

HERSTELLUNG FUNKTIONALER KOMPOSITMATERIALIEN FÜR DAS
TISSUE ENGINEERING VON KNOCHEN

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Chem. Stefanie Röker

Geboren am 20.09.1982 in Hannover

2009

Referentin: PD Dr. Cornelia Kasper

Institut für Technische Chemie

Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Korreferent: Prof. Dr. Martijn van Griensven

Ludwig Boltzmann Institut für experimentelle und klinische Traumatologie

Wien, Österreich

Tag der Promotion: 29.06.2009

Erklärung

Ich versichere, dass ich diese Dissertation selbstständig verfasst habe und alle benutzten Hilfsmittel sowie evtl. zur Hilfeleistung herangezogene Institutionen vollständig angegeben wurden. Diese Arbeit wurde nicht als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, im Mai 2009

DANKSAGUNG

Ich danke Frau PD Dr. Cornelia Kasper und Herrn Prof. Thomas Scheper für die Möglichkeit am Institut für Technische Chemie meine Promotion anfertigen zu können und für die Bereitstellung des interessanten und hoch aktuellen Themas. Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Cornelia Kasper für die tatkräftige Unterstützung und Förderung während meiner Promotion. Herrn Prof Dr. Martijn van Griensven danke ich für die Hilfe bei der Beantwortung fachlicher Fragen und für die Übernahme des Koreferats.

Für die Bereitstellung von BMP-2 danke ich Herrn Prof. Dr. Walter Sebald, Frau Dr. Birgit Weyand (Klinik für Plastische, Hand- und Wiederherstellungschirurgie, Medizinische Hochschule Hannover) und MMag. Anja Peterbauer (Oberösterreichisches Rotes Kreuz, Linz) danke ich für die wiederholte Überlassung humaner mesenchymaler Stromazellen.

Dr. Antje Quade vom Leibniz Institut für Plasmaforschung und Technologie e.V. danke ich für die Durchführung der XPS-Analysen.

Ignacio Ochoa und der GEMM Group des Aragón Institute of Engineering Research (I3A) danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung biomechanischer Untersuchungen und für die angenehme Zeit während meines Auslandsaufenthalts an der Universität Zaragoza, Spanien.

Weiterhin danke ich allen Kooperationspartnern für die Zusammenarbeit im Rahmen der geförderten Forschungsprojekte.

Meinen Diplomandinnen Franziska Bode und Nataliya Gorinski sowie meinen Schwerpunktpraktikantinnen Bilyana Suvandzhieva und Olga Raisch danke ich für ihre Arbeiten und die damit zu meiner Arbeit geleisteten Beiträge.

Der Zellwerk GmbH danke ich für die Möglichkeit in ihrem Hause eine Reaktorkultivierung durchführen zu können und ihren Mitarbeitern insbesondere Dana Marten für die Unterstützung.

Der Feinmechanikwerkstatt danke ich für die Kreativität und die Realisierung jeglicher Ideen. Allen Mitarbeitern der Arbeitskreise Scheper und Kasper danke ich für die tolle Arbeitsatmosphäre, ohne die die Arbeit nur halb soviel Spaß gemacht hätte. Besonders danke ich Solvig Diederichs und Stefanie Böhm für die enge Zusammenarbeit, vor allem für das gemeinsame Durchhalten bei etlichen Reaktorpannen.

Meinen Eltern danke ich für die Möglichkeit dieses Studium absolvieren zu können und dafür, dass sie mich während der gesamten Studien- und Promotionszeit in jeglicher Art motiviert und unterstützt haben. Meinem Freund Rouven danke ich dafür, mich bei meiner Promotion sowohl fachlich als auch moralisch unterstützt zu haben.

INHALT

DANKSAGUNG.....	V
INHALT.....	VII
1. EINLEITUNG	5
2. AUFGABENSTELLUNG.....	7
3. THEORETISCHE GRUNDLAGEN	9
3.1. EIGENSCHAFTEN VON KNOCHEN	9
3.1.1. <i>Aufbau des Knochens</i>	9
3.1.2. <i>Funktioneller Knochenbau</i>	17
3.2. KOMPOSITMATERIALIEN FÜR DAS TISSUE ENGINEERING VON KNOCHEN	20
3.2.1. <i>Polymer-Keramik-Komposite</i>	21
3.2.2. <i>Einschluss bioaktiver Moleküle</i>	22
3.2.3. <i>Oberflächenfunktionalisierung von Keramiken</i>	24
3.3. OSTEOGENE DIFFERENZIERUNG MESENCHYMALER STROMAZELLEN.....	27
3.4. BIOREAKTOREN FÜR DAS TISSUE ENGINEERING	30
4. EXPERIMENTELLER TEIL.....	41
4.1. OBERFLÄCHENMODIFIKATION MITTELS POLYMERSPACERN	42
4.1.1. <i>Synthese der Konjugate</i>	45
4.1.1.1. Aktivierung von p(MAG).....	45
4.1.1.2. Aktivierung von p(MVD).....	46
4.1.1.3. Anbindung der Liganden.....	47
4.1.1.4. Qualitativer Nachweis der Konjugate.....	49
4.1.1.5. Quantitativer Nachweis der Konjugate.....	51
4.1.2. <i>Herstellung der Kompositmaterialien</i>	53
4.1.2.1. Adsorption der Konjugate	53
4.1.2.2. Nachweis der Adsorption	54
4.1.3. <i>Biomechanische Untersuchungen</i>	58
4.1.3.1. Kompressionstests	58
4.1.4. <i>Zellkulturuntersuchungen</i>	66
4.1.4.1. Statische Zellkultivierung.....	67
4.1.4.2. Bioreaktor-Kultivierung	71
4.2. EINSCHLUSS BIOAKTIVER KOMponentEN	93
4.2.1. <i>Beschichtung von Sponceram®</i>	94
4.2.2. <i>Quantitative Untersuchungen der Beschichtungen</i>	94
4.2.3. <i>Zellkulturuntersuchungen</i>	97
4.2.4. <i>Untersuchung der Freisetzung aus der Trägermatrix</i>	98
4.3. MIKROSPHÄREN.....	101
4.3.1. <i>Kinetik der Freisetzung</i>	103
4.3.2. <i>Zellkulturuntersuchungen</i>	105
5. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	111
6. ANHANG	115
6.1. STATISTISCHE ÜBERPRÜFUNG VON MESSWERTEN.....	115
6.2. VERWENDETE ZELLEN.....	115
6.3. OBERFLÄCHENMODIFIKATION MITTELS POLYMERSPACERN	118
6.3.1. <i>Schiffsche Probe</i>	118
6.3.2. <i>Qualitativer Nachweis der Konjugate</i>	120
6.3.3. <i>Quantitative Untersuchungen der Konjugate</i>	122
6.3.4. <i>XPS-Untersuchung der Komposite</i>	123
6.3.5. <i>Biomechanische Untersuchungen</i>	124
6.3.6. <i>Statische Zellkultivierung</i>	125
6.3.7. <i>Bioreaktor-Kultivierung</i>	126
6.3.8. <i>Histologische Färbungen</i>	131
6.3.9. <i>PCR</i>	136
6.3.10. <i>Rasterelektronenmikroskopie</i>	140
6.4. EINSCHLUSS BIOAKTIVER MOLEKÜLE IN EINE MATRIX.....	141

6.4.1.	<i>Nachweis der Beschichtungen</i>	141
6.4.2.	<i>Zellkulturuntersuchungen</i>	142
6.5.	MIKROSPHÄREN.....	143
6.5.1.	<i>Herstellung der Sponceram®/PLGA-Mikrosphären</i>	143
6.5.2.	<i>Zellkulturuntersuchungen</i>	144
6.6.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	145
6.7.	GERÄTE UND LABORAUSSTATTUNG	149
6.8.	VERBRAUCHSMATERIALIEN.....	151
6.9.	VERWENDETE REAGENZIEN.....	153

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 3-1: ZUSAMMENSETZUNG DES KNOCHENS. (ADAPTIERT AUS: FELSENBERG, 2001)⁴ 9

ABBILDUNG 3-2: TOPOGRAFISCHE BEZIEHUNGEN ZWISCHEN DEN ZELLEN DES KNOCHENGEBEBES (ADAPTIERT AUS MARKS UND POPOFF, 1988)¹² 12

ABBILDUNG 3-3: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER MECHANOTRANSDUKTION (ADAPTIERT AUS JEROSCH, BADER, UHR, 2002)⁶ 13

ABBILDUNG 3-4: AUFBAU DES KNOCHENGEBEBES, 1: HAVERSCHES KANÄLE, 2: PERIOST, 3: ÄUßERE GRUNDLAMELLEN, 4: OSTEON, 5: SPONGIOSABÄLKCHEN (ENTNOMMEN AUS GEISSLER ET AL, 1976)¹⁷..... 15

ABBILDUNG 3-5: AUFBAU DES RÖHRENKNOCHENS (ADAPTIERT AUS STEINBRÜCK, BAUMHOER, HENLE 2008)¹⁸ . 16

ABBILDUNG 3-6: VERLAUF DER AUS DER HAUPTBELASTUNG RESULTIERENDEN SPANNUNGSTRAJEKTORIEN FÜR DRUCK UND ZUG IM OBERSCHENKELKOPF UND -HALS DES MENSCHEN. DIE RICHTUNG DER SPONGIOSAZÜGE ENTSPRICHT DEM SPANNUNGSTRAJEKTORIENVERLAUF (ADAPTIERT AUS CZIHAK, 1990)²¹ 18

ABBILDUNG 3-7: UNTERSCHIEDLICHE METHODEN ZUR HERSTELLUNG KERAMIKBASIERTER KOMPOSITMATERIALIEN ALS BIOMATERIALIEN 26

ABBILDUNG 3-8: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER DREI MINIMALKRITERIEN MESENCHYMALER STROMAZELLEN 27

ABBILDUNG 3-9: POSTULIERTE SCHRITTE DER OSTEOGENEN ENTWICKLUNG MIT NACHWEISBAREN PHASEN DER PROLIFERATION UND DIFFERENZIERUNG AUS *IN VITRO* UND *IN VIVO* EXPERIMENTEN. NEBEN FINALEN STADIEN DER DIFFERENZIERUNG IST AUCH DIE APOPTOSE BERÜCKSICHTIGT, DER EIN TEIL DER ZELLEN UNTERLIEGT. ETABLIERTE MARKER OSTEOBLASTÄRER ZELLEN UND IHR EXPRESSIONSPROFIL SIND ZUSÄTZLICH DARGESTELLT. HETEROGENE EXPRESSION EINIGER MARKER SIND EBENSO BERÜCKSICHTIGT. - : KEINE NACHWEISBARE EXPRESSION, +/- - +++: EXPRESSION VARIERT VON SCHWACH BIS STARK, → +++ HETEROGENE EXPRESSION IN EINZELNEN ZELLEN (ADAPTIERT AUS: AUBIN UND HEERSCH, 2000)⁸⁰ 30

ABBILDUNG 3-10: ZELLKULTURSYSTEME FÜR DIE STATISCHE KULTUR ADHÄRENT WACHSENDER ZELLEN. A: ZELLKULTURFLASCHEN, B: PETRISCHALEN, C: LOCHPLATTEN (QUELLE: WWW.NUNCBRAND.COM, MÄRZ 2009)..... 31

ABBILDUNG 3-11: TYPISCHE WACHSTUMSKURVE EINER EUKARYOTISCHEN ZELLPOPULATION UNTER STATISCHEN KULTURBEDINGUNGEN 32

ABBILDUNG 3-12: PRINZIPIEN DER KULTIVIERUNG IN ZWEI UNTERSCHIEDLICHEN AUSFÜHRUNGEN DES PERFUSSIONSREAKTORS. A: DAS KULTURMEDIUM STRÖMT DURCH DAS MIT ZELLEN BESIEDELTE PORÖSE KONSTRUKT. B: DAS ZWEI- ODER DREIDIMENSIONALE KONSTRUKT WIRD MIT KULTURMEDIUM ÜBERSTRÖMT..... 34

ABBILDUNG 3-13: MIKROCARRIER-SPINNERFLASCHE MAGNA-FLEX[®] DER FIRMA WHEATON INDUSTRIES INC. (QUELLE: WWW.WHEATONSCI.COM, MÄRZ 2009)..... 35

ABBILDUNG 3-14: SCHEMA EINES ROTATING WALL VESSEL REAKTORS. A: MOTOR, B: KULTURGEFÄß, C: PUMPE FÜR LUFTVERSORGUNG, D: FILTER, E: OXYGENATOR (ENTNOMMEN AUS HAMMOND AND HAMMOND, 2001)⁹¹ 36

ABBILDUNG 3-15: TENSION/TORSION BIODYNAMIC[®] TEST INSTRUMENT DER FIRMA BOSE CORPORATION – ELECTRO FORCE[®] SYSTEMS GROUP (QUELLE: WWW.BOSE-ELECTROFORCE.COM, MÄRZ 2009) 37

ABBILDUNG 3-16: EINWEGREAKTOR BIOSTAT CULTIBAG RM 20/50 VON SARTORIUS/WAVE BIOTECH (QUELLE: CHEMANAGER 23/2006)¹⁰⁸ 39

ABBILDUNG 4-1: SPONCERAM[®], EINE MAKROPORÖSE ZIRKONIUMDIOXIDKERAMIK. LINKS: SPONCERAM[®]-SCHEIBE MIT EINEM DURCHMESSER VON 65 MM, RECHTS: SPONCERAM[®]-MINIDISC MIT EINEM DURCHMESSER VON 10 MM 42

ABBILDUNG 4-2: SCHEMA DER FUNKTIONALISIERUNG VON SPONCERAM[®] MIT HILFE VON POLYMERSPACERN UND POLY-L-LYSIN SOWIE BMP-2 ALS BIOAKTIVE LIGANDEN 45

ABBILDUNG 4-3: OXIDATION DES GLUCOSERINGS VON P(MAG) MIT NATRIUMPERIODAT..... 46

ABBILDUNG 4-4: COPOLYMERISATION VON 2-DESOXY-N-METHACRYLAMIDO-D-GLUCOSE MIT N-VINYLPYRROLIDON UND ACROLEINDIETHYLACETAL ZU P(MVD) 46

ABBILDUNG 4-5: SYNTHESE VON P(MVA): KONVERSION DER ACETALGRUPPEN IN P(MVD) IN ALDEHYDGRUPPEN 47

ABBILDUNG 4-6: SCHEMA DER SYNTHESE DER EINZELKONJUGATE AM BEISPIEL DER HERSTELLUNG VON OX.P(MAG)-PLL 48

ABBILDUNG 4-7: A: QUALITATIVER NACHWEIS DER EINFACHKONJUGATE MIT DEM POLYMER OX.P(MAG) IN EINEM 12 % IGE M SDS-GEL, MIT SILBER GEFÄRBT (1: RNASE, 2: OX.P(MAG), 3: OX.P(MAG)-PLL, 4: OX.P(MAG)-PLL, 5: OX.P(MAG)-RNASE); B: QUALITATIVER NACHWEIS VON OX.P(MAG)-RNASE-PLL UND DEM ZWISCHENPRODUKT OX.P(MAG)-RNASE (1: PROTEINMARKER, 2: RNASE, 3: OX.P(MAG), 4: OX.P(MAG)-RNASE, 5: OX.P(MAG)-RNASE-PLL) 49

ABBILDUNG 4-8: QUALITATIVER NACHWEIS DER EINFACHKONJUGATE MIT DEM POLYMER P(MVA) IN EINEM 16 % IGE M SDS-GEL, MIT SILBER GEFÄRBT (1: PROTEINMARKER, 2: RNASE, 3: PLL, 4: P(MVA), 5:

p(MVA)-PLL, 6: p(MVA)-RNASE, 7: p(MVA)-RNASE (ZWISCHENPRODUKT DES DOPPELKONJUGATS), 8: p(MVA)-RNASE-PLL, 9: PLL)	50
ABBILDUNG 4-9: QUANTITATIVE ANALYSE DER ANBINDUNG VON RNASE IN p(MVA)-RNASE SOWIE PLL IN p(MVA)-PLL UND p(MVA)-RNASE-PLL MIT FITC-MARKIERTEN LIGANDEN. DIE WERTE SIND ALS MITTELWERT AUS VIER EXPERIMENTEN \pm STANDARDFEHLER ANGEGEBEN.	52
ABBILDUNG 4-10: QUANTITATIVE ANALYSE DER ANBINDUNG VON RNASE IN ox.p(MAG)-RNASE SOWIE PLL IN ox.p(MAG)-PLL UND ox.p(MAG)-RNASE-PLL MIT FITC-MARKIERTEN LIGANDEN. DIE WERTE SIND ALS MITTELWERT AUS VIER EXPERIMENTEN \pm STANDARDFEHLER ANGEGEBEN.	52
ABBILDUNG 4-11: XPS-ÜBERSICHTSSPEKTRUM VON SPONCERAM [®] , SPONCERAM [®] /ox.p(MAG)-RNASE, SPONCERAM [®] /ox.p(MAG)-PLL UND SPONCERAM [®] /ox.p(MAG)-RNASE-PLL.....	54
ABBILDUNG 4-12: XPS-ÜBERSICHTSSPEKTRUM VON SPONCERAM [®] , SPONCERAM [®] /p(MVA)-RNASE, SPONCERAM [®] /p(MVA)-PLL UND SPONCERAM [®] /p(MVA)-RNASE-PLL.....	55
ABBILDUNG 4-13: DEFORMATIONEN VON PRÜFKÖRPERN DURCH ZUG, SCHERUNG ODER KOMPRESSION. F UND F' SIND GLEICH GROBE ENTGEGENGESETZTE ZUG- ODER KOMPRESSIONSKRÄFTE, -F UND F SIND GLEICH GROBE, ENTGEGENGESETZTE SCHERKRÄFTE (ADAPTIERT AUS: CULLINANE UND EINHORN, 2002) ¹⁹	59
ABBILDUNG 4-14: TYPISCHER KURVENVERLAUF DER MONOAXIALEN KOMPRESSION VON SPONCERAM [®] -ZELLTRÄGERN.....	61
ABBILDUNG 4-15: MAXIMALE DEFORMATION VON SPONCERAM [®] BASIERTEN MATERIALIEN. DIE WERTE SIND ANGEGEBEN ALS DER MITTELWERT AUS FÜNF EXPERIMENTEN \pm STANDARDFEHLER. STATISCH SIGNIFIKANTE UNTERSCHIEDE GEGENÜBER SPONCERAM [®] /ox.p(MAG)-PLL SIND MIT * FÜR 0,001 < p < 0,05 UND ** FÜR p \leq 0,001 GEKENNZEICHNET.....	62
ABBILDUNG 4-16: MAXIMALE BELASTBARKEIT VON SPONCERAM [®] BASIERTEN MATERIALIEN. DIE WERTE SIND GEGEBEN ALS DER MITTELWERT AUS FÜNF EXPERIMENTEN \pm STANDARDFEHLER. STATISCH SIGNIFIKANTE UNTERSCHIEDE GEGENÜBER SPONCERAM [®] /ox.p(MAG)-PLL SIND MIT * FÜR 0,001 < p < 0,05 UND ** FÜR p \leq 0,001 GEKENNZEICHNET.....	63
ABBILDUNG 4-17: BERECHNETE BRUCHENERGIE DREIER PROBEN SPONCERAM [®] 30/90.....	64
ABBILDUNG 4-18: BRUCHENERGIE VON SPONCERAM [®] BASIERTEN MATERIALIEN. DIE WERTE SIND ANGEGEBEN ALS DER MITTELWERT AUS FÜNF EXPERIMENTEN \pm STANDARDFEHLER. STATISCH SIGNIFIKANTE UNTERSCHIEDE GEGENÜBER SPONCERAM [®] /ox.p(MAG)-PLL SIND MIT * FÜR 0,001 < p < 0,05 UND ** FÜR p \leq 0,001 GEKENNZEICHNET. STATISCH SIGNIFIKANTE UNTERSCHIEDE GEGENÜBER SPONCERAM [®] 30/90 SIND MIT * FÜR 0,001 < p < 0,05 UND ** FÜR p \leq 0,001 GEKENNZEICHNET	65
ABBILDUNG 4-19: GLUCOSEVERBRAUCH VON MC3T3-E1-ZELLEN, KULTIVIERT AUF SPONCERAM [®] , SPONCERAM [®] /ox.p(MAG)-PLL UND SPONCERAM [®] /p(MVA)-PLL ÜBER EINEN ZEITRAUM VON 15 TAGEN. DIE WERTE SIND ANGEGEBEN ALS DER MEDIANWERT. DIE FEHLERBALKEN ZEIGEN DIE 25 %- BZW. 75 %- PERZENTILE AN.	69
ABBILDUNG 4-20: FLUORESZENZINTENSITÄT DAPI-GEFÄRBTEN MC3T3-E1-ZELLEN, KULTIVIERT AUF SPONCERAM [®] , SPONCERAM [®] /ox.p(MAG)-PLL UND SPONCERAM [®] /p(MVA)-PLL ÜBER EINEN ZEITRAUM VON 15 TAGEN. DIE WERTE SIND ANGEGEBEN ALS DER MITTELWERT AUS FÜNF WERTEN \pm STANDARDFEHLER. STATISTISCHE UNTERSCHIEDE ZWISCHEN DEN WERTEN SIND NICHT NACHWEISBAR....	70
ABBILDUNG 4-21: DAS Z [®] RP REAKTORSYSTEM BESTEHT AUS EINEM DREHBETT-BIOREAKTOR, DER SICH IN EINER GMP-KONFORMEN, BEHEIZBAREN STERILWERKBANK (BREEDER) BEFINDET. (ENTNOMMEN AUS: BETRIEBSANWEISUNG Z [®] RP TECHNOLOGIE) ¹²⁹	71
ABBILDUNG 4-22: ZWEI AUSFÜHRUNGEN DES Z [®] RP-SYSTEMS. A: Z [®] RP500-REAKTOR; B: Z [®] RPD- REAKTOR .	73
ABBILDUNG 4-23: TÄGLICHE LAKTATPRODUKTION VON HUMANEN MESENCHYMALEN STROMAZELLEN AUF MATERIALIEN SPONCERAM [®] /ox.p(MAG)-BMP-2 UND SPONCERAM [®] /BMP-2 KULTIVIERT IM Z [®] RP500-SYSTEM ÜBER EINEN ZEITRAUM VON 50 TAGEN.	75
ABBILDUNG 4-24: TÄGLICHER GLUCOSEVERBRAUCH VON HUMANEN MESENCHYMALEN STROMAZELLEN AUF DEN MATERIALIEN SPONCERAM [®] /ox.p(MAG)-BMP-2 UND SPONCERAM [®] /BMP-2 KULTIVIERT IM Z [®] RP500-SYSTEM ÜBER EINEN ZEITRAUM VON 50 TAGEN.	75
ABBILDUNG 4-25: DAPI-FÄRBUNG DER AUF SPONCERAM [®] /ox.p(MAG)-BMP-2 DYNAMISCH KULTIVIERTEN ZELLEN	77
ABBILDUNG 4-26: DAPI-FÄRBUNG DER AUF SPONCERAM [®] /BMP-2 DYNAMISCH KULTIVIERTEN ZELLEN	77
ABBILDUNG 4-27: TOLUIDINBLAU-FÄRBUNG DER AUF SPONCERAM [®] /BMP-2 (A) UND SPONCERAM [®] /ox.p(MAG)-BMP-2 (B) DYNAMISCH KULTIVIERTEN ZELLEN	78
ABBILDUNG 4-28: HISTOLOGISCHE FÄRBUNGEN DER AUF SPONCERAM [®] /ox.p(MAG)-BMP-2 UND SPONCERAM [®] /BMP-2 DYNAMISCH KULTIVIERTEN ZELLEN. A: VON KOSSA-FÄRBUNG; B: ALIZARINROT-FÄRBUNG; C: AP-FÄRBUNG. LINKS: SPONCERAM [®] /ox.p(MAG)-BMP-2, RECHTS: SPONCERAM [®] /BMP-2, UNTEN: UNBESIEDELTE REFERENZ.....	79
ABBILDUNG 4-29: ERGEBNISSE DER SEMIQUANTITATIVEN PCR VON MESENCHYMALEN STROMAZELLEN AUF DEN KOMPOSITMATERIALIEN SPONCERAM [®] /ox.p(MAG)-BMP-2 UND SPONCERAM [®] /BMP-2 NACH DER DYNAMISCHEN KULTIVIERUNG IM Z [®] RP500-SYSTEM ÜBER EINEN ZEITRAUM VON 50 TAGEN. DIE WERTE	

SIND ANGEGEBEN ALS DIE ERGEBNISSE EINER EINFACHBESTIMMUNG. AP = ALKALISCHE PHOSPHATASE, COL I = KOLLAGEN I, OPN = OSTEOPONTIN, OC = OSTEOCALCIN 80

ABBILDUNG 4-30: REM-AUFNAHMEN DER PROBE SPONCERAM[®]/OX.P(MAG)-BMP-2. VERGRÖßERUNGEN: A: 100-FACH; B: 250-FACH; C: 500-FACH, D: 1000-FACH 81

ABBILDUNG 4-31: REM-AUFNAHMEN DER PROBE SPONCERAM[®]/BMP-2. VERGRÖßERUNGEN: A: 100-FACH; B: 250-FACH; C, D: 1000-FACH 82

ABBILDUNG 4-32: TÄGLICHER GLUCOSEVERBRAUCH VON HUMANEN MESENCHYMALEN STROMAZELLEN AUF DEN MATERIALIEN SPONCERAM[®]/BMP-2 UND SPONCERAM[®]/OX.P(MAG)-BMP-2 KULTIVIERT IN EINEM Z[®]RPD-SYSTEM ÜBER EINEN ZEITRAUM VON 47 TAGEN 86

ABBILDUNG 4-33: DAPI-FÄRBUNG DER AUF SPONCERAM[®]/BMP-2 DYNAMISCH KULTIVIERTEN ZELLEN IM Z[®]RPD-SYSTEM 87

ABBILDUNG 4-34: DAPI-FÄRBUNG DER AUF SPONCERAM[®]/OX.P(MAG)-BMP-2 DYNAMISCH KULTIVIERTEN ZELLEN IM Z[®]RPD-SYSTEM..... 87

ABBILDUNG 4-35: HISTOLOGISCHE FÄRBUNGEN DER AUF SPONCERAM[®]/BMP-2 (RECHTS) UND SPONCERAM[®]/OX.P(MAG)-BMP-2 (LINKS) DYNAMISCH IM Z[®]RPD-SYSTEM KULTIVIERTEN ZELLEN. A: VON KOSSA-FÄRBUNG; B: ALIZARINROT-FÄRBUNG; C: AP-FÄRBUNG. OBEN SIND JEWEILS DIE PROBEN, UNTEN DIE NICHT MIT ZELLEN BESIEDELTE REFERENZMATERIALIEN GEZEIGT. 88

ABBILDUNG 4-36: ERGEBNISSE DER PCR VON MESENCHYMALEN STROMAZELLEN AUF DEN KOMPOSITMATERIALIEN SPONCERAM[®]/OX.P(MAG)-BMP-2 UND SPONCERAM[®]/BMP-2 NACH DER DYNAMISCHEN KULTIVIERUNG IM Z[®]RPD-SYSTEM ÜBER EINEN ZEITRAUM VON 50 TAGEN. DIE WERTE SIND ANGEGEBEN ALS DIE ERGEBNISSE EINER EINFACHBESTIMMUNG. AP = ALKALISCHE PHOSPHATASE, COL I = KOLLAGEN I, OPN = OSTEOPONTIN, OC = OSTEOCALCIN 89

ABBILDUNG 4-37: REM-AUFNAHMEN DER PROBE SPONCERAM[®]/BMP-2. VERGRÖßERUNGEN: A: 50-FACH; B, C: 250-FACH; D, E: 500-FACH; F: 1000-FACH..... 90

ABBILDUNG 4-38: REM-AUFNAHMEN DER PROBE SPONCERAM[®]/OX.P(MAG)-BMP-2. VERGRÖßERUNGEN: A: 50-FACH, B, C: 250-FACH; D, E: 500-FACH; F: 1000-FACH..... 91

ABBILDUNG 4-39: ERGEBNISSE DER MIT HILFE DER PIKRO-SIRIUSROT-FÄRBUNG ERMITTELTE MENGE VON KOLLAGEN BZW. GELATINE AUF SPONCERAM[®] NACH DER BESCHICHTUNG. DIE WERTE SIND ANGEGEBEN ALS MITTELWERTE AUS DREI WERTEN ± STANDARDFEHLER. STATISCH SIGNIFIKANTE UNTERSCHIEDE SIND MIT * FÜR 0,001 < p < 0,05 GEKENNZEICHNET. 95

ABBILDUNG 4-40: VERGLEICH DER VERBLIBENEN GELATINE- BZW. KOLLAGENMENGE AUF SPONCERAM[®] NACH SIEBENTÄGIGER INKUBATION IN PBS BEI 37 °C. DIE POLYMERMENGEN WURDEN MIT DEM PIKRO-SIRIUSROT-TEST BESTIMMT. DIE WERTE SIND ANGEGEBEN ALS DIE MITTELWERTE AUS VIER WERTEN ± STANDARDFEHLER. STATISCH SIGNIFIKANTE UNTERSCHIEDE NACH DER INKUBATION GEGENÜBER DEM AUSGANGSMATERIAL SIND MIT ** FÜR p ≤ 0,001 GEKENNZEICHNET. 96

ABBILDUNG 4-41: ERGEBNISSE DER DAPI-FÄRBUNG VON MC3T3-E1-ZELLEN, DIE ÜBER EINEN ZEITRAUM VON 14 TAGEN AUF SPONCERAM[®], SPONCERAM[®]/GELATINE UND SPONCERAM[®]/KOLLAGEN KULTIVIERT WURDEN. DIE WERTE SIND ANGEGEBEN ALS DIE MITTELWERTE AUS VIER WERTEN ± STANDARDFEHLER. STATISCH SIGNIFIKANTE UNTERSCHIEDE GEGENÜBER SPONCERAM[®] SIND MIT * FÜR 0,001 < p < 0,05 UND ** FÜR p ≤ 0,001 GEKENNZEICHNET..... 97

ABBILDUNG 4-42: ZEITLICHE FREISETZUNG VON RNASE AUS DEM KOMPOSITMATERIAL SPONCERAM[®]/KOLLAGEN. 99

ABBILDUNG 4-43: ZEITLICHE FREISETZUNG VON RNASE AUS DEM KOMPOSITMATERIAL SPONCERAM[®]/KOLLAGEN, BEZOGEN AUF DIE FREIGESetzte GESAMTMENGE RNASE NACH 162 STUNDEN..... 100

ABBILDUNG 4-44: REM-AUFNAHMEN DER SPONCERAM[®]/PLGA-MIKROSPHÄREN, ANGEFERTIGT AM TECHNION ISRAEL INSTITUTE OF TECHNOLOGY. VERGRÖßERUNGEN: A: 200-FACH, B: 50-FACH, C: 100-FACH..... 102

ABBILDUNG 4-45: STRUKTUR VON POLYLACTID-CO-GLYCOLID (PLGA) 102

ABBILDUNG 4-46: KUMULATIVE, ZEITLICHE FREISETZUNG VON BMP-2 AUS PLGA-MIKROSPHÄREN. DIE WERTE SIND ANGEGEBEN ALS DIE ERGEBNISSE EINER EINFACHBESTIMMUNG (n = 1)..... 104

ABBILDUNG 4-47: KUMULATIVE, ZEITLICHE FREISETZUNG VON BMP-2 AUS SPONCERAM[®]/PLGA-MIKROSPHÄREN. DIE WERTE SIND ANGEGEBEN ALS DIE ERGEBNISSE EINER EINFACHBESTIMMUNG (n = 1). 104

ABBILDUNG 4-48: ALIZARINROT-ÜBERSICHTSFÄRBUNGEN VON MC3T3-E1-ZELLEN KULTIVIERT ÜBER EINEN ZEITRAUM VON 15 TAGEN. OBEN: SPONCERAM[®]/PLGA-MIKROSPHÄRE, UNTEN: SPONCERAM[®] (LINKS: REFERENZ, MITTE UND RECHTS: BESIEDELTE PROBEN) 106

ABBILDUNG 4-49: ALIZARINROT-FÄRBUNG VON MC3T3-E1-ZELLEN AUF SPONCERAM[®], KULTIVIERT ÜBER EINEN ZEITRAUM VON 15 TAGEN..... 107

ABBILDUNG 4-50: ALIZARINROT-FÄRBUNG VON MC3T3-E1-ZELLEN AUF SPONCERAM[®]/PLGA-MIKROSPHÄREN, KULTIVIERT ÜBER EINEN ZEITRAUM VON 15 TAGEN 107

ABBILDUNG 4-51: RASTERELEKTRONENMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN DER MIT MC3T3-E1-ZELLEN BESIEDELTE UND ÜBER EINEN ZEITRAUM VON 15 TAGEN KULTIVIERTEN SPONCERAM[®]/PLGA-

MIKROSPHÄREN. VERGRÖßERUNGEN: A: 25-FACH; B, D: 50-FACH; C: 1000-FACH, E: 550-FACH, F: 25-FACH (UNBESIEDELTE REFERENZ)	108
ABBILDUNG 4-52: RASTERELEKTRONENMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN DER MIT MC3T3-E1-ZELLEN BESIEDELTEN UND ÜBER EINEN ZEITRAUM VON 15 TAGEN KULTIVierten SPONCERAM®-KERAMIKEN. VERGRÖßERUNGEN: A: 25-FACH; B: 50-FACH; C: 500-FACH, D, E: 200-FACH, F: 25-FACH (UNBESIEDELTE REFERENZ)	109
ABBILDUNG 6-1: HERSTELLUNG DES SCHIFFSCHEN REAGENZ (FUCHSINSCHWEFLIGE SÄURE).....	119
ABBILDUNG 6-2: REAKTION DES SCHIFFSCHEN REAGENZ MIT ALDEHYDGRUPPEN	119
ABBILDUNG 6-3: REAKTION VON FLUORESCEINISOTHIOCYANAT MIT EINER AMINOGROUPE	122
ABBILDUNG 6-4: SCHALTBILD DES Z®RP-REAKTORSYSTEMS. A: FLASCHE FÜR ÜBERLAUFMEDIUM, B: FLASCHE FÜR FRISCHES MEDIUM, C: FLASCHE FÜR BASE, 5: ANSCHLUSS EINGANG ZIRKULATION, 6: ANSCHLUSS KOPFRAUMBEGASUNG, 7: ANSCHLUSS ÜBERLAUFSCHLAUCH, 8: ANSCHLUSS GASZUFUHR SPARGER, 9: ANSCHLUSS AUSGANG ZIRKULATION, 10: BLINDSTOPFEN (ADAPTIERT AUS: BETRIEBSANWEISUNG Z®RP TECHNOLOGIE) ¹²⁹	127
ABBILDUNG 6-5: TECHNISCHE ZEICHUNGEN DER VERWENDETEN Z®RP-BIOREAKTORSYSTEME. LINKS: Z®RP500-REAKTOR, RECHTS: Z®RPD-REAKTOR. 1: ANSCHLUSS MOTOR AN DIE STEUEREINHEIT, 2: ADAPTER FÜR PH-SENSOR, 3: ADAPTER FÜR pO ₂ -SENSOR, 4: ADAPTER FÜR pT100-TEMPERATURFÜHLER, 5: MEDIENROHR (ANSCHLUSS EINGANG ZIRKULATION), 6: MEDIENDÜSENROHR (ANSCHLUSS KOPFRAUMBEGASUNG), 7: ANSCHLUSS ÜBERLAUFSCHLAUCH, 8: ANSCHLUSS GASZUFUHR SPARGER, 9: ANSCHLUSS AUSGANG ZIRKULATION, 10: BLINDSTOPFEN, 11: PROBENAHMESEPTUM (ADAPTIERT AUS BETRIEBSANWEISUNG Z®RP TECHNOLOGIE UND PRODUKTINFORMATION) ^{129, 152}	129
ABBILDUNG 6-6: STRUKTUR VON NATRIUMALIZARINSULFONAT (ALIZARINROT S)	132
ABBILDUNG 6-7: MÖGLICHE STRUKTUREN VON ALIZARINROT S, ADSORBIERT AN HYDROXYLAPATIT: SALZ- (LINKS) UND CHELATFORM (RECHTS). X = H, Na ¹⁵⁴	132
ABBILDUNG 6-8: STRUKTUR VON 4',6-DIAMIDINO-2-PHENYLINDOL (DAPI).....	133
ABBILDUNG 6-9: STRUKTUR VON 3-AMINO-7-DIMETHYLAMINO-2-METHYL-PHENOTHIAZIN-5-IUMCHLORID (TOLUIDINBLAU)	134
ABBILDUNG 6-10: REAKTIONSMECHANISMUS DER HYDROLYSE VON BCIP MIT ANSCHLIEßENDER OXIDATION ZUM UNLÖSLICHEN INDIGOFARBSTOFF	135
ABBILDUNG 6-11: REAKTIONSMECHANISMUS DER REDUKTION VON NBT	136
ABBILDUNG 6-12: STRUKTUR VON SIRIUSROT.....	142

TABELLENVERZEICHNIS

TABELLE 3-1: DURCHSCHNITTSWERTE FÜR MECHANISCHE DATEN HUMANEN KNOCHENMATERIALS ¹⁹	19
TABELLE 4-1: CHEMISCHE QUANTIFIZIERUNG DER AUF DER OBERFLÄCHE DER P(MVA)-KOMPOSITE DETEKTIERTEN ELEMENTE. DIE WERTE SIND ANGEZEIGT ALS MITTELWERT AUS N MESSUNGEN ± STANDARDFEHLER.	56
TABELLE 4-2: CHEMISCHE QUANTIFIZIERUNG DER AUF DER OBERFLÄCHE DER OX.P(MAG)-KOMPOSITE DETEKTIERTEN ELEMENTE. DIE WERTE SIND ANGEZEIGT ALS DER MITTELWERT AUS N MESSUNGEN ± STANDARDFEHLER.	56
TABELLE 6-1: DATEN DER IN DIESER ARBEIT VERWENDETEN HUMANEN MESENCHYMALEN STROMAZELLEN.....	116
TABELLE 6-2: TECHNISCHE SPEZIFIKATIONEN UNTERSCHIEDLICHER SPONCERAM [®] -MATERIALIEN (K.A. = KEINE ANGABE) ^{150, 151}	125
TABELLE 6-3: TECHNISCHE SPEZIFIKATIONEN DER UNTERSCHIEDLICHEN Z [®] RP-REAKTORMODELLE ^{129, 152}	128
TABELLE 6-4: FÜR DIE PCR VERWENDETE, SPEZIFISCHE PRIMER	139
TABELLE 6-5: ZYKLEN DER RT-PCR, T _A = ANNEALING-TEMPERATUR	140

ZUSAMMENFASSUNG

Die Rekonstruktion von Knochendefekten kritischer Größe, hervorgerufen durch Trauma, Krankheit oder abnormale skelettale Entwicklung, stellt eine große Herausforderung dar. Der derzeitige Standard, die Verwendung allogener Ersatzmaterialien, birgt die Gefahr von Abstoßungs- und Immunreaktionen sowie Infektionen und ist aufgrund geringer Spenderzahlen begrenzt. Das Tissue Engineering kann durch die Entwicklung von Knochenersatzmaterialien aus Gerüstsubstanzen und lebenden Zellen einen Ausweg aus dieser Problematik darstellen¹⁻³. Dabei muss der entwickelte Hartgewebeersatz die Charakteristika natürlichen Knochens optimal imitieren. Eine große Zahl biodegradierbarer und permanent beständiger Materialien sind bereits experimentell oder klinisch untersucht worden, darunter hauptsächlich Keramikmaterialien sowie natürliche und synthetische Polymere. Beide Stoffklassen sind jedoch nur eingeschränkt als Biomaterial einsetzbar: Polymere zeigen für den Hartgewebeersatz unzureichende Stabilität, Keramiken weisen nur limitierte bioaktive Eigenschaften auf. Durch Funktionalisierung der Materialien mit bioaktiven Liganden können Kompositmaterialien mit steuerbaren biologischen Eigenschaften hergestellt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine makroporöse Zirkoniumdioxid-Keramik (Sponceram[®]) mit Hilfe unterschiedlicher Ansätze in ein biomimetisches Kompositmaterial überführt. Poly-L-Lysin als adhäsionsfördernder Faktor sowie BMP-2 zur Induktion der osteogenen Differenzierung wurden mit Hilfe zweier unterschiedlicher Polysaccharid basierter Polymere (p(MVA), ox.p(MAG)) auf der Keramikoberfläche adsorbiert. Die Polymere wurden als Spacermoleküle verwendet, um die bioaktiven Liganden von der Keramikoberfläche zu distanzieren. Die kovalente Anbindung von Poly-L-Lysin und BMP-2 wurde durch Reaktion mit in den Polymeren vorhandenen Aldehydgruppen realisiert. Der Vorteil dieser Reaktion liegt in der Durchführung unter milden Reaktionsbedingungen und dem Entstehen von Wasser als einzigem Nebenprodukt. Die mit den Polymer-Ligand-Konjugaten funktionalisierten Keramikmaterialien wurden qualitativ und quantitativ analysiert sowie in Zellkulturuntersuchungen getestet. Die Poly-L-Lysin enthaltenden Kompositmaterialien zeigten das Potential, die Adhäsion von Zellen gegenüber unmodifiziertem Sponceram[®] zu verbessern. Die osteogene Differenzierung von humanen mesenchymalen Stromazellen, die

auf Sponceram[®]/ox.p(MAG)-BMP-2 kultiviert wurden, konnte im Rahmen einer Bioreaktor-Kultivierung im Drehbettreaktor-System Z[®]RP nachgewiesen werden.

In einem zweiten Ansatz wurde die Verwendung von Kollagen und Gelatine als Matrix für die Beschichtung der Keramik und den Einschluss bioaktiver Moleküle untersucht. RNase wurde als Modellprotein in die Matrices eingeschlossen und dessen zeitliche Freisetzung bestimmt. In ersten Zellkulturuntersuchungen mit der Modellzelllinie MC3T3-E1 konnte gezeigt werden, dass die aus Sponceram[®] und Gelatine bzw. Kollagen bestehenden Kompositmaterialien für die Zellkultivierung geeignet sind.

Ergänzend wurden Untersuchungen an Sponceram[®]-Keramiken durchgeführt, die mit BMP-2 beladenen PLGA-Mikrosphären bestückt waren. Erste Untersuchungen der osteogenen Differenzierung von MC3T3-E1-Zellen, die auf den Kompositen kultiviert wurden, zeigten keine eindeutigen Resultate, so dass weitere Untersuchungen dieses Materials notwendig sind.

Schlagworte: Knochen Tissue Engineering, Bioreaktor, Funktionalisierung, Kompositmaterial

ABSTRACT

The reconstruction of large bone defects, caused by trauma, diseases or abnormal skeletal development poses a therapeutic challenge for surgeons. Presently, allogenic grafts are used as standard material, but the application is limited by quantitative restrictions and risks of infections and immune responses. Tissue Engineering may contribute to the search of alternatives by the development of biofunctional grafts using matrix materials and living cells. The objective is to imitate the characteristics of natural bone optimally. Several biodegradable and permanent materials including ceramics as well as synthetic and natural polymers have been already tested experimentally and clinically. However, both types of materials are showing limitations concerning their applicability as biomaterials. Polymers are not stiff enough in order to be provided as bone substitutes, ceramics often do not show bioactive properties. The functionalization of the basis materials using bioactive components leads to the development of smart composite materials with controllable biological properties.

In the present work, a macroporous zirconium dioxide ceramic (Sponceram[®]) was transformed into a biomimetic composite material by different ways. Poly-L-lysine serving as an adhesion enhancing factor and BMP-2 inducing the osteogenic differentiation of cells were adsorbed on the ceramic surface by using two different polysaccharide based polymers (p(MVA), ox.p(MAG)). The polymeres were used as spacer molecules in order to distance the bioactive ligands from the ceramic surface. The covalent coupling of poly-L-lysine and BMP-2 was realized by undergoing a reaction with aldehyde groups present in the polymers. The advantage of this chemistry is the practicability under mild reaction conditions and the generation of water as non toxic byproduct. The ceramic materials which were functionalized with the conjugates consisting of polymer and ligand were analysed qualitatively and quantitatively and were furthermore tested in cell culture concerning their bioactive potential. The composite materials containing poly-L-lysine showed the capability to increase the adhesion of cells compared to untreated Sponceram[®]. The osteogenic differentiation of human mesenchymal stromal cells cultivated on Sponceram[®]/ox.p(MAG)-BMP-2 was determined within a bioreactor cultivation in the rotating bed system Z[®]RP.

In a second approach, the application of collagen and gelatine as coating matrices for the ceramic and for the incorporation of bioactive molecules was studied. RNase used as a model protein was incorporated into the matrices and its release was measured. Cell culture tests

using the model cell line MC3T3-E1 showed the qualification of the composite materials for cell culture applications.

Additionally, Sponceram[®] modified with BMP-2 loaded PLGA microspheres were tested. A first determination of the osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells cultivated on the composites did not show clear results which should be investigated furtheron.

Key words: Bone Tissue Engineering, bioreactor, functionalization, composite material, osteogenic differentiation

1. EINLEITUNG

Knochen ist eine hoch spezialisierte Form des Bindegewebes, das im Körper hauptsächlich Schutz- und Stützfunktionen übernimmt. Obwohl der Knochen eine einzigartige Kapazität zur Selbstheilung und –erneuerung besitzt, können dennoch nur solche Defekte regenerieren, die eine kritische Größe nicht überschreiten. Bei größeren Defekten ist die Verwendung von Knochentransplantaten notwendig, um eine effiziente Heilung zu ermöglichen. Über Jahre hinweg war die Verwendung autologen Knochens der sogenannte „goldene Standard“ in der Transplantationsmedizin. Durch die Entnahme von patienteneigenem Knochenmaterial (meist aus Beckenkamm, Waden- oder Schienbein) sind Immunreaktionen zwar ausgeschlossen, jedoch ist die mögliche Entnahmemenge und damit auch der Anwendungsbereich stark limitiert. Des Weiteren können Komplikationen wie Weichteilinfektionen, Wund- und Knochenheilungsstörungen oder Blutgefäß- und Nervenschädigungen wegen der Knochenentnahme auftreten. Neben autologen Knochentransplantaten können auch allogene (homologe) oder xenogene (heterologe) Materialien verwendet werden, die jedoch Immunreaktionen hervorrufen können oder durch die pathogene Erreger übertragen werden können. Eine weitere Alternative zu den genannten Materialien ist der Einsatz von Metallen oder Keramiken, die ihrerseits allerdings zahlreiche Nachteile aufweisen. Metalle werden nur schlecht in das umgebende Gewebe integriert, Keramiken können spröde sein und somit in Bereichen hoher Belastung nicht ausreichend stabil sind. Weiterhin werden bei der Transplantation von Knochenmaterial humanen oder tierischen Ursprungs bereits wichtige biologische Faktoren für die Regeneration des defekten Knochens mit übertragen, die bei der Verwendung von Metallen oder Keramiken fehlen.

Die Suche nach einem geeigneten Knochenersatzmaterial stellt somit gegenwärtig eine große Herausforderung dar. Im Bereich des Tissue Engineering wird für diese Applikation folgender Ansatz verfolgt: Aus geeigneten dreidimensionalen Gerüstmaterialien, lebenden Zellen und Signalfaktoren sowie unter Einwirkung externer Stimuli sollen funktionelle Gewebersatzmaterialien hergestellt werden. Das Gerüstmaterial dient dabei als Matrix für die verwendeten Zellen und stellt eine gewebespezifische Umgebung und Architektur bereit. Weiterhin dient es als Reservoir für Wasser, Nährstoffe und notwendige Signalstoffe wie Cytokine oder Wachstumsfaktoren. Als wichtige Voraussetzungen, die ein geeignetes Biomaterial erfüllen muss, sind zunächst Biokompatibilität, Porosität und mechanische

Stabilität zu nennen. Die Beschaffenheit der Oberfläche ist entscheidend, um die Integration des Materials zu gewährleisten. Die verwendeten (meist autologen) Zellen sollen weiterhin zur osteogenen Differenzierung angeregt werden (Osteoinduktion). Die derzeit am häufigsten verwendeten Biomaterialien sind synthetische oder natürliche Polymere und Keramiken. Da diese jedoch nur eingeschränkt bioaktiv und nicht osteoinduktiv wirken, werden derartige Materialien durch Verwendung von Signalfaktoren (z.B. Wachstumsfaktoren) funktionalisiert. Durch Kombination von polymeren und keramischen Anteilen können Kompositmaterialien hergestellt werden, die in Bezug auf ihre strukturellen und mechanischen Eigenschaften optimiert werden können. Da Knochen ein mechanisch aktives Gewebe darstellt, ist ein weiterer entscheidender Faktor in der Entwicklung funktioneller Knochenersatzmaterialien eine dynamisch aktive Umgebung die der *in vivo* ähnelt. In speziell entwickelten Bioreaktoren können die mit Signalfaktoren ausgestatteten und mit Zellen besiedelten Biomaterialien während der Kultivierung mechanischen Belastungen ausgesetzt und damit gezielt stimuliert werden.

2. AUFGABENSTELLUNG

Ziel dieser Arbeit ist die Funktionalisierung der makroporösen Zirkoniumdioxidkeramik Sponceram[®] zu einem biomimetischen Kompositmaterial, das die osteogene Differenzierung mesenchymaler Stromazellen induzieren sollⁱ. Dazu werden drei unterschiedliche Ansätze verfolgt: Zunächst wird die Oberfläche des Keramikmaterials mit bioaktiven Komponenten modifiziert, indem diese mit Hilfe sogenannter „Spacermoleküle“ adsorbiert werden. Als Spacermoleküle sollen zwei Polyvinylsaccharide verwendet werden, die auf dem Polymer Poly(2-Desoxy-N-methacrylamido-D-glucose) basieren. Im zweiten Ansatz sollen die Signalmoleküle in geeignete polymere Matrixmaterialien eingebettet werden, die ihrerseits auf die Keramikoberfläche aufgebracht werden. Durch diesen Ansatz soll eine kontrollierte Freisetzung der Komponenten erreicht werden. Das gleiche Ziel verfolgt auch der dritte Ansatz, in dem die bioaktiven Moleküle in PLGA-Mikrosphären eingeschlossen werden, die in die Poren der Keramik eingebracht werden. Als bioaktive Moleküle sollen im ersten Ansatz die adhäsionsfördernde polymere Aminosäure Poly-L-Lysin sowie der osteogene Wachstumsfaktor BMP-2 verwendet werden. Für die Einbettung in die unterschiedlichen Matrices soll ausschließlich BMP-2 verwendet werden.

Die Eignung der Kompositmaterialien als Biomaterial soll zunächst mit Hilfe der Modellzelllinie MC3T3-E1 untersucht werden. Um das differenzierungsinduzierende Potential der Materialien zu untersuchen, sollen humane mesenchymale Stromazellen verwendet werden, die aus adultem Fettgewebe gewonnen werden. Ausgewählte Kompositmaterialien sollen mit diesen Zellen besiedelt und im Z[®]RP-System, einem speziellen Drehbettreaktor, kultiviert werden. Der Status der osteogenen Differenzierung soll mit Hilfe von histologischen Färbungen, rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen und Analyse der Genexpression beurteilt werden. Weiterhin soll das verwendete Z[®]RP-Reaktorsystem mit einem neu entwickelten Einmal-Reaktorsystem verglichen werden.

ⁱ Diese Arbeit wurde im Rahmen des DFG-Forschungsprojekt „Tailor-made functionalized biomaterials for cell culture applications (bone tissue generation)“ angefertigt

3. THEORETISCHE GRUNDLAGEN

3.1. EIGENSCHAFTEN VON KNOCHEN

3.1.1. AUFBAU DES KNOCHENS

Knochen ist ein natürliches Kompositmaterial, das zu 10 % aus Wasser, zu 70 % aus anorganischer und zu 20 % aus organischer Substanz besteht. Die organische Komponente des Knochens, auch als Osteoid bezeichnet, besteht zu 95 % aus Kollagen und zu 5 % aus nicht-kollagenen Proteinen wie Osteocalcin (OC), Osteonektin (ON), Knochenproteoglycan, Bone Sialoprotein (BSP), *bone morphogenetic proteins* (BMPs) und Proteolipid. Der anorganische Part besteht zu 95 % aus Hydroxylapatit, die übrigen 5 % werden aus Mg-, Na- und K-Fluoriden sowie Chloriden gebildet⁴ (vgl. Abbildung 3-1).

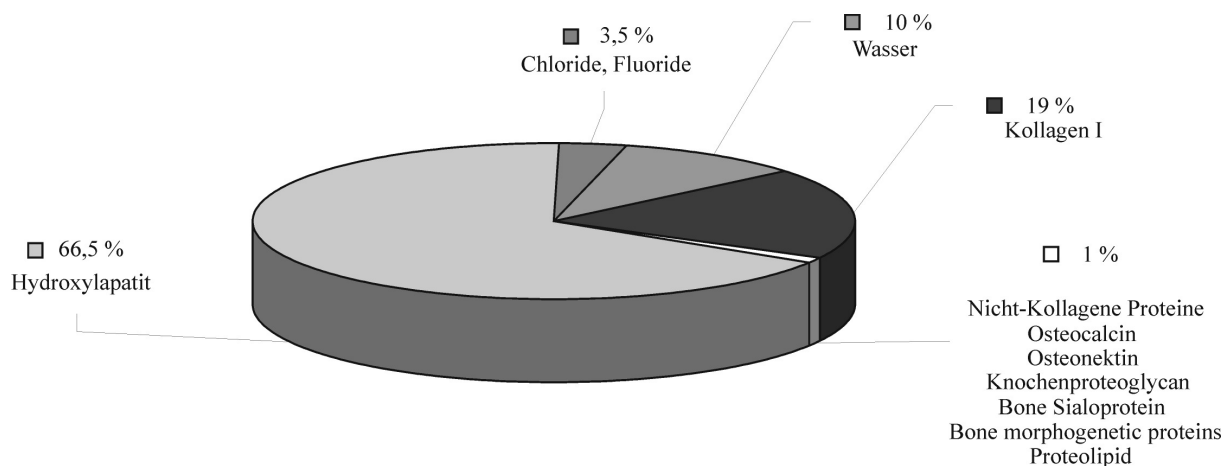


Abbildung 3-1: Zusammensetzung des Knochens. (adaptiert aus: Felsenberg, 2001)⁴

Zellen des Knochengewebes

Im Knochengewebe kommen vier unterschiedliche Zelltypen vor: knochenbildende Osteoblasten, reife Osteozyten und *bone lining cells* sowie knochenabbauende Osteoklasten (s. Abbildung 3-2). Die ersten drei erwähnten Typen entstehen aus Osteoprogenitorzellen (vgl. Abschnitt 3.3), Osteoklasten entwickeln sich aus hematopoetischen Zellen der Monozyten-Makrophagen-Linie⁵.

Osteoblasten sind vollständig differenzierte, etwa 20 µm große, kuboidale Zellen⁶. Sie synthetisieren die Proteine des Osteoids (Kollagen I, Osteopontin, Osteonektin, Osteocalcin, Bone Sialoprotein) und sezernieren Wachstumsfaktoren wie TGF-β (*transforming growth factor β*), BMP (*bone morphogenetic protein*), PDGF (*Platelet-derived growth factor*) und IGF (*Insulin-like growth factor*), die in der Knochenmatrix gespeichert werden. Weiterhin produzieren sie große Mengen alkalischer Phosphatase, die an der Vorbereitung des Osteoids für die Mineralisierung beteiligt ist. Unterhalb der Osteoblasten befindet sich immer eine Schicht unmineralisierten Osteoids^{7,8}. Dessen Deposition findet im Allgemeinen in Richtung der Knochenoberfläche statt, periodisch jedoch umschließt es den Osteoblasten und produziert somit die nächste Schicht von Osteozyten. Zell-Zell-Kanäle (*gap junctions*) verbinden die Osteoblasten mit ihren Nachbarn und sichern die interzelluläre Kommunikation. Über ein Netzwerk von kleinen Kanälen (Canaliculi) kommunizieren sie zudem mit den Osteozyten unterhalb der Knochenoberfläche. Nur etwa 10 - 20 % der Osteoblasten wandeln sich im Laufe ihrer weiteren Entwicklung entlang der osteoblastären Linie in Osteozyten und *bone lining cells* um, der Rest unterliegt vermutlich der Apoptose⁷ (vgl. Abschnitt 3.3).

Bone lining cells (auch Knochendeckzellen, Knochensaumzellen, Knochenbelegzellen) sind flache Zellen osteoblastären Phänotyps, die sich hauptsächlich an den inneren (endostealen) Knochenoberflächen befinden und weder am Knochenauf- noch -abbau beteiligt sind. Aus diesem Grund werden sie auch als inaktive Osteoblasten bezeichnet. Sie werden neben den Osteozyten als eine von zwei möglichen Formen terminal differenzierter Osteoblasten angesehen⁹. Sie besitzen nur wenige zytoplasmatische Organellen und haben ihre synthetisierenden Eigenschaften fast vollständig verloren. Auch sie verfügen über *gap junctions* und kommunizieren mit den Osteozyten über kleine Kanäle (Canaliculi). *Bone lining cells* besitzen einige Eigenschaften synthetisierender Osteoblasten, so exprimieren sie

Hormonrezeptoren und sind möglicherweise in der Lage Wachstumsfaktoren und Zytokine zu produzieren. Sie stellen die größte Population reifer Osteoblasten dar⁸. Vermutlich können diese als inaktiv bezeichneten Zellen bei Bedarf wieder aktiviert und zu Osteoblasten umgewandelt werden⁷. Es ist wenig über die genaue Funktion der *bone lining cells* bekannt, es wurden jedoch unterschiedliche Ansätze diskutiert. Talmage postulierte, dass sie als funktionelle „Membran“ für den Mineralmetabolismus dienen¹⁰. Weiterhin wurde ihnen eine Rolle in der interzellulären Signalübertragung zugeschrieben⁸.

Osteozyten sind reife Osteoblasten, die bei Fortschreiten der Mineralisierung von der Matrix eingeschlossen und in Knochenzellhöhlen, den Lakunen, eingebettet werden. Sie sind 20 - 60 µm groß und sind über Canaliculi miteinander verbunden, so dass der Transport von Stoffwechselprodukten und die interzelluläre Kommunikation gewährleistet sind. Osteozyten bleibt eine geringe Syntheseaktivität erhalten, so dass sie kleine Mengen des Osteoids synthetisieren können¹¹. Osteozyten sind neben der interzellulären Kommunikation an der Mineralstoff-Homöostase und der Mechanotransduktion, also der Umwandlung von mechanischen in biochemische Signale beteiligt⁶.

Osteoklasten sind vielkernige Riesenzellen, die bis zu 100 µm groß werden können und für die Knochenresorption verantwortlich sind⁶. Wenn sie aktiv sind, befinden sich Osteoklasten direkt auf der Knochenoberfläche. An der dem Knochen anliegenden Seite der Zelle wird dessen Plasmamembran durch zahlreiche Faltungen stark vergrößert. Dieser zentrale Bereich der Membran wird als *ruffled border* bezeichnet, hier findet die eigentliche Knochenresorption statt. Die *ruffled border* wird von der *clear zone* umgeben, über die der Osteoklast während des Resorptionsvorgangs an der Oberfläche des Knochens verankert ist⁷. An der Stelle des Knochenabbaus entsteht eine Resorptionsbucht (Howship'sche Lakune). Osteoklasten sind mobile Zellen, die sich nach der Bildung einer Resorptionsbucht über die Oberfläche des Knochens bewegen, um an einer anderen Stelle aktiv zu werden⁴.

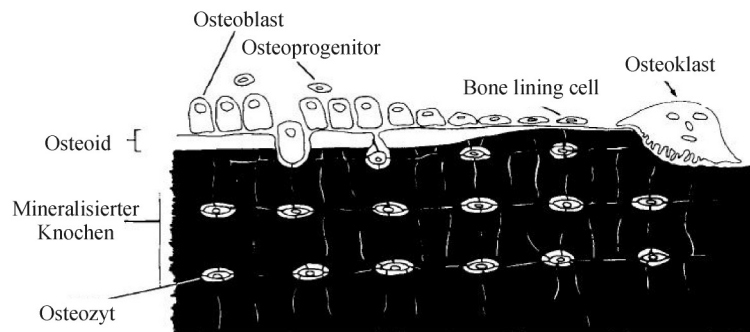


Abbildung 3-2: Topografische Beziehungen zwischen den Zellen des Knochengewebes (adaptiert aus Marks und Popoff, 1988)¹²

Um die mechanische Funktionalität des Skeletts zu gewährleisten, unterliegt der Knochen einem ständigen *Remodelling*. Durch die Belastung des Knochens und den damit einhergehenden Verformungen treten Mikrofrakturen auf, die permanent repariert werden müssen. Durch die Aktivität und das Zusammenspiel von Osteoklasten und Osteoblasten wird fortwährend Knochen resorbiert, gefolgt von der Synthese und Mineralisierung neuer Knochenmatrix. Der gesamte Prozess des Auf- und Abbaus dauert etwa 3 – 4 Monate⁴. Die Umformung wird unter anderem durch die Mechanosensitivität der Osteozyten gesteuert.

Die Anpassung des Knochens an neue bzw. veränderte mechanische Belastungen geschieht in mehreren Schritten. Beim mechanischen Einkuppeln (dem Beginn der mechanischen Belastung) werden Flüssigkeitsströmungen bzw. Scherkräfte in Flüssigkeiten des Netzwerks der Lakunenkanäle des Knochens induziert. Die lokalen Signale werden anschließend beim biochemischen Einkuppeln in biochemische Signale umgeformt. Dieser als Transduktion bezeichnete Vorgang erfolgt über Stoffwechselwege in Zellmembran und Zytoskelett. Die Signale werden von den Sensorzellen (wahrscheinlich Osteozyten und *bone lining cells*) zu den Effektorzellen (wahrscheinlich Osteoblasten, Osteoklasten) weitergegeben, wobei dies über so genannte Effektor-Signalmoleküle, vermutlich Prostaglandine (PG) und Stickstoffmonoxid (NO), geschieht. Die Reaktion auf diese Signale ist der Umbau des Knochens (Aufbau durch Osteoblasten oder Abbau durch Osteoklasten) entsprechend den mechanischen Belastungen (Abbildung 3-3)⁶. Weinbaum et al. berechneten, dass die in den Lakunenkanälen auftretenden Flüssigkeitsscherkräfte *in vivo* im Bereich von 0,8 - 3 Pa liegen¹³.

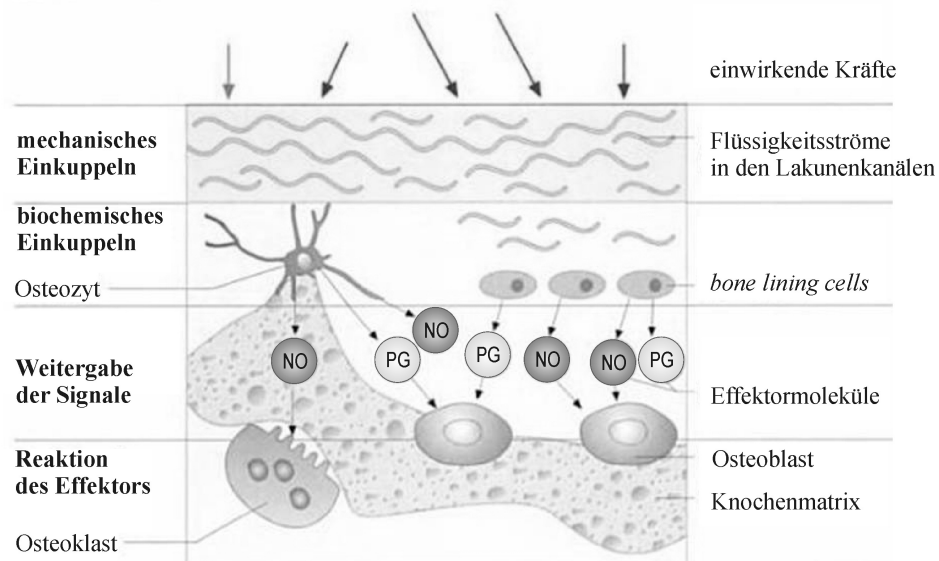


Abbildung 3-3: Schematische Darstellung der Mechanotransduktion (adaptiert aus Jerosch, Bader, Uhr, 2002)⁶

Aufbau des Knochengewebes

Nach der Art der Anordnung der Kollagenfibrillen im Knochen kann zwischen zwei grundlegenden Formen unterschieden werden: dem Geflechtknochen und dem Lamellenknochen. Im Geflechtknochen verlaufen die Kollagenfasern ohne besondere Orientierung zu den Gefäßen. Diese Knochenart kommt beim Menschen während der Knochenentwicklung, der Knochenheilung an den Ansatzstellen von Sehnen und Bändern sowie in Teilen des Schädelknochens vor. In den ersten Lebensjahren wird der Geflechtknochen durch Remodellierungen durch den funktionell höher strukturierten Lamellenknochen ersetzt¹⁴.

Der Lamellenknochen Erwachsener besitzt einen schalen- bzw. schichtenförmigen Aufbau aus helikal verlaufenden, parallel angeordneten Kollagenfaserbündeln und Apatitkristallen mit entsprechender Parallelausrichtung¹⁴. Histologisch können zwei grundlegende Formen unterschieden werden: Die Kortikalis macht etwa 80 - 85 % des gesamten Skeletts aus und dominiert die langen Knochen der Extremitäten. Die Spongiosa (15 - 20 %) ist hauptsächlich

in den Wirbelkörpern und dem Beckenknochen präsent^{4, 15}. Das Verhältnis zwischen Kortikalis und Spongiosa variiert erheblich in den unterschiedlichen Knochen.

Die Kortikalis ist aus den Haver'schen Systemen (kortikale Osteone) aufgebaut. Dies sind zylindrische Gebilde, die aus dünnen Knochenlamellen (Haver'sche Lamellen) und einem zentralen Kanal (Haver'scher Kanal), in dem Nerven und Blutgefäße liegen, bestehen. Seitliche Verzweigungen der Haver'schen Kanäle, die sogenannten Volkmann'schen Kanäle, verbinden die einzelnen Osteone miteinander (Abbildung 3-4). In einem normalen Skelett finden sich insgesamt etwa 21×10^6 Haver'sche Systeme. Aufgrund des räumlichen Aufbaus der Haver'schen Systeme ist im Vergleich zur Spongiosa nur eine relativ kleine Fläche mit Zellen bedeckt, woraus eine geringere metabolische Aktivität resultiert. Die Kortikalis ist an der Außenseite vom Periost (der äußeren Knochenhaut), an der Innenseite vom Endost (der inneren Knochenhaut) begrenzt. Das Periost ist wichtig während des Knochenwachstums und der Frakturheilung. Die Zunahme des Knochenumfangs (appositionelles oder Dickenwachstum) findet im Allgemeinen durch externe Formation von neuem Gewebe am Periost und gleichzeitiger interner Resorption am Endost statt. Wächst der Knochen in seinem Umfang, nimmt auch das Volumen der Markhöhle zu. Dieser Vorgang bleibt zeitlebens erhalten, bei einem bestehenden Gleichgewicht zwischen Knochenauf- und -abbau bleibt die Knochenwand gleich dick, wobei der Knochenumfang langsam zunimmt. Bei im Wachstum befindlichen Jugendlichen überwiegt der Knochenaufbau etwas, da das Körpergewicht steigt und die steigende Belastung der Knochen ausgeglichen werden muss. Bei älteren Menschen nimmt die funktionelle Belastung der Knochen ab, der Knochen kann dünner werden, die Knochenresorption überwiegt¹⁶.

Die Spongiosa besteht aus Knochenbälkchen (Trabekel) mit einer Dicke zwischen 50 und 400 μm . Die Trabekel sind wabenförmig miteinander verbunden und maximieren somit die mechanischen Eigenschaften des Knochens. Die Trabekel selbst sind aus halbmondförmigen Untereinheiten (*bone structural units*, BSU) aufgebaut. In den Hohlräumen der Spongiosa befindet sich in der Nähe der Gelenke das Blut bildende, rote Knochenmark.

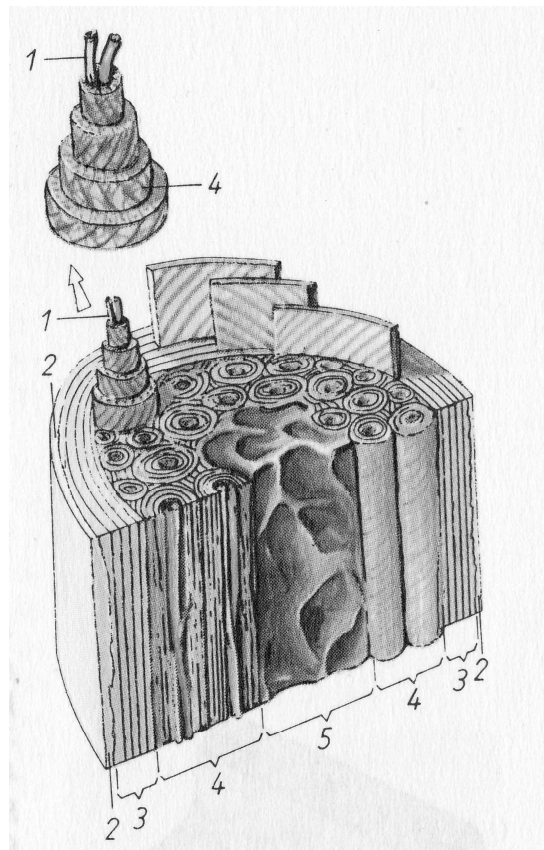


Abbildung 3-4: Aufbau des Knochengewebes, 1: Haversche Kanäle, 2: Periost, 3: äußere Grundlamellen, 4: Osteon, 5: Spongiosabälkchen (entnommen aus Geissler et al, 1976)¹⁷

Grundlegende Knochenformen

Aufgrund seiner äußeren Form unterscheidet man drei Arten von Knochen: kurze, lange sowie platte Knochen.

Kurze Knochen, z.B. Hand- und Fußwurzelknochen, sind hauptsächlich aus Spongiosa aufgebaut und nur von einer dünnen Schicht Kortikalis umgeben.

Lange Knochen (z.B. Oberschenkel- oder Oberarmknochen) werden auch Röhrenknochen genannt. Sie bestehen aus einem röhrenförmigen, aus Kortikalis bestehenden Mittelstück, der Diaphyse. Die Spongiosa fehlt hier fast vollständig, im Innern befindet sich die Markhöhle, die beim Erwachsenen mit dem gelben, aus Fettgewebe bestehenden Knochenmark gefüllt ist. An beiden Enden der Diaphyse befinden sich zwei verdickte Endstücke, die Epiphysen. Diese

sind von einer sehr dünnen Schicht Kortikalis umgeben, darunter findet sich die Spongiosa (Abbildung 3-5). Der in der Nähe der Epiphyse befindliche, unscharf abgegrenzte Abschnitt der Diaphyse, der hauptsächlich aus Spongiosa besteht, wird als Metaphyse bezeichnet. Während des Knochenwachstums enthält die Metaphyse die Epiphysenfuge, die dem Längenwachstum (interstitielles Wachstum) des Knochens dient. Die aus hyalinem Knorpel bestehende Fugenzone mineralisiert während des Wachstums, durch Chondroklasten wird der Knorpel ab-, durch Osteoblasten der Knochen aufgebaut. Ist die Epiphysenfuge geschlossen, so ist das Längenwachstum abgeschlossen.

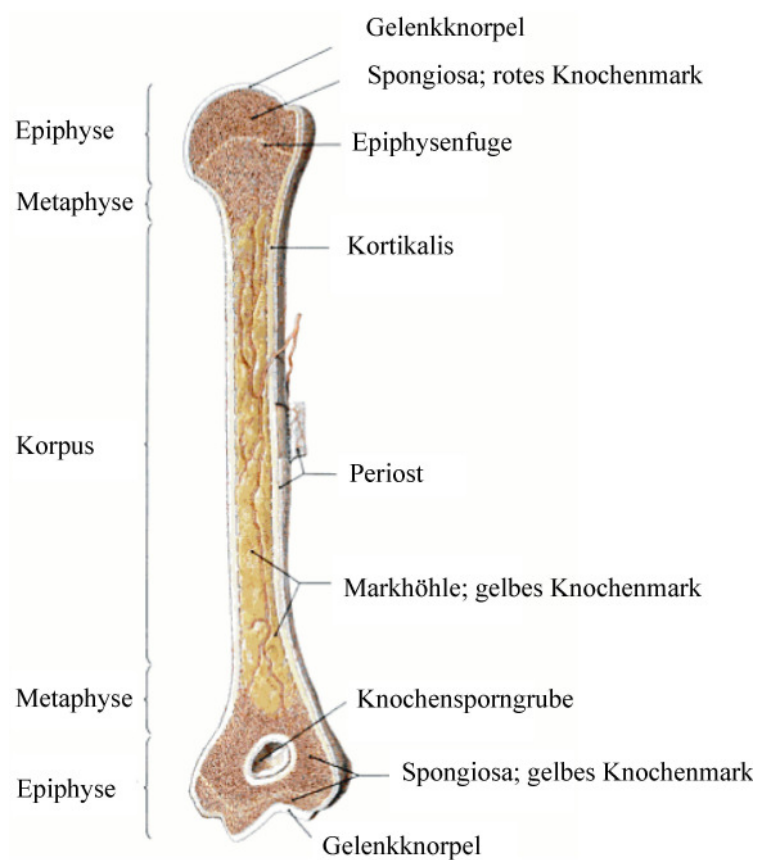


Abbildung 3-5: Aufbau des Röhrenknochens (adaptiert aus Steinbrück, Baumhoer, Henle 2008)¹⁸

Platte Knochen (z.B. Brustbein, Rippen oder Schädelknochen) bestehen aus zwei Schichten Kortikalis, zwischen denen eine mehr oder weniger dicke Schicht Spongiosa zu finden ist. In einigen Knochen (z.B. dem Schulterblatt) kann die Spongiosa sogar vollständig fehlen.

3.1.2. FUNKTIONELLER KNOCHENBAU

Knochen ist ein physiologisch dynamisches Gewebe, dessen primäre Aufgabe es ist, ein mechanisches Stützsystem für muskuläre Aktivitäten bereitzustellen sowie Organe und Weichgewebe zu schützen. Es existiert eine dynamische Struktur-Funktions-Beziehung zwischen dem Knochen und den mechanischen Belastungen, die auf ihn wirken, die als Wolff's Gesetz beschrieben wird. Dieses sagt aus, dass Form und Stärke des Knochens von der Art und der Intensität der Belastung (der mechanischen Spannung und dynamischen Dehnung) abhängt und sich funktionell an veränderte Bedingungen anpasst¹⁹. Die mechanischen Eigenschaften von Knochen variieren mit der Stärke und Richtung der ihnen ausgesetzten Belastung, sie verhalten sich anisotrop (vgl. Tabelle 3-1)¹⁹. Eine weitere Eigenschaft des Knochens ist seine Viskoelastizität. Ein viskoelastisches Material verhält sich abhängig von der Geschwindigkeit der Belastung unterschiedlich. Schnell eintretenden Belastungen gegenüber reagiert das Material mit großer Steifheit, bei langsam einsetzenden Belastungen ist das Material nachgiebig. Dieses Verhalten ist hauptsächlich auf den Wasseranteil im Knochen zurückzuführen. Knochen verhalten sich nicht linear elastisch, sondern zeigen sehr schnell eine Fließneigung, d. h. dass sie einer Belastung mit einer dauerhaften Deformation nachgeben.

Auf den Knochen wirken Zug-, Druck- sowie Biegespannungen. Durch seine Leichtbauweise folgt er dem Minimum-Maximum-Prinzip: bei einem Minimum an Material wird ein Maximum an Festigkeit erzielt. Realisiert wird dieses Prinzip dadurch, dass nur dort Material vorhanden ist, wo es wirklich benötigt wird. Des Weiteren wird die Beanspruchung der einzelnen Strukturen durch verschiedene Bauprinzipien herabgesetzt.

Bei einem durch Biegung beanspruchten Stützelement stellt in der Technik das Rohr die optimale Konstruktion dar. Gegenüber einem massiven Stab gleichen Gewichts weist es eine deutlich größere Festigkeit auf. Der Röhrenknochen besitzt somit aufgrund seiner Form eine hohe Biegefestigkeit. Durch die Biegebelastung entstehen Zugspannungen auf der einen Seite des Knochenschaftes und gleichzeitig Druckspannungen auf der gegenüberliegenden Seite. Durch das Prinzip der Zuggurtung werden diese Belastungen verringert. Muskeln, Sehnen und Bänder erzeugen eine Gegenkraft, die die auf den Knochen wirkenden Kräfte zum Teil in axiale Beanspruchungen umwandelt und damit die Biegespannungen verringert.

Die Spongiosa des Knochens ist durch die Verteilung und Ausrichtung des Spongiosamaterials auf die wirkenden Kräfte angepasst. Die Spongiosatrabeln sind entlang der unter der Hauptbelastung auftretenden Spannungslinien (Trajektorien) ausgerichtet, so dass sie Zug- und Druckspannungen optimal aufnehmen können (Abbildung 3-6). Dieser Aufbau wird als trajektorielle Bauweise mit Zug- und Drucktrabeln bezeichnet²⁰. Ändert sich die übliche Belastung des Knochens, so passt sich die trajektorielle Knochenstruktur den veränderten statischen Verhältnissen an.

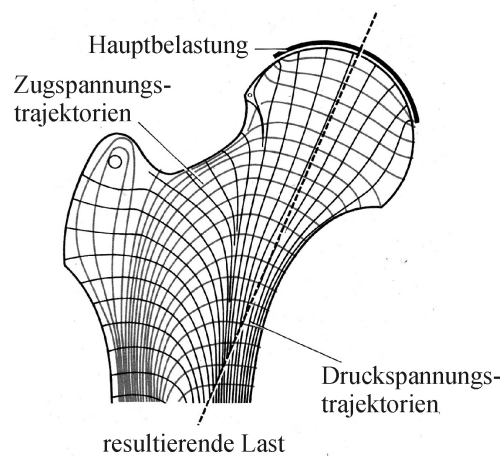


Abbildung 3-6: Verlauf der aus der Hauptbelastung resultierenden Spannungstrajektorien für Druck und Zug im Oberschenkelkopf und -hals des Menschen. Die Richtung der Spongiosa-Züge entspricht dem Spannungstrajektorienverlauf (adaptiert aus Czihak, 1990)²¹

Im Röhrenknochen muss die Diaphyse hauptsächlich Biege- und Rotationskräfte abfangen. Das in der Mitte der Diaphyse befindliche Rohr aus Kortikalis ist dementsprechend aufgebaut. Die Lamellen der Kortikalis sind parallel zur Knochenlängsachse angeordnet. Innerhalb der Lamellen verlaufen kollagene Fibrillen parallel zueinander und zur Diaphyse. Die kollagenen Fasern der einzelnen Schichten sind in jeder Lamelle entgegengesetzt spiralg angeordnet. Somit ist die Kortikalis in der Lage, Rotationsbelastungen aus unterschiedlichen Richtungen abzufangen.

Im Bereich der Epiphysen muss der Röhrenknochen hauptsächlich Druckbelastungen standhalten. Aus diesem Grund ist er hier aus Spongiosa aufgebaut. In der Spongiosa verlaufen die kollagenen Fasern in Richtung der Belastungslinien. Diese Trabekelstruktur kann sich äußeren Belastungen besonders gut anpassen. Die kollagenen Fasern in der Spongiosa

werden durch Apatitkristalle verstärkt. Die Spongiosa wird von einer dünnen Schicht Kortikalis umhüllt.

Wirbelkörper werden durch das Körpergewicht hauptsächlich starken Druckbelastungen ausgesetzt. Aus diesem Grund verlaufen Spongiosabälkchen senkrecht von der oberen zur unteren Deckplatte des Wirbels. Gleichzeitig treten senkrecht zur Druckrichtung auch Zugspannungen auf. Durch Bälkchen, die den Wirbelkörper in horizontaler Richtung durchziehen, können diese Spannungen abgefangen werden.

Tabelle 3-1: Durchschnittswerte für mechanische Daten humanen Knochenmaterials¹⁹

Knochentyp	Richtung und Art der wirkenden Kraft	Dichte [g/cm ³]	Maximale Festigkeit [MPa]	Elastizitätsmodul [GPa]
Kortikalis (mittlerer Oberschenkelknochen)	Longitudinaler Zug	1,85	133	17,0
	Longitudinale Kompression	1,85	193	17,0
	Longitudinale Scherung	1,85	68	3,0
	Transversaler Zug	1,85	51	11,5
	Transversale Kompression	1,85	33	11,5
Spongiosa (Wirbelkörper)	Kompression	0,31	6	76,0 · 10 ⁻³

3.2. KOMPOSITMATERIALIEN FÜR DAS TISSUE ENGINEERING VON KNOCHEN

Um eine neue Möglichkeit für die Therapie von Knochendefekten zu erhalten, werden Knochenersatzgewebe aus autologen Zellen und geeigneten Gerüstmaterialien entwickelt. Die dafür verwendeten Biomaterialien müssen unterschiedlichen Anforderungen entsprechen: Zunächst ist eine dreidimensionale Struktur notwendig, die die Adhäsion, Proliferation und Differenzierung der verwendeten Zellen unterstützt^{22, 23}. Eine interkonnektierende poröse Struktur des Materials ist essentiell. Mikroporen mit etwa 10 µm Durchmesser dienen der Vaskularisierung des Konstrukts *in vivo*, Makroporen mit 150 – 900 µm Durchmesser gewährleisten die Nährstoffversorgung der Zellen und den Abtransport von Stoffwechselprodukten²⁴. Des Weiteren muss das Material den mechanischen Anforderungen genügen, denen es *in vivo* ausgesetzt wird.

Bei der Diskussion über die Eigenschaften von Biomaterialien als Knochenersatz werden häufig die Begriffe Osteoinduktion, Osteokonduktion sowie Osseointegration verwendet, die an dieser Stelle kurz eingeführt und definiert werden sollen²⁵:

Osteoinduktion bezeichnet die Induktion der Osteogenese (Differenzierung entlang der osteogenen Linie) undifferenzierter und pluripotenter Stammzellen.

Osteokonduktion beschreibt die Zellverteilung und das Knochenwachstum auf einer Materialoberfläche.

Osseointegration ist histologisch als die direkte Verankerung eines Implantats im Knochen definiert.

Für die Entwicklung von Knochenersatzgeweben ist die Verwendung von porösen natürlichen und synthetischen Polymer- sowie Keramikmaterialien weit verbreitet. Als natürliche Polymere finden Proteine der extrazellulären Matrix (Kollagen²⁶, Glycosaminoglykan^{26, 27}) oder andere Polysaccharide (Chitosan²⁷⁻²⁹, Stärke²⁹, Alginate^{27, 30}) Anwendung, ihre Vorzüge liegen in ihrer Biokompatibilität und Degradierbarkeit. Durch den natürlichen Ursprung können jedoch antigene Effekte auftreten, zudem ist die Gewährleistung gleichbleibender

Qualität problematisch. Synthetische Polymere, z.B. Poly-L-Lactid (PLLA) oder Polyglycolsäure (PGA)^{31, 32}, können den Anforderungen entsprechend geformt werden, beim hydrolytischen Abbau entstehen allerdings oft saure Nebenprodukte, die *in vivo* Entzündungen hervorrufen können³³⁻³⁵. Polymere zeigen weiterhin ungenügende biomechanische Stabilität für die Anwendung als Hartgewebeersatz.

Biokompatible Keramikmaterialien hingegen weisen eine höhere mechanische Belastbarkeit auf³⁶, sind aber häufig nur limitiert bioaktiv. Zwar sind die weithin verwendeten Calciumphosphate osteokonduktiv^{2, 24, 37}, eine gezielte Beeinflussung der verwendeten Zellen (z.B. Induktion der Osteogenese) ist jedoch kaum möglich. Für die Hartgeweberegeneration verwendete Keramikmaterialien können sowohl *in vivo* abbaubare als auch permanent beständige Materialien sein. Häufig ist die Degradation des Materials über einen bestimmten Zeitraum erwünscht. Die Stützfunktion soll nur so lange bestehen bleiben, bis diese von körpereigenem, neu gebildetem Gewebe übernommen werden kann. Zu den bioabbaubaren Keramikmaterialien zählen Hydroxylapatit, Tricalciumphosphat, Tetracalciumphosphat oder Octacalciumphosphat³¹. Bei großen Defekten kann jedoch auch eine permanente Stützfunktion erwünscht sein. In diesem Fall finden bioinerte Materialien wie Aluminiumoxid-, Titandioxid- oder Zirkoniumoxid-Keramiken Anwendung^{31, 38}.

Durch Kombination von Polymeren und Keramiken oder die Modifikation von Keramiken mit bioaktiven Molekülen können sogenannte „smarte“ biomimetische Kompositmaterialien mit steuerbaren Eigenschaften hergestellt werden. Dabei können unterschiedliche Strategien verfolgt werden, die im Folgenden vorgestellt werden sollen (vgl. auch Abbildung 3-7).

3.2.1. POLYMER-KERAMIK-KOMPOSITE

Die einfachste Methode zur Herstellung von Kompositmaterialien ist die Kombination einer polymeren Komponente mit einer keramischen/anorganischen Komponente, die mechanisch miteinander vermischt werden. Das Zusammenspiel von organischen und anorganischen Komponenten in einem Biomaterial ist besonders attraktiv für die Hartgeweberegeneration, da es die Komposition natürlichen Knochens nachahmt (vgl. Abschnitt 3.1). Aufgrund ihrer

osteokonduktiven Eigenschaften finden hauptsächlich Hydroxylapatit und Calciumphosphate Anwendung. Der anorganische Part wird in den meisten Fällen als nano- oder mikro-Partikel mit dem Polymer vermischt. Er wirkt als Füllstoff, der den Abbau und die Resorption des Polymers beeinflusst und aufgrund seiner osteokonduktiven Eigenschaften die Hartgewebeintegration verbessert. Zudem werden die durch die polymere Degradation häufig resultierenden aciden Abbauprodukte durch die Anwesenheit der basischen Keramikkomponente gepuffert³⁹. Die Dispersionen aus beiden Komponenten werden anschließend durch unterschiedliche Prozesse in die erwünschte poröse Struktur überführt. Wei et al. beschreiben Nano-Hydroxylapatit/Polymer-Komposite hoher Porosität, die durch thermisch induzierte Phasenseparation (TIPS) hergestellt wurden⁴⁰. Weiterhin findet die Methode der *Solvent-cast*-Technik^{31, 41} sowie die unter hoher Temperatur durchgeführte Kompression von Hydroxylapatit/Polymer-Gemischen^{42, 43} Anwendung.

3.2.2. EINSCHLUSS BIOAKTIVER MOLEKÜLE

Der Einschluss bioaktiver Moleküle in eine geeignete Matrix ist interessant für das Tissue Engineering, da so eine gezielte Freisetzung der Moleküle aus der Matrix erreicht werden kann. Das Ziel dieses Ansatzes ist es, eine Dosis des entsprechenden Signalmoleküls am gewünschten Ort zu erhalten, die eine effektive Wirkweise gewährleistet, ohne dabei systemische Effekte auszulösen⁴⁴. Unterschiedliche natürliche und synthetische Polymere sind für diese Anwendung untersucht worden, unter anderem als synthetische Polymere Polyglycolsäure (PGA)⁴⁵ und Polylactid-co-Glycolid (PLGA)^{46, 47}, als natürliche Polymere Gelatine^{48, 49}, Alginat⁵⁰ und Fibrin⁵¹. Die Freisetzung der Moleküle findet durch Erosion der Matrix statt. Es resultiert ein Pool gelöster bioaktiver Moleküle um die Matrix herum, die so direkt auf die adhärennten Zellen wirken können. Der grundlegende Prozess der Polymererosion ist dessen Degradation, die sowohl enzymatisch⁵² als auch hydrolytisch stattfinden kann. Unter der Degradation wird die Spaltung der Polymerketten zu Oligomeren und schließlich zu Monomeren verstanden. Die Erosion bezeichnet den Verlust von Material, verursacht durch die Diffusion der Oligo- und Monomere aus der Polymermatrix heraus⁵³. Durch Modifikationen der polymeren Matrix können deren Löslichkeit in Wasser sowie die thermische und mechanische Stabilität beeinflusst werden, um damit die Abbaurate der Matrix und die damit verbundene Freisetzung der bioaktiven Moleküle zu kontrollieren.

Sogenannte Crosslinker verknüpfen die Ketten eines Polymers und verändern damit oben erwähnte physikalische Eigenschaften⁵⁴.

Wird eine derart modifizierte Polymermatrix mit einem keramischen Trägermaterial kombiniert, werden die Vorzüge beider Materialien im resultierenden Kompositmaterial miteinander vereinigt. Die Keramik gewährleistet die mechanische Stabilität des Kompositmaterials, durch die Polymermatrix erlangt es biomimetische Eigenschaften.

Die Kombination von Polymer- und Keramikkomponente kann mittels unterschiedlicher Methoden realisiert werden. Zunächst können poröse Keramiken mit der polymeren Matrix beschichtet werden. Diese Methode ist einfach zu verwirklichen, jedoch besteht die Möglichkeit, dass sich die Matrix nicht über die gesamte dreidimensionale Struktur der Keramik verteilt. Außerdem kann die Polymerbeschichtung zu einem Verschluss der Porenstruktur und damit zu einer Verschlechterung der Nährstoffversorgung der adhären Zellen führen. Bei dieser Methode sind demnach die Wahl der polymeren Komponente als auch der Porengröße der Keramik von großer Bedeutung. Zur Anwendung kommen bioabbaubare Polymere wie z.B. Poly- ϵ -caprolacton (PCL)⁵⁵ oder Poly-Vinylpyrrolidon (PVP)⁵⁶ und hochporöse Keramiken. Durch den Abbau der Polymermatrix können eingeschlossene bioaktive Substanzen freigesetzt werden, die keramische Komponente bleibt temporär oder permanent als Stützgerüst erhalten.

Die Verwendung von Mikrosphären als sog. *drug delivery system* stellt eine weitere Möglichkeit dar, polymere Komponenten mit Keramiken zu vereinigen. Mikrosphären sind kleine Kügelchen (Sphären) mit poröser innerer Matrix und variabler Oberfläche. Die bioaktiven Moleküle liegen in der inneren Matrix dispergiert vor. Typischerweise besitzen Mikrosphären einen Durchmesser von 1 – 500 μm . Kleinere Partikel (10 – 1000 nm Durchmesser) werden als Nanosphären bezeichnet⁵⁷. Die biodegradierbaren Mikrosphären werden in die Poren des keramischen Trägermaterials eingebaut. Der Vorteil dieser Methode ist die Verlängerung der Halbwertszeit der bioaktiven Substanzen *in vitro* und *in vivo* aufgrund zeitlich kontrollierter Freisetzung⁴⁶. Außerdem kann durch Kombination von Mikrosphären mit definierten Freisetzungsprofilen und unterschiedlichen bioaktiven Molekülen eine gezielte Beeinflussung der Zellen erreicht werden. Der Zeitraum der Freisetzung kann durch Variation der Polymereigenschaften gesteuert werden und sich über

Wochen oder Monate erstrecken. Das am häufigsten verwendete Polymer für diesen Zweck ist Polylactid-co-Glycolid (PLGA)^{46, 47, 58}. Weiterhin finden Alginate⁵⁹ oder Chitosan^{60, 61} als geeignete Polymere Anwendung. Erste Versuche zur Einbettung bioaktiver Stoffe in Polymerträger zu deren gezielter Freisetzung wurden in den 1960er Jahren vorgenommen. Durch Verwendung von unterschiedlichen bioaktiven Molekülen und Polymeren mit definierten Freisetzungsprofilen kann *in vitro* eine *in vivo* Umgebung simuliert werden¹.

3.2.3. OBERFLÄCHENFUNKTIONALISIERUNG VON KERAMIKEN

Die gezielte Modifikation einer bioinerten Keramikoberfläche mit biologischen Komponenten ist eine weitere Methode, um dieser bioaktive Eigenschaften zu verleihen. In ersten Arbeiten, die sich mit der gezielten Funktionalisierung von Oberflächen beschäftigten, wurden Proteine der extrazellulären Matrix verwendet und immobilisiert. Die mit z.B. Fibronectin oder Laminin beschichteten Oberflächen fördern Zellproliferation und Adhäsion von Zellen⁶². Seitdem bekannt ist, dass nur bestimmte Aminosäuresequenzen dieser Proteine mit den Integrinen der Zellen interagieren, wurden diese kurzen Fragmente für die Modifikationen verwendet. Eines der in diesem Zusammenhang am besten untersuchten Peptide ist das RGD-Peptid, das aus der Aminosäure-Sequenz Arginin-Glycin-Asparaginsäure (RGD) aufgebaut ist und die Zelladhäsion fördert⁶³⁻⁶⁵. Weitere Peptid-Sequenzen wie YIGSR (Tyrosin-Isoleucin-Glycin-Serin-Arginin)⁶⁶, REDV (Arginin-Glutamin-Asparaginsäure-Valin)⁶⁷ und IKVAV (Isoleucin-Lysin-Valin-Alanin-Valin)⁶⁶ finden Anwendung für die Beschichtung von Oberflächen.

Neben bioaktiven Molekülen, die die Adhäsion von Zellen auf der Matrix begünstigen können, sind Wachstumsfaktoren von großer Bedeutung für die Herstellung biomimetischer Kompositmaterialien. Wachstumsfaktoren sind Peptide oder Proteine, die durch Bindung an spezifische Zellrezeptoren eine Signalkaskade in Gang setzen, die die Proliferation, Migration oder Differenzierung der Zelle regulieren. *Bone morphogenetic proteins* (BMPs), die der *Transforming growth factor- β* (TGF- β) Superfamilie angehören, sind in der embryonalen Entwicklung an der Entstehung von Organen und Geweben, insbesondere von Knorpel und Knochen, beteiligt⁶⁸. Insgesamt sind heute mehr als zwölf Proteine bekannt, die der Gruppe der BMPs angehören⁶⁹. Aufgrund ihrer osteoinduktiven Eigenschaften haben BMP-2, 4 und 7

besondere Bedeutung für das Tissue Engineering von Knochen^{24, 44, 68}. Dabei ist ihre wesentliche Aufgabe, die osteogene Differenzierung mesenchymaler Stromazellen zu induzieren⁶⁸. Der dabei ablaufende Mechanismus ist noch nicht vollständig geklärt, es ist jedoch bekannt, dass z.B. BMP-2 eine wichtige Rolle in der Expression osteogener Marker spielt. BMPs sind in zahlreichen präklinischen und klinischen Studien verwendet worden^{68, 70}, BMP-2 (InductOs™, Wyeth Pharmaceuticals, Madison, USA) sowie BMP-7 (Osigraft, Stryker Osteonics SA, Montreux, Schweiz) sind für die Fusion der unteren Wirbelsäule (InductOs™) bzw. für die Behandlung von Tibiafrakturen (InductOs™, Osigraft) bereits klinisch zugelassen^{71, 72}.

Die Immobilisierung bioaktiver Liganden kann durch Adsorption oder kovalente Bindung an der Keramikoberfläche verwirklicht werden. Bei der Adsorption bilden die Moleküle keine chemische Bindung zur Oberfläche aus, so dass keine oder nur eine geringe Strukturänderung stattfindet. Die Bioaktivität des Stoffes wird somit nicht vermindert. Allerdings werden die Adsorbate nur sehr schwach durch Van-der-Waals-Kräfte an der Oberfläche gehalten, so dass geringe Umgebungsänderungen (Temperatur, Druck, Lösungsmittel) eine Desorption der Teilchen hervorrufen können. Eine Reduzierung der biologischen Eigenschaften kann weiterhin durch die große Nähe des Adsorbats zur Oberfläche oder durch Adsorption in mehreren Schichten auftreten, da durch diese Effekte die Flexibilität der Moleküle eingeschränkt wird.

Eine kovalente Anbindung kann über reaktive Seitengruppen der eingesetzten Liganden realisiert werden. Die Wahl der funktionellen Gruppe hat dabei direkten Einfluss auf die bioaktiven Eigenschaften des Moleküls. Auch die Reaktionsbedingungen, unter denen die kovalente Anbindung stattfindet, dürfen keinen Einfluss auf die Liganden haben. Bei der kovalenten Anbindung kann eine zu große Nähe zur Substratoberfläche eine Beeinträchtigung der Bioaktivität bedeuten, weshalb sich die Verwendung sogenannter Spacermoleküle als geeignet erwiesen hat⁷³. Dies sind spezielle Moleküle (z.B. Polymere), die als Abstandhalter dienen, um die Liganden von der Substratoberfläche zu distanzieren und somit ihre volle Flexibilität zu erhalten^{73, 74}.

Polymerspacer besitzen zwei funktionelle Gruppen: eine Gruppe ist fähig, den Liganden kovalent zu binden, die andere Gruppe ist so geschaffen, dass sie mit einer gegenüber dem

Liganden erhöhten Affinität an der Oberfläche der Matrix bindet. Die aus der Verwendung der Spacermoleküle resultierenden Vorteile sind vielfältig: Durch die Distanzierung der bioaktiven Liganden von der Oberfläche der Matrix ist die Erreichbarkeit des bioaktiven Zentrums für Zellen erleichtert. Des Weiteren ist die Konzentration des immobilisierten Liganden kontrollierbar, durch Verwendung unterschiedlicher Liganden können die bioaktiven Eigenschaften der Kompositmaterialien gezielt gesteuert werden. Die aus Spacer und Ligand resultierenden Konjugate werden durch Adsorption auf der Substratoberfläche immobilisiert, da ein dauerhaftes Verbleiben der bioaktiven Moleküle aufgrund nicht abschätzbarer Langzeiteffekte unerwünscht ist. Die Desorptionsgeschwindigkeit des Konjugats und die daraus resultierende Wirkdauer des bioaktiven Liganden kann durch Veränderung der Spacer-Eigenschaften (z.B. Polarität, Hydrophobie, Ladung, Molekulargewicht) gesteuert werden.

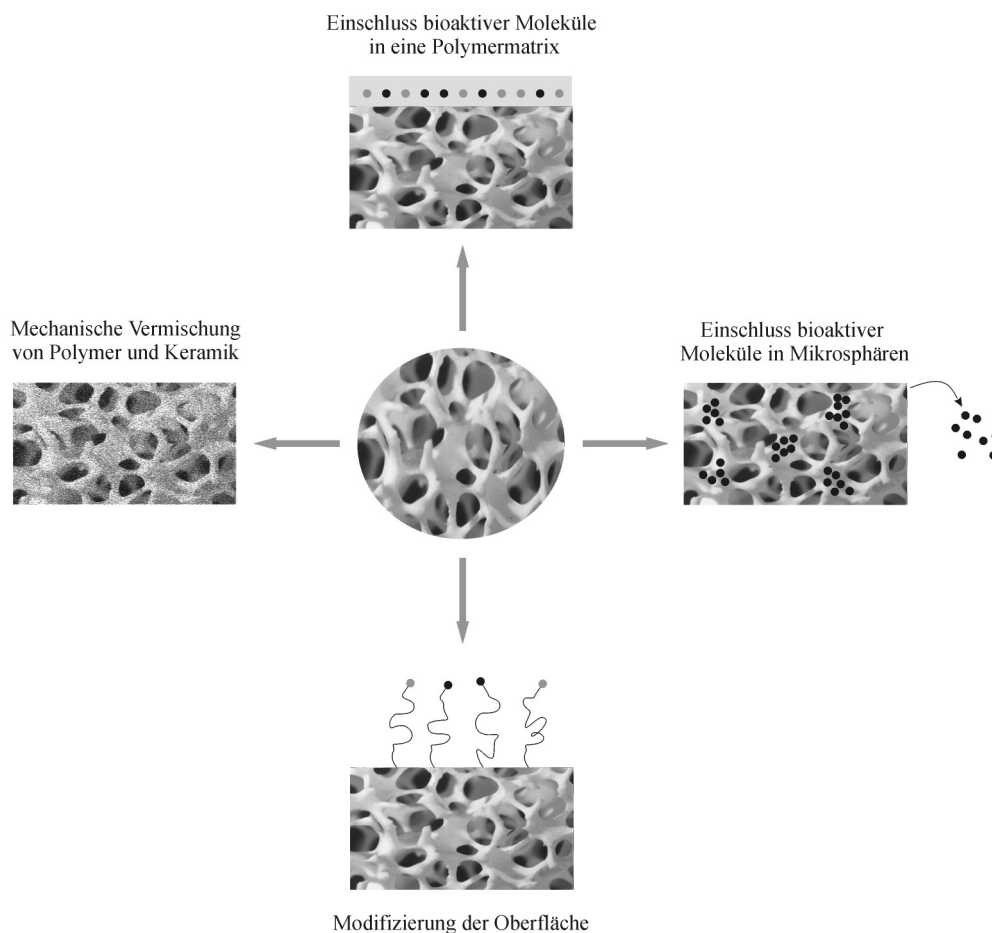


Abbildung 3-7: Unterschiedliche Methoden zur Herstellung keramikbasierter Kompositmaterialien als Biomaterialien

3.3. OSTEOGENE DIFFERENZIERUNG MESENCHYMALER STROMAZELLEN

Das Potential multipotenter mesenchymaler Stromazellen (*engl. mesenchymal stromal cell, MSC*) für die Anwendung im Tissue Engineering spiegelt sich in den mannigfaltigen Studien dieser Zellen wider. Die Definitionen ihrer Charakteristika variieren jedoch zum Teil stark, so dass im Jahr 2006 von Dominici et al. drei Minimalkriterien mesenchymaler Stromazellen postuliert wurden (schematische Darstellung s. Abbildung 3-8): MSCs sind unter Standard-Kulturbedingungen auf Zellkulturplastik adhärent wachsende Zellen. Die spezifischen Oberflächen-Antigene CD 105, CD 73 und CD 90 müssen durch eine durchfluss-zytometrische Analyse nachweisbar sein, die Marker CD 45, CD 34, CD 14 oder CD 11b, CD 79 α oder CD 19 und HLA Klasse II dürfen nicht von den Zellen exprimiert werden. Das dritte Kriterium für eine mesenchymale Stromazelle ist deren *in vitro* Differenzierungskapazität in Osteoblasten, Adipozyten und Chondroblasten unter standardisierten Differenzierungsbedingungen⁷⁵.

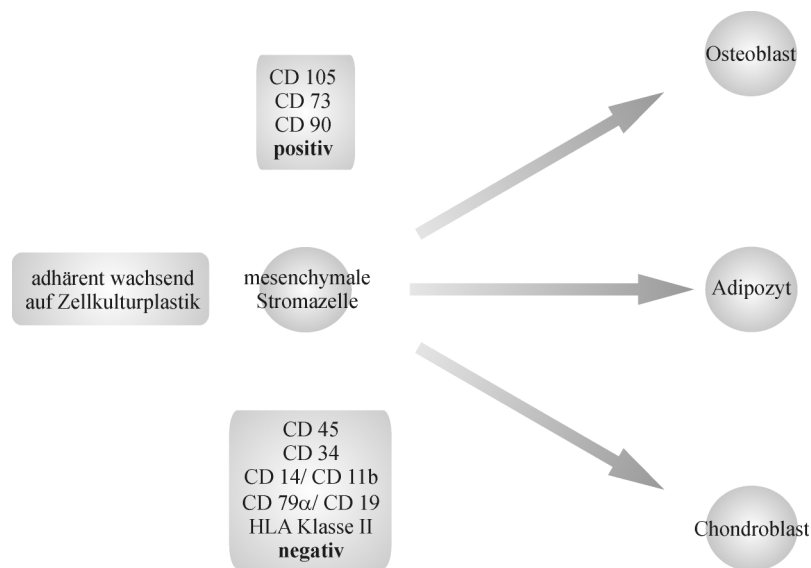


Abbildung 3-8: Schematische Darstellung der drei Minimalkriterien mesenchymaler Stromazellen

Die osteogene Differenzierung mesenchymaler Stromazellen *in vitro* kann durch unterschiedliche externe Stimuli induziert werden, die biochemischer oder mechanischer Natur sein können. So kann durch Einwirkung von Matrixkomponenten, Wachstumsfaktoren (z.B. BMP-2) oder Hormonen (z.B. Dexamethason)⁷⁶ sowie mechanischer Belastung^{77, 78} die Osteodifferenzierung beeinflusst werden (vgl. auch Abschnitt 3.1.1 sowie 3.2.3). Auch die

Topographie und Mikroarchitektur der Substratoberfläche, auf der die Zellen kultiviert werden, kann Einfluss auf die osteogene Entwicklung der Zellen haben²².

Bei der osteogenen Entwicklung durchlaufen MSCs eine Reihe unterschiedlicher Stadien. Ein wichtiger Schlüssel der osteogenen Differenzierung ist Cbfa1, ein Transkriptionsfaktor, der die Expression aller wichtigen Gene in Osteoblasten reguliert. Die Analyse Cbfa1-defizienter Mäuse bestätigte, dass die osteoblastäre Differenzierung in Abwesenheit von Cbfa1 ausbleibt⁷⁹. Die Regulierung der Cbfa1-Expression ist nicht vollständig geklärt, es ist jedoch bekannt, dass externe Stimuli wie BMPs seine Expression aktivieren können⁹. Durch die Stimulation der mesenchymalen Stammzelle wird diese zum Osteoprogenitor und durchläuft weitere Entwicklungsstadien der osteoblastären Entwicklung (Abbildung 3-9). Osteoprogenitor-Zellen lassen sich weiterhin in mindestens zwei Populationen unterteilen: Unreife (induzierbare) Progenitor-Zellen können nur durch die Einwirkung externer Stimuli (z.B. Dexamethason, BMPs) differenzieren, reife Progenitor-Zellen durchlaufen die osteogene Differenzierung unter Standard-Kulturbedingungen (Vitamin C, β -Glycerolphosphat, fötales Kälberserum)⁸⁰. Die Selbsterneuerungs-Kapazität von Osteoprogenitoren ist gegenüber mesenchymalen Stromazellen limitiert, die Proliferation weiterhin extensiv. Die Entwicklung des Osteoprogenitors zum Präosteoblasten verläuft über eine nicht bekannte Anzahl an Zwischenstufen, die Proliferation der Präosteoblasten ist limitiert. Reife Osteoblasten sind mitotisch inaktiv. In dieser Phase der Differenzierung wird das hauptsächlich aus Kollagen I bestehende Osteoid gebildet, das im weiteren Verlauf mineralisiert und damit die Osteoblasten einschließt. Diese „ummauerten“ Osteoblasten werden als Osteozyten bezeichnet. Alle Entwicklungsstadien von den Präosteoblasten bis zu den Osteozyten werden unter dem Überbegriff osteoblastäre Zellen zusammengefasst.

Die Charakterisierung der einzelnen Stadien wurde durch morphologische Untersuchungen und die Analyse der Expression zell- und gewebespezifischer Gene vorgenommen. Ein großer Fortschritt diesbezüglich wurde durch das *in vitro* „Bone nodule assay“ erreicht, in dem die Eigenschaften von Osteoprogenitoren und den weiter differenzierten Zellen mit Hilfe funktioneller, immunologischer und molekularer Verfahren untersucht wurde. Es konnte gezeigt werden, dass die untersuchten Zellen morphologisch identisch mit Zellen *in vivo* sind und die durch die Zellen gebildete Matrix die wichtigsten Knochenmatrixproteine enthält. Mineralisierte *Bone Nodules* repräsentieren dabei das Endprodukt der Proliferation und

Differenzierung des Osteoprogenitors, bestehen aus einem Multilayer kuboidaler, von Osteoid und Hydroxylapatitablagerungen umgebenen Zellen und sind morphologisch, histologisch, sowie histo- und immunochemisch als Knochengewebe klassifizierbar^{81, 82}. Der Verlauf der Differenzierung mesenchymaler Stroma- bzw. Osteoprogenitor-Zellen zu matrix-synthetisierenden Osteoblasten wurde, basierend auf der *in vitro* „Bone nodule“-Bildung, in drei Phasen eingeteilt, mit denen charakteristische Veränderungen in der Genexpression einhergehen: Proliferation, Matrixbildung und –maturation sowie Matrixmineralisierung. Gene, die im Zusammenhang mit der Proliferation stehen (Histone, Protoonkogene), werden in der ersten (proliferativen) Phase exprimiert, bestimmte Cycline hingegen erst postproliferativ. Die Expression der wichtigsten osteoblast-assoziierten Gene (Kollagen I, alkalische Phosphatase, Osteopontin, Osteocalcin, Bone Sialoprotein) findet asynchron statt und variiert, während die Osteoprogenitoren proliferieren und die Matrix maturiert und mineralisiert. Generell gilt, dass die Expression von Kollagen I (COL-I) zu Beginn relativ hoch ist und dann abnimmt. Der Spiegel alkalischer Phosphatase (AP) steigt zunächst und fällt erst dann wieder ab, wenn die Mineralisierung der Matrix fortgeschritten ist. Osteopontin (OPN) zeigt einen biphasischen Verlauf: Es wird während der Proliferation und erneut im weiteren Verlauf der Entwicklung exprimiert, jedoch vor den anderen Matrixproteinen Osteocalcin (OC) und Bone Sialoprotein (BSP). Die Expression von OC findet begleitend mit der Mineralisierung statt, die von BSP hingegen vorübergehend sehr früh und dann erneut im reifen Osteoblasten⁸⁰. Owen et al. postulierten, dass die Proliferation abgeschlossen sein muss, bevor die Differenzierung und die Expression osteoblasten-spezifischer Gene beginnt⁸³. Durch Verwendung molekularbiologischer Methoden konnte gezeigt werden, dass alle diese osteogenen Marker, mit Ausnahme von OC, bereits vor Beendigung der proliferativen Phase in Osteoprogenitorzellen bzw. Präosteoblasten exprimiert werden⁸¹. Die Differenzierung ist also bereits fortgeschritten, wenn die Proliferation endet, so dass die osteoblastäre Differenzierung mindestens in sieben anstelle der oben genannten drei Phasen kategorisiert werden muss^{9, 80}. In Abbildung 3-9 sind postulierte Stadien der osteogenen Differenzierung und die in den jeweiligen Stadien exprimierten Marker dargestellt. Es ist jedoch zu beachten, dass die Expression einzelner Gene in unterschiedlichen Zellpopulationen verschieden stark ausgeprägt sein kann. Die Analyse der von den Zellen exprimierten Gene gibt demnach nur einen Hinweis auf den Differenzierungszustand der Zellen. Da in einer Zellpopulation sich außerdem immer Zellen unterschiedlichen Reifegrades nebeneinander befinden, kann nur eine Aussage über die Differenzierung der Gesamtpopulation, nicht aber der einzelnen Zelle getroffen werden.

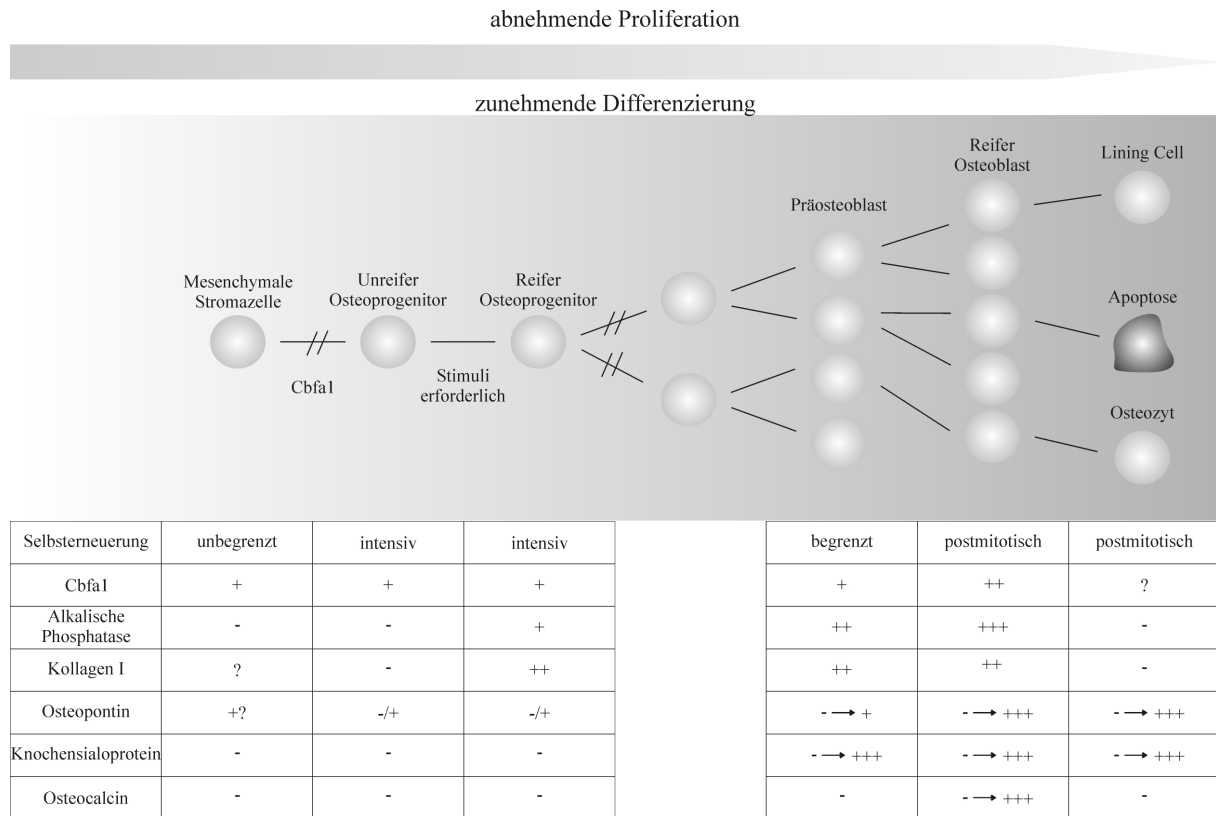


Abbildung 3-9: Postulierte Schritte der osteogenen Entwicklung mit nachweisbaren Phasen der Proliferation und Differenzierung aus *in vitro* und *in vivo* Experimenten. Neben finalen Stadien der Differenzierung ist auch die Apoptose berücksichtigt, der ein Teil der Zellen unterliegt. Etablierte Marker osteoblastärer Zellen und ihr Expressionsprofil sind zusätzlich dargestellt. Heterogene Expression einiger Marker sind ebenso berücksichtigt. - : keine nachweisbare Expression, -/+ - +++: Expression variiert von schwach bis stark, → +++ heterogene Expression in einzelnen Zellen (adaptiert aus: Aubin und Heersche, 2000)⁸⁰

3.4. BIOREAKTOREN FÜR DAS TISSUE ENGINEERING

Für die Kultivierung adhärent wachsender Zellen kommen zwei grundlegende Strategien zum Einsatz. Die statische oder *batch*-Kultur bezeichnet die Kultur von Zellen in geschlossenen Systemen wie Zellkultur-Flaschen, -Schalen oder -Platten. Die Zellen wachsen dabei in einem festgelegten Volumen des Kulturmediums.

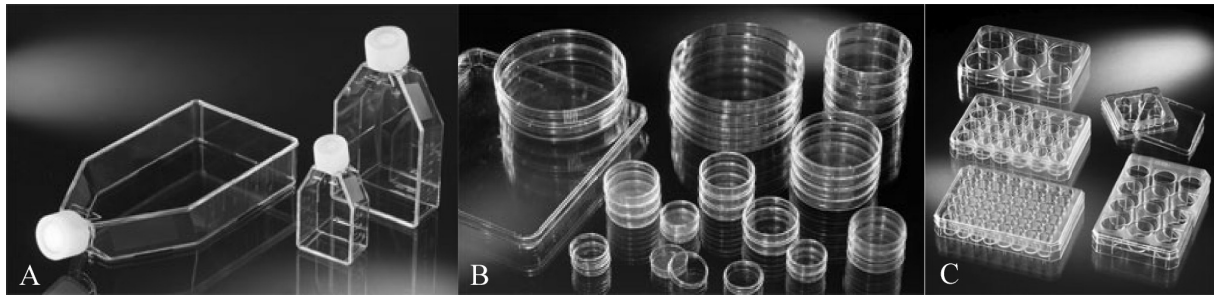


Abbildung 3-10: Zellkultursysteme für die statische Kultur adhärent wachsender Zellen. A: Zellkulturflaschen, B: Petrischalen, C: Lochplatten (Quelle: www.nuncbrand.com, März 2009)

Im zeitlichen Verlauf der statischen Kultivierung erhält man eine typische Wachstumskurve, die sich in vier verschiedene Phasen unterteilen lässt (Abbildung 3-11): In der Anlaufphase (lag-Phase) findet keine Proliferation statt, da sich die Zellen an die neuen Bedingungen adaptieren. Sie ersetzen Teile ihrer Oberfläche und der extrazellulären Matrix, die während der Trypsinierung verloren gegangen sind, adhärieren auf der Kulturoberfläche und breiten sich aus. In der anschließenden exponentiellen Phase (log-Phase) wachsen die Zellen mit maximaler (exponentieller) Rate. Die Länge dieser Phase ist von der Zahl der ausgesäten Zellen, ihrer Wachstumsrate und der Zelldichte abhängig, bei der eine Wachstumsinhibition eintritt. Am Ende der log-Phase wird die stationäre Phase (Plateau) erreicht, die Zellpopulation wird konfluent. Die gesamte für die Zellen zur Verfügung stehende Kulturoberfläche ist bewachsen und alle Zellen befinden sich in Kontakt mit den sie umgebenden Zellen. Bei Erreichen der Konfluenz wird die Wachstumsrate reduziert, man spricht von einer Kontaktinhibition der Zellen. In dieser Phase befinden sich Vermehrung und Absterben der Zellen im Gleichgewicht. Dieser Gleichgewichtszustand kann mehrere Wochen anhalten. Wird die Kultur fortgesetzt, wird die Absterbephase erreicht, die ebenfalls exponentiell verläuft. Das Absterben erfolgt aufgrund von Nährstoffmangel oder Anreicherung toxischer Stoffwechselprodukte^{84, 85}.

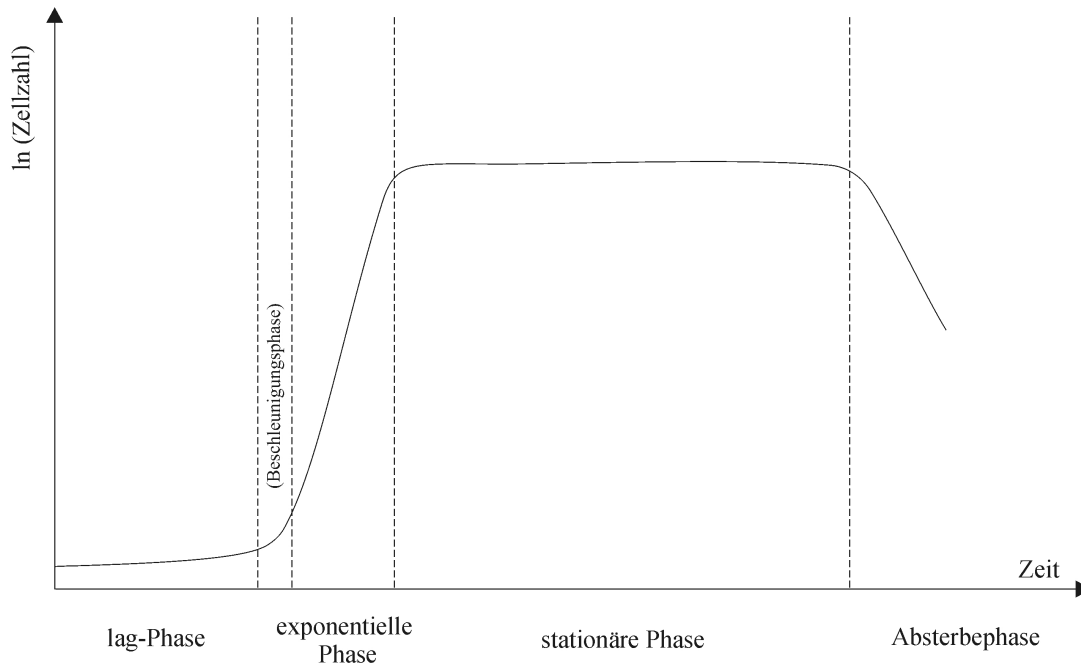


Abbildung 3-11: Typische Wachstumskurve einer eukaryotischen Zellpopulation unter statischen Kulturbedingungen

In der batch-Kultur sind die zu erreichenden Zelldichten aufgrund systembedingter Beschränkungen limitiert. Durch das vorgegebene Mediumvolumen ist die Nährstoffkonzentration limitiert und toxische Stoffwechselprodukte reichern sich während der Kultur darin an.

In den klassischen Kulturbehältern (Abbildung 3-10) werden Zellen auf einer zweidimensionalen Oberfläche kultiviert, so dass keine dreidimensionalen Gewebestrukturen erhalten werden können. Um diese zu erhalten, werden die entsprechenden Zellen auf dreidimensionalen, porösen Gerüstmaterialien kultiviert (vgl. Abschnitt 3.2). Die Kultur dieser Gerüst-Gewebe-Konstrukte ist auch unter statischen Bedingungen möglich, jedoch kommt neben den oben erwähnten Einschränkungen ein weiterer limitierender Faktor hinzu. Unter statischen Kultivierungsbedingungen findet der Transport von Nährstoffen nur diffusionskontrolliert statt, so dass große Zellmengen nur unzureichend versorgt werden können. Besonders bei der Kultur von Zellen auf dreidimensionalen Gerüstmaterialien können demnach nur solche Zellen versorgt werden, die sich an der Peripherie des Konstrukts befinden.

Die dynamische Zellkultivierung wird in speziellen Bioreaktoren durchgeführt. Das Kulturmedium wird in den Reaktoren permanent durchmischt, so dass der Nährstofftransport nicht mehr nur diffusionskontrolliert stattfindet und die Versorgung gegenüber der statischen Kultur verbessert ist. Weiterhin kann in einigen Bioreaktoren frisches Kulturmedium zuzusowie verbrauchtes Medium abgeführt werden, wobei das Volumen konstant bleibt. Man spricht dann von einer Kultivierung im Perfusionsmodus. Durch Regelung der Flussrate kann die Nährstoffzufuhr dem Zellmetabolismus entsprechend angepasst werden. Weiterhin werden toxisch wirkende Stoffwechselprodukte abtransportiert.

Ein weiterer Vorteil der Kultivierung von Zellen in Bioreaktoren ist die Möglichkeit, die Parameter während des Prozesses kontinuierlich zu kontrollieren. Über geeignete Sensoren, die sich im Innern des Reaktors befinden, können dessen Temperatur sowie pH-Wert, CO₂- und O₂-Gehalt im Kulturmedium *on-line* gemessen und geregelt werden. Die Regelung des pH-Werts wird meist durch CO₂-Begasung oder Zugabe von Base in das Reaktormedium realisiert, der pO₂-Wert kann durch Zufuhr von reinem Sauerstoff manipuliert werden. Durch die Optimierung der biophysikalischen Umgebung und des Nährstoffangebots können Bedingungen geschaffen werden, die denen *in vivo* ähneln.

Weiterhin können bei der dynamischen Kultivierung *in vivo* Bedingungen in Bezug auf mechanische Beanspruchungen simuliert werden. Besonders für die Hartgeweberegeneration ist die Simulation von mechanischen Belastungen (hydrostatischer Druck, Scherstress), wie sie *in vivo* im Knochen auftreten, von großer Bedeutung, da diese die Entwicklung osteoblastärer Zellen beeinflussen. Werden Zell- bzw. Gewebekonstrukte während der *in vitro* Kultivierung mechanischer Stimulation ausgesetzt, zeigen sie Eigenschaften, die den Charakteristika von *in vivo* Strukturen ähneln. So beeinflusst unter anderem die Fluidodynamik im Bioreaktor Zellfunktion und -morphologie⁸⁶. Neben mechanischen Belastungen, die durch Flüssigkeitsscherstress hervorgerufen werden, werden in einigen Bioreaktoren zusätzlich Zug-, Kompressions- oder Torsionsbelastungen verwendet, um die kultivierten Zellen zu stimulieren. Im Detail wird auf diesen Aspekt im weiteren Verlauf dieses Kapitels eingegangen.

Für die Kultivierung von Zellen unter dynamischen Bedingungen wurden in den letzten Jahren zahlreiche Reaktortypen entwickelt und für spezielle Anwendungen optimiert. Drei

Reaktortypen können als Grundtypen aller weiter entwickelten Bioreaktoren angesehen werden:

Perfusionsreaktoren zeichnen sich dadurch aus, dass poröse dreidimensionale Gerüstmaterialien mit Kulturmedium durchströmt werden. Die Zellaussaat kann innerhalb der Reaktoren durchgeführt werden, indem die Zellsuspension dem Perfusionskreislauf zugeführt wird. Durch den Fluss des Mediums durch die poröse Matrix ist die Nährstoffversorgung der Zellen auch im Innern des dreidimensionalen Konstrukts gewährleistet. Weiterhin als Perfusionsreaktoren bezeichnet werden Systeme, in denen zwei- oder dreidimensionale Konstrukte von Kulturmedium überströmt werden (s. Abbildung 3-12). Wird ein Perfusionsreaktor im kontinuierlichen Modus betrieben, wird permanent Medium zu- und abgeführt. Toxisch wirkende Stoffwechselprodukte werden so aus dem Reaktor abtransportiert, durch Regulation der Flussrate lässt sich die Nährstoffkonzentration dem Zellmetabolismus anpassen. Durch Regulation der Fließgeschwindigkeit kann weiterhin der auf die Zellen wirkende Scherstress variiert werden. Perfusionsreaktoren werden unter anderem für Applikationen im Bereich des Tissue Engineerings von Knochen- und Knorpelkonstrukten entwickelt^{87, 88}.

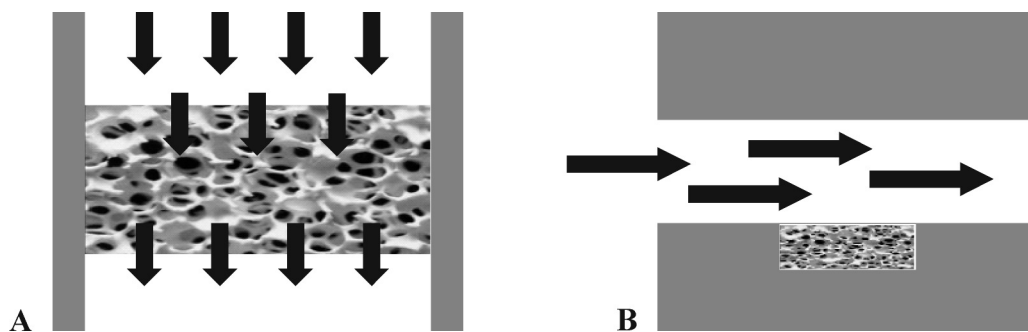


Abbildung 3-12: Prinzipien der Kultivierung in zwei unterschiedlichen Ausführungen des Perfusionsreaktors. A: Das Kulturmedium strömt durch das mit Zellen besiedelte poröse Konstrukt. B: Das zwei- oder dreidimensionale Konstrukt wird mit Kulturmedium überströmt.

Spinnerflaschen wurden für die Kultivierung von Suspensionszellen entwickelt. Die Zellen befinden sich in einer Flasche, in der das Kulturmedium durch einen magnetgetriebenen Rührer am Boden der Flasche in Bewegung gehalten wird. Adhärenz wachsende Zellen können in Spinnerflaschen kultiviert werden, wenn sie auf kleinen porösen dreidimensionalen Matrices ausgesät werden. Die besiedelten Konstrukte können an Nadeln befestigt werden,

die vom Deckel der Flasche herabhängen (s. Abbildung 3-13). Durch die Durchmischung des Kulturmediums ist eine gute Nährstoffversorgung gewährleistet. Weiterhin ist die Verwendung von *Mikrocarrier* möglich. Dies sind sehr kleine poröse Matrices, die durch die Mediumbewegung in der Flasche in Suspension gehalten werden. Spinnerflaschen wurden unter anderem für die Kultivierung von Zell/Polymer-Konstrukte für die Regeneration von Knorpel- und Knochengewebe verwendet^{89, 90}.



Abbildung 3-13: Mikrocarrier-Spinnerflasche Magna-Flex[®] der Firma Wheaton Industries Inc. (Quelle: www.wheatonsci.com, März 2009)

Der **Rotating Wall Vessel** Reaktor (RWVR) wurde im Jahr 1992 von der NASA entwickelt, um Zellen in einer Umgebung simulierter Mikrogravitation zu kultivieren. Eigentlich für die Kultivierung von Suspensionszellen entwickelt, können auch adhärenente Zellen auf Mikrocarrier im RWVR kultiviert werden. Der Reaktor ist aus einem rotierenden Zylinder aufgebaut, in dem sich wiederum horizontal ein rotierendes Kulturgefäß mit mittig angebrachten Oxygenator befindet (s. Abbildung 3-14). Dieser ist für die Anreicherung des Kulturmediums mit Sauerstoff und die Entfernung von Kohlenstoffdioxid zuständig, da sich im Kulturgefäß kein gasgefüllter Kopfraum befindet. Der RWVR-Reaktor zeichnet sich dadurch aus, dass die im Reaktor herrschende Strömung laminarer Natur ist und durch turbulente Strömungen auftretender Scherstress vermieden wird. Durch die Bewegungen der Zylinder wird das Medium außerdem durchmischt, so dass keine zusätzlichen Rührvorrichtungen erforderlich sind. Durch den Verzicht auf die Kopfraumbegasung werden weitere Turbulenzen und Scherstress durch Blasenbildung vermieden⁹¹. Für die Regeneration von Knochengewebe ist dieser Reaktortyp jedoch nicht zwangsläufig zweckdienlich. Auf Knochen hat die Mikrogravitation schädliche Auswirkungen. Es ist bekannt, dass eine solche Umgebung oft zu einem Verlust der Gesamtknochenmasse führt^{6, 92, 93}. Wang et al. untersuchten die osteogene Differenzierung humaner mesenchymaler Stromazellen in einem RWV-Reaktor und konnten gegenüber einer statischen Kultur keine verstärkte Osteogenese

feststellen⁹⁰. Anwendung gefunden hat der RWVR unter anderem für die Differenzierung von Zellen entlang der chondrogenen⁹⁴ und neuronalen Linie⁹⁵.

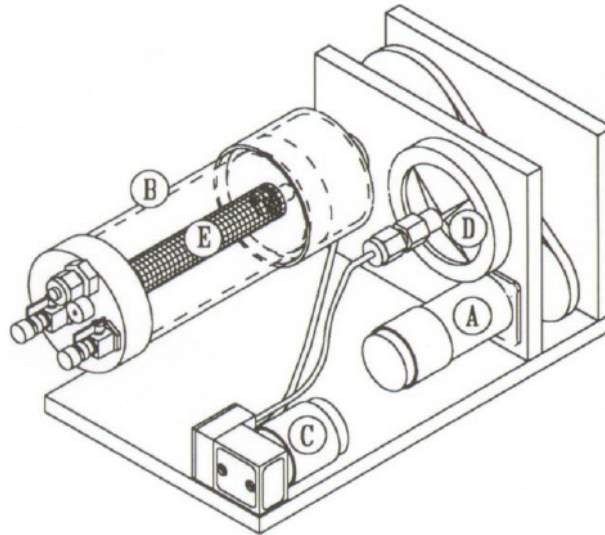


Abbildung 3-14: Schema eines Rotating Wall Vessel Reactors. A: Motor, B: Kulturgefäß, C: Pumpe für Luftversorgung, D: Filter, E: Oxygenator (entnommen aus Hammond and Hammond, 2001)⁹¹

In den vergangenen Jahren hat die mechanische Stimulation von Zell- und Gewebekonstrukten während der Kultivierung im Bioreaktor steigende Beachtung gefunden. Zellen sind in ihrer natürlichen *in vivo* Umgebung ständig mechanischen Belastungen ausgesetzt. Physikalische Stimulationen durch Scherstress, Fluidströmungen, Kompression oder Dehnung beeinflussen die Zellstruktur und werden in biochemische Signale umgewandelt, die intra- sowie interzelluläre Signalwege modulieren (vgl. auch Abschnitt 3.1.1). Es gibt Hinweise darauf, dass physikalische Stimuli die Genexpression von Zellen beeinflussen und die Biosyntheseaktivität unterschiedlichster Zelltypen signifikant gesteigert wird. Zahlreiche Studien haben sich bereits mit der Beeinflussung des Zellmetabolismus durch mechanische Stimuli beschäftigt und gezeigt, dass Zellen bereits auf die Stimulation durch Fluidströmungen reagieren^{96, 97}.

Die Tatsache, dass durch physikalische Stimulation die Zellfunktion und Gewebebildung beeinflusst werden kann, hat zur Entwicklung zahlreicher Systeme geführt, die Zellen *in vitro* biomechanisch stimulieren.

Die einfachste Form der mechanischen Stimulation ist die Induzierung von Scherstress durch Fluidströmungen. In den klassischen Reaktorsystemen wie der Spinnerflasche und Perfusionsbioreaktoren, werden die Zellen durch die Fluidbewegung hydrodynamischen Scherkräften ausgesetzt. Andere Systeme stimulieren Zellen bzw. Zell-Gewebe-Konstrukte mit Hilfe von Rotations-, Zug- oder hydrodynamischen Druckbelastungen, die meist zyklisch einwirken. So hat unter anderem die Firma Bose Corporation unterschiedliche Reaktorsysteme entwickelt, in denen Zell-Matrix-Konstrukte während der Kultivierung mechanisch belastet und gleichzeitig charakterisiert werden können (s. Abbildung 3-15). In einer Kulturkammer wird die zellbesiedelte Matrix je nach Applikation mit Zugklammern oder Druckplatten fixiert. Die Nährstoffversorgung kann durch Befüllung der gesamten Kulturkammer oder direkte Perfusion der Matrix realisiert werden, der Mediumfluss kann kontinuierlich oder pulsierend erfolgen. Letzteres ist besonders für die Züchtung kardiovaskulärer Konstrukte interessant. Weiterhin kann das fixierte Zell-Matrix-Konstrukt Zug-, Druck- oder Torsionsbelastungen in unterschiedlicher Stärke und Frequenz ausgesetzt werden.

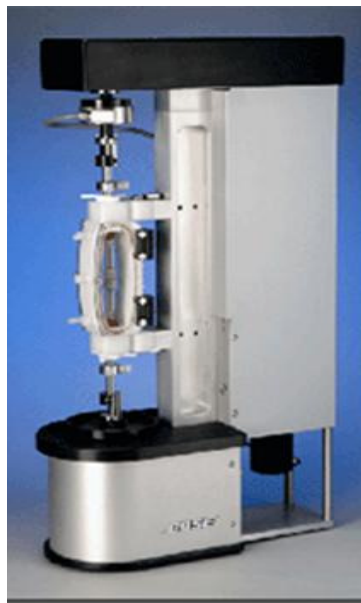


Abbildung 3-15: Tension/Torsion BioDynamic[®] Test Instrument der Firma Bose Corporation – Electro Force[®] Systems Group (Quelle: www.bose-electroforce.com, März 2009)

Auch verschiedene Arbeitsgruppen beschäftigen sich mit der Entwicklung mechanoinduzierender Bioreaktoren. Powell et al. entwickelten einen mechanischen Zellstimulator, in dem in Kollagen/Matrigel eingebettete Muskelzellen zyklisch gedehnt

werden. Nach der Stimulation zeigten die Konstrukte verbesserte mechanische Eigenschaften⁹⁸. Altman et al. fertigten einen Bioreaktor, in dem zellbesiedelte, dreidimensionale Matrices multidimensionalen Dehnungsbelastungen ausgesetzt werden können⁹⁹. Für die Herstellung kardiovaskulärer Gewebe werden die entsprechenden physiologischen Bedingungen durch pulsierenden Mediumfluss und Druckbeaufschlagung simuliert¹⁰⁰.

Die neueste Entwicklung im Bereich der Bioreaktortechnik ist die Verwendung von wegwerfbaren (*disposable*) Einwegsystemen. Ein typischer *disposable* Reaktor besteht aus einem sterilen Kunststoff-Kulturbehälter, der nach der Kultivierung entsorgt wird. Die Vorteile von *disposable* Systemen sind vielfältig: Sterilisation und Reinigung des Reaktors entfallen, die Gefahr von Kreuzkontaminationen werden durch den Einmalgebrauch minimiert, die Systeme sind einfach aufgebaut und vielseitig einsetzbar. Die Nachteile der Einwegreaktoren sind die noch nicht ausgereifte Einwegsensortechnik sowie die mögliche Abgabe von toxischen Stoffen aus dem Kunststoffmaterial, die als *Leachables* und *Extractables* bezeichnet werden¹⁰¹. Die derzeit noch sehr hohen Preise für Reaktoren der Einwegtechnik werden durch die bereits erwähnten Vorteile (entfallende Sterilisation und Reinigung) kompensiert.

In den 1990er Jahren entwickelte der amerikanische Zellbiologe Vijay Singh einen Einwegreaktor, der als so genannter Wave-Reaktor bekannt wurde. Der Reaktor besteht aus einem sterilen Kunststoff-Beutel, der auf einer mechanisch betriebenen Plattform bewegt wird, so dass im Innern des Reaktors eine Wellenbewegung des Kulturmediums entsteht. Wave-Reaktoren (Abbildung 3-16) werden von zahlreichen Firmen hergestellt und unterscheiden sich hauptsächlich in der Art des mechanischen oder pneumatischen Antriebs. Kunststoffbeutel (*engl. bag*) stellen auch die Grundlage anderer Einwegreaktoren dar^{102, 103}. In gerührten „bag“-Reaktoren werden die sterilen Kunststoff-Beutel in einen Stahltank eingesetzt, in den dann Rührer und Begasungssystem eingeführt werden, um die Homogenität und Sauerstoffversorgung des Mediums zu gewährleisten. „Hybrid-bag“-Reaktoren besitzen bereits in den sterilen Beutel integrierte Rührer und Begasungssysteme¹⁰². Eine weitere Einwegreaktor-Entwicklung ist der „Orbital-shaker“, der auf einem Schüttler in Bewegung versetzt wird. Ähnlich wie in einem Schüttelkolben wird das Medium im Reaktor kreisförmig bewegt¹⁰⁴. Weitere Entwicklungen sind Einwegspinner und geschüttelte Bioreaktoren, die mit Multiwellplatten oder Spinröhrchen arbeiten.

In den bisher beschriebenen Systemen können sowohl Suspensionszellen als auch adhären wachsende Zellen kultiviert werden. Letztere werden dafür auf Mikrocarriern kultiviert¹⁰⁵. Anwendung finden diese Systeme hauptsächlich für die Kultivierung produzierender Zellen zur Herstellung rekombinanter Produkte (Impfstoffe, Antikörper, Hormone, Enzyme)^{106, 107}. Für die Kultivierung größerer dreidimensionaler Konstrukte zur Gewebeerstellung eignen sich von den bisher erwähnten Reaktoren nur solche, in denen die Konstrukte befestigt werden können. Spinnerflaschen sind bereits für die Anwendung in der Knochen- und Knorpelrekonstruktion verwendet worden^{89, 90}. Beutelbasierte Reaktoren müssten dementsprechend ausgestattet werden, ihre Verwendung im Tissue Engineering ist in der Literatur jedoch noch nicht beschrieben.



Abbildung 3-16: Einwegreaktor Biostat Cultibag RM 20/50 von Sartorius/Wave Biotech (Quelle: CHEManager 23/2006)¹⁰⁸

Die Entwicklung von weiteren speziellen Einmalreaktoren für die Kultivierung dreidimensionaler Gewebekonstrukte ist erst wenig weit fortgeschritten. Einzelne Systeme sind bisher entwickelt worden. Die Firma Zellwerk GmbH hat einen im Perfusionsmodus betreibbaren Einmalreaktor entwickelt, der auf der Drehbett-Reaktortechnik beruht. Eine poröse Keramikscheibe wird mit Zellen besiedelt und bildet das Drehbett des zylinderförmigen Reaktors, das sich alternierend durch das Zellkulturmedium und den gasgefüllten Kopfraum bewegt. Mit Hilfe einer Steuereinheit werden pH- sowie pO₂-Wert, Temperatur und Nährstoffzufuhr kontrolliert und geregelt. Durch die Bewegung der zellbesiedelten Keramikscheibe im Innenraum des Reaktors sowie den Mediumfluss im Perfusionsmodus wirken weiterhin Flüssigkeitsscherkräfte auf die adhären Zellen. Besonders für die Anwendung im Knochen Tissue Engineering ist dies interessant, da die durch Flüssigkeitsströmungen verursachte mechanische Stimulation die osteogene

Differenzierung mesenchymaler Stromazellen induzieren kann⁹⁷. Weitere Details zu diesem Reaktor finden sich im experimentellen Teil dieser Arbeit (s. Abschnitt 4.1.4.2).

4. EXPERIMENTELLER TEIL

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Funktionalisierung von Keramikmaterialien limitierter Bioaktivität mit der Zielsetzung biomimetische Kompositmaterialien zu erhalten. Das Basismaterial Sponceram[®], eine makroporöse Zirkoniumdioxidkeramik wurde dazu mit bioaktiven Liganden modifiziert, die die Adhäsion von Zellen fördern sowie die Differenzierung von mesenchymalen Stromazellen in Osteoblasten induzieren sollten. Die Liganden wurden zum einen mit Hilfe von Polymerspacern an der Oberfläche der Keramik adsorbiert und zum anderen in geeignete biogene Matrixmaterialien eingeschlossen. Die Herstellungsverfahren der Kompositmaterialien wurden qualitativ sowie quantitativ untersucht. Anschließend wurde die Biokompatibilität der Materialien in statischen Zellkulturuntersuchungen geprüft. Für die Evaluierung des differenzierungs-induzierenden Potentials wurden ausgewählte Kompositmaterialien unter dynamischen Bedingungen kultiviert.

Das Basismaterial zur Herstellung biomimetischer Kompositmaterialien war Sponceram[®], eine dotierte, makroporöse Zirkoniumdioxidkeramik die zusätzlich eine mikroporöse Oberfläche besitzt (s. Abbildung 4-1). Kompakte zirkoniumdioxid-basierte Materialien werden aufgrund ihres inerten Verhaltens und der daraus resultierenden Biokompatibilität bereits als Implantatmaterialien verwendet³⁸. Das poröse Material Sponceram[®] wurde in vorangehenden Studien auf seine Biokompatibilität untersucht¹⁰⁹.

Die Zellkultivierungen unter statischen Bedingungen wurden auf Sponceram[®]-Minidiscs mit 10 mm Durchmesser durchgeführt. Für die Bioreaktorkultivierungen wurden spezielle Sponceram[®]-Scheiben mit einem Durchmesser von 65 mm und einer Dicke von 3 mm verwendet. Technische Spezifikationen von Sponceram[®] 30/90 sind in Tabelle 6-2 aufgeführt. Um die Zellträger für *in vitro* Testungen einsetzen zu können, werden diese im Autoklaven bei 121 °C für 30 min sterilisiert.

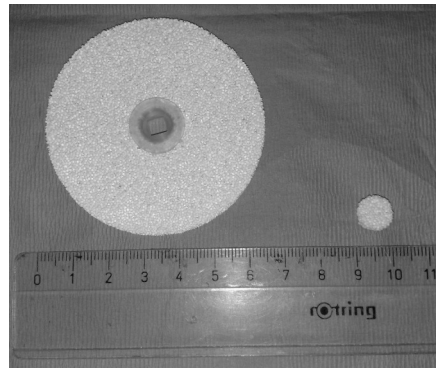


Abbildung 4-1: Sponceram[®], eine makroporöse Zirkoniumdioxidkeramik. Links: Sponceram[®]-Scheibe mit einem Durchmesser von 65 mm, rechts: Sponceram[®]-Minidisc mit einem Durchmesser von 10 mm

4.1. OBERFLÄCHENMODIFIKATION MITTELS POLYMERSPACERN

Eine Möglichkeit der Funktionalisierung eines Keramikmaterials ist die Modifikation der Oberfläche mit bioaktiven Liganden mit Hilfe von Polymeren, die als Spacermoleküle fungieren (vgl. Abschnitt 3.2.3). Durch Kombination unterschiedlicher Liganden lassen sich biomimetische Kompositmaterialien mit steuerbaren Eigenschaften herstellen. In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche biokompatible, nicht-degradierbare Polyvinylsaccharide für die Verwendung als Spacermoleküle untersucht, die beide auf dem Polymer 2-Desoxy-N-methacrylamido-D-glucose basieren.

Als Spacermoleküle zu verwendende Polymere müssen mehreren Anforderungen entsprechen. Zunächst müssen sie biokompatibel sein. Eine Degradation der Polymere ist nicht erwünscht, da dies eine Freisetzung der Liganden und damit den Verlust der bioaktiven Eigenschaften des Keramikmaterials zur Folge hätte. Trotzdem muss das Molekulargewicht so geschaffen sein, dass ein Ausscheiden des mit der Zeit desorbierten Polymers aus dem Körper möglich ist. Ein Abbau über die Nieren ist bis zu einem Molekulargewicht von 50 - 60 kDa möglich¹¹⁰. Des Weiteren muss das Polymer so aufgebaut sein, dass eine Adsorption auf der Keramikoberfläche begünstigt und eine kovalente Bindung der Liganden möglich ist.

In Polysacchariden wird das „Rückgrat“ des Makromoleküls durch Kohlenstoffketten gebildet, die Seitenketten bestehen aus Saccharidresten. Sie stellen eine interessante Stoffklasse für den

Einsatz im Tissue Engineering dar, da sie im Allgemeinen eine geringe Toxizität und gute Biokompatibilität aufweisen und zudem eine chemische Struktur besitzen, die den Glykosaminoglykanen der extrazellulären Matrix (z.B. Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat, Heparinsulfat) gleichen¹¹¹.

Die Anbindung der bioaktiven Liganden an das Polymer sollte unter milden Reaktionsbedingungen ablaufen, um die Bioaktivität der Liganden nicht zu beeinflussen. Weiterhin dürfen bei der Reaktion zwischen Polymer und Ligand keine toxischen Nebenprodukte entstehen und die ausgebildete kovalente Bindung muss eine ausreichende Stabilität aufweisen. Die Verwendung von Aldehydgruppen als Bindungsstellen im Polymer entspricht den genannten Anforderungen: Die bioaktiven Liganden reagieren mit ihren Aminogruppen mit den Aldehydgruppen im Polymer unter Bildung von Iminen. Die Reaktion kann bei einem pH-Wert von 7 und Raumtemperatur durchgeführt werden. Als Nebenprodukt entsteht bei der Reaktion ausschließlich Wasser. Um die Stabilität der Bindung zu erhöhen, werden die Imine durch Reduktion mit Natriumborhydrid in Amine überführt.

In dieser Arbeit wurde Poly(2-Desoxy-N-methacrylamido-D-glucose) (p(MAG)) als Basispolymer verwendet. Die Aldehydgruppen wurden mit Hilfe von zwei unterschiedlichen Methoden in das Polymer eingeführt: Zum einen wurde das Polymer 2-Desoxy-N-methacrylamido-D-glucose mit Natriumperiodat umgesetzt. Der Glucosering des Polymers wird aufgebrochen, die Hydroxygruppen werden zu Aldehydgruppen oxidiert. Das resultierende, oxidierte Polymer wird als ox.p(MAG) bezeichnet (vgl. Abschnitt 4.1.1.1; Abbildung 4-3).

Zum anderen wurde das Basispolymer 2-Desoxy-N-methacrylamido-D-glucose mit N-Vinylpyrrolidon (N-VP) und Acroleindiethylacetal (DAAc) copolymerisiert (Abbildung 4-4). Das resultierende Copolymer p(MVD) besitzt ein Monomeren-Verhältnis von [MAG]:[VP]:[DAAc] = 15:45:40 mol %, die Taktizität der einzelnen Monomere ist nicht bekannt. Um die Acetalgruppen des Monomers DAAc in Aldehydgruppen zu konvertieren, wurde das Copolymer p(MVD) mit Salzsäure umgesetzt (vgl. Abschnitt 4.1.1.2, Abbildung 4-5). Das entschützte Polymer wird mit p(MVA) bezeichnet.

Die Polymere p(MAG), und p(MVD) wurden von Viktor Korzhikov am *Institute of Macromolecular Compounds (Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russland)* hergestellt und physikalisch-chemisch charakterisiert (¹H-NMR- und IR-Spektroskopie, Viskosimetrie, dynamische Lichtstreuung)^{112, 113}. Die Zytotoxizität der Polymere p(MAG), ox.p(MAG), p(MVD) und p(MVA) wurde von Viktor Korzhikov und Solvig Diederichs im Rahmen ihrer Dissertationen untersucht¹¹⁴. Dazu wurden MC3T3-E1 Zellen über einen Zeitraum von 11 Tagen mit Zellkulturmedium kultiviert, dem die Polymere mit einer Konzentration von 0,1 mg/mL zugesetzt wurden. Keines der Polymere verringerte die Viabilität der Zellen (Nachweis mittels MTT-Test¹¹⁵). In einem weiteren Versuch wurden die Polymere mit unterschiedlichen Konzentrationen (0,1 mg/mL; 0,5 mg/mL; 0,7 mg/mL) dem Kulturmedium zugesetzt, die Viabilität der Zellen wurde vier Tage nach der Aussaat mit Hilfe des MTT-Tests bestimmt. Durch den Zusatz der Polymere p(MAG) und p(MVD) wurde die Viabilität der Zellen nicht beeinträchtigt. Die Aldehydgruppen enthaltenden Polymere zeigten dagegen mit steigender Konzentration zunehmend toxische Wirkung^{112, 114}. Da bekannt ist, dass Aldehydgruppen auf Organismen toxisch wirken können¹¹⁶ und die Basispolymere (ohne Aldehydgruppen) keinen negativen Einfluss zeigten, werden die Polymer-Ligand-Konjugate nach der Synthese mit Natriumborhydrid umgesetzt. Diese Reaktion hat neben der Reduktion der Imin- zu Amingruppen auch eine Reduktion der verbliebenen Aldehydgruppen zur Folge, so dass keine toxischen Effekte mehr zu erwarten sind.

Als bioaktive Liganden wurden sowohl Poly-L-Lysin (PLL) als auch BMP-2 ausgewählt. PLL soll die Adhäsion der Zellen an das Kompositmaterial fördern (vgl. Abschnitt 4.1.4), BMP-2 die osteogene Differenzierung der adhären Zellen induzieren (vgl. Abschnitt 3.2.3). Beide Liganden sollten sowohl einzeln als auch in Kombination an die als Spacermoleküle fungierenden Polymere gebunden werden (schematische Darstellung s. Abbildung 4-2). Die resultierenden Einfach- bzw. Doppelkonjugate sollten anschließend auf der Sponceram[®]-Keramik adsorbiert werden.

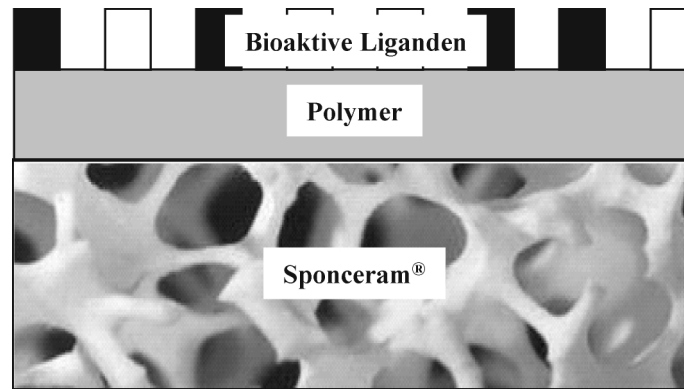


Abbildung 4-2: Schema der Funktionalisierung von Sponceram[®] mit Hilfe von Polymerspacern und Poly-L-Lysin sowie BMP-2 als bioaktive Liganden

Für die Analyse der BMP-2 enthaltenden Konjugate wurde aus wirtschaftlichen Gründen anstelle von BMP-2 bovine Ribonuclease A (RNase) verwendet. Vergleichbare Molekulargewichte sowie vergleichbare isoelektrische Punkte beider Moleküle qualifizieren RNase für die Verwendung als Modellprotein.

4.1.1. SYNTHESE DER KONJUGATE

4.1.1.1. AKTIVIERUNG VON P(MAG)

Um die gewünschten Liganden an das Polymer (p(MAG)) binden zu können, muss dieses oxidiert werden. Dabei wird der Glucosering des Polymers gespalten und dessen Hydroxy- in Aldehydgruppen überführt (Abbildung 4-3). Für die Oxidation wurden 25 mg Polymer in 5 mL ddH₂O gelöst und auf 4 °C gekühlt. Nach Zugabe von 15 mg Natriumperiodat wurde das Reaktionsgemisch für 21 Stunden bei 4 °C gelagert. Die Reaktionsmischung nimmt während der Oxidation des Polymers eine gelb-braune Farbe an, da das Natriumperiodat zu Iod reduziert wird. Nach erfolgter Reaktion wurde das Produkt mit Hilfe eines Zentrifugalkonzentrators (MW 3000) abgetrennt, dreimalig mit Boratpuffer (pH = 10) gewaschen und darin aufgenommen. Mit Schiffs Reagenz konnte die Anwesenheit von Aldehydgruppen bestätigt werden (s. Anhang 6.3.1), deren Konzentration beträgt 30 mol % (bezogen auf die Molmasse des Polymers)¹¹³.

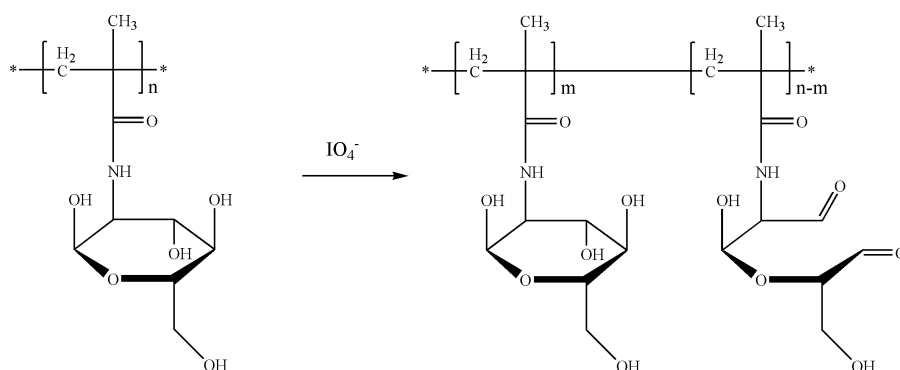


Abbildung 4-3: Oxidation des Glucoserings von p(MAG) mit Natriumperiodat

4.1.1.2. AKTIVIERUNG VON P(MVD)

Um die bioaktiven Liganden an das Copolymer p(MVD) anbinden zu können, müssen dessen Acetal- in Aldehydgruppen konvertiert werden (Abbildung 4-5). Dazu wurden 35 mg p(MVD) in 7 mL 0,01 M Salzsäure gelöst und 2 Stunden bei Raumtemperatur und 650 rpm inkubiert. Das Produkt wurde mit Hilfe eines Zentrifugalkonzentrators (MW 3000) abgetrennt, dreimal mit Boratpuffer (pH = 10) gewaschen und darin aufgenommen. Mit Schiffs Reagenz konnte die Anwesenheit von Aldehydgruppen bestätigt werden (s. Anhang 6.3.1), deren Konzentration 7 mol % beträgt¹¹³.

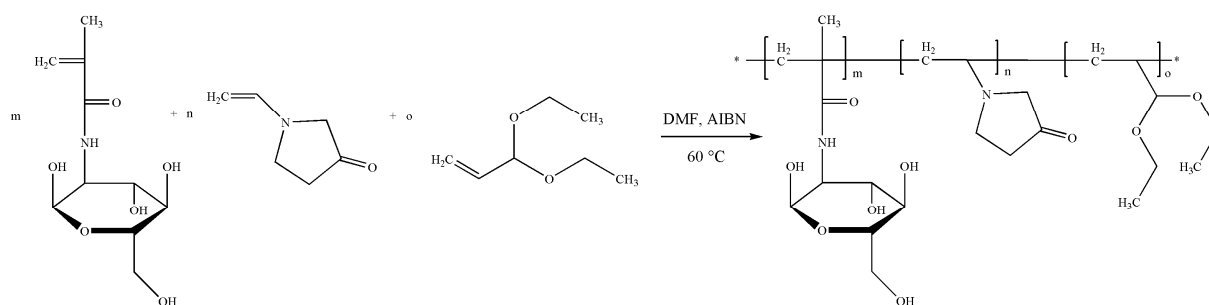


Abbildung 4-4: Copolymerisation von 2-Desoxy-N-methacrylamido-D-glucose mit N-Vinylpyrrolidon und Acroleindiethylacetal zu p(MVD)

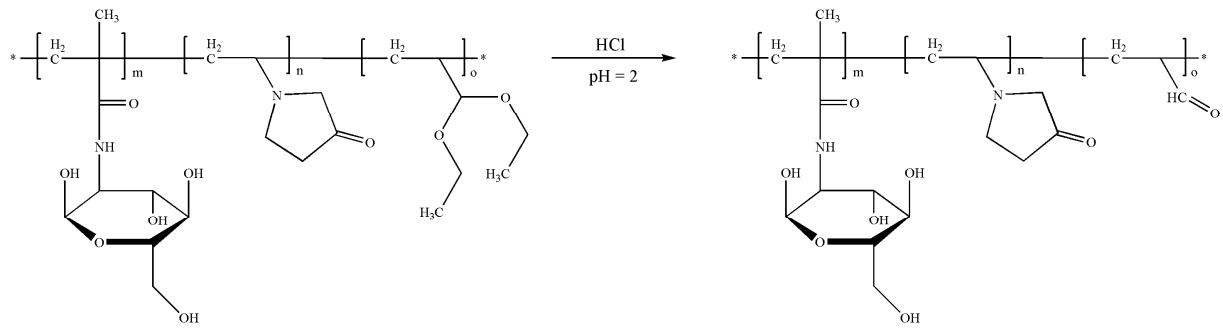


Abbildung 4-5: Synthese von p(MVA): Konversion der Acetalgruppen in p(MVD) in Aldehydgruppen

4.1.1.3. ANBINDUNG DER LIGANDEN

Synthese von Einzelkonjugaten mit Poly-L-Lysin

Zur Anbindung der polymeren Aminosäure Poly-L-Lysin an die Aldehydgruppen der Polymere ox.p(MAG) sowie p(MVA) wurden die Edukte in Boratpuffer (pH = 10) gelöst und in einem Gewichtsverhältnis Polymer:PLL 10:1 (ox.p(MAG)) bzw. 20:1 (p(MVA)) zusammen gegeben (Abbildung 4-6). Nach 2 Stunden Inkubationszeit bei Raumtemperatur und 550 rpm wurde das Produkt mit Hilfe eines Zentrifugalkonzentrators (MW 30.000) abgetrennt. Durch Zugabe von Natriumborhydrid (1,5 Moläquivalent) wurden die Imin- zu Aminogruppen reduziert. Die Aufarbeitung geschah durch erneute Zentrifugation des Reaktionsgemisches in einem Zentrifugalkonzentrator (MW 30.000) und zweimaliges Waschen des Produkts mit Phosphatpuffer pH = 7. Das resultierende Konjugat wurde in Phosphatpuffer pH = 7 aufgenommen.

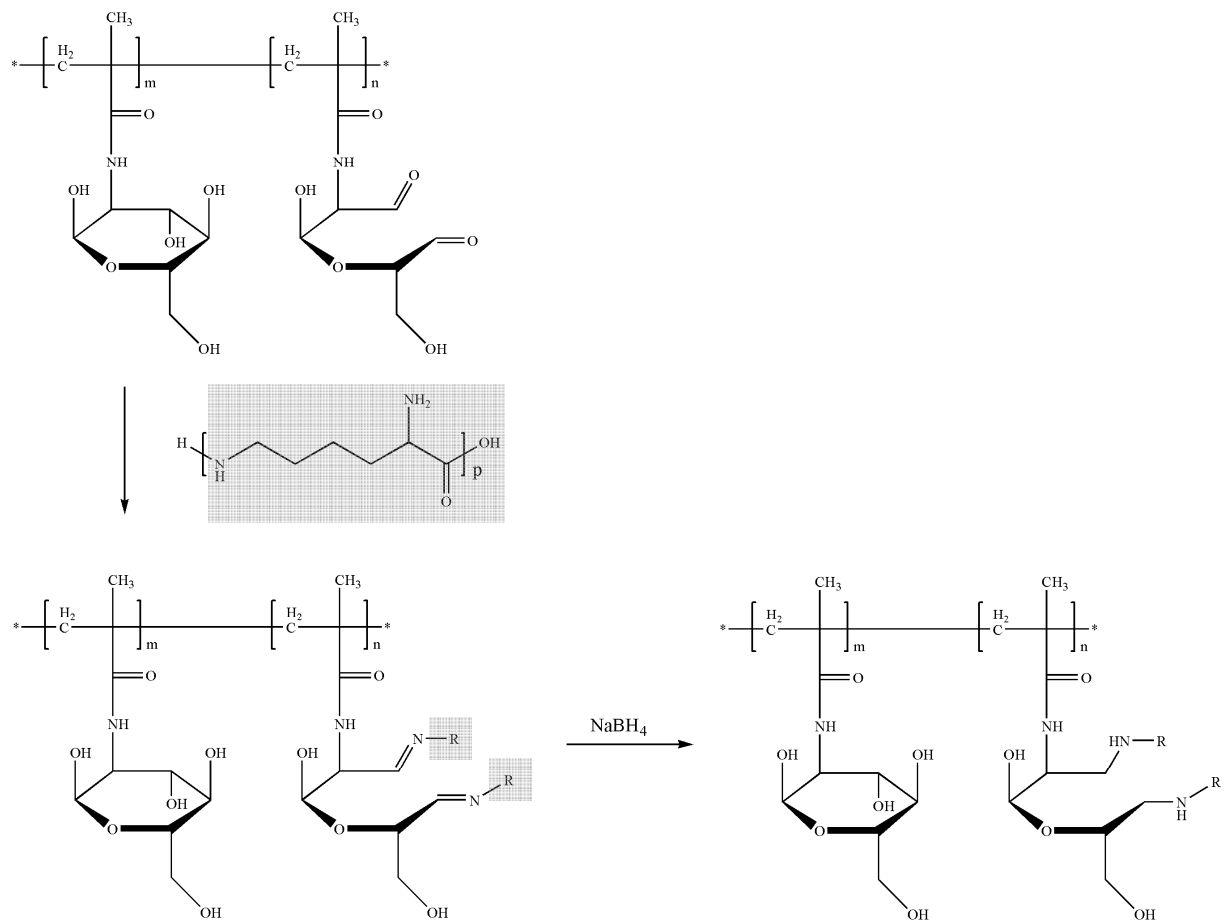


Abbildung 4-6: Schema der Synthese der Einzelkonjugate am Beispiel der Herstellung von ox.p(MAG)-PLL

Synthese von Einzelkonjugaten mit dem Modellprotein RNase

Zur Anbindung der als Modellprotein verwendeten RNase an die Polymere wurden die Edukte (gelöst in Boratpuffer pH = 10) in einem Gewichtsverhältnis Polymer:RNase 10:1 (ox.p(MAG)) bzw. 20:1 (p(MVA)) zusammengegeben. Die Reaktionsmischung wurde 2 h bei Raumtemperatur und 550 rpm inkubiert. Reduktion und Aufreinigung wurden wie oben beschrieben durchgeführt.

Synthese von Doppelkonjugaten

Zur Herstellung des Doppelkonjugats wurde zunächst RNase, wie oben beschrieben, an das jeweilige Polymer gebunden. Nach erfolgter Abtrennung des Produkts wurde in einem zweiten Reaktionsschritt PLL gebunden (s.o.). Reduktions- und Aufreinigungsschritt wurden wie im Fall der Einfachkonjugate durchgeführt.

4.1.1.4. QUALITATIVER NACHWEIS DER KONJUGATE

Für den qualitativen Nachweis der Kupplungsreaktion wurden die hergestellten Konjugate mittels Gelelektrophorese untersucht (Durchführung s. Anhang 6.3.2).

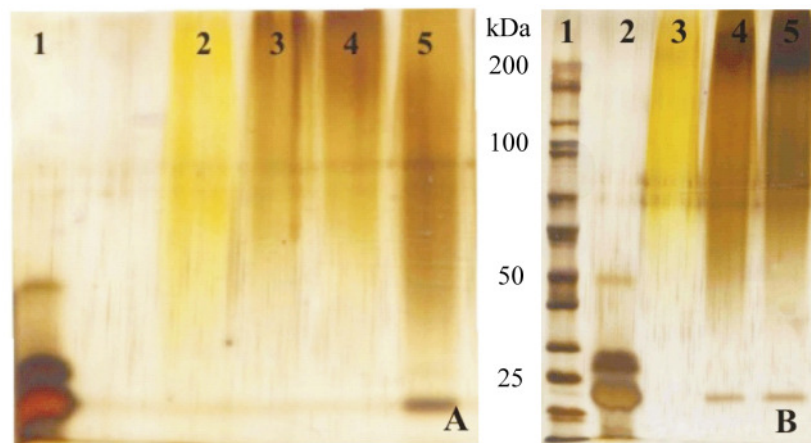


Abbildung 4-7: A: Qualitativer Nachweis der Einfachkonjugate mit dem Polymer ox.p(MAG) in einem 12 % igem SDS-Gel, mit Silber gefärbt (1: RNase, 2: ox.p(MAG), 3: ox.p(MAG)-PLL, 4: ox.p(MAG)-PLL, 5: ox.p(MAG)-RNase); B: Qualitativer Nachweis von ox.p(MAG)-RNase-PLL und dem Zwischenprodukt ox.p(MAG)-RNase (1: Proteinmarker, 2: RNase, 3: ox.p(MAG), 4: ox.p(MAG)-RNase, 5: ox.p(MAG)-RNase-PLL)

Abbildung 4-7 A zeigt den qualitativen Nachweis der Einfach- und Doppelkonjugate des Polymers ox.p(MAG) in einem 12 % igem SDS-Trenngel. Aufgrund seiner breiten Molekulargewichtsverteilung weist ox.p(MAG) keine diskrete Bande, sondern eine lang gezogene gelbe Spur auf (Spur 2). Nach der Anbindung von Poly-L-Lysin an das Polymer verändert sich die Farbe der Spur zum charakteristischen Braun gefärbter Proteine (Spur 3, 4).

Das Konjugat ox.p(MAG)-RNase zeigt ebenfalls die charakteristische braune Farbe, jedoch wanderte diese Probe weiter durch das Trenngel (Spur 5). Dieser Befund lässt auf ein geringeres Molekulargewicht des Konjugats ox.p(MAG)-RNase gegenüber ox.p(MAG)-PLL schließen. Offenbar haben mehr Moleküle des kleineren Poly-L-Lysins an das Polymer gebunden. Dieser Effekt ist vermutlich auf sterische Hinderungen zurückzuführen. Die diskrete Bande in Spur 5 weist auf RNase hin, die bei der Aufreinigung des Produkts nicht vollständig entfernt wurde.

In Abbildung 4-7 B ist der qualitative Nachweis des Doppelkonjugats ox.p(MAG)-RNase-PLL gezeigt. Das Zwischenprodukt ox.p(MAG)-RNase zeigt die charakteristische braune Farbe silbergefärbter Proteine (Spur 4). Nach der Anbindung des zweiten Liganden Poly-L-Lysin ist eine potentielle Verstärkung der Farbintensität zu erkennen. Außerdem scheint sich das Doppelkonjugat näher am Ausgangspunkt im Sammelgel zu befinden (Spur 5). Dieser Befund weist auf ein größeres Molekulargewicht des Doppel- als des Einfachkonjugats hin.

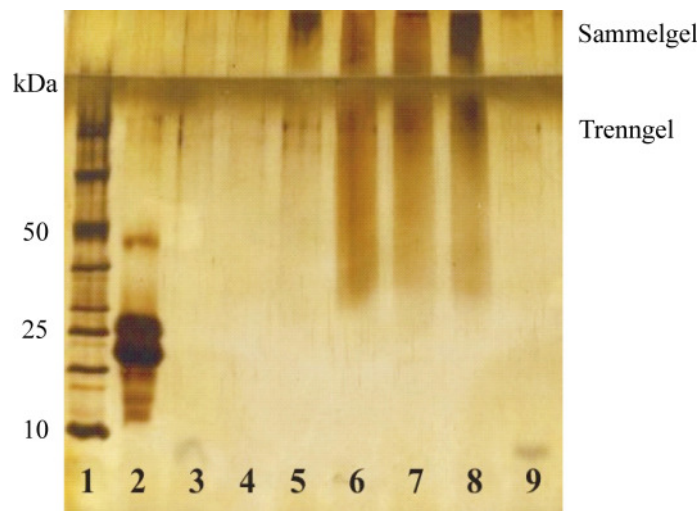


Abbildung 4-8: Qualitativer Nachweis der Einfachkonjugate mit dem Polymer p(MVA) in einem 16 % igem SDS-Gel, mit Silber gefärbt (1: Proteinmarker, 2: RNase, 3: PLL, 4: p(MVA), 5: p(MVA)-PLL, 6: p(MVA)-RNase, 7: p(MVA)-RNase (Zwischenprodukt des Doppelkonjugats), 8: p(MVA)-RNase-PLL, 9: PLL)

In Abbildung 4-8 ist der qualitative Nachweis der Einfach- und Doppelkonjugate des Polymers p(MVA) dargestellt. Diese Untersuchung wurde von Franziska Bode im Rahmen ihrer Diplomarbeit durchgeführt¹¹⁷. In Spur 3 und 9 ist Poly-L-Lysin schwach erkennbar. Da Poly-L-Lysin aufgrund seines geringen Molekulargewichts nicht in einem 12% igem

Trenngel nachgewiesen werden konnte (vgl. Abbildung 4-7), wurde hier ein 16 % iges Gel verwendet. Das Polymer p(MVA) kann im Gel nicht nachgewiesen werden (Spur 4). Das Konjugat p(MVA)-PLL befindet sich aufgrund seiner Größe fast ausschließlich im Sammelgel (Spur 5). Das Konjugat p(MVA) und das Zwischenprodukt des Doppelkonjugats migrierten vergleichbar weit im Trenngel. Das Molekulargewicht von p(MVA)-PLL ist somit offenbar größer als das Molekulargewicht von p(MVA)-RNase. Dieses Ergebnis wurde ebenso im Fall der Konjugate des Polymers ox.p(MAG) gefunden. Das Doppelkonjugat p(MVA)-RNase-PLL migrierte vergleichbar mit dem Einzelkonjugat p(MVA)-RNase, jedoch verblieb zusätzlich ein großer Teil des Konjugats im Sammelgel.

4.1.1.5. QUANTITATIVER NACHWEIS DER KONJUGATE

Für den quantitativen Nachweis der Kupplungsreaktionen zwischen Polymer und Liganden wurden Poly-L-Lysin und RNase mit dem Fluoreszenzmarker FITC markiert (Durchführung s. Anhang 6.3.3). Die Anbindung der FITC-markierten Liganden an die Polymere p(MVA) und ox.p(MAG) erfolgte wie unter 4.1.1.3 beschrieben. Nach erfolgter Reaktion und Aufreinigung wurde die Menge der gebundenen Liganden mittels Fluoreszenzmessung (Anregung: 485 nm, Emission: 535 nm) quantifiziert.

Die quantitativen Analysen der Konjugate des Polymers p(MVA) wurden von Franziska Bode im Rahmen ihrer Diplomarbeit durchgeführt. Dabei wurde bestätigt, dass die Ausbeute der Poly-L-Lysin-Kupplung die der RNase-Kupplung übersteigt (Abbildung 4-9). RNase wurde im Einzelkonjugat mit einer Ausbeute von $52,8 \pm 2,5 \%$, Poly-L-Lysin mit einer Ausbeute von $67,7 \pm 4,7 \%$ gebunden (bezogen auf die eingesetzte Menge). Im Doppelkonjugat beträgt die Menge des im zweiten Schritt gebundenen Poly-L-Lysins $55,9 \pm 8,3 \%$ der eingesetzten Menge.

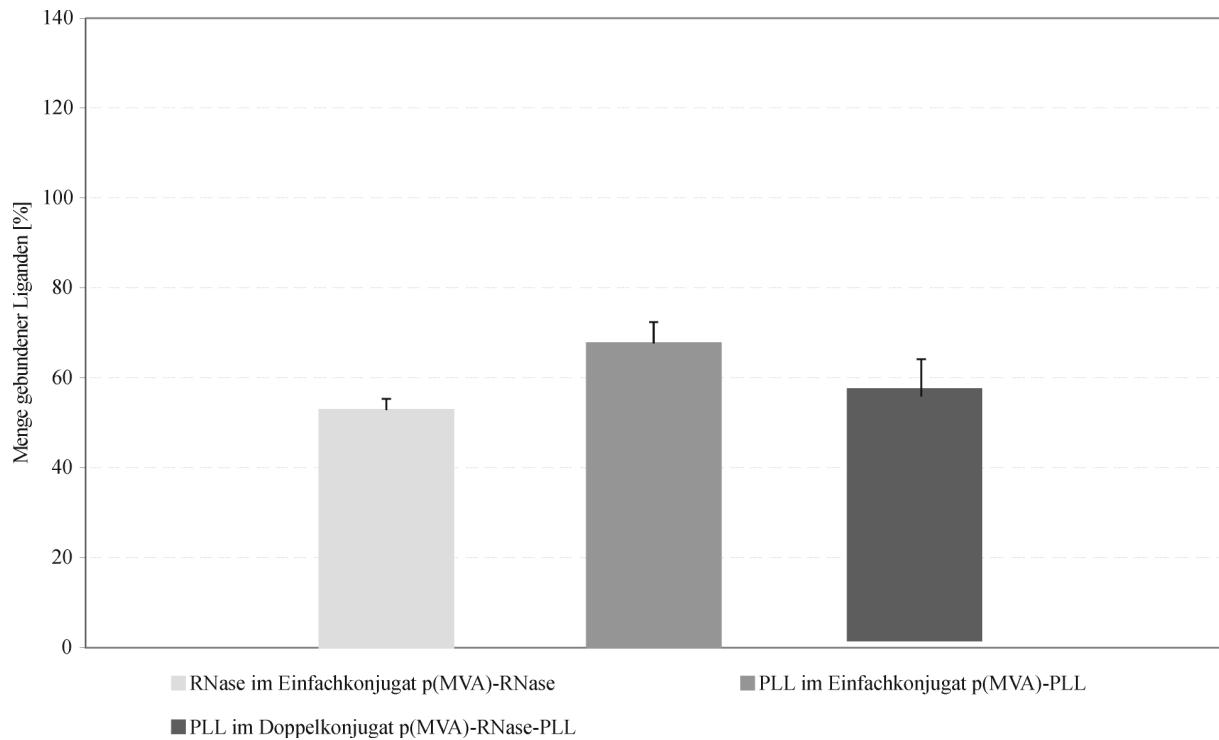


Abbildung 4-9: Quantitative Analyse der Anbindung von RNase in p(MVA)-RNase sowie PLL in p(MVA)-PLL und p(MVA)-RNase-PLL mit FITC-markierten Liganden. Die Werte sind als Mittelwert aus vier Experimenten \pm Standardfehler angegeben.

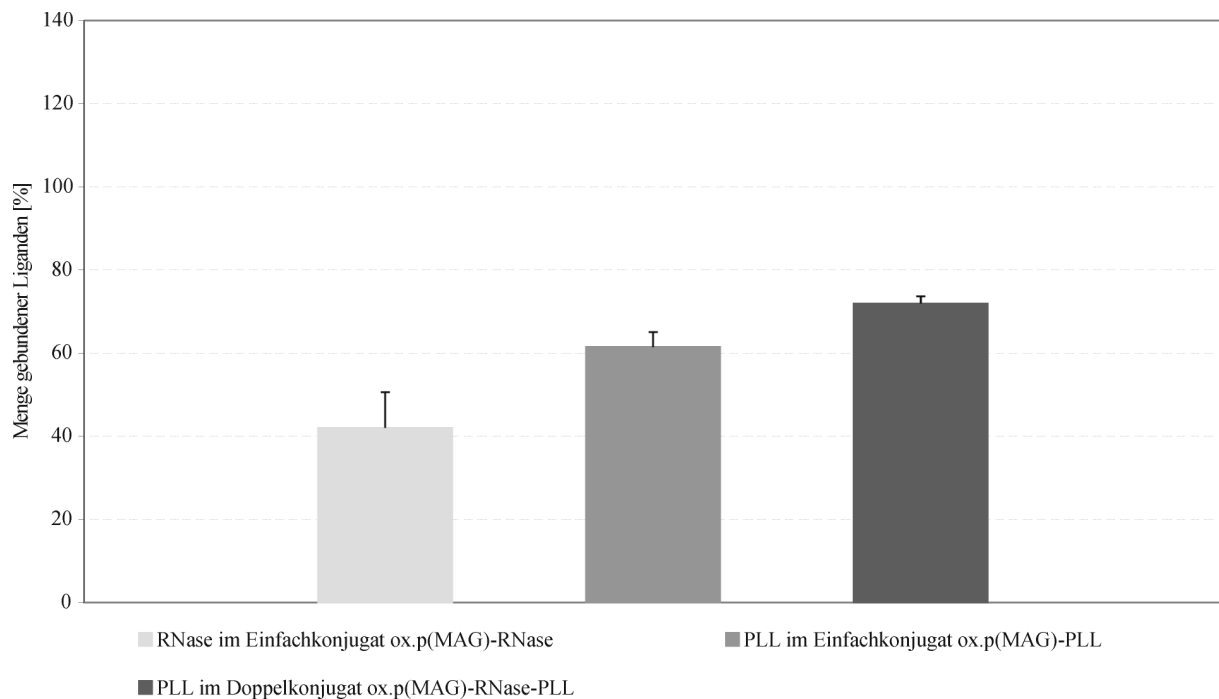


Abbildung 4-10: Quantitative Analyse der Anbindung von RNase in ox.p(MAG)-RNase sowie PLL in ox.p(MAG)-PLL und ox.p(MAG)-RNase-PLL mit FITC-markierten Liganden. Die Werte sind als Mittelwert aus vier Experimenten \pm Standardfehler angegeben.

Auch die quantitative Analyse der Reaktionen zwischen ox.p(MAG) und Poly-L-Lysin sowie RNase zeigen, dass die Reaktion mit Poly-L-Lysin mit größerem Umsatz abläuft als die Reaktion mit RNase (Abbildung 4-10). Bei Einsatz gleicher Ligandenmengen wurde RNase mit einer Ausbeute von $42,0 \pm 8,5 \%$ und Poly-L-Lysin mit einer Ausbeute von $61,4 \pm 3,6 \%$ gebunden. Im Doppelkonjugat beträgt die Menge des im zweiten Schritt gebundenen Poly-L-Lysins $71,9 \% \pm 1,7 \%$ der eingesetzten Menge.

Fazit: Mit Hilfe der durchgeführten qualitativen und quantitativen Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass der adhäsionsfördernde Faktor Poly-L-Lysin sowie das Modellprotein RNase an die ausgewählten Polymere p(MVA) und ox.p(MAG) angebunden werden können. Durch eine zweistufige Anbindung von Poly-L-Lysin und RNase kann ein Doppelkonjugat erhalten werden, das beide Liganden enthält. Ergänzende Untersuchungen mit fluoreszenzmarkiertem PLL zeigten, dass das im ersten Schritt angebundene PLL durch die Zugabe von RNase nicht verdrängt wird, sondern beide Liganden im Konjugat nebeneinander vorliegen (Daten nicht gezeigt).

4.1.2. HERSTELLUNG DER KOMPOSITMATERIALIEN

4.1.2.1. ADSORPTION DER KONJUGATE

Zur Herstellung der Kompositmaterialien wurden Sponceram[®] Minidiscs oder Sponceram[®]-Discs zur Sterilisation zunächst autoklaviert (30 min, 121 °C). Die wie unter Abschnitt 4.1.1.3 beschrieben hergestellten Konjugatlösungen wurden steril filtriert. Anschließend wurden in jeweils eine Kavität einer 6-Lochplatte 7 Sponceram[®]-Minidiscs gegeben und mit 4 mL der jeweiligen Konjugatlösung überschichtet. Die Platten wurden für 1 Stunde bei 300 rpm geschüttelt und anschließend bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert. Für die Herstellung der Kompositmaterialien für die Reaktorkultivierung wurden Sponceram[®]-Discs mit einem Durchmesser von 65 mm verwendet. Die Scheiben wurden nach dem Autoklavieren in einer Petrischale über Nacht in 25 mL Konjugatlösung inkubiert.

4.1.2.2. NACHWEIS DER ADSORPTION

Die Adsorption wurde mittels XPS-Messungen nachgewiesen, die Messungen wurden am Leibniz Institut für Plasmaforschung und Technologie e.V. durchgeführt (für Details s. Anhang 6.3.4). Es wurden zwei Keramiken jeden Komposit-Materials sowie zwei in Phosphatpuffer inkubierte Sponceram[®]-Discs als Referenzmaterial untersucht. Die Adsorption der Konjugate wurde wie unter 4.1.2.1 beschrieben durchgeführt. Nach der Inkubation wurden die modifizierten Keramiken zunächst dreimal mit Phosphatpuffer gewaschen und anschließend bei Raumtemperatur getrocknet. Auf jeder Probe wurden fünf Messungen an unterschiedlichen Stellen durchgeführt.

Die Adsorption der Konjugate auf Sponceram[®] konnte durch ihren Stickstoffgehalt nachgewiesen werden. Alle untersuchten Komposit-Materialien zeigen einen Stickstoff-Peak bei einer Bindungsenergie von 398 eV. Im Falle des nicht-modifizierten, in Phosphatpuffer inkubierten Sponceram[®] wurde kein Stickstoff nachgewiesen (Abbildung 4-11, Abbildung 4-12).

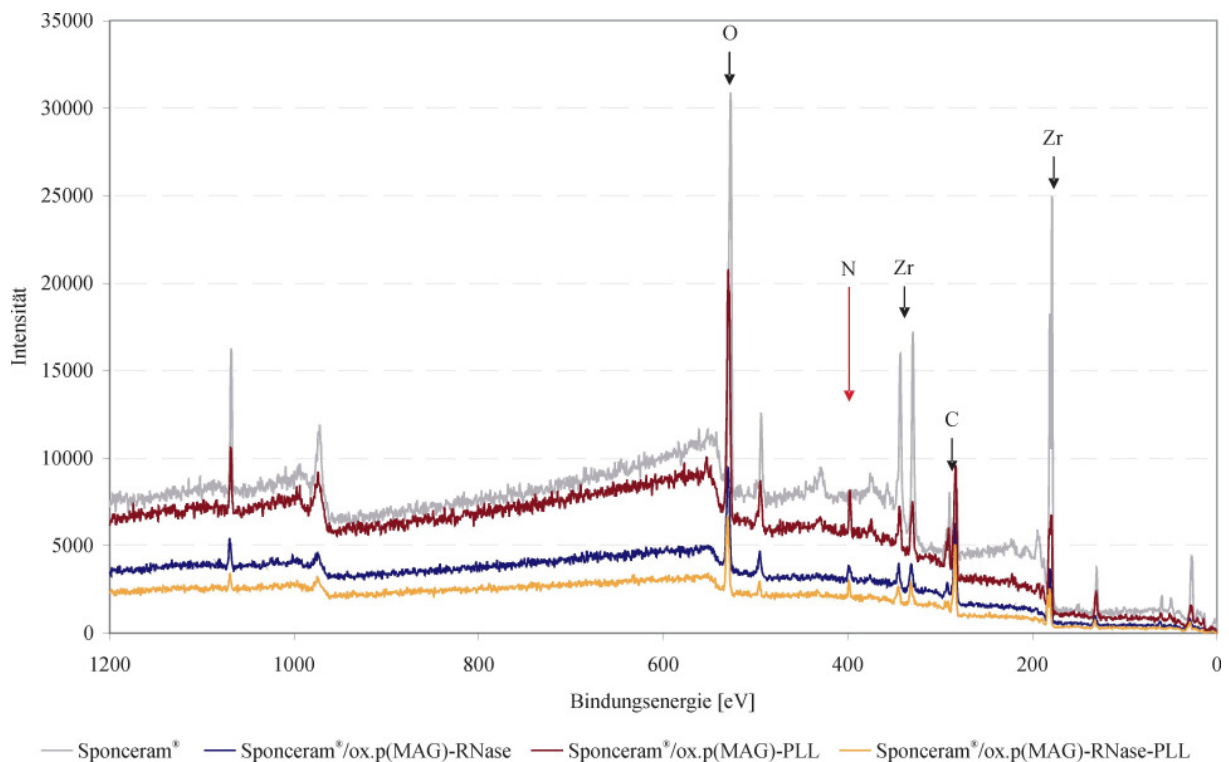


Abbildung 4-11: XPS-Übersichtsspektrum von Sponceram[®], Sponceram[®]/ox.p(MAG)-RNase, Sponceram[®]/ox.p(MAG)-PLL und Sponceram[®]/ox.p(MAG)-RNase-PLL

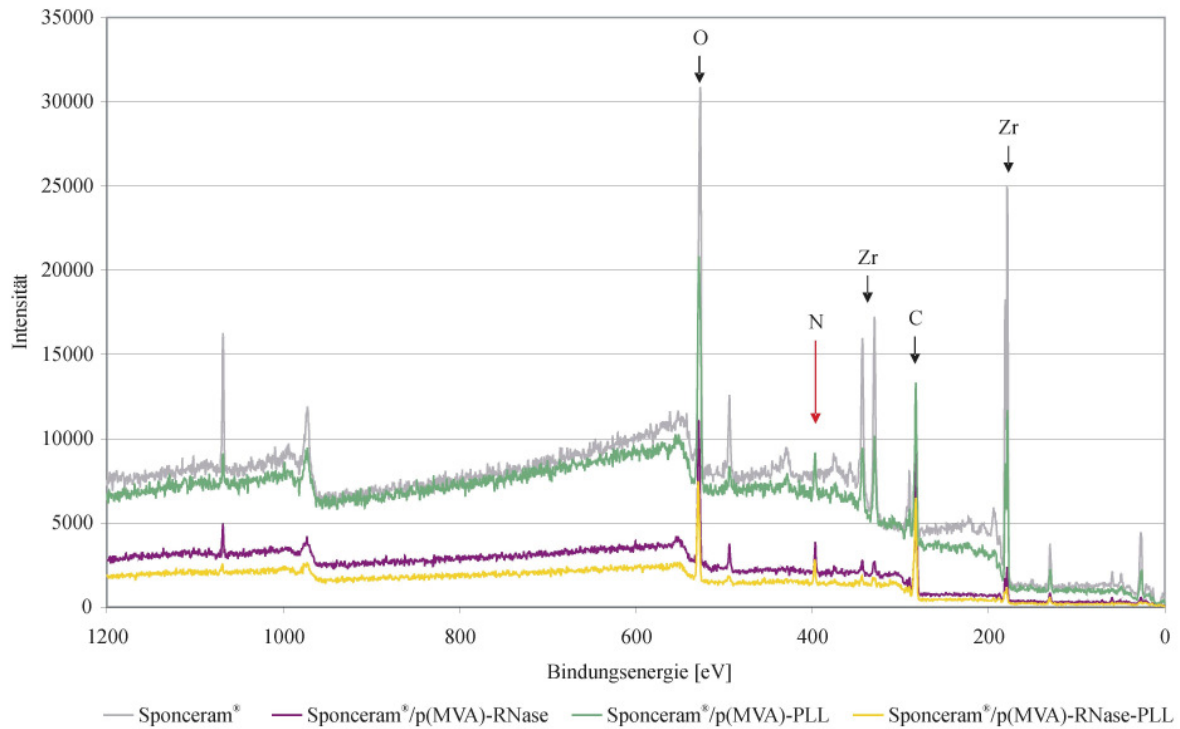


Abbildung 4-12: XPS-Übersichtsspektrum von Sponceram[®], Sponceram[®]/p(MVA)-RNase, Sponceram[®]/p(MVA)-PLL und Sponceram[®]/p(MVA)-RNase-PLL

In Tabelle 4-1 und Tabelle 4-2 sind die Anteile an Kohlenstoff, Zirkonium, Sauerstoff und Stickstoff aller Proben im Vergleich gezeigt. Die aufgeführten Anteile an Natrium, Kalium und Phosphor sind Bestandteile des verwendeten Phosphatpuffers und nicht relevant.

Tabelle 4-1: Chemische Quantifizierung der auf der Oberfläche der p(MVA)-Komposite detektierten Elemente. Die Werte sind angegeben als Mittelwert aus n Messungen \pm Standardfehler.

Element	Referenz Sponceram [®]	Sponceram [®] / p(MVA)-PLL	Sponceram [®] / p(MVA)-RNase	Sponceram [®] / p(MVA)-RNase-PLL
Zr	13,2 \pm 0,21 %	3,7 \pm 0,36 %	1,2 \pm 0,22 %	1,4 \pm 0,17 %
O	51,8 \pm 0,34 %	34,5 \pm 1,14 %	28,5 \pm 0,99 %	25,3 \pm 0,46 %
C	20,5 \pm 0,47 %	48,4 \pm 1,76%	59 \pm 1,44 %	62,5 \pm 0,64 %
N	-	5,6 \pm 0,31 %	6,2 \pm 0,29 %	7,2 \pm 0,20 %
K	2,8 \pm 0,07 %	2 \pm 0,44 %	0,7 \pm 0,20 %	0,6 \pm 0,07 %
P	4,7 \pm 0,09 %	3,2 \pm 0,40 %	2,2 \pm 0,32 %	1,6 \pm 0,10 %
Na	5,3 \pm 0,16 %	2,3 \pm 0,11 %	2,2 \pm 0,39 %	1,2 \pm 0,08 %
Si	1,5 \pm 0,16 %	-	-	-
Anzahl Messungen (n)	16	6	5	10

Tabelle 4-2: Chemische Quantifizierung der auf der Oberfläche der ox.p(MAG)-Komposite detektierten Elemente. Die Werte sind angegeben als der Mittelwert aus n Messungen \pm Standardfehler.

Element	Referenz Sponceram [®]	Sponceram [®] / ox. p(MAG)-PLL	Sponceram [®] / ox. p(MAG)-RNase	Sponceram [®] / ox. p(MAG)-RNase-PLL
Zr	13,2 \pm 0,21 %	4,2 \pm 0,14 %	3,5 \pm 0,10 %	2,0 \pm 0,35 %
O	51,8 \pm 0,34 %	36,7 \pm 0,97 %	32,1 \pm 0,25 %	30,4 \pm 0,57 %
C	20,5 \pm 0,47 %	43,3 \pm 1,52 %	50,0 \pm 0,42 %	52,6 \pm 0,69 %
N	-	6,3 \pm 0,17 %	6,9 \pm 0,16 %	7,9 \pm 0,27 %
K	2,8 \pm 0,07 %	2,3 \pm 0,29 %	1,8 \pm 0,02 %	1,5 \pm 0,10 %
P	4,7 \pm 0,09 %	3,8 \pm 0,31 %	2,9 \pm 0,09 %	2,9 \pm 0,23 %
Na	5,3 \pm 0,16 %	3,1 \pm 0,05 %	2,8 \pm 0,09 %	2,7 \pm 0,27 %
Si	1,5 \pm 0,16 %	-	-	-
Anzahl Messungen (n)	16	3	10	10

In den Proben Sponceram[®]/p(MVA)-PLL sowie Sponceram[®]/p(MVA)-RNase wurde Stickstoff mit einem Elementanteil von 5,6 % bzw. 6,2 % nachgewiesen (Tabelle 4-1). Die Elementanteile des Zirkoniums und des Sauerstoffs sind gegenüber der Referenz Sponceram[®] nach der Adsorption des Konjugats geringer. Dieser Effekt beruht auf einer Abdeckung der Sponceram[®]-Oberfläche durch die Konjugatschicht. Die größeren Anteile an Stickstoff und Kohlenstoff sowie die geringeren Anteile an Zirkonium und Sauerstoff im Falle von Sponceram[®]/p(MVA)-RNase gegenüber Sponceram[®]/p(MVA)-PLL lassen auf eine effektivere Adsorption des Konjugats p(MVA)-RNase schließen. Die Unterschiede der Elementanteile der Proben Sponceram[®]/p(MVA)-RNase und Sponceram[®]/p(MVA)-RNase-PLL sind vergleichbar. Ein leicht erhöhter Stickstoffanteil um 1 % im Fall von Sponceram[®]/p(MVA)-RNase-PLL ist mit der Anwesenheit zweier stickstoffhaltiger Liganden (Poly-L-Lysin, RNase) erklärbar.

Die Ergebnisse der Untersuchungen der ox.p(MAG) enthaltenden Komposite zeigen ein vergleichbares Ergebnis (Tabelle 4-2). Der Stickstoffanteil des Komposits Sponceram[®]/ox.p(MAG)-RNase ist größer als der Anteil in Sponceram[®]/ox.p(MAG)-PLL. Da auch der Kohlenstoffanteil im Komposit Sponceram[®]/ox.p(MAG)-RNase größer, sowie Sauerstoff- und Zirkoniumanteil geringer sind als in Sponceram[®]/ox.p(MAG)-PLL, kann auch hier auf eine effektivere Adsorption des Konjugats ox.p(MAG)-RNase geschlossen werden. Sponceram[®]/ox.p(MAG)-RNase-PLL zeigt vergleichbare Elementanteile wie das Kompositmaterial Sponceram[®]/ox.p(MAG)-RNase. Der Stickstoffanteil ist jedoch auch hier im Fall von Sponceram[®]/ox.p(MAG)-RNase-PLL leicht erhöht.

Fazit: Die Adhäsion der Konjugate beider Polymere konnte mit Hilfe der XPS-Messungen nachgewiesen werden. Gegenüber unbehandeltem Sponceram[®] erniedrigte Elementanteile an Zirkonium und Sauerstoff sowie erhöhte Anteile an Stickstoff und Kohlenstoff an der Oberfläche der Kompositmaterialien beweisen die Abdeckung der Zirkonumdioxidoberfläche durch die adsorbierten Konjugate.

4.1.3. BIOMECHANISCHE UNTERSUCHUNGEN

Eine interkonnektiv poröse dreidimensionale Struktur ist für ein Biomaterial, das als Knochenersatz verwendet werden soll, essentiell (vgl. Abschnitt 3.2). Besonders im Einsatz der Hartgeweberegeneration muss die Porosität des Materials so geschaffen sein, dass es den mechanischen Anforderungen, denen es *in vivo* ausgesetzt wird, genügt (vgl. Abschnitt 3.1). Eine geringe Porosität oder Poren geringen Durchmessers, die eine hohe Stabilität des Materials gewährleisten würden, sind jedoch problematisch, da in diesem Fall sowohl die Nährstoffversorgung der adhären Zellen, als auch der Abtransport von Stoffwechselprodukten erschwert werden. Die Deposition extrazellulärer Matrix, die während der osteogenen Differenzierung auftritt, muss zusätzlich berücksichtigt werden. Durch Ablagerungen innerhalb der Poren können diese verkleinert oder sogar vollständig verschlossen werden, so dass keine Versorgung der Zellen mehr gewährleistet ist. Die mechanischen Eigenschaften eines Biomaterials können durch biomechanische Untersuchungen bestimmt werden. Wichtige Parameter sind dabei die maximale Festigkeit und Deformation des Materials sowie die Energie die zum Bruch des porösen Netzwerks führt, die durch Ausführung eines Kompressionstests erhalten werden.

4.1.3.1. KOMPRESSIONSTESTS

Zur Ermittlung der biomechanischen Eigenschaften eines Materials kann dieses Kompressions-, Zug- oder Scherbelastungen ausgesetzt werden (Abbildung 4-13). Die aus den wirkenden Kräften resultierenden Deformationen des Prüfkörpers werden registriert und zur Charakterisierung des Materials verwendet. Zugtests sind bei der Bewertung von Knochenersatzmaterialien in der Regel nicht relevant, da Knochen *in vivo* primär Kompressionskräften ausgesetzt sind¹¹⁸. Kompressionsversuche haben zudem den Vorteil, dass relativ kleine Prüfkörper verwendet werden können. Um die Einwirkung von Scherkräften auf Materialien zu untersuchen, sind spezielle Prüfkörperformen notwendig, die in diesem Fall nicht zugänglich waren. Die biomechanischen Untersuchungen der verwendeten Materialien beschränkten sich in dieser Arbeit daher auf die Durchführung von Kompressionstests. Die Kompression wurde dabei monoaxial durchgeführt, so dass sich der Prüfkörper seitlich ausweichend verformen kann.

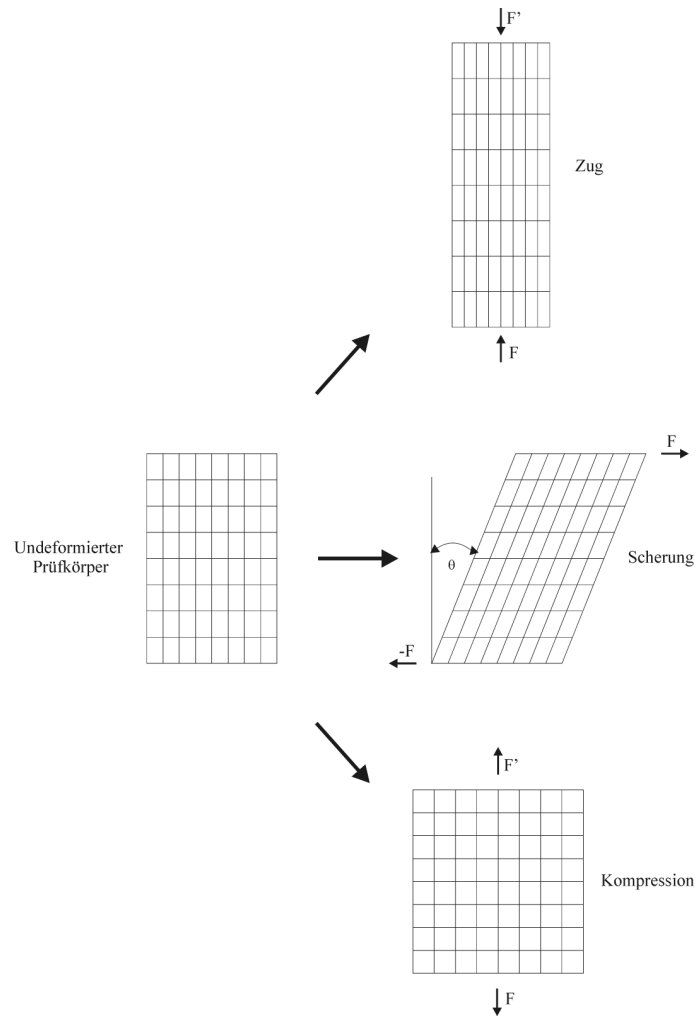


Abbildung 4-13: Deformationen von Prüfkörpern durch Zug, Scherung oder Kompression. F und F' sind gleich große entgegengesetzte Zug- oder Kompressionskräfte, $-F$ und F sind gleich große, entgegengesetzte Scherkräfte (adaptiert aus: Cullinane und Einhorn, 2002)¹⁹

Um den Einfluss der Polymerbeschichtung auf die Stabilität von Sponceram[®] zu untersuchen, wurde das Kompositmaterial Sponceram[®]/ox.p(MAG) exemplarisch im Vergleich zu unmodifiziertem Sponceram[®] 30/90 getestet. Auf eine Untersuchung des Kompositmaterials Sponceram[®]/p(MVA) wurde verzichtet, da die biomechanischen Eigenschaften beider Materialien aufgrund des identischen Herstellungsverfahrens als vergleichbar angesehen werden. Zu Vergleichszwecken wurden auch weitere kommerziell erhältliche Sponceram[®]-Materialien getestet: Sponceram[®]/ 30/90 Ti (beschichtet mit Titandioxid), Sponceram[®] 30/90 HA (beschichtet mit Hydroxylapatit) und Sponceram[®] 30/145. Technische Spezifikationen der unterschiedlichen Keramiken sind in Tabelle 6-2 zusammengefasst.

Für die Kompressionstests wurden Sponceram[®]-Minidisks mit einem Durchmesser von 10 mm und einer Dicke von 3 mm verwendet. Die Polymerbeschichtung des Materials Sponceram[®]/ox.p(MAG) wurde, wie in Abschnitt 4.1.2.1 beschrieben (mit Polymerlösung, ohne angebundene Liganden), hergestellt.

Die Versuche wurden im Rahmen eines Auslandsaufenthaltes an der Universität Zaragoza durchgeführtⁱⁱ. Die Materialien wurden mit Hilfe einer Universalprüfmaschine einer Kompressionsbelastung ausgesetzt und die dabei resultierenden Deformationen gemessen (detaillierte Durchführung s. Anhang 6.3.5). Die gemessenen Werte wurden graphisch dargestellt, indem die Kraft F auf die Fläche A und die Längenänderung ΔL auf die Ausgangslänge (-dicke) L_0 der Probe bezogen wurden. Es resultieren daraus die Spannung σ sowie die Deformation ε , die in einem Diagramm gegeneinander aufgetragen wurden.

$$\sigma = \frac{F}{A_0} \quad \varepsilon = \frac{\Delta L}{L_0} \quad (\text{Formel 4.1.})$$

Aus dem sog. Spannungs-Deformations-Diagramm können die maximale Spannung und die maximale Deformation bis zum Zusammenbruch der Porenstruktur ermittelt werden. Die Fläche unter der Kurve entspricht der zu leistenden Arbeit, die zum Zusammenbruch der Porenstruktur führt.

ⁱⁱ Aufenthalt im Rahmen eines DAAD-Stipendiums an der Universität Zaragoza, Aragon Institute of Engineering Research, Group of Structural Mechanics and Material Modelling (03.01.-29.02.2008)

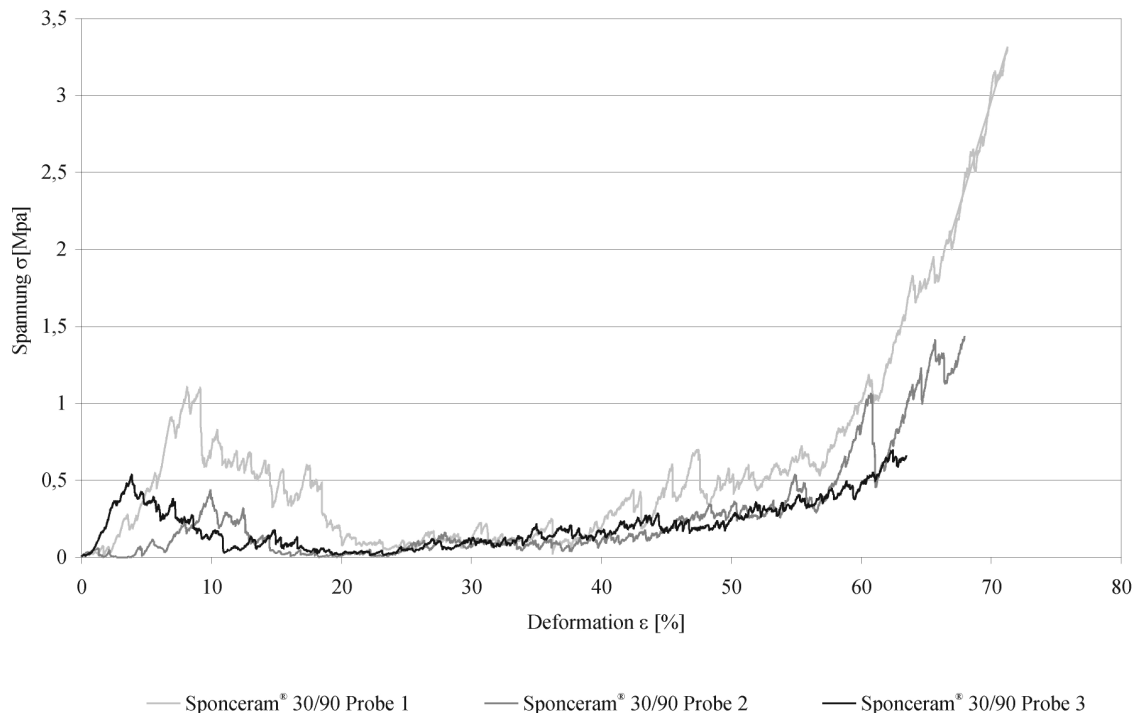


Abbildung 4-14: Typischer Kurvenverlauf der monoaxialen Kompression von Sponceram[®]-Zellträgern

Abbildung 4-14 zeigt typische Spannungs-Deformationskurven für die monoaxiale Kompression von Sponceram[®] 30/90 Minidisks. Die Streuung der Kurvenverläufe weist erhebliche Inhomogenitäten des Materials hin. In allen Fällen ist jedoch deutlich, dass die Spannung ein Maximum durchläuft, auf einen Wert nahe Null abfällt, um anschließend wieder anzusteigen. Das erste Spannungsmaximum repräsentiert die maximale Belastbarkeit der porösen Struktur. Vor Erreichen dieses Maximums sind in der Feinstruktur der Kurve weitere kleine Spannungsmaxima erkennbar. Hier werden offenbar bereits Poren mit geringerer Stabilität zerstört. Bei Überschreiten des Spannungsmaximums kollabiert das poröse Netzwerk. Der anschließende Verlauf der Kurve zeigt die weitere Verdichtung des bereits zerstörten Materials mit geringer Krafteinwirkung. Mit zunehmender Packungsdichte nimmt der Widerstand gegen die Verformung kontinuierlich zu.

Den Spannungs-Deformationskurven wurden die Werte für die maximale Deformation sowie die maximale Spannung (Belastbarkeit) entnommen. Die erhaltenen Werte wurden auf signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen untersucht (Details zur statistischen Überprüfung s. Anhang 6.1). Wie in Abbildung 4-15 gezeigt, ist die maximale Deformierbarkeit des Kompositmaterials Sponceram[®]/ox.p(MAG)-PLL signifikant größer als

die der Materialien Sponceram[®] 30/90 HA, Sponceram[®] 30/145 und Sponceram[®] 30/90 Ti. Zwischen den Deformierbarkeiten des Kompositmaterials und Sponceram[®] 30/90 sind keine signifikanten Unterschiede feststellbar. Auch für die Werte von Sponceram[®] 30/90, Sponceram[®] 30/145, Sponceram[®] 30/90 HA und Sponceram[®] 30/90 Ti konnten untereinander keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden.

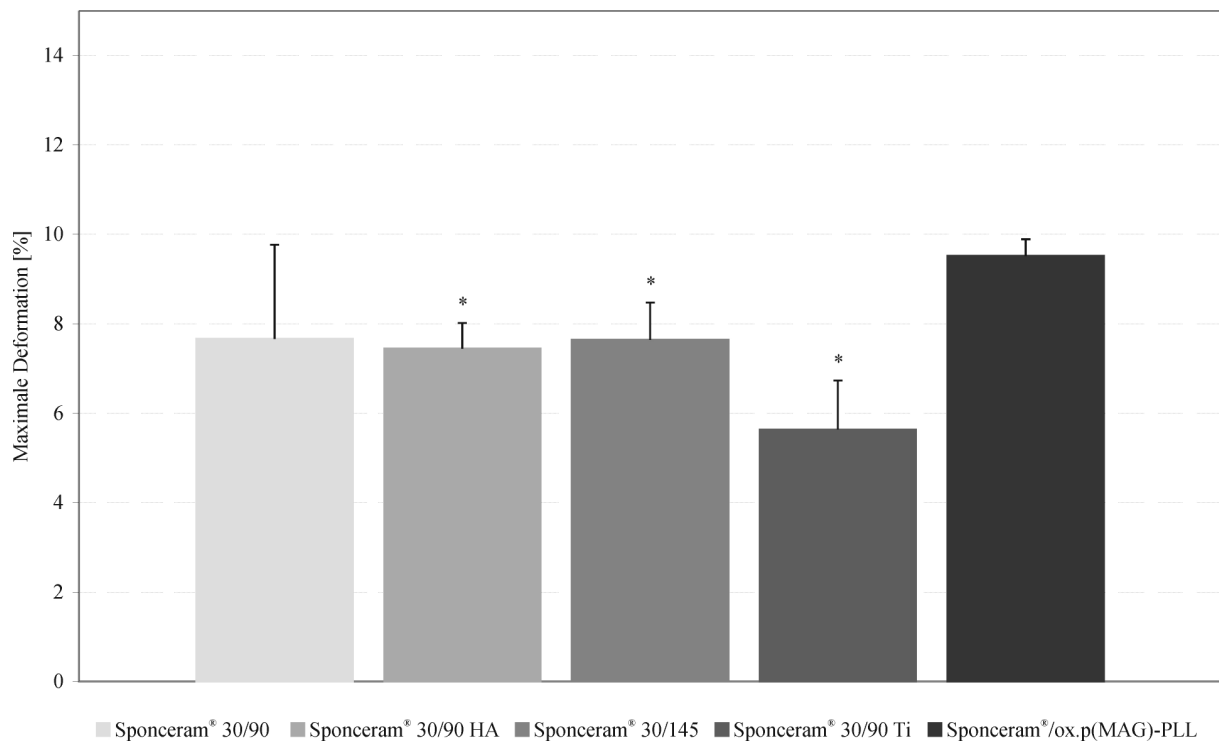


Abbildung 4-15: Maximale Deformation von Sponceram[®] basierten Materialien. Die Werte sind angegeben als der Mittelwert aus fünf Experimenten \pm Standardfehler. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber Sponceram[®]/ox.p(MAG)-PLL sind mit * für $0,001 < p < 0,05$ und ** für $p \leq 0,001$ gekennzeichnet

Die maximale Belastbarkeit und damit die Stabilität des Porengitters von Sponceram[®]/ox.p(MAG)-PLL ist signifikant kleiner als die der Materialien Sponceram[®] 30/90 HA, Sponceram[®] 30/90 Ti und Sponceram[®] 30/145. Zwischen dem Komposit-Material und unmodifizierten Sponceram[®] 30/90 sowie zwischen Sponceram[®] 30/90 HA, Sponceram[®] 30/90 Ti und Sponceram[®]/30/90 sind keine signifikanten Unterschiede der maximalen Belastbarkeiten festzustellen (Abbildung 4-16).

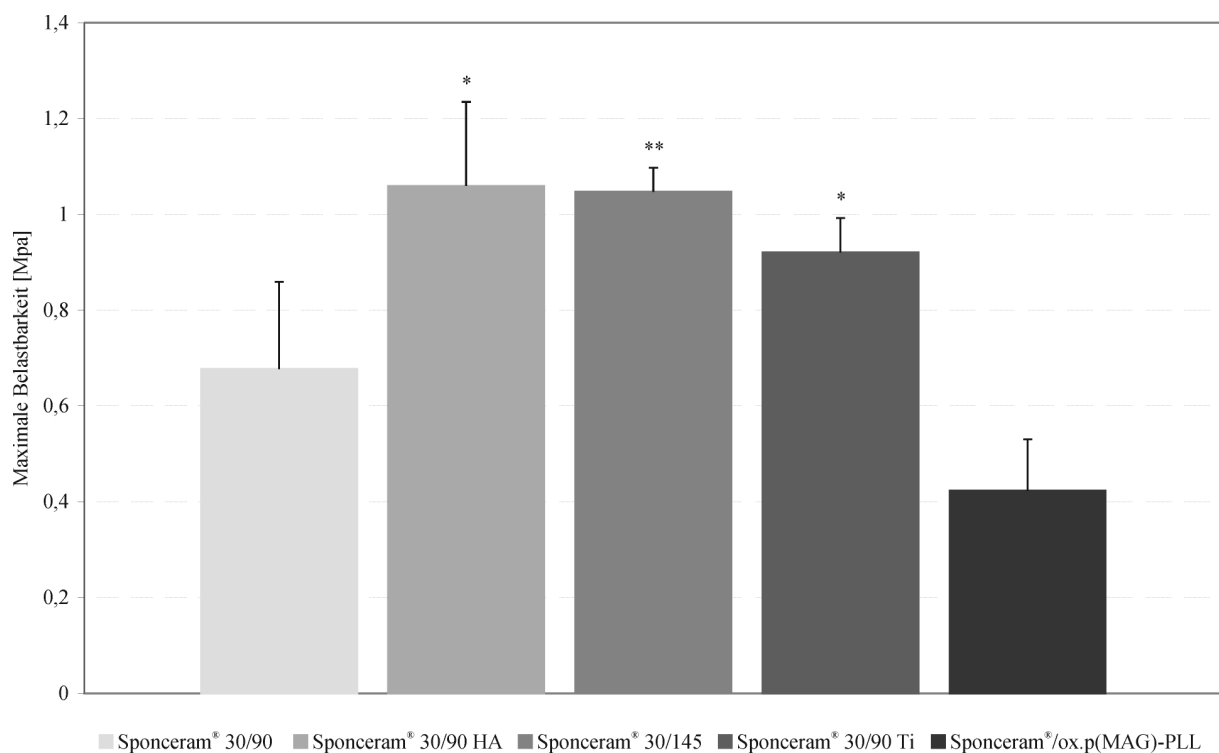


Abbildung 4-16: Maximale Belastbarkeit von Sponceram[®] basierten Materialien. Die Werte sind gegeben als der Mittelwert aus fünf Experimenten \pm Standardfehler. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber Sponceram[®]/ox.p(MAG)-PLL sind mit * für $0,001 < p < 0,05$ und ** für $p \leq 0,001$ gekennzeichnet

In Abbildung 4-17 ist der Kurvenverlauf der Energie gezeigt, die bis zum Bruch der Porenstruktur aufgebracht werden muss. Die Bruchenergie wurde durch Berechnung des Integrals der Spannungs-Deformationskurve bestimmt. Die unterschiedlichen Kurvenverläufe für drei Proben des Materials Sponceram[®] 30/90 zeigen deutlich dessen Inhomogenität.

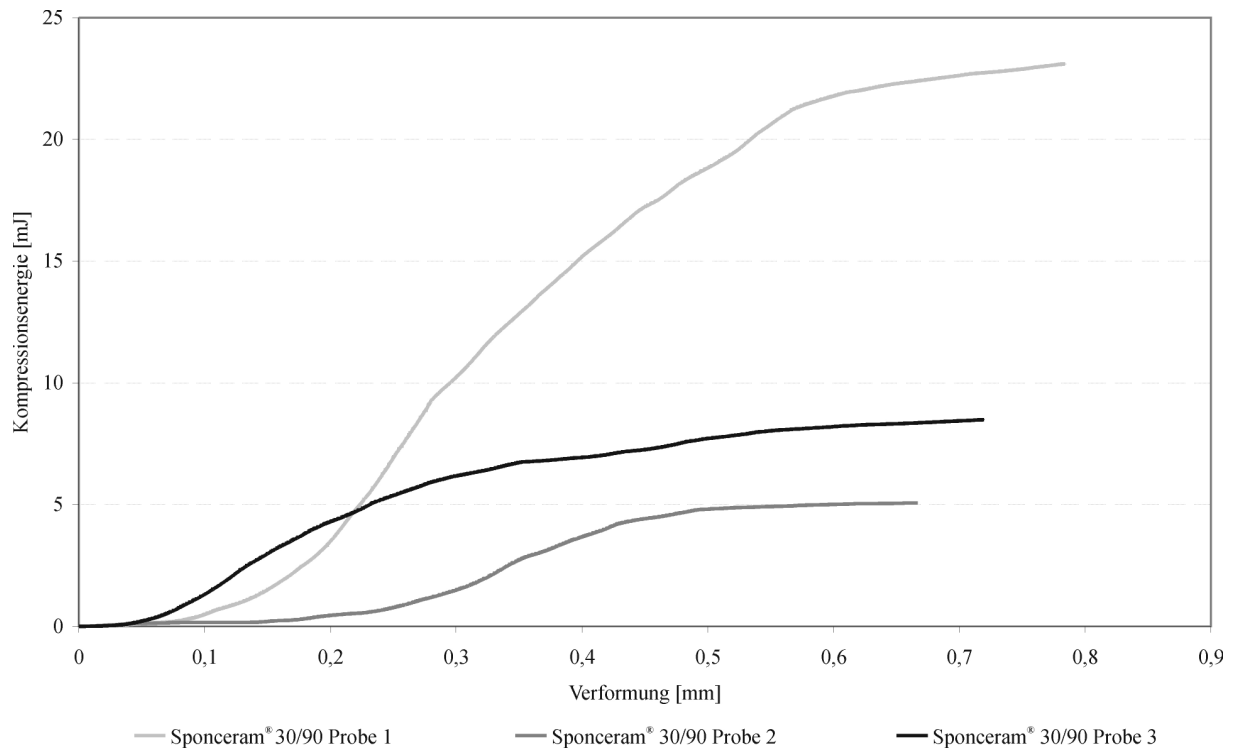


Abbildung 4-17: Berechnete Bruchenergie dreier Proben Sponceram® 30/90

In Abbildung 4-18 sind die Bruchenergien aller untersuchten Materialien im Vergleich dargestellt. Die Bruchenergie von Sponceram® 30/90 ist signifikant geringer als die von Sponceram® 30/145, Sponceram® 30/90 HA und Sponceram® 30/90 Ti. Auch Sponceram®/ox.p(MAG)-PLL besitzt eine signifikant kleinere Bruchenergie als die Materialien Sponceram® 30/90 HA, Sponceram® 30/90 Ti und Sponceram® 30/145. Zwischen den Bruchenergien der Materialien Sponceram®/ox.p(MAG)-PLL und Sponceram® 30/90 ist kein signifikanter Unterschied nachweisbar.

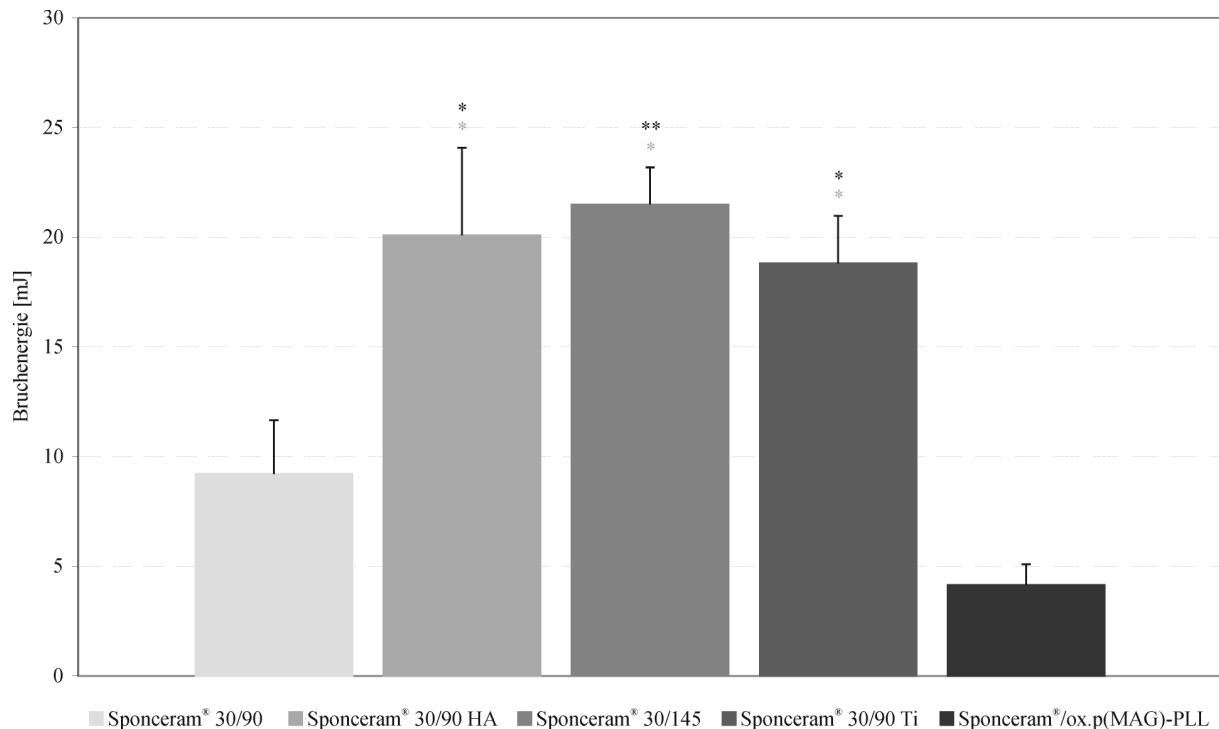


Abbildung 4-18: Bruchenergie von Sponceram[®] basierten Materialien. Die Werte sind angegeben als der Mittelwert aus fünf Experimenten \pm Standardfehler. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber Sponceram[®]/ox.p(MAG)-PLL sind mit * für $0,001 < p < 0,05$ und ** für $p \leq 0,001$ gekennzeichnet. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber Sponceram[®] 30/90 sind mit * für $0,001 < p < 0,05$ und ** für $p \leq 0,001$ gekennzeichnet

Fazit: Die großen Streuungen der aus den Kompressionsversuchen erhaltenen Werte für Sponceram[®] 30/90 zeigen deutlich die Inhomogenität des Materials. Die anderen kommerziell erhältlichen Materialien Sponceram[®] 30/145, Sponceram[®] 30/90 HA und Sponceram[®] 30/90 Ti zeigen geringere Streuungen und untereinander vergleichbare mechanische Eigenschaften. Für alle drei Materialien sind gegenüber Sponceram[®] 30/90 aufgrund dessen Inhomogenität keine signifikanten Unterschiede in der maximalen Belastbarkeit und Deformation nachweisbar.

Ebenso sind keine signifikanten Unterschiede der mechanischen Eigenschaften von Sponceram[®] 30/90 und Sponceram[®]/ox.p(MAG) nachweisbar. Eine tendenziell geringere Stabilität von Sponceram[®]/ox.p(MAG) scheint jedoch vorzuliegen. Ein direkter Einfluss des Polymers auf die Stabilität des Keramikmaterials ist unwahrscheinlich. Vermutlich ist die

Destabilisierung auf die mechanische Belastung während des Herstellungsprozesses des Kompositmaterials zurückzuführen. Die in 6-Lochplatten gelagerten Keramiken werden bei der Adsorption des Konjugats bzw. Polymers geschüttelt, um dessen homogene Verteilung zu gewährleisten (vgl. Abschnitt 4.1.2.1). Dabei stoßen die Keramiken sowohl gegeneinander als auch an die Wände der Behältnisse in denen sie sich befinden. Es ist vorstellbar, dass dabei mikrostrukturelle Beschädigungen erfolgen, die visuell nicht erkennbar sind.

4.1.4. ZELLKULTURUNTERSUCHUNGEN

Die Adhäsion von Zellen auf Oberflächen beruht im Wesentlichen auf zwei unterschiedlichen Vorgängen. Zum einen können Zellen mit spezifischen Rezeptoren mit auf der Oberfläche befindlichen Liganden interagieren, zum anderen treten Interaktionen auf, die auf elektrostatischen Wechselwirkungen beruhen¹¹⁹. Bei der Kultivierung adhärent wachsender Zellen in serumhaltigen Kulturmedien findet eine Adhäsion der Serumproteine an der entsprechenden Oberfläche statt, die ihrerseits als Liganden für die Anheftung der Zellen fungieren^{73, 120}. Unspezifische elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Substratoberfläche und Zellen treten ebenfalls in Erscheinung, da Zellen bei einem physiologischen pH-Wert prinzipiell negative Ladungen an ihrer Oberfläche besitzen¹²¹. Diese Ladungen sind über die gesamte Zelle verteilt und können sich mit dem physiologischen Zustand der Zelle verändern. Somit können Zellen sowohl auf positiv als auch auf negativ geladenen Oberflächen adhären. Eine hohe Ladungsdichte scheint demnach für die Adhäsion entscheidender zu sein als die absolute Ladung des Materials^{62, 122}. Die Ladung der Oberfläche begünstigt dabei beide genannten Faktoren: die Adhäsion der Zellen selbst sowie die Anheftung von Proteinen, die ihrerseits als Adhäsionsfaktoren wirken^{85, 123}. Die zu besiedelnden Biomaterialoberflächen können durch Verwendung von künstlichen als auch von natürlichen Substanzen modifiziert werden. So finden unter anderem Gelatine^{124, 125}, Kollagen¹²⁴⁻¹²⁶ oder Poly-L-Lysin^{125, 127} als natürliche Komponenten Anwendung^{62, 85}.

Die Adhäsionsverbesserung von Zellen auf Biomaterialien kann durch Einsatz von Liganden erreicht werden, die Zellen spezifisch oder unspezifisch binden. Eine auf zelluläre Interaktionen basierende, spezifische Anheftung findet dann statt, wenn Peptide als Liganden

verwendet werden, die spezielle Aminosäuresequenzen aufweisen, an die die Oberflächen-Rezeptoren (Integrine) der Zellen binden können⁸⁵. Eine der am häufigsten verwendeten Aminosäuresequenzen für diesen Einsatz ist die RGD-Sequenz (Arginin-Glycin-Asparaginsäure), die in Fibronectin und Laminin vorkommt⁷³ (vgl. auch Abschnitt 3.2.3). Durch Variation von Kettenlänge und Konformation der RGD-haltigen Peptide reagieren diese spezifisch mit bestimmten Integrinen¹²⁸.

Eine unspezifische Förderung der Adhäsion von Zellen auf Biomaterialoberflächen kann durch Veränderung der Ladungseigenschaften der Oberfläche erreicht werden. Durch Verwendung geladener Liganden treten elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Substrat und Zelle auf, die die Anheftung der Zellen verbessern können^{125, 127}. In dieser Arbeit wurde Poly-L-Lysin (PLL), eine positiv geladene, polymere Aminosäure, als adhäsionsfördernder Ligand verwendet. Solvig Diederichs wies im Rahmen ihrer Dissertation nach, dass ein spezifisches RGD-Peptid als Ligand in der hier vorgesehenen Applikation im Gegensatz zu Poly-L-Lysin keine verbesserte Adhäsion von Zellen zeigte¹¹⁴. Auch ökonomische Gründe sprechen für die Favorisierung von Poly-L-Lysin gegenüber einem RGD-Peptid.

4.1.4.1. STATISCHE ZELLKULTIVIERUNG

Die Poly-L-Lysin enthaltenden Kompositmaterialien Sponceram[®]/ox.p(MAG)-PLL und Sponceram[®]/p(MVA)-PLL wurden unter statischen Bedingungen auf ihre adhäsionsfördernden Eigenschaften untersucht. Als Modellzelllinie wurden die Knochenvorläuferzellen MC3T3-E1 verwendet. Die Kompositmaterialien sowie unmodifiziertes Sponceram[®] wurden mit Zellen besiedelt und über einen Zeitraum von 15 Tagen unter Verwendung von serumhaltigem Kulturmedium in den Vertiefungen einer 24-Lochplatte kultiviert (s. Anhang 6.3.6). Während der Kultivierung wurde die Glucosekonzentration des Mediums mit Hilfe eines biochemischen Analysators gemessen. Zusätzlich zu den besiedelten Kompositen wurden unbesiedelte Proben unter den gleichen Bedingungen in Zellkulturmedium inkubiert, dessen Glucosegehalt ebenso bestimmt und als Basiswert verwendet wurde. Der Glucoseverbrauch der Proben wurde auf diesen Wert bezogen, um etwaige Verdunstungen des Mediums zu berücksichtigen. Der normierte Glucoseverbrauch wurde als Maß für die Zellzahl bzw. -viabilität herangezogen.

In Abbildung 4-19 ist der Medianwert des Glucoseverbrauchs für die kultivierten Zellen dargestellt. Die Darstellung des Medianwertes wurde gewählt, da dieser gegenüber sog. Ausreißerwerten robuster ist als der Mittelwert. In den ersten sieben Tagen der Kultivierung befinden sich die Zellen in der lag-Phase. Die exponentielle Wachstumsphase schließt sich daran an, am 13. Tag der Kultivierung wird die Plateau-Phase erreicht. Die anschließende Abnahme des Glucoseverbrauchs ist darauf zurückzuführen, dass die Glucosemenge im Medium für die Versorgung der Zellen nicht mehr ausreichend war. Der Glucoseverbrauch der Zellen auf den Kompositmaterialien ist gegenüber denen auf unmodifiziertem Sponceram[®] tendenziell leicht erhöht, wobei die Werte des Komposits Sponceram[®]/ox.p(MAG)-PLL die höchsten sind. Dieser Trend wurde während der ersten 10 Tage der Kultivierung beobachtet, anschließend findet eine Angleichung der Zellzahlen aufgrund der starken Proliferation der verwendeten MC3T3-E1-Zellen statt. Um diesen Befund zusätzlich zu untersuchen, wurden die Keramikmaterialien nach beendeter Kultivierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI gefärbt (detaillierte Durchführung s. Anhang 6.3.8). Die Fluoreszenzintensität der Proben wurde als Maß für die Zellzahl mit Hilfe eines Fluoreszenzmessgeräts bestimmt. Eine unbesiedelte Probe diente als Referenzwert. In Abbildung 4-20 sind die Mittelwerte der DAPI-Färbung angegeben. Eine signifikante Unterscheidung der Zellzahlen auf den unterschiedlichen Materialien ist statistisch nicht möglich (Details zur statistischen Überprüfung s. Anhang 6.1) . Dieses Ergebnis war jedoch zu erwarten, da nach 15 Tagen Kultivierung die stark proliferierenden MC3T3-E1-Zellen die anfänglichen Unterschiede „überwachsen“ haben. Dieses Ergebnis wurde bereits bei der Messung des Glucoseverbrauchs der Zellen an Tag 13 und 15 (Abbildung 4-19) erhalten.

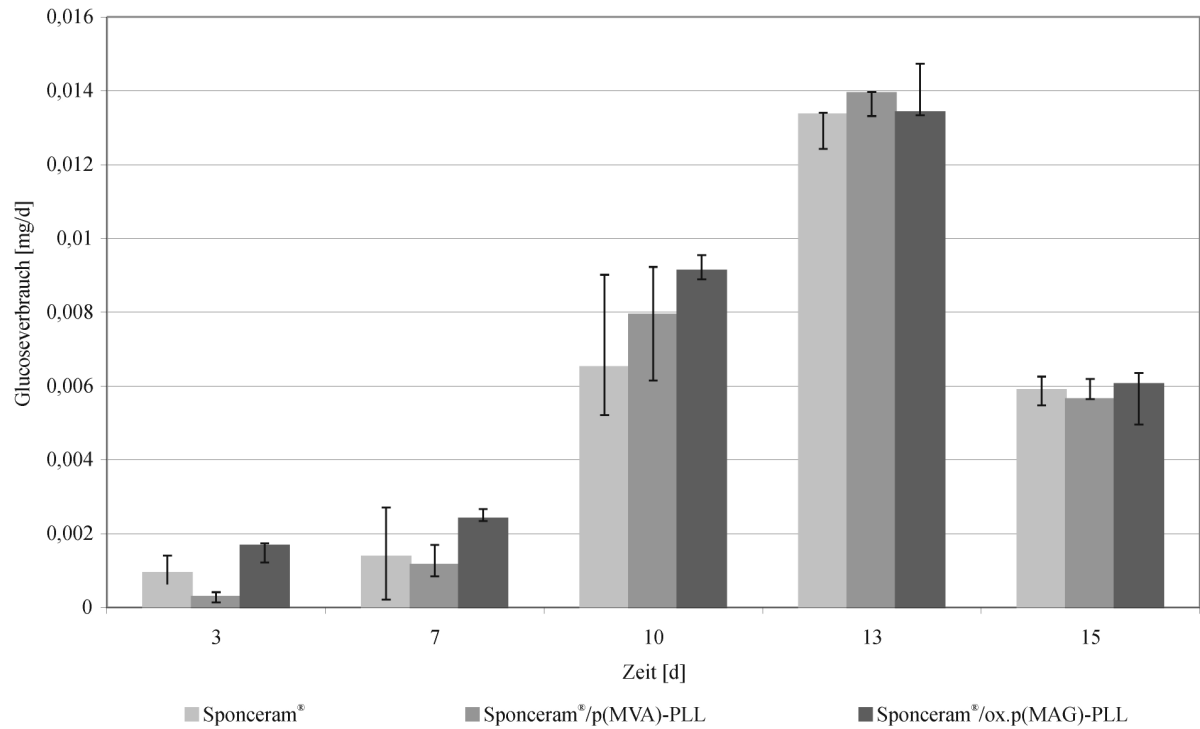


Abbildung 4-19: Glucoseverbrauch von MC3T3-E1-Zellen, kultiviert auf Sponceram[®], Sponceram[®]/ox.p(MAG)-PLL und Sponceram[®]/p(MVA)-PLL über einen Zeitraum von 15 Tagen. Die Werte sind angegeben als der Medianwert. Die Fehlerbalken zeigen die 25 %- bzw. 75 %-Perzentile an.

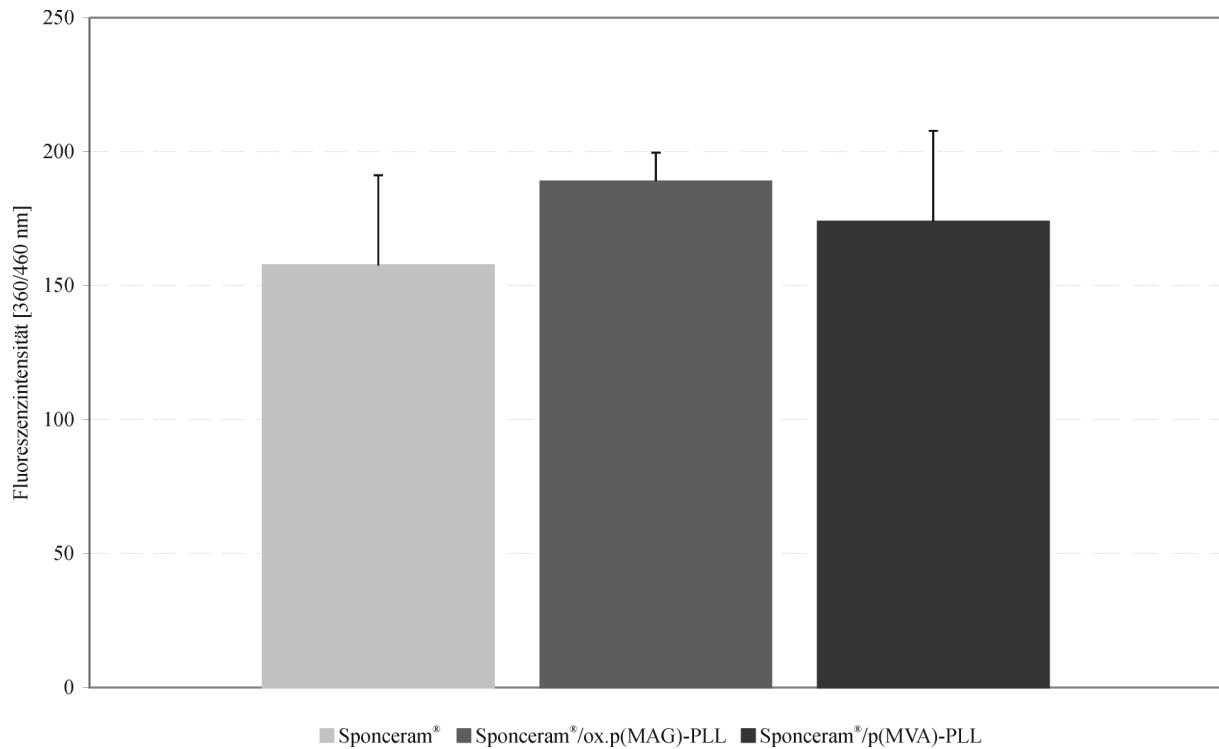


Abbildung 4-20: Fluoreszenzintensität DAPI-gefärbter MC3T3-E1-Zellen, kultiviert auf Sponceram[®], Sponceram[®]/ox.p(MAG)-PLL und Sponceram[®]/p(MVA)-PLL über einen Zeitraum von 15 Tagen. Die Werte sind angegeben als der Mittelwert aus fünf Werten \pm Standardfehler. Statistische Unterschiede zwischen den Werten sind nicht nachweisbar.

Fazit: Die PLL enthaltenden Kompositmaterialien Sponceram[®]/ox.p(MAG)-PLL und Sponceram[®]/p(MVA)-PLL zeigten eine Verbesserung der Adhäsion von Zellen gegenüber unbehandeltem Sponceram[®]. Bei der verwendeten Knochenvorläufer-Zelllinie MC3T3-E1 handelt es sich jedoch um stark proliferierende Zellen, so dass eine erhöhte Zellzahl auf den Kompositmaterialien bereits nach 10 Tagen nicht mehr nachweisbar ist. Das Potential der entwickelten Kompositmaterialien wird jedoch deutlich. Im Bereich des Tissue Engineerings wird bevorzugt mit autologen Zellen gearbeitet. Diese primären Zellen stehen jedoch nur in geringer Zahl zur Verfügung, so dass eine optimale Adhäsion der Zellen auf den vorgesehenen Matrixkonstrukten von großer Bedeutung ist.

4.1.4.2. BIOREAKTOR-KULTIVIERUNG

Um das differenzierungs-induzierende Potential des BMP-2 enthaltenden Kompositmaterials Sponceram[®]/ox.p(MAG)-BMP-2 beurteilen zu können, wurde dieses mit adulten mesenchymalen Stromazellen aus humanem Fettgewebe besiedelt und im Z[®]RP-Bioreaktorsystem kultiviert. Unter statischen Kultivierungsbedingungen treten vor allem bei längeren Kultivierungsperioden diffusionsbedingte Nährstoffdefizite auf, die das Zellwachstum einschränken. Besonders im Falle von starken Matrixdepositionen, die bei der osteogenen Differenzierung erwartet werden, ist die Versorgung unter statischen Bedingungen stark limitiert. In dem hier verwendeten Bioreaktor wird dem System kontinuierlich frisches Zellkulturmedium zugeführt. Das im Reaktor befindliche Medium wird zusätzlich über einen Kreislauf zirkuliert. Durch diesen Perfusionsmodus ist die Versorgung der Zellen mit Nährstoffen verbessert und eine mechanisch aktive Umgebung geschaffen, die den *in vivo* Bedingungen ähnelt (vgl. Abschnitt 3.4). Der durch die Bewegung des Drehbetts und die Perfusion des Mediums resultierende Flüssigkeitsscherstress ist weiterhin interessant, da dieser die osteogene Differenzierung adhärierter mesenchymaler Stromazellen induzieren kann⁹⁷.



Abbildung 4-21: Das Z[®]RP Reaktorsystem besteht aus einem Drehbett-Bioreaktor, der sich in einer GMP-konformen, beheizbaren Sterilwerkbank (Breeder) befindet. (entnommen aus: Betriebsanweisung Z[®]RP Technologie)¹²⁹

Das verwendete Z[®]RP Reaktorsystem besteht aus einem Drehbett-Bioreaktor, der sich in einer GMP-konformen, temperierbaren Sterilwerkbank (*Breeder*) befindet (Abbildung 4-21). Alle Prozessparameter wie pH-Wert, Temperatur, Rotationsgeschwindigkeit des Drehbetts und Mediumzulauf werden über eine Steuereinheit kontrolliert und geregelt. Der *Breeder*, in dem der Bioreaktor platziert ist, gewährleistet sterile Manipulationen (z.B. Probenahmen) am Reaktorsystem. Die Innenraumtemperatur von *Breeder* und Reaktor wird über Sensoren gemessen und über die Steuereinheit reguliert. Der pH- sowie der pO₂-Wert werden ebenso sensorisch gemessen und über die Zuführung von CO₂ und O₂ geregelt. Der Drehbett-Reaktor wurde in dieser Arbeit in zwei unterschiedlichen Ausführungen verwendet: Als Z[®]RP500-Reaktor mit einem Innenraumvolumen von 500 mL und als Z[®]RPD (Z[®]RP *disposable*) mit einem geringeren Volumen von 100 mL (Abbildung 4-22). Der Z[®]RPD-Reaktor ist ein aus Kunststoff bestehender, für den Einmalgebrauch entwickelter Reaktor. Diese Variante des Reaktors ist bei der Kultivierung einer geringen Anzahl von Sponceram[®]-Scheiben ökonomisch zu bevorzugen. Zudem zeichnen sich *disposable* Reaktoren prinzipiell dadurch aus, dass Sterilisation und Reinigung nicht notwendig sind und damit die Gefahr von Kreuzkontaminationen minimiert wird¹³⁰ (vgl. Abschnitt 3.4). Detaillierte Spezifikationen beider Reaktorsysteme sind in Tabelle 6-3 aufgeführt.

In den Z[®]RP-Reaktorsystemen werden spezielle Sponceram[®]-Discs mit einem Durchmesser von 65 mm und einer Dicke von 3 mm als Zellträger verwendet. Die Scheiben bilden auf eine Achse gesteckt das Drehbett des Reaktors, welches mit Hilfe eines Magnetantriebs berührungslos in Bewegung versetzt wird. Der Reaktorinnenraum ist bis zur Hälfte mit Kulturmedium gefüllt, so dass die Scheiben zur Hälfte in das Medium eintauchen. Durch Rotation um die Längsachse werden die auf den Keramikträgern adhären Zellen alternierend durch das Medium und den Gasraum bewegt. Das im Reaktor befindliche Medium wird kontinuierlich umgewälzt. Der Reaktor kann im Perfusionsbetrieb betrieben werden, so dass eine kontinuierliche Versorgung der Zellen mit frischem Nährmedium gewährleistet ist. Dabei wird überschüssiges Medium über einen in der Mitte des Reaktors angebrachten Überlauf in eine Abfallflasche abgeführt. Der Kopfraum des Reaktors wird permanent mit Luft begast, bei Bedarf kann die Kopfraumatmosphäre mit Sauerstoff oder Stickstoff angereichert werden. Der pH-Wert des Mediums wird durch die Begasung mit CO₂ eingestellt. Im Z[®]RP500 wird das Gas hierzu durch ein mit einem Keramikauflauf versehenes Begasungsrohr (*Sparger*) direkt in das Reaktormedium eingeleitet, im Z[®]RPD wird CO₂ der Kopfraumatmosphäre zugemischt.

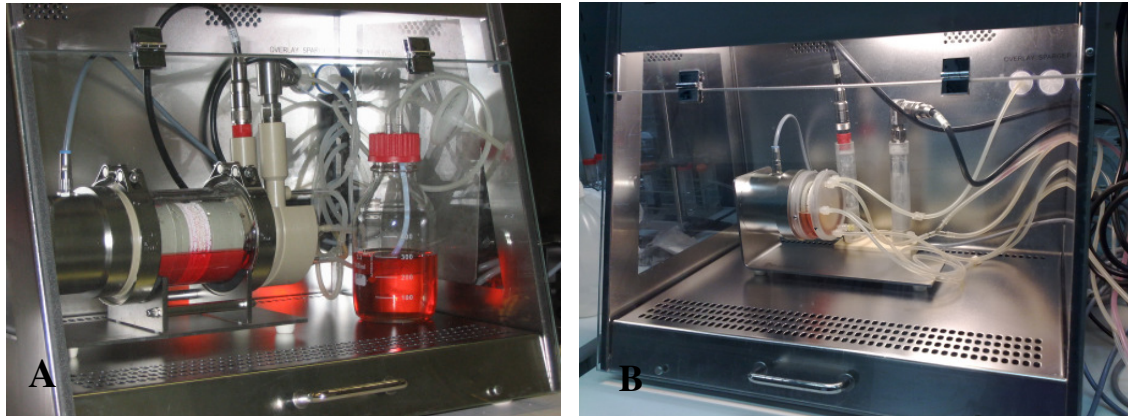


Abbildung 4-22: Zwei Ausführungen des Z[®]RP-Systems.
A: Z[®]RP500-Reaktor; B: Z[®]RPD- Reaktor

Testung von ox.p(MAG)-BMP-2 im Z[®]RP500

Für die Testung des Kompositmaterials Sponceram[®]/ox.p(MAG)-BMP-2 unter dynamischen Kultivierungsbedingungen wurden humane adulte mesenchymale Stromazellen (huF62) der achten Passage verwendet, die aus Fettgewebe isoliert worden sind. Eine detaillierte Beschreibung der Zellisolation befindet sich im Anhang (Abschnitt 6.2).

Das Kompositmaterial wurde wie in Abschnitt 4.1.1.3 beschrieben hergestellt, jedoch wurde gegenüber dem Modellprotein RNase eine geringere Konzentration an BMP-2 eingesetzt. Basierend auf vorangegangenen Untersuchungen, in denen sich eine BMP-2 Konzentration von 50 ng/mL für die osteogene Differenzierung der hier verwendeten Stromazellen als ausreichend erwiesen hat (Daten nicht gezeigt), wurde aus wirtschaftlichen Aspekten diese Ausgangskonzentration verwendet. Als Referenzmaterial wurde eine Sponceram[®]-Scheibe verwendet, die in BMP-2-Lösung (50 ng/mL in PBS) inkubiert wurde. Jede Scheibe wurde nach Aussaat der Zellen ($2 \cdot 10^7$ Zellen / Scheibe) in einen separaten Z[®]RP500-Reaktor eingesetzt und über einen Zeitraum von 48 Tagen kultiviert (detaillierte Beschreibung s. Anhang 6.3.7). Die Kultivierung wurde bei einer Reaktorinnenraumtemperatur von 37 °C und einem pH-Wert von 7,3 durchgeführt. Mit Hilfe der Steuereinheit wurden diese Parameter

kontinuierlich überwacht und geregelt. Die Temperatursteuerung wurde durch das temporäre Aufheizen des *Breeder*-Innenraums realisiert. Während der gesamten Kultivierung wurde der mediumleere Kopfraum des Bioreaktors mit Luft begast. Der pO_2 -Wert wurde im Reaktormedium gemessen und sollte einen Minimalwert von 80 % nicht unterschreiten. Bei Bedarf hätte mit der Kopfraumbegasung Sauerstoff zugeführt werden können. Da der untere Sauerstoffgrenzwert jedoch nicht erreicht wurde, war dies nicht notwendig. Auch dieser Vorgang wurde automatisch durch die Steuereinheit überwacht und reguliert. Der Z[®]RP500-Reaktor wurde kontinuierlich betrieben, die Mediumzufuhr wurde anhand des täglich im Reaktorinnenraum gemessenen Laktatgehalts reguliert. Die sterile Probenahme wurde durch ein im Umwälzungskreislauf befindliches Septum ermöglicht, Glucose- sowie Laktatkonzentration wurden im Reaktor und im abgeführten Medium bestimmt. Um zytotoxische Wirkungen des Laktats auszuschließen, wurde eine Konzentration von 1 g/L im Reaktor als maximal zulässiger Wert definiert. Bei Überschreiten dieses Wertes wurde die Nährstoffzufuhr erhöht. Der Glucosegehalt war aufgrund der Verwendung von DMEM-Medium mit einer Ausgangskonzentration von 4,5 g/L Glucose nicht limitierend. Die Sponceram[®]-Scheiben wurden mit einer Geschwindigkeit von 1 rpm rotiert, die Umwälzrate des Mediums wurde auf 40 mL/min eingestellt. Beide Reaktoren wurden zu Beginn der Kultivierung mit 240 mL Standardmedium befüllt. Am zweiten Tag der Kultivierung wurde der Perfusionsmodus des Systems gestartet. Alle folgenden Manipulationen (Regelung der Nährstoffzufuhr, Probenahmen) wurden an beiden Reaktoren parallel durchgeführt.

Nach 48 Tagen wurde die Kultivierung beendet und die Sponceram[®]-Scheiben aus beiden Z[®]RP-System entnommen. Mittels Toluidinblau- und DAPI-Färbungen wurden die adhärenierten Zellen sichtbar gemacht, mittels von Kossa- sowie Alizarinrotfärbungen die kalzifizierte Matrix nachgewiesen. Die osteogene Differenzierung wurde mit Hilfe der Methode der Polymerase-Kettenreaktion (*engl. polymerase chain reaction, PCR*) untersucht. Mit rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden Zellwachstum und Matrixdepositionen zusätzlich visualisiert (detaillierte Durchführungen s. Anhang 6.3.8 - 6.3.10).

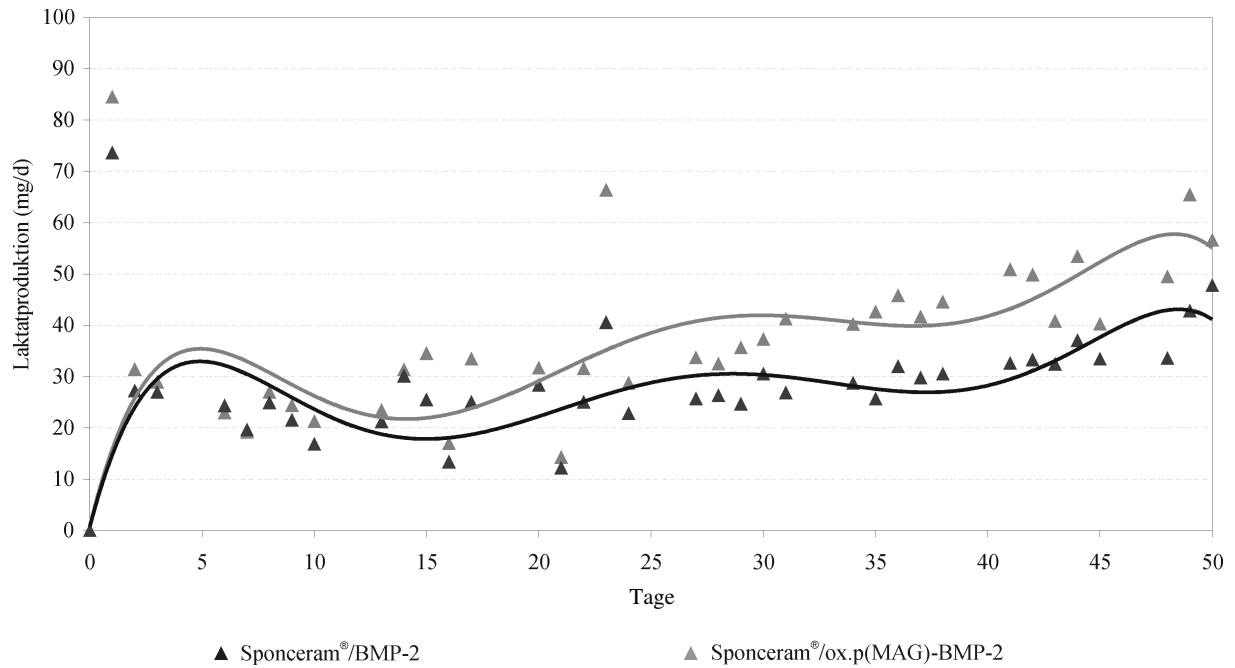


Abbildung 4-23: Tägliche Laktatproduktion von humanen mesenchymalen Stromazellen auf Materialien Sponceram®/ox.p(MAG)-BMP-2 und Sponceram®/BMP-2 kultiviert im Z[®]RP500-System über einen Zeitraum von 50 Tagen.

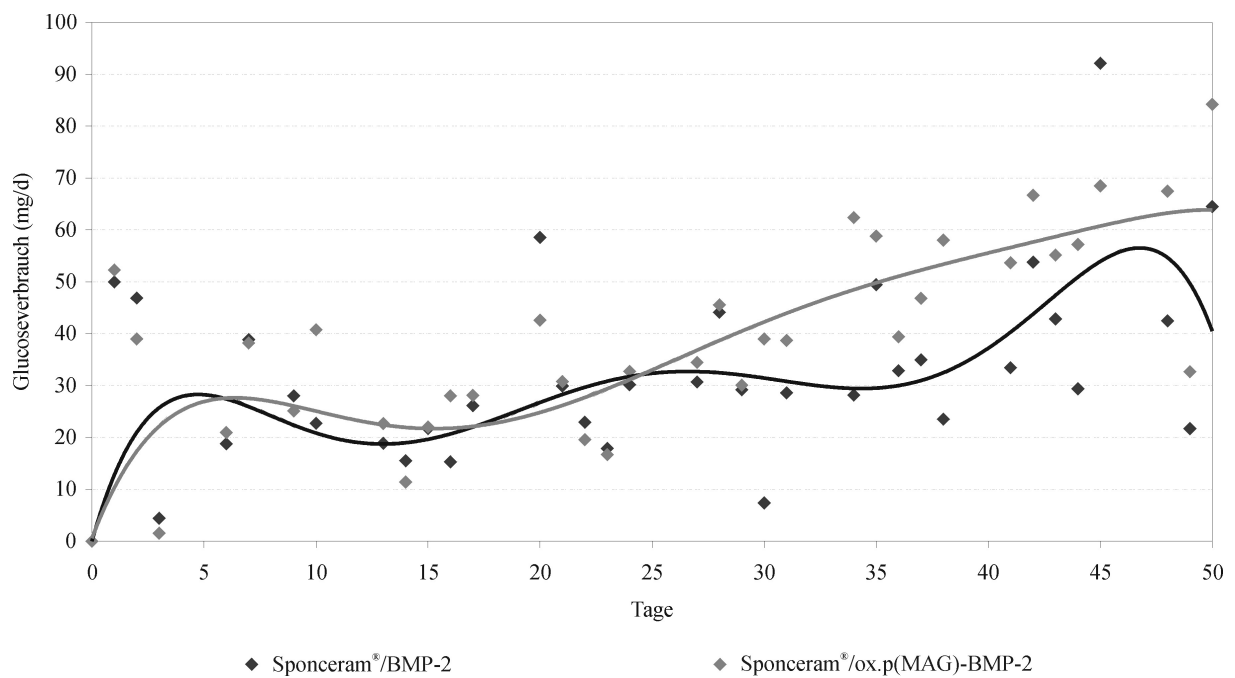


Abbildung 4-24: Täglicher Glucoseverbrauch von humanen mesenchymalen Stromazellen auf den Materialien Sponceram®/ox.p(MAG)-BMP-2 und Sponceram®/BMP-2 kultiviert im Z[®]RP500-System über einen Zeitraum von 50 Tagen.

In Abbildung 4-23 und Abbildung 4-24 sind die tägliche Laktatproduktion sowie der tägliche Glucoseverbrauch beider Kultivierungen im Vergleich gezeigt. Der Bedarf an Glucose wurde als Maß für die metabolische Aktivität und Proliferation der Zellen herangezogen. Der tägliche Verbrauch wurde unter Berücksichtigung der Zu- und Abfuhr von Kulturmedium berechnet. Der gesamte Glucoseverbrauch der auf Sponceram[®]/ox.p(MAG)-BMP-2 kultivierten Zellen betrug 1,408 g, die Zellen auf der Referenz Sponceram[®]/BMP-2 verbrauchten 1,154 g Glucose. Im Vergleich zu einer vorausgegangenen Kultivierung adulter mesenchymaler Stromazellen im Z[®]RP-System, die in Kooperation mit Solvig Diederichs im Rahmen ihrer Dissertation durchgeführt wurde¹¹⁴, ist der Glucoseverbrauch für diesen Zeitraum als gering einzustufen. Im Rahmen der vorigen Kultivierung wurden adulte mesenchymale Stromazellen aus dem Fettgewebe (huF68) auf zwei unterschiedlichen Sponceram[®]-Scheiben (Sponceram[®] 30/90; Sponceram[®]/HA, s. Tabelle 6-2) über einen Zeitraum von 47 Tagen in einem Z[®]RP500-System kultiviert. Jede Scheibe wurde mit $10 - 15 \cdot 10^6$ Zellen besiedelt. Die osteogene Differenzierung wurde im Gegensatz zur aktuellen Kultivierung nicht durch Modifikation der Keramiken sondern durch Verwendung von Differenzierungsmedium (Standardmedium versetzt mit 10 nM Dexamethason, 10 mM β -Glycerolphosphat, 2,84 mM Vitamin C) induziert. Der Z[®]RP-Reaktor wurde im Perfusionsmodus betrieben, die Parameter für CO₂, pO₂ und Temperatur waren analog derer im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Kultivierung. Der Gesamtglucoseverbrauch betrug 17 g für beide Scheiben. Die Beschichtung mit Hydroxylapatit hatte dabei keinen proliferationsfördernden Einfluss auf die Zellen¹¹⁴.

Der geringe Glucoseverbrauch der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Kultivierungen ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die osteogene Differenzierung bereits mit der Aussaat der Zellen auf den modifizierten Keramiken induziert wird. Bei fortschreitender osteogener Differenzierung nimmt die Proliferationskapazität der kultivierten Zellen ab (vgl. Abschnitt 3.3). In Abbildung 4-25 und Abbildung 4-26 sind die mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI angefärbten, blau fluoreszierenden Zellkerne gezeigt. Die großen Zellmengen auf beiden Materialien lassen darauf schließen, dass die geringen Glucoseverbrauchsdaten nicht auf eine geringe Zellzahl, sondern auf die Differenzierung der Zellen zurückzuführen ist. Ein stationärer Glucoseverbrauch, der auf die vollständige Beendigung der Proliferation der Gesamtpopulation hinweisen würde, wird nicht beobachtet. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass es sich jeweils um heterogene Zellpopulationen handelt, in denen Zellen

unterschiedlicher Entwicklungsstadien (proliferierend/postproliferativ) nebeneinander vorliegen.

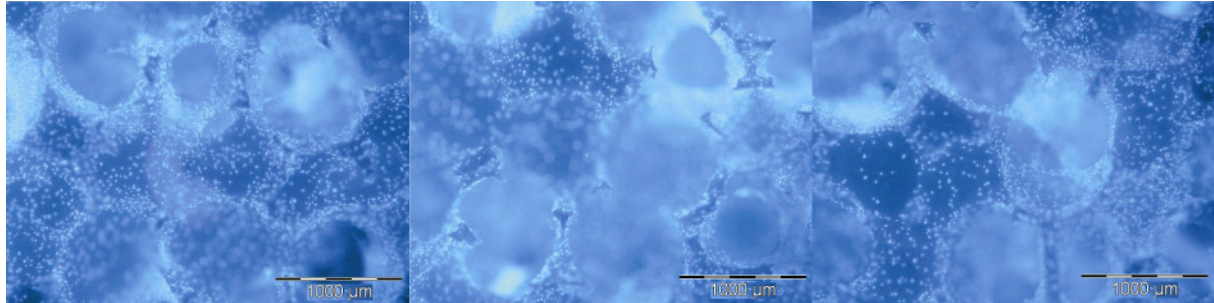


Abbildung 4-25: DAPI-Färbung der auf Sponceram[®]/ox.p(MAG)-BMP-2 dynamisch kultivierten Zellen

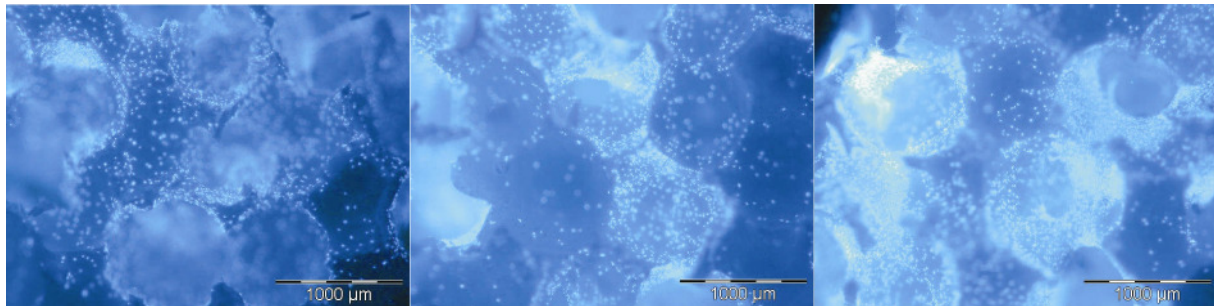


Abbildung 4-26: DAPI-Färbung der auf Sponceram[®]/BMP-2 dynamisch kultivierten Zellen

Visuell konnte kein Unterschied der Zellzahlen auf beiden Materialien festgestellt werden. Auf eine Quantifizierung der Zellzahlen beider Materialien mittels Fluoreszenzmessung wurde verzichtet, da die gefärbten Probenstücke unterschiedlicher Größe waren und aufgrund der dreidimensionalen Struktur der Keramik innen befindliche Zellen während der Messung nicht erfassbar sind. Zusätzlich zur DAPI-Färbung wurden die Zellen mit Toluidinblau angefärbt (Abbildung 4-27). Auch hier sind große Zellmengen auf beiden Proben zu sehen. Die Zellmenge auf Sponceram[®]/ox.p(MAG)-BMP-2 scheint tendenziell größer zu sein, da jedoch auch hier nur Teile beider Scheiben angefärbt worden sind, kann die Relevanz dieses Unterschieds nicht akkurat beurteilt werden.

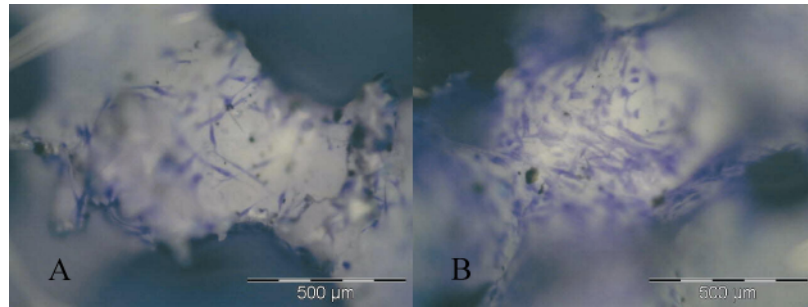


Abbildung 4-27: Toluidinblau-Färbung der auf Sponceram[®]/BMP-2 (A) und Sponceram[®]/ox.p(MAG)-BMP-2 (B) dynamisch kultivierten Zellen

Der Standard für den Nachweis osteogener Differenzierung *in vitro* ist zum einen der histologische Nachweis von Calcium in der extrazellulären Matrix mit Hilfe geeigneter Färbemethoden (Von Kossa, Alizarinrot). Zum anderen können spezifische osteogene Marker sowohl auf Gen- als auch auf Protein-Ebene nachgewiesen werden. Einer dieser Marker ist das Ektoenzym (extrazelluläre Enzym) alkalische Phosphatase, das an der extrazellulären Oberfläche von Zellmembranen gebunden ist¹³¹. Der histologische Nachweis alkalischer Phosphatase kann, wie der Nachweis von Calcium auch, kolorimetrisch erbracht werden (Durchführungen der Färbungen s. Anhang 6.3.8)

Die Calcifizierung der extrazellulären Matrix konnte auf beiden dynamisch kultivierten Keramiken mit Von-Kossa- und Alizarinrot-Färbung nachgewiesen werden. Auch die histologische Färbung von alkalischer Phosphatase war auf beiden Scheiben positiv (Abbildung 4-28). Die Färbung des Komposit-Materials Sponceram[®]/ox.p(MAG)-BMP-2 fiel dabei intensiver aus. Da aber bei allen Färbungen wiederum nur Teile der kultivierten Keramikscheiben untersucht wurden, ist eine reproduzierbare Aussage, die auf den Differenzierungsgrad der Zellpopulation schließen lässt, nicht möglich.

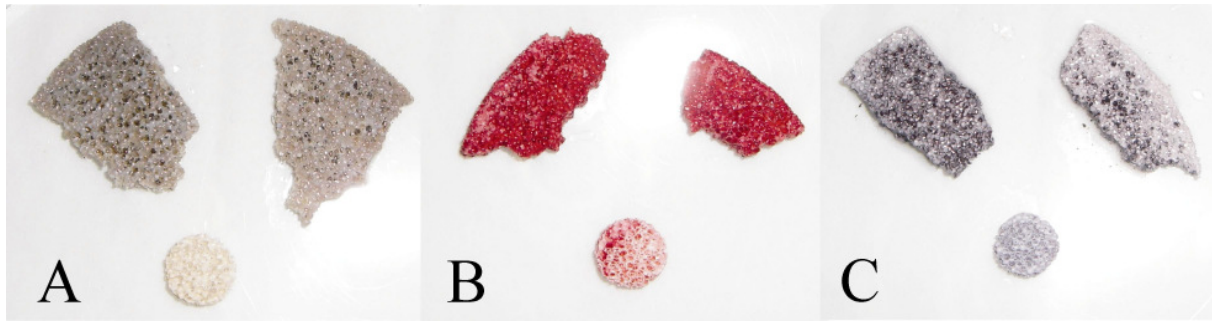


Abbildung 4-28: Histologische Färbungen der auf Sponceram[®]/ox.p(MAG)-BMP-2 und Sponceram[®]/BMP-2 dynamisch kultivierten Zellen. A: Von Kossa-Färbung; B: Alizarinrot-Färbung; C: AP-Färbung. Links: Sponceram[®]/ox.p(MAG)-BMP-2, rechts: Sponceram[®]/BMP-2, unten: unbesiedelte Referenz

Alkalische Phosphatase wurde zusätzlich auf Genexpressions-Ebene durch die Analyse der mRNA der kultivierten Zellen nachgewiesen. Des Weiteren wurde die Expression der osteogenen Marker Kollagen I, Osteopontin und Osteocalcin untersucht. Dazu wurde die mRNA der Zellen mit Hilfe der PCR vervielfältigt und mittels Gelelektrophorese untersucht (Durchführung s. Anhang 6.3.9). Durch Analyse des Expressionsprofils kann der Differenzierungsstatus der Zelle bzw. der Zellpopulation bestimmt werden (vgl. Abschnitt 3.3). Kollagen I und alkalische Phosphatase sind frühe Marker der osteogenen Differenzierung. Beide Gene werden bereits in noch proliferierenden osteoblastären Zellen (Osteoprogenitoren, Präosteoblasten) exprimiert. Kollagen I ist die Hauptkomponente des Osteoids, alkalische Phosphatase ist an der Vorbereitung der Grundsubstanz auf die Mineralisierung beteiligt^{4, 132}. Osteopontin wird bereits vor, Osteocalcin erst mit Beginn der Mineralisierung exprimiert (vgl. Abschnitt 3.3). Beide Proteine gehören zu den nicht-kollagenen Bestandteilen der extrazellulären Matrix und sind aufgrund ihrer Fähigkeit Calcium zu binden an deren Mineralisierung beteiligt¹³³⁻¹³⁵.

In den Zellaufschlüssen beider Proben konnte die Expression von Kollagen I, alkalischer Phosphatase und Osteopontin nachgewiesen werden. Im Fall der auf Sponceram[®]/BMP-2 kultivierten Zellen wurde zudem Osteocalcin mit geringer Intensität nachgewiesen (Abbildung 4-29). Der Nachweis dieser osteogenen Marker beweist die osteogene Differenzierung der mesenchymalen Stromazellen auf beiden Kompositmaterialien. Das Fehlen der Genexpression von Osteocalcin im Falle des Materials Sponceram[®]/ox.p(MAG)-BMP-2 kann unterschiedliche Ursachen haben. Osteocalcin ist ein osteogener Marker, der nur in reifen Osteoblasten exprimiert wird. Die Intensität variiert jedoch in Abhängigkeit der *in*

in vitro-Umgebung der Osteoblasten⁸⁰. Weiterhin beginnt die Expression erst mit eintretender Mineralisierung im zeitlichen Ablauf nach der Expression von Osteopontin. In stark mineralisierten Kulturen hingegen nehmen die Level von Osteocalcin und Osteopontin wieder ab¹³⁵, in terminal differenzierten Osteozyten ist Osteocalcin nicht mehr nachweisbar⁸⁰. Die Expression von Osteocalcin ist demnach abhängig von unterschiedlichen Parametern und kann nicht als einheitlich für alle reifen Osteoblasten angesehen werden⁸⁰.

Ein Vergleich beider Zellpopulationen und eine Beurteilung, welche Population in der Differenzierung weiter fortgeschritten ist, ist aufgrund der zu berücksichtigenden Heterogenitäten der Zellpopulationen nicht möglich. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass das Kompositmaterial Sponceram[®]/ox.p(MAG)-BMP-2 die Differenzierung der Zellen entlang der osteogenen Linie ebenso induziert, wie die in BMP-2-Lösung inkubierte Sponceram[®]-Keramik.

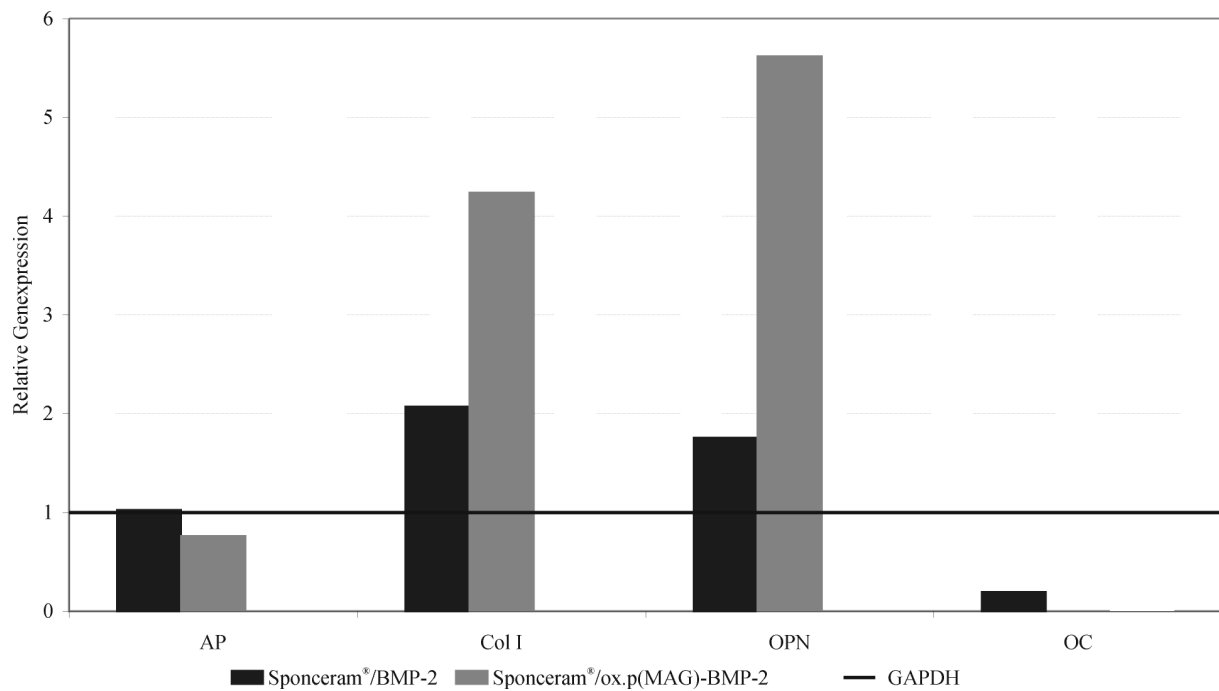


Abbildung 4-29: Ergebnisse der semiquantitativen PCR von mesenchymalen Stromazellen auf den Kompositmaterialien Sponceram[®]/ox.p(MAG)-BMP-2 und Sponceram[®]/BMP-2 nach der dynamischen Kultivierung im Z[®]RP500-System über einen Zeitraum von 50 Tagen. Die Werte sind angegeben als die Ergebnisse einer Einfachbestimmung. AP = alkalische Phosphatase, Col I = Kollagen I, OPN = Osteopontin, OC = Osteocalcin

Um die Zellpopulationen und die mit der Differenzierung entstandene extrazelluläre Matrix zu visualisieren, wurden von beiden Kompositmaterialien nach beendeter Kultivierung REM-Aufnahmen gemacht (detaillierte Durchführung s. Anhang 6.3.10). Auf beiden Keramiken sind sowohl einzelne Zellen, als auch gewebeartige Konstrukte zu erkennen. In Abbildung 4-30 sind Bilder der Probe Sponceram[®]/ox.p(MAG)-BMP-2 zu sehen. Die Zellen befinden sich sowohl innerhalb der Poren (A) als auch auf der Oberfläche des Materials (D). In den Poren liegen die Zellen nicht einzeln nebeneinander vor, sondern bilden verwobene Strukturen. Außerdem sind fibrilläre Strukturen erkennbar, die offenbar aus organischen Komponenten bestehen (B, C). Diese Strukturen können sowohl aus großen Zellmengen als auch aus Komponenten der extrazellulären Matrix (z.B. Kollagen) bestehen. Weiterhin sind auf einigen Zellen Knötchenbildungen erkennbar, die vermutlich auf die Deposition extrazellulärer Matrix zurückzuführen sind (D).

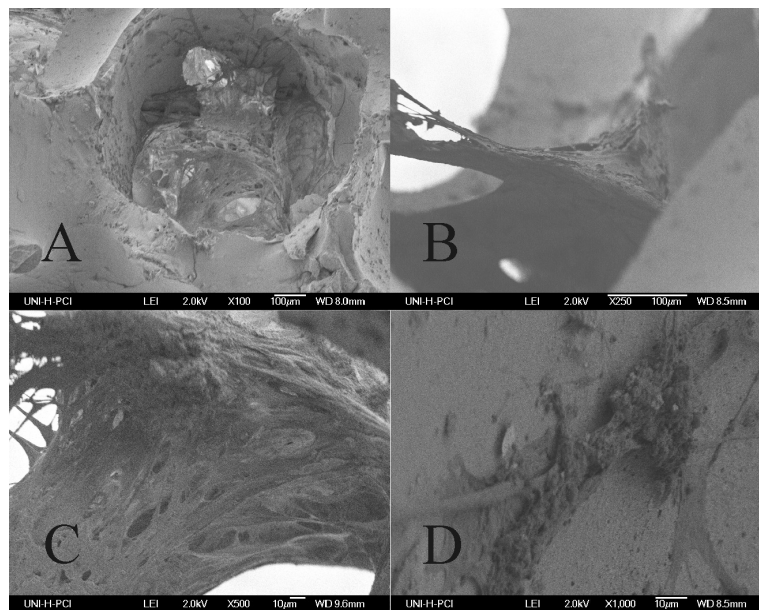


Abbildung 4-30: REM-Aufnahmen der Probe Sponceram[®]/ox.p(MAG)-BMP-2. Vergrößerungen: A: 100-fach; B: 250-fach; C: 500-fach, D: 1000-fach

In Abbildung 4-31 sind die REM-Aufnahmen der Probe Sponceram[®]/BMP-2 gezeigt. Auch hier sind einzelne Zellen (A), gewebeartige und fibrilläre Strukturen (B, C) sowie vermutlich Matrixdepositionen auf den Zellen (D) erkennbar.

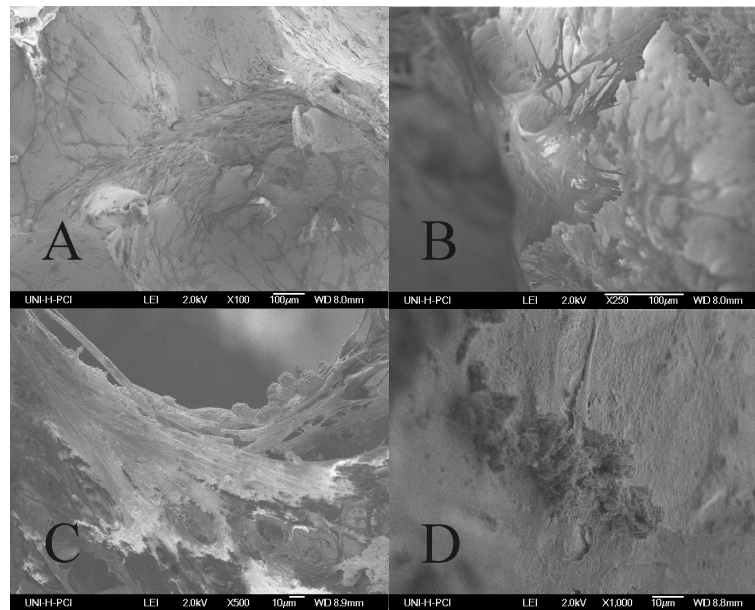


Abbildung 4-31: REM-Aufnahmen der Probe Sponceram[®]/BMP-2.
Vergrößerungen: A: 100-fach; B: 250-fach; C, D: 1000-fach

Die REM-Aufnahmen beider Proben unterscheiden sich im Wesentlichen nicht voneinander. Strukturen, die mit der osteogenen Differenzierung im Zusammenhang gesehen werden, konnten in beiden Fällen gezeigt werden. Fibrilläre Strukturen weisen auf die Anwesenheit von Kollagen hin, der Nachweis der Genexpression von Kollagen I bei beiden Proben, unterstützt dieses. Auch die Deposition extrazellulärer Matrix, die in beiden Fällen vermutet wurde, kann durch den Nachweis der Genexpression von Kollagen I, Osteopontin, Osteocalcin sowie die positiven histologischen Färbungen mit Alizarinrot und Von Kossa bekräftigt werden (Abbildung 4-28, Abbildung 4-29).

Fazit: Durch die vorgenommenen Untersuchungen der dynamisch kultivierten mesenchymalen Stromazellen auf den Keramikmaterialien Sponceram[®]/BMP-2 und Sponceram[®]/ox.p(MAG)-BMP-2 konnte in beiden Fällen eine osteogene Differenzierung bestätigt werden. Die Genexpression der wichtigsten Marker der Osteogenese (alkalische Phosphatase, Kollagen I, Osteopontin und Osteocalcin) konnte mit Hilfe der PCR nachgewiesen werden. Das Fehlen des Markers Osteocalcin im Fall der Probe Sponceram[®]/ox.p(MAG)-BMP-2 kann damit erklärt werden, dass dieser Marker erst sehr spät im Laufe der Differenzierung auftritt, möglicherweise ist die Kultur nicht terminal ausdifferenziert. Allerdings sollte auch beachtet werden, dass in stark mineralisierten Kulturen die Expression dieses Markers wieder abnimmt. Eine abschließende Beurteilung des Differenzierungsgrades ist demnach erwartungsgemäß nur schwer zu erbringen. Die

Heterogenität der Zellpopulation führt weiterhin zu Variationen der Genexpression. Der histologische Nachweis von Calcium auf der Keramikoberfläche durch Von Kossa- und Alizarinrotfärbungen weist die osteogene Differenzierung zusätzlich nach. Die mit dem Rasterelektronen-Mikroskop erhaltenen Bilder der kultivierten Zellen zeigten auf beiden Materialien einzelne Zellen, Zellverbände sowie fibrilläre und gewebeartige Strukturen.

Die osteogene Differenzierung kann demnach sowohl durch die Verwendung von Sponceram[®], das in BMP-2 inkubiert wurde, als auch durch das Kompositmaterial Sponceram[®]/ox.p(MAG)-BMP-2 initiiert werden. Dabei ist zu beachten, dass die Menge BMP-2, die im Kompositmaterial an das Polymer ox.p(MAG) gebunden ist, aufgrund des Herstellungsprozesses des Konjugats geringer ist als die Menge, die durch Adsorption auf der Sponceram[®]-Scheibe immobilisiert wurde. Der Vorteil in der Verwendung des Kompositmaterials liegt in der Möglichkeit, weitere Liganden, die z.B. die Adhäsion oder Vaskularisierung fördern können, an das Polymer anzubinden und die Keramik somit gerichtet zu modifizieren.

Testung von ox.p(MAG)-BMP-2 im Z[®]RPD

Nachdem die osteogene Differenzierung von humanen mesenchymalen Stromazellen im Z[®]RP500-System erfolgreich nachgewiesen werden konnte, sollte die Methode auf das Einwegreaktor-System Z[®]RPD übertragen werden. Besonders für die Biomaterialtestung, bei der in dieser Arbeit jeweils nur zwei Materialien miteinander verglichen werden, eignet sich das System aufgrund seines kleineren Volumens. Neben den unterschiedlichen Reaktorvolumina unterscheiden sich beide Systeme in der Art der Sensormessung sowie in der pH-Regelung. Die CO₂-Begasung des Kopfraums zur pH-Regulierung im Falle des kleineren Z[®]RPD-Systems beseitigt das Problem der Blasen- und Schaumbildung im Medium, das durch die Sparger-Begasung im Z[®]RP500-System auftreten kann. Da das CO₂ jedoch zunächst in das Medium diffundieren muss, ist diese Methode der pH-Regelung indirekt und somit langsamer wirksam. Die Sensormessung von pH- und pO₂-Wert in Messzellen außerhalb des Reaktors kann weiterhin zu Abweichungen der Messwerte führen.

Um die Kultivierung in beiden Reaktorsystemen vergleichen zu können, wurde zunächst im Z[®]RPD-System das Kompositmaterial Sponceram[®]/ox.p(MAG)-BMP-2 ein weiteres Mal im Vergleich zu Sponceram[®]/BMP-2 getestet. Beide Materialien wurden analog der ersten Kultivierung hergestellt und mit jeweils $1,2 \cdot 10^7$ humanen mesenchymalen Stromazellen aus Fettgewebe (FatSC3, Passage 5) extern besiedelt (detaillierte Durchführung der Zellisolation s. Anhang 6.2, Details zur Besiedelung s. Anhang 6.3.7). Beide Keramikscheiben wurden nach 24 Stunden Inkubation bei 37 °C / 5 % CO₂ zusammen in einen Z[®]RPD-Reaktor eingesetzt, um identische Umgebungsbedingungen für beide Materialien zu gewährleisten. Mögliche Effekte, die durch die gegenseitige Beeinflussung beider Materialien auftreten können, wurden gegenüber dem Einfluss nicht identischer Umgebungsbedingungen als vernachlässigbar eingestuft.

Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 47 Tagen im Reaktor kultiviert. Die Parameter wurden analog der vorangegangenen Kultivierung gewählt (37 °C; pH = 7,3, Kopfraumbegasung mit synthetischer Luft), der pH-Wert wurde durch CO₂-Begasung des Kopfraums reguliert. In der vorhergehenden Z[®]RP500-Kultivierung wurde DMEM-Medium mit einer Glucosekonzentration von 4,5 g/L verwendet. Um auch geringe Veränderungen der Glucosekonzentration und damit des Nährstoffverbrauchs der Zellen registrieren zu können, wurde bei dieser Kultivierung DMEM-Medium mit einer niedrigeren Glucosekonzentration von 1 g/L verwendet. Die Erstbefüllung des Reaktors betrug 47 mL. Einen Tag nach Einsetzen der Scheiben wurde der Perfusionsmodus des Systems gestartet. Glucose- und Laktatgehalt in Reaktor und abgeführtem Medium wurden täglich gemessen, das dafür verwendete Probenahmeseptum war direkt am Reaktor angebracht (vgl. Abbildung 6-5). Eine Laktatkonzentration von 1 g/L im Reaktor wurde als zulässige Maximalkonzentration definiert, bei Erreichen dieses Wertes wurde die Nährstoffzufuhr erhöht. Die Sponceram[®]-Scheiben wurden mit einer Geschwindigkeit von 1 rpm im Reaktor gedreht, die Umwälzrate des Mediums im Reaktor betrug 40 mL/min.

Nach beendeter Kultivierung wurden die Scheiben aus dem Reaktor entnommen und für die folgende Analytik präpariert. Zur Visualisierung der Zellzahl wurden Teile der Scheiben mit DAPI gefärbt. Zum histologischen Nachweis der osteogenen Differenzierung wurden Alizarinrot- und Von Kossa-Färbung durchgeführt, sowie alkalische Phosphatase angefärbt. REM-Aufnahmen sollten die Matrixbildung zusätzlich deutlich machen. Mit Hilfe der PCR

wurde die Genexpression der Zellen zum Zeitpunkt der Beendigung der Reaktorkultivierung analysiert (detaillierte Durchführungen s. Anhang 6.3.8 - 6.3.10).

In Abbildung 4-32 ist der tägliche Glucoseverbrauch der im Z[®]RPD-System kultivierten mesenchymalen Stromazellen dargestellt. Auf die Darstellung der Laktatproduktion wurde verzichtet, da der Kurvenverlauf wie bei der vorhergehenden Reaktorkultivierung im Z[®]RP500-System mit dem des Glucoseverbrauchs vergleichbar war (vgl. Abbildung 4-23 und Abbildung 4-24) und keine weiteren Informationen aus dem Verlauf der Laktatproduktion entnommen werden können. Über den Kultivierungszeitraum von 47 Tagen ist ein Anstieg der Glucoseverbrauchsrate festzustellen, der Gesamtglucoseverbrauch betrug jedoch nur 856 mg für die kultivierten Zellen auf beiden Sponceram[®]-Scheiben zusammen. Der im Vergleich zur ersten Kultivierung im Z[®]RP500-System etwas geringere Glucoseverbrauch ist hauptsächlich auf die niedrigere Gesamtzellzahl (12 Mio Zellen pro Scheibe im Z[®]RPD, 20 Mio Zellen pro Scheibe im Z[®]RP500) zurückzuführen. In beiden Kultivierungen wurden mesenchymale Stromazellen unterschiedlichen Ursprungs verwendet. Die Isolation der Zellen aus Gewebe verschiedener Patienten unter Anwendung unterschiedlicher Isolationsprotokolle (vgl. Abschnitt 6.2) kann zusätzlich Auswirkungen auf die Proliferationskapazität der Zellen haben. Ein Vergleich der Zellproliferation auf Sponceram[®]/ox.p(MAG)-BMP-2 und Sponceram[®]/BMP-2 anhand der Glucoseverbrauchsrate ist nicht möglich, da beide Scheiben in einem Reaktor kultiviert wurden. Der wie bereits in der ersten Kultivierung gefundene geringe Glucoseverbrauch kann auf eine starke Differenzierung der Zellen oder eine geringe Zellzahl auf den Sponceram[®]-Scheiben hinweisen.

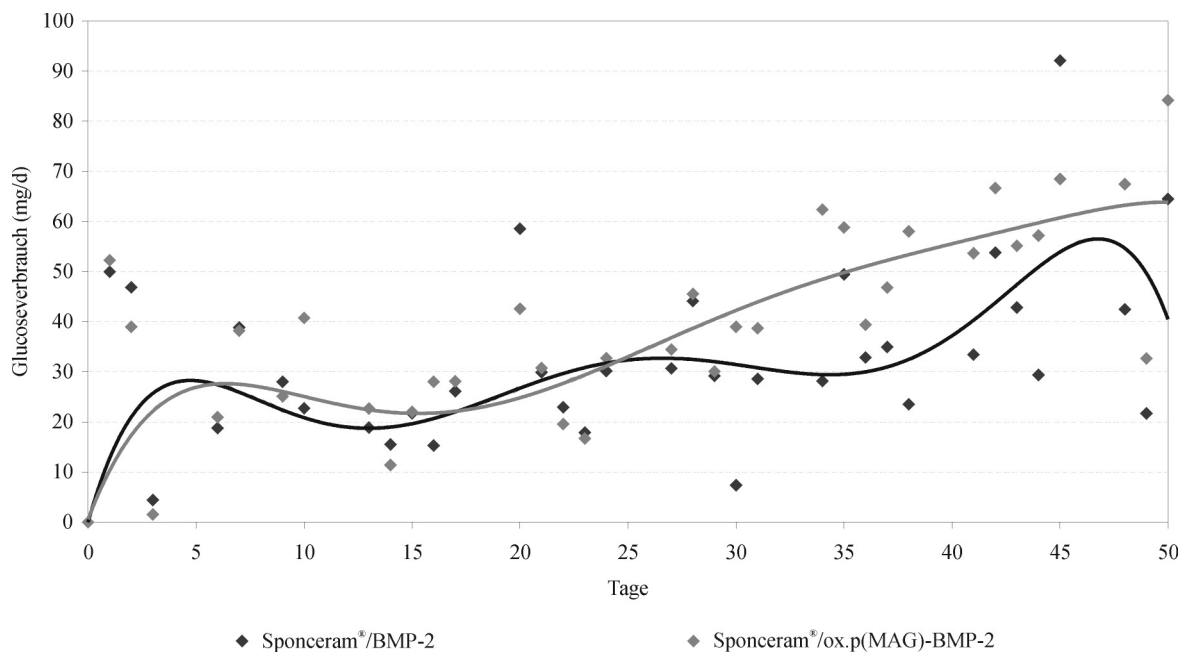


Abbildung 4-32: Täglicher Glucoseverbrauch von humanen mesenchymalen Stromazellen auf den Materialien Sponceram®/BMP-2 und Sponceram®/ox.p(MAG)-BMP-2 kultiviert in einem Z[®]RPD-System über einen Zeitraum von 47 Tagen

Um letzteres ausschließen zu können und die Zellzahlen auf beiden Materialien nach der Kultivierung einschätzen zu können, wurden Stücke beider Sponceram®-Scheiben mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI eingefärbt (Abbildung 4-33, Abbildung 4-34). Auf beiden Materialien sind große Mengen an Zellen erkennbar, wobei die Zellzahl auf dem Material Sponceram®/BMP-2 tendenziell größer zu sein scheint. Dieser Befund würde auf eine verstärkte Proliferation der Zellen auf diesem Material und einer damit einhergehenden geringeren Differenzierung sprechen. Dieser Unterschied ist jedoch nicht aussagekräftig, da wiederum nur Ausschnitte der Materialien gefärbt wurden. Auch eine Quantifizierung der Zellzahlen ist aufgrund der dreidimensionalen Struktur der Matrix nicht möglich. Das Ergebnis der Färbung zeigt jedoch, dass die geringe Glucoseverbrauchsrate (Abbildung 4-32) nicht auf eine geringe Zellzahl zurück geführt werden kann.

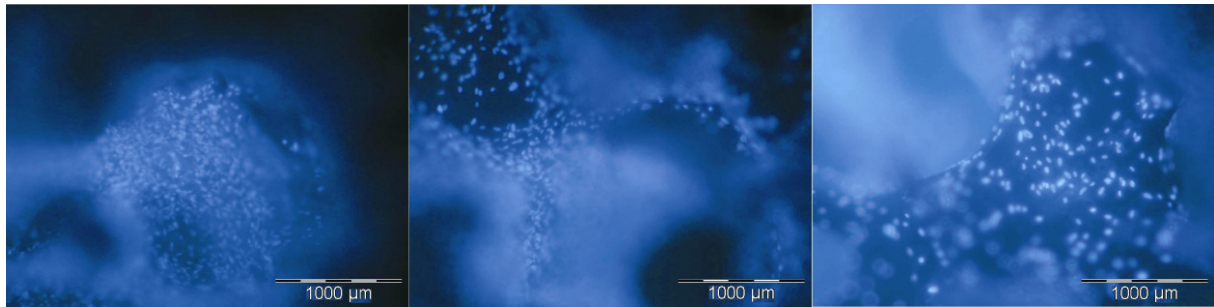


Abbildung 4-33: DAPI-Färbung der auf Sponceram[®]/BMP-2 dynamisch kultivierten Zellen im Z[®]RPD-System

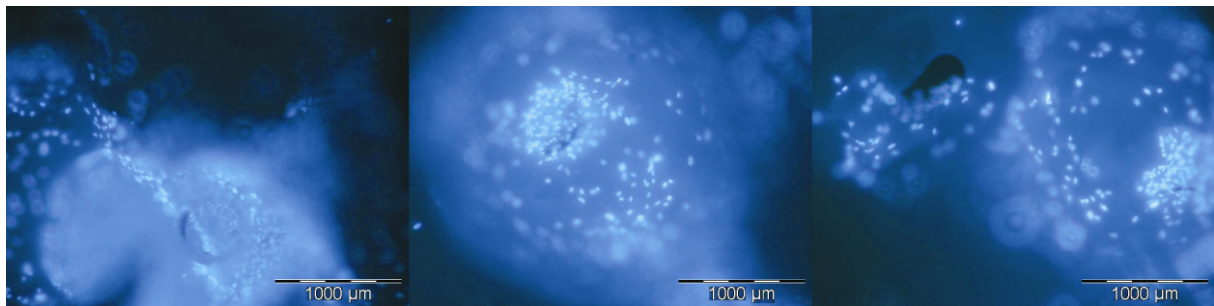


Abbildung 4-34: DAPI-Färbung der auf Sponceram[®]/ox.p(MAG)-BMP-2 dynamisch kultivierten Zellen im Z[®]RPD-System

Die osteogene Differenzierung der Zellen auf beiden Materialien sollte zunächst mit Hilfe histologischer Färbungen nachgewiesen werden. In Abbildung 4-35 A und B sind die Färbungen nach Von Kossa und mit Alizarinrot gezeigt. Sowohl auf Sponceram[®]/BMP-2 als auch auf Sponceram[®]/ox.p(MAG)-BMP-2 fielen beide Färbungen positiv aus, so dass die Calcifizierung der Matrix qualitativ bestätigt werden konnte. Eine quantitative Differenzierung der Intensität der Färbungen auf beiden Materialien ist jedoch aus bereits genannten Gründen nicht möglich. In Abbildung 4-35 C ist der positive histologische Nachweis von alkalischer Phosphatase auf beiden Materialien gezeigt. Es wird deutlich, dass die Intensität der Färbung besonders in den Poren der Matrix intensiv ausfällt. Dieser Befund weist darauf hin, dass sich die Zellen nicht nur an der Oberfläche der Keramik befinden, sondern in die dreidimensionale Struktur hineingewachsen sind.

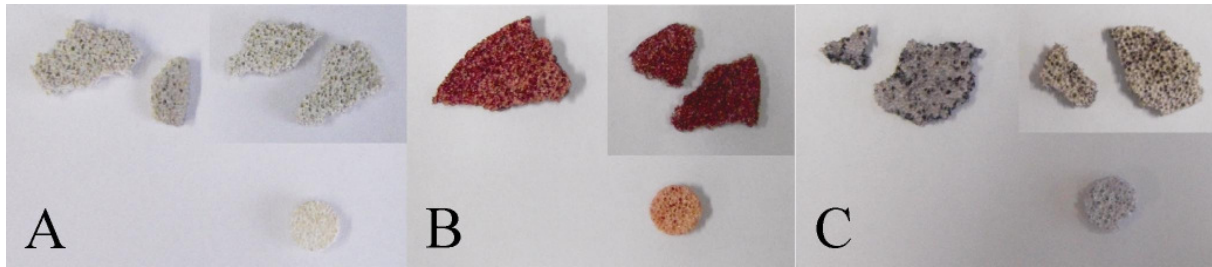


Abbildung 4-35: Histologische Färbungen der auf Sponceram[®]/BMP-2 (rechts) und Sponceram[®]/ox.p(MAG)-BMP-2 (links) dynamisch im Z[®]RPD-System kultivierten Zellen. A: Von Kossa-Färbung; B: Alizarinrot-Färbung; C: AP-Färbung. Oben sind jeweils die Proben, unten die nicht mit Zellen besiedelten Referenzmaterialien gezeigt.

Die Analyse der Genexpression der Zellpopulationen auf beiden Materialien sollte weiteren Aufschluss über deren Differenzierungszustand geben. In Abbildung 4-36 sind die Ergebnisse der semiquantitativen PCR beider Populationen dargestellt. In beiden Fällen, besonders jedoch für Sponceram[®]/BMP-2, fällt die starke Dominanz der Genexpression von Kollagen I auf. Die MSCs, die auf Sponceram[®]/ox.p(MAG)-BMP-2 kultiviert wurden, exprimierten weiterhin alkalische Phosphatase, Osteopontin und Osteocalcin. Die Anwesenheit dieser osteogenen Marker weist die Differenzierung der Zellen eindeutig nach. Die Dominanz von Kollagen I ist auf das Vorhandensein einer Mischpopulation zurückzuführen, in der offenbar ein Teil der Zellen noch nicht als reife Osteoblasten einzustufen ist (vgl. dazu Abschnitt 3.3). Da aber auch Osteocalcin nachgewiesen werden konnte, das nur in reifen Osteoblasten exprimiert wird, sind auch Zellen dieses Entwicklungsstatus in der Population vorhanden.

Für die Zellen auf Sponceram[®]/BMP-2 konnte neben der Expression von Kollagen I nur Osteocalcin nachgewiesen werden. Die Expression von Osteocalcin als spätem osteogenen Marker weist die osteogene Differenzierung der Zellen auch auf diesem Material eindeutig nach. Kollagen I ist ein früher Marker der Differenzierung, der jedoch erst nach alkalischer Phosphatase exprimiert wird (vgl. Abschnitt 3.3). Das Fehlen der Genexpression von alkalischer Phosphatase als frühem Marker der Osteogenese ist somit nicht verständlich, zumal dessen histologische Anfärbung positiv ausgefallen ist (Abbildung 4-35). Möglicherweise ist dieser Befund auf eine mangelnde Qualität der isolierten RNA der auf Sponceram[®]/BMP-2 kultivierten Zellen zurückzuführen, da auch die Expression der GAPDH im Vergleich zu Sponceram[®]/ox.p(MAG)-BMP-2 sehr gering war (20 % der Intensität, Daten nicht gezeigt). Die Qualität der RNA kann durch die Methode der Zellablösung (35 Minuten Inkubation der Zellen in Hyaluronidase/Kollagenase) beeinträchtigt sein (s. Anhang 6.3.9).

Weiterhin muss berücksichtigt werden, dass nicht die gesamte Zellpopulation von der Keramikoberfläche abgelöst wird. Besonders Zellen, die sich in der Tiefe der Keramik befinden oder von großen Mengen extrazellulärer Matrix bedeckt sind, lösen sich nur schwer ab.

Die starke Dominanz von Kollagen I kann möglicherweise auf einen größeren Anteil nicht reifer Osteoblasten in der anwesenden Mischpopulation zurückgeführt werden. Da die verwendete Methode der PCR jedoch nur semiquantitativ ist und offenbar ein Problem mit der Qualität der isolierten RNA vorlag, ist diese Interpretation nur spekulativ zu betrachten.

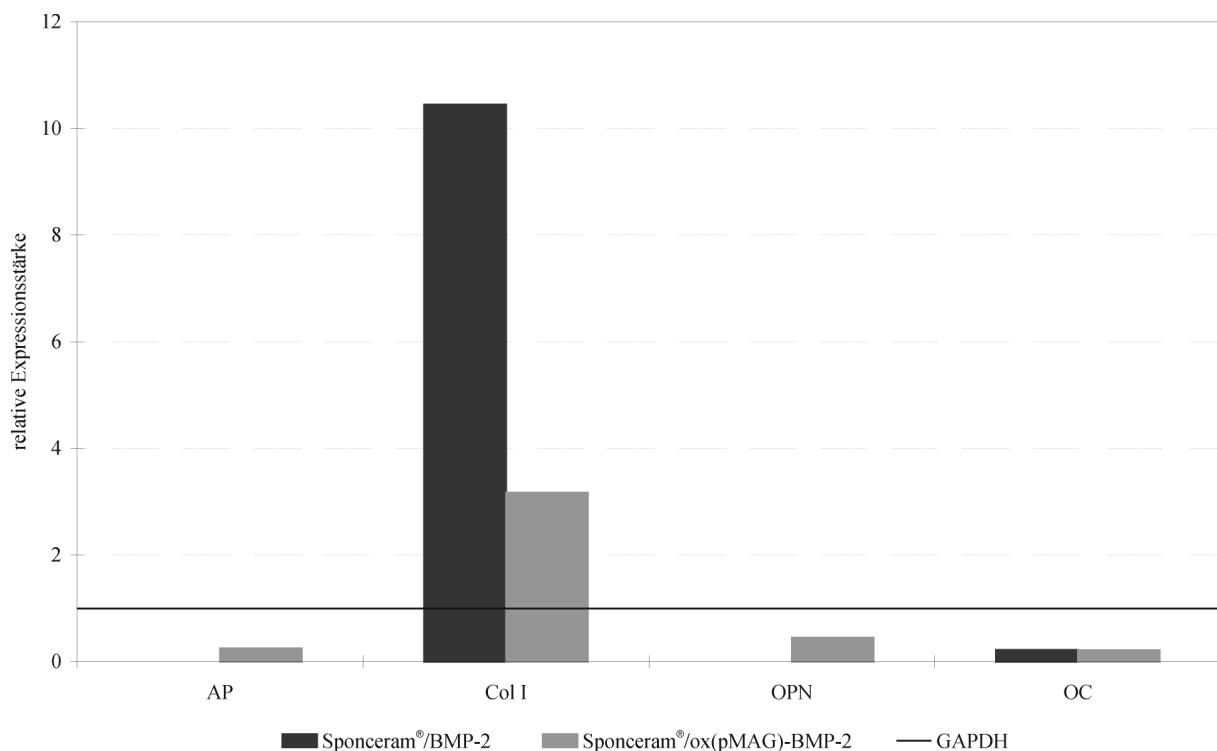


Abbildung 4-36: Ergebnisse der PCR von mesenchymalen Stromazellen auf den Kompositmaterialien Sponceram®/ox.p(MAG)-BMP-2 und Sponceram®/BMP-2 nach der dynamischen Kultivierung im Z[®]RPD-System über einen Zeitraum von 50 Tagen. Die Werte sind angegeben als die Ergebnisse einer Einfachbestimmung. AP = alkalische Phosphatase, Col I = Kollagen I, OPN = Osteopontin, OC = Osteocalcin

Mit Hilfe von rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden die Zellpopulationen und Matrixdepositionen auf Sponceram®/ox.p(MAG)-BMP-2 und Sponceram®/BMP-2 visualisiert (Abbildung 4-37, Abbildung 4-38). Auf beiden Materialien sind einzelne Zellen sowie gewebeartige Strukturen erkennbar. Auf der Probe Sponceram®/ox.p(MAG)-BMP-2 wachsen

die Zellen auf der Keramikoberfläche und in die Poren hinein (Abbildung 4-37 A). Die Zellen bilden netzartige, dreidimensionale Strukturen (B) sowie flächige, gewebeartige Gebilde (E). In Abbildung 4-37 D und F sind kleine Strukturen erkennbar, die die Oberfläche der Keramik überziehen und sich zum Teil unter den Zellen befinden. Vermutlich handelt es sich dabei um von den Zellen sezernierte extrazelluläre Matrix. In Abbildung 4-38 sind die REM-Aufnahmen der Probe Sponceram[®]/ox.p(MAG)-BMP-2 gezeigt. Auch hier sind einzelne Zellen und dreidimensionale Netzwerke der Zellen auf der Keramik und in deren Poren erkennbar (A, C, F). Weiterhin sind fibrilläre Strukturen erkennbar (E), die offenbar aus Zellen und Bestandteilen der extrazellulären Matrix (Kollagen) aufgebaut sind. Die Zellen, die die Oberfläche der Keramik überziehen, bilden flächige, plattenartige Strukturen aus, in denen die Zellzwischenräume von organischer Substanz ausgefüllt zu sein scheinen (B, C).

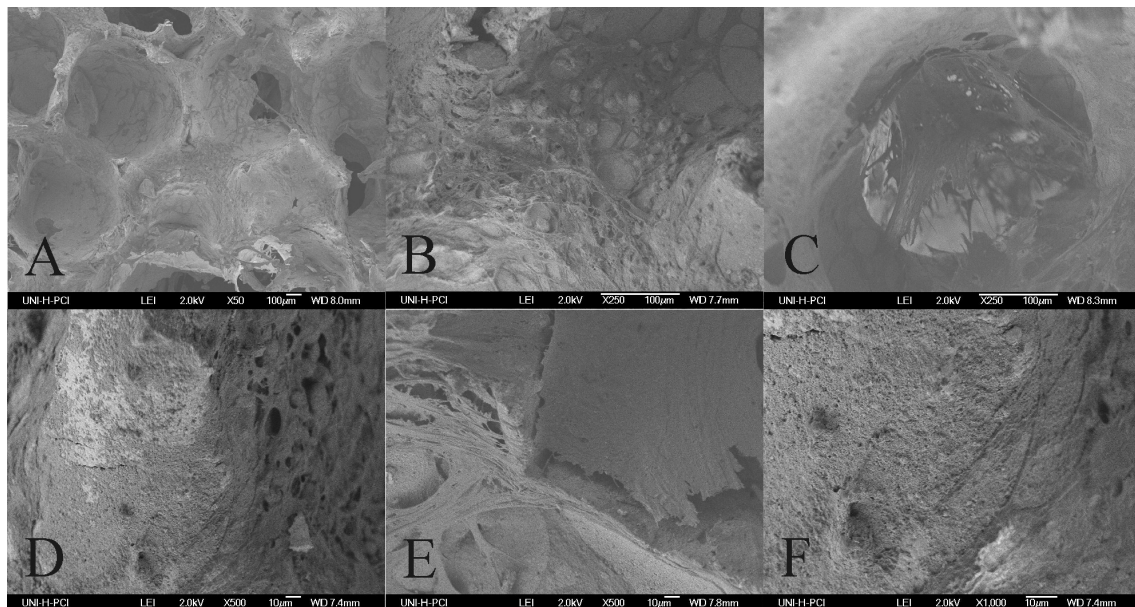


Abbildung 4-37: REM-Aufnahmen der Probe Sponceram[®]/BMP-2. Vergrößerungen: A: 50-fach; B, C: 250-fach; D, E: 500-fach; F: 1000-fach

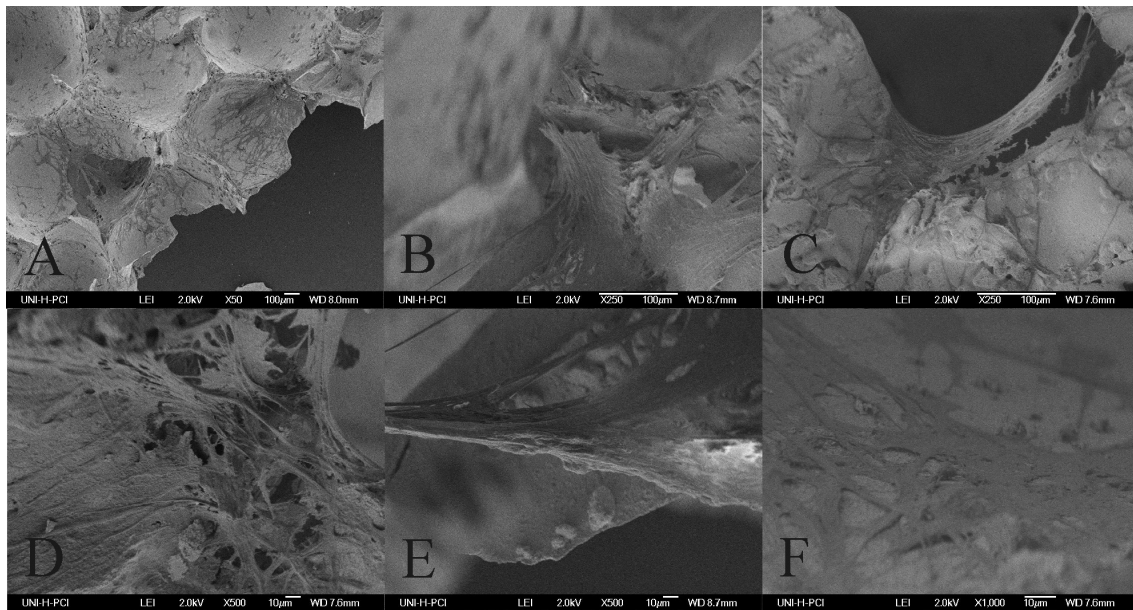


Abbildung 4-38: REM-Aufnahmen der Probe Sponceram[®]/ox.p(MAG)-BMP-2. Vergrößerungen: A: 50-fach, B, C: 250-fach; D, E: 500-fach; F: 1000-fach

Die REM-Aufnahmen beider Proben zeigen ähnliche Strukturen der Zellen. Dreidimensionale, flächige Strukturen dominieren die Bilder, die vermutlich aus Zellen und extrazellulärer Matrix bestehen. Diese Vermutung wird durch den Nachweis der Genexpression von Osteocalcin, Osteopontin und Kollagen gestützt, da diese Proteine Bestandteile der extrazellulären Matrix sind.

Fazit: Die Analyse der mit mesenchymalen Stromazellen besiedelten und im Z[®]RPD-Reaktor kultivierten Materialien Sponceram[®]/ox.p(MAG)-BMP-2 und Sponceram[®]/BMP-2 konnte die osteogene Differenzierung der Zellen auf beiden Materialien nachweisen. Die Expression des späten osteogenen Markers Osteocalcin zeigte die Anwesenheit von reifen Osteoblasten in den Zellpopulationen auf beiden Materialien. Die starke Expression von Kollagen I, besonders im Fall von Sponceram[®]/BMP-2, deutet jedoch auch auf einen großen Anteil von Zellen hin, die noch nicht ausgereift sind (Abbildung 4-36). Das Fehlen der Genexpression von alkalischer Phosphatase im Fall der Probe Sponceram[®]/BMP-2 ist auf eine mangelnde Qualität der isolierten RNA zurückzuführen, da die histologische Färbung der AP positiv ausgefallen ist. Der histologische Nachweis von Calcium durch die positiven Färbungen nach Von Kossa und mit Alizarinrot weist die osteogene Differenzierung der Zellen ebenfalls auf beiden Materialien nach. Auf beiden Sponceram[®]-Scheiben konnten weiterhin mit Hilfe von REM-Aufnahmen dreidimensionale Zell- und Gewebestrukturen nachgewiesen werden.

Abschließend kann festgestellt werden, dass die Differenzierung mesenchymaler Stromazellen auf den Materialien Sponceram[®]/ox.p(MAG)-BMP-2 und Sponceram[®]/BMP-2 in beiden Reaktorsystemen erfolgreich war. Die Verwendung des Einwegreaktors Z[®]RPD sollte daher aus bereits genannten Gründen (ökonomische Aspekte etc.) für zukünftige Versuche bevorzugt werden.

In den bisher durchgeführten Reaktorkultivierungen konnten keine signifikanten Unterschiede der Beeinflussung bzw. Induzierung der Osteogenese zwischen den Materialien Sponceram[®]/ox.p(MAG)-BMP-2 und Sponceram[®]/BMP-2 nachgewiesen werden. Um weitere mögliche Effekte des Kompositmaterials zu untersuchen, sollte in weitergehenden Untersuchungen das Kompositmaterial Sponceram[®]/ox.p(MAG)-BMP-2-PLL getestet werden. Die Kombination von adhäsionsfördernden und osteoinduktiven Eigenschaften sollte durch die Verbesserung der Zelladhäsion und die damit erreichte erhöhte Zellzahl zu Beginn der Kultivierung die bisher nachgewiesenen Effekte verstärken.

4.2. EINSCHLUSS BIOAKTIVER KOMPONENTEN

Wie in Abschnitt 4.1 beschrieben, kann ein eingeschränkt bioaktives oder bioinertes Keramikmaterial unter Verwendung geeigneter Spacermoleküle und bioaktiver Liganden so funktionalisiert werden, dass ein biomimetisches Kompositmaterial erhalten wird. Eine weitere Möglichkeit der gezielten Modifikation besteht im Einschluss bioaktiver Komponenten in eine geeignete abbaubare Matrix, die auf die Keramikoberfläche aufgebracht wird. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass die bioaktiven Moleküle durch Abbau der sie umgebenden Matrix freigesetzt werden können. Die Freisetzung kann durch Variation der Abbaugeschwindigkeit der Matrix zeitlich gesteuert werden (vgl. Abschnitt 3.2.2).

Als Matrix eignen sich aufgrund ihrer bioaktiven Eigenschaften insbesondere natürliche, abbaubare Polymermaterialien. Durch Kontrolle der Verarbeitungsbedingungen werden Risiken in Bezug auf Immunreaktionen oder potentielle Infektionsgefahren minimiert.

In dieser Arbeit wurden als Polymermaterialien Kollagen I und Gelatine ausgewählt. Kollagen I als Bestandteil der extrazellulären Matrix und Gelatine als seine denaturierte Form fördern die Adhäsion von Zellen, da diese mit bestimmten Rezeptoren (Zelladhäsionsmoleküle, *engl. cell adhesion molecules, CAMs*) auf der Zelloberfläche interagieren können. Eines der wichtigsten Glycoproteine auf der Zelloberfläche ist in diesem Zusammenhang Fibronectin^{136, 137}.

Das verwendete Kollagen wurde über das Forschungsinstitut für Leder- und Kunststoffbahnen (FILK) in Freiberg bezogen. Es handelt sich um säurelösliches Kollagen, das durch essigsäure Extraktion von Kalbshaut gewonnen und anschließend gefällt, gesiebt und gefriergetrocknet wurde.

Gelatine ist ein heterogenes Gemisch, das aus den wasserlöslichen, hochmolekularen Proteinen des Kollagens besteht. Die Proteine werden aus Haut, Sehnen, Bindegewebe und Knochen porcinem Ursprungs mit heißem Wasser extrahiert. Gelatine kann entweder aus sauer oder basisch extrahierter Haut gewonnen werden und wird dann als Typ A bzw. Typ B bezeichnet. In dieser Arbeit wurde Gelatine des Typs A verwendet.

Als bioaktiver Ligand sollte BMP-2 verwendet werden, um die osteogene Differenzierung der auf den Kompositmaterialien kultivierten Zellen zu induzieren und möglicherweise zu steuern. Für die Untersuchung der Freisetzungskinetiken wurde aus Kostengründen, wie bereits bei der Funktionalisierung der Sponceram[®]-Oberfläche mittels Polymerspaceren (vgl. Abschnitt 4.1), anstelle von BMP-2 RNase als Modellprotein verwendet.

Die Versuche zur Beschichtung von Sponceram[®] sowie zum Einschluss bioaktiver Komponenten in die polymeren Matrices wurden von Nataliya Gorinski im Rahmen ihrer Diplomarbeit durchgeführt¹³⁸.

4.2.1. BESCHICHTUNG VON SPONCERAM[®]

Zunächst wurden Sponceram[®]/Kollagen- bzw. Sponceram[®]/Gelatine-Kompositmaterialien ohne Verwendung bioaktiver Komponenten hergestellt, um die Beschichtungsmethodik zu optimieren und die resultierenden Komposite zu charakterisieren.

Für die Beschichtung der Sponceram[®]-Minidiscs wurden das gefriergetrocknete Kollagen in 1 % iger Essigsäure (5 mg/mL) und die Gelatine in PBS (20 mg/mL) gelöst. Die Konzentrationen wurden so gewählt, dass eine gute Verarbeitbarkeit gewährleistet war. 250 µL der jeweiligen Lösungen wurden tropfenweise auf die Keramiken aufgetragen. Um einen Verschluss der porösen Struktur zu verhindern, wurden die Keramiken so gelagert, dass ein Abfließen überschüssiger Lösung möglich war. Die beschichteten Keramiken wurden bei 37 °C inkubiert, bis sie vollständig getrocknet waren.

4.2.2. QUANTITATIVE UNTERSUCHUNGEN DER BESCHICHTUNGEN

Kollagen und Gelatine können mit Hilfe der Pikro-Siriusrot-Färbung auf der Keramikoberfläche direkt nachgewiesen werden. Der Test beruht auf einer Reaktion des

anionischen Farbstoffs Siriusrot mit bestimmten, im Kollagen vorkommenden Aminogruppen¹³⁹ (Details und Durchführung s. Anhang 6.3.8).

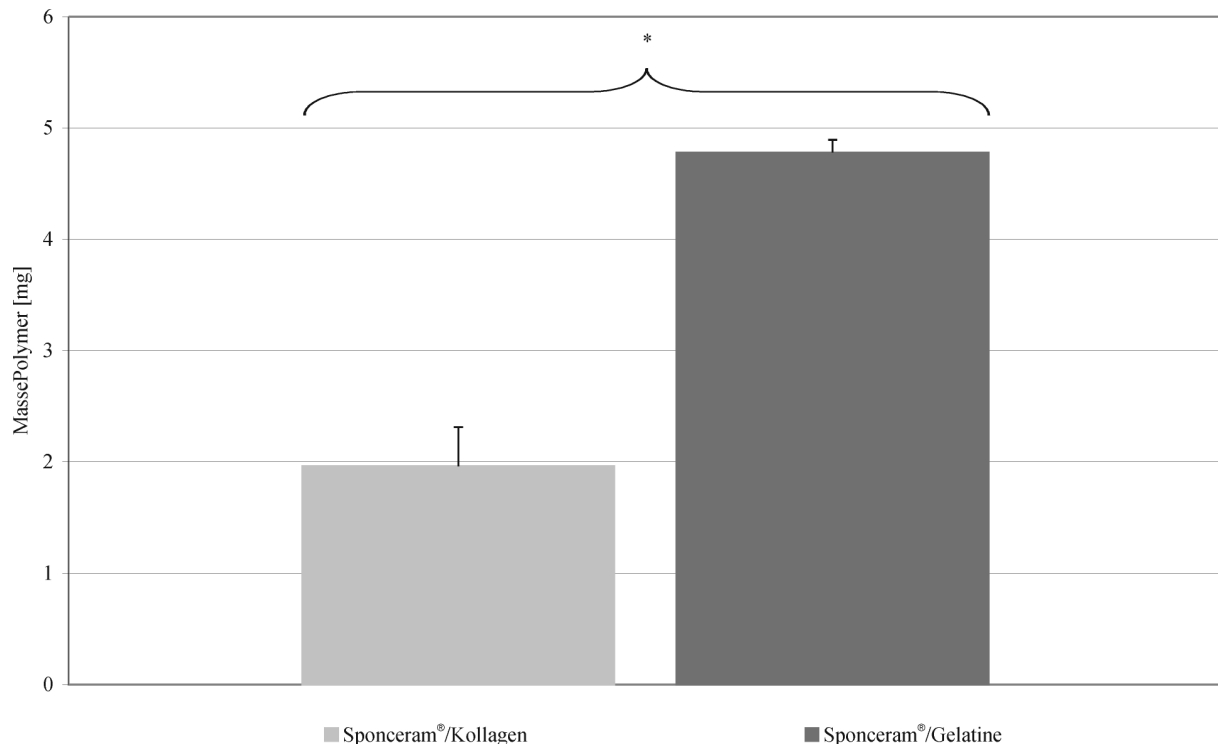


Abbildung 4-39: Ergebnisse der mit Hilfe der Piko-Siriusrot-Färbung ermittelten Menge von Kollagen bzw. Gelatine auf Sponceram[®] nach der Beschichtung. Die Werte sind angegeben als Mittelwerte aus drei Werten \pm Standardfehler. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit * für $0,001 < p < 0,05$ gekennzeichnet.

In Abbildung 4-39 ist das Ergebnis der Piko-Sirius-Färbung der Kompositmaterialien Sponceram[®]/Kollagen und Sponceram[®]/Gelatine dargestellt. Es ist ersichtlich, dass die auf der Keramikoberfläche befindliche Menge Gelatine die Menge an Kollagen übersteigt. Allerdings muss bei dieser Färbemethode beachtet werden, dass nur oberflächennahe Matrixmoleküle mit dem Farbstoff nachgewiesen werden können. Tiefer liegende Schichten werden nicht erfasst, so dass keine Information der gesamten, auf der Keramik befindlichen Kollagen- bzw. Gelatine-Menge erhalten werden kann.

Die auf der Keramik aufgebraute Kollagen- oder Gelatineschicht soll als Matrix für die Einbettung bioaktiver Liganden verwendet werden. Um die Freisetzung der Liganden zu verbessern, die sonst nur durch Diffusion der Moleküle durch die Matrix stattfinden kann, sollte die Matrix definiert abgebaut werden. Die Degradation der Matrix kann sowohl durch

Hydrolyse als auch durch enzymatischen Abbau stattfinden. In dieser Arbeit sollte zunächst der hydrolytische Abbau der Matrixmaterialien untersucht werden.

Um eine erste Einschätzung über die Beständigkeit der Polymerschicht zu erhalten und somit eine Aussage über deren Eignung als Einschlussmatrix für bioaktive Moleküle treffen zu können, wurden die Proben zunächst sieben Tage bei 37 °C in PBS inkubiert. Anschließend wurden sie getrocknet und die auf der Keramik verbliebene Gelatine- bzw. Kollagenmenge mit dem Piko-Siriusrot-Test analysiert. Abbildung 4-40 zeigt, dass die auf den Sponceram[®]-Oberflächen anhaftenden Polymermengen nach einwöchiger Inkubation in PBS abnehmen. Es ist somit möglich, die eingeschlossenen bioaktiven Komponenten durch Abbau der Matrix freizusetzen.

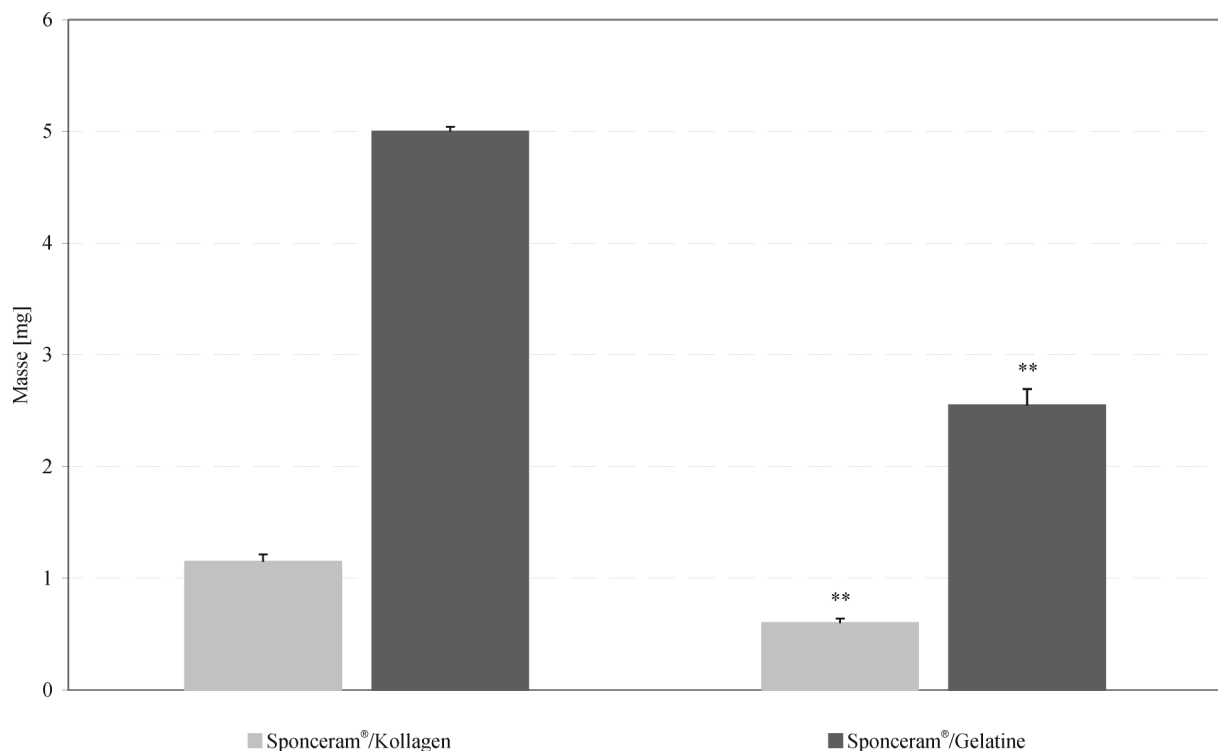


Abbildung 4-40: Vergleich der verbliebenen Gelatine- bzw. Kollagenmenge auf Sponceram[®] nach siebentägiger Inkubation in PBS bei 37 °C. Die Polymermengen wurden mit dem Piko-Siriusrot-Test bestimmt. Die Werte sind angegeben als die Mittelwerte aus vier Werten \pm Standardfehler. Statistisch signifikante Unterschiede nach der Inkubation gegenüber dem Ausgangsmaterial sind mit ** für $p \leq 0,001$ gekennzeichnet.

4.2.3. ZELLKULTURUNTERSUCHUNGEN

Die mit Gelatine bzw. Kollagen beschichteten Sponceram[®]-Keramiken wurden zunächst ohne in die Matrix eingeschlossene bioaktive Komponenten auf ihre Eignung zur Kultivierung adhärent wachsender Zellen getestet. Dazu wurden die Komposite mit der Modellzelllinie MC3T3-E1 besiedelt und über einen Zeitraum von 14 Tagen kultiviert. Als Referenzmaterial diente unbehandelter Sponceram[®] (detaillierte Durchführung s. Anhang 6.4.2). Die adhärenierten Zellen wurden zu fünf unterschiedlichen Zeitpunkten mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI eingefärbt. Die Fluoreszenzintensität wurde mit Hilfe eines Fluoreszenzlesegeräts quantitativ ausgewertet (detaillierte Durchführung s. Anhang 6.3.8).

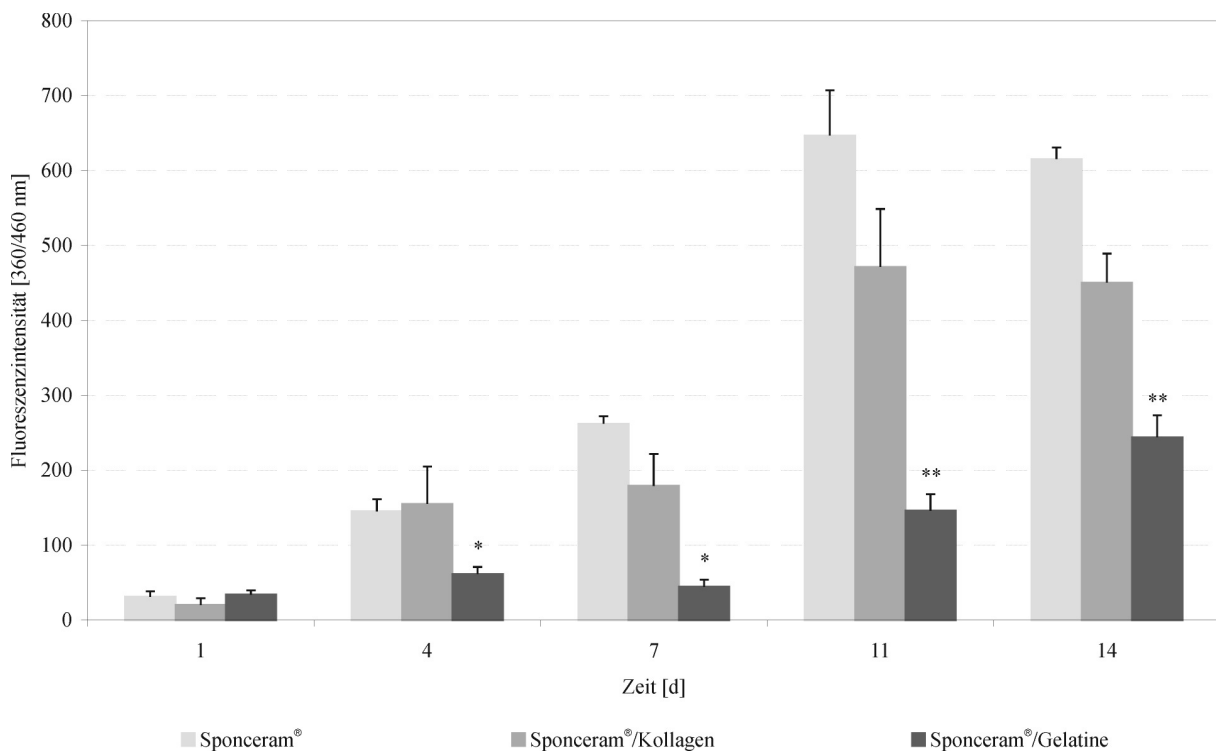


Abbildung 4-41: Ergebnisse der DAPI-Färbung von MC3T3-E1-Zellen, die über einen Zeitraum von 14 Tagen auf Sponceram[®], Sponceram[®]/Gelatine und Sponceram[®]/Kollagen kultiviert wurden. Die Werte sind angegeben als die Mittelwerte aus vier Werten \pm Standardfehler. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber Sponceram[®] sind mit * für $0,001 < p < 0,05$ und ** für $p \leq 0,001$ gekennzeichnet.

In Abbildung 4-41 sind die Ergebnisse der DAPI-Färbung von MC3T3-E1-Zellen gezeigt, die über einen Zeitraum von 14 Tagen auf Sponceram[®] und den Kompositmaterialien Sponceram[®]/Gelatine sowie Sponceram[®]/Kollagen kultiviert wurden. Die Zellzahlen steigen

kontinuierlich an, auf Sponceram[®] und Sponceram[®]/Kollagen erreichen sie ab Tag 11 ein Plateau. Ab diesem Zeitpunkt ist die Oberfläche der Keramik vollständig bewachsen, Zellerneuerung und –absterben befinden sich im Gleichgewicht (vgl. Abschnitt 3.4). Die Ergebnisse der quantitativen Auswertung wurden mit Hilfe des t-Tests auf signifikante Unterschiede untersucht (s. Anhang 6.1). Die Zellzahlen auf Sponceram[®] und Sponceram[®]/Kollagen unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. Die Kollagenbeschichtung hat somit offenbar keinen nachweisbaren proliferationsfördernden oder –inhibierenden Einfluss auf die adhärenierten Zellen. Im Falle der Gelatine-Beschichtung ist eine deutlich geringere Zellzahl gegenüber unbehandeltem Sponceram[®] zu erkennen, eine Plateauphase wird während der 14-tägigen Kultivierung nicht erreicht. Möglicherweise wurden die Poren der Keramik durch die viskose Gelatine verschlossen, so dass das dreidimensionale Wachstum der Zellen eingeschränkt wird.

Fazit: Die Kultivierung von MC3T3-E1-Zellen auf den Kompositmaterialien Sponceram[®]/Gelatine und Sponceram[®]/Kollagen zeigte, dass beide Materialien als Biomaterial geeignet sind. Die auf dem Material Sponceram[®]/Gelatine erzielten Zellzahlen waren jedoch weit geringer als auf Sponceram[®]/Kollagen. Da die Beschichtungen jedoch in erster Linie als Trägermatrix für bioaktive Komponenten dienen sollen, ist es notwendig, die Freisetzungseigenschaften der Trägermatrix für bioaktive Moleküle zu untersuchen, um weitere Aussagen über die Qualifikation der Materialien treffen zu können.

4.2.4. UNTERSUCHUNG DER FREISETZUNG AUS DER TRÄGERMATRIX

Für die Analyse des Freisetzungsprofils bioaktiver Liganden, die in die polymeren Matrices eingebetteten wurden, wurde als Modellprotein RNase verwendet, das dazu mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC markiert wurde (s. Anhang 6.3.3). Die Kollagen- bzw. Gelatinelösungen wurden mit dem markierten Protein (250 µg/mL) vermischt und wie in Abschnitt 4.2.1 beschrieben auf die Sponceram[®]-Keramiken aufgetragen. Nach der vollständigen Trocknung der Kompositmaterialien bei 37 °C wurden diese in PBS inkubiert. Über einen Zeitraum von 168 Stunden wurden zu fünf verschiedenen Zeitpunkten Proben (150 µL) der die Keramiken umgebenden Lösung entnommen. Die darin enthaltene

Konzentration RNase-FITC wurde mit Hilfe des Fluoreszenzlesegeräts (Anregung: 485 nm, Emission: 535 nm) bestimmt.

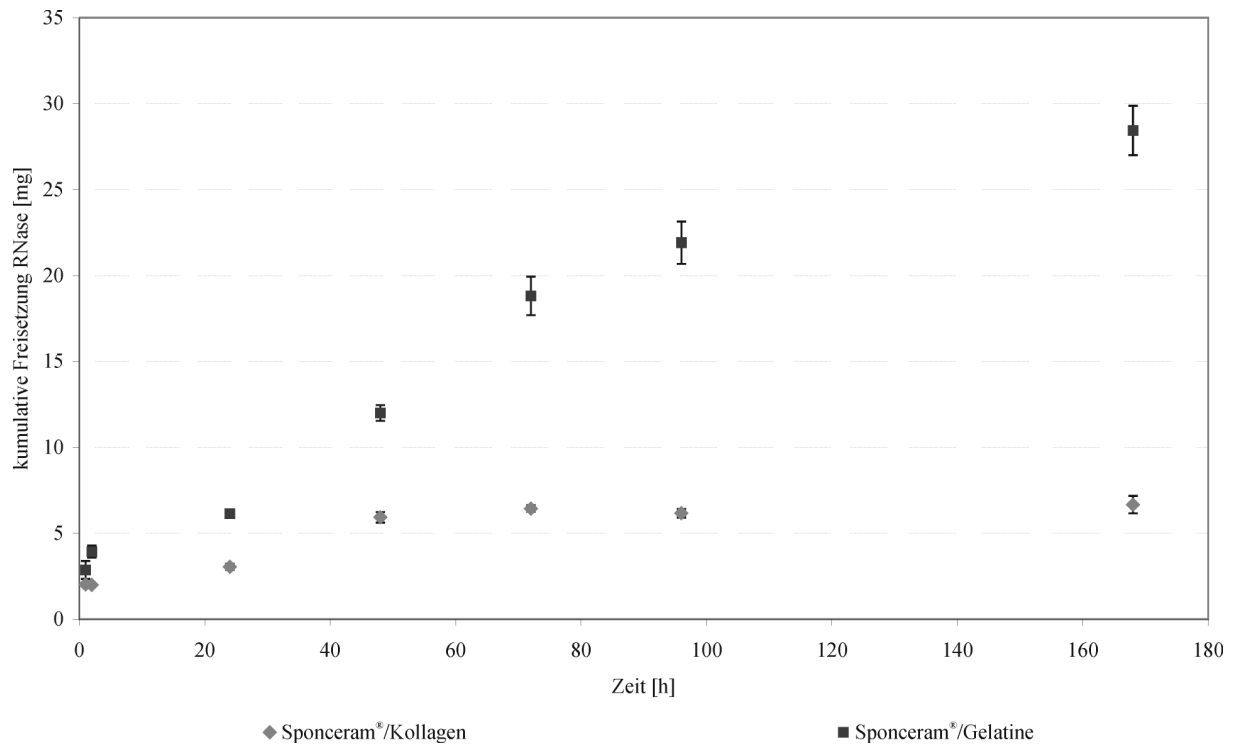


Abbildung 4-42: Zeitliche Freisetzung von RNase aus dem Kompositmaterial Sponceram®/Kollagen.

In Abbildung 4-42 ist die Freisetzung von RNase-FITC aus den Kompositmaterialien Sponceram®/Kollagen und Sponceram®/Gelatine dargestellt. Die Freisetzung aus beiden Matrixmaterialien nimmt zunächst mit der Zeit zu, bis ein konstanter Wert erreicht wird. An diesem Punkt ist die gesamte in die Matrizes eingeschlossene Menge an RNase freigesetzt worden. Aus den Gelatine-Matrizes wird gegenüber Kollagen etwa die vierfache Menge an RNase freigesetzt. Dieser Befund korreliert mit dem Ergebnis, dass die Menge an Gelatine, die nach der Beschichtung auf der Sponceram®-Oberfläche anhaftet, die Menge an Kollagen deutlich übersteigt (Abbildung 4-39; Abbildung 4-40). Das Plateau der RNase-Freisetzung wird beim Sponceram®/Gelatine-Komposit später erreicht, die vollständige Freisetzung nimmt aufgrund der größeren Beschichtungsmenge mehr Zeit in Anspruch.

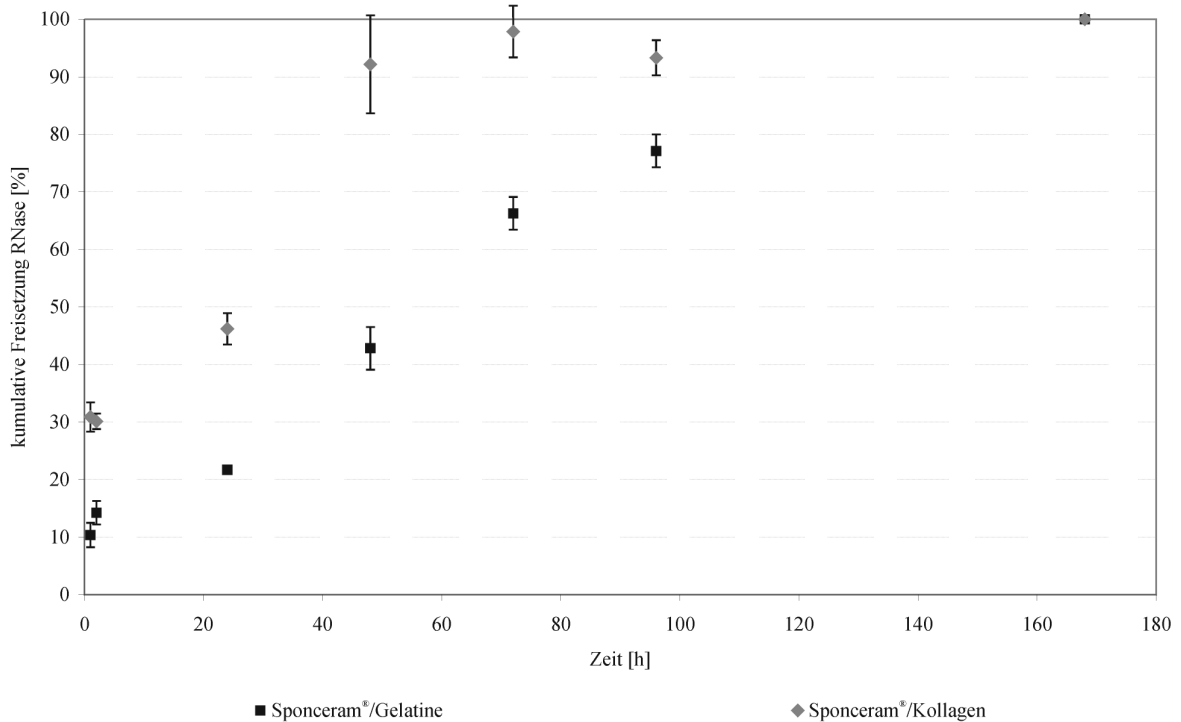


Abbildung 4-43: Zeitliche Freisetzung von RNase aus dem Kompositmaterial Sponceram®/Kollagen, bezogen auf die freigesetzte Gesamtmenge RNase nach 162 Stunden.

In Abbildung 4-43 ist die prozentuale Freisetzung der RNase gezeigt. Es wird deutlich, dass sich beide Kurvenverläufe stark ähneln. Die vollständige Freisetzung von RNase aus Sponceram®/Kollagen ist nach ca. 50 Stunden, aus Sponceram®/Gelatine nach ca. 100 Stunden erreicht.

Fazit: Die Beschichtung von Sponceram® mit Gelatine oder Kollagen führt zu Kompositmaterialien, die für die kontrollierte Freisetzung bioaktiver Komponenten verwendet werden können. Die Freisetzung des eingeschlossenen Proteins war dabei nicht von der Art der Polymermatrix (Gelatine, Kollagen) sondern nur von dessen Beschichtungsmenge abhängig. Die erfolgreiche Kultivierung von MC3T3-E1-Zellen auf den beschichteten Keramiken zeigt ihre Eignung als Biomaterial. Die Zahl der adhärenierten Zellen war auf Sponceram®/Gelatine gegenüber unbehandeltem Sponceram® und Sponceram®/Kollagen erniedrigt. Vermutlich verringert die Gelatinebeschichtung die Porosität der Keramik, so dass ein dreidimensionales Wachstum der Zellen erschwert wird.

4.3. MIKROSPHÄREN

In Abschnitt 4.1 und 4.2 wurden zwei Ansätze für die Funktionalisierung von Sponceram[®] mit bioaktiven Molekülen beschrieben, indem diese mit Hilfe von Spacermolekülen auf der Oberfläche der Keramik adsorbiert oder in eine auf die Keramik aufgebrachte Matrixschicht eingebettet wurden.

Weiterhin ist es möglich die bioaktiven Moleküle in Polymermaterialien zu verkapseln und die resultierenden Mikrosphären in die Keramik einzubringen (vgl. Abschnitt 3.2.2). Die Verteilung der beladenen Polymerpartikel im gesamten dreidimensionalen Konstrukt kann zu einer gleichmäßigen Versorgung der adhären Zellen beitragen. Die poröse Struktur der Keramik wird durch die eingebrachten Mikrosphären vermutlich weniger beeinträchtigt, als dies bei der vollständigen Beschichtung der Keramikoberfläche mit einer polymeren Matrix der Fall ist (vgl. Abschnitt 4.2.3).

In Kooperation mit dem Technion Israel Institute of Technology (Prof. Marcelle Machluf, Haifa, Israel) wurden auf der Basis von Sponceram[®] Kompositmaterialien entwickelt, auf die mit BMP-2 beladene PLGA-Mikrosphären aufgebracht wurdenⁱⁱⁱ. In Abbildung 4-44 sind rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Sponceram[®]/PLGA-Mikrosphären gezeigt. Es ist deutlich zu erkennen, dass sich die PLGA-Mikrosphären in den Vertiefungen der Sponceram[®]-Keramik befinden.

ⁱⁱⁱ Die Mikrosphären wurden im Rahmen des Niedersächsisch-israelischen Forschungsprojektes „Tailor-made functionalized biomaterials for bone tissue generation“ angefertigt.

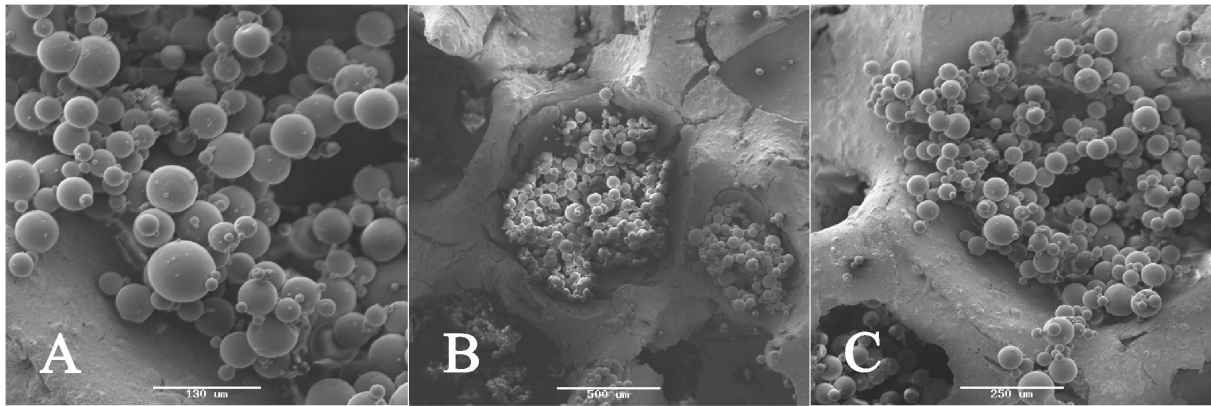


Abbildung 4-44: REM-Aufnahmen der Sponceram[®]/PLGA-Mikrosphären, angefertigt am Technion Israel Institute of Technology. Vergrößerungen: A: 200-fach, B: 50-fach, C: 100-fach

PLGA, Polylactid-co-Glycolid (Abbildung 4-45), ist ein biokompatibles und bioabbaubares Copolymer, das geringe Toxizität und Immunogenität aufweist¹⁴⁰. Abhängig vom Monomeren-Verhältnis (Lactid:Glycolid) können PLGA-Polymere unterschiedlicher Eigenschaften hergestellt werden. So ist die Geschwindigkeit des hydrolytischen Abbaus abhängig von diesem Verhältnis: Je größer der Anteil an Glycolid-Monomeren ist, desto geringer ist die notwendige Degradationszeit¹⁴⁰.

PLGA ist für *in vivo* Anwendungen besonders geeignet, da die bei der Hydrolyse des Polymers resultierenden Produkte Milchsäure und Glycolsäure Nebenprodukte zahlreicher metabolischer Reaktionen sind und über den Citratzyklus als CO₂ sowie im Urin als Wasser ausgeschieden werden¹⁴¹. PLGA ist aufgrund seiner Eigenschaften das am häufigsten verwendete Polymer für die Einkapselung von Medikamenten und Proteinen^{46, 58}.

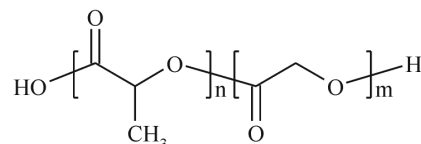


Abbildung 4-45: Struktur von Polylactid-co-Glycolid (PLGA)

Die Erosion von biodegradierbaren Polymeren kann auf zwei Wegen erfolgen (vgl. auch Abschnitt 3.2.2): Der Abbau kann von der Oberfläche aus beginnen (*surface erosion*). Dabei läuft der Abbau des Polymers schneller ab, als Wasser in die Matrix eindringen kann. Anders

verläuft der Quellungsabbau (*bulk erosion*). Hier wird das Wasser sehr schnell in die Matrix aufgenommen, so dass das Polymer quillt und innerhalb der gesamten Matrix abgebaut wird. PLGA-Mikrosphären werden unter physiologischen Bedingungen durch letzteren Vorgang abgebaut, wobei nach der Aufnahme von Wasser und anschließender Quellung die Esterbindungen hydrolytisch gespalten werden^{57, 142}. Enzymatische Prozesse spielen bei der Degradation von PLGA vermutlich keine Rolle¹⁴⁰. Die Degradation ist auf drei Mechanismen zurückzuführen: Spaltung von Quervernetzungen, Hydrolyse oder Protonierung von Seitengruppen sowie die Spaltung von Ketten.

Moleküle, die in PLGA-Polymere eingeschlossen sind, zeigen einen triphasischen Freisetzungsvorgang. Zunächst zeigt sich eine initial hohe Freisetzung (*initial burst effect*), da zuerst solche Moleküle freigesetzt werden, die sich auf oder in der Nähe der Oberfläche befinden. Anschließend werden nur wenige Moleküle freigesetzt, da diese durch Diffusion aus der Matrix gelangen müssen. Mit dem Beginn der Polymererosion wird die Freisetzung erneut beschleunigt¹⁴³.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Sponceram[®]-Keramiken untersucht, auf denen beidseitig 1 mg PLGA aufgebracht wurden. Die enthaltene BMP-2-Konzentration betrug 0,25 µg/mg PLGA, das molare Copolymer-Verhältnis des PLGA 50:50 (Lactid:Glycolid). Die Herstellung der Sponceram[®]/PLGA-Mikrosphären ist im Anhang 6.5.1) beschrieben.

4.3.1. KINETIK DER FREISETZUNG

Im Technion Israel Institute of Technology wurde die Freisetzung von BMP-2 aus den PLGA-Mikrosphären mit Hilfe eines BMP-2-ELISA gemessen. Die Freisetzung wurde sowohl aus den freien Mikrosphären als auch aus den auf Sponceram[®] aufgetragenen Mikrosphären bestimmt. Dazu wurden die Proben unter Schütteln bei 37 °C in PBS inkubiert und die Menge an BMP-2 in der überstehenden Lösung in regelmäßigen Intervallen (alle 2 - 3 Tage) bestimmt.

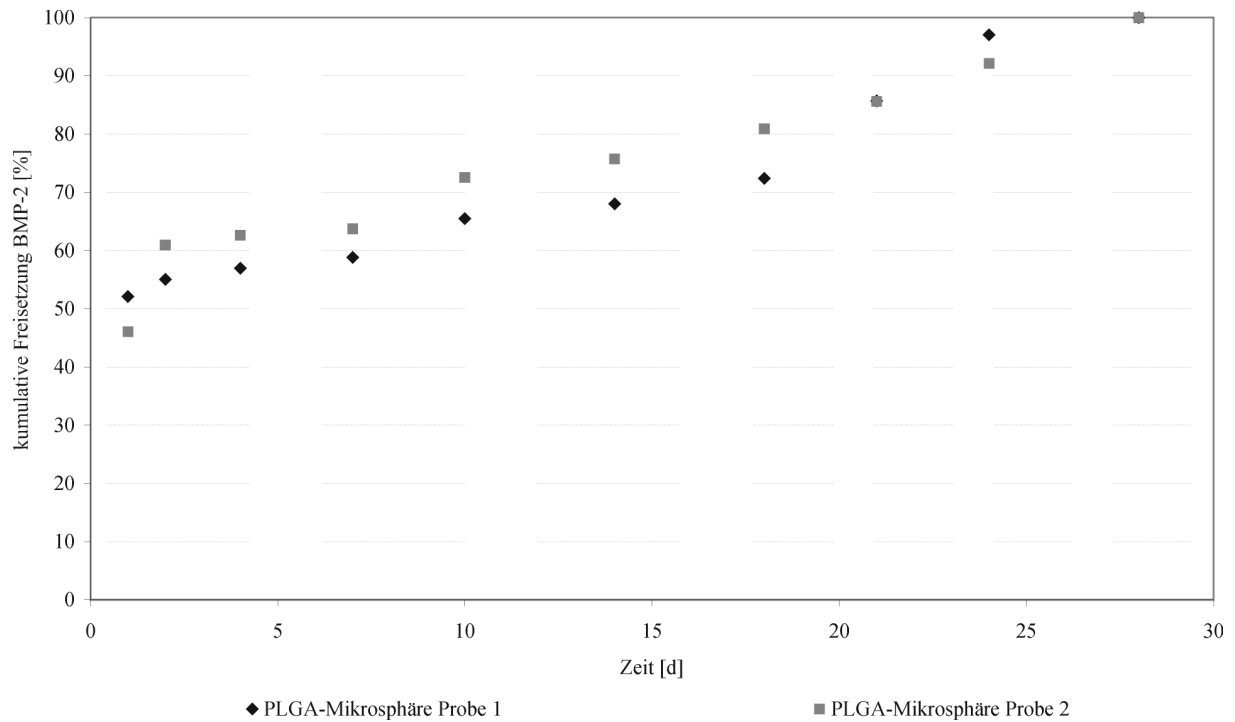


Abbildung 4-46: Kumulative, zeitliche Freisetzung von BMP-2 aus PLGA-Mikrosphären. Die Werte sind angegeben als die Ergebnisse einer Einfachbestimmung ($n = 1$)

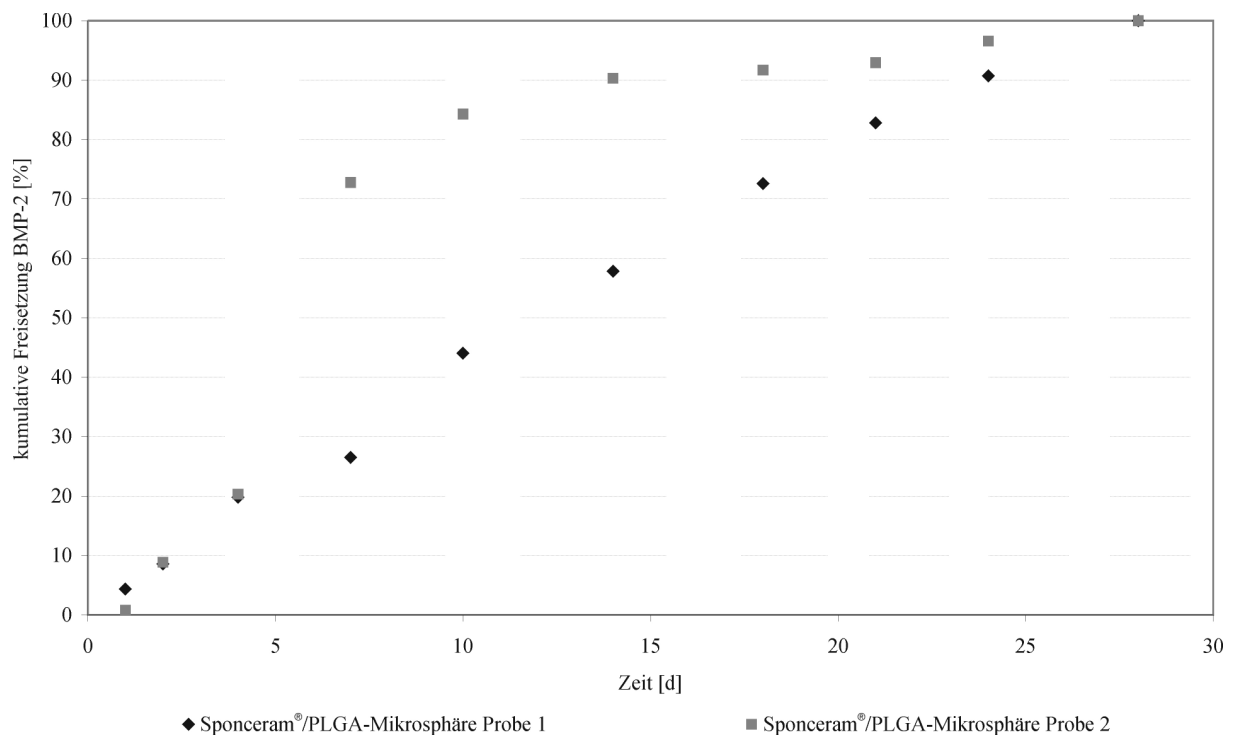


Abbildung 4-47: Kumulative, zeitliche Freisetzung von BMP-2 aus Sponceram®/PLGA-Mikrosphären. Die Werte sind angegeben als die Ergebnisse einer Einfachbestimmung ($n = 1$).

In Abbildung 4-46 wird deutlich, dass bei der Freisetzung von BMP-2 aus den freien Mikrosphären der *initial burst effect* auftritt. Innerhalb der ersten 24 Stunden werden ca. 50 % des eingeschlossenen Wachstumsfaktors freigesetzt. Anschließend verläuft die Abgabe kontinuierlich aber wesentlich langsamer, bis sich nach 30 Tagen die gesamte eingeschlossene Menge an BMP-2 in Lösung befindet.

Im Fall der Sponceram[®]/PLGA-Mikrosphären zeigt die Freisetzung des eingeschlossenen BMP-2 bei zwei untersuchten Proben deutlich unterschiedliche Verläufe (Abbildung 4-47). Eine der beiden Proben zeigt ebenso wie die freien Mikrosphären eine verstärkte Freisetzung zu Beginn der Inkubation, die im Vergleich dazu jedoch verzögert auftritt. Nach einwöchiger Inkubation sind etwa 70 % des eingeschlossenen BMP-2 freigesetzt, eine beschleunigte Abgabe tritt jedoch nicht bereits am ersten Tag sondern erst an Tag 5 – 7 ein. Im Vergleich zu den freien PLGA-Mikrosphären zeigt sich nach einer Woche eine größere Freisetzung (Anstieg um 10 %), dieser Befund ist jedoch vermutlich auf unterschiedliche Konzentrationen der PLGA-Mikrosphären (Inhomogenitäten bei der Beschichtung) zurückzuführen. Die zweite Probe der Sponceram[®]/PLGA-Mikrosphären zeigt eine kontinuierliche Abgabe von BMP-2, ein *initial burst effect* ist nicht zu beobachten. Dieses gegenüber der ersten Sponceram[®]/PLGA-Mikrosphäre veränderte Freisetzungsprofil ist vermutlich auf Adsorptionseffekte des BMP-2 auf der Keramikoberfläche zurückzuführen.

4.3.2. ZELLKULTURUNTERSUCHUNGEN

Für eine erste Beurteilung des differenzierungs-induzierenden Potentials der Sponceram[®]/PLGA-Mikrosphären wurden diese mit MC3T3-E1-E1-Zellen besiedelt und über einen Zeitraum von 15 Tagen mit Standardmedium kultiviert (detaillierte Durchführung s. Anhang 4.3.2). Als Referenzmaterial diente unbehandeltes Sponceram[®]. Nach beendeter Kultivierung wurden die Keramikmaterialien mit Alizarinrot gefärbt, um Calcium in der extrazellulären Matrix nachzuweisen (s. Anhang 6.3.8).

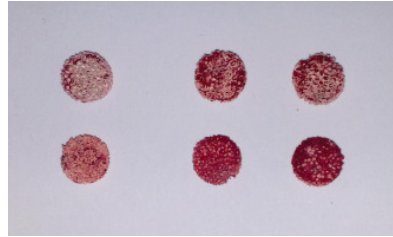


Abbildung 4-48: Alizarinrot-Übersichtsfärbungen von MC3T3-E1-Zellen kultiviert über einen Zeitraum von 15 Tagen. Oben: Sponceram[®]/PLGA-Mikrosphäre, unten: Sponceram[®] (links: Referenz, mitte und rechts: besiedelte Proben)

In Abbildung 4-48 sind die Ergebnisse der Alizarinrot-Färbungen beider Materialien als Übersichtsaufnahmen gezeigt. Sowohl auf unbehandeltem Sponceram[®] als auch auf den Sponceram[®]/PLGA-Mikrosphären konnte Calcium nachgewiesen werden.

Der Vergleich der Färbungen zeigt, dass auf den Sponceram[®]/PLGA-Mikrosphären (Abbildung 4-50) Teilbereiche intensiver gefärbt sind als auf unbehandeltem Sponceram[®] (Abbildung 4-49). Möglicherweise waren an diesen Stellen der intensiven Calciumdeposition die PLGA-Mikrosphären lokalisiert (vgl. Abbildung 4-49). Da die Hintergrundfärbung von Sponceram[®] intensiver ausfällt als die der Sponceram[®]/PLGA-Mikrosphären, ist die restliche Färbung der Proben (intensiv gefärbte Teilbereiche ausgenommen) als vergleichbar anzusehen (Abbildung 4-48).

Das Ergebnis der Alizarinrotfärbung lässt vermuten, dass MC3T3-E1-Zellen bereits durch die Topographie der Keramikoberfläche zur osteogenen Differenzierung angeregt werden können. Die Inkooperation von BMP-2 beladenen PLGA-Mikrosphären in die Keramik scheint die Deposition von Calcium zu verstärken.

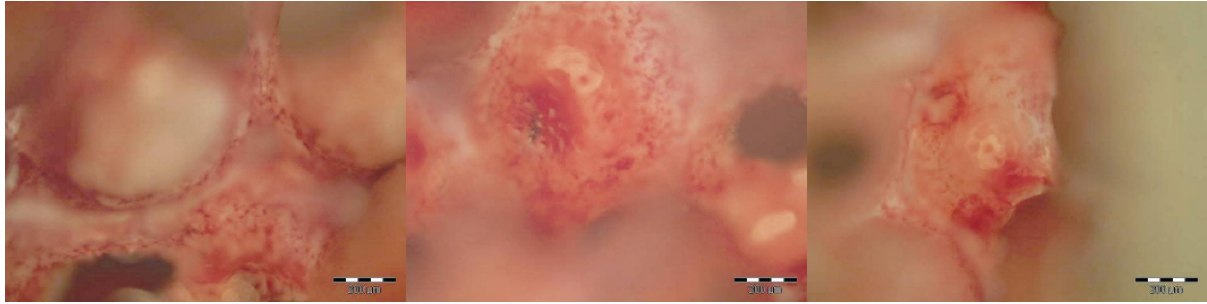


Abbildung 4-49: Alizarinrot-Färbung von MC3T3-E1-Zellen auf Sponceram[®], kultiviert über einen Zeitraum von 15 Tagen

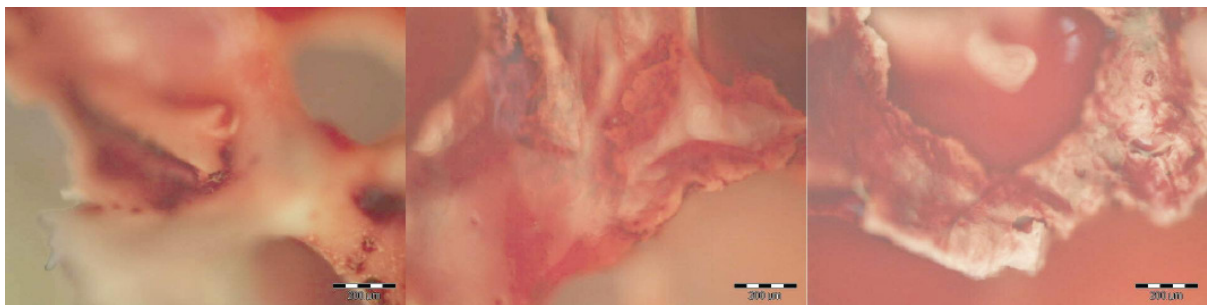


Abbildung 4-50: Alizarinrot-Färbung von MC3T3-E1-Zellen auf Sponceram[®]/PLGA-Mikrosphären, kultiviert über einen Zeitraum von 15 Tagen

Zur weiteren Veranschaulichung wurden die bereits gefärbten Proben mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie untersucht (s. Anhang 6.3.10). In Abbildung 4-51 sind die Aufnahmen der zellbesiedelten Sponceram[®]/PLGA-Mikrosphären gezeigt. Es sind deutlich kristalline Strukturen erkennbar (A - D), die auf den adsorbierten Farbstoff zurückzuführen sind. Darunter befinden sich möglicherweise einzelne Zellen (E), auf der Keramikoberfläche sind jedoch keine Zellen oder Gewebestrukturen zu erkennen. Da auf der unbesiedelten Referenz (F) kaum kristalline Strukturen erkennbar sind, ist es unwahrscheinlich, dass der Farbstoff auf der Keramik adsorbiert wird ohne eine Reaktion mit auf der Oberfläche der Keramik befindlichen Calciumionen einzugehen.

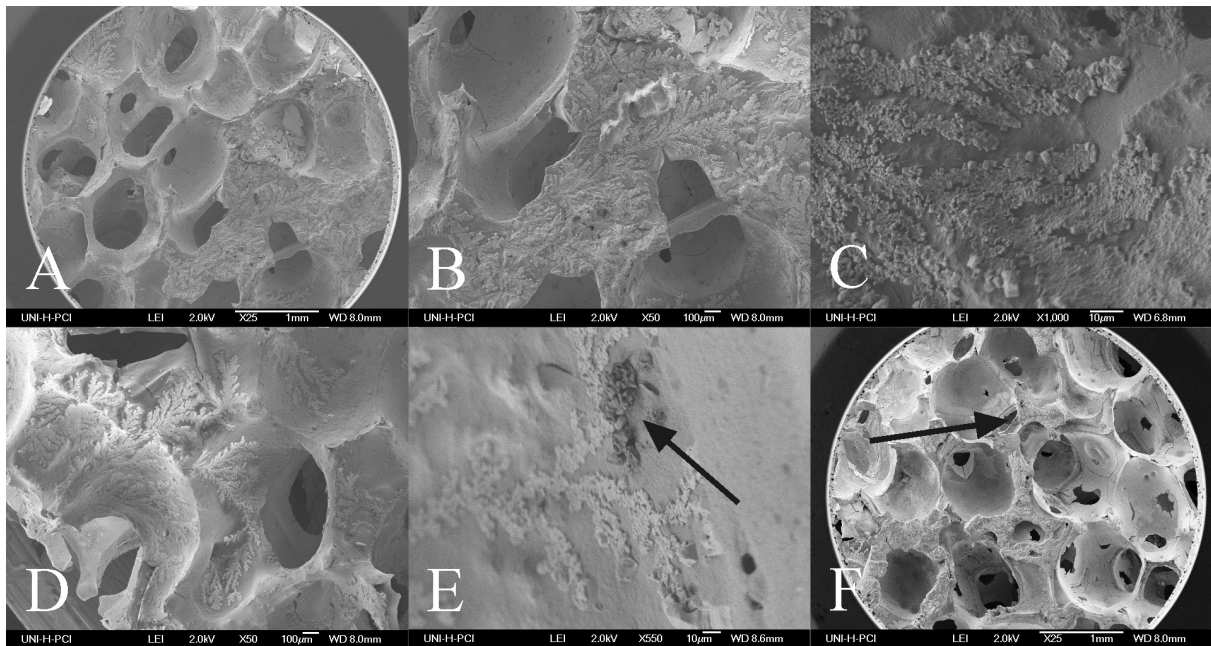


Abbildung 4-51: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der mit MC3T3-E1-Zellen besiedelten und über einen Zeitraum von 15 Tagen kultivierten Sponceram[®]/PLGA-Mikrosphären. Vergrößerungen: A: 25-fach; B, D: 50-fach; C: 1000-fach, E: 550-fach, F: 25-fach (unbesiedelte Referenz)

In Abbildung 4-52 sind die REM-Bilder der parallel kultivierten Sponceram[®] Keramiken zu sehen. Auf diesen Proben ist deutlich weniger Kristallbildung erkennbar, jedoch können sowohl Zellen als auch Gewebestrukturen (B - E) erkannt werden. Auf diesen Strukturen haben sich Kristalle des Farbstoffs abgelagert (C – E) was dafür spricht, dass die Zellen an diesen Stellen offenbar Calcium sezerniert haben. Dieser Befund korreliert mit dem Ergebnis der Alizarinrotfärbung, dass die verwendeten MC3T3-E1-Zellen offenbar bereits durch die Topographie der Sponceram[®]-Oberfläche zur osteogenen Differenzierung angeregt werden können. Die mit Alizarinrot gefärbte, unbesiedelte Sponceram[®]-Keramik (F) zeigt im Gegensatz zur unbesiedelten Sponceram[®]/PLGA-Mikrosphäre stärkere Kristalldepositionen.

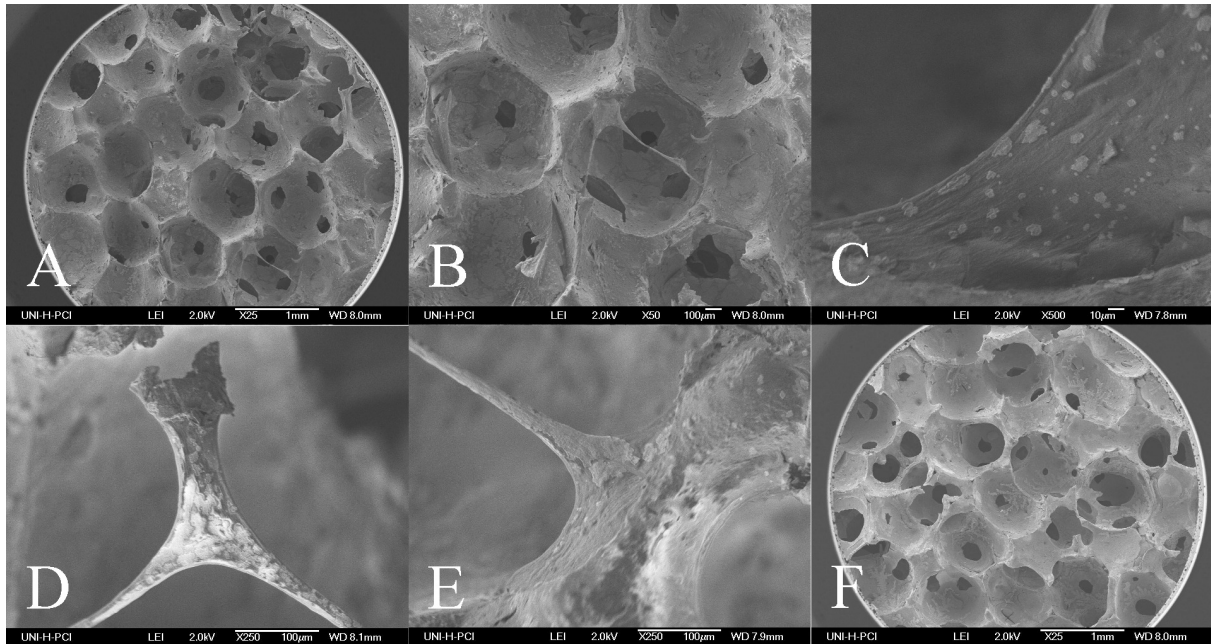


Abbildung 4-52: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der mit MC3T3-E1-Zellen besiedelten und über einen Zeitraum von 15 Tagen kultivierten Sponceram®-Keramiken. Vergrößerungen: A: 25-fach; B: 50-fach; C: 500-fach, D, E: 200-fach, F: 25-fach (unbesiedelte Referenz)

Fazit: Eine abschließende Beurteilung der Sponceram®/PLGA-Mikrosphären ist mit Hilfe der angewendeten Methoden nur sehr eingeschränkt möglich. Mit Hilfe der Alizarinrotfärbung konnte sowohl auf Sponceram® als auch auf den Sponceram®/PLGA-Mikrosphären offenbar Calcium nachgewiesen werden. Die verwendete Modellzelllinie MC3T3-E1 lässt sich demnach bereits durch eine geeignete Struktur und Topographie des verwendeten Biomaterials zur Differenzierung entlang der osteogenen Linie anregen. Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der Sponceram®-Matrix bestätigten das Ergebnis der histologischen Färbung. Es konnten Zellen sowie gewebeartige Strukturen erkannt werden, auf denen zum Teil Farbstoffkristalle zu erkennen waren. An diesen Stellen haben die Zellen demnach Calcium in die extrazelluläre Matrix sezerniert. Auf den REM-Aufnahmen der Sponceram®/PLGA-Mikrosphären konnten keine Zellen oder Gewebestrukturen nachgewiesen werden, dafür waren hier große Bereiche der Matrix mit kristallinen Strukturen überzogen. Auf den unbesiedelten Sponceram®/PLGA-Mikrosphären konnten hingegen kaum Kristalle gesehen werden. Möglicherweise sind einzelne Zellen von der Kristallschicht abgedeckt. Die offenbar geringe Zellzahl kann damit zusammenhängen, dass die Differenzierung der Zellen durch das freigesetzte BMP-2 direkt nach der Aussaat induziert wird und die Zellen somit vermutlich nur wenig bzw. gar nicht proliferieren.

Ein Vergleich der REM-Bilder der beiden unbesiedelten, mit Alizarinrot gefärbten Proben zeigt, dass auch auf Sponceram[®] Kristallbildung zu beobachten ist, auf den Sponceram[®]/PLGA-Mikrosphären hingegen kaum. Offenbar hat der Herstellungsprozess/die Beladung der Keramik mit den Mikrosphären Einfluss auf die Eigenschaften der Keramikoberfläche. Eine Veränderung der Keramikoberfläche wiederum kann neben der Adsorption des Farbstoffs auch die Zelladhäsion beeinflussen, so dass nicht abschließend beurteilt werden kann aus welchem Grund auf den REM-Bildern der Sponceram[®]/PLGA-Mikrosphären keine Zellen zu erkennen sind.

Um die unterschiedlichen Ergebnisse interpretieren zu können, wäre die Untersuchung der zellbesiedelten Materialien mit molekularbiologischen Methoden (z.B. PCR) hilfreich. Limitierend sind jedoch die geringe Größe der Sponceram[®]-Discs, da die erreichbaren Zellzahlen für die Methode der PCR nicht ausreichend sind. Die Verwendung von Sponceram[®]-Scheiben mit einem Durchmesser von 65 mm kann diese Problematik überwinden. Die Kultivierung der Scheiben im Z[®]RP-Reaktorsystem unter dynamischen Bedingungen unterstützt weiterhin die osteogene Differenzierung, so dass die durch das BMP-2 hervorgerufenen Effekte unterstützt werden sollten.

5. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Obwohl Knochen ein Gewebe ist, das die Fähigkeit zur Selbstheilung und Regeneration besitzt, können Defekte, die ein kritisches Ausmaß überschreiten, nicht von selbst ausheilen. Zur Überbrückung solcher Defekte wird derzeit hauptsächlich allogenes oder autologes Knochenmaterial verwendet, dessen Anwendung aufgrund der Entnahmemengen bzw. der Gefahr von Immunreaktionen und Infektionen nur eingeschränkt möglich ist. *Das Tissue Engineering* beschäftigt sich mit der Entwicklung von funktionellen Knochenersatzkonstrukten, die aus geeigneten Gerüstmaterialien und lebenden Zellen bestehen. Aufgrund ihrer mechanischen Eigenschaften werden im Bereich der Hartgeweberegeneration hauptsächlich Keramikmaterialien verwendet, die im Allgemeinen jedoch nur eingeschränkt bioaktiv sind. Durch Entwicklung geeigneter Funktionalisierungsmethoden können sie in biomimetische Kompositmaterialien mit steuerbaren Eigenschaften überführt werden.

In dieser Arbeit wurde eine makroporöse Zirkoniumdioxid-Keramik (Sponceram[®]) als Basismaterial verwendet, um funktionelle Knochenersatzmaterialien zu entwickeln. Sponceram[®] besitzt eine Porosität von 85 % sowie eine durchschnittlichen Porengröße von 600 µm und erfüllt damit die Anforderungen an ein Biomaterial um eine ausreichende Nährstoffversorgung der Zellen und den Abtransport von Stoffwechselprodukten zu gewährleisten. In der Literatur werden Porendurchmesser von 150 – 900 µm als erforderlich beschrieben²⁴. Zirkoniumdioxid ist ein biokompatibles und -inertes Material, das bereits als Implantatmaterial verwendet wird³⁸. Durch Funktionalisierung mit entsprechenden Signalmolekülen können dem Material bioaktive Eigenschaften verliehen werden.

In dieser Arbeit wurde die Funktionalisierung der Keramik auf drei unterschiedlichen Wegen realisiert. Poly-L-Lysin als adhäsionsfördernder Faktor und der osteogene Wachstumsfaktor BMP-2 wurden zunächst mit Hilfe von Polymeren auf der Keramikoberfläche immobilisiert. Da eine zu große Nähe der bioaktiven Liganden zur Keramik eine Einschränkung ihrer Flexibilität und damit einen Verlust der bioaktiven Eigenschaften zur Folge haben kann^{73, 74}, wurden die Polymere Poly(2-Desoxy-N-methacrylamido-D-glucose) (p(MAG)) und Poly(2-Desoxy-N-methacrylamido-D-glucose-co-N-Vinylpyrrolidon-co-Acrolein) (p(MVA)) als Spacermoleküle verwendet, um die bioaktiven Liganden von der Keramikoberfläche zu

distanzieren. Die Liganden wurden kovalent an die Polymere gebunden und die resultierenden Konjugate durch Adsorption auf Sponceram[®] immobilisiert. Die Konjugate wurden qualitativ und quantitativ untersucht, ihre Adsorption wurde mit Hilfe von XPS-Messungen nachgewiesen. In statischen Zellkulturuntersuchungen konnte die proliferationsfördernde Wirkung der Poly-L-Lysin enthaltenden Kompositmaterialien nachgewiesen werden. Bei der verwendeten Modellzelllinie MC3T3-E1 war der erwünschte Effekt aufgrund der großen Proliferationskapazität der Zellen nur zu Beginn der 14-tägigen Kultivierung zu beobachten, bei Verwendung autologer Stammzellen sollte die Wirkung jedoch stärker in Erscheinung treten. Um das differenzierungsinduzierende Potential des BMP-2 enthaltenden Kompositmaterials Sponceram[®]/ox.p(MAG)-BMP-2 zu untersuchen, wurden mesenchymale Stromazellen aus humanem Fettgewebe über einen Zeitraum von 50 Tagen in einem speziellen Drehbett-Bioreaktorsystem (Z[®]RP500) kultiviert. Als Referenzmaterial diente eine in BMP-2-Lösung inkubierte Sponceram[®]-Scheibe. Auf beiden Materialien konnte mit Hilfe von histologischen Färbungen und der Genexpressions-Analyse knochenspezifischer Marker (Kollagen I, alkalische Phosphatase, Osteopontin) die osteogene Differenzierung der kultivierten Zellen nachgewiesen werden. In rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden Zell- und Gewebestrukturen erkannt. Obwohl keine relevanten Unterschiede der osteogenen Differenzierung auf beiden Materialien festgestellt wurden, ist als Vorteil des entwickelten Kompositmaterials zu erwähnen, dass neben den bereits erwähnten bioaktiven Liganden weitere Signalmoleküle genutzt werden können um ein Biomaterial mit definierten Eigenschaften zu erhalten.

Im Bereich der Bioreaktortechnik ist die Entwicklung von Einwegreaktoren (*disposable*) ein zentrales Thema. Durch *disposable* Kunststoffreaktoren sollen Kontaminationsrisiken minimiert und der Kultivierungsablauf (durch entfallende Reinigung und Sterilisation) vereinfacht werden¹⁰¹. In dieser Arbeit wurde ein Einwegreaktor (Z[®]RPD) untersucht, der auf dem bereits verwendeten Z[®]RP-Reaktor beruht. Das bereits im Bioreaktor untersuchte Kompositmaterial Sponceram[®]/ox.p(MAG)-BMP-2 wurde erneut verwendet um darauf humane mesenchymale Stromazellen im Z[®]RPD-System zu kultivieren. Die osteogene Differenzierung der Zellen konnte nach einem Kultivierungszeitraum von 47 Tagen mit Hilfe histologischer Färbungen und PCR-Analyse nachgewiesen werden. Der Einwegbioreaktor zeigt demnach gegenüber dem konventionellen Z[®]RP500-Reaktor keine Einschränkungen in der Eignung für die Zellkultivierung. Bei der Verwendung einer geringen Anzahl von

Sponceram[®]-Scheiben ist der Z[®]RPD-Reaktor aufgrund seines geringeren Innenraumvolumens zu bevorzugen.

In einem zweiten Ansatz zur Funktionalisierung wurde Sponceram[®] mit Gelatine und Kollagen beschichtet. Die Polymere sollten als Einschlussmatrizes für bioaktive Komponenten dienen, um ein Kompositmaterial zu erhalten, aus dem diese kontrolliert freigesetzt werden. Sowohl Kollagen als auch Gelatine konnten auf die Matrix aufgebracht werden, wobei die Menge der anhaftenden Gelatine größer war. Die kontinuierliche Freisetzung der als Modellprotein verwendeten RNase konnte aus beiden Polymermatrizes nachgewiesen werden, wobei nicht die Art der Matrix sondern nur die Beschichtungsmenge einen Einfluss auf die Freisetzungsdauer hatte. Die erfolgreiche Kultivierung von MC3T3-E1-Zellen auf den hergestellten Kompositmaterialien zeigte ihre Eignung als Biomaterial. Die Beschichtung mit Gelatine führte jedoch offenbar zu einem Verschluss der Porenstruktur der Keramik, so dass das dreidimensionale Wachstum der Zellen eingeschränkt wurde.

In Kooperation mit dem Technion Israel Institute of Technology wurden auf Basis von Sponceram[®] Kompositmaterialien hergestellt, die mit BMP-2 beladenen PLGA-Mikrosphären bestückt wurden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, inwieweit die Sponceram[®]/PLGA-Mikrosphären die osteogene Differenzierung von Zellen initiieren. Nach 15-tägiger Kultivierung von MC3T3-E1-Zellen konnte sowohl auf den Sponceram[®]/PLGA-Mikrosphären als auch auf unbehandeltem Sponceram[®] von den Zellen sezerniertes Calcium mit Hilfe von histologischen Färbungen nachgewiesen werden. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten auf nicht modifiziertem Sponceram[®] Zellen und gewebeartige Konstrukte sowie Kristalle des adsorbierten Farbstoffs. Auch das Kompositmaterial war in großen Bereichen von Farbstoff-Kristallen überzogen, Zellen jedoch konnten nicht nachgewiesen werden. Möglicherweise wurden auf der Keramik befindliche Zellen durch die Adsorption des Farbstoffs bedeckt. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass durch die Modifikation der Keramik mit den PLGA-Mikrosphären die Oberfläche der Keramik so verändert wird, dass sowohl die Adsorption des Farbstoffs als auch die Zelladhäsion beeinflusst werden. Eine abschließende Beurteilung der erhaltenen Ergebnisse ist nicht möglich. Molekularbiologische Untersuchungen sollten genutzt werden, um zu klären, ob die Sponceram[®]/PLGA-Mikrosphären die osteogene Differenzierung von Zellen induzieren.

In der vorliegenden Arbeit wurden unterschiedliche Methoden zur Funktionalisierung der makroporösen Zirkoniumdioxidkeramik Sponceram[®] entwickelt. Die Herstellung eines Kompositmaterials mit Hilfe von polysaccharidbasierten Polymeren und bioaktiven Liganden konnte etabliert werden und die erwünschten Eigenschaften in statischen und dynamischen Zellkulturuntersuchungen nachgewiesen werden. Die Eignung von Kollagen- und Gelatinebeschichtungen für den Einschluss bioaktiver Moleküle konnte erwiesen werden.

Die verwendete makroporöse Keramik Sponceram[®] ist ein bioinertes, *in vivo* dauerhaft beständiges Material. Für die Überbrückung großer Defekte kann eine permanente Stützfunktion erforderlich sein, die große Porosität des Materials und die damit verbundene begrenzte Stabilität schränken jedoch die Anwendung auf Bereiche ein, die nicht allzu großen mechanischen Belastungen ausgesetzt sind. Eine denkbare Anwendung der in dieser Arbeit entwickelten, funktionellen Kompositmaterialien ist die Verwendung als Implantatmaterial. Eine poröse, funktionalisierte Oberfläche der Keramik erleichtert die Integration des Implantats in das umliegende Gewebe. Durch einen Porositätsgradienten (hohe Porosität an der Oberfläche, kompaktes Material im Innern) ist die Stabilität des Implantats gewährleistet.

Eine weitere interessante Perspektive besteht in der Übertragung der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methoden der Funktionalisierung auf degradierbare poröse Keramikmaterialien. Zu den abbaubaren Keramiken zählen z.B. Tricalciumphosphat, Hydroxylapatit und bioaktive Gläser, die zwar osteokonduktive, aber keine osteoinduktiven Eigenschaften besitzen. Durch Anwendung der entwickelten Methoden erhalten die temporären Knochenersatzmaterialien die erwünschten bioaktiven Charakteristiken. Durch die Osteoinduktion der *in vivo* das Ersatzmaterial umgebenden Zellen wird das degradierende Material durch natürlichen Knochen ersetzt.

6. ANHANG

6.1. STATISTISCHE ÜBERPRÜFUNG VON MESSWERTEN

Die Messergebnisse der einzelnen Messreihen wurden statistisch mit Hilfe des t-Tests überprüft: Der t-Test liefert einen Wahrscheinlichkeitswert p , der angibt, mit welcher Wahrscheinlichkeit die Mittelwerte zweier Messgruppen gleich sind. Bei einem Wahrscheinlichkeitswert, der kleiner als 0,05 ($p < 0,05$) ist, ist die Wahrscheinlichkeit, dass sich zwei Mittelwerte signifikant unterscheiden, größer als 95 %.

Als Voraussetzung für den t-Test gilt, dass die untersuchten Grundgesamtheiten normalverteilt und die Standardabweichungen als annähernd gleich angesehen werden können. Die zu untersuchenden Messwerte einer Gruppe wurden mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests auf Normalverteilung untersucht. Waren die Messwerte einer Gruppe nicht normalverteilt, wurde der Mann-Whitney-U-Test zur statistischen Überprüfung verwendet.

6.2. VERWENDETE ZELLEN

MC3T3-E1

Die verwendete Zelllinie MC3T3-E1 wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) bezogen. Die Zellen wurden ursprünglich aus dem Schädeldach eines Mäuseembryos isoliert. Sie werden morphologisch als Fibroblasten-ähnliche, als Monolayer adhärent wachsende Zellen beschrieben und sind in der Lage zu Osteoblasten zu differenzieren sowie Kollagen zu synthetisieren. Sie werden in Standardkulturmedium kultiviert und ein- bis zweimal pro Woche mit Trypsin passagiert (Verdünnung 1:10).

Humane mesenchymale Stromazellen

Die in dieser Arbeit verwendeten humanen mesenchymalen Stromazellen wurden aus Fettgewebe isoliert. Es kamen Zellen zweier Spender zum Einsatz, die von der Blutspendezentrale Linz (Oberösterreichisches Rotes Kreuz) sowie von der Klinik für Plastische, Hand- und Wiederherstellungschirurgie (Medizinische Hochschule Hannover) zur Verfügung gestellt wurden (Bezeichnungen und Spenderdaten s. Tabelle 6-1). Vor der Verwendung der Zellen wurde ihre osteogene Differenzierbarkeit untersucht. Die Zellen wurden nach dem Auftauen mit Standardkulturmedium in Zellkulturflaschen (175 cm²) kultiviert. Zur Passagierung wurden die Zellen etwa einmal pro Woche mit Trypsin von der Oberfläche der Kulturflasche gelöst und mit zehnfacher Verdünnung erneut ausgesät. Um die für die Reaktorkultivierungen notwendigen Zellzahlen zu erhalten, wurden die Zellen in speziellen Wannenstapeln mit einer Kulturoberfläche von 2520 cm² expandiert.

Tabelle 6-1: Daten der in dieser Arbeit verwendeten humanen mesenchymalen Stromazellen

Bezeichnung	huF62	FatSC3
Spenderdaten	Patientin weiblich, 52 Jahre, Liposuktion	Patientin weiblich, 55 Jahre, Bauchdeckenstraffung
Bezugsquelle	Blutspendezentrale Linz, Oberösterreichisches Rotes Kreuz	Klinik für Plastische, Hand- und Wiederherstellungschirurgie, Medizinische Hochschule Hannover
Verwendete Additive zur Untersuchung der osteogenen Differenzierbarkeit	Dexamethason, β-Glycerolphosphat, Vitamin C	BMP-2

Trypsin: 0,2 % Trypsin, pH = 7,5 in PBS, 0,02 % EDTA

Standardmedium: DMEM + 10 % FCS + 100 U/mL Penicillin, 0,1 mg/mL Streptomycin + 2 μ mol/mL L-Glutamin

Isolierung von huF62¹⁴⁴

Die mesenchymalen Stromazellen huF62 wurden aus dem Gewebe einer Liposuktion isoliert. Das Fettgewebe wurde zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit Kollagenase-Lösung für 60 Minuten bei 37 °C unter starkem Schütteln aufgeschlossen. Nach anschließender Zentrifugation (10 Minuten, 1200 g) wurde das resultierende Pellet in EL-Puffer resuspendiert und für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert, um die enthaltenen Erythrozyten zu lysieren. Nach Zugabe von PBS wurden die Zellen mit Hilfe eines 100 μ m-Nylonnetzes filtriert und in EGM-2 Medium bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

Kollagenase-Lösung: 1,5 mg/mL Kollagenase I; 20 mg/mL BSA; 25 mM HEPES in PBS

EL-Puffer (Erythrozyten Lysis Puffer): 154 mM NH₄Cl; 10 mM KHCO₃; 0,1 mM EDTA in ddH₂O

Isolierung von FatSC3

Die adulten mesenchymalen Stromazellen (FatSC3) wurden aus dem Fettgewebe einer Abdominoplastik gewonnen. Zur Isolation wurde das Fettgewebe zunächst mit einer Schere zerkleinert (ca. 20 mL) und mit 10 mL Kollagenase-Lösung versetzt. Die Suspension wurde für eine Stunde bei 37 °C / 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurde die Suspension homogenisiert, auf zwei Zentrifugenröhrchen aufgeteilt und mit Waschpuffer I auf jeweils 50 mL aufgefüllt. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 4 °C und 150 g wurde der Fettüberstand abgegossen, die mittlere, wässrige Phase abgenommen, das im Röhrchen verbliebene Pellet mit dem Überstand vereinigt und mit Waschpuffer II auf 50 mL aufgefüllt. Nach zehn Minuten Zentrifugation (4 °C, 540 g) wurden Fett und Überstand abgegossen, das Pellet erneut in Waschpuffer II aufgenommen und zentrifugiert (10 Minuten, 4 °C, 540 g). Der wässrige Überstand wurde abgenommen. Das Pellet wurde in Kulturmedium gelöst und

in Zellkulturflaschen gegeben. Nach 24 - 48 Stunden Inkubation bei 37 °C / 5 % CO₂ wurde das Medium gewechselt, um Bindegewebsrückstände zu entfernen.

Waschpuffer I: 500 mL Hanks' Puffer + 200 µmol Adenosin

Waschpuffer II: 500 mL Hanks' Puffer + 200 µmol Adenosin + 25 mL 10 % BSA (in PBS)

Kollagenase-Lösung: 20 mg Kollagenase I in 10 mL Waschpuffer I

Medium: DMEM/Ham's Nutrient Mixture F-12 + 5 % FCS + 0,02 mM/mL Natrium-Pyruvat + 100 U/mL Penicillin, 0,1 mg/mL Streptomycin + 1 % nichtessentielle Aminosäuren

6.3. OBERFLÄCHENMODIFIKATION MITTELS POLYMERSPACERN

6.3.1. SCHIFFSCHE PROBE

Die Schiffsche Probe ist eine Nachweisreaktion für Aldehydgruppen, die nach ihrem Entdecker Hugo Schiff benannt wurde. Das Schiffsche Reagenz (fuchsin-schweflige Säure) wird durch Reaktion mit Aldehydgruppen violett gefärbt. Die Intensität der Farbreaktion liefert eine Information über die Konzentration der Aldehydgruppen und kann mittels UV-Messungen ($\lambda = 550 \text{ nm}$) quantitativ ausgewertet werden.

Die Schiffsche Base wird hergestellt, indem Fuchsin und schweflige Säure miteinander umgesetzt werden. Dabei wird das Fuchsin entfärbt (Abbildung 6-1).

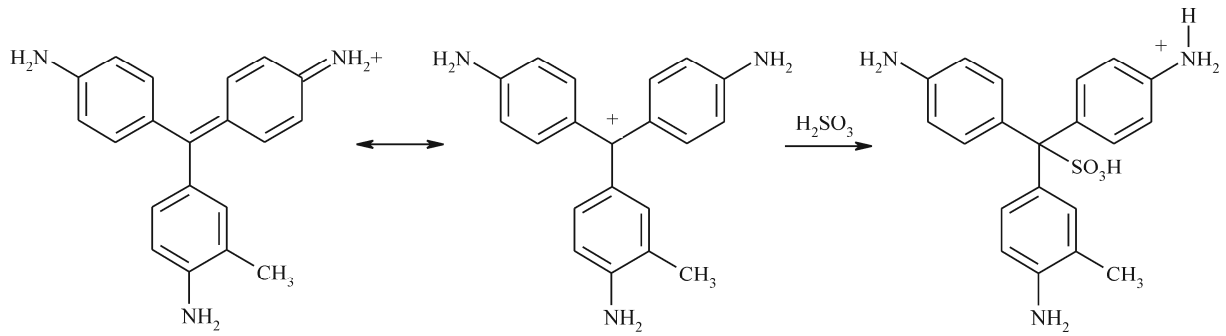


Abbildung 6-1: Herstellung des Schiffschens Reagenz (fuchschschweflige Säure)

Durch Reaktion der fuchschschwefligen Säure mit Aldehydgruppen bildet sich das chromophore System des Fuchschins zurück, so dass es wieder seine violette Farbe annimmt (Abbildung 6-2).

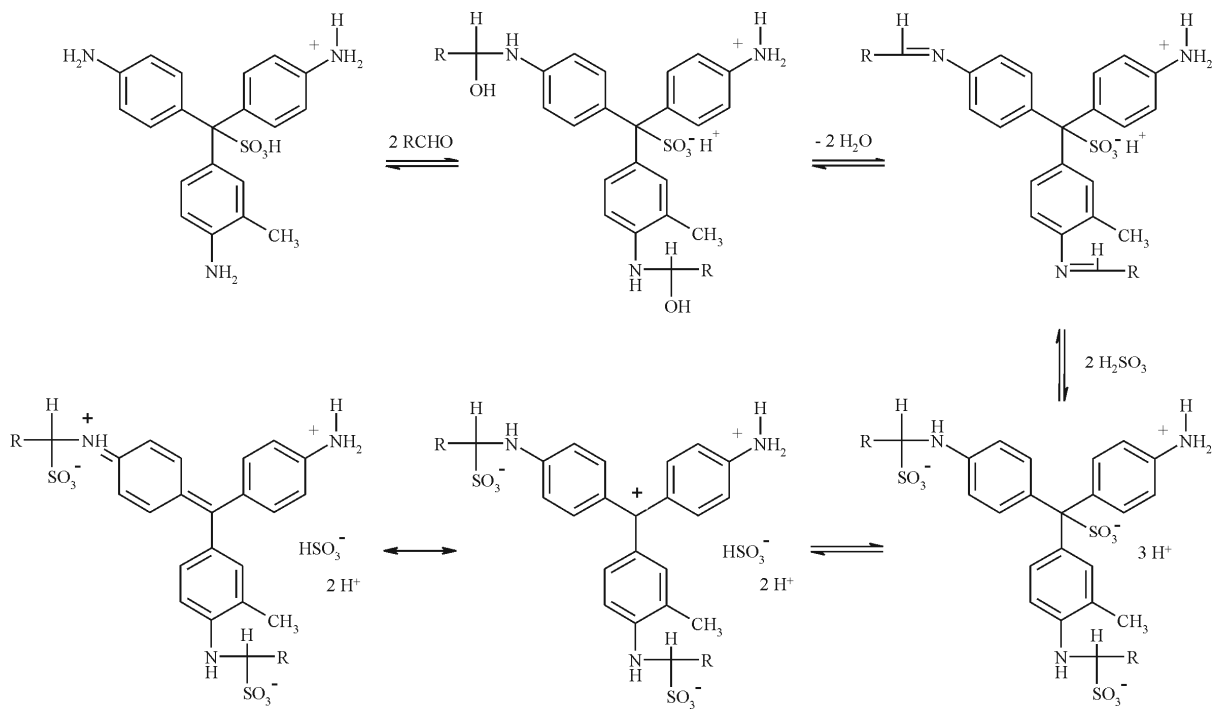


Abbildung 6-2: Reaktion des Schiffschens Reagenz mit Aldehydgruppen

Für den Nachweis von Aldehydgruppen in den Polymerlösungen von ox.p(MAG) und p(MVD) werden diese in einem Verhältnis von 1:2 mit Schiffschens Reagenz vermischt. Nach kurzer Inkubation bei 37 °C färbt sich die Lösung bei Anwesenheit von Aldehydgruppen violett.

6.3.2. QUALITATIVER NACHWEIS DER KONJUGATE

Die SDS-Gelelektrophorese ist eine analytische Trennmethode, die für die Charakterisierung von Proteinen bzw. Proteingemischen verwendet wird. Diese werden entsprechend ihrer Größe getrennt, indem sie auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen und einem elektrischen Feld ausgesetzt werden. Die Proteine wandern im elektrischen Feld, ihre Wanderungsgeschwindigkeit und -weite ist abhängig von ihrer Größe. Die Ladung der Proteine ist nicht von Bedeutung, da diese durch Zugabe des Detergents SDS (Natriumdodecylsulfat, *engl. sodium dodecyl sulfate*) und dessen Anlagerung an die Proteine ausgeglichen wird. Durch Färbung z.B. mit Silbernitratlösung werden die Proteine im Gel sichtbar gemacht. Durch Vergleich mit einem Proteingemisch bekannter Zusammensetzung (*protein ladder*) kann die Größe (Molekulargewicht) der untersuchten Proteine bestimmt werden¹⁴⁵.

Die Silberfärbung ist gegenüber der häufig verwendeten Coomassie-Färbung bis zu 100-mal empfindlicher, so dass Proteine bis in den Nanogramm-Bereich nachgewiesen werden können¹⁴⁶. Zum ersten Mal erwähnt wird die Verwendung der Silberfärbung für die Detektion von Proteinen in der Gelelektrophorese 1979 von Switzer et al¹⁴⁶. Der Mechanismus der Färbung beruht auf einer Reduktion von ionischem zu metallischem Silber, wobei die Silberionen auf zweierlei Arten mit den Proteinen reagieren. Es können sich Salze mit den Carboxylgruppen von Asparaginsäure oder Glutamin bilden, weiterhin sind Komplexbildungen mit den nucleophilen Seitenketten von Histidin (Imidazolring), Cystein (-SH), Methionin (-SCH₃) und Lysin (-NH₂) möglich¹⁴⁷. Die Reduktion der komplexierten Silberionen findet durch Formaldehyd statt.

In dieser Arbeit wurde die SDS-Gelelektrophorese für den qualitativen Nachweis der Konjugate verwendet, da nur solche Liganden, die keine Reaktion mit dem Polymer eingegangen sind, im Gel als diskrete Bande sichtbar sein sollten. Ein Polymer, an welches Proteine gebunden sind, sollte im SDS-Gel sichtbar werden und aufgrund seines veränderten Molekulargewichts eine andere Wanderungsgeschwindigkeit aufweisen als das nicht modifizierte Polymer.

Für den Nachweis der Reaktion zwischen Polymer und Ligand wurde ein 12 % iges bzw. 16 % iges Trenngel sowie ein 4,5 % iges Sammelgel hergestellt und verwendet. Die zu untersuchenden Proben wurden mit SDS-Probenpuffer im Verhältnis 1:1 gemischt, für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt und anschließend bei 4000 g für 4 Minuten zentrifugiert. Die im Sammelgel aufgetragenen Proben wurden 30 Minuten bei 100 V gesammelt und weitere 45 Minuten bei 200 V aufgetrennt. Anschließend wurde die SDS-Page angefärbt. Dazu wurde das Gel für mindestens 30 Minuten in Silber-Entfärber-Fixierer eingelegt und anschließend zweimal kurz mit ddH₂O gewaschen. Nach 2,5 minütiger Inkubation in Farmers Reducer wurde erneut zweimal 5 Minuten mit ddH₂O gewaschen. Die Färbung erfolgte 30 Minuten in 0,1 % Silbernitratlösung. Nach erneutem Waschen mit ddH₂O und 2,5 % Natriumcarbonatlösung wurde das Gel zur Reduktion der Silberionen in eine Lösung aus 0,5 % Formaldehyd in Natriumcarbonatlösung gelegt. Nach ausreichender Färbung der Banden wurde die Lösung abgegossen und das Gel 10 Minuten in 10 % Essigsäure eingelegt.

Trenngel (12% ig): 2,92 mL Acrylamid, 1,56 mL Bisacrylamid, 2,8 mL Tris (pH 8,8), 1 mL SDS, 1,76 mL H₂O, 20 µL Temed, 20 µL APS

Trenngel (16% ig): 3,90 mL Acrylamid, 2,08 mL Bisacrylamid, 2,8 mL Tris (pH 8,8), 1 mL SDS, 2,26 mL H₂O, 20 µL Temed, 20 µL APS

Sammelgel (5% ig): 731 µL Acrylamid, 390 µL Bisacrylamid, 760 µL Tris (pH 6,8), 300 µL SDS, 3,82 mL H₂O, 10 µL Temed, 10 µL APS

Silber-Entfärber-Fixierer: 80 mL Eisessig, 400 mL Ethanol, 400 mL ddH₂O)

Farmers Reducer:: 0,3 % K₃[Fe(CN)₆], 0,6 % Na₂S₂O₃ in H₂O

1 x TGS-Puffer:: 0,025 M Tris, pH 8.6; 0,192 M Glycin, 0,1 % SDS

SDS-Probenpuffer: 240 µL SDS-Lösung, 30 µL Mercaptoethanol, 30 µL Glycerol

6.3.3. QUANTITATIVE UNTERSUCHUNGEN DER KONJUGATE

Für den quantitativen Nachweis der Reaktion zwischen Polymer und Liganden wurden Poly-L-Lysin und RNase mit dem Fluorophor Fluorescein-5-isothiocyanat (FITC) markiert. FITC ist ein Fluorescein-Derivat, das mit seiner Isothiocyanatgruppe mit den Aminogruppen der Proteine reagiert (Abbildung 6-3).

Für die Markierung wurde jeweils 1 mL Ligandlösung mit 10 μ L FITC-Lösung ($c = 1$ mg/mL, in PBS) versetzt und 1,5 Stunden bei Raumtemperatur und 550 rpm inkubiert. Zur Separation der Edukte wurde das Reaktionsgemisch auf eine Sephadex G-25 Gel-Kolonnen A aufgetragen, mit PBS eluiert und in Fraktionen von jeweils 1 mL aufgefangen. Die Produkt enthaltenden Fraktionen wurden mittels UV-Messungen bei 210 nm bestimmt und vereinigt. Durch Zentrifugation des Produkts in einer Spinkolonne (MW 30.000) wurde der Puffer für die folgende Reaktion mit dem Polymer durch Boratpuffer pH = 10 ersetzt. Die Konzentration des resultierenden Produkts wurde durch UV-Messung bei 210 nm bestimmt.

Die Anbindung der FITC-markierten Liganden an die Polymere p(MVA) und ox.p(MAG) erfolgte wie unter 2.1. beschrieben. Nach erfolgter Reaktion und Aufreinigung wurde die Menge der gebundenen Liganden mittels Fluoreszenzmessung (Anregung: 485 nm, Emission: 535 nm) quantifiziert.

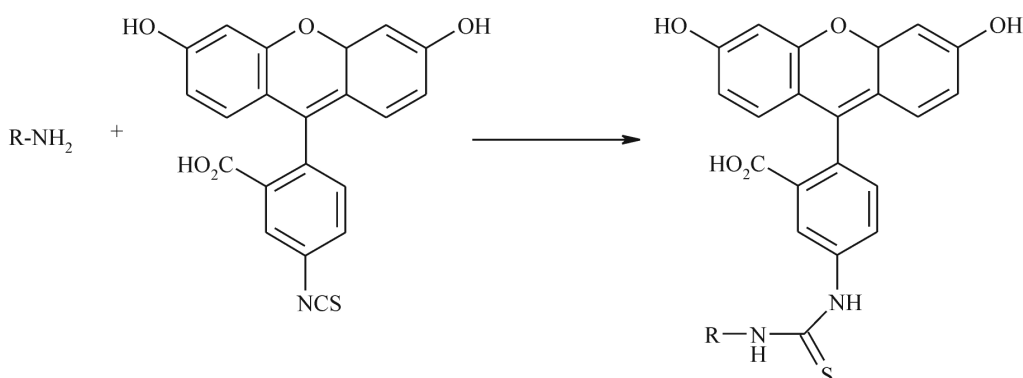


Abbildung 6-3: Reaktion von Fluoresceinisothiocyanat mit einer Aminogruppe

6.3.4. XPS-UNTERSUCHUNG DER KOMPOSITE

Die röntgeninduzierten Photoelektronenspektroskopie (*engl. X-Ray photoelectron spectroscopy, XPS*) ist eine hoch empfindliche Methode zur Untersuchung der chemischen Zusammensetzung von Oberflächen. Hierbei wird der photoelektrische Effekt ausgenutzt. Durch weiche Röntgenstrahlung ($\lambda < 50 \text{ nm}$) werden aus den auf der Oberfläche der Probe befindlichen Atomen Photoelektronen „heraus geschlagen“, deren kinetische Energie mit Hilfe eines Analysators (einer elektrostatischen Ablenkeinheit) bestimmt wird. Ein Teil der einfallenden Röntgenstrahlung $h\nu$ wird für die Ionisierung der Oberflächenatome verbraucht (Ionisierungsenergie I_i), die restliche Energie wird in Form von kinetischer Energie auf die emittierten Elektronen übertragen:

$$h\nu = \frac{1}{2}m_e v^2 + I_i \quad (\text{Formel 6.1})$$

Die Elektronen können aus den verschiedenen Atomorbitalen i herausgeschlagen werden, die jeweils unterschiedliche Ionisierungsenergien besitzen. Über die gemessene kinetische Energie der herausgeschlagenen Photoelektronen kann damit die Ionisierungsenergie der Elektronen aus den einzelnen Orbitalen bestimmt werden. Nach Koopmanns' Theorem ist die Ionisierungsenergie eines Elektrons in einem Orbital i näherungsweise gleich der Energie dieses Orbitals.

Durch die hohe Strahlungsenergie der verwendeten Röntgenstrahlung werden die Elektronen aus den Atomrümpfen herausgeschlagen. Die Energien der Rumpfelektronen sind für das entsprechende Atom charakteristisch, so dass die im Spektrum auftretenden Linien jeweils einem bestimmten Element zugeordnet werden können. Röntgenstrahlung ist zwar in der Lage, in die Probe einzudringen, aufgrund der mittleren freien Weglänge von Elektronen in Festkörpern können aber nur Elektronen aus einer Tiefe von max. 100 \AA aus der Probe freigesetzt werden. Daher ist die Photoelektronenspektroskopie eine geeignete Methode für die Untersuchung von Oberflächenschichten^{128, 148, 149}.

Die Charakterisierung der Kompositmaterialien wurde am Leibniz Institut für Plasmaforschung und Technologie e.V. (INP), Greifswald durchgeführt. Das verwendete Hochleistungs-Röntgenphotoelektronenspektrometer besitzt eine maximale Energieauflösung von 0,45 eV (Ag 3d) und eine optimale lokale Auflösung von 7 μm . Die Informationstiefe beträgt etwa 10 nm. Die Messungen wurden mit monochromatischer Al K_{α} -Strahlung durchgeführt. Die Übersichtsspektren wurden fünffach in der Probenmitte bei einer Leistung von 150 W (15 kV, 10 mA) und einer lokalen Auflösung von 80 eV aufgenommen.

6.3.5. BIOMECHANISCHE UNTERSUCHUNGEN

Um die mechanische Stabilität der Komposit-Materialien zu überprüfen, wurden diese einer Druckverformung ausgesetzt und der maximale Spannungswert, die maximale Deformation sowie die Arbeit, die für den Bruch des porösen Netzwerkes geleistet wird (Bruchenergie) bestimmt.

Vor der Durchführung der Kompressionstests wurden die zu untersuchenden Materialien für 30 Minuten bei 37 °C in PBS inkubiert. Die Kompressionstests wurden monoaxial mit einer Geschwindigkeit von 0,1 mm/min bis zu einer maximalen Belastung von 0,25 kN durchgeführt. Die Tests wurden mit einer Universaltestmaschine und einem 1 kN Kraftaufnehmer durchgeführt.

Tabelle 6-2: Technische Spezifikationen unterschiedlicher Sponceram[®]-Materialien (k.A. = keine Angabe)^{150, 151}

Sponceram [®]	30/90	30/90 HA	30/90 Ti	30/145
Porengröße [µm]	600	600	600	600
Porosität [%]	89	80	k.A.	k.A.
Oberfläche (BET) [m ² /g]	2,0	2,0	2,0	1,1
Dicke [mm]	3	3	3	3
Durchmesser Disc [mm]	65	65	65	65
Durchmesser Minidisc [mm]	10	10	10	10
Dichte [g/mL]	0,7	0,7	0,7	0,7
Permeabilität k [m ²]	$3,2 \cdot 10^{-8}$	$1,8 \cdot 10^{-8}$	k.A.	k.A.

6.3.6. STATISCHE ZELLKULTIVIERUNG

Die durch autoklavieren sterilisierten Kompositmaterialien Sponceram[®]/ox.p(MAG)-PLL und Sponceram[®]/p(MVA)-PLL sowie Sponceram[®] (unbehandelt) wurden in einer 24-Lochplatte mit jeweils 5000 MC3T3-E1-Zellen in 100 µL Medium besiedelt. Um die Glucoseverbrauchsrate der Zellen exakt bestimmen zu können, wurde DMEM-Medium mit einem geringen Glucosegehalt von 1 g/L verwendet. Pro Kompositmaterial wurden 5 Proben besiedelt, eine Probe jeder Sorte blieb als Referenz unbesiedelt. Nach 30 Minuten Adhäsionszeit wurden die Vertiefungen der Platte mit exakt 1 mL Medium aufgefüllt. Nach weiteren 24 Stunden Inkubation bei 37 °C / 5 % CO₂ wurden die besiedelten Keramiken in eine neue 24-Lochplatte überführt und erneut mit exakt 1 mL Medium aufgefüllt. Über einen Zeitraum von 15 Tagen wurden aus jeder Vertiefung 50 µL Medium entnommen, dessen Glucosewert bestimmt wurde. Bei einem Glucosegehalt unterhalb von 0,7 g/L wurde ein Mediumwechsel aller Proben durchgeführt. Die Differenz des Glucosegehalts zwischen Probe und Referenz wurde berechnet.

Medium: DMEM + 10 % FCS + 100 U/mL Penicillin, 0,1 mg/mL Streptomycin + 2 µmol/mL L-Glutamin

6.3.7. BIOREAKTOR-KULTIVIERUNG

Vor Beginn der Kultivierung im Z[®]RP500- bzw. im Z[®]RPD-System wurde der jeweilige Reaktor mit dem gesamten Schlauchsystem, Septum für die Probenahme sowie Mediumzufuhr- und Abfallflasche bei 121 °C 30 min autoklaviert. Beim Z[®]RPD -Reaktor kamen die Messzellen für die pH- und pO₂-Elektrode hinzu, das Probenahme-Septum des Z[®]RPD wurde durch Inkubation in Isopropanol (70 %) sterilisiert. Die pO₂-Elektrode wurde separat unter den gleichen Bedingungen autoklaviert und anschließend zur Polarisation für mindestens 8 Stunden vor Beginn der Kultivierung an die Steuereinheit angeschlossen. Die pH-Elektrode wurde durch Inkubation in Isopropanol (70 %) 30 Minuten sterilisiert.

Das Z[®]RP500-System wurde wie in Abbildung 6-4 dargestellt aufgebaut. Die Möglichkeit der pH-Wert-Regulierung mit Base wurde jedoch nicht genutzt (Flasche C). Die Elektroden und Pumpen wurden mit Hilfe der Steuereinheit kalibriert. Das Z[®]RPD -System wurde analog angeschlossen, jedoch wurde keine CO₂-Begasung mittels *sparger*, sondern über den Kopfraum durchgeführt. Anstelle des *spargers* wurde an diesen Anschluss des Reaktors das Probenahme-Septum angebracht (vgl. Abbildung 6-5).

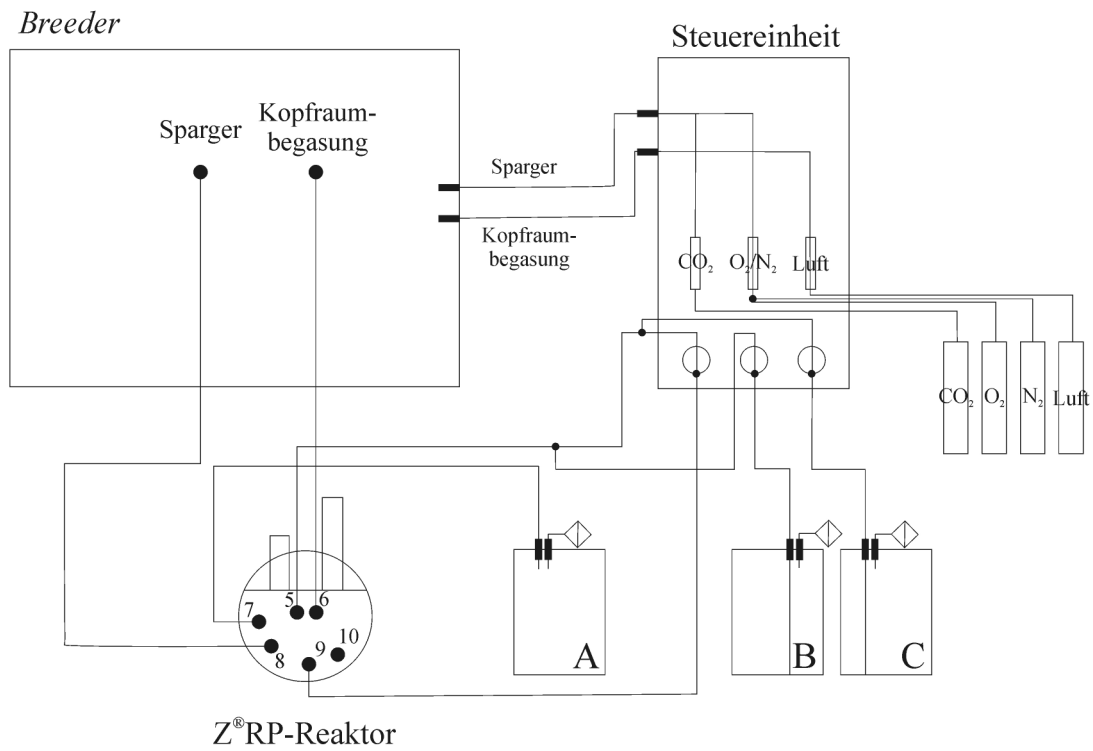


Abbildung 6-4: Schaltbild des Z[®]RP-Reaktorsystems. A: Flasche für Überlaufmedium, B: Flasche für frisches Medium, C: Flasche für Base, 5: Anschluss Eingang Zirkulation, 6: Anschluss Kopfraumbegasung, 7: Anschluss Überlaufschlauch, 8: Anschluss Gaszufuhr Sparger, 9: Anschluss Ausgang Zirkulation, 10: Blindstopfen (adaptiert aus: Betriebsanweisung Z[®]RP Technologie)¹²⁹

Tabelle 6-3: Technische Spezifikationen der unterschiedlichen Z[®]RP-Reaktormodelle^{129, 152}

Reaktorsystem	Z [®] RP500	Z [®] RPD
Maße (B x H x T) [cm]	19,5 x 15,5 x 13	4 x 9,6 x 9,6
Gewicht [g]	1400	158
Reaktorvolumen [mL]	500	100
Max. Anzahl Scheiben	19	2
Scheibengröße [mm]	65	65
Temperatursensor	pT100	pH-Elektrode
pH-Messung	Im Reaktor	In der Messzelle
pO ₂ - Messung	Im Reaktor	In der Messzelle
Begasung	Kopfraum + Sparger	Kopfraum
Probenahme	Septum im Umwälzungskreislauf	Septum am Reaktor

Nach beendeter Kultivierung wurden die Sponceram[®]-Scheiben entnommen und für die folgenden Analysen vorbereitet (s. Anhang 6.3.8 – 6.3.10). Beide Reaktorsysteme wurden zur Sterilisation 30 Minuten bei 121 °C autoklaviert und anschließend entleert. Das Z[®]RPD-System wurde aus ökonomischen Gründen ebenfalls mehrfach verwendet.

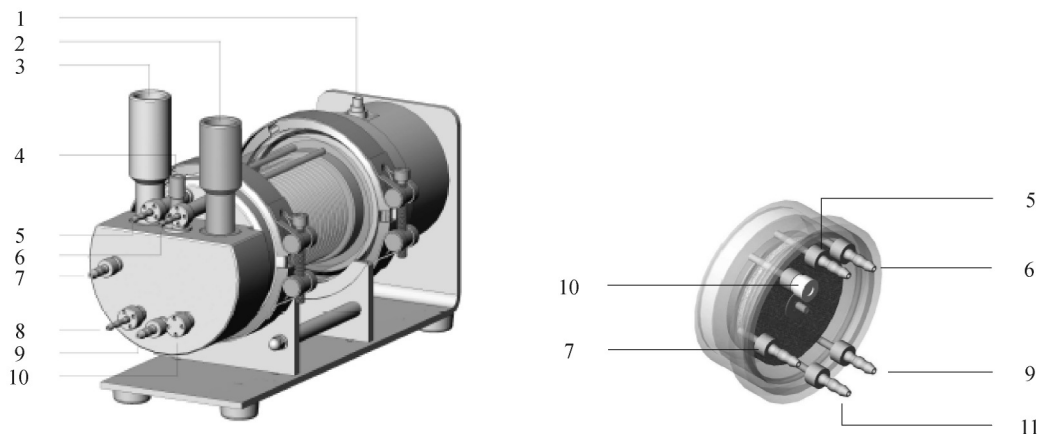


Abbildung 6-5: Technische Zeichnungen der verwendeten Z®RP-Bioreaktorsysteme. links: Z®RP500-Reaktor, rechts: Z®RPD-Reaktor. 1: Anschluss Motor an die Steuereinheit, 2: Adapter für pH-Sensor, 3: Adapter für pO₂-Sensor, 4: Adapter für pT100-Temperaturfühler, 5: Medienrohr (Anschluss Eingang Zirkulation), 6: Mediendüsenrohr (Anschluss Kopfraumbegasung), 7: Anschluss Überlaufschlauch, 8: Anschluss Gaszufuhr Sparger, 9: Anschluss Ausgang Zirkulation, 10: Blindstopfen, 11: Probenmeseptum (adaptiert aus Betriebsanweisung Z®RP Technologie und Produktinformation)^{129, 152}

Testung von Sponceram®/ox.p(MAG)-BMP-2 im Z®RP500

Die erste Testung des Kompositmaterials Sponceram®/ox.p(MAG)-BMP-2 wurde im Bioreaktor des Typs Z®RP500 durchgeführt. Als Referenzmaterial wurde eine Sponceram®-Scheibe verwendet, die in BMP-2-Lösung inkubiert wurde. Pro Sponceram®-Scheibe wurden $2 \cdot 10^7$ humane mesenchymale Stromazellen aus dem Fettgewebe (huF62, Passage 8) in 2 mL Standardmedium ausgesät. Die besiedelten Scheiben wurden 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, um anschließend unter sterilen Bedingungen in jeweils einen Z®RP500-Reaktor eingesetzt zu werden. Beide Reaktoren wurden zu Beginn der Kultivierung mit 240 mL Medium befüllt. Alle folgenden Manipulationen der Reaktoren wurden parallel durchgeführt. Am zweiten Tag der Kultivierung wurde die Zufütterung mit frischem Medium gestartet. Zunächst betrug die Futterrate 51,8 mL/Tag, wurde dann aufgrund sehr geringen Glucoseverbrauchs jedoch auf 25,9 mL/Tag reduziert. Mit Hilfe eines biochemischen Analysators wurden täglich Glucose- und Laktatgehalt des Reaktorinhalts sowie des abgeführten Mediums bestimmt. Bei Überschreiten einer maximalen Laktatkonzentration von 1 g/L im Innenraum des Reaktors wurde die Befütterung mit frischem Kulturmedium

heraufgesetzt. Die im Reaktor befindliche Glucosemenge war aufgrund der hohen Anfangskonzentration von 4,5 g/L nicht limitierend. Nach 14 Tagen Kultivierung wurde die Fütterung auf 43,2 mL/min erhöht. Nach weiteren 14 Tagen wurde die Rate ein letztes Mal auf 72 mL/Tag erhöht. Während der Kultivierung wurden täglich 100 µL Probe aus einem im Umwälzungskreislauf befindlichen Septum entnommen.

Medium: DMEM + 10 % FCS + 100 U/mL Penicillin, 0,1 mg/mL Streptomycin + 2 µmol/mL L-Glutamin

Testung von Sponceram[®]/ox.p(MAG)-BMP-2 im Z[®]RPD

Um die beiden Reaktorsysteme Z[®]RP500 und Z[®]RPD für die Kultivierung mesenchymaler Stromazellen vergleichen zu können, wurden die Keramikmaterialien Sponceram[®]/ox.p(MAG)-BMP-2 und Sponceram[®]/BMP-2 erneut im Einwegreaktor-System Z[®]RPD getestet. Dazu wurden außerhalb des Reaktors pro Sponceram[®]-Scheibe $1,2 \cdot 10^7$ humane mesenchymale Stromazellen aus dem Fettgewebe (FatSC3, Passage 5) in 2,5 mL Standardmedium ausgesät. Nach Inkubation der besiedelten Scheiben bei 37 °C / 5 % CO₂ über Nacht wurden diese in das Z[®]RPD-System eingesetzt. Der Reaktor wurde zunächst mit 47 mL Kulturmedium (1 g/L Glucose) befüllt. Zwei Tage nach Einsetzen der Scheiben wurde der Perfusionsmodus gestartet, die Zufütterungsrate betrug zunächst 14,4 mL/Tag. Glucose- und Laktatkonzentration im Reaktorinnenraum und im abgeführten Medium wurden täglich gemessen. Bei Überschreiten einer Laktatkonzentration von 0,7 g/L wurde die Zufütterungsrate erhöht. Am 4. Tag der Kultivierung wurde die Zufuhr frischen Mediums auf eine Rate von 28,8 mL/Tag erhöht, nach weiteren 4 Tagen auf 43,2 mL/Tag. Am 21., 39., 41. und 42. Tag nach Beginn der Kultivierung wurde die Mediumzufuhr erneut um jeweils 28,8 mL/Tag erhöht, zuletzt betrug die Futtermenge 144 mL/Tag.

Medium: DMEM + 10 % FCS + 100 U/mL Penicillin, 0,1 mg/mL Streptomycin + 2 µmol/mL L-Glutamin

6.3.8. HISTOLOGISCHE FÄRBUNGEN

Zur Vorbereitung der Sponceram[®]-Scheiben für die histologischen Färbungen wurden diese nach der Entnahme aus dem Z[®]RP-System zunächst mit PBS gewaschen und bei -20 °C mindestens 30 Minuten mit absolutem Ethanol fixiert. Vor den jeweiligen Färbungen wurden die Scheiben dreifach mit ddH₂O oder PBS gewaschen.

Alizarinrot-Färbung

Alizarinrot S (Abbildung 6-6) ist ein Antrachinonderivat, das für den Nachweis von Calciumionen verwendet wird.¹⁵³ Im Rahmen dieser Arbeit wird diese Methode für den Nachweis von Calciumionen (Calciumphosphat) in der extrazellulären Matrix verwendet. Bei der Reaktion von Alizarinrot S mit Calciumionen bildet sich ein rotes Produkt, dessen Struktur noch nicht eindeutig geklärt ist.

Moriguchi et al. schlägt zwei mögliche Strukturen für den an Hydroxylapatit adsorbierten Farbstoff Alizarinrot S vor. Bei der hauptsächlich vorkommenden Salzform bildet sich eine Ionenbindung zwischen den Calciumionen des Hydroxylapatits und den vicinalen 1,2-Hydroxygruppen des Farbstoffs aus. Bei der Chelatform sind die 9-Carboxylgruppe und die 1-Hydroxygruppe an einer Komplexbildung beteiligt (Abbildung 6-7). Dabei können die 2-Hydroxygruppe und die 3-Sulfonsäuregruppe sowohl als freie Säure als auch als Natriumsalz vorliegen. Bei der Salzform trifft dies nur für die Sulfonsäuregruppe zu. In welcher Form beide Gruppen vorliegen, hat nach Moriguchi keinen Einfluss auf das Adsorptionsverhalten des Farbstoffs¹⁵⁴.

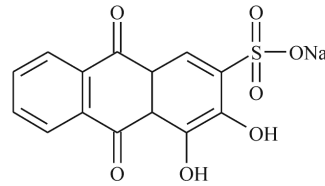


Abbildung 6-6: Struktur von Natriumalizarinsulfonat (Alizarinrot S)

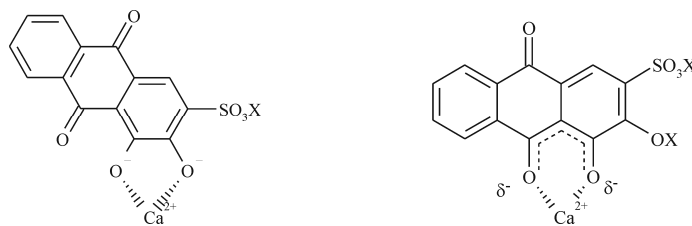


Abbildung 6-7: Mögliche Strukturen von Alizarinrot S, adsorbiert an Hydroxylapatit: Salz- (links) und Chelatform (rechts). X = H, Na ¹⁵⁴

Für die Anfärbung der Calciumionen wurden die mit PBS gewaschenen Sponceram[®]-Scheiben für 15 Minuten in Alizarinrot-Lösung (0,5 % in ddH₂O) inkubiert. Anschließend wurde mehrmals mit PBS gewaschen, um den keramischen Untergrund zu entfärben.

Von Kossa-Färbung

Die von Kossa-Färbung wird für den histologischen Nachweis von Calciumverbindungen verwendet und beruht auf einer Reaktion mit Silbernitrat. Der Mechanismus der Reaktion ist nicht abschließend geklärt, jedoch deutet vieles darauf hin, dass Calciumionen in Calciumphosphat oder -carbonat durch Silberionen ersetzt werden. Die Silberionen der resultierenden Salze werden dann bei Einwirkung von UV-Licht zu elementarem Silber reduziert. Offenbar spielen bei diesem Mechanismus auch organische Komponenten eine Rolle.¹⁵⁵

Die Reaktion ist nicht auf Calciumsalze beschränkt; auch Chloride, Phosphate, Sulfate und Carbonate vieler anderer Kationen können ebenso mit Silbernitrat reagieren, jedoch kommen diese *in vivo* nicht in ausreichender Menge vor, um zu interferieren.¹⁵⁶

Zum Nachweis von Calcium in der extrazellulären Matrix werden die Sponceram[®]-Scheiben dreimal mit ddH₂O gewaschen und anschließend 30 Minuten unter Lichtausschluß in Silbernitratlösung (5 % in ddH₂O) inkubiert. Nach erneutem Waschen mit ddH₂O werden die Keramiken zwei Minuten mit UV-Licht bestrahlt. Der keramische Untergrund wird durch Zugabe von Natriumthiosulfat (5 % in ddH₂O) entfärbt.

DAPI-Färbung

Zur Visualisierung der auf den Keramiken adhärenen Zellen werden diese mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) gefärbt. DAPI (Abbildung 6-8) bindet selektiv an die DNA und bildet stark fluoreszierende DNA-DAPI-Komplexe mit hoher Spezifität. Es interkaliert schnell in die DNA der Zellen, so dass die Zellkerne fluoreszieren¹⁵⁷. Das Absorptionsmaximum der Fluoreszenz liegt bei einer Wellenlänge von 358 nm, das Emissionsmaximum bei 461 nm.

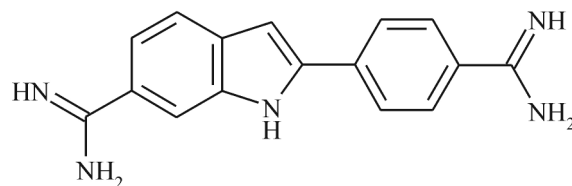


Abbildung 6-8: Struktur von 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)

Um die Zellkerne anzufärben, werden die auf den Keramiken fixierten Zellen dreimal mit PBS gewaschen und anschließend 15 Minuten bei 37 °C mit DAPI-Lösung inkubiert (2 µL Stammlösung in Färbepuffer). Anschließend werden die Keramiken dreifach mit PBS gewaschen und mit dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Zur quantitativen Auswertung der

Zellzahlen können die Proben mit dem Fluoreszenzlesegerät (Anregung: 360 nm, Emission: 460 nm) vermessen werden.

Stammlösung: 500 µg/mL DAPI in ddH₂O

Färbepuffer: 100 mM Tris pH 7, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 0,5 mM MgCl₂, 0,1 % Nonidet-P40 in ddH₂O

Toluidinblau-Färbung

Zur Sichtbarmachung der an der Keramik adhärenen Zellen kann der basische Thiazinfarbstoff Toluidinblau (Abbildung 6-9) verwendet werden. Aufgrund seiner Basizität bindet er selektiv an saure Gewebssubstanzen wie DNA und RNA.¹⁵⁸

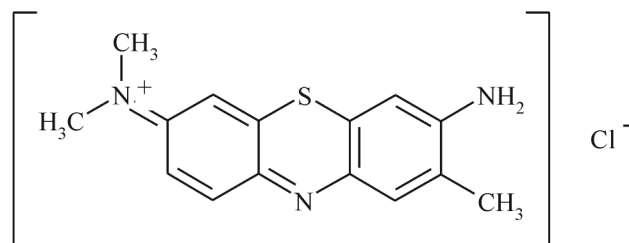


Abbildung 6-9: Struktur von 3-Amino-7-dimethylamino-2-methylphenothiazin-5-iumchlorid (Toluidinblau)

Zur Anfärbung der Zellen werden die dreifach mit PBS gewaschenen Sponceram[®]-Scheiben 10 Minuten bei Raumtemperatur in Färbelösung (0,1 % Toluidinblau in ddH₂O) inkubiert. Anschließend werden die Keramiken mehrmals mit PBS waschen, um den Untergrund zu entfärben. Die angefärbten Zellen werden mit dem Auflichtmikroskop betrachtet.

AP-Färbung

Der histologische Nachweis von alkalischer Phosphatase wird mit Hilfe eines Substratsystems bestehend aus 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP) und einem Tetrazoliumsalz, Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT), erbracht. Durch Einwirkung des Enzyms alkalische Phosphatase wird BCIP hydrolysiert. Die daraus resultierende dephosphorylierte Form wird durch Einwirkung von Sauerstoff zu einem unlöslichen Indigofarbstoff oxidiert (Abbildung 6-10). Gleichzeitig wird das NBT zu einem blauen Diformazanfarbstoff reduziert (Abbildung 6-11).¹⁵⁹ Beide Farbstoffe ergeben zusammen ein blauvioletttes Präzipitat.

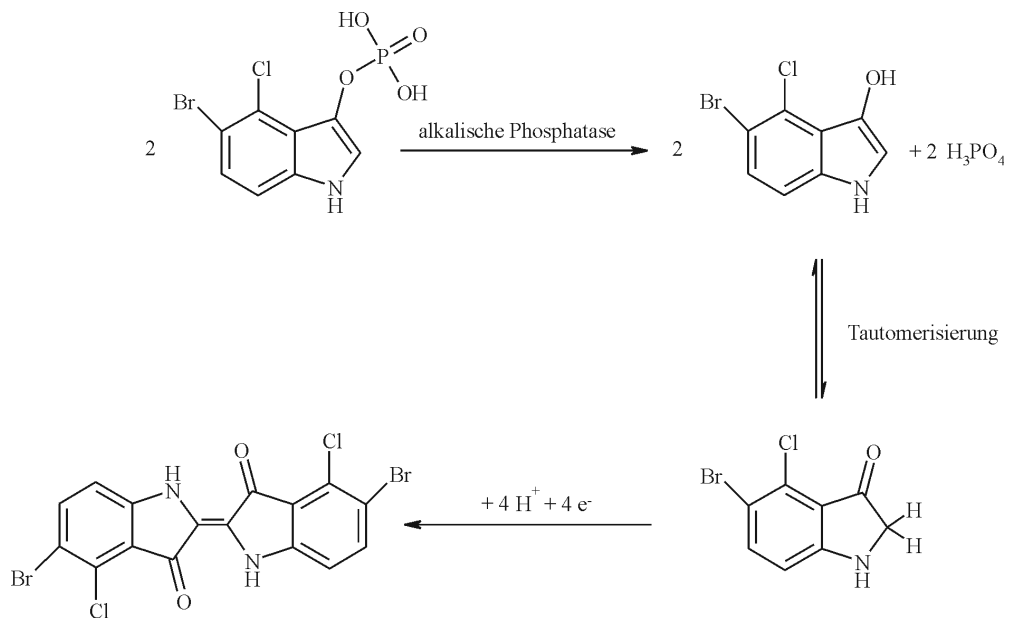


Abbildung 6-10: Reaktionsmechanismus der Hydrolyse von BCIP mit anschließender Oxidation zum unlöslichen Indigofarbstoff

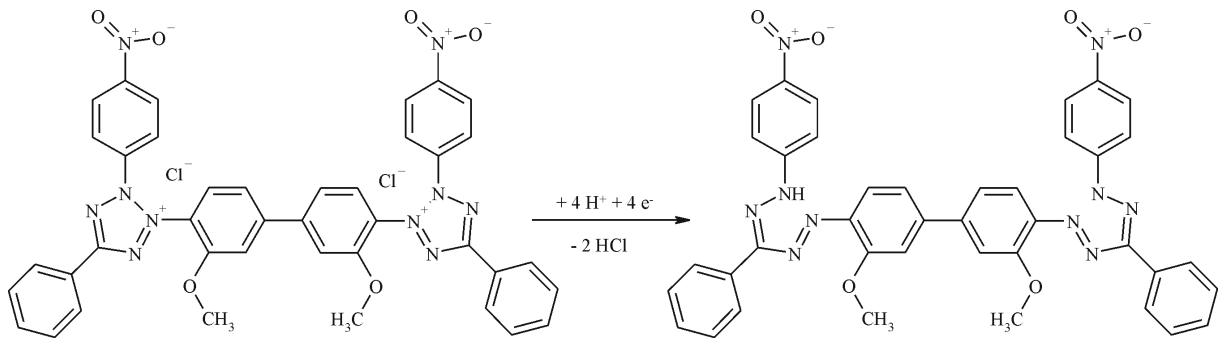


Abbildung 6-11: Reaktionsmechanismus der Reduktion von NBT

Zum histologischen Nachweis synthetisierter alkalischer Phosphatase werden die Sponceram[®]-Scheiben dreimal mit ddH₂O gewaschen und anschließend 15 – 60 Minuten bei 37 °C in Färbereagenz inkubiert. Der keramische Untergrund wird durch mehrmaliges Waschen mit ddH₂O entfärbt.

Färbereagenz: SIGMAFAST[™] BCIP[®]/NBT (0.15 mg/ml BCIP; 0.30 mg/ml NBT; 100 mM Tris, 5 mM MgCl₂ in ddH₂O)

6.3.9. PCR

Um die Genexpression von Zellpopulationen bestimmen zu können, wird die mRNA, die die Informationen der exprimierten Gene trägt, analysiert. Die Methode der Gelelektrophorese eignet sich für diese Untersuchung, jedoch ist die mRNA-Population einer Zelle sehr komplex, so dass sich die einzelnen Transkripte nur schwer voneinander trennen lassen. Außerdem sind die Transkripte zum Teil in sehr unterschiedlicher Zahl vorhanden, so dass solche, die nur in geringer Konzentration vorliegen, schwer analysierbar sind. Durch die Anwendung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR, engl. *polymerase chain reaction*) vor der eigentlichen Auftrennung werden die Transkripte amplifiziert. Dazu wird die gesamte isolierte RNase zunächst mit Hilfe der reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Mit der PCR werden mit Hilfe von DNA-Polymerasen gezielt DNA-Abschnitte dupliziert. Dazu werden *Primer* (DNA-Fragmente von etwa 20 Nucleotiden Länge) eingesetzt, die an den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt binden und mit der Polymerase verlängert werden können. Die PCR setzt sich aus drei unterschiedlichen Phasen zusammen, die bei verschiedenen Temperaturen

durchgeführt werden: Denaturierung der DNA in ihre Einzelstränge, Anlagerung (*Annealing*) der Primer an die Zielsequenz, Verlängerung (*Extension*) der Primer. Dieser aus drei Phasen bestehende Zyklus wird mehrfach wiederholt. Die amplifizierten Anteile werden in einer Gelelektrophorese getrennt^{160, 161}.

RNA-Isolierung

Für die Isolierung der RNA wurde ein Stück jeder kultivierten Keramik in 10 mL einer Mischung aus Kollagenase und Hyaluronidase (Kollagenase 100 U/mL, Hyaluronidase 40 U/mL in PBS) 35 Minuten bei 37 °C / 5 % CO₂ inkubiert. Die Zellen enthaltende Enzymlösung wurde 5 Minuten bei 200 g zentrifugiert, das erhaltene Pellet wurde mit 1 mL *RNA tidy G* überschichtet und bei -20 °C aufbewahrt. Zur eigentlichen Isolierung der RNA wurde die Zellsuspension nach dem Auftauen durch mehrfaches Schütteln homogenisiert und zum Abtrennen von Zelltrümmern, Membranen, Polysacchariden und hochmolekularer DNA 10 Minuten bei 12.000 g / 4 °C zentrifugiert. Die Probe wurde 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um die Dissoziation von Nucleoproteinkomplexen zu gewährleisten. Anschließend wurden 200 µL Chloroform zugegeben, geschüttelt und erneut 2 - 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch fünfzehnminütiges Zentrifugieren bei 12.000 g / 4 °C wurde die Lösung in drei Phasen getrennt: eine Chloroform-Phase, eine Protein und DNA enthaltende Interphase sowie eine RNA-haltige, wässrige Phase. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zur Fällung der RNA mit 500 µL Isopropanol (abs.) versetzt. Nach fünfminütiger Inkubation wurde die ausgefallene RNA 10 Minuten bei 12.000 g / 4 °C zentrifugiert. Das erhaltene RNA-Pellet wurde mit 1 mL Ethanol (75 %) gewaschen, erneut 5 Minuten bei 12.000 g / 4 °C zentrifugiert und getrocknet. Anschließend wurde die RNA in DEPC-Wasser (0,1 %, pH = 7,5) aufgenommen. Konzentration und Reinheit der RNA wurden mit Hilfe von UV-Messungen bei 260 nm und 280 nm bestimmt.

cDNA-Synthese für RT-PCR

Um die isolierte RNA in cDNA umzuschreiben, werden *Oligo-dT-Primer* verwendet, die an den Poly(A)-Schwanz von mRNA-Molekülen binden. Ribosomale sowie andere zellspezifische RNA, die keine genetischen Informationen tragen, besitzen diese aus bis zu 200 Adeninresten bestehende Kette am 3'-Ende nicht und werden somit nicht umgeschrieben¹⁶². Somit repräsentiert die synthetisierte cDNA nur Gene, die zum Zeitpunkt der RNA-Isolierung in den Zellen exprimiert wurden. Die verwendeten Primer sind spezifisch für bestimmte nachzuweisende Gene (s. Tabelle 6-4). Zur Synthese wurden 2 µg RNA mit 3 µL Oligo-dT-Primer (100 µM) und 18 µL DEPC-Wasser zusammen gegeben und 5 Minuten bei 65 °C denaturiert. Anschließend wurde die Reaktionsmischung 2 Minuten auf Eis abgekühlt. Die denaturierte RNA wurde mit 4 µL einer Desoxynucleosidtriphosphat-Mischung (dNTP-Mix; 2,5 mM), 1 µL M-MLV reverse Transkriptase (200 U/µL), 8 µL 3 x RT-Puffer sowie 27 µL DEPC-Wasser zusammen 60 Minuten auf 37 °C erwärmt. Die Synthese der cDNA wurde durch fünfminütiges Erhitzen auf 65 °C gestoppt.

Tabelle 6-4: Für die PCR verwendete, spezifische Primer

Gen	sense	antisense	Annealing-Temperatur [° C]	Produktgröße [bp]
GAPDH	5'-GCC ACC CAG AAG ACT GTG GAT-3'	5'-TGG TCC AGG GTT TCT TAC TCC-3'	61	419
Kollagen I	5'-GAA AAC ATC CCA GCC AAG AA-3'	5'-CAG GTT GCC AGT CTC CTC AT-3'	57	234
Osteocalcin	5'-AGG CGC TAC CTG TAT CAA T-3'	5'-CAG ATT CCT CTT CTG GAG TTT-3'	48	315
Osteopontin	5'-CTA-GGC- ATC-ACC- TGT-GCC- ATA-CC-3'	5'-CAG-TGA- CCA-GTT- CAT-CAG- ATT-CAT-C-3'	60	330
Alkalische Phosphatase	5'-GCT GAA CAG GAA CAA CGT GA- 3'	5'-CCA CCA AAT GTG AAG ACG TG-3'	51	267

RT-PCR

Die synthetisierte cDNA wurde mit Hilfe von Taq-Polymerase amplifiziert. Dazu wurden 1 µL cDNA mit 10 µL 5 x PCR-Puffer, 4 µL dNTP-Mix (2,5 µM), je 1 µL *sense* und *antisense*-Primer, 0,25 µL Taq-Polymerase (5 U/µL) sowie 32,75 µL H₂O versetzt. Die Reaktionsmischung wurde nach einem anfänglichen Denaturierungszyklus für die Dauer von 35 Zyklen amplifiziert (Tabelle 6-5).

Tabelle 6-5: Zyklen der RT-PCR, T_A = Annealing-Temperatur

Anzahl Zyklen	T_A [° C]	Dauer [min]	Vorgang
1	95	5	Denaturierung
35	95	0,5	Denaturierung
	T_A	0,5	Annealing
	72	0,5	Extension
1	72	7	Extension

Die Produkte der PCR wurden in einem 1 % Agarose-Gel ihrer Größe nach aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Die Bandenstärke wurde densitometrisch (semiquantitativ) ausgewertet.

6.3.10. RASTERELEKTRONENMIKROSKOPIE

Bei der Rasterelektronenmikroskopie (REM) werden Objekte mit Hilfe von Elektronenstrahlen vergrößert abgebildet. Ein hochenergetischer, gebündelter Elektronenstrahl rastert die Oberfläche der zu untersuchenden Probe ab. Durch das Auftreffen des Elektronenstrahls (Primärelektronen) auf die Probe wird durch Wechselwirkungen mit der Materialoberfläche ein Spektrum von Elektronen unterschiedlicher Energie emittiert. Diese Sekundärelektronen entstehen durch inelastische Wechselwirkungen der Primärelektronen mit der Atomhülle der Probe. Sie stammen aus einer dünnen Oberflächenschicht, ihre Energie liegt unterhalb von 50 eV. Elektronen mit einer Energie größer als 50 eV werden als Rückstreuelektronen bezeichnet, sie stammen aus tiefer liegenden Bereichen der Probe. Beide Elektronenarten sind entscheidend für die Bildgebung im Rasterelektronenmikroskop. Die Rückstreuelektronen geben eine Auskunft über den Materialkontrast; Sekundärelektronen über die Oberflächentopographie. Der REM-Prozess findet im Hochvakuum statt, um Wechselwirkungen zwischen dem Elektronenstrahl und Atomen und Molekülen in der Luft zu vermeiden.

Um elektronenmikroskopische Aufnahmen der besiedelten Sponceram[®]-Scheiben machen zu können, wurden kleine Stücke der Keramiken zunächst dreifach mit PBS gewaschen und

dann 24 Stunden bei 4 °C in Karnovsky-Puffer inkubiert. Anschließend wurden die Proben dreifach mit Cacodylatpuffer gewaschen und bei 4 °C darin eingelegt. Bevor die Proben mit dem Rasterelektronenmikroskop betrachtet werden konnten, mussten diese vollständig entwässert werden. Dazu wurden sie für jeweils 15 Minuten in Aceton/Wasser-Gemischen inkubiert, bei denen der Acetonanteil in 6 Schritten von 10 % auf 100 % erhöht wird. Die Inkubation in 100 % Aceton wurde dreimal wiederholt, anschließend wurden die Keramiken bei Raumtemperatur getrocknet.

Die Aufnahmen wurden mit einem Rasterelektronenmikroskop bei einer Beschleunigungsspannung von 2 kV durchgeführt.

Cacodylatpuffer: 0,2 M Cacodylsäure Natriumsalz Trihydrat in ddH₂O, pH = 7,3

Karnovsky-Puffer: 5 mg CaCl₂, 10 mL Cacodylatpuffer, 20 µL Glutaraldehyd (50 %), 2,48 mL ddH₂O

6.4. EINSCHLUSS BIOAKTIVER MOLEKÜLE IN EINE MATRIX

6.4.1. NACHWEIS DER BESCHICHTUNGEN

Zur Anfärbung von Kollagen und Gelatine kann der anionische Farbstoff Siriusrot (Abbildung 6-12) verwendet werden. Die Sulfonsäuregruppen des Farbstoffs reagieren mit den Aminogruppen der im Kollagen vorkommenden Aminosäuren Lysin und Hydroxylysin sowie mit den Guanidingruppen von Arginin¹³⁹.

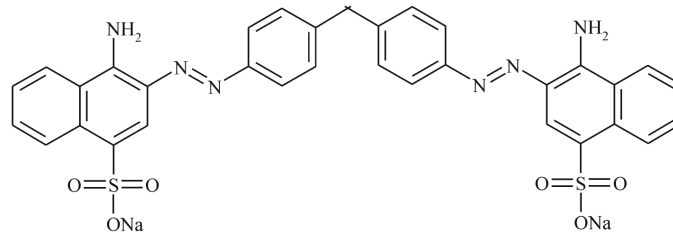


Abbildung 6-12: Struktur von Siriusrot

Zur Anfärbung werden die beschichteten Sponceram[®]-Keramiken unter Lichtausschluss 15 Minuten in Direktrot-Färbelösung (0,1 % in gesättigter Pikrinsäurelösung) inkubiert. Durch wiederholtes Waschen mit ddH₂O wird der keramische Untergrund entfärbt.

Für den quantitativen Nachweis der anhaftenden Kollagen- bzw. Gelatinematrix wurde der rote Farbstoff durch Zugabe von jeweils 1 mL Entfärber gelöst. Jeweils 150 µL der resultierenden Lösungen wurden im UV-Messgerät bei 530 nm vermessen. Zur Bestimmung der Kollagen- bzw. Gelatinekonzentrationen in den Lösungen wurde zusätzlich eine Kalibrationsgerade erstellt und vermessen.

Dazu wurden sechs unterschiedliche Kollagen- bzw. Gelatinekonzentration in eine 24-Lochplatte gegeben und bei 37 °C vollständig getrocknet. Anschließend wurden die oben beschriebenen Schritte der Färbung und Entfärbung durchgeführt.

Entfärber: 0,1 % (w/w) Natronlauge, absol. Ethanol im Verhältnis 1:1

6.4.2. ZELLKULTURUNTERSUCHUNGEN

Die Kompositmaterialien Sponceram[®]/Gelatine und Sponceram[®]/Kollagen wurden zur Sterilisation zunächst über Nacht unter UV-Licht aufbewahrt. Anschließend wurden sie für 60 Minuten bei 37 °C in Kulturmedium inkubiert. Die vorbereiteten Kompositmaterialien wurden in einer 24-Lochplatte mit jeweils 40.000 MC3T3-E1-Zellen in 50 µL Medium besiedelt (je Material 5 Proben, eine Probe blieb als Referenz unbesiedelt). Nach 30 Minuten

Adhäsionszeit bei 37 °C / 5 % CO₂ wurden die Vertiefungen der 24-Lochplatte mit jeweils 1 mL Kulturmedium aufgefüllt. Bei Bedarf wurde das Medium aller Proben gewechselt.

Medium: DMEM + 10 % FCS + 100 U/mL Penicillin, 0,1 mg/mL Streptomycin + 2 µmol/mL L-Glutamin

6.5. MIKROSPHÄREN

6.5.1. HERSTELLUNG DER SPONCERAM[®]/PLGA-MIKROSPHÄREN

Die PLGA-Mikrosphären wurden am Technion Israel Institute of Technology (Haifa, Israel) unter Anwendung der doppelten Lösemittel-Emulsions-Evaporations-Methode hergestellt. Dazu wurden zunächst 200 mg PLGA in 0,5 mL Dichlormethan gelöst. Eine Lösung von 50 µg BMP-2 in Tris-EDTA-Puffer (pH = 8) wurde zugegeben und 1 Minute mit Hilfe eines Dispergiersystems homogenisiert. Die resultierende Wasser in Öl-Emulsion wurde mit einer mit Dichlormethan gesättigten Lösung von 5 % Polyvinylalkohol (85 – 89 kDa) versetzt und erneut homogenisiert. Die Wasser in Öl in Wasser-Emulsion wurde 5 Minuten stark gerührt. Anschließend wurden 50 mL einer Lösung aus 5 % (v/v) 2-Propanol in 0,1 % wässriger Polyvinyl-Alkohol-Lösung zugegeben. Nach 30 Minuten starken Rührens wurden die Mikrosphären zentrifugiert, dreimal gewaschen und lyophilisiert.

Die Sponceram[®]/PLGA-Mikrosphären wurden hergestellt, indem jeweils 1 mg des feinen Puders aus PLGA-Mikrosphären auf den Sponceram[®]-Keramiken verstreut wurde. Anschließend wurden die beladenen Keramiken für etwa eine halbe Minute über Dichlormethan gelagert, so dass sie der Dampfphase des Lösungsmittels ausgesetzt waren. Durch diesen letzten Schritt sollte sich ein Teil des PLGA langsam lösen, so dass die Mikrosphären auf der Oberfläche der Keramik anhafteten.

Tris-EDTA-Puffer (pH = 8): 10 mM Tris (pH = 8), 1 mM EDTA (pH = 8) in ddH₂O

6.5.2. ZELLKULTURUNTERSUCHUNGEN

Die mit PLGA/BMP-2 beladenen Sponceram[®]-Keramiken wurden zur Sterilisation zunächst 4 Stunden unter UV-Licht aufbewahrt. Zur Zellaussaat wurden die Materialien in eine 24-Lochplatte platziert und mit jeweils 30.000 Zellen in 50 µL Medium besiedelt. Als Referenzmaterial diente unbehandeltes Sponceram[®], das zur Sterilisation autoklaviert und ebenso besiedelt wurde. Pro Sorte wurden jeweils 4 Keramiken mit Zellen besiedelt, eine Keramik jeder Sorte blieb als Negativkontrolle unbesiedelt. Nach 30 Minuten Adhäsionszeit bei 37 °C / 5 % CO₂ wurden die Vertiefungen der 24-Lochplatte mit Kulturmedium befüllt. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 15 Tagen kultiviert, bei Bedarf wurde das Medium aller Proben gewechselt.

Medium: DMEM + 10 % FCS + 100 U/mL Penicillin, 0,1 mg/mL Streptomycin + 2 µmol/mL L-Glutamin

6.6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Å	Ångström
Abb.	Abbildung
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
BET-Oberfläche	Spezifische Oberfläche, benannt nach Brunauer, Emmet und Teller [m ² /g]
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i> Knochen-morphogenetisches Protein
BSA	bovines Serumalbumin
BSP	<i>Bone sialo protein</i> Knochensialoprotein
c	Konzentration
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COL-I	Kollagen I
°C	Grad Celsius
cDNA	<i>complementary DNA</i> komplementäre DNA
Da	Dalton
DAAc	Acroleindiethylacetal
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethylenpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>

	Desoxyribonukleinsäure
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eV	Elektronenvolt
FCS	<i>fetal calf serum</i>
	fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
h	Plancksches Wirkungsquantum
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
I _i	Ionisierungsenergie
IGF	<i>Insuline-like growth factor</i>
	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor
J	Joule
λ	Wellenlänge
L	Liter
M	Molar
MAG	2-Desoxy-N-methacrylamido-D-glucose
m _e	Masse eines Elektrons
M-MLV	<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>
	Moloney-Murine-Leukämievirus
MVA	Aktivierte Form von MVD
MVD	Copolymer aus 2-Desoxy-N-methacrylamido-D-glucose, N-Vinylpyrrolidon und Acroleindiethylacetal

MSC	<i>Mesenchymal stromal cell</i> Mesenchymale Stromazelle
v	Frequenz
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
N-VP	N-Vinylpyrrolidon
OC	Osteocalcin
ON	Osteonektin
OPN	Osteopontin
ox.p(MAG)	oxidierte Version von p(MAG)
Pa	Pascal
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i> Blutplättchen-Wachstumsfaktor
PLL	Poly-L-Lysin
p(MAG)	polymere Form von MAG
p(MVA)	polymere Form von MVA
p(MVD)	polymere Form von MVD
P/S	Penicillin/ Streptomycin
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> Ribonukleinsäure
RNase A	Ribonuclease A
rpm	<i>revolutions per minute</i>

	Umdrehungen pro Minute
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> Natriumdodecylsulfat
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylene-1,2-diamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt
XPS	<i>X-Ray photoelectron spectroscopy</i> röntgeninduzierte Photoelektronenspektroskopie

Für Längen-, Massen-, Stoffmengen- und Zeitangaben wurden SI-Einheiten verwendet sowie Vorsilben für dezimale Vielfache und Teile der SI-Einheiten nach DIN 1301.

6.7. GERÄTE UND LABORAUSSATTUNG

Gerät	Typus, Hersteller, Ort
Biochemischer Analysator	YSI 2700 Select™, YSI Incorporated, Yellow Springs, USA
Brutschrank	Heracell 240 Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Dispergiersystem	DI-18 Ultra-Turrax®, IKA® Werke GmbH & Co KG, Staufen, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	Olympus IX 50 Olympus Corporation, Tokio, Japan
Fluoreszenzplattenlesegerät	Fluoroskan Ascent Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Phasenkontrastmikroskop	Olympus BX 41 Olympus Corporation, Tokio, Japan
pH-Elektrode	Checker® Hanna Instruments Ltd, Leighton Buzzard, Großbritannien
Zählkammer	Blaubrand®, nach Neubauer Brand GmbH & Co KG, Wertheim, Deutschland
Pipetten	Research®: 10-100 µL, 100-1000 µL Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe	Pipetus® Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co KG, Eberstadt, Deutschland
Plattenlesegerät	Absorbance Microplate Reader Model 680 Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland Multiskan Spektrum

	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Rasterelektronenmikroskop	JSM-6700F Jeol Ltd., Tokio, Japan
Röntgenphotoelektronenspektrometer	Axis Ultra Kratos, Manchester, Großbritannien
Sterilbank	Technoflow 2F150-II GS Integra Biosciences AG, Zürich, Schweiz HERAsafe KS Kendro Laboratory Products, Boston, USA
Universalprüfmaschine	INSTRON Series 5548 Microtester Instron GmbH, Darmstadt, Deutschland
Wasseraufbereitungsanlage	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Zentrifuge	Multifuge 3s Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland

6.8. VERBRAUCHSMATERIALIEN

Material	Typus, Hersteller, Ort
Einmalhandschuhe	Semperguard Semperit AG Holding, Wien, Österreich
Einmalpipetten	Serologische Pipetten: 2 ml, 10 ml Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Eppendorf-Hütchen	Reagiergefäße: 1,5 mL, 2 mL Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Gelkolonne	Sephadex G-25 Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München, Deutschland
Kryoröhrchen	Mikroröhren mit Drehverschluss: 2 mL Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen	Spitzentyp A, B, D Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Reagenz- und Zentrifugenröhren	15 mL, 50 mL Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Spritzen	20 mL Terumo Europe NV, Leuven, Belgien
Spritzenvorsatzfilter	Minisart 0,2 µm Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Vakuumfilter	Sartolab 0,2 µm Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Wannenstapel	Wannenstapel Easy Fill™ Nunc GmbH & Co KG, Langensfeld, Deutschland
Zellkulturflaschen	T 175-Flaschen, T 75-Flaschen

	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturplatten	96-Lochplatten, 24-Lochplatten, 6-Lochplatten
	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Zentrifugalkondensatoren	MW 30.000, MW 3.000 Vivaspin 20
	Satorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Deutschland

6.9. VERWENDETE REAGENZIEN

Alle verwendeten Chemikalien hatten, wenn nicht anders aufgeführt, den höchsten erhältlichen Reinheitsgrad.

Reagenz	Hersteller
Acrylamid	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Adenosin	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Deutschland
Alizarinrot S	Fluka Chemie AG, Buchs, Deutschland
Aminosäuren, nicht-essentiell	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München, Deutschland
Ammoniumchlorid	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München, Deutschland
APS	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München, Deutschland
Bisacrylamid	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland
BMP-2	Prof. Sebald, Würzburg, Deutschland
BSA	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München, Deutschland
Cacodylsäure Natriumsalz Trihydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Calciumchlorid	Fluka Chemie AG, Buchs, Deutschland
Chloroform	Fluka Chemie AG, Buchs, Deutschland
DAPI	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

DEPC	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Dichlormethan	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat	Riedel-de-Haen AG, Seelze, Deutschland
Direktrot 80	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München, Deutschland
DMEM (Pulver)	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München, Deutschland
DMEM/Ham's Nutrient Mixture F-12	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München, Deutschland
dNTPs	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
EDTA	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München, Deutschland
EGM-2	Cambrex Bio Sciences Verviers, Verviers, Belgien
Essigsäure	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Formaldehyd	Fluka Chemie AG, Buchs, Deutschland
FCS	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
FITC	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München, Deutschland
Gelatine (aus Schweinehaut)	Fluka Chemie AG, Buchs, Deutschland
L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Glutaraldehyd	Amersham Pharmacia Biotech AG, Uppsala, Schweden
Glycerol	Fluka Chemie AG, Buchs, Deutschland

Glycin	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Hanks'-Puffer	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München, Deutschland
HEPES	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Hyaluronidase	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München, Deutschland
Isopropanol	Riedel-de-Haen AG, Seelze, Deutschland
Kaliumchlorid	Riedel-de-Haen AG, Seelze, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München, Deutschland
Kaliumhexacyanoferrat(III)	Fluka Chemie AG, Buchs, Deutschland
Kaliumhydrogencarbonat	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München, Deutschland
Kollagen	FILK, Freiberg, Deutschland
Kollagenase	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München, Deutschland
MAG	Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russland
Magnesiumchlorid	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München, Deutschland
Mercaptoethanol	Fluka Chemie AG, Buchs, Deutschland
MVA	Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russland
Natriumcarbonat	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München, Deutschland
Natriumchlorid	Fluka Chemie AG, Buchs, Deutschland
Natriumdodecylsulfat	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	Fluka Chemie AG, Buchs, Deutschland

Natrium-Pyruvat	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Natriumtetraborat Decahydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumthiosulfat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Nonidet P-40 Substitute	Fluka Chemie AG, Buchs, Deutschland
Oligo-dT-Primer	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
PCR-Puffer	
(5 x Colorless GoTaq™ Reaction Buffer)	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Pikrinsäurelösung (gesättigt)	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München, Deutschland
Polylactid-co-Glycolid	Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co KG, Ingelheim, Deutschland
Poly-L-Lysin Hydrobromid	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München, Deutschland
Polyvinylalkohol	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Primer	MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland
2-Propanol	Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Niederlande
Reverse Transkriptase (M-MLV RT)	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Ribonuclease A (bovin)	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München, Deutschland
RNA tidy G	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
3x RT-Puffer (M-MLV RT 5 x Buffer)	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
SIGMAFAST™ BCIP®/NBT	Sigma Aldrich Chemie-GmbH, München, Deutschland
Silbernitrat	Fluka Chemie AG, Buchs, Deutschland

Taq-Polymerase (GoTaq™ Hot Start)	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
TEMED	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Toluidinblau	Fluka Chemie AG, Buchs, Deutschland
Tris	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich

LITERATURVERZEICHNIS

1. Langer R, Vacanti JP. Tissue Engineering. *Science*. 1993;260(5110):920-926.
2. Schieker M, Seitz H, Drosse I, Seitz S, Mutschler W. Biomaterials as Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Eur J Trauma*. 2006;2:114-124.
3. Silber JS, Anderson DG, Daffner SD, et al. Donor Site Morbidity After Anterior Iliac Crest Bone Harvest for Single-Level Anterior Cervical Discectomy and Fusion. *Spine*. 2003;28(2):134-139.
4. Felsenberg D. Struktur und Funktion des Knochens: Stützwerk aus Kollagen und Hydroxylapatit. *Pharmazie in unserer Zeit*. 2001;30(6):488-494.
5. Takahashi N, Udagawa N, Takami M, Suda T. Cells of Bone: Osteoclast Generation. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, eds. *Principles of Bone Biology*. Vol 1. San Diego: Academic Press; 2002:109-126.
6. Jerosch J, Bader A, Uhr G. *Knochen: curasan Taschenatlas spezial* Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2002.
7. Marks SC, Odgren PR. Structure and Development of the Skeleton. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, eds. *Principles of Bone Biology*. Vol 1. 2. ed. San Diego: Academic Press; 2002.
8. Martin TJ, Findlay DM, Heath JK, Ng KW. Osteoblasts: Differentiation and Function. In: Mundy GR, Martin TJ, eds. *Physiology and Pharmacology of Bone*. Vol 107. Berlin: Springer Verlag; 1993:149-183.
9. Aubin JE, Triffitt JT. Mesenchymal Stem Cells and Osteoblast Differentiation. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, eds. *Principles of Bone Biology*. Vol 1. 2. ed. San Diego: Academic Press; 2002.
10. Talmage RV. Morphological and physiological considerations in a new concept of calcium transport in bone. *Am J Anat*. 1970;129(4):467-476.

11. van den Berg F. *Angewandte Physiologie 1: Das Bindegewebe des Bewegungsapparates verstehen und beeinflussen*. Vol 1. 2. korr. ed. Stuttgart: Thieme Verlag; 2003.
12. Marks SC, Jr., Popoff SN. Bone cell biology: the regulation of development, structure, and function in the skeleton. *Am J Anat*. 1988;183(1):1-44.
13. Weinbaum S, Cowin SC, Zeng Y. A model for the excitation of osteocytes by mechanical loading-induced bone fluid shear stresses. *J Biomech*. 1994;27(3):339-360.
14. Thews G, Mutschler E, Vaupel P. *Anatomie Physiologie Pathophysiologie des Menschen*. 5. ed. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH; 1999.
15. Eriksen EF, Vesterby A, Kassem M, Melsen F, Mosekilde L. Bone Remodelling and Bone Structure. In: Mundy GR, Martin TJ, eds. *Physiology and Pharmacology of Bone*. Vol 107. Berlin: Springer Verlag; 1993:67-109.
16. Lippert H. *Lehrbuch Anatomie*. 7. ed. München: Elsevier, Urban & Fischer Verlag; 2006.
17. Geissler E, Libbert E, Nitschmann J, Thomas-Petersein G. *Kleine Enzyklopädie Biologie*. Thun: Verlag Harri Deutsch; 1976.
18. Steinbrück I, Baumhoer D, Henle P. *Intensivkurs Anatomie*. 1. ed. München: Elsevier, Urban & Fischer Verlag; 2008.
19. Cullinane DM, Einhorn TA. Biomechanics of Bone. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, eds. *Principles of Bone Biology*. Vol 1. San Diego: Academic Press; 2002.
20. Ulfing N. *Bewegungsapparat*. Basel: Karger Publishers; 2002.
21. Czihak G, Langer H, Ziegler H. *Biologie*. 4. ed. Berlin: Springer Verlag; 1990.
22. Boyan BD, Lossdörfer S, Wang L, et al. Osteoblasts generate an osteogenic microenvironment when grown on surfaces with rough microtopographies. *Eur Cell Mater*. 2003;6:22-27.

23. Kim BS, Baez CE, Atala A. Biomaterials for tissue engineering. *World J Urol.* 2000;18(1):2-9.
24. Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL. Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromol Biosci.* 2004;4(8):743-765.
25. Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J.* 2001;10 Suppl 2:S96-101.
26. Yannas IV. Biologically Active Scaffolds Based on Collagen-GAG Copolymers. In: Ma PX, Elisseeff J, eds. *Scaffolding in Tissue Engineering.* Boca Raton: Taylor & Francis Group; 2006.
27. Ehrenfreund-Kleinman T, Golenser J, Domb AJ. Polysaccharide Scaffolds for Tissue Engineering. In: Ma PX, Elisseeff J, eds. *Scaffolding in Tissue Engineering.* Boca Raton: Taylor & Francis Group; 2006.
28. Tuzlakoglu K, Alves CM, Mano JF, Reis RL. Production and characterization of chitosan fibers and 3-D fiber mesh scaffolds for tissue engineering applications. *Macromol Biosci.* 2004;4(8):811-819.
29. Martins AM, Santos MI, Azevedo HS, Malafaya PB, Reis RL. Natural origin scaffolds with in situ pore forming capability for bone tissue engineering applications. *Acta Biomater.* 2008;4(6):1637-1645.
30. Ma PX. Alginate for Tissue Engineering. In: Ma PX, Elisseeff J, eds. *Scaffolding in Tissue Engineering.* Boca Raton: Taylor & Francis Group; 2006.
31. Yang S, Leong KF, Du Z, Chua CK. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. *Tissue Eng.* 2001;7(6):679-689.
32. Chan G, Mooney DJ. New materials for tissue engineering: towards greater control over the biological response. *Trends Biotechnol.* 2008;26(7):382-392.
33. Santavirta S, Konttinen YT, Saito T, et al. Immune response to polyglycolic acid implants. *J Bone Joint Surg Br.* 1990;72(4):597-600.

34. Taylor MS, Daniels AU, Andriano KP, Heller J. Six bioabsorbable polymers: in vitro acute toxicity of accumulated degradation products. *J Appl Biomater.* 1994;5(2):151-157.
35. Hollinger JO, Battistone GC. Biodegradable bone repair materials. Synthetic polymers and ceramics. *Clin Orthop Relat Res.* 1986(207):290-305.
36. Lavik E, Langer R. *Tissue engineering: current state and perspectives.* *Appl Microbiol Biotechnol.* 2004;65(1):1-8.
37. Mano JF, Reis RL. Osteochondral defects: present situation and tissue engineering approaches. *J Tissue Eng Regen Med.* 2007;1(4):261-273.
38. Piconi C, G. M. Zirconia as a ceramic biomaterial. *Biomaterials.* 1999;20:1-25.
39. Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials.* 2000;21(24):2529-2543.
40. Wei G, Ma PX. Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials.* 2004;25(19):4749-4757.
41. Deng X, Hao J, Wang C. Preparation and mechanical properties of nanocomposites of poly(D,L-lactide) with Ca-deficient hydroxyapatite nanocrystals. *Biomaterials.* 2001;22(21):2867-2873.
42. Kasuga T, Ota Y, Nogami M, Abe Y. Preparation and mechanical properties of polylactic acid composites containing hydroxyapatite fibers. *Biomaterials.* 2001;22(1):19-23.
43. Ignjatovic N, Tomic S, Dakic M, Miljkovic M, Plavsic M, Uskokovic D. Synthesis and properties of hydroxyapatite/poly-L-lactide composite biomaterials. *Biomaterials.* 1999;20(9):809-816.
44. Malafaya PB, Silva GA, Baran ET, Reis RL. Drug delivery therapies I: General trends and its importance on bone tissue engineering applications. *Current Opinion in Solid State and Materials Science.* 2002;6(4):283-295.

45. Thanoo BC, Doll WJ, Mehta RC, Digenis GA, DeLuca PP. Biodegradable indium-111 labeled microspheres for in vivo evaluation of distribution and elimination. *Pharm Res.* 1995;12(12):2060-2064.
46. Cohen S, Yoshioka T, Lucarelli M, Hwang LH, Langer R. Controlled delivery systems for proteins based on poly(lactic/glycolic acid) microspheres. *Pharm Res.* 1991;8(6):713-720.
47. Benoit JP, Faisant N, Venier-Julienne MC, Menei P. Development of microspheres for neurological disorders: from basics to clinical applications. *J Control Release.* 2000;65(1-2):285-296.
48. Tabata. Role of Gelatin in the Release Carrier of Growth Factor for Tissue Engineering. In: Ma PX, Elisseeff JH, eds. *Scaffolding in Tissue Engineering*: CRC Press; 2005:45-59.
49. Young S, Wong M, Tabata Y, Mikos AG. Gelatin as a delivery vehicle for the controlled release of bioactive molecules. *J Contr Release.* 2005;109:256-274.
50. Gombotz WR, Pettit DK. Biodegradable polymers for protein and peptide drug delivery. *Bioconjug Chem.* 1995;6(4):332-351.
51. Schense JC, Bloch J, Aebischer P, Hubbell JA. Enzymatic incorporation of bioactive peptides into fibrin matrices enhances neurite extension. *Nat Biotechnol.* 2000;18(4):415-419.
52. Taipale J, Keski-Oja J. Growth factors in the extracellular matrix. *Faseb J.* 1997;11(1):51-59.
53. Goepferich A. Mechanisms of polymer degradation and erosion. *Biomaterials.* 1996;17:103-114.
54. Bencherif SA, Sheehan JA, Hollinger JO, Walker LM, Matyjaszewski K, Washburn NR. Influence of cross-linker chemistry on release kinetics of PEG-co-PGA hydrogels. *J Biomed Mater Res A.* 2008;[Epub ahead of print].
55. Kim HW, Knowles JC, Kim HE. Development of hydroxyapatite bone scaffold for controlled drug release via poly(epsilon-caprolactone) and hydroxyapatite hybrid coatings. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2004;70(2):240-249.

56. Arcos D, Cabanas MV, Ragel CV, Vallet-Regi M, San Roman J. Ibuprofen release from hydrophilic ceramic-polymer composites. *Biomaterials*. 1997;18(18):1235-1242.
57. Bouissou C, van der Walle C. Poly(lactic-co-glycolic acid) Microspheres. In: Uchegbu IF, Schätzlein A, eds. *Polymers in drug delivery*. illustrated ed. Boca Raton: CRC Press; 2006:81-100.
58. Fu K, Harrell R, Zinski K, et al. A potential approach for decreasing the burst effect of protein from PLGA microspheres. *J Pharm Sci*. 2003;92(8):1582-1591.
59. Chan L, Lee H, Heng P. Production of alginate microspheres by internal gelation using an emulsification method. *Int J Pharm*. 2002;242(1-2):259-262.
60. Zhang Y, Zhang M. Three-dimensional macroporous calcium phosphate bioceramics with nested chitosan sponges for load-bearing bone implants. *J Biomed Mater Res*. 2002;61(1):1-8.
61. Lee JY, Seol YJ, Kim KH, et al. Transforming growth factor (TGF)-beta1 releasing tricalcium phosphate/chitosan microgranules as bone substitutes. *Pharm Res*. 2004;21(10):1790-1796.
62. Lindl T. *Zell- und Gewebekultur*. 5 ed. Heidelberg: Spektrum, Akademischer Verlag; 2002.
63. Li J, Yun H, Gong Y, Zhao N, Zhang X. Investigation of MC3T3-E1 Cell Behaviour on the Surface of GRGDS-Coupled Chitosan. *Biomacromolecules*. 2006;7(4):1112-1123.
64. Craig WS, Cheng S, Mullen DG, Blevitt J, Pierschbacher MD. Concept and progress in the development of RGD-containing peptide pharmaceuticals. *Biopolymers*. 1995;37(2):157-175.
65. Massia SP, Hubbell JA. Covalent surface immobilization of Arg-Gly-Asp- and Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg-containing peptides to obtain well-defined cell-adhesive substrates *Anal Biochem*. 1990;187(2):292-301.
66. Ranieri JP, Bellamkonda R, Bekos EJ, Vargo TG, Gardella JA, Jr., Aebischer P. Neuronal cell attachment to fluorinated ethylene propylene films with covalently immobilized laminin oligopeptides YIGSR and IKVAV. II. *J Biomed Mater Res*. 1995;29(6):779-785.

67. Massia SP, Hubbell JA. Vascular endothelial cell adhesion and spreading promoted by the peptide REDV of the IIIICS region of plasma fibronectin is mediated by integrin alpha 4 beta 1. *J Biol Chem.* 1992;267(20):14019-14026.
68. Rosen V, Wozney JM. Bone Morphogenetic Proteins. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, eds. *Principles of Bone Biology*. Vol 2. San Diego: Academic Press; 2002.
69. Miyazono K. Bone Morphogenetic Protein Receptors and Actions. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, eds. *Principles of Bone Biology*. Vol 2. San Diego: Academic Press; 2002.
70. Bishop GB, Einhorn TA. Current and future clinical applications of bone morphogenetic proteins in orthopaedic trauma surgery. *Int Orthop.* 2007;31(6):721-727.
71. *Europäischer öffentlicher Beurteilungsbericht: Osigraft*: European Medicines Agency; 2007.
72. *Europäischer öffentlicher Beurteilungsbericht: InductOs*: European Medicines Agency; 2008.
73. Shin H, Jo S, Mikos AG. Biomimetic materials for tissue engineering. *Biomaterials.* 2003;24(24):4353-4364.
74. Salchert K, Gouzy MF, Glorius M, Kuhn A, Nitschke M, Werner C. Immobilization of an anticoagulant benzamidine derivative: effect of spacer arms and carrier hydrophobicity on thrombin binding. *Acta Biomater.* 2005;1(4):441-449.
75. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315-317.
76. Sikavitsas VI, Temenoff JS, Mikos AG. Biomaterials and bone mechanotransduction. *Biomaterials.* 2001;22(19):2581-2593.
77. Yu X, Botchwey EA, Levine EM, Pollack SR, Laurencin CT. Bioreactor-based bone tissue engineering: the influence of dynamic flow on osteoblast phenotypic expression and matrix mineralization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Aug 3 2004;101(31):11203-11208.

78. Franceschi RT, Xiao G. Regulation of the osteoblast-specific transcription factor, Runx2: responsiveness to multiple signal transduction pathways. *J Cell Biochem.* 2003;88(3):446-454.
79. Ducy P. Cbfa1: a molecular switch in osteoblast biology. *Dev Dyn.* 2000;219(4):461-471.
80. Aubin JE, Heersche JN. Osteoprogenitor Cell Differentiation to Mature Bone-Forming Osteoblasts. *Drug Development Research.* 2000;49(3):206-215.
81. Liu F, Malaval L, Aubin JE. Global amplification polymerase chain reaction reveals novel transitional stages during osteoprogenitor differentiation. *J Cell Sci.* 2003;116(Pt 9):1787-1796.
82. Bellows CG, Aubin JE, Heersche JN, Antosz ME. Mineralized bone nodules formed in vitro from enzymatically released rat calvaria cell populations. *Calcif Tissue Int.* 1986;38(3):143-154.
83. Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, et al. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol.* 1990;143(3):420-430.
84. Ganten D, Ruckpaul K. *Grundlagen der molekularen Medizin.* 3. ed. Berlin: Springer Verlag; 2007.
85. Freshney RI. *Culture of Animal Cells.* 4 ed. New York: John Wiley & Sons Inc.; 2000.
86. Ellis M, Jarman-Smith M, Chaudhuri JB. Bioreactor Systems for Tissue Engineering: A Four-Dimensional Challenge. In: Chaudhuri J, Al-Rubeai M, eds. *Bioreactors for Tissue Engineering.* Dordrecht: Springer; 2005:375.
87. Bancroft GN, Sikavitsas VI, Mikos AG. Design of a flow perfusion bioreactor system for bone tissue-engineering applications. *Tissue Eng.* 2003;9(3):549-554.
88. Portner R, Nagel-Heyer S, Goepfert C, Adamietz P, Meenen NM. Bioreactor design for tissue engineering. *J Biosci Bioeng.* 2005;100(3):235-245.

89. Sikavitsas VI, Bancroft GN, Mikos AG. Formation of three-dimensional cell/polymer constructs for bone tissue engineering in a spinner flask and a rotating wall vessel bioreactor. *J Biomed Mater Res*. 2002;62(1):136-148.
90. Wang TW, Wu HC, Wang HY, Lin FH, Sun JS. Regulation of adult human mesenchymal stem cells into osteogenic and chondrogenic lineages by different bioreactor systems. *J Biomed Mater Res A*. Mar 15 2009;88(4):935-946.
91. Hammond TG, Hammond JM. Optimized suspension culture: the rotating-wall vessel. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2001;281(1):F 12-25.
92. Droppert PM. The effects of microgravity on the skeletal system--a review. *J Br Interplanet Soc*. 1990;43(1):19-24.
93. Fritton SP, Weinbaum S. Fluid and Solute Transport in Bone: Flow-Induced Mechanotransduction. *Annual Review Of Fluid Mechanics*. 2009;41:347-374.
94. Ohyabu Y, Kida N, Kojima H, Taguchi T, Tanaka J, Uemura T. Cartilaginous tissue formation from bone marrow cells using rotating wall vessel (RWV) bioreactor. *Biotechnol Bioeng*. 2006;95(5):1003-1008.
95. Lelkes PI, Galvan DL, Hayman GT, et al. Simulated microgravity conditions enhance differentiation of cultured PC12 cells towards the neuroendocrine phenotype. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 1998;34(4):316-325.
96. Korossis SA, Bolland F, Kearney JN, Fisher J, Ingham E. Bioreactors in Tissue Engineering. In: Ashammakhi N, Reis RL, eds. *Topics in Tissue Engineering*. Vol 2: ExpertTissue; 2006.
97. Holtorf HL, Jansen JA, Mikos AG. Flow perfusion culture induces the osteoblastic differentiation of marrow stroma cell-scaffold constructs in the absence of dexamethasone. *J Biomed Mater Res A*. Mar 1 2005;72(3):326-334.
98. Powell CA, Smiley BL, Mills J, Vandenburg HH. Mechanical stimulation improves tissue-engineered human skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002;283(5):C1557-1565.
99. Altman GH, Lu HH, Horan RL, et al. Advanced bioreactor with controlled application of multi-dimensional strain for tissue engineering. *J Biomech Eng*. 2002;124(6):742-749.

100. Hoerstrup SP, Sodian R, Sperling JS, Vacanti JP, Mayer JE, Jr. New pulsatile bioreactor for in vitro formation of tissue engineered heart valves. *Tissue Eng.* 2000;6(1):75-79.
101. Markovic I. Evaluation of safety and quality impact of extractable and leachable substances in therapeutic biologic protein products: a risk-based perspective. *Expert Opin Drug Saf.* 2007;6(5):487-491.
102. Eibl R, Eibl D. Application of disposable bag bioreactors in tissue engineering and for the production of therapeutic agents. In: Kasper C, Van Griensven M, Poertner R, eds. *Bioreactor Systems for Tissue Engineering*. Vol 112. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag; 2009:183-207.
103. Singh V. Disposable bioreactor for cell culture using wave-induced agitation. *Cytotechnology.* 1999;30(1-3):149-158.
104. Stettler M, Zhang X, Hacker DL, De Jesus M, Wurm FM. Novel orbital shake bioreactors for transient production of CHO derived IgGs. *Biotechnol Prog.* 2007;23(6):1340-1346.
105. Genzel Y, Olmer RM, Schafer B, Reichl U. Wave microcarrier cultivation of MDCK cells for influenza virus production in serum containing and serum-free media. *Vaccine.* 2006;24(35-36):6074-6087.
106. Heinzelmann E. Pharmawirkstoffe aus dem 1-Weg-Bioreaktor. *Technische Rundschau.* 2004;1(2):40-43.
107. Langhammer S, Riedel M, Bushnaq-Josting H, Brecht R, Pörtner R, Marx U. Evaluation of a Scalable Disposable Bioreactor System for Manufacturing of Mammalian Cell Based Biopharmaceuticals *Cell Technology for Cell Products, Proceedings of the 19th ESACT Meeting, Harrogate, UK, June 5-8, 2005* Dordrecht: Springer The Netherlands; 2007.
108. Einweg statt Mehrweg, Einweg-Prozesstechnik für die Biotechnologie. *CHEManager,* 2006: 6.
109. Suck K, Behr L, Fischer M, et al. Cultivation of MC3T3-E1 cells on a newly developed material (Sponceram®) using a rotating bed system bioreactor. *Journal of Biomedical Materials Research Part A.* 2006;80A(2):268-275.

110. Kayser O. *Grundwissen pharmazeutische Biotechnologie*. Wiesbaden: Vieweg + Teubner Verlag; 2002.
111. Kong H, Mooney DJ. Polysaccharide-Based Hydrogels in Tissue Engineering. In: Dumitriu S, ed. *Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility*. 2., illustrated ed. Boca Raton: CRC Press; 2004.
112. Korzhikov V, Diederichs S, Nazarova OV, et al. Water-Soluble Aldehyde-Bearing Polymers of 2-Deoxy-2-methacrylamido-D-glucose for Bone Tissue Engineering. *J Appl Polym Sci*. 2008;108:2386-2397.
113. Korzhikov V, Roeker S, Vlakh E, Kasper C, Tennikova T. Synthesis of Multifunctional Polyvinylsaccharide Containing Controllable Amounts of Biospecific Ligands. *Bioconjug Chem*. 2008;19(3):617-625.
114. Diederichs S. *Dynamische Kultivierungsmethoden für das Tissue Engineering von Knochen* [Dissertation]. Hannover: Naturwissenschaftliche Fakultät, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität 2008.
115. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1-2):55-63.
116. Marquardt H, Schäfer S. *Lehrbuch der Toxikologie*. 2. ed. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH; 2004.
117. Bode F. *Neue Ansätze für das funktionelle Knochen Tissue Engineering* [Diplomarbeit]. Hannover: Naturwissenschaftliche Fakultät, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität; 2008.
118. Athanasiou KA, Zhu C-F, Lanctot DR, Agrawal CM, Wang X. Fundamentals of Biomechanics in Tissue Engineering of Bone. *Tissue Eng*. 2000;6(4):361-381.
119. Rainaldi G, Filippini P, Ferrante A, Indovina PL, Santini MT. Fibronectin facilitates adhesion of K562 leukemic cells normally growing in suspension to cationic surfaces. *J Biomed Mater Res*. 2001;55(1):104-113.
120. Steele JG, McFarland C, Dalton BA, et al. Attachment of human bone cells to tissue culture polystyrene and to unmodified polystyrene: the effect of surface chemistry upon initial cell attachment. *J Biomater Sci Polym Ed*. 1993;5(3):245-257.

121. Maslow DE, Weiss L. Some effects of positively charged surface groups on cell aggregation. *J Cell Sci.* 1976;21(2):219-225.
122. Maroudas NG. Adhesion and spreading of cells on charged surfaces. *J Theor Biol.* 1975;49(2):417-424.
123. Qiu Q, Sayer M, Kawaja M, Shen X, Davies JE. Attachment, morphology, and protein expression of rat marrow stromal cells cultured on charged substrate surfaces. *J Biomed Mater Res.* 1998;42(1):117-127.
124. Ma Z, Gao C, Gong Y, Ji J, Shen J. Immobilization of natural macromolecules on poly-L-lactic acid membrane surface in order to improve its cytocompatibility. *J Biomed Mater Res.* 2002;63(6):838-847.
125. Budd JS, Bell PR, James RF. Attachment of indium-111 labelled endothelial cells to pretreated polytetrafluoroethylene vascular grafts. *Br J Surg.* 1989;76(12):1259-1261.
126. Geissler U, Hempel U, Wolf C, Scharnweber D, Worch H, Wenzel K. Collagen type I-coating of Ti6Al4V promotes adhesion of osteoblasts. *J Biomed Mater Res.* 2000;51(4):752-760.
127. Mazia D, Schatten G, Sale W. Adhesion of cells to surfaces coated with polylysine. Applications to electron microscopy. *J Cell Biol.* 1975;66(1):198-200.
128. Dee KC, Puleo DA, Bizios R. Biomaterial Surfaces and the Physiological Environment In: John Wiley & Sons I, ed. *An Introduction To Tissue-Biomaterial Interactions.* New Jersey; 2002:149-172.
129. *Betriebsanweisung Z^(R)RP Technologie.* Eichstätt: Zellwerk GmbH; 2007.
130. Eibl R, Eibl D. Disposable bioreactors for cell culture-based bioprocessing. *ACHEMA WORLDWIDE News.* 2007;2:8-10.
131. Seibel MJ, Eastell R, Gundberg CM, Hannon R, Pols HAP. Biochemical Markers of Bone Metabolism. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, eds. *Principles of Bone Biology.* Vol 2. 2. ed. San Diego: Academic Press; 2002.
132. Anderson HC, Morris DC. Mineralization. In: Mundy GR, Martin TJ, eds. *Physiology and Pharmacology of Bone.* Vol 107. Berlin: Springer-Verlag; 1993.

133. Noda M, Denhardt DT. Osteopontin. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, eds. *Principles of Bone Biology*. Vol 1. 2. ed. San Diego: Academic Press; 2002.
134. Delmas PD, Malaval L. The Proteins of Bone. In: Mundy GR, Martin TJ, eds. *Physiology and Pharmacology of Bone*. Vol 107. Berlin: Springer-Verlag; 1993.
135. Lian JB, Stein GS. Concepts of osteoblast growth and differentiation: basis for modulation of bone cell development and tissue formation. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1992;3(3):269-305.
136. Forastieri H, Ingham KC. Fluid-phase interaction between human plasma fibronectin and gelatin determined by fluorescence polarization assay. *Arch Biochem Biophys*. 1983;227(2):358-366.
137. Heino J. The collagen family members as cell adhesion proteins. *Bioessays*. 2007;29(10):1001-1010.
138. Gorinski N. *Herstellung funktionalisierter Kompositmaterialien für das Tissue Engineering* [Diplomarbeit]. Hannover: Naturwissenschaftliche Fakultät, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität 2009.
139. Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J*. 1979;11(4):447-455.
140. Shive MS, Anderson JM. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Adv Drug Deliv Rev*. 1997;28(1):5-24.
141. Sinha VR, Trehan A. Biodegradable microspheres for protein delivery. *J Control Release*. 2003;90(3):261-280.
142. von Burkersroda F, Schedl L, Göpferich A. Why degradable polymers undergo surface erosion or bulk erosion *Biomaterials*. 2002;23(21):4221-4231.
143. Batycky RP, Hanes J, Langer R, Edwards DA. A theoretical model of erosion and macromolecular drug release from biodegrading microspheres. *J Pharm Sci*. 1997;86(12):1464-1477.

144. Wolbank S, Peterbauer A, Wassermann E, et al. Labelling of human adipose-derived stem cells for non-invasive in vivo cell tracking. *Cell Tissue Bank*. 2007;8(3):163-177.
145. Karlson P, Doenecke D, Koolman J. *Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler*. 14. ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 1994.
146. Switzer RC, 3rd, Merrill CR, Shifrin S. A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem*. 1979;98(1):231-237.
147. Rabilloud T. Mechanisms of protein silver staining in polyacrylamide gels: a 10-year synthesis. *Electrophoresis*. 1990;11(10):785-794.
148. Atkins PW. *Physikalische Chemie*. 2. ed. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH; 1996.
149. Wedler G. *Lehrbuch der Physikalischen Chemie*. 5. ed. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH; 2004.
150. *Product information: Sponceram(R) cell carrier disc for adherent cell culture with Red Point(R) Technology*. Eichstätt: Zellwerk GmbH; 2008.
151. Sanz-Herrera JA, Kasper C, van Griensven M, Garcia-Aznar JM, Ochoa I, Doblare M. Mechanical and flow characterization of Sponceram carriers: Evaluation by homogenization theory and experimental validation. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2008;87(1):42-48.
152. *Product information: A down scale disposable system for the Z^(R)RP Technology*. Eichstätt: Zellwerk GmbH; 2009.
153. Puchtler H, Meloan SN, Terry MS. On the history and mechanism of alizarin and alizarin red S stains for calcium. *J Histochem Cytochem*. 1969;17(2):110-124.
154. Moriguchi T, Yano K, Nakagawa S, Kaji F. Elucidation of adsorption mechanism of bone-staining agent alizarin red S on hydroxyapatite by FT-IR microspectroscopy. *J Colloid Interface Sci*. 2003;260(1):19-25.
155. Puchtler H, Meloan SN. Demonstration of phosphates in calcium deposits: a modification of von Kossa's reaction. *Histochemistry*. 1978;56(3-4):177-185.

- 156.** Chaplin AJ, Grace SR. Calcium oxalate and the von Kossa method with reference to the influence of citric acid. *Histochem J.* 1975;7(5):451-458.
- 157.** *Produktinformation DAPI.* Mannheim: Roche Diagnostics GmbH; 2001.
- 158.** Koburg E, Steinbach E. Toluidinblau-Vitalfärbung zur Früherkennung und Abgrenzung maligner Kehlkopftumoren. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology.* 1969;194(2):320-323.
- 159.** McGadey J. A tetrazolium method for non-specific alkaline phosphatase. *Histochemie.* 1970;23(2):180-184.
- 160.** Lottspeich F, Zorbas H. *Bioanalytik.* Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 1998.
- 161.** Newton CR, Graham A. *PCR.* Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 1994.
- 162.** Glick BR, Pasternak JJ. *Molekulare Biotechnologie.* Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 1995.

LEBENS LAUFPersönliche Daten

Name Stefanie Röker

Geburtstag 20.09.1982

Nationalität deutsch

Schulbildung

1988-1992 Grundschule und Mittelpunktschule Osterwald, Garbsen

1992-1994 Orientierungsschule Berenbostel, Garbsen

1994-2001 Gymnasium Berenbostel (jetzt: Geschwister Scholl Gymnasium), Garbsen,
Abschluss Abitur

Studium

2001-2006 Studium der Chemie, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

2007-2009 Promotion am Institut für Technische Chemie, Gottfried Wilhelm Leibniz
Universität Hannover

PUBLIKATIONSLISTE

Journal of Biotechnology 2007, 131 (3) 335-345

Collagen Biomaterial Doped with Colominic Acid for Cell Culture Applications with Regard to Peripheral Nerve Repair

S. Bruns, Y. Stark, S. Röker, M. Wieland, G. Dräger, A. Kirschning, F. Stahl, C. Kasper, T. Scheper

Journal of Bioconjugate Chemistry 2008, 19 (3) 617-625

Synthesis of Multifunctional Polyvinylsaccharide containing Controllable Amounts of Biospecific Ligands

V. Korzhikov, S. Röker, E. Vlach, C. Kasper, T. Tennikova

Chemie Ingenieur Technik 2008, 80 (12) 1803-1808

3D-Zellkultivierung im Z[®]RP-System

D. Marten, K. Suck, S. Diederichs, S. Röker, M. van Griensven, C. Leschke, H. Hoffmeister, C. Kasper

Materialwissenschaft und Werkstofftechnik 2009, 40 (1-2) 54-60

Novel 3D biomaterials for Tissue Engineering based on collagen and macroporous Ceramics

S. Röker, S. Diederichs, Y. Stark, S. Böhm, I. Ochoa, J.A. Sanz, J.M. García-Aznar, M. Doblaré, M. van Griensven, T. Scheper, C. Kasper

Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, *online veröffentlicht am 28.04.2009*

A study on the influence of biocompatible composites with bioactive ligands towards their effect on cell adhesion and growth for the application in Bone Tissue Engineering

S. Röker, S. Böhm, S. Diederichs, F. Bode, A. Quade, V. Korzhikov, M. van Griensven, T.B. Tennikova, C. Kasper

Journal of Biotechnology Progress (*angenommen*)

Dynamic cultivation of human mesenchymal stem cells in a rotating bed bioreactor system based on the Z®RP platform

S. Diederichs, S. Röker, A. Peterbauer, T. Scheper, M. van Griensven, C. Kasper

Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, 2009, 112, 95-123

Mechanical Strain Using 2D and 3D Bioreactors Induces Osteogenesis – Implications for Bone Tissue Engineering

M. van Griensven, S. Diederichs, S. Röker, S. Böhm, A. Peterbauer, S. Wollbank, D. Riechers, F. Stahl, C. Kasper