

Aus der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie

Der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.- Prof. Dr. med. J. Windolf

Effekte von Cefuroxim, Rifampicin und Clindamycin auf humane
mesenchymale Stammzellen *in vitro*

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Sarah Jasmin Czerwinski

2024

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Hakan Pilge

Zweitgutachterin: Prof. Dr. med. Maria Grandoch

Ein Gelehrter in seinem Laboratorium ist nicht nur ein Techniker; er steht auch vor den Naturgesetzen wie ein Kind vor der Märchenwelt.

Marie Skłodowska Curie (Physikerin und Chemikerin, 1867- 1934)

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Kubo H, Czerwinski S, Schrumpf H, Bühren B, Prodinger P, Krauspe R, Pilge H. *Rifampicin has - Compared to clindamycin - A dose and time dependent effect on hMSCs during osteogenic differentiation in vitro*. J Orthop. 2021 Jul 9;26:49-53. (1)

Zusammenfassung

Eine der gefürchtetsten Komplikationen in der Endoprothetik ist die periprothetische Infektion. Daher ist der Einsatz von Antibiotika zur Infektionsprophylaxe von großer Bedeutung. In zahlreichen Studien wurden aber auch negative Effekte auf Osteoblasten und deren Vorläuferzellen benannt. Daher wurde in dieser Arbeit der Einfluss von Cefuroxim, Rifampicin und Clindamycin auf die osteogene Differenzierung untersucht. Dazu wurden humane mesenchymale Stammzellen *in vitro* über 7, 14 und 21 Tage mit je drei Konzentrationen (Cefuroxim: 5, 50, 100 µg/ml, Rifampicin sowie Clindamycin: 0,5, 5, 50 µg/ml) und die dazugehörigen Kontrollproben osteogen differenziert. Diese Konzentrationen liegen eng um den klinisch verwendeten Bereich. Untersucht wurde die Proliferation mittels Bromdesoxyuridin, die Genexpression durch eine quantitative real-time reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion, die Mineralisierung mittels Anfärbung der Alkalischen Phosphatase, der Grad der Kalzifizierung durch Alizarin- Rot- Färbung sowie das Migrationspotenzial.

An allen Kinetikpunkten führten die höchsten Konzentrationen von Cefuroxim und Rifampicin zu einer, teilweise signifikant, verminderten Proliferation. Dieser Effekt konnte ebenso nach 7-tägiger Inkubation mit 50 µg/ml Cefuroxim detektiert werden. Die Zugabe von Clindamycin führte zu keinen signifikanten Effekten. Eine signifikant geringere Färbung der Alkalischen Phosphatase wiesen Zellen welche mit 50 µg/ml Rifampicin inkubiert wurden auf. Nach Inkubation mit Cefuroxim und Clindamycin konnten Hinweise auf eine Steigerung der Farbintensität unter Einfluss der zwei niedrigsten Konzentrationen, sowie eine Abnahme bei Zugabe der höchsten Konzentrationen festgestellt werden. Die Kalzifizierung fiel nach 21-tägiger Zugabe von Rifampicin signifikant geringer aus, während die Zugabe der anderen Antibiotika keine Auswirkung hatte. Für einige osteogene Marker konnte gezeigt werden, dass unter Zugabe von 5 µg/ml Cefuroxim eine teilweise signifikant gesteigerte, nach Inkubation mit 100 µg/ml eine verminderte Expression stattgefunden hat. Auch nach Zugabe von Clindamycin wurde teilweise ein signifikant negativer Einfluss auf die Expression einiger osteogener Marker herausgearbeitet. Die Inkubation mit Rifampicin ergab keine Hinweise.

Diese Ergebnisse unterstützen den in vorangegangenen Studien beschriebenen negativen Einfluss von Antibiotika auf die Knochenheilung. In der vorliegenden Studie konnten Indizien gesammelt werden, dass sich die Antibiotika Cefuroxim, Rifampicin und Clindamycin signifikant negativ auf die frühe Phase der Knochenheilung auswirken können. Ob sich diese *in vitro* Ergebnisse im klinischen Alltag wiederfinden, muss durch weitere *in vivo* Experimente und klinisch randomisierte Studien geklärt werden.

Summary

One of the most feared complications in endoprosthetics is the periprosthetic infection. Therefore, the use of antibiotics for infection prophylaxis is of great importance. In numerous studies, however, negative effects on osteoblasts and their progenitor cells have also been mentioned. Therefore, the influence of cefuroxime, rifampicin and clindamycin on osteogenic differentiation was examined in this work. For this purpose, human mesenchymal stem cells were osteogenically differentiated *in vitro* over 7, 14 and 21 days with three concentrations each (cefuroxime: 5, 50, 100 µg/ml, rifampicin and clindamycin: 0.5, 5, 50 µg/ml) and associated control samples. These concentrations are close to the clinically used range. Proliferation was examined using bromodeoxyuridine, gene expression using a quantitative real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction, mineralization using alkaline phosphatase staining, the degree of calcification using alizarin red staining, and the migration potential.

At all kinetic points, the highest concentrations of cefuroxime and rifampicin resulted in reduced proliferation, in some cases significantly. This effect could also be detected after 7 days of incubation with 50 µg/ml cefuroxime. The addition of clindamycin did not lead to any significant effects.

Cells incubated with 50 µg/ml rifampicin showed a significantly lower alkaline phosphatase staining. After incubation with cefuroxime and clindamycin, there was evidence of an increase in color intensity under the influence of the two lowest concentrations, and a decrease under the influence of the highest concentration.

Calcification was significantly less after 21 days of adding rifampicin, while adding the other antibiotics had no effect.

For some osteogenic markers it could be shown that the addition of 5 µg/ml cefuroxime resulted in an in part significantly increased expression and a reduced expression after incubation with 100 µg/ml. Even after the addition of clindamycin, a significant negative influence on the expression of some osteogenic markers was sometimes worked out. Incubation with rifampicin gave no clues.

These results support the negative impact of antibiotics on bone healing described in previous studies. In the present study, evidence was collected that the antibiotics cefuroxime, rifampicin and clindamycin can have a significant negative effect on the early phase of bone healing. Whether these *in vitro* results are reflected in everyday clinical practice must be clarified by further *in vivo* experiments and clinical randomized studies.

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	deutsche Übersetzung	englische Übersetzung
μ	mikro	
Abb.	Abbildung	
ALP/AP	Alkalische Phosphatase	alkaline phosphatase
APC	Allophycocyanin	
Aquadest	Destilliertes Wasser	
B	Blank	
BMP2	Knochenmorphogenetisches Protein 2	bone morphogenic protein 2
BrdU	Bromdesoxyuridin	
Bzw.	beziehungsweise	
° C	Grad Celsius	
C	Clindamycin	
ca.	circa	
Ca ²⁺	freie Kalziumionen	
CD		Cluster of differentiation
cDNA	komplementäre DNA	complementary DNA
Cef	Cefuroxim	
Cl	Clindamycin	
cm ²	Quadratzentimeter	
COL1A1	Kollagen I A1	collagen I A1

CRYAB	Alpha-B-Crystallin	alpha-B-crystallin
Ct		cycle threshold
dif	differenziert	
DMEM	Medium nach Dulbecco und Eagle	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid	
DNA	Desoxyribonukleinsäure	desoxyribonucleic acid
DNase	Desoxyribonuklease	
dNTPs	Desoxyribonukleotid-triphosphat	
dTTP	Desoxythymidintriphosphat	
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	
FBS	Fötale Rinderserum	fetale bovine serum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat	
g	Gramm	
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat- Dehydrogenase	
gDNA	Genomische Desoxyribonukleinsäure	
h	Stunde	hour
H2SO4	Schwefelsäure	
HCL	Chlorwasserstoffsäure	
HKG		Housekeeping Gene

hMSC(s)	Humane mesenchymale Stammzelle(n)	Human mesenchymal stem cell(s)
Ig	Immunglobulin	
Iso	Isotyp	
IGF1	Insulinartiger Wachstumsfaktor 1	
IGF2	Insulinartiger Wachstumsfaktor 2	
K	Kontrolle	
Kg	Kilogramm	
l	Liter	
m	Meter	
M	Marker	
mg	milligramm	
ml	milliliter	
min	Minute	
MK	Mediumkontrolle	
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure	messenger ribonucleic acid
MRSA	Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus	
MTT	Tetrazoliumsalze	
n	Anzahl (der Wiederholungen, Proben, Generationen...)	

N₂	Stickstoff	
NH₄CL	Ammoniumchlorid	
nm	Nanometer	
OCN	Osteocalcin	
OP	Operation	
OPG	Osteoprotegerin	
P	Passage	
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion	
PE	Phcoerythin	
PerCP-Cy5.5	Peridinin Chlorophyll-Cyanin 5.5	
PFA	Phosphatgepufferte Formaldehydlösung	
PSG	Penicillin/Streptomycin/L- Glutamin	
qRT-PCR	Quantitative Reverse Transkriptase - Polymerase Kettenreaktion	quantitative real- time transkriptase polymerase reverse chain reaction
R	Rifampicin	
RANKL		Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand

RDD		Buffer for column digestion of DNA and bound RNA to the column
Rif	Rifampicin	
RNA	Ribonukleinsäure	ribonucleic acid
RNase	Ribonuklease	
RNasin		Recombinant Rnasin Ribonuclease Inhibitor
RPE		Buffer for washing membrane- bound RNA
rpm	Drehungen pro Minute	Round per minute
RT	Reverse Transkriptase	
Runx2		Runt-related transcription factor 2
sRunx2	Sekunde(n)	
SDF-1	stromal cell-derived factor	
s	1 Sekunde(n)	
SEMSDF-1	Standardfehler des Mittelwertsstromal cell-derived factor 1	
t.SEM	Technisches ReplicateStandardfehler des Mittelwerts	
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-amionmethan	

USA

Vereinigte Staaten von Amerika united states of america

z.B.

zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	<i>Infektionen des Knochens und Prophylaxe</i>	<i>1</i>
1.1.1	Gelenkersatz	1
1.1.2	Infektionsprophylaxe durch Antibiotika	1
1.1.3	Infektion und die Bedeutung von Antibiotika	2
1.2	<i>Entwicklung, Forschungsstand: Cefuroxim, Rifampicin und Clindamycin</i>	<i>4</i>
1.2.1	Entwicklung und Eigenschaften von Cefuroxim	4
1.2.2	Wirkungen von Cefuroxim auf den Knochen <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>	4
1.2.3	Entwicklung und Eigenschaften von Rifampicin	5
1.2.4	Wirkungen von Rifampicin auf den Knochen <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>	6
1.2.5	Entwicklung und Eigenschaften von Clindamycin	7
1.2.6	Wirkungen von Clindamycin auf den Knochen <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>	8
1.3	<i>Ziele der Arbeit</i>	<i>10</i>
2	Material und Methoden	12
2.1	<i>Gewinnung der humanen mesenchymalen Stromazellen (hMSC)</i>	<i>12</i>
2.1.1	Patientenkollektiv	12
2.1.2	Operative Beschaffung des Knochenmarks	14
2.2	<i>Isolation und Expansion der humanen mesenchymalen Stromazellen</i>	<i>15</i>
2.2.1	Aufarbeitung von Knochenmark	15
2.2.2	Kryokonservierung	16
2.2.3	Auftauen und Aussaat der Zellen in Passage Null (P0)	17
2.2.4	Passagieren von humanen mesenchymalen Stammzellen	17
2.3	<i>Osteogene Differenzierung</i>	<i>19</i>
2.3.1	MTT	19
2.3.2	Kultivierung über 21 Tage	21
2.3.3	Analyse der Proliferation mittels BrdU	24
2.4	<i>Transkriptionelle Analyse</i>	<i>27</i>
2.4.1	Einleitung	27
2.4.2	RNA- Isolierung und Konzentrationsbestimmung	27
2.4.3	Herstellung der cDNA	29
2.5	<i>Polymerasekettenreaktion</i>	<i>30</i>
2.6	<i>Analyse der Kalzifizierung und Mineralisierung</i>	<i>33</i>
2.6.1	Vorbereitungen der Färbungen	33
2.6.2	Alizarin Rot Färbung	33
2.6.3	Alkalische Phosphatase	35
2.6.4	Mikroskopie und Bildauswertung	35
2.7	<i>Migration</i>	<i>37</i>
2.8	<i>Statistik</i>	<i>39</i>

3	Ergebnisse.....	40
3.1	<i>Auswertung des MTT</i>	40
3.2	<i>Effekte auf die Proliferation</i>	43
3.2.1	Cefuroxim	43
3.2.2	Rifampicin	44
3.2.3	Clindamycin.....	44
3.3	<i>Effekte auf die osteogene Differenzierung/ Färbungen</i>	46
3.3.1	Alkalische Phosphatase	46
3.3.2	Alizarin- Rot	48
3.4	<i>Effekte auf die Expression osteogener Marker</i>	51
3.4.1	CRYAB	51
3.4.2	RUNX2	53
3.4.3	BMP2	55
3.4.4	COL1A1	57
3.4.5	IGF1	59
3.4.6	IGF2	60
3.4.7	OPG	62
3.4.8	OCN.....	63
3.5	<i>Migration</i>	65
4	Diskussion.....	66
4.1	<i>Cefuroxim</i>	66
4.1.1	Migration	67
4.1.2	Proliferation	67
4.1.3	BMP2, RUNX2, Mineralisierung und Kalzifizierung.....	68
4.1.4	IGF1/ 2, OPG.....	71
4.1.5	COL1A1	72
4.1.6	CRYAB	73
4.1.7	Schlussfolgerungen.....	73
4.2	<i>Rifampicin</i>	76
4.2.1	Proliferation	76
4.2.2	Mineralisierung und Kalzifizierung.....	78
4.2.3	Expression osteogener Marker	79
4.2.4	Schlussfolgerungen.....	80
4.3	<i>Clindamycin</i>	81
4.3.1	Proliferation	81
4.3.2	Expression osteogener Marker, Mineralisierung und Kalzifizierung.....	82
4.3.3	Schlussfolgerungen.....	86
4.4	<i>Abschließende Schlussfolgerungen</i>	88
5	Literatur- und Quellenverzeichnis.....	89

1 Einleitung

1.1 Infektionen des Knochens und Prophylaxe

1.1.1 Gelenkersatz

Die totale Gelenkendoprothetik gilt derzeit als effektives Verfahren, um die Lebensqualität von Patienten mit schwerer Arthrose oder Gelenkdestruktion wiederherzustellen oder zu verbessern (2, 3, 4).

Aufgrund des demografischen Wandels ist anzunehmen, dass die Versorgung von Knochenerkrankungen zunehmend relevanter wird und dem Einsatz der Endoprothetik ein rasanter Anstieg bevorsteht, so Del Pozo und Patel (4). Die Zahl der primären totalen Hüft- und Knieendoprothesen stieg schon in den letzten zehn Jahren stetig an. Bis 2030 soll die Zahl der jährlich durchgeführten Hüft- und Kniearthroplastiken in den Vereinigten Staaten von 500.000 auf 700.000 steigen (5).

Love et al. stellen heraus, dass Gelenkendoprothesen die Lebensqualität zwar verbessern können, jedoch die Gefahr eines Prothesenversagens bestehe (6). Ein solches Prothesenversagen, welches beispielsweise im Rahmen von tiefen Infektionen auftreten kann, ist eine der schwerwiegendsten Komplikationen in der orthopädischen Chirurgie (7), da ein chirurgisches Debridement oder eine chirurgische Drainage (4) sowie eine langwierige und intensive Antibiotikatherapie notwendige Folgemaßnahmen sind (8).

1.1.2 Infektionsprophylaxe durch Antibiotika

Vor über 40 Jahren wurde die prophylaktische Antibiotikatherapie erstmals in der Hüftendoprothetik angewendet und ist seitdem fester Bestandteil im Bereich der Gelenkendoprothetik (9, 10, 11, 12). Neben der guten aseptischen Technik und den modernen Verfahren im Operationssaal minimiert die intravenöse Verabreichung von Antibiotika direkt vor der Operation das Infektionsrisiko erheblich (4). Vor der Einführung von standardisierten prophylaktischen Antibiotikatherapien lag die Infektionsrate bei über 5 % (13). Heute trete sie bei 0,8 bis 1,9 % der Kniearthroplastiken (14, 15) und 0,3 bis 1,7 % der Hüftarthroplastiken (15, 16, 17) auf. Bei Revisionsimplantaten liege sie bei 3 bis 5 % (5) bzw. bei 5 bis 10 % (18).

Da während der gesamten Öffnungszeit der Inzision die Gefahr einer bakteriellen Kontamination besteht, muss durch eine optimale Prophylaxe eine Infektion verhindert werden. Dies wird durch ausreichende Konzentrationen eines geeigneten antimikrobiellen Mittels im Serum, Gewebe sowie in der Wunde erreicht (19).

1.1.3 Infektion und die Bedeutung von Antibiotika

Im Falle eines Versagens aller präventiven Maßnahmen zum Schutz vor einer Infektion ist der Einsatz von Antibiotika obligatorisch.

Del Pozo und Patel setzten sich in ihrer Arbeit unter anderem mit der Behandlung einer infektiösen Gelenkentzündung auseinander (4). Im Folgenden wird vor allem auf die Forschungsergebnisse der beiden Autoren Bezug genommen.

Chronische Infektionen erfordern in der Regel eine Resektionsarthroplastik. Eine Resektionsarthroplastik kann entweder in einem einstufigen oder einem zweistufigen Austausch erfolgen. Im einstufigen Austausch erfolgt innerhalb einer Operation die Explantation der infizierten Prothese sowie die Implantation einer Neuen. Bei dem zweistufigen Verfahren wird während des ersten Eingriffs die infizierte Prothese entfernt und systemisch antimikrobielle Mittel verabreicht. Die systemische antimikrobielle Therapie wird dabei nach Del Pozo und Patel oft für 4 bis 6 Wochen durchgeführt (4). In einem zweiten Eingriff, welcher zwischen 6 Wochen und 3 Monaten nach dem ersten Eingriff erfolgt, wird dann die Implantation einer neuen Prothese vorgenommen. Bei beiden Verfahren ist nach ihrer Meinung der Einsatz von Antibiotika zu empfehlen (4).

Aus mehreren Berichten geht hervor, dass die Ergebnisse, sowohl bei einem einstufigen als auch bei einem zweistufigen Verfahren, durch mit antimikrobiellen Mitteln imprägniertes Polymethylmethacrylat verbessert werden können (4, 20, 21). Cabrita et al. wiesen dies in einer randomisierten Studie an Patienten mit einer Hüftendoprothese nach (21). Dort wurden die Ergebnisse einer Behandlung mit einer Verwendung eines mit Vancomycin-beladenen Spacers gegenüber einer Endoprothetik ohne Spacer verglichen. Die Verwendung eines Vancomycin-beladenen Spacers führte zu einer niedrigeren Rate an rezidivierenden Infektionen (11 % vs. 33 %, $p = 0,002$) (21).

Bei Patienten, die sich einer Débridement- Behandlung unter Beibehaltung der Prothese unterziehen, werden häufig 3-monatige Behandlungszyklen für Infektionen im Zusammenhang mit Hüftendoprothesen und 6-monatige Infektionszyklen im Zusammenhang mit Knieprothesen eingesetzt (4). Auch bei Patienten, bei denen eine Operation kontraindiziert ist, könne eine antimikrobielle Suppression in Betracht gezogen werden (4).

Eine verzögerte oder ineffektive Behandlung bringe in Bezug auf Schmerztherapie und Funktionserhaltung ein schlechtes Comeout mit sich und die Notwendigkeit einer erneuten Operation werde wahrscheinlicher (4). Neben den daraus entstehenden Einschränkungen der Patienten ist die Aufenthaltsdauer in klinischer Umgebung laut Gaine et al. mit 19 Tagen signifikant länger als im Mittel 14,6 Tage bei Patienten nach gelungener Arthroplastik (22).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass es von essentieller Bedeutung ist, das Risiko von Gelenkinfektionen gering zu halten. Die Therapie einer Infektion ist kostspielig, langwierig und es können möglicherweise lebenslange Behinderungen aus ihnen resultieren, wie Yates et al. konstatieren (9).

1.2 Entwicklung, Forschungsstand: Cefuroxim, Rifampicin und Clindamycin

1.2.1 Entwicklung und Eigenschaften von Cefuroxim

Im folgenden Abschnitt wird auf den Einsatz des Antibiotikums Cefuroxim im orthopädischen Bereich eingegangen.

Cefuroxim ist ein Antibiotikum aus der Gruppe der Beta- Lactamantibiotika. Es zählt zu den Cephalosporinen der zweiten Generation. Seine bakterizide Wirkung entfaltet es durch die Hemmung eines Enzyms, welches für den Aufbau der Peptidoglycan- Zellwand notwendig ist.

Cefuroxim weist ein breites antimikrobielles Spektrum mit einer Wirksamkeit gegen grampositive und gramnegative Erreger auf (23). Staphylokokken machen etwa 70 % der postoperativen Infektionen in der orthopädischen Chirurgie aus, wobei der führende Organismus Staphylokokkus epidermidis ist (24). Daher ist Cefuroxim aufgrund der ausgezeichneten Wirksamkeit gegen diese Pathogene eines der am häufigsten zur Prophylaxe verwendeten Antibiotika (24, 25, 26). Außerdem besitzt es eine hohe Stabilität gegen Beta-Lactamasen (23) und bietet eine gute Knochenpenetration (25, 27, 28, 29).

Cefuroxim- Natrium wird intravenös verabreicht, wohingegen Cefuroximaxetil oral oder durch einen mit Cefuroxim versetzten Zement gegeben wird. Leigh hat in seiner Studie die Serumkonzentration von Cefuroxim bei 12 Patienten gemessen, die sich einer Knieendoprothetik unterzogen und daraufhin 1,5 g Cefuroxim intravenös verabreicht bekommen haben. Die durchschnittlich gemessene Serumkonzentration von Cefuroxim betrug 112,4 mg/l zum Zeitpunkt der Anwendung des mittleren Oberschenkel- Tourniquets. Die mittlere Femurknochenkonzentration betrug 18,6 mg/kg, während die mittlere Tibiaknochenkonzentration 15,5 mg/kg betrug (29).

1.2.2 Wirkungen von Cefuroxim auf den Knochen *in vivo* und *in vitro*

Die Wirkung von Cefuroxim auf den Knochen ist bislang nur unzureichend erforscht. Wenige Arbeiten bezüglich dieses vermuteten Zusammenhanges geben erste Hinweise auf den Einfluss von Cefuroxim und sollen im Folgenden dargestellt werden.

Salzmann et al. führten eine *in vitro* Studie zur Testung der Wirkung von Cefuroxim auf humane Osteoblasten durch (7). Salzmann et al. verfolgten dabei die Intention, Informationen über die Proliferation, extrazelluläre Matrixverkalkung und den Stoffwechsel der Zellen sowie die Zytotoxizität und Reversibilität des Medikaments zu erfahren (7). Es wurden dazu

Osteoblasten über einen Zeitraum von 24, 48 und 72 Stunden kultiviert und Konzentrationen von 0 bis 1000 µg/ml verwendet. Zur Reversibilitätstestung wurden die Zellen 24 Stunden mit Cefuroxim behandelt und im Anschluss 48 Stunden lang ohne Antibiotikazusatz kultiviert. In der Studie konnte eine zeit- und dosisabhängige Wirkung von Cefuroxim eruiert werden.

Cefuroxim zeigte bei höheren Dosen potenziell toxische Wirkungen. Sowohl Zellproliferation als auch Metabolismus und Verkalkung von Osteoblasten stellten sich als beeinträchtigt dar (7). Salzmann et al. leiten daraus ab, dass Cefuroxim in der lokalen Anwendung in der Endoprothetik die Osteoblastenfunktion und den periprothetischen Knochenstoffwechsel entscheidend beeinträchtigen kann. Als Beispiel für einen solchen Fall nennen die Autoren antibiotikaimprägnierten Knochenzement (7).

In niedrigen therapeutischen Dosen konnte allerdings keine toxische Wirkung festgestellt werden. Dort wiesen die Zellen eine erhöhte metabolische Aktivität und extrazelluläre Matrixverkalkung auf (7).

Natividad- Pedren~o M et al. testeten in einem *in vivo* Modell mit 75 Wistar- Ratten den Effekt von Cefazolin und Cefuroxim auf die Knochenheilung (30). Dazu teilten sie die Ratten in drei Gruppen auf. Je 25 Ratten bildeten dabei eine Placebo-, Cefazolin- sowie eine Cefuroximgruppe. Vier Wochen nach der Fraktur wurden die Ratten getötet und die Femora durch mechanische und histologische Tests analysiert. Es konnte in dem Experiment gezeigt werden, dass die Frakturheilung bei Ratten, welche mit Cefuroxim behandelt wurden, im Vergleich zur Cefazolin- und der Placebogruppe stark gestört war. Daraus leiteten sie ab, dass die Verwendung von Cefuroxim während der Frakturheilung zur Behandlung vermieden werden sollte, sollten die Ergebnisse auch denen des Menschen ähneln (30). Diese Studie war die erste *in vivo* Studie von Cefuroxim am Tiermodell.

1.2.3 Entwicklung und Eigenschaften von Rifampicin

Im Folgenden soll ein Überblick über das Antibiotikum Rifampicin und seinen Einsatz in der Orthopädie gegeben werden.

Rifampicin ist ein bakterizides Antibiotikum aus der Gruppe der Ansamycine. Es entfaltet seine Wirkung durch eine Hemmung der bakteriellen DNA- abhängigen RNA- Polymerase. Durch diese Hemmung wird die Transkription der Bakterien vermindert. Rifampicin hat eine gute bis sehr gute Wirksamkeit gegen viele grampositive, aber auch gegen gramnegative und atypische Bakterien. Es gilt als Reserveantibiotikum.

Einige Artikel befassen sich mit der Verwendung von Rifampicin. Sie arbeiten heraus, dass

Rifampicin aufgrund der Wirksamkeit gegen die Biofilmbildung (31, 32, 33, 34, 35, 36) von Bakterien sowie der bakteriziden Wirkung gegen anhaftende Staphylokokken (37) zur Behandlung von periprothetischen Gelenkinfektionen neben der chirurgischen Behandlung wichtig ist.

Aufgrund des schnellen Auftretens von Resistenzen sollte es jedoch nicht als Monotherapie verabreicht werden (37). Daher ist häufig eine Kombinationstherapie das Mittel der Wahl, wodurch eine orthopädische implantatassoziierte Infektion bei bis zu 80- 90 % aller Fälle verhindert werden kann (32, 37). Eine kleinere randomisierte Studie, welche verschiedene antibiotische Therapien bei Patienten mit Staphylokokkeninfektionen von Knie-, Hüftprothesen oder osteosynthetischen Implantaten untersuchte, beschäftigte sich mit der Wirksamkeit solcher Kombinationstherapien (31). Je 12 Patienten wurden 3 bis 6 Monate lang mit Rifampicin und Ciprofloxacin bzw. einer Monotherapie mit Ciprofloxacin behandelt. Alle 12 Patienten mit Kombinationstherapie erzielten bessere Ergebnisse ($p= 0,02$) (31). Daraus ziehen Zimmerli et al. den Schluss, dass bei Infektionen mit Rifampicin- empfindlichen Staphylokokken neben einem Debridement und einer Retention der Prothese eine Kombinationstherapie mit Rifampicin empfohlen werden kann (31).

1.2.4 Wirkungen von Rifampicin auf den Knochen *in vivo* und *in vitro*

Wie zuvor bereits dargestellt ist Rifampicin ein bedeutendes Medikament zur Behandlung von prothetischen Gelenkinfektionen. Belegt ist die Wirksamkeit der Rifampicin-Kombinationstherapie durch signifikante Ergebnisse zahlreicher Studien.

Drancourt et al. untersuchten in ihrer Studie die Wirksamkeit und Sicherheit der oral verabreichten Kombinationstherapie mit Rifampicin und Ofloxacin zur Behandlung von periprothetischen Infektionen durch *Staphylokokkus aureus* (38). Alle Patienten wurden in Abhängigkeit der Lokalisation der Infektion mit einer Tagesdosis von 900 mg Rifampicin und 600 mg Ofloxacin über einen Zeitraum zwischen 6 und 9 Monaten behandelt. Die Erfolgsrate für Hüftprothesen lag bei 81 %, bei 69 % für Knieprothesen und bei 69 % für Osteosynthesen. Drancourt et al. folgerten daraus, dass eine orale Kombinationstherapie mit Rifampicin und Ofloxacin eine geeignete Alternative zur herkömmlichen intravenösen Langzeittherapie zur Behandlung von periprothetischen Infektionen durch Staphylokokken darstellt (38).

Auch Zimmerli et al. führten eine Studie über die Wirksamkeit von Rifampicinkombinationstherapien durch (31). Untersucht wurden 33 Patienten mit prothetischen Infektionen durch Staphylokokken. Bei der Studie handelte es sich um eine randomisierte, placebokontrollierte Doppelblindstudie, die von 1992 bis 1997 durchgeführt

wurde. Die Patienten bekamen als erste Intervention ein Debridement und eine zweiwöchige intravenöse Gabe von Flucloxacillin oder Vancomycin in Kombination mit Rifampicin. Anschließend bekamen sie eine Ciprofloxacin- Rifampicin- oder Ciprofloxacin- Placebo- Langzeittherapie. Die Infektionen aller Patienten der Ciprofloxacin- Rifampicin- Gruppe konnten geheilt werden, wohingegen nur 58 % der Ciprofloxacin- Placebo- Gruppe erfolgreich geheilt werden konnten ($p= 0,02$) (31).

Darüber hinaus berichten weitere Studien über eine Erfolgsrate von Rifampicin-Kombinationen bei orthopädischen implantat-assoziierten Staphylokokkeninfektionen von 82 % (33) und mit Ofloxacin- Rifampicin- Kombination und ohne Entfernung der Prothese von 62 % (38). Durch die direkte Gegenüberstellung von Studienergebnissen, welche sich mit der herkömmlichen Therapie ohne Entfernung der Prothese beschäftigen, wird deutlich, welche Vorteile aus einer Kombinationstherapie mit Rifampicin resultieren. In den Studien wurden Heilungsraten von 20- 30 % (39, 40, 41) festgestellt.

Allerdings belegen erste *in vitro* Experimente auch negative Effekte von Rifampicin auf Osteoblasten.

In einer *in vitro* Studie wurde die Wirkung verschiedener Konzentrationen von Rifampicin auf die osteogene Differenzierung und Proliferation von mesenchymalen Stammzellen im menschlichen Knochenmark untersucht (42). Dabei wurden Konzentrationen von 0, 4, 8, 16, 32, 64 und 128 mg/ml Rifampicin über 28 Tage verwendet. In der Studie konnte nachgewiesen werden, dass die Proliferation von mesenchymalen Stammzellen bei Konzentrationen von über 32 mg/ml signifikant gehemmt worden ist. Darüber hinaus wurde nach einer 28- tägigen Behandlung mit Rifampicin bei hohen Konzentrationen die Bildung von Calciumknötchen, OPG/ BGP und COL1A1 gehemmt. Ebenso wurde die RNA- Expression von den Genen OPG/ BGP, COL1A1 und ALP nach einer Induktion, sowie die Proteinexpression von RUNX2, COL1A1 und OPG/ BGP signifikant herunterreguliert. Zusammenfassend zeigt Rifampicin bei hohen Konzentrationen negative Auswirkungen auf die Proliferation von MSCs im menschlichen Knochenmark und die Differenzierung von Osteoblasten (42).

1.2.5 Entwicklung und Eigenschaften von Clindamycin

Dieser Abschnitt soll einen kurzen Überblick über das Antibiotikum Clindamycin und sein Einsatzgebiet in der orthopädischen Praxis gewähren.

Clindamycin gehört zur Gruppe der Lincosamid- Antibiotika. Seine Wirkung erreicht es über eine Bindung an die 50s- Untereinheit der prokaryotischen Ribosomen. Diese führt zu einer Hemmung der Proteinsynthese von Bakterien. Aufgrund des ähnlichen Wirkmechanismus wie

durch Makrolide gibt es Kreuzresistenzen.

Clindamycin wird zur präoperativen Prophylaxe vor periprothetischen Infektionen eingesetzt. Bei 30 Patienten, welche einen Tag vor dem Eingriff in achtstündigen Abständen je 300 mg Clindamycin verabreicht bekamen, wurden perioperativ durchschnittliche Serumkonzentrationen von $7,33 \pm 3,37 \mu\text{g/ml}$ erreicht. Im Knochen konnten Konzentrationen von $2,63 \pm 1,76 \mu\text{g/ml}$ gemessen werden (43). Außerdem wird Clindamycin häufig zur Behandlung von Knochen- und Gelenkinfektionen durch Gram-positive Pathogene bei Erwachsenen (44, 45, 46, 47, 48) und bei Kindern (49) eingesetzt. Auch Protheseninfektionen, chronische Osteomyelitis und die Infektionsprophylaxe durch imprägnierten Knochenzement gehören zum Einsatzgebiet von Clindamycin (50).

Viele Autoren haben sich mit dem Wirkspektrum von Clindamycin beschäftigt. Ihnen ist zu entnehmen, dass Clindamycin gegen einige aerobe und anaerobe Gram-positive Erreger wirkt. In Abhängigkeit des Stamms und der verabreichten Konzentration (51, 52) von Clindamycin weist es eine bakterielle und bakterizide Wirkung auf (52, 53).

Clindamycin wird bei Knochen- und Gelenkinfektionen, die durch *Staphylokokkus aureus* verursacht wurden, häufig zusammen mit Rifampicin verabreicht. Curis et al. konnten nachweisen, dass eine Kombinationsbehandlung mit Rifampicin die Talspiegel von Clindamycin signifikant senkt (44). Curis et al. weisen darauf hin, dass aufgrund dessen eine Kombinationstherapie aus Clindamycin und Rifampicin ungeeignet sei. Es bestünde die Gefahr, dass die Konzentrationsspiegel zu niedrig sein könnten (44).

1.2.6 Wirkungen von Clindamycin auf den Knochen *in vivo* und *in vitro*

Die Wirkung von Clindamycin auf den Knochen ist bislang nur unzureichend erforscht. Wenige Arbeiten bezüglich dieser Wirkung geben erste Hinweise auf den Einfluss von Clindamycin und sollen im Folgenden dargestellt werden.

Naal et al. haben in einem *in vitro* Experiment daher das Ziel verfolgt, herauszufinden, welche Wirkung Clindamycin auf Knochenzellen ausübt (50).

Naal et al. testeten verschiedene Konzentrationen von Clindamycin an vier verschiedenen Spendern (50). Die Konzentrationen reichten von 0 bis $500 \mu\text{g/ml}$. Kinetikpunkte setzten sie nach 24, 48 und 72 Stunden. In ihrem Experiment fanden sie heraus, dass die Proliferation der Osteoblasten dosisabhängig signifikant abnahm. Bei der höchsten Dosis von $500 \mu\text{g/ml}$ und nach 72 Stunden wurden nur noch 3,5 % des Proliferationspotentials der Kontrollprobe erreicht. Die ALP-Aktivität stieg bei einer Konzentration von $10 \mu\text{g/ml}$ nach 24 und 48 Stunden

signifikant an, nahm dann aber zeit- und dosisabhängig ab. In ähnlicher Weise konnte dieses Verhalten in Bezug auf die Verkalkung beobachtet werden. Geringere Dosen von 10 und 25 $\mu\text{g/ml}$ führten zu einer Zunahme, während höhere Konzentrationen ab 50 $\mu\text{g/ml}$ eine geringere oder keine Verkalkung mehr aufwiesen. Zusammenfassend ist festzustellen, dass in diesem *in vitro* Experiment erste Hinweise darauf gefunden werden konnten, dass Clindamycin bei niedrigen Konzentrationen den Zellmetabolismus von humanen Osteoblasten stimuliert, höhere Konzentrationen jedoch zytotoxische Effekte aufweisen (50).

1.3 Ziele der Arbeit

Aufgrund des demografischen Wandels nimmt die Zahl der notwendigen Operationen mit endoprothetischem Gelenkersatz stetig zu. Diese Operationen bergen die Gefahr von periprothetischen Infektionen. Zur Prophylaxe sowie zur Therapie von periprothetischen Infektionen und Osteomyelitis gibt es zahlreiche Antibiotika. Cefuroxim und Clindamycin zählen dabei zu den routinemäßig verwendeten Medikamenten. Der Einsatz von Rifampicin wird durch die steigende Resistenzentwicklung von Bakterien immer wichtiger. Die Wirksamkeit der Antibiotika ist vielseitig belegt, Daten zur Auswirkung der Medikamente auf Knochenbildung und Frakturheilung sind jedoch unzureichend beschrieben.

Daher war das Ziel dieser Arbeit, die Einflüsse von den drei Antibiotika Cefuroxim, Rifampicin und Clindamycin auf die osteogene Differenzierung mesenchymaler Stammzellen zu erforschen.

Aufgrund der Ergebnisse von Salzmann et al. kann ein negativer Einfluss von hohen Dosen Cefuroxim auf die Proliferation und extrazelluläre Matrixverkalkung von Osteoblasten unter Cefuroxim vermutet werden (7). Salzmann et al. konnten in ihrem *in vitro* Experiment zeigen, dass hohe Konzentrationen von Cefuroxim einen potenziell toxischen Effekt auf Osteoblasten haben (7). Sie untersuchten dabei lediglich die Funktion der Osteoblasten nach 24, 48 und 72 Stunden. Vor allem bei Komplikationen nach orthopädischen Operationen kann aber eine wochenlange Antibiotikatherapie notwendig sein. Daher wurden die Effekte von Cefuroxim auf Osteoblasten in dieser Arbeit über einen Zeitraum von 21 Tagen beobachtet. Durch diese Herangehensweise wird ein praxisnäheres Ergebnis bezüglich der Effekte von Cefuroxim auf Osteoblasten erwartet. Neben Proliferation und extrazellulärer Matrixverkalkung sollten außerdem Daten über die Mineralisierung, Migration und das Expressionsverhalten von verschiedenen Genen und Oberflächenmolekülen erhoben werden.

Auch die Datenlage bezüglich der Effekte von Rifampicin und Clindamycin auf den Knochenstoffwechsel ist lückenhaft. Ergebnisse von Zhang et al. zeigen eine hemmende Wirkung von Rifampicin auf die Proliferation von mesenchymalen Stammzellen zu Osteoblasten und andere negative Effekte auf Osteoblasten (42). Ebenso stellen erste Arbeiten einen dosisabhängigen Effekt von Clindamycin auf Osteoblasten dar. Dabei wurde der Effekt von Clindamycin allerdings lediglich über einen Zeitraum von maximal 72 Stunden untersucht (50). In der Praxis erfolgt die Gabe von Clindamycin jedoch über Wochen. Das häufige Behandlungsregime beinhaltet nämlich ein chirurgisches Debridement und eine systemische Antibiotikatherapie für mindestens 4- 6 Wochen (47, 54, 55). Aufgrund dieser lückenhaften

Datenlage sollen in der vorliegenden Arbeit die Effekte von Rifampicin und Clindamycin über einen längeren Zeitraum von 21 Tagen untersucht werden und neben Proliferation auch Daten über die extrazelluläre Matrixkalzifizierung, Mineralisierung und erstmals die Expression von verschiedenen Genen unter Rifampicin- und Clindamycintherapie erhoben werden.

Sollten die Ergebnisse dieser Arbeit die negativen Effekte vorheriger Arbeiten bestätigen, sollte der bisherige Einsatz der Antibiotika zur Prophylaxe und Therapie von periprothetischen Gelenkinfektionen differenziert überdacht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Gewinnung der humanen mesenchymalen Stromazellen (hMSC)

2.1.1 Patientenkollektiv

Für diese Studie wurde ein Ethikvotum der Uniklinik Düsseldorf (Nummer: 5039) erteilt. Die verwendeten Materialien entstammen ausschließlich von Patienten, welche vor der zusätzlichen Entnahme des Knochenmarks darüber aufgeklärt wurden und dieser Entnahme schriftlich eingewilligt haben.

Die Anzahl der zur Auswertung verwendeten Spender sowie deren Durchschnittsalter ist der Tabelle 1 zu entnehmen.

Alle Patienten wurden aufgrund einer Coxarthrose operiert.

Tabelle 1: Spenderübersicht

Ver-fahren	Anti-biotikum	Anzahl der Spender	Durchschnitts-alter	Altersspanne	Geschlecht
BrdU	Cefuroxim	6	50,8	17- 66	weiblich 2, männlich 5
	Rifampicin	Tag 7, 14=	46	17- 66	weiblich 1, männlich 4
		5	41	17- 52	weiblich 1, männlich 3
	Clindamycin	Tag 7, 14=	46	17- 66	weiblich 1, männlich 4
		5	41	17- 52	weiblich 1, männlich 3
	ALP-Färbung	Cefuroxim	5	46	17- 66
Rifampicin		3	56	51- 66	weiblich 1, männlich 2
Clindamycin		3	58	51- 66	weiblich 0, männlich 3

Ver-fahren	Anti-biotikum	Anzahl der Spender	Durchschnitts-alter	Altersspanne	Geschlecht
Alizarin-Färbung	Cefuroxim	5	46	17- 66	weiblich 1, männlich 4
	Rifampicin	3	56	51- 66	weiblich 1, männlich 2
	Clindamycin	3	58	51- 57	weiblich 0, männlich 3
PCR	Cefuroxim	BMP2: Tag 7= 6	BMP2: Tag 7 = 47,83	BMP2: Tag 7= 17- 66	BMP2: Tag 7= weiblich 1, männlich 5
		Tag 14= 5	Tag 14= 54	Tag 14= 51- 66	Tag 14= weiblich 1, männlich 4
		Tag 21= 3	Tag 21= 58,33	Tag 21= 52- 66	Tag 21= weiblich 1, männlich 2
		COL1A1, IGF1, IGF2, OCN, RUNX2: Tag 7= 6	COL1A1, IGF1, IGF2, OCN, RUNX2: Tag 7= 47,83	COL1A1, IGF1, IGF2, OCN, RUNX2: Tag 7= 17- 66	COL1A1, IGF1, IGF2, OCN, RUNX2: Tag 7= weiblich 1, männlich 5
		Tag 14= 5	Tag 14= 54	Tag 14= 51- 66	Tag 14= weiblich 1, männlich 4
		Tag 21= 4	Tag 21= 56,5	Tag 21= 51- 66	Tag 21: weiblich 1, männlich 3
		CRYAB: Tag 7= 5	CRYAB: 48,6	CRYAB: 17- 66	CRYAB: Tag 7= weiblich 1, männlich 4
		Tag 14, 21= 4			Tag 14, 21= weiblich 1, männlich 3
		OPG: Tag 7= 6	OPG: Tag 7= 47,83	OPG: Tag 7= 17- 66	OPG: Tag 7= weiblich 1, männlich 5
		Tag 14= 5	Tag 14= 54	Tag 14= 51- 66	Tag 14= weiblich 1, männlich 4

Ver-fahren	Anti-biotikum	Anzahl der Spender	Durchschnitts-alter	Altersspanne	Geschlecht
PCR	Rifampicin	3	58	51- 66	weiblich 0, männlich 3
	Clindamycin	4	55,5	48- 66	weiblich 0, männlich 4
Migra-tion	Cefuroxim	3	37,33	17- 44	weiblich 0, männlich 3

Für die Studie wurde das Knochenmark der sonst routinemäßig verworfenen Hüftköpfe verwendet um hMSCs zu gewinnen. Dadurch war eine Erweiterung des Eingriffes für die Entnahme der hMSCs nicht notwendig.

2.1.2 Operative Beschaffung des Knochenmarks

Alle Patienten haben einen Hüftgelenkersatz durch eine Endoprothese erhalten. Bei dieser Operation wird der Hüftkopf durchtrennt sowie die Hüftpfanne und der innere Femurschaft ausgefräst. Nachdem aus diesem anfallenden Knochenmaterial die festen Bestandteile entfernt wurden, konnten hMSCs isoliert werden.

2.2 Isolation und Expansion der humanen mesenchymalen Stromazellen

2.2.1 Aufarbeitung von Knochenmark

Der erste Schritt der Aufarbeitung von Knochenmark bestand darin, dieses zunächst 1: 1 mit Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS; Sigma- Aldrich, St Louis, USA) zu verdünnen. Daraufhin wurde in einem 50 ml Röhrchen (Greiner *Bio- One* GmbH, Frickenhausen, Deutschland) 15 ml Lymphozyten- Separations- Medium (*PAA Laboratories* GmbH, Cölbe, Deutschland) vorgelegt. Zu diesem wurden dann bis zu 35 ml des Knochenmark- PBS- Ansatzes zugegeben. Die Probe wurde im Folgenden bei 20 °C für 20 Minuten ohne Bremse zentrifugiert (*Centrifuge*, 5810 R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). So teilte sich die Probe in mehrere Phasen auf. Oben befand sich Serum, mittig bildete sich eine Interphase aus mononukleären Zellen und unten sammelten sich Erythrozyten an. Die Zellen der Interphase wurden daraufhin in ein neues 50 ml Röhrchen überführt, das Röhrchen bis zur 50 ml Marke mit PBS aufgefüllt und anschließend für 5 Minuten bei 20 °C zentrifugiert. Anschließend konnte der Überstand dekantiert und das Zellpellet zur Erythrozytenlyse in 10 ml NH₄Cl resuspendiert werden. Anschließend wurde die Reaktion durch die Zugabe von 40 ml PBS gestoppt. Die Probe ist daraufhin erneut für 5 Minuten bei 20 °C zentrifugiert, dekantiert und noch einmal mit 50 ml PBS resuspendiert und zentrifugiert worden. Anschließend wurde der Überstand verworfen. Das entstandene Zellpellet wurde daraufhin in 10 ml Basalmedium (*Dulbecco 's Modified Eagle 's Medium* (DMEM) Sigma-Aldrich, St Louis, USA) resuspendiert. Die Zusammensetzung des Basalmediums ist in Tabelle 2 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 2: Zusammensetzung des Basalmediums

Stoff	Menge	Firma
<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (DMEM) low Glucose	Ad 600 ml	Sigma- Aldrich, St Louis, USA
<i>Fetale Bovine Serum</i> (FBS) Superior	100 ml	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
10.000 Einheiten Penicillin/ 10 mg/ml Streptomycin/ 200 mM L- Glutamin (PSG) in 0,9 % Natriumchlorid Finale Konzentration: Penicillin 100 U/ml, Streptomycin 100 µg/ ml, Glutamin 2 mM)	5 ml	Sigma- Aldrich, St Louis, USA

Zur Zellzählung wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblaulösung (*Trypan Blue Solution*, 0,4 %, Sigma- Aldrich, St Louis, USA) in einem 500 µl Tube (*Eppendorf Tube*, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) resuspendiert. Da der Farbstoff lediglich durch die zerstörte Zellmembran der avitalen Zellen eindringen kann, kann mit dieser Färbung zwischen vitalen und avitalen Zellen unterschieden werden (56). Mithilfe der Neubauerkammer (Marienfeld Superior, Lauda- Königshofen, Deutschland) konnte die Zellzählung dann stattfinden. Dazu wurden 10 µl der Suspension in eine Neubauerkammer überführt und die vier äußeren Quadranten meanderförmig ausgezählt. Anhand der Bildung des Mittelwerts wurde daraufhin die Zellzahl ermittelt und entsprechend kryokonserviert.

2.2.2 Kryokonservierung

Nach der Zellzählung wurden die Zellen in ein Einfriermedium (FBS + 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO; Sigma- Aldrich, St Louis, USA) in Kryo- Rörchen (CRYO.S™, Greiner *Bio- One* GmbH, Frickenhausen, Deutschland) überführt. Dabei wurde darauf geachtet, dass in 1 ml Einfriermedium lediglich bis zu 2×10^6 Zellen aufgenommen und in ein Kryo- Rörchen überführt wurden. Daraufhin wurden sie sofort in einem Kryo- Container bei -80 °C eingefroren. Für die weitere Lagerung mussten die Zellen dann in flüssigen Stickstoff (N₂; MVE Cryosystem 4000) innerhalb von 24 Stunden bis 14 Tagen transferiert werden.

2.2.3 Auftauen und Aussaat der Zellen in Passage Null (P0)

Zunächst wurden die humanen mesenchymalen Stammzellen in Passage Null aufgetaut, indem sie sofort in 50 ml auf 37 °C vorgewärmtes Basalmedium überführt wurden. Diese Zellsuspension im 50 ml Röhrchen wurde dann 5 Minuten lang bei 1800 rpm und 20 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand dekantiert und das Zellpellet mit 10 ml Basalmedium resuspendiert.

Anschließend folgte die Färbung sowie Zellzählung mit Trypanblau und mithilfe der Neubauerkammer. Anhand dieser Zellzahlermittlung erfolgte dann eine Aussaat von ca. 5000 Zellen/cm² in eine T225 Flasche (Greiner *Bio-One* GmbH, Frickenhausen, Deutschland). Die Zellen wurden dabei in ein Basalmedium überführt. Diese Aussaat bildet die erste Passage der Zellen ab, weshalb sie bei diesem Schritt von P0 in P1 überführt wurden.

Nach ca. 24 Stunden wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Dieser ist notwendig um nicht adhärenente Zellen, welche beim Einfrieren und Auftauen verstorben sind, zu verwerfen. Alle 3 Tage wurde das Medium daraufhin erneuert. Bei jedem Mediumwechsel wurde mit dem Lichtmikroskop (*Axiocvert 200*, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) die Adhärenz und Konfluenz der Zellen überprüft. Nach ungefähr einer Woche hatten die Zellen eine ausreichende Konfluenz erreicht und konnten passagiert werden.

2.2.4 Passagieren von humanen mesenchymalen Stammzellen

Zunächst wurde das Medium verworfen und die Zellen mit 30 ml Phosphat- gepufferter Salzlösung gewaschen. Nach diesem Waschschrift wurde auf die Zellen 30 ml der zuvor angesetzten Trypsin- Ethylendiamintetraessigsäure (Trypsin- EDTA 1: 10 mit PBS verdünnt, Sigma Aldrich, St Louis, USA) für 3 Minuten bei 37 °C gegeben. Trypsin spaltet extrazelluläre Proteine, wodurch sich die adhärenente Zellen von dem Boden der Zellkulturflaschen lösen. Nach den drei Minuten wurde die Ablösung der Zellen mit dem Lichtmikroskop kontrolliert. Dabei konnte die Ablösung durch Klopfen gegen die T225 Flasche unterstützt werden. Bei erfolgreicher Ablösung wurde die gleiche Menge Medium hinzugefügt, um die Reaktion zu stoppen und eine Schädigung der Zellen zu verhindern. Die Zellsuspension wurde in mehrere 50 ml Röhrchen überführt. Diese wurden dann für 5 Minuten bei 1800 rpm und 20 °C zentrifugiert. Danach konnte der Überstand verworfen werden und das erste Zellpellet mit 10 ml Medium resuspendiert werden. Diese Zellsuspension wurde dann zum Resuspendieren des nächsten Pellets verwendet. So wurde mit allen weiteren Pellets vorgegangen, bis alle in dem 10 ml Medium gelöst wurden. Je nach Zellzahl wurde das Medium mit weiteren 40 ml zur Vereinfachung der Zellzählung verdünnt. Die Färbung mit Trypanblau und die Zellzählung

mithilfe der Neubauerkammer erfolgten wie zuvor beschrieben.

Nach der Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen in Zellkulturflaschen mit entsprechender Wachstumsoberfläche ausplattiert. Dadurch wurden die Zellen in Passage zwei überführt. Nachdem auch diese ausplattierten Zellen eine ausreichende Konfluenz erreichten, wurden sie ebenso trypsiniert und kryokonserviert.

2.3 Osteogene Differenzierung

2.3.1 MTT

Das Prinzip des MTT- Tests beruht auf der Reduktion des Farbstoffs 3- (4,5- Dimethylthiazol-2- yl) - 2,5- diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in Formazan. Bei dieser Reduktion von einem wasserlöslichen in einen wasserunlöslichen Farbstoff ist ein Farbumschlag von gelb auf violett sichtbar.

Anhand des MTT- Tests können Rückschlüsse auf die metabolische Aktivität der Zellen gezogen werden.

Häufig korreliert die metabolische Aktivität von Zellen mit ihrer Vitalität, weshalb anhand des MTT neben der Toxizität der Medikamente auch die Vitalität der Zellen im Vergleich zur Mediumkontrolle eruiert werden konnte. Diese Informationen waren wichtig, um geeignete Konzentrationen für das weitere Arbeiten finden sowie festlegen zu können.

Für das Antibiotikum Cefuroxim (Cefuroxim 1500 mg, Hikma Pharma GmbH, Gräfelfing, Deutschland) wurden die Konzentrationen 0,5, 5, 50, 100 und 1000 µg/ml getestet. Für Clindamycin (Clindamycin 300 mg/2 ml, Zulassungs- Nummer: 42472.01.00, Hikma Pharma GmbH, Gräfelfing, Deutschland) wurden die Konzentrationen 0,05, 0,5, 5, 50 und 100 µg/ml genutzt. Die Toxizität von Rifampicin (EREMFAT i. v. 600 mg, Zulassungs- Nummer: 3260.01.02, RIEMSER Pharma GmbH, Greifswald- Insel Riems, Deutschland) wurde bei Konzentrationen von 0,05, 0,5, 5, 50, 100 und 1000 µg/ml getestet. Die Auswahl dieser vorläufigen Konzentrationen orientierte sich an der jeweiligen therapeutisch verwendeten Konzentration des Antibiotikums. Zur Durchführung der Toxizitätsprüfung wurden 2000 Zellen/well in einer 96 Well- Platte (Greiner Bio- One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) ausgesät. Jeder Ansatz umfasste je vier Proben von jeder Konzentration, der Mediumkontrolle, einer 1 %igen sowie einer 5 %igen DMSO-Negativkontrolle. Außerdem wurden vier Blanks mitgeführt. Dabei handelt es sich um well, welche mit Medium, aber ohne Zellen gefüllt wurden.

Die Zellen wurden zunächst in ein Basalmedium ausgesät (Tag -3). Nach ungefähr 24 Stunden (Tag -2) erfolgte ein Mediumwechsel, um beim Auf- und Abtauprozess gestorbene Zellen auszuwaschen. An Tag 0 wurden die jeweiligen Proben mit der entsprechenden Konzentration des Antibiotikums bzw. DMSO's versetzt. Außerdem wurde nun ein Medium mit osteogenen

Stimulanzen verwendet.

Die Zusammensetzung des Mediums mit osteogenen Stimulanzen ist in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Ansatz des osteogenen Differenzierungsmediums

Stoff	Menge	Einheit	°C	Firma
DMEM low glucose	38	ml	37	Sigma- Aldrich, St Louis, USA
FBS	10	ml	37	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
PSG	500	µl	37	Sigma- Aldrich, St Loius, USA
Beta- Glycerophosphat (20 mM beta- Glycerophosphat finale Konzentration)	1	ml	20	Sigma- Aldrich, Sigma G-9891, St Loius, USA
Dexamethason 10^{-5M} (100 nM Dexamethason finale Konzentration)	500	µl	4	Sigma- Aldrich, Sigma D-4902, St Loius, USA
Ascorbinsäure- 2- phosphat) 50 µM Ascorbinsäure- 2 phosphat finale Konzentration)	50	µl	20	Sigma- Aldrich, A- 8960, St Loius, USA

Nach einer Kultivierung über weitere 4 Tage wurde dann die Toxizitätsprüfung durchgeführt.

Dazu wurde im Vorfeld 100 mg MTT (Tetrazoliumsalze; Sigma M5655) in 20 ml PBS unter der Bench (Sicherheitswerkbank, Herasafe, Heraeus) gelöst. Dieser MTT- Stock wurde anschließend in 2 ml Aliquots bei -20 °C gelagert.

Initial wurde aus dem 2 ml MTT- Stock durch Zufügen von 18 ml Medium eine MTT- Arbeitslösung hergestellt. Je 200 µl der MTT- Arbeitslösung wurden daraufhin, nachdem das alte Medium dekantiert wurde, in jedes *well* pipettiert. Nach einer Stunde Inkubation im Brutschrank (BINDER CB210, Tuttlingen, Deutschland) erfolgten dann die weiteren Schritte. Zunächst wurde die MTT- Arbeitslösung dekantiert und anschließend 200 µl 2- Propanol (2- Propanol, Zulassungsnummer: STBB7003, Sigma- Aldrich, St Louis, USA) in jedes *well* pipettiert. Durch hoch- und runter pipettieren konnte nun das gebildete Formazan aus den Zellen gelöst werden. Ein Mediumumschlag zum Farbton violett konnte beobachtet werden. Dabei bedeutete eine stärkere Färbung eine geringere Toxizität der getesteten Substanz. Zuletzt wurde

dann die optische Dichte der 96- well- Platte bei 570 nm (*Multimode Plate Reader*, VICTOR C3, PerkinElmer, Waltham, USA) gemessen.

Zur Auswertung wurden die Mittelwerte der technischen Wiederholungen einer jeden Probe gebildet und mit dem Mittelwert der Mediumkontrolle verglichen.

2.3.2 Kultivierung über 21 Tage

Für die Kultivierung über 21 Tage wurde die benötigte Zellzahl mit 10 % Puffer zunächst aufgetaut und in 50 ml 37 °C warmes Medium überführt. Anschließend wurde die Zellsuspension für 5 Minuten bei 18000 rpm und bei 20 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet für die anschließende Zellzählung mit 10 ml Medium resuspendiert.

Nach der Zellzählung wurde die für das jeweilige Experiment notwendige Zellzahl in die entsprechenden Platten ausgesät (Mengen siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Zellzahl für Experimente

Experiment	Tag 7	Tag 14 und d21	Platten	Technisches Replicate	Firma
PCR, ALP- + Alizarin- Färbung	3000 Zellen/c m ²	2000 Zellen/cm ²	6- Well- Platte	2	Greiner <i>Bio- One</i> GmbH, Frickenhausen, Deutschland)
BrdU	3000 Zellen/c m ²	3000 Zellen/cm ²	96- Well- Platte	3	Greiner <i>Bio- One</i> GmbH, Frickenhausen, Deutschland)
FACS	5000 Zellen/c m ²	3000 Zellen/cm ²	T75 Flasche	/	Greiner <i>Bio- One</i> GmbH, Frickenhausen, Deutschland)
Migration	2000 Zellen/c m ²	/	96- Well- Platte	4	Greiner <i>Bio- One</i> GmbH, Frickenhausen, Deutschland)

Bei der Aussaat wurden die mesenchymalen Stammzellen zuerst in Basalmedium ausgesät (Tag -3). Nach ungefähr 24 Stunden wurde der erste Mediumwechsel zum Entfernen toter Zellen getätigt (Tag -2). An Tag 0 konnte dann der eigentliche Versuch mit osteogen stimulierendem Medium und den zu testenden Antibiotika gestartet werden.

Zur Herstellung der verschiedenen Konzentrationen der Antibiotika wurden zunächst *Stock-Lösungen* (A) angesetzt.

Cefuroxim lag in Form von Injektionspulver vor. Es wurden zu 1500 mg Cefuroxim 15 ml Aquadest (*Ampuwa*, Zulassungsnummer: 40676.00.00, FRESENIUS KABI, Bad Homburg, Deutschland) hinzugefügt. Es entstand so eine Konzentration von 100 mg/ml. Die gesamte Lösung wurde in 500 µl Tubes aliquotiert.

Clindamycin lag bereits in gelöster Form vor und konnte direkt aliquotiert werden.

Rifampicin lag in Form von Injektionspulver vor. Es wurde mit Natriumchlorid (Isotone Kochsalzlösung, Natriumchlorid, Zulassungs- Nummer: 6948822.00.00, FRESENIUS KABI; Bad Homburg, Deutschland) gemischt und ebenfalls aliquotiert.

Die Aliquots wurden anschließend zur Lagerung bei -20 °C eingefroren.

Zur besseren Handhabung wurde an den entsprechenden Tagen des Medienwechsels aus den Aliquots mit der *Stock-Lösung* A eine zweite *Stock-Lösung* B hergestellt. Zur Verdünnung wurde bei Cefuroxim sowie Clindamycin Aquadest verwendet, bei Rifampicin Natriumchlorid. Die Zusammensetzung ist den Tabellen 5, 6 und 7 zu entnehmen.

Neben den verschiedenen Konzentrationen wurde eine Kontrolle ohne Zusatz eines Antibiotikums mitgeführt.

Tabelle 5: Ansätze für Cefuroxim

Konzentration in µg/ml	Stock A: 1500 mg/15 ml (100 mg/ml)	Stock B. 1:100 verdünnt
5	/	75
50	7,5	/
100	15	/

Tabelle 6: Ansätze für Rifampicin

Konzentration in $\mu\text{g/ml}$	Stock A: 600 mg/10 ml (60 mg/ml)	Stock B.1: 00 verdünnt
0,5	/	37,5
5	/	375
50	37,5	/

Tabelle 7: Ansätze für Clindamycin

Konzentration in $\mu\text{g/ml}$	Stock A: 150 mg/ml	Stock B. 1:100 verdünnt
0,5	/	4,98
5	/	49,90
50	4,98	/

Um auch das Differenzierungsmedium bei jedem Mediumwechsel einfacher herstellen zu können, wurden Aliquots mit den in der Tabelle 2 stehenden Konzentrationen von Ascorbinsäure- 2- phosphat (Sigma- Aldrich, St Louis USA), Dexamethason (Sigma- Aldrich, St Louis, USA) und Beta- Glycerophosphat (Sigma- Aldrich, St Louis, USA) hergestellt. Diese mussten dann zum Ansetzen des Mediums für osteoblastäre Stimulation lediglich auf Raumtemperatur bzw. 4 °C gebracht werden.

Für die Herstellung der 50 μM Ascorbinsäure- 2- phosphat wurden 72,4 mg Ascorbinsäure- 2- phosphat in 5 ml Aquadest gelöst und steril filtriert (*Steriflip, Vacuum- driven Filtration System*, EMD Millipore Corporation, Billerica, MA 01821 USA). Zum Abwiegen wurde eine Feinwaage (Sartorius, Göttingen, Deutschland) benutzt. Die Aliquots wurden bei -20 °C gelagert.

Zur Herstellung der 100 nM Dexamethason- *Stocklösung* wurden 100 mg in 25,4 ml Ethanol gelöst und steril filtriert. Diese *Stocklösung* kann bei -80 °C gelagert werden. Zur Herstellung der 10 μM Dexamethason- *Gebrauchslösung* mussten 10 μl der *Stocklösung* dann noch mit 10 ml PBS verdünnt werden. (1: 1000 Verdünnung). Diese Lösung wurde dann aliquotiert und bei

-20 °C gelagert.

Zur Herstellung von 1 M Beta- Glycerophosphat wurden 2,16 g Beta- Glycerophosphat in 10 ml PBS gelöst und steril filtriert. Die Aliquots wurden daraufhin bei -20 °C eingefroren.

Die Zellen wurden für 7, 14 oder 21 Tage kultiviert. Ein Mediumwechsel hat zweimal wöchentlich stattgefunden. Medium aus der Vorratsflasche, welches älter als 3 Tage war, wurde entsprechend der verbliebenden Menge erneut PSG zugegeben.

2.3.3 Analyse der Proliferation mittels BrdU

Zur Markierung der Proliferation der hMSCs wurde Bromdesoxyuridin (BrdU) verwendet. Dabei handelt es sich um ein chemisches Analogon des Nukleosids Thymidin bzw. Desoxyuridin. BrdU wird von Zellen aufgenommen. Für diese Bindung ist eine Denaturierung der DNA notwendig, welche mittels Säuren oder Hitze durchgeführt wird. Nach der Bindung wird in der nachfolgenden S- Phase des Zellzyklus in den synthetisierten Dann- Strang BrdU in phosphorylierter Form anstelle von Desoxythymidintriphosphat (dTTP) eingebaut. Bestimmte Antikörper gegen BrdU können diese Bindung immunhistochemisch nachweisen.

An den Tagen 7, 14 und 21 hat eine BrdU zur Ermittlung der Proliferation der Zellen stattgefunden. Dazu wurde ein *Cell Proliferation- Kit (Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric))*, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) verwendet.

Dazu wurde im Vorfeld, wie zuvor beschrieben, eine 96 *well*- Platte benutzt und die entsprechenden Tage kultiviert. An dem jeweiligen Kinetikpunkt wurde zu den 100 µl 10 µl BrdU- Labeling zugegeben und für 24 Stunden inkubiert. Dabei wurde das BrdU- Labeling auf die Mediumkontrolle, die verschiedenen Konzentrationen und *well* ohne Zellen als Blank gegeben. Auf der Platte wurden im Vorfeld außerdem *well* mit Mediumkontrollen vorgesehen, in welche kein Labeling gegeben wird, da diese der Backgroundmessung dienen. Die Aufteilung der Konzentrationen ist der Abbildung 1 zu entnehmen. Außerdem wurde um die zu testenden *well* ein Mediumgraben mit 100 µl Medium/*well* angelegt, um eine Verfälschung der Ergebnisse durch das Austrocknen der Zellen, bedingt durch die Verdunstung des Mediums, zu verhindern. Die Plattenaufteilung ist der Abbildung 1 zu entnehmen.

Nach der 24-stündigen Inkubation des BrdU- Labeling wurde das Medium abgesaugt und 200 µl/*well* FixDenat zugegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Platte ausgeklopft und 100 µl/*well* anti- Brdu- POD- Arbeitslösung zugegeben. Diese Arbeitslösung wurde in der Inkubationszeit angesetzt. Dazu wurden 100 µl Stocklösung mit 10 ml Antibody Disolution verdünnt. Die *Stocklösung* wurde im Vorfeld

angesetzt, indem Anti- BrdU- POD mit 1,1 ml Aquadest 10 Minuten lang gelöst wurde. Daraus wurden 100 µl Aliquots hergestellt, die bei -20°C gelagert wurden und für den oben beschriebenen Ansatz der Arbeitslösung benutzt werden konnten.

Dann wurden die Proben 90 Minuten lang inkubiert. Gegen Ende der Inkubationsdauer konnte bereits der Waschpuffer für den folgenden Schritt angesetzt werden. Dazu wurden 10 ml des Waschpuffers mit 90 ml Aquadest verdünnt. Bei dem folgenden Waschschrift wurden die *well* drei Mal mit je 300 µl/*well* des Waschpuffers gespült. Im Anschluss wurde die Platte erneut ausgeklopft und daraufhin 100 µl/*well* Substrat hinzugegeben. Während der folgenden 15-minütigen Inkubation färbte sich das Substrat cyanblau. Durch das Zugeben der 25 µl/*well* Stopplösung (1 M Schwefelsäure) schlug die Farbe in einen Gelbton um. Je stärker die Proliferation der Zellen war, desto stärker konnte die Färbung schon mit dem menschlichen Auge wahrgenommen werden. Die Stopplösung wurde im Vorfeld angesetzt, indem 1 ml H₂SO₄ auf 10 ml Aquadest gegeben wurden.

Die Platte wurde dann bei 600 rpm für eine Minute inkubiert und anschließend bei 450 nm für 0,1s im VICTOR X3 gemessen.

Die Substanzen des *Proliferations- Assay* wurden bei Raumtemperatur verwendet. Für die Dauer jeder Inkubation wurde die 96- *well*- Platte lichtgeschützt gelagert.

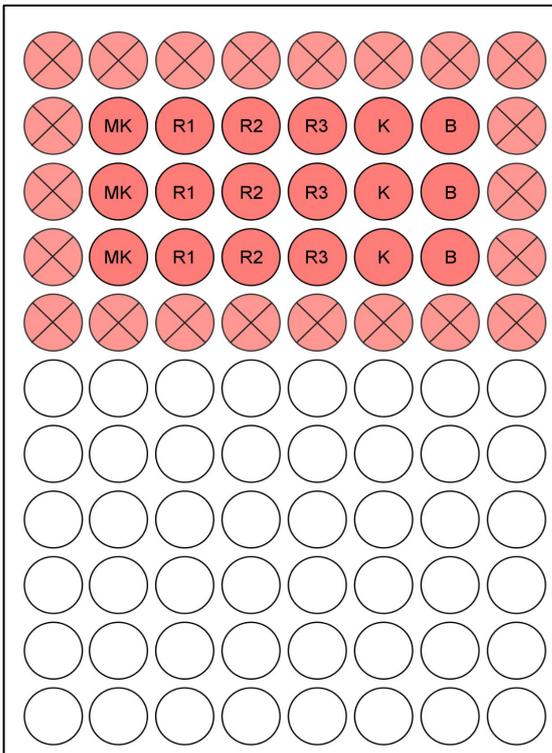


Abb. 1 Plattenaufteilung für die BrdU

Dargestellt ist die Verteilung der verschiedenen Konzentrationen auf einer 96 *well*- Platte anhand des Beispiels von Rifampicin. In Feldern mit Kreuzen wurden keine Zellen ausplattiert. Um eine Beeinflussung der Ergebnisse durch unterschiedliche Füllungen der benachbarten *well* zu verhindern wurden diese *well* dennoch mit gleicher Menge Basalmedium gefüllt. MK = Mediumkontrolle mit Label, R1 = 0,5 µg/ml Rifampicin mit Label, R2 = 5 µg/ml Rifampicin mit Label, R3 = 50 µg/ml Rifampicin mit Label; K = Kontrolle (Zellen, kein Label), B = Blank (keine Zellen, kein Label)

2.4 Transkriptionelle Analyse

2.4.1 Einleitung

Zur Detektion und Amplifikation spezifischer Desoxyribonukleinsäureabschnitte wurde eine Polymerase- Kettenreaktion (PCR = *polymerase chain reaction*) durchgeführt. Da das Ziel dieses Vorgehens in dieser Arbeit eine Quantifizierung der ursprünglich enthaltenen Boten-Ribonukleinsäure (messenger RNA, mRNA) gewesen ist, wurde eine besondere Form der PCR durchgeführt, die quantitative *real-time* Reverse Transkriptase PCR (qRT- PCR). Bei dieser bestimmten Form der PCR werden die Daten der Vervielfältigung bereits während der Reaktion (*real-time*) durch Fluoreszenz- Messungen erhoben. Die Fluoreszenz verhält sich dabei proportional zur Menge der ursprünglich vorhandenen mRNA.

Bei der mRNA handelt es sich um ein Transkript der DNA. Die Aufgabe des Transkriptes bei eukaryontischen Zellen im Zellkern ist es, bestimmte Proteine nach dem Transport ins Zytoplasma zu kodieren. In der hier verwendeten qRT- PCR bilden DNA- abhängige DNA- Polymerasen entsprechend ihrer DNA- Matrize DNA- Stränge. Dazu muss die mRNA nach der Isolierung zuerst durch Reverse Transkriptasen (RT), dabei handelt es sich um RNA- abhängige DNA- Polymerasen, zu einem komplementären Strang (*complementary DNA*, cDNA) transkribiert werden. Die dadurch entstehende cDNA kann dann zur Amplifikation mittels qRT- PCR verwendet werden.

2.4.2 RNA- Isolierung und Konzentrationsbestimmung

Für die RNA- Isolierung wurde das RNeasy Mini- Kit (250) gemeinsam mit dem RNase- freien DNase- Set von der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) genutzt. Dabei wurde nach Herstellerangaben gearbeitet. Beim Arbeiten mit diesen Verfahren bindet die RNA an eine Siliciumdioxidmembran. DNA und andere Zellbestandteile werden in verschiedenen Schritten ausgewaschen und dekantiert. Die RNA wird im letzten Schritt mit RNase freiem Wasser ausgewaschen und aufgefangen.

Vor dem ersten Gebrauch des Kits mussten verschiedene Lösungen zunächst gebrauchsfertig gemacht werden. Dazu wurden 10 ml RLT- Puffer 10 µl beta- Mercaptoethanol hinzugefügt. Außerdem wurde der RPE- Puffer mit 100 %igen Ethanol verdünnt (1: 4).

Nach der Kultivierung der Zellen über 7, 14 und 21 Tage wurde jede Probe nach Dekantieren des Mediums mit 350 µl/well RLT- Puffer- beta- Mercaptoethanol- Gemisch versetzt. Um die Ablösung der RNA bei starker Kalzifizierung zu erleichtern, wurde ein Zellschaber (Cell

Scraper 25 cm, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) benutzt. Die gevortexten (L46 Power Mixer, Labinco BV, Breda, Niederlande) Proben wurden daraufhin für mindestens 24 Stunden bei -80 °C eingefroren.

Bei allen folgenden Arbeitsschritten wurden die Proben in einer Kühlbox gelagert.

Die aufgetaute und gevortexte Probe wurde dann vollständig auf eine QIAshredder- Säule pipettiert und bei 10 °C für 2 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert (MIKRO 22R, Hettich Zentrifugen, Tuttingen, Deutschland). Dadurch findet eine Fragmentierung von DNA im Säulenfilter statt. Dem gereinigten Lysat wurde daraufhin ebenfalls 350 µl 70 %iges Ethanol pro Probe zugefügt. Aufgrund dessen kann RNA im Folgenden an die Siliciumdioxidmembran binden. Um diese Bindung zu erreichen, wird die Probe daraufhin auf eine *RNeasy Säule (RNeasy Mini Spin Column)* pipettiert und anschließend bei 10 °C für 15 Sekunden bei 10.000 rpm zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde der Durchfluss verworfen und die *RNeasy- Säule* in ein neues 2 ml- Sammelgefäß gesetzt. Daraufhin wurden je 350 µl RW1- Buffer auf die *RNeasy- Säulen* pipettiert und anschließend für 15 Sekunden bei 10 °C und 10.000 rpm zentrifugiert. 10 µl DNase I und 70 µl RDD- Buffer wurden gemischt und anschließend auf die Membran pipettiert. Es folgte eine 15-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend wurden wie zuvor noch einmal 350 µl RW1- Buffer auf eine *RNeasy- Säule* pipettiert und daraufhin für 15 Sekunden bei 10 °C und 10.000 rpm zentrifugiert. Durchfluss und Sammelröhrchen wurden verworfen und die *RNeasy- Säule* in ein neues 2 ml- Sammelgefäß gesetzt. Nun wurden 500 µl RPE- Buffer pro *RNeasy- Säule* pipettiert und erneut für 15 Sekunden bei 10 °C und 10.000 rpm zentrifugiert. Durchfluss und Sammelröhrchen wurden verworfen und die *RNeasy- Säulen* auf ein neues 2 ml- Sammelgefäß gesetzt. Dann wurden erneut 500 µl RPE- Buffer auf die *RNeasy- Säulen* pipettiert und nun für 2 Minuten bei 10 °C und 10.000 rpm zentrifugiert. Um den übrigen Puffer von der Membran zu lösen, wurden die Proben nun mit offenen Deckeln bei Raumtemperatur für 5 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. In dieser Wartezeit wurde bereits 1 µl RNasin (*Recombinant Rnasin Ribonuclease Inhibitor*, Promega, Madison, WI, USA) in ein 1,5 ml Tube (*Eppendorf Tube*, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) vorgelegt. Nach Zentrifugation wurde die *RNeasy- Säule* dann auf das 1,5 ml Tube gesetzt. Auf die Membran wurden 50 µl RNase- freies Wasser pipettiert. Abschließend wurden die Proben für 1 Minute bei 10.000 rpm zentrifugiert, wodurch die isolierte RNA ausgewaschen wurde. Die *RNeasy- Säule* konnte verworfen werden.

Mithilfe einer spektroskopischen Messung mittels *NanoDrop 2000* (Peqlab, Erlangen, Deutschland, Software: *Thermo Fisher Scientific Inc. Version 1. 4. 2.*) konnte die Konzentration der RNA bestimmt werden. Dazu wurden 1,5 µl der isolierten RNA auf den *NanoDrop* gegeben.

Die Proben wurden dann in cDNA umgeschrieben und anschließend bei -80 °C gelagert.

2.4.3 Herstellung der cDNA

Für die folgende qRT-PCR werden DNA-abhängige Polymerasen verwendet. Die RNA kann von diesen aber nicht abgelesen werden. Daher ist es nach der RNA-Isolierung notwendig, die die mRNA-Stränge in cDNA umzuschreiben. Um dies zu erreichen, werden Oligo(dt)-Primer verwendet. Die Oligo(dt)-Primer stellen den Startpunkt für die Transkription zur Verfügung, indem sie sich an den poly (A)-Schwanz der mRNA-Stränge anlagern. Die Reverse Transkriptase bildet den cDNA-Strang.

Für die Synthese des cDNA-Stranges wurde das *Quantitect Reverse Transcription Kit* von Qiagen (Hilden, Deutschland) verwendet. Mit einer Pipettiervorlage wurden die zu pipettierenden Volumina ermittelt. Diese sind der Tabelle 8 zu entnehmen. Die Pipettiervorlage errechnet die Zusammensetzung für 14 µl aus 1 µg RNA, 2 µl gDNA Puffer (7x) und RNase freiem Wasser. Die Proben wurden in einen PCR-Streifen mit 8x 0,2 ml (Greiner *Bio-One* GmbH, Frickenhausen, Deutschland; VWR, Radnor, Pennsylvania) pipettiert und nach kurzer Zentrifugation mittels Tischzentrifuge (Galaxy Mini, VWR, Radnor, Pennsylvania) anschließend in den *Mastercycler gradient* (Eppendorf, Wesseling, Deutschland) gegeben und für zwei Minuten bei 42 °C erhitzt. Zuletzt wurden 4 µl Reverse Transkriptase Puffer, 1 µl Reverse Transkriptase sowie 1 µl Reverse Transkriptase Primer pro 0,2 ml Tube hinzugefügt. Nach kurzer Zentrifugation wurden die nun 20 µl für 30 Minuten bei 42 °C erhitzt. Abschließend hat eine Inaktivierung für 3 Minuten bei 95 °C im *Mastercycler gradient* stattgefunden.

Jede der so entstandenen 20 µl cDNA-Proben wurde mit je 210 µl Aquadest in eine 96 Well-Platte zur leichteren Handhabung der nächsten Schritte pipettiert. Diese Proben wurden dann bei -20 °C eingefroren und eingelagert.

2.5 Polymerasekettenreaktion

Bei der Polymerasekettenreaktion soll ein bestimmter DNA- Abschnitt amplifiziert werden. Sie besteht aus den sich wiederholenden Schritten der Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation. Diese drei Schritte finden bei unterschiedlichen Temperaturen statt. Um eine PCR ohne Unterbrechung zu ermöglichen, wurden daher temperaturstabile DNA- Polymerasen verwendet.

Tabelle 8: Pipettiervorlage

Substanzen	Menge	Einheit
RNA	für 1 µg	µl
gDNA-Puffer /x)	2	µl
H2O	entsprechend der Differenz zur Summe	µl
Summe	14	µl

Zur Amplifikation der cDNA wird ein Primer benötigt. Dabei handelt es sich um einen kurzen Abschnitt doppelsträngiger DNA mit einem freien 3'OH- Ende. Dieses Ende bildet den Ansatzpunkt für die DNA- Polymerase und wird deswegen dem Ansatz zugefügt. Dieser Primer lagert sich an die cDNA an (Primerhybridisierung). Durch die Anlagerung von freien Desoxyribonukleotidtriphosphaten (dNTPs) verlängert die DNA- Polymerase den Strang (Elongation). Ein Doppelstrang wird synthetisiert. Der Vorgang wird nach anschließender Denaturierung wiederholt. Durch die Zugabe von je einem *forward* und einem *reverse* Primer wird der zwischen den Primern liegende DNA- Abschnitt verdoppelt.

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Durchführung der qRT- PCR ein *StepOne Real- Times PCR System* unter Nutzung des *SYBR Green PCR Master MIX (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, USA)* verwendet.

In einem 1,5 µl *Eppendorf- Tube (Eppendorf Tube, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)* wurde für jede Probe 12,5 µl *SYBR Green PCR Master Mix* mit 1 µl Primerarbeitslösung vermischt. Die Primer von *Quiagen (Hilden, Deutschland)* konnten direkt verwendet werden. Primer von *Biolegio (Nimwegen, Niederlande)* mussten zunächst gebrauchsfertig gemacht werden. Dazu wurden je 5 µl der Primer *forward* und *reverse* Lösungen mit 40 µl RNase freiem Wasser zusammen pipettiert. Aus dem Mastermix bestehend aus *SYBR Green PCR Master Mix*

und Primerlösung wurden nun pro well der 48- well- Platte (MicroAmp™, Fast optical 48-well- reaction plate (0,1 ml), Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, USA) 13,5 µl benötigt. Dazu wurden 11,5 µl des cDNA- RNase freien Wasser- Ansatzes (Millipore Corporation, Billerica, USA) pipettiert und der Ansatz resuspendiert. Für jeden Primer wurde eine Kontrollmessung ohne cDNA durchgeführt. Eine Liste der verwendeten Primer mit der Beschreibung, für welches Protein dieser Teil der mRNA kodiert ist, ist in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9: Liste der verwendeten Primer

Name	Bedeutung	Forward (5' - 3')	Reverse (3' - 5')
BMP2	<i>Bone morpho- genetic protein II</i>	C AGCCGAGCCAACACTGT	A GGTGATAAACTCCTCCGTGG
COL1A1	<i>Collagen I A 1</i>	Qiagen Hs_COL1A1_1_SG QuantiTect Primer Assay	
CRYAB	<i>Crystallin, alpha B</i>	Hs_CRYAB_1_SG QuantiTect Primer Assay	
GAPDH	<i>HKG Glyceral- dehyde-3- phosphate dehydro-genase</i>	GAAGGCTGGGGCTCATTG	CAGGAGGCATTGCTGATGATC
IGF1	<i>Insulin- like growth factor 1</i>	TGTCCTCCTCGCATCTCTTCT	CGCAATACATCTCCAGCCTCC
IGF2	<i>Insulin- like growth factor 2</i>	Qiagen Hs_IGF2_1_SG QuantiTect Primer Assay	
OCN	<i>Osteocalcin / bone gamma- carboxy- glutamate (gla) protein (BGLAP)</i>	GAGCCCTCACACTCCTCG	TCAGCCAACTCGTCACAGT
OPG	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b, osteo-protegerin	GTACGTCAAGCAGGAGTGCA A	GCAAACGTATTTCGCTCTGGG
RUNX2	<i>Runt- related transcription factor 2</i>	AGTGGACGAGGCAAGAGTTT	AAGGAGCCCATTAGTGCTTGTA

Das Cycler- Programm startete mit einer initialen 10-minütigen Denaturierung bei 90 °C. Daraufhin folgten 40 Zyklen bei 95 °C für je 15 Sekunden sowie bei 60 °C für je 1 Minute. Eine Schmelzkurve wurde durch die Messung der Fluoreszenzstärke des *SYBR- Green* während einer Erhöhung der Temperatur von 60 °C auf 95 °C erstellt. Dabei erfolgte die Temperaturerhöhung in 0,5 °C Schritten. Sie wurde zur Beurteilung der Qualität der vervielfältigten DNA erstellt. Mit Hilfe der *Step- One-* Software wurden nun die C_t - Werte (cycle threshold, Schwellenwert- Zyklus) bestimmt. Der C_t - Wert gibt Auskunft über die Anzahl der Zyklen, die benötigt werden, damit das Fluoreszenzsignal des *SYBR- Green* über einen definierten Fluoreszenzwert steigt. Das Signal kommt dabei durch die Bindung an doppelsträngige DNA zustande. Je mehr doppelsträngige DNA in der Probe vorhanden ist, desto schneller kommt es zur Überschreitung des Schwellenwertes. Anschließend wurden die C_t - Werte der verschiedenen Proben mit denen der *Housekeeping- Gene* (HKG) verglichen (ΔC_t -Wert). In dieser Arbeit wurde dazu GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) verwendet. Aufgrund dieses Vorgehens konnten technische Fehler, die sowohl Zielgen als auch HKG betreffen, verhindert werden, da HKG ubiquitär und homogen exprimiert werden. Unterschiede im Expressionslevel zwischen den einzelnen Proben wurden anschließend zur Bestimmung der relativen Genexpression mit Hilfe der $\Delta\Delta C_t$ -Methode bestimmt.

2.6 Analyse der Kalzifizierung und Mineralisierung

2.6.1 Vorbereitungen der Färbungen

Die Zellen für die Färbung wurden in 6- *well*- Platten entsprechend der Abbildung 2 ausplattiert. Die Zellzahl bei Aussaat ist der Tabelle 3 zu entnehmen.

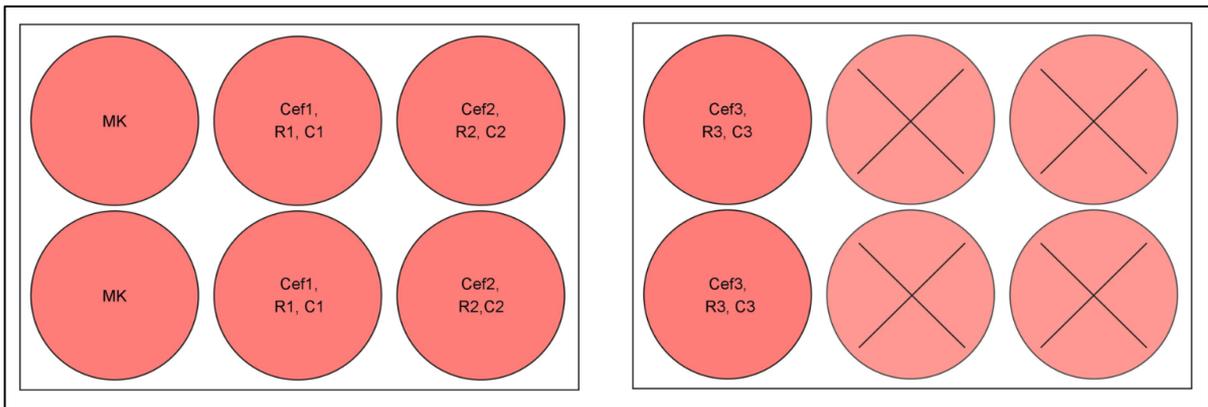


Abb. 2: Aufteilung der 6- well Platten

Dargestellt ist die Verteilung der verschiedenen Konzentrationen auf einer 6 *well*- Platte. In Feldern mit Kreuzen wurden keine Zellen ausplattiert. Um eine Beeinflussung der Ergebnisse durch unterschiedliche Füllungen der benachbarten *well* zu verhindern, wurden diese *well* mit der gleichen Menge Basalmedium gefüllt.

MK = Mediumkontrolle; Cef1 = 5 µg/ml, Cef2 = 50 µg/ml, Cef3 = 100 µg/ml Cefuroxim;

R1 = 0,5 µg/ml, R2 = 5 µg/ml, R3 = 50 µg/ml Rifampicin;

C1 = 0,5 µg/ml, C2 = 5 µg/ml, C3 = 50 µg/ml Cindamycin

2.6.2 Alizarin Rot Färbung

Alizarinrot S ist ein Farbstoff der Anthrachinonfarbstoffe.

Durch Chelation lagert sich Alizarinrot S an Calcium an, wodurch Alizarinrot S- Calcium gebildet wird. Dies ist in der Mikroskopie aber auch bereits durch das menschliche Auge als rote Färbung zu sehen (57).

Für die Darstellung der Kalzifizierung wurden die hMSC mit Alizarin- Rot angefärbt.

Nach der Kultivierungszeit von 7, 14 und 21 Tagen war das Dekantieren des Zellüberstandes obligatorisch. Anschließend wurde jedes *well* zweimal mit TRIS- Puffer (100 mM TRIS- Puffer pH 8) gewaschen. Zur Herstellung des TRIS- Puffers wurde TRIS-Base (Sigma- Aldrich, St Louis, USA) in Aquadest gelöst und anschließend mit Chlorwasserstoff auf einen pH von 8

eingestellt.

Die Menge des TRIS- Puffers wurde so gewählt, dass die Zellen im *well* gut bedeckt waren. Anschließend wurden die Zellen unter einem Abzug mit 4% PFA (Roti- Histofix 4%, säurefreie (pH 7) -phosphatgepufferte Formaldehydlösung 4 %, Zulassungsnummer: 287260577, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) gut bedeckt und für 5 Minuten fixiert. Im Folgenden wurden die Zellen zweimal mit Aquadest gewaschen und daraufhin erneut für zwei Minuten mit TRIS- Puffer inkubiert. Nun wurden 1,5 ml/*well* der Alizarin- Lösung (1 % Alizarin- Rot- S, pH 4,1, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland, Sigma A- 5533 Alizarin Red S, Zulassungsnummer: MKBS9114V) für 5 Minuten auf die Zellen gegeben. Dabei wurden die Zellen zur gleichmäßigeren Verteilung der Lösung auf einen Orbitalschüttler (3017, GFL Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland) bei 600 rpm gestellt.

Die Alizarin- Lösung wurde im Vorfeld angesetzt. Dazu wurden 2 g Alizarin- Rot (Alizarin Red S, Zulassungsnummer: MKBS9114V) in 200 ml Aquadest bei 50 °C gelöst. Diese Lösung wurde nach dem Abkühlen filtriert und anschließend 120 µl 25 %ige HCL (Chlorwasserstoffsäure 25 %, Zulassungsnummer: Z581916, MERCK, Darmstadt, Deutschland) zugegeben. Nach den 5 Minuten Inkubation auf dem Schüttler (GFL, 3017, Burgwedel, Deutschland) bei 60- 65 rpm wurde jedes *well* mit Aquadest gewaschen. Kalzifizierte Zellen bleiben bei diesem Waschvorgang rot angefärbt, da der Farbstoff Kalzium bindet.

Zu viele Waschvorgänge führten zum vollständigen Abwaschen der sich leicht ablösenden Zellen, zu vorsichtiges Abwaschen zu überschüssiger Farbe. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde beschlossen, jedes Well zweimal zu waschen, um vergleichbare Ergebnisse zu generieren.

Anschließend wurde jedes Well zur Lagerungsmöglichkeit mit 1,5 ml/*well* Glycerin- Gelatine (Gelatine, Platin, reinst, 240 Bloom, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) beschichtet.

2.6.3 Alkalische Phosphatase

Die Alkalische Phosphatase wird in der Humanmedizin unter anderem als Indikator für Stoffwechselveränderungen im Knochen verwendet.

Bei der Alkalischen Phosphatase handelt es sich um eine Hydrolase, welche Dephosphorylierungen durchführt. Dabei wird die Phosphatgruppe der hMSCs abgespalten und es entsteht ein blaues Endprodukt.

Um AP- aktive Zellen darzustellen wurde das *Vector Blue Alkaline Phosphatase Substrate Kit* (Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA) genutzt.

Die Schritte von der Kultivierung über 7, 14 und 21 Tage bis zur zweiminütigen Inkubation mit TRIS- Puffer sind identisch mit dem Vorgehen der Alizarin- Rot- Färbung (siehe 2. 6. 1.).

Anschließend wurden die Zellen mit 1,5 ml/*well* der Alkalischen Phosphatase angefärbt.

Die Alkalische Phosphatase- Lösung wurde zuvor angesetzt. Dazu wurden auf 5 ml TRIS- Puffer (100 mM TRIS pH 8) je 2 Tropfen von Lösung 1, 2 und 3 gegeben. Nach der Zugabe jedes Reagenz des Kits wurde die Färbelösung durch Vortexen gemischt.

Die mit der Alkalischen Phosphatase- Lösung bedeckten Zellen wurden dann für 10 Minuten auf dem Schüttler bei 60- 65 rpm inkubiert und anschließend mit TRIS gewaschen und mit 1,5 ml/*well* Gelatine bedeckt.

2.6.4 Mikroskopie und Bildauswertung

Die gefärbten Zellen wurden mit einem Stereomikroskop (SteREO Discovery, V8) mit einem Achromat S 0,3 x FWD 236 mm Objektiv fotografiert. Es wurde dabei die Axio Vision Software Version 4. 8. 1. verwendet (Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland).

Dabei wurde für die Färbung mit Alizarin- Rot eine Belichtung von 55 sowie für die Färbung mit der Alkalischen Phosphatase eine Belichtung von 54 ausgewählt. Um eine subjektive Beeinflussung der Präsentation der Färbungen zu verhindern, wurde nicht nur ein kleiner Ausschnitt jedes Wells für das Foto gewählt, sondern ein möglichst großer Bereich jedes Wells. Dieses Vorgehen stellt Abbildung 3 dar und wurde bei jeder Färbung gleich gehandhabt.

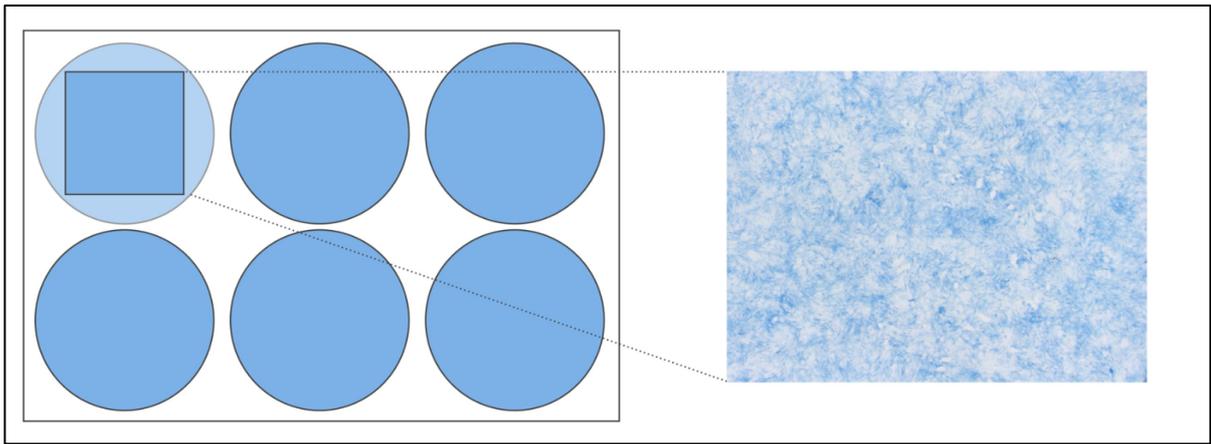


Abb. 3: Vorgehen der Fotodokumentation

Dargestellt ist das Vorgehen der Fotodokumentation an einem Beispiel einer Färbung der alkalischen Phosphatase. Der Bereich in jedem *well* wurde so ausgewählt, dass die Ecken des Fotos den Rand des *well* beinahe berühren. So wurde die Objektivität der Aufnahme gewährleistet und es konnte vermieden werden, dass die Daten durch einen kleinen, subjektiv gewählten Bereich manipuliert werden.

Zur Auswertung der verschiedenen Intensitäten wurden die Fotos verblindet und von 15 Probanden auf einer Skala von 1- 5 (sehr schwach- sehr stark) beurteilt. Aus diesen Angaben wurden Mittelwerte gebildet, welche zur statistischen Auswertung dienten.

2.7 Migration

Zur Analyse des Migrationsverhaltens der Zellen unter Einfluss der entsprechenden Konzentrationen der Antibiotika wurde von den T75 Flaschen für die Fluoreszenzzytometrische Immunphänotypisierung pro Konzentration $0,1 \times 10^6$ der überzähligen Zellen benutzt. Die benötigte Menge an Zellen wurde in 500 μl mit 1% PSG versetztes Medium pipettiert. Diese Zellsuspension wurde in eine zuvor mit Filtern (TC- Insert, Pore 8,0 μm , PET, translucent, SARSTEDT AG & Co., Nürnberg, Deutschland) versehene 12 *well*- Platte Greiner *Bio- One* GmbH, Frickenhausen, Deutschland) pipettiert. An die Außenseite des Filters wurden 1,5 μl Medium pipettiert. Dieses Medium wurde zuvor mit 4 % PSG, 10 % FBS angereichert. In jedes so ausgestattete *well* wurde anschließend noch 1,5 μl SDF1alpha pipettiert. FBS und SDF1alpha im äußeren Medium dienen dabei als anlockende Substanzen zur Passage des Filters (siehe Abbildung 4). Anschließend wurden die Zellen für 22 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Nach der Inkubation wurde das alte Medium verworfen und jedes *well* mit 1,5 μl PBS gewaschen. Alle Substanzen nach der Inkubation wurden außerhalb des Filters direkt in das *well* gegeben. Nach dem Verwerfen des PBS wurde das *well* mit 1,5 μl Trypsin- EDTA für 3 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die gleiche Menge Medium zum Abstoppen des Ablösevorgangs hinzugegeben. Die Zellsuspension wurde daraufhin für eine anschließende Färbung mit Trypanblau zur Zellzählung mithilfe der Neubauerkammer in 15 ml Röhren überführt. Mit dem Zellschaber wurden auch die Zellen an der Unterseite des Filters gelöst.

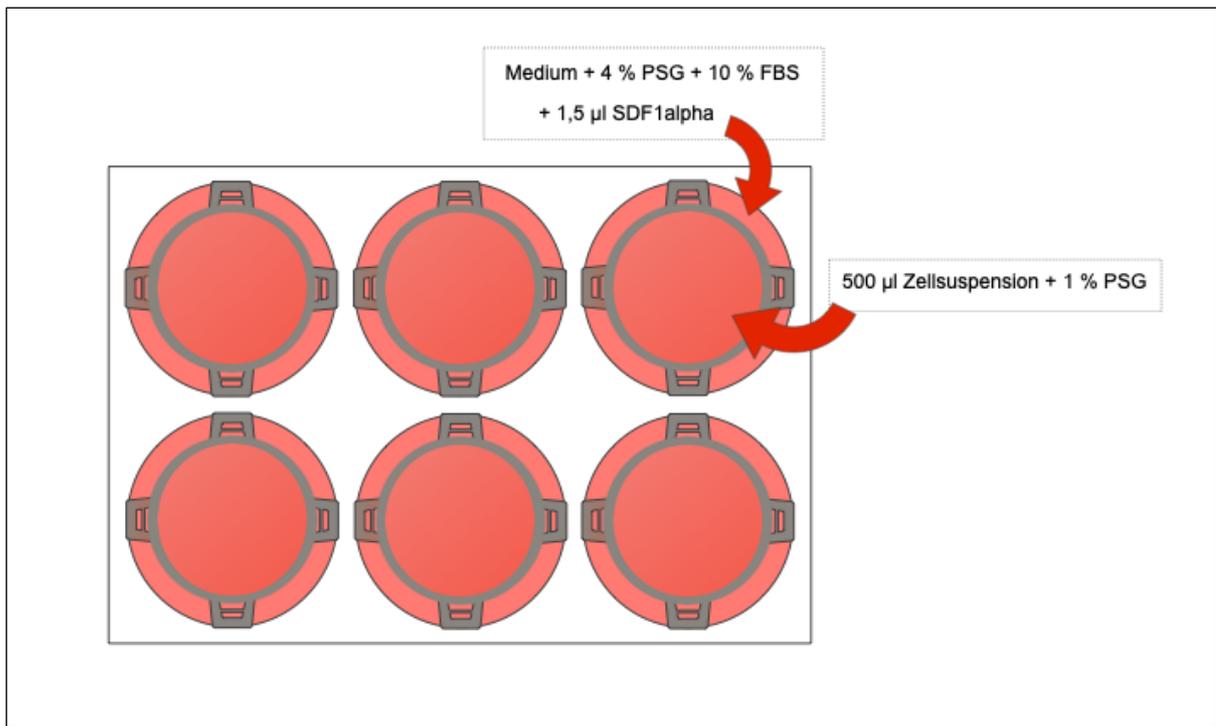


Abb. 4: Migrationsansatz

Dargestellt ist der Versuchsaufbau für die Migrationstestung. Pro *well* werden 1,5 ml Medium (4 % PSG, 10 % FBS) und 1,5 µl SDF1alpha hinzugegeben. In jeden Filter werden 500 µl Zellsuspension mit 1 % PSG pipettiert.

2.8 Statistik

Die statistische Analyse wurde unter Verwendung von GraphPad Prism (Version 7,03, GraphPad Software Inc., San Diego, Kalifornien) durchgeführt. Alle Werte werden als Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben. Statistische Unterschiede zwischen Gruppen, die mit Cefuroxim, Rifampicin und Clindamycin behandelt wurden sowie unbehandelten Kontrollen wurden unter Verwendung des Student- *t*- Tests analysiert. Ein *p*-Wert <0,05 wurde als signifikant angesehen. Sternchen werden verwendet, um das Signifikanzniveau in den Figuren zu zeigen (* *p* <0,05, ** *p* <0,01 und *** *p* <0,001).

3 Ergebnisse

3.1 Auswertung des MTT

Eine Testung des Metabolismus der Zellen wurde durchgeführt, um Rückschlüsse auf die Toxizität der Medikamente und die daraus resultierende Vitalität der Zellen zu schließen. Außerdem sollten anhand dieser Ergebnisse geeignete Konzentrationen für die weiteren Experimente gefunden werden.

Die Ergebnisse des MTT sind den Tabellen 10 bis 12 zu entnehmen.

Zur einfacheren Darstellung wurden die Messergebnisse der optischen Dichte der Mediumkontrollen auf 100 % gesetzt. Verglichen wurde jede Probe mit Bezug zur Mediumkontrolle.

Alle Toxizitätstestungen konnten zur Auswertung verwertet werden. Die DMSO-Kontrollen zeigten wie erwartet eine Abnahme der Zellvitalität bei steigender DMSO-Konzentration. Auch die Blank- Kontrolle ohne Zellen war negativ.

Die Ergebnisse des MTT wiesen für das Antibiotikum Cefuroxim einen leichten Anstieg der Vitalität bei Zugabe von 0,5, 5, 50 und 100 µg/ml Cefuroxim zu den Zellen im Vergleich zur Mediumkontrolle auf. Erst ab einer Konzentration von 1000 µg/ml nahm die Vitalität der Zellen auf 72 % im Vergleich zur Mediumkontrolle ab. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die Konzentrationen 5, 50 und 100 µg/ml für weitere Versuche ausgewählt. Die Konzentrationen liegen eng um den klinisch verwendeten Bereich. In einer vorangegangenen Studie konnte nachgewiesen werden, dass nach intravenöser Verabreichung von 1,5 g Cefuroxim die durchschnittlich gemessene Serumkonzentration 112,4 mg/l, die Femurknochenkonzentration 18,6 mg/kg und die mittlere Tibiaknochenkonzentration bei 15,5 mg/kg beträgt (29).

Die Ergebnisse des MTT von behandelten Zellen mit Rifampicin sind der Tabelle Nr. 16 zu entnehmen. Es konnte erhoben werden, dass Rifampicin bei den Konzentrationen von 0,05, 0,5 und 5 µg/ml keinen tatsächlichen Einfluss auf die Vitalität der Zellen hat. Ab der getesteten Konzentration von 50 µg/ml nahm die Vitalität der Zellen dann stetig und stark ab. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die Konzentrationen 0,5, 5 und 50 µg/ml für weitere Versuche ausgewählt. Die Konzentrationen liegen eng um den klinisch verwendeten Bereich. In einer Studie konnte nachgewiesen werden, dass nach oraler Applikation von 600 mg Rifampicin alle 12 Stunden Serumkonzentrationen von 10- 15 µg/ml erreicht werden (58). Die Konzentration von Rifampicin im Knochen lag nach einer Kurzinfusion, gefolgt von einer langsamen Infusion

mit 300 mg Rifampicin zwischen 1,4 und 8,8 µg/g (59).

Die Ergebnisse des MTT der Zellen welche mit Clindamycin behandelt und kultiviert wurden sind der Tabelle Nr. 17 zu entnehmen. Es konnte kein Einfluss von Clindamycin auf die Vitalität der Zellen festgestellt werden. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die Konzentrationen 0,5, 5 und 50 µg/ml für weitere Versuche ausgewählt. Die Konzentrationen liegen eng um den klinisch verwendeten Bereich. Es konnte eruiert werden, dass perioperativ durchschnittliche Serumkonzentrationen von 7,33 +/- 3,37 µg/ml erreicht werden können, wenn Patienten einen Tag präoperativ 300 mg Clindamycin alle acht Stunden verabreicht bekommen haben. Im Knochen konnten Konzentrationen von 2,63 +/- 1,76 µg/ml gemessen werden (43).

Tabelle 10: MTT von Cefuroxim

	Medium- kontrolle	DMSO 1 %	DMSO 2 %	0,5	5	50	100	1000
n1 t.	100	94	68	117	102	100	102	73
n2 t.	100	93	69	98	109	109	117	67
n3 t.	100	97	62	109	110	110	102	70
n4 t.	100	93	59	104	98	110	118	78
Mittelwert	100			107	105	107	110	72

Normierte Ergebnisse der Vitalitätstestung von Cefuroxim

Tabelle 11: MTT von Rifampicin

	Medium- kontrolle	DMSO 1 %	DMSO 2 %	0,05	0,5	5	50	100	1000
n1 t.	100	88	70	97	92	92	77	65	69
n2 t.	100	83	70	112	100	90	80	73	62
n3 t.	100	89	62	97	101	101	93	81	61
n4 t.	100	82	62	108	114	112	82	75	68
Mittelwert	100			104	102	99	83	73	65

Normierte Ergebnisse der Vitalitätstestung von Rifampicin

Tabelle 12: MTT von Clindamycin

	Medium- kontrolle	DMSO 1 %	DMSO 2 %	0,05	0,5	5	50	100
n1 t.	100	85	56	95	96		106	98
n2 t.	100	88	51	90	98		100	93
n3 t.	100	86	54	109	102		94	94
n4 t.	100	84	69	106	91		94	95
Mittelwert	100			100	97		98	95

Normierte Ergebnisse der Vitalitätstestung von Clindamycin

3.2 Effekte auf die Proliferation

Die Proliferation wurde mittels BrdU bestimmt. Generiert wurde durch diese Messungen die optische Dichte jeder einzelnen Probe. Die Ergebnisse sind der Abbildung 5 zu entnehmen.

Insgesamt konnte bei allen Proben Antibiotika unabhängig voneinander nachgewiesen werden, dass die Proliferation vor allem an Tag 7 stattgefunden hat und danach zeitabhängig geringer wurde. Dies ist bedingt durch die dann dominierende Kalzifizierung und Mineralisierung (60).

Die Daten zur Ermittlung der Proliferation von Cefuroxim wurden durch die Testung von sechs verschiedenen Spendern mit einem Durchschnittsalter von 50,8 Jahren (17- 66 Jahre) generiert und an den Tagen 7, 14 und 21 gewonnen.

Die Messungen von Rifampicin und Clindamycin wurden an den Kinetikpunkten 7 und 14 mithilfe von fünf Spendern mit einem Durchschnittsalter von 46 Jahren (17- 66 Jahre) durchgeführt. An Tag 21 wurden die Daten von 4 Spendern mit einem Durchschnittsalter von 41 Jahren (17- 52 Jahre) verwendet. Cefuroxim zeigte zu allen Zeitpunkten einen dosisabhängigen Effekt auf die Proliferation.

3.2.1 Cefuroxim

An Tag 7 konnte dargestellt werden, dass die Konzentration 5 µg/ml keinen signifikanten Effekt auf die Proliferation hat. Es konnte lediglich eine Tendenz für einen proliferationsfördernden Effekt nachgewiesen werden. Die Konzentrationen 50 und 100 µg/ml präsentierten sich an Tag 7 mit einer signifikant geringeren optischen Dichte und somit einer signifikant geringeren Proliferation in Bezug auf die Mediumkontrolle. Im Vergleich zum empirischen Mittelwert der Mediumkontrolle von 2,325 (+/- SEM 0,1621), lag er bei der Konzentration 50 µg/ml bei 1,852 (+/- SEM 0,0813, $p = 0,0261$) und bei 100 µg/ml 1,057 (+/- SEM 0,09669, $p < 0,0001$).

An Tag 14 stellte sich eine ähnliche Wirkung von Cefuroxim auf die Proliferation im Vergleich zur Mediumkontrolle wie an Tag 7 dar. Die geringste Konzentration von 5 µg/ml zeigte nur Hinweise für einen sehr geringen positiven Einfluss auf die Proliferation im Vergleich zur Kontrolle. Die Konzentration von 50 µg/ml hatte einen leicht negativen Einfluss und der Zusatz von 100 µg/ml Cefuroxim sogar einen signifikant negativen Einfluss auf die Proliferation. Die empirischen Mittelwerte lagen bei der Mediumkontrolle bei 1,99 (+/- SEM 0,0813) und bei 100 µg/ml bei 1,309 (+/- SEM 0,1394, $p = 0,0314$).

An Tag 21 zeigten alle Konzentrationen Hinweise für eine geringere Proliferation als die Kontrolle. Ein signifikanter Effekt auf die Proliferation konnte bei der höchsten Konzentration von 100 µg/ml beobachtet werden. Die empirischen Mittelwerte der Mediumkontrolle lagen

bei 1,623 (+/- SEM 0,1708) und bei 100 µg/ml bei 0,7292 (+/- SEM 0,225, $p = 0,0101$).

3.2.2 Rifampicin

Unter Verwendung von Rifampicin konnte ein dosisabhängiger Effekt auf die Proliferation dargestellt werden. An Tag 7 zeigte sich kein Effekt bzw. ergaben sich Hinweise für eine geringfügig verringerte Proliferation bei Verwendung von 0,5 und 5 µg/ml Rifampicin. Proben, welche mit 50 µg/ml Rifampicin behandelt wurden, zeigten eine signifikant verringerte Proliferation im Vergleich zur Mediumkontrolle. Der empirische Mittelwert lag bei der Mediumkontrolle bei 2,92 (+/- SEM 0,3032), bei 50 µg/ml Rifampicin bei 0,2358 (+/- SEM 0,04449, $p < 0,0001$).

An Tag 14 zeigte sich kein Effekt bzw. ergaben sich Hinweise für eine geringfügig gesteigerte Proliferation bei Verwendung von 0,5 und 5 µg/ml Rifampicin. Die Konzentration von 50 µg/ml zeigte auch hier im Vergleich zur Mediumkontrolle eine signifikante Abnahme der Proliferation. Die empirischen Mittelwerte beliefen sich für die Mediumkontrolle auf 2,114 (+/- SEM 0,2065) und für die Konzentration von 50 µg/ml auf 0,2649 (+/- SEM 0,01815, $p < 0,0001$).

An Tag 21 wiesen die Zellen, welche mit 0,5 und 5 µg/ml Rifampicin behandelt wurden, eine Tendenz für eine geringfügig verringerte Proliferation im Bezug zur Kontrolle auf. Abbildung 5 verdeutlicht, dass Zellen, welche mit 50 µg/ml Rifampicin kultiviert wurden, sich wie an den Tagen 7 und 14 durch eine signifikant verminderte Proliferation präsentierten. Die Werte des empirischen Mittelwerts belaufen sich bei der Kontrolle auf 1,645 (+/- SEM 0,2596) und bei einer Konzentration von 50 µg/ml auf 0,2855 (+/- SEM 0,06313, $p = 0,002$).

3.2.3 Clindamycin

Bei mit Clindamycin behandelten Zellen konnte keine zeit- und dosisabhängige Veränderung der Proliferation im Vergleich zur Kontrollprobe beobachtet werden.

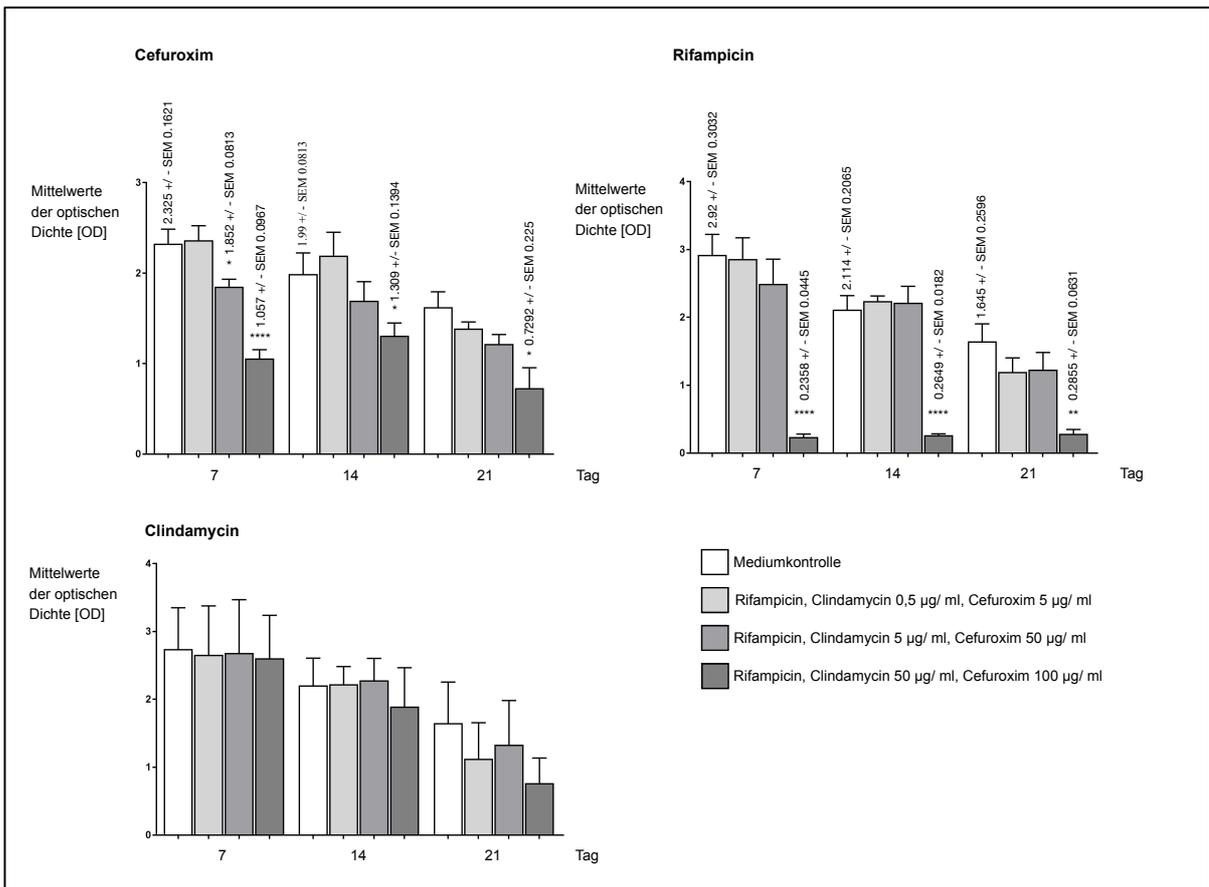


Abb. 5: Proliferationsrate

Für jede Probe wurden jeweils die Mittelwerte der optischen Dichte gemessen. Dargestellt sind die Veränderungen des Mittelwerts der optischen Dichte an den drei Messpunkten (Tag 7, 14, 21) unter Einfluss der unterschiedlichen Konzentrationen von Cefuroxim, Rifampicin und Clindamycin.

Cefuroxim- und Rifampicinzugaben führten zu allen Zeitpunkten zu einer dosisabhängigen Abnahme der Proliferation im Vergleich zu den Kontrollproben. An Tag 7 präsentierten die Konzentrationen 50 und 100 µg/ml eine signifikant geringere Proliferation in Bezug auf die Mediumkontrolle (50 µg/ml = * $p = 0,0261$; 100 µg/ml = **** $p < 0,0001$). An den Tagen 14 und 21 führte der Einsatz von 100 µg/ml Cefuroxim zu einem signifikant negativen Einfluss auf die Proliferation (Tag 14, 100 µg/ml = * $p = 0,0314$; Tag 21, 100 µg/ml = * $p = 0,0101$). Proben, welche mit 50 µg/ml Rifampicin behandelt wurden, zeigten an allen Tagen eine hoch signifikant verringerte Proliferation im Vergleich zur Mediumkontrolle (Tag 7, 14 = **** $p < 0,0001$; Tag 21 0 ** $p = 0,002$).

Bei clindamycinbehandelten Zellen konnte keine zeit- und dosisabhängige Veränderung der Proliferation im Vergleich zur Kontrollprobe beobachtet werden.

Tag 7, 14, 21 Cefuroxim: n = 6

Tag 7, 14 Rifampicin, Clindamycin: n = 5, Tag 21 Rifampicin, Clindamycin: n = 4

3.3 Effekte auf die osteogene Differenzierung/ Färbungen

3.3.1 Alkalische Phosphatase

Die Alkalische Phosphatase (ALP) wurde als Indikator für die Osteoblasten- Aktivität angefärbt (61). Dabei zeigte sich Antibiotika unabhängig eine zeitabhängige Zunahme der Farbintensität.

Die Daten für Cefuroxim wurden anhand der Ergebnisse von fünf Spendern mit einem Durchschnittsalter von 46 Jahren (17- 66 Jahre) generiert. Die Statistiken zur Darstellung des Einflusses von Rifampicin auf die Alkalische Phosphatase wurden anhand der Ergebnisse von drei Spendern mit einem Durchschnittsalter von 56 Jahren (51- 66 Jahre) und für Clindamycin anhand von drei Spendern mit einem Durchschnittsalter von 58 Jahren (51- 66 Jahre) erstellt.

Bei Zellen, welche mit Cefuroxim versetztem Medium kultiviert wurden, stellte sich eine geringfügige Dosisabhängigkeit dar, welche in Abbildung 6 dargestellt wird. Während bei der geringsten Konzentration von 5 µg/ml Cefuroxim Tendenzen einer geringfügig stärkeren Färbung dargestellt werden konnten, führte die Zugabe von 50 µg/ml zu keiner Veränderung der Farbintensität. Bei der Zugabe von 100 µg/ml Cefuroxim ergaben sich Hinweise für eine Abnahme der Farbintensität.

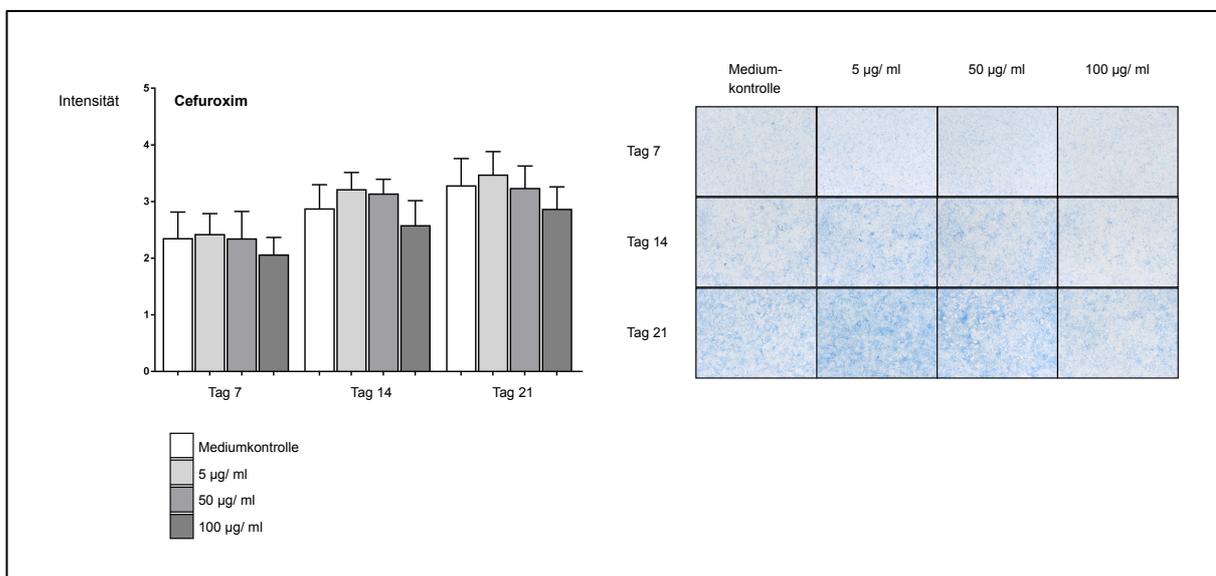


Abb. 6: Beispiel- well der Färbung der Alkalischen Phosphatase und statistische Auswertung von Cefuroxim

Die Zugabe von 5 µg/ml Cefuroxim zeigte an allen Tagen im Vergleich zur Mediumkontrolle die Tendenz einer leichten dosisabhängigen Steigerung der Farbintensität. Der Zusatz von 50 µg/ml führte zu keinem Einfluss auf die Intensität der Färbung. Zellen mit einem Zusatz von 100 µg/ml Cefuroxim zeigten an allen Tagen Hinweise einer geringeren Farbintensität als die ohne Cefuroximzuatz. Tag 7, 14, 21: n = 5

Abbildung 7 stellt den dosisabhängigen Einfluss von Rifampicin auf die Farbintensität der Alkalischen Phosphatase im Vergleich zu Zellen der Mediumkontrolle dar. An allen Tagen wiesen Zellen, welche mit 0,5 µg/ml Rifampicin behandelt wurden, keine oder Hinweise einer geringfügig stärkeren Färbung im Vergleich zur Kontrolle auf. Die Konzentration von 5 µg/ml Rifampicin führte an den Tagen 7 und 14 zu keiner Beeinflussung, an Tag 21 konnten Tendenzen eines geringen Intensitätsverlust detektiert werden. An allen Tagen konnte eine signifikant schwächere Färbung bei Zellen, welche mit 50 µg/ml Rifampicin kultiviert wurden, festgestellt werden. An Tag 7 lagen die empirischen Werte der Mediumkontrolle bei 2,523 (+/- SEM 0,029) und bei 50 µg/ml bei 1,629 (+/- SEM 0,081, $p = 0,0005$). An Tag 14 zeigten sich Werte von 2,972 (+/- SEM 0,096) der Mediumkontrolle und bei 50 µg/ml von 1,467 (+/- SEM 0,392, $p = 0,020$). An Tag 21 lagen die empirischen Mittelwerte der Mediumkontrolle bei 3,592 (+/- SEM 0,378) und bei einer Konzentration von 50 µg/ml bei 1,046 (+/- SEM 0,025, $p = 0,003$).

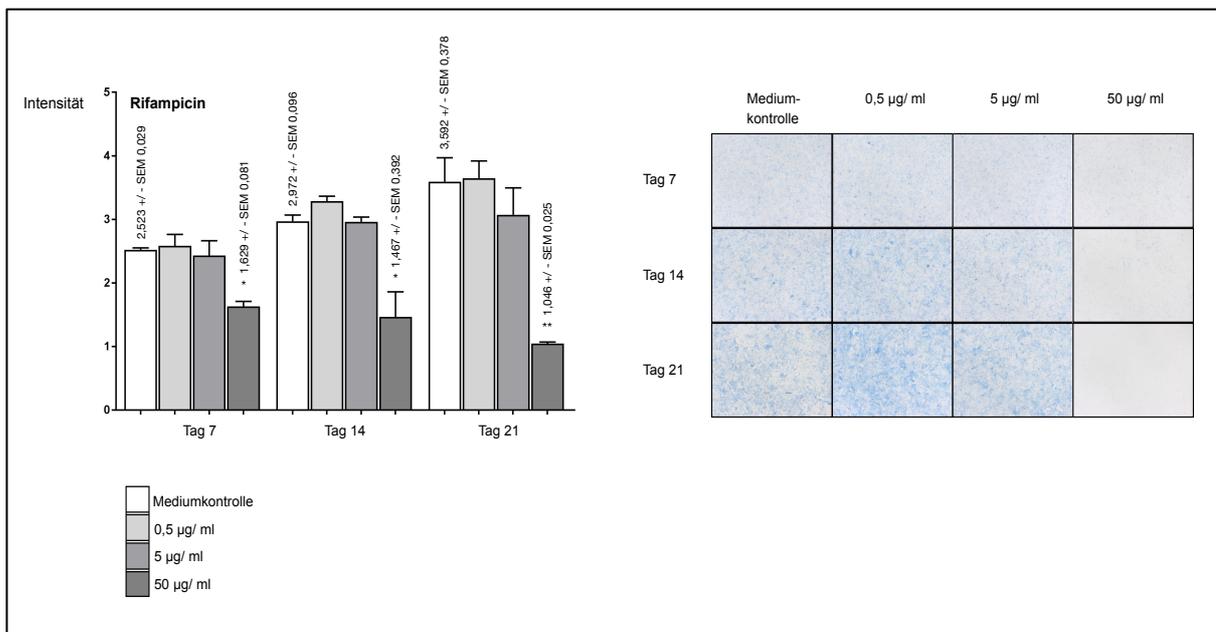


Abb. 7: Beispiel- well der Färbung der Alkalischen Phosphatase und statistische Auswertung von Rifampicin

Die Zugabe von 0,5 sowie 5 µg/ml Rifampicin führte an allen Tagen im Vergleich zu Zellen der Mediumkontrolle zu keinem signifikanten Einfluss auf die Farbintensität der Alkalischen Phosphatase. Zellen mit einem Zusatz von 50 µg/ml Rifampicin wiesen an allen Tagen eine signifikant geringere Farbintensität auf als die ohne Rifampicinzugabe (Tag 7: $p = 0,0005$, Tag 14: $p = 0,020$, Tag 21: $p = 0,003$). Tag 7, 14, 21: $n = 3$

An Tag 7 konnten keine Hinweise auf eine Beeinflussung der Farbintensität durch Clindamycinzugabe dargestellt werden. An den Tagen 14 und 21 ergaben sich Hinweise auf einen dosisabhängigen Einfluss von Clindamycin auf die Färbung der Alkalischen Phosphatase, welche in Abbildung 8 dargestellt sind. An Tag 14 zeigten sich Tendenzen einer Clindamycin abhängigen Steigerung der Farbintensität bei der Verwendung von 0,5 und 5 µg/ml Clindamycin, bei der Zugabe von 50 µg/ml Clindamycin hingegen Tendenzen einer Clindamycin abhängigen Abnahme. Zellen, welche 21 Tage lang einer Konzentration von 0,5, 5 und 50 µg/ml Clindamycin ausgesetzt waren, wurden scheinbar geringfügig stärker gefärbt als die ohne Clindamycinzusatz.

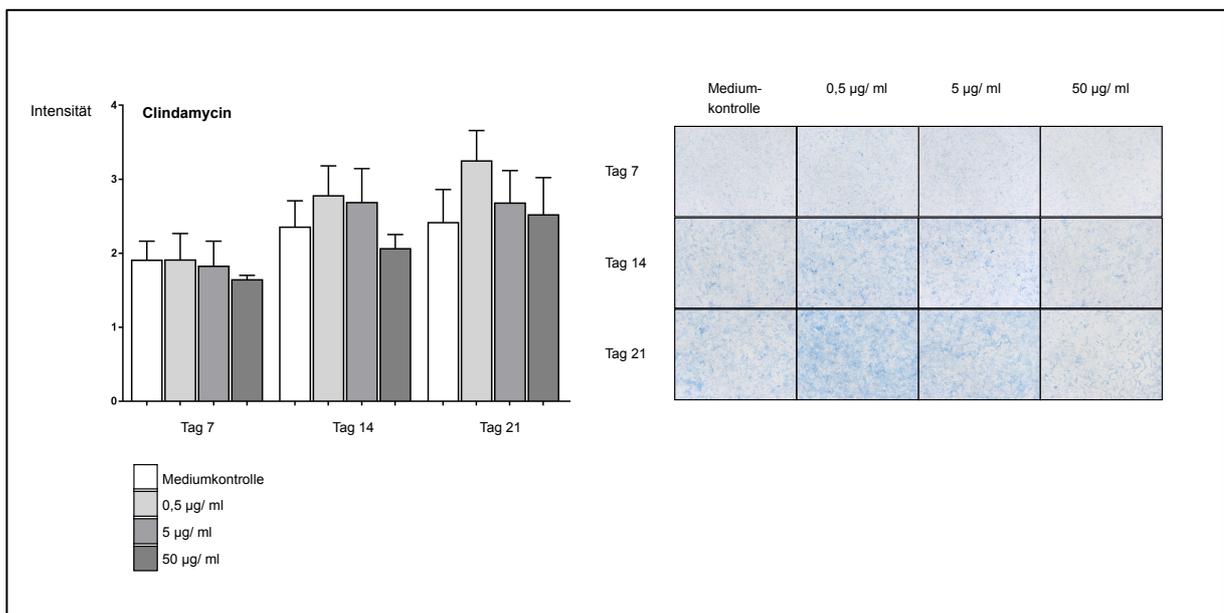


Abb. 8: Beispiel- well der Färbung der Alkalischen Phosphatase und statistische Auswertung von Clindamycin

Die Zugabe Clindamycin führte an allen Tagen im Vergleich zu Zellen der Mediumkontrolle zu keinem signifikanten Einfluss auf die Farbintensität der Färbung der alkalischen Phosphatase. Es ergaben sich Hinweise auf einen dosisabhängigen Einfluss auf die Aktivität der Alkalischen Phosphatase.

Tag 7, 14, 21: n = 3

3.3.2 Alizarin- Rot

Mit der Alizarin- Rot- Färbung werden Kalzifizierungen angefärbt (57).

Insgesamt konnte eine antibiotikaunabhängige, aber zeitabhängige Steigerung der Farbintensität festgestellt werden. An Tag 7 konnte unabhängig der getesteten Antibiotika keine Kalzifizierung dargestellt werden. An Tag 14 konnte eine beginnende und an Tag 21 eine stattgefundene Kalzifizierung dargestellt werden.

Die Daten für Cefuroxim wurden anhand der Ergebnisse von fünf Spendern mit einem Durchschnittsalter von 46 Jahren (17- 66 Jahre) generiert. Die Statistiken zur Darstellung des Einflusses von Rifampicin auf die Kalzifizierung wurden anhand der Ergebnisse von drei Spendern mit einem Durchschnittsalter von 56 Jahren (51- 66 Jahre) und für Clindamycin anhand der Daten von drei Spendern mit einem Durchschnittsalter von 58 Jahren (51- 57 Jahre) erstellt.

Bei Zellen, welche mit Cefuroxim versetztem Medium kultiviert wurden, stellte sich insgesamt kein signifikanter Einfluss auf die Kalzifizierung im Vergleich zu den Kontrollproben heraus. Dies ist in Abbildung 9 dargestellt.

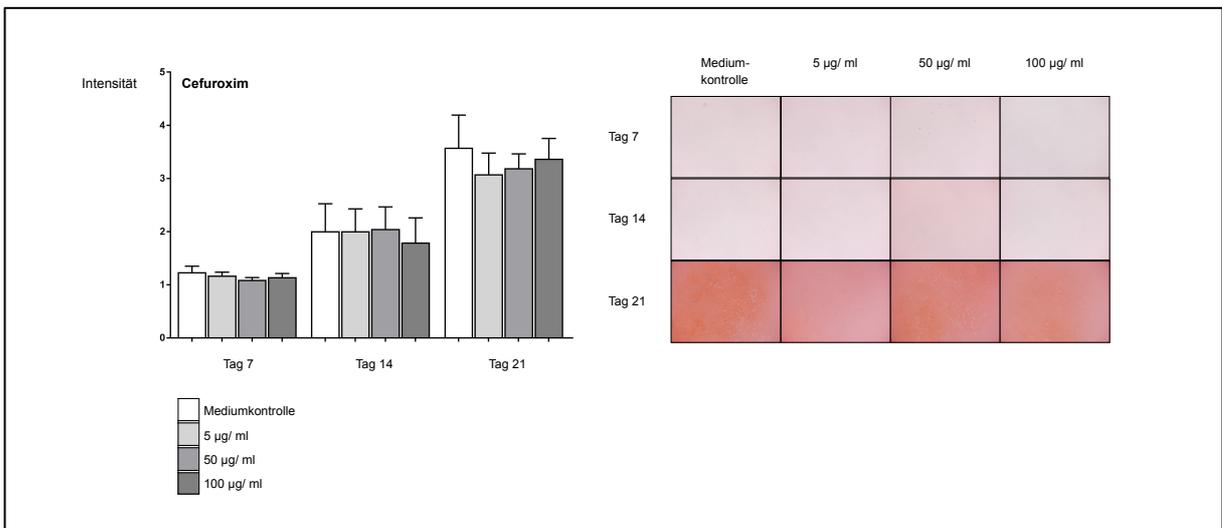


Abb. 9: Beispiel- well der Färbung mit Alizarin- Rot und statistische Auswertung von Cefuroxim

Es konnte kein signifikanter Einfluss von Cefuroxim auf die Farbintensität nach Alizarin- Rot Färbung dargestellt werden. Tag 7, 14, 21: n = 5

Nach Zugabe von 0,5 und 5 µg/ml Rifampicin konnte zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Einfluss auf den Grad der Kalzifizierung nachgewiesen werden. Auch die Zugabe von 50 µg/ml Rifampicin zeigte an Tag 7 keinen Einfluss. An den Tagen 14 und 21 konnte allerdings eine verringerte Kalzifizierung bei Verwendung von 50 µg/ml Rifampicin dargestellt werden. Abbildung 10 zeigt die an Tag 21 dargestellte signifikant schwächere Kalzifizierung nach Zugabe von 50 µg/ml Rifampicin. Die empirischen Mittelwerte lagen für die Mediumkontrolle bei 3,269 (+/- SEM 0,243) und für 50 µg/ml bei 1,601 (+/- SEM 0,324, $p = 0,015$).

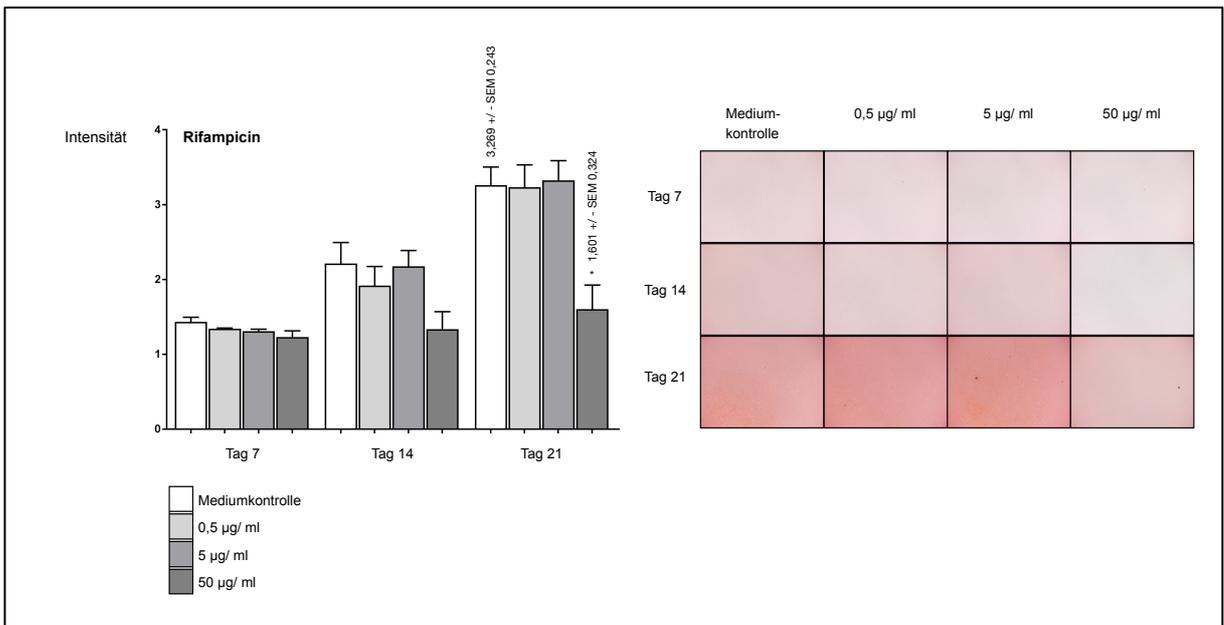


Abb. 10: Beispiel- well der Färbung mit Alizarin- Rot und statistische Auswertung von Rifampicin

Die Zugabe von 0,5 sowie 5 µg/ml Rifampicin führte an allen Tagen im Vergleich zu Zellen der Mediumkontrolle zu keinem signifikanten Einfluss auf den Grad der Kalzifizierung. Zellen mit einem Zusatz von 50 µg/ml Rifampicin wiesen ab Tag 14 eine geringere Kalzifizierung auf als die der Kontrollproben. An Tag 21 stellte sich eine signifikant verminderte Kalzifizierung dar (* $p = 0,015$).

Tag 7, 14, 21: n = 3

Bei Zellen, welche mit Clindamycin versetztem Medium kultiviert wurden, stellte sich insgesamt kein signifikanter Einfluss auf die Kalzifizierung im Vergleich zu den Kontrollproben heraus. Dies ist in Abbildung 11 dargestellt.

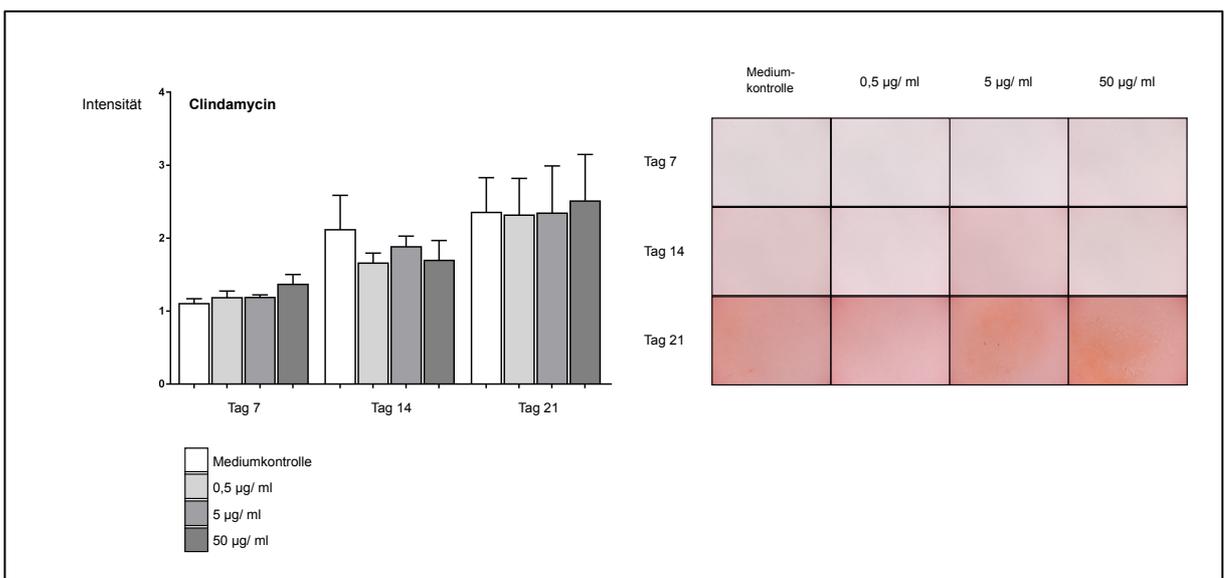


Abb. 11: Beispiel- well der Färbung Alizarin- Rot und statistische Auswertung von Clindamycin

Es konnte kein signifikanter Einfluss von Clindamycin auf die Farbtintensität nach Alizarin- Rot Färbung dargestellt werden. Tag 7, 14, 21: n = 3

3.4 Effekte auf die Expression osteogener Marker

Die relative Genexpression der Marker in Bezug auf die jeweilige Kontrolle wurde für alle Proben an den Tagen 7, 14 und 21 bestimmt. Dabei ist zu beachten, dass an den Tagen 14 und 21 aufgrund der mit der Zeit zunehmenden Kalzifizierung nicht alle Proben verwendet werden konnten. Daher unterscheidet sich die Anzahl der verwendeten Spender zwischen den einzelnen Kinetikpunkten sowie den untersuchten Genen. Genaue Angaben sind der Tabelle 1 zu entnehmen.

Des Weiteren konnte durch die zytotoxische Wirkung von 50 µg/ml Rifampicin für die Analyse dieser Konzentration nicht genug RNA gewonnen und keine quantitative- Real- time- PCR durchgeführt werden.

Bei der Auswertung der getesteten Marker konnten nur an wenigen Stellen signifikante Ergebnisse generiert werden. Es zeigten sich allerdings an einigen Stellen Trends, welche durch zukünftige Versuche weiter herausgearbeitet werden könnten.

3.4.1 CRYAB

Abbildung 12 stellt die Expression von CRYAB in humanen mesenchymalen Zellen mit und ohne Antibiotikazusatz über 21 Tage dar. Insgesamt haben sich Hinweise einer dosisabhängigen Steigerung der Expression von CRYAB unter dem Einfluss aller drei Antibiotika ergeben.

Die Expression von CRYAB scheint Antibiotika unabhängig zwischen Tag 7 und 14 am größten zu sein.

An Tag 7 konnte kein Einfluss durch den Zusatz von 5 und 50 µg/ml Cefuroxim auf die Expression von CRYAB im Vergleich zu Zellen ohne Antibiotikazusatz beobachtet werden. Zellen, welche mit 100 µg/ml Cefuroxim kultiviert wurden, schienen eine leicht erhöhte Expression des Gens aufzuweisen. An Tag 14 und 21 wurden bei allen Konzentrationen Hinweise auf eine stärkere Expression von CRYAB im Vergleich zur Mediumkontrolle detektiert. Eine besonders starke Expression zeigte sich an allen Messzeitpunkten bei der Verwendung von 100 µg/ml Cefuroxim, welche sich zudem an Tag 14 als signifikant erwies, wie der Abbildung 12 zu entnehmen ist. Die empirischen Mittelwerte lagen für die Mediumkontrolle bei 19754 (+/- SEM 6343) und für 100 µg/ml bei 86589 (+/- SEM 26110, p 0,0473).

Zellen, welche mit 0,5 µg/ml Rifampicin behandelt wurden, zeigten keinen signifikanten Unterschied in der Expression von CRYAB im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Zellen mit einem Zusatz von 5 µg/ml Rifampicin wiesen zu beiden Zeitpunkten eine scheinbar stärkere

Expression von CRYAB auf, als Zellen der Mediumkontrolle.

Insgesamt ergaben sich unter Clindamycinzusatz Hinweise auf eine dosisabhängige Zunahme der Expression von CRYAB.

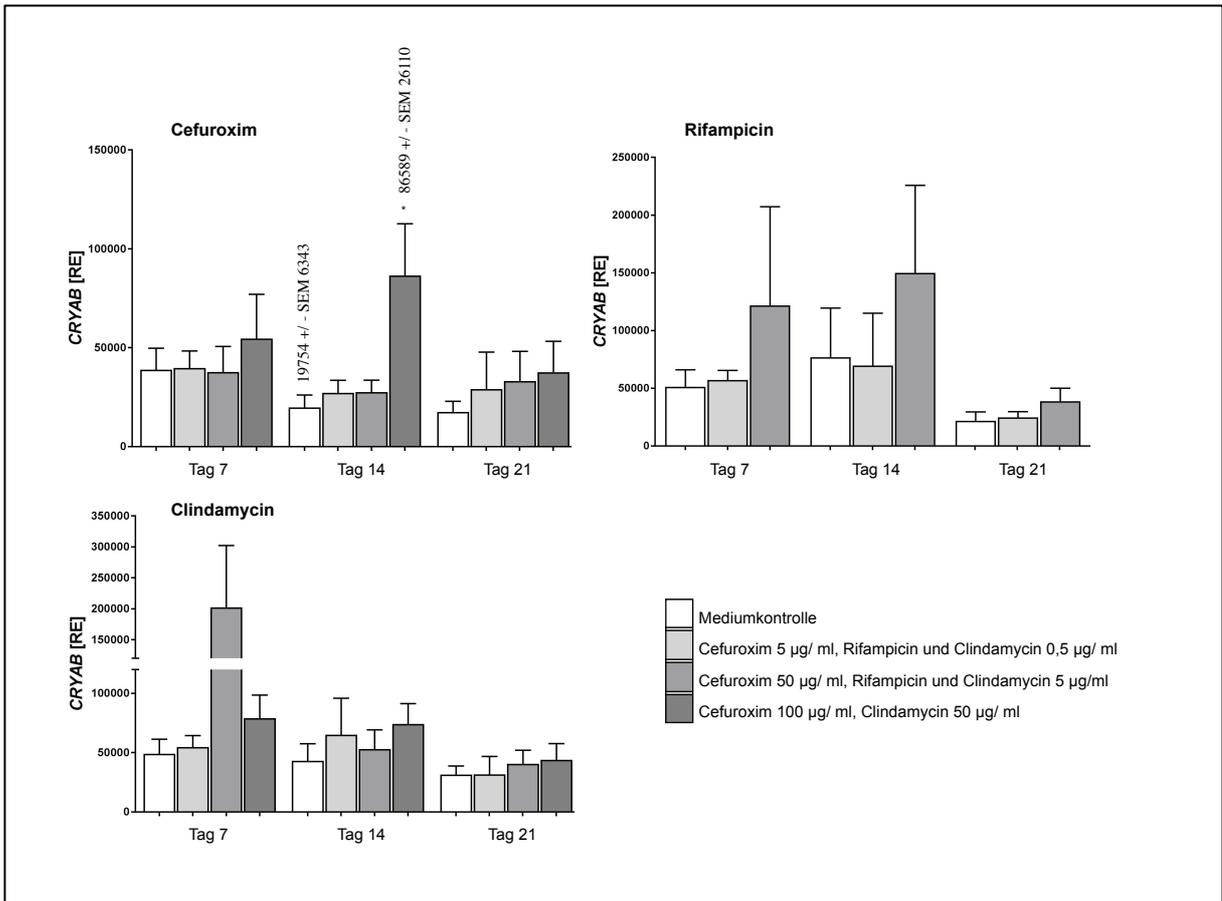


Abb. 12: Genexpression von CRYAB

Die Zugabe von Cefuroxim, Rifampicin und Clindamycin führte an allen Tagen im Vergleich zur Mediumkontrolle zu einer dosisabhängigen Steigerung der Expression von CRYAB. An Tag 14 wiesen Zellen mit 100 µg/ml Cefuroximzusatz eine signifikant höhere Expression auf, als die der Mediumkontrolle (* $p = 0,0473$; $n = 5$ biologisch).

CRYAB = *Apha-crystalin B chain*; RE = Relative Einheiten

Tag 7 Cefuroxim: $n = 5$, Tag 14, 21 Cefuroxim: $n = 4$

Tag 7, 14 Rifampicin: $n = 3$; Tag 7, 14, 21 Clindamycin: $n = 4$

3.4.2 RUNX2

Abbildung 13 stellt die Expression von RUNX2 in humanen mesenchymalen Stammzellen mit und ohne Antibiotikazusatz über 21 Tage dar. Die Expression von CRYAB scheint Antibiotika unabhängig zwischen Tag 14 und 21 am größten zu sein und zeitabhängig zuzunehmen.

An Tag sieben zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen mit Cefuroxim behandelten und unbehandelten Zellen. An Tag 14 schien die Expression des Gens RUNX2 bei allen Konzentrationen von Cefuroxim geringer als die der Mediumkontrolle zu sein. An Tag 21 fanden sich Hinweise eines dosisabhängigen Effekts von Cefuroxim auf die Expression des Gens. Die Konzentration von 5 µg/ml Cefuroxim zeigte eine scheinbar stärkere Expression, die Zugabe von 50 µg/ml Cefuroxim keinen Effekt und der Zusatz von 100 µg/ml Cefuroxim eine scheinbar verminderte Expression von RUNX2 in Bezug auf die Zellen der Mediumkontrolle.

Es konnten keine signifikanten Ergebnisse generiert werden. Mit Ausnahme der Konzentration von 5 µg/ml Rifampicin an Tag 14 konnte kein Effekt von Rifampicin auf die Expression von RUNX2 nachgewiesen werden. An Tag 14 zeigte sich bei Zellen mit einem Zusatz von 5 µg/ml Rifampicin die Tendenz einer höheren Expression von RUNX2 als in denen der Proben ohne Antibiotikazusatz.

An Tag 7 zeigten Zellen im Medium mit 0,5 µg/ml Clindamycin eine signifikant größere Expression von RUNX2. Die empirischen Mittelwerte lagen für die Mediumkontrolle bei 457 (+/- SEM 49,34) und für 0,5 µg/ml bei 657,1 (+/- SEM 41,05, $p = 0,0356$). Insgesamt entstand an den Tagen 7 und 14 das Bild einer dosisabhängigen Wirkung von Clindamycin auf die Expression von RUNX2. Die Zugabe von 0,5 und 5 µg/ml Clindamycin führte zu einer stärkeren Expression des Gens. Der Zusatz von 50 µg/ml Clindamycin zeigte keinen Einfluss. An Tag 21 konnte aufgrund größerer Standardfehler keine dosisabhängige Wirkung von Clindamycin auf die Expression von RUNX2 nachgewiesen werden.

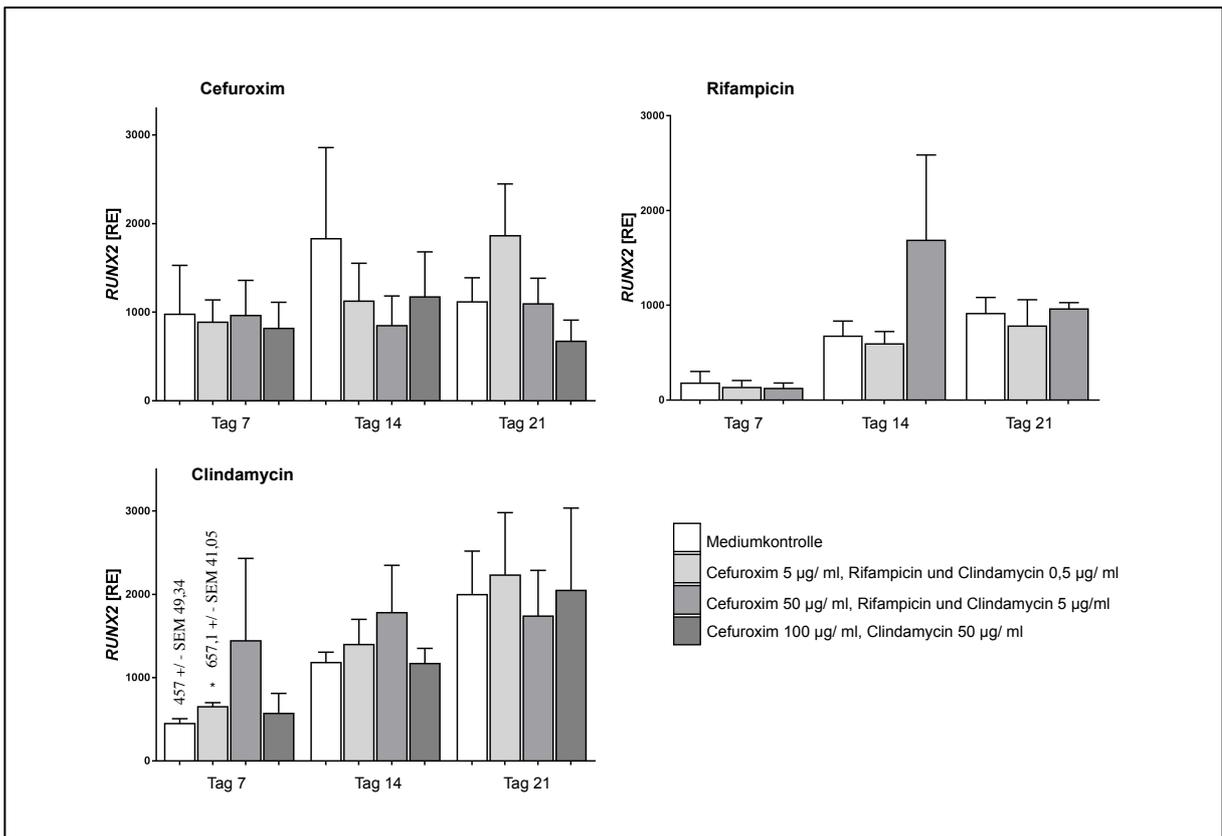


Abb. 13: Genexpression von RUNX2

An Tag 7 zeigten sich zwischen mit Cefuroxim kultivierten Zellen und Kontrollproben keine Unterschiede, an Tag 14 eine geringere Expression und an Tag 21 ein dosisabhängiger Effekt von Cefuroxim auf die Expression des Gens.

Rifampicinzugabe zeigt an allen Tagen keinen Einfluss auf die Expression von COL1A1.

Die Konzentrationen 0,5 und 5 µg/ml Clindamycin wiesen eine dosisabhängige Steigerung auf, 50 µg/ml Clindamycin eine Annäherung an das Expressionsniveau der Kontrollen. An Tag 7 wiesen Zellen in Medium mit 0,5 µg/ml Clindamycin eine signifikant größere Expression von RUNX2 (* $p = 0,0356$) auf. Insgesamt entstand an den Tagen 7 und 14 das Bild einer dosisabhängigen Wirkung von Clindamycin auf die Expression von RUNX2. Die Zugabe von 0,5 und 5 µg/ml Clindamycin führte zu einer stärkeren Expression. Der Zusatz von 50 µg/ml Clindamycin zeigte keinen Einfluss. An Tag 21 war durch größere Standardfehler keine dosisabhängige Wirkung von Clindamycin auf die Expression von RUNX2 festzustellen.

COL1A1 = Kollagen Typ I; RE = Relative Einheiten

Tag 7 Cefuroxim: n = 6, Tag 14 Cefuroxim: n = 5, Tag 21 Cefuroxim: n = 4

Tag 7, 14 Rifampicin: n = 3; Tag 7, 14, 21 Clindamycin: n = 4

3.4.3 BMP2

Abbildung 14 stellt die Expression von BMP2 in humanen mesenchymalen Stammzellen mit und ohne Antibiotikazusatz über 21 Tage dar.

An den Tagen 7 und 21 ist das Bild einer mit steigenden Dosis abnehmenden Expression von BMP2 entstanden. An Tag 7 überschritt dabei keine Konzentration das Expressionsniveau der Mediumkontrolle. An Tag 21 führte erst die Zugabe von 100 $\mu\text{g/ml}$ Cefuroxim zu einer signifikanten Unterschreitung des BMP2- Expressionsniveaus der Kontrollproben. Die empirischen Mittelwerte lagen für die Mediumkontrolle bei 59,76 (+/- SEM 0,7801) und für 100 $\mu\text{g/ml}$ bei 29,4 (+/- SEM 8,847, $p = 0,0268$). An Tag 14 konnte kein Einfluss von Cefuroxim auf die Expression dargestellt werden.

Insgesamt ergaben sich unter Rifampicin- und Clindamycinzusatz Hinweise auf eine dosisabhängige Zunahme der Expression von BMP2.

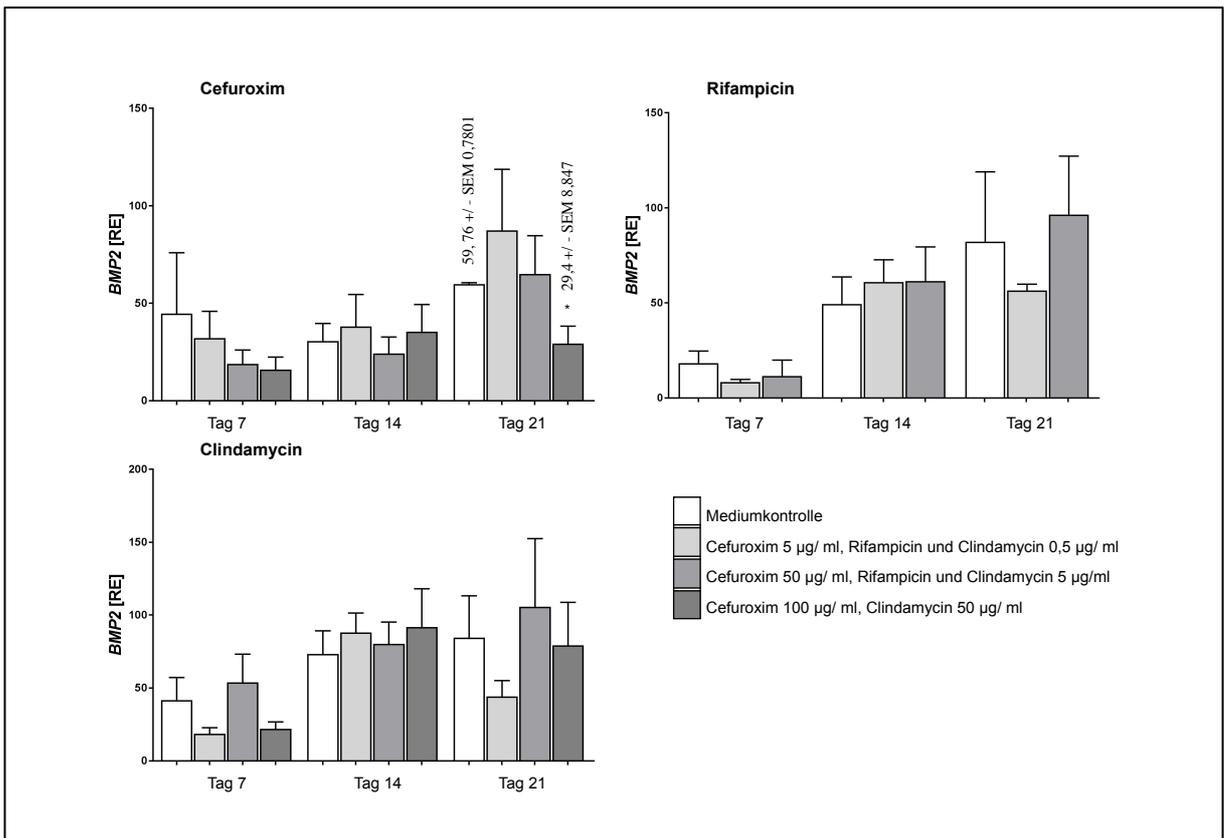


Abb. 14: Genexpression von BMP2

An den Tagen 7 und 21 ist das Bild einer mit steigenden Dosis abnehmenden Expression von BMP2 entstanden, wobei an Tag 21 die Zugabe von 100 µg/ml Cefuroxim zu einer signifikanten Unterschreitung des BMP2- Expressionsniveaus der Kontrollproben führte (* $p = 0,0268$). An Tag 14 konnte kein Einfluss von Cefuroxim auf die Expression dargestellt werden. Insgesamt ergaben sich unter Rifampicin- und Clindamycinzusatz Hinweise auf eine dosisabhängige Zunahme der Expression von BMP2.

BMP2 = *Bone morphogenetic protein 2*; RE = Relative Einheiten

Tag 7 Cefuroxim: n = 6, Tag 14, Cefuroxim: n = 5, Tag 21 Cefuroxim: n = 3

Tag 7, 14 Rifampicin: n = 3; Tag 7, 14, 21 Clindamycin: n = 4

3.4.4 COL1A1

Abbildung 15 stellt die Expression von COL1A1 in humanen mesenchymalen Stammzellen mit und ohne Antibiotikazusatz über 21 Tage dar. Die Versuche zeigten eine Antibiotika unabhängige zeitabhängige Zunahme der Expression von COL1A1. Es konnten insgesamt keine signifikanten Ergebnisse generiert werden, jedoch zeichneten sich eindeutige dosisabhängige Trends ab.

An Tag 7 konnte kein Einfluss von Cefuroxim auf die Expression von COL1A1 beobachtet werden. An den Tagen 14 und 21 entstand das Bild eines dosisabhängigen Einflusses der Expression. Dabei führte eine Steigerung der verwendeten Konzentration von Cefuroxim zu einer geringeren Expression von COL1A1.

Für die Beurteilung der Rifampicin induzierten Effekte konnte nicht ausreichend RNA gewonnen werden. Dadurch hat keine Analyse zur Beurteilung der Auswirkung von Rifampicin auf COL1A1 stattgefunden.

An Tag 7 zeigten Zellen mit 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Clindamycinzusatz eine scheinbar geringere Expression als Zellen der Kontrollproben. Zellen mit 5 $\mu\text{g/ml}$ Clindamycin wiesen eine geringfügig stärkere Expression und Zellen mit 50 $\mu\text{g/ml}$ keinen Unterschied in der Expression von COL1A1 in Bezug zu Zellen der Mediumkontrollen auf. An Tag 14 und 21 zeigten alle Zellen aller getesteten Clindamycinkonzentrationen Hinweise auf eine schwächere Expression von COL1A1.

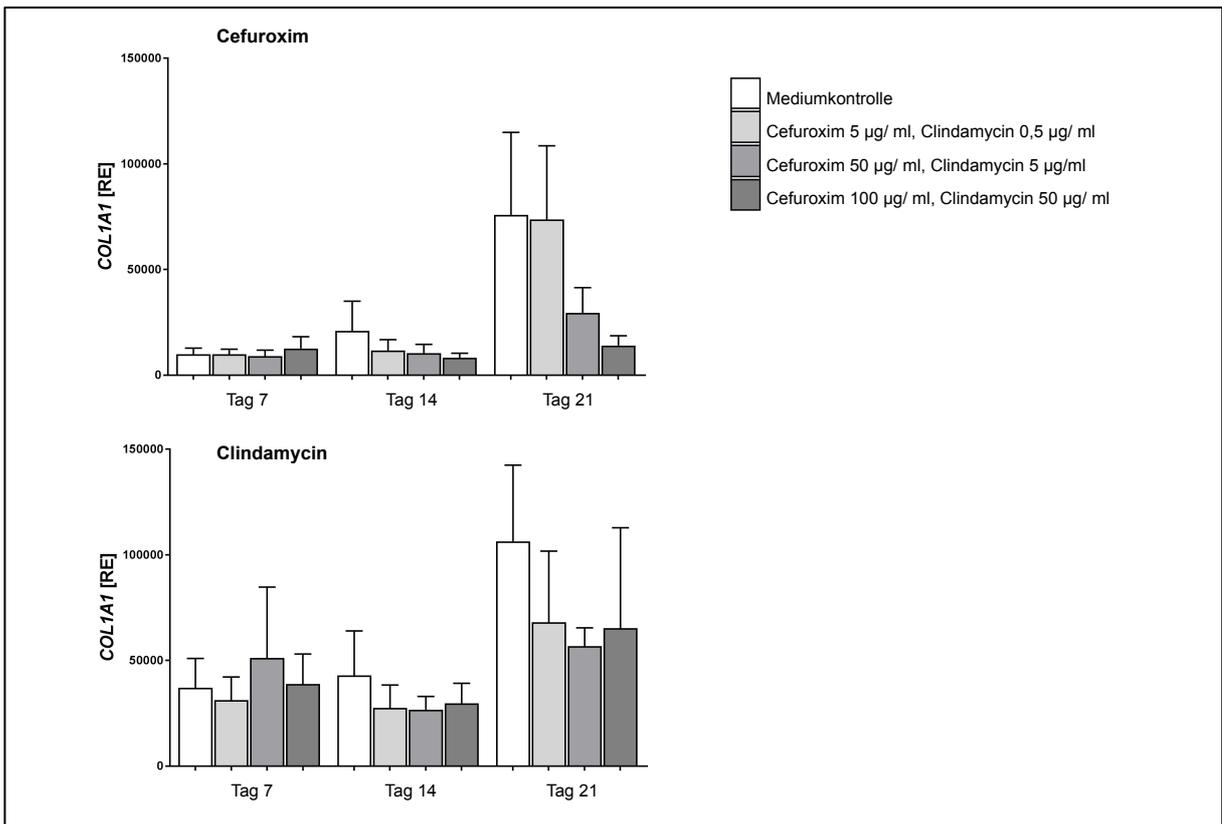


Abb. 15: Genexpression von COL1A1

Die Zugabe von Cefuroxim zeigte an Tag 7 im Vergleich zur Mediumkontrolle keinen Effekt auf die Expression von COL1A1. Tag 14 und 21 ergaben Hinweise auf eine dosisabhängige Abnahme der COL1A1- Expression unter Cefuroximzusatz. Die Clindamycinzugabe zeigte an allen Tagen keinen Einfluss auf die Expression von COL1A1.

COL1A1 = Kollagen Typ I; RE = Relative Einheiten

Tag 7 Cefuroxim: n = 6, Tag 14 Cefuroxim: n = 5, Tag 21 Cefuroxim: n = 4

Tag 7, 14, 21 Clindamycin: n = 4

3.4.5 IGF1

Abbildung 16 stellt die Expression von IGF1 in humanen mesenchymalen Stammzellen mit und ohne Antibiotikazusatz über 21 Tage dar. Die Versuche zeigten insgesamt eine Antibiotika unabhängige, zeitabhängige Zunahme der Expression von IGF1. Es konnten insgesamt keine signifikanten Ergebnisse generiert werden, jedoch zeichneten sich eindeutige dosisabhängige Trends ab.

Bei der Untersuchung der Expression von IGF1 unter Einfluss von Cefuroxim fand sich generell ein dosisabhängiges Expressionsmuster. Der Zusatz von 5 µg/ml Cefuroxim führte an den Tagen 7 und 21 zu einer geringfügig stärkeren Expression von IGF1. Bei der Hinzugabe von 50 µg/ml Cefuroxim wurde keine bzw. eine geringfügig niedrigere Expression von IGF1 evoziert. Der Zusatz von 100 µg/ml Cefuroxim führte zu einer geringeren Expression von IGF1 als Zellen ohne Antibiotikazusatz. An Tag 14 konnten keine Unterschiede verzeichnet werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte kein Rifampicin induzierter Einfluss auf das Expressionsverhalten von IGF1 aufgezeichnet werden.

In der vorliegenden Arbeit zeigten sich an Tag 7 bezüglich der Expression von IGF1 unter Clindamycinzusatz Hinweise auf eine stärkere Expression aller getesteten Konzentrationen. An Tag 14 wiesen Zellen, welche mit 0,5 und 5 µg/ml Clindamycin inkubiert wurden, ebenso Tendenzen einer geringfügig gesteigerten Expression von IGF1 auf. Der Zusatz von 50 µg/ml Clindamycin führte zu einer scheinbar geringfügigen Abnahme der Expression im Vergleich zu Zellen der Kontrollen. An Tag 21 zeigte sich mit steigender Konzentration eine dosisabhängige Abnahme unterhalb des Niveaus der Mediumkontrollen.

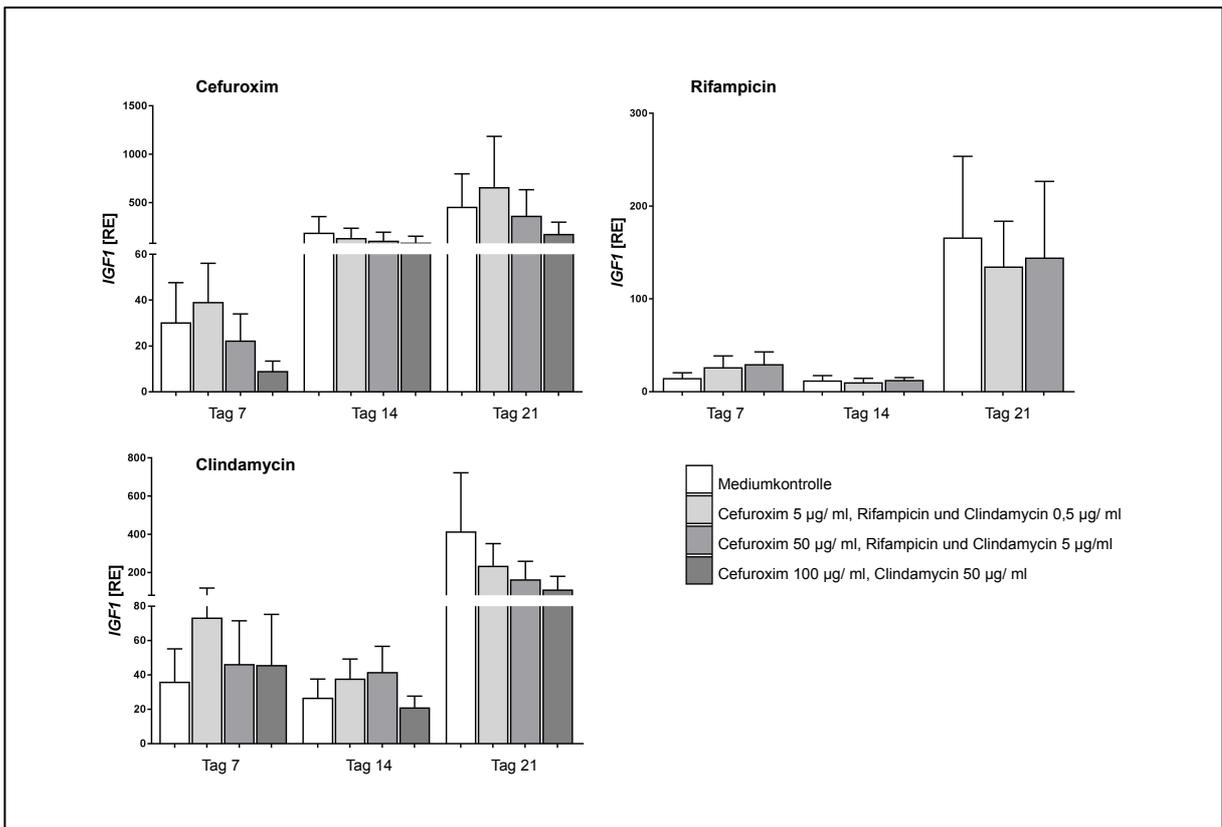


Abb. 16: Genexpression von IGF1

Unter Zugabe von Cefuroxim entstand an allen Tagen im Vergleich zur Mediumkontrolle das Bild einer dosisabhängigen Abnahme der Expression von IGF1. Gleiches entstand unter Zugabe von Clindamycin an Tag 21. Rifampicinzusatz zeigte an allen Tagen keinen Einfluss auf die Expression von IGF1.

IGF1 = *Insulin-like growth factor 1*; RE = Relative Einheiten

Tag 7 Cefuroxim: n = 6, Tag 14 Cefuroxim: n = 5, Tag 21 Cefuroxim: n = 4

Tag 7, 14 Rifampicin: n = 3; Tag 7, 14, 21 Clindamycin: n = 4

3.4.6 IGF2

Abbildung 17 stellt die Expression von IGF2 in humanen mesenchymalen Stammzellen mit und ohne Antibiotikazusatz über 21 Tage dar. Es konnten insgesamt keine signifikanten Ergebnisse generiert werden, jedoch zeichneten sich eindeutige dosisabhängige Trends ab.

Bei der Untersuchung der Expression von IGF2 unter Cefuroximeinfluss konnten keine signifikanten Ergebnisse generiert werden, dennoch entstand das Bild eines dosisabhängigen Effekts. Im Vergleich zu Zellen, bei denen kein Antibiotikum hinzugefügt wurde, führte der Zusatz von 5 µg/ml Cefuroxim zu einer geringfügig stärkeren Expression von IGF2, während Konzentrationen von 50 und 100 µg/ml zu keiner oder einer geringfügig niedrigeren Expression von IGF2 führten. Die Expression wurde Cefuroxim unabhängig bis Tag 21 gesteigert.

In der vorliegenden Arbeit konnte kein Rifampicin induzierter Einfluss auf das Expressionsverhalten von IGF2 aufgezeichnet werden.

Die Ergebnisse bezüglich des Einflusses von Clindamycin auf das Expressionsverhalten von IGF2 stellten das Bild eines dosisabhängigen Einflusses dar. An den Tagen 7 und 14 präsentierten sich die Zellen mit einer dosisabhängigen Zunahme der Expression von IGF2, welche jedoch unter dem Niveau der Expression der Kontrollproben stattgefunden hat. An Tag 14 erreichten die unbehandelten Kontrollproben das Expressionsmaximum, mit Clindamycin behandelte Zellen jedoch nicht. Aufgrund dessen stellte sich die Expression von IGF2 unter Clindamycineinfluss im Schnitt scheinbar stärker dar als die der Kontrollen.

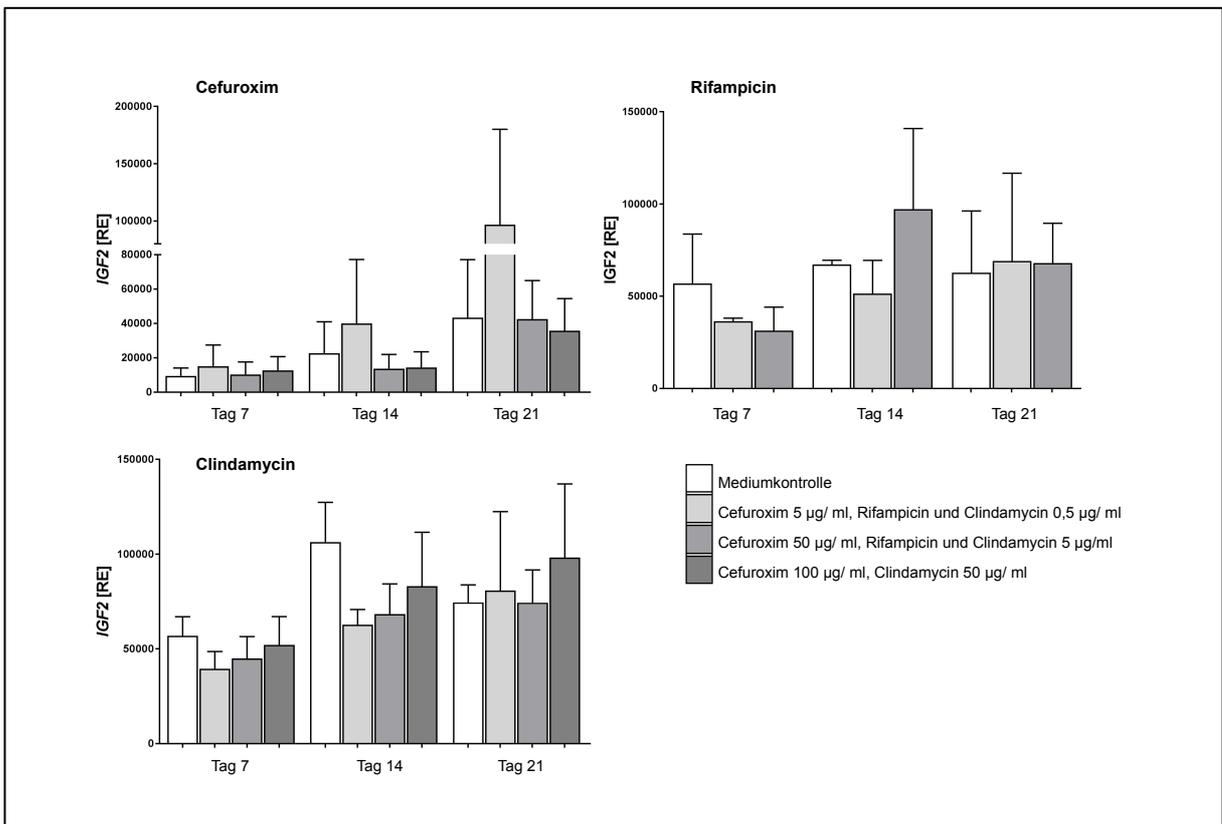


Abb. 17: Genexpression von IGF2

Zellen mit 5 µg/ ml Cefuroximzusatz zeigten Tendenzen einer stärkeren IGF2- Expression als die der Kontrollen. An allen Tagen ergaben sich Hinweise auf eine dosisabhängige Zunahme der IGF2- Expression unter Clindamycinzugabe. Die Expression blieb dabei allerdings unterhalb des Expressionsniveaus der Kontrollproben. Des Weiteren stellte sich die Hochregulation der IGF2- Expression unter Clindamycinzugabe als verzögert einsetzend dar. Rifampicinzugabe zeigte an allen Tagen keinen Einfluss auf die Expression von IGF2.

IGF2 = *Insulin- like growth factor 2*; RE = Relative Einheiten;

Tag 7 Cefuroxim: n = 6, Tag 14 Cefuroxim: n = 5, Tag 21 Cefuroxim: n = 4; Tag 7, 14

Rifampicin: n = 3; d 7, 14, 21 Clindamycin: n = 4

3.4.7 OPG

Abbildung 18 stellt die Expression von OPG in humanen mesenchymalen Stammzellen mit und ohne Antibiotikazusatz über 21 Tage dar. Es konnte eine Antibiotika unabhängige, zeitabhängige Zunahme der Expression beobachtet werden. Es konnten keine signifikanten Ergebnisse generiert, jedoch starke Trends herausgearbeitet werden.

An den Tagen 7 und 14 stellte sich das Bild einer geringen dosisabhängigen Steigerung der Expression von OPG unter Cefuroximeinfluss dar. An Tag 21 konnten aufgrund von Verunreinigungen keine Ergebnisse generiert werden.

In dieser Arbeit konnte kein Einfluss von Rifampicin auf die Expression von OPG dargestellt werden.

Bezüglich des Einflusses von Clindamycin auf die Expression von OPG konnte an Tag 7 und 14 das Bild einer dosisabhängigen Abnahme der Expression von OPG gezeigt werden. An Tag 21 konnte der Trend einer dosisabhängigen Zunahme der Expression dargestellt werden. Keine getestete Konzentration wies eine stärkere Expression des Gens im Bezug zu Zellen ohne Antibiotikazusatz auf. Insgesamt zeigte sich unabhängig vom Antibiotikum eine Zunahme der Expression bis zum 14. Tag. An Tag 21 lag das Niveau der OPG- Expression unterhalb der des 7. Tages.

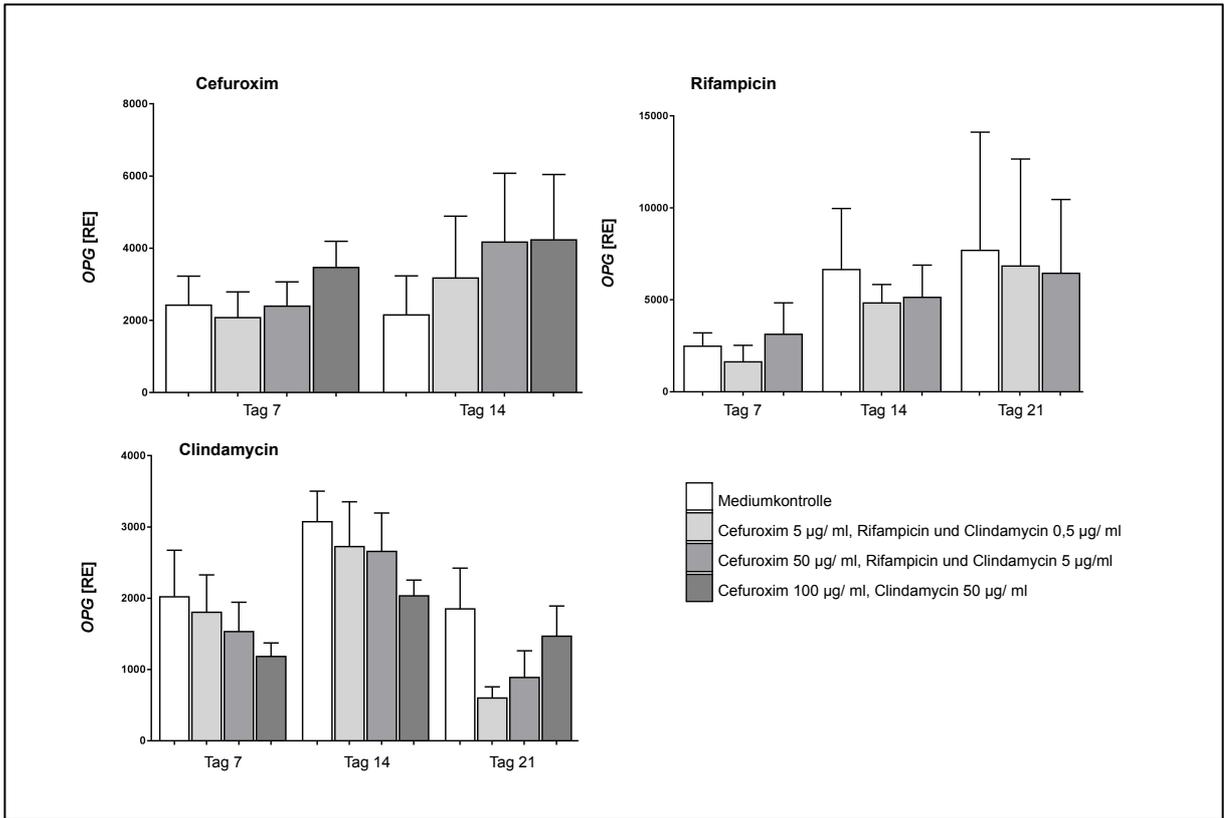


Abb. 18: Genexpression von OPG

An den Tagen 7 und 14 zeigten sich Hinweise auf eine geringfügige dosisabhängige Zunahme der OPG-Expression unter Cefuroximzugabe. Zellen mit Clindamycinzusatz präsentierten sich durch eine dosisabhängige Abnahme der OPG-Expression an den Tagen 7 und 14. An Tag 21 wiesen sie eine dosisabhängige Zunahme der Expression auf, welche unterhalb des Expressionsniveaus der Kontrollen blieb. Rifampicinzugabe zeigte an allen Tagen keinen Einfluss auf die Expression von OPG.

OPG = Osteoprotegerin; RE = Relative Einheiten

Tag 7 Cefuroxim: n = 6, Tag 14 Cefuroxim: n = 5

Tag 7, 14 Rifampicin: n = 3; Tag 7, 14, 21 Clindamycin: n = 4

3.4.8 OCN

Abbildung 19 stellt die Expression von OCN in humanen mesenchymalen Stammzellen mit und ohne Antibiotikazusatz über 21 Tage dar. Es konnten insgesamt nur bei Clindamycin signifikante Ergebnisse generiert werden, jedoch zeichneten sich zudem eindeutige dosisabhängige Trends ab.

Bezüglich des Einflusses von Cefuroxim auf das Expressionsverhalten von OCN zeichneten sich an Tag 7 und 14 Trends einer dosisabhängigen Zunahme der Expression von OCN ab. Dabei wiesen Zellen unter Zusatz von 100 µg/ml Cefuroxim an Tag 7 sowie die

Konzentrationen von 50 und 100 µg/ml an Tag 14 eine stärkere Expression als Zellen der Kontrollproben auf. An Tag 21 konnte eine dosisabhängige Abnahme der Expression von OCN dargestellt werden, welche bei einem Zusatz von 5 und 50 µg/ml Cefuroxim über dem Expressionsniveau der Mediumkontrollen gelegen hat und sich bei der Zugabe von 100 µg/ml Cefuroxim dem Niveau der Kontrollproben annäherte.

Bei der Untersuchung der Expression von OCN unter Rifampicineinfluss entstand das Bild einer dosisabhängigen Zunahme der Expression von OCN, welche sich im zeitlichen Verlauf zu verstärken schien. An Tag 14 stellte sich die Expression der Konzentration 5 µg/ml Rifampicin über dem Niveau der Kontrollen dar, an Tag 21 bereits Konzentrationen ab 0,5 µg/ml Rifampicin. Antibiotika unabhängig konnte eine zeitabhängige Expressionssteigerung über 21 Tage beobachtet werden.

Für die Beurteilung der Clindamycin induzierten Effekte konnte nicht ausreichend RNA gewonnen werden. Dadurch hat keine Analyse zur Beurteilung der Auswirkung von Clindamycin auf OCN stattgefunden.

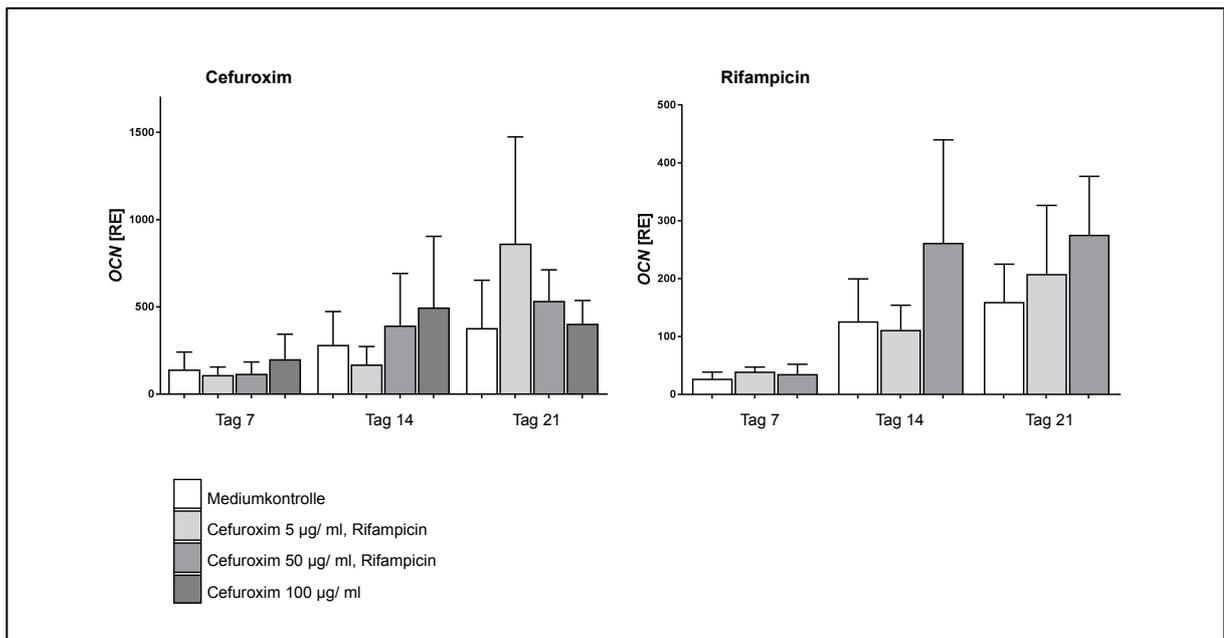


Abb. 19: Genexpression von OCN

An den Tagen 7 und 14 zeigten sich Hinweise auf eine geringfügige dosisabhängige Zunahme der OPG-Expression unter Cefuroximzugabe. Rifampicinzugabe zeigte an allen Tagen keinen Einfluss auf die Expression von IGF2.

OPG = Osteoprotegerin; RE = Relative Einheiten

Tag 7 Cefuroxim: n = 6, Tag 14 Cefuroxim: n = 5, Tag 21 Cefuroxim: n = 4

Tag 7, 14 Rifampicin: n = 3

3.5 Migration

Der Zusatz von Cefuroxim zeigte keinen signifikanten Einfluss auf das Migrationsverhalten der MSCs im Vergleich zu den Kontrollproben. Dies ist in Abbildung 20 dargestellt.

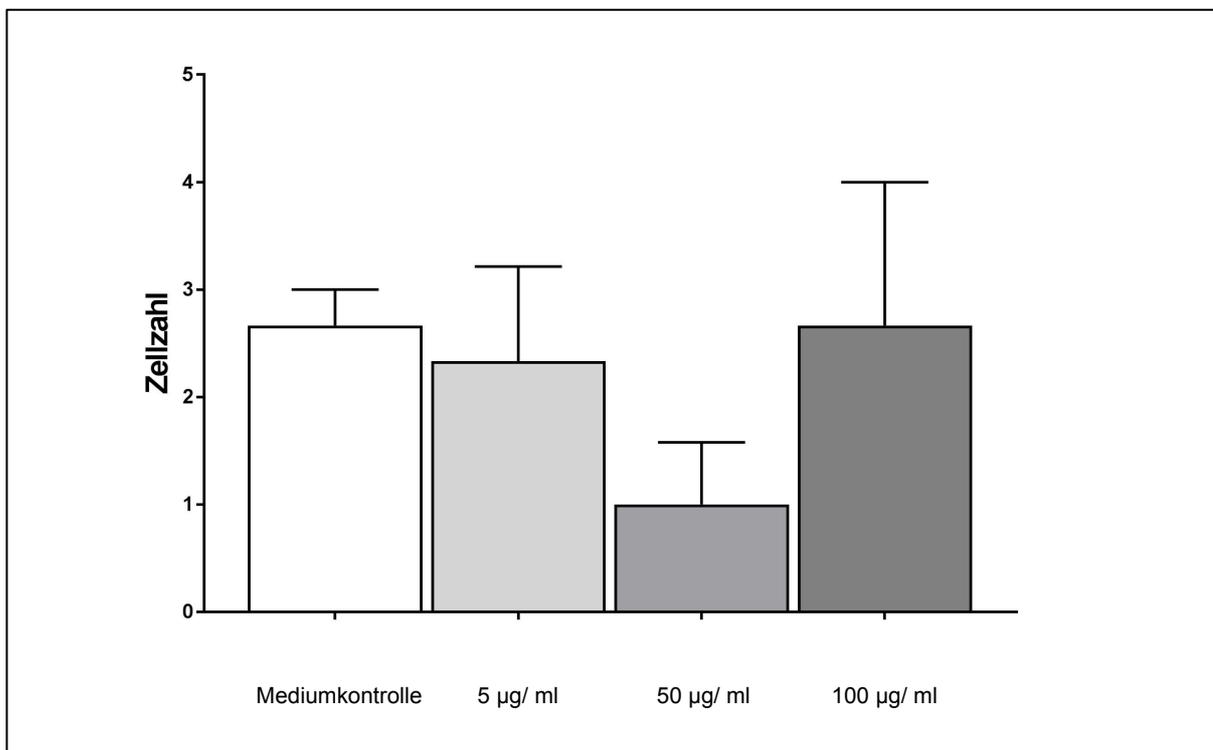


Abb. 20: Einfluss von Cefuroxim auf die Migrationsfähigkeit der hMSC

Der Zusatz von Cefuroxim zeigte keinen signifikanten Einfluss auf das Migrationsverhalten der hMSCs im Vergleich mit den Kontrollproben.

n = 3

4 Diskussion

Als eine der gefürchtetsten Komplikationen in der Endoprothetik gilt die periprothetische Infektion. Diese trete bei 0,8 bis 1,9 % der Kniearthroplastiken (14, 15) und 0,3 bis 1,7 % der Hüftarthroplastiken (15, 16, 17) auf. Daher spielen Antibiotika in der operativen Orthopädie eine essentielle Rolle. Die Kenntnisse des Einflusses vieler Antibiotika auf den Knochenstoffwechsel sind jedoch limitiert.

Daher wurde in dieser Studie der Einfluss verschiedener Konzentrationen der Antibiotika Cefuroxim, Rifampicin und Clindamycin auf Migration, Proliferation sowie die Differenzierung von humanen MSCs untersucht.

Zur Untersuchung des Einflusses der Antibiotika auf die Differenzierung von hMSCs zu Osteoblasten wurden in dieser Arbeit unterschiedliche Methoden verwendet. Rückschlüsse auf die Proliferation wurden mittels BrdU gezogen. Die Vitalität der Zellen wurde mittels MTT getestet. Färbungen der Alkalischen Phosphatase ließen Rückschlüsse auf die Mineralisierung der Zellen, Färbungen mittels Alizarin- Rot auf den Kalzifizierungsgrad der Zellen zu. Um einen Einblick auf die Wirkung auf Genebene zu erhalten wurde eine qRT- PCR angewandt. Dazu wurden Primer ausgewählt, welche häufig zur Beurteilung der Osteogenese herangezogen werden. So konnten Rückschlüsse über die Differenzierung der hMSCs unter Antibiotikazusatz im Vergleich zu unbehandelten Zellen in den Kontrollgruppen gezogen werden. Alle Experimente wurden an den Tagen 7, 14 und 21 durchgeführt.

4.1 Cefuroxim

Cefuroxim ist ein Antibiotikum aus der Gruppe der Beta- Lactamantibiotika. Es zählt zu den Cephalosporinen der zweiten Generation.

Es weist ein breites antimikrobielles Spektrum mit einer Wirksamkeit gegen grampositive und gramnegative Erreger auf (23). Aufgrund der ausgezeichneten Wirksamkeit gegen diese Pathogene ist es eines der am häufigsten zur Prophylaxe verwendeten Antibiotika (25, 26). Außerdem besitzt es eine hohe Stabilität gegen Beta- Lactamasen (23) und bietet eine gute Knochenpenetration (25, 27, 28, 29).

4.1.1 Migration

Eine physiologische Knochenheilung setzt sich aus einer Entzündungs-, Reparatur- und Umbauphase zusammen. Nach dem anfänglichen Entzündungsprozess migrieren hMSCs an die Traumastelle und die Proliferation findet statt. Anschließend kommt es über den Wnt-Signalweg zur Differenzierung zu Osteoblasten. Diese sind für die letzte Phase, die Umbauphase, verantwortlich. Sie beginnt 3- 4 Wochen postoperativ (62).

In dieser Arbeit konnten bezüglich der Migrationsfähigkeit von hMSCs unter Cefuroximzugabe keine signifikanten Ergebnisse generiert werden. Dennoch bildete sich der Trend ab, dass mit steigender Dosis die Migrationsfähigkeit abnimmt. Schon die Verwendung von 5 und 50 µg/ml Cefuroxim schien diese bereits einzuschränken. Bei 100 µg/ml Cefuroxim konnte kein Unterschied zwischen mit Cefuroxim versetzten und unbehandelten Zellen dargestellt werden. Diese Ergebnisse sollten jedoch kritisch betrachtet werden. Bei zwei von drei Spendern konnte bei dieser Konzentration keine einzige migrierte Zelle nachgewiesen werden. Lediglich bei einem der drei Spender konnten sogar mehr migrierte Zellen nachgewiesen werden als in Proben der Mediumkontrolle. Es ist wahrscheinlich, dass die schwierige Durchführung des Experiments zu Fehlern und zur Verfälschung dieses Wertes geführt hat. Weitere Versuche sollten diesen Zusammenhang dringend erneut beleuchten.

Die Fähigkeit zur Migration spielt zudem eine bedeutende Rolle bei der physiologischen Kallusbildung und enchondralen Ossifikation (63, 64). So kann durch die Auswirkung von Antibiotika auf die Kallusbildung auf die Migrationsfähigkeit von Zellen geschlossen werden. In diesem Sinne untersuchten Bissinger et al. die Kallusbildung unter Cefuroximeinfluss (64). Sie stellten heraus, dass nach dreiwöchiger Cefuroximtherapie keine bedeutenden Unterschiede in der Kallusbildung zwischen Kontroll- und Antibiotikagruppe bestanden haben (64).

In diesem Experiment wurden jedoch lediglich Konzentrationen zwischen 2 und 20 µg/ml Cefuroxim getestet (64). Um einen schädigenden Einfluss von Cefuroxim auf die Migrationsfähigkeit und damit auf eine physiologische Kallusbildung endgültig auszuschließen, sollten weitere *in vivo* Experimente durchgeführt werden.

4.1.2 Proliferation

In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass Cefuroxim einen dosisabhängigen Einfluss auf die Proliferation hat. Geringe Dosen von 5 µg/ml Cefuroxim zeigten an Tag 7 und 14 Hinweise auf eine geringfügig stärkere Proliferationsrate als die der Kontrollproben, wohingegen Dosen ab 50 bis 100 µg/ml zu einer teils signifikant verminderten Proliferationsrate der hMSCs im Vergleich zu unbehandelten MSCs führten. An Tag 21 wiesen

alle mit Cefuroxim behandelten hMSCs ein vermindertes Proliferationspotenzial auf. Diese Ergebnisse wurden mittels eines BrdU erhoben.

Salzmann et al. zogen Schlussfolgerungen auf die Proliferationsrate durch die Interpretation eines MTT (7). Sie konnten zeigen, dass die Verwendung von 25, 50 und 100 µg/ml Cefuroxim keine oder nur eine geringe positive Wirkung auf die Proliferation hatte. Nur höhere Konzentrationen von 250 und 1000 µg/ml Cefuroxim konnten signifikante zeit- und dosisabhängige positive Effekte auf die Proliferationsrate evozieren (7).

Die Unterschiede der Ergebnisse sollten im Kontext der ausgewählten Methode sowie den ausgewählten Kinetikpunkten exploriert werden. Zunächst ist zu betonen, dass in der vorliegenden Arbeit für die Beurteilung der Proliferationsraten eine BrdU und kein MTT gewählt wurde. Auch die Ergebnisse der MTT- Testung der vorliegenden Studie zeigten eine wie von Salzmann et al. beschriebene geringe Steigerung der Vitalität im Vergleich zur Mediumkontrolle (7). Bei 100 µg/ml Cefuroximzusatz zeigte sich noch eine 110 %ige Vitalität im Vergleich zu der Mediumkontrolle.

Jedoch führte die Zugabe von 1000 µg/ml zu einer Abnahme der Vitalität auf 72 % und nicht zu einer Steigerung, so wie bei Salzmann et al. beschrieben wurde (7). Dies kann durch die ausgewählten Kinetikpunkte erklärt werden. Die MTT-Testung dieser Arbeit wurde nach 4 Tagen durchgeführt. Die von Salzmann et al. explorierte signifikante Steigerung wurde nach einer Inkubationsdauer von 24, 48 und 72 Stunden detektiert (7). Denkbar wäre, dass eine kurzzeitige Inkubation von bis zu 72 Stunden auch bei Zugabe von hohen Konzentrationen von bis zu 1000 µg/ml Cefuroxim zu einer Steigerung der Proliferationsrate führt, längere Inkubationen hingegen zu einer Abnahme führen und bereits bei der Verwendung von geringen Konzentrationen von 50 µg/ml ausreichen, um die Proliferation signifikant einzuschränken.

4.1.3 BMP2, RUNX2, Mineralisierung und Kalzifizierung

BMP2 trägt eine wichtige Rolle für die chondrozytäre Proliferation und Reifung während der enchondralen Knochenentwicklung (65). Eine kurzzeitige Hochregulation der BMP2-Expression ist für die Induktion der Osteogenese notwendig (66). Das Fehlen von BMP2 führt zu einer erheblichen Beeinträchtigung der Osteogenese (67), welche vermutlich nicht durch andere osteogene Stimuli kompensiert werden kann (68).

In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass zu den Messzeitpunkten an Tag 7 und Tag 21 ein dosisabhängiger Einfluss auf die Expression von BMP2 bestand. Es zeigte sich das Bild einer mit ansteigender Konzentration abfallenden Expression von BMP2. Dabei überstieg an Tag 7 keine der verwendeten Konzentrationen das Niveau der unbehandelten Zellen. An Tag 21

ergaben sich Hinweise dafür, dass die Expression von BMP2 nach einer Inkubation von bis zu 50 µg/ml Cefuroxim das Expressionsniveau der Kontrollproben überstieg. Der Zusatz von 100 µg/ml Cefuroxim führte zu einer signifikant geringeren Expression im Vergleich zur Mediumkontrolle.

BMP2 ist, wie bereits geschildert, essentiell für die Induktion der Osteogenese (66). Die vorliegenden Daten geben erste Hinweise und zeigen an Tag 21 sogar signifikant, dass die Zugabe von 100 µg/ml Cefuroxim zu einer geringeren Expression von BMP2 führt. Daher ist nach 21-tägiger Inkubation mit hohen Dosen von Cefuroxim von einer eingeschränkten Osteogenese auszugehen. Es liegen bislang keine *in vivo* Daten über die Osteogenese sowie die Expression von BMP2 unter Cefuroximtherapie vor. Anschließende *in vivo* Experimente sollten die Frage klären, ob eine Cefuroximtherapie im klinischen Alltag die Induktion der Osteogenese beeinflusst.

BMP2 entfaltet seine osteogene Wirkung durch eine Induktion vieler verschiedener Gene. Durch eine Aktivierung des Notch-Signalweges konnte *in vitro* eine erhöhte Expression von BMP2 und eine daraus resultierende Induktion der ALP-Aktivität gezeigt werden (69). Auch der Umkehrschluss einer verminderten Aktivität von ALP durch eine Inhibition des Notch-Weges und der BMP2 Expression konnte dargestellt werden (70). Basierend auf diesen Beobachtungen wäre ein ähnliches Verhalten der Alkalischen Phosphatase im Vergleich zur BMP2 Expression zu erwarten. In dieser Arbeit wurde die Aktivität der Alkalischen Phosphatase durch Färbungen dargestellt.

Wie bereits zuvor erläutert, konnte ein antibiotikaunabhängiger zeitabhängiger Anstieg der Expression von BMP2 abgebildet werden. Außerdem zeigte sich eine dosisabhängige Abnahme der BMP2-Expression, welche sich an Tag 21 unter Zugabe von 100 µg/ml als signifikant erwies.

Die Ergebnisse der Färbung der Alkalischen Phosphatase konnten in gleicher Weise die zeitliche Zunahme der Aktivität der Alkalischen Phosphatase darstellen. Ebenso wurde der Trend des dosisabhängigen Einflusses gezeigt, welcher ähnlich der Expression von ALP an Tag 21 bei der Verwendung von 5 µg/ml Cefuroxim zu einer geringfügigen Steigerung, bei 50 µg/ml Cefuroxim zu keinem Effekt und bei 100 µg/ml zu einer verminderten Intensität der Färbung führte.

Salzmann et al. untersuchten in ihrer Arbeit ebenfalls die Cefuroxim-induzierten Wirkungen auf die Aktivität der Alkalischen Phosphatase (7). In ihrer Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass Konzentrationen von 25, 50 und 100 µg/ml Cefuroxim einen signifikanten Anstieg der

Aktivität der Alkalischen Phosphatase nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden verursachten (7).

Die höchste Cefuroximkonzentration von 1000 µg/ml führte zu einer zeitabhängigen Abnahme der ALP- Aktivität. Die Aktivitätswerte wurden nach 72 Stunden auf 37 % der Kontrollspiegel gesenkt (7).

Die zunächst konträr erscheinenden Ergebnisse können durch die gleiche Argumentation wie die der Proliferation schlüssig interpretiert werden. Auch in dieser Arbeit konnte eine geringe Aktivitätszunahme bei geringen Konzentrationen von Cefuroxim dargestellt werden. Es ist anzunehmen, dass aufgrund der Betrachtung nach 7, 14 und 21 Tagen anstatt nach 48-stündiger Inkubation bereits geringere Konzentrationen zu einer Abnahme der Aktivität und Expression der Alkalischen Phosphatase führten.

BMP2 führt aber nicht nur zur Induktion der Alkalischen Phosphatase, sondern auch zur Bildung von Verkalkungen. Dies konnte *in vitro* dargestellt werden (71). Daher war ein ähnliches Verhalten der Alizarinaktivität in diesem Versuch zu erwarten.

Generell zeigte sich eine zeitabhängige Zunahme der Kalzifizierung, ähnlich der Aktivitätszunahme von BMP2. Es konnte jedoch kein Effekt auf die Matrixkalzifizierung mittels Alizarin- Rot Färbung aufgrund des Zusatzes von verschiedenen Konzentrationen von Cefuroxim gezeigt werden. Als Grund dafür können methodische Probleme bei der Anfärbung mit Alizarin- Rot vermutet werden. Aufgrund des schmalen Grates zwischen Auswaschen des überschüssigen Färbemittels und Abwaschen der gefärbten Zellen sowie der raschen Ablösung und damit Dekantieren von stark kalzifizierten Zellen ergaben sich Fehler in der Darstellung des tatsächlichen Kalzifizierungsgrades, welche das Entstehen von hohen Standardabweichungen und der ungenauen Interpretation dieser verursacht haben. Außerdem führten in dieser Arbeit starke Unterschiede zwischen den verwendeten Spendern zu großen interindividuellen Abweichungen der Farbtintensitäten und daraus resultierenden hohen Standardabweichungen.

Diese Vermutungen entstanden verstärkt, da Salzmann et al. in ihrer Arbeit bei einem Zusatz von 25 und 50 µg/ml Cefuroxim eine Verdreifachung und bei 100 µg/ml eine Vervierfachung der Matrixverkalkung nachweisen konnten (7). Erst Konzentrationen von 250 µg/ml führten zu einer Abnahme. Konzentrationen von 1000 µg/ml Cefuroxim führten zu keiner Matrixkalzifizierung (7). Diese Ergebnisse lassen im Kontext der vorherigen Interpretationen der Proliferation sowie der Alkalischen Phosphatase vermuten, dass die Auswertung von späteren Kinetikpunkten eine schon bei geringeren Konzentrationen stattfindende negative

Beeinflussung der Kalzifizierung gezeigt hätte. Dies stünde im Einklang mit der dargestellten BMP2 Expression.

BMP2 führt außerdem zur eigentlichen Zielexpression von RUNX2 (72). RUNX2 ist essentiell sowohl für die enchondrale als auch für die intramembranöse Knochenbildung (73). Des Weiteren ist es grundlegend für die kontrollierte Expression und Differenzierung von Osteoblasten verantwortlich (74).

Das RUNX2 Expressionsmuster sollte demnach dem BMP2 Expressionsmuster ähneln. Tatsächlich konnten für die RUNX2 Expression keine signifikanten Ergebnisse generiert werden. Dennoch entstand nach 7- und 21- tägiger Inkubation das Bild einer dosisabhängigen Wirkung. Außerdem ist der Eindruck einer verzögerten Hochregulation entstanden. Während unbehandelte Zellen ihr Expressionsmaximum an Tag 14 aufwiesen, zeigten mit Cefuroxim behandelte Zellen einen zeitabhängigen Zuwachs der Expression mit einem Maximum an Tag 21. Es liegen bisher keine Daten anderer Studien bezüglich des Expressionsverhaltens von RUNX2 unter Cefuroximeinfluss vor.

4.1.4 IGF1/ 2, OPG

Allgemein bekannt ist, dass IGF1 eine wichtige Rolle beim postnatalen Knochenwachstum und der Knochenentwicklung trägt (75). IGF2 ist vor allem an der fetalen Phase von Wachstum und Differenzierung beteiligt (76). Es wird aber zudem als essentiell für die Erhaltung des Knochens im Erwachsenenalter angesehen (77). OPG trägt eine wesentliche Rolle bei der Inhibition der Osteoklastenbildung (78).

In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die Expression der Gene IGF1, IGF2 und OPG zeitabhängig zunimmt. Es konnten keine signifikanten Ergebnisse erzeugt werden, allerdings bildete sich ein eindeutiges dosisabhängiges Expressionsmuster heraus. Es wurde festgestellt, dass vor allem an den Tagen 7 und 21 die Zugabe der geringsten Konzentration von 5 µg/ml Cefuroxim eine leicht stärkere Expression von IGF1 bewirkt. Die Zugabe von 50 µg/ml Cefuroxim führte zu keiner oder einer geringfügig kleineren Expression. Zellen mit 100 µg/ml Cefuroximzugabe zeigten eine geringere Expression von IGF1. Experimente zur Untersuchung von IGF2 wiesen das gleiche dosisabhängige Muster zu allen Kinetikpunkten dieser Arbeit auf.

Zur Interpretation der Expression von OPG ist es wichtig zu betonen, dass IGF1 einen stimulierenden Effekt auf die Osteoblastogenese besitzt (79). Über diese Funktion führt IGF1 zu einem negativen Effekt auf die Expression von OPG (78). Dieses regulierende Verhalten von IGF1 ist zur Erhaltung des Gleichgewichtes zwischen Osteogenese und Osteoklastogenese bedeutend. Daher würde eine Untersuchung des Expressionsniveaus der genannten Gene

erwarten lassen, dass besonders hohe Expressionen von IGF1 zu einer geringeren Expression von OPG führen und umgekehrt. Dieser spiegelbildliche Effekt von IGF1 und OPG konnte in den vorliegenden Experimenten nachgewiesen werden. Der Zusatz von 5 µg/ml Cefuroxim hat nach siebentägiger Inkubation zu einer stärkeren Expression von IGF1 geführt. Diese starke Expression führte zu einer stärkeren Unterdrückung der Expression von OPG, sodass sich in den Experimenten eine verringerte Expression von OPG zeigte. Spiegelbildlich verhielt sich die Zugabe von 100 µg/ml Cefuroxim. Am Tag sieben führte sie zu einer verringerten Expression von IGF1. Dadurch wurde die Expression von OPG weniger herunterreguliert und es zeigte sich eine stärkere Expression von OPG im Vergleich zur Mediumkontrolle.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Verwendung von geringen Dosen Cefuroxim zu einer stärkeren Expression von IGF1 führt. Die Regulationsmechanismen zur Erhaltung eines Gleichgewichts zwischen Knochenaufbau und Knochenabbau scheinen dabei erhalten zu sein. So kann angenommen werden, dass geringe Konzentrationen von Cefuroxim einen positiven Effekt auf die Knochenheilung haben. Locatelli und Bianchi bestätigen diese Vermutung, indem sie in ihrer Arbeit darauf hinweisen, dass eine GH/- IGF1- Therapie eine signifikant anabole Wirkung auf den Knochen habe und das klinische Ergebnis der Behandlung von Knochenfrakturen erheblich verbessern könne (80).

Die geringfügig gesteigerte Expression von IGF1 im Vergleich zu Zellen der Kontrollproben ist aber auch kritisch zu betrachten, da bereits bekannt ist, dass IGF1 und IGF2 bei anhaltender Expression die Karzinogenese fördern können (81, 82). In dieser Arbeit konnte lediglich ein Hinweis auf eine geringfügig gesteigerte Expression von IGF1 und IGF2 nachgewiesen werden. Es ist fraglich, inwieweit sie Einfluss auf eine mögliche Karzinogenese haben kann. Vor allem in Anbetracht einer mehrwöchigen Therapie mit Cefuroxim sollte dieser Aspekt dennoch durch weitere *in vitro* und *in vivo* Studien beleuchtet werden.

Hohe Konzentrationen von 100 µg/ml Cefuroxim bewirkten gegenteilige negative Effekte auf die Expression von IGF1. Dennoch zeigte sich auch bei diesen Konzentrationen die kompensatorisch stattfindende Hochregulation von OPG als erhalten. Daher sollten weitere *in vivo* Experimente klären, ob die schützende Hochregulation von OPG ausreicht, um einen negativen Effekt auf die Osteogenese zu verhindern.

4.1.5 COL1A1

Des Weiteren wurde die Expression von COL1A1 untersucht. Es konnten keine signifikanten Ergebnisse, jedoch eindeutige Trends generiert werden. Besonders an Tag 21 konnte gezeigt werden, dass die Expression von COL1A1 dosisabhängig abnimmt.

Es sind keine anderen Arbeiten bekannt, in denen die Wirkung von Cefuroxim auf die Expression des Gens untersucht wurde. Es ist allerdings bekannt, dass COL1A1 eines der Schlüsselproteine für Reifung, Entwicklung und Mineralisierung von Knochen darstellt (83) und mit Mutationen im Gen COL1A1 unter anderem die Erbkrankheiten Osteogenesis imperfecta (84, 85) und der idiopathischen juvenilen Arthritis (86) assoziiert werden. Weitere Untersuchungen sollten folgen, um den tatsächlichen Einfluss von COL1A1 zu erforschen und herauszuarbeiten, ob eine längerfristige Cefuroximtherapie mit einhergehenden längerfristig erniedrigten COL1A1 Spiegeln die Knochenstabilität nachhaltig beeinträchtigen kann.

4.1.6 CRYAB

CRYAB ist ein humanes Hitzeschockprotein und ist unter anderem an der Zytoskelett-Assemblierung, Remodelierung und Stabilisierung, sowie Apoptosehemmung beteiligt (87). Zudem ist bekannt, dass die Expression von CRYAB bei verschiedenen Stressoren erhöht sein kann (88).

Es konnte nachgewiesen werden, dass Cefuroxim einen dosisabhängigen Effekt auf die Expression von CRYAB hat. Geringe Konzentrationen Cefuroxim hatten keinen oder einen geringen Effekt auf die Expression von CRYAB. Die Zugabe der höchsten Konzentration von 100 µg/ml Cefuroxim führte zu einer stärkeren Expression, welche sich an Tag 14 sogar signifikant darstellte.

Bislang gab es keine Studien, welche die Wirkung von Cefuroxim auf die Expression von CRYAB untersucht haben.

4.1.7 Schlussfolgerungen

Zusammenfassend konnten einige dosis- und zeitabhängige Effekte von Cefuroxim auf die Proliferation und die Osteogenese herausgearbeitet werden. Salzmann et al. wiesen nach, dass nach kurzzeitiger Cefuroximtherapie von bis zu 72 Stunden auch hohe Konzentrationen von bis zu 1000 µg/ml Cefuroxim einen positiven Einfluss auf die Proliferationsrate von hMSCs haben können (7). In der vorliegenden Arbeit wurde deutlich, dass jedoch nach 7 – 21 tägiger Cefuroximbehandlung diese gesteigerte Proliferation nicht mehr gegeben ist, sondern bereits die Zugabe von 50 µg/ml Cefuroxim zu einer signifikant geringeren Proliferation führt.

Neben der Einschränkung der Proliferationsfähigkeit bei Konzentrationen ab 50 µg/ml Cefuroxim konnte auch ein negativer Effekt auf die Kalzifizierung und Mineralisierung von hMSCs nachgewiesen werden. In dieser Arbeit konnten Hinweise darauf gefunden werden, dass bei langfristiger Inkubation ab 7 Tagen die Mineralisierung bei schon geringeren Dosen

eingeschränkt zu sein scheint. Andere Arbeiten zeigen, dass eine kurzzeitige Inkubation von bis zu 72 Stunden selbst bei Zusätzen von bis zu 100 µg/ml Cefuroxim noch zu einem positiven Effekt auf Mineralisierung und Kalzifizierung führt (7).

Basierend auf den Ergebnissen der beiden Studien kann davon ausgegangen werden, dass bei einer kurzfristigen Inkubation mit Cefuroxim höhere Konzentrationen auch zu einer Erhöhung des Mineralisierungspotentials der hMSCs führen. Wenn die hMSCs jedoch länger der gleichen Konzentration an Cefuroxim ausgesetzt sind, kann bereits bei niedrigeren Konzentrationen ein negativer Effekt auf die Mineralisierung der Zellen festgestellt werden.

Die Untersuchung der Induktion und des Ablaufs der Osteogenese durch BMP2 und RUNX2 ergab Hinweise auf einen negativen Effekt von Dosen ab 100 µg/ml Cefuroxim, der sich für die Expression von BMP2 an Tag 21 sogar als signifikant bestätigte. Des Weiteren zeigte sich das Bild einer um sieben Tage verzögerten Hochregulation der Expression von RUNX2 und damit ein verzögerter Beginn eines der wichtigsten Gene für die Osteogenese.

Auch Untersuchungen bezüglich der Expression von IGF1 und IGF2 ergaben Hinweise auf eine mit zunehmender Dosis abnehmende Expression der Gene. Der Regulationsmechanismus über OPG, welcher das Gleichgewicht zwischen Osteogenese und Osteoklastogenese sichern soll, stellte sich allerdings als erhalten heraus.

Die Beurteilung der Expression von COL1A1 ergab Hinweise auf eine mögliche Störung der Knochenstabilität bei Zugabe von Konzentrationen ab 100 µg/ml Cefuroxim. Die Beurteilung des Expressionsmusters von CRYAB, welches bei Aktivierung einiger Stressoren hochreguliert wird (88), vermittelte den Eindruck, dass die Zugabe 100 µg/ml Cefuroxim die hMSCs bei mehrtägiger Inkubation in einen Stresszustand versetzte.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass Cefuroxim in niedrigeren Konzentrationen keine hemmende Wirkung auf hMSC hat. Cefuroxim kann in niedriger Dosierung sogar einen positiven Einfluss auf die Mineralisierung und Verkalkung haben. Hohe Konzentrationen von Cefuroxim können jedoch die Proliferation von hMSC signifikant verringern. Diese hohen Konzentrationen scheinen bei intravenöser Gabe nicht erreicht zu werden (29). Allerdings können bereits mittlere Konzentrationen wie 50µg/ml Cefuroxim die Proliferation signifikant einschränken. Durch den gewählten Dosierungssprung von 5 auf 50 µg/ml Cefuroxim ist es nicht möglich, eine Aussage für Konzentrationen zwischen 5 und 50 µg/ml Cefuroxim zu treffen. Dies wäre wichtig, um den klinischen Einfluss von Cefuroxim abzuschätzen, da nach einer einmaligen intravenösen Injektion von 1,5 g Cefuroxim, einer standardisiert eingesetzten Dosis, durchschnittliche Femurknochenkonzentrationen von 18,6 mg/kg und

Tibiaknochenkonzentrationen von 15,5 mg/kg erreicht werden (29) können. Weitere *in vitro* Studien sollten also zwingend untersuchen, ob die *in vitro* gezeigten Einschränkungen der Proliferation auch für Konzentrationen zwischen 5 und 50 µg/ml nachgewiesen werden können.

Außerdem können bei lokaler Verabreichung, beispielsweise in imprägniertem Knochenzement durch die kontinuierliche Freisetzung von Antibiotika aus dem Knochenzement, Zellen längeren und höheren Konzentrationen von Antibiotika ausgesetzt werden (89). Dadurch gewinnt die Betrachtung der teils signifikant negativen Einflüsse von 50 und 100 µg/ml Cefuroxim an Bedeutung.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse sollten weitere *in vivo* Experimente die Wirkung von Cefuroxim testen. Bis zu der genaueren Untersuchung dieser Datenlage ist ein vorsichtiger Umgang mit hohen Dosen Cefuroxim anzuraten.

4.2 Rifampicin

Rifampicin ist ein bakterizides Antibiotikum aus der Gruppe der Ansamycine. Es wird zur Behandlung von periprothetischen Gelenkinfektionen aufgrund seiner Wirksamkeit gegen die bakterielle Biofilmbildung (31, 32, 33, 34, 35, 36) sowie anhaftende Staphylokokken (37) häufig verwendet.

Aufgrund des schnellen Auftretens von Resistenzen wird Rifampicin in Kombination mit anderen Antibiotika verabreicht, wodurch schätzungsweise eine orthopädische implantatassoziierte Infektion in bis zu 80- 90% aller Fälle verhindert werden kann (32, 37). Die Bedeutung von Rifampicin zur Behandlung von periprothetischen Infektionen ist daher unumstritten.

Rifampicin weist eine sehr gute Zell- und Gewebepenetration auf. Im Knochen können dadurch hohe Spiegel erreicht werden (59). In dieser Arbeit sollte daher die Frage geklärt werden, ob der Einsatz von Rifampicin zur Behandlung von implantatassoziierten Infektionen die Knochenreparatur beeinträchtigt. Dazu wurden die Auswirkungen der Konzentrationen 0,5, 5 und 50 µg/ml Rifampicin an den Tagen 7, 14 und 21 getestet. Die Konzentrationen liegen eng um den klinisch verwendeten Bereich (59).

4.2.1 Proliferation

Ein Teil dieser Arbeit bestand daraus, mittels BrdU Informationen über die Proliferationsrate von hMSCs mit und ohne Zusatz von verschiedenen Konzentrationen Rifampicin während osteogener Differenzierung zu erhalten.

Es konnte ermittelt werden, dass Rifampicin an allen Kinetikpunkten einen dosisabhängigen Effekt auf die Proliferation von hMSCs aufweist. Die Zugabe von 0,5 und 5 µg/ml Rifampicin zeigte Tendenzen für eine geringfügig verringerte Proliferation oder führte zu keiner Beeinflussung der Proliferation im Vergleich zu der Rate der Mediumkontrolle. Zellen mit einem Zusatz von 50 µg/ml Rifampicin zeigten an allen Kinetikpunkten eine signifikant geringere Proliferation als die der Mediumkontrolle.

Der MTT dieser Arbeit konnte ebenso zeigen, dass die Zugabe von 50, 100 und 1000 µg/ml zu einer Abnahme der Vitalität auf 83, 73 und 65 % führt.

Z. Zhang et al. zogen Schlussfolgerungen auf die Proliferationsrate durch die Interpretation eines MTT (42). Sie verwendeten neben einer Mediumkontrolle die Konzentrationen 4, 8, 16, 32, 64 und 128 µg/ml Rifampicin. Sie konnten nachweisen, dass ab einer verwendeten Konzentration von 32 µg/ml Rifampicin eine signifikant geringere Proliferation stattgefunden

hat, als in unbehandelten Zellen. Die Proliferationsrate bei diesen Konzentrationen stellte sich an Tag 1, 3 und 5 stets signifikant niedriger dar, als die Rate der Zellen ohne Antibiotikazusatz (42).

Die Ergebnisse der beiden Arbeiten können in Einklang gebracht werden (siehe Abbildung 21).

Da in der vorliegenden Arbeit größere Abstände zwischen den verschiedenen Konzentrationen von Rifampicin verwendet wurden, konnte lediglich eine signifikant verringerte Proliferation ab einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ Rifampicin dargestellt werden. Die nächst kleinere Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ besaß keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferation. Kleinere Dosierungsabstufungen hätten mit hoher Wahrscheinlichkeit bereits frühere signifikante Einbußen der Proliferation wie bei Zhang et al. aufzeigen können.

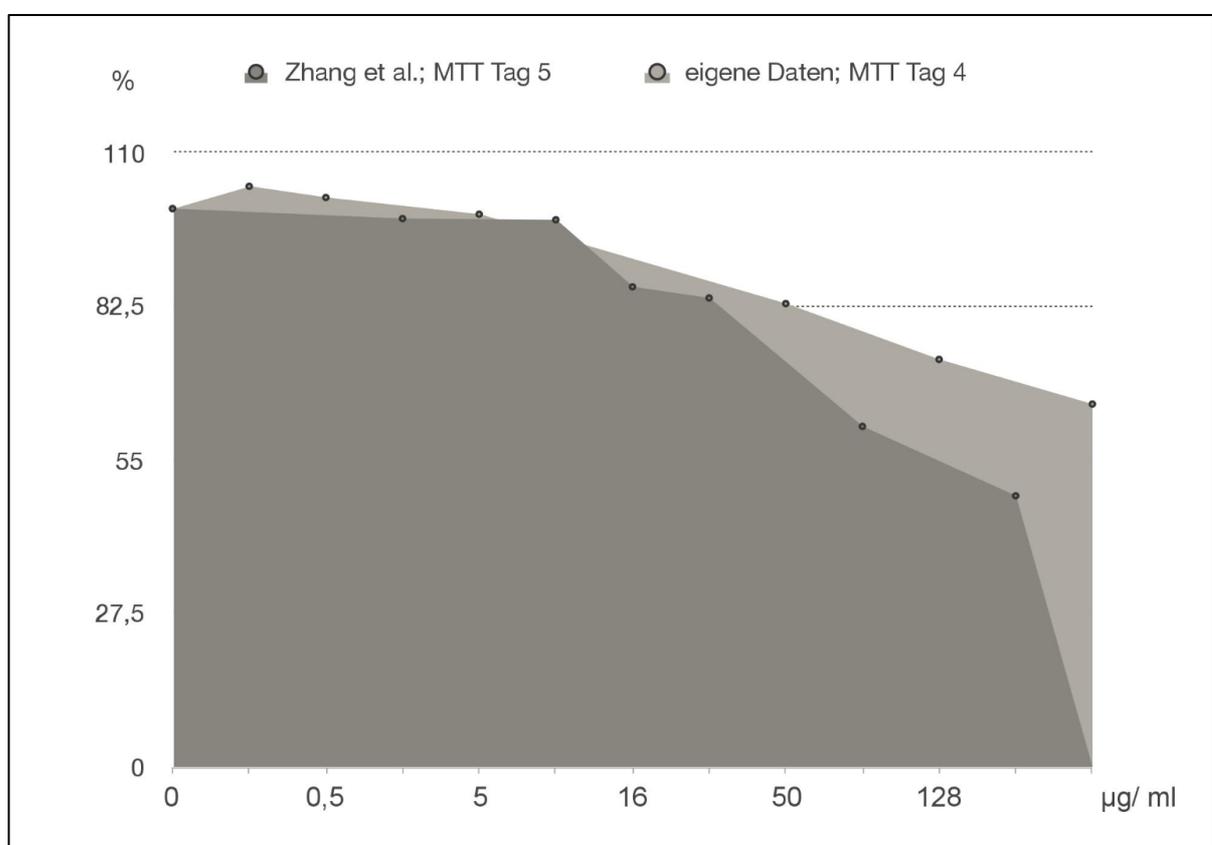


Abb. 21: Vergleich MTT: Zhang et al. Tag 5, die vorliegenden Daten Tag 4

Dargestellt sind die Ergebnisse des MTT der beiden Arbeiten. Die Daten der Konzentrationen 4, 8, 16, 32, 64 und 128 $\mu\text{g/ml}$ Rifampicin wurden der Arbeit von Zhang et al. entnommen und wurden an Tag 5 generiert. Die Daten der vorliegenden Arbeit sind die Konzentrationen 0,05, 0,5, 5, 50, 100 und 1000 $\mu\text{g/ml}$ Rifampicin und wurden an Tag 4 generiert.

Auch Rathbone et al. konnten in einem Vergleich von einigen Antibiotika nach 10 und 14-tägiger Inkubation zeigen, dass Rifampicin zu den Antibiotika mit den größten negativen Effekten auf die Zellzahl gehört (90). Eine Abnahme der Zellzahl um $> 75\%$ wurde bei einer

verwendeten Konzentration von 100 µg/ml dargestellt (90).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass Rifampicin mit ansteigender Dosierung toxisch wirkt und die Proliferation nachhaltig beeinträchtigt.

4.2.2 Mineralisierung und Kalzifizierung

ALP ist für die Mineralisierung der extrazellulären Matrix verantwortlich (91). Es konnte an allen getesteten Tagen gezeigt werden, dass die Aktivität der Alkalischen Phosphatase mit steigender Dosierung sinkt. Dabei führte erneut die Verwendung 50 µg/ml Rifampicin zu hoch signifikanten Einbußen der Aktivität der Alkalischen Phosphatase. Eine verminderte Mineralisierung bei der Verwendung von 50 µg/ml Rifampicin lag dabei bereits nach sieben tägiger Antibiotikabehandlung vor.

Z.Zhang et al. untersuchten in ihrer Arbeit ebenfalls die Rifampicin- induzierten Wirkungen auf die Aktivität der Alkalischen Phosphatase (42). Sie nutzten dazu die Real- time- PC und untersuchten die Zellen nach 28- tägiger Inkubation. In ihrer Arbeit konnte exploriert werden, dass Konzentrationen ab 16 µg/ml Rifampicin einen signifikant reduzierenden Einfluss auf die Aktivität der Alkalischen Phosphatase hatten (42).

Eine weitere Studie konnte eine Abnahme der Aktivität der Alkalischen Phosphatase um > 75 % nach einer Zugabe von 100 µg/ml Rifampicin zeigen (90, 92).

Durch die größeren Dosierungsabstände dieser Arbeit konnten lediglich signifikante Verringerungen der Mineralisierung bei Konzentrationen ab 50 µg/ml nachgewiesen werden. Die nächst niedrigere Konzentration lag bei 5 µg/ml Rifampicin. Auch bei diesen Konzentrationen konnten Z. Zhang et al. keine Unterschiede feststellen (42). Durch den Versuchsaufbau dieser Arbeit kann keine gesicherte Aussage über den Einfluss auf die Mineralisierung von Konzentrationen zwischen 5 und 50 µg/ml getroffen werden. Es ist aber davon auszugehen, dass schon bei geringeren Konzentrationen eine geringere Mineralisierung hätte aufgedeckt werden können und die Ergebnisse von Z. Zhang et al. und dieser Arbeit deckungsgleich sind.

Mittels Alizarin- Rot Färbung konnte gezeigt werden, dass der Zusatz von 50 µg/ml Rifampicin nach 21- tägiger Inkubation zu einer signifikant verminderten Kalzifizierung führt. Schon an Tag 14 entstand das Bild eines verringerten Grades der Kalzifizierung.

Auch Z. Zhang et al. konnten in ihrer Arbeit bei einem Zusatz von steigenden Rifampicinkonzentrationen eine Verringerung von Kalziumknötchen darstellen (42).

So kann als Zwischenresümee festgehalten werden, dass die Zugabe von 0,5 und 5 µg/ml

Rifampicin zu keinem signifikanten Einfluss auf die Kalzifizierung sowie Mineralisierung von hMSCs führt. Höhere Konzentrationen von 50 µg/ml Rifampicin können jedoch einen stark negativen Einfluss auf Diese haben. Dadurch ist ein negativer Einfluss von hohen Rifampicinkonzentrationen auf die Differenzierung von hMSCs und die Osteogenese wahrscheinlich.

4.2.3 Expression osteogener Marker

Aufgrund der stark toxischen Wirkung von Rifampicin mit steigenden Konzentrationen war es nicht möglich, Informationen über die Expression der getesteten Gene bei der verwendeten Konzentration von 50 µg/ml Rifampicin zu gewinnen. Selbst die Isolierung der doppelten Menge RNA für die Beurteilung mittels PCR reichte nicht aus, um unverfälschte Ergebnisse zu erhalten. Daher wurden alle Analysen der Expression von osteogenen Markern unter Rifampicineinfluss lediglich bei Zellen mit einem Zusatz von 0,5 und 5 µg/ml Rifampicin durchgeführt.

Die Genexpression von BMP2, RUNX2, OPG, OCN, IGF1 und IGF2 unter Zugabe von 0,5 und 5 µg/ml Rifampicin zeigte sich im Vergleich zu den Kontrollproben unverändert.

Z.Zhang et al. untersuchten in ihrer Arbeit die Rifampicin- induzierten Wirkungen auf die Expression von RUNX2 und COL1A1 (42). Sie nutzten dazu die Real- time- PC sowie einen Western Blot und untersuchten die Zellen nach 28- tägiger Inkubation. In ihrer Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass Konzentrationen ab 16 µg/ml Rifampicin einen signifikant reduzierenden Einfluss auf Expression von RUNX2 und COL1A1 haben (42).

Z. Zhang et al. haben in ihrer Arbeit eine dreifach höhere Konzentration im Vergleich zur vorliegenden Arbeit verwendet. Dadurch sind die dort erhobenen Ergebnisse zu erklären. Vermutlich hätten auch die Experimente dieser Arbeit ähnliche Ergebnisse bei gleicher Konzentration zeigen können. Diese Vermutung bestätigt die Analyse der Expression von CRYAB. Es konnten Hinweise dafür detektiert werden, dass Zellen unter Zugabe von 5 µg/ml Rifampicin eine gesteigerte Expression von CRYAB im Vergleich zu unbehandelten Zellen aufweisen. Alpha Crystallin ist, wie zuvor beschrieben, ein Hitzeschockprotein (93, 94, 95, 96). Es ist bekannt, dass die Expression von CRYAB bei verschiedenen Stressoren erhöht sein kann (88). Diese Ergebnisse geben also Indizien dafür, dass geringere Dosen Rifampicin die Zellen schon vor einer toxischen Wirkung in einen Stresszustand versetzen und negativ beeinflussen können.

4.2.4 Schlussfolgerungen

In dieser Arbeit konnten signifikante Einschränkungen der Vitalität, Proliferation, Mineralisierung und Kalzifizierung ab einer Zugabe von 50 µg/ml Rifampicin verzeichnet werden.

Andere Autoren zeigen eine weitaus früher einsetzende Störung dieser Prozesse (42, 90). Als Grund dafür kann der in dieser Arbeit sehr große Dosierungssprung von 5 µg/ml auf 50 µg/ml vermutet werden. Unterstützend für diese Annahme kann die gesteigerte Expression von CRYAB unter Zugabe von

5 µg/ml Rifampicin hinzugezogen werden, da Alpha Crystallin unter Einfluss von Stressoren erhöht sein kann (88). Dies bedeutet, dass bereits Zellen, welche keine signifikant negative Auswirkung auf die Differenzierung durch niedrige Konzentrationen von Rifampicin aufwiesen, Stress ausgesetzt waren und so negativ beeinflusst worden sind.

Eine physiologische osteogene Differenzierung ist bedeutend für das Knochenwachstum, die Frakturheilung und auch die Osteointegration von knochenverankerten Implantaten (97).

Erste signifikant negative Einflüsse auf die Mineralisierung und Expression von COL1A1 und RUNX2 verzeichneten Zhang et al. ab Konzentrationen von 16 µg/ml (42). Hinweise für einen vermehrten Stress der Zellen unter Zugabe von 5 µg/ml Rifampicin konnten in dieser Arbeit gesammelt werden. Nach standardisiert eingesetzten Rifampicindosierungen werden im Knochen Konzentrationen zwischen 1,4 und 8,8 µg/g erreicht (98).

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse sollten weitere *in vivo* Experimente die Wirkung von Rifampicin in realitätsnäheren Versuchen testen. Bis zu der genaueren Untersuchung dieser Datenlage ist ein vorsichtiger Umgang von hohen Dosen Rifampicin anzuraten.

4.3 Clindamycin

Clindamycin gehört zur Gruppe der Lincosamid- Antibiotika mit gutem Wirkspektrum gegen aerobe und anaerobe Gram- positive Erreger (51, 52).

Aufgrund seiner hervorragenden Fähigkeit zur Knochenpenetration (43, 99, 100, 101, 102, 103) wird Clindamycin häufig zur Behandlung von Knochen- und Gelenkinfektionen durch Gram-positive Pathogene bei Erwachsenen (44, 45, 46, 47, 48) und bei Kindern (49) eingesetzt. Auch Protheseninfektionen, chronische Osteomyelitis und die Infektionsprophylaxe durch imprägnierten Knochenzement gehören zum Einsatzgebiet von Clindamycin (50).

In der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, ob der bisherige Einsatz von Clindamycin zur Behandlung von Knochen- und Protheseninfektionen unbedenklich für die Heilung des Knochens und die Osteointegration der Prothese ist.

4.3.1 Proliferation

Ein Teil der Arbeit bestand daraus, mittels BrdU Informationen über die Proliferationsrate von hMSCs mit und ohne Zusatz von verschiedenen Konzentrationen Clindamycin während osteogener Differenzierung zu erhalten.

Bei mit Clindamycin behandelten Zellen konnte keine signifikante zeit- und dosisabhängige Veränderung der Proliferation im Vergleich zu den Kontrollproben beobachtet werden. Bei genauer Betrachtung zeigte sich der Trend einer dosisabhängigen sowie sehr geringfügigen Abnahme der Proliferationsrate. Auch der durchgeführte MTT bestätigte dieses Bild. Es konnte dort eine geringfügige Abnahme der Vitalität mit steigender Konzentration festgestellt werden. Bei Verwendung von 0,05 µg/ml Clindamycin lag die Vitalität noch bei 100 % der Mediumkontrolle, nahm dann aber mit zunehmender Konzentration bei 100 µg/ml Clindamycin auf 95 % der Proben ohne Antibiotikazusatz ab.

Naal et al. zogen Schlussfolgerungen auf die Proliferationsrate durch die Interpretation eines MTT (50). Sie konnten nachweisen, dass Clindamycin in einer dosisabhängigen Weise einen negativen Effekt auf die Proliferation ausübt. Der Zusatz von 100 µg/ml Clindamycin führte zu einer signifikant verminderten Proliferation nach 24-stündiger Inkubation ($p < 0,01$). Der Zusatz von 500 µg/ml Clindamycin führte sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden zu einer signifikant geringeren Proliferation ($p < 0,01$) im Vergleich zu der Proliferationsrate von Zellen ohne Antibiotikazusatz. Nach 72 Stunden bewirkten schon geringe Konzentrationen von 10 µg/ml Clindamycin eine signifikante Abnahme der Proliferation. Die Proliferationsrate nach Zusatz von 500 µg/ml Clindamycin bewirkte eine signifikante Abnahme auf 3,5 % ($p < 0,01$)

der Kontrollproben. Naal. et al. vermuten, dass nach 72- stündiger Inkubation Clindamycin in niedrigen Konzentrationen zytostatische Wirkungen auf Osteoblasten besitzt und hohe Konzentrationen von Clindamycin zytotoxische Effekte aufweisen (50). Dies untermauern sie durch die von ihnen dargestellte signifikant gesteigerte LDH Aktivität von Zellen nach 48- und 72- stündiger Inkubation mit 500 µg/ml Clindamycin (50).

Die Ergebnisse ihrer Arbeit stehen im Kontrast zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. In der vorliegenden Arbeit wurden keine vergleichbar hohen Konzentrationen getestet, wie in der Arbeit von Naal et al. Daher ist es nicht möglich, Aussagen über die Auswirkung von Konzentrationen über 50 µg/ml Clindamycin zu treffen. Allerdings zeigten sie nach 72- stündiger Inkubation auch bei der vergleichbaren Konzentration von 50 µg/ml Clindamycin eine signifikant verminderte Proliferationsrate, welche in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden konnte. Dabei ist zu beachten, dass in den verglichenen Arbeiten unterschiedliche Kinetikpunkte gewählt wurden. Naal et al. weisen in ihrer Arbeit allerdings darauf hin, dass die Einschränkung der Proliferation mit der Dauer der Inkubation größer werde und so auch geringere Konzentrationen des Antibiotikums ausreichen würden, um einen signifikant mindernden Effekt auszuüben. Diese Vermutung würde dazu führen, dass durch die 7 bis 21- tägige Inkubation dieser Arbeit im Vergleich zu Naal et al. 24 bis 72- stündiger Inkubation die Proliferationsrate bei noch niedrigeren Konzentrationen eingeschränkt sein müsste. Dies konnte nicht nachgewiesen werden.

Zu beachten ist weiterhin die unterschiedliche Methodenwahl. In dieser Arbeit wurden Aussagen über die Proliferation mittels BrdU, in der Arbeit von Naal. et al. mittels eines MTT getroffen. Doch auch die nach viertägiger Inkubation durchgeführte MTT- Testung mit Einschluss von einem Zusatz von 100 µg/ml Clindamycin konnte diese Ergebnisse nicht generieren. Es zeigte sich zwar sowohl in der BrdU, als auch im MTT eine geringfügig verminderte Proliferation bzw. Vitalität der Zellen, jedoch in keinem vergleichbaren Maße.

4.3.2 Expression osteogener Marker, Mineralisierung und Kalzifizierung

Der *insulin- like growth factor 2* (IGF2) trägt eine entscheidende Rolle bei der Verstärkung des Wachstums von humanen Knochenzellen (76). IGF2 ist vor allem an der fetalen Phase von Wachstum und Differenzierung beteiligt (76). IGF2 wird aber nicht nur während des Wachstums, sondern auch zur Erhaltung von Knochen im Erwachsenenalter als bedeutend angesehen (77). Einer Studie ist zu entnehmen, dass in osteoporotischen Knochen die IGF2 Produktion herunterreguliert ist (104). Außerdem hat IGF2 durch die Anlagerung der Knochenmatrix, sowie die Kollagenproduktion einen Einfluss auf die Differenzierung (105)

und besitzt antiapoptotische Wirkung (106).

In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die IGF2- Expression der Kontrollproben ein Maximum an Tag 14 erreichte. Die Expression von clindamycinbehandelten Zellen stieg auf einem niedrigeren Niveau bis Tag 21 weiter an. Da nach 21 Tagen keine weiteren Daten generiert wurden, kann nicht festgestellt werden, ob dort das Expressionsmaximum erreicht wurde. Vermutlich wäre Dieses aber erst zu einem späteren Zeitpunkt erreicht worden, da sich das Expressionsniveau der clindamycinbehandelten Zellen an Tag 21 immer noch geringer darstellte als jenes der Kontrollen an Tag 14. Die verzögert einsetzende Hochregulation der Genexpression hatte zufolge, dass sich an den Tagen 7 und 14 die Expression von clindamycinbehandelten Zellen geringer darstellte als in den Kontrollproben. Durch den Abfall der Expression von IGF2 nach dem Expressionsmaximum der Kontrollproben an Tag 14 und die weiterhin stattfindende Hochregulation der Expression der Zellen mit Clindamycinzusatz erreichten an Tag 21 Zellen mit Clindamycin das Expressionsniveau der Kontrollproben. Es ist allerdings wichtig hervorzuheben, dass sich an Tag 21 das Expressionsniveau von Kontrollprobe und Probe mit Clindamycinzusatz ähnlich darstellte, das Niveau der Expression aber weiterhin sehr viel geringer war, als jenes der Kontrollen an Tag 14.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass in Clindamycin behandelten Zellen die Hochregulation der IGF2- Produktion um mindestens eine Woche verzögert zu sein scheint. Selbst nach 21- tägiger Inkubation zeigte sich eine geringere Expression als in unbehandelten Zellen nach zweiwöchiger Inkubation.

IGF2 besitzt, wie bereits zuvor erläutert, einen Einfluss auf die Kollagenproduktion (105). Passend dazu zeichnete die Expression von COL1A1, Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix (107), an den Tagen 14 und 21 den Trend einer konzentrationsunabhängig verminderten Expression dar. Die Testung weiterer Spender würde vermutlich zu signifikanten Ergebnissen führen.

CRYAB wird in Stresssituationen hoch reguliert (88) und entfaltet eine den Knochen stabilisierende und antiapoptotische Wirkung um den Knochen zu schützen (87).

In dieser Arbeit konnten keine signifikanten Ergebnisse bezüglich der Expression von CRYAB unter Clindamycinzusatz generiert werden. Allerdings entstanden eindeutige dosisabhängige Trends unter Clindamycinzugabe. Mit steigender Dosis von Clindamycin zeigte sich das Bild einer zunehmend stärkeren Expression von CRYAB.

Die Testung der Expression von COL1A1, IGF1, BMP2 konnte weder signifikante Ergebnisse,

noch dosisabhängige Trends unter Clindamycinzusatz zeigen.

In dieser Arbeit konnte außerdem kein Effekt auf die Kalzifikation der Zellen mittels Alizarin-Rot Färbung für die Konzentrationen 0,5, 5 und 50 µg/ml Clindamycin an den Tagen 7, 14 und 21 dargestellt werden.

Auch Naal et al. konnten in ihrer Arbeit keine signifikanten Ergebnisse generieren (50). Sie konnten allerdings eine dosisabhängige Wirkung von Clindamycin aufweisen. Eine Zugabe von 10 µg/ml Clindamycin bewirkte eine dreifach und 25 µg/ml Clindamycin eine zweifach stärkere Kalzifizierung. Die Zugabe von 50 µg/ml Clindamycin führte zu einer geringeren, 100 und 500 µg/ml Clindamycin zu keiner Matrixkalzifizierung (50).

Als Grund für die voneinander abweichenden Ergebnisse können starke Unterschiede zwischen den in dieser Arbeit verwendeten Spendern aufgeführt werden, welche zu großen interindividuellen Abweichungen der Farbintensitäten und daraus resultierenden hohen Standardabweichungen geführt haben. Eine größere Anzahl an Spendern sollte zur Verfeinerung der Ergebnisse angeschlossen werden.

OPG hat eine wesentliche Rolle bei der Inhibition der Osteoklastenbildung (108, 109). In dieser Arbeit zeigten sich bezüglich der Expression von OPG zwar keine Signifikanzen, dafür aber eindeutige Trends. OPG schien an den Tagen 7 und 14 mit steigender Dosis stärker, an Tag 21 schwächer exprimiert worden zu sein. Zu keinem Zeitpunkt und bei keiner der verwendeten Konzentrationen überschritt die Expression jedoch die Konzentration der Kontrollproben. Dies würde bedeuten, dass Clindamycin über eine geringere Expression von OPG zu einer verminderten Inhibition der Osteoklastogenese führt. Dadurch würde es zu einem Überwiegen von knochenabbauenden Prozessen kommen.

Im Kontrast zu diesem Ergebnis scheint das Ergebnis der Expression von RUNX2 zu stehen, da RUNX2 ein essentielles Gen für die Osteogenese darstellt (110).

In dieser Arbeit konnte bei Zellen mit Zugabe von 0,5 und 5 µg/ml Clindamycin ein positiver Effekt auf die Expression von RUNX2 an den Tagen 7 und 14 festgestellt werden. Die Verwendung von 0,5 µg/ml Clindamycin an Tag 7 stellte sich sogar als signifikant dar. Der Zusatz von 50 µg/ml Clindamycin führte zu keinem Expressionsunterschied zwischen Antibiotika behandelten und unbehandelten Zellen.

Ein möglicher Erklärungsansatz für diese zunächst widersprüchlich erscheinenden Ergebnisse könnte sein, dass RUNX2 kompensatorisch aufgrund der niedrigeren Expression von OPG hochreguliert wird und es ohne diesen Schutzmechanismus zu einer noch stärkeren Herunterregulation der OPG- Expression käme. Ein weiterer denkbarer Ansatz wäre, dass die

RUNX2- Überexpression die terminale osteoblastäre Differenzierung hemmt (110) und es zu einer gesteigerten Knochenresorption kommt. Dies könnte durch das vermehrt aktive RANK-System zustande kommen (111).

Die Alkalische Phosphatase gilt als Knochenspezifischer Marker und beeinflusst die Mineralisierung der extrazellulären Matrix (91).

In der vorliegenden Arbeit konnte durch das Anfärben der Alkalischen Phosphatase die Tendenz einer mit steigender Konzentration abnehmenden Aktivität der Alkalischen Phosphatase gezeigt werden. Der 14- bzw. 21-tägige Einsatz von 0,5 und 5 µg/ml Clindamycin bewirkte eine intensivere Färbung der Alkalischen Phosphatase und Zellen mit 50 µg/ml Clindamycinzusatz unterschritten das Farbniveau der Kontrollproben ohne Antibiotikazusatz im Schnitt leicht. Diese Ergebnisse geben erste Hinweise darauf, dass die Zugabe von geringen Konzentrationen von bis zu 5 µg/ml Clindamycin eine Aktivitätssteigerung der Alkalischen Phosphatase bewirken können. Dadurch würde im Vergleich zu unbehandelten Zellen vermehrt Mineralisierung stattfinden. Höhere Konzentrationen ab 50 µg/ml schienen allerdings einen geringfügig verminderten bis keinen Einfluss auf die Mineralisierung zu haben.

Naal et al. untersuchten in ihrer Arbeit ebenfalls die Clindamycin- induzierten Wirkungen auf die Aktivität der Alkalischen Phosphatase (59). In ihrer Arbeit konnte gezeigt werden, dass nach 24- ($p < 0,05$) und 48- stündiger ($p < 0,01$) Inkubation der Zusatz von 10 µg/ml Clindamycin eine signifikante Aktivitätssteigerung der Alkalischen Phosphatase bewirkte. Hohe Konzentrationen von Clindamycin wiesen einen gegenteiligen Effekt auf. Außerdem beschreiben Naal et al. eine zeitabhängige Abnahme der Aktivität der Alkalischen Phosphatase. Zellen nach 24- und 48- stündiger Inkubation mit 10 µg/ml Clindamycin wiesen eine signifikant höhere Aktivität der Alkalischen Phosphatase auf ($p < 0,01$), wohingegen die gleiche Konzentration nach 72- stündiger Inkubation zu einer geringeren Aktivität als nach 24- bzw. 48-stündiger Inkubation ($p < 0,01$) führte. Die Zugabe von höheren Konzentrationen zwischen 50 und 500 µg/ml Clindamycin führte bereits nach 48- stündiger Inkubation zu einer geringeren Aktivität als nach 24-stündiger Inkubation (50).

Auch in dieser Arbeit konnten Hinweise auf eine Aktivitätszunahme bei der Verwendung von geringen Konzentrationen von Clindamycin gefunden werden. Da die Färbung erst nach einem längeren Zeitraum betrachtet wurde, verstärkte sich vermutlich die von Naal et al. nachgewiesene zeitabhängige Annäherung an die Werte der Mediumkontrolle (50), wodurch vermutlich geringere Effekte herausgearbeitet werden konnten.

4.3.3 Schlussfolgerungen

Eine physiologische osteogene Differenzierung ist bedeutend für das Knochenwachstum, die Frakturheilung und auch die Osteointegration von knochenverankerten Implantaten (97).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit geben Hinweise darauf, dass Clindamycin die Expression von IGF2 verzögern und einschränken könnte, wodurch die Aufgabe von IGF2, dem Erhalten von gesunder Knochensubstanz (77), nur eingeschränkt möglich zu sein scheint. Hinzu kommt die Zuständigkeit für die Bildung von Kollagen, welche auch negativ beeinflusst werden könnte (105). Die Expressionswerte von COL1A1 (107), Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix, geben nach 14- und 21- tägiger Inkubation ebenfalls Hinweise auf eine verminderte Expression. Des Weiteren wurde das pro osteogenetische Gen OPG zu jedem getesteten Zeitpunkt und jeder getesteten Konzentration geringer exprimiert, als in Zellen ohne Clindamycinzusatz. Dadurch entsteht vermutlich eine vermehrte pro osteoklastische Wirkung. So scheint ein instabilerer Knochen zu entstehen, in dem die abbauende Funktion der Osteoklasten weniger gehemmt wird. Ein weiteres Indiz dafür ist die ermittelte dosisabhängige Steigerung der Expression von CRYAB. CRYAB wird in Stresssituationen hoch reguliert (88) und entfaltet eine den Knochen stabilisierende und antiapoptotische Wirkung um den Knochen zu schützen (87). Da RUNX2 als essentieller Faktor für die Osteogenese aufgeführt wird (112), scheinen die in dieser Arbeit dargestellten Tendenzen einer Hochregulation von RUNX2 bei Verwendung von geringen Konzentrationen Clindamycin zunächst im Gegensatz zu den bisherigen Ergebnissen zu stehen. Allerdings ist ebenso bekannt, dass eine RUNX2-Überexpression die terminale osteoblastäre Differenzierung hemmt (110) und es so zu einer gesteigerten Knochenresorption kommt. Dies bestätigt die Annahme, dass es durch die verminderte OPG- Expression zu einer verstärkten Osteoklastenaktivität kommen könnte.

Allerdings zeigte diese Arbeit und auch die Arbeiten anderer Autoren im Gegenzug Hinweise auf einen positiven Effekt von niedrigen Konzentrationen Clindamycin auf die Mineralisierung des Knochens.

Insgesamt ergaben die Untersuchungen einige Hinweise auf einen negativen Einfluss von Clindamycin auf die Bildung eines physiologischen Knochens. Dieser Effekt tritt scheinbar bereits bei niedrigen Dosen von 0,5 und 5 µg/ml Clindamycin auf. Diese Konzentrationen werden bereits durch eine standardisierte perioperative Prophylaxe erreicht. Bei 30 Patienten, welche einen Tag vor dem Eingriff in achtstündigen Abständen je 300 mg Clindamycin verabreicht bekamen, wurden perioperativ durchschnittliche Clindamycinkonzentrationen im Knochen von 2,63 +/- 1,76 µg/ml erreicht (43).

In dieser Arbeit konnten hauptsächlich Hinweise auf einen negativen Effekt auf die Osteoblastogenese dargestellt werden. Daher und aufgrund der sehr lückenhaften Erforschung bezüglich seiner Auswirkungen auf die Knochenheilung, ist es zu diesem Zeitpunkt nicht möglich, von einem definitiv schädlichen Effekt von Clindamycin auf die Knochenbildung zu sprechen. Aufgrund der aufgezeigten Tendenzen sollten weitere Studien die Auswirkungen von Clindamycin auf Osteoblasten unbedingt zusätzlich erforschen.

4.4 Abschließende Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Studie konnten Indizien gesammelt werden, dass sich die Antibiotika Cefuroxim, Rifampicin und Clindamycin teilweise signifikant negativ auf die frühe Phase der Knochenheilung auswirken können. Diese Ergebnisse unterstützen die in vorangegangenen Studien erhobenen Hinweise eines negativen Einflusses von Antibiotika auf die Knochenheilung.

Ob sich diese *in vitro* Ergebnisse im klinischen Alltag wiederfinden, muss durch weitere *in vivo* Experimente und klinisch randomisierte Studien geklärt werden. Bis zu der genaueren Untersuchung dieser Datenlage ist ein vorsichtiger Umgang von hohen Dosen der thematisierten Antibiotika anzuraten.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

- 1 Kubo H, Czerwinski S, Schrupf H, Buhren B, Prodinger P, Krauspe R, Pilge H. Rifampicin has - Compared to clindamycin - A dose and time dependent effect on hMSCs during osteogenic differentiation *in vitro*. *J Orthop*. 2021 Jul 9;26:49-53.
- 2 Jones, C. A., L. A. Beaupre, D. W. Johnston, and M. E. Suarez-Almazor. 2005. 'Total joint arthroplasties: current concepts of patient outcomes after surgery', *Clin Geriatr Med*, 21: 527-41, vi.
- 3 Lavernia, C. J., J. F. Guzman, and A. Gachupin-Garcia. 1997. 'Cost effectiveness and quality of life in knee arthroplasty', *Clin Orthop Relat Res*: 134-9.
- 4 Del Pozo, J. L., and R. Patel. 2009. 'Clinical practice. Infection associated with prosthetic joints', *N Engl J Med*, 361: 787-94.
- 5 Love, C., M. B. Tomas, S. E. Marwin, P. V. Pugliese, and C. J. Palestro. 2001. 'Role of nuclear medicine in diagnosis of the infected joint replacement', *Radiographics*, 21: 1229-38.
- 6 Love, C., S. E. Marwin, and C. J. Palestro. 2009. 'Nuclear medicine and the infected joint replacement', *Semin Nucl Med*, 39: 66-78.
- 7 Salzmann, G. M., F. D. Naal, F. von Knoch, J. Tuebel, R. Gradingner, A. B. Imhoff, and J. Schauwecker. 2007. 'Effects of cefuroxime on human osteoblasts in vitro', *J Biomed Mater Res A*, 82: 462-8.
- 8 Cunha, B. A. 2002. 'Osteomyelitis in elderly patients', *Clin Infect Dis*, 35: 287-93.
- 9 Yates, A. J., Jr., Hip American Association of, and Committee Knee Surgeons Evidence-Based Medicine. 2018. 'Postoperative prophylactic antibiotics in total joint arthroplasty', *Arthroplast Today*, 4: 130-31.
- 10 Clarke, B. 2008. 'Normal bone anatomy and physiology', *Clin J Am Soc Nephrol*, 3 Suppl 3: S131-9.
- 11 Espehaug, B., L. B. Engesaeter, S. E. Vollset, L. I. Havelin, and N. Langeland. 1997. 'Antibiotic prophylaxis in total hip arthroplasty - Review of 10 905 primary cemented total hip replacements reported to the Norwegian arthroplasty register, 1987 to 1995', *Journal of Bone and Joint Surgery-British Volume*, 79b: 590-95.

- 12 Boxma, H., T. Broekhuizen, P. Patka, and H. Oosting. 1996. 'Randomised controlled trial of single-dose antibiotic prophylaxis in surgical treatment of closed fractures: the Dutch Trauma Trial', *Lancet*, 347: 1133-7.
- 13 Benson, M. K., and S. P. Hughes. 1975. 'Infection following total hip replacement in a general hospital without special orthopaedic facilities', *Acta Orthop Scand*, 46: 968-78.
- 14 Jansen, E., H. Huhtala, T. Puolakka, and T. Moilanen. 2009. 'Risk factors for infection after knee arthroplasty. A register-based analysis of 43,149 cases', *J Bone Joint Surg Am*, 91: 38-47.
- 15 Pulido, L., E. Ghanem, A. Joshi, J. J. Purtill, and J. Parvizi. 2008. 'Periprosthetic joint infection: the incidence, timing, and predisposing factors', *Clin Orthop Relat Res*, 466: 1710-5.
- 16 Choong, P. F., M. M. Dowsey, D. Carr, J. Daffy, and P. Stanley. 2007. 'Risk factors associated with acute hip prosthetic joint infections and outcome of treatment with a rifampinbased regimen', *Acta Orthop*, 78: 755-65.
- 17 Phillips, J. E., T. P. Crane, M. Noy, T. S. Elliott, and R. J. Grimer. 2006. 'The incidence of deep prosthetic infections in a specialist orthopaedic hospital: a 15-year prospective survey', *Journal of Bone and Joint Surgery-British Volume*, 88: 943-8.
- 18 Della Valle CJ, Bogner E, Desai P, et al. Analysis of frozen sections of intraoperative specimens obtained at the time of reoperation after hip or knee resection arthroplasty for the treatment of infection. *J Bone Joint Surg Am*. 1999;81(5):684-689. doi:10.2106/00004623-199905000-00009
- 19 Bratzler, D. W., P. M. Houck, and Workgroup Surgical Infection Prevention Guideline Writers. 2005. 'Antimicrobial prophylaxis for surgery: an advisory statement from the National Surgical Infection Prevention Project', *Am J Surg*, 189: 395-404.
- 20 Jiranek, W. A., A. D. Hanssen, and A. S. Greenwald. 2006. 'Antibiotic-loaded bone cement for infection prophylaxis in total joint replacement', *J Bone Joint Surg Am*, 88: 2487-500.
- 21 Cabrita, H. B., A. T. Croci, O. P. Camargo, and A. L. Lima. 2007. 'Prospective study of the treatment of infected hip arthroplasties with or without the use of an antibiotic-loaded cement spacer', *Clinics (Sao Paulo)*, 62: 99-108.
- 22 Gaine, W. J., N. A. Ramamohan, N. A. Hussein, M. G. Hullin, and S. W. McCreath. 2000. 'Wound infection in hip and knee arthroplasty', *Journal of Bone and Joint Surgery-*

British Volume, 82: 561-5.

- 23 Gold, B., and W. J. Rodriguez. 1983. 'Cefuroxime: mechanisms of action, antimicrobial activity, pharmacokinetics, clinical applications, adverse reactions and therapeutic indications', *Pharmacotherapy*, 3: 82-100.
- 24 de Lalla, F. 2001. 'Antibiotic prophylaxis in orthopedic prosthetic surgery', *J Chemother*, 13 Spec No 1: 48-53.
- 25 Lovering, A. M., J. Perez, K. E. Bowker, D. S. Reeves, A. P. MacGowan, and G. Bannister. 1997. 'A comparison of the penetration of cefuroxime and cephmandole into bone, fat and haematoma fluid in patients undergoing total hip replacement', *J Antimicrob Chemother*, 40: 99-104.
- 26 McQueen, M. M., S. P. Hughes, P. May, and L. Verity. 1990. 'Cefuroxime in total joint arthroplasty. Intravenous or in bone cement', *J Arthroplasty*, 5: 169-72.
- 27 Nungu, K. S., S. Larsson, L. Wallinder, and S. Holm. 1995. 'Bone and wound fluid concentrations of cephalosporins. Oral cefadroxil and parenteral cefuroxime compared in 52 patients with a trochanteric fracture', *Acta Orthop Scand*, 66: 161-5.
- 28 Katzer, A., J. V. Wening, P. Kupka, N. M. Meenen, and K. H. Jungbluth. 1997. '[Perioperative antibiotic prophylaxis in hip operations. Penetration into bone, capsule tissue and cartilage exemplified by cefuroxime]', *Unfallchirurgie*, 23: 161-70.
- 29 Leigh, D. A. 1986. 'Serum and bone concentrations of cefuroxime in patients undergoing knee arthroplasty', *J Antimicrob Chemother*, 18: 609-11.
- 30 Natividad-Pedreno, M., A. Nunez-Chia, N. Cobo-Valenzuela, T. Alcantara-Martos, M. T. Carrascal, and A. D. Delgado-Martinez. 2016. 'Effect of cefazolin and cefuroxime on fracture healing in rats', *Injury*, 47 Suppl 3: S3-S6.
- 31 Zimmerli, W., A. F. Widmer, M. Blatter, R. Frei, and P. E. Ochsner. 1998. 'Role of rifampin for treatment of orthopedic implant-related staphylococcal infections: a randomized controlled trial. Foreign-Body Infection (FBI) Study Group', *JAMA*, 279: 1537-41.
- 32 Zimmerli, W. 2014. 'Clinical presentation and treatment of orthopaedic implant-associated infection', *J Intern Med*, 276: 111-9.
- 33 Widmer, A. F., A. Gaechter, P. E. Ochsner, and W. Zimmerli. 1992. 'Antimicrobial treatment of orthopedic implant-related infections with rifampin combinations', *Clin Infect Dis*, 14: 1251-3.

- 34 El Helou, O. C., E. F. Barbari, B. D. Lahr, J. E. Eckel-Passow, R. R. Razonable, I. G. Sia, A. Virk, R. C. Walker, J. M. Steckelberg, W. R. Wilson, A. D. Hanssen, and D. R. Osmon. 2010. 'Efficacy and safety of rifampin containing regimen for staphylococcal prosthetic joint infections treated with debridement and retention', *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 29: 961-7.
- 35 Peel, T. N., K. L. Buising, M. M. Dowsey, C. A. Aboltins, J. R. Daffy, P. A. Stanley, and P. F. Choong. 2013. 'Outcome of debridement and retention in prosthetic joint infections by methicillin-resistant staphylococci, with special reference to rifampin and fusidic acid combination therapy', *Antimicrob Agents Chemother*, 57: 350-5.
- 36 Trampuz, A., C. K. Murphy, D. M. Rothstein, A. F. Widmer, R. Landmann, and W. Zimmerli. 2007. 'Efficacy of a novel rifamycin derivative, ABI-0043, against *Staphylococcus aureus* in an experimental model of foreign-body infection', *Antimicrob Agents Chemother*, 51: 2540-5.
- 37 Czekaj, J., A. Dinh, A. Moldovan, P. Vaudaux, G. Gras, P. Hoffmeyer, D. Lew, L. Bernard, and I. Uckay. 2011. 'Efficacy of a combined oral clindamycin+rifampicin regimen for therapy of staphylococcal osteoarticular infections', *Scand J Infect Dis*, 43: 962-7.
- 38 Drancourt, M., A. Stein, J. N. Argenson, A. Zannier, G. Curvale, and D. Raoult. 1993. 'Oral rifampin plus ofloxacin for treatment of *Staphylococcus*-infected orthopedic implants', *Antimicrob Agents Chemother*, 37: 1214-8.
- 39 Schoifet, S. D., and B. F. Morrey. 1990. 'Treatment of infection after total knee arthroplasty by debridement with retention of the components', *J Bone Joint Surg Am*, 72: 1383-90.
- 40 Burger, R. R., T. Basch, and C. N. Hopson. 1991. 'Implant salvage in infected total knee arthroplasty', *Clin Orthop Relat Res*: 105-12.
- 41 Tsukayama, D. T., B. Wicklund, and R. B. Gustilo. 1991. 'Suppressive antibiotic therapy in chronic prosthetic joint infections', *Orthopedics*, 14: 841-4.
- 42 Zhang, Z., X. Wang, F. Luo, H. Yang, T. Hou, Q. Zhou, F. Dai, Q. He, and J. Xu. 2014. 'Effects of rifampicin on osteogenic differentiation and proliferation of human mesenchymal stem cells in the bone marrow', *Genet Mol Res*, 13: 6398-410.
- 43 Nicholas, P., B. R. Meyers, R. N. Levy, and S. Z. Hirschman. 1975. 'Concentration of clindamycin in human bone', *Antimicrob Agents Chemother*, 8: 220-1.

- 44 Curis, E., V. Pestre, V. Jullien, L. Eyrolle, D. Archambeau, P. Morand, L. Gatin, M. Karoubi, N. Pinar, V. Dumaine, J. C. Nguyen Van, A. Babinet, P. Anract, and D. Salmon. 2015. 'Pharmacokinetic variability of clindamycin and influence of rifampicin on clindamycin concentration in patients with bone and joint infections', *Infection*, 43: 473-81.
- 45 Geddes, A. M., N. S. Dwyer, A. P. Ball, and R. S. Amos. 1977. 'Clindamycin in bone and joint infections', *J Antimicrob Chemother*, 3: 501-7.
- 46 El Samad, Y., E. Havet, H. Bentayeb, B. Olory, B. Canarelli, J. F. Lardanchet, Y. Douadi, F. Rousseau, F. X. Lescure, P. Mertl, F. Eb, and J. L. Schmit. 2008. '[Treatment of osteoarticular infections with clindamycin in adults]', *Med Mal Infect*, 38: 465-70.
- 47 Mader, J. T., M. E. Shirliff, S. C. Bergquist, and J. Calhoun. 1999. 'Antimicrobial treatment of chronic osteomyelitis', *Clin Orthop Relat Res*: 47-65.
- 48 Darley, E. S., and A. P. MacGowan. 2004. 'Antibiotic treatment of gram-positive bone and joint infections', *J Antimicrob Chemother*, 53: 928-35.
- 49 Feigin, R. D., L. K. Pickering, D. Anderson, R. E. Keeney, and P. G. Shackelford. 1975. 'Clindamycin treatment of osteomyelitis and septic arthritis in children', *Pediatrics*, 55: 213-23.
- 50 Naal, F. D., G. M. Salzmann, F. von Knoch, J. Tuebel, P. Diehl, R. Gradinger, and J. Schauwecker. 2008. 'The effects of clindamycin on human osteoblasts in vitro', *Arch Orthop Trauma Surg*, 128: 317-23.
- 51 Zabransky, R. J., J. A. Johnston, and K. J. Hauser. 1973. 'Bacteriostatic and bactericidal activities of various antibiotics against *Bacteroides fragilis*', *Antimicrob Agents Chemother*, 3: 152-6.
- 52 Klepser, M. E., D. P. Nicolau, R. Quintiliani, and C. H. Nightingale. 1997. 'Bactericidal activity of low-dose clindamycin administered at 8- and 12-hour intervals against *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Bacteroides fragilis*', *Antimicrob Agents Chemother*, 41: 630-5.
- 53 LaPlante, K. L., S. N. Leonard, D. R. Andes, W. A. Craig, and M. J. Rybak. 2008. 'Activities of clindamycin, daptomycin, doxycycline, linezolid, trimethoprim-sulfamethoxazole, and vancomycin against community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with inducible clindamycin resistance in murine thigh infection and in vitro pharmacodynamic models', *Antimicrob Agents Chemother*, 52: 2156-62.

- 54 Houshian, S., A. S. Zawadski, and P. Riegels-Nielsen. 2000. 'Duration of postoperative antibiotic therapy following revision for infected knee and hip arthroplasties', *Scand J Infect Dis*, 32: 685-8.
- 55 Mader, J. T., J. Wang, and J. H. Calhoun. 2002. 'Antibiotic therapy for musculoskeletal infections', *Instr Course Lect*, 51: 539-51.
- 56 Marchenko S, Flanagan L. Counting human neural stem cells. Journal of visualized experiments: JoVE 2007;(7):262. eng
- 57 Gregory CA, Gunn WG, Peister A, Prockop DJ. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Analytical biochemistry* 2004;329:77–84. eng.
- 58 Cluzel, R. A., R. Lopitiaux, J. Sirot, and S. Rampon. 1984. 'Rifampicin in the treatment of osteoarticular infections due to staphylococci', *J Antimicrob Chemother*, 13 Suppl C: 23-9.
- 59 Roth B: 'Penetration of Parenterally Administered Rifampicin into Bone Tissue.' *Chemotherapy* 1984;30:358-365. doi: 10.1159/000238294
- 60 Kulterer, B., G. Friedl, A. Jandrositz, F. Sanchez-Cabo, A. Prokesch, C. Paar, M. Scheideler, R. Windhager, K. H. Preisegger, and Z. Trajanoski. 2007. 'Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow during expansion and osteoblast differentiation', *BMC Genomics*, 8: 70.
- 61 Leung, K. S., K. P. Fung, A. H. Sher, C. K. Li, and K. M. Lee. 1993. 'Plasma bone-specific alkaline phosphatase as an indicator of osteoblastic activity', *Journal of Bone and Joint Surgery-British Volume*, 75: 288-92.
- 62 Pilge, H., J. Frobel, S. Lensing-Hohn, C. Zilkens, and R. Krauspe. 2016. 'Cefazolin Irreversibly Inhibits Proliferation and Migration of Human mesenchymal Stromal Cells', *Biomed Res Int*, 2016: 2042687.
- 63 Haasters, F., D. Docheva, C. Gassner, C. Popov, W. Bocker, W. Mutschler, M. Schieker, and W. C. Prall. 2014. 'Mesenchymal stem cells from osteoporotic patients reveal reduced migration and invasion upon stimulation with BMP-2 or BMP-7', *Biochem Biophys Res Commun*, 452: 118-23.
- 64 Bissinger, O., K. Kreutzer, K. D. Wolff, G. Wexel, A. Hapfelmeier, C. Pautke, S. Vogt, P. Michael Prodingler, and T. Tischer. 2017. 'Does cefuroxime alter fracture healing in vivo? A micro-computertomographic, biomechanical, and histomorphometric evaluation using a rat fracture model', *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 105: 2282-

91.

- 65 Shu, B., M. Zhang, R. Xie, M. Wang, H. Jin, W. Hou, D. Tang, S. E. Harris, Y. Mishina, R. J. O'Keefe, M. J. Hilton, Y. Wang, and D. Chen. 2011. 'BMP2, but not BMP4, is crucial for chondrocyte proliferation and maturation during endochondral bone development', *J Cell Sci*, 124: 3428-40.
- 66 Noel, D., D. Gazit, C. Bouquet, F. Apparailly, C. Bony, P. Ponce, V. Millet, G. Turgeman, M. Perricaudet, J. Sany, and C. Jorgensen. 2004. 'Short-term BMP-2 expression is sufficient for in vivo osteochondral differentiation of mesenchymal stem cells', *Stem Cells*, 22: 74-85.
- 67 Bandyopadhyay, A., K. Tsuji, K. Cox, B. D. Harfe, V. Rosen, and C. J. Tabin. 2006. 'Genetic analysis of the roles of BMP2, BMP4, and BMP7 in limb patterning and skeletogenesis', *PLoS Genet*, 2: e216.
- 68 Tsuji, K., K. Cox, A. Bandyopadhyay, B. D. Harfe, C. J. Tabin, and V. Rosen. 2008. 'BMP4 is dispensable for skeletogenesis and fracture-healing in the limb', *J Bone Joint Surg Am*, 90 Suppl 1: 14-8.
- 69 Tezuka, K., M. Yasuda, N. Watanabe, N. Morimura, K. Kuroda, S. Miyatani, and N. Hozumi. 2002. 'Stimulation of osteoblastic cell differentiation by Notch', *J Bone Miner Res*, 17: 231-9.
- 70 Nobta, M., T. Tsukazaki, Y. Shibata, C. Xin, T. Moriishi, S. Sakano, H. Shindo, and A. Yamaguchi. 2005. 'Critical regulation of bone morphogenetic protein-induced osteoblastic differentiation by Delta1/Jagged1-activated Notch1 signaling', *J Biol Chem*, 280: 15842-8.
- 71 Suzuki, A., Ghayor, C., Guicheux, J., Magne, D., Quillard, S., Kakita, A., Ono, Y., Miura, Y., Oiso, Y., Itoh, M. and Caverzasio, J. (2006), Enhanced Expression of the Inorganic Phosphate Transporter Pit-1 Is Involved in BMP-2-Induced Matrix Mineralization in Osteoblast-Like Cells. *J Bone Miner Res*, 21: 674-683. doi:[10.1359/jbmr.020603](https://doi.org/10.1359/jbmr.020603)
- 72 Dai J, Li Y, Zhou H, Chen J, Chen M, Xiao Z. Genistein promotion of osteogenic differentiation through BMP2/SMAD5/RUNX2 signaling. *Int J Biol Sci*. 2013;9(10):1089-1098. Published 2013 Nov 21. doi:10.7150/ijbs.7367
- 73 Lee, K. S., H. J. Kim, Q. L. Li, X. Z. Chi, C. Ueta, T. Komori, J. M. Wozney, E. G. Kim, J. Y. Choi, H. M. Ryoo, and S. C. Bae. 2000. 'Runx2 is a common target of transforming growth factor beta1 and bone morphogenetic protein 2, and cooperation between Runx2

- and Smad5 induces osteoblast-specific gene expression in the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12', *Mol Cell Biol*, 20: 8783-92.
- 74 Jonason, J. H., G. Xiao, M. Zhang, L. Xing, and D. Chen. 2009. 'Post-translational Regulation of Runx2 in Bone and Cartilage', *J Dent Res*, 88: 693-703.
- 75 Bouillon, R., and A. Prodonova. 2000. 'Growth and hormone deficiency and peak bone mass', *J Pediatr Endocrinol Metab*, 13 Suppl 6: 1327-36.
- 76 Liu, L., S. Greenberg, S. M. Russell, and C. S. Nicoll. 1989. 'Effects of insulin-like growth factors I and II on growth and differentiation of transplanted rat embryos and fetal tissues', *Endocrinology*, 124: 3077-82.
- 77 Giustina, A., G. Mazziotti, and E. Canalis. 2008. 'Growth hormone, insulin-like growth factors, and the skeleton', *Endocr Rev*, 29: 535-59.
- 78 Rubin, J., C. L. Ackert-Bicknell, L. Zhu, X. Fan, T. C. Murphy, M. S. Nanes, R. Marcus, L. Holloway, W. G. Beamer, and C. J. Rosen. 2002. 'IGF-I regulates osteoprotegerin (OPG) and receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand in vitro and OPG in vivo', *J Clin Endocrinol Metab*, 87: 4273-9.
- 79 Krishnan, V., H. U. Bryant, and O. A. Macdougald. 2006. 'Regulation of bone mass by Wnt signaling', *J Clin Invest*, 116: 1202-9.
- 80 Locatelli, V., and V. E. Bianchi. 2014. 'Effect of GH/IGF-1 on Bone Metabolism and Osteoporosis', *Int J Endocrinol*, 2014: 235060.
- 81 De Santi, M., G. Annibalini, E. Barbieri, A. Villarini, L. Vallorani, S. Contarelli, F. Berrino, V. Stocchi, and G. Brandi. 2016. 'Human IGF1 pro-forms induce breast cancer cell proliferation via the IGF1 receptor', *Cell Oncol (Dordr)*, 39: 149-59.
- 82 Renehan, A. G., J. Frystyk, and A. Flyvbjerg. 2006. 'Obesity and cancer risk: the role of the insulin-IGF axis', *Trends Endocrinol Metab*, 17: 328-36.
- 83 Boskey, A. L., and A. S. Posner. 1984. 'Bone structure, composition, and mineralization', *Orthop Clin North Am*, 15: 597-612.
- 84 Pollitt, R., R. McMahon, J. Nunn, R. Bamford, A. Afifi, N. Bishop, and A. Dalton. 2006. 'Mutation analysis of COL1A1 and COL1A2 in patients diagnosed with osteogenesis imperfecta type I-IV', *Hum Mutat*, 27: 716.
- 85 Forlino, A., W. A. Cabral, A. M. Barnes, and J. C. Marini. 2011. 'New perspectives on osteogenesis imperfecta', *Nat Rev Endocrinol*, 7: 540-57.
- 86 Kostik, M. M., A. M. Smirnov, G. S. Demin, M. M. Mnuskina, L. A. Scheplyagina, and

- V. I. Larionova. 2013. 'Genetic polymorphisms of collagen type I alpha1 chain (COL1A1) gene increase the frequency of low bone mineral density in the subgroup of children with juvenile idiopathic arthritis', *EPMA J*, 4: 15.
- 87 Muchowski, P. J., J. A. Bassuk, N. H. Lubsen, and J. I. Clark. 1997. 'Human alphaB-crystallin. Small heat shock protein and molecular chaperone', *J Biol Chem*, 272: 2578-82.
- 88 van de Schootbrugge, C., E. M. Schults, J. Bussink, P. N. Span, R. Grenman, G. J. Pruijn, J. H. Kaanders, and W. C. Boelens. 2014. 'Effect of hypoxia on the expression of alphaB-crystallin in head and neck squamous cell carcinoma', *BMC Cancer*, 14: 252.
- 89 Mader, J.T., Calhoun, J., Cobos, J. 'In vitro evaluation of antibiotic diffusion from antibiotic-impregnated biodegradable beads and polymethylmethacrylate beads. *Antimicrob Agents Chemother* 41 (1997) 415- 418
- 90 Rathbone, C. R., J. D. Cross, K. V. Brown, C. K. Murray, and J. C. Wenke. 2011. 'Effect of various concentrations of antibiotics on osteogenic cell viability and activity', *J Orthop Res*, 29: 1070-4.
- 91 Marom, R., I. Shur, R. Solomon, and D. Benayahu. 2005. 'Characterization of adhesion and differentiation markers of osteogenic marrow stromal cells', *J Cell Physiol*, 202: 41-8.
- 92 Isefuku, S., C. J. Joyner, and A. H. Simpson. 2001. 'Toxic effect of rifampicin on human osteoblast-like cells', *J Orthop Res*, 19: 950-4.
- 93 Moyano, J. V., J. R. Evans, F. Chen, M. Lu, M. E. Werner, F. Yehiely, L. K. Diaz, D. Turbin, G. Karaca, E. Wiley, T. O. Nielsen, C. M. Perou, and V. L. Cryns. 2006. 'AlphaB-crystallin is a novel oncoprotein that predicts poor clinical outcome in breast cancer', *J Clin Invest*, 116: 261-70.
- 94 Huang, X. Y., A. W. Ke, G. M. Shi, X. Zhang, C. Zhang, Y. H. Shi, X. Y. Wang, Z. B. Ding, Y. S. Xiao, J. Yan, S. J. Qiu, J. Fan, and J. Zhou. 2013. 'alphaB-crystallin complexes with 14-3-3zeta to induce epithelial-mesenchymal transition and resistance to sorafenib in hepatocellular carcinoma', *Hepatology*, 57: 2235-47.
- 95 Yilmaz, M., O. F. Karatas, B. Yuceturk, H. Dag, M. Yener, and M. Ozen. 2015. 'Alpha-B-crystallin expression in human laryngeal squamous cell carcinoma tissues', *Head Neck*, 37: 1344-8.
- 96 Yang, J., D. Yang, Y. Sun, B. Sun, G. Wang, J. C. Trent, D. M. Araujo, K. Chen, and W.

- Zhang. 2011. 'Genetic amplification of the vascular endothelial growth factor (VEGF) pathway genes, including VEGFA, in human osteosarcoma', *Cancer*, 117: 4925-38.
- 97 Graneli, C., A. Thorfve, U. Ruetschi, H. Brisby, P. Thomsen, A. Lindahl, and C. Karlsson. 2014. 'Novel markers of osteogenic and adipogenic differentiation of human bone marrow stromal cells identified using a quantitative proteomics approach', *Stem Cell Res*, 12: 153-65.
- 98 Roth B: 'Penetration of Parenterally Administered Rifampicin into Bone Tissue.' *Chemotherapy* 1984;30:358-365. doi: 10.1159/000238294
- 99 Panzer, J. D., D. C. Brown, W. L. Epstein, R. L. Lipson, H. W. Mahaffey, and W. H. Atkinson. 1972. 'Clindamycin levels in various body tissues and fluids', *J Clin Pharmacol New Drugs*, 12: 259-62.
- 100 Schurman, D. J., B. L. Johnson, Jr., G. Finerman, and H. C. Amstutz. 1975. 'Antibiotic bone penetration. Concentrations of methicillin and clindamycin phosphate in human bone taken during total hip replacement', *Clin Orthop Relat Res*: 142-6.
- 101 Dornbusch, K., A. Carlstrom, H. Hugo, and A. Lidstrom. 1977. 'Antibacterial activity of clindamycin and lincomycin in human bone', *J Antimicrob Chemother*, 3: 153-60.
- 102 Summersgill, J. T., L. G. Schupp, and M. J. Raff. 1982. 'Comparative penetration of metronidazole, clindamycin, chloramphenicol, cefoxitin, ticarcillin, and moxalactam into bone', *Antimicrob Agents Chemother*, 21: 601-3.
- 103 Duckworth, C., J. F. Fisher, S. A. Carter, C. L. Newman, C. Cogburn, R. R. Nesbit, and C. H. Wray. 1993. 'Tissue penetration of clindamycin in diabetic foot infections', *J Antimicrob Chemother*, 31: 581-4.
- 104 De-Ugarte, L., G. Yoskovitz, S. Balcells, R. Guerri-Fernandez, S. Martinez-Diaz, L. Mellibovsky, R. Urreiziti, X. Nogues, D. Grinberg, N. Garcia-Giralt, and A. Diez-Perez. 2015. 'MiRNA profiling of whole trabecular bone: identification of osteoporosis-related changes in MiRNAs in human hip bones', *BMC Med Genomics*, 8: 75.
- 105 Minuto, F., C. Palermo, M. Arvigo, and A. M. Barreca. 2005. 'The IGF system and bone', *J Endocrinol Invest*, 28: 8-10.
- 106 Conover, C. A., and S. Khosla. 2003. 'Role of extracellular matrix in insulin-like growth factor (IGF) binding protein-2 regulation of IGF-II action in normal human osteoblasts', *Growth Horm IGF Res*, 13: 328-35.
- 107 Aubin, J. E. 2001. 'Regulation of osteoblast formation and function', *Rev Endocr Metab*

Disord, 2: 81-94.

- 108 Quinn, J. M., K. Itoh, N. Udagawa, K. Hausler, H. Yasuda, N. Shima, A. Mizuno, K. Higashio, N. Takahashi, T. Suda, T. J. Martin, and M. T. Gillespie. 2001. 'Transforming growth factor beta affects osteoclast differentiation via direct and indirect actions', *J Bone Miner Res*, 16: 1787-94.
- 109 Martin, T. J., and N. A. Sims. 2015. 'RANKL/OPG; Critical role in bone physiology', *Rev Endocr Metab Disord*, 16: 131-9.
- 110 Liu, W., S. Toyosawa, T. Furuichi, N. Kanatani, C. Yoshida, Y. Liu, M. Himeno, S. Narai, A. Yamaguchi, and T. Komori. 2001. 'Overexpression of Cbfa1 in osteoblasts inhibits osteoblast maturation and causes osteopenia with multiple fractures', *J Cell Biol*, 155: 157-66.
- 111 Geoffroy, V., M. Kneissel, B. Fournier, A. Boyde, and P. Matthias. 2002. 'High bone resorption in adult aging transgenic mice overexpressing cbfa1/runx2 in cells of the osteoblastic lineage', *Mol Cell Biol*, 22: 6222-33.
- 112 Komori, T. 2010. 'Regulation of osteoblast differentiation by Runx2', *Adv Exp Med Biol*, 658: 43-9.

Danksagung

Zum Schluss möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. J. Windolf für die freundliche und wertvolle Unterstützung bedanken. Ebenso Danke ich Herrn Prof. Dr. Krauspe für seine Hilfe, welcher während der Ausfertigung der Arbeit emeritiert ist.

Meinen anschließenden Dank richte ich an Herrn Priv.- Doz. Dr. med. Hakan Pilge, der für mich den Weg in die Forschung ebnete und die vorliegende Promotionsarbeit damit ermöglichte.

Ein besonderer Dank gilt ebenso Priv. Doz. Dr. med. Hannes Kenji Kubo, Dr. rer. nat. Holger Schrupf, Dr. rer. nat. Bettina Alexandra Buhren und Sabine Lensing- Höhn für die ausgezeichnete Betreuung dieses Projektes. Ohne Ihre konstante Unterstützung und Beratung wäre es nicht möglich gewesen, diese Arbeit fertig zu stellen. Ich freue mich sehr heute auf die Ergebnisse unserer Forschung blicken zu können.

Ebenso danken möchte ich allen Zellspendern, Herrn Prof. Dr. Fischer und Herrn Prof. Dr. Zilkens für die Möglichkeit der Bereitstellung sowie den Erwerb der Zellen.

Meine Dankbarkeit an meinen Verlobten Laurin Hellfeier kennt keine Grenzen. Danken möchte ich für die unermüdliche und fortwährende Unterstützung, welche meine Ideen stets vorangebracht hat. Auch als ich in vermeintlichen Sackgassen steckte ermunterte er mich stets weiter zu machen und führte mich so auf die Zielgerade. Danke, dass du mich bei all meinen Projekten und Ideen nie alleine lässt.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei meinen Eltern und Großeltern bedanken. Ihr Vertrauen und ihre Unterstützung waren zu jeder Zeit der Rückhalt, der mir sowohl diese Arbeit, als auch mein gesamtes Studium ermöglicht hat. Ohne sie wäre dieser Weg nicht möglich gewesen.