

**Zytokompatibilität eines neuen porösen Polymermaterials
gegenüber humanen Knochenzellen**

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

vorgelegt von Spreda, Miriam
aus Siegen

Gießen 2024

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Experimentelle Unfallchirurgie der Klinik und Poliklinik für Unfall-,
Hand- und Wiederherstellungschirurgie

Gutachterin: Prof. Dr. Katrin S. Lips

Gutachter: Prof. Dr. Bernd Wöstmann

Tag der Disputation: 03. Juli 2024

für Diana

Inhalt

1	Einleitung.....	1
1.1	Biologie und Physiologie des Knochens	1
1.2	Mesenchymale Stromazellen	4
1.3	Osteoklasten.....	6
1.3.1	Osteoklastogenese	7
1.3.2	Molekulare Mechanismen der Knochenresorption	10
1.4	Osteochondrale Läsionen	12
1.4.1	Biomechanik der osteochondralen Einheit.....	12
1.4.2	Pathologien des subchondralen Knochens	14
1.4.3	Therapie osteochondraler Läsionen	16
1.5	Ersatzmaterialien für den subchondralen Knochen	18
1.5.1	Werkstoffe	19
1.5.2	Struktur und Geometrie	21
1.5.3	Herstellungsverfahren poröser 3D Scaffolds	24
1.6	Fragestellung und Zielsetzung	26
2	Material und Methoden.....	27
2.1	Scaffolds	27
2.2	Standardbedingungen bei der Arbeit mit Zellkulturen	28
2.3	Mesenchymale Stromazellen	28
2.3.1	Verwendete Zellen	28
2.3.2	Zellkultur	30
2.3.3	Vitalitätsassay	30
2.3.4	Zytotoxizitätsassay	32
2.3.5	Lichtmikroskopie mesenchymaler Stromazellen	32
2.4	Osteoklasten.....	33

2.4.1	Isolation humaner Monozyten aus Spenderblut	33
2.4.2	Osteoklastenzellkultur	35
2.4.3	RNA-Isolation	35
2.4.4	cDNA-Synthese.....	36
2.4.5	Real-time Reverse-Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion	37
2.4.6	Kapillarelektrophorese	41
2.4.7	Tartratresistente saure Phosphatase (TRAP) 5b ELISA	41
2.4.8	Lebendzellbeobachtung der Osteoklastendifferenzierung	42
2.4.9	Immunfluoreszenzmikroskopie	42
2.5	Statistische Auswertung	43
2.6	Erstellung schematischer Abbildungen	44
3	Ergebnisse.....	45
3.1	Mesenchymale Stromazellen (MSC).....	45
3.1.1	Vitalität.....	45
3.1.2	Toxizität	45
3.1.3	Morphologische Begutachtung der MSC.....	46
3.2	Osteoklasten.....	47
3.2.1	Differenzierung	47
3.2.2	Osteoklasten Aktivität	49
3.2.3	Elektrophoretische Analyse der RT-PCR-Produkte.....	53
3.2.4	Lichtmikroskopische Beobachtung der Osteoklastogenese	54
3.2.5	Morphologische Charakterisierung der Osteoklasten	57
4	Diskussion	59
4.1	Biokompatibilität im Kontakt mit MSC	59
4.2	Auswirkung der Scaffolds auf Osteoklasten	63
4.2.1	LCM-Scaffolds verändern die Morphologie der Osteoklasten	64
4.2.2	Osteoklastogenese molekularbiologisch unverändert	68

4.2.3	Reduktion der Osteoklastenaktivität	70
4.3	Fazit der Studie und Ausblick	75
5	Zusammenfassung.....	77
6	Summary.....	78
7	Abkürzungs-, Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	79
7.1	Abkürzungsverzeichnis	79
7.2	Abbildungsverzeichnis	82
7.3	Tabellenverzeichnis	83
8	Literaturverzeichnis	84
9	Appendix.....	103
10	Publikationsverzeichnis.....	108
10.1	Originalpublikation.....	108
10.2	Kongressbeitrag	108
11	Ehrenwörtliche Erklärung.....	109
12	Danksagung	110

1 Einleitung

1.1 Biologie und Physiologie des Knochens

Das menschliche Skelettsystem besteht aus Knochen- und Knorpelgewebe. Die Funktionen des Knochens sind vielseitig. Zum einen bietet er Schutz für innere Organe und ermöglicht als Ansatzpunkt für Muskeln und Sehnen die Bewegung des Körpers. Zum anderen ist Knochengewebe metabolisch aktiv und dient als Speicher für Mineralien und Wachstumsfaktoren. Das enthaltene Knochenmark stellt den Ort der adulten Hämatopoese dar (Buck und Dumanian, 2012). Sein Aufbau aus Substantia compacta (Kortikalis) und Substantia spongiosa (Spongiosa) verleiht dem Knochen seine einzigartigen biomechanischen Eigenschaften. Die Kortikalis macht 80 Prozent (%) des Gesamtgewichts des Knochens aus und ist überwiegend im Schaft langer Röhrenknochen (Diaphyse) sowie als dünne Schale aller Knochen unmittelbar unter der Knochenhaut (Periost) angesiedelt (Clarke, 2008). Durch ihre kompakte Struktur und geringe Porosität von 5 bis 10 % trägt die Kortikalis maßgeblich zur Druck- und Zugfestigkeit des Knochens bei (Buck und Dumanian, 2012). Im Gegensatz dazu ist die Spongiosa von einer wabenartigen Trabekelstruktur gekennzeichnet. Aufgrund der hohen Porosität von 50 bis 80 % macht die Spongiosa trotz ihres geringen Anteils am Gesamtgewicht des Knochens den Großteil der Knochenoberfläche aus (Clarke, 2008). Dadurch erlaubt die Spongiosa nicht nur eine gewisse Elastizität, sondern durch hohen Knochenumsatz auch eine Anpassung der Knochenstruktur an mechanische Stimuli (Buck und Dumanian, 2012). Das Knochengewebe setzt sich zu 10 % aus Zellen und zu 90 % aus Knochenmatrix zusammen. Letztere besteht zu etwa zwei Dritteln aus anorganischem Material, welches überwiegend in Form von Hydroxylapatit den größten Calcium- und Phosphatspeicher des Körpers darstellt. Circa (ca.) 20 % der Matrix fügen sich aus organischen Komponenten, hauptsächlich Collagen Typ 1, aber auch Proteoglykanen, Glykoproteinen und Wachstumsfaktoren zusammen. Wasser und Lipide machen die restlichen zehn bis fünfzehn Prozent der Matrix aus (Buck und Dumanian, 2012). Die Zellen des Knochens entspringen aus zwei unterschiedlichen Zelllinien: Osteoblasten und Osteozyten entwickeln sich aus Osteoprogenitorzellen, welche von mesenchymalen Stammzellen (MSC) abstammen, Osteoklasten hingegen haben ihren Ursprung in der hämatopoetischen Zelllinie. Osteoprogenitorzellen residieren inaktiv an der

Knochenoberfläche, bis sie durch Wachstumssignale migrieren, proliferieren und sich zu Osteoblasten differenzieren. Wichtige Wachstumsfaktoren, welche die Osteogenese begünstigen, sind unter anderem (u. a.) *bone morphogenic protein* (BMP) und Mitglieder der *transforming growth factor β* (TGF- β) Familie (Buck und Dumanian, 2012). Osteoblasten sind aktiv für den Aufbau des Knochens verantwortlich, indem sie die Bestandteile der organischen Matrix sezernieren. Dazu zählen unter anderem Osteocalcin, *bone sialoprotein* I/II und Collagen Typ 1 (Florencio-Silva et al., 2015). Inaktive, der Knochenoberfläche flach aufliegende Osteoblasten werden als Saumzellen (engl. *bone lining cells*) bezeichnet. Saumzellen können ihre sekretorische Aktivität zurückgewinnen und sind an regulatorischen Prozessen der Knochenhomöostase beteiligt (Florencio-Silva et al., 2015). Osteoblasten, welche vollständig von mineralisierter Matrix umgeben sind, entwickeln sich zu Osteozyten. Diese sind über Zellfortsätze und *gap junctions* miteinander verbunden und bilden ein Kommunikationsnetzwerk innerhalb des Knochens. Osteozyten sorgen für den Erhalt der Knochenmatrix und die Calciumhomöostase (Buck und Dumanian, 2012). Zudem besitzen sie mechanosensitive Eigenschaften (Clarke, 2008). Ferner beeinflussen sie das Differenzierungsverhalten anderer Knochenzellen sowie Alterungsprozesse des Knochens (Ding et al., 2022). Das Gegenstück zu den knochenbildenden Zellen bilden die Osteoklasten. Es handelt sich um mehrkernige Riesenzellen, welche Knochenmatrix abbauen und in flachen Vertiefungen (Howship Lakunen) der Knochenoberfläche aufliegen. Die Entwicklung und Funktion der Osteoklasten werden im Kapitel 1.3 tiefergehend beleuchtet.

Trotz scheinbarer Unveränderlichkeit auf makroskopischer Ebene imponiert Knochengewebe auf mikroskopischer Ebene durch erhebliche Dynamik. Infolge kontinuierlichen Umbaus (*Remodeling*) wird alter Knochen ersetzt, kleinere Defekte repariert und die Homöostase des Calciumhaushalts aufrechterhalten (Eriksen, 2010). Dieser Prozess wird in Abbildung 1 schematisch dargestellt. Dabei bilden Osteoklasten und Osteoblasten eine funktionelle Einheit. Zunächst baut ein Osteoklast das zu ersetzende Material in Form eines Resorptionstunnels (*cutting cone*) ab. In diesen wandern Osteoblasten sowie kleine Blutgefäße ein und bilden neue Matrix (Buckwalter et al., 1996). Der Knochenumbau unterliegt einer mechanischen und biochemischen Regulation. Mechanische Kräfte bewirken eine Freisetzung von anabolen Signalmolekülen, beispielsweise (bspw.) Prostaglandinen, Stickstoffmonoxid oder *insulin-like growth factor 1* aus den Osteozyten, welche die Osteogenese stimulieren.

Verminderte mechanische Belastung induziert hingegen die Inhibition von Osteoblasten über die Sekretion von u. a. Sclerostin aus Osteozyten (Florencio-Silva et al., 2015). Biochemisch wird der Knochenstoffwechsel sowohl lokal durch Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren als auch durch systemische Botenstoffe reguliert. Als Mediatoren des Calciumstoffwechsels beeinflussen Calcitonin, Vitamin D und das Parathormon direkt den Knochenaufbau beziehungsweise Knochenabbau. Auch andere Hormone, wie Estrogene, Schilddrüsenhormone oder Glukokortikoide, haben anabole und katabole Auswirkungen auf den Knochenstoffwechsel (Buckwalter et al., 1996). Ein Ungleichgewicht in den fein abgestimmten Vorgängen des Knochenbaus manifestiert sich in typischen klinischen Krankheitsbildern wie der Osteoporose, Osteosklerose oder Osteopetrose (Clarke, 2008).

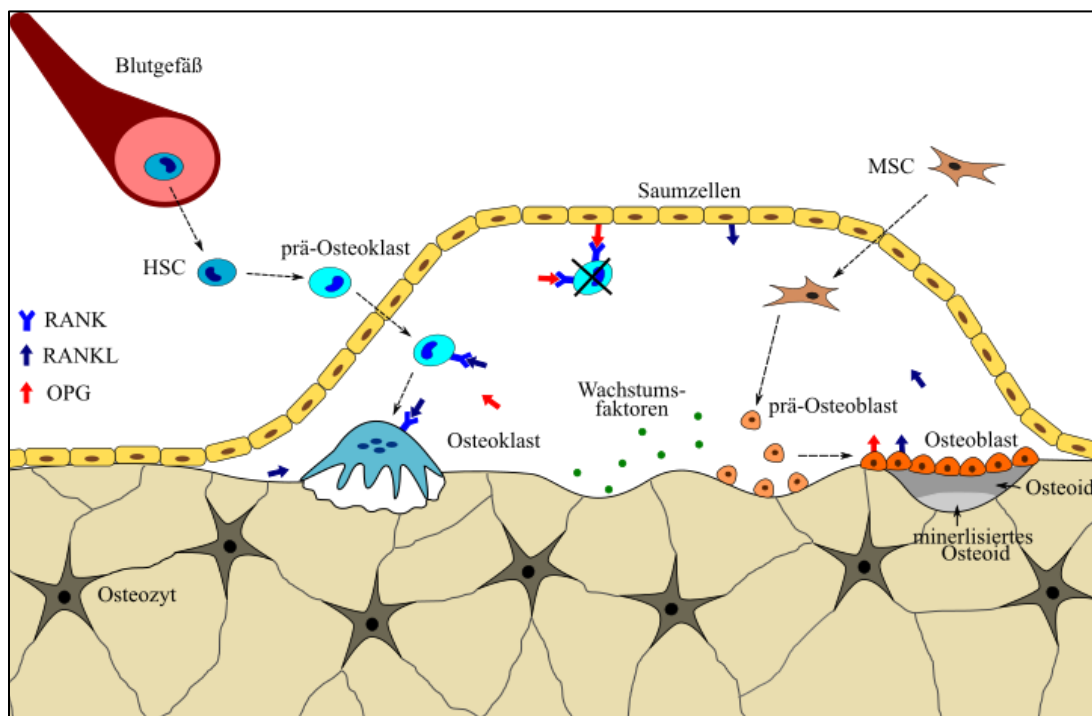


Abbildung 1: Knochen Remodeling

Hämatopoetische Stammzelle (HSC) differenzieren nach Interaktion von receptor activator of nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B-cells (RANK) und receptor activator of nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B-cells ligand (RANKL) zu Osteoklasten. Diese Bindung wird durch Osteoprotegerin (OPG) gehemmt. Mesenchymale Stromazellen (MSC) differenzieren durch Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren zu Osteoblasten.

1.2 Mesenchymale Stromazellen

Mesenchymale Stromazellen (MSC), oftmals auch als mesenchymale Stammzellen bezeichnet, stellen eine heterogene Gruppe multipotenter Vorläuferzellen dar. Erstmals wurden sie im Jahre 1970 aus Knochenmark isoliert, seitdem konnten sie jedoch auch aus einigen weiteren Gewebearten wie Knorpel, Haut, Plazenta, Fettgewebe oder Blut gewonnen werden (Lavrentieva et al., 2013). MSC sind durch ihre hohe Proliferationsrate und ihre Fähigkeit zur Differenzierung in Knochen-, Knorpel- oder Fettgewebe charakterisiert. Im Gegensatz zu anderen Stammzellen sind sie einfach und mit wenigen ethischen Einschränkungen zu isolieren. Daher sind sie von großem Interesse für moderne Therapieansätze in der Geweberekonstruktion, dem so genannten *Tissue Engineering* (TE) (Lavrentieva et al., 2013). Darüber hinaus können MSC auch u. a. neuronales, myogenes oder endotheliales Differenzierungspotenzial aufweisen (Tuan et al., 2003; Witkowska-Zimny und Wrobel, 2011). Aufgrund der Vielzahl an unterschiedlichen Isolations- und Differenzierungsmethoden hat die *International Society for Cellular Therapy* folgende Kriterien für die Definition von multipotenten MSC in vitro festgelegt (Dominici et al., 2006):

1. Adhärenz zu Plastik
2. Expression spezifischer Oberflächenantigene
3. Multipotentes Differenzierungspotenzial

Insgesamt konnte bisher noch kein exklusiv für mesenchymale Stromazellen spezifischer Marker ausgemacht werden. Dementsprechend müssen mehrere Merkmale erfüllt sein, um Zellen als MSC klassifizieren zu können. Auch morphologisch imponieren MSC durch große Heterogenität. Ihre Form kann spindelförmig, fibroblastenähnlich verzweigt, klein und rundlich oder groß und flach erscheinen (Samsonraj et al., 2017). Eine hohe Proliferationsrate sowie die Adhärenz auf Zellkulturplastik erlauben eine unkomplizierte Handhabung und Kultur der MSC. Jedoch weisen auch andere Zellpopulationen, bspw. hämatopoetischen Ursprungs, ähnliche Eigenschaften auf (Li et al., 2016). Das Verfahren der Durchflusszytometrie ermöglicht mittels farbstoffgekoppelter, spezifischer Antikörper gegen Oberflächenantigene die Abgrenzung der MSC von anderen Zelllinien durch positive und negative Selektion auf Basis von Oberflächenmerkmalen, den sogenannten *Cluster of Differentiation* (CD). Mindestens 95 % der Zellen müssen CD105, CD73 und CD90 auf ihrer Oberfläche exprimieren (Dominici et al., 2006).

CD105, auch Endoglin genannt, ist ein Teil des TGF- β -Rezeptorkomplexes (Wong et al., 2000). Die 5'-Nukleotidase CD73 wird in mehreren Organsystemen exprimiert und hat unterschiedliche Funktionen inne (Minor et al., 2019). Das Thy-1-Membran-Glykoprotein gehört zur Superfamilie der Immunglobuline und scheint ebenfalls eine Bedeutung für die osteogene Differenzierung von MSC zu haben (Picke et al., 2018). Angesichts der mangelnden Spezifität dieser Marker müssen MSC auch durch die Abwesenheit hämatopoetischer Oberflächenantigene gekennzeichnet sein. Dazu zählen CD45 als Leukozyten-spezifischer Marker und CD34 als Merkmal primitiver hämatopoetischer Vorläuferzellen und Endothelzellen. Monozyten und Makrophagen sind durch die Expression von CD14 und CD11b charakterisiert. Auch B-Zellen können als adhärenente Zellen in MSC-Kulturen auftreten. Sie weisen jedoch CD79 α und CD19 auf ihrer Oberfläche auf. Charakteristischerweise sind keine HLA-DR-Moleküle auf MSC zu finden, welche der Antigenpräsentation auf Immunzellen dienen (Dominici et al., 2006; Stern und Calvo-Calle, 2009).

Das Differenzierungsverhalten der MSC wird durch interne und externe Faktoren beeinflusst. Zum einen zeigen MSC unterschiedlichen Ursprungs abweichende Entwicklungspräferenzen. Bspw. weisen MSC, welche aus Fettgewebe isoliert wurden, ein geringeres chondrogenes Differenzierungspotenzial auf als MSC aus Knochenmark (Im et al., 2005). Alter und Geschlecht der Spender scheinen auch eine entscheidende Rolle zu spielen. Zum anderen beeinflussen auch physikalische Faktoren das Differenzierungsverhalten der MSC. Z. B. begünstigt mechanische Belastung die Osteogenese, während dynamische Kompression die Expression chondrogener Gene hervorruft (Jagodzinski et al., 2004; Kisiday et al., 2009). Auf molekularer Ebene bestimmt das Zusammenspiel von Hormonen und Transkriptionsfaktoren das Schicksal der MSC. In der osteogenen Differenzierung besitzen hauptsächlich drei Proteine eine Schlüsselrolle: *Runt-related transcription factor 2*, Osterix und BMP (James, 2013).

Die allgemeinen Charakteristika von MSC werden in Abbildung 2 zusammengefasst.

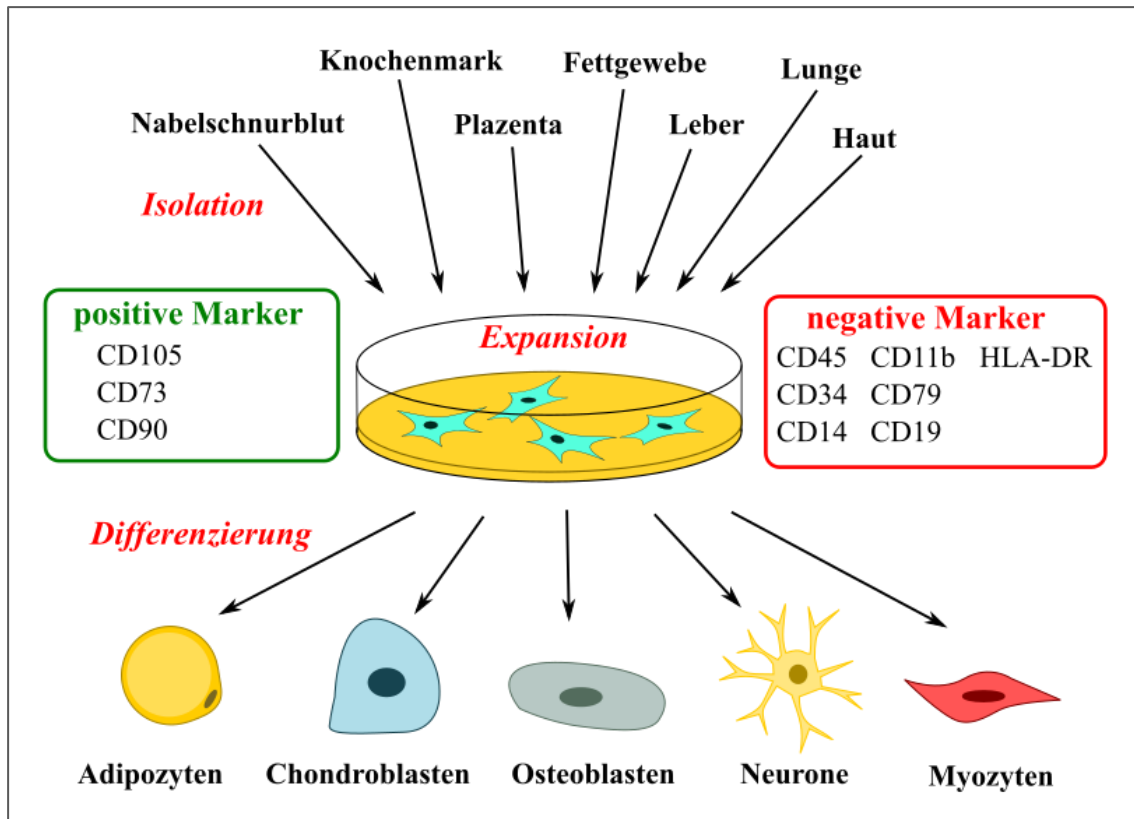


Abbildung 2: Charakteristika mesenchymaler Stromazellen (MSC)
 MSC sind adhärenz zu Zellkulturplastik, weisen spezifische Oberflächenantigene (cluster of differentiation, CD) auf und besitzen ein multipotentes Differenzierungspotential. Frei nach Chen et al. (2016).

1.3 Osteoklasten

Osteoklasten (griechisch „osteon“ Knochen, „klastos“ zerbrochen) sind mehrkernige Riesenzellen, welche neben einer einzigartigen Morphologie durch vielseitige Funktionen über den Knochenabbau hinaus gekennzeichnet sind. Ähnlich den Epithelzellen, kann eine klare Polarisierung der Zelle beobachtet werden. Der apikale Zellpol zeigt in Richtung der Knochenmatrix. In der Peripherie bilden Haftkontakte die so genannte Versiegelungszone, während sich das umgebende Zytoplasma annähernd frei von Zellorganellen präsentiert. Charakteristisch ist die dem Knochen gegenüberliegende Plasmamembran in Mikrovilli-ähnliche Falten gelegt, weshalb sie als Faltenaum oder *ruffled border* bezeichnet wird (Baron, 1989). Der zum Knochenmark gerichtete basolaterale Pol beherbergt die multiplen Nuklei, endoplasmatisches Retikulum, den Golgi-Apparat sowie eine große Zahl von Mitochondrien (Cappariello et al., 2014). Die Polarisierung des Osteoklasten ermöglicht die Unterscheidung mehrerer funktionell unterschiedlicher Zonen. Im Falle der *ruffled border* kann eine äußere

Fusionszone („*fusion zone*“) von einer inneren Aufnahmezone („*uptake zone*“) abgegrenzt werden. In der Fusionszone verschmelzen endosomale und lysosomale Vesikel mit der Plasmamembran, um lysosomale Enzyme freizusetzen oder Ionentransporter in die Zellmembran zu integrieren. Abbauprodukte der Knochenmatrix werden in der Aufnahmezone resorbiert (Cappariello et al., 2014). Über verschiedene Transzytosemechanismen, u. a. Guanosintriphosphat (GTP)-bindende Proteine (G-Proteine) und Mikrotubuli werden die Vesikel zur basolateralen Zellmembran transportiert und in das vaskuläre System freigesetzt. Daher wird dieser Bereich auch als funktionell sekretorische Domäne bezeichnet (Mulari et al., 2003; Cappariello et al., 2014). Eine besondere Bedeutung kommt auch dem Adhäsionsapparat der Osteoklasten in der Versiegelungszone zu. Dieser besteht aus Haftkontakten, den Podosomen, und erlaubt eine feste, aber dynamisch regulierte Verankerung der Zelle an der Knochenmatrix. In frühen Phasen der Osteoklastogenese liegen die Podosomen als einzelne Strukturen oder in Clustern vor, in reifen Osteoklasten hingegen bilden sie einen ringförmigen Gürtel in der Peripherie des Osteoklasten. Die wichtigsten Bestandteile der Podosomen bilden u. a. Aktinfilamente, Adhäsionsproteine, Tyrosinkinase, Adapterproteine, Signalproteine und Integrinrezeptoren. Daher erfüllen sie nicht nur eine Haftfunktion, sondern spielen eine fundamentale Rolle in der Migration und Mechanosensitivität der Osteoklasten (Schachtner et al., 2013). Der durch die Podosomen geformte Aktinring ist ein exklusives Merkmal adhärenter, resorbierender Osteoklasten und stellt daher ein phänotypisches Charakteristikum dar (Väänänen, 2005).

1.3.1 Osteoklastogenese

Osteoklasten entspringen der hämatopoetischen Zelllinie. Hämatopoetische Stammzellen (HSC) des Knochenmarks entwickeln sich zu multipotenten Vorläuferzellen, welche sich jedoch nicht mehr selbst regenerieren können. Aus diesen differenzieren sich entweder die Vorläuferzellen der Megakaryozyten und Erythrozyten, der Lymphozyten oder der myeloischen Zelllinie (Seita und Weissman, 2010). Osteoklasten entwickeln sich aus den myeloischen Vorläuferzellen und sind Teil des mononukleär-phagozytären Systems (Ono und Nakashima, 2018). Monozyten und Makrophagen sind in nahezu allen Gewebearten des Körpers anzutreffen. Osteoklasten hingegen sind ausschließlich im Knochen lokalisiert. Daher wird angenommen, dass die Differenzierung der Vorläuferzellen zu

reifen Osteoklasten direkt im Knochen induziert wird (Rodan und Martin, 1981). Als zentrales Signalmolekül wurde das von Osteoblasten und Osteozyten exprimierte Protein *receptor activator of nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B-cells* (NF- κ B) *ligand* (RANKL) identifiziert (Suda et al., 1999). Bindet RANKL an den auf der Osteoklastenoberfläche lokalisierte *receptor activator of NF- κ B* (RANK), wird die Osteoklastogenese induziert. Als Gegenspieler fungiert der lösliche Rezeptor Osteoprotegerin (OPG), da er im Vergleich zu RANK eine höhere Affinität zu RANKL aufweist und deren Interaktion inhibiert (Ono und Nakashima, 2018). Durch die Bindung von RANKL an RANK wird eine intrazelluläre Signalkaskade angestoßen. Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und des MAP (*mitogen-activated-protein*)-Kinase-Signalwegs resultiert in einer gesteigerten Expression des *nuclear factor of activated T-cells* (NFATc1) (Yamashita et al., 2007). NFATc1 ist der zentrale Transkriptionsfaktor der Osteoklastogenese und ist für die Expression einer Vielzahl osteoklastenspezifischer Gene wie *dendritic cell-specific transmembrane protein* (DC-STAMP), *osteoclast-stimulatory transmembrane protein* (OC-STAMP), tartratresistente saure Phosphatase 5 (TRAP), Calcitoninrezeptor (CTR) oder Cathepsin K (CtsK) verantwortlich. Weiterhin verfügt NFATc1 über die Fähigkeit zur Autoamplifikation (Takayanagi et al., 2002; Kim et al., 2008; Ono und Nakashima, 2018). Im Rahmen dieser Autoamplifikation liegt NFATc1 in einem inaktiven, phosphorylierten Zustand im Zytosol vor. Erst nach seiner Dephosphorylierung durch das Enzym Calcineurin kann er funktionsfähig in den Nukleus translozieren (Hirotsani et al., 2004). Der *osteoclast-associated immunoglobulin-like receptor* (OSCAR) bewirkt über die Aktivierung der Phospholipase C (PLC) und dem IP₃/DAG (Insositoltriphosphat/Diacylglycerin)-Signalweg eine Freisetzung von Calcium aus dem glatten endoplasmatischen Retikulum. Dies resultiert in der Aktivierung von Calcineurin (Ono und Nakashima, 2018).

NFATc1 unterliegt auch einer negativen Regulation. Neben der Inhibition des RANKL-Signalweges durch OPG zeigen Moleküle wie der Interferon-regulatorische Faktor (IRF) 8 oder Transkriptionsfaktoren wie *B cell lymphoma 6* (Bcl6) und *lymphoma-related factor* einen suppressiven Effekt auf die Osteoklastogenese (Tsuji-Takechi et al., 2012; Ono und Nakashima, 2018; Zhao et al., 2009). Abbildung 3 gibt einen Überblick über die komplexen Regulationsmechanismen der Osteoklastendifferenzierung.

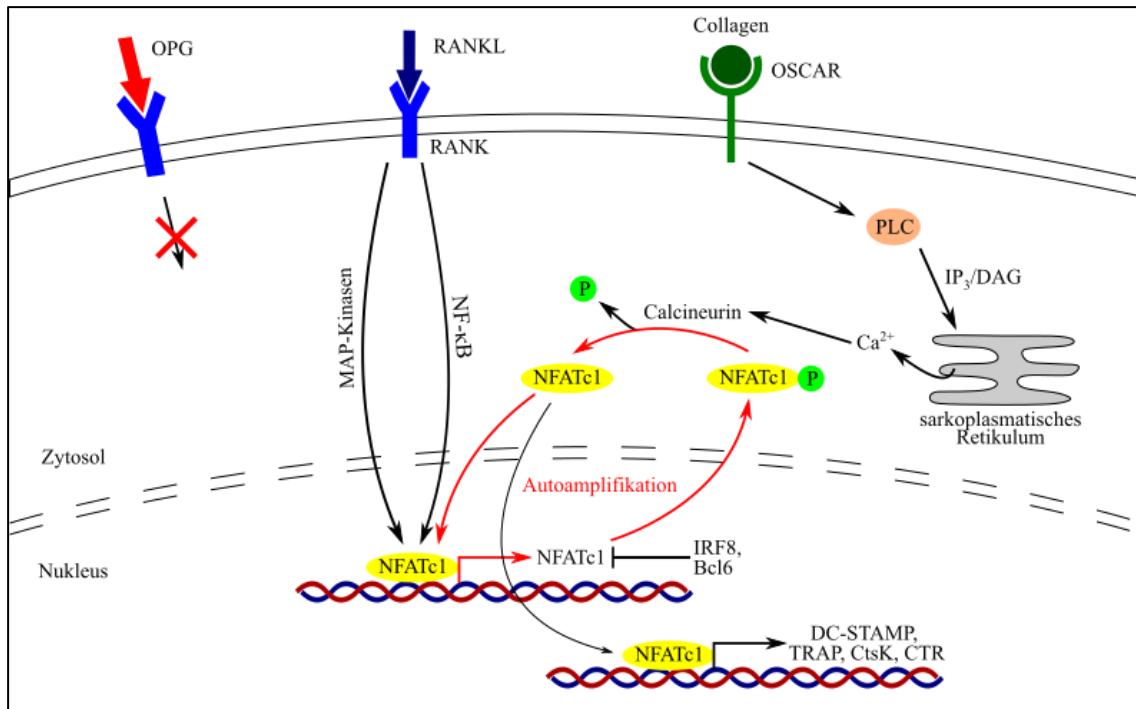


Abbildung 3: Regulation der Osteoklastogenese

nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B-cells (NF-κB), receptor activator of NF-κB (RANK), receptor activator of NF-κB ligand (RANKL), Osteoprotegerin (OPG), mitogen-activated-protein (MAP)-Kinase, nuclear factor of activated T-cells (NFATc1), osteoclast-associated immunoglobulin-like receptor (OSCAR), Phospholipase C (PLC), Inositoltriphosphat/Diacylglycerin (IP₃/DAG), Interferon-regulatorische Faktor 8 (IRF8), B cell lymphoma 6 (Bcl6), dendritic cell-specific transmembrane protein (DC-STAMP), osteoclast-stimulatory transmembrane protein (OC-STAMP), tartratresistente saure Phosphatase (TRAP), Calcitoninrezeptor (CTR), Cathepsin K (CtsK), Calcium-Ionen (Ca²⁺), Phosphat (P)

Fortgeschrittene Stadien der Osteoklastenentwicklung zeichnen sich durch die Fusion von kleinen, einkernigen Vorläuferzellen zu mehrkernigen Riesenzellen aus. Diese Größenzunahme ermöglicht den Einschluss eines größeren Oberflächenareals innerhalb der Versiegelungszone und damit eine effizientere Resorption (Ono und Nakashima, 2018). Die Fusion der Zellmembranen ist durch eine Umverteilung der in der Doppellipidschicht enthaltenen Phospholipide charakterisiert. Gewöhnlich wird das innere Blatt der Doppellipidschicht durch Phosphatidylinositol, Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamin gebildet, während Phosphatidylcholin und Sphingomyelin vorwiegend in der äußeren Schicht zu finden sind. Die Umorganisation dieser asymmetrischen Anordnung erfolgt bei diversen zellulären Vorgängen wie der Apoptose oder der Thrombozytenaggregation (Zachowski, 1993; Chaurio et al., 2009). Zwar sind die genauen Mechanismen noch weitestgehend unklar, jedoch scheinen insbesondere Phospholipide eine entscheidende Rolle bei der Osteoklastenfusion zu spielen. Die

Externalisierung bestimmter Phospholipide, z.B. Phosphatidylethanolamin, in das äußere Blatt der Doppellipidschicht, vor allem in den Filopodien, ist für das Verschmelzen der Zellmembranen essenziell (Irie et al., 2017; Verma et al., 2018). Weiterhin sind auch osteoklastenspezifische Gene wie DC-STAMP und OC-STAMP von Bedeutung. Ein Fehlen dieser Gene führt zur Abwesenheit multinukleärer Zellen und zu einer eingeschränkten Resorptionsaktivität (Kukita et al., 2004; Yagi et al., 2005; Miyamoto et al., 2012).

1.3.2 Molekulare Mechanismen der Knochenresorption

Unabdingbar für die Resorptionsaktivität der Osteoklasten ist die Versiegelungszone. In dieser ist die Zellmembran über Haftkontakte fest auf der Knochenoberfläche verankert, sodass das unter dem Osteoklasten befindliche Kompartiment von der Umgebung separiert vorliegt. In dieser Resorptionslakune werden anorganische Matrixkomponenten durch eine Ansäuerung des pH-Wertes degradiert und organische Komponenten enzymatisch gespalten, weshalb sie auch als extrazelluläres Lysosom bezeichnet wird (Ono und Nakashima, 2018; Vaes, 1970).

An der Aufrechterhaltung des sauren Milieus sind verschiedene Transportproteine und Ionenkanäle beteiligt. Vakuoläre-ATPasen (V-ATPasen) und der Chloridkanal Typ 7 (ClC-7) sind in der Zellmembran des Faltsaumes lokalisiert. V-ATPasen sezernieren Wasserstoffionen (H^+) unter Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP) (Baron et al., 1985; Supanchart und Kornak, 2008; Blair et al., 1989). Um elektrochemischen Ausgleich zu schaffen, werden negativ geladene Chloridionen (Cl^-) über den ClC-7 in die Resorptionslakune geschleust (Blair et al., 1991; Kornak et al., 2001). Voraussetzung für die Sekretion der Ionen ist ihr intrazelluläres Vorkommen in ausreichender Konzentration. Das Enzym Carboanhydrase 2 (CA2) katalysiert die Reaktion von Kohlenstoffdioxid zu Kohlensäure (H_2CO_3), welche zu Hydrogencarbonat (HCO_3^-) und H^+ dissoziiert. HCO_3^- wird an der basolateralen Membran im Austausch gegen Cl^- nach extrazellulär abgegeben, um eine Alkalisierung des Zytoplasmas zu verhindern (Blair et al., 1991; Teti et al., 1989).

Neben der Zersetzung der mineralisierten Knochenmatrix bewirkt die Azidifikation der Resorptionslakune die Aktivierung saurer Hydrolasen, welche vom Osteoklasten sezerniert wurden. Die prominentesten Vertreter sind u. a. die Cysteinprotease CtsK oder

die TRAP. CtsK ist maßgeblich am Abbau von Kollagen Typ 1 beteiligt. Die TRAP und ihre osteoklastenspezifischen Isoform TRAP5b katalysieren in der sogenannten Fenton-Reaktion die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, welche wiederum eine Rolle für den Abbau organischer Matrixbestandteile spielen. Zudem dephosphoryliert die TRAP Matrixproteine, welche für die Adhäsion der Osteoklasten mitverantwortlich sind. Dadurch wird eine Migration der Zelle ermöglicht. Auch Matrix-Metalloproteinasen (MMP) werden von Osteoklasten synthetisiert und degradieren Proteine der extrazellulären Matrix (Ishibashi et al., 2001; Ono und Nakashima, 2018; Halleen et al., 1999; Bull et al., 2002; Fenton, 1894; Ek-Rylander und Andersson, 2010). Abbildung 4 stellt die molekularen Vorgänge der Knochenresorption dar.

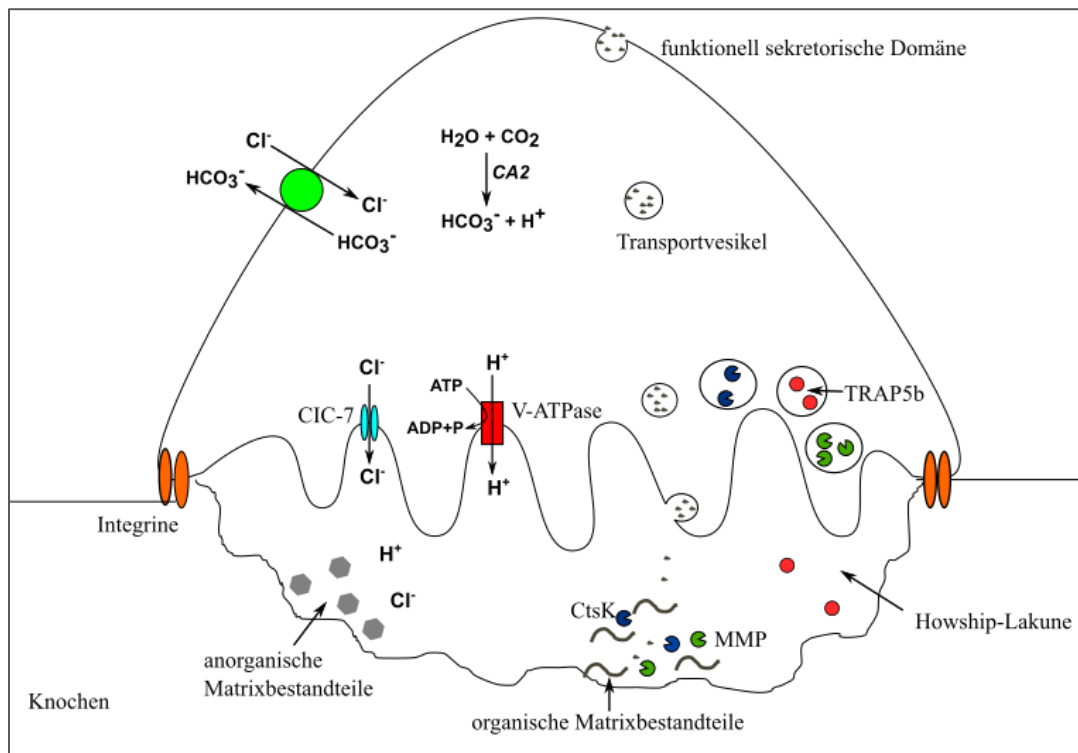


Abbildung 4: Molekulare Mechanismen der Osteoklastenfunktion

Cathepsin K (CtsK), Matrix-Metalloproteinasen (MMP), Hydrogencarbonat (HCO_3^-), Wasserstoff-Ion (H^+), Vakuoläre-ATPasen (V-ATPasen), Chloridkanal Typ 7 (CIC-7), Chloridionen (Cl^-), Carboanhydrase 2 (CA2), tartratresistente saure Phosphatase 5b (TRAP5b), Adenosintriphosphat (ATP), Adenosindiphosphat (ADP), Phosphat (P)

1.4 Osteochondrale Läsionen

Osteochondrale Läsionen (OL) betreffen sowohl den hyalinen Gelenkknorpel als auch den darunter befindlichen subchondralen Knochen. Da Osteoarthritis, traumatische Ereignisse und die Osteochondritis dissecans (OCD) als häufigste Ursachen identifiziert werden, sind OL in allen Altersgruppen anzutreffen (Gorbachova et al., 2018). Die Osteoarthritis ist die häufigste Gelenkerkrankung weltweit. Im Jahr 2017 waren 303 Millionen Menschen weltweit von ihr betroffen (Kloppenburger und Berenbaum, 2020). In Deutschland liegt die 12-Monats-Prävalenz bei 17,9 % der erwachsenen Bevölkerung. Bei Männern über 65 Jahren sind es sogar mehr als 30 %, bei Frauen über 65 Jahren leidet jede Zweite an Osteoarthritis (Fuchs et al., 2017). Die OCD ist seltener und betrifft vorrangig jüngere männliche Patienten (Kessler et al., 2014). Aufgrund von Schmerzen und Instabilität des betroffenen Gelenkes gehen OL mit einer deutlich reduzierten Lebensqualität und einer Beeinträchtigung der Arbeitsfähigkeit einher, was erhebliche sozioökonomische Folgen mit sich bringt (Hunter und Bierma-Zeinstra, 2019). Allein die Osteoarthritis verursacht in hochentwickelten Ländern Kosten in Höhe von 1 % bis 2,5 % des Bruttosozialprodukts (Hunter et al., 2014). Insbesondere im Kontext einer alternden Gesellschaft und des ungesunden westlichen Lebensstils stellen OL eine wachsende Herausforderung für das Gesundheitssystem dar (Vina und Kwok, 2018; Cui et al., 2020).

1.4.1 Biomechanik der osteochondralen Einheit

Die osteochondrale Einheit umfasst den oberflächlich gelegenen Gelenkknorpel und den tiefer liegenden subchondralen Knochen. Hyaliner Knorpel ist frei von Nerven und Gefäßen und besteht überwiegend aus extrazellulärer Matrix, welche aus Wasser, Proteoglykanen und Kollagen Typ 2 zusammengesetzt ist. Diese wird von Chondrozyten gebildet, die jedoch nur einen kleinen Teil der Knorpelmasse ausmachen (Jacob et al., 2020). Der Gelenkknorpel wird in vier unterschiedliche Zonen unterteilt, welche sich durch eine einzigartige Anordnung der Kollagenfibrillen, Zellen und Matrixzusammensetzung auszeichnen: die oberflächliche Tangentialzone, darunter die Übergangszone und darunter die Radiärzone. Die dem Knochen aufliegende Schicht des Knorpels enthält Calciumphosphatkristalle, weshalb sie auch als Mineralisierungszone

bezeichnet wird. Die Grenze zwischen mineralisierten und unmineralisierten Knorpel wird Grenzlinie (engl. „*tidemark*“) genannt (Fox et al., 2009). In Abbildung 5 wird die Anatomie der osteochondralen Einheit schematisch dargestellt.

Die Struktur des subchondralen Knochens ist sehr variabel und hängt stark von der mechanischen Belastung des entsprechenden Gelenkabschnitts ab. Unmittelbar unter dem Knorpel imponiert der Knochen als dichte Platte aus lamellarem Knochengewebe. Darunter ist die subartikuläre Spongiosa anzutreffen, welche Knochenmark enthält und deren Knochentrabekel entlang der Belastungslinien angeordnet sind. Der Übergang des Knorpels zum Knochen wird als Zementlinie bezeichnet. Dabei handelt es sich nicht um eine plane Fläche, sondern vielmehr um eine unregelmäßige Verzahnung der beiden Gewebearten (Madry et al., 2010).

Im Zusammenspiel ihrer einzelnen Schichten erfüllt die osteochondrale Einheit mehrere Aufgaben, welche essenziell für eine einwandfreie Funktion des Bewegungsapparates sind. Die Knorpelzone ist großen Krafteinwirkungen ausgesetzt. Dazu zählen neben der Kompressionskraft durch die lasttragende Funktion des Gelenkes auch Reibung und Scherkräfte (Fox et al., 2009). Durch seine viskoelastische Beschaffenheit kann der Knorpel diesen Ansprüchen gerecht werden. Unter wechselnden Belastungen strömen Wasser aus dem Gewebe aus und ein, weshalb es durch dauerhafte Beanspruchung an Elastizität verliert (Jacob et al., 2020). Die Versorgung des avaskulären Knorpels wird einerseits über die Synovialflüssigkeit, andererseits über den subchondralen Knochen sichergestellt. Kleine arterielle und venöse Gefäße sowie Nerven reichen bis in die Mineralisierungszone hinein. Zudem beherbergt der subchondrale Knochen nozizeptive Nervenendigungen, gewährleistet mechanische Stabilität und dämpft bis zu 30 % der bei Bewegung entstehenden Belastung des Gelenkes (Jacob et al., 2020; Madry et al., 2010).

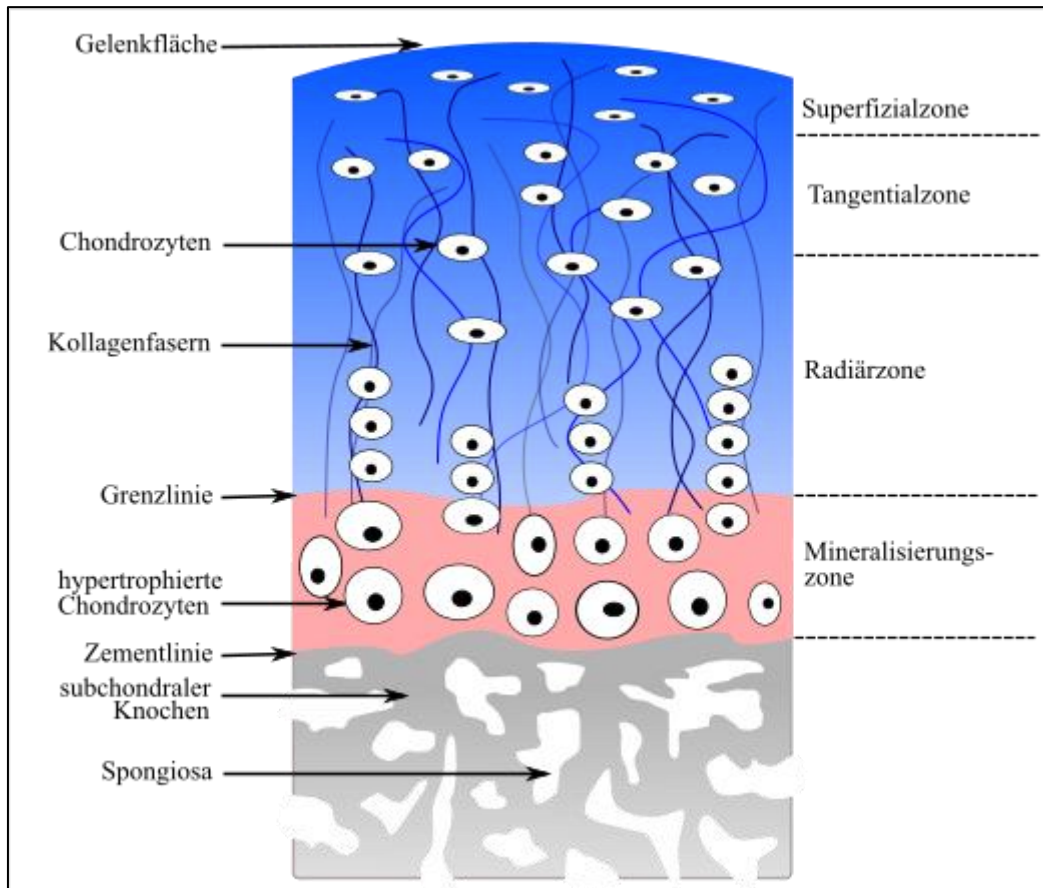


Abbildung 5: Anatomie der osteochondralen Einheit

1.4.2 Pathologien des subchondralen Knochens

Verletzungen des subchondralen Knochens können durch unterschiedliche Ursachen auftreten.

Traumatische Verletzungen, welche nicht nur den Gelenkknorpel, sondern auch den darunter befindlichen Knochen betreffen, werden als osteochondrale Defekte bezeichnet. Dadurch ergeben sich profunde Unterschiede zu reinen chondralen Läsionen. Einerseits resultiert die Beteiligung des Knochens in mechanischer Instabilität des Gelenks. Andererseits ermöglicht die Eröffnung einer Verbindung zum Knochenmark spontane Heilungsprozesse (Madry et al., 2010). Ausgeschüttete Wachstumsfaktoren induzieren die Differenzierung eingewanderter pluripotenter mesenchymaler Stromazellen zu Osteoblasten und Chondroblasten. Jüngere Untersuchungen legen auch eine Aktivierung residierender chondrogener Stammzellen aus dem angrenzenden gesunden Knorpel nahe (Nelson et al., 2014). Chondroblasten produzieren ein faserknorpeliges Ersatzmaterial,

welches sich im Gegensatz zu hyalinem Knorpel überwiegend aus Kollagen Typ 2 zusammensetzt und nicht die gleichen viskoelastischen Eigenschaften besitzt (Shapiro et al., 1993; Madry et al., 2010). Neu gebildeter Faserknorpel bedeckt und schützt die Läsionsränder, jedoch zeigt er bereits nach wenigen Monaten erste Abnutzungserscheinungen und scheint nicht die gleiche Stabilität bieten zu können wie gesunder hyaliner Knorpel (Jackson et al., 2001; Shapiro et al., 1993; Madry et al., 2010). Die Heilung des subchondralen Knochens erfolgt nach dem Prinzip der enchondralen Ossifikation. Im Anschluss an die initiale Bildung eines fibrösen Pfropf besiedeln hypertrophe Chondrozyten die Ränder des Defekts. Der von ihnen gebildete Knorpel wird mineralisiert und im Laufe der Zeit von Osteoklasten abgebaut. Osteoblasten bilden an gleicher Stelle neues Knochengewebe (Lydon et al., 2019).

Die Spontanheilungsfähigkeit osteochondraler Defekte hängt von ihrer Größe und der lokalen Belastung ab. Die Stabilität des subchondralen Knochens scheint einen ausschlaggebenden prognostischen Faktor darzustellen. Ist dieser zu stark geschädigt, führt dies zu einer Vergrößerung des Defekts und einer Schädigung des umliegenden Knochen- und Knorpelgewebes (Jackson et al., 2001; Lydon et al., 2019).

Die Osteochondritis dissecans bezeichnet eine atraumatische Ablösung von Knorpel-Knochen-Anteilen, die meist das Kniegelenk betrifft, grundsätzlich aber in jedem Gelenk auftreten kann. Die Namensgebung erfolgte bereits 1888 durch den deutschen Chirurgen Franz König, welcher von einer spontanen Osteonekrose des subchondralen Knochens als Ursache für die Dissektion ausging. Obwohl der Name ein Entzündungsgeschehen nahelegt, konnten inflammatorische Prozesse im Rahmen der Ätiologie nicht nachgewiesen werden (König, 1888). Neben genetischen Einflüssen scheinen Ischämien und anatomische Anomalien zu einer Nekrose zu führen, welche bei verzögerter Heilung das Auftreten einer OCD zu begünstigen (Madry et al., 2010).

Auch andere Ursachen können eine Nekrose des subchondralen Knochens und die damit einhergehende Instabilität und Dysfunktion der osteochondralen Einheit hervorrufen. Eine Osteonekrose kann primär idiopathischen Ursprungs oder eine sekundäre Komplikation anderer Grunderkrankungen sein. Dazu zählen u. a. Osteoporose, systemische Steroidtherapie, Alkoholabusus oder systemischer Lupus erythematodes (Madry et al., 2010).

Wenngleich die Osteoarthritis (OA), auch Arthrose genannt, vorrangig als Erkrankung des Gelenkknorpels angesehen wird, hat der subchondrale Knochen erheblichen Einfluss auf Pathogenese und Prognose des Krankheitsbildes. Bereits im Anfangsstadium der OA finden Umbauprozesse im subchondralen Knochen statt, welche sich in der Bildung von Osteophyten sowie subchondraler Sklerosierung und Verdickung der subchondralen Knochenplatte ausdrücken. Weiterhin verursachen kleinste Frakturen, Ödeme und Einblutungen die Bildung der für OA typischen Zysten (Loeser et al., 2012). In fortgeschrittenen Stadien kann dies im Zusammenbruch des subchondralen Knochens, Deformationen und dadurch zusätzlichen Verschleiß des Gelenkknorpels resultieren. Die Arthrose betrifft folglich die gesamte osteochondrale Einheit (Madry et al., 2010; Loeser et al., 2012).

1.4.3 Therapie osteochondraler Läsionen

Osteochondrale Defekte können mechanische (z. B. Überbelastung oder Traumata) oder biologische Ursachen (z. B. Osteochondritis dissecans) haben und führen zu Schmerzen, Schwellung und Funktionseinschränkung des Gelenks. PatientInnen mit osteochondralen Defekten des Kniegelenks sind in ihrer Lebensqualität in ähnlichem Maße eingeschränkt wie PatientInnen, welche eine Totalendoprothese des Kniegelenks benötigen (Heir et al., 2010). Der natürliche Heilungsprozess führt meist zur Bildung von Faserknorpel, welcher im Gegensatz zum hyalinen Knorpel, der mechanischen Belastung nicht dauerhaft standhalten kann und einen weiteren Verschleiß des Gelenks begünstigt. Dementsprechend ist ein konservativer Therapieansatz bei tiefen, großflächigen sowie instabilen Defekten oft unzureichend (Howell et al., 2021). In der chirurgischen Praxis sind verschiedene Herangehensweisen zur Behandlung osteochondraler Defekte etabliert. Ziel aller chirurgischen Interventionen ist vorrangig die Linderung der Symptome sowie die Kongruenz der Gelenkflächen zu erhalten, um verstärkter Abnutzung vorzubeugen (Howell et al., 2021).

Ist bei osteochondralen Defekten ein Fragment von mindestens 1 Quadratzentimeter (cm^2) Oberfläche vorhanden, kann durch Refixierung des Fragments ein sehr gutes Ergebnis erzielt werden. Dies kann durch arthroskopisches oder offen operatives Einbringen kopfloser Schrauben oder Nägel aus Metall oder bioresorbierbaren Materialien geschehen (Howell et al., 2021; Jacob et al., 2020).

Insbesondere bei mittelgradigen Knorpeldefekten ohne Beteiligung des subchondralen Knochens ist die arthroskopische Chondroplastik ein beliebtes Verfahren. Dabei werden die Ränder des Defekts mit einem Shaver oder mit Radiofrequenzablation geglättet. Dadurch soll Reibung reduziert und der verbleibende Knorpel stabilisiert werden. Chondroplastik bewirkt kurzfristig eine Symptomlinderung, langfristig jedoch keine ausreichende Heilung des Defekts (Howell et al., 2021).

Eine weitere Therapieoption bei Defekten ohne direkte Beteiligung des Knochens bietet die Knochenmarksstimulation durch Anbohren oder Mikrofrakturierung. Dabei wird der subchondrale Knochen aufgebrochen, was eine Einwanderung von mesenchymalen Stammzellen in das Defektareal ermöglicht und eine natürliche Heilung durch Faserknorpel induzieren soll. Dieses Verfahren ist sehr kostengünstig, verzeichnet jedoch auch schlechte Langzeitprognosen und Komplikationen (Howell et al., 2021).

Um die Füllung osteochondraler Läsionen durch hyalinen Knorpel anstatt Faserknorpels herbeizuführen, existieren verschiedene Techniken, mit denen gesunder hyaliner Knorpel transplantiert wird. Es können ein großes oder mehrere kleine Stücke (Mosaikplastik) osteochondralen Gewebes an nicht lasttragenden Stellen, z. B. der interkondylären Kerbe, entnommen und transplantiert werden. Bei großen Läsionen kann, anstelle des patienteneigenen Knorpels im Sinne eines Autografts, ein Allograft aus Leichenknorpel verwendet werden (Howell et al., 2021). Auch eine autologe Chondrozytentransplantation ist möglich. Dazu wird ein kleines Knorpelfragment entnommen. Daraus werden Chondrozyten isoliert, in vitro vermehrt und nach drei bis fünf Wochen an der geschädigten Stelle eingebracht. Auch die autologe Transplantation von MSC wird erprobt. Durch diese Transplantationen werden vielversprechende Ergebnisse erzielt, jedoch sind sie technisch anspruchsvoll sowie kostenintensiv (Howell et al., 2021; Jacob et al., 2020).

Der bisher innovativste Ansatz ist die autologe matrix-induzierte Chondrogenese (AMIC). Dabei wird die Basis der Läsion durch Bohrung oder Mikrofrakturierung angefrischt und ein poröses Scaffold (deutsch: Gerüst) eingelegt. Dabei kann es sich um rein chondrale, als auch um osteochondrale Implantate aus natürlichen oder synthetischen Materialien handeln (Filardo et al., 2020; Deng et al., 2019; Chen et al., 2023). Einerseits bieten die Scaffolds mechanische Stabilität und ermöglichen die Einwanderung sowie Adhäsion von Zellen. Andererseits sind sie biodegradierbar, sodass sie nach erfolgter

Heilung resorbiert werden und keine Entfernung notwendig ist. Die AMIC erzielt auch in langfristig angelegten Studien gute Ergebnisse. Insbesondere osteochondrale Scaffolds stellen eine vielversprechende Therapieoption für tiefe osteochondrale Defekte dar (Filardo et al., 2020; Howell et al., 2021; Kon et al., 2018; Wang et al., 2022b).

1.5 Ersatzmaterialien für den subchondralen Knochen

Auch wenn bei vielen Knorpeldefekten der darunterliegende Knochen nicht unmittelbar geschädigt ist, spielt der subchondrale Knochen eine zentrale Rolle in der Genese und Prognose osteochondraler Defekte. Daher sollte bei der Therapie die gesamte osteochondrale Einheit rekonstruiert werden (Loeser et al., 2012; Deng et al., 2019; Le Yu et al., 2023). Die Entwicklung geeigneter, multiphasischer Implantate ist Gegenstand der aktuellen Forschung. Scaffolds dienen als künstliche extrazelluläre Matrix und sollen die strukturellen und funktionellen Eigenschaften der ursprünglichen extrazellulären Matrix (EZM) widerspiegeln (Nooeaid et al., 2012; Chen et al., 2023). Aufgrund der unterschiedlichen Architektur und biomechanischen Eigenschaften von Knochen und Knorpel stellt dies eine große Herausforderung dar. Multiphasische Implantate sollen die Biomechanik und Architektur der osteochondralen Einheit widerspiegeln (Chen et al., 2023; Le Yu et al., 2023). Der Anteil des Implantats, welcher den subchondralen Knochen ersetzen soll, die sog. Osteophase, muss idealerweise folgende Eigenschaften besitzen (Camarero-Espinosa und Cooper-White, 2017; Danilevicius et al., 2015; Kashirina et al., 2019):

1. Biokompatibilität. Das verwendete Material darf im Kontakt mit dem Gewebe keine toxische Wirkung haben oder sich anderweitig negativ auf Zellen und ihren Stoffwechsel auswirken.
2. Mechanische Stabilität. Der subchondrale Knochen ist in seiner tragenden Funktion großer Druckbelastung ausgesetzt. Dieser muss auch das eingesetzte Scaffold standhalten, ohne sich zu verformen oder einzubrechen.
3. Zellmigration und -adhäsion ermöglichen. Um Defektheilung zu ermöglichen, müssen Blut und Stammzellen in das Scaffold einwandern, adhärieren, proliferieren und sich weiter differenzieren können.

4. Porosität. Der Transport und die Diffusion von Nährstoffen und Metaboliten müssen gewährleistet sein.
5. Bioresorbierbarkeit. Das Implantat muss biologisch abbaubar sein und vom Organismus resorbiert werden können. Die Degradation darf jedoch nicht zu schnell erfolgen, damit die Stabilität des Scaffolds während der Defektheilung erhalten bleibt.

Die Eignung eines Implantats als Knochenersatz wird durch das zugrunde liegende Material, seine Struktur sowie die Herstellungsmethode beeinflusst.

1.5.1 Werkstoffe

Aufgrund ihrer ausgezeichneten mechanischen Stabilität werden traditionell Metalle als Knochenersatzmaterial verwendet. Typischerweise handelt es sich um Titan und seine Legierungen, Edelstahl oder Cobalt-Chrom-Legierungen. Diese sind zellulär gut verträglich, jedoch biologisch inert, d. h. sie interagieren nicht mit dem Gewebe (Deng et al., 2019; Noeaid et al., 2012). Moderne Implantate sind bioaktiv. Dazu eignen sich Beschichtungen mit Biokeramikpartikeln, bspw. Calciumphosphaten oder Hydroxylapatit, welche auch in der anorganischen Matrix des Knochens vorzufinden sind. So kann eine vermehrte Mineralisierung und bessere Verankerung des Implantats erreicht werden (Deng et al., 2019). Auch Magnesiumverbindungen verfügen über gute mechanische und bioaktive Eigenschaften und sind biodegradierbar. Korrosion und Komplikationen bei der Zersetzung stellen jedoch Probleme dar (Deng et al., 2019).

Biokeramik oder Bioglass können je nach Zusammensetzung biologisch inert, bioaktiv oder bioresorbierbar sein. Vor allem Hydroxylapatit oder Tricalciumphosphat werden in Forschung und Klinik vielfach als Knochenersatzmaterial eingesetzt. Sie fördern die Mineralisation und wirken osteogen, weshalb sie hervorragend in das umliegende Knochengewebe integriert werden. Nachteilig sind jedoch die hohe Brüchigkeit und Steifigkeit der Materialien (Deng et al., 2019; Noeaid et al., 2012; Lesage et al., 2022).

Auch Polymere können zur Herstellung von Implantaten verwendet werden. Dabei kann es sich um natürliche oder synthetische Polymere handeln. Die natürlichen Polymere wie Kollagen, Hyaluronsäure oder Glykosaminoglykane sind regelhafte Bestandteile der EZM des Knochengewebes. Dadurch sind sie nicht nur zellulär sehr gut verträglich,

sondern besitzen molekulare Domänen, welche Zelladhäsion und Proliferation begünstigen (Nooeaid et al., 2012; Chen et al., 2023). Nachteilig wirken sich jedoch ihre große Elastizität und Weiche sowie Verunreinigungen und Immunogenität für den Ersatz von Knochenmaterial aus (Nooeaid et al., 2012; Deng et al., 2019).

Aus synthetischen Polymeren können Implantate mit passgenauen biomechanischen Charakteristika hergestellt werden. Je nach ihrer chemischen Beschaffenheit haben synthetische Polymermaterialien verschiedene Eigenschaften. Zudem sind synthetische Polymere in großen Mengen verfügbar und leicht zu verarbeiten. Häufig verwendete, sowie von der amerikanischen *Food and Drug Administration* (FDA) zugelassene Polymere sind Polycaprolacton (PCL), Polylactat (PLA), Polylactid-co-Glycolid (PLGA) oder Polyurethan (PU). PCL zeichnet sich durch seine hohe Widerstandsfähigkeit und Stabilität aus, verfügt jedoch über eine geringe Degradationsrate. Aufgrund seiner Hydrophobie erschwert es jedoch Zelladhäsion und Proliferation (Bharadwaz und Jayasuriya, 2020; Bisht et al., 2021). Lactat-Polymere (PLA) finden vielseitige Anwendungen in Medizin und Pharmazie. Lactat ist ein Dimer, welches in verschiedenen Stereoformen vorliegen kann: D,D-Lactid, L,L-Lactid oder D,L-Lactid (Kashirina et al., 2019). Lactat ist ubiquitär im Körper vorhanden, daher ist PLA ausgezeichnet biokompatibel und biodegradierbar. Für den Einsatz als Knochenersatzmaterial fehlt reinem PLA ebenso wie PLGA jedoch die notwendige mechanische Stabilität. PU hingegen erscheint sowohl biokompatibel als auch biomechanisch geeignet (Bharadwaz und Jayasuriya, 2020; Ramot et al., 2016).

Um die individuellen Stärken der Materialien zu nutzen und Schwächen auszugleichen, werden verschiedene Biomaterialien miteinander kombiniert. Polymerscaffolds, welche mit anorganischen Partikeln beschichtet werden, stellen einen beliebten und vielversprechenden Ansatz dar (Chen et al., 2023). So wird z. B. PLGA mit günstigem Degradationsverhalten mit osteoinduktiven Hydroxylapatitpartikeln kombiniert oder die hervorragenden biomechanischen Eigenschaften von PCL durch eine Beschichtung mit biologisch ausgezeichnet kompatibel und aktiven Tricalciumphosphat ergänzt (Bisht et al., 2021; Lesage et al., 2022). Auch die Synthese von Co-Polymeren natürlichen und/oder synthetischen Ursprungs ist möglich. Ein Beispiel ist die Kombination von Lactid und Caprolacton Monomeren in Form von Poly-((D,L)-Lactid- ϵ -Caprolacton)-dimethacrylat (LCM). Durch die osteoinduktiven Eigenschaften und die mechanische Stabilität des PCLs in Verbindung mit dem günstigen Degradationsverhalten von PLA kann

eine gute Biokompatibilität erreicht werden (Hauptmann et al., 2019; Vertenten et al., 2009). Über das Verhältnis der Komponenten lassen sich die physikalischen und biologischen Beschaffenheiten des Werkstoffs variieren und an die jeweiligen Anforderungen anpassen. Je höher der Anteil des Lactids, desto steifer und hydrophiler das Material und desto höher ist seine Degradationsrate (Hauptmann et al., 2019).

1.5.2 Struktur und Geometrie

Neben dem Material, aus welchem ein Knochenersatzmaterial besteht, beeinflussen auch die räumliche Struktur und Geometrie seine biomechanischen und biophysikalischen Eigenschaften. Die Porosität ist dabei ein häufig verwendeter Begriff. Jedoch kann die Biokompatibilität eines Implantats durch weitaus mehr architektonische Parameter beeinflusst werden. Dabei kann die Architektur des Scaffolds auf unterschiedlichen Größenebenen betrachtet werden (Gariboldi und Best, 2015; Ebrahimi, 2021).

Die kleinste Ebene stellt die Topographie der Oberfläche dar. Diese basiert überwiegend auf der Oberflächenrauheit und der sogenannten Mikroporosität. Letztere bezeichnet das Vorliegen von Poren mit einem Durchmesser von weniger als 10 μm , welche offen, mit Kontakt zur Oberfläche, oder geschlossen, als abgeschlossene Hohlräume sein können. Geschlossene Poren beeinflussen zwar nicht die Oberflächenstruktur, sind jedoch für mechanische Eigenschaften von Bedeutung. Ebenso scheint das Vorliegen von Mikroporen eine osteoinduktive Wirkung zu haben (Gariboldi und Best, 2015; Zhang et al., 2018a). Die Topographie spielt insbesondere für Zelladhäsion eine wichtige Rolle, die Studienlage zu ihrem genauen Einfluss ist jedoch widersprüchlich. Auch unterscheiden sich *in vitro* Untersuchungen von *in vivo* Studien. Es wird vermutet, dass eine erhöhte Mikroporosität Zellausläufern vermehrte Verankerungsflächen bietet und somit vornehmlich die initiale Zellanhaftung sowie Zellmigration in das Scaffold fördert (Gariboldi und Best, 2015; Zhang et al., 2018a). Zudem steigert die Rauigkeit der Oberfläche die Adsorption von Serumproteinen. Diese haben Einfluss auf Adhäsion und Proliferation von Zellen sowie die Vaskularisation (Gariboldi und Best, 2015).

Darüber hinaus ist die Analyse von Größe und Geometrie der Makroporen geboten. Die Porosität hat Auswirkungen für die mechanischen Eigenschaften des Materials. Eine hohe Porosität ermöglicht die biomechanische Verzahnung des Implantats mit dem umgebenden Gewebe und damit eine stabilere Verankerung. Weiterhin kann das

Elastizitätsmodul des Materials an den umliegenden Knochen angepasst werden. Dies vermindert den Abbau des gesunden Knochens infolge seiner Entlastung, den so genannten *Stress-Shielding*-Effekt (Ebrahimi, 2021). Ist die Porosität jedoch zu groß, leidet auch die strukturelle Stabilität und mechanische Belastbarkeit. Ebenso geht eine erhöhte Porosität mit einer verstärkten Degradationsrate einher. Diese sollte jedoch mit der Regenerationsrate des Knochens korrespondieren (Ebrahimi, 2021; Gariboldi und Best, 2015). Der Einfluss der Porengröße auf die Biokompatibilität eines Knochenimplantats *in vitro* und *in vivo* werden kontrovers diskutiert. Daher ist die Definition einer idealen Porengröße schwierig. Die minimal erforderliche Porengröße für die osteogene Reparatur scheint ca. 100 μm zu betragen (Ebrahimi, 2021; Zadpoor, 2015). Je nach Zelltyp sind unterschiedliche Porengrößen von Vorteil. Während glatte Muskelzellen Porengrößen von 50 bis 200 μm bevorzugen, erweist sich eine Porengröße von 200 bis 450 μm für die osteogene Differenzierung von Vorläuferzellen als günstig (Ebrahimi, 2021). Ein weiterer wichtiger Faktor ist die spezifische Oberfläche des Scaffolds, welche sich umgekehrt proportional zur Porengröße verhält. Insbesondere die initiale Zelladhäsion wird durch eine große spezifische Oberfläche gefördert. Ist diese jedoch zu groß, kommt es zu einer Überpopulation, welche das Einwandern von Zellen in das Innere des Scaffolds verhindern kann. Die Porengröße muss also klein genug sein, um genug Adhäsionsfläche zu bieten, und groß genug, um Zellmigration zu ermöglichen und Raum für neu gebildetes Gewebe zu bieten (Ebrahimi, 2021).

Neben der Größe der Poren ist auch der Einfluss ihrer Geometrie auf die physikalischen und biologischen Eigenschaften des Scaffolds nicht zu vernachlässigen. Eine komplexe Architektur der Poren geht mit höherer mechanischer Stabilität einher (Ebrahimi, 2021). Rumpler et al. (2008) beobachteten, dass sich die Regenerationsrate des Gewebes in einer Osteoblastenkultur proportional zur Krümmung der Oberfläche verhält. Auch die Art der Krümmung spielt eine Rolle. Konkave Oberflächen gehen im Vergleich zu flachen und konvexen Oberflächen mit verstärkter Gewebebildung einher. Zudem nimmt die Krümmung Einfluss auf die zelluläre Adhäsionsrate, die Migrationsgeschwindigkeit, die Morphologie der Zellen, die Anordnung der Kollagenfasern sowie die mechanischen Eigenschaften des Gewebes (Zadpoor, 2015; Ebrahimi, 2021; Engelmayr et al., 2006). Ferner beeinflusst die Geometrie des Scaffolds die Entzündungsaktivität. Die moderate Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine hat einen positiven Effekt auf die

Geweberegeneration. Große Poren mit weiten Winkeln fördern die Sekretion dieser Zytokine (Almeida et al., 2014).

Auch die Ausrichtung, Verteilung und Verknüpfung der Poren sind von zentraler Bedeutung für die Biokompatibilität eines Knochenersatzmaterials. Die Poren können von einheitlicher Größe und Form sein (monomodale Porosität), oder unterschiedlich sein (multimodal). Zudem können sie gleichmäßig, homogen oder heterogen angeordnet sein. Dies beeinflusst insbesondere die mechanischen Eigenschaften des Scaffolds, wie die mechanische Belastbarkeit oder das Elastizitätsmodul (Ebrahimi, 2021). Die Interkonnektivität der Poren bestimmt neben der Porengröße die Permeabilität des Scaffolds. Diese ist unabdingbar, um Zelleinwanderung sowie den Austausch von Nährstoffen, Zytokinen und Metaboliten zu gewährleisten. Zellen können dabei durch Öffnungen migrieren, welche kleiner sind als ihr eigener Durchmesser (Gariboldi und Best, 2015; Polak et al., 2013). Zudem geht eine hohe Porosität mit einer erhöhten Degradationsrate einher. Diese sollte ungefähr der Regenerationrate des neu gebildeten Knochens entsprechen. Ist die Porosität zu hoch, kann die strukturelle Integrität des Scaffolds und seine mechanische Stabilität langfristig nicht erhalten bleiben (Ebrahimi, 2021).

Insgesamt lässt sich festhalten, dass die dreidimensionale Struktur eines Knochenersatzmaterials seine biologischen und physikalischen Eigenschaften mitbestimmt und von zentraler Bedeutung für seine Biokompatibilität ist. Eine optimal angepasste Architektur des Scaffolds, welche sowohl ausreichende Stabilität, Wachstumsfläche, konkave Oberflächen als auch suffiziente Permeabilität bietet, ist daher wünschenswert. Das geometrische Modell periodischer Minimalflächen bietet einen vielversprechenden Ansatz, da sie ähnliche physikalische Eigenschaften wie trabekulärer Knochen aufweisen (Zadpoor, 2015; Kelly et al., 2018). In Abbildung 6 werden verschiedene Modelle periodischer Minimalflächen dargestellt. Vor allem die Mikrostruktur der *Schwarz's Primitive Minimal Surface* (Schwarz-P) wird als Designgrundlage im Tissue Engineering verwendet. Schwarz-P-Strukturen bieten ein hohes Verhältnis von Oberfläche zu Volumen, mechanische Stabilität sowie konkav gekrümmte Poren und scheinen damit gut geeignet für den Einsatz in Knochenersatzmaterialien (Ambu und Morabito, 2019; Kapfer et al., 2011; Shin et al., 2012).

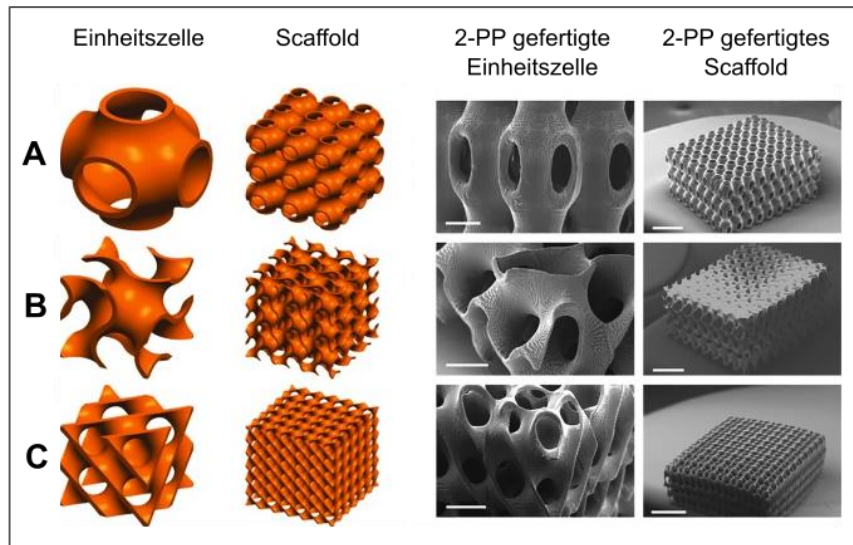


Abbildung 6: Periodische Minimalflächen
Schematische Darstellung und elektronenmikroskopische Aufnahmen von Einheitszellen und Scaffolds auf Basis periodischer Minimalflächen: Schwarz-P (A), Gyroid (B), Diamant (C). Maßstab entspricht 1 mm (links) und 200 μm (rechts). Abbildung modifiziert nach Hauptmann et al., 2019, mit freundlicher Genehmigung der Autoren.

1.5.3 Herstellungsverfahren poröser 3D Scaffolds

Zur Fabrikation biomimetischer Scaffolds stehen verschiedene Methoden zur Verfügung, die sich u. a. in ihrem zeitlichen und finanziellen Aufwand, als auch in der Präzision der produzierten Scaffolds unterscheiden. Insbesondere die Fertigung von Materialien mit definierter und reproduzierbarer Architektur und Porengröße stellen eine Herausforderung dar (Bisht et al., 2021; Deng et al., 2019). Tabelle 1 gibt eine Übersicht über Vor- und Nachteile populärer Herstellungsmethoden poröser Scaffolds (Kashirina et al., 2019; Bisht et al., 2021; Deng et al., 2019).

Herkömmliche Produktionsmethoden wie z. B. das *Electrospinning*, das *Gas foaming*, oder die Emulsions-Gefriertrocknung sind kostengünstig und schnell verfügbar. Häufig können mit diesen Verfahren jedoch keine ausreichende mechanische Stabilität und einheitliche Struktur erzielt werden (Bisht et al., 2021; Kashirina et al., 2019). Daher werden Technologien des *Rapid Prototyping* immer beliebter. Dabei werden computerassistent dreidimensionale Strukturen schichtweise gefertigt, was weitläufig als 3D-Druck bezeichnet wird. Auf diese Weise können Maße, Architektur und mechanische Eigenschaften des Scaffolds passgenau an die Anforderungen der PatientInnen angepasst werden. Gerade im Hinblick auf das zukunftsorientierte Konzept der personalisierten Medizin sind dies wünschenswerte Voraussetzungen. Obwohl mit einigen *Rapid*

Prototyping Methoden auch Metalle oder Keramik verarbeitet werden können, kommen überwiegend Polymermaterialien zur Anwendung (Kelly et al., 2018; Kashirina et al., 2019; Hauptmann et al., 2019). Im Folgenden werden verschiedene Verfahren des *Rapid Prototypings* vorgestellt.

Bei der Schmelzschichtung werden thermoplastische Materialien geschmolzen und über eine Düse Schicht für Schicht aufgetragen. Auf diese Weise wird kein potentiell toxisches Lösungsmittel benötigt (Roseti et al., 2017).

Auch das selektive Lasersintern ist ein additives Produktionsverfahren. Mithilfe eines Lasers wird pulverförmiges Ausgangsmaterial gehärtet. Aufgrund der geringen Verdichtung des Materials bleibt eine interne Porosität erhalten (Roseti et al., 2017).

Eine weitere Möglichkeit bietet die Stereolithographie. Lichthärtende Materialien (Photopolymere) werden gezielt mit einem Laser ausgehärtet. Mit der 2-Photonen-Polymerisation (2-PP) wurde das Prinzip der Stereolithographie weiterentwickelt. Dabei findet die Reaktion nur fokal im Brennpunkt des Lasers statt, was eine präzise Synthese heterogener Strukturen im Nanometerbereich ermöglicht (Roseti et al., 2017; Hauptmann et al., 2019).

Tabelle 1: Herstellungsverfahren von 3D Scaffolds

Methode	Vorteile	Nachteile
Electrospinning	- einfache Modellierung	- geringe Porengröße - eingeschränkte Architektur
Gas foaming	- keine organischen Lösungsmittel benötigt	- ungenügende mechanische Eigenschaften - Porosität und Interkonnektivität schlecht zu kontrollieren
Emulsions Gefriertrocknung	- kontrollierte Porengröße und Interkonnektivität - schnell	- keine komplexe Geometrie möglich - ungenügende mechanische Stabilität
Thermisch induzierte Phasenseparation	- kontrollierte Porengröße und Struktur	- Poren >200 µm schwierig - wenige Materialien verwendbar
Solvent casting/particle leaching	- günstig - unkompliziert	- keine komplexen Strukturen - zeitaufwändig - unzureichende Stabilität
Rapid Prototyping	- Fertigung geometrisch komplexer Strukturen - patientenorientierte Maßanfertigung möglich	- Verarbeitung verschiedener Komponenten nicht möglich - keine Kontrolle über die Rauigkeit der Oberfläche

1.6 Fragestellung und Zielsetzung

Die vorliegende Studie wird im Rahmen des vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderten Projekts „Erforschung eines industriellen laserbasierten Nano-3D-Druckverfahrens für hierarchisch strukturierte Knochen-Knorpel-Implantate auf Polymerbasis“ (Förderkennzeichen: FKZ 13XP5089) durchgeführt. Dieses dient der Entwicklung biphasischer Implantate zur Versorgung tiefer osteochondraler Defekte. Das Ziel der vorliegenden Studie ist die *in vitro* Analyse der Biokompatibilität von LCM-Scaffolds, welche die Osteophase der Implantate darstellen. Zudem wird der Einfluss der porösen 3D-Struktur der Scaffolds auf ihre Zytokompatibilität beurteilt. Dazu wurden humane MSC bzw. Osteoklasten auf porösen Scaffolds aus Schwarz-P-Einheitszellen, kompakten Scaffolds sowie Kontrollen ohne Material kultiviert. Zu mehreren Inkubationszeitpunkten wurden die Zellkulturen unter verschiedenen Gesichtspunkten untersucht. Folgende Fragen sollen anhand des Modells beantwortet werden:

- Zeigen die LCM-Scaffolds im Kontakt mit humanen MSC einen zytotoxischen Effekt?
- Beeinflussen die LCM-Scaffolds die Vitalität von humanen MSC?
- Haben LCM-Scaffolds Einfluss auf das Differenzierungsverhalten und die Morphologie humaner Osteoklasten?
- Wirken sich die LCM-Scaffolds auf die Aktivität humaner Osteoklasten aus?
- Gibt es Unterschiede zwischen den porösen und den kompakten Scaffolds?
- Sind die porösen LCM-Scaffolds ein geeignetes Knochenersatzmaterial?

Die Ergebnisse sollen dazu beitragen, sowohl LCM als Material, als auch die spezielle Geometrie der Schwarz-P-Zellen in ihrer Tauglichkeit für den Einsatz als Osteophase osteochondraler Implantate zu evaluieren. Die Verwendung biokompatibler, biphasischer Implantate ist ein vielversprechender Ansatz, um die bislang unbefriedigende Therapie osteochondraler Defekte zu verbessern.

2 Material und Methoden

2.1 Scaffolds

Die zu untersuchenden Polymerscaffolds wurden vom Institut für Bioprocess- und Analysenmesstechnik e.V. (iba, Heilbad Heiligenstadt, Deutschland) hergestellt und zur Verfügung gestellt. Die Materialien wiesen einen Durchmesser von 7 Millimetern (mm) und eine Höhe von 1 mm auf. Sie bestanden aus Poly-((D,L)-Lactid- ϵ -Caprolacton)-dimethacrylat (LCM), welches in einem Polymerverhältnis von 16:4 (Lactid : Caprolacton) durch eine ringöffnende Polymerisation synthetisiert wurde. Es wurden zwei verschiedene Ausführungen untersucht. Zum einen kompakte Polymerronden, welche im Folgenden als kompakte Scaffolds bezeichnet werden. Diese wurden mittels UV-Aushärtung gefertigt. Zum anderen poröse Scaffolds, welche durch eine besondere Geometrie und 3D-Struktur gekennzeichnet waren. Sie bestanden aus einem dreidimensionalen Gitter, welches aus so genannten Schwarz-P-Zellen aufgebaut war. Diese basierten auf dem Prinzip periodischer Minimalflächen, sodass eine gute mechanische Stabilität mit zugleich hoher Porosität erreicht werden konnte. Die Herstellung der porösen Scaffolds erfolgte mittels Zwei-Photonen-Polymerisation (2-PP). Dieses Verfahren ermöglicht die passgenaue Anfertigung komplexer geometrischer Körper mit genau definierter Porengröße und mechanischen Eigenschaften. Eine detaillierte Beschreibung des Herstellungsprozesses ist in Publikationen von Felfel et al. (2016) und Hauptmann et al. (2019) zu finden. In ihren biomechanischen Charakteristika waren die Scaffolds den Eigenschaften des Knochens nachempfunden. Sie besaßen ein Elastizitätsmodul von 0,16 Megapascal (MPa) und eine Porosität von 93,7 % bei einer Porengröße von 170 μm .

Die porösen und kompakten Scaffolds wurden in Ethanol gelagert. Vor ihrer Verwendung bei der Zellaussaat wurden die Materialien für zwei Tage in sterilem, destilliertem Wasser gespült. Dieses wurde dreimal täglich gewechselt, um das Ethanol rückstandslos zu entfernen.

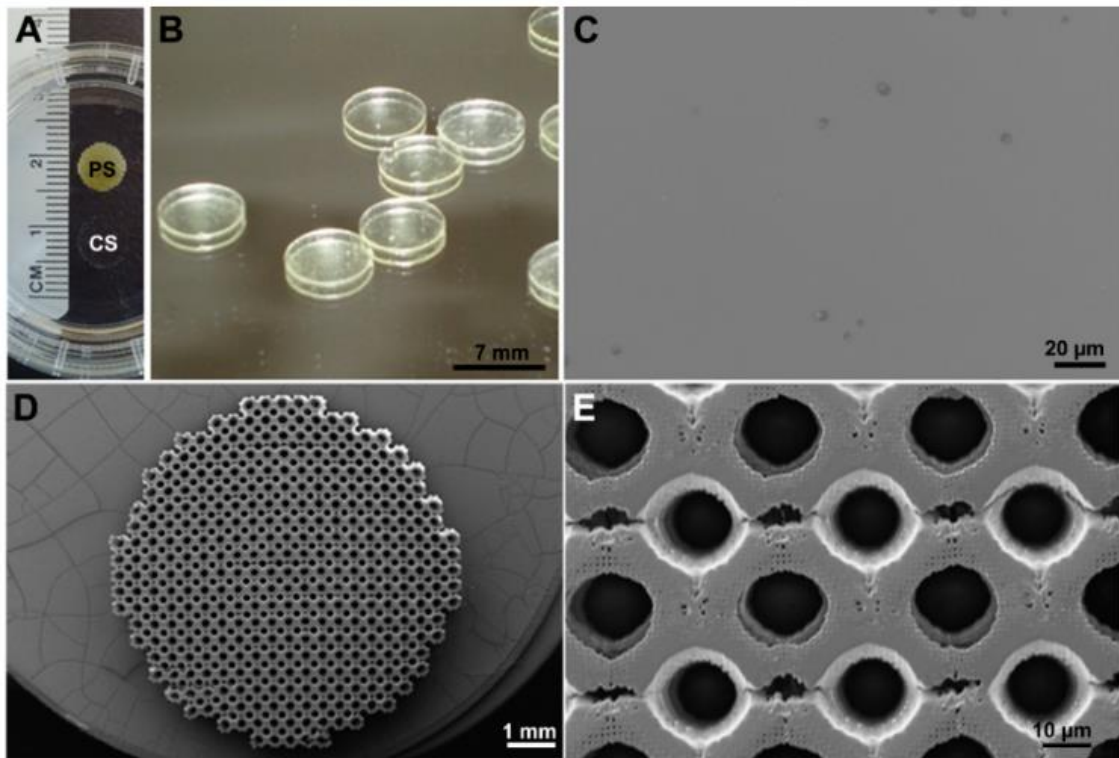


Abbildung 7: LCM Scaffolds

A und B: Makroskopische Aufnahmen der porösen Scaffolds (PS) und kompakten Scaffolds (CS) und elektronenmikroskopische Aufnahmen der kompakten (C) und porösen Scaffolds (D und E). Abbildung aus Spreda et al., 2021).

2.2 Standardbedingungen bei der Arbeit mit Zellkulturen

Mit allen Zellkulturen wurde unter einer Sicherheitswerkbank (Heraeus, Langenselbold, Deutschland) unter sterilen Bedingungen gearbeitet. Für die Kultivierung und Inkubation wurde ein Kohlenstoffdioxid (CO₂)-begaster Brutschrank (Heraeus) mit 5 % CO₂ bzw. 6 % CO₂, einer Temperatur von 37 Grad Celsius (°C) und einer Luftfeuchtigkeit von 95 % verwendet.

2.3 Mesenchymale Stromazellen

2.3.1 Verwendete Zellen

In dieser Studie wurde die Zytokompatibilität der Scaffolds im Kontakt mit humanen MSC untersucht. Zu diesem Zweck hat die Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und

Wiederherstellungschirurgie am Standort Gießen (UKGM, Gießen, Deutschland) mit schriftlichem Einverständnis der PatientInnen sowie dem Einverständnis der lokalen Ethikkommission (Referenznummer: 74/09) humane Hüftköpfe und Knochenbohrmehl zur Verfügung gestellt. Das Knochenmaterial fiel bei Routineoperationen, etwa dem Einsetzen einer Endoprothese, als organisches Restmaterial an. Es handelte sich um vier weibliche und drei männliche SpenderInnen mit einem durchschnittlichen Alter von 62,1 (\pm 19,9) Jahren ohne Vorerkrankungen, welche den Knochenstoffwechsel beeinflussen würden. Daraus isolierte eine Mitarbeiterin des Instituts für Experimentelle Unfallchirurgie MSC. Hierfür wurde die Spongiosa aus dem Hüftkopf herausgelöst und zerkleinert. Wenn Bohrmehl verwendet wurde, war dieser Schritt nicht notwendig. Die Zellen wurden mit einem kollagenasehaltigem Puffer proteolytisch aus der Knochenmatrix gelöst. Ein Lysepuffer zerstörte die enthaltenen Erythrozyten. Anschließend wurden die Zellen durch ein Zellsieb mit einer Porengröße von 70 μ m gefiltert.

Die Zellen wurden mit farbstoffgekoppelten spezifischen Antikörpern gegen die Oberflächenmarker CD73, CD105, CD34 und CD45 gefärbt. Mittels Durchflusszytometrie (*Fluorescence-activated Cell Sorting*, FACS) wurden MSC selektiert, welche von den CD73 und CD105 spezifischen Antikörpern gefärbt wurden, jedoch nicht von CD34 oder CD45 spezifischen Antikörpern.

Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen mit 75 cm² Wachstumsfläche (Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland) überführt. Das Kulturmedium wurde wie folgt hergestellt: Als Grundlage diente MesenPRO RS Medium (Gibco, Life Science Technologies, Grand Island, New York, USA). Diesem wurden 5×10^{-8} mol/l MesenPRO RS Supplement (Gibco), 10 % fetales Kälberserum (FKS)-MSC (PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland), 1 % Glutamin (Capricorn Scientific GmbH, Elbersdorfergrund, Deutschland) sowie 10 μ g/ml Gentamicin, und 0,25 μ g/ml Amphotericin B (Gentamicin/Amphotericin B, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) zugesetzt. Wenn die Zellen eine Konfluenz von ca. 90 % erreicht hatten, konnten sie passagiert werden. Da es sich bei MSC um adhärente Zellen handelte, wurden sie mittels Proteolyse vom Boden der Zellkulturflasche gelöst. Zunächst wurde das Medium abgeschüttet und der Zellrasen mit PBS (Gibco) gespült. Nun wurden 3 ml Trypsinlösung (0,05 % Trypsin-EDTA, Gibco) zugegeben. Während einer fünfminütigen Inkubation bei 37 °C wurden die MSC gelöst. Danach konnten unter dem Lichtmikroskop

kugelige, frei schwimmende Zellen beobachtet werden. Der Verdau wurde durch Zugabe von 3 ml Zellkulturmedium abgestoppt. Nun konnte die Zellsuspension auf zwei Zellkulturflaschen aufgeteilt werden. Wenn die Zellen nicht mehr benötigt wurden, wurden sie mittels Kryokonservierung gelagert. Dabei wurden die gelösten Zellen 5 Minuten bei 1200 Umdrehungen pro Minute (*revolutions per minute*, rpm) und 4 °C zentrifugiert und in einem Gemisch aus 80 % FKS-MSK und 20 % Dimethylsulfoxid (DMSO) aufgenommen. Die Suspension wurde in Kryokonservierungsröhrchen (CRYO.S, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) überführt. Nach einer initialen Kühlung bei - 80 °C für mindestens vier Stunden konnten die Röhrchen in Flüssigstickstoff gelagert werden.

2.3.2 Zellkultur

Zu Beginn wurde das Kulturmedium für die Zellaussaat hergestellt. Dieses basierte auf Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) low glucose (Gibco) mit 10 % FKS MSC (PAN-Biotech), 1 % Glutamin (Capricorn) sowie 10 µg/ml Gentamicin, und 0,25 µg/ml Amphotericin B (Gentamicin/Amphotericin B, ThermoFisher Scientific). Pro Zellreihe wurden je vier 48-Wellplatten (Greiner Bio-One) in folgender Weise präpariert: In drei Wells wurden 500 µl Medium vorgelegt. Anschließend wurde in je ein Well ein poröses bzw. kompaktes Scaffold eingesetzt. Ein Well blieb ohne Material und diente als Kontrolle. Die MSC wurden wie unter 2.3.1 beschrieben trypsiniert und im Anschluss mit 1200 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgekippt und das Zellpellet in 1 ml PBS resuspendiert. Mit einem Cell Counter Modell CASY TTC (Omni Life Science GmbH & Co. KG, Bremen, Deutschland) wurde die Zellzahl bestimmt. Zu diesem Zweck wurden 10 µl Zellsuspension in einem CASYcup (Omni Life Science) mit 10 ml CASYton (Omni Life Science) gemischt und im Cellcounter platziert. Das Gerät ermittelte die Konzentration vitaler Zellen. Damit konnte die benötigte Menge an Zellsuspension berechnet und 15.000 MSC pro Well ausgesät werden.

2.3.3 Vitalitätsassay

Bei 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) handelt es sich um einen gelben, wasserlöslichen Farbstoff, welcher von mitochondrialen Reduktasen zu

violetten, wasserunlöslichen Formazan umgesetzt wird. Diese Eigenschaft macht sich der MTT-Assay zunutze: Der Farbstoff dient als Indikator für Stoffwechselaktivität und Vitalität. Das chemische Prinzip des MTT-Assays wird in Abbildung 8 veranschaulicht.

Der Assay wurde nach je drei und sechs Tagen Zellkultur wie folgt durchgeführt: Zuerst wurden dem Kulturmedium 50 µl MTT-Lösung (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) pro Well zugegeben. Damit die Stoffwechselprozesse ablaufen konnten, wurde die Zellkulturplatte für exakt vier Stunden bei 37 °C und 6 % CO₂ lichtgeschützt inkubiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgenommen, um den überschüssigen Farbstoff zu entfernen und den Zellrasen nicht zu verletzen. Die MSC wurden je Well mit 500 µl 2-Propanol gemischt, mit 0,04 Mol pro Liter (mol/l) Salzsäure lysiert und 10 Minuten auf Eis geschüttelt. Nachdem das Lysat mit einer Pipette gemischt wurde, wurden je 200 µl in Doppelbestimmung auf eine 96-Wellplatte überführt. Abschließend wurde die Absorption bei 570 Nanometern (nm) und 630 nm Wellenlänge mit Hilfe eines Mikroplatten Reader (Synergy HT microplate Reader, BioTek, Bad Friedrichshall, Deutschland) gemessen. Zur Auswertung der Daten wurde zunächst der Variationskoeffizient für die Werte der Doppelbestimmung berechnet. Lag dieser über 10 %, wurden die Werte nicht verwendet und die Untersuchung wiederholt. Nun wurde die Absorption des Lysepuffers (Blank) von allen Werten subtrahiert. Im Anschluss wurden die Absorptionen bei 630 nm von den Absorptionen bei 570 nm subtrahiert. Höhere Absorptionswerte entsprechen einer besseren Vitalität der Zellen.

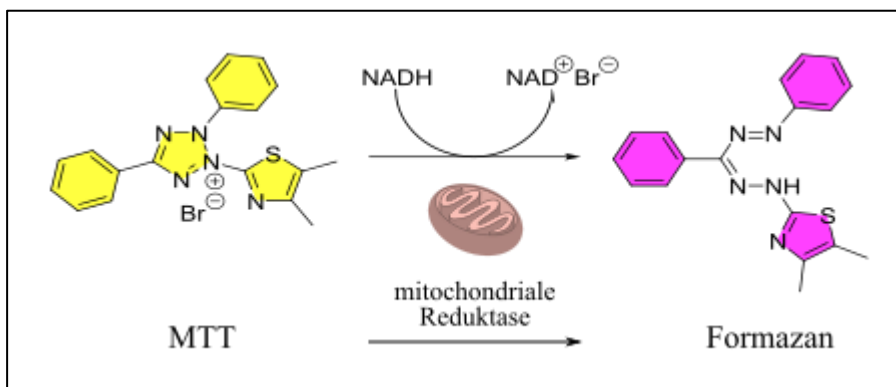


Abbildung 8: Chemisches Prinzip des MTT-Assays
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)

2.3.4 Zytotoxizitätsassay

Die Konzentrations- oder Aktivitätsmessung des obligat intrazellulär vorhandenen Enzyms Lactatdehydrogenase (LDH) im Serum oder Zellüberstand ist ein etablierter Parameter zur Abschätzung von Zytotoxizität in Forschung und Klinik. Nach drei und sechs Tagen Kultivierung wurde die Toxizität der MSC mit Hilfe des Cytotox 96[®] Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, Fitchburg, Massachusetts, USA) ermittelt. Dafür wurden je 50 µl Zellüberstand in Triplets auf eine 96-Wellplatte pipettiert. Um die Zellmembran zu zerstören und das intrazelluläre LDH freizusetzen, wurden pro Well 500 µL Lysepuffer bestehend aus PBS mit 1 % Triton X-100 (Sigma-Aldrich) auf den Zellrasen gegeben. Daraufhin wurde die Platte für 15 Minuten auf Eis geschüttelt, gefolgt von fünfminütiger Zentrifugation bei 500 g und 4 °C. Die entstandenen Überstände wurden ebenfalls in Triplets von je 50 µl auf die zuvor verwendete 96-Wellplatte überführt. Zu den Überständen und Lysaten der MSC wurde nun je 50 µl LDH-Substrat (Kit-Komponente) pipettiert, welches während der folgenden lichtgeschützten Inkubation bei Raumtemperatur von dem enthaltenen Enzym umgesetzt wurde. Dies bewirkte einen Farbumschlag, dessen Absorption nach dem Abstoppen der Reaktion mit 50 µl Stopp-Lösung (Kit-Komponente) bei 490 nm im Mikroplatten Reader (BioTek) gemessen wurde. Messwerte mit einem Variationskoeffizienten von > 10 % im Triplet wurden ausgeschlossen und die Messung wiederholt. Zudem wurde von allen Messwerten der Blindwert des Lysepuffers subtrahiert. Die relative Zytotoxizität berechnete sich mit folgender Formel: $A_{490\text{ nm}}(\text{Überstand}) / (A_{490\text{ nm}}(\text{Überstand}) + A_{490\text{ nm}}(\text{Lysat}))$.

2.3.5 Lichtmikroskopie mesenchymaler Stromazellen

Vitalität und Adhärenz der MSC wurde lichtmikroskopisch nach drei- und sechstägiger Inkubation in der Zellkultur mit einem inversen Zeiss Axiovert 10 Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) und einer Stingray F-145 Kamera (Allied Vision Technologies GmbH, Stadtroda, Deutschland) beurteilt und dokumentiert. Zur Bildbearbeitung wurde das Programm ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) verwendet.

2.4 Osteoklasten

2.4.1 Isolation humaner Monozyten aus Spenderblut

Osteoklasten gehören zum mononukleäre-phagozytären System (MPS) und entstehen durch Fusion von mononukleären Vorläuferzellen der hämatopoetischen Zelllinie. In vitro können sich Osteoklasten unter anderem aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes (englisch *Peripheral Blood Mononuclear Cells*, kurz: PBMCs) unter Einfluss von M-CSF und RANKL differenzieren.

Zu diesem Zwecke hat das Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin (Justus-Liebig-Universität, Gießen, Deutschland) humanes Spenderblut von fünf verschiedenen Spendern (n = 5) zur Verfügung gestellt. Als Erstes wurde ein PBS-Gemisch (im Folgenden als PBS* bezeichnet) in folgender Zusammensetzung hergestellt: 98 % PBS mit 2 % FKS (Biochrom, Berlin, Deutschland) und 1 Millimol (mM) Ethylendiamintetraacetat (EDTA). Dieses wurde auf 4 °C gekühlt. Im Anschluss wurden 10 ml Blut in 25 ml PBS* verdünnt. Das Gemisch wurde vorsichtig auf ein Leucosep™ Röhrchen (Greiner Bio-One) aufgetragen. Dabei handelte es sich um 50 ml Röhrchen, welche eine Trennscheibe sowie ein spezielles Trennmedium enthalten. Durch eine 15-minütige Dichtegradientenzentrifugation bei 800 g ohne Bremse wurden die Erythrozyten und Granulozyten abgetrennt. Die restlichen Leukozyten stellten sich in einer weißgelblichen Phase, dem sogenannte „Buffy Coat“, dar (siehe Abbildung 9). Nachdem das überständige Plasma mit einer Pipette abgetragen wurde, konnte die feine Leukozytenschicht in ein neues 50 ml Röhrchen überführt und mit PBS* auf 50 ml verdünnt werden. Dabei war zu beachten, möglichst ausschließlich die weißliche Phase aufzunehmen, da enthaltene Erythrozyten die weitere Isolation erheblich behindern können. Folgenden Schritte dienten der Aufreinigung der gewonnenen Zellen: Zunächst wurde die Zellsuspension 5 min bei 450 g ohne Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das erhaltene Zellpellet in 30 ml PBS* gelöst. Es folgte eine Zentrifugation für 10 min bei 120 g ohne Bremse. Wieder wurde der Überstand dekantiert, das Pellet in 30 ml PBS* resuspendiert und für 10 min bei 120 g ohne Bremse zentrifugiert. Das aufgereinigte Leukozytenpellet wurde in 1 ml PBS* gelöst und die Konzentration an vitalen Zellen bestimmt. Dazu wurde der Cell Counter Modell CASY TTC (Omni Life Science) verwendet. Im Einzelnen wurde in einem CASYcup (Omni Life Science) 1 µl Zellsuspension in 10 ml CASYton (Omni Life Science) verdünnt und

durch Invertieren gemischt. Das Cup wurde in das Gerät eingestellt und die Zellzahl gemessen. Anhand dessen wurde die Zellsuspension mit PBS* auf eine Konzentration von 5×10^7 Zellen pro Milliliter verdünnt. Davon wurden 2 ml in einem Polystyrenröhrchen (Sarstedt) überführt. Nun erfolgte die eigentliche Isolation mit Hilfe des EasySep™ Human Monocyte Enrichment Kit (Stemcell Technologies, Vancouver, Kanada). Das Verfahren basierte auf dem Prinzip der negativen Selektion. In einem ersten Schritt wurden die Zellen mit 100 µl EasySep™ Human Monocyte Enrichment Cocktail (Kit-Komponente) gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Die enthaltenen tetramerischen Antikörper binden alle nicht-monozytären Zellen, indem sie Oberflächenmarker wie CD16 erkennen. Im Gegensatz dazu exprimieren Monozyten kein CD16 auf ihrer Oberfläche und wurden daher nicht markiert. Zudem ist ein Antikörper gegen den humanen Fc-Rezeptor enthalten, um eine unspezifische Bindung an Monozyten zu verhindern. In einem zweiten Schritt wurden 100 µl EasySep™ Magnetic Particles (Kit-Komponente) hinzugefügt, gemischt und für 5 min auf Eis inkubiert. Die Magnetpartikel binden an die zuvor verwendeten tetramerischen Antikörper. Zuletzt wurde mit 300 µl PBS* auf ein Gesamtvolumen von 2,5 ml aufgefüllt und das Polystyrenröhrchen in einem EasySep™ Magneten (Stemcell Technologies) platziert. Dadurch wurden alle nicht-monozytären Zellen an der Wand des Röhrchens fixiert. Nach einer Inkubationszeit von 2,5 min bei Raumtemperatur konnten die Monozyten in ein neues Röhrchen abgegossen werden. Die Suspension wurde 5 min bei 450 g ohne Bremse zentrifugiert. Abschließend wurde das Pellet in 1 ml PBS* gelöst und die Zellkonzentration, wie zuvor beschrieben, bestimmt.

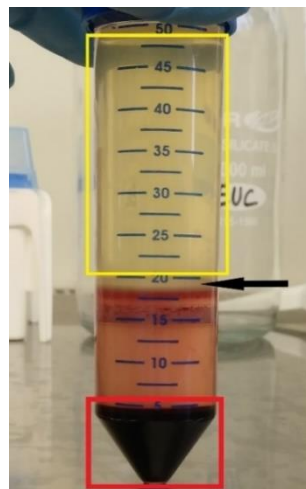


Abbildung 9: Leucosep™ Röhrchen nach Dichtegradientenzentrifugation
Pfeil: „Buffy Coat“ Rot: Erythrozyten, Gelb: Plasma

2.4.2 Osteoklastenzellkultur

Für die Differenzierung der Monozyten zu Osteoklasten wurde ein spezielles Medium hergestellt. Es bestand aus 89 % Alpha modified Minimal Essential Medium (α MEM) (Gibco), 10 % FKS (Biochrom) und 1 % Glutamin (Capricorn Scientific GmbH). Außerdem wurden 10 μ g/ml Gentamicin, 0,25 μ g/ml Amphotericin B (Gentamicin/Amphotericin B, ThermoFisher Scientific), sowie 50 ng/ml M-CSF (Sigma-Aldrich) und 50 ng/l RANKL (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA) hinzugefügt. Vor der Zellaussaat wurden in einer 48-Wellplatte (Greiner Bio-One) 500 μ l Kulturmedium pro Well vorgelegt. Daraufhin wurden die Materialien in die für sie vorgesehenen Wells eingesetzt. Es wurden je drei Wells mit porösen Scaffolds, kompakten Scaffolds und Kontrollen ohne Material präpariert. Die Platte wurde für mindestens 20 Minuten im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, damit sich das Medium aufwärmen und sich das Puffersystem einstellen konnte. Abschließend wurden je Well 200 000 Monozyten ausplattiert. Dafür wurde die benötigte Menge an Zellsuspension berechnet und gleichmäßig über das gesamte Well verteilt. Zusätzlich wurde die gleichmäßige Aussaat unter dem Lichtmikroskop (Zeiss) kontrolliert. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Alle zwei Tage erfolgte ein Mediumwechsel.

2.4.3 RNA-Isolation

Nach vier-, acht- und zwölftägiger Zellkultur erfolgte die Zellernte bei je einem Well mit porösen und kompakten Scaffolds, sowie einem Well ohne Material. Hierfür wurde das RNeasy[®] Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Die Bezeichnungen der Puffer (RLT, RW1, RPE) wurden vom Hersteller vergeben. Die Bedeutung dieser Bezeichnungen ist nicht bekannt. Zuerst wurde das Zellkulturmedium abgenommen und der Zellrasen mit PBS gespült. Daraufhin wurden die Zellen mit 350 μ l RLT-Puffer (Kit-Komponente) lysiert. Das Lysat wurde in Cups überführt und bei -80 °C gelagert. Nach Abschluss der Zellkulturarbeiten erfolgte die eigentliche RNA-Isolation für alle Proben. Zunächst wurden die Lysate vollständig aufgetaut und auf eine QIAshredder-Säule (Qiagen) gegeben. Durch zweiminütige Zentrifugation bei 14 000 rpm wurden die Proben homogenisiert. Der Durchfluss wurde mit 70 % Ethanol verdünnt und auf eine RNeasy[®] Spin Column (Kit-Komponente)

überführt und für 30 Sekunden bei 8000 g zentrifugiert. In dieser Säule wurde die enthaltene RNA gebunden und der Durchfluss verworfen. Folgende Schritte dienten der Aufreinigung der RNA. Zunächst wurden 700 ml RW1-Puffer auf die Säule pipettiert und für fünf Minuten inkubiert. Nach 30 Sekunden Zentrifugation bei 8000 g wurde der Durchfluss verworfen. Anschließend wurden 500 µl RPE-Puffer auf die Säule pipettiert und 30 Sekunden bei 8000 g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und erneut 500 µl RPE-Puffer auf die Säule gegeben und zentrifugiert. Die Spin-Säule wurde auf ein neues 2 ml-Cup gesetzt und für 2 Minuten bei maximaler Leistung zentrifugiert, um alle Rückstände der Waschpuffer zu entfernen. Nun wurde die Säule auf ein 1,5 ml-Cup gesetzt. Abschließend wurden 30 µl RNase-freies Wasser (Kit-Komponente) auf die Säule gegeben und für fünf Minuten inkubiert. Durch Zentrifugation für eine Minute bei 8000 g wurde die RNA von der Säule gelöst. Mit Hilfe eines Spectrophotometers Typ ND-1000 (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, Delaware, USA) konnte die RNA-Konzentration des Eluats bestimmt werden. Dieses wurde entweder bei -80 °C gelagert oder direkt zur Synthese von komplementärer DNA verwendet (siehe 2.4.4.).

2.4.4 cDNA-Synthese

Um zu ermitteln, welche Gene in welchem Maße von den Osteoklasten exprimiert werden, kam das Prinzip der *real-time* Reversen-Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) zur Anwendung. Dafür wurde zuerst die unter 2.4.3. isolierte RNA mit Hilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, der sogenannten reversen Transkriptase, zu komplementärer DNA (cDNA) umgeschrieben.

Zu diesem Zweck wurde das QuantiTect® Reverse Transcription Kit (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Um eine Kontamination mit genomischer DNA zu verhindern, wurden 375 ng RNA mit 3 µl DNase-haltigen Wipeout-Buffer (Qiagen) und RNase-freies Wasser auf ein Gesamtvolumen von 21 µl angesetzt und für fünf Minuten bei 42 °C im i-Cycler (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) inkubiert. Von diesem Ansatz wurden je 14 µl für die zu untersuchenden Proben und 7 µl für die Negativkontrollen in ein neues PCR-Cup überführt. Danach wurde der Mastermix für die reverse Transkription wie folgt angesetzt: Pro zu transkribierender Probe wurden 1 µl RT Primer Mix, 4 µl Quantiscript RT Buffer sowie 1 µl Quantiscript Reverse Transkriptase gemischt. Alle Reagenzien waren im Kit enthalten. Zudem wurde ein Mastermix ohne

reverse Transkriptase für die Negativkontrollen angesetzt. Dazu wurden je 2 µl Quantiscript RT Buffer mit 0,5 µl RT Primer Mix und 0,5 µl RNase-freien Wasser vermischt. Nach Zugabe des jeweiligen Mastermix wurden die Proben für 30 Minuten bei 42 °C im Thermocycler (Bio-Rad Laboratories) inkubiert. Zur Inaktivierung der reversen Transkriptase erfolgte eine abschließende Inkubation bei 95 °C für drei Minuten. Die synthetisierte cDNA wurde mit RNase-freien Wasser in einem Verhältnis von 1:4 verdünnt und bei -20 °C gelagert.

2.4.5 Real-time Reverse-Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion

Bei der real-time Reverse-Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) wurde komplementäre DNA (cDNA) mit Hilfe einer hitzestabilen Polymerase amplifiziert. Dies ermöglichte die Quantifizierung der mRNA-Expression der Osteoklasten. Im Mastermix war der Cyaninfarbstoff SYBR Green enthalten. Wenn dieser an doppelsträngige DNA binden konnte, absorbierte er blaues Licht einer Wellenlänge von 494 nm und emittierte grünes Licht. Dies wurde bei der real-time RT-PCR nach jedem Amplifikationszyklus erfasst. Je mehr Doppelstrang-DNA in der Probe enthalten war, desto stärker war die Emission. Der CT-Wert (engl. *cycle threshold*) beschreibt den Zyklus, bei dem sich die Emission erstmals signifikant von der Grundfluoreszenz abhob. Je geringer der CT-Wert, desto mehr mRNA wurde von den Osteoklasten exprimiert.

Um die Differenzierung und Aktivität der Osteoklasten bewerten zu können, wurde die Expression folgender Gene untersucht: CtsK, DC-STAMP, NFATc1, CTR und CA2. β2-Mikroglobulin (B2M) diente als Housekeeping-Gen. Die verwendeten Primer wurden von der Eurofins MWG Holding GmbH (Ebersberg, Deutschland) in Auftragssynthese hergestellt und sind in Tabelle 2 dargestellt.

Für die RT-PCR von B2M, CtsK, DC-STAMP, NFATC1 und CTR wurde das QuantiFast SYBR® Green PCR Kit (Qiagen) verwendet. Zunächst wurde ein Mastermix angesetzt. Dazu wurden 5 µl des QuantiFast Reagenz (Qiagen) mit 3,8 µl RNase-freiem Wasser und 0,2 µl Primer sorgfältig gemischt und in 20 µl LightCycler© (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) Kapillaren vorgelegt. Nun wurde je 1 µl cDNA direkt in den Mastermix pipettiert. Durch 30 Sekunden Zentrifugation bei 400 g setzte sich das Gemisch an den Boden der Kapillare. Diese wurden in einen LightCycler© 2.0 (Roche Diagnostics) eingesetzt. Die Amplifizierung erfolgte gemäß folgendem Protokoll: Nach

einer initialen Denaturierungsphase bei 95 °C für 5 Minuten liefen 40 Zyklen bestehend aus je 10 Sekunden Denaturierung bei 95 °C und 30 Sekunden Synthese bei 60 °C. Zum Schluss wurde eine Schmelzkurve erstellt, um die spezifische Schmelztemperatur der PCR-Produkte zu kontrollieren. Die Abbildungen 10 bis 12 stellen exemplarisch die Amplifikationskurven (10), Schmelzpunkte (11) sowie Schmelzkurven (12) der real-time RT-PCR dar.

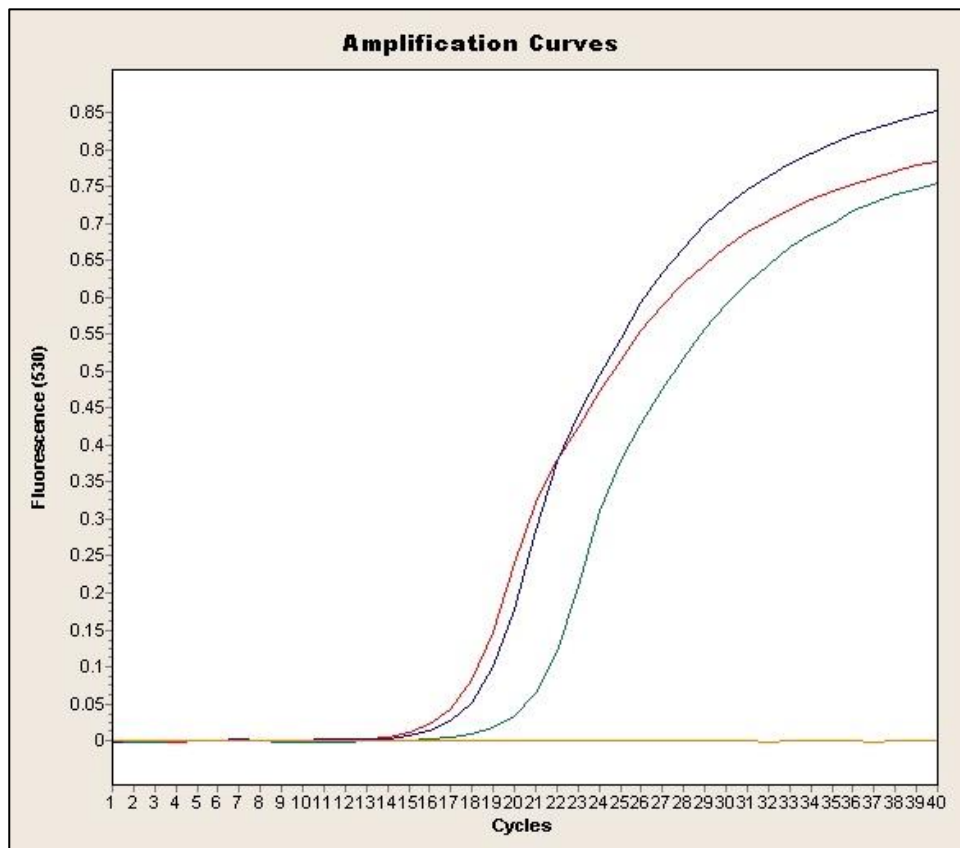


Abbildung 10: Amplifikationskurve bei real-time PCR
Amplifikation von β 2-Mikroglobulin (B2M) in Proben der Kontrollen (rot), porösen Scaffolds (blau), kompakten Scaffolds (grün) und Wasser (gelb)

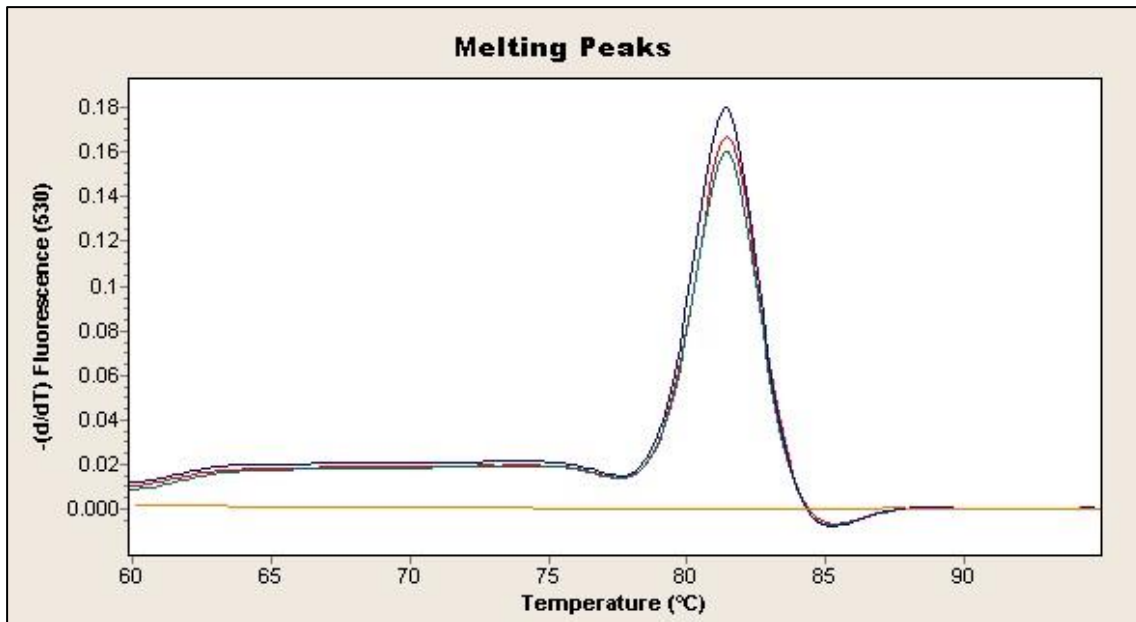


Abbildung 11: Schmelzpunkte bei real-time PCR
Amplifikation von β 2-Mikroglobilin (B2M) in Proben der Kontrollen (rot), porösen Scaffolds (blau), kompakten Scaffolds (grün) und Wasser (gelb)

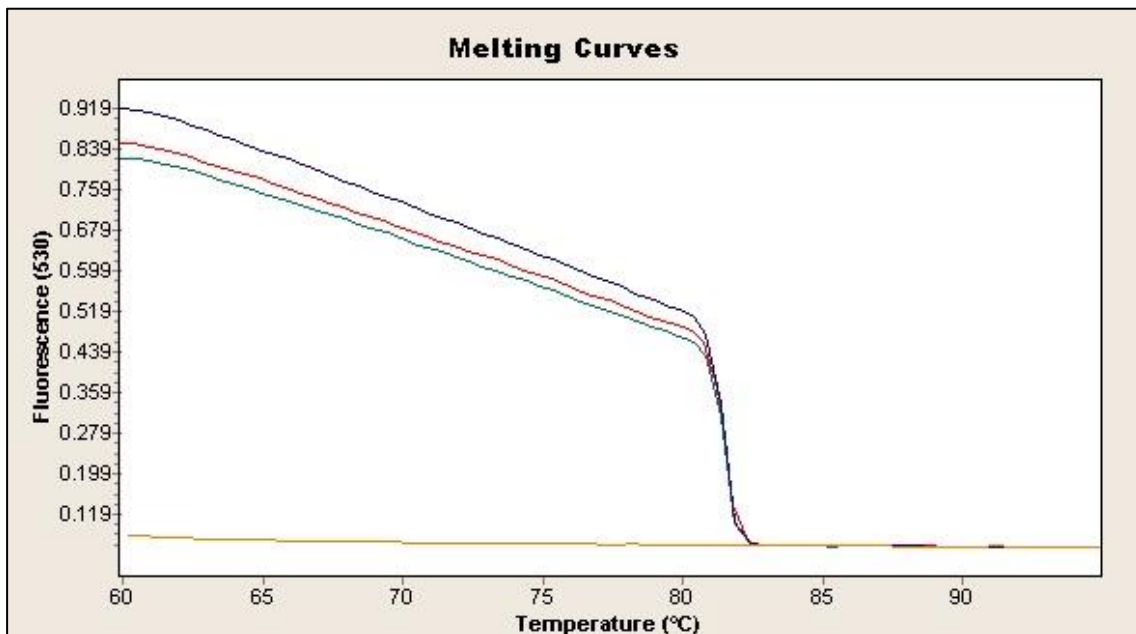


Abbildung 12: Schmelzkurven bei real-time PCR
Amplifikation von β 2-Mikroglobilin (B2M) in Proben der Kontrollen (rot), porösen Scaffolds (blau), kompakten Scaffolds (grün) und Wasser (gelb)

Um die Genexpression der CA2 zu analysieren, kam der LightCycler® FastStart^{PLUS} DNA Master SYBR® Green I (Roche) Mastermix zur Anwendung. 4 μ l cDNA wurden in einem Gemisch aus 2 μ l Mastermix, 0,2 μ l Primer und 3,8 μ l RNase-freien Wasser in die

LightCycler Kapillare eingebracht und nach unten zentrifugiert. Nach einer zehnmütigen Denaturierung bei 95 °C folgten 40 Zyklen aus je 5 Sekunden Denaturierung bei 95 °C, Primerhybridisierung für 5 Sekunden bei 64 °C und 5 Sekunden Elongation bei 72 °C. Auch hier wurde eine Schmelzkurve erstellt.

Zudem wurde bei allen Untersuchungen eine Negativkontrolle mit Wasser gemessen, um Kontaminationen auszuschließen. Im Falle des nicht-intronspannenden Primers für DC-STAMP wurde zudem eine nicht revers-transkribierte Probe gemessen, um Verunreinigungen durch genomische DNA zu erkennen.

Die Auswertung der real-time RT-PCR erfolgte mit der $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ -Methode (Livak und Schmittgen, 2001). Diese dient der Berechnung des Verhältnisses der Expression eines Gens bezogen auf einen definierten Referenzwert. Für jede Probe wurde mittels real-time RT-PCR der CT-Wert für die osteoklastenspezifischen Gene sowie für das konstitutionell exprimierte Membranprotein $\beta 2$ -Mikroglobulin (B2M) als *housekeeping-gene* bestimmt. Die Differenz zwischen CT(B2M) und CT(Zielgen) ergibt den Delta-CT-Wert (ΔCT). Der ΔCT -Wert wurde nun auf einen einheitlichen Referenzwert ΔCT_0 bezogen. In dieser Untersuchung wurde ΔCT_0 als Mittelwert der ΔCT -Werte der Kontrollen ohne Material zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt definiert. Die Differenz aus ΔCT und ΔCT_0 ergab den $\Delta\Delta CT$ -Wert. Die relative Genexpression bezogen auf den Referenzwert wurde mit der Formel $x = 2^{-\Delta\Delta CT}$ berechnet.

Tabelle 2: Primer für die real-time RT-PCR

Primer	Sequenz	Länge [bp]	Accession No.
B2M	for: 5'-TCT CTC TTT CTG GCC TGG AG-3' rev: 5'-CAA CTT CAA TGT CGG ATG GA-3'	135	NM_004048.4
CtsK	for: 5'-AGG AGA TAC TGG ACA CCC AC-3' rev: 5'-CCC AAA TTA AAC GCC GAG AG-3'	96	NM_000396.4
DC-STAMP	for: 5'-GCA AAG GGG AAG TCC TGA GC-3' rev: 5'-GCC CTG CAA AGG CAA GTA G-3'	93	NM_030788.4
NFATc1	for: 5'-GAT GGA CTG GCC GTT CTA GG-3' rev: 5'-CGA AAT GGC GGG ATC TCA ACC-3'	70	NM_172390.3
CA2	for: 5'-GAT GGA CTG GCC GTT CTA GG-3' rev: 5'-TGA AGT CAG CAC TCT TGC CC-3'	115	NM_000067
CTR	for: 5'-TGA GTG TGG AAA CCC ATT TGC-3' rev: 5'-ATT TTG GTC ACA AGC ACC CG-3'	109	NM_001164737

Länge des PCR-Produkts in Basenpaaren [bp], for: forward-Sequenz, rev: reverse-Sequenz

2.4.6 Kapillarelektrophorese

Um den Erfolg der real-time RT-PCR zu kontrollieren und die spezifische Länge der PCR-Produkte nachzuweisen, wurden die Proben mittels Kapillarelektrophorese untersucht. Dazu kam das QIAxcel Advanced System (Qiagen) zur Anwendung. Im Einzelnen wurden die Lightcycler-Kapillaren mit der Öffnung nach unten in Cups gestellt. Durch 45 Sekunden Zentrifugation bei 800 rpm wurden die PCR-Produkte aus der Kapillare in das Cup überführt. In den im Kit enthaltenen PCR-Cups wurden je 5 µl Probe in 10 µl Verdünnungslösung (Kit-Komponente) gemischt und mit einem Tropfen Öl (Kit-Komponente) überschichtet. Zudem wurden die Negativkontrollen aus der RT-PCR sowie eine Kontrolle mit Wasser anstelle von PCR-Produkt präpariert. Im Falle von DC-STAMP wurden auch die Negativkontrollen, welche nicht revers transkribiert wurden, pipettiert. Außerdem wurde der im Kit enthaltene Standard aufgetragen. Die vorbereiteten Cups wurden nun in das QIAxcel Advanced Instrument (Qiagen) eingesetzt und kapillarelektrophoretisch aufgetrennt. Die spezifische Länge der enthaltenen PCR-Produkte konnte mit Hilfe des Standards ermittelt werden.

2.4.7 Tartratresistente saure Phosphatase (TRAP) 5b ELISA

Zur Bestimmung der Aktivität des osteoklastenspezifischen Enzyms TRAP5b wurde ein Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) angewendet. Zu diesem Zwecke wurde nach vier, acht und zwölf Tagen Zellkultur die Mediumüberstände abgenommen und bei -80 °C gelagert. Nach Abschluss aller Zellkulturarbeiten konnten die Proben aufgetaut und untersucht werden. Dazu wurde das Microvue TRAP5b ELISA Kit (Quidel, San Diego, Kalifornien, USA) nach den Angaben des Herstellers eingesetzt. Zuerst wurden auf der im Kit enthaltenen 96-Wellplatte pro Well 100 µl Probendiluent (Kit-Komponente) vorgelegt. Danach wurden je 50 µl der im Kit enthaltenen Standards mit bekannter Enzymaktivität und Kontrollen (Kit-Komponente), sowie 50 µl Probe in die entsprechenden Wells pipettiert. Die Platte wurde mit einer Klebefolie verschlossen und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Dabei wurde aktives TRAP5b von Antikörpern gebunden, welche am Boden der Wells verankert waren. Inaktives TRAP5b wurde jedoch von löslichen Antikörpern im Probendiluent erkannt, welche die Bindung an den Boden der Platte verhinderten. Im Anschluss wurden die Wells dreimalig mit Waschpuffer (Kit-Komponente) gespült und das inaktive TRAP5b ausgewaschen. Es folgte die Zugabe von

100 μ l Substrat (Kit-Komponente) je Well und Versiegelung der Platte mit Klebefolie. Durch die Umsetzung des Substrats durch TRAP5b färbte sich die ursprünglich farblose Lösung gelblich (vergleiche, vgl. Abbildung 13). Nach 60-minütiger Inkubation bei 37 °C wurde die Enzymreaktion mit 50 μ l Stopplösung (Kit-Komponente) abgestoppt. Abschließend wurde die Extinktion bei 405 nm Wellenlänge im Plattenreader (BioTek) gemessen. Die Absorptionen der enthaltenen Standards dienten dem Erstellen einer Standardkurve. Anhand dieser konnte die Enzymaktivität der Proben berechnet werden.

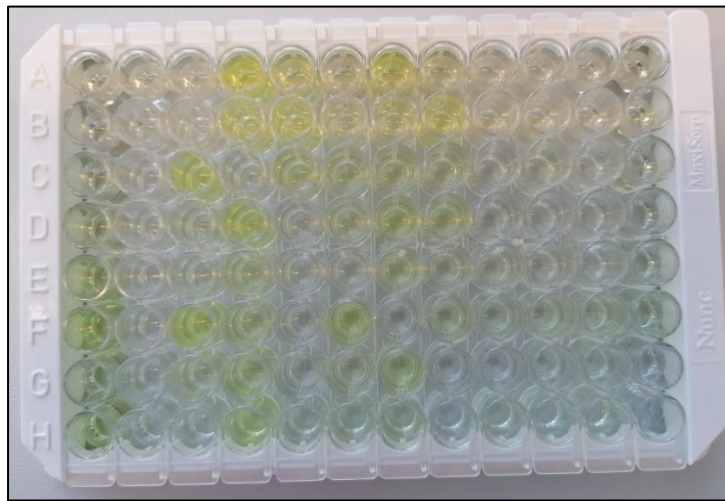


Abbildung 13: 96-Well-Platte des TRAP5b-ELISA

2.4.8 Lebendzellbeobachtung der Osteoklastendifferenzierung

Die Vitalität und Differenzierung der Osteoklasten wurden alle zwei Tage vor dem Wechsel des Kulturmediums bzw. vor der Zellernte lichtmikroskopisch evaluiert und photographisch festgehalten. Es wurden ein inverses Zeiss Axiovert 10 Mikroskop (Zeiss) mit einer Stingray F-145 Kamera (Allied Vision Technologies GmbH) sowie das Programm ImageJ verwendet.

2.4.9 Immunfluoreszenzmikroskopie

Da das Verhalten der Osteoklasten unmittelbar auf den Materialien mit dem Lichtmikroskop nicht beurteilbar war, wurde eine Immunfluoreszenzmikroskopie durchgeführt. Dazu wurden humane Monozyten isoliert, wie unter 2.4.1. beschrieben.

Ebenfalls wurde Zellkulturmedium wie unter 2.4.2. beschrieben angesetzt. Für die Zellaussaat wurde je ein poröses und ein kompaktes Scaffolds mit einem sterilen Skalpell geviertelt. Die Stücke wurden in je ein Well einer 96-Wellplatte (SCREENSTAR, Greiner Bio-One) eingesetzt. Die Wells wurden mit 200 µl Medium aufgefüllt. Zudem wurden vier weitere Wells mit Medium präpariert. Nach dem Anwärmen der Platte im Brutschrank folgte die Aussaat von 100 000 Monozyten pro Well. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgte jeden zweiten Tag. Nach acht Tagen wurde die Färbung durchgeführt. Als Erstes wurde das Medium entfernt und der Zellrasen sechsmal mit PBS gespült. Anschließend wurden die Zellen mit 4 % Paraformaldehyd (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) in PBS für zehn Minuten fixiert. Um die Aktinfilamente des Zytoskeletts anzufärben, wurden die Proben mit 5 µg/ml Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)-gekoppelten Phalloidin (Sigma-Aldrich) überschichtet und 40 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Nach wiederholtem Waschen mit PBS wurde die DNA mit 100 µg/ml Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich) angefärbt. Im Anschluss an eine 15-minütige, lichtgeschützte Inkubation wurde der überschüssige Farbstoff durch Waschen mit PBS entfernt und die Proben mit je einem Tropfen ProLong Gold Antifade Reagent (Invitrogen, Eugene, Oregon, USA) eingedeckt. Die Proben konnten so bei 4 °C gelagert werden. Für die mikroskopischen Aufnahmen wurde ein THUNDER Imager 3D Live Cell System (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) genutzt.

2.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der SPSS Statistik-Software (Version 26, SPSS Institute Inc., Chicago, USA). Zunächst wurde mit einem Kolmogorov-Smirnov-Test die Normalverteilung überprüft. Dieser ergab keine Normalverteilung für die Ergebnisse des MTT-Assays, des Zytotoxizitäts-Assays, des TRAP5b-ELISAs sowie die relative mRNA-Expression von CtsK und CA2. Diese wurden weiterhin mit einem Kruskal-Walis-Test sowie Friedmans-Varianzanalyse für verbundene Stichproben untersucht. Die Ergebnisse des MTT-Assays wurden außerdem mit dem Wilcoxon-Rangsummen-Test überprüft. Die relative Genexpression von CTR, DC-STAMP und NFATc1 war als normalverteilt einzuschätzen. Daher wurde weiterhin

das Allgemeine Lineare Modell angewendet. Das Signifikanzniveau wurde für $p < 0,05$ angesetzt. Die Ergebnisse wurden in Form von Box-Whisker-Plots graphisch dargestellt. Werte, welche außerhalb eines Intervalls von drei Standardabweichungen lagen, wurden als Kreise, extreme Ausreißer als Sternchen eingezeichnet.

2.6 Erstellung schematischer Abbildungen

Die schematischen Abbildungen zur Illustration der vorliegenden Arbeit wurden, sofern nicht anders angegeben, mit dem Vektorgrafik-Programm Inkscape (Software Freedom Conservacy, Brooklyn, New York, USA) erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Mesenchymale Stromazellen (MSC)

3.1.1 Vitalität

Um die Vitalität der MSC zu beurteilen, wurde nach drei und sechs Tagen Zellkultur ein MTT-Assay durchgeführt. An Tag drei wurden für die porösen Scaffolds signifikant höhere Absorptionswerte gemessen als bei den kompakten Scaffolds ($p = 0,043$). Dies entspricht einer besseren Vitalität. Zwischen den MSC der Kontrolle auf Zellkulturplastik und den MSC auf den Scaffolds wurden keine signifikanten Abweichungen festgestellt. Am Tag sechs waren keine signifikanten Unterschiede messbar. Die Ergebnisse sind in Abbildung 14 in Form von Boxplots graphisch dargestellt.

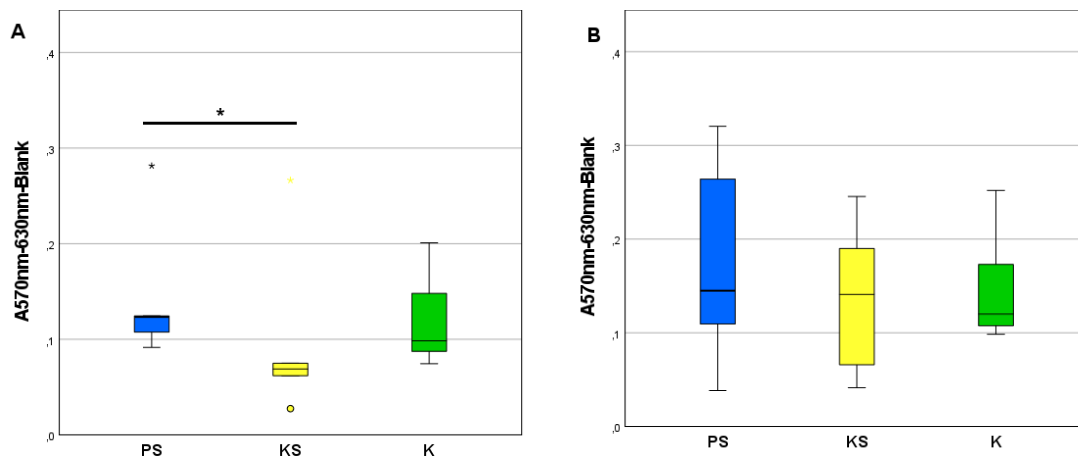


Abbildung 14: Absorptionswerte im MTT-Assay der MSC nach 3 (A) bzw. 6 Tagen (B) im Kontakt mit porösen Scaffolds (PS), kompakten Scaffolds (KS) und Kontrollen ohne Material (K). Kreise und Sternchen markieren statistische Ausreißer. modifiziert nach Spreda et al. (2021)

3.1.2 Toxizität

Nach drei und sechs Tagen Zellkultur wurde mittels LDH-Assay die zytotoxische Wirkung der Materialien evaluiert. Es zeigten sich zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen porösen Scaffolds, kompakten Scaffolds und Kontrollen (vgl. Abbildung 15).

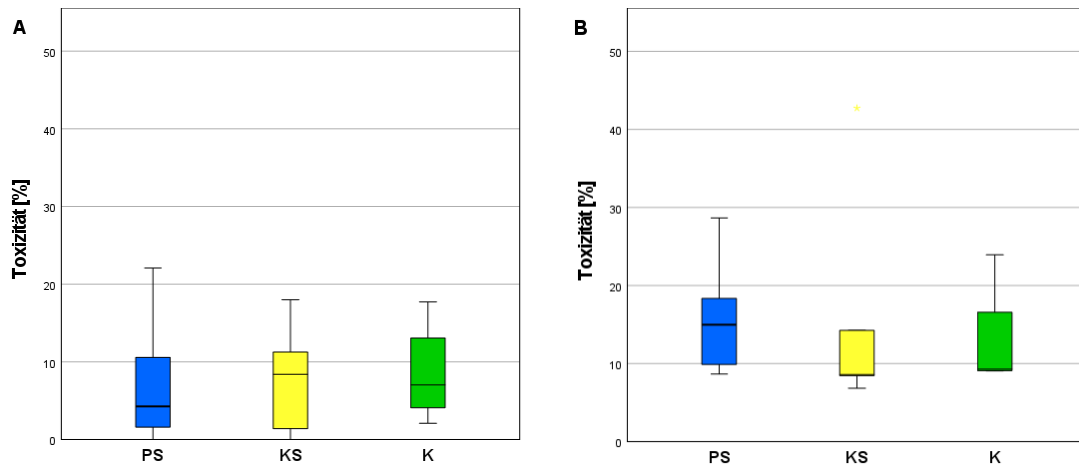


Abbildung 15: Toxizitätsbestimmung der MSC nach 3 (A) bzw. 6 Tagen (B) im Kontakt mit porösen Scaffolds (PS), kompakten Scaffolds (KS) und Kontrollen ohne Material (K).
modifiziert nach Spreda et al. (2021)

3.1.3 Morphologische Begutachtung der MSC

Nach je drei und sechs Tagen Zellkultur wurde die Vitalität und Adhärenz der MSC lichtmikroskopisch beurteilt und exemplarisch in Abbildung 16 dargestellt. In allen Kulturen waren die Zellen vital und zeigten kein Vermeidungsverhalten gegenüber den porösen oder kompakten Scaffolds. Zudem waren sie typisch spindelförmig bis verzweigt geformt. Allerdings war die Konfluenz der Zellen unter Kontrollbedingungen deutlich höher als in Anwesenheit von Material. Insbesondere bei den kompakten Scaffolds schienen weniger und kleinere MSC vorhanden zu sein.

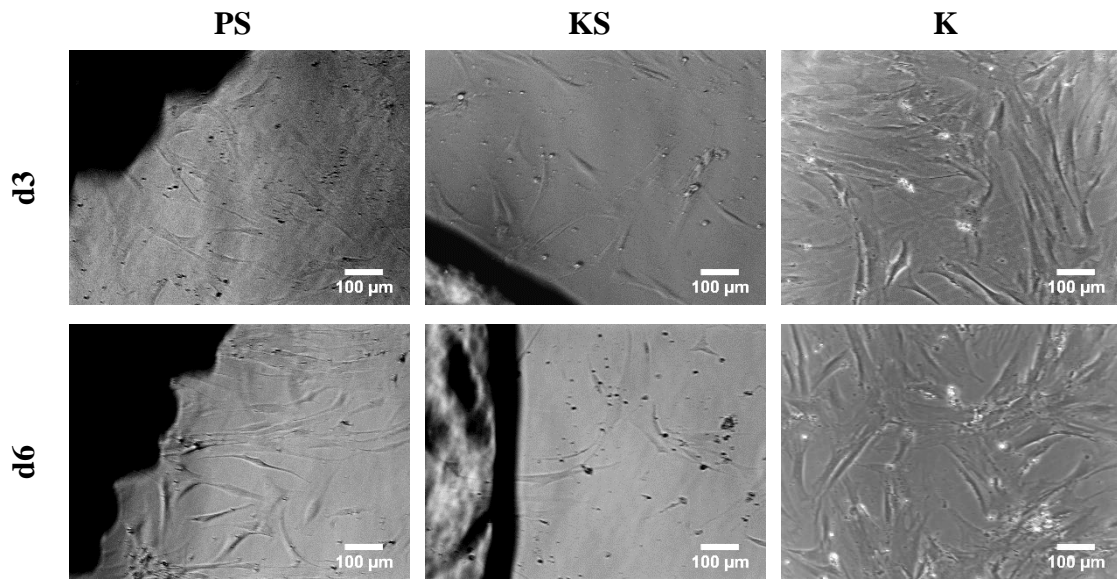


Abbildung 16: Lichtmikroskopische Aufnahmen der MSC nach 3 (d3) bzw. 6 Tagen (d6) im Kontakt mit porösen Scaffolds (PS), kompakten Scaffolds (KS) und Kontrollen ohne Material (K). Modifiziert nach Spreda et al. (2021)

3.2 Osteoklasten

3.2.1 Differenzierung

Die Differenzierung von mononukleären Zellen zu reifen Osteoklasten wird von einer Vielzahl an Faktoren beeinflusst.

Das Vorliegen des **Transkriptionsfaktors NFATc1** ist essenziell für die Transkription zahlreicher osteoklastärer Gene. Daher wurde die relative Genexpression von NFATc1 mittels real-time RT-PCR ermittelt. Weder nach vier noch nach acht oder zwölf Tagen waren signifikante Unterschiede zwischen porösen Scaffolds, kompakten Scaffolds und Ronden nachweisbar (vgl. Abbildung 17).

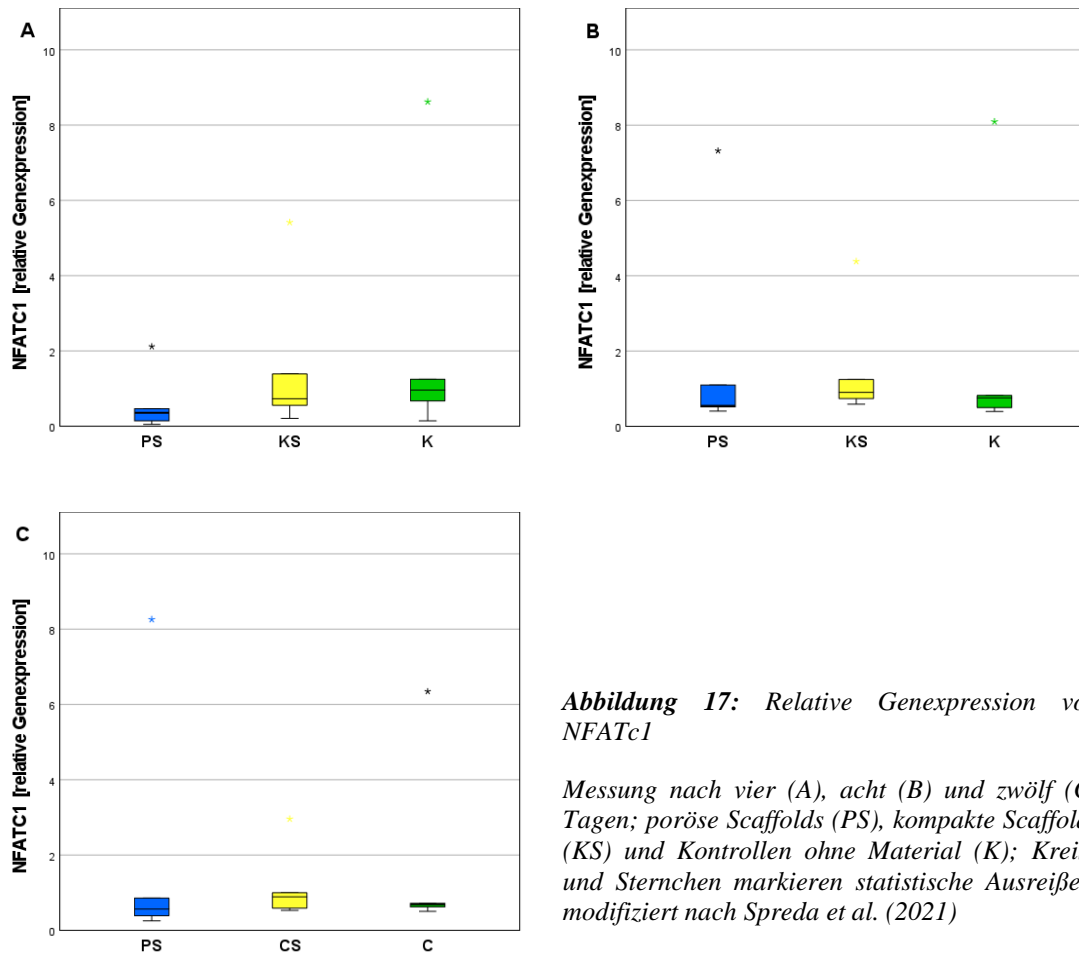
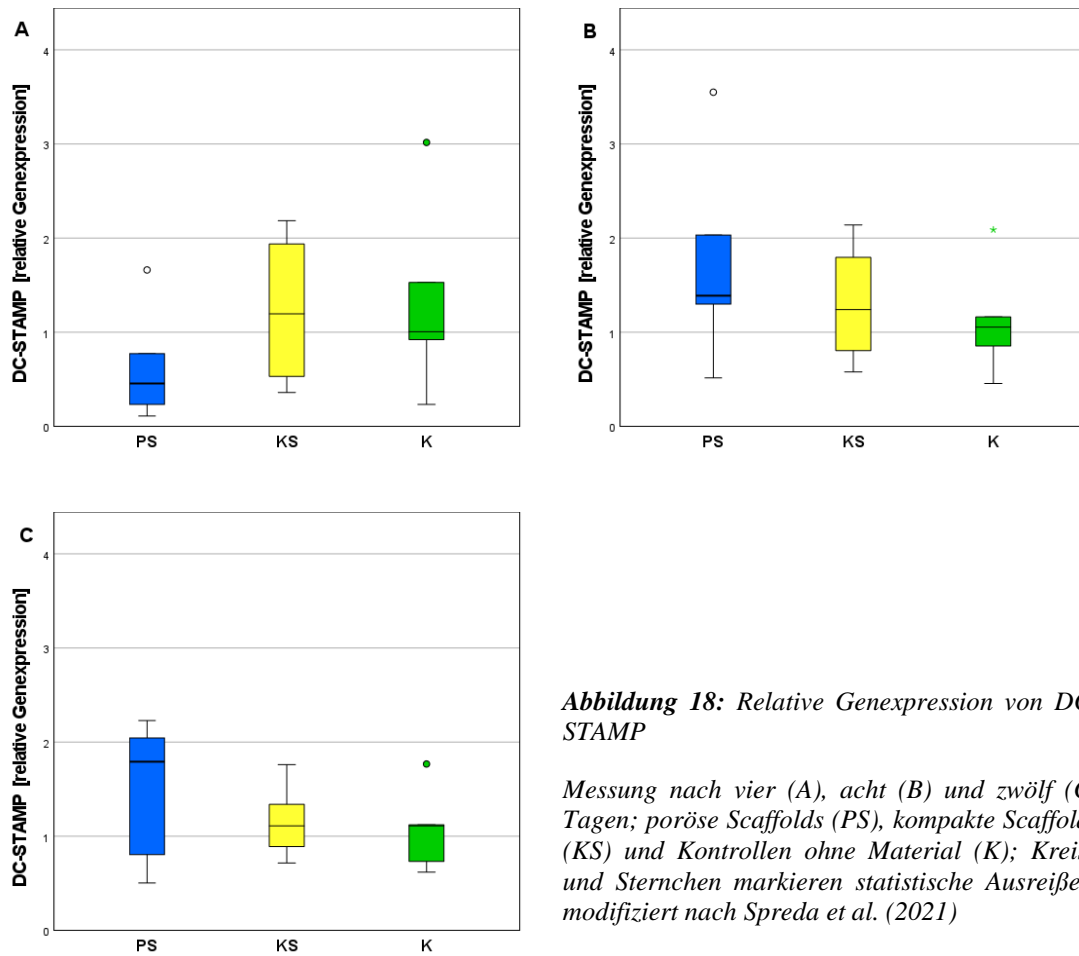


Abbildung 17: Relative Genexpression von *NFATc1*

Messung nach vier (A), acht (B) und zwölf (C) Tagen; poröse Scaffolds (PS), kompakte Scaffolds (KS) und Kontrollen ohne Material (K); Kreise und Sternchen markieren statistische Ausreißer; modifiziert nach Spreda et al. (2021)

Auch **DC-STAMP** stellt einen etablierten Marker für Osteoklastendifferenzierung dar. Es ist maßgeblich an der Fusion mononukleärer Zellen zu multinukleären Riesenzellen beteiligt. Nach vier-, acht- und zwölftägiger Zellkultur konnten keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression von DC-STAMP zwischen den Scaffolds und den Kontrollen ermittelt werden (vgl. Abbildung 18).

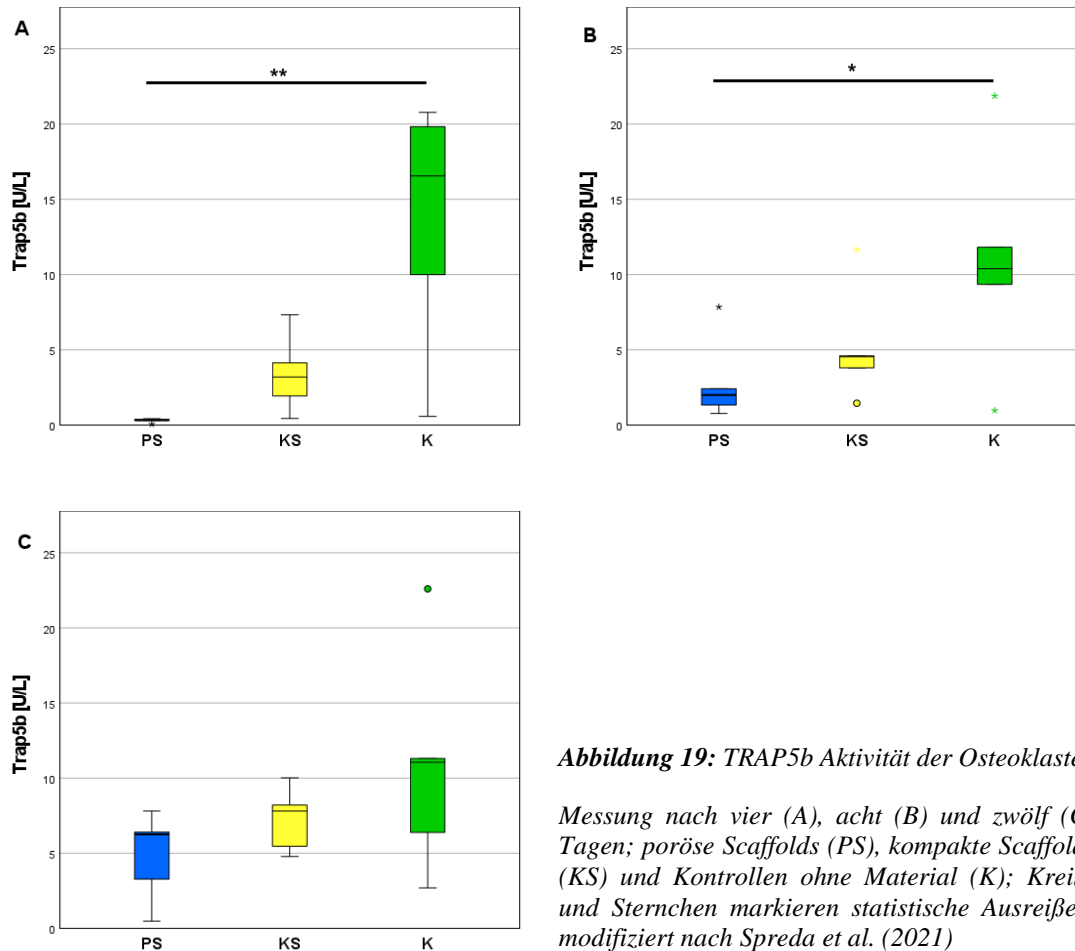


3.2.2 Osteoklasten Aktivität

Die Aktivität der Osteoklasten wurde anhand unterschiedlicher Methoden beurteilt.

Das Enzym TRAP wird vor allem von Osteoklasten, Neuronen und aktivierten Makrophagen exprimiert. Die Isoform **TRAP5b** gilt als spezifisch für Osteoklasten und dient in Forschung und Klinik als Marker für Osteoklastenaktivität. Daher wurde nach vier, acht und zwölf Tagen die Enzymaktivität von TRAP5b mittels ELISA ermittelt. Zu allen Untersuchungszeitpunkten zeigten die Osteoklasten der Kontrollgruppe die höchste und die Osteoklasten der porösen Scaffolds die geringste Aktivität. Die Unterschiede zwischen Kontrollen und porösen Scaffolds waren am Tag vier hochsignifikant ($p = 0,005$) und am Tag acht signifikant ($p = 0,034$). Die Werte der kompakten Scaffolds waren zwischen den porösen Scaffolds und den Kontrollen angesiedelt und zu keiner der beiden Gruppen signifikant unterschiedlich. Obwohl sich diese Konstellation auch nach

zwölf Tagen andeutete, konnten hier keine statistisch signifikanten Abweichungen ermittelt werden (vgl. Abbildung 19).



Ferner wurde die relative Genexpression verschiedener osteoklastärer Gene mittels real-time RT-PCR gemessen. Die **Cysteinprotease CtsK** wird von Osteoklasten sezerniert und ist für den Abbau von Kollagen Typ I der organischen Knochenmatrix verantwortlich. Nach vier ($p = 0,013$), acht ($p = 0,034$) und zwölf Tagen ($p = 0,013$) wurde eine statistisch signifikant geringe CtsK Expression in den Proben der porösen Scaffolds verglichen mit den Kontrollen gemessen. Die kompakten Scaffolds wiesen eine stärkere Expression als die porösen Scaffolds, aber eine geringere Expression als die Kontrollen auf. Die Unterschiede waren nicht signifikant (vgl. Abbildung 20).

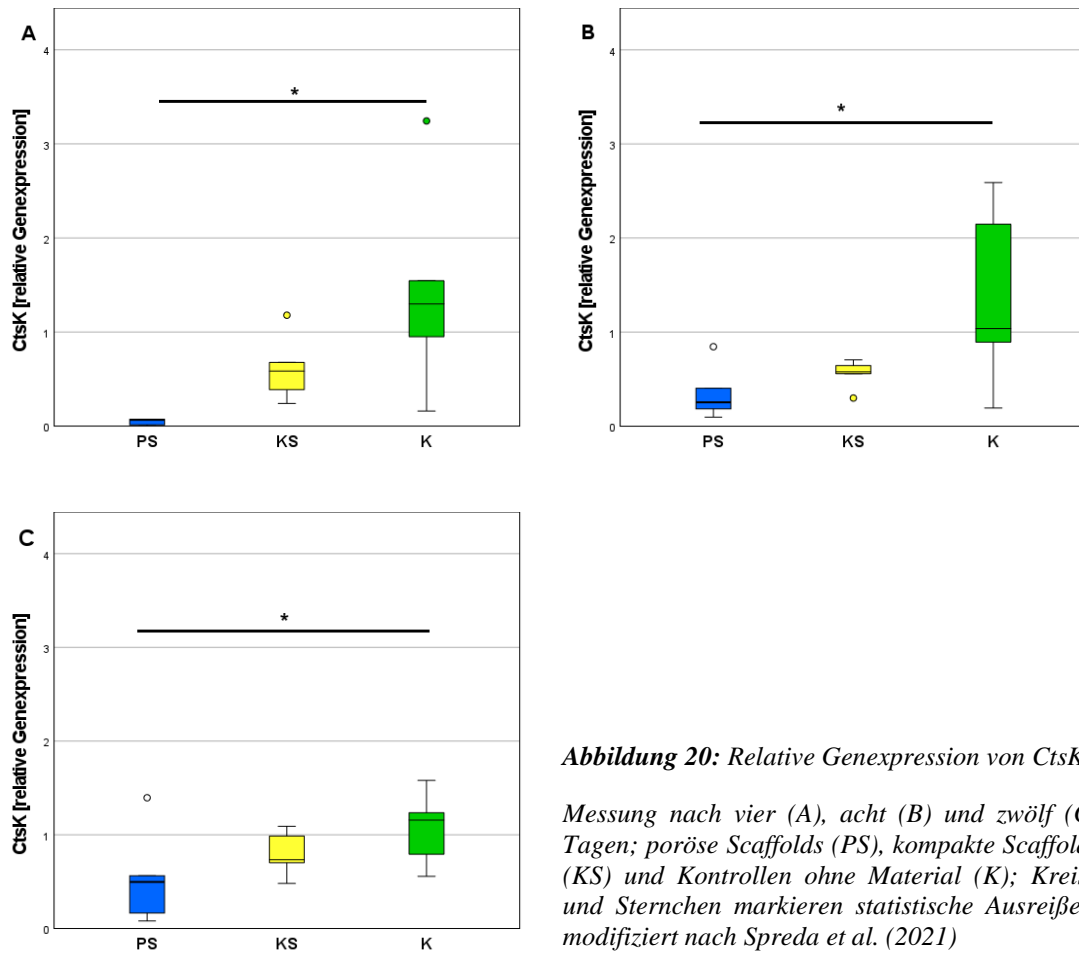
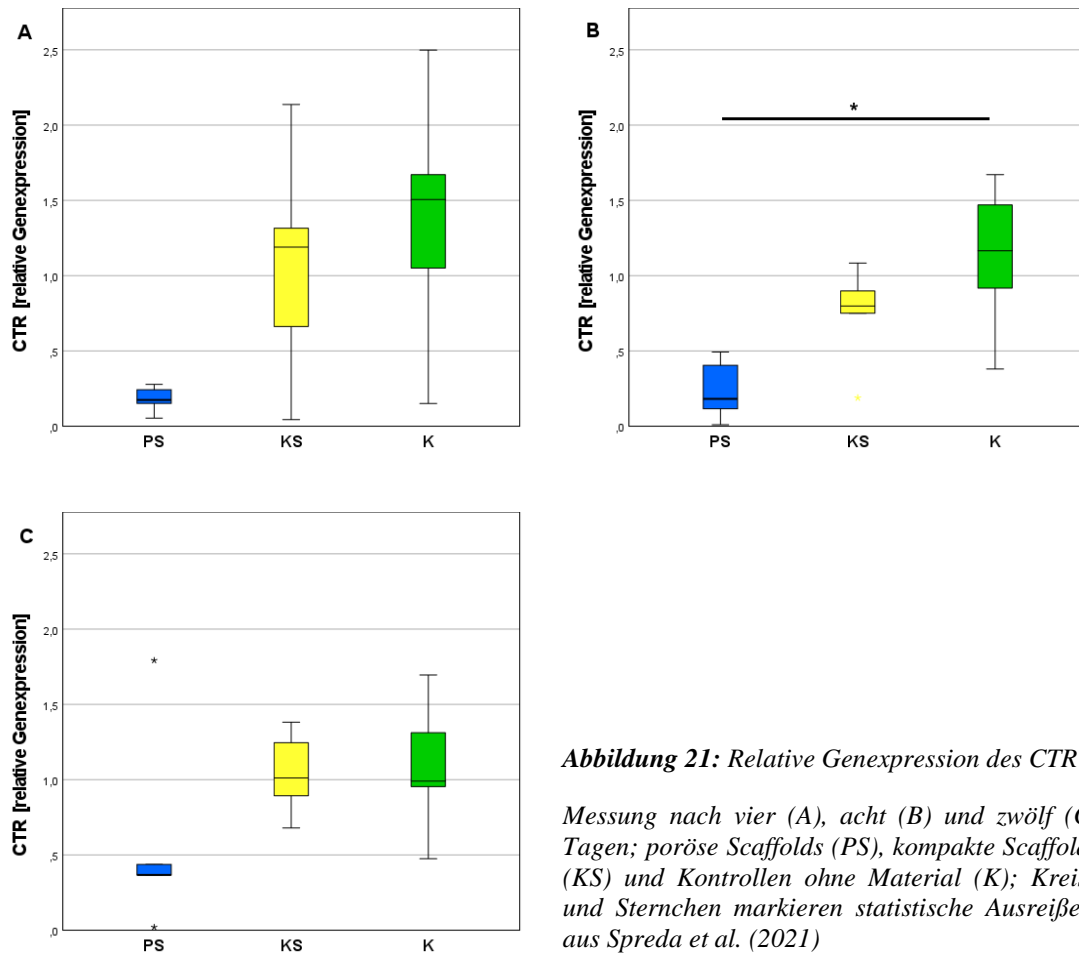


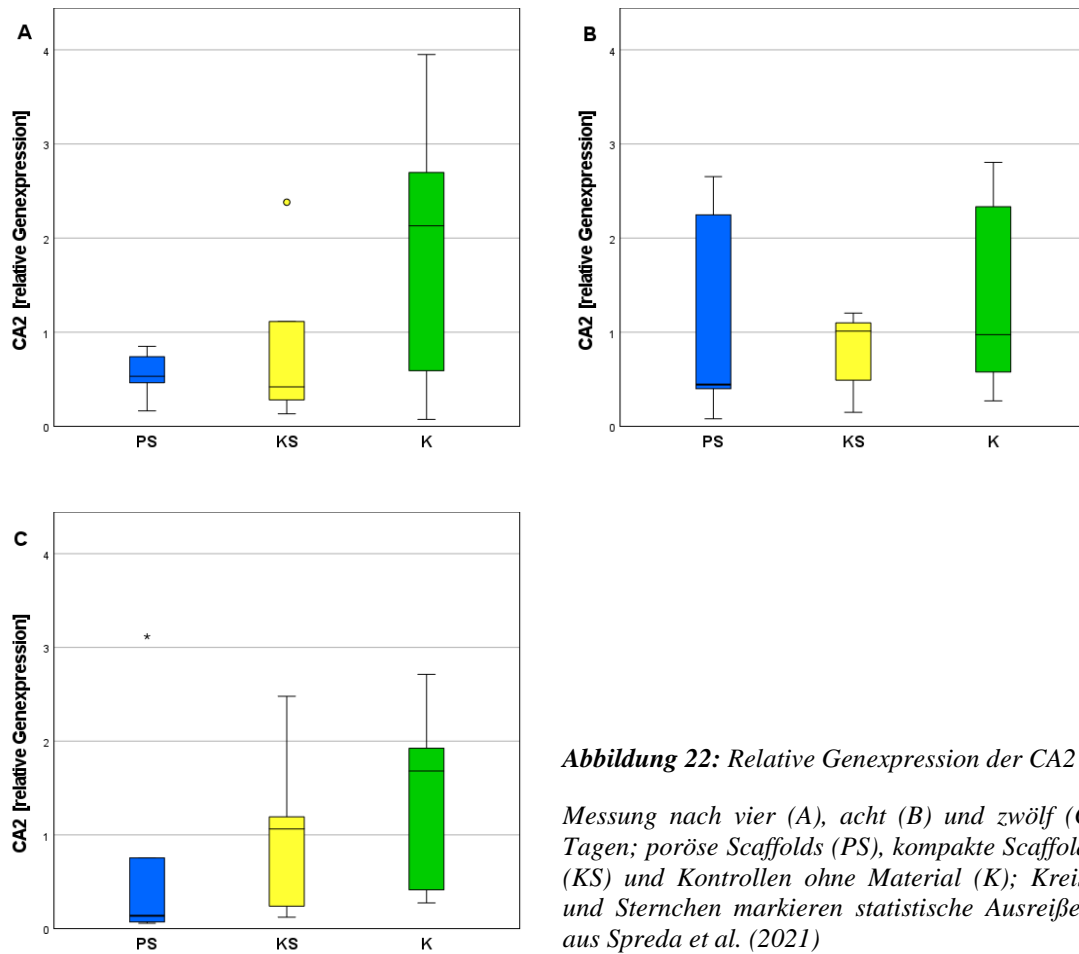
Abbildung 20: Relative Genexpression von *CtsK*

Messung nach vier (A), acht (B) und zwölf (C) Tagen; poröse Scaffolds (PS), kompakte Scaffolds (KS) und Kontrollen ohne Material (K); Kreise und Sternchen markieren statistische Ausreißer; modifiziert nach Spreda et al. (2021)

Der **Calcitoninrezeptor (CTR)** wird von reifen Osteoklasten exprimiert und dient ihrer Regulation im Rahmen des Calciumstoffwechsels des Körpers. Obwohl die in Abbildung dargestellten Ergebnisse eine deutliche Überlegenheit der Kontrollen gegenüber den porösen Scaffolds zu allen Zeitpunkten suggerierten, konnten lediglich am Tag acht statistisch signifikante Abweichungen detektiert werden ($p = 0,041$) (vgl. Abbildung 21).



Die **Carboanhydrase 2 (CA2)** ist an zahlreichen physiologischen Prozessen im menschlichen Körper beteiligt. In Osteoklasten sorgt sie maßgeblich für die Aufrechterhaltung des sauren Milieus der Howship-Lakune. In unseren Untersuchungen konnten weder am Tag vier noch am Tag acht oder zwölf ein signifikanter Unterschied in der Expression der CA2 der verschiedenen Gruppen festgestellt werden (vgl. Abbildung 22).



3.2.3 Elektrophoretische Analyse der RT-PCR-Produkte

Während der real-time RT-PCR wurden Produkte spezifischer Länge gebildet. Diese entsprachen den Angaben für die jeweiligen Primer (vgl. Tabelle 2). Abbildung 23 zeigt die Ergebnisse der Kapillarelektrophorese jeweils exemplarisch an den PCR-Produkten der Osteoklasten auf den kompakten Scaffolds.

