 2 Tage lang in einer 24-Well-Platte in 1,5 ml Zellmedium bei 37°C inkubiert. Ebenfalls wurden einige Testkörper ohne Zellen in der gleichen Well-Platte für die Ermittlung des Medium-Leerwerts mit inkubiert.

Vor dem Test wurden die im Kit enthaltenden Reagenzien (Substrate Mix, Assay Buffer, Lysis Buffer und Stop Solution) auf Eis schonend aufgetaut. Inzwischen wurden aus jedem Well der 24-Well-Platte, in der sich die Biomateriellen befanden, 100 µl Zellmedium entnommen und in eine 96-Well-Platte überführt. Zusätzlich wurde zu jeweils einem mit Zellen besiedeltem Testkörper je Sorte ein Lysis Buffer in einem Verhältnis von 1:50 zum Zellmedium hinzugefügt und gut vermischt. Dadurch wurden alle USSC, die sich auf diesen Trägern befanden, lysiert und ergaben so den Maximalwert der Zellen bei der Analyse, da so die maximal erreichbare Laktatdehydrogenase freigesetzt wurde. 100 µl dieser Suspension wurden in die gleiche 96-Well-Platte überführt. Vor den weiteren Schritten wurde die 96-Well-Platte für 20 Minuten bei Raumtemperatur (22°C) inkubiert, um das zu untersuchende Zellmedium so auf Raumtemperatur abzukühlen.

Jedes Well wurde mit 100 µl mit Assay-Substrat-Mix versetzt, gut vermischt und 10 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 50 µl Stop Solution zu jedem Well hinzugefügt und somit die Reaktion im Well gestoppt. Es folgte eine Fluoreszenzmessung, wobei die Excitation bei 560 nm erfolgte und die Emission bei 590 nm ermittelt wurde. Mittels Excel® und der unten angegebenen Formel wurden die Zytotoxizitätswerte für jedes Testkörperchen ermittelt (Abb. 9).

$$\text{Relative Zytotoxizität} = 100 \times \frac{\text{ermittelter Wert}}{\text{Maximalwert}}$$

Abb. 9: Rechenformel für die Ermittlung der Zytotoxizität eines Testkörpers mit CytoTox-ONE® nach Gebrauchsanweisung der Firma Promega®.

2.2.13. Cell Tracker™ Vitalitätsfärbung (Orange)

CellTracker™-Farbstoffe enthalten eine thiolreaktive Gruppe, die eine langfristige Markierung der lebenden Zellen bis zu 72 Stunden und sogar in mehreren Generationen ermöglicht. Bei der Färbung diffundiert der Farbstoff passiv durch die Zellmembran und reagiert in dieser in einer Glutathion-S-Transferase vermittelten Reaktion mit seiner Chlormethylgruppe mit den Thiolen der Zelle (Zhang et al., 1992). Dabei transformiert sich der Farbstoff zu einem zell-impermeablen fluoreszierenden Farbstoff-Thioether-Addukt, das in der Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden kann. Der unkonjugierte Farbstoff diffundiert aus der Zelle in das Medium und kann durch Waschung kurz vor der Analyse entfernt werden.

Die Vorteile dieser Methode bestehen darin, dass der Farbstoff bei einer Zellteilung an Tochterzellen gegeben wird, nicht aber an die benachbarten Zellen in einem Zellverbund. Außerdem zeigt der Farbstoff ideale Tracking-Eigenschaften, indem er stabil ist, bei einem physiologischen pH-Wert in einem Fluoreszenzmikroskop hell leuchtet und für Zellen in empfohlenen Arbeitsdosen nicht toxisch ist.

Zuerst wurde der gefriergetrocknete Farbstoff auf die Raumtemperatur gebracht und anschließend mit DMSO auf eine Arbeitskonzentration nach Anleitung (CellTracker®Orange, Lonza) verdünnt. Für die Arbeitslösung wurden 5 ml Serumfreies Medium mit 1,25 µl Farbstoff gründlich vermischt. Das mit Nabelschnurstammzellen besiedelte NanoBone®-Körperchen wurde aus dem Zellmedium entnommen und in eine 24-Well-Platte, in der sich 1 ml Farbstoffsuspension befand, überführt. In diesem Medium wurden die Zellen auf dem Träger 30 Minuten lang bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Farbstofflösung durch serumhaltiges Vollmedium ersetzt und wiederholt für 30 Minuten in den Brutschrank gestellt. Als nächstes wurde der NanoBone®-Träger mit PBS gewaschen, um heraus diffundierten Farbstoff zu entfernen. Die Zellen konnten in einem Fluoreszenzmikroskop untersucht werden und Bildaufnahmen erstellt werden.

2.2.14. Statistische Auswertung

Die Mittelwerte von entsprechenden Messwertgruppen aus der CyQuant®-Untersuchung wurden mit dem Verfahren der Varianzanalyse (ANOVA, Analysis of Variance) vergleichend statistisch untersucht und ihre Unabhängigkeit bewertet.

ANOVA ist eine einfaktorielle Varianzanalyse die es ermöglicht einen Mittelwertsvergleich von mehr als eine Stichprobe durchzuführen.

3. Ergebnisse

3.1. Zellproliferation auf dreidimensionalen Trägermaterialien

Für die Ermittlung der *in vitro* Biokompatibilität von verschiedenen in dieser Arbeit untersuchten Knochenersatzmaterialien wurde die Zahl der USSCs, die sich an diesen Trägerkörper befunden haben, ermittelt. Da die einfachen Standardverfahren zur Zellzahlbestimmung wie die Neubauer-Zählkammer eine hohe Variabilität haben und für die Untersuchung dreidimensionaler Materialien eher ungeeignet sind, wurde in dieser Arbeit der DNA-Gehalt mit Hilfe eines CyQuant®-Assays als Rückschluss auf die Zellbesiedlung verwendet. Dabei wurde die Proliferation von USSCs auf ICBM, BioOss® Collagen und NanoBone® als relatives Fluoreszenzsignal (Anregung bei 485 nm, Emission bei 535 nm) ermittelt und die Zellzahl über den ebenfalls gemessenen DNA-Gehalt bekannter Zellzahlreihen bestimmt.

Für diese Untersuchung wurden die humanen Nabelschnurstammzellen einen und sieben Tage auf den Trägermaterialien kultiviert und deren Zahl anschließend ermittelt. Dabei spiegelt die Zahl der USSCs am ersten Tag das Attachment der Zellen auf dem Trägerkörper und die Zellanzahl am siebten Tag die Proliferation dieser Zellen wieder. Die ermittelten Daten geben zusammenfassend ein Maß für die Kompatibilität der Biomaterialien mit den verwendeten humanen Nabelschnurblutstammzellen.

ICBM Tag 1											
n 1	n 2	n 3	n 4	n 5	n 6	n 7	n 8	n 9	n 10	n 11	n 12
2643	5512	9917	6250	4583	5654	5293	5102	2660	3982	3147	6202

Tabelle 1: Fluoreszenzwerte von USSCs, die 1 Tag auf ICBM kultiviert wurden. Der Mittelwert beträgt 5078 und die Standardabweichung entspricht 796. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors und dem Vergleich des gemessenen DNA-Gehalts mit dem einer bekannten Zellzahlreihe entspricht es in Mitte einer Zellzahl von 1.114×10^3 Zellen auf einem ICBM.

BioOss® Collagen Tag 1											
n 1	n 2	n 3	n 4	n 5	n 6	n 7	n 8	n 9	n 10	n 11	n 12
2378	2973	5336	2832	3269	3294	3134	4001	4459	4124	3217	2868

Table 2: Fluoreszenzwerte von USSCs, die 1 Tag auf BioOss® Collagen kultiviert wurden. Der Mittelwert beträgt 3490 und die Standardabweichung entspricht 1372. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors und dem Vergleich des gemessenen DNA-Gehalts mit dem einer bekannten Zellzahlreihe entspricht es in der Mitte einer Zellzahl von 384.790 Zellen auf einem BioOss® Collagen.

NanoBone® Tag 1											
n 1	n 2	n 3	n 4	n 5	n 6	n 7	n 8	n 9	n 10	n 11	n 12
566	5434	2108	1289	2660	2015	2275	4492	4642	2185	2351	2251

Table 3: Fluoreszenzwerte von USSCs, die 1 Tag auf NanoBone® kultiviert wurden. Der Mittelwert beträgt 2689 und die Standardabweichung entspricht 1154. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors und dem Vergleich des gemessenen DNA-Gehalts mit dem einer bekannten Zellzahlreihe entspricht es in der Mitte einer Zellzahl von 344.100 Zellen auf einem NanoBone®.

ICBM Tag 7											
n 1	n 2	n 3	n 4	n 5	n 6	n 7	n 8	n 9	n 10	n 11	n 12
5366	5150	5311	5278	4488	5048	7568	4239	6304	4585	3667	7495

Table 4: Fluoreszenzwerte von USSCs, die 7 Tage auf ICBM kultiviert wurden. Der Mittelwert beträgt 5372 und die Standardabweichung entspricht 2571. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors und dem Vergleich des gemessenen DNA-Gehalts mit dem einer bekannten Zellzahlreihe entspricht es in der Mitte einer Zellzahl von 1.467×10^3 Zellen auf einem ICBM.

BioOss® Collagen Tag 7											
n 1	n 2	n 3	n 4	n 5	n 6	n 7	n 8	n 9	n 10	n 11	n 12
9882	8160	8307	8021	1006 0	8423	9801	8061	9905	1008 9	7609	227

Table 5: Fluoreszenzwerte von USSCs, die 7 Tage auf BioOss® Collagen kultiviert wurden. Der Mittelwert beträgt 8212 und die Standardabweichung entspricht 617. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors und dem Vergleich des gemessenen DNA-Gehalts mit dem einer bekannten Zellzahlreihe entspricht es in der Mitte einer Zellzahl von 668.540 Zellen auf einem BioOss® Collagen.

NanoBone® Tag 7											
n 1	n 2	n 3	n 4	n 5	n 6	n 7	n 8	n 9	n 10	n 11	n 12
1349	2584	2806	1601	2062	3407	2630	2895	1615	1938	1592	1976

Table 6: Fluoreszenzwerte von USSCs, die 7 Tage auf NanoBone® kultiviert wurden. Der Mittelwert beträgt 2204 und die Standardabweichung entspricht 443. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktor und dem Vergleich des gemessenen DNA-Gehalts mit dem einer bekannten Zellzahlreihe entspricht es in der Mitte einer Zellzahl von 314.601 Zellen auf einem NanoBone®.

In den Proliferationsraten zeigt sich, dass die kollagenen (ICBM) und mit Kollagen imprägnierten Materialien (BioOss® Collagen) höhere initiale Besiedlungszahlen aufweisen als das rein mineralische NanoBone®, das sich aus Hydroxylapatit und Siliziumoxid zusammensetzt. ICBM weist mit großem Abstand die höchsten Werte sowohl an Tag eins, als auch an Tag sieben auf und zeichnet sich damit als besonders zellfreundliche Matrix aus. Allgemein zeigen sich nach der Dauer einer siebentägigen Inkubation der USSCs auf den Biomaterialien die größten Unterschiede. Das stärkste Wachstum ließ sich das Wachstum für die humanen Nabelschnurblutstammzellen auf ICBM nachweisen, gefolgt von BioOss® Collagen. Auf dem mineralischen NanoBone® ging die Zahl der Zellen innerhalb der sieben Tage sogar leicht zurück (Abb.10). Die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) ergab signifikante Werte für die spezifische Besiedelung der Biomaterialien (n=12) an allen untersuchten Tagen ($p < 0,0015$).

