

**Untersuchung der osteoblastären Differenzierung  
am Interface von Knochenersatzmaterialien  
nach Zugabe von Pharmaka**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von  
Sebastian Wilczek  
aus Pyskowice/Polen

Gießen 2015

Aus dem Labor für experimentelle Unfallchirurgie  
der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Christian Heiß

Gutachter: Prof. Dr. Katrin S. Lips  
Gutachter: Prof. Dr. Sabine Wenisch

Tag der Disputation: 02.02.2016

# Inhaltsverzeichnis

|         |  |    |
|---------|--|----|
| 1       | Einleitung.....  | 1  |
| 1.1     | Osteoporose.....                                       | 1  |
| 1.2     | Knochenersatzmaterialien .....                         | 3  |
| 1.3     | Osteoblastäre Differenzierung .....                    | 6  |
| 1.4     | Neuronale Mediatoren im Knochenstoffwechsel .....      | 9  |
| 1.4.1   | Neurotrophine.....                                     | 9  |
| 1.4.2   | Das cholinerge System.....                             | 11 |
| 1.5     | Fragestellung.....                                     | 14 |
| 2       | Material und Methoden .....                            | 15 |
| 2.1     | Material .....   | 15 |
| 2.1.1   | Geräte, Laborbedarf und Verbrauchsmaterialien .....    | 15 |
| 2.1.2   | Medien, Chemikalien und Puffer .....                   | 16 |
| 2.1.2.1 | PBS-Puffer und Lysis-Puffer .....                      | 16 |
| 2.1.2.2 | Osteogenes Medium.....                                 | 16 |
| 2.1.2.3 | Ham's F-12K-(Kaihg'n's)-Medium .....                   | 17 |
| 2.1.3   | Firmen .....   | 17 |
| 2.1.4   | ALP-Assay.....   | 18 |
| 2.1.5   | PicoGreen-Assay.....                                   | 18 |
| 2.1.6   | Knochenersatzmaterialien .....                         | 19 |
| 2.1.6.1 | Calciumphosphatzement .....                            | 19 |
| 2.1.6.2 | Kollagen-Tapes.....                                    | 20 |
| 2.2     | Methoden .....   | 21 |
| 2.2.1   | Gewinnung von hMSC aus Bohrmehl .....                  | 21 |
| 2.2.2   | Kultivierung der hMSC.....                             | 22 |
| 2.2.3   | Aussäen der hMSC .....                                 | 23 |
| 2.2.4   | Spender der hMSC .....                                 | 24 |
| 2.2.5   | Ansetzen des osteogenen Mediums .....                  | 24 |
| 2.2.6   | Wechsel des Mediums und Zugabe der Pharmaka.....       | 25 |
| 2.2.7   | Ernten der Zellen und Lebendzellbeobachtung.....       | 26 |
| 2.2.8   | Erstellen der Standardkurven .....                     | 26 |
| 2.2.8.1 | ALP.....   | 26 |
| 2.2.8.2 | Zellzahl (PicoGreen) .....                             | 27 |
| 2.2.9   | Messungen der ALP-Konzentration und der Zellzahl ..... | 28 |
| 2.2.9.1 | Messung der ALP-Konzentration .....                    | 29 |
| 2.2.9.2 | Messung der Zellzahl.....                              | 29 |
| 2.2.10  | Konzentrationstest der Pharmaka.....                   | 29 |
| 2.2.11  | Statistische Auswertung .....                          | 29 |

|         |   |    |
|---------|---|----|
| 3       | Ergebnisse.....   | 30 |
| 3.1     | Konzentrationstest der Pharmaka.....  | 30 |
| 3.2     | Versuche ohne Knochenersatzmaterialien .....  | 32 |
| 3.3     | Lebendzellbeobachtung .....   | 33 |
| 3.3.1   | Konzentrationstest für BDNF .....   | 33 |
| 3.3.2   | Konzentrationstest für Nikotin .....  | 34 |
| 3.3.3   | Konzentrationstest für ACh .....  | 35 |
| 3.3.4   | Test ohne Material.....   | 37 |
| 3.3.5   | CPC .....   | 38 |
| 3.3.6   | Kollagen-Tapes .....  | 40 |
| 3.3.7   | hMSC einer osteoporotischen Spenderin .....   | 41 |
| 3.4     | Differenzierungsverhalten.....  | 43 |
| 3.4.1   | CPC ohne Pharmaka.....  | 43 |
| 3.4.2   | Kollagen-Tapes ohne Pharmaka .....  | 44 |
| 3.4.3   | CPC mit Pharmaka.....   | 46 |
| 3.4.4   | Kollagen-Tapes mit Pharmaka.....  | 47 |
| 3.4.5   | Osteoporotische und ältere Spenderin.....   | 48 |
| 3.4.5.1 | CPC.....  | 48 |
| 3.4.5.2 | Kollagen-Tapes.....   | 49 |
| 4       | Diskussion .....  | 50 |
| 4.1     | Zellsystem und funktioneller In-vitro-ALP-Assay.....  | 50 |
| 4.2     | Wirkungen der Knochenersatzmaterialien auf die Zellpopulation.....                              | 53 |
| 4.2.1   | CPC .....   | 54 |
| 4.2.2   | Kollagen-Tapes .....  | 56 |
| 4.3     | Evaluation verschiedener Pharmakakonzentrationen<br>am Interface von Knochenersatzmaterial..... | 58 |
| 4.3.1   | BDNF .....  | 59 |
| 4.3.2   | Nikotin .....   | 61 |
| 4.3.3   | ACh .....   | 66 |
| 4.4     | Osteoporose und Alter.....  | 67 |
| 4.5     | Ausblick.....   | 69 |
| 5       | Zusammenfassung .....   | 71 |
| 6       | Summary .....   | 72 |
| 7       | Verzeichnisse .....   | 73 |
| 7.1     | Abkürzungsverzeichnis.....  | 73 |

|     |                               |    |
|-----|-------------------------------|----|
| 7.2 | Abbildungsverzeichnis.....    | 75 |
| 7.3 | Tabellenverzeichnis.....      | 76 |
| 7.4 | Literaturverzeichnis .....    | 77 |
| 8   | Publikationen .....           | 93 |
| 8.1 | Kongressbeiträge.....         | 93 |
| 8.2 | Poster .....                  | 93 |
| 9   | Ehrenwörtliche Erklärung..... | 94 |
| 10  | Danksagung .....              | 95 |

# 1 Einleitung

## 1.1 Osteoporose

Die demografische Entwicklung in Industrienationen wie Deutschland hat in den letzten Jahren zu einer Veränderung der Bevölkerungsstruktur hin zu einer immer älter werdenden Gesellschaft geführt (Statistisches Bundesamt 2006). Diese Veränderung hat vor allem (v.a.) zwei Ursachen: zum einen den Rückgang der Geburtenrate, zum anderen den Anstieg der Lebenserwartung. So hatte beispielsweise 1960 jede Frau in Deutschland im Schnitt 2,5 Kinder, im Jahr 2010 hingegen im Schnitt 1,39 Kinder (Statistisches Bundesamt 2012). Die durchschnittliche Lebenserwartung Neugeborener lag zu Beginn des 20. Jahrhunderts bei etwa 46 Jahren, heutige Neugeborene werden dagegen statistisch etwa 80 Jahre alt (Statistisches Bundesamt 2011). Das führt zu einem Anstieg des mittleren Alters der deutschen Gesellschaft (Statistisches Bundesamt 2006). Durch die Verschiebung der Altersstruktur treten auch vermehrt Erkrankungen auf, die v.a. ältere Menschen betreffen, beispielsweise Diabetes, Schlaganfälle und Osteoporose.

Osteoporose, auch unter dem Namen Knochenschwund bekannt, ist eine Erkrankung des gesamten Skelettsystems, die typischerweise im höheren Lebensalter auftritt. Charakteristisch ist neben einer Verminderung der Knochendichte auch eine veränderte Knochenarchitektur (Abbildung [Abb.] 1 und 2) (Kling et alii/aliae [al.] 2014; Chen et al. 2014; Carmona 2004).

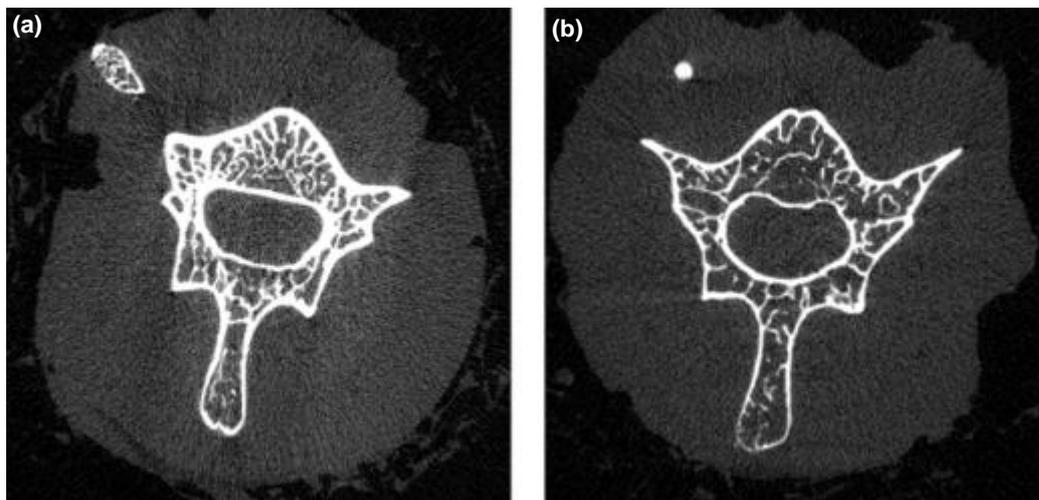
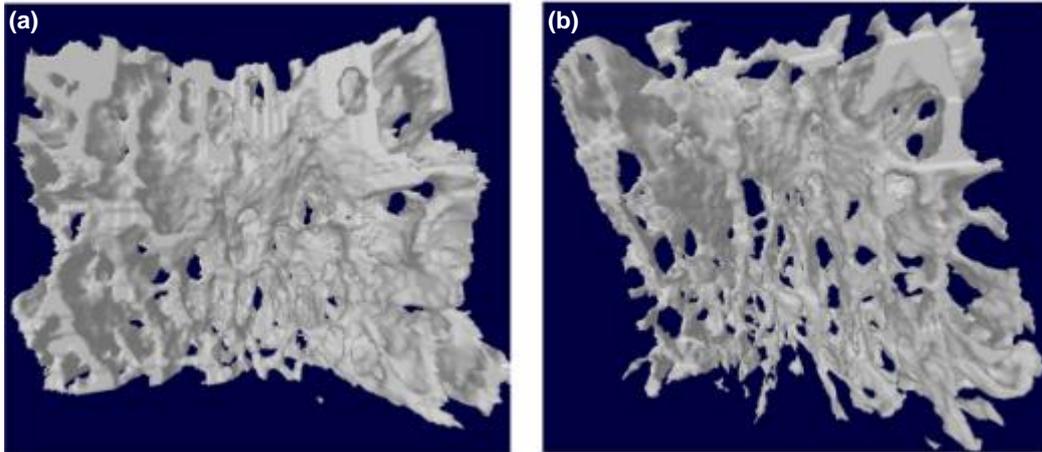


Abb. 1: Osteoporose im Rattenmodell im Vergleich zur Kontrolle (1). (a) Computertomografie-Schnitt durch einen gesunden Wirbelkörper. (b) Computertomografie-Schnitt durch einen Wirbelkörper im Osteoporose-Modell. Die Abnahme der Knochendichte im Vergleich zwischen dem gesunden und dem osteoporotischen Wirbelkörper wird durch eine Verminderung der weißen, röntgendichten Knochenstruktur deutlich. Abb. modifiziert nach Chen et al. 2014.



**Abb. 2: Osteoporose im Rattenmodell im Vergleich zur Kontrolle (2). (a) 3D-Rekonstruktion einer Mikro-Computertomografie eines gesunden Versuchstiers. (b) 3D-Rekonstruktion einer Mikro-Computertomografie eines Tiers mit Osteoporose. Abb. modifiziert nach Chen et al. 2014.**

Mögliche Ursachen dieser Erkrankung sind vielfältig und reichen von der Einnahme von Medikamenten wie Cortison oder Blutverdünnern wie Marcumar (Sato et al. 1997) über Immobilisation bis hin zu Vitaminmangel. Hauptursache der Osteoporose in westlichen Industrienationen ist allerdings der postmenopausale Mangel des Hormons Östrogen (Maeda und Lazaretti-Castro 2014). So waren 2009 in Deutschland etwa 6,3 Millionen Menschen von einer Osteoporose betroffen, davon waren 5,2 Millionen Frauen (Hadjj et al. 2013).

Osteoporose ist nicht nur eine lokale Erkrankung eines einzelnen Knochens, sondern eine systemische Knochenerkrankung, die das gesamte Skelett befällt. Wichtig für das Verständnis der Erkrankung sind die zellulären Mechanismen im Knochen, v.a. das Zusammenspiel von Osteoblasten und Osteoklasten. Im gesunden Knochen findet ein ständiger Aufbau und Abbau der Knochensubstanz statt, um durch dieses sogenannte Knochengewebe-Remodelling Bereiche des Knochens mit vermehrter mechanischer Belastung zu stärken und kleine Risse im Knochen, die durch alltägliche Belastungen auftreten, zu reparieren (Wenzel et al. 1996). Osteoblasten übernehmen dabei im Wesentlichen drei Aufgaben: die Synthese der Knochenmatrix, also den Aufbau des Knochens, die Regulation von Genen für die Kalzifizierung und die Hemmung der Osteoklasten (Cohen Jr. 2006). Osteoklasten hingegen bauen Knochenmatrix ab und nehmen Einfluss auf die Osteoblasten und damit auf den Knochenaufbau.

Bei der postmenopausalen Osteoporose ist das Wechselspiel zwischen Osteoblasten und Osteoklasten gestört (Gruber et al. 1986): die Aktivität der Osteoblasten ist vermindert, die der Osteoklasten erhöht. Deswegen zielen die wesentlichen Ansätze in der Pharmakotherapie der postmenopausalen Osteoporose entweder auf die Hemmung der Osteoklasten oder auf die Aktivierung der Osteoblasten (Goltzman 2002).

Folge des veränderten Knochenaufbaus sind Frakturen. Im klinischen Alltag der Orthopädie und der Unfallchirurgie fällt in den letzten Jahren eine Zunahme der osteoporotisch bedingten Frakturen auf (Leslie und Morin 2014). Das Risiko, eine osteoporotisch bedingte Fraktur zu erleiden, beträgt bei einer Frau über 50 Jahren in Industrieländern etwa 46% (Kanis et al. 2008).

Bei der Behandlung von osteoporotisch bedingten Frakturen sind in der Klinik verschiedene Methoden zur Stabilisierung etabliert. Allerdings ist das Implantatversagen bei Patienten mit Osteoporose häufiger als bei der Frakturversorgung junger, sonst knochengesunder Patienten (Duijsens et al. 2005; Barrios et al. 1993). Vor dem Hintergrund der steigenden Zahl osteoporotischer Knochendefekte sowie einer alternden Bevölkerung stellt die Entwicklung neuer Materialien und deren Modifikation speziell für diese Zielgruppen also eine wichtige Aufgabe dar.

## **1.2 Knochenersatzmaterialien**

Zur Wiederherstellung nach Frakturen oder bei Knochensubstanzverlust werden Knochenersatzmaterialien eingesetzt, um den Knochen wieder zu stabilisieren bzw. den Substanzverlust aufzufüllen. Der Einsatz von Knochenersatzmaterialien reicht über viele Jahrhunderte zurück. Die ersten Funde solcher Implantate lassen sich auf die Zeit vor 200 vor Christus datieren. Damals wurden Tierknochen, v.a. von Schweinen oder Rindern, in den Menschen implantiert (James und Thorpe 1998). Ab dem 18. Jahrhundert wurden Metalle wie Kupfer oder Metalllegierungen benutzt, die allerdings toxisch wirkten und die Proliferation von Osteoblasten hemmten (Yang et al. 2010). Seit den 1980er Jahren wurden die ersten Calciumphosphatzemente (CPC) für den klinischen Gebrauch entwickelt. Zunächst wurden sie nur zur Verankerung von Implantaten aus anderen Materialien benutzt. Im klinischen Einsatz zeigte sich jedoch, dass sie auch geeignet waren, Knochensubstanzdefekte aufzufüllen (Reinstorf 2005). Seit etwa 25–30 Jahren werden Kollagen-Verbundstoffe als Knochenersatzmaterial erforscht und benutzt (Serre et al. 1993). Allerdings besteht noch immer Forschungsbedarf hinsichtlich der Zusammensetzung dieser Verbundstoffe, um deren Eigenschaften weiter zu verbessern.

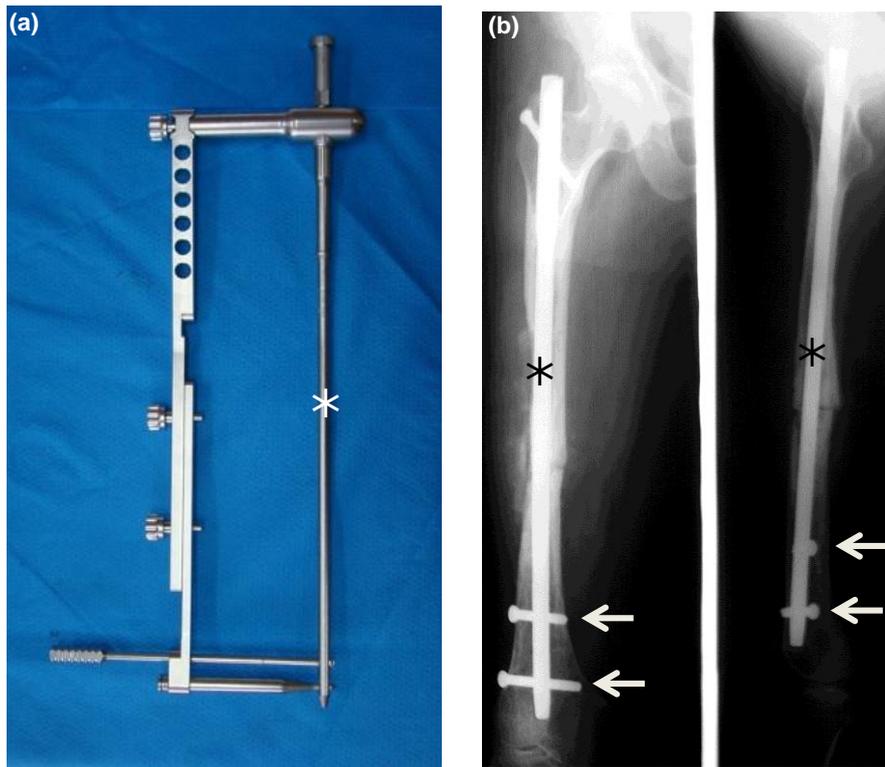
Die Anforderungen an Knochenersatzmaterialien sind vielfältig. Sie müssen eine mechanische Stabilität ab dem Zeitpunkt der Implantation gewähren. Das ist insbesondere bei resorbierbaren Materialien wichtig, da diese ihre maximale Festigkeit zu Beginn aufweisen und im Verlauf der Frakturheilung nur so weit abgebaut werden dürfen, wie neuer Knochen gebildet wurde, der die stabilisierenden Eigenschaften übernimmt. Weiterhin müssen Knochenersatzmaterialien gewebeverträglich sein und dürfen keine toxischen Effekte aufweisen. Beispielsweise wurden Verbindungen mit Aluminium als

Knochenersatzmaterial verwendet (Nagamine et al. 1987); neuere Studien zeigen allerdings zahlreiche mögliche negative Effekte von Aluminium auf den menschlichen Körper (Exley 2013). Wünschenswerte Anforderungen an ein Knochenersatzmaterial sind osteokonduktive und osteoinduktive Eigenschaften. Osteokonduktivität meint, dass der neugebildete Knochen entlang dem Material wächst und das Material dabei als Gerüst für die Knochenneubildung dient. Osteoinduktivität bezeichnet die Eigenschaft, die Knochenneubildung zu fördern.

Insgesamt kann kein Knochenersatzmaterial alle Eigenschaften des Knochens vollständig ersetzen. Die mechanischen Eigenschaften können gut von Knochenersatzmaterialien nachgeahmt werden, viele biologische Funktionen bleiben allerdings unerfüllt (Reinstorf 2005). So dient der Knochen als Calciumspeicher, beinhaltet das Knochenmark als Ort der Blutbildung und ist darüber hinaus in der Lage, sich selbständig zu regenerieren und auf veränderte mechanische Belastung durch Umbau der Struktur zu reagieren. Somit steht die Entwicklung und Modifikation von Knochenersatzmaterial unter der Prämisse, einen möglichst guten Ersatz für den Knochen zu schaffen.

Um Implantatmaterialien zur Frakturstabilisierung einzusetzen, stehen verschiedene Implantationsmethoden und Formen der Materialien zur Verfügung. Der klinische Einsatz von meist metallischen Implantaten zur Frakturstabilisierung wird als Osteosynthese bezeichnet, bei der Platten-, Schrauben-, Draht- und Marknagel-Osteosynthesen sowie Fixateure unterschieden werden. Bei der Marknagel-Osteosynthese wird ein Nagel in die Markhöhle des Knochens eingebracht (Abb. 3). Diese intramedullären Nägel bestehen entweder aus medizinischem Stahl oder aus Titan.

Die Technik der Marknagelung ist bei Frakturen im diaphysären Bereich der Tibia und des Femurs Goldstandard der Therapie (Crist und Wolinsky 2009; Finkemeier et al. 2000). Grundsätzlich werden zwei Arten der Einbringung des Nagels unterschieden: die unaufgebohrte Technik, bei der der Nagel in den Knochen eingeschlagen wird, und die aufgebohrte Technik, bei der die Markhöhle vorher mit einem Bohrer vergrößert wird, damit der Nagel hineinpasst. Aktuell ist keine der beiden Techniken der anderen deutlich überlegen (Duan et al. 2012). Bei der aufgebohrten Technik wird mit mehreren Bohrern mit aufsteigenden Durchmessern die Markhöhle des Knochens aufgebohrt, bis in etwa der Durchmesser des Nagels erreicht ist. Danach wird der Nagel in die entstandene Markhöhle eingebracht. Zunächst ist nur eine Stabilität in der Längsachse gegeben. Um eine Rotationsstabilität zu erhalten, muss der Nagel noch verriegelt werden. Dazu wird eine Schraube quer zur Längsachse in Knochen und Nagel eingebracht (Abb. 3b) (Citak et al. 2009).



**Abb. 3: Marknagel-Osteosynthese. (a) Ein klinisch eingesetzter Tibia-Marknagel (Stern) mit Implantationssystem. (b) Röntgenbild nach einer Marknagel-Osteosynthese des Femurs im anterior-posterioren sowie im seitlichen Strahlengang. Zu sehen sind sowohl Nagel (Stern) als auch Verriegelungsschrauben (Pfeile). Quelle: (a) Phillips et al. 2012; (b) Xie et al. 2011.**

Beim Aufbohren eines Knochens fällt am Bohrkopf Bohrmehl an. Es konnte gezeigt werden, dass das Einbringen von Bohrmehl in einen Frakturspalt zu einer schnelleren Frakturheilung führt (Frölke et al. 2001). Diese Beobachtung führte zu der Annahme, dass im Bohrmehl Faktoren und Zelltypen vorhanden sein müssen, die knochenregenerativ wirken können, und dass die Zellen die Prozedur des Aufbohrens überstehen (Hoegel et al. 2004). So konnten humane multipotente Stromazellen (hMSC) im Bohrmehl isoliert werden (Trinkaus et al. 2005; Wenisch et al. 2005).

In einer Vielzahl verschiedener Knochenersatzmaterialien ist CPC im klinischen Alltag weit verbreitet. Er wird v.a. aufgrund seiner knochenähnlichen Zusammensetzung benutzt (Jarcho 1981). Zur Herstellung werden verschiedene Calcium- und Phosphatsalze in einer wässrigen Lösung gemischt, bis eine Paste entsteht, die zu einer festen Masse abbindet und schließlich in einer Flüssigkeit oder im menschlichen Körper endgültig aushärtet (Khairoun et al. 1997). Die verschiedenen Formen von CPC, zum Beispiel (z.B.) Tricalciumphosphat, Octacalciumphosphat oder Hydroxylapatit (HA), entstehen durch verschiedene Ausgangssalze und durch Variation der Reaktionsbedingungen wie Temperatur, pH-Wert oder Zusammensetzung der wässrigen Lösung (LeGeros 2008). So entsteht bei einem neutralen bis leicht basischen pH-Wert von 5 bis 10, wie er im menschlichen Körper vorherrscht, während des endgültigen Aushärtens HA (Reinstorf 2005).

CPC hat in der Anwendung den Vorteil, dass es in pastöser Form in den Knochendefekt eingebracht werden kann und erst dort aushärtet. Außerdem baut es sich nach der Implantation langsam ab. Für die Resorptionsdauer ist die Art des verwendeten Calciumphosphats von Bedeutung.  $\beta$ -Tricalciumphosphat wird beispielsweise schneller abgebaut als HA (Kamakura et al. 2002). Weiterhin wirkt CPC osteokonduktiv und hat die Fähigkeit, an den Knochen zu binden, ist aber nicht osteoinduktiv (LeGeros 2008). Um eine Osteoinduktivität zu erreichen, sind die nötigen Modifikationen oder pharmakologischen Zusätze zu finden.

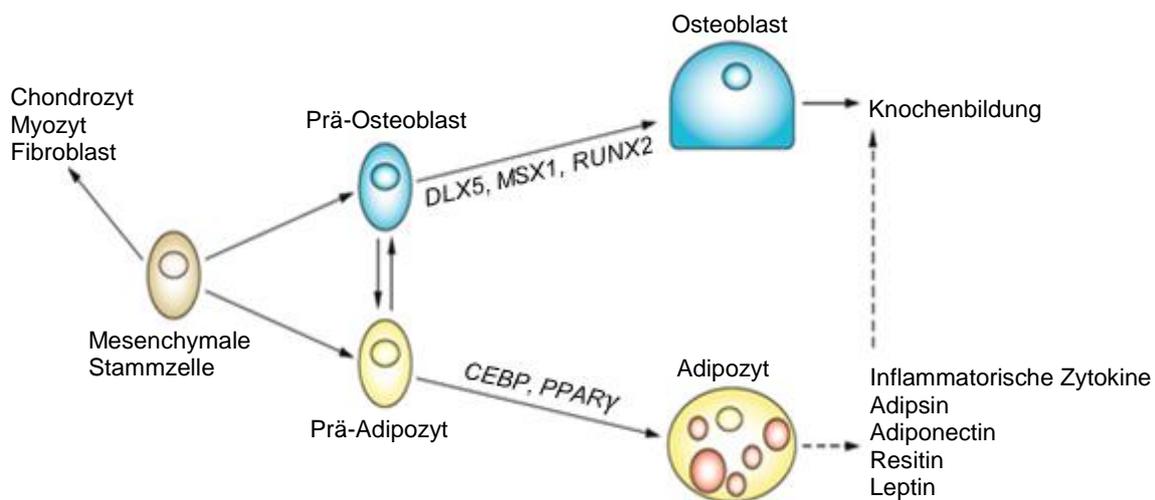
Kollagen ist ein Strukturprotein im Bindegewebe. Bisher sind 28 verschiedene Subtypen bekannt, von denen noch nicht bei allen genau geklärt ist, wofür sie verantwortlich sind (Mienaltowski und Birk 2014). Im Knochen kommt Kollagen in der extrazellulären Matrix, also im Gewebe um die Zellen, in Form von Kollagen Typ 1 vor. Allerdings ist die mechanische Festigkeit von Kollagen Typ 1 allein eher schlecht (Wahl und Czernuszka 2006). Deshalb ist es in der extrazellulären Knochenmatrix beispielsweise durch HA, eine im Wesentlichen aus Calcium und Phosphat bestehende Verbindung, mineralisiert, was die mechanische Festigkeit erheblich steigert. In der Entwicklung von Knochenersatzmaterialien war es deshalb naheliegend, ein künstliches Material zu entwickeln, das ähnlich dem Knochen auch Kollagen Typ 1 und HA enthält. Das Kollagen kann für diesen Zweck aus menschlichem oder tierischem Bindegewebe wie Sehnen, Haut oder Bändern gewonnen werden. Verbundstoffe aus Kollagen Typ 1 und HA zeigen eine gute Biokompatibilität (Mehlich et al. 1990) sowie osteokonduktive Eigenschaften (Itoh et al. 2001). HA alleine steigert sogar die Differenzierungsfähigkeit von Osteoblasten (Xie et al. 2004). Vor diesem Hintergrund stellt sich Kollagen Typ 1 zusammen mit HA schon jetzt als ein gutes Knochenersatzmaterial dar. Allerdings wächst, insbesondere im Hinblick auf systemische Knochenkrankungen wie Osteoporose, der Bedarf an weiteren Materialien speziell für solche Erkrankungen. Dazu können bewährte, nachweislich positiv auf den Knochenstoffwechsel wirkende Materialien modifiziert oder mit anderen Stoffen funktionalisiert werden, die die ossäre Integration weiter fördern und damit den Heilungsverlauf beschleunigen.

### **1.3 Osteoblastäre Differenzierung**

Stammzellen sind in der Lage, sich in Richtung eines spezialisierten Zelltyps zu entwickeln (Wislet-Gendebien et al. 2005). Je nachdem, in wie viele verschiedene Zelltypen sie sich differenzieren können, unterscheidet man verschiedene Stammzelltypen. Embryonale Stammzellen beispielsweise sind pluripotent; sie können sich in Zelltypen aller drei Keimblätter, also des Entoderms, des Mesoderms und des Ektoderms, differenzieren. Insbesondere für solche Zelltypen im menschlichen Körper, die die Fähigkeit zur Proliferation verloren haben, beispielsweise für Herzmuskelzellen und Nerven-

zellen, stehen pluripotente Stammzellen im wissenschaftlichen Fokus. Heutige experimentelle Forschung versucht, mit ihrer Hilfe eine Heilung von Morbus Parkinson (Ambasudhan et al. 2014) oder den Ersatz von untergegangenem Herzmuskelgewebe nach einem Herzinfarkt (Lundy et al. 2014) zu erreichen. Humane embryonale Stammzellen werden zumeist aus der Blastozyste, einer frühen Entwicklungsstufe eines menschlichen Embryos, gewonnen (Thomson 1998). Dazu muss allerdings die Blastozyste zerstört werden, was sowohl ethisch als auch rechtlich bedenklich ist. In Deutschland ist die Gewinnung humaner embryonaler Stammzellen aus diesem Grund gesetzlich verboten.

Neben den pluripotenten embryonalen Stammzellen gibt es auch adulte Stammzellen, die multipotent sind, sich also nur noch in bestimmte Gewebetypen differenzieren können. Zu ihnen gehören die mesenchymalen Stammzellen, die in der Lage sind, sich in Knorpelzellen (Chondrozyten), Muskelzellen (Myozyten), Bindegewebszellen (Fibroblasten), Knochenzellen (Osteoblasten) und Fettzellen (Adipozyten) zu differenzieren (Bobis et al. 2006) (Abb. 4).

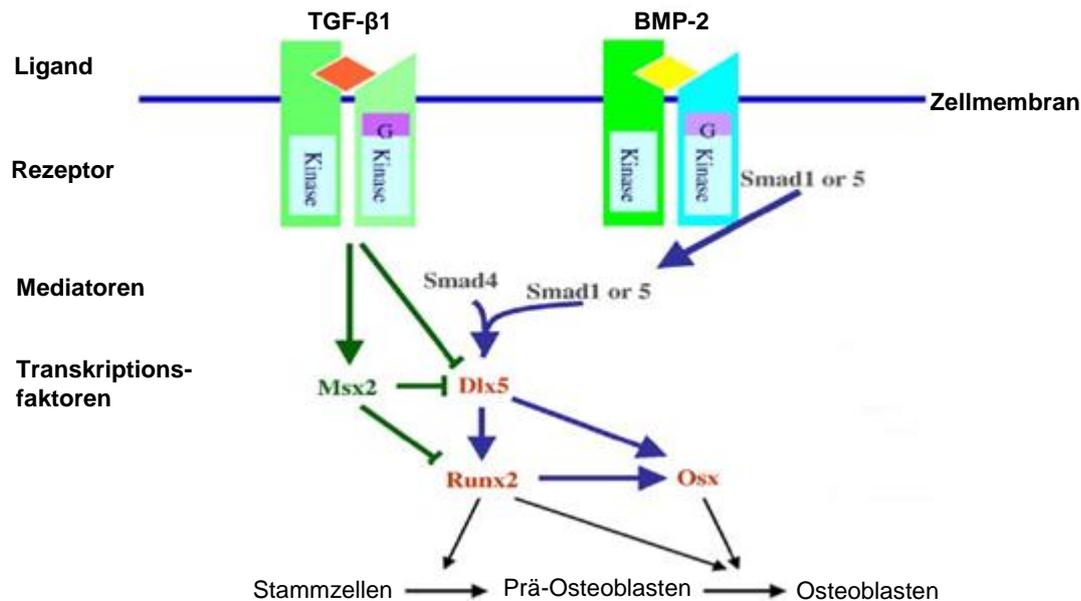


**Abb. 4: Differenzierungsmöglichkeiten einer mesenchymalen Stammzelle. Abb. modifiziert nach Rosen und Boussein 2006.**

Die für diese Arbeit verwendeten hMSC, die aus humanem Bohrmehl isoliert werden können, weisen viele Charakteristika mesenchymaler Stammzellen auf. Auch für sie konnten verschiedene Wege der Differenzierung hin zu Knochen-, Knorpel- und Fettzellen nachgewiesen werden (Trinkaus et al. 2005; Wenisch et al. 2005).

Insbesondere die osteogene Differenzierung der bei der Marknagelung gewonnenen hMSC ist für die Forschung zu Krankheiten des Knochens von Bedeutung. Der Goldstandard in der Therapie größerer Knochendefekte ist heutzutage die autologe Spongiosaplastik aus dem Beckenkamm, bei der ein Knochenspan in den Defekt eingesetzt wird. Das ist allerdings mit einem zweiten Eingriff verbunden und kann zu weiteren

Komplikationen wie Gefäß- und Nervenverletzungen, Hämatombildung, Infektionen und Frakturen des Beckens führen (Dimitriou et al. 2011; Arrington et al. 1996). hMSC könnten aufgrund ihrer Osteoinduktivität in Kombination mit geeigneten Materialien eine Alternative zur autologen Spongiosaplastik sein und sind deshalb für die Forschung interessant. Sie sind breit verfügbar und bei der Marknagel-Osteosynthese relativ einfach und, anders als etwa embryonale Stammzellen, ohne ethische Bedenken oder rechtliche Hindernisse zu gewinnen.



**Abb. 5: Molekulare Differenzierungsmechanismen von Stammzellen zu Osteoblasten. Dargestellt ist ein Schaubild mit den beteiligten Proteinen und deren Funktion. Abb. modifiziert nach Ryoo et al. 2006.**

Die Differenzierung von hMSC hin zu Osteoblasten wird vom Ablauf einer Signalkaskade gesteuert (Abb. 5). Bei ihr spielt eine Reihe von Proteinen und Transkriptionsfaktoren wie Distal-less homeoboxprotein 5 (Dlx5), Msh-homeoboxprotein 2 (Msx2) und Runt-related transcription factor 2 (Runx2) eine Rolle (Nakashima et al. 2002; Lee et al. 2000; Ryoo et al. 1997). Die Signalkaskade mündet in einer gesteigerten Expression der osteoblastentypischen Gene, einer vermehrten Produktion der Genprodukte wie Kollagen Typ 1, Osteocalcin oder alkalischer Phosphatase (ALP) und damit insgesamt in einer Steigerung der osteoblastären Differenzierung. Das Verständnis der molekularen Vorgänge bei der Differenzierung ist wichtig, um bei Erkrankungen des Knochens therapeutisch in diese Vorgänge eingreifen zu können und effektive Therapiestrategien zu entwickeln. In der Forschung kann die Genexpression oder die Bestimmung einzelner Proteine während der Differenzierung genutzt werden, um den Grad der osteogenen Differenzierung zu bestimmen. Dazu ist v. a. die ALP geeignet.

Beim Menschen kommt die ALP in verschiedenen Geweben vor, beispielsweise in Leber, Dünndarm oder Knochen (Hatayama et al. 2012). Ihre Hauptfunktion besteht in der Umsetzung phosphorhaltiger Esterverbindungen (insbesondere Phosphorsäuremonoester) zu Phosphat und verschiedenen Alkoholen im alkalischen Milieu. Klinisch lässt sich die ALP-Konzentration im Blut von Patienten bestimmen und kann auf Erkrankungen der Gallenwege wie einen Gallenstau hinweisen oder Knochenerkrankungen wie Knochentumoren, Frakturen oder Osteoporose anzeigen. Im Knochen dient die ALP im Wesentlichen der Kalzifikation durch Erhöhung der lokalen Phosphatkonzentration und der Steuerung der Wanderung von Vesikeln während der Knochenmineralisierung (van Hoof und Broe 1994). In der experimentellen Forschung hat sich die ALP als ein Marker für den Differenzierungsgrad von Stammzellen zu aktiven Osteoblasten etabliert, weil sie mit dem Grad der Differenzierung des Zellsystems korreliert (Wlodarski und Reddi 1986). Somit kann sie auch zur Bestimmung des Differenzierungsverhaltens von hMSC hin zu aktiven Osteoblasten dienen.

#### **1.4 Neuronale Mediatoren im Knochenstoffwechsel**

Im Knochenstoffwechsel spielen viele verschiedene Faktoren eine Rolle, u.a. Neurotrophine (NT) und Komponenten des cholinergen Systems. In dieser Arbeit wurde die Wirkung des Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) als Vertreter der NT und von Nikotin und Acetylcholin (ACh) als Liganden des cholinergen Systems auf die Differenzierungsfähigkeit von hMSC untersucht.

##### **1.4.1 Neurotrophine**

NT sind eine Gruppe von Signalmolekülen, die regulatorische Funktionen bei Neuronen haben und sich durch gemeinsame Eigenschaften wie ein ähnliches Molekulargewicht, einen ähnlichen isoelektrischen Punkt sowie eine etwa 50-prozentige Übereinstimmung in der Primärstruktur auszeichnen (Mowla et al. 2001). Zu dieser Gruppe zählen der Nervenwachstumsfaktor (Nerve growth factor, NGF), BDNF und die namensgebende Untergruppe mit NT-3, NT-4 und NT-5 (Levi-Montalcini 1987; Barde et al. 1982). Aufgrund der engen Strukturverwandtschaft werden NT-4 und NT-5 häufig als NT-4/5 zusammengefasst. NT werden zunächst als Vorläufermoleküle (Pro-Neurotrophine) innerhalb der Zelle gebildet und dann dort zu reifen Proteinen gespalten (Lessmann et al. 2003; Mowla et al. 2001). Allerdings werden auch schon Pro-NT freigesetzt, die in der Lage sind, an den p75-Neurotrophin-Rezeptor (p75-NTR) zu binden und dadurch Apoptose auszulösen (Lee et al. 2001).

Alle NT binden mit einer relativ geringen Affinität an den p75-NTR. Daneben gibt es eine Gruppe von drei Rezeptoren, Tropomyosin-receptor kinase A, B und C (TrkA,

TrkB und TrkC), die zur Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen gehören. Tyrosinkinasen sind Rezeptoren, die sich selbst oder andere Proteine phosphorylieren und so aktivieren können. An jede dieser drei Tyrosinkinasen bindet spezifisch ein Neurotrophin: NGF an TrkA, NT-4/5 sowie BDNF an TrkB und NT-3 an TrkC (Chao 2003) (Abb. 6).

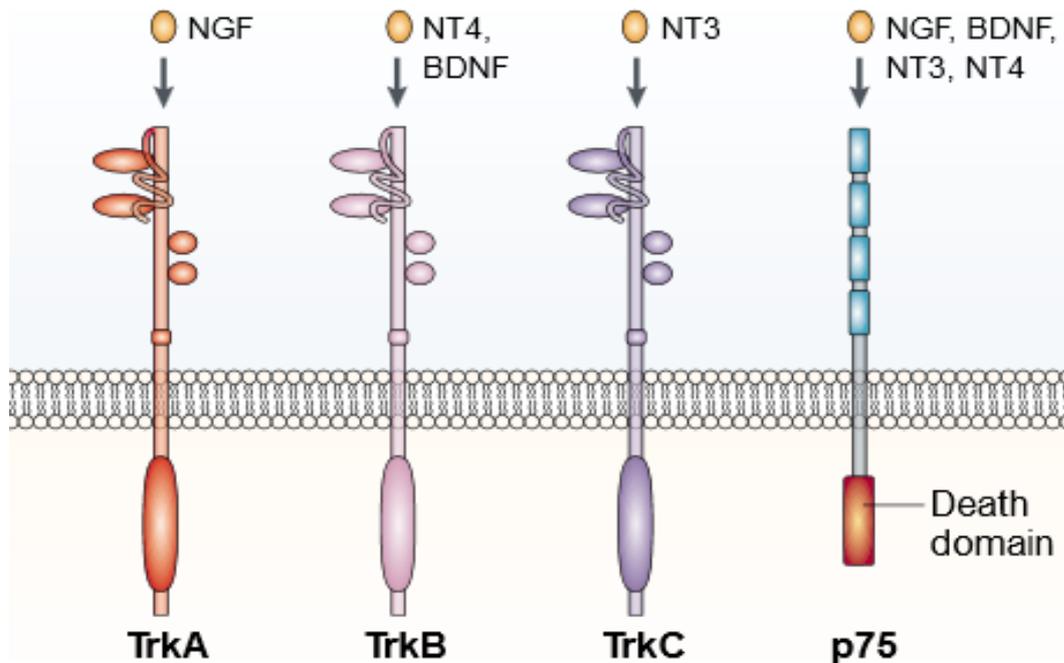


Abb. 6: Bindungen der NT an ihre Rezeptoren. Abb. modifiziert nach Chao 2003.