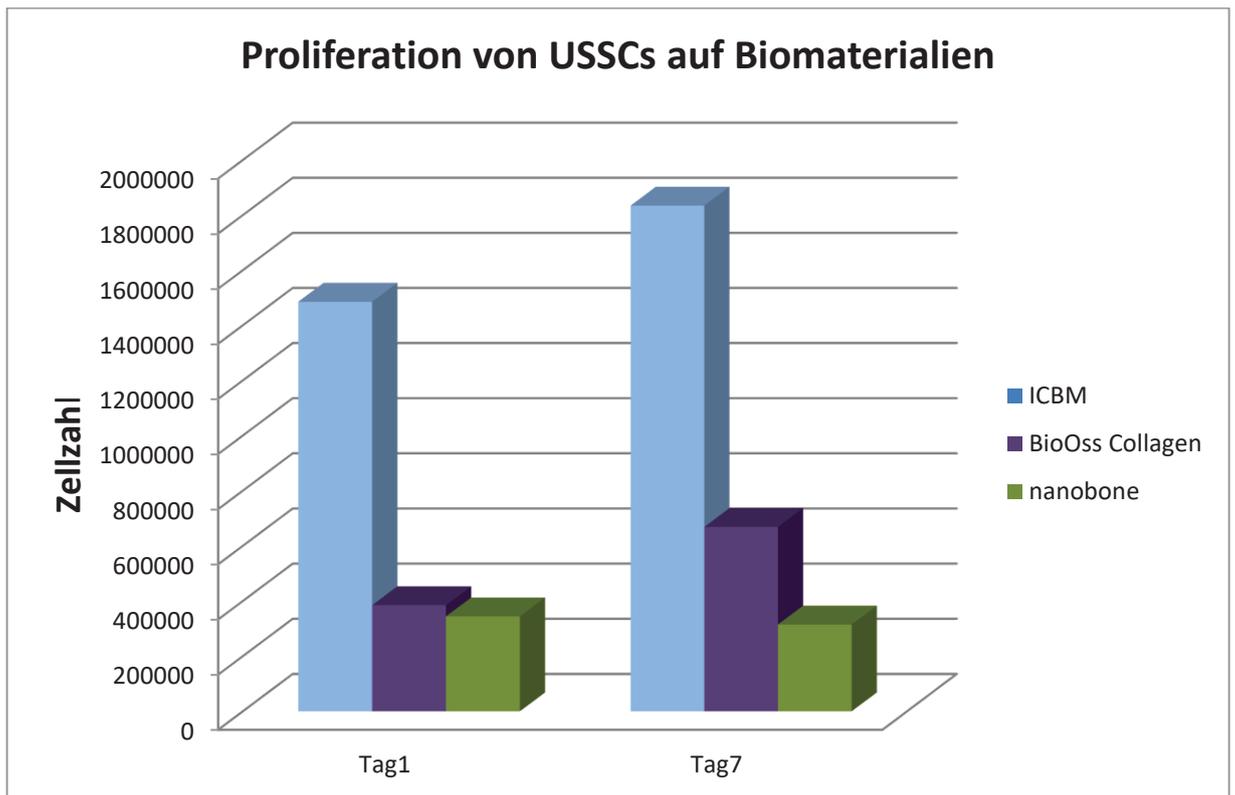


Abb. 10: Proliferation von USSCs auf ICBM, BioOss® Collagen und NanoBone® mittels CyQuant®-Assay nach einer ein- und siebentägigen Inkubation der Stammzellen auf den Biomaterialien.

3.2. Ergebnisse der Zytotoxizitätsanalyse mit CytoTox-One®

Zur Bestimmung der Zellvitalität und der toxischen Auswirkung eines Testverfahrens auf die Zellkultur wurde in dieser Dissertation der CytoTox-ONE® Homogeneous Membrane Integrity Assay verwendet. Es handelt sich um ein fluorometrisches Verfahren zur Abschätzung der Anzahl der lebensfähigen Zellen in einer Zellkultur. Zellen, deren Membranintegrität durch verschiedene Einflüsse beschädigt wurde, setzen die normalerweise nur intrazellulär vorhandenes LDH frei. Diese freigesetzte LDH erzeugt Reduktionsäquivalente, die für die Bildung stark fluoreszierenden Resorufins aus Resazurin durch die ebenfalls zugefügte Diaphorase verantwortlich sind (Abb. 8). Die Fluoreszenzintensität dieses Endprodukts ist proportional zu der freigesetzten LDH-Menge aus den untergegangenen Zellen und kann somit als Maß für die Zytotoxizität herangezogen werden.

Für das Experiment wurden ICBM, NanoBone® und BioOss®-Kollagen jeweils mit 500.000 Zellen besiedelt und 2 Tage lang kultiviert.

Nach der Auswertung der Ergebnisse zeigt sich die deutlich günstigere Biokompatibilität der kollagenen Strukturen (ICBM und BioOss® Collagen) im Vergleich zum anorganischen Träger (NanoBone®). Die relative Zytotoxizität erreicht bei BioOss® Collagen Werte, die im Vergleich zu ICBM um das 1,5-fache erhöht sind, für NanoBone® liegen die Messungen im Bereich von 1,8-fach erhöhter Zytotoxizität (Abb. 11). Diese Eigenschaften sind auch mit den unterschiedlichen Volumenverhältnissen und den Porengrößen der Biomaterialien verknüpft.

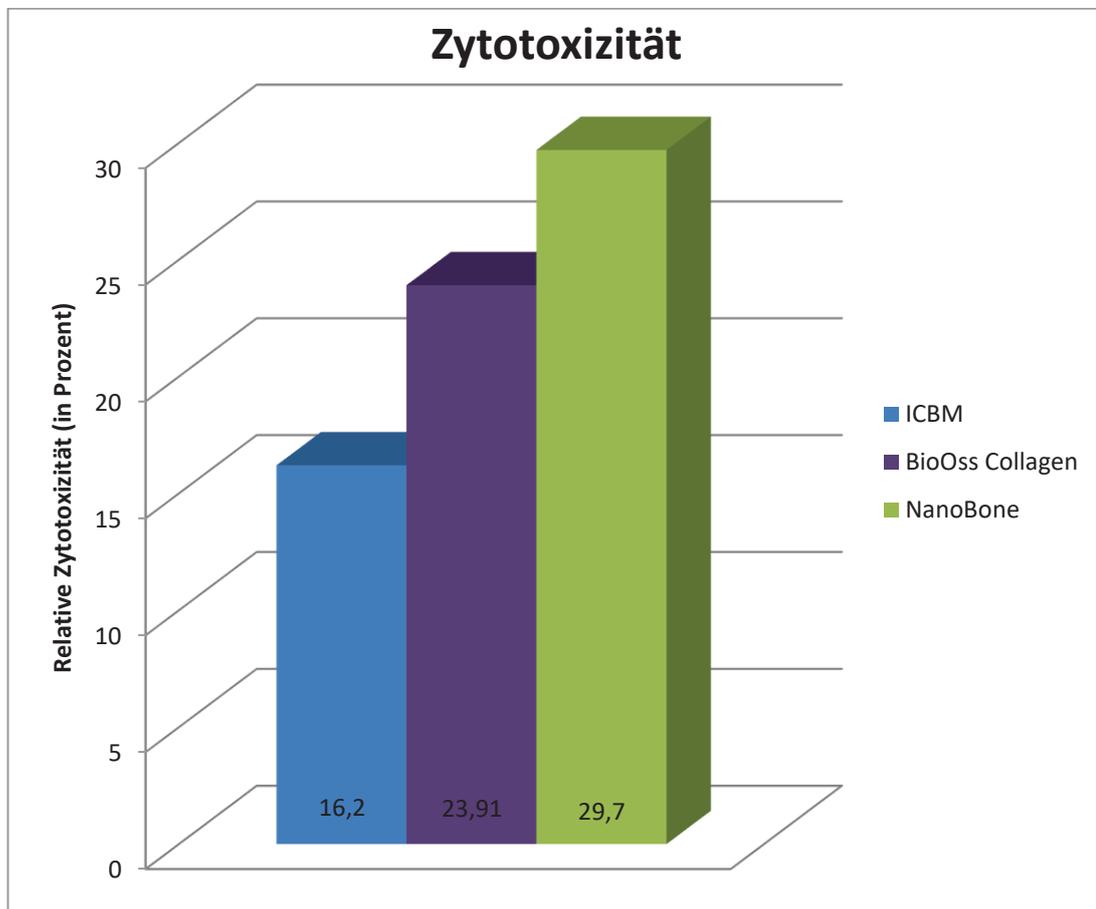


Abb. 11: Darstellung der relativen Zytotoxizität der besiedelten Biomaterialien in Prozent (48-Stunden-Wert).

3.3. Ergebnisse der Rasterelektronenmikroskopie

Bei der Rasterelektronenmikroskopie (REM) werden die Proben mittels eines feingebündelten Elektronenstrahls in definierten Abständen abgetastet. Dies ermöglicht eine sehr genaue Darstellung auch dreidimensionaler nicht-elektronentransparenter Proben aus den einzelnen Messpunkten. In dieser Arbeit wurden ICBM, BioOss® Collagen und NanoBone® erst vor einer Zellbesiedelung rasterelektronenmikroskopisch untersucht und anschließend nach einer siebentägigen Inkubation mit USSCs. Dabei wurde besonderes Augenmerk auf die Oberflächenbeschaffenheit des Biomaterials, die Zellbesiedelung und die Morphologie der Zellen auf dem Träger gelegt.

Auf den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen wird sichtbar, dass die Feinstruktur der ICBM besonders große Lumina für das Einwachsen von Zellen bietet. Es unterscheidet sich durch seine glatte Oberfläche und spongiöse Struktur von den anderen Biomaterialien (Abb. 12 a,b). Im Vergleich dazu finden sich bei BioOss® Collagen kleinere Poren (Abb. 13 a,b), bei NanoBone® zeigt sich eine eher raue, kleinlumige Oberfläche (Abb. 14 a,b).

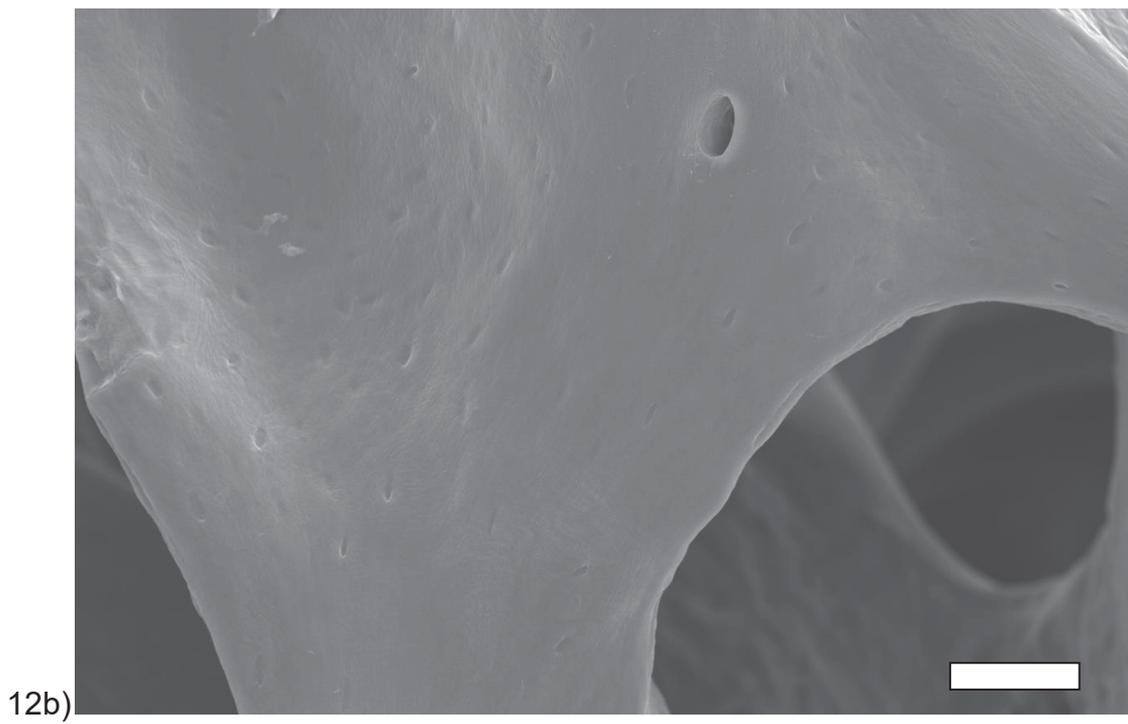
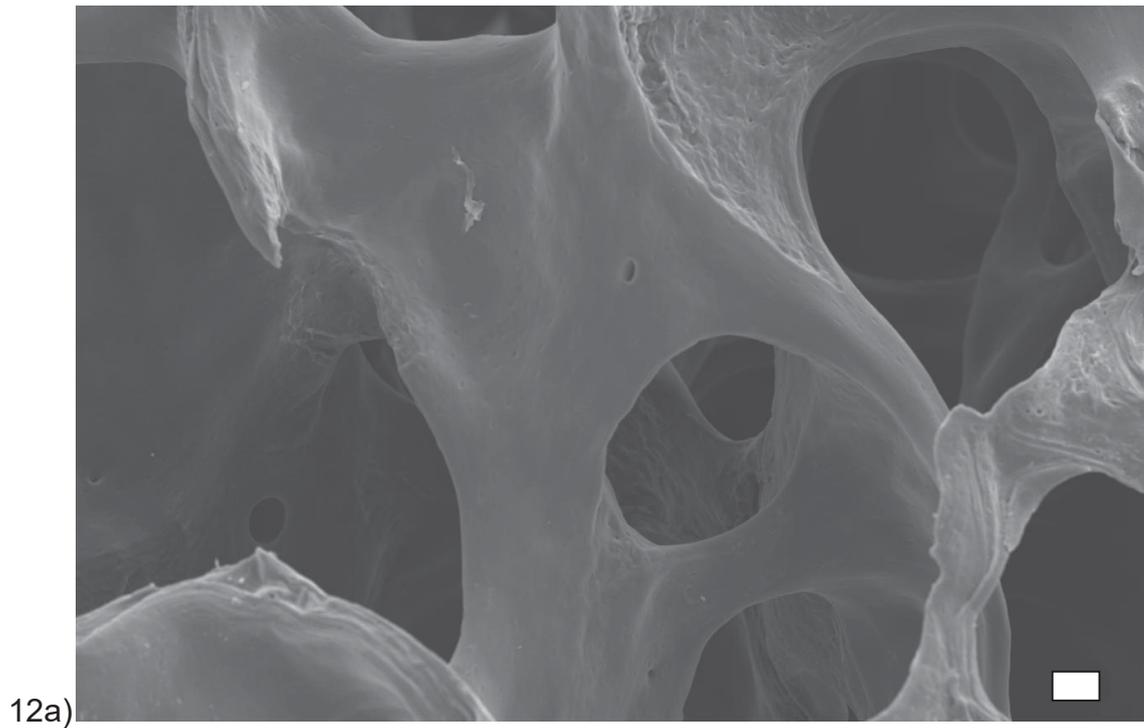


Abb. 12 a), b): REM-Aufnahme eines ICBM vor der Zellbesiedlung. Alle Messbalken haben die Größe von 100 μm .

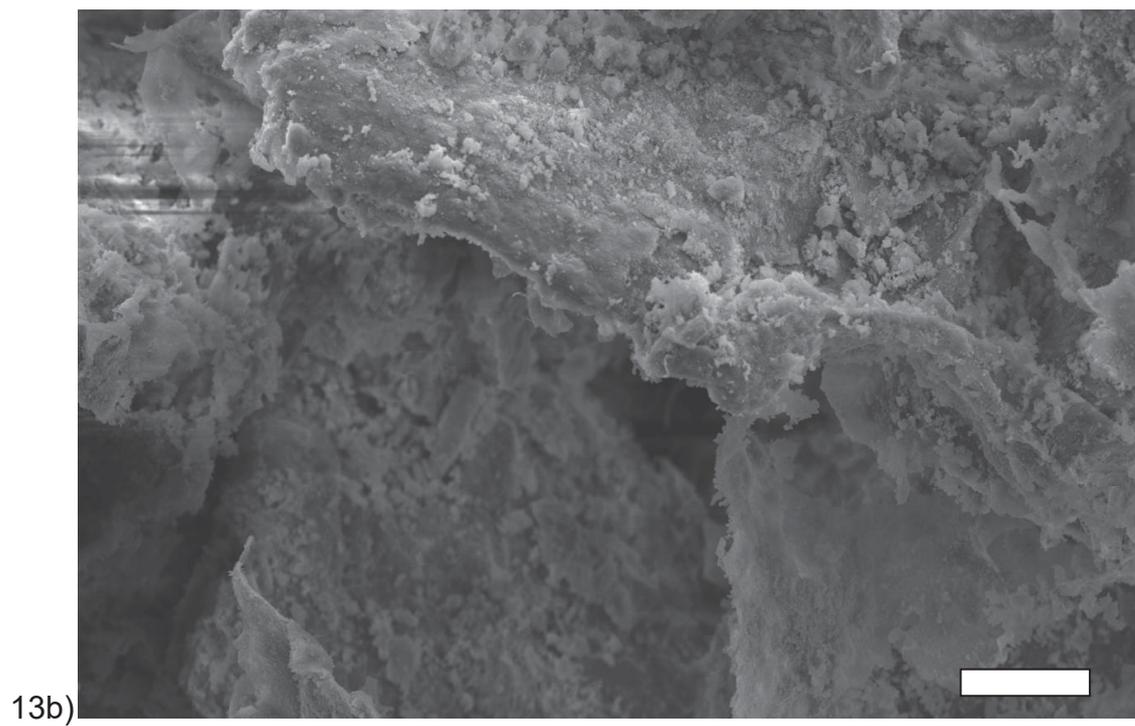
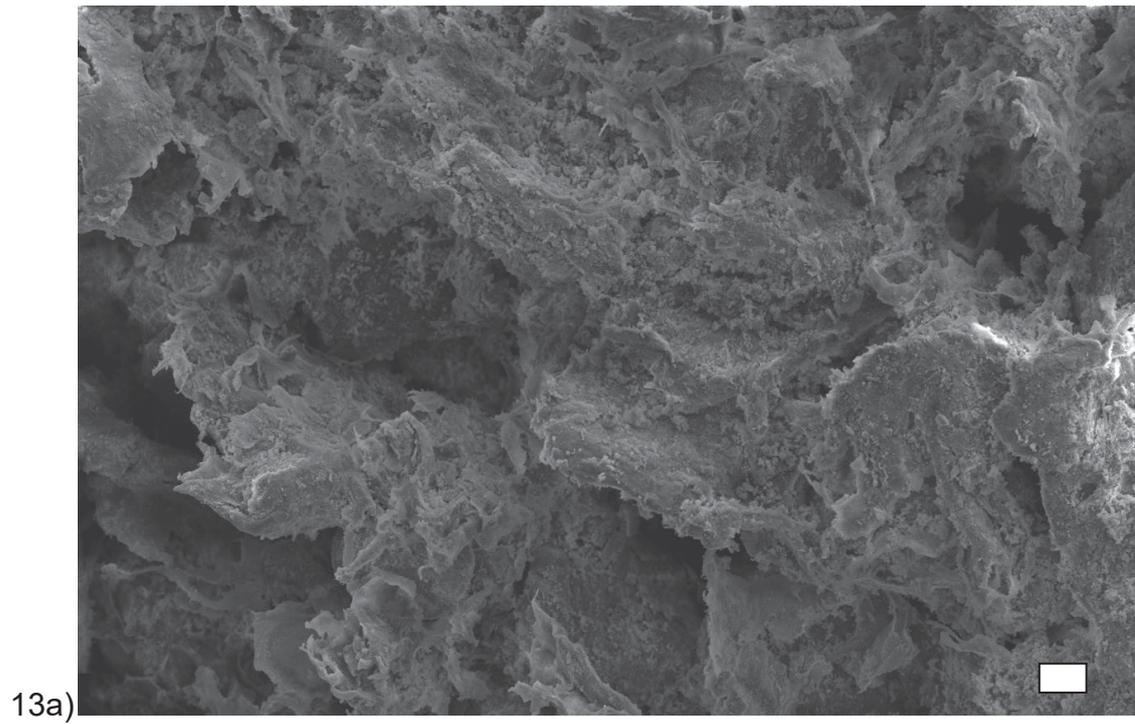


Abb. 13 a), b): REM-Aufnahme eines BioOss® Collagen vor der Zellbesiedlung. Alle Messbalken haben die Größe von 100 μm

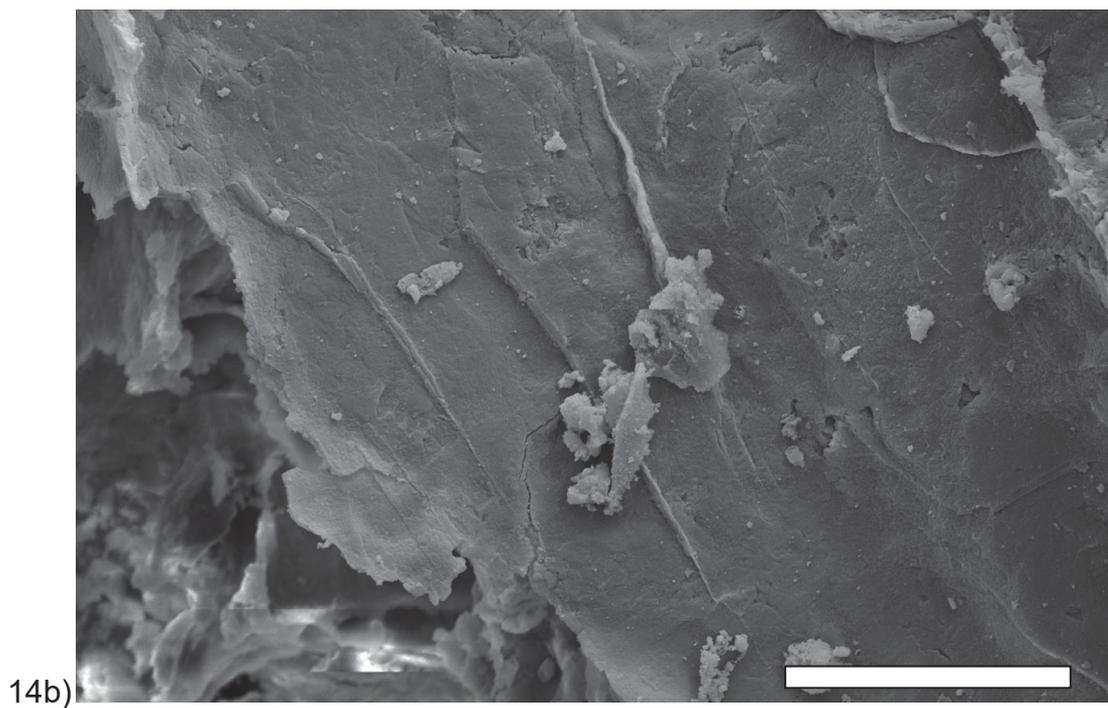
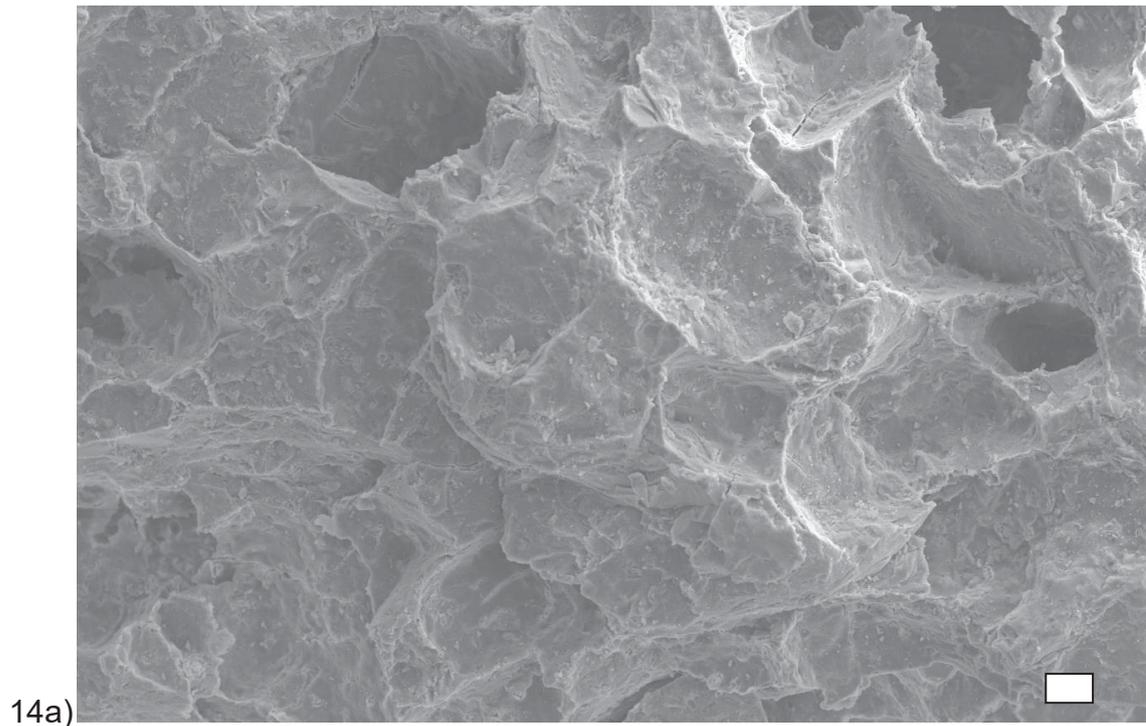


Abb. 14 a), b): REM-Aufnahme einer NanoBone®-Oberfläche vor der Zellbesiedlung. Alle Messbalken haben die Größe von 100 µm

Bei der Betrachtung der mit USSCs besiedelten Biomaterialien in der REM werden die Ergebnisse aus der CyQuant®-Analyse bestätigt. Auf ICBM befanden sich mehr Zellen als auf BioOss® Collagen und auf NanoBone® (Abb. 15, 16, 17). Außerdem bildeten die USSCs mehr Zellfortsätze aus und durchwuchsen

oder kleideten die großen Poren des ICBM aus (Abb. 15). Die mineralischen Träger aus Hydroxylapatit (NanoBone®) wiesen die am wenigsten dichte Zellbesiedlung auf (Abb. 17). Hier waren die Zellfortsätze und Zell-Zell-Kontakte nur wenig ausgebildet. Die Gemeinsamkeit der Biomaterialien bestand darin, dass die USSCs einen direkten Kontakt zu allen Biomaterialien aufwiesen ohne in diese durch Veränderung der Oberfläche einzuwachsen.

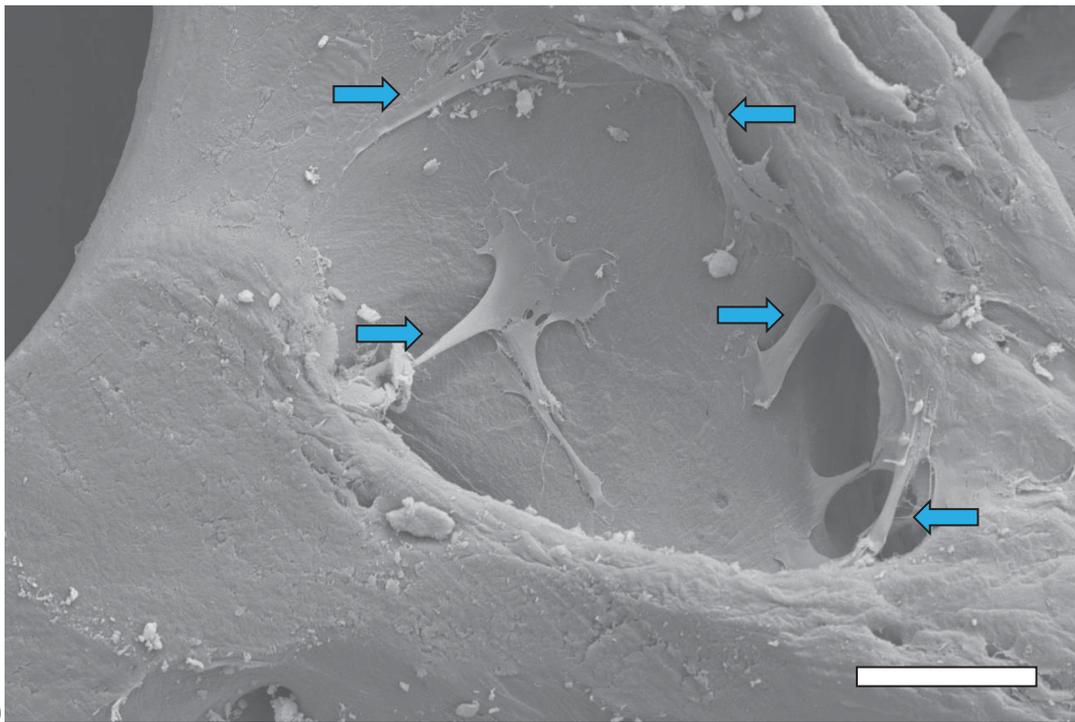


Abb. 15: REM-Aufnahme eines ICBM mit USSC nach 7-tägiger Kultivierung. Alle Messbalken haben die Größe von 100 μm . Die Pfeile weisen auf besonders gut sichtbare Zellen hin, Einzelzellen sind im REM nicht voneinander abgrenzbar.

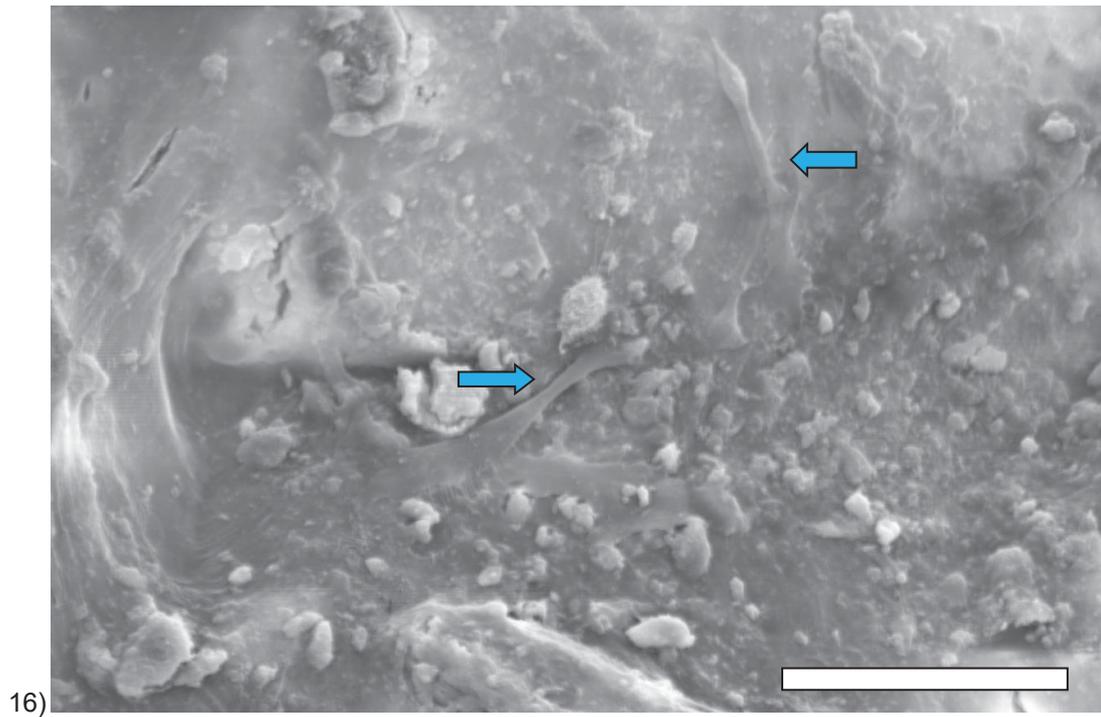


Abb. 16: REM-Aufnahme eines BioOss®-Collagen-Trägers mit USSC nach 7-tägiger Kultivierung. Alle Messbalken haben die Größe von 100 µm. Die Pfeile weisen auf besonders gut sichtbare Zellen hin, Einzelzellen sind im REM nicht voneinander abgrenzbar.

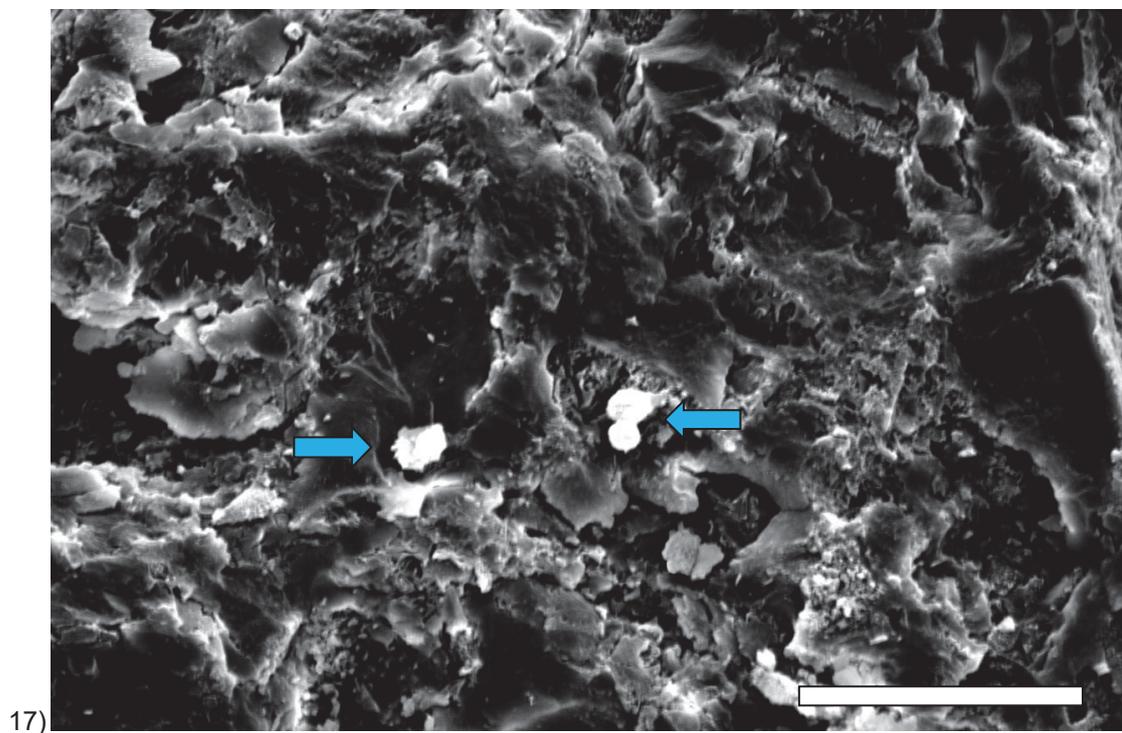


Abb. 17: REM-Aufnahme eines NanoBone®-Trägers mit USSC nach 7-tägiger Kultivierung. Alle Messbalken haben die Größe von 100 µm. Die Pfeile weisen auf besonders gut sichtbare Zellen hin.

3.4. Darstellung von vitalen Zellen auf den Biomaterialien

CellTracker™ (Orange) ist ein fluoreszierender Farbstoff mit einer thiolreaktiven Gruppe, der sich in lebenden Zellen anreichert und sich über mehrere Tage und mehrere erfolgreiche Teilungen nachweisen lässt. Er zeigt ideale Tracking-Eigenschaften indem er stabil ist, bei einem physiologischen pH-Wert unter einem Fluoreszenzmikroskop hell leuchtet und in empfohlenen Arbeitsdosen für Zellen nicht toxisch ist.

Für diese Untersuchung wurden die Biomaterialien ICBM, BioOss® Collagen und NanoBone mit USSCs besiedelt und 48 Stunden lang kultiviert. Nach einer Färbung der Proben mit dem Celltracker™ Orange und Betrachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop mit verschiedenen Filtern konnte man feststellen, dass die proteinhaltigen Materialien ICBM und BioOss® Collagen Eigenfluoreszenz in allen Wellenlängen aufweisen und somit keine Abgrenzung zu den fluoreszierenden, lebenden Zellen ermöglichen. Nur auf NanoBone® konnte man mithilfe von TX2-Filter lebende Zellen gut erkennen (Abb. 18).

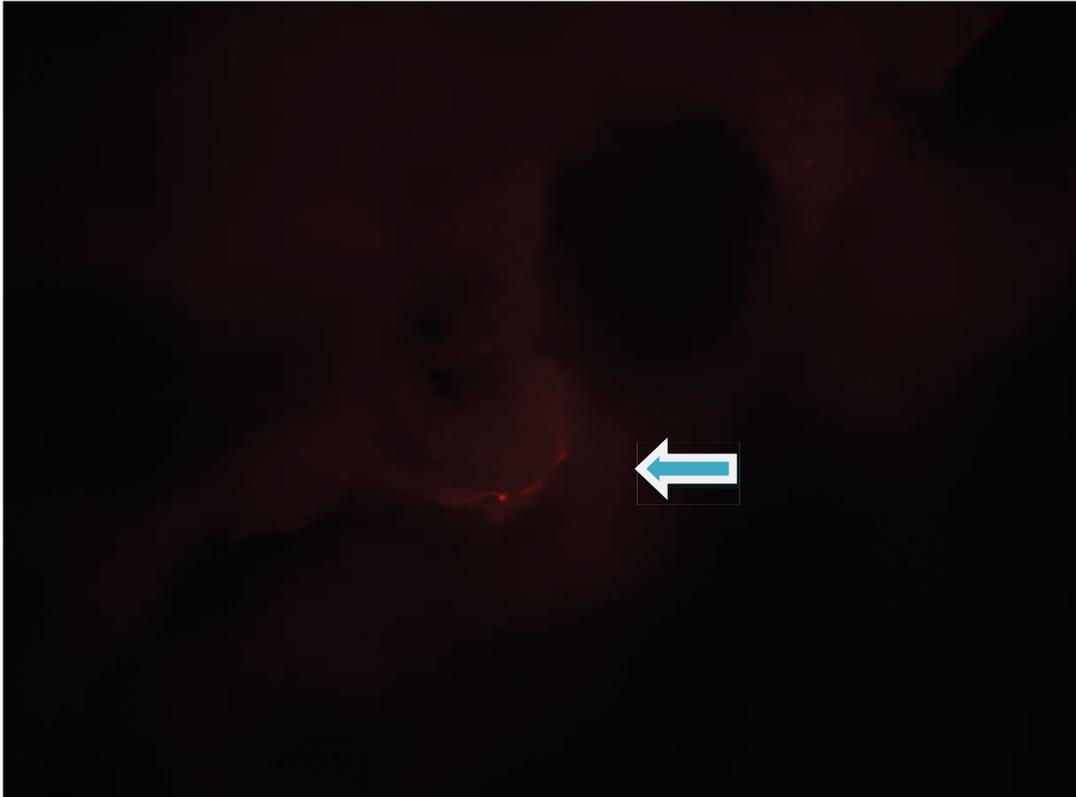
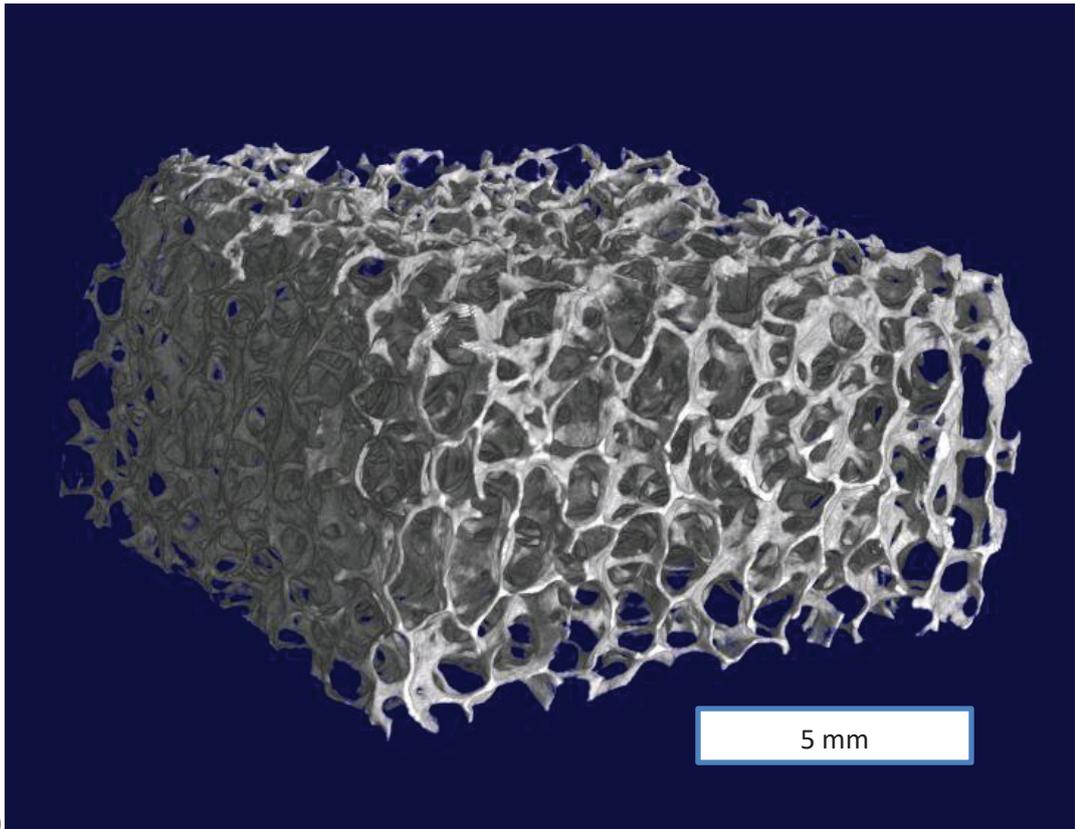


Abb. 18: Eine Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines mit Celltracker™ Orange gefärbten USSCs auf NanoBone®-Träger nach einer 48-stündigen-Kultivierung. Aufnahme mit TX2-Filter. Vergrößerung 100-fach. Der Pfeil markiert die fluoreszierenden Zellen.

3.5. Ergebnisse der Mikro-Computertomografie (μ -CT)

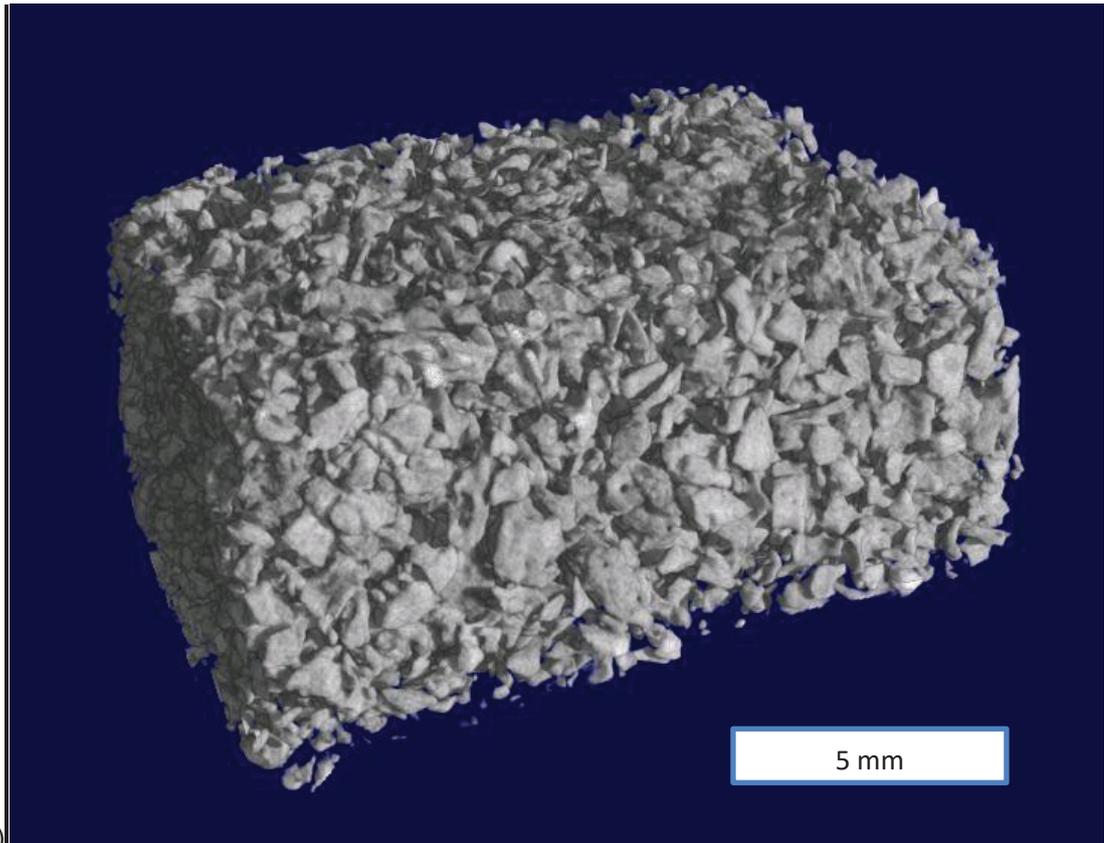
Die Mikro-Computertomographie (μ -CT) eignet sich als besonders schonende Methode zur strukturellen Analyse von Knochenersatzmaterialien und biologischen Hartgeweben wie Knochen (Ruegsegger et al., 1996; Cooper, 2004). Im Gegensatz zur Rasterelektronenmikroskopie ermöglicht die μ -CT-Analyse eine räumliche Darstellung der Proben.

Die *in vitro* untersuchten Matrices zeigen unterschiedliche Gesamtporosität und Porengrößen. Dabei hat ICBM (Abb. 19) die größte Gesamtporosität von 78,82 Prozent und einen hohen Anteil von großvolumigen Poren, die im Schnitt 487 μ m groß sind. Die Gesamtporosität von BioOss® Collagen (Abb. 20) liegt bei 62,61 Prozent und die Porosität bei 243 μ m. Das mineralische NanoBone® (Abb. 21) hat die kleinste Gesamtporosität von 57,09 Prozent und die kleinsten Poren von 219 μ m.



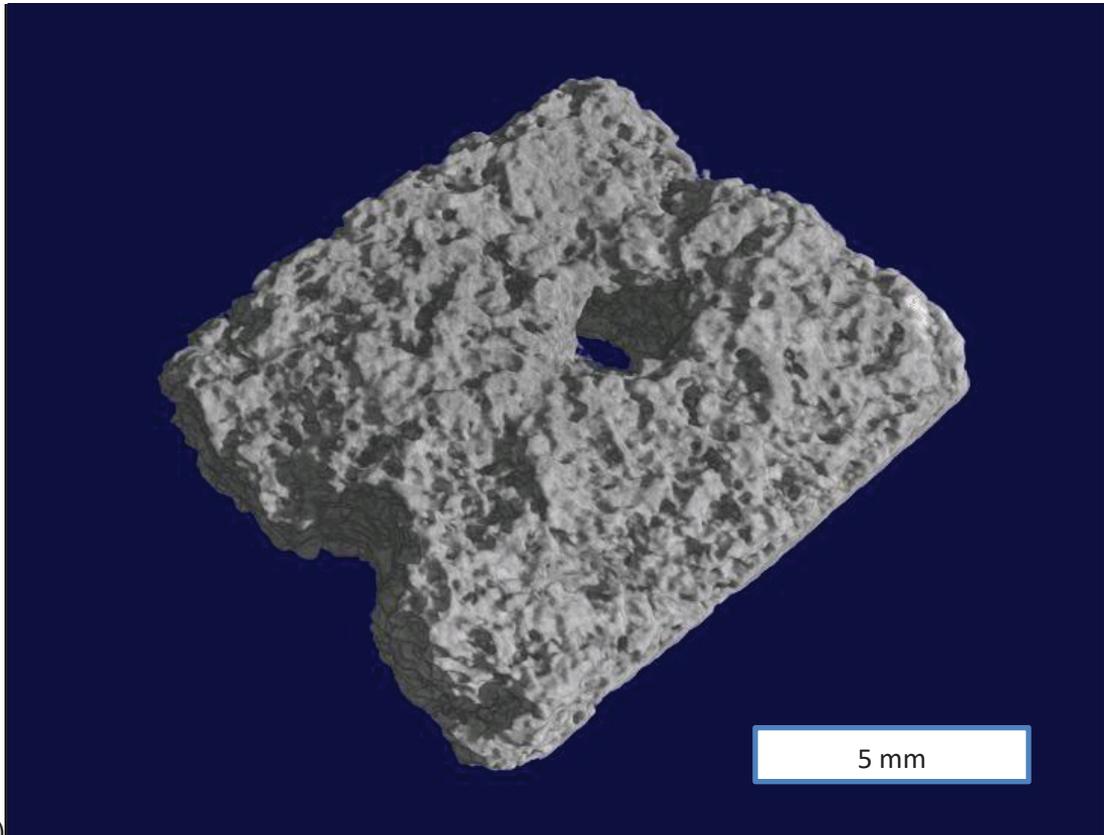
19)

Abb. 19: Mikro-CT-Aufnahme eines 1x1x0,5 cm großen ICBM-Blocks.



20)

Abb. 20: Mikro-CT-Aufnahme eines 1x1x0,5cm großen BioOss®-Collagen-Blocks.



21)

Abb. 21: Mikro-CT-Aufnahme eines 1x1x0,5cm großen NanoBone®-Blocks.

4. Diskussion

Der Einsatz von Knochenersatzmaterialien und die modernen Verfahren wie das *Tissue Engineering* haben heute eine große Bedeutung in der rekonstruktiven sowie in der Tumorchirurgie. Auch in der modernen Zahnmedizin ist es bei augmentativen Maßnahmen eine bevorzugte Methode (von Arx et al., 2001). Die drei grundlegenden Säulen des TE sind die Wachstumsfaktoren, die pluripotenten Stammzellen und eine geeignete dreidimensionale Matrix (Scaffold) (Bruder, S.P. und B.S. Fox, 1999). In dieser Arbeit wurde die Biokompatibilität von Matrices mit geeigneten Vorläuferzellen untersucht und damit die Schnittstellen von zwei dieser Säulen, nämlich den dreidimensionalen Knochenersatzmaterialien und den humanen Nabelschnurblutstammzellen evaluiert. Es zeigte sich, dass sich die Biokompatibilität der erheblich unterscheidet.

Die Biokompatibilität wurde in dieser Dissertation anhand unterschiedlicher Testverfahren ermittelt. Zum einen wurde eine Zellzahlanalyse mit einem CyQuant®-Assay durchgeführt. Parallel dazu wurden rasterelektronische und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von den Biomaterialien mit und ohne Zellen erstellt, die Zytotoxizität der Träger mit CytoToxONE™ ermittelt und eine Mikro-CT-Analyse der Biomaterialien durchgeführt.

4.1. Auswahl der Zellen

2004 veröffentlichte Prof. Dr. G. Kögler an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf den Nachweis einer Stammzellpopulation aus mononukleären Zellen des Nabelschnurblutes mit einem hohen Differenzierungs- und Proliferationspotenzial, das sowohl *in vivo* als auch *in vitro* nachgewiesen werden konnte (Kögler et al., 2004). Diese Zellen wurden als *unrestricted somatic stem / stromal cells* (USSC) bezeichnet. Zusammen mit dem hohen Proliferationspotential und der damit einhergehenden guten Verfügbarkeit macht das vielfältige Differenzierungspotenzial diese Zelllinie für die Verwendung in der Forschung besonders geeignet. Die Differenzierbarkeit dieser Zellen sowohl in Osteoblasten, als auch in Chondroblasten, Adipozyten, hämatopoetische und

neuronalen Zellen konnte *in vitro* gezeigt werden. Im Gegensatz zu den embryonalen Stammzellen wird der Einsatz dieser Zellen in der Forschung als ethisch unbedenklich eingestuft.

Die in dieser Arbeit verwendeten USSCs waren aus Nabelschnurblut verschiedener Spenderinnen am Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf nach etablierten Verfahren isoliert worden (Kögler et al., 2004). Das Nabelschnurblut wurde unter strengen Anforderungen und mit dem Einverständnis der Mütter unmittelbar nach der Abnabelung aus der Nabelschnurvene entnommen. In den Versuchen wurden Nabelschnurblutstammzellen der Passage 8 eingesetzt.

4.2. Auswahl der Knochenersatzmaterialien

Eine geeignete Trägermatrix (Scaffold) ist ein essentieller Bestandteil des *Tissue Engineering*. Es muss biokompatibel und biologisch abbaubar sein (Hing et al., 1999; De Oliveira et al., 2003). Außerdem sollte ein ideales Biomaterial eine große Oberfläche aufweisen und eine angemessene Porengröße für die Vaskularisierung und die Einwanderung von Zellen haben (Wintermantel et al., 1999). Des Weiteren sollen die Matrizes in mechanischen, strukturellen und physikalischen Eigenschaften dem ursprünglichen Hartgewebe ähnlich sein (Klein M.O., 2010).

Heute werden Knochenersatzstoffe aus verschiedensten Materialien in der rekonstruktiven Chirurgie verwendet. Es gibt sowohl biologische Träger, als auch synthetische und Kompositmaterialien (Verbundmaterialien) (Smeets et al., 2010). Für diese Arbeit wurden drei Knochenersatzmaterialien aus verschiedenen Stoffgruppen ausgesucht, um deren Biokompatibilität mit humanen Nabelschnurblutstammzellen zu untersuchen. Die Trägermaterialien unterscheiden sich in Zusammensetzung, Porengröße und Herkunft voneinander. Dadurch kann man den Einfluss verschiedener Eigenschaften dieser Matrizes auf das Zellwachstum beobachten und miteinander vergleichen.

Das ICBM (insoluble collagenous bone matrix) wurde in eigenem Labor aus der Spongiosa des Rinderknochens hergestellt, die Gewinnung erfolgte nach

Anleitung aus der Patentschrift von Kuberasampath und Ridge (Kuberasampath and Ridge, 1992), modifiziert nach einem etablierten Verfahren (Depprich et al., 2005; Würzler, 2004). Diese Trägermatrix gehört zu den biologischen Materialien und besteht zum größten Teil aus Kollagen Typ I. Seine spongiöse Oberflächenstruktur und die Zusammensetzung aus Kollagen bieten optimale Voraussetzungen für die Besiedelung mit Zellen (Handschel et al., 2008a; Naujoks et al., 2011).

BioOss® Collagen gehört ebenfalls zu der Gruppe der biologischen Materialien und besteht laut Hersteller zu 90% aus bovinem Spongiosa Granulat (\varnothing 0,25-1mm) und 10% porcinem Kollagen. Die natürliche Struktur der Spongiosa wird in einem aufwendigen Herstellungsverfahren nachgeahmt, indem das Spongiosa Granulat mit Kollagen vermengt und anschließend in eine schwammartige Blockform gebracht wird. Somit weist es nur wenige und sehr kleine Makro- und Mikroporen von 3nm bis 1,5mm auf. *In vivo* fördert das Material durch seine Stabilität den Erhalt des Alveolarkammvolumens nach Zahnextraktion und verhindert die Resorption des Knochens (Jung et al., 2013; Schropp et al., 2003).

NanoBone® ist ein Vertreter aus der Gruppe der rein synthetischen Kompositmaterialien. Es setzt sich aus 76% nanokristallinem Hydroxylapatit (HA) und 24% Siliziumdioxid (SiO₂) aus hochporöser Silicagelmatrix zusammen (Gerber et al., 2006). Die Trägermatrix wird im Sol-Gel-Verfahren ohne Sinterungsprozess hergestellt, wodurch es poröser und lockerer in seiner Beschaffenheit bleibt und somit im Vergleich zu gesinterten HA-Materialien größere innere Oberfläche von 204,8m²/g aufweist. Durch das Siliziumoxid werden Vaskularisierung, Kollagen- und Knochenbildung des Umgebungsgewebes gefördert (Götz et al., 2008; Xu et al., 2009, Punke C., 2012).

4.3. Proliferationsverhalten der USSCs

Die Biokompatibilität der USSCs auf dreidimensionalen Knochenersatzmaterialien wurde mit verschiedenen Verfahren untersucht. Zum einen erfolgte eine Bestimmung der Zellzahl, die sich auf dem Biomaterial nach einer ein- und siebentägigen Inkubation befunden haben, mittels eines fluoreszenzbasierten Färbeassay (CyQuant®). Diese Methode beruht auf der Einlagerung des Farbstoffs (CyQuant® GR dye) in die Nukleinsäure der lysierten Zellen, der anschließend über die Messung der Fluoreszenzintensität im Fluorometer quantifiziert wird. In dem zugrunde gelegten Messbereich kann zwischen Fluoreszenzintensität und der Zellzahl in einer Probe eine lineare Abhängigkeit festgestellt werden (Jones et al., 1991).

Die Untersuchung des Proliferationsverhaltens hat gezeigt, dass die Nabelschnurblutstammzellen ein unterschiedliches Attachement und spezifische Proliferationsraten auf den untersuchten Biomaterialien aufweisen (Abb. 10).

Bei der Betrachtung der initialen Besiedlungszahlen der Nabelschnurblutstammzellen auf den Knochenersatzmaterialien fällt ein großer Unterschied zwischen den Biomaterialien auf (Abb. 10; Tag1). Dabei ist das Attachment der USSCs auf ICBM am höchsten, gefolgt von BioOss® Collagen und NanoBone®, die etwa gleich hohe Besiedlungszahlen aufweisen. Bei der Proliferation der USSCs zeigen sich die größten Unterschiede zwischen den Trägern (Abb. 10; Tag 7). Die höchste Zellzahl von 1.467×10^3 Zellen konnte auf ICBM nach 7 Tagen Kultivierung nachgewiesen werden, auf BioOss® Collagen hat sich die Zahl der USSCs im Vergleich zu Tag 1 von 384.790 auf 668.540 Zellen in etwa verdoppelt. Anders verhielten sich die Nabelschnurblutstammzellen auf NanoBone®. Hier ging die Zellzahl sogar von 344.100 auf 314.601 Zellen leicht zurück.

Der Vergleich der Fluoreszenzintensitäten und damit der Zellzahlen auf den unterschiedlichen Materialien ergab, dass die Besiedlung der Träger signifikant voneinander mit einem p-Wert von <0.005 unterscheidbar waren.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass ICBM aufgrund seiner Porenstruktur und Beschaffenheit besonders zellfreundlich ist, sowohl bezüglich

der initialen Besiedlungsraten, als auch der Proliferation der Zellen auf diesem Träger. Die Ergebnisse anderer Studien zeigten ebenfalls, dass das Zellattachment unter anderem von der Zusammensetzung des Biomaterials abhängt. Meyer U. T. bewies in seiner Arbeit, dass die Fibronectinbeschichtung von künstlichen Substraten die Bindungsstärke und Proliferationsrate von Osteoblasten deutlich erhöht. (Meyer et al., 1998).

Daten anderer Studie legen nahe, dass auch eine dreidimensionale Kollagenmatrix eine günstigere Umgebung für die Anheftung, die Proliferation und die Differenzierung von Osteoblasten bietet (Petrovic et al., 2006).

Auch die Größe von Biomaterialien spielt für die Entwicklung der Zellen eine Rolle, so lieferten größere Fibrinpartikel günstigere Ergebnisse in Bezug auf Zellproliferation, als verdünntes Fibrin (Eweida A., 2017).

4.4. Rasterelektronenmikroskopie

Die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung bestätigt das Ergebnis der fluoreszenzbasierten Proliferations-Assay. Auf ICBM war in den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen ein dichter Zellrasen zu erkennen (Abb. 15). Die Besiedelung der BioOss® Collagen-Träger stellte sich dagegen deutlich weniger dicht dar (Abb. 16). Auf dem rein mineralischen NanoBone® konnte nur durch intensive Suche auf den Präparaten in der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung die Anwesenheit von Zellen auf dem Träger gezeigt werden (Abb. 17). In anderen wissenschaftlichen Arbeiten konnte ebenfalls die Korrelation zwischen der in einem Proliferations-Assay ermittelten Zellzahl und der rasterelektronenmikroskopischen Darstellung nachgewiesen werden (Bandyopadhyay-Ghosh, 2006; Naujoks, 2011; Nyberg E et al., 2017).

Neben der Zellzahl konnte man in den REM- Aufnahmen das morphologische Zellbild der USSCs beurteilen. Auf dem kollagenhaltigen ICBM und dem kollagenimprägnierten BioOss® Collagen hatten die USSCs viele Zell-Zell-Kontakte untereinander ausgebildet und zeigten eine spindelförmige Zellform mit vielen Ausläufern (Abb. 15, 16). Auf dem rein mineralischen NanoBone® hatten

die Nabelschnurblutstammzellen eine sphärische Form, Zell-Zell-Kontakte waren hier kaum vorhanden (Abb. 17).

Ähnliche Resultate wurden in Arbeiten über die Biokompatibilität von osteogen vordifferenzierten Nabelschnurstammzellen (USSC) und murinen embryonalen Stammzellen (ESC) auf verschiedenen Biomaterialien (Handschel et al., 2008b; Naujoks, 2011) erzielt. Auch in diesen Studien hat sich ICBM als die zellfreundlichste Matrix mit der höchsten Biokompatibilität erwiesen. Die Veränderungen der Zellmorphologie und der Genexpression der Stammzellen durch das Wachstum auf verschiedenen Biomaterialien waren ebenfalls wichtige Beobachtungspunkte dieser Studien.

4.5. Zelltoxizitätsanalyse

Die CytoTox-ONE®-Analyse ermöglicht eine Aussage über die Toxizität einer Substanz oder eines Stoffes dem die zu untersuchenden Zellen in einem Experiment ausgesetzt wurden. Die Zellen, deren Membranintegrität durch verschiedene Einflüsse beschädigt wird, setzen die sonst nur intrazellulär vorhandene LDH frei. Die Menge der freigesetzten LDH kann über die Bildung von stark fluoreszierendem Resorufin bestimmt werden, das durch die Reduktion von Resazurin mit NADH entsteht (Abb. 8). Die Fluoreszenzintensität dieses Endprodukts ist innerhalb des linearen Messbereichs damit proportional zu freigesetzten LDH-Menge aus den zugrunde gegangenen Zellen und kann somit als Maß für die Zytotoxizität herangezogen werden (Korzeniewski, 1983; Decker, 1988).

In der Toxizitäts-Analyse wurde deutlich, dass ICBM die zellfreundlichsten Bedingungen am wenigsten toxisch für die Nabelschnurblutstammzellen bietet, gefolgt von einem ebenfalls kollagenhaltigen BioOss® Collagen. Am wenigsten zellfreundlich hat sich das vollsynthetische NanoBone® erwiesen (Abb. 11). Trotzdem ist die Zytotoxizität dieses stabilen, rein mineralischen Biomaterials mit 29,7% allgemein gesehen als gering einzustufen, was durch andere wissenschaftliche Arbeiten belegt wurde (Liu et al., 2011).

4.6. Lebendzell-Fluoreszenzmikroskopie

Mit Hilfe eines fluoreszierenden Farbstoffes aus einer Gruppe von Lebendzellfarbstoffen konnte in der mikroskopischen Analyse die Anwesenheit und die Position von lebenden Nabelschnurblutstammzellen auf einem Knochenersatzmaterial nachgewiesen werden.

Die Färbung der USSCs auf NanoBone mit CellTracker™ Orange zeigt eine zellselektive Anfärbung ohne Hintergrundfluoreszenz (Abb. 18). Auf anderen Knochenersatzmaterialien wie ICBM und BioOss® Collagen war der Nachweis von lebenden Zellen wegen der Eigenfluoreszenz der in den Biomaterialien enthaltenen Proteine nicht möglich. Denn nahezu alle Proteine besitzen dank ihrer aromatischen Aminosäuren wie Tyrosin, Tryptophan und Phenylalanin eine intrinsische Fluoreszenz (Striebel et al., 2004; Plessow, 2004).

4.7. Mikro-CT (μ -CT)

Wie die Studien anderer Arbeitsgruppen gezeigt haben, hängt die Biokompatibilität nicht nur von der chemischen Zusammensetzung des Knochenersatzmaterials, sondern auch von weiteren Faktoren, wie der dreidimensionalen Topographie, der Struktur und den physikalisch-chemischen Eigenschaften des Trägers ab (Meyer et al., 2004; Dalby et al., 2000). Dabei hat die Porosität eines Materials einen entscheidenden Einfluss auf das An- und Einwachsen der Zellen (Wintermantel et al., 2009).

Die strukturelle Analyse von Knochenersatzmaterialien erfolgte in dieser Studie mittels Mikrocomputertomographie (μ -CT) unter besonderer Berücksichtigung der Porosität dieser Materialien. Das Verfahren der μ -CT-Analyse bietet die Möglichkeit den komplexen dreidimensionalen Aufbau der Proben zu untersuchen und zu analysieren (Klein et al., 2009).

Nach der Auswertung der μ -CT-Ergebnisse zeigt sich bei ICBM eine hohe Gesamtporosität von 78,82 % mit einem überproportionalen Anteil an großen Poren, die eine mittlere Größe von 487,8 μ m haben. Diese Eigenschaften von ICBM fördern besonders gut die Gewebeintegration die durch die

Proliferationsmessung mittels CyQuant-Assay® bestätigt werden konnte (Punke C., 2012). Auch andere Studien legen eine ideale Porengröße eines Trägermaterials zwischen 300 und 700 µm zugrunde (Kargeorgiou et al., 2005; Chang et al., 2000; Mastrogiacomo et al., 2006). BioOss® Collagen und NanoBone® sind mit ihren vergleichsweise kleinen Poren mit mittleren Lumina von etwa 243 µm und 219 µm weniger für eine gute Integration von Zellen in jeweils diese Träger geeignet.

Literatur:

1. Chang B. S., Lee C. K., Hong K. S., Youn H. J., Ryu H. S., Chung S. S., Park K. W. (2000): Osteoconduction at porous hydroxyapatite with various pore configurations. *Biomaterials*, Bd. 21, Nr. 12; 1291-1298.
2. Bandyopadhyay-Ghosh S., Reaney I. M., Brook I. M., Hurrell-Gillingham K., Johnson A., Hatton P.V., (2006): *In vitro* biocompatibility of fluorcanasite glass-ceramics for bone tissue repair. *Journal of Biomedical Materials Research, Part A, Volume 80A, Issue 1*; 175–183.
3. Bianco, P., Robey P.G. (2001): Stem cells in tissue engineering. *Nature*, 414(6859); 118-121.
4. Bosch J. (2013): Vergleich des Differenzierungspotentials und der assoziierten Genexpressionssignatur von adulten und neonatalen humanen Stromazellpopulationen in Korrelation zur Knochenregeneration. Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. urn:nbn:de:hbz:061-20130902-101202-6.
5. Bruder S.P., Fox B.S. (1999): Tissue engineering of bone. Cell based strategies. *Clinic Orthopedic Related Research*; 367
6. Bucholz R. W. (2002): Nonallograft osteoconductive bone graft substitutes. *Clinic Orthopedic Related Research* (395); 44-52.
7. Caplan Al. (2007): Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *Journal Cell Physiology*. 213(2); 341-7.
8. Carvalho J. L. , de Goes A. M., Gomes D. A., de Carvalho P. H. (2013): *Innovative Strategies for Tissue Engineering*. IntechOpen Limited, London Open Access Publisher.
9. Cooper D. M., Matyas J. R., Katzenberg M. A., Hallgrimsson B. (2004): Comparison of microcomputed tomographic and microradiographic measurements of cortical bone porosity. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 74; 437–447.
10. Cornell C. N. , Lane J. M. (1992): Newest factors in fracture healing. *Clinical Orthopaedics*, 277; 297-311.

11. Dalby M. J., Di Silvo L., Davies G. W., Bonfield W. (2000): Surface Topography and HA filler volume effect on primary human osteoblasts in vitro. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 11(2); 805-810.
12. De Oliveira J. F., De Aguiar P. F. (2003): Effect of process parameters on the characteristics of porous calcium phosphate ceramics for bone tissue scaffolds. *Artificial organs journal*, 27; 406-411.
13. Decker T., Lohmann-Matthes M. L. (1988): A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *Journal of Immunological Methods*, 115(1); 61-9.
14. Depprich R., Handschel J., Sebald W., Kübler N. R., Würzler K. K. (2005): Comparison of the osteogenic activity of bone morphogenetic protein (BMP) mutants. *Mund Kiefer Gesichtschirurgie* (9); 363-368.
15. Dorozhkin S.V., Epple M. (2002): Biological and Medical Significance of Calcium Phosphates. *Angewandte Chemie*, Vol. 41; 3130-3146.
16. Drossel I., Volkmer E., Seitz S., Seitz H., Penzkofer R., Zahn K., Matis U., Mutschler W., Augat P., Schieker M. (2008): Validation of a femoral critical size defect model for orthotopic evaluation of bone healing. *Tissue Engineering, Part C Methods*. 14(1); 79-88.
17. Wintermantel E., Ha S. W. (2009): *Medizintechnik - Life Science Engineering*. Berlin/Heidelberg (Springer-Verlag).
18. Epple M. (2003): *Biomaterialien und Biomineralisation*. Wiesbaden (Teubner Verlag).
19. Eriksen E.F., Douglas W. A., Flemming M. (1994): *Bone Histomorphometry*. Raven Press, New York; 74.
20. Eweida A., Schulte M., Frisch O., Kneser U., Harhaus L. (2017): The impact of various scaffold components on vascularized bone constructs. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*. Volume 45, Issue 6; 881-890.
21. Fleming J. E., Cornell C. N., Mutschler G. F. (2000): Bone cells and matrices in orthopedic tissue engineering. *Orthopedic Clinics of North America*, 31(3); 357-374.
22. Frauendorf W. (2007): *Knochenersatz in der zahnärztlichen Chirurgie*. *Implantologie Journal* (4); 6-11.

23. Gerber T., Holzhüter G., Götz W., Bienengraber V., Henkel K.-O., Rumpel E. (2006): Nanostructuring of Biomaterials— A Pathway to Bone Grafting Substitute. *European Journal of Trauma*, Volume 32; 132-140.
24. Götz W., Gerber T., Michel B., Lossdörfer S., Henkel K.O., Heinemann F. (2008): Immunohistochemical characterization of nanocrystalline hydroxyapatite silica gel (NanoBone(r)) osteogenesis: a study on biopsies from human jaws. *Clinical Oral Implants Research*. 19(10): 1016-1026.
25. Gugala Z., Gogolewski S. (1999): Regeneration of segmental diaphyseal defects in sheep tibiae using resorbable polymeric membranes: a preliminary study. *Journal Orthopedic Trauma*; 187-95.
26. Handschel J., Wiesmann H.P., Stratmann U., Kleinheinz J., Meyer U., Joos U. (2002): TCP is hardly resorbed and not osteoconductive in a non-loading calvarial model. *Biomaterials*. 23 (7); 1689-1695.
27. Handschel J., Wiesmann H.P., Depprich R., Kübler N.R., Meyer U. (2006): Cell-based bone reconstruction therapies--cell sources. *Oral Maxillofacial Implants*. 21(6); 890-8.
28. Handschel J., Naujoks C., Langenbach F., Berr K., Depprich R.A., Ommerborn M.A., Kübler N.R., Brinkmann M., Kögler G., Meyer U. (2010): Comparison of Ectopic Bone Formation of Embryonic Stem Cells and Cord Blood Stem Cells in Vivo. *Tissue Engineering Part A* 16; 2475-2483.
29. Handschel, J., Berr, K., Depprich, R., Kübler N.R., Naujoks C., Wiesmann H.P., Ommerborn M.A., Meyer U. (2008a): Induction of osteogenic markers in differentially treated cultures of embryonic stem cells. *Head Face Medicin.*; 4-10.
30. Handschel, J., Berr, K., Depprich, R., Naujoks C., Kübler N.R., Meyer U., Ommerborn M., Lammers L. (2008b): Compatibility of Embryonic Stem Cells with Biomaterials. *Journal Biomaterials Apply* May; 23(6); 549-560.
31. Hing, K. A., Best, S. M., Bonfield, W. (1999): Characterization of porous hydroxylapatite. *Journal Materials Science: Materials in Medicine* 10; 135-145.
32. Hogan BL (1996): Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes and Development* 10; 1580-1594.

33. Hollinger J.O., Kleinschmidt J.C. (1990): The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *Journal of Craniofacial Surgery*.1(1); 60-68.
34. Jäger M., Sager M., Lensing-Höhn S., Krauspe R. (2005): The critical size bony defect in a small animal for bone healing studies (II): implant evolution and surgical technique on a rat's femur. *Biomedicine Technology (Berlin)* ; 50(5); 137-142.
35. Jones L.J., Gray M., Yue S.T., Haugland R.P., Singer V.L. (2001): Sensitive determination of cell number using the CyQuant cell proliferation assay. *Journal Immunological Methods* 254; 85-98.
36. Jung R. E., Philipp A., Annen B. M., Signorelli L., Thoma D.S., Hämmerle C.H., Attin T., Schmidlin P. (2013): Radiographic evaluation of different techniques for ridge preservation after tooth extraction: a randomized controlled clinical trial. *Journal Clinical Periodontology*. 40(1); 90-98.
37. Klein M., Goetz H., Pazen S., Al-Nawas B., Wagner W., Duschner H. (2009): Pore characteristics of bone substitute materials assessed by microcomputed tomography. *Clinical Oral Implants Research*. 20(1); 67-74.
38. Klein M.O. (2010): Anforderungen an moderne Knochenersatzmaterialien. *Der MKG-Chirurg*. Volume 3, Issue 4 (Springer-Verlag, Heidelberg); 274-281.
39. Kögler G., Sensken S., Wernet P. (2006): Comparative generation and characterization of pluripotent unrestricted somatic stem cells with mesenchymal stem cells from human cord blood. *Experimental Hematology*, 34; 1589-1595.
40. Kögler G., Sensken S., Airey J.A., Trapp T., Müschen M., Feldhahn N., Liedtke S., Sorg R.V., Fischer J., Rosenbaum C., Greschat S., Knipper A., Bender J., Degistirici O., Gao J., Caplan A.I., Colletti E.J., Almeida-Porada G., Müller H.W., Zanjani E., Wernet P. (2004): A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *Journal Experimental Medicine*. 200(2) 123 - 135.
41. Korzeniewski C., Callewaert D. M. (1983): An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. *Journal Immunological Methods*. 25; 64(3); 313-320.

42. Kuberasampath T., Ridge R.J. (1992): Bone Collagen Matrix for Implants. USA Pat. Nr. 5171574.
43. Kühnel W. (2008): Taschenatlas Histologie, 12. Auflage (Thieme-Verlag)
44. Langer R., Vacanti J.P. (1993): Tissue engineering. *Science*, 260(5110); 920-926.
45. Liebich H.G (2003): Funktionelle Histologie der Haussäugetiere, Stuttgart, New York, (Schattauer Verlag).
46. Liu Q., Douglas T., Zamponi, C., Becker S. T., Sherry E., Sivananthan S., Warnke F., Wiltfang J., Warnke P. H. (2011): Comparison of in vitro biocompatibility of NanoBone(®) and BioOss(®) for human osteoblasts. *Clinical Oral Implants Research*, 22(11); 1259-1264.
47. Lones D.B., Nolte H., Scholübbbers JG, Turner E, Veltel D. (1991): Biochemical signal transduction of mechanical strain in osteoblast-like cells. *Biomaterials* 12(2); 101-110.
48. Lüllmann-Rauch R. (2009): Taschenlehrbuch Histologie (Thieme-Verlag).
49. Mastrogiacomo M., Scaglione S., Martinetti R., Dolcini L., Beltrame F., Cancedda R., Quarto R. (2006): Role of scaffold internal structure on in vivo bone formation in macroporous calcium phosphate bioceramics. *Biomaterials*, 27(17); 3230-3237.
50. Meyer U. T., Jones D. B. (1998): Attachment kinetics, proliferation rates and vinculin assembly of bovine osteoblasts cultured on different pre-coated artificial substrates. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine* 9(6); 301–307.
51. Meyer U., Joos U., Wiesmann H. P. (2004): Biological and biophysical principles in extracorporeal bone tissue engineering. Part III, *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 33(7); 635-641.
52. Michels H., Neumann C.L. (2007): Kurzlehrbuch Anatomie (München, Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag)
53. Misch C.E.¹, Dietsch F. (1993): Bone-grafting materials in implant dentistry. *Implant Dentistry*, 2(3); 158-167.
54. Müller-Mai C. (2003): Bioaktive Granulate in der Unfallchirurgie. *Scienec Publishing, München*; 15-16.

55. Naujoks C., Von Beck F.P., Langenbach F., Hentschel M., Berr K., Hofer M., Depprich R., Kübler N., Handschel J. (2013): Biocompatibility of membranes with unrestricted somatic stem cells. *In Vivo*. 27(1); 41-47.
56. Naujoks C., Langenbach F., Berr K., Depprich R., Kübler N., Meyer U., Handschel J., Kögler G. (2011): Biocompatibility of osteogenic predifferentiated human cord blood stem cells with biomaterials and the influence of the biomaterial on the process of differentiation. *Journal of Biomaterials*, 25; 497-512.
57. Nyberg E. , Rindone A. , Dorafshar A. , Grayson W. L. (2017): Comparison of 3D-Printed Poly- ϵ -Caprolactone Scaffolds Functionalized with Tricalcium Phosphate, Hydroxyapatite, Bio-Oss, or Decellularized Bone Matrix. *Tissue Engineering, Part A*, Vol. 23; 11-12.
58. Nkenke E., Weisbach V., Winckler E., Kessler P., Schultze-Mosgau S., Wiltfang J., Neukam F.W. (2004): Morbidity of harvesting of bone grafts from the iliac crest for preprosthetic augmentation procedures: a prospective study. *The International Journal of Oral Maxillofacial Surgery*. 33(2); 157-163.
59. Petrovic L., Schlegel A. K., Schultze-Mosgau S., Wiltfang J. (2006): Different substitute biomaterials as potential scaffolds in tissue engineering. *The International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* 21(2); 225–231.
60. Plessow R. (2004): Entwicklung und Charakterisierung einer Methode zur Untersuchung von Makromolekülen mit Hilfe zeitaufgelöster laserinduzierter Fluoreszenz und Anregungs-Emissionsspektroskopie, (Cuvillier Verlag); 24-26.
61. Pretorius J.A., Melsen B., Nel J.C., Germishuys P.J. (2005): A histomorphometric evaluation of factors influencing the healing of bony defects surrounding implants, *The International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*, 20(3); 387-398.
62. Prymak, O. (2005): Untersuchungen zu Biomaterialien und Biomineralien auf der Basis von Nickel-Titan-Legierungen und Calciumphosphaten. Dissertation, Fachbereich Chemie der Universität Duisburg-Essen.

63. Punke C., Goetz W., Just T., Pau H.-W. (2012): Mastoidhöhlenobliteration mit einem hochporösen Knochenaufbaumaterial (NanoBone®) und Conchaknorpel. *Laryngo-Rhino-Otologie*, 91(09); 566-570.
64. LeGeros R.Z. (1991): *Calcium Phosphates in oral biology and medicine* (Karger, Basel); 1-201.
65. Reddi A.H. (2000): Bone morphogenetic proteins and skeletal development: the kidney-bone connection. *Pediatr. Nephrol.*, 14; 598-601.
66. Rohen J.W., Lütjen-Drecoll E. (2000): *Funktionelle Histologie* (Stuttgart, Schattauer Verlag).
67. Rueger, J.M. (1992): *Knochenersatzmittel* (Springer-Verlag, Berlin).
68. Rueger, J.M. (1998): Bone substitution materials. Current status and prospects. *Orthopadie*, 27(2); 72-79.
69. Ruegsegger P., Koller B., Muller R. (1996): A microtomographic system for the nondestructive evaluation of bone architecture. *Calcified Tissue International*, 58; 24–29.
70. Sasso R.C., LeHuec J.C., Shaffrey C. (2005): Iliac crest bone graft donor site pain after anterior lumbar interbody fusion: a prospective patient satisfaction outcome assessment. *Journal of Spinal Disorders and Techniques*; 77-81.
71. Schmidt-Rohlfing B., Tzioupis C., Menzel S.L., Pape H.C. (2009): *Tissue Engineering von Knochengewebe, Prinzipien und klinische Anwendungsmöglichkeiten*. *Unfallchirurg* (Springer, Medizin Verlag, Berlin); 785-795.
72. Schmitz J.P., Hollinger J.O. (1986): The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, (205); 299-308.
73. Schnettler R., Horas U., Pelinkovic D., Herr G., Aigner T., (2003): Autologous chondrocyte implantation and osteochondral cylinder transplantation in cartilage repair of the knee joint. A prospective, comparative trial. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 85-A (2); 185-192
74. Schnürer S.M., Gopp U., Kühn K.D., Breusch S.J. (2003): Bone substitutes. *Orthopade*, 32; 2-10.

75. Schönberger T.S. (2009): Xenogene Transplantation humaner mesenchymaler Stammzellen zur Knochenregeneration im Critical Size Defect Modell der Schafstibia. Dissertation, Universität Freiburg. urn:nbn:de:bsz:25-opus-73023.
76. Schropp L., Wenzel A., Kostopoulos L., Karring T. (2003): Bone healing and soft tissue contour changes following single-tooth extraction: a clinical and radiographic 12-month prospective study. *International Journal of Periodontics Restorative Dental.*, 23(4); 313-323.
77. Schünke (2000): Funktionelle Anatomie- Topografie und Funktion des Bewegungssystems (Georg Thieme Verlag Stuttgart; New York).
78. Sittinger M. (2001): Tissue Engineering – Hoffnungsträger der regenerativen Medizin. *Laborwelt, Tissue Engineering*; Biocom AG Berlin 12-16.
79. Smeets R., Kolk A. (2016): Osteokonduktive und -induktive Knochenersatzmaterialien, *Zahnheilkunde Management Kultur*. Spitta Verlag, Balingen; 27 (6/2010); 328-340.
80. Spicer P.P., Kretlow J.D., Young S., Jansen J.A., Kasper F.K., Mikos A.G. (2012): Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect, *Nature Protocols*; 1918-1929.
81. Striebel H. M.; Schellenberg P.; Grigaravicius P.; Greulich K. O. (2004): Readout of protein microarrays using intrinsic time resolved UV fluorescence for label-free detection. *Proteomics* 2004, 4 (6); 1703-1711.
82. Takahiro W.N., Masahiro I., Noriyuki K., Toshio A., Hiroki K (2016): High-speed atomic force microscopy reveals strongly polarized movement of clostridial collagenase along collagen fibrils. *Nature Scientific Reports*, Article number: 28975.
83. Tölli H., Kujala S., Jämsä T., Jalovaara P. (2011): Reindeer bone extract can heal the critical-size rat femur defect. *International Orthopedic.*, 35(4); 615-622.
84. Karageorgiou V., Kaplan D. (2005): Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*, Nr. 27; 5474-5491.
85. Vögelin E., Jones N.F., Huang J.I., Brekke J.H., Lieberman J.R. (2005): Healing of a critical-sized defect in the rat femur with use of a vascularized

- periosteal flap, a biodegradable matrix, and bone morphogenetic protein. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 87(6); 1323-1331.
86. Von Arx T., Cochran D.L., Hermann J.S. (2001): Lateral ridge augmentation using different bone fillers and barrier membrane application. A histologic and histomorphometric pilot study in the canine mandible. *Clinical Oral Implants Research*, 12 (3); 260-269.
87. Wintermantel E., Mayer J., Ruffieux K., Bruinink A., Eckert K.L. (1999): Biomaterials, human tolerance and integration. *Chirurg*; 70 (8); 847-857.
88. Wippermann R., Kniesch S. (1994): Zum Einfluss der Präparation und der Applikation von basischen Fibroblastenfaktor (bFGF) auf die Einheilung einer Hydroxylapatitkeramik (HA) in einem Tibiasegmentdefekt beim Schaf: *Osteoporosis International* 2; 136-146.
89. Wolter J.R., Meyer R.F. (1984): Sessile macrophages forming clear endothelium-like membrane on inside of successful keratoprosthesis. *Trans. Am. Ophthalmologic Societies*, 82; 187-202.
90. Wopenka B., Pasteris J. D. (2005): A mineralogical perspective on the apatite in bone. *Materials Science and Engineering: C* 25; 131-143.
91. Würzler K. K. (2004): Aktuelle Aspekte zur Regeneration von Knochengewebe in ausgedehnten Defekten. Habilitationsschrift. Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
92. Xu W., Holzhüter G., Sorg H., Wolter D., Lenz S., Gerber T., Vollmar B. (2009): Early matrix change of a nanostructured bone grafting substitute in the rat. *Journal of Biomedical Materials Research Part B*, 91(2); 692-699.
93. Zhang Y.-Z., Olson N., (1992): New fluorescent probes for long-term tracing of living cells. *FASEB Journal* 6, A1835.
94. Zimmermann G., Moghaddam A. (2011): Allograft bone matrix versus synthetic bone graft substitutes. *Injury* 2011, 42 (2); 16-21.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen besonderen Dank nachstehenden Personen entgegenbringen, ohne deren Mithilfe die Anfertigung dieser Promotionsschrift niemals zustande gekommen wäre:

Mein Dank gilt zunächst meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Dr. Jörg Handschel für die Überlassung des Themas, die Betreuung dieser Arbeit, der freundlichen fachlichen und persönlichen Hilfe. Ich danke Ihnen für das Vertrauen!

Mein außerordentlicher Dank gilt Frau Dr. Karin Berr, ohne deren mühevollen Geduld und liebevolles Verständnis in dieser beschwerlichen Zeit ein solcher Arbeitsumfang niemals hätte gelingen können. Die mehrfache Durchsicht dieser Abhandlung, ihre kritischen Betrachtungen, ihre Ideengebungen, die mir einen kritischen Zugang zu dieser Thematik eröffnete, ihre differenzierten Anmerkungen sowie die mit ihr zweckdienlichen Diskussionen, vor allem aber ihr moralischer Beistand und der menschliche Halt, haben mir Kraft und Mut zur Anfertigung und Vollendung meiner Dissertation gegeben.

Besonders möchte ich an dieser Stelle auch meiner Familie, insbesondere meinem Ehemann und meinen drei tollen Kindern, für die unermüdliche Stärkung und Motivierung und Verständnis danken, sowie für das stets offene Ohr für meine Sorgen und die Zeit, die ihr mir für die Fertigstellung dieser Arbeit gegeben habt. Euch widme ich diese Dissertation!

Auch möchte ich der Firma Geistlich für die Bereitstellung der Materialien danken. Außerdem Herrn Prof. Dr. Hans-Peter Wiesmann vom Institut für Werkstoffwissenschaft in Dresden, sowie allen Beteiligten meiner Studien bin ich sehr dankbar für die gute und zahlreiche Unterstützung sowie die konstruktive und angenehme Zusammenarbeit.