Bei Bindung eines NT kommt es zur Dimerisierung und Autophosphorylierung des Rezeptors (Jing et al. 1992; Berg et al. 1991). Dadurch werden verschiedene Signalkaskaden mit einer Vielzahl von Effekten ausgelöst. NT sind am besten bei neuronalen Zellen untersucht. Dort regulieren sie das Überleben der Zellen und die neuronale Plastizität nach Verletzungen des Rückenmarks (Arvanian 2013). Sie spielen eine Rolle bei der Gedächtnisbildung (Callaghan und Kelly 2013), sind involviert in die Regulation der zellulären Apoptose (Ichim et al. 2012), stärken das Überleben von Neuronen (Baydyuk et al. 2013) und fördern die Differenzierung von Fibroblasten der Haut (Palazzo et al. 2012).

NT werden allerdings nicht nur von neuronalen Zellen exprimiert, sondern beispielsweise auch von Fibroblasten (Kurihara et al. 2003). Außerdem fördert v.a. BDNF die Bildung neuer Gefäße (Kermani und Hempstead 2007) und ist für die Stabilisierung von Gefäßen wichtig (Donovan et al. 2000). Im Knochen wird BDNF während der Frakturheilung und bei der Knochenneubildung verstärkt exprimiert (Kilian et al. 2014; Aiga et al. 2006; Asami et al. 2000). Darüber hinaus werden Knochenmarker unter Einfluss von BDNF verstärkt gebildet (Yamashiro et al. 2001).

Aufgrund dieser Beobachtungen wird den NT, unter ihnen insbesondere dem BDNF, eine wichtige Rolle bei der Frakturheilung zugeschrieben.

### 1.4.2 Das cholinerge System

ACh ist bekannt als ein Signalübermittler zwischen Nervenzellen. Als Neurotransmitter im Parasympathikus, Sympathikus und an der motorischen Endplatte ist es eines der wichtigsten Glieder in der Signaltransduktion. ACh wird mit Hilfe der Cholinacetyltransferase aus Cholin und Acetyl-Coenzym A in den Zellen synthetisiert. Dann wird es durch den vesikulären ACh-Transporter in Vesikel verpackt und zur Synapse transportiert, wo es bei Bedarf ausgeschüttet wird. Nach der Ausschüttung wird es nach kurzer Zeit durch die Acetylcholinesterase gespalten und damit seine Signalwirkung beendet (Abb. 7). Schließlich werden die Spaltprodukte Acetat und Cholin wieder in das Neuron aufgenommen und recycelt (Pohanka 2012).

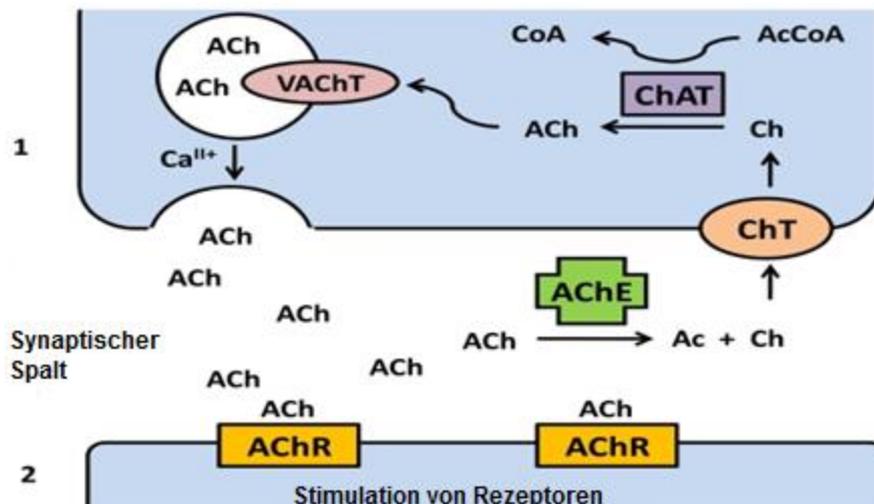
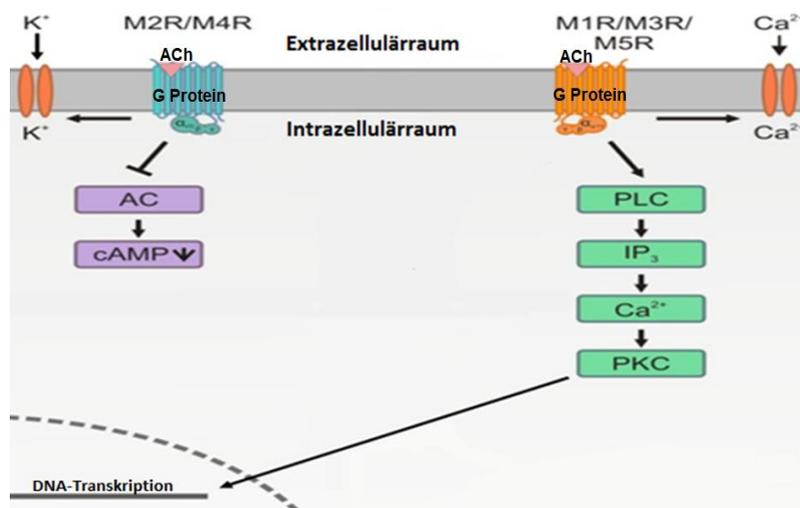


Abb. 7: Freisetzung und Abbau des ACh am synaptischen Spalt. Ac - Acetat; AChE - Acetylcholinesterase; AChR - Acetylcholinrezeptor; AcCoA - Acetyl-Coenzym A; ChAT - Cholineacetyltransferase; ChT - Cholintransporter; VAcHT - Vesikulärer ACh-Transporter, 1 - axonales Ende des Neurons; 2 - Dendrit des Neurons der Zielzelle. Abb. nach Pohanka 2012.

Die schwerwiegenden Folgen eines ACh-Mangels werden an der Alzheimer-Erkrankung deutlich (Ehrenstein et al. 2000). Versuche zur Therapie des Morbus Alzheimer beruhen darauf, die ACh-Konzentration im zentralen Nervensystem zu erhöhen.

Die Rezeptoren für ACh lassen sich in zwei große Kategorien einteilen, in muskarinische und nikotinische ACh-Rezeptoren. Muskarinische ACh-Rezeptoren (mAChR) haben ihren Namen vom Gift Muskarin, das wie ACh selbst diese Rezeptoren aktivieren kann. In unterschiedlichen Organsystemen finden sich fünf Subtypen des mAChR, die mit M1 bis M5 bezeichnet werden. Der mAChR ist ein transmembranäres Protein, das aus sieben Segmenten besteht. Die Signaltransduktion bei den Subtypen M1, M3 und M5 verläuft über ein an Phospholipase C gekoppeltes Guanosin-

triphosphat-bindendes regulatorisches Protein (G-Protein) (Haga 2013). Wenn ein G-Protein an Phospholipase C gekoppelt ist, wird es als  $G_q$ -Protein bezeichnet. Durch Aktivierung der Phospholipase C kommt es zur Bildung von Inositoltrisphosphat und Diacylglycerin (second messenger). Schließlich wird dadurch die Proteinkinase C aktiviert, die wiederum andere Proteine phosphoryliert und damit in ihrer Funktion beeinflusst. Weiterhin kommt es zur Freisetzung von Calcium-Ionen aus dem endoplasmatischen Retikulum und dem Extrazellulärraum (Abb. 8). Die resultierenden Wirkungen sind vielfältig und unterscheiden sich stark von Gewebe zu Gewebe. Der M3-Rezeptor führt in der Lunge beispielsweise zur Verengung der Bronchien (Schlenz et al. 2010). Im Knochen führt Osteoporose im Tiermodell der Ratte zu einer Verminderung der Expression des M3-Rezeptors (Kauschke et al. 2014).



**Abb. 8: Signaltransduktion des mAChR.** AC - Adenylatcyclase; cAMP - cyclisches Adenosinmonophosphat; PLC - Phospholipase C; IP<sub>3</sub> - Inositoltrisphosphat; PKC - Proteinkinase C. Abb. modifiziert nach Ockenga et al. 2013.

Die Weitergabe von Signalen bei den Rezeptorsubtypen M2 und M4 erfolgt über ein inhibitorisches G-Protein ( $G_i$ -Protein), das im Wesentlichen den Gehalt an cyclischem Adenosinmonophosphat senkt. Außerdem wirken  $G_i$ -Proteine modulierend an verschiedenen Kaliumkanälen (Abb. 8). Beispielsweise führt im Herzen eine Aktivierung von Kaliumkanälen zu einem Kaliumausstrom aus der Zelle und damit zur Hyperpolarisation, was sich klinisch in einer verlangsamten Herzfrequenz als Folge der Wirkung des Parasympathikus zeigt (Logothetis et al. 1987).

Nikotinische ACh-Rezeptoren (nAChR) sind nach dem aus dem Tabakrauch bekannten Nikotin benannt. Außer durch ACh können diese Rezeptoren auch durch die Bindung von Nikotin aktiviert werden. Die nAChR sind transmembranäre Ionenkanäle, die sich aus fünf Untereinheiten, unter anderem (u.a.) den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten, zusammensetzen. Ein Typ dieser Rezeptoren, der eher im Muskel vorkommt (muskulärer Typ), besteht aus zwei  $\alpha$ - und je einer  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Untereinheit, der andere, eher

im neuronalen Gewebe vorkommende Typ (neuronaler Typ) hingegen setzt sich aus drei  $\alpha$ - und zwei  $\beta$ -Untereinheiten oder aus fünf  $\alpha$ -Untereinheiten zusammen. Die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten unterliegen einer großen Variabilität. Beim Menschen sind die Varianten  $\alpha 1$  bis  $\alpha 7$  sowie  $\alpha 9$  und  $\alpha 10$  bzw.  $\beta 1$  bis  $\beta 4$  bekannt, sodass sich insgesamt eine Vielzahl verschiedener Subtypen von nAChR ergibt (Sato et al. 2010). Bindet nun ein Ligand wie Nikotin oder ACh selbst an die nAChR, so ändert sich die dreidimensionale Struktur der Ionenkanäle, sodass sie durchlässig für Ionen werden. Nach kurzer Zeit lösen sich die Liganden wieder vom Rezeptor, und der Rezeptor kehrt zum geschlossenen Ausgangszustand zurück (Abb. 9).

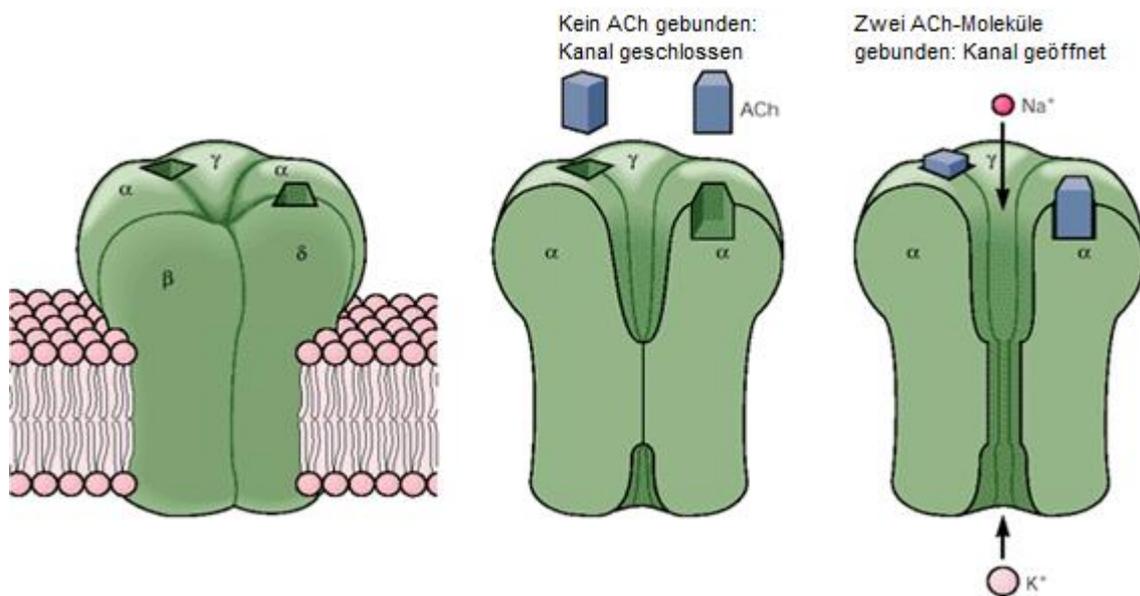


Abb. 9: Struktur und Funktionsweise des nAChR. Abb. nach Kandel und Siegelbaum 2013.

Im durchlässigen Zustand können Natrium- und Calcium-Ionen in die Zelle einströmen und eine Depolarisation auslösen. Dies findet im Muskel an der motorischen Endplatte statt: Aus der Nervenendigung wird ACh ausgeschüttet, das an einer Muskelzelle bindet, diese depolarisiert und so eine Muskelkontraktion auslöst.

Seit einigen Jahren ist bekannt, dass ACh nicht nur in Nervenzellen, sondern auch in der Signalübermittlung non-neuronaler Zellen, z.B. in den Atemwegen, im Magen-Darm-Trakt und in den ableitenden Harnwegen vorkommt (Wessler et al. 1998). Anders als bei neuronalen Zellen spricht ACh bei non-neuronalen Zellen die verschiedenen Rezeptoren über autokrine und parakrine Signaltransduktion an und kann dadurch Proliferation, Differenzierung, Zellüberleben und Zellmigration regulieren (Wessler und Kirkpatrick 2008). Auch im Knochen spielt ACh offensichtlich eine Rolle, da dort ACh selbst, das Abbauenzym Acetylcholinesterase und auch die entsprechenden muskarinischen und nikotinischen ACh-Rezeptoren gefunden wurden (Beckmann und Lips 2013; Liu et al. 2011; Sato et al. 2010; En-Nosse et al. 2009). Die genaue Funktion von ACh im Knochen ist allerdings noch nicht vollständig aufgeklärt.

## 1.5 Fragestellung

In den letzten Jahren ist, v.a. durch die alternde Gesellschaft bedingt, eine Zunahme von osteoporotischen Frakturen zu verzeichnen. Für die Knochenneubildung im Knochendefekt ist die Differenzierung von Stammzellen zu aktiven Osteoblasten notwendig. Solche Stammzellen können u.a. aus humanem Bohrmehl gewonnen werden. Zur Bestimmung des Differenzierungsgrades kann die ALP als Marker dienen. Zusätzlich müssen Frakturen häufig durch Knochenersatzmaterialien stabilisiert werden, die ebenfalls Effekte auf die Knochenheilung haben können. Es ist bekannt, dass BDNF und seine Rezeptoren während der Frakturheilung verstärkt exprimiert werden und dass sich Komponenten des non-neuronalen cholinergen Systems im Knochen finden.

Daraus resultieren folgende Fragestellungen, die in dieser Arbeit beantwortet werden sollen:

- Sind BDNF, ACh und Nikotin geeignet, als Pharmaka die osteogene Differenzierung zu fördern, und wenn ja, in welcher Konzentration?
- Können Kollagen-Typ-1-haltige Materialien und der hier vorliegende CPC die Differenzierung und Proliferation von hMSC aus Bohrmehl beeinflussen?
- Welche Effekte auf die Differenzierung von hMSC haben BDNF, ACh und Nikotin am Interface von CPC und Kollagen-Typ-1-haltigen Materialien?
- Besteht in einem Pilotversuch ein genereller Unterschied zwischen hMSC von gesunden jungen, einer gesunden älteren und einer osteoporotischen Spenderin hinsichtlich ihrer Differenzierungskapazität und ihrer Proliferationsrate?

Wenn die Pharmaka einen positiven Effekt auf die Differenzierung und Proliferation ausüben, könnte es zukünftig möglich sein, differenzierungs- und proliferationsfördernde Knochenersatzmaterialien mit diesen Pharmaka zu versetzen oder zu beschichten und damit insbesondere bei systemischen Knochenerkrankungen wie Osteoporose eine bessere Frakturheilung zu erreichen.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Geräte, Laborbedarf und Verbrauchsmaterialien**

|   |                     |
|---|---------------------|
| 24-Well-Platte                              | Greiner bio-one     |
| 96-Well-Platte (schwarz und transparent)    | Greiner bio-one     |
| ALP-Assay                                   | Ana-Spec            |
| Bakterienfilter                             | Merck               |
| Bechergläser (verschiedene Volumina)        | Brand               |
| Brutschrank                                 | Heraeus             |
| Eppendorf-Gefäße (verschiedene Volumina)    | Eppendorf           |
| Feinwaage                                   | Sartorius           |
| Gefrierschrank (– 80 Grad Celsius [°C])     | Heraeus             |
| Kotröhrchen                                 | Sarstedt            |
| Kryo-Röhrchen                               | Greiner bio-one     |
| Kühlschränke/Gefrierschränke                | Bosch, Beko         |
| Lichtmikroskop                              | Leica               |
| Mikroliterpipetten (verschiedene Volumina)  | Eppendorf           |
| Neubauer-Zählkammer                         | Brand               |
| Pinzetten                                   | Roth, Aesculap      |
| Pipetten (verschiedene Volumina)            | Greiner bio-one     |
| Pipettenspitzen                             | Gibson              |
| Pipettierhilfe (Pipetus®)                   | Hirschmann          |
| Plastikröhrchen (50 Milliliter [ml], 15 ml) | Falcon              |
| Plattenreader (Synergy HT)                  | BioTek              |
| Quant- iT-PicoGreen-Assay                   | Life Technologies   |
| Schüttelplatte                              | eigene Konstruktion |
| Spritze (10 ml)                             | B.Braun             |
| Sterilbank                                  | Heraeus             |
| Vortexer                                    | Heidolph            |
| Wasserbad                                   | Grant Instruments   |
| Zellkulturflaschen (200 ml)                 | Greiner bio-one     |
| Zellkulturschalen                           | Falcon              |
| Zentrifugen                                 | Hettich             |

### 2.1.2 Medien, Chemikalien und Puffer

|  |                     |
|--|---------------------|
| ACh (Feststoff)  | Sigma               |
| Aqua ad injectabilia (10 ml, 1000 ml)                                    | B.Braun             |
| Ascorbinsäure  | Sigma               |
| BDNF (Feststoff)   | Sigma               |
| Dexamethason   | Sigma               |
| Dimethylsulfoxid (DMSO)  | ATCC                |
| Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)<br>(low glucose) + 2% L-Glutamin | PAA (GE Healthcare) |
| Ethanol zur Desinfektion   | Riedel de Haen      |
| Fetales Kälberserum (FKS)  | PAA (GE Healthcare) |
| Glycerol-Phosphat  | Sigma               |
| Ham's F-12K-(Kaihn's)-Medium   | Life Technologies   |
| Nikotin (Flüssigkeit)  | Sigma               |
| Penicillin/Streptomycin (P/S)  | Life Technologies   |
| Phosphate buffered saline (PBS)  | Life Technologies   |
| Triton X-100   | Sigma               |
| Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)                              | Life Technologies   |

#### 2.1.2.1 PBS-Puffer und Lysis-Puffer

Die Pufferlösung bestand aus PBS in destilliertem Wasser (Faktor 1:10) und hatte nach dem Verdünnen folgende Bestandteile:

|   |                                  |
|---|----------------------------------|
| Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )   | 1440 mg/l (Milligramm pro Liter) |
| Natriumchlorid ( $\text{NaCl}$ )  | 90.000 mg/l                      |
| Dinatriumhydrogenphosphat-Heptahydrat<br>( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ ) | 7950 mg/l                        |

Der Lysis-Puffer bestand aus 1% Triton X-100 in PBS. Triton X-100 ist ein nicht-ionisches Tensid, das die Membranproteine herauslöst, ohne die Proteine zu denaturieren (Helenius und Simons 1975). Dadurch werden die Zellen lysiert, ohne die Proteinstrukturen zu verändern.

#### 2.1.2.2 Osteogenes Medium

Das osteogene Medium auf Basis von DMEM (low glucose) diente zur Stimulation der Differenzierung der hMSC zu Osteoblasten. Das Medium beinhaltet:

|                   |                                  |
|-------------------|----------------------------------|
| Dexamethason      | 0,1 Mikromolar ( $\mu\text{M}$ ) |
| Glycerol-Phosphat | 10 Millimolar (mM)               |
| Ascorbinsäure     | 0,05 mM                          |
| FKS               | 10%                              |

P/S 1%  
gelöst in DMEM (low glucose) + 2% L-Glutamin

### **2.1.2.3 Ham's F-12K-(Kaihg'n's)-Medium**

Ham's-F-12K-(Kaihg'n's)-Medium wurde ursprünglich für Zellkulturbedingungen entwickelt, bei denen niedrige Serumspiegel gebraucht werden. Es wird für eine Vielzahl verschiedener Zelltypen eingesetzt, u. a. für die Proliferation von hMSC. Dem Medium wurden zusätzlich 20% FKS sowie 1% P/S beigefügt.

### **2.1.3 Firmen**

Aesculap: siehe B.Braun AG

Ana-Spec, Fremont, CA 94555, USA

ATCC, Teddington, Middlesex TW11 0LY, United Kingdom

B.Braun und Aesculap: B.Braun AG, 34212 Melsungen, Deutschland

Beko GmbH, 63263 Neu-Isenburg, Deutschland

BioTek, 74177 Bad Friedrichshall, Deutschland

Bosch: Robert Bosch GmbH, 81379 München, Deutschland

Brand GmbH + Co. KG, 97877 Wertheim, Deutschland

Eppendorf AG, 22339 Hamburg, Deutschland

Falcon: BD Biosciences, San Jose, CA 95131, USA

Gibson Bioscience, Lexington, KY 40508, USA

Grant Instruments (Cambridge) Ltd, Shepreth, Cambridgeshire SG8 6GB, United Kingdom

Greiner bio-one, 72636 Frickenhausen, Deutschland

Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, 91126 Schwabach, Deutschland

Heraeus Instruments, 63452 Hanau, Deutschland

Hettich Holding GmbH & Co. oHG, 32278 Kirchlengern, Deutschland

Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, 74246 Eberstadt, Deutschland

Leica Microsystems GmbH, 35578 Wetzlar, Deutschland

Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA 92008, USA

Merck Millipore Headquarters, Billerica, MA 01821, USA

PAA Laboratories GmbH (GE Healthcare), 4061 Pasching, Österreich

Riedel de Haen: Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH, 30926 Seelze, Deutschland

Roth: Carl Roth GmbH + Co. KG, 76185 Karlsruhe, Deutschland

Sarstedt AG & Co., 51582 Nümbrecht, Deutschland

Sartorius AG, 37075 Göttingen, Deutschland

Sigma-Aldrich, St. Louis, MO 63103, USA

### 2.1.4 ALP-Assay

Das ALP-Assay dient der Bestimmung der ALP-Konzentration nach dem Prinzip der Kolorimetrie, bei der der Farbumschlag einer Flüssigkeit gemessen und mit einer Standardkurve verglichen wird. Dieses Verfahren hat gegenüber der Photometrie den Vorteil, dass keine absoluten Werte, sondern Referenzen zur Standardkurve bestimmt werden und daher z.B. auch kolloide Lösungen oder Suspensionen gemessen werden können, die photometrisch nicht bestimmbar sind. Beim ALP-Assay wird p-Nitrophenol-Phosphat (pNPP) über die ALP dephosphoryliert. Durch das dabei entstehende p-Nitrophenol kommt es zum Farbumschlag von farblos zu gelb (Abb. 10). Die Stärke der Gelbfärbung ist linear von der ALP-Konzentration abhängig. Das Extinktionsmaximum von p-Nitrophenol liegt bei 405 nm (Nanometern). Das bedeutet, dass bei dieser Wellenlänge die farbige Lösung am meisten Licht absorbiert. Daher wird bei dieser Wellenlänge die Extinktion gemessen.

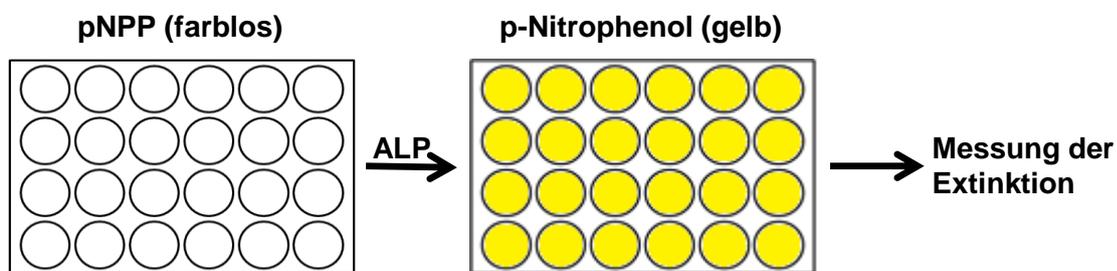


Abb. 10: Prinzip der Messung der ALP-Konzentration.

### 2.1.5 PicoGreen-Assay

Das Quant-iT-PicoGreen-Assay dient zur Quantifizierung von Desoxyribonukleinsäure (DNA), speziell der Doppelstrang-DNA (dsDNA), in Lösungen durch die Methode der Spektrofluorometrie. Durch Bestrahlung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge wird das PicoGreen-Reagenz angeregt, selbst Licht einer anderen Wellenlänge zu emittieren, das gemessen werden kann. Das PicoGreen-Reagenz bindet spezifisch an dsDNA. Es wird dann bei einer Wellenlänge von 480 nm angeregt, da es dort sein Exzitationsmaximum besitzt. Das bei einer Wellenlänge von 520 nm emittierte Licht wird gemessen (Abb. 11). Der Nachweis von dsDNA über die damit verbundene Emission des Lichts wurde im vorliegenden Versuch mit der Zellzahl korreliert.

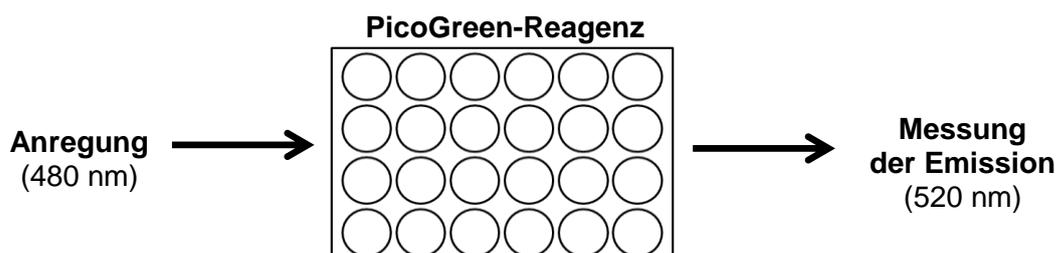


Abb. 11: Schema der PicoGreen-Messung.

Das PicoGreen-Assay-Kit enthielt:

|                     |  |
|---------------------|--|
| PicoGreen-Reagenz   | gelöst in DMSO   |
| TE-Lösung           | 200 mM Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan-Salzsäure<br>20 mM EDTA<br>pH 7,5 |
| Standard-DNA-Lösung | 100 µg/ml (Mikrogramm pro Liter)   |

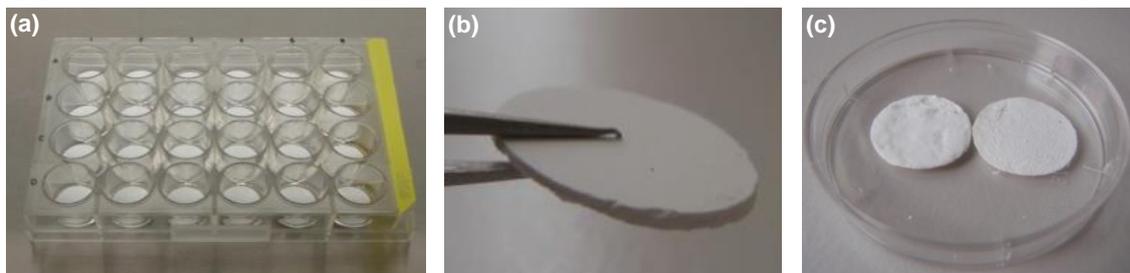
Die TE-Lösung wurde im Verhältnis 1:20 mit destilliertem Wasser verdünnt. Diese Lösung wird fortan als Arbeitslösung bezeichnet.

### 2.1.6 Knochenersatzmaterialien

Die verwendeten Knochenersatzmaterialien wurden von Matthias Schumacher und Sven Knaack aus der Arbeitsgruppe von Professor Dr. Michael Gelinsky im Zentrum für translationale Knochen-, Gelenk- und Weichgewebeforschung der Technischen Universität Dresden produziert und im Rahmen des von der Deutschen Forschungsgemeinschaft geförderten Sonderforschungsbereichs/Transregio 79 zur Verfügung gestellt.

#### 2.1.6.1 Calciumphosphatzement

CPC entsteht im Rahmen der sogenannten Zementierung aus einem Precursorpulver. Dessen Hauptbestandteile waren  $\beta$ -Tricalciumphosphat und Calciumhydrogenphosphat, außerdem geringe Anteile an Calciumcarbonat. Alle Komponenten des Pulvers wurden durch Mahlen homogen vermischt. Mit wässrigem Dinatriumhydrogenphosphat versetzt, band das Pulver innerhalb von 15 Minuten (Min.) zu einer festen Masse ab. Auf diese Weise entstanden CPC-Plättchen mit 1–2 Millimeter (mm) Höhe und circa (ca.) 8 mm Durchmesser. Schließlich wurden die CPC-Plättchen durch Lagerung in einer wässrigen Flüssigkeit, die einer simulierten Körperflüssigkeit entsprach, vollständig ausgehärtet, sodass ein calcium-defizitäres Material entstand. Die beteiligten Calciumphosphate setzten sich im Zuge dieses Prozesses zu HA um. So entstanden die fertigen CPC-Plättchen (Abb. 12) (Reinstorf 2005; Khairoun et al. 1997).



**Abb. 12: Calciumphosphatzement. (a) Lagerung in einer 24-Well-Platte. (b) Plättchen von der Seite. (c) Plättchen von Vorder- und Rückseite in einer Zellkulturschale.**

### 2.1.6.2 Kollagen-Tapes

Die Kollagen-Tapes bestanden aus mit HA mineralisiertem Kollagen-Nanokomposit und waren 0,5–1 mm dick bei einem Durchmesser von 8 mm. Als Quelle für das Material diente Kollagen Typ 1, welches aus Kälberhaut (ohne Pepsinbehandlung) isoliert wurde. Die Isolation des Kollagens erfolgte durch Lösen des Kollagens mit Hilfe von 10 mM Salzsäure und unter Zugabe von 0,1 M Calciumchlorid-Lösung. Der pH-Wert wurde bei 7 stabilisiert und die Lösung für 12 Stunden auf 37 °C erwärmt. Daraufhin entstand die Struktur von HA, einem wesentlichen Bestandteil der anorganischen Substanz des menschlichen Knochens. Mittels Zentrifugation wurden die hergestellten mineralisierten Kollagen-Fasern gesammelt und nach Einfüllen in eine 24-Well-Platte gefriergetrocknet. Die so entstandenen Kollagen-Tapes wurden zur Sterilisation mit Gammastrahlen in einer Dosis von 25 Gray bestrahlt. Die Kollagen-Tapes hatten eine glatte Vorderseite und eine unregelmäßige und raue Rückseite (Abb. 13) (Gelinsky et al. 2008). Die Zellen wurden später auf die glatte Vorderseite ausgesät.

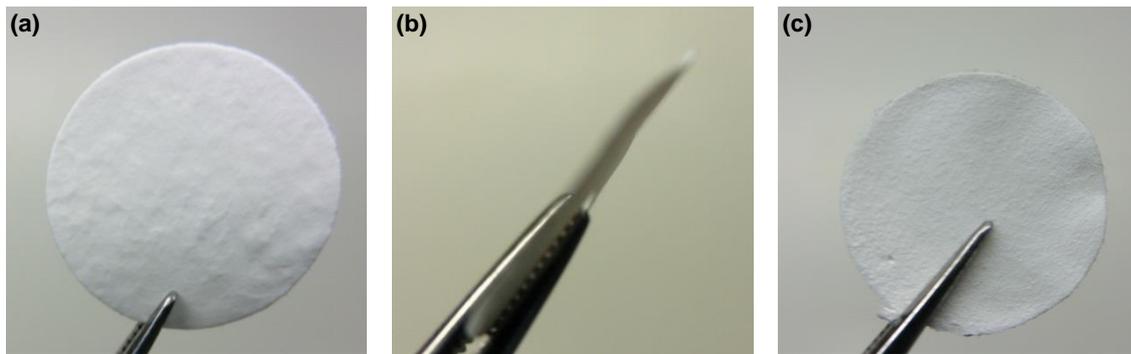
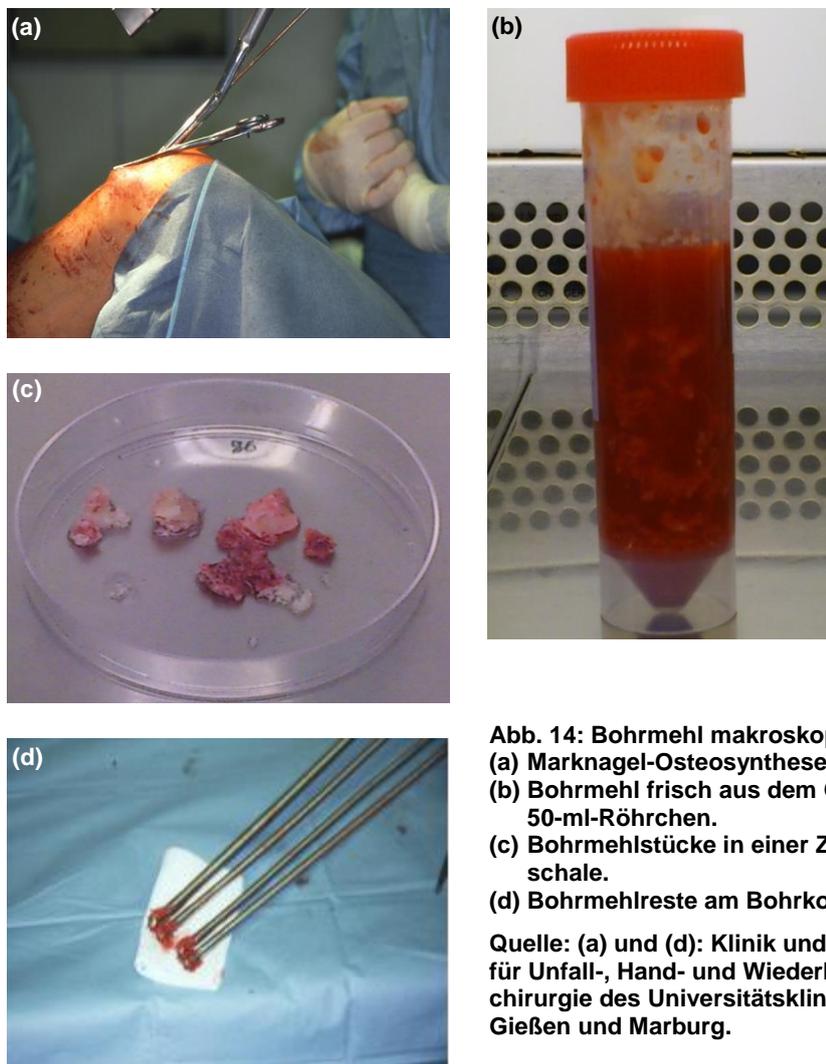


Abb. 13: Kollagen-Tapes (a) von der Rückseite, (b) von der Seite und (c) von der Vorderseite.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Gewinnung von hMSC aus Bohrmehl

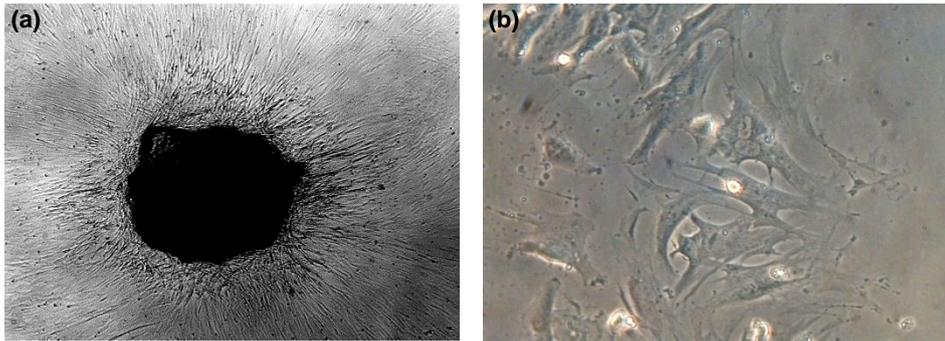
Bei der Marknagel-Osteosynthese von Frakturen im Bereich der Tibia oder des Femurs wird der Knochen aufgebohrt, um den Marknagel einzubringen. Bei diesem Prozess entsteht Bohrmehl, eine Mischung aus Blut, Knochenmark und Knochen, das eine Vielzahl verschiedener Zelltypen enthält. Das Bohrmehl der Spender wurde vom Bohrkopf entfernt und noch im OP steril in F-12K-Medium (+ 20% FKS und 1% P/S) verbraucht (Abb. 14). Alle Spender wurden aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis, das positive Votum der Ethik-Kommission der Justus-Liebig-Universität Gießen lag vor (Aktenzeichen: 74/09).



**Abb. 14: Bohrmehl makroskopisch.**  
(a) Marknagel-Osteosynthese der Tibia.  
(b) Bohrmehl frisch aus dem OP in einem 50-ml-Röhrchen.  
(c) Bohrmehlstücke in einer Zellkultur-schale.  
(d) Bohrmehlreste am Bohrkopf.

Quelle: (a) und (d): Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg.

Das Bohrmehl wurde gespült und in einer Zellkulturschale bei 37 °C und 5% Kohlenstoffdioxid- (CO<sub>2</sub>)-Gehalt kultiviert. Im Verlauf von zwei Wochen wuchsen aus dem Bohrmehl hMSC aus, die weiter kultiviert wurden, sodass nach etwa drei Wochen ein homogener Zellrasen entstand (Abb. 15).



**Abb. 15: Bohrmehl mikroskopisch. (a) Zellen beim Auswachsen aus dem Bohrmehl. (b) Homogener Zellrasen. Quelle (b): Dr. med. vet. Katja Trinkaus, Labor für experimentelle Unfallchirurgie, Justus-Liebig-Universität Gießen.**

Die auf diese Weise gewonnenen Zellen hatten die Fähigkeit, sich in eine osteogene, eine chondrogene oder eine adipogene Zelllinie weiter zu differenzieren. Für weitere Versuche wurden die Zellen eingefroren beziehungsweise (bzw.) ausgesät.

### **2.2.2 Kultivierung der hMSC**

Die nach dem oben beschriebenen Verfahren gewonnenen hMSC wurden in Zellkulturflaschen in 10 ml F-12K-Medium (+ 20% FKS) bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt kultiviert. Alle 7 Tage erfolgte der Medienwechsel, alle 14 Tage wurden die Zellen gesplittet und passagiert. Das Wachstumsverhalten wurde regelmäßig lichtmikroskopisch kontrolliert. Bei vollständiger Konfluenz wurden die Zellen ausgesät oder gesplittet und eingefroren.

Zum Passagieren und Splitten wurde das überständige Medium verworfen und die Zellen zweimal mit 10 ml PBS-Puffer gespült. Durch Zugabe von 3 ml 0,05%-Trypsin-EDTA für 6 Min. wurden die adhärenenten Zellen gelöst. Trypsin ist eine Protease, die natürlicherweise im humanen Pankreas vorkommt. Bei sachgemäßer Anwendung kommt es lediglich zur Spaltung der Adhärenzproteine der Zellen in der Zellkulturflasche und nicht zur Zellschädigung. Die Reaktion des Trypsin-EDTA wurde durch Zugabe von 7 ml F-12K-Medium (+ 20% FKS) gestoppt. Die entstandene Zellsuspension wurde auf zwei neue Zellkulturflaschen verteilt und mit 15 ml F-12K-Medium (+ 20% FKS) versetzt. Alle 7 Tage wurde das Medium gewechselt. Zeitweise wurden einige Zellen in niedrigen Passagen zur dauerhaften Konservierung eingefroren: Nach Lösen der Zellen wurde die Zellsuspension in ein 50-ml-Röhrchen überführt, bei 20 °C und 5000 rpm (Umdrehungen pro Min.) zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert, 900 Mikroliter (µl) FKS zugegeben und die so gewonnene Lösung in Kryo-Röhrchen überführt. Zur Verhinderung von Eiskristallbildung und Zellyse erfolgte die Zugabe von 100 µl DMSO. Daraufhin wurde die Zellsuspension schrittweise zunächst bei –20 °C, dann bei –80 °C eingefroren und schließlich in flüssigem Stickstoff für spätere Versuche dauerhaft konserviert.

Um die Zellen wieder aufzutauen, wurden zunächst die Kryo-Röhrchen angetaut. Die halb gefrorene Zellsuspension wurde in vorgewärmte Zellkulturflaschen mit 20 ml F-12K-Medium (+ 20% FKS) überführt und im Inkubator bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt vollständig aufgetaut. Nach 24 Stunden wurde das Medium gewechselt.

### 2.2.3 Aussäen der hMSC

Konfluent gewachsene Zellen konnten für die Versuche ausgesät werden. Hierbei wurden lediglich Zellen bis zur maximal dritten Passage verwendet. Die adhärenenten Zellen wurden analog zur Kultivierung aus dem Bohrmehl zweimal mit 10 ml PBS-Puffer gewaschen, mit Hilfe von Trypsin-EDTA abgelöst und die Trypsin-Reaktion nach 6 Min. durch Zugabe von 7 ml F-12K-Medium (+ 20% FKS) gestoppt. Die so erhaltene Zelllösung wurde in ein 50-ml-Plastikröhrchen überführt und bei 5000 rpm und 20 °C für 5 Min. zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand über dem entstandenen Zellpellet vorsichtig abpipettiert und wiederum 1,5 ml F-12K-Medium (+ 20% FKS) hinzugegeben. Aus dieser Lösung wurden 25 µl in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und die Zellen ausgezählt. Dazu wurden mit Hilfe des Lichtmikroskops 8 mal 16 Quadrate ausgezählt. Die Berechnung der Zellzahl erfolgte nach folgender Formel:

$$\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} = \frac{\sum X}{8} \cdot 10.000.$$

Per Dreisatz errechnete sich daraus das Volumen zum Aussäen von 20.000 bzw. 40.000 Zellen. Das so ermittelte Volumen wurde in eine 24-Well-Platte in F-12K-Medium (+ 20% FKS) ausgesät. Für den Versuch ohne Knochenersatzmaterial und zum Konzentrationstest der einzelnen Pharmaka wurden 40.000 Zellen je Well in fünf 24-Well-Platten ausgesät, je zwei Wells pro Pharmakon und zwei Wells für die Kontrolle (Abb. 16). Direkt nach der Aussaat wurde mittels Lichtmikroskop die Vitalität der Zellen kontrolliert und die Zellen bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt kultiviert.

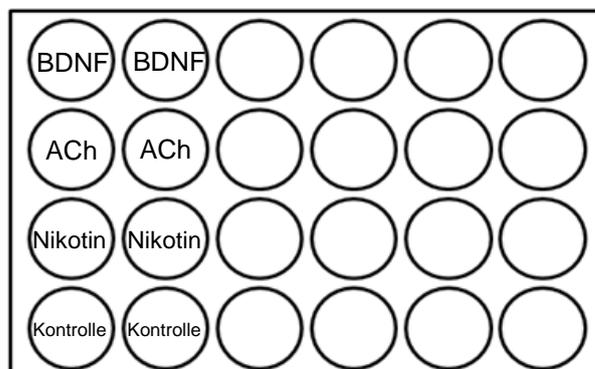


Abb. 16: Plattenlayout der 24 Well-Platte.

Bei der Aussaat auf Knochenersatzmaterial ergaben sich aufgrund der Materialeigenschaften einige Besonderheiten.

Um die Zellen auf CPC auszusäen, wurden vor dem Aussäen die entsprechenden CPC-Plättchen für 24 Stunden mit 1 ml F-12K-Medium (+ 20% FKS) inkubiert, da CPC den pH-Wert des F-12K-Mediums anfangs stark beeinflusste. Stündlich wurde insgesamt fünfmal das Medium gewechselt, damit sich ein gleichmäßiger pH-Wert einstellen und die CPC-Plättchen das Medium teilweise aufnehmen konnten. Nach 24 Stunden wurde abermals das Medium gewechselt. Die entsprechenden Wells einer 24-Well-Platte wurden dann für 30 Min. mit 200 µl FKS inkubiert, das FKS verworfen und die vorher inkubierten CPC-Plättchen wurden in die Wells umgesetzt. Nun erfolgte die Aussaat von 40.000 Zellen pro Well in 1 ml F-12K-Medium (+ 20% FKS), jeweils zwei Wells für die Pharmaka und die Kontrollen mit und ohne CPC. Nachdem die ausgesäten Zellen lichtmikroskopisch kontrolliert wurden, erfolgte die Kultivierung bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt.

Die Kollagen-Tapes wurden analog zu den CPC-Plättchen 24 Stunden vor dem Aussäen der Zellen mit 1 ml F-12K-Medium (+ 20% FKS) je Well inkubiert, allerdings nicht mehr umgesetzt, da dies aufgrund der Materialeigenschaften (die Kollagen-Tapes wurden nach dem Inkubieren mit Medium gelartig) nicht mehr möglich war. Nach 24 Stunden wurde einmalig das Medium gewechselt und 20.000 Zellen pro Well wurden in 1 ml F-12K-Medium (+ 20% FKS) ausgesät. Wie bei CPC wurden jeweils zwei Wells für die Pharmaka und die Kontrollen mit und ohne Kollagen-Tapes ausgesät, lichtmikroskopisch kontrolliert und bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt kultiviert.

#### **2.2.4 Spender der hMSC**

Als Spender dienten männliche, knochengesunde Patienten im Alter von 24 bis 52 Jahren ohne systemische Grunderkrankungen wie Diabetes mellitus, Osteoporose, maligne Erkrankungen oder Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises. Der Stichprobenumfang betrug  $n = 3$  für CPC und Kollagen-Tapes. Zum Vergleich wurde als Pilotversuch bei CPC und Kollagen-Tapes das Bohrmehl einer knochengesunden 81-jährigen Patientin ohne systemische Grunderkrankung sowie einer 71-jährigen Patientin mit Osteoporose verwendet.

#### **2.2.5 Ansetzen des osteogenen Mediums**

Um eine Differenzierung der Zellen in Richtung der osteoblastären Linie zu induzieren, wurde ein spezielles Medium gemischt, welches die Differenzierung fördert. Es wurden 440 µl Ascorbinsäure und 981 µl Dexamethason zusammen mit 50 ml FKS sowie 5 ml P/S zu 443,5 ml DMEM (low glucose) gegeben und vermischt. Weiterhin wurden

1531 Milligramm (mg) Glycerol-Phosphat steril filtriert zugefügt, sodass ein Volumen von 500 ml entstand. Dieses Medium diente als Grundmedium für die hMSC.

### 2.2.6 Wechsel des Mediums und Zugabe der Pharmaka

48 Stunden nach der Aussaat wurde auf das osteogene Medium umgestellt, und die Pharmaka ACh, BDNF und Nikotin wurden in der jeweiligen Konzentration hinzugegeben. Dies stellte fortan den Zeitpunkt 0 dar. Die Pharmaka wurden bei jedem Mediumwechsel dem Medium frisch zugesetzt, um Veränderungen der Pharmaka entgegenzuwirken. Das war v. a. bei ACh wichtig, da ACh in wässrigem Milieu schnell hydrolysiert.

#### a) ACh

Die ACh-Zielkonzentration betrug 100  $\mu\text{M}$ . Zunächst wurde eine Lösung mit einer Konzentration von 1 Mol pro Liter (mol/l) ACh hergestellt und diese dann weiter verdünnt. Die Einwaage  $m$  von ACh wurde aus der zunächst gewünschten Stoffmengenkonzentration  $c$ , dem Volumen  $V$  des Lösungsmediums und der molaren Masse von ACh  $M = 181,66 \text{ g/mol}$  (Gramm pro Mol) über folgende Formel berechnet:

$$\begin{aligned} m &= c \cdot V \cdot M \\ &= 1 \frac{\text{mol}}{\text{l}} \cdot 1 \text{ ml} \cdot 181,66 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 181,66 \text{ mg.} \end{aligned}$$

181,66 mg ACh wurden mit 1 ml osteogenem Medium versetzt und steril filtriert, sodass eine Lösung mit einer Konzentration von 1 mol/l entstand, die zweimalig 1:100 bis zur Zielkonzentration von 100  $\mu\text{M}$  mit osteogenem Medium verdünnt wurde.

#### b) BDNF

Zunächst wurde eine Ausgangslösung mit 5  $\mu\text{g}$  BDNF in 1 ml sterilem Wasser ( $\gamma_A = 5 \mu\text{g/ml}$ ) hergestellt und in 100- $\mu\text{l}$ -Eppendorf-Gefäße aliquotiert. Das für die gewünschte Zielkonzentration  $\gamma_Z = 40 \text{ ng/ml}$  (Nanogramm pro Milliliter) benötigte Volumen  $V_A$  dieser Ausgangslösung wurde aus dem gewünschten Volumen  $V_Z = 10 \text{ ml}$  der Ziellösung wie folgt ermittelt:

$$V_A = \frac{\gamma_Z}{\gamma_A} \cdot V_Z = \frac{40 \text{ ng/ml}}{5000 \text{ ng/ml}} \cdot 10 \text{ ml} = 0,08 \text{ ml} = 80 \mu\text{l}.$$

Es wurden also 80  $\mu\text{l}$  des Aliquots in 10 ml osteogenem Medium gelöst.

c) Nikotin

Die Stocklösung von Nikotin hatte eine Massenkonzentration von 1 g/ml. Zunächst wurde die Stocklösung 1:1000 mit osteogenem Medium auf  $\gamma_A = 1$  mg/ml verdünnt. Die für die gewünschte Zielkonzentration  $c_Z = 1 \mu\text{M} = 1 \mu\text{mol/l}$  benötigte Menge  $V_A$  dieser Ausgangslösung wurde aus dem gewünschten Volumen  $V_Z = 50$  ml der Zielösung und der molaren Masse von Nikotin  $M_{\text{Nik}} = 162,23$  g/mol wie folgt ermittelt:

$$\begin{aligned} V_A &= \frac{\gamma_Z}{\gamma_A} \cdot V_Z = \frac{c_Z \cdot M_{\text{Nik}}}{\gamma_A} \cdot V_Z = \frac{1 \frac{\mu\text{mol}}{\text{l}} \cdot 162,23 \frac{\text{g}}{\text{mol}}}{1 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}} \cdot 50 \text{ ml} \\ &= \frac{162,23 \mu\text{g/l}}{1 \text{ g/l}} \cdot 0,05 \text{ l} = 8,11 \mu\text{l}. \end{aligned}$$

Es wurden also 8,11  $\mu\text{l}$  der verdünnten Nikotinlösung in 50 ml osteogenem Medium gelöst.

Zum Medienwechsel wurde das alte Medium abpipettiert und die hergestellten osteogenen Medien mit Pharmaka hinzugegeben. Mechanische Irritationen der Zellen wurden durch entsprechende Pipettierweise vermieden. Der Mediumwechsel erfolgte alle 48 Stunden.

### 2.2.7 Ernten der Zellen und Lebendzellbeobachtung

Vor dem Ernten der Zellen wurde zunächst das Zellwachstum fotodokumentiert. Die Ernte der Zellen erfolgte zu fünf Zeitpunkten. Der Zeitpunkt 0 wurde 48 Stunden nach Aussaat mit der erstmaligen Zugabe von Pharmaka und osteogenem Medium angesetzt. Die Zellen wurden dann 7, 14, 21 und 28 Tage nach Zeitpunkt 0 geerntet. Zur Ernte wurde das alte Medium verworfen und die Wells zweimal mit je 1 ml PBS pro Well gewaschen. Danach wurden je Well 250  $\mu\text{l}$  Lysis-Puffer (bestehend aus 1% Triton X-100 gelöst in PBS) zur Zellyse zugefügt. Anschließend wurden die 24-Well-Platten bei  $-80^\circ\text{C}$  zur späteren Auswertung eingefroren. Die Zeit zwischen Einfrieren und Auswertung betrug maximal 14 Tage.

### 2.2.8 Erstellen der Standardkurven

#### 2.2.8.1 ALP

Die Erstellung der Standardkurve für die ALP erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Dazu wurde zu der Standard-Lösung mit bekannter ALP-Konzentration (200 ng/ml) eine Pufferlösung gegeben, sodass Lösungen mit Konzentrationen von 100, 50, 25, 12,5, 6,25 und 3,125 ng/ml entstanden. Nun wurden je 50  $\mu\text{l}$  der unterschiedlich konzentrierten ALP-Lösungen zu je 50  $\mu\text{l}$  pNPP-Substrat gegeben, die Platte

für 30 Sekunden geschüttelt und für 45 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte die kolorimetrische Messung der Extinktion  $E$  bei einer Wellenlänge von 405 nm und die Auftragung der Extinktion gegen die ALP-Konzentration  $c$  zur Erstellung der Standardkurve. Diese wurde mit einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,998$  bestimmt. Die Steigung der Geraden betrug  $m = 0,0114/(\text{ng/ml})$  (Abb. 17). Aus der Standardkurve konnte nun die Formel für die Bestimmung der ALP-Konzentration  $c$  aus der Extinktion  $E$  ermittelt werden:

$$c = \frac{E}{0,0114} \text{ ng/ml.}$$

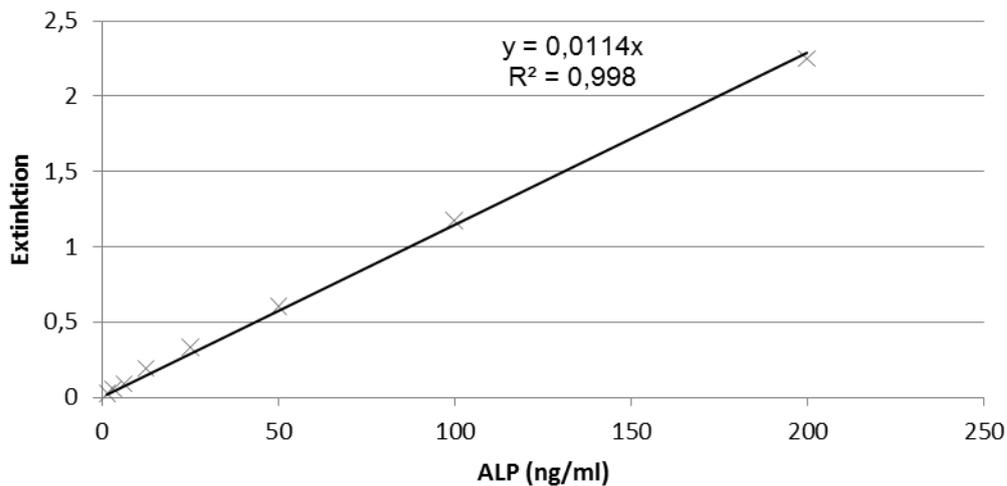
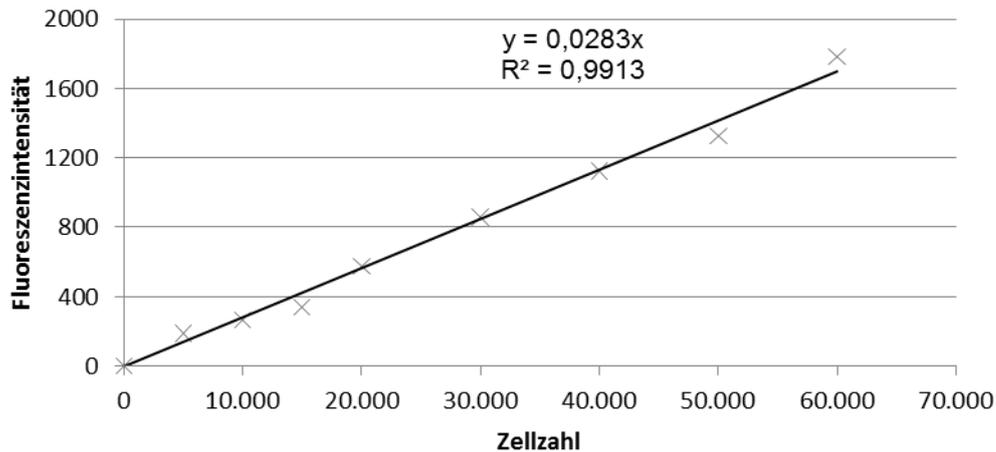


Abb. 17: Standardkurve der ALP. Hinzugefügt wurde eine Regressionsgerade durch die gemessenen Werte. Angegeben sind auch die Gleichung der Regressionsgeraden und das Bestimmtheitsmaß.

### 2.2.8.2 Zellzahl (PicoGreen)

Um die Standardkurve für die Zellzahl zu bestimmen, wurden definierte Zellzahlen (5000, 10.000, 15.000, 20.000, 30.000, 40.000, 50.000 und 60.000 Zellen) von hMSC ausgezählt. Die Zellen wurden lysiert und gemäß Herstellerprotokoll wurde mittels PicoGreen-Assay die Fluoreszenzintensität bestimmt. Dazu wurden 5  $\mu\text{l}$  des Zelllysats zu 195  $\mu\text{l}$  Arbeitslösung in eine schwarze 96-Well-Platte gegeben und 3 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die Anregung erfolgte beim Exzitationsmaximum von 480 nm, die Fluoreszenzmessung beim Emissionsmaximum von 520 nm. Daraus wurde die Standardkurve (Zellzahl gegen Fluoreszenzintensität) erstellt. Die Steigung der Regressionsgeraden betrug  $m = 0,0283$  bei einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,9913$  (Abb. 18). Hieraus ergibt sich als Formel für die Bestimmung der Zellzahl  $Z$  aus der Fluoreszenzintensität  $I$ :

$$Z = \frac{I}{0,0283}.$$



**Abb. 18: Standardkurve der Zellzahl (PicoGreen).** Hinzugefügt wurde eine Trendlinie durch die gemessenen Werte. Angegeben sind auch die Gleichung der Regressionsgerade und das Bestimmtheitsmaß.

Aus diesen beiden Standardkurven ergibt sich die Formel für die Berechnung der auf eine definierte Zellzahl von 200 Zellen bezogenen ALP-Konzentration  $\bar{c}$ , die in der vorliegenden Arbeit als Vergleichsgröße dient. In dieser Formel wird die aus den Extinktionsmessungen errechnete ALP-Konzentration  $c$  mit dem Faktor 5 multipliziert, weil bei der Erstellung der Standardkurve mit 50  $\mu\text{l}$  der zu messenden Lösung gearbeitet wurde, bei den Versuchen hingegen mit 10  $\mu\text{l}$ . Außerdem ist die aus den gemessenen Fluoreszenzintensitäten errechnete Zellzahl  $Z$  mit dem Faktor 2 zu multiplizieren, um zu berücksichtigen, dass bei der Messung der Zellzahl – dem Vorgehen bei der Erstellung der Standardkurve entsprechend – jeweils 5  $\mu\text{l}$  des Zelllysates verwendet wurden, bei der ALP-Messung hingegen 10  $\mu\text{l}$ .

$$\begin{aligned} \bar{c} &= 5 \cdot c \cdot \frac{200}{2 \cdot Z} = \frac{5 \cdot E}{0,0114} \text{ ng/ml} \cdot \frac{200}{\frac{2 \cdot I}{0,0283}} = \frac{E}{I} \cdot \frac{1000 \cdot 0,0283}{2 \cdot 0,0114} \text{ ng/ml} \\ &= \frac{E}{I} \cdot 1241 \text{ ng/ml.} \end{aligned}$$

### 2.2.9 Messungen der ALP-Konzentration und der Zellzahl

Zur Vorbereitung der Messungen wurden die eingefrorenen 24-Well-Platten auf Eis langsam aufgetaut, 10 Min. geschüttelt, die Zelllysate in Eppendorf-Gefäße überführt und für 5 Min. bei 5000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Als Leerwert (Blank) wurde anstelle des Zelllysats jeweils Lysis-Puffer verwendet. Die Bestimmung erfolgte jeweils als Triplet und aus den erhaltenen Mittelwerten wurden jeweils die ALP-Konzentration und die Zellzahl bestimmt.

### **2.2.9.1 Messung der ALP-Konzentration**

10 µl Zelllysat je Probe wurden zu 40 µl verdünntem Puffer und zu 50 µl pNPP-Substrat gegeben und in eine klare 96-Well-Platte überführt. Die 96-Well-Platte wurde für 30 Sekunden geschüttelt und 45 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte die Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 405 nm.

### **2.2.9.2 Messung der Zellzahl**

5 µl Zelllysat je Probe wurden zu 195 µl Arbeitslösung in eine schwarze 96-Well-Platte gegeben. Danach wurde die 96-Well-Platte bei Raumtemperatur für 3 Min. inkubiert. Die so erhaltenen Lösungen wurden bei einer Wellenlänge von 480 nm angeregt und die Fluoreszenz bei 520 nm gemessen.

### **2.2.10 Konzentrationstest der Pharmaka**

Um die jeweils förderlichste Konzentration der einzelnen Pharmaka zu evaluieren, wurden verschiedene Konzentrationen der einzelnen Pharmaka getestet. Dazu wurden 40.000 Zellen pro Well ausgesät und jeweils zwei Wells je Pharmakon-Konzentration kultiviert. Für BDNF wurden die Konzentrationen 10, 20, 40 und 80 ng/ml gewählt, für ACh und Nikotin jeweils 1 mM, 100 µM, 10 µM, 1 µM, 100 nM (Nanomolar), 10 nM und 1 nM. Als Kontrolle wurden jeweils zwei Wells ohne Pharmaka kultiviert. Nach 21 Tagen erfolgte die Ernte mit Messung der Zellzahl und der ALP-Konzentration nach den oben beschriebenen Methoden. Dabei wurden hMSC aus dem Bohrmehl eines einzelnen Patienten verwendet. Jedes Well galt als  $n = 1$ .

### **2.2.11 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung erfolgte mittels Fisher's Least-Significant-Difference-Test (LSD-Test). Die Voraussetzungen für diesen Test wurden überprüft, durch eine signifikante Varianzanalyse erfüllt und mit einem Varianzhomogenitätstest ergänzt. Als Software wurde IBM SSPS Statistics (Version 20) benutzt. Im Folgenden wird ein Signifikanzwert  $p \leq 0,05$  als statistisch signifikant mit einem Stern markiert, ein Wert von  $p \leq 0,01$  als hochsignifikant mit zwei Sternen und ein Wert von  $p \leq 0,001$  als höchst signifikant mit drei Sternen markiert.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Konzentrationstest der Pharmaka

Der Konzentrationstest wurde vorangestellt, weil für den Zelltyp der hMSC aus Bohrmehl bisher kein Konzentrationstest der verwendeten Pharmaka existiert. Dabei betrug der Stichprobenumfang  $n = 2$  Wells.

Für Nikotin zeigte sich bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  die höchste ALP-Konzentration bezogen auf 200 Zellen (Abb. 19). Daher wurde für die weiteren Versuche diese Konzentration verwendet. Alle getesteten Nikotin-Konzentrationen wiesen einen geringeren ALP-Wert bezogen auf die Kontrolle auf.

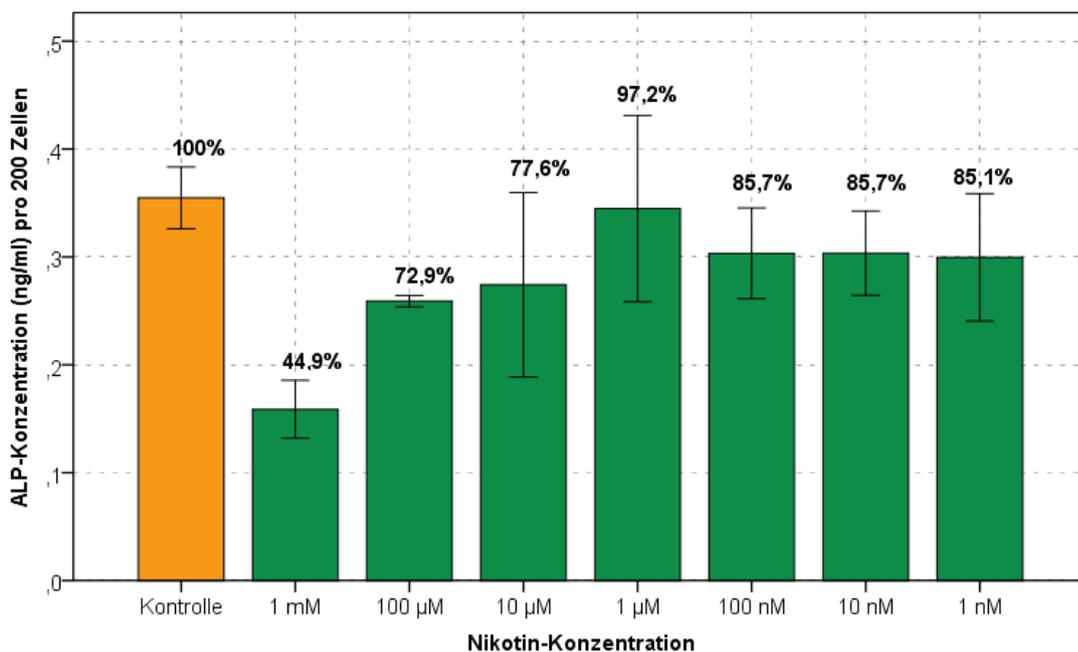


Abb. 19: Konzentrationstest von Nikotin. Quantifizierung der ALP nach 21 Tagen. Die ALP-Konzentration wurde auf 200 Zellen bezogen. Dargestellt sind verschiedene Nikotin-Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle ohne Pharmakon. Über den Balken sind die ALP-Konzentrationen als Prozentsatz im Verhältnis zur Kontrolle angegeben.  $n = 2$ .

Bei BDNF zeigte sich für alle Konzentrationen ein höherer ALP-Wert als in der Kontrolle ohne BDNF. Der ALP-Wert war bei einer BDNF-Konzentration von 40 ng/ml am höchsten und lag dabei um ca. 29% höher als in der Kontrolle (Abb. 20). Daher wurde für die weiteren Versuche diese Konzentration verwendet.

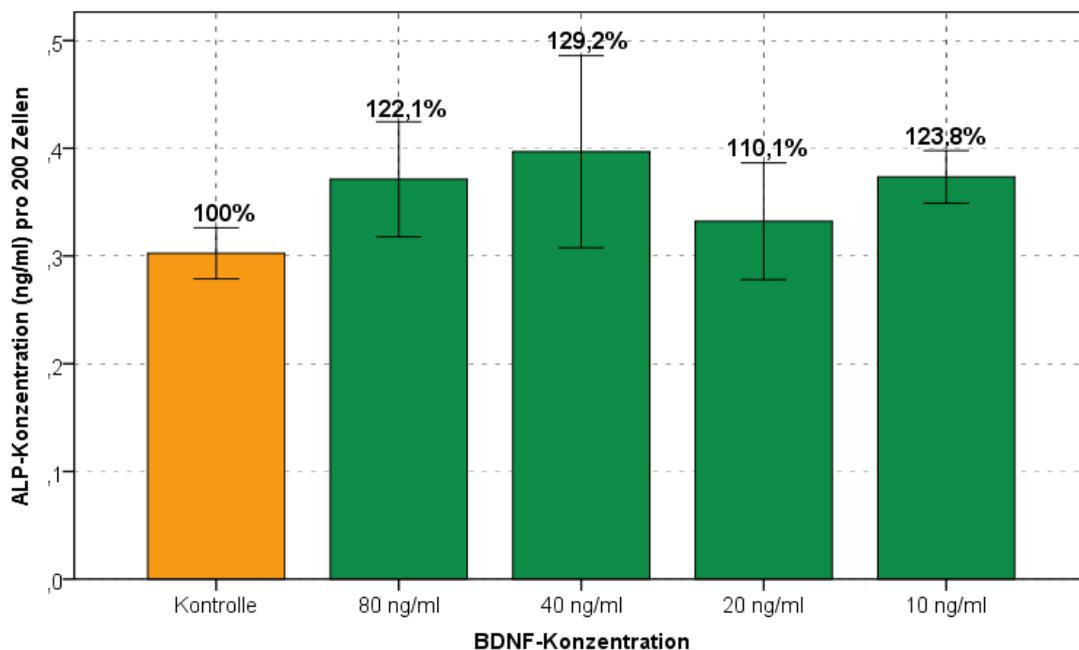


Abb. 20: Konzentrationstest von BDNF. Quantifizierung der ALP nach 21 Tagen. Die ALP-Konzentration wurde auf 200 Zellen bezogen. Dargestellt sind verschiedene BDNF-Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle ohne Pharmakon. Über den Balken sind die ALP-Konzentrationen als Prozentsatz im Verhältnis zur Kontrolle angegeben.  $n = 2$ .

Bei allen getesteten ACh-Konzentrationen waren schwankende ALP-Werte zu sehen (Abb. 21). Obwohl der ALP-Wert bei einer ACh-Konzentration von 1 mM am höchsten war, wurden für die weiteren Versuche 100  $\mu$ M genommen, da in der Lebendzellbeobachtung bei der Konzentration von 1 mM Löcher im Zellrasen zu beobachten waren.

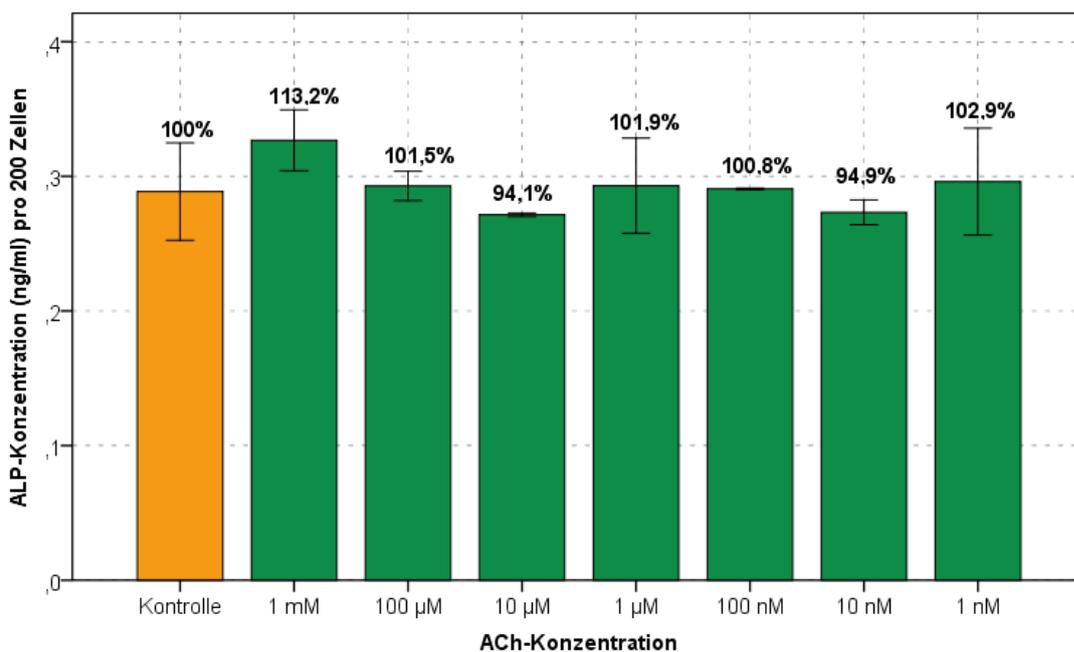


Abb. 21: Konzentrationstest von ACh. Quantifizierung der ALP nach 21 Tagen. Die ALP-Konzentration wurde auf 200 Zellen bezogen. Dargestellt sind verschiedene ACh-Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle ohne Pharmakon. Über den Balken sind die ALP-Konzentrationen als Prozentsatz im Verhältnis zur Kontrolle angegeben.  $n = 2$ .

### 3.2 Versuche ohne Knochenersatzmaterialien

Zu den Zeitpunkten 0, 7 und 14 Tagen zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen den einzelnen Pharmaka bzw. zwischen Pharmaka und Kontrolle. Erst nach 21 Tagen konnten größere Unterschiede zwischen den einzelnen Pharmaka und der Kontrolle festgestellt werden. Dabei wurde für BDNF eine Erhöhung der ALP-Konzentration um ca. 14,6% festgestellt. Bei Nikotin entsprach die ALP-Konzentration mit 97,5% in etwa der Kontrolle. Bei ACh nahm die ALP-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle um ca. 7,7% ab (Abb. 23). Nach 28 Tagen fielen die ALP-Werte allgemein wieder und näherten sich einander an. Zu diesem Zeitpunkt waren lediglich die Werte für ACh deutlich geringer (Abb. 22).

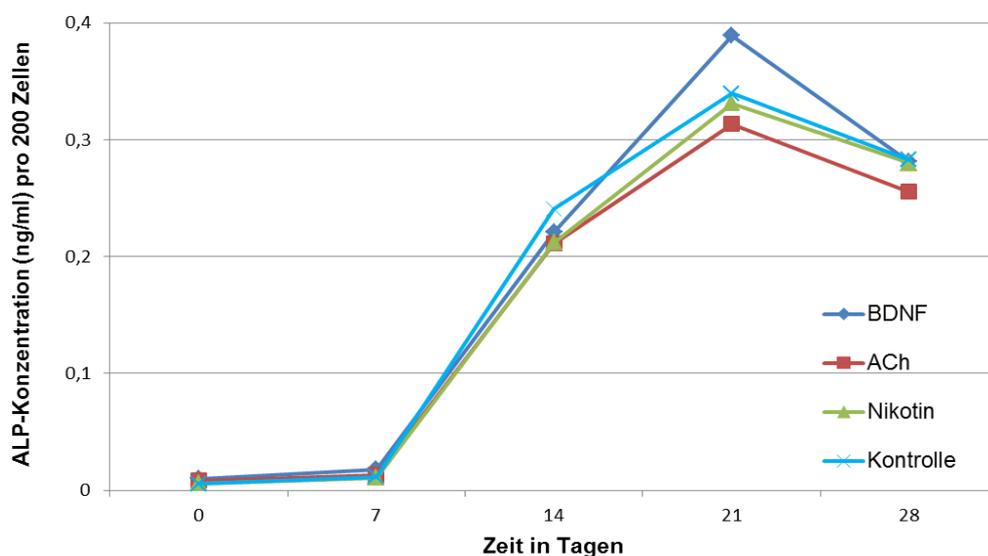


Abb. 22: Versuch ohne Knochenersatzmaterial mit Pharmaka. Die Zellen wurden zu fünf Zeitpunkten gemessen. Erst nach 21 Tagen konnten wesentliche Unterschiede ausgemacht werden.  $n = 1$ .

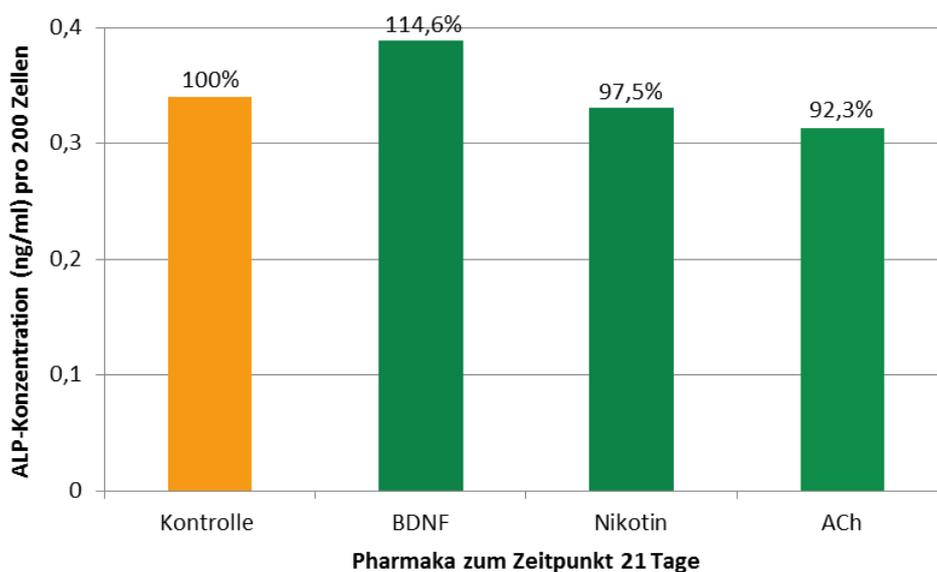


Abb. 23: Versuch ohne Knochenersatzmaterial nach 21 Tagen. Dargestellt sind die Pharmaka im Vergleich zur Kontrolle zum Zeitpunkt 21 Tage. Über den Balken sind die ALP-Konzentrationen als Prozentsatz im Verhältnis zur Kontrolle angegeben.  $n = 1$ .

### 3.3 Lebendzellbeobachtung

Die Zellen wurden lichtmikroskopisch zu verschiedenen Zeitpunkten fotodokumentiert.

#### 3.3.1 Konzentrationstest für BDNF

In der Lebendzellbeobachtung ließen sich zu keinem Zeitpunkt wesentliche Veränderungen im Vergleich zwischen den einzelnen BDNF-Konzentrationen und der Kontrolle feststellen. In Abb. 24 sind dafür exemplarisch die Zeitpunkte 7 Tage und 21 Tage in zwei verschiedenen BDNF-Konzentrationen jeweils mit Kontrolle dargestellt.

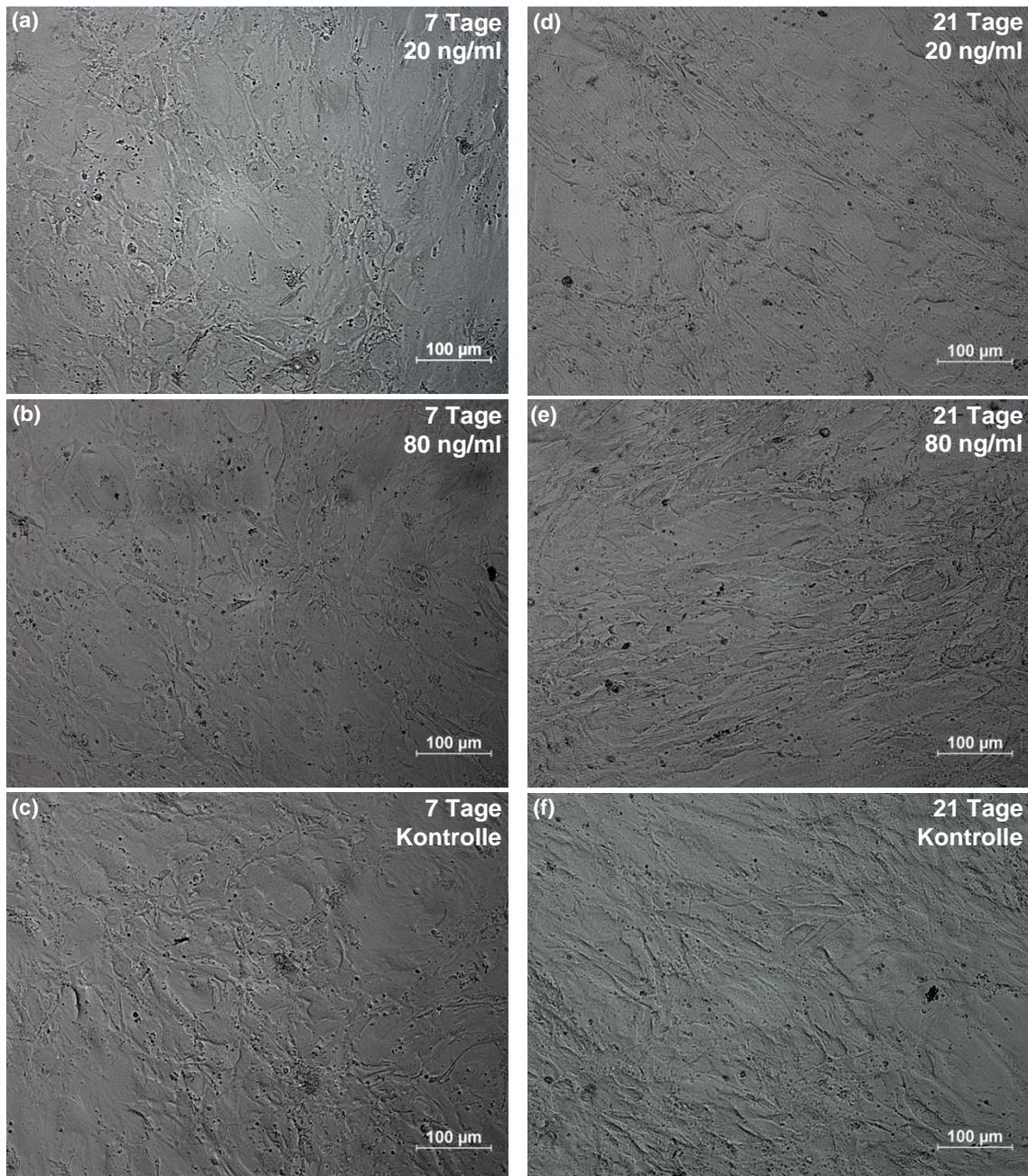
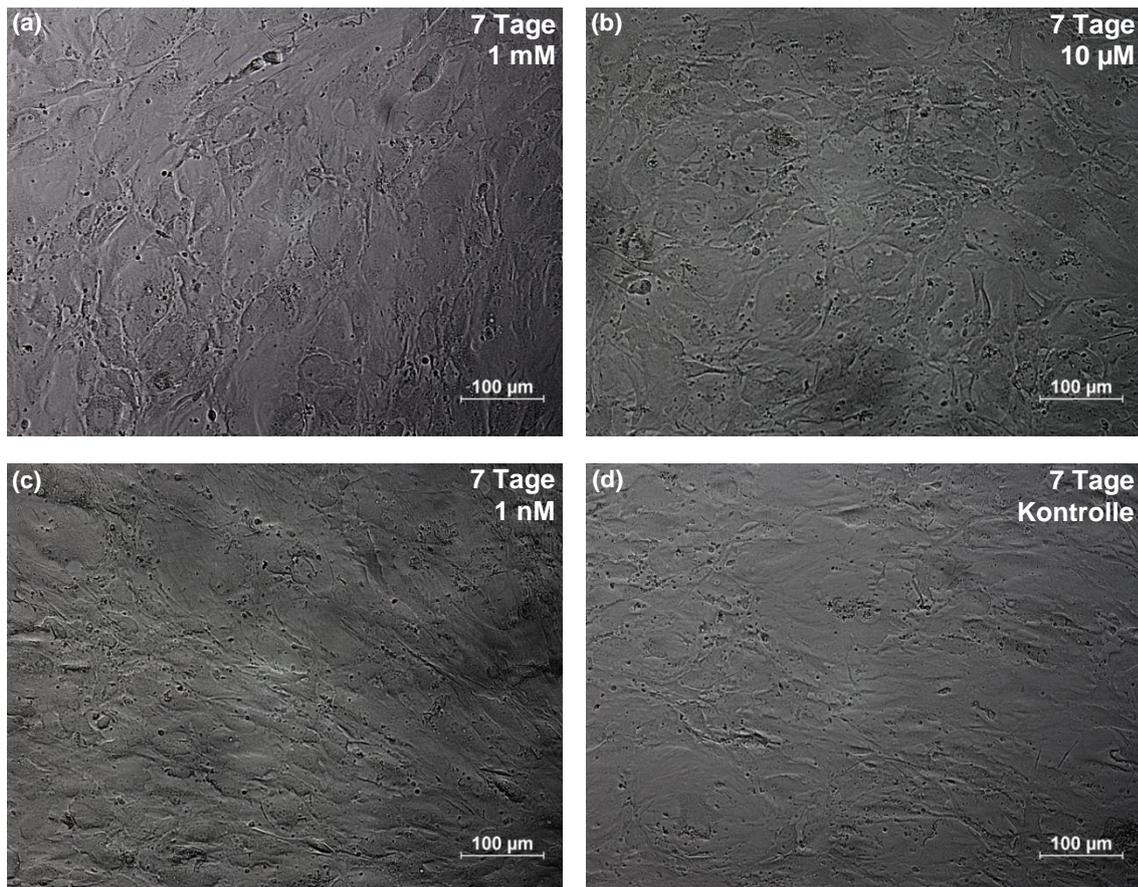


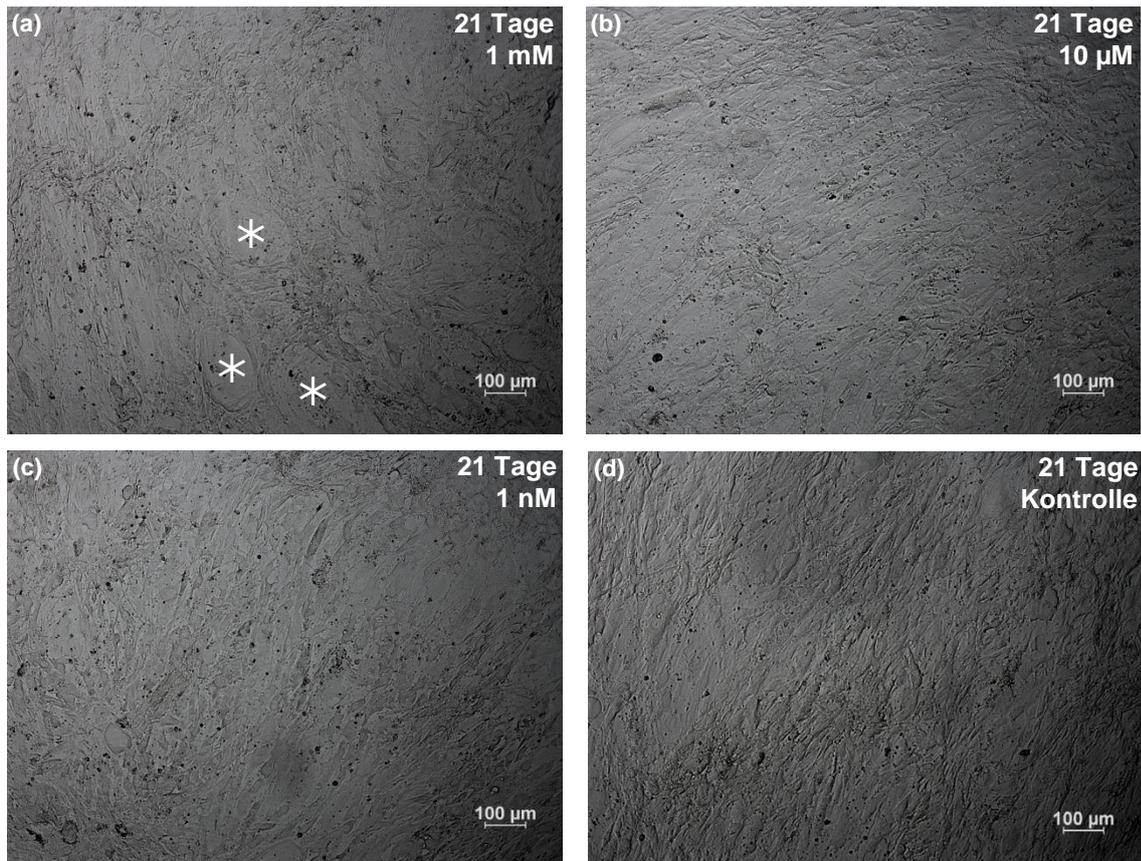
Abb. 24: Lebendzellbeobachtung beim Konzentrationstest für BDNF. (a)–(c) Verschiedene BDNF-Konzentrationen und Kontrolle zum Zeitpunkt 7 Tage. (d)–(f) Verschiedene BDNF-Konzentrationen und Kontrolle zum Zeitpunkt 21 Tage.

### 3.3.2 Konzentrationstest für Nikotin

Zu den Zeitpunkten 0, 7 und 14 Tagen war das Wachstumsverhalten für alle Nikotin-Konzentrationen im Verhältnis zur Kontrolle ähnlich (Abb. 25). Zum Zeitpunkt 21 Tage hingegen war bei höheren Konzentrationen die Bildung von Löchern im Zellrasen feststellbar. Auch für die ALP-Konzentration wurde bei der höchsten Konzentration von 1 mM ein starker Abfall gemessen. Bei niedrigen Nikotin-Konzentrationen zeigte sich ein ähnliches Wachstumsmuster wie bei Zellen ohne Nikotineinfluss (Abb. 26).



**Abb. 25:** Lebendzellbeobachtung beim Konzentrationstest für Nikotin (7 Tage). (a)–(d) Verschiedene Konzentrationen und Kontrolle zum Zeitpunkt 7 Tage.



**Abb. 26: Lebendzellbeobachtung beim Konzentrationstest für Nikotin (21 Tage). (a)–(d) Verschiedene Konzentrationen und Kontrolle zum Zeitpunkt 21 Tage. Mit \* sind Löcher im Zellrasen bei der Konzentration von 1 mM bezeichnet.**

### 3.3.3 Konzentrationstest für ACh

Bei einer ACh-Konzentration von 1 mM fielen zum Zeitpunkt 7 Tage Löcher im Zellrasen auf. Dies war bei den anderen Konzentrationen und in der Kontrolle nicht zu sehen. Nach 21 Tagen waren die Zellen bei allen Konzentrationen konfluent gewachsen; es waren keine Unterschiede mehr feststellbar, weder zwischen den einzelnen Konzentrationen noch zwischen der Kontrolle und verschiedenen ACh-Konzentrationen (Abb. 27). Die verwendete ACh-Konzentration von 100 µM ist exemplarisch nach 7 und 28 Tagen weiter unten in Abb. 28c bzw. Abb. 29c dargestellt.

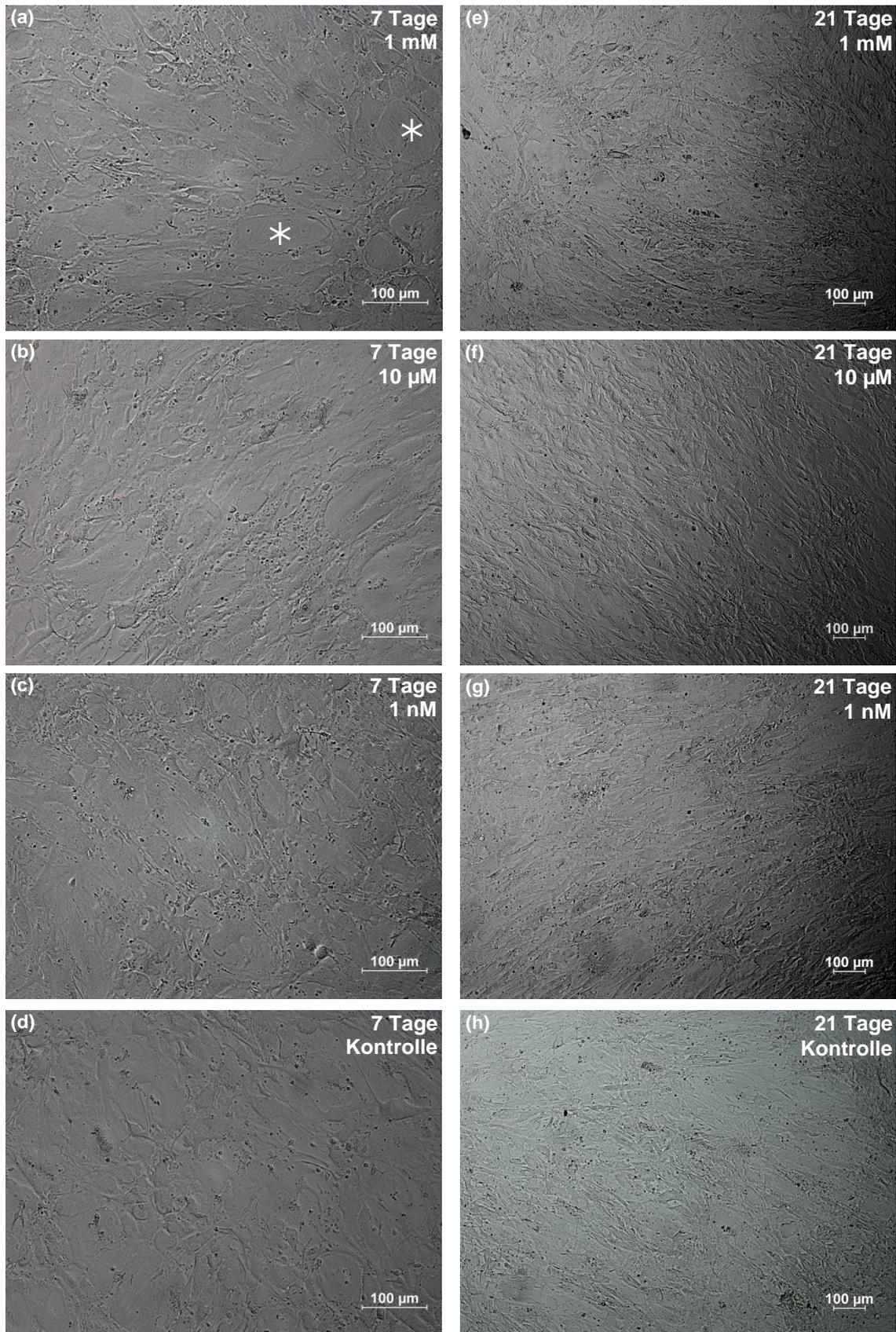


Abb. 27: Lebendzellbeobachtung beim Konzentrationstest für ACh. (a)–(d) Verschiedene Konzentrationen und Kontrolle zum Zeitpunkt 7 Tage. Mit \* sind Löcher im Zellrasen bei der Konzentration von 1 mM ACh bezeichnet. (e)–(h) Verschiedene Konzentrationen und Kontrolle zum Zeitpunkt 21 Tage.

### 3.3.4 Test ohne Material

Es ließen sich zu keinem der Zeitpunkte Unterschiede zwischen den einzelnen Pharmaka und der Kontrolle feststellen. Das Wachstumsverhalten und die anfängliche Zellproliferation war in allen Kulturen ähnlich, die Zellen sahen zu jedem Zeitpunkt und sowohl bei den Pharmaka als auch bei der Kontrolle vital aus. Dafür sind exemplarisch die Zeitpunkte nach 7 Tagen (Abb. 28) und nach 28 Tagen (Abb. 29) für jedes der Pharmaka sowie die Kontrolle dargestellt.

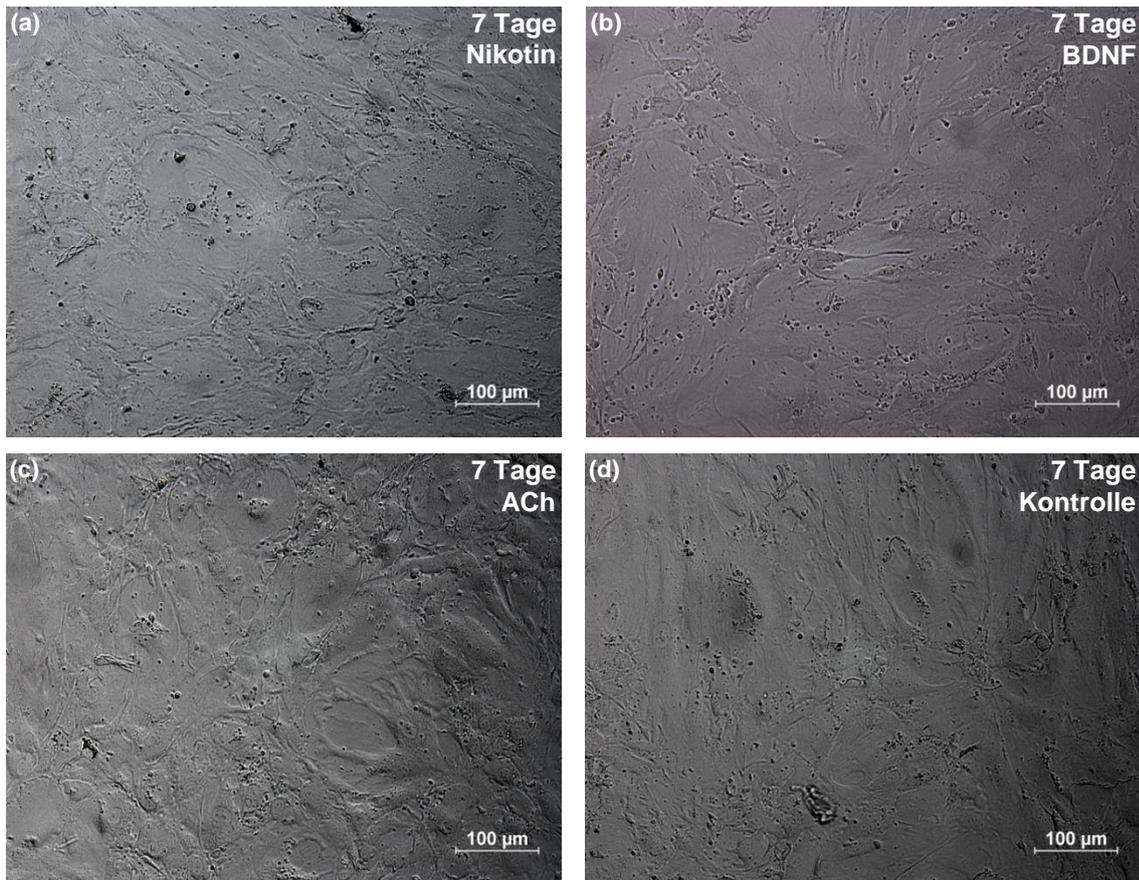


Abb. 28: Lebendzellbeobachtung beim Test ohne Material nach 7 Tagen.

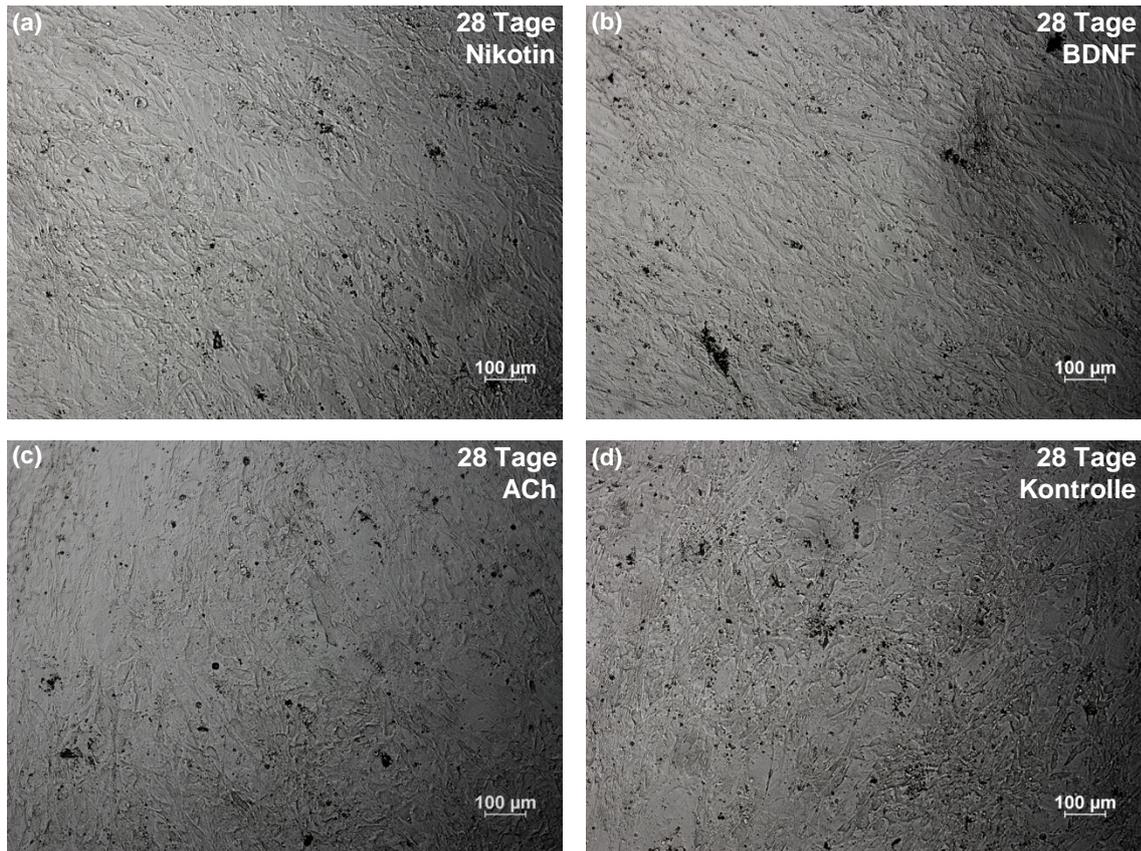
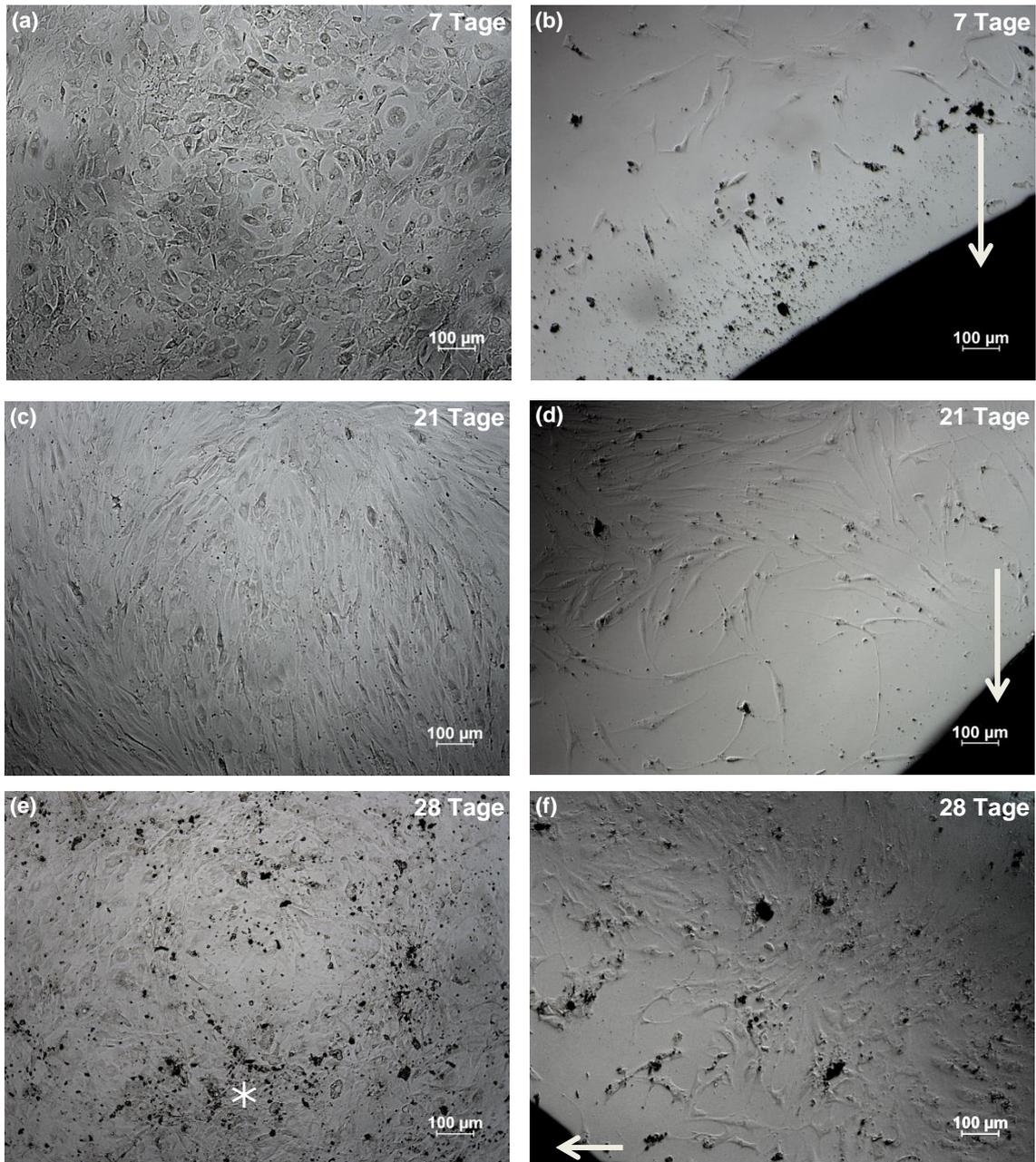


Abb. 29: Lebendzellbeobachtung beim Test ohne Material nach 28 Tagen.

### 3.3.5 CPC

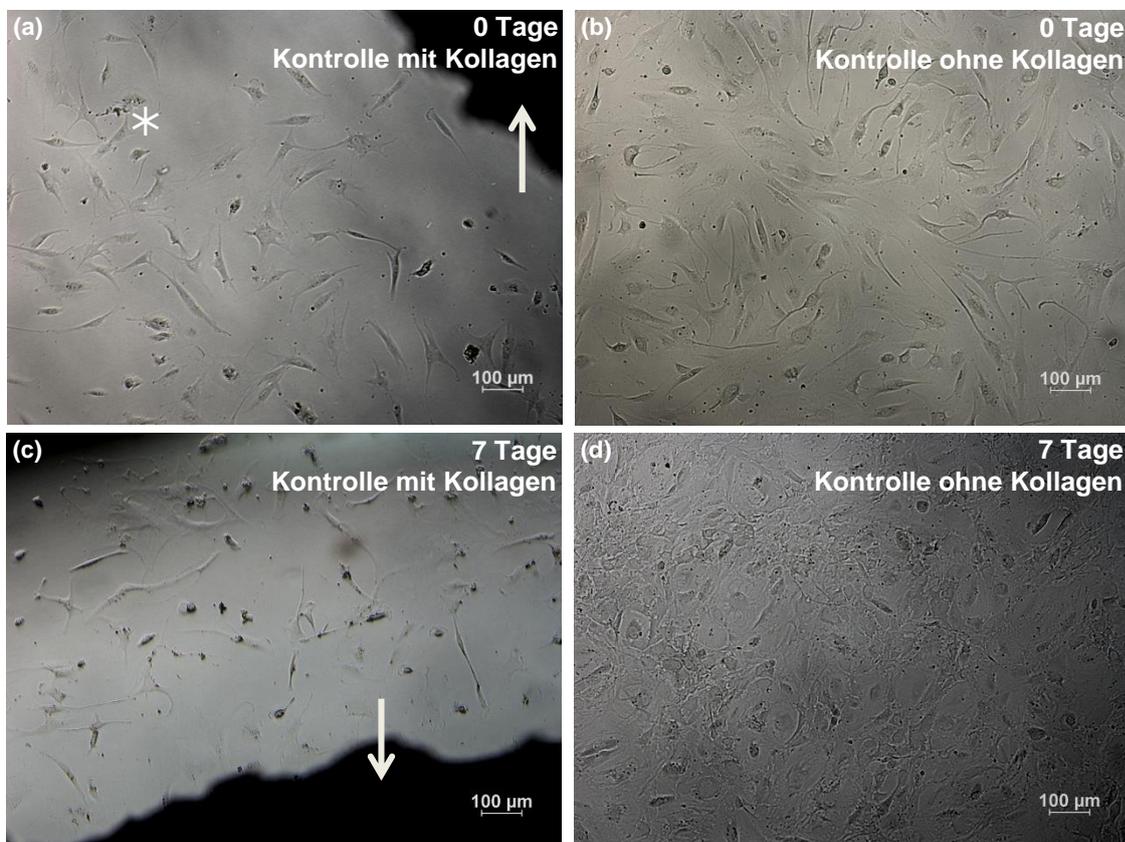
Zum Zeitpunkt 0 Tage ließen sich keine Unterschiede in der Lebendzellbeobachtung feststellen. Ab dem Zeitpunkt 7 Tage migrierten die Zellen vom Material weg bzw. wuchsen nicht bis an das Material heran und bildeten nur einen spärlichen Zellrasen aus. Außerdem fielen in der Umgebung des Materials kleine Partikel auf, die vom Material abgegeben worden waren. Der schon nach 7 Tagen bestehende Unterschied zeigte sich auch zu den späteren Zeitpunkten 14, 21 und 28 Tage in gleicher Weise: der Zellrasen blieb weniger dicht. Außerdem nahm mit der Zeit die Zahl der Osteoblasten zu, erkennbar an einer vermehrten Bildung intrazellulärer Granula und extrazellulärer Knochenmatrix. Zwischen den Pharmaka, die alle unter dem Material-einfluss standen, lassen sich keine Unterschiede erkennen (Abb. 30).



**Abb. 30: Materialeinfluss des CPC in der Lebendzellbeobachtung. (a) Kontrolle ohne Material zum Zeitpunkt 7 Tage. (b) CPC zum Zeitpunkt 7 Tage. (c) Kontrolle nach 21 Tagen im Phasenkontrast. (d) CPC nach 21 Tagen. (e) Kontrolle nach 28 Tagen. (f) CPC nach 28 Tagen. Das Material ist mit einem Pfeil markiert, Bereiche mit vermehrter Knochenmatrix mit einem Stern.**

### 3.3.6 Kollagen-Tapes

Nach Zugabe von Kollagen-Tapes war bereits nach 0 Tagen (also 48 Stunden nach dem Aussäen) ein Unterschied im Vergleich zur Kontrolle zu sehen. Der Zellrasen unter Einfluss von Kollagen war zwar etwas weniger dicht, allerdings waren hier im Gegensatz zur Kontrolle bereits erste osteogene Granula zu erkennen. Zu den Zeitpunkten 7, 14, 21 und 28 Tage blieb der Zellrasen weniger dicht. Die osteogenen Granula nahmen im Verlauf sowohl bei der Kontrolle als auch bei Zellen unter Materialeinfluss zu. Nach 0 und 7 Tagen waren zwischen den einzelnen Pharmaka und der Kontrolle mit Kollagen keine Unterschiede zu erkennen. Zum Zeitpunkt 21 Tage waren jedoch bei Nikotin und BDNF mehr osteogene Granula zu sehen als in der Kontrolle und bei ACh. Außerdem wuchsen die Zellen im Unterschied zu CPC zu jedem Zeitpunkt dicht bis an das Material heran (Abb. 31 und Abb. 32).



**Abb. 31: Materialeinfluss der Kollagen-Tapes in der Lebendzellbeobachtung. (a) Kontrolle mit - Kollagen nach 0 Tagen. (b) Kontrolle ohne Material nach 0 Tagen. (c) Kontrolle mit Material nach 7 Tagen. (d) Kontrolle ohne Material nach 7 Tagen. Pfeile bezeichnen jeweils das Material, Sterne Bereiche mit vermehrten osteogenen Granula.**

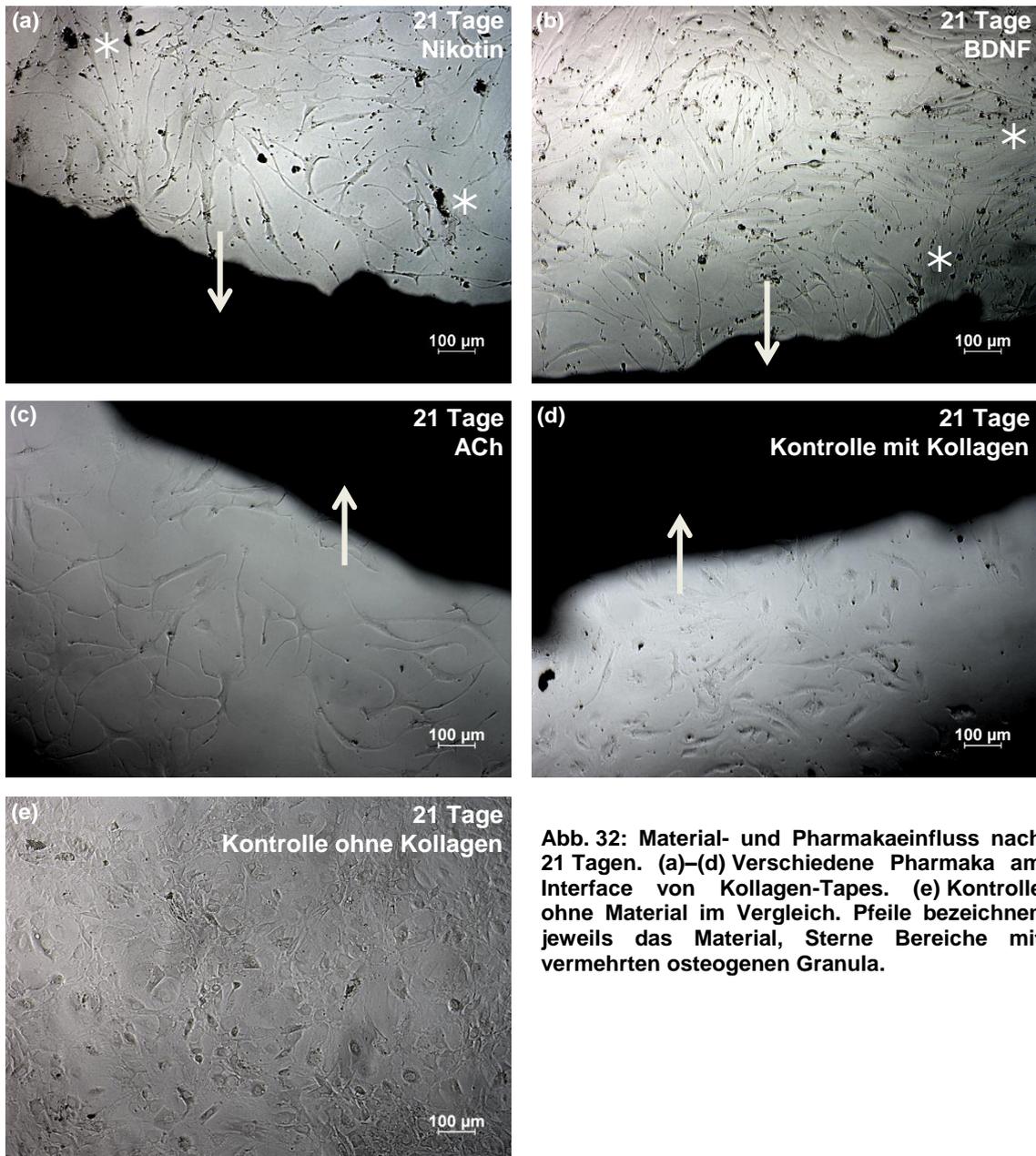


Abb. 32: Material- und Pharmakaeinfluss nach 21 Tagen. (a)–(d) Verschiedene Pharmaka am Interface von Kollagen-Tapes. (e) Kontrolle ohne Material im Vergleich. Pfeile bezeichnen jeweils das Material, Sterne Bereiche mit vermehrten osteogenen Granula.

### 3.3.7 hMSC einer osteoporotischen Spenderin

Der Zellrasen war sowohl bei Kollagen als auch bei CPC nach 7 Tagen weniger dicht als in Zellpopulationen von jungen, gesunden Spendern. Die Materialeffekte, die bei jungen, gesunden Spendern beobachtet wurden, waren auch hier sichtbar. Unter Einfluss von CPC wuchsen die Zellen nicht so dicht an das Material heran. Nach 21 Tagen war der Zellrasen dichter, allerdings waren weniger osteogene Granula zu erkennen als bei jungen, gesunden Spendern. Zwischen den einzelnen Pharmaka zeigten sich in der Lebendzellbeobachtung keine Unterschiede (Abb. 33).

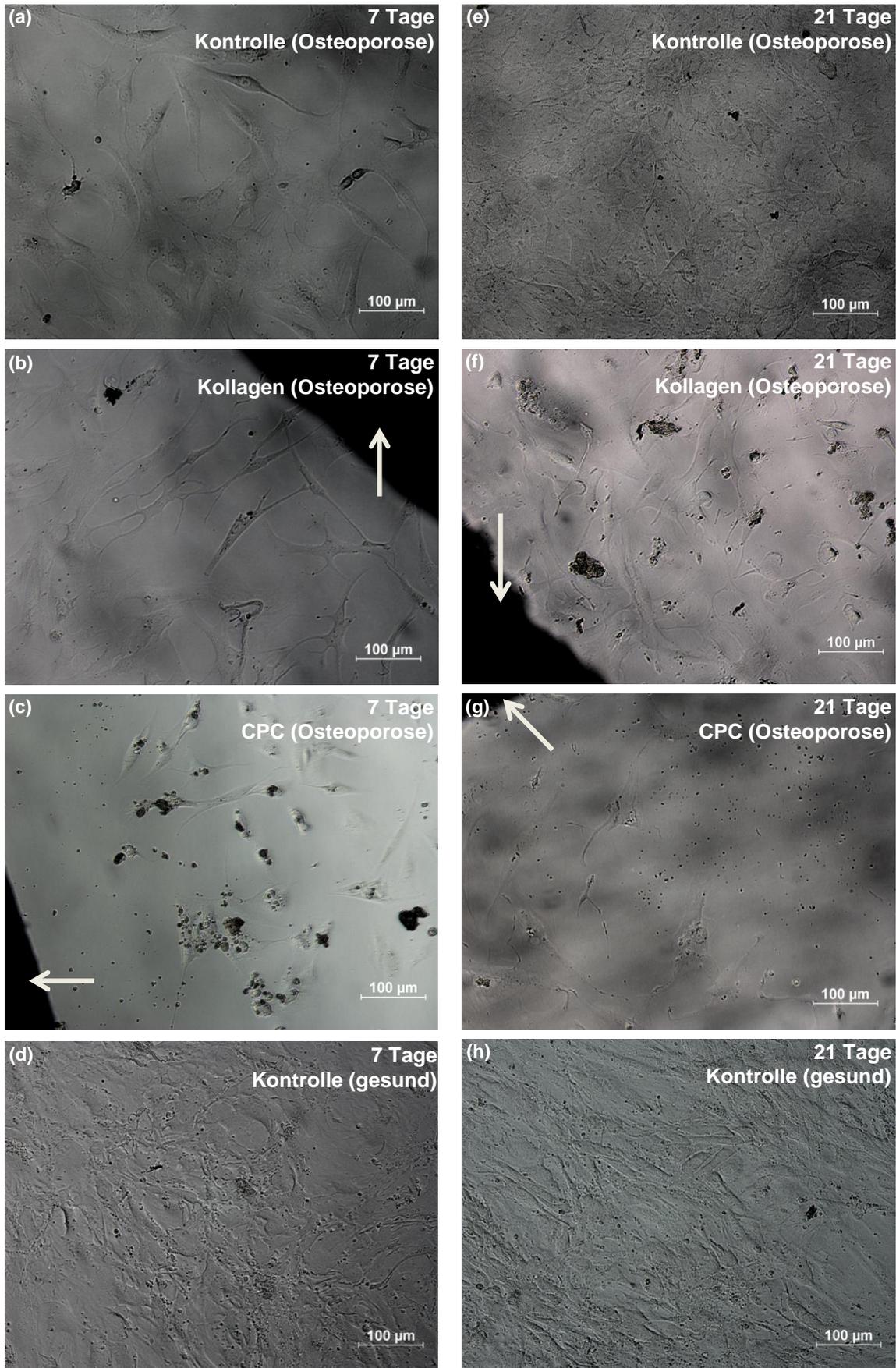


Abb. 33: Lebendzellbeobachtung der Zellen der osteoporotischen Spenderin. (a)–(c) Osteoporotische Spenderin mit und ohne Materialeinfluss (7 Tage). (d) Kontrolle eines gesunden Spenders (7 Tage). (e)–(g) Osteoporotische Spenderin mit und ohne Materialeinfluss (21 Tage). (h) Kontrolle eines gesunden Spenders (21 Tage). Pfeile bezeichnen jeweils das Material.

### 3.4 Differenzierungsverhalten

Verglichen wurde das Differenzierungsverhalten der Zellen unter Materialeinfluss mit dem ohne Materialeinfluss sowie die Zellen unter Pharmaka und Materialeinfluss mit solchen, die nur unter dem Einfluss des Knochenersatzmaterials standen. Außerdem wurde das Verhalten der Zellen einer osteoporotischen Spenderin sowie einer älteren, knochengesunden Spenderin mit dem der Zellen von jungen, gesunden Spendern mit und ohne Material und Pharmaka verglichen.

#### 3.4.1 CPC ohne Pharmaka

Auf das Differenzierungsverhalten der Zellen übte CPC im Vergleich zur Kontrolle zu den Zeitpunkten 0 und 7 Tage noch keinen signifikanten Effekt aus, allerdings war ein negativer Effekt zum Zeitpunkt 7 Tage schon erkennbar. Zu den späteren Zeitpunkten 14 Tage ( $p = 0,002$ ), 21 Tage ( $p = 0,000005$ ) und 28 Tage ( $p = 0,000018$ ) hatte CPC einen mit fortschreitender Versuchsdauer zunehmenden, signifikant negativen Effekt im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 34). Der Stichprobenumfang betrug jeweils  $n = 3$ .

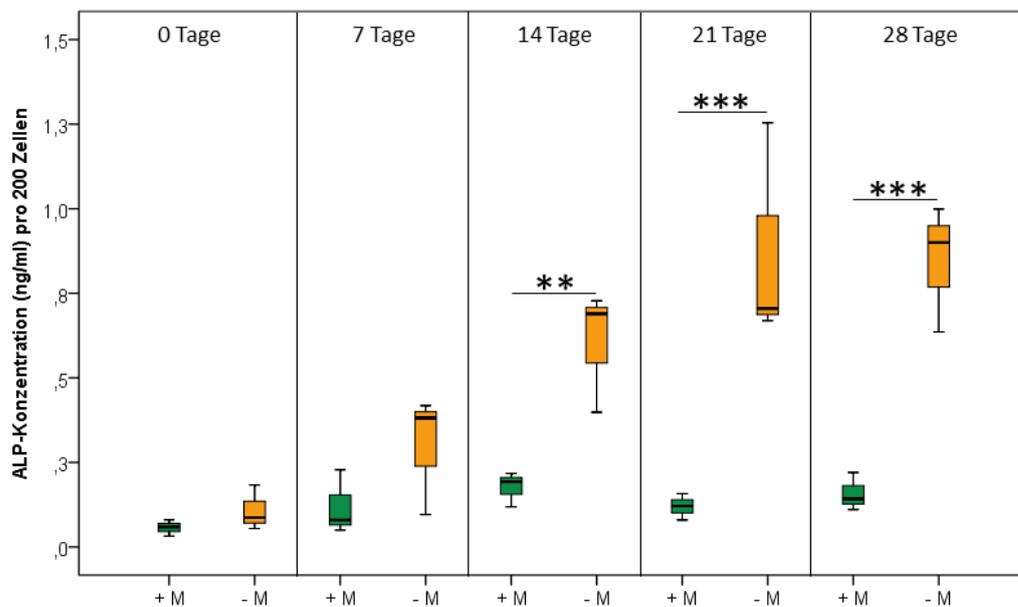


Abb. 34: ALP-Konzentration unter Einfluss von CPC. Vergleich der Kontrollen ohne CPC (- M) und mit CPC (+ M).  $n = 3$ .

Auch auf die Proliferationseigenschaften von hMSC wirkte sich CPC negativ aus. Während zum Zeitpunkt 0 Tage noch kein Effekt erkennbar war, zeigte sich ab dem Zeitpunkt 7 Tage ein signifikant negativer Effekt ( $p = 0,031$ ), der sich zum Zeitpunkt 14 Tage nochmals verstärkte ( $p = 0,003$ ) und dann bis zum Ende der Beobachtungszeiträume konstant negativ blieb. Zum Zeitpunkt 21 Tage ( $p = 0,002$ ) war der negative Effekt hoch signifikant, bei 28 Tagen ( $p = 0,001$ ) höchst signifikant (Abb. 35). Der Stichprobenumfang betrug jeweils  $n = 3$ .

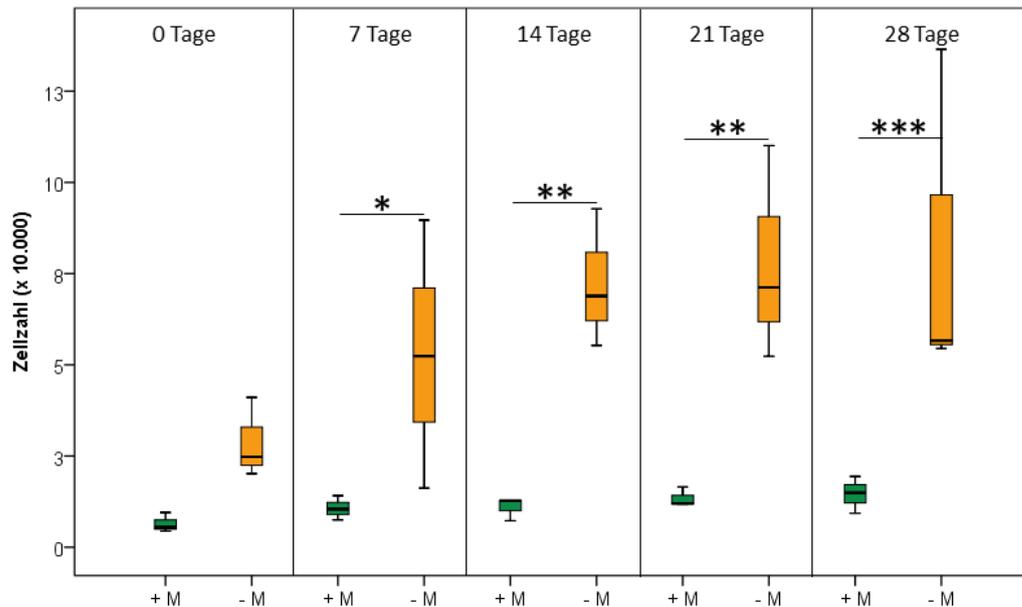


Abb. 35: Zellzahl unter Einfluss von CPC. Vergleich der Kontrollen ohne CPC (- M) und mit CPC (+ M).  $n = 3$ .

### 3.4.2 Kollagen-Tapes ohne Pharmaka

Kollagen-Tapes hatten zu den Zeitpunkten 0, 7, 14 und 21 Tage positive Effekte auf das Differenzierungsverhalten, die sich zum Zeitpunkt 28 Tage wieder abschwächten. Im Vergleich zur Kontrolle war die ALP-Konzentration unter Einfluss von Kollagen zu den Zeitpunkten bis 21 Tage etwa dreimal so hoch wie in der Kontrolle ohne Material. Zum Zeitpunkt 21 Tage war der Effekt hoch signifikant ( $p = 0,008$ ) und die ALP-Konzentration unter Kollageneinfluss insgesamt am höchsten. (Abb. 36). Der Stichprobenumfang betrug jeweils  $n = 3$ .

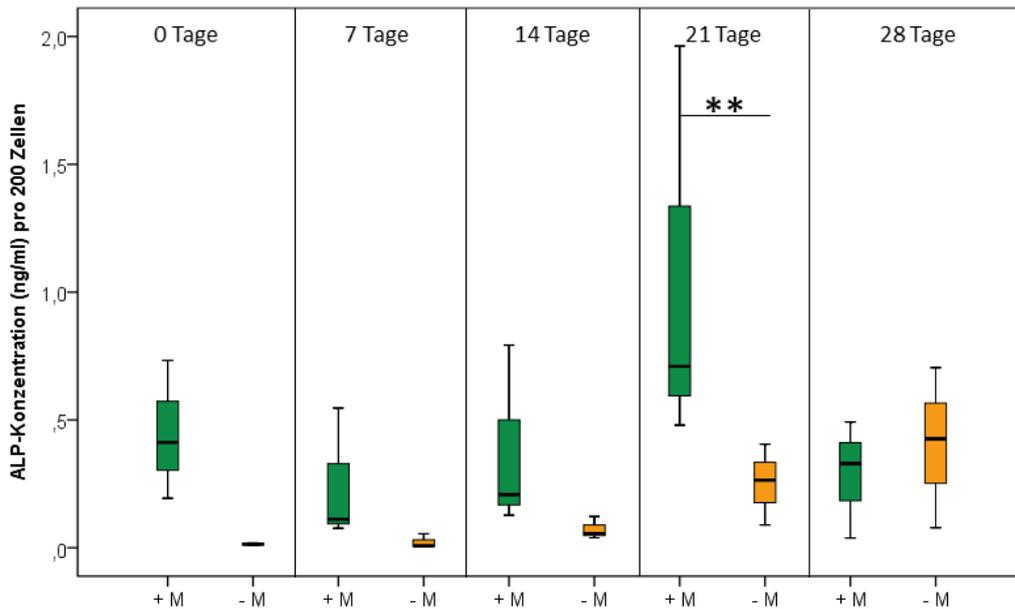


Abb. 36: ALP-Konzentration unter Einfluss von Kollagen-Tapes. Vergleich der Kontrollen ohne Kollagen-Tapes (- M) und mit Kollagen-Tapes (+ M).  $n = 3$ .

Die Zellzahlen lagen unter Einfluss von Kollagen-Tapes deutlich niedriger als bei der Kontrolle. Zum Zeitpunkt 0 Tage gab es noch keinen signifikanten, zum Zeitpunkt 7 Tage schon einen tendenziellen Unterschied ( $p = 0,071$ ). Mit der Versuchsdauer wurde der Unterschied immer größer. Zum letzten Beobachtungszeitpunkt nach 28 Tagen waren in der Kontrolle ohne Material etwa zehnmal mehr Zellen gewachsen als im Vergleich mit Kollagen-Tapes. Die Signifikanzniveaus betragen nach 14 Tagen  $p = 0,001$ , nach 21 Tagen und 28 Tagen jeweils  $p < 0,0001$  (Abb. 37). Der Stichprobenumfang betrug jeweils  $n = 3$ .

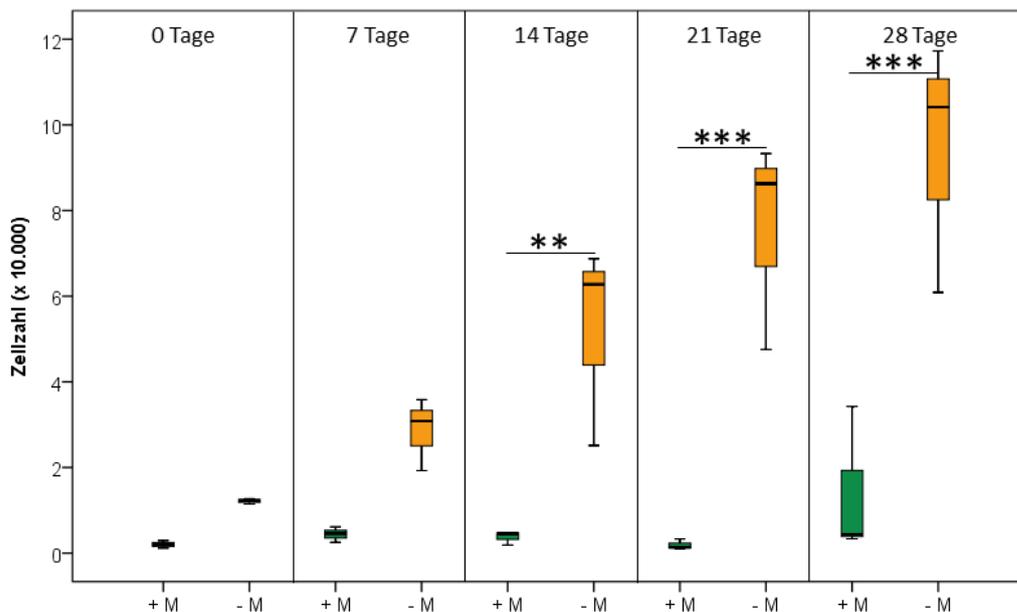
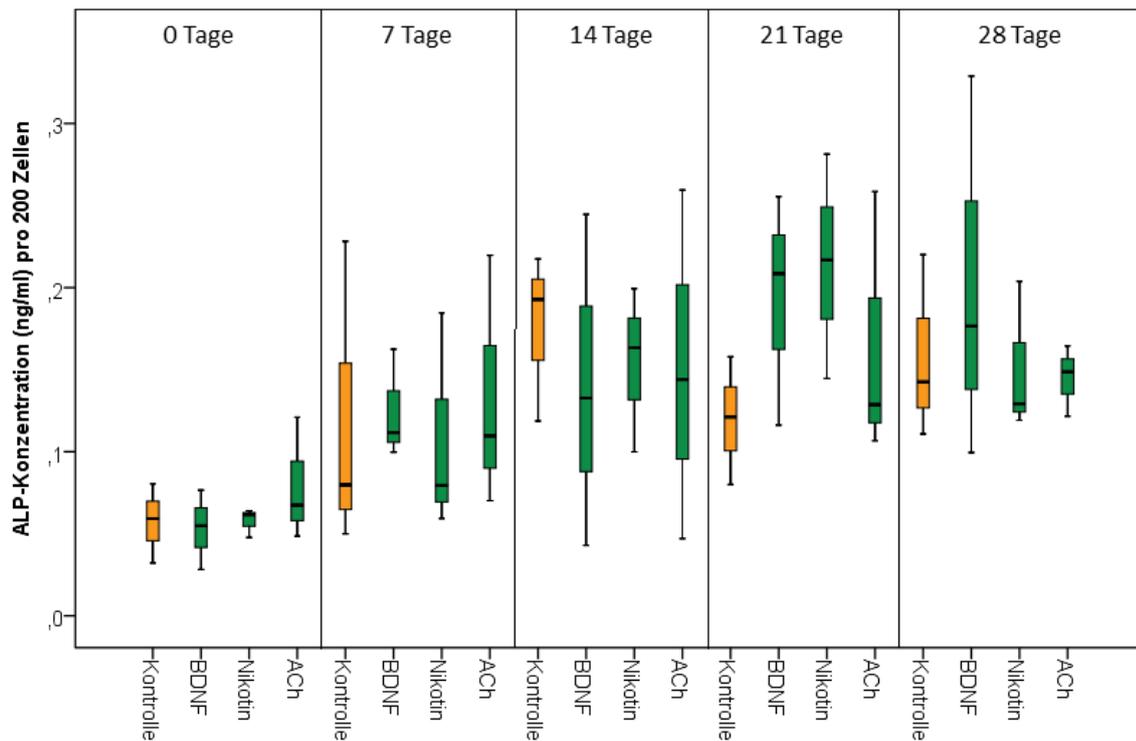


Abb. 37: Zellzahl unter Einfluss von Kollagen-Tapes. Vergleich der Kontrollen ohne Kollagen-Tapes (- M) und mit Kollagen-Tapes (+ M).  $n = 3$ .

### 3.4.3 CPC mit Pharmaka

Nach Zugabe von CPC zusammen mit den Pharmaka (Nikotin, BDNF und ACh) konnte zu den Zeitpunkten 0, 7 und 14 Tage kein wesentlicher Unterschied in der Differenzierungsfähigkeit festgestellt werden. Zum Zeitpunkt 21 Tage war die ALP-Konzentration bei Nikotin ( $p = 0,29$ ) und BDNF ( $p = 0,41$ ) höher, allerdings war dieser Unterschied nicht signifikant. Der Effekt der Pharmaka wurde zum Zeitpunkt 28 Tage wieder schwächer (Abb. 38). Der Stichprobenumfang betrug jeweils  $n = 3$ .



**Abb. 38:** Einfluss von BDNF, ACh und Nikotin am Interface von CPC auf die ALP-Konzentration pro 200 Zellen als Marker für die Differenzierungsfähigkeit. Nach 21 Tagen lagen die ALP-Werte bei BDNF und Nikotin höher als bei der Kontrolle.  $n = 3$ .

### 3.4.4 Kollagen-Tapes mit Pharmaka

Weder bei ACh noch bei BDNF oder Nikotin kam es zu den Zeitpunkten 0, 7, 14 und 21 Tage zu einer Veränderung der ALP-Konzentration, also der Differenzierungsfähigkeit der Zellen. Zum Zeitpunkt 28 Tage löste BDNF ( $p = 0,023$ ) einen signifikant positiven Effekt aus. Die ALP-Konzentration unter Einfluss von Nikotin war nach 28 Tagen zwar höher als in der Kontrolle, allerdings war der Unterschied nicht signifikant ( $p = 0,19$ ). ACh bewirkte auch nach 28 Tagen keine Veränderung in der Differenzierungsfähigkeit (Abb. 39). Der Stichprobenumfang betrug jeweils  $n = 3$ .

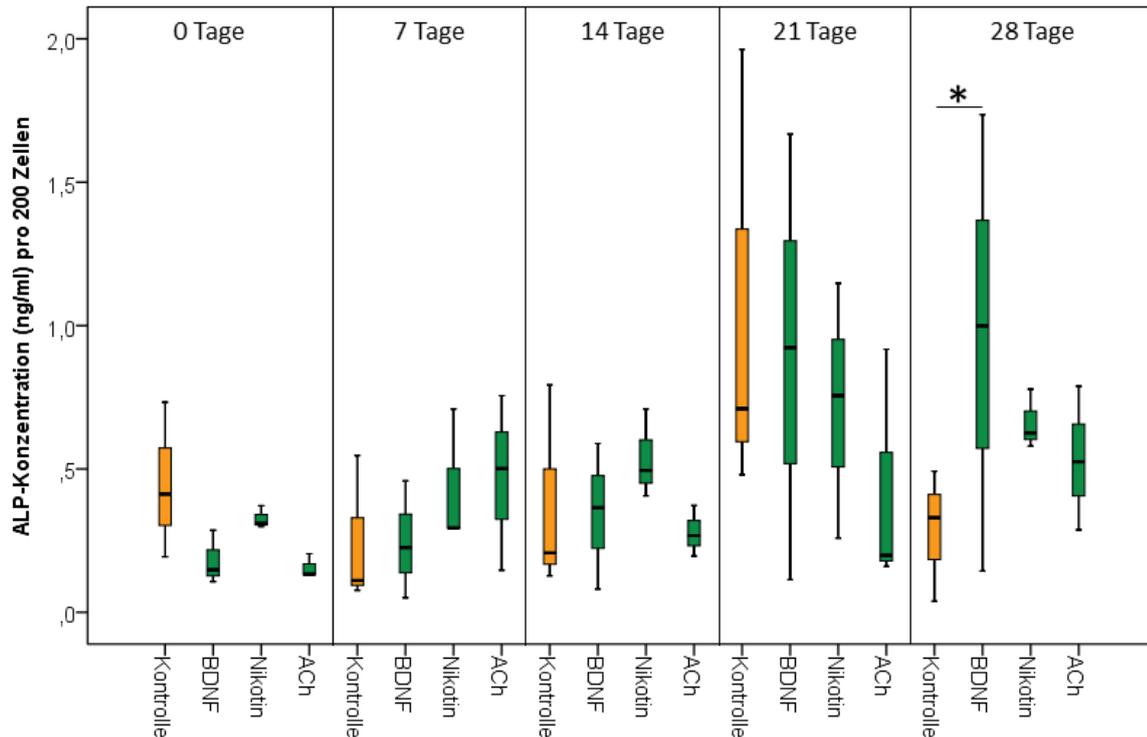


Abb. 39: Einfluss von BDNF, ACh und Nikotin am Interface von Kollagen-Tapes auf die ALP-Konzentration pro 200 Zellen als Marker für die Differenzierungsfähigkeit. Nach 28 Tagen trat bei BDNF eine signifikante Erhöhung der ALP-Konzentration gegenüber der Kontrolle auf.  $n = 3$ .

### 3.4.5 Osteoporotische und ältere Spenderin

Die Versuche mit Zellen einer osteoporotischen und einer älteren Spenderin dienten bei CPC und Kollagen-Tapes als Pilotversuch, um einen generellen Einblick zu bekommen, ob Unterschiede vorliegen könnten oder nicht. Der Stichprobenumfang betrug  $n = 1$ .

#### 3.4.5.1 CPC

Ohne Zugabe von CPC war die ALP-Konzentration bei den hMSC des jungen, gesunden Spenders deutlich höher als bei Zellen der älteren und der osteoporotischen Spenderin. Die ALP-Konzentrationen bei Zellen der älteren Spenderin unterschieden sich nur wenig von denen bei Zellen der osteoporotischen Spenderin. Unter Einfluss von CPC war dieser Unterschied nicht mehr so groß. Die ALP-Konzentration bei den Zellen des jungen, gesunden Spenders war nur wenig höher als bei den Zellen der älteren und der osteoporotischen Spenderin.

Die Zellzahl war absteigend von gesunden Spendern über die ältere zur osteoporotischen Spenderin. Unter Zugabe von CPC war dieser Abfall deutlich weniger stark. Hier lag außerdem die Zellzahl bei der osteoporotischen Spenderin höher als bei der älteren gesunden Spenderin (Abb. 40). Der Stichprobenumfang betrug  $n = 1$ .

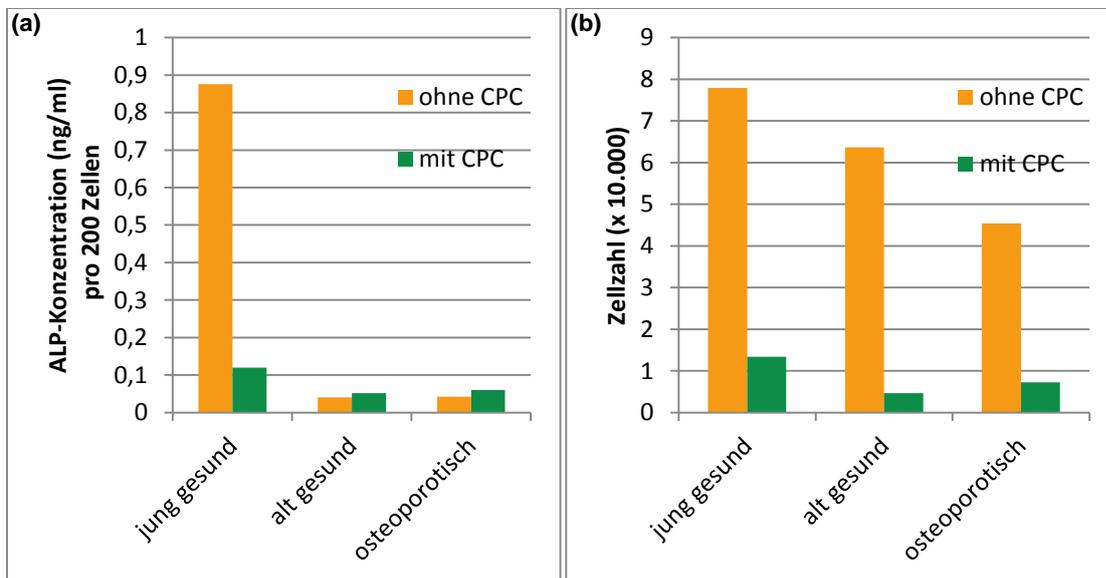


Abb. 40: Osteoporose und CPC. Vergleich der ALP-Konzentration (a) und der Zellzahl (b) am Interface von CPC nach 21 Tagen bei Zellen von jungen, gesunden Spendern, einer älteren und einer osteoporotischen Spenderin.  $n = 1$ .

### 3.4.5.2 Kollagen-Tapes

Ohne Materialeinfluss war die ALP-Konzentration bei den Zellen der jungen, gesunden Spender etwa doppelt bis dreimal so hoch wie im osteoporotischen Zellmodell. Zwischen den Zellen der osteoporotischen und der älteren Spenderin bestand nur ein geringer Unterschied. Nach Zugabe von Kollagen-Tapes war die ALP-Konzentration in allen drei Gruppen höher als in der Kontrolle ohne Kollagen-Einfluss. Im osteoporotischen Zellmodell war diese Differenz am größten. Die Zellzahl fiel von jungen, gesunden Spendern über die ältere bis hin zur osteoporotischen Spenderin ab. Unter Kollagen-Einfluss war sie bei der älteren Spenderin und im osteoporotischen Zellmodell höher als bei jungen, gesunden Spendern (Abb. 41). Der Stichprobenumfang betrug  $n = 1$ .

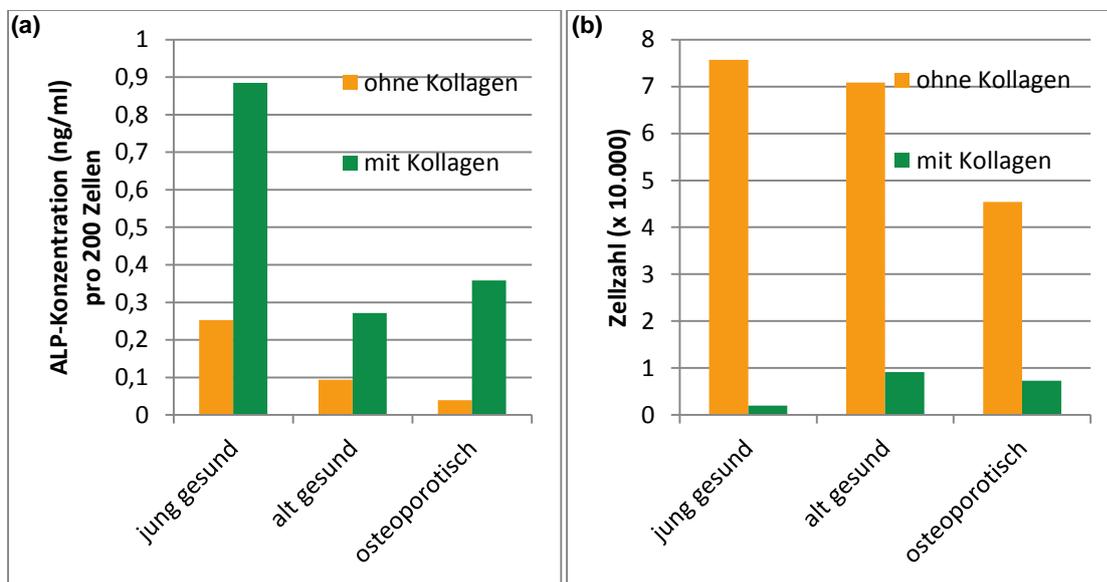


Abb. 41: Osteoporose und Kollagen-Tapes. Vergleich der ALP-Konzentration (a) und der Zellzahl (b) am Interface von Kollagen-Tapes zum Zeitpunkt 21 Tage bei Zellen junger, gesunder Spender, einer älteren und einer osteoporotischen Spenderin.  $n = 1$ .

## **4 Diskussion**

### **4.1 Zellsystem und funktioneller In-vitro-ALP-Assay**

Als Zellsystem für die vorliegende Studie wurden hMSC aus Bohrmehl verwendet. Die Zellen wurden während der Marknagel-Osteosynthese nach Frakturen aus der Tibia oder des Femurs gewonnen. Dieses Verfahren ist der Goldstandard für die Versorgung diaphysärer Frakturen von Tibia und Femur (Pfister 2010). Das durch das Verfahren der aufgebohrten intramedullären Nagelung gewonnene Bohrmehl wurde vom Bohrkopf entfernt und kultiviert. Die Wärmeentwicklung während des Bohrvorgangs schädigte den Zellen offensichtlich nicht. Im Vorfeld wurde nachgewiesen, dass das Bohrmehl neben vielen anderen Zelltypen auch hMSC enthält (Wenisch et al. 2005; Trinkaus et al. 2005). hMSC aus Bohrmehl können sich nicht nur in chondrogene, adipogene und osteogene Zellen differenzieren, sondern auch in frühe neuronähnliche Vorläuferzellen (Wenisch et al. 2006). hMSC wurden sowohl über ihre Morphologie als auch über ihre Oberflächeneigenschaften charakterisiert und als mesenchymale Stromazellen identifiziert (Hung et al. 2002).

Während hMSC bisher aus verschiedenen anderen Quellen, z.B. aus Fettgewebe oder aus dem Knochenmark gewonnen werden mussten (Adegani et al. 2013; Pittenger 1999), steht mit der Gewinnung von hMSC aus Bohrmehl als einem Abfallprodukt, welches ohnehin bei aufgebohrten Marknagel-Osteosynthesen entsteht, eine alternative Quelle zur Verfügung. Die meisten anderen Verfahren zur Gewinnung dieses Zelltyps erfordern einen zusätzlichen operativen Eingriff beim Patienten, z.B. eine Stanze aus dem Beckenkamm, Brustbein oder Oberschenkelknochen mit Knochenmarksaspiration oder die Entnahme von Fettgewebe. Somit bietet die hier etablierte Vorgehensweise einen deutlichen Vorteil gegenüber den anderen, bisher genutzten Verfahren.

Allerdings muss beachtet werden, dass die Spender des Bohrmehls einen Knochendefekt bzw. eine Fraktur aufwiesen. Dies könnte das Zellwachstum und die Zellpopulation beeinflussen. Um solche Effekte zu minimieren, wurden im vorliegenden Versuch Zellen aus dem Bohrmehl verschiedener Spender verwendet. Weiterhin wurden andere systemische Knochenerkrankungen wie arterielle Hypertonie, Malignome, chronischer Alkoholabusus oder Diabetes bei den Spendern ausgeschlossen, da bekannt ist, dass beispielsweise Diabetes einen Anstieg des Cathepsin S im Serum bewirkt (Liu et al. 2006), was zu einer Veränderung der Differenzierungsfähigkeit sowie der Knochenstruktur führen kann (Rauner et al. 2014). Ebenfalls kann sich chronischer Alkoholkonsum negativ auf die Knochendichte (Kim et al. 2003) und die Proliferation, positiv hingegen auf die Differenzierung von osteoblasten-ähnlichen Zellen (Osteosarkom-

Zellen) auswirken (Vignesh et al. 2006). Vor allem wurde Osteoporose bei den Versuchen mit gesunden Spendern ausgeschlossen; für die Versuche mit Zellen osteoporotischer Spender wurde eigens eine Spenderin mit Osteoporose rekrutiert. Auch bei der Auswahl dieser Spenderin wurde darauf geachtet, dass sie keine weiteren knochenrelevanten Systemerkrankungen hatte. Prinzipiell kann nicht ausgeschlossen werden, dass Bohrmehl von Spendern mit bisher unerkannten Erkrankungen verwendet wurde.

Wegen der Nutzung von humanem Bohrmehl verschiedener Patienten und damit von Zellen unterschiedlicher Spender unterliegt der gewählte Versuchsaufbau einer gewissen Variabilität im Vergleich zur Nutzung einer Zelllinie oder von Zellen aus Inzuchtstämmen. Zu diesen variablen Faktoren gehören insbesondere Alter und Geschlecht (Muschler et al. 2001). Diese beiden Faktoren wurden im vorliegenden Versuch beachtet; es wurde nur Bohrmehl von männlichen Spendern im Alter zwischen 24 und 52 Jahren benutzt. Die große Altersspanne ist v. a. durch die Verfügbarkeit der Spender bedingt. Das bietet einerseits die Möglichkeit, die Ergebnisse auch für eine breitere Altersspanne zu interpretieren, andererseits können aber auch hier bisher unbekannte Faktoren zu stärkeren interindividuellen Schwankungen und damit zu einer breiteren Streuung der Ergebnisse führen. Eine gewisse Variabilität wurde in Kauf genommen, um die Interpretation der Ergebnisse auf eine größere Population beziehen zu können. Durch die Verwendung von Zellen mehrerer Spender und die statistische Auswertung wurde versucht, den Einfluss unbekannter Faktoren zu mitteln.

Bei der Differenzierung von hMSC zu aktiven Osteoblasten ist zu beachten, dass Proliferation und Differenzierung im Allgemeinen zwei gegenläufige Prozesse sind. Mit steigendem Grad der Differenzierung hin zu Osteoblasten sinkt die Fähigkeit der Zellen, sich weiter zu teilen und damit zu proliferieren. Proliferationsmarker wie Cyclin D1 werden vermindert, Differenzierungsmarker wie ALP und Kollagen Typ 1 hingegen verstärkt exprimiert. Die Mechanismen werden über die Proteine Dlx5 und Msx2 reguliert (Ryoo et al. 2006). Dlx5 führt zu einer gesteigerten Expression osteoblastärer Gene, Msx2 hemmt hingegen die Genexpression hin zu einer Differenzierung und verstärkt die Proliferation der Zelle.

Daher galt es bei den hier beschriebenen Versuchen darauf zu achten, genügend Zellen auszusäen, damit die Zellen adhären und anfangs proliferieren, sich später aber auch differenzieren können. Dies ist ein Prozess, der nicht bei allen Zellen gleichzeitig abläuft. Einige Zellen proliferieren, andere differenzieren sich, je nach äußeren Bedingungen und Einflussfaktoren (Atkins et al. 2003; Walsh et al. 2000). Nur in Bezug auf das ganze Zellsystem kann festgestellt werden, ob es gerade eher zur Differenzierung oder zur Proliferation neigt.

Die ALP ist ein Enzym, das im alkalischen Milieu Substrate dephosphorylieren kann. Sie kann auf verschiedene Arten bestimmt werden. Im vorliegenden Experiment wurde die ALP-Konzentration kolorimetrisch bestimmt. Dazu wurde das Substrat pNPP dephosphoryliert, was in einem Farbumschlag messbar ist. Diese Methode ist sehr sensitiv, aber wenig spezifisch, da das pNPP auch von einer ALP aus anderen Quellen wie beispielsweise Leberzellen dephosphoryliert würde, weil sowohl die ALP im Knochen als auch die in der Leber vom gleichen Genabschnitt kodiert wird (Panigrahi et al. 1994). Im vorliegenden Versuch war die Differenzierung zu Osteoblasten aber die einzig mögliche ALP-Quelle. Die ALP wird experimentell als Marker für den Grad der Differenzierung gesehen (Halvorsen et al. 2001; Pittenger 1999; Wlodarski und Reddi 1986).

Neben der kolorimetrischen Messung kann die ALP-Konzentration auch über 3,6-Fluorescein-Diphosphat bestimmt werden. Mit dieser Methode kann man etwa fünfzigfach geringere ALP-Konzentrationen nachweisen als mit der kolorimetrischen Methode (Huang et al. 1992), was Bestimmungen bis in attomolare Bereiche erlaubt. Für die hier nötigen Messungen im nanomolaren Bereich war jedoch die kolorimetrische Methode ausreichend. Die Messung über Bestimmung von 3,6-Fluorescein-Diphosphat wäre etwa 50% teurer gewesen, ohne einen Mehrnutzen zu bieten.

Es ist möglich, sowohl die ALP-Massenkonzentration als auch die ALP-Aktivität einer Probe zu messen. Da die beiden Werte aber linear miteinander korrelieren, sind beide Messmethoden gleichwertig (Avbersek-Luznik et al. 2007). In der klinischen Praxis dient die ALP-Konzentration im Blut als Marker für den Knochenstoffwechsel (Epstein 1988) zur Detektion von Knochenerkrankungen mit vermehrtem Knochenstoffwechsel wie Osteoporose, Akromegalie oder dem Hyperparathyreoidismus (Delmas 1991; Duda et al. 1988).

Neben der ALP gibt es noch einige weitere Marker zur Bestimmung des Differenzierungsgrads eines Zellsystems zu Osteoblasten, darunter v.a. Osteocalcin, Osteopontin, Bone sialoprotein und Kollagen Typ 1 (Marom et al. 2005; Aubin 1998; Bruder et al. 1997). Für verschiedene Stadien der Entwicklung von der mesenchymalen Stammzelle hin zum aktiven Osteoblasten werden unterschiedliche Marker exprimiert (Javed et al. 2010): Zunächst bilden sich Osteoprogenitoren, die durch verschiedene Oberflächenantigene wie Stromal cell-derived factor 1 (SDF1, auch als CXCL12 bekannt) und Activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM) charakterisiert sind (Shahnazari et al. 2013; Arai et al. 2002) und die Proliferation und Festlegung in Richtung der osteoblastären Linie anzeigen. Den nächsten Schritt in der Entwicklung stellen Prä-Osteoblasten dar, die noch proliferieren können und sich weiter zu adulten Osteoblasten differenzieren. Als Marker der Prä-Osteoblasten gelten die ALP, Kollagen

Typ 1 und Bone sialoprotein 2 (Ilmer et al. 2009; Kulterer et al. 2007; Jikko et al. 1999). Osteonectin und Osteocalcin zeigen die weitere Entwicklung zu adulten Osteoblasten an (Kulterer et al. 2007; Aubin 1998). Osteopontin wird sowohl in der frühen als auch in der reifen Entwicklungsstufe exprimiert (Kulterer et al. 2007; Aubin 2001).

Einschränkend gilt jedoch, dass die meisten der genannten Marker nicht spezifisch für den Knochen sind und außerdem in verschiedenen Entwicklungsstufen innerhalb der osteoblastären Differenzierung produziert und exprimiert werden. Insgesamt stellt die ALP den am besten untersuchten Marker dar, ist sensitiv genug, um die Differenzierung anzuzeigen, und dabei relativ einfach zu messen.

Im vorliegenden Versuch wurde die ALP-Konzentration auf einen Wert pro 200 Zellen umgerechnet, um eine von der Proliferation und der Zellzahl unabhängige Vergleichsgröße zu erhalten. Neben dem Bezug der ALP-Konzentration auf die Zellzahl besteht auch die Möglichkeit, die ALP-Konzentration bzw. die ALP-Aktivität auf die Proteinmenge einer Probe umzurechnen. Dies ist in der Literatur das regelmäßige Vorgehen (Fei et al. 2012; Zhao et al. 2010; Wang et al. 2008; Hempel et al. 2004). Allerdings kann, wie Bernhardt et al. beschreiben, der Proteingehalt als Bezugsgröße problematisch sein, da bei Applikation von Knochenersatzmaterial, insbesondere von Kollagen, zum Zellsystem auf dem Knochenersatzmaterial Proteine akkumulieren. Durch diese falsch hohen Proteinwerte entsteht eine falsche Bezugsgröße (Bernhardt et al. 2008). Vor diesem Hintergrund wurde im vorliegenden Experiment die Zellzahl (ermittelt über den DNA-Gehalt mittels PicoGreen-Assay) als Bezugsgröße gewählt.

#### **4.2 Wirkungen der Knochenersatzmaterialien auf die Zellpopulation**

Vor Beginn der Versuche wurde die einzusetzende Zellzahl festgelegt. In Anlehnung an Zhao et al. und Wang et al., die ihre Versuche mit einer Zellzahl von 30.000 bzw. 50.000 begannen (Zhao et al. 2010; Wang et al. 2008), wurden bei den hier beschriebenen Versuchen mit CPC 40.000 Zellen pro Well ausgesät, bei Kollagen, ebenfalls in Anlehnung an andere Publikationen (Bernhardt et al. 2008: 15.000 Zellen), 20.000 Zellen. Die unterschiedliche Zellzahl zu Beginn der Versuche, ist der Tatsache geschuldet, dass die CPC-Plättchen im Medium einen sauren pH-Wert erzeugen (Khashaba et al. 2010), der für die Zellen schädlich sein kann und die Zellteilung hemmt, wie bei neuronalen Zellen gezeigt werden konnte (Bear und Schneider 1977). Als Maßnahme zur pH-Regulation wurde daher bei CPC vor Aussaat der Zellen mehrfach das Medium gewechselt. Die unterschiedliche Zellzahl zu Beginn der Versuche bedingt, dass die Ergebnisse für CPC nicht ohne weiteres mit denen für Kollagen-Tapes verglichen werden können und die einzelnen Knochenersatzmaterialien jeweils für sich betrachtet werden müssen.

#### 4.2.1 CPC

CPC hatte sowohl in der Lebendzellbeobachtung als auch bei der Messung der ALP-Konzentration einen überwiegend negativen Effekt auf die Zellen im Vergleich zu Zellen ohne Materialeinfluss. In der Lebendzellbeobachtung wurde deutlich, dass die Zellen das Material mieden und ein weitgehend zellfreier Saum um das Material entstand. Dieser „Hemmhof“ könnte dadurch zustande gekommen sein, dass sich Partikel aus den CPC-Plättchen lösten und das Material säumten. Die ALP-Messung bestätigte diese Beobachtung, dass sich nach 14 bzw. 21 und 28 Tagen unter Materialeinfluss deutlich weniger hMSC zu Osteoblasten differenziert hatten als bei der Kontrolle ohne Materialeinfluss. Auch auf die Proliferation wirkte CPC negativ, da schon ab dem Zeitpunkt 7 Tage die Zellzahl geringer war als in der Kontrolle ohne Materialeinfluss. Ab dem Zeitpunkt 14 Tage lag die Zellzahl unter CPC-Einfluss konstant bei nur etwa einem Fünftel des Vergleichswertes in der Kontrolle ohne Materialeinfluss.

Der negative Einfluss von CPC wird bereits von Wang et al. beschrieben: Dort zeigte ein mit Calciumphosphat beschichtetes Titan bei Osteoblasten der Maus einen negativen Einfluss sowohl auf die Zellproliferation als auch auf die Zelldifferenzierung (Wang et al. 2008). Bei Hempel et al., die CPC mit der gleichen Zusammensetzung wie in den hier beschriebenen Versuchen verwendeten, zeigte sich ebenfalls ein deutlich negativer Einfluss auf die Differenzierungsfähigkeit von Osteoblasten aus dem Schädeldach (Hempel et al. 2004).

Andere Publikationen hingegen legen einen positiven Einfluss von Calciumphosphat bzw. CPC nahe. Müller et al. wiesen bei hMSC differenzierungsfördernde Eigenschaften nach (Müller et al. 2008). Induzierte pluripotente Stammzellen differenzieren am Interface von CPC gut zu Osteoblasten und proliferieren dort ebenfalls gut (Tang et al. 2014). Weiterhin hat CPC sehr gute osteokonduktive Eigenschaften, die bei der Bildung von neuem Knochen wichtig sind (Xu et al. 2006).

Die Ursachen für die Unterschiede bei in vitro getestetem CPC können vielfältig sein. Eine mögliche Ursache sind Variationen in der Zusammensetzung der CPC. Müller et al. verwendeten als Hauptbestandteil ihres Materials HA mit einem geringen Anteil Siliziumoxid, Wang et al. hingegen eine Beschichtung mit Calciumphosphat. Vor allem Siliziumverbindungen mit Calcium zeigten auch in anderen Studien eine bessere Stimulation der Differenzierungsfähigkeit und der Zellviabilität osteoblastärer Zellen im Vergleich zu Tricalciumphosphat-Verbindungen (Zhou et al. 2013; Hesaraki et al. 2012; Fei et al. 2012; Ni et al. 2008). Wird Calciumphosphat in andere organische Stoffe wie Silizium-Kollagen-Verbindungen eingebunden, ist der Anteil des Calciumphosphats im Gemisch für die bioaktiven Eigenschaften wichtig (Heinemann et al. 2013). Im hier

beschriebenen Versuch wurden  $\beta$ -Tricalciumphosphat und Calciumhydrogenphosphat als Hauptkomponenten verwendet. Diese Zusammensetzung wurde gewählt, um eine dem Knochenmineral ähnliche Substanz zu erhalten (Reinstorf 2005).

Auch in der Abbindezeit und in den Resorptionseigenschaften unterscheiden sich die verschiedenen CPC. Tetracalciumphosphat und Dicalciumphosphat haben beispielsweise eine Abbindezeit von vier Stunden und werden nur wenig resorbiert, das hier verwendete  $\beta$ -Tricalciumphosphat härtet in zwölf Stunden aus und wird vollständig resorbiert (Low et al. 2010). Auch die Resorptionsdauer ist von der Art des Zements abhängig: Calciumsulfatzemente sind bereits nach zwei Monaten resorbiert, Dicalciumphosphat erst nach sechs Monaten (Rechenberg et al. 2013). Für den Einsatz in vivo sind diese Zeiten wichtig, da die Resorptionsdauer nicht die Dauer der Knochenneubildung überschreiten darf.

Weiterhin kann die Mikrostruktur des CPC die Osteoinduktivität beeinflussen. Eine feinere Mikrostruktur führt zu einer gesteigerten Proliferation von mesenchymalen Stammzellen (Vater et al. 2009). Calciumphosphat kann auch in granulärer Form appliziert werden und steigert so im Gegensatz zur Applikation in pastöser Form die Differenzierung und die Proliferation von osteoblasten-ähnlichen Zellen (Bernhardt et al. 2013). Der Unterschied könnte dadurch zu erklären sein, dass die vergrößerte Oberfläche zu einer besseren Zelladhäsion führt (Liu et al. 2013a). Ein anderer Grund könnte die im Vergleich zum hier verwendeten CPC veränderte Zusammensetzung sein.

Die Diversität der Ergebnisse mit ähnlichen Materialien legt den Schluss nahe, dass in vitro schon kleine Veränderungen an den Materialien zu Veränderungen hinsichtlich Proliferations- und Differenzierungskapazität führen.

In vivo im ovinen Tiermodell zeigt sich ein positiver Einfluss ähnlicher Knochenersatzmaterialien in der Defektheilung und damit eine gute knöcherne Integration des Materials, insbesondere bei zusätzlicher Applikation von mesenchymalen Stammzellen (Kon et al. 2000; Marcacci et al. 1999). Auch im Rattenmodell haben tricalciumphosphathaltige Materialien einen positiven Effekt auf die Knochenbildung (Okuda et al. 2007). Allerdings hängt die Differenzierungsfähigkeit und die ossäre Integration auch in vivo von der Zusammensetzung der Materialien ab (Arinze et al. 2005). In vivo haben im Gegensatz zu In-vitro-Studien alle Verbindungen aus HA und Tricalciumphosphat positive Effekte auf die Knochenneubildung (Cheng et al. 2014; Nery et al. 1992). Das unterschiedliche Verhalten der Materialien in vivo gegenüber den hier vorliegenden In-vitro-Versuchen verdeutlicht, dass der Prozess der Defektheilung in vivo komplexeren Mechanismen unterliegt und dort noch eine Reihe weiterer Faktoren wie Angiogenese

und Innervation eine Rolle spielen. Eine Ursache könnten die Bedingungen in der Zellkultur sein: Im statischen Medium ist der Differenzierungsgrad geringer als in perfundiertem Medium (Bernhardt et al. 2011). Perfundiertes Medium kommt aber den Bedingungen in vivo näher, wo die Umgebung des Materials durch Blut- und Lymphfluss ständig perfundiert wird.

In vivo besteht der größte Vorteil von CPC im Vergleich zu vielen anderen Materialien in der Verarbeitung. Der Zement kann in pastöser Form injiziert werden und härtet erst im Knochen endgültig aus (Low et al. 2010). So ist beispielsweise bei der Kyphoplastie von gesinterten Wirbelkörpern nur ein kleiner Schnitt notwendig, um den CPC über eine Hohlnadel in den Wirbelkörper zu spritzen. Bei metallischen Implantaten ist die Form des Implantats vorgegeben, sodass keine Injektion möglich ist und damit größere Schnitte und Wundflächen entstehen.

Auch in vivo scheinen chemische Modifikationen der Materialien sinnvoll, da sie zu einer verbesserten Knochenadhäsion führen (Bauer et al. 2009). Vor diesem Hintergrund stehen zurzeit CPC in Verbindung mit anderen Stoffen im Focus der Forschung, um die Osteoinduktivität zu verbessern (wie im vorliegenden Experiment), bessere mechanische Eigenschaften zu erreichen oder den Materialien andere wünschenswerte Effekte zu geben. Beispielsweise führt der Zusatz von Silberverbindungen zu einem antimikrobiellen Effekt, ohne dabei für die Zellen schädlich zu sein (Jacquart et al. 2013). Wird Tricalciumphosphat-Verbindungen Ascorbinsäure zugesetzt, so steigert das ihre mechanische Festigkeit (Low et al. 2010).

#### **4.2.2 Kollagen-Tapes**

In vitro wirkte sich die Zugabe von Kollagen-Tapes positiv auf die Differenzierung aus. Nach 21 Tagen stieg die ALP-Konzentration hochsignifikant an. Sie war unter Materialeinfluss etwa dreimal so hoch wie in der Kontrolle ohne Material. In der Lebendzellbeobachtung war im Gegensatz zu CPC, bei dem die Zellen das Material mieden, kein negativer Einfluss zu erkennen. Die Zellen bildeten einen stabilen Zellrasen aus und wuchsen bis an das Material heran.

Interessanterweise zeigten Zellen unter Einfluss von Kollagen aber negative Effekte auf die Proliferation. Die Zellzahl nahm über die Dauer des Versuchs ab. Nach 28 Tagen waren in der Gruppe ohne Materialeinfluss etwa zehnmal mehr Zellen vorhanden. Diese Diskrepanz zwischen Stimulation der Differenzierung auf der einen Seite und Hemmung der Proliferation auf der anderen Seite passt zu der in Kap. 4.1 diskutierten Gegenläufigkeit von Proliferation und Differenzierung.

Die Degradation des Materials durch Osteoklasten und die gleichzeitige Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten auf dem Material wird in der Literatur beschrieben (Domaschke et al. 2006; Yokoyama et al. 2005). Bernhardt et al. haben nachgewiesen, dass Osteoblasten unter Kollageneinfluss nach 21 Tagen die maximale Differenzierungsfähigkeit und damit die höchste ALP-Konzentration erreichten, die bis zu viermal so hoch war wie in der Kontrolle ohne Kollagen (Bernhardt et al. 2008). In Co-Kulturen von Osteoblasten mit Osteoklasten konnte ebenfalls eine erhöhte Differenzierungsfähigkeit belegt werden (Bernhardt et al. 2010). Im vorliegenden Versuch konnten die Ergebnisse von Bernhardt et al. bestätigt werden. Auch Mizuno et al. beschreiben bereits nach 12 Tagen einen positiven Einfluss von Kollagen Typ 1 auf die Differenzierung von Knochenmarkszellen hin zu aktiven Osteoblasten (Mizuno et al. 2000). Kollagen in Verbindung mit anderen Komponenten der extrazellulären Matrix wie Elastin hat ebenfalls positive Auswirkungen auf die Differenzierung von Prä-Osteoblasten (Amruthwar und Janorkar 2013). Insbesondere Osteoblasten, die unter Einfluss von Kollagen Typ 1 (wie in der natürlichen Knochenumgebung) stehen, zeigen eine bessere Zellfunktion als Osteoblasten, die auf einer anderen extrazellulären Matrix wachsen (Park et al. 2014). Diese Beobachtung unterstützt die aufgestellte These der Gegenläufigkeit von Proliferation und Differenzierung.

In gleicher Weise verhalten sich auch hMSC unter Einfluss von Kollagen. Bei steigender Proliferationskapazität nimmt der Differenzierungsgrad ab; steigt jedoch die Differenzierungskapazität, so sinkt die Zellzahl, was auch in anderen Experimenten bestätigt wurde (Jäger et al. 2005). Das in der vorliegenden Studie verwendete Material bestand neben Kollagen aus gebundenem HA (Gelinsky et al. 2008), um eine mechanische Stabilität zu gewährleisten (Heinemann et al. 2011). Für HA wurde ein negativer Effekt auf die osteoblastäre Differenzierung beschrieben. Untersuchungen mit verschiedenen rauen HA-Proben zeigten einen nur geringen Anstieg der ALP-Konzentration und damit eine schlechtere Differenzierungsfähigkeit von humanen stromalen Knochenmarkszellen (Deligianni et al. 2001). Andererseits wurde bei Verwendung von HA ein positiver Einfluss auf das Differenzierungsverhalten von MC3T3-Maus-Osteoblasten beobachtet (Shu et al. 2003). HA und Kollagen Typ 1 wurden nicht nur in vitro untersucht. Kollagenhaltige Materialien wurden wie CPC bereits in injizierbarer Form entwickelt, die auch die Proliferation und Bildung der extrazellulären Knochenmatrix steigert (Baylan et al. 2013).

Andere Quellen wie Fischhaut könnten zukünftig neben den bisher genutzten meist bovinen Quellen für die Entwicklung von Knochenersatzmaterialien geeignet sein (Hoyer et al. 2012).

In vivo zeigt HA stimulierende Effekte auf die Knochenneubildung bei ektopter Transplantation (Ohgushi et al. 1993) und kann die Knochenneubildung beschleunigen (Piccinini et al. 2013). Neben HA können auch Kollagen-Typ-1-haltige Materialien die knöcherne Integration verbessern (Yang et al. 2014). Kollagen Typ 1 führte bei Pulpa-zellen der Ratte in vitro und in vivo zu einer Erhöhung der ALP-Messenger-Ribonukleinsäure-(mRNA-)Expression, was auf eine Differenzierung zu Osteoblasten hinweist (Khan et al. 2013). Es wurden auch osteokonduktive Eigenschaften und eine gute Biokompatibilität im Modell des Schweins und des Kaninchens für kollagenhaltige Materialien nachgewiesen (Li et al. 2013; Mai et al. 2008; Mai et al. 2005). Verbundmaterialien aus HA und Kollagen haben im Kaninchenmodell einen stimulierenden Effekt auf die Knochenneubildung (Chen et al. 2011). Außerdem ist im Bereich von kollagenhaltigen Materialien die für die Knochenheilung wichtige Angiogenese zu beobachten (Alt et al. 2011).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Nanokomposit-Verbundstoff aus Kollagen Typ 1 und HA eine gute Grundlage für die knöcherne Differenzierung in vitro darstellt, was durch die vorliegenden Analysen mit humanem Bohrmehl bestätigt werden konnte. Auch die Degradation von Verbundmaterialien scheint kein Problem darzustellen (Kikuchi 2013). Nichtsdestotrotz sollte zukünftig insbesondere an dreidimensionalen Kollagen-HA-Kompositen geforscht werden (Bernhardt et al. 2008), um zum einen durch Veränderungen der Architektur, z.B. der Porengröße, im dreidimensionalen Knochenersatzmaterial, zum anderen durch Modifikationen der Zusammensetzung des Materials eine Optimierung der Komposite zu erreichen (Prosecká et al. 2011; Mittal et al. 2010) und schließlich die knöcherne Integration in vivo weiterhin zu verbessern. Allerdings dürfen bei dieser Entwicklung die mechanischen Eigenschaften der Materialien nicht außer Acht gelassen werden.

#### **4.3 Evaluation verschiedener Pharmakakonzentrationen am Interface von Knochenersatzmaterial**

Die auf dem Markt befindlichen Knochenersatzmaterialien zeigen zwar eine gute Stabilität nach Implantation in den Knochen und können osteokonduktiv wirken, allerdings wirken viele dieser Materialien nicht osteoinduktiv (Romagnoli et al. 2013). Um diesen Mangel zu beheben, bietet sich entweder eine Neuentwicklung osteoinduktiv wirkender Materialien an oder die Modifikation vorhandener Materialien, beispielsweise mit Nanopartikeln (Hu et al. 2014) oder mit osteoinduktiv wirkenden Pharmaka wie Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) (Zhang et al. 2014). BMP-2, von dem schon lange bekannt ist, dass es osteoinduktiv wirkt, wird bereits im klinischen Alltag eingesetzt (Garrison et al. 2010; Einhorn et al. 2003; Bostrom et al. 1999).

Eine Modifikation von Knochenersatzmaterial mit anderen Pharmaka wie den hier untersuchten BDNF, ACh und Nikotin stellt einen Aspekt heutiger Forschung dar. Auch werden Knochenersatzmaterialien vermehrt als Drug-Delivery-Systeme genutzt, um beispielsweise Antibiotika in infiziertem Gewebe freizusetzen und gleichzeitig als stabile Knochenersatzmaterialien zu dienen (Vorndran et al. 2013; Leprêtre et al. 2009). Für osteoinduktiv wirkende Wachstumsfaktoren wie BMP-2 und Basic fibroblast growth factor wurde ein Drug-Delivery-System bereits etabliert (Draenert et al. 2013). So könnten in Zukunft auch andere osteoinduktive Pharmaka aus den Materialien freigesetzt werden. Zunächst muss allerdings geklärt werden, in welcher Konzentration die hier verwendeten Pharmaka die optimale Wirkung haben.

#### **4.3.1 BDNF**

BDNF ist ein NT, das nicht nur für die Differenzierung und Proliferation von Neuronen von Bedeutung ist, sondern auch im Knochenstoffwechsel und während der Frakturheilung eine Rolle spielt.

Für den Zelltyp der hMSC aus Bohrmehl findet sich in der Literatur kein Versuch, in dem die Wirkung verschiedener BDNF-Konzentrationen auf die Differenzierung zu Osteoblasten bestimmt wurde. Daher wurde ein Konzentrationstest vorangestellt, in dem BDNF in allen getesteten Konzentrationen einen positiven Effekt auf die osteoblastäre Differenzierungsfähigkeit zeigte. Die höchste ALP-Konzentration war bei einer BDNF-Konzentration von 40 ng/ml zu messen. Sie lag etwa 30% über der Kontrolle. In der Lebendzellbeobachtung ließen sich keine wesentlichen Unterschiede in der Morphologie des Zellsystems und der einzelnen Zellen zwischen den verschiedenen Konzentrationen und der Kontrolle beobachten.

Für die Applikation von BDNF in vitro und in vivo finden sich in der Literatur v.a. Studien mit neuronalen Zellen (Nagahara und Tuszynski 2011; Binder und Scharfman 2004). Ein Konzentrationstest mit neuronalen Stammzellen zeigte ebenfalls bei Applikation einer BDNF-Konzentration von 40 ng/ml einen positiven Effekt auf die Proliferationsfähigkeit der Zellen (Li et al. 2009). Andere Versuche mit neuronalen Zellen zeigten, dass eine Konzentration von 5 ng/ml zu einer höheren Dichte an Dornenfortsätzen von Dendriten, eine Konzentration von 25 ng/ml zu einer Steigerung des Dendritenwachstums (Ji et al. 2005) und eine Konzentration von 40 ng/ml zu einer Erhöhung der Neuronendichte und Länge der Fortsätze führt (Kellner et al. 2014). Allerdings handelt es sich bei den geschilderten Studien um einen ganz anderen Zelltyp, und es wurde nicht die Differenzierungsfähigkeit von Zellen gemessen, sodass aus den genannten Ergebnissen für das hier vorliegende Experiment nur eine grobe Orientierung für eine optimale BDNF-Konzentration folgen konnte.

Den Osteoblasten ähnlicher sind Zementoblasten, die im Zahnhalteapparat vorkommen und dort den Zement bilden, der eine ähnliche Zusammensetzung wie Knochen hat. In einem Zellmodell mit solchen Zementoblasten haben Kajiya et al. die mRNA-Expression der ALP unter Einfluss verschiedener BDNF-Konzentrationen untersucht. Bei einer Konzentration von 20 ng/ml zeigte sich der höchste Anstieg der ALP-mRNA-Expression. Andere ossäre Marker wie Osteopontin und BMP-2 waren ebenfalls erhöht (Kajiya et al. 2008). Auch Takeda et al. verwendeten Zellen aus dem Zahnhalteapparat, Stammzellen aus dem parodontalen Ligament, die sich u.a. zu Osteoblasten differenzieren können (Nohutcu et al. 1997). Dabei zeigte sich für eine BDNF-Konzentration von 100 ng/ml die höchste mRNA-Expression für die ALP und andere mit dem Knochenstoffwechsel assoziierte Proteine wie BMP-2, Osteopontin und Osteocalcin (Takeda et al. 2005). Schon dieser Unterschied zwischen optimalen BDNF-Konzentrationen für zwei ähnliche Zellpopulationen aus dem Zahnhalteapparat in den Arbeiten von Takeda et al. und Kajiya et al., bei denen die gleichen Parameter auf die gleiche Weise gemessen wurden, legt nahe, dass für einen anderen Versuchsaufbau und Zelltyp (hMSC) ein eigener Konzentrationstest für BDNF notwendig ist.

Die BDNF-Konzentration von 40 ng/ml, die im vorliegenden Experiment als optimal bestimmt wurde, liegt, verglichen mit anderen Publikationen, im mittleren Bereich und scheint vor diesem Hintergrund realistisch. Eine Zusammenschau ist in Tabelle (Tab.) 1 dargestellt.

| <b>BDNF (vorliegendes Experiment: 40 ng/ml)</b> |                                   |                             |                     |
|---|-----------------------------------|-----------------------------|---------------------|
| <b>Konzentration</b>                            | <b>Zelltyp</b>                    | <b>Effekt</b>               | <b>Autor</b>        |
| 40 ng/ml  | neuronale Progenitoren            | Proliferation ↑             | Li et al. 2009      |
| 40 ng/ml  | neuronale Zellen                  | Neuronendichte ↑            | Kellner et al. 2014 |
| 5 ng/ml   | neuronale Zellen                  | Dornfortsatzdichte ↑        | Ji et al. 2005      |
| 25 ng/ml  | neuronale Zellen                  | Dendritenwachstum ↑         | Ji et al. 2005      |
| 20 ng/ml  | Zementoblasten                    | osteogene Differenzierung ↑ | Kajiya et al. 2008  |
| 100 ng/ml                                       | Stammzellen des Zahnhalteapparats | osteogene Differenzierung ↑ | Takeda et al. 2005  |

**Tab. 1: Vergleichende Darstellung verschiedener BDNF-Konzentrationen in unterschiedlichen Publikationen (↑ - gesteigert/erhöht).**

Die Rolle von BDNF im komplexen Prozesses der Frakturheilung ist noch nicht vollständig geklärt. Asaumi et al. stellen dar, dass NT und ihre Rezeptoren während der Frakturheilung im Mausmodell verstärkt exprimiert werden (Asaumi et al. 2000). Speziell für BDNF und seinen spezifischen Rezeptor TrkB konnte dieses Ergebnis auch beim Menschen bestätigt werden (Kilian et al. 2014). Yamashiro et al. wiesen nach, dass BDNF und sein Rezeptor TrkB in Osteoblasten gleichermaßen exprimiert werden

(Yamashiro et al. 2001; Nakanishi et al. 1994). Dies spricht dafür, dass BDNF in der Regulation von Osteoblasten eine Rolle spielt.

Im vorliegenden Versuch war am Interface von Kollagen-Tapes unter Einfluss von BDNF nach 28 Tagen ein signifikant positiver Effekt auf die Differenzierung im Vergleich zur Kontrolle nur mit Kollagen-Tapes zu sehen. Bei CPC war die Differenzierungsfähigkeit 21 Tage nach Zugabe von BDNF zwar erhöht, allerdings war dieser Unterschied nicht signifikant. In anderen In-vitro-Untersuchungen im durch das multiple Myelom systemisch erkrankten Knochen wurde hingegen eine vermehrte Osteoklastogenese durch BDNF nachgewiesen (Sun et al. 2012; Ai et al. 2012). Das könnte daran liegen, dass BDNF infolge der hämato-onkologischen Erkrankung andere Prozesse steuert als im Knochen nach Frakturen, sodass diese Ergebnisse nicht direkt mit den hier vorliegenden vergleichbar sind. Weitere Studien zur Differenzierung von hMSC am Interface von CPC oder Kollagen-Tapes nach Zugabe von BDNF existieren bisher nicht.

In vivo wurde von Jimbo et al. nachgewiesen, dass BDNF zusammen mit einem Knochenersatzmaterial bestehend aus hochmolekularer Hyaluronsäure bei einem Knochendefekt im Kiefer von Primaten zu einer schnelleren Heilung führte (Jimbo et al. 2014). Insbesondere diese Studie unterstützt die These, dass BDNF die knöcherne Integration von Knochenersatzmaterial fördert. In vivo sind im Prozess der Frakturheilung noch andere Faktoren wie Lymphangiogenese und Vaskularisation von Bedeutung. BDNF stimuliert die Neovaskularisation (Usui et al. 2014; Donovan et al. 2000) und könnte u.a. über diesen Mechanismus zu einer verbesserten Heilung von Knochendefekten führen.

#### **4.3.2 Nikotin**

Nikotin kann an die nAChR binden, die zum einen an der motorischen Endplatte des Muskels und zum anderen im neuronalen System vorkommen. Darüber hinaus finden sich Teile des cholinergen Systems nicht nur bei Neuronen, sondern auch im Knochen (Beckmann und Lips 2013; Eimar et al. 2013; En-Nosse et al. 2009; Inkson et al. 2004; Asmus et al. 2001). Daher stand Nikotin bei diesem Experiment als Ligand für das cholinerge System im Fokus. Es sollte untersucht werden, ob und in welcher Konzentration Nikotin einen Einfluss auf die Differenzierung von hMSC nehmen kann.

Im vorliegenden Experiment wurden Nikotin-Konzentrationen getestet, die in etwa denen im Blut, Urin und im Speichel von Rauchern entsprechen, bis hin zu hohen Konzentrationen von 1 mM, bei denen toxische Effekte erwartet werden. Nikotin-Konzentrationen im Blut betragen je nach Quelle im Mittel 203 nM (Russell et al. 1980), 68 nM (Taylor et al. 1986) bzw. 28 nM (Luck und Nau 1984), unterliegen allerdings hohen

interindividuellen Schwankungen. Der Speichel von Rauchern kann Nikotin-Konzentrationen von 0,9  $\mu\text{M}$  bis zu 5,5  $\mu\text{M}$  enthalten (Feyerabend et al. 1982). Im Urin kann es zu höheren Werten von 1,3  $\mu\text{M}$  (Russell und Feyerabend 1975), 1,4  $\mu\text{M}$  (Wald et al. 1984) und bis zu 9  $\mu\text{M}$  (Feyerabend et al. 1982) kommen. Die im vorliegenden Experiment verwendete Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  entspricht somit in etwa der im Speichel von Rauchern.

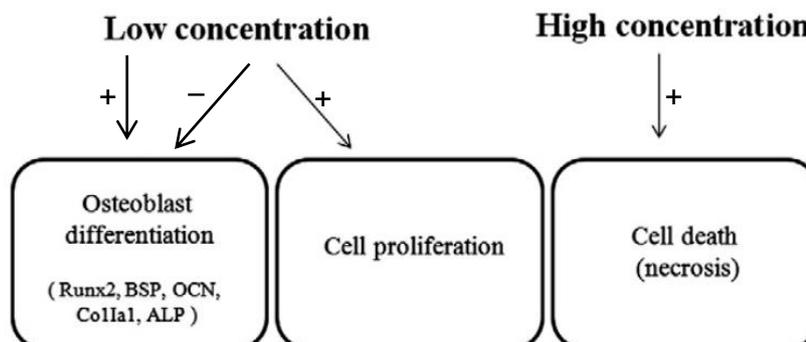
Im hier durchgeführten Experiment waren in der Lebendzellbeobachtung nach 21 Tagen bei der höchsten getesteten Konzentration von 1 mM Löcher im Zellrasen zu sehen. Die deutlichsten Effekte auf die ALP-Konzentration wurden bei sehr hohen und sehr niedrigen Nikotin-Konzentrationen beobachtet: die ALP-Konzentration war jeweils niedriger als bei 1  $\mu\text{M}$ . Aufgrund des Ergebnisses der Lebendzellbeobachtung und der um mehr als 50% gesunkenen ALP-Konzentration wurde die Nikotin-Konzentration von 1 mM als toxisch interpretiert. Allerdings war bei keiner der getesteten Nikotin-Konzentrationen die ALP-Konzentration als Marker für eine Stimulation der Differenzierung höher als bei der Kontrolle ohne Pharmaka.

Fang et al. beobachteten einen positiven Effekt auf die Differenzierung osteoblasten-ähnlicher Zellen bei einer Nikotin-Konzentration von 1  $\mu\text{M}$ . Im Vergleich zu den Kontrollen stellten sie sogar für alle verwendeten Nikotin-Konzentrationen einen positiven Effekt gegenüber der Kontrolle fest (Fang et al. 1991). Ähnliche Ergebnisse wurden von Yuhara et al. bei Konzentrationen von 60  $\mu\text{M}$  bis 1,5 mM erzielt (Yuhara et al. 1999). Diese positiven Effekte konnten in der vorliegenden Studie nicht bestätigt werden. Mögliche Ursachen hierfür könnten zum einen die unterschiedlichen In-vitro-Systeme sein, zum anderen spielt sicherlich auch die Inkubationsdauer eine große Rolle. Fang et al. inkubierten die osteoblasten-ähnlichen Zellen für 24 Stunden mit Nikotin, während im vorliegenden Experiment die hMSC aus Bohrmehl bis zu 28 Tage inkubiert wurden. Solche Langzeitbeobachtungen sind jedoch notwendig vor dem Hintergrund, dass ein nikotin-funktionalisiertes Material ebenfalls längere Zeit im knöchernen Defekt verbleiben würde. Allerdings bilden sie trotzdem nicht die Bedingungen in vivo ab, da dort die vollständige Frakturheilung mitunter viele Wochen dauern kann.

Neben Fang et al. stellten auch Rothem et al. positive Effekte nach Applikation von Nikotin fest. Sie fanden bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  die beste Wirkung auf die Proliferation von osteoblasten-ähnlichen Zellen. Die ALP-Genexpression war bei einer Nikotin-Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  am höchsten (Rothem et al. 2009). Auch hier könnten die Unterschiede zu den Ergebnissen des vorliegenden Experimentes durch die verschiedenen Zelltypen und die kürzere Versuchsdauer von 24 bzw. 72 Stunden bei Rothem et al. gegenüber 28 Tagen im hier vorliegenden Experiment bedingt sein.

Für einen längeren Beobachtungszeitraum von 21 Tagen konnten Marinucci et al. nachweisen, dass Nikotin in den Konzentrationen von 0,1  $\mu\text{M}$  (100 nM), 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  die Zellproliferation von humanen Osteoblasten steigerte, während hohe (1 mM) oder niedrige Konzentrationen (10 nM) negative Effekte auf die Osteoblastenproliferation hatten. Bei noch höheren Konzentrationen (50 mM) war ein deutlicher toxischer Effekt zu beobachten, was sich sowohl in der Lebendzellbeobachtung als auch in einem starken Abfall der Zellzahl zeigte (Marinucci et al. 2014). Kim et al. beschreiben 5 mM als toxische Konzentration und stellten signifikante Veränderungen der ALP-Aktivität bei mesenchymalen Stammzellen erst bei einer Konzentration von 2 mM fest. Bei niedrigeren Konzentrationen kam es in ihrer Studie zu keinen Veränderungen (Kim et al. 2012).

Insgesamt lässt sich dem vorliegenden Experiment und der Literatur ein zweiseitiger Effekt von Nikotin in Abhängigkeit von der gewählten Konzentration beobachten (Kim et al. 2012; Rothem et al. 2009; Walker et al. 2001; Kamer et al. 2006). In hohen Konzentrationen wirkt Nikotin toxisch, bei niedrigeren Konzentrationen kommt es zu einem positiven Effekt. Je nach Zelltyp und Studiendesign ist bei den einen ein positiver Effekt auf die Differenzierung (Zhang et al. 2010; Fang et al. 1991), bei den anderen hingegen ein positiver Effekt auf die Proliferation, nicht aber auf die Differenzierung zu verzeichnen (Sato et al. 2008). Die Konzentration, ab welcher Nikotin toxisch wirkt, unterscheidet sich je nach Zelltyp und Beobachtungszeitpunkt, liegt aber etwa im Bereich von 1 mM und darüber. Der positive Effekt ist bei Konzentrationen um 1  $\mu\text{M}$  am stärksten (Walker et al. 2001; Fang et al. 1991) (Abb. 42).



**Abb. 42: Wirkung von Nikotin auf die Zellpopulation in Abhängigkeit von der Konzentration. Zusammenfassende Darstellung der beschriebenen Ergebnisse verschiedener Studien. Abb. modifiziert nach Kim et al. 2012.**

Im vorliegenden Versuch wurde für hMSC ebenfalls eine Applikation von 1  $\mu\text{M}$  Nikotin als geeignet identifiziert. Eine vergleichende Darstellung der Wirkungen verschiedener Nikotin-Konzentrationen auf unterschiedliche Zelltypen ist in Tab. 2 zu sehen.

| <b>Nikotin (vorliegendes Experiment: 1 <math>\mu</math>M)</b> |                          |  |                       |
|---|--------------------------|--|-----------------------|
| <b>Konzentration</b>  | <b>Zelltyp</b>           | <b>Effekt</b>  | <b>Autor</b>          |
| 1 $\mu$ M   | Osteoblasten             | osteogene Differenzierung $\uparrow$                                 | Fang et al. 1991      |
| 1 $\mu$ M   | Osteoblasten             | Proliferation $\uparrow$   | Rothem et al. 2009    |
| 100 $\mu$ M   | Osteoblasten             | Proliferation $\uparrow$ ,<br>osteogene Differenzierung $\uparrow$   | Rothem et al. 2009    |
| 50 mM   | Osteoblasten             | Zellzahl $\downarrow$  | Marinucci et al. 2014 |
| 1 mM  | Osteoblasten             | Proliferation $\downarrow$   | Marinucci et al. 2014 |
| 100 nM  | Osteoblasten             | Proliferation $\uparrow$   | Marinucci et al. 2014 |
| 10 $\mu$ M  | Osteoblasten             | Proliferation $\uparrow$   | Marinucci et al. 2014 |
| 1 $\mu$ M   | Osteoblasten             | Proliferation $\uparrow$   | Marinucci et al. 2014 |
| 10 nM   | Osteoblasten             | Proliferation $\downarrow$   | Marinucci et al. 2014 |
| 1 $\mu$ M   | Prä-Osteoblasten         | Proliferation $\uparrow$ ,<br>osteogene Differenzierung $\downarrow$ | Sato et al. 2008      |
| 100 $\mu$ M   | Prä-Osteoblasten         | Proliferation $\uparrow$ ,<br>osteogene Differenzierung $\downarrow$ | Sato et al. 2008      |
| 1 $\mu$ M   | Osteoblasten             | Proliferation $\uparrow$   | Walker et al 2001     |
| 2 mM  | mesenchymale Stammzellen | osteogene Differenzierung $\downarrow$                               | Kim et al. 2012       |
| 5 mM  | mesenchymale Stammzellen | Proliferation $\uparrow$   | Kim et al. 2012       |

**Tab. 2: Vergleichende Darstellung der Wirkungen verschiedener Nikotin-Konzentrationen ( $\uparrow$  - gesteigert/erhöht;  $\downarrow$  - vermindert/erniedrigt).**

Die nAChR sind pentamere Ionenkanäle, die u.a. aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten bestehen. Für den menschlichen Knochen scheinen mehrere Subtypen von Bedeutung zu sein. So konnten verschiedene  $\alpha$ -Untereinheiten ( $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 7$ ) im menschlichen Knochen oder Periost nachgewiesen werden (Bajayo et al. 2012; Walker et al. 2001; Romano et al. 1997). Es scheinen aber nicht alle vorhandenen Rezeptoren direkt für den Aufbau und die Stabilität der Knochen wichtig zu sein, da beispielsweise bei männlichen  $\alpha 7$ -knockout-Mäusen bezüglich der Knochendichte und der Trabekelstruktur keine Unterschiede zum Wildtyp zu sehen sind (Kliemann et al. 2012). Weibliche  $\alpha 7$ -knockout-Mäuse hingegen haben eine verstärkte Knochenstruktur (Lips et al. 2015b). Somit scheint der nikotinsche  $\alpha 7$ -Rezeptor geschlechtsspezifische Effekte im Knochenstoffwechsel zu haben.

Der genaue Signalweg, der bei niedrigen Konzentrationen zur Proliferation führt, ist weiterhin unklar. Eine mögliche Erklärung könnte im unterschiedlichen Sekretionsmechanismus liegen, da ACh im non-neuronalen System autokrin und parakrin sezerniert wird (Wessler und Kirkpatrick 2008) und dadurch über andere Signalkaskaden wirken könnte.

Der toxische Effekt des Nikotins ist möglicherweise weniger durch die Bindung an die nAChR, sondern vielmehr über andere Signalkaskaden begründet, beispielsweise über eine Erhöhung der Caspase 3, die die Apoptose der Zelle induziert (Ramlochansingh

et al. 2011). Die Caspasen sind dabei Teil einer komplexen Signalkaskade, die meist über Fas-Liganden aktiviert wird (Kurokawa und Kornbluth 2009). Die Vermutung wird dadurch gestützt, dass im hier vorliegenden Experiment unter Einfluss hoher Nikotin-Konzentrationen keine Nekrose beobachtet wurde und die Apoptose daher möglich scheint.

Im vorliegenden Versuch zeigte sich nach Zugabe von Nikotin am Interface von CPC und Kollagen-Tapes ein positiver, allerdings nicht signifikanter Effekt auf das Differenzierungsverhalten. Pereira et al. konnten für Nikotin an Interface von Titan-Implantaten nachweisen, dass niedrige Nikotin-Konzentrationen im nanomolaren Bereich einen geringen positiven Einfluss auf die Proliferation, mittlere Konzentrationen im niedrigen mikromolaren Bereich (wie im vorliegenden Experiment) einen positiven Einfluss auf Proliferation und Differenzierung und hohe Konzentrationen im hohen mikromolaren Bereichen einen negativen Einfluss auf die Differenzierung und Proliferation von mesenchymalen Stammzellen haben (Pereira et al. 2008). Diese Beobachtungen konnten die Autoren in einer weiteren Studie mit Saos-2 (Sarcoma osteogenic cells) bestätigen, die Effekte sind dort allerdings schwächer ausgeprägt (Pereira et al. 2009).

In vivo hatte die subkutane Applikation von 125 µg pro 100 g Körpergewicht bei Ratten einen negativen Effekt auf den Calciumgehalt im Serum und auf das neue Knochen-volumen rund um einen mit HA gefüllten Substanzdefekt (Soares et al. 2010). Laut dieser Publikation wurden etwa 412 µg Nikotin pro Tier und Tag appliziert, allerdings wird nicht klar, wie hoch die Nikotin-Konzentration am Knochen war. Die schlechtere knöcherne Integration des HA lässt vermuten, dass die Konzentrationen eventuell toxisch waren.

Zahlreiche Studien belegen den schädigenden Effekt des Rauchens auf Knochen und Knochenimplantate (Baig und Rajan 2007), z.B. bei Zahnimplantaten (Levin und Schwartz-Arad 2005; Kan et al. 1999) oder rund um Titanimplantate (Nociti et al. 2002). Allerdings zeigten Skott et al., dass nicht das Nikotin die knöcherne Integration solcher Implantate stört, sondern andere im Zigarettenrauch enthaltene Stoffe (Skott et al. 2006). Nikotin selbst hemmt v.a. die Vaskularisation bei einem autologen Knochentransplantat (Riebel et al. 1995) und könnte über diesen Mechanismus schädlich für die Knochenheilung in vivo sein. Andere Studien belegen hingegen, dass Nikotin keine negativen Effekte auf die knöcherne Integration von Implantatmaterialien hat (Balatsouka et al. 2005; Cesar-Neto et al. 2003; Stefani et al. 2002). Für Nikotin zusammen mit Kollagen konnte sogar gezeigt werden, dass Konzentrationen von 100 µM die Gefäßneubildung und die Wundheilung im Bereich des Materials fördern (Liem et al. 2013).

Die orale Gabe von Nikotin führt zu keiner verbesserten Knochenarchitektur (Iwaniec et al. 2002). Sie hemmt sogar die Knochenheilung in vivo (Saito et al. 2013; Hollinger et al. 1999). Bei oraler Gabe kann allerdings keine Aussage über die lokale Konzentration am Knochen getroffen werden.

Zusammengefasst legen diese Erkenntnisse nahe, dass Nikotin in der richtigen Konzentration als Zusatz eines Knochenersatzmaterials geeignet sein könnte und in dieser Applikationsform die Knochenheilung fördern kann.

### 4.3.3 ACh

ACh wurde im hier beschriebenen Versuch ebenso wie Nikotin als Vertreter des cholinergen Systems untersucht. ACh kann sowohl an mAChR als auch an nAChR binden und Effekte auslösen. ACh spielt nicht nur als Neurotransmitter im zentralen Nervensystem eine Rolle, sondern ACh selbst und die Rezeptoren (nAChR und mAChR) kommen auch in non-neuronalen Zellen vor, so auch im Knochen. Wie bei Nikotin sollte untersucht werden, welche Konzentration welchen Einfluss auf die Differenzierungsfähigkeit von hMSC zu Osteoblasten nimmt.

ACh wurde in Konzentrationen von 1 nM bis zu einem 1 mM getestet. Die ALP-Konzentration war bei einer Applikation von 1 mM am höchsten, und zwar etwa 13% höher als in der Kontrolle. Bei allen anderen Konzentrationen wurde eine ALP-Konzentration etwa in Höhe der Kontrolle gemessen. In der Lebendzellbeobachtung zeigten sich allerdings bei einer Konzentration von 1 mM nach 7 Tagen Löcher im Zellrasen.

Bei Versuchen mit Methacholin, das ebenfalls ein Agonist am AChR ist, war die Zellviabilität von Osteoblasten verglichen mit der Kontrolle bei einer Konzentration von 100  $\mu$ M am höchsten (Liu et al. 2011). Wenn auch ein direkter Vergleich der Pharmaka nicht möglich ist, gibt dieses Ergebnis dennoch Hinweise darauf, wie sich humane Osteoblasten gegenüber der Stimulation des mAChR bei unterschiedlichen Konzentrationen verhalten.

Sato et al. vertreten die Hypothese, dass bereits 1 nM ACh für einen suffizienten pharmakologischen Effekt auf Osteoblasten ausreicht, weil sie bereits bei dieser Konzentration eine Reduktion der ALP feststellten (Sato et al. 2010). Diese These wird nach Ansicht der Autoren dadurch gestützt, dass in der Umgebung von Makrophagen ähnliche ACh-Konzentrationen gemessen wurden (de Jonge et al. 2005). Dagegen ist einzuwenden, dass sich der Zelltyp der Makrophagen nur schwer mit Osteoblasten vergleichen lässt. Außerdem wurden von Sato et al. nicht eigens die Auswirkungen verschiedener ACh-Konzentrationen getestet.

Der hier durchgeführte Konzentrationstest für ACh zeigte den höchsten ALP-Wert zwar bei einer ACh-Konzentration von 1 mM. Da aber bei dieser Konzentration in der Lebendzellbeobachtung Löcher im Zellrasen auftraten, wurde die zweithöchste getestete ACh-Konzentration von 100  $\mu$ M verwendet. Außerdem wurde diese Konzentration bevorzugt, da sich auch in Versuchen mit anderen Zellen (Epithelzellen) gezeigt hat, dass eine Konzentration von 50  $\mu$ M einen Einfluss auf die Calciumpermeabilität hat (Lei et al. 2008). Die Calciumpermeabilität ist auch im Knochenstoffwechsel ein wichtiger Faktor der Signalübermittlung und dient als Marker für die Aktivität von Osteoblasten. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sich niedrigere ACh-Konzentrationen von 1  $\mu$ M positiv auf die Migration von mesenchymalen Stammzellen auswirken (Lei et al. 2008).

Unter Berücksichtigung der Literatur mit teils sehr unterschiedlichen Konzentrationsangaben und den eigenen Ergebnissen aus Lebendzellbeobachtung und ALP-Messung wurde für die Versuche eine ACh-Konzentration von 100  $\mu$ M genutzt. Eine Zusammenfassung der Konzentrationen bietet Tab. 3.

| <b>ACh (vorliegendes Experiment: 100 <math>\mu</math>M)</b> |                             |  |                  |
|---|-----------------------------|--|------------------|
| <b>Konzentration</b>  | <b>Zelltyp</b>              | <b>Effekt</b>                          | <b>Autor</b>     |
| 100 $\mu$ M<br>Methacholin                                  | Osteoblasten                | Zellviabilität $\uparrow$              | Liu et al. 2011  |
| 1 nM  | Osteoblasten                | osteogene Differenzierung $\downarrow$ | Sato et al. 2010 |
| 50 $\mu$ M  | Epithelzellen               | Calciumpermeabilität $\uparrow$        | Lei et al. 2008  |
| 1 $\mu$ M   | mesenchymale<br>Stammzellen | Migration $\uparrow$                   | Lei et al. 2008  |

**Tab. 3: Vergleichende Darstellung der Wirkungen verschiedener ACh-Konzentrationen ( $\uparrow$  - gesteigert/erhöht;  $\downarrow$  - vermindert/erniedrigt).**

In Osteoblasten und osteoblasten-ähnlichen Zellen finden sich Komponenten des non-neuronalen Systems (Sato et al. 2010; En-Nosse et al. 2009). Vermutlich spielt also ACh im Knochenstoffwechsel eine Rolle. Dafür spricht auch, dass Knockout-Mäuse, denen ein Rezeptor für ACh fehlt, eine veränderte, osteoporose-ähnliche Knochenarchitektur haben (Lips et al. 2015a; Kliemann et al. 2012). Im vorliegenden Experiment konnte keine Steigerung der Differenzierungsfähigkeit von hMSC am Interface von Knochenersatzmaterial unter Zugabe von ACh nachgewiesen werden. Allerdings könnte ACh andere förderliche Funktionen haben, z.B. für die nervale Versorgung im Prozess der Frakturheilung, da ACh die Differenzierung und Proliferation peripherer Nervenzellen beeinflussen kann (Uggenti et al. 2014).

#### **4.4 Osteoporose und Alter**

Die Zellen einer osteoporotischen Spenderin dienten für einen Pilotversuch und wiesen ohne Materialeinfluss deutlich niedrigere ALP-Werte, also eine deutlich schlechtere

Differenzierungsfähigkeit auf als die Zellen gesunder Spender. Die Zellen der älteren Spenderin verhielten sich ähnlich wie die der osteoporotischen Spenderin. Auch die Zellzahlen waren von den jungen, gesunden Spendern über die ältere hin zur osteoporotischen Spenderin abfallend.

Dies deutet an, dass Osteoporose nicht nur die Knochenarchitektur verändert, sondern schon auf zellulärer Ebene Auswirkungen hat. Bereits frühere Studien konnten bestätigen, dass osteoporotische Stammzellen eine geringere Proliferations- und Differenzierungskapazität haben als solche von gesunden Spendern (Rodríguez et al. 1999). Auch die geringere Calciumablagerung in Wells osteoporotischer Spender spricht für eine verlangsamte osteogene Differenzierung (Hess et al. 2005). Weiterhin wurde beschrieben, dass osteoporotische Stammzellen eine geringere osteoblastäre Differenzierungskapazität haben, dafür aber ihre adipogene Differenzierungsfähigkeit gesteigert ist (Pino et al. 2012; Rodríguez et al. 2000). Auf molekularer Ebene exprimieren Stammzellen osteoporotischer Patienten die für die Differenzierung wichtigen Proteine Dlx5 und Runx2 in geringerem Maß als Zellen gesunder Spender (Prall et al. 2013), was ein Grund für die schlechtere Defektheilung bei osteoporotischen Versuchstieren gegenüber gesunden sein könnte (Thormann et al. 2014). Insgesamt scheint bei Osteoporose v. a. die Osteogenese und weniger die Angiogenese betroffen zu sein (Liu et al. 2013b).

In Zukunft sollten zur Therapie der Osteoporose weitere Mechanismen Beachtung finden. Insbesondere die Modifikation von Rezeptoren, die in den Prozess der Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen involviert sind, stellen ein vielversprechendes Ziel neuer Therapiestrategien dar (He et al. 2013; Nuttall und Gimble 2004). Dabei könnte die pharmakologische Modifikation dieser Rezeptoren ein Baustein der Therapie sein, der auch lokal als Zusatz von Knochenersatzmaterial in osteoporotischen Frakturen benutzt werden könnte. Weitere Studien in diesem Bereich sollten vor diesem Hintergrund durchgeführt werden.

Die Entwicklung der Osteoporose hängt u. a. vom Alter und Body-Mass-Index eines Patienten ab (Rosen und Bouxsein 2006). Auch im vorliegenden Versuch wurde der Einfluss des Alters deutlich in der verminderten Zellzahl, die zwischen der bei den jungen, gesunden Spendern und der bei der osteoporotischen Spenderin lag, und in der verminderten ALP-Konzentration, die vergleichbar war mit der bei der Osteoporosekranken. Sowohl Untergewicht als auch Übergewicht sind Risikofaktoren für osteoporotische Frakturen (Tanaka et al. 2013). Daher ist es insbesondere für ältere und extremgewichtige Patienten wichtig, die mechanischen und v. a. auch die osteoinduktiven Eigenschaften von Knochenersatzmaterialien weiter zu verbessern.

Unter Einfluss von CPC fällt bei den ALP-Konzentrationen der Unterschied zwischen den drei Gruppen nur noch gering aus. Die Materialeigenschaften scheinen demnach *in vitro* die eigentlich großen Unterschiede in der Differenzierungsfähigkeit zu überlagern. Auch bei der Zellzahl lässt sich unter CPC-Einfluss dieser Effekt beobachten. Bei Kollagen hingegen verstärkt der positive Effekt des Materials noch die Unterschiede zwischen den Patientengruppen hinsichtlich der ALP-Konzentration, sodass junge und gesunde Patienten, die ohnehin schon eine bessere Knochenarchitektur haben, mehr von den Vorteilen eines osteoinduktiven Knochenersatzmaterials profitieren. Dies unterstützt die These, dass die meisten Knochenersatzmaterialien nicht explizit für osteoporotische Knochen hergestellt und erforscht worden sind (Moroni et al. 2006).

Diese beiden Beobachtungen führen zu dem Schluss, dass es wichtig ist, bei der Entwicklung von Materialien nicht nur auf die Bioverträglichkeit, sondern auch auf Osteokonduktivität und auf Osteoinduktivität zu achten. Weiterhin sollten die bereits vorhandenen stimulierenden Materialien besser auf die Eigenschaften des systemisch erkrankten Knochens eingestellt werden, um die Frakturheilung im systemisch erkrankten Knochen zu verbessern und zu beschleunigen.

#### **4.5 Ausblick**

Die hier vorgestellten Betrachtungen und Ergebnisse beschäftigten sich mit dem Differenzierungsgrad von hMSC zu Osteoblasten und dem Proliferationsverhalten am Interface zweier Knochenersatzmaterialien sowie der Applikation verschiedener Pharmaka, die Vertreter des cholinergen Systems und der NT sind. Ziel war es, den Einfluss der Materialien auf die Zellen zu testen und zu untersuchen, ob BDNF, ACh und Nikotin das Differenzierungsverhalten am Interface dieser Materialien verbessern können, um später Knochenersatzmaterial mit diesen Stoffen zu funktionalisieren. Vor allem bei Patienten, die an systemischen Knochenkrankungen wie Osteoporose erkrankt sind, ist es notwendig, die knöcherne Integration der Materialien zu verbessern und den Heilungsprozess zu stimulieren. Vor allem BDNF könnte dafür eingesetzt werden, was im vorliegenden Versuch an einem *In-vitro*-Modell mit Knochenersatzmaterial zum ersten Mal gezeigt werden konnte: Nach Applikation von BDNF war ein signifikant positiver Effekt zu sehen. Für Nikotin konnte ein zwar positiver, allerdings nicht signifikanter Effekt gezeigt werden.

Bis zum Einsatz im klinischen Alltag sind noch weitere Untersuchungen nötig. Für BDNF und andere Pharmaka muss die Freisetzungskinetik aus dem Material bestimmt werden. Dafür ist eventuell ein Drug-Delivery-System notwendig, damit über einen längeren Zeitraum konstante Mengen der Pharmaka in die Umgebung abgegeben

werden können und damit eine stabile Konzentration rund um das Knochenersatzmaterial erreicht wird. Für BDNF konnte bereits eine konstante Freisetzung aus einem Material aus Hyaluronsäure über 14 Tage nachgewiesen werden (Takeda et al. 2011). Diese Zeit entspricht zwar nicht der Zeit der Knochenheilung *in vivo*, zeigt aber, dass eine Freisetzung von BDNF aus einem Knochenersatzmaterial grundsätzlich möglich ist. Außerdem sollte die Rolle und Wirkung von Nikotin im Prozess der Knochenheilung weiter untersucht werden.

Es wurde nachgewiesen, dass die getesteten Materialien einen Einfluss auf die Differenzierung und Proliferation haben. In diesem Zusammenhang wurde diskutiert, dass die Materialzusammensetzung einen starken Einfluss auf die biologischen Eigenschaften hat (Fei et al. 2012). Weitere Untersuchungen müssen neben den mechanischen auch die osteoinduktiven Eigenschaften der Materialien verbessern. Dies kann z.B. durch Funktionalisierung mit anderen Stoffen wie Strontium (Schumacher et al. 2013; Thormann et al. 2013), Chitosan (Xu und Simon 2005) oder Silizium (Guo et al. 2007) erreicht werden sowie durch Veränderungen bestehender Materialien in der prozentualen Zusammensetzung ihrer Komponenten. Als ein *in vitro* osteoinduktiv wirkendes Material wurden Kollagen-Tapes identifiziert. Schließlich ist es notwendig, die *in vitro* gewonnenen Erkenntnisse in ein Tiermodell zu übertragen, bevor eine Translation der Erkenntnisse für den klinischen Alltag stattfinden kann.

Osteoporose stellt sich nicht nur *in vivo* durch eine veränderte Knochenarchitektur und Knochendichte dar. Auch *in vitro* besteht ein Unterschied zwischen gesunden und osteoporotischen Zellen, was anhand geringerer Zellzahlen und einer niedrigeren Differenzierungskapazität nachgewiesen wurde. Die hier gezeigte niedrigere Proliferations- und Differenzierungskapazität von Zellen osteoporotischer Patienten macht deutlich, dass besondere Anforderungen an Knochenersatzmaterial speziell für systemische Knochenerkrankungen berücksichtigt werden müssen. Die Ergebnisse müssen allerdings noch an einem größeren Patientenkollektiv überprüft werden, da im vorliegenden Versuch lediglich eine osteoporotische Spenderin rekrutiert wurde.

Die Erkenntnisse sollten bei der weiteren Materialentwicklung und Funktionalisierung Beachtung finden, damit letztlich bessere Behandlungsmöglichkeiten für Patienten mit systemischen Knochenerkrankungen zur Verfügung stehen.

## **5 Zusammenfassung**

Im klinischen Alltag der Orthopädie und Unfallchirurgie wird eine Zunahme von osteoporotisch-bedingten Frakturen verzeichnet. Die Defektheilung im Knochengewebe kann durch stabilisierende Knochenersatzmaterialien sowie durch differenzierungsfördernde Pharmaka stimuliert werden. Für eine erfolgreiche Knochenheilung ist die Differenzierung von Stammzellen zu aktiven Osteoblasten notwendig. Ziel des hier vorliegenden Experiments war die Klärung der Frage, ob Brain-derived neurotrophic factor (BDNF), Acetylcholin und Nikotin in Anwesenheit von geeigneten Knochenersatzmaterialien wie Calciumphosphatzement (CPC) und Kollagen-Tapes die Osteoblastendifferenzierung stimulieren können. Ausgewählt wurden solche Pharmaka, für die in der Literatur bereits eine Beteiligung im Knochenstoffwechsel und bei der Frakturheilung nachgewiesen wurde.

Als In-vitro-Modell wurden humane multipotente Stromazellen, die sich zu aktiven Osteoblasten differenzieren können, aus dem Bohrmehl junger, gesunder und zum Vergleich einer gesunden älteren sowie einer osteoporotischen Spenderin gewonnen. Die Zellen wurden 28 Tage am Interface der Knochenersatzmaterialien kultiviert. Alle zwei Tage wurde das Medium mit den Pharmaka erneuert. Jede Woche wurden Zellen geerntet, fotodokumentiert und die Konzentration der alkalischen Phosphatase als Marker der Differenzierung sowie die Zellzahl bestimmt.

Es konnte nachgewiesen werden, dass Zellen unter Einfluss von CPC schlechter proliferieren und sich in geringerem Maße zu aktiven Osteoblasten differenzieren als Zellen ohne Materialeinfluss. Kollagen-Tapes hingegen wirken positiv auf die Differenzierung, auf die Proliferation aber hemmend. Außerdem konnte erstmals nachgewiesen werden, dass BDNF zusammen mit Knochenersatzmaterial einen positiven Effekt auf das Differenzierungsverhalten hat und Nikotin teilweise positive Einflüsse zeigt. Zusätzlich wurden die Ergebnisse junger, gesunder Spender mit denen einer gesunden älteren sowie einer osteoporotischen Spenderin verglichen. Die Zellen der osteoporotischen Spenderin zeigten dabei eine deutliche geringere Proliferations- und Differenzierungskapazität als die der gesunden Spender.

Vor diesem Hintergrund könnte vor allem BDNF für die Funktionalisierung von Knochenersatzmaterialien wie Kollagen-Tapes geeignet sein. Die Rolle von Nikotin sollte in weiteren Studien untersucht werden. Bis zum klinischen Einsatz ist aber weitere Forschung nötig, um beispielsweise Fragen bezüglich der Freisetzung der Pharmaka zu beantworten. Die hier gewonnenen Erkenntnisse sollten in einem nächsten Schritt im Tierversuch bestätigt werden, um zukünftig zu einer wirksamen Therapie v. a. bei osteoporotischen Frakturen beizutragen.

## **6 Summary**

An increase of osteoporotic fractures is noticed in daily routine of orthopedics and trauma surgery. The defect healing in bone tissue can be stimulated by implantation of bone substitution materials and drugs, which shall improve osteogenic differentiation. Differentiation of stem cells into active osteoblasts is necessary for successful bone healing. The aim of the present study was to analyze whether brain-derived neurotrophic factor (BDNF), acetylcholine and nicotine could improve osteogenic differentiation in the presence of suitable bone graft materials. Calciumphosphate cement (CPC) and Collagen-tapes were chosen as appropriate materials. For the used drugs, involvement in bone metabolism and fracture healing has been already demonstrated in the literature.

Human remaining debris was obtained during intramedullary nailing from younger healthy donors and human multipotent stromal cells were isolated, which can differentiate into active osteoblasts. Furthermore, cells from an older bone-healthy woman as well as an osteoporotic donor were used. The cells were cultivated for 28 days at the interface of bone substitution materials. Every second day media were changed and drugs renewed. Once a week cells were harvested, morphology documented by light microscopy, cell number determined, and concentration of alkaline phosphatase measured that was a prove of cell differentiation.

A reduced cellular proliferation and differentiation was determined at the interface of CPC compared with cells that were allowed to grow on blank cell culture plastic. However, Collagen-tapes influenced differentiation positively, but not the proliferation. Moreover, it was shown for the first time that application of BDNF together with bone substitution materials leads to an increased differentiation. Nicotine had also partially positive effects on differentiation. The cells of the older bone-healthy and of the osteoporotic donor had a considerably lower proliferation and differentiation capacity than those of young and healthy donors.

Taken together, Collagen-Tapes seem to have osteoinductive effects and BDNF could be suitable for the functionalization of bone substitution materials. The role of nicotine should be investigated in further studies. To answer questions regarding the drug-releasing from bone substitution materials further in vitro studies have to follow. In a next step, the gained knowledge of the present study should be confirmed in animal experiments to improve therapy strategies for osteoporotic fractures.

## **7 Verzeichnisse**

### **7.1 Abkürzungsverzeichnis**

|                 |   |
|-----------------|---|
| °C              | Grad Celsius  |
| µg              | Mikrogramm  |
| µl              | Mikroliter  |
| µM              | Mikromolar  |
| Abb.            | Abbildung   |
| ACh             | Acetylcholin  |
| al.             | alii/aliae  |
| ALP             | alkalische Phosphatase                                |
| BDNF            | Brain-derived neurotrophic factor                     |
| BMP             | Bone morphogenetic protein                            |
| bzw.            | beziehungsweise                                       |
| ca.             | circa   |
| CO <sub>2</sub> | Kohlenstoffdioxid                                     |
| CPC             | Calciumphosphatzement                                 |
| Dlx5            | Distal-less homeoboxprotein 5                         |
| DMEM            | Dulbecco's Modified Eagle Medium                      |
| DMSO            | Dimethylsulfoxid                                      |
| DNA             | Desoxyribonukleinsäure                                |
| dsDNA           | Doppelstrang-DNA                                      |
| EDTA            | Ethylendiamintetraessigsäure                          |
| FKS             | fetales Kälberserum                                   |
| g/mol           | Gramm pro Mol   |
| G-Protein       | Guanosintriphosphat-bindendes regulatorisches Protein |
| HA              | Hydroxylapatit  |
| hMSC            | humane multipotente Stromazellen                      |
| M               | Molar   |
| mAChR           | muskarinische(r) Acetylcholin-Rezeptor(en)            |
| mg              | Milligramm  |
| mg/l            | Milligramm pro Liter                                  |
| Min.            | Minute(n)   |
| ml              | Milliliter  |
| mm              | Millimeter  |
| mM              | Millimolar  |
| mol/l           | Mol pro Liter   |

|         |   |
|---------|---|
| mRNA    | Messenger-Ribonukleinsäure                |
| Msx2    | Msh-homeoboxprotein 2                     |
| nAChR   | nikotinische(r) Acetylcholin-Rezeptor(en) |
| ng/ml   | Nanogramm pro Milliliter                  |
| NGF     | Nerve growth factor                       |
| nm      | Nanometer                                 |
| nM      | Nanomolar                                 |
| NT      | Neurotrophin(e)                           |
| P/S     | Penicillin/Streptomycin                   |
| p75-NTR | p75-Neurotrophin-Rezeptor                 |
| PBS     | Phosphate buffered saline                 |
| pNPP    | p-Nitrophenol-Phosphat                    |
| rpm     | Umdrehungen pro Minute                    |
| Runx2   | Runt-related transcription factor 2       |
| S.      | Seite                                     |
| Tab.    | Tabelle                                   |
| Trk     | Tropomyosin-receptor kinase               |
| u. a.   | unter anderem                             |
| v. a.   | vor allem                                 |
| z. B.   | zum Beispiel                              |

## 7.2 Abbildungsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Abb. 1: Osteoporose im Rattenmodell im Vergleich zur Kontrolle (1).....            | 1  |
| Abb. 2: Osteoporose im Rattenmodell im Vergleich zur Kontrolle (2).....            | 2  |
| Abb. 3: Marknagel-Osteosynthese .....  | 5  |
| Abb. 4: Differenzierungsmöglichkeiten einer mesenchymalen Stammzelle.....          | 7  |
| Abb. 5: Molekulare Differenzierungsmechanismen von Stammzellen zu Osteoblasten     | 8  |
| Abb. 6: Bindungen der NT an ihre Rezeptoren .....                                  | 10 |
| Abb. 7: Freisetzung und Abbau des ACh am synaptischen Spalt .....                  | 11 |
| Abb. 8: Signaltransduktion des mAChR.....  | 12 |
| Abb. 9: Struktur und Funktionsweise des nAChR .....                                | 13 |
| Abb. 10: Prinzip der Messung der ALP-Konzentration .....                           | 18 |
| Abb. 11: Schema der PicoGreen-Messung.....   | 18 |
| Abb. 12: Calciumphosphatzement.....  | 19 |
| Abb. 13: Kollagen-Tapes .....  | 20 |
| Abb. 14: Bohrmehl makroskopisch .....  | 21 |
| Abb. 15: Bohrmehl mikroskopisch .....  | 22 |
| Abb. 16: Plattenlayout der 24 Well-Platte .....                                    | 23 |
| Abb. 17: Standardkurve der ALP .....   | 27 |
| Abb. 18: Standardkurve der Zellzahl (PicoGreen).....                               | 28 |
| Abb. 19: Konzentrationstest von Nikotin.....                                       | 30 |
| Abb. 20: Konzentrationstest von BDNF .....   | 31 |
| Abb. 21: Konzentrationstest von ACh.....   | 31 |
| Abb. 22: Versuch ohne Knochenersatzmaterial mit Pharmaka .....                     | 32 |
| Abb. 23: Versuch ohne Knochenersatzmaterial nach 21 Tagen .....                    | 32 |
| Abb. 24: Lebendzellbeobachtung beim Konzentrationstest für BDNF.....               | 33 |
| Abb. 25: Lebendzellbeobachtung beim Konzentrationstest für Nikotin (7 Tage) .....  | 34 |
| Abb. 26: Lebendzellbeobachtung beim Konzentrationstest für Nikotin (21 Tage) ..... | 35 |
| Abb. 27: Lebendzellbeobachtung beim Konzentrationstest für ACh.....                | 36 |
| Abb. 28: Lebendzellbeobachtung beim Test ohne Material nach 7 Tagen.....           | 37 |
| Abb. 29: Lebendzellbeobachtung beim Test ohne Material nach 28 Tagen.....          | 38 |
| Abb. 30: Materialeinfluss des CPC in der Lebendzellbeobachtung.....                | 39 |
| Abb. 31: Materialeinfluss der Kollagen-Tapes in der Lebendzellbeobachtung .....    | 40 |
| Abb. 32: Material- und Pharmakaeinfluss nach 21 Tagen.....                         | 41 |
| Abb. 33: Lebendzellbeobachtung der Zellen der osteoporotischen Spenderin.....      | 42 |
| Abb. 34: ALP-Konzentration unter Einfluss von CPC.....                             | 43 |
| Abb. 35: Zellzahl unter Einfluss von CPC .....                                     | 44 |
| Abb. 36: ALP-Konzentration unter Einfluss von Kollagen-Tapes .....                 | 45 |
| Abb. 37: Zellzahl unter Einfluss von Kollagen-Tapes.....                           | 45 |

Abb. 38: Einfluss von BDNF, ACh und Nikotin am Interface von CPC ..... 46  
Abb. 39: Einfluss von BDNF, ACh und Nikotin am Interface von Kollagen-Tapes..... 47  
Abb. 40: Osteoporose und CPC ..... 48  
Abb. 41: Osteoporose und Kollagen-Tapes ..... 49  
Abb. 42: Wirkung von Nikotin auf die Zellpopulation in Abhängigkeit von der  
Konzentration ..... 63

**7.3 Tabellenverzeichnis**

Tab. 1: Vergleichende Darstellung verschiedener BDNF-Konzentrationen ..... 60  
Tab. 2: Vergleichende Darstellung verschiedener Nikotin-Konzentrationen..... 64  
Tab. 3: Vergleichende Darstellung verschiedener ACh-Konzentrationen..... 67

#### 7.4 Literaturverzeichnis

Adegani, F. J.; Langroudi, L.; Arefian, E.; Shafiee, A.; Dinarvand, P.; Soleimani, M. (2013): A comparison of pluripotency and differentiation status of four mesenchymal adult stem cells. In: *Mol Biol Rep.* 40 (5), Seite (S.) 3693–3703.

Ai, L.-S.; Sun, C.-Y.; Zhang, L.; Zhou, S.-C.; Chu, Z.-B.; Qin, Y. et al. (2012): Inhibition of BDNF in multiple myeloma blocks osteoclastogenesis via down-regulated stroma-derived RANKL expression both in vitro and in vivo. In: *PLoS ONE.* 7 (10), S. e46287.

Aiga, A.; Asaumi, K.; Lee, Y.; Kadota, H.; Mitani, S.; Ozaki, T.; Takigawa, M. (2006): Expression of neurotrophins and their receptors tropomyosin-related kinases (Trk) under tension-stress during distraction osteogenesis. In: *Acta Med. Okayama* 60 (5), S. 267–277.

Alt, V.; Kögelmaier, D. V.; Lips, K. S.; Witt, V.; Pacholke, S.; Heiss, C. et al. (2011): Assessment of angiogenesis in osseointegration of a silica-collagen biomaterial using 3D-nano-CT. In: *Acta Biomater.* 7 (10), S. 3773–3779.

Ambasudhan, R.; Dolatabadi, N.; Nutter, A.; Masliah, E.; McKercher, S. R.; Lipton, S. A. (2014): Potential for cell therapy in parkinson's disease using genetically programmed human embryonic stem cell-derived neural progenitor cells. In: *J Comp Neurol.* 522 (12), S. 2845–2856.

Amruthwar, S. S.; Janorkar, A. V. (2013): In vitro evaluation of elastin-like polypeptide-collagen composite scaffold for bone tissue engineering. In: *Dent Mater.* 29 (2), S. 211–220.

Arai, F.; Ohneda, O.; Miyamoto, T.; Zhang, X. Q.; Suda, T. (2002): Mesenchymal stem cells in perichondrium express activated leukocyte cell adhesion molecule and participate in bone marrow formation. In: *J Exp Med.* 195 (12), S. 1549–1563.

Arinzech, T. L.; Tran, T.; McAlary, J.; Daculsi, G. (2005): A comparative study of biphasic calcium phosphate ceramics for human mesenchymal stem-cell-induced bone formation. In: *Biomaterials.* 26 (17), S. 3631–3638.

Arrington, E. D.; Smith, W. J.; Chambers, H. G.; Bucknell, A. L.; Davino, N. A. (1996): Complications of iliac crest bone graft harvesting. In: *Clin Orthop Relat Res.* (329), S. 300–309.

Arvanian, V. (2013): Role of neurotrophins in spinal plasticity and locomotion. In: *Curr Pharm Des.* 19 (24), S. 4509–4516.

Asaumi, K.; Nakanishi, T.; Asahara, H.; Inoue, H.; Takigawa, M. (2000): Expression of neurotrophins and their receptors (TRK) during fracture healing. In: *Bone* 26 (6), S. 625–633.

Asmus, S. E.; Tian, H.; Landis, S. C. (2001): Induction of cholinergic function in cultured sympathetic neurons by periosteal cells: cellular mechanisms. In: *Dev Biol.* 235 (1), S. 1–11.

Atkins, G. J.; Kostakis, P.; Pan, B.; Farrugia, A.; Gronthos, S.; Evdokiou, A. et al. (2003): RANKL expression is related to the differentiation state of human osteoblasts. In: *J Bone Miner Res.* 18 (6), S. 1088–1098.

Aubin, J. E. (1998): Bone stem cells. In: *J Cell Biochem Suppl.* 30–31, S. 73–82.

Aubin, J. E. (2001): Regulation of osteoblast formation and function. In: *Rev Endocr Metab Disord.* 2 (1), S. 81–94.

Avbersek-Luznik, I.; Gmeiner Stopar, T.; Marc, J. (2007): Activity or mass concentration of bone-specific alkaline phosphatase as a marker of bone formation. In: *Clin Chem Lab Med.* 45 (8), S. 1014–1018.

- Baig, M. R.; Rajan, M. (2007): Effects of smoking on the outcome of implant treatment: a literature review. In: *Indian J Dent Res.* 18 (4), S. 190–195.
- Bajayo, A.; Bar, A.; Denes, A.; Bachar, M.; Kram, V.; Attar-Namdar, M. et al. (2012): Skeletal parasympathetic innervation communicates central IL-1 signals regulating bone mass accrual. In: *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 109 (38), S. 15455–15460.
- Balatsouka, D.; Gotfredsen, K.; Lindh, C. H.; Berglundh, T. (2005): The impact of nicotine on bone healing and osseointegration. In: *Clin Oral Implants Res.* 16 (3), S. 268–276.
- Barde, Y. A.; Edgar, D.; Thoenen, H. (1982): Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. In: *EMBO J.* 1 (5), S. 549–553.
- Barrios, C.; Broström, L. A.; Stark, A.; Walheim, G. (1993): Healing complications after internal fixation of trochanteric hip fractures: the prognostic value of osteoporosis. In: *J Orthop Trauma.* 7 (5), S. 438–442.
- Bauer, N. B.; Brinke, N.; Heiss, C.; Skorupa, A. B.; Peters, F.; Kraus, R. et al. (2009): Biodegradable  $\beta$ -Tri-Calciumphosphate/hydroxyethyl methacrylate enhanced three component bone adhesive demonstrates biocompatibility without evidence of systemic toxicity in a rabbit model. In: *J Biomed Mater Res.* 90 (2), S. 767–777.
- Baydyuk, M.; Xie, Y.; Tessarollo, L.; Xu, B. (2013): Midbrain-derived neurotrophins support survival of immature striatal projection neurons. In: *J Neurosci.* 33 (8), S. 3363–3369.
- Baylan, N.; Bhat, S.; Ditto, M.; Lawrence, J. G.; Lecka-Czernik, B.; Yildirim-Ayan, E. (2013): Polycaprolactone nanofiber interspersed collagen type-I scaffold for bone regeneration: a unique injectable osteogenic scaffold. In: *Biomed Mater.* 8 (4), S. 45011.
- Bear, M. P.; Schneider, F. H. (1977): The effect of medium pH on rate of growth, neurite formation and acetylcholinesterase activity in mouse neuroblastoma cells in culture. In: *J Cell Physiol.* 91 (1), S. 63–68.
- Beckmann, J.; Lips, K. S. (2013): The non-neuronal cholinergic system in health and disease. In: *Pharmacology.* 92 (5–6), S. 286–302.
- Berg, M. M.; Sternberg, D. W.; Hempstead, B. L.; Chao, M. V. (1991): The low-affinity p75 nerve growth factor (NGF) receptor mediates NGF-induced tyrosine phosphorylation. In: *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88 (16), S. 7106–7110.
- Bernhardt, A.; Lode, A.; Boxberger, S.; Pompe, W.; Gelinsky, M. (2008): Mineralised collagen – an artificial, extracellular bone matrix – improves osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells. In: *J Mater Sci Mater Med.* 19 (1), S. 269–275.
- Bernhardt, A.; Thieme, S.; Domaschke, H.; Springer, A.; Rösen-Wolff, A.; Gelinsky, M. (2010): Crosstalk of osteoblast and osteoclast precursors on mineralized collagen – towards an in vitro model for bone remodeling. In: *J Biomed Mater Res.* 95 (3), S. 848–856.
- Bernhardt, A.; Lode, A.; Peters, F.; Gelinsky, M. (2011): Optimization of culture conditions for osteogenically-induced mesenchymal stem cells in  $\beta$ -tricalcium phosphate ceramics with large interconnected channels. In: *J Tissue Eng Regen Med.* 5 (6), S. 444–453.
- Bernhardt, A.; Lode, A.; Peters, F.; Gelinsky, M. (2013): Comparative evaluation of different calcium phosphate-based bone graft granules – an in vitro study with osteoblast-like cells. In: *Clin Oral Imp Res.* 24 (4), S. 441–449.
- Binder, D. K.; Scharfman, H. E. (2004): Brain-derived neurotrophic factor. In: *Growth Factors.* 22 (3), S. 123–131.

- Bobis, S.; Jarocha, D.; Majka, M. (2006): Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. In: *Folia Histochem Cytobiol.* 44 (4), S. 215–230.
- Bostrom, M. P.; Saleh, K. J.; Einhorn, T. A. (1999): Osteoinductive growth factors in preclinical fracture and long bone defects models. In: *Orthop Clin North Am.* 30 (4), S. 647–658.
- Bruder, S. P.; Horowitz, M. C.; Mosca, J. D.; Haynesworth, S. E. (1997): Monoclonal antibodies reactive with human osteogenic cell surface antigens. In: *Bone.* 21 (3), S. 225–235.
- Callaghan, C. K.; Kelly, A. M. (2013): Neurotrophins play differential roles in short- and long-term recognition memory. In: *Neurobiol Learn Mem.* 104, S. 39–48.
- Carmona, H. (Herausgeber) (2004): *US Department of Health and Human Services. Publications and Reports of the Surgeon General*, S. 41–53 (Bone health and osteoporosis: A report of the surgeon general).
- Cesar-Neto, J. B.; Duarte, P. M.; Sallum, E. A.; Barbieri, D.; Moreno, H., Jr.; Nociti, F. H., Jr. (2003): A comparative study on the effect of nicotine administration and cigarette smoke inhalation on bone healing around titanium implants. In: *J Periodontol.* 74 (10), S. 1454–1459.
- Chao, M. V. (2003): Neurotrophins and their receptors: A convergence point for many signalling pathways. In: *Nat Rev Neurosci.* 4 (4), S. 299–309.
- Chen, Z.; Liu, H.; Liu, X.; Cui, F.-Z. (2011): Injectable calcium sulfate/mineralized collagen-based bone repair materials with regulable self-setting properties. In: *J Biomed Mater Res.* 99 (4), S. 554–563.
- Chen, L.; Zhu, Z.; Peng, X.; Wang, Y.; Wang, Y.; Chen, M. et al. (2014): Hepatic magnetic resonance imaging with T2\* mapping of ovariectomized rats: correlation between iron overload and postmenopausal osteoporosis. In: *Eur Radiol.* 24 (7), S. 1715–1724.
- Cheng, C.; Alt, V.; Pan, L.; Thormann, U.; Schnettler, R.; Strauss, L. G. et al. (2014): Preliminary evaluation of different biomaterials for defect healing in an experimental osteoporotic rat model with dynamic PET-CT (dPET-CT) using F-18-Sodium Fluoride (NaF). In: *Injury.* 45 (3), S. 501–505.
- Citak, M.; Kendoff, D.; Gardner, M. J.; Oszwald, M.; O'Loughlin, P. F.; Olivier, L. C. et al. (2009): Rotational stability of femoral osteosynthesis in femoral fractures – navigated measurements. In: *Technol Health Care.* 17 (1), S. 25–32.
- Cohen Jr., M. M. (2006): The new bone biology: Pathologic, molecular, and clinical correlates. In: *Am J Med Genet.* 140 (23), S. 2646–2706.
- Crist, B. D.; Wolinsky, P. R. (2009): Reaming does not add significant time to intramedullary nailing of diaphyseal fractures of the tibia and femur. In: *J Trauma.* 67 (4), S. 727–734.
- de Jonge, W. J.; van der Zanden, E. P.; The, F. O.; Bijlsma, M. F.; van Westerloo, D. J.; Bennink, R. J. et al. (2005): Stimulation of the vagus nerve attenuates macrophage activation by activating the Jak2-STAT3 signaling pathway. In: *Nat Immunol.* 6 (8), S. 844–851.
- Deligianni, D. D.; Katsala, N. D.; Koutsoukos, P. G.; Missirlis, Y. F. (2001): Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength. In: *Biomaterials.* 22 (1), S. 87–96.
- Delmas, P. D. (1991): Biochemical markers of bone turnover: methodology and clinical use in osteoporosis. In: *Am J Med.* 91 (5B), S. 59–63.

- Dimitriou, R.; Mataliotakis, G. I.; Angoules, A. G.; Kanakaris, N. K.; Giannoudis, P. V. (2011): Complications following autologous bone graft harvesting from the iliac crest and using the RIA: A systematic review. In: *Injury*. 42 (2), S. 3–15.
- Domaschke, H.; Gelinsky, M.; Burmeister, B.; Fleig, R.; Hanke, T.; Reinstorf, A. et al. (2006): In vitro ossification and remodeling of mineralized collagen I scaffolds. In: *Tissue Eng.* 12 (4), S. 949–958.
- Donovan, M. J.; Lin, M. I.; Wiegand, P.; Ringstedt, T.; Kraemer, R.; Hahn, R. et al. (2000): Brain derived neurotrophic factor is an endothelial cell survival factor required for intramyocardial vessel stabilization. In: *Development*. 127 (21), S. 4531–4540.
- Draenert, F. G.; Nonnenmacher, A.-L.; Kämmerer, P. W.; Goldschmitt, J.; Wagner, W. (2013): BMP-2 and bFGF release and in vitro effect on human osteoblasts after adsorption to bone grafts and biomaterials. In: *Clin Oral Impl Res.* 24 (7), S. 750–757.
- Duan, X.; Al-Qwbani, M.; Zeng, Y.; Zhang, W.; Xiang, Z. (2012): Intramedullary nailing for tibial shaft fractures in adults. In: *Cochrane Database Syst Rev* 1, S. CD008241.
- Duda, R. J.; O'Brien, J. F.; Katzmann, J. A.; Peterson, J. M.; Mann, K. G.; Riggs, B. L. (1988): Concurrent assays of circulating bone Gla-protein and bone alkaline phosphatase: effects of sex, age, and metabolic bone disease. In: *J Clin Endocrinol Metab.* 66 (5), S. 951–957.
- Duijsens, A.-W. H. B.; Keizer, S.; Vliet-Vlieland, T.; Nelissen, R. G. H. H. (2005): Resurfacing hip prostheses revisited. In: *Int Orthop.* 29 (4), S. 224–228.
- Ehrenstein, G.; Galdzicki, Z.; Lange, G. D. (2000): A positive-feedback model for the loss of acetylcholine in Alzheimer's disease. In: *Ann N Y Acad Sci.* 899 (1), S. 283–291.
- Eimar, H.; Tamimi, I.; Murshed, M.; Tamimi, F. (2013): Cholinergic regulation of bone. In: *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 13 (2), S. 124–132.
- Einhorn, T. A.; Majeska, R. J.; Mohaideen, A.; Kagel, E. M.; Boussein, M. L.; Turek, T. J.; Wozney, J. M. (2003): A single percutaneous injection of recombinant human bone morphogenetic protein-2 accelerates fracture repair. In: *J Bone Joint Surg Am.* 85 (8), S. 1425–1435.
- En-Nosse, M.; Hartmann, S.; Trinkaus, K.; Alt, V.; Stigler, B.; Heiss, C. et al. (2009): Expression of non-neuronal cholinergic system in osteoblast-like cells and its involvement in osteogenesis. In: *Cell Tissue Res.* 338 (2), S. 203–215.
- Epstein, S. (1988): Serum and urinary markers of bone remodeling: assessment of bone turnover. In: *Endocr Rev.* 9 (4), S. 437–449.
- Exley, C. (2013): Human exposure to aluminium. In: *Environ Sci Processes Impacts.* 15 (10), S. 1807.
- Fang, M.; Frost, P.; Iida-Klein, A.; Hahn, T. (1991): Effects of nicotine on cellular function in UMR 106-01 osteoblast-like cells. In: *Bone.* 12 (4), S. 283–286.
- Fei, L.; Wang, C.; Xue, Y.; Lin, K.; Chang, J.; Sun, J. (2012): Osteogenic differentiation of osteoblasts induced by calcium silicate and calcium silicate/ $\beta$ -tricalcium phosphate composite bioceramics. In: *J Biomed Mater Res.* 100 (5), S. 1237–1244.
- Feyerabend, C.; Higenbottam, T.; Russell, M. A. (1982): Nicotine concentrations in urine and saliva of smokers and non-smokers. In: *BMJ.* 284 (6321), S. 1002–1004.
- Finkemeier, C. G.; Schmidt, A. H.; Kyle, R. F.; Templeman, D. C.; Varecka, T. F. (2000): A prospective, randomized study of intramedullary nails inserted with and without reaming for the treatment of open and closed fractures of the tibial shaft. In: *J Orthop Trauma.* 14 (3), S. 187–193.

- Frölke, J. P.; Bakker, F. C.; Patka, P.; Haarman, H. J. (2001): Reaming debris in osteotomized sheep tibiae. In: *J Trauma*. 50 (1), S. 65–70.
- Garrison, K. R.; Shemilt, I.; Donell, S.; Ryder, J. J.; Mugford, M.; Harvey, I. et al. (2010): Bone morphogenetic protein (BMP) for fracture healing in adults. In: *Cochrane Database Syst Rev*. (6), CD006950.
- Gelinsky, M.; Welzel, P.; Simon, P.; Bernhardt, A.; König, U. (2008): Porous three-dimensional scaffolds made of mineralised collagen: Preparation and properties of a biomimetic nanocomposite material for tissue engineering of bone. In: *Chem Eng J*. 137 (1), S. 84–96.
- Goltzman, D. (2002): Discoveries, drugs and skeletal disorders. In: *Nat Rev Drug Discov*. 1 (10), S. 784–796.
- Gruber, H. E.; Ivey, J. L.; Thompson, E. R.; Chesnut, C. H.; Baylink, D. J. (1986): Osteoblast and osteoclast cell number and cell activity in postmenopausal osteoporosis. In: *Miner Electrolyte Metab*. 12 (4), S. 246–254.
- Guo, H.; Wei, J.; Yuan, Y.; Liu, C. (2007): Development of calcium silicate/calcium phosphate cement for bone regeneration. In: *Biomed Mater*. 2 (3), S. 153–159.
- Hadji, P.; Klein, S.; Gothe, H.; Häussler, B.; Kless, T.; Schmidt, T. et al. (2013): The epidemiology of osteoporosis – Bone Evaluation Study (BEST): an analysis of routine health insurance data. In: *Dtsch Arztebl Int*. 110 (4), S. 52–57.
- Haga, T. (2013): Molecular properties of muscarinic acetylcholine receptors. In: *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 89 (6), S. 226–256.
- Halvorsen, Y. D.; Franklin, D.; Bond, A. L.; Hitt, D. C.; Auchter, C.; Boskey, A. L. et al. (2001): Extracellular matrix mineralization and osteoblast gene expression by human adipose tissue-derived stromal cells. In: *Tissue Eng*. 7 (6), S. 729–741.
- Hatayama, K.; Ichikawa, Y.; Nishihara, Y.; Goto, K.; Nakamura, D.; Wakita, A.; Kobayashi, J. (2012): Serum alkaline phosphatase isoenzymes in SD rats detected by polyacrylamide-gel disk electrophoresis. In: *Toxicol Mech Methods*. 22 (4), S. 289–295.
- He, L.; Lee, J.; Jang, J. H.; Sakchaisri, K.; Hwang, J.; Cha-Molstad, H. J. et al. (2013): Osteoporosis regulation by salubrinal through eIF2 $\alpha$  mediated differentiation of osteoclast and osteoblast. In: *Cellular Signal*. 25 (2), S. 552–560.
- Heinemann, S.; Heinemann, C.; Jäger, M.; Neunzehn, J.; Wiesmann, H. P.; Hanke, T. (2011): Effect of silica and hydroxyapatite mineralization on the mechanical properties and the biocompatibility of nanocomposite collagen scaffolds. In: *ACS Appl Mater Interfaces*. 3 (11), S. 4323–4331.
- Heinemann, S.; Heinemann, C.; Wenisch, S.; Alt, V.; Worch, H.; Hanke, T. (2013): Calcium phosphate phases integrated in silica/collagen nanocomposite xerogels enhance the bioactivity and ultimately manipulate the osteoblast/osteoclast ratio in a human co-culture model. In: *Acta Biomater*. 9 (1), S. 4878–4888.
- Helenius, A.; Simons, K. (1975): Solubilization of membranes by detergents. In: *Biochem Biophys Acta*. 415 (1), S. 29–79.
- Hempel, U.; Reinstorf, A.; Poppe, M.; Fischer, U.; Gelinsky, M.; Pompe, W.; Wenzel, K. W. (2004): Proliferation and differentiation of osteoblasts on Biocement D modified with collagen type I and citric acid. In: *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater*. 71 (1), S. 130–143.
- Hesarakı, S.; Alizadeh, M.; Borhan, S.; Pourbaghi-Masouleh, M. (2012): Polymerizable nanoparticulate silica-reinforced calcium phosphate bone cement. In: *J Biomed Mater Res*. 100 (6), S. 1627–1635.

- Hess, R.; Pino, A. M.; Ríos, S.; Fernández, M.; Rodríguez, J. P. (2005): High affinity leptin receptors are present in human mesenchymal stem cells (MSCs) derived from control and osteoporotic donors. In: *J Cell Biochem.* 94 (1), S. 50–57.
- Hoegel, F.; Mueller, C. A.; Peter, R.; Pfister, U.; Suedkamp, N. P. (2004): Bone debris: dead matter or vital osteoblasts. In: *J Trauma.* 56 (2), S. 363–367.
- Hollinger, J. O.; Schmitt, J. M.; Hwang, K.; Soleymani, P.; Buck, D. (1999): Impact of nicotine on bone healing. In: *J Biomed Mater Res.* 45 (4), S. 294–301.
- Hoyer, B.; Bernhardt, A.; Heinemann, S.; Stachel, I.; Meyer, M.; Gelinsky, M. (2012): Biomimetically mineralized salmon collagen scaffolds for application in bone tissue engineering. In: *Biomacromolecules.* 13 (4), S. 1059–1066.
- Hu, J.; Zhou, Y.; Huang, L.; Liu, J.; Lu, H. (2014): Effect of nano-hydroxyapatite coating on the osteoinductivity of porous biphasic calcium phosphate ceramics. In: *BMC Musculoskelet Disord.* 15 (1), S. 114.
- Huang, Z.; Olson, N. A.; You, W.; Haugland, R. P. (1992): A sensitive competitive ELISA for 2,4-dinitrophenol using 3,6-fluorescein diphosphate as a fluorogenic substrate. In: *J Immunol Methods.* 149 (2), S. 261–266.
- Hung, S.-C.; Chen, N.-J.; Hsieh, S.-L.; Li, H.; Ma, H.-L.; Lo, W.-H. (2002): Isolation and characterization of size-sieved stem cells from human bone marrow. In: *Stem Cells.* 20 (3), S. 249–258.
- Ichim, G.; Tauszig-Delamasure, S.; Mehlen, P. (2012): Neurotrophins and cell death. In: *Exp Cell Res.* 318 (11), S. 1221–1228.
- Ilmer, M.; Karow, M.; Geissler, C.; Jochum, M.; Neth, P. (2009): Human osteoblast-derived factors induce early osteogenic markers in human mesenchymal stem cells. In: *Tissue Eng Part A.* 15 (9), S. 2397–2409.
- Inkson, C. A.; Brabbs, A. C.; Grewal, T. S.; Skerry, T. M.; Genever, P. G. (2004): Characterization of acetylcholinesterase expression and secretion during osteoblast differentiation. In: *Bone.* 35 (4), S. 819–827.
- Itoh, S.; Kikuchi, M.; Takakuda, K.; Koyama, Y.; Matsumoto, H. N.; Ichinose, S. et al. (2001): The biocompatibility and osteoconductive activity of a novel hydroxyapatite/collagen composite biomaterial, and its function as a carrier of rhBMP-2. In: *J Biomed Mater Res.* 54 (3), S. 445–453.
- Iwaniec, U. T.; Haynatzki, G. R.; Fung, Y. K.; Akhter, M. P.; Haven, M. C.; Cullen, D. M. (2002): Effects of nicotine on bone and calciotropic hormones in aged ovariectomized rats. In: *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2 (5), S. 469–478.
- Jacquart, S.; Siadous, R.; Henocq-Pigasse, C.; Bareille, R.; Roques, C.; Rey, C.; Combes, C. (2013): Composition and properties of silver-containing calcium carbonate – calcium phosphate bone cement. In: *J Mater Sci Mater Med.* 24 (12), S. 2665–2675.
- Jäger, M.; Feser, T.; Denck, H.; Krauspe, R. (2005): Proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells cultured onto three different polymers in vitro. In: *Ann Biomed Eng.* 33 (10), S. 1319–1332.
- James, P.; Thorpe, N. (1998): Keilschrift, Kompaß, Kaugummi. Eine Enzyklopädie der frühen Erfindungen, München, S. 44.
- Jarcho, M. (1981): Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. In: *Clin Orthop Relat Res.* (157), S. 259–278.
- Javed, A.; Chen, H.; Ghori, F. Y. (2010): Genetic and transcriptional control of bone formation. In: *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 22 (3), S. 283–293.

- Ji, Y.; Pang, P. T.; Feng, L.; Lu, B. (2005): Cyclic AMP controls BDNF-induced TrkB phosphorylation and dendritic spine formation in mature hippocampal neurons. In: *Nat Neurosci.* 8 (2), S. 164–172.
- Jikko, A.; Harris, S. E.; Chen, D.; Mendrick, D. L.; Damsky, C. H. (1999): Collagen integrin receptors regulate early osteoblast differentiation induced by BMP-2. In: *J Bone Miner Res.* 14 (7), S. 1075–1083.
- Jimbo, R.; Tovar, N.; Janal, M. N.; Mousa, R.; Marin, C.; Yoo, D. et al. (2014): The effect of brain-derived neurotrophic factor on periodontal furcation defects. In: *PLoS ONE.* 9 (1), S. e84845.
- Jing, S.; Tapley, P.; Barbacid, M. (1992): Nerve growth factor mediates signal transduction through trk homodimer receptors. In: *Neuron.* 9 (6), S. 1067–1079.
- Kajiya, M.; Shiba, H.; Fujita, T.; Ouhara, K.; Takeda, K.; Mizuno, N. et al. (2008): Brain-derived neurotrophic factor stimulates bone/cementum-related protein gene expression in cementoblasts. In: *J Biol Chem.* 283 (23), S. 16259–16267.
- Kamakura, S.; Sasano, Y.; Shimizu, T.; Hatori, K.; Suzuki, O.; Kagayama, M.; Motegi, K. (2002): Implanted octacalcium phosphate is more resorbable than  $\beta$ -tricalcium phosphate and hydroxyapatite. In: *J Biomed Mater Res.* 59 (1), S. 29–34.
- Kamer, A. R.; El-Ghorab, N.; Marzec, N.; Margarone, J. E. 3rd; Dziak, R. (2006): Nicotine induced proliferation and cytokine release in osteoblastic cells. In: *Int J Mol Med.* 17 (1), S. 121–127.
- Kan, J. Y.; Rungcharassaeng, K.; Lozada, J. L.; Goodacre, C. J. (1999): Effects of smoking on implant success in grafted maxillary sinuses. In: *J Prosthet Dent.* 82 (3), S. 307–311.
- Kandel, E.; Siegelbaum, A. (2013): Principles of neural science, 5. Auflage, New York, S. 199.
- Kanis, J. A.; Burlet, N.; Cooper, C.; Delmas, P. D.; Reginster, J.-Y.; Borgstrom, F.; Rizzoli, R. (2008): European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. In: *Osteoporos Int.* 19 (4), S. 399–428.
- Kauschke, V.; Lips, K. S.; Heiss, C.; Schnettler, R. (2014): Expression of muscarinic acetylcholine receptors M3 and M5 in osteoporosis. In: *Med Sci Monit.* 20, S. 869–874.
- Kellner, Y.; Gödecke, N.; Dierkes, T.; Thieme, N.; Zagrebelsky, M.; Korte, M. (2014): The BDNF effects on dendritic spines of mature hippocampal neurons depend on neuronal activity. In: *Front Synaptic Neurosci.* 6 (5), S. 1–17.
- Kermani, P.; Hempstead, B. (2007): Brain-derived neurotrophic factor: a newly described mediator of angiogenesis. In: *Trends Cardiovasc Med.* 17 (4), S. 140–143.
- Khairoun, I.; Boltong, M.; Driessens, F.; Planell, J. (1997): Effect of calcium carbonate on the compliance of an apatitic calcium phosphate bone cement. In: *Biomaterials.* 18 (23), S. 1535–1539.
- Khan, S. Z.; Kokubu, E.; Matsuzaka, K.; Inoue, T. (2013): Behaviour of rat-cultured dental pulp cells in three-dimensional collagen type-1 gel in vitro and in vivo. In: *Aust Endod J.* 39 (3), S. 137–145.
- Khashaba, R. M.; Lockwood, P. E.; Lewis, J. B.; Messer, R. L.; Chutkan, N. B.; Borke, J. L. (2010): Cytotoxicity, calcium release, and pH changes generated by novel calcium phosphate cement formulations. In: *J Biomed Mater Res.* 93 (2), S. 297–303.
- Kikuchi, M. (2013): Hydroxyapatite/collagen bone-like nanocomposite. In: *Biol Pharm Bull.* 36 (11), S. 1666–1669.

- Kilian, O.; Hartmann, S.; Dongowski, N.; Karnati, S.; Baumgart-Vogt, E.; Härtel, F. V. et al. (2014): BDNF and its TrkB receptor in human fracture healing. In: *Ann Anat.* 196 (5), S. 286–295.
- Kim, M.; Shim, M.; Kim, M.; Lee, Y.; Shin, Y.; Chung, C.; Kwon, S. (2003): Effect of chronic alcohol ingestion on bone mineral density in males without liver cirrhosis. In: *Korean J Intern Med.* 18 (3), S. 174–180.
- Kim, B.-S.; Kim, S.-J.; Kim, H.-J.; Lee, S.-J.; Park, Y.-J.; Lee, J.; You, H.-K. (2012): Effects of nicotine on proliferation and osteoblast differentiation in human alveolar bone marrow-derived mesenchymal stem cells. In: *Life Sci.* 90 (3–4), S. 109–115.
- Kliemann, K.; Kneffel, M.; Bergen, I.; Kampschulte, M.; Langheinrich, A. C.; Dürselen, L. et al. (2012): Quantitative analyses of bone composition in acetylcholine receptor M3R and alpha7 knockout mice. In: *Life Sci.* 91 (21–22), S. 997–1002.
- Kling, J. M.; Clarke, B. L.; Sandhu, N. P. (2014): Osteoporosis prevention, screening, and treatment: a review. In: *J Womens Health (Larchmt).* 23 (7), S. 563–572.
- Kon, E.; Muraglia, A.; Corsi, A.; Bianco, P.; Marcacci, M.; Martin, I. et al. (2000): Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones. In: *J Biomed Mater Res.* 49 (3), S. 328–337.
- Kulterer, B.; Friedl, G.; Jandrositz, A.; Sanchez-Cabo, F.; Prokesch, A.; Paar, C. et al. (2007): Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow during expansion and osteoblast differentiation. In: *BMC Genomics.* 8 (1), S. 70.
- Kurihara, H.; Shinohara, H.; Yoshino, H.; Takeda, K.; Shiba, H. (2003): Neurotrophins in cultured cells from periodontal tissues. In: *J Periodontol.* 74 (1), S. 76–84.
- Kurokawa, M.; Kornbluth, S. (2009): Caspases and kinases in a death grip. In: *Cell.* 138 (5), S. 838–854.
- Lee, K. S.; Kim, H. J.; Li, Q. L.; Chi, X. Z.; Ueta, C.; Komori, T. et al. (2000): Runx2 is a common target of transforming growth factor beta1 and bone morphogenetic protein 2, and cooperation between Runx2 and Smad5 induces osteoblast-specific gene expression in the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. In: *Mol Cell Biol.* 20 (23), S. 8783–8792.
- Lee, R.; Kermani, P.; Teng, K. K.; Hempstead, B. L. (2001): Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. In: *Science.* 294 (5548), S. 1945–1948.
- LeGeros, R. Z. (2008): Calcium phosphate-based osteoinductive materials. In: *Chem Rev.* 108 (11), S. 4742–4753.
- Lei, X.; Wu, J.; Lu, Y.; Zhu, T. (2008): Effects of acetylcholine chloride on intracellular calcium concentration of cultured sweat gland epithelial cells. In: *Arch Dermatol Res.* 300 (7), S. 335–341.
- Leprêtre, S.; Chai, F.; Hornez, J.-C.; Vermet, G.; Neut, C.; Descamps, M. et al. (2009): Prolonged local antibiotics delivery from hydroxyapatite functionalised with cyclodextrin polymers. In: *Biomaterials.* 30 (30), S. 6086–6093.
- Leslie, W. D.; Morin, S. N. (2014): Osteoporosis epidemiology 2013: implications for diagnosis, risk assessment, and treatment. In: *Curr Opin Rheumatol.* 26 (4), S. 440–446.
- Lessmann, V.; Gottmann, K.; Malcangio, M. (2003): Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. In: *Prog Neurobiol.* 69 (5), S. 341–374.

- Levi-Montalcini, R. (1987): The nerve growth factor 35 years later. In: *Science*. 237 (4819), S. 1154–1162.
- Levin, L.; Schwartz-Arad, D. (2005): The effect of cigarette smoking on dental implants and related surgery. In: *Implant Dent*. 14 (4), S. 357–361.
- Li, T.; Jiang, L.; Zhang, X.; Chen, H. (2009): In-vitro effects of brain-derived neurotrophic factor on neural progenitor/stem cells from rat hippocampus. In: *NeuroReport*. 20 (3), S. 295–300.
- Li, J.; Yang, J.; Zhong, X.; He, F.; Wu, X.; Shen, G. (2013): Demineralized dentin matrix composite collagen material for bone tissue regeneration. In: *J Biomater Sci Polym Ed*. 24 (13), S. 1519–1528.
- Liem, P. H.; Morimoto, N.; Ito, R.; Kawai, K.; Suzuki, S. (2013): Treating a collagen scaffold with a low concentration of nicotine promoted angiogenesis and wound healing. In: *J Surg Res*. 182 (2), S. 353–361.
- Lips, K. S.; Kneffel, M.; Willscheid, F.; Mathies, F. M.; Kampschulte, M.; Hartmann, S. et al. (2015a): Altered ultrastructure, density and cathepsin K expression in bone of female muscarinic acetylcholine receptor M3 knockout mice. In: *Int Immunopharmacol*. [Epub ahead of print].
- Lips, K. S.; Yanko, Ö.; Kneffel, M.; Panzer, I.; Kauschke, V.; Madzharova, M. et al. (2015b): Small changes in bone structure of female  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor knockout mice. In: *BMC Musculoskelet Disord*. 16 (1), S. 5.
- Liu, J.; Ma, L.; Yang, J.; Ren, A.; Sun, Z.; Yan, G. et al. (2006): Increased serum cathepsin S in patients with atherosclerosis and diabetes. In: *Atherosclerosis*. 186 (2), S. 411–419.
- Liu, P.-S.; Chen, Y.-Y.; Feng, C.-K.; Lin, Y.-H.; Yu, T.-C. (2011): Muscarinic acetylcholine receptors present in human osteoblast and bone tissue. In: *Eur J Pharmacol*. 650 (1), S. 34–40.
- Liu, R.; Lei, T.; Dusevich, V.; Yao, X.; Liu, Y.; Walker, M. P. et al. (2013a): Surface characteristics and cell adhesion: a comparative study of four commercial dental implants. In: *J Prosthodont*. 22 (8), S. 641–651.
- Liu, Y.; Cao, L.; Ray, S.; Thormann, U.; Hillengass, J.; Delorme, S. et al. (2013b): Osteoporosis influences osteogenic but not angiogenic response during bone defect healing in a rat model. In: *Injury*. 44 (7), S. 923–929.
- Logothetis, D. E.; Kurachi, Y.; Galper, J.; Neer, E. J.; Clapham, D. E. (1987): The  $\beta\gamma$  subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic  $K^+$  channel in heart. In: *Nature*. 325 (6102), S. 321–326.
- Low, K. L.; Tan, S. H.; Zein, S. H. S.; Roether, J. A.; Mouriño, V.; Boccaccini, A. R. (2010): Calcium phosphate-based composites as injectable bone substitute materials: A review. In: *J Biomed Mater Res*. 94 (1), S. 273–286.
- Luck, W.; Nau, H. (1984): Nicotine and cotinine concentrations in serum and milk of nursing smokers. In: *Br J Clin Pharmacol*. 18 (1), S. 9–15.
- Lundy, S. D.; Gantz, J. A.; Pagan, C. M.; Filice, D.; Laflamme, M. A. (2014): Pluripotent stem cell derived cardiomyocytes for cardiac repair. In: *Curr Treat Options Cardio Med*. 16 (7), S. 319.
- Maeda, S. S.; Lazaretti-Castro, M. (2014): An overview on the treatment of postmenopausal osteoporosis. In: *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 58 (2), S. 162–171.

- Mai, R.; Reinsdorf, A.; Pilling, E.; Lauer, G.; Gelinsky, M.; Eckelt, U. (2005): Custom moldable hydroxyapatite collagen composite for repair of osseous defects. In: *Mund Kiefer Gesichtschir.* 9 (1), S. 12–17.
- Mai, R.; Reinstorf, A.; Pilling, E.; Hlawitschka, M.; Jung, R.; Gelinsky, M. et al. (2008): Histologic study of incorporation and resorption of a bone cement-collagen composite: an in vivo study in the minipig. In: *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 105 (3), S. e9–14.
- Marcacci, M.; Kon, E.; Zaffagnini, S.; Giardino, R.; Rocca, M.; Corsi, A. et al. (1999): Reconstruction of extensive long-bone defects in sheep using porous hydroxyapatite sponges. In: *Calcif Tissue Int.* 64 (1), S. 83–90.
- Marinucci, L.; Bodo, M.; Balloni, S.; Locci, P.; Baroni, T. (2014): Sub-toxic nicotine concentrations affect extracellular matrix and growth factor signaling gene expressions in human osteoblasts. In: *J Cell Physiol*, S. 2038–2048.
- Marom, R.; Shur, I.; Solomon, R.; Benayahu, D. (2005): Characterization of adhesion and differentiation markers of osteogenic marrow stromal cells. In: *J Cell Physiol.* 202 (1), S. 41–48.
- Mehlisch, D. R.; Leider, A. S.; Eugene Roberts, W. (1990): Histologic evaluation of the bone/graft interface after mandibular augmentation with hydroxylapatite/purified fibrillar collagen composite implants. In: *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 70 (6), S. 685–692.
- Mienaltowski, M. J.; Birk, D. E. (2014): Structure, physiology, and biochemistry of collagens. In: *Adv Exp Med Biol.* 802, S. 5–29.
- Mittal, A.; Negi, P.; Garkhal, K.; Verma, S.; Kumar, N. (2010): Integration of porosity and bio-functionalization to form a 3D scaffold: cell culture studies and in vitro degradation. In: *Biomed Mater.* 5 (4), S. 45001.
- Mizuno, M.; Fujisawa, R.; Kuboki, Y. (2000): Type I collagen-induced osteoblastic differentiation of bone-marrow cells mediated by collagen-alpha2beta1 integrin interaction. In: *J Cell Physiol.* 184 (2), S. 207–213.
- Moroni, A.; Hoang-Kim, A.; Lio, V.; Giannini, S. (2006): Current augmentation fixation techniques for the osteoporotic patient. In: *Scand J Surg.* 95 (2), S. 103–109.
- Mowla, S. J.; Farhadi, H. F.; Pareek, S.; Atwal, J. K.; Morris, S. J.; Seidah, N. G.; Murphy, R. A. (2001): Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor. In: *J Biol Chem.* 276 (16), S. 12660–12666.
- Müller, P.; Bulnheim, U.; Diener, A.; Lüthen, F.; Teller, M.; Klinkenberg, E.-D. et al. (2008): Calcium phosphate surfaces promote osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. In: *J Cell Mol Med.* 12 (1), S. 281–291.
- Muschler, G. F.; Nitto, H.; Boehm, C. A.; Easley, K. A. (2001): Age- and gender-related changes in the cellularity of human bone marrow and the prevalence of osteoblastic progenitors. In: *J Orthop Res.* 19 (1), S. 117–125.
- Nagahara, A. H.; Tuszynski, M. H. (2011): Potential therapeutic uses of BDNF in neurological and psychiatric disorders. In: *Nat Rev Drug Discov.* 10 (3), S. 209–219.
- Nagamine, T.; Yakata, H.; Nakajima, T. (1987): Secondary reconstruction of the mandible with an aluminum oxide prosthesis. In: *J Oral Maxillofac Surg.* 45 (2), S. 173–176.
- Nakanishi, T.; Takahashi, K.; Aoki, C.; Nishikawa, K.; Hattori, T.; Taniguchi, S. (1994): Expression of nerve growth factor family neurotrophins in a mouse osteoblastic cell line. In: *Biochem Biophys Res Commun.* 198 (3), S. 891–897.

- Nakashima, K.; Zhou, X.; Kunkel, G.; Zhang, Z.; Deng, J. M.; Behringer, R. R.; de Crombrugge, B. (2002): The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. In: *Cell*. 108 (1), S. 17–29.
- Nery, E. B.; LeGeros, R. Z.; Lynch, K. L.; Lee, K. (1992): Tissue response to biphasic calcium phosphate ceramic with different ratios of HA/beta TCP in periodontal osseous defects. In: *J Periodontol*. 63 (9), S. 729–735.
- Ni, S.; Lin, K.; Chang, J.; Chou, L. (2008):  $\beta$ -CaSiO<sub>3</sub>/ $\beta$ -Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> composite materials for hard tissue repair: In vitro studies. In: *J Biomed Mater Res*. 85 (1), S. 72–82.
- Nociti, F. H.; César, N. J. B.; Carvalho, M. D.; Sallum, E. A. (2002): Bone density around titanium implants may be influenced by intermittent cigarette smoke inhalation: a histometric study in rats. In: *Int J Oral Maxillofac Implants*. 17 (3), S. 347–352.
- Nohutcu, R. M.; McCauley, L. K.; Koh, A. J.; Somerman, M. J. (1997): Expression of extracellular matrix proteins in human periodontal ligament cells during mineralization in vitro. In: *J Periodontol*. 68 (4), S. 320–327.
- Nuttall, M. E.; Gimble, J. M. (2004): Controlling the balance between osteoblastogenesis and adipogenesis and the consequent therapeutic implications. In: *Curr Opin Pharmacol*. 4 (3), S. 290–294.
- Ockenga, W.; Kühne, S.; Bocksberger, S.; Banning, A.; Tikkanen, R. (2013): Non-neuronal functions of the M2 muscarinic acetylcholine receptor. In: *Genes*. 4 (2), S. 171–197.
- Ohgushi, H.; Dohi, Y.; Tamai, S.; Tabata, S. (1993): Osteogenic differentiation of marrow stromal stem cells in porous hydroxyapatite ceramics. In: *J Biomed Mater Res*. 27 (11), S. 1401–1407.
- Okuda, T.; Ioku, K.; Yonezawa, I.; Minagi, H.; Kawachi, G.; Gonda, Y. et al. (2007): The effect of the microstructure of beta-tricalcium phosphate on the metabolism of subsequently formed bone tissue. In: *Biomaterials*. 28 (16), S. 2612–2621.
- Palazzo, E.; Marconi, A.; Truzzi, F.; Dallaglio, K.; Petrachi, T.; Humbert, P. et al. (2012): Role of neurotrophins on dermal fibroblast survival and differentiation. In: *J Cell Physiol*. 227 (3), S. 1017–1025.
- Panigrahi, K.; Delmas, P. D.; Singer, F.; Ryan, W.; Reiss, O.; Fisher, R. et al. (1994): Characteristics of a two-site immunoradiometric assay for human skeletal alkaline phosphatase in serum. In: *Clin Chem*. 40 (5), S. 822–828.
- Park, J. Y.; Choi, J.-C.; Shim, J.-H.; Lee, J.-S.; Park, H.; Kim, S. W. et al. (2014): A comparative study on collagen type I and hyaluronic acid dependent cell behavior for osteochondral tissue bioprinting. In: *Biofabrication*. 6 (3), S. 35004.
- Pereira, M. L.; Carvalho, J. C.; Peres, F.; Fernandes, M. H. (2009): Effect of nicotine in matrix mineralization by human bone marrow and Saos-2 cells cultured on the surface of plasma-sprayed titanium implants. In: *J Biomed Mater Res*. 88 (1), S. 84–93.
- Pereira, M. L.; Carvalho, J. C.; Peres, F.; Gutierrez, M.; Fernandes, M. H. (2008): Behaviour of human osteoblastic cells cultured on plasma-sprayed titanium implants in the presence of nicotine. In: *Clin Oral Implants Res*. 19 (6), S. 582–589.
- Pfister, U. (2010): Marknagelung nach Aufbohrung. In: *Orthopäde*. 39 (2), S. 171–181.
- Phillips, J.; Zirkle, L. G.; Gosselin, R. A. (2012): Achieving locked intramedullary fixation of long bone fractures: technology for the developing world. In: *Int Orthop (SICOT)* 36 (10), S. 2007–2013.

- Piccinini, M.; Rebaudi, A.; Sglavo, V. M.; Bucciotti, F.; Pierfrancesco, R. (2013): A new HA/TTCP material for bone augmentation: an in vivo histological pilot study in primates sinus grafting. In: *Implant Dent.* 22 (1), S. 83–90.
- Pino, A. M.; Rosen, C. J.; Rodríguez, J. P. (2012): In Osteoporosis, differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) improves bone marrow adipogenesis. In: *Biol Res.* 45 (3), S. 279–287.
- Pittenger, M. F. (1999): Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. In: *Science.* 284 (5411), S. 143–147.
- Pohanka, M. (2012): Alpha7 nicotinic acetylcholine receptor is a target in pharmacology and toxicology. In: *Int J Mol Sci.* 13 (12), S. 2219–2238.
- Prall, W. C.; Haasters, F.; Heggebö, J.; Polzer, H.; Schwarz, C.; Gassner, C. et al. (2013): Mesenchymal stem cells from osteoporotic patients feature impaired signal transduction but sustained osteoinduction in response to BMP-2 stimulation. In: *Biochem Biophys Res Commun.* 440 (4), S. 617–622.
- Prosecká, E.; Rampichová, M.; Vojtová, L.; Tvrdík, D.; Melčáková, Š.; Juhasová, J. et al. (2011): Optimized conditions for mesenchymal stem cells to differentiate into osteoblasts on a collagen/hydroxyapatite matrix. In: *J Biomed Mater Res.* 99 (2), S. 307–315.
- Ramlochansingh, C.; Taylor, R. E.; Tizabi, Y. (2011): Toxic effects of low alcohol and nicotine combinations in SH-SY5Y cells are apoptotically mediated. In: *Neurotox Res.* 20 (3), S. 263–269.
- Rauner, M.; Föger-Samwald, U.; Kurz, M.; Brünner-Kubath, C.; Schamall, D.; Kapfenberger, A. et al. (2014): Cathepsin S controls adipocytic and osteoblastic differentiation, bone turnover, and bone microarchitecture. In: *Bone.* 64, S. 281–287.
- Rechenberg, B. von; Genot, O. R.; Nuss, K.; Galuppo, L.; Fulmer, M.; Jacobson, E. et al. (2013): Evaluation of four biodegradable, injectable bone cements in an experimental drill hole model in sheep. In: *Eur J Pharm Biopharm.* 85 (1), S. 130–138.
- Reinstorf, A. S. (2005): Biomimetisch gelenkte Synthese von Calciumphosphatzementen. Ingenieurwissenschaftliche Dissertationsschrift, Universität Dresden, S. 10–43.
- Riebel, G. D.; Boden, S. D.; Whitesides, T. E.; Hutton, W. C. (1995): The effect of nicotine on incorporation of cancellous bone graft in an animal model. In: *Spine (Phila Pa 1976).* 20 (20), S. 2198–2202.
- Rodríguez, J. P.; Garat, S.; Gajardo, H.; Pino, A. M.; Seitz, G. (1999): Abnormal osteogenesis in osteoporotic patients is reflected by altered mesenchymal stem cells dynamics. In: *J Cell Biochem.* 75 (3), S. 414–423.
- Rodríguez, J. P.; Montecinos, L.; Ríos, S.; Reyes, P.; Martínez, J. (2000): Mesenchymal stem cells from osteoporotic patients produce a type I collagen-deficient extracellular matrix favoring adipogenic differentiation. In: *J Cell Biochem.* 79 (4), S. 557–565.
- Romagnoli, C.; D'Asta, F.; Brandi, M. L. (2013): Drug delivery using composite scaffolds in the context of bone tissue engineering. In: *Clin Cases Miner Bone Metab.* 10 (3), S. 155–161.
- Romano, S. J.; Pugh, P. C.; McIntosh, J. M.; Berg, D. K. (1997): Neuronal-type acetylcholine receptors and regulation of alpha 7 gene expression in vertebrate skeletal muscle. In: *J Neurobiol.* 32 (1), S. 69–80.
- Rosen, C. J.; Bouxsein, M. L. (2006): Mechanisms of disease: is osteoporosis the obesity of bone? In: *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2 (1), S. 35–43.

- Rothem, D. E.; Rothem, L.; Soudry, M.; Dahan, A.; Eliakim, R. (2009): Nicotine modulates bone metabolism-associated gene expression in osteoblast cells. In: *J Bone Miner Metab.* 27 (5), S. 555–561.
- Russell, M. A.; Feyerabend, C. (1975): Blood and urinary nicotine in non-smokers. In: *Lancet.* 305 (7900), S. 179–181.
- Russell, M. A.; Jarvis, M.; Iyer, R.; Feyerabend, C. (1980): Relation of nicotine yield of cigarettes to blood nicotine concentrations in smokers. In: *Br Med J.* 280 (6219), S. 972–976.
- Ryoo, H. M.; Hoffmann, H. M.; Beumer, T.; Frenkel, B.; Towler, D. A.; Stein, G. S. et al. (1997): Stage-specific expression of Dlx-5 during osteoblast differentiation: involvement in regulation of osteocalcin gene expression. In: *Mol Endocrinol.* 11 (11), S. 1681–1694.
- Ryoo, H.-M.; Lee, M.-H.; Kim, Y.-J. (2006): Critical molecular switches involved in BMP-2-induced osteogenic differentiation of mesenchymal cells. In: *Gene.* 366 (1), S. 51–57.
- Saito, Y.; Sato, S.; Oginuma, T.; Saito, Y.; Arai, Y.; Ito, K. (2013): Effects of nicotine on guided bone augmentation in rat calvarium. In: *Clin Oral Impl Res.* 24 (5), S. 531–535.
- Sato, Y.; Honda, Y.; Kunoh, H.; Oizumi, K. (1997): Long-term oral anticoagulation reduces bone mass in patients with previous hemispheric infarction and nonrheumatic atrial fibrillation. In: *Stroke.* 28 (12), S. 2390–2394.
- Sato, T.; Abe, T.; Nakamoto, N.; Tomaru, Y.; Koshikiya, N.; Nojima, J. et al. (2008): Nicotine induces cell proliferation in association with cyclin D1 up-regulation and inhibits cell differentiation in association with p53 regulation in a murine pre-osteoblastic cell line. In: *Biochem Biophys Res Commun.* 377 (1), S. 126–130.
- Sato, T.; Abe, T.; Chida, D.; Nakamoto, N.; Hori, N.; Kokabu, S. et al. (2010): Functional role of acetylcholine and the expression of cholinergic receptors and components in osteoblasts. In: *FEBS Letters.* 584 (4), S. 817–824.
- Schlenz, H.; Kummer, W.; Jositsch, G.; Wess, J.; Krasteva, G. (2010): Muscarinic receptor-mediated bronchoconstriction is coupled to caveolae in murine airways. In: *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 298 (5), S. L626.
- Schumacher, M.; Lode, A.; Helth, A.; Gelinsky, M. (2013): A novel strontium(II)-modified calcium phosphate bone cement stimulates human-bone-marrow-derived mesenchymal stem cell proliferation and osteogenic differentiation in vitro. In: *Acta Biomater.* 9 (12), S. 9547–9557.
- Serre, C. M.; Papillard, M.; Chavassieux, P.; Boivin, G. (1993): In vitro induction of a calcifying matrix by biomaterials constituted of collagen and/or hydroxyapatite: an ultrastructural comparison of three types of biomaterials. In: *Biomaterials.* 14 (2), S. 97–106.
- Shahnazari, M.; Chu, V.; Wronski, T. J.; Nissenson, R. A.; Halloran, B. P. (2013): CXCL12/CXCR4 signaling in the osteoblast regulates the mesenchymal stem cell and osteoclast lineage populations. In: *The FASEB J.* 27 (9), S. 3505–3513.
- Shu, R.; McMullen, R.; Baumann, M. J.; McCabe, L. R. (2003): Hydroxyapatite accelerates differentiation and suppresses growth of MC3T3-E1 osteoblasts. In: *J Biomed Mater Res.* 67 (4), S. 1196–1204.
- Skott, M.; Andreassen, T. T.; Ulrich-Vinther, M.; Chen, X.; Keyler, D. E.; LeSage, M. G. et al. (2006): Tobacco extract but not nicotine impairs the mechanical strength of fracture healing in rats. In: *J Orthop Res.* 24 (7), S. 1472–1479.

- Soares, E. V.; Fávoro, W. J.; Cagnon, V. H. A.; Bertran, C. A.; Camilli, J. A. (2010): Effects of alcohol and nicotine on the mechanical resistance of bone and bone neoformation around hydroxyapatite implants. In: *J Bone Miner Metab.* 28 (1), S. 101–107.
- Statistisches Bundesamt (Herausgeber) (2006): Bevölkerung Deutschlands bis 2050. 11. koordinierte Bevölkerungsvorausberechnung, Wiesbaden, S. 22–39.
- Statistisches Bundesamt (Herausgeber) (2011): Periodensterbetafeln für Deutschland. Allgemeine Sterbetafeln, abgekürzte Sterbetafeln und Sterbetafeln. 1871/81 bis 2008/10, Wiesbaden, S. 19–22; S. 479.
- Statistisches Bundesamt (Herausgeber) (2012): Geburten in Deutschland. Ausgabe 2012, Wiesbaden, S. 15.
- Stefani, C. M.; Nogueira, F.; Sallum, E. A.; de Toledo, S.; Sallum, A. W.; Nociti, F. H., Jr. (2002): Influence of nicotine administration on different implant surfaces: a histometric study in rabbits. In: *J Periodontol.* 73 (2), S. 206–212.
- Sun, C.-Y.; Chu, Z.-B.; She, X.-M.; Zhang, L.; Chen, L.; Ai, L.-S.; Hu, Y. (2012): Brain-derived neurotrophic factor is a potential osteoclast stimulating factor in multiple myeloma. In: *Int J Cancer.* 130 (4), S. 827–836.
- Takeda, K.; Sakai, N.; Shiba, H.; Nagahara, T.; Fujita, T.; Kajiya, M. et al. (2011): Characteristics of high-molecular-weight hyaluronic acid as a brain-derived neurotrophic factor scaffold in periodontal tissue regeneration. In: *Tissue Eng Part A.* 17 (7-8), S. 955–967.
- Takeda, K.; Shiba, H.; Mizuno, N.; Hasegawa, N.; Mouri, Y.; Hirachi, A. et al. (2005): Brain-derived neurotrophic factor enhances periodontal tissue regeneration. In: *Tissue Eng.* 11 (9–10), S. 1618–1629.
- Tanaka, S.; Kuroda, T.; Saito, M.; Shiraki, M. (2013): Overweight/obesity and underweight are both risk factors for osteoporotic fractures at different sites in Japanese postmenopausal women. In: *Osteoporos Int.* 24 (1), S. 69–76.
- Tang, M.; Chen, W.; Liu, J.; Weir, M. D.; Cheng, L.; Xu, H. H. (2014): Human induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cell seeding on calcium phosphate scaffold for bone regeneration. In: *Tissue Eng Part A.* 20 (7–8), S. 1295–1305.
- Taylor, R. G.; Woodman, G.; Clarke, S. W. (1986): Plasma nicotine concentration and the white blood cell count in smokers. In: *Thorax.* 41 (5), S. 407–408.
- Thomson, J. A. (1998): Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. In: *Science.* 282 (5391), S. 1145–1147.
- Thormann, U.; Ray, S.; Sommer, U.; El Khassawna, T.; Rehling, T.; Hundgeburth, M. et al. (2013): Bone formation induced by strontium modified calcium phosphate cement in critical-size metaphyseal fracture defects in ovariectomized rats. In: *Biomaterials.* 34 (34), S. 8589–8598.
- Thormann, U.; El Khawassna, T.; Ray, S.; Duerselen, L.; Kampschulte, M.; Lips, K. S. et al. (2014): Differences of bone healing in metaphyseal defect fractures between osteoporotic and physiological bone in rats. In: *Injury.* 45 (3), S. 487–493.
- Trinka, K.; Wenisch, S.; Siemers, C.; Hose, D.; Schnettler, R. (2005): Reaming debris: a source of vital cells! First results of human specimens. In: *Unfallchirurg.* 108 (8), S. 650–656.
- Ugenti, C.; Egle De Stefano, M.; Costantino, M.; Loreti, S.; Pisano, A.; Avallone, B. et al. (2014): M2 muscarinic receptor activation regulates schwann cell differentiation and myelin organization. In: *Dev Neurobiol.* 74 (7), S. 676–691.

- Usui, T.; Naruo, A.; Okada, M.; Hayabe, Y.; Yamawaki, H. (2014): Brain-derived neurotrophic factor promotes angiogenic tube formation through generation of oxidative stress in human vascular endothelial cells. In: *Acta Physiol.* 211 (2), S. 385–394.
- van Hoof, V. O.; de Broe, M. E. (1994): Interpretation and clinical significance of alkaline phosphatase isoenzyme patterns. In: *Crit Rev Clin Lab Sci.* 31 (3), S. 197–293.
- Vater, C.; Lode, A.; Bernhardt, A.; Reinstorf, A.; Heinemann, C.; Gelinsky, M. (2009): Influence of different modifications of a calcium phosphate bone cement on adhesion, proliferation, and osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells. In: *J Biomed Mater Res Part A.* 92 (4), S. 1452–1460.
- Vignesh, R.; Sitta Djody, S.; Jayasudha, E.; Gopalakrishnan, V.; Ilangovan, R.; Balaganesh, M. et al. (2006): Effect of ethanol on human osteosarcoma cell proliferation, differentiation and mineralization. In: *Toxicology.* 220 (1), S. 63–70.
- Vorndran, E.; Geffers, M.; Ewald, A.; Lemm, M.; Nies, B.; Gbureck, U. (2013): Ready-to-use injectable calcium phosphate bone cement paste as drug carrier. In: *Acta Biomater.* 9 (12), S. 9558–9567.
- Wahl, D. A.; Czernuszka, J. T. (2006): Collagen-hydroxyapatite composites for hard tissue repair. In: *Eur Cell Mater.* 11, S. 43–56.
- Wald, N. J.; Idle, M.; Boreham, J.; Bailey, A.; van Vunakis, H. (1984): Urinary nicotine concentrations in cigarette and pipe smokers. In: *Thorax.* 39 (5), S. 365–368.
- Walker, L. M.; Preston, M. R.; Magnay, J. L.; Thomas, P. B.; El Haj, A. J. (2001): Nicotinic regulation of c-fos and osteopontin expression in human-derived osteoblast-like cells and human trabecular bone organ culture. In: *Bone.* 28 (6), S. 603–608.
- Walsh, S.; Jefferiss, C.; Stewart, K.; Jordan, G. R.; Screen, J.; Beresford, J. N. (2000): Expression of the developmental markers STRO-1 and alkaline phosphatase in cultures of human marrow stromal cells: regulation by fibroblast growth factor (FGF)-2 and relationship to the expression of FGF receptors 1–4. In: *Bone.* 27 (2), S. 185–195.
- Wang, J.; de Boer, J.; de Groot, K. (2008): Proliferation and differentiation of MC3T3-E1 cells on calcium phosphate/chitosan coatings. In: *J Dent Res.* 87 (7), S. 650–654.
- Wenisch, S.; Trinkaus, K.; Hild, A.; Hose, D.; Heiss, C.; Alt, V. et al. (2006): Immunochemical, ultrastructural and electrophysiological investigations of bone-derived stem cells in the course of neuronal differentiation. In: *Bone.* 38 (6), S. 911–921.
- Wenisch, S.; Trinkaus, K.; Hild, A.; Hose, D.; Herde, K.; Heiss, C. et al. (2005): Human remaining debris: a source of multipotent stem cells. In: *Bone.* 36 (1), S. 74–83.
- Wenzel, T.; Schaffler, M.; Fyhrie, D. (1996): In vivo trabecular microcracks in human vertebral bone. In: *Bone.* 19 (2), S. 89–95.
- Wessler, I.; Kirkpatrick, C. J.; Racke, K. (1998): Non-neuronal acetylcholine, a locally acting molecule, widely distributed in biological systems: expression and function in humans. In: *Pharmacol Ther.* 77 (1), S. 59–79.
- Wessler, I.; Kirkpatrick, C. J. (2008): Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. In: *Br J Pharmacol.* 154 (8), S. 1558–1571.
- Wislet-Gendebien, S.; Hans, G.; Leprince, P.; Rigo, J.-M.; Moonen, G.; Rogister, B. (2005): Plasticity of cultured mesenchymal stem cells: switch from nestin-positive to excitable neuron-like phenotype. In: *Stem Cells.* 23 (3), S. 392–402.
- Wlodarski, K. H.; Reddi, A. H. (1986): Alkaline phosphatase as a marker of osteoinductive cells. In: *Calcif Tissue Int.* 39 (6), S. 382–385.

- Xie, J.; Baumann, M. J.; McCabe, L. R. (2004): Osteoblasts respond to hydroxyapatite surfaces with immediate changes in gene expression. In: *J Biomed Mater Res Part A*. 71 (1), S. 108–117.
- Xie, X. T.; Gao, Y. S.; Zhang, C. Q. (2011): Salvage of a femoral nonunion after primary non-Hodgkin's lymphoma of bone: a case report and literature review. In: *Med Sci Monit*. 17 (11), S. CS138-143.
- Xu, H. H.; Simon, C. G. (2005): Fast setting calcium phosphate-chitosan scaffold: mechanical properties and biocompatibility. In: *Biomaterials*. 26 (12), S. 1337–1348.
- Xu, H. H.; Weir, M. D.; Burguera, E. F.; Fraser, A. M. (2006): Injectable and macro-porous calcium phosphate cement scaffold. In: *Biomaterials*. 27 (24), S. 4279–4287.
- Yamashiro, T.; Fukunaga, T.; Yamashita, K.; Kobashi, N.; Takano-Yamamoto, T. (2001): Gene and protein expression of brain-derived neurotrophic factor and TrkB in bone and cartilage. In: *Bone*. 28 (4), S. 404–409.
- Yang, L.; Perez-Amodio, S.; Barrère-de Groot, F. Y.; Everts, V.; van Blitterswijk, C. A.; Habibovic, P. (2010): The effects of inorganic additives to calcium phosphate on in vitro behavior of osteoblasts and osteoclasts. In: *Biomaterials*. 31 (11), S. 2976–2989.
- Yang, W.; Both, S. K.; van Osch, G. J.; Wang, Y.; Jansen, J. A.; Yang, F. (2014): Performance of different three-dimensional scaffolds for in vivo endochondral bone generation. In: *Eur Cell Mater*. 27, S. 350–364.
- Yokoyama, A.; Gelinsky, M.; Kawasaki, T.; Kohgo, T.; König, U.; Pompe, W.; Watari, F. (2005): Biomimetic porous scaffolds with high elasticity made from mineralized collagen -- an animal study. In: *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater*. 75 (2), S. 464–472.
- Yuhara, S.; Kasagi, S.; Inoue, A.; Otsuka, E.; Hirose, S.; Hagiwara, H. (1999): Effects of nicotine on cultured cells suggest that it can influence the formation and resorption of bone. In: *Eur J Pharmacol*. 383 (3), S. 387–393.
- Zhang, J.; Chen, F.; Yun, F.; Chen, J. (2010): Low level nicotine: A novel approach to reduce osteoporosis incidence. In: *Medical Hypotheses*. 74 (6), S. 1067–1068.
- Zhang, Q.; Tan, K.; Zhang, Y.; Ye, Z.; Tan, W.-S.; Lang, M. (2014): In situ controlled release of rhBMP-2 in gelatin-coated 3D porous poly( $\epsilon$ -caprolactone) scaffolds for homogeneous bone tissue formation. In: *Biomacromolecules*. 15 (1), S. 84–94.
- Zhao, Q.; Qian, J.; Zhou, H.; Yuan, Y.; Mao, Y.; Liu, C. (2010): In vitro osteoblast-like and endothelial cells' response to calcium silicate/calcium phosphate cement. In: *Biomed Mater*. 5 (3), S. 35004.
- Zhou, S.; Ma, J.; Shen, Y.; Haapasalo, M.; Ruse, N. D.; Yang, Q.; Troczynski, T. (2013): In vitro studies of calcium phosphate silicate bone cements. In: *J Mater Sci Mater Med*. 24 (2), S. 355–364.

## **8 Publikationen**

### **8.1 Kongressbeiträge**

Panzer, I.; Lohmann, T.; Madzharova, M.; **Wilczek, S.**; Trinkaus, K.; Schumacher, M.; Gelinsky, M.; Schnettler, R.; Kilian, O.; Lips, K. S. (2011): Neurotrophin BDNF stimuliert die Proliferation von Osteoblasten-Progenitoren und die knöchernen Integration von Calciumphosphat-Zement in-vitro. In: *Biomaterialien* 12 (1–4), S. 74.

### **8.2 Poster**

**Wilczek, S.**; Panzer, I.; Schumacher, M.; Knaack, S.; Kauschke, V.; Madzharova, M.; Kilian, O.; Schnettler, R.; Gelinsky, M.; Lips, K. S. (2012): In-vitro-Untersuchungen zum Differenzierungsverhalten von mesenchymalen Stammzellen in aktive Osteoblasten nach Zugabe von Knochenersatzmaterialien und Pharmaka. In: *BioNanoMaterials* 13 (1–4), S. 147.

**Wilczek, S.**; Schumacher, M.; Knaack, S.; Szalay, G.; Heiss, C.; Schnettler, R.; Gelinsky, M.; Lips, K.S. (2015): Influence of nicotine, acetylcholine and BDNF to the osteoinductivity of calcium phosphate cement and collagen scaffolds. *Von-Behring-Röntgen-Symposium 2015*, Gießen.

## **9 Ehrenwörtliche Erklärung**

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

---

Ort, Datum

---

Sebastian Wilczek

## **10 Danksagung**

Mein herzlicher Dank gilt in erster Linie Frau Professor Dr. Katrin Lips für die interessante Themenstellung, für die Einbindung in den Sonderforschungsbereich/Transregio 79, für Hilfe und Unterstützung bei der Durchführung und für ein immer offenes Ohr für Fachliches und auch darüber hinaus. Außerdem danke ich ihr für jegliche konstruktive Kritik und die Finanzierung von Tagungen wie der Jahrestagung der DGBM 2012 sowie für viele anregende Diskussionen. In diesem Zusammenhang gilt mein Dank auch der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Finanzierung der hier vorgestellten Arbeiten im Rahmen des Sonderforschungsbereichs/Transregio 79. Ich danke der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. Michael Gelinsky in Dresden, besonders Herrn Matthias Schumacher und Herrn Sven Knaack für die Produktion und Überlassung des Knochenersatzmaterials. Weiterhin danke ich den Ärztinnen und Ärzten des Uniklinikums in Gießen für die Gewinnung des Bohrmehls sowie allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Labors für experimentelle Unfallchirurgie, die mit der freundlichen Einbindung ins Team und fachlicher Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Hier danke ich insbesondere Frau Dr. Imke Panzer für die Einarbeitung und anfängliche Hilfe bei Fragen und Frau Olga Dakischew für die Hilfe und Unterstützung bei der statistischen Auswertung. Außerdem danke ich Herrn Gerhard Braun für wiederholtes Korrekturlesen und hilfreiche Hinweise zur Formatierung. Schließlich danke ich meiner Familie, meiner Freundin und meinen Freunden für das Begleiten meines Weges und für das Verständnis für die Abendtermine im Labor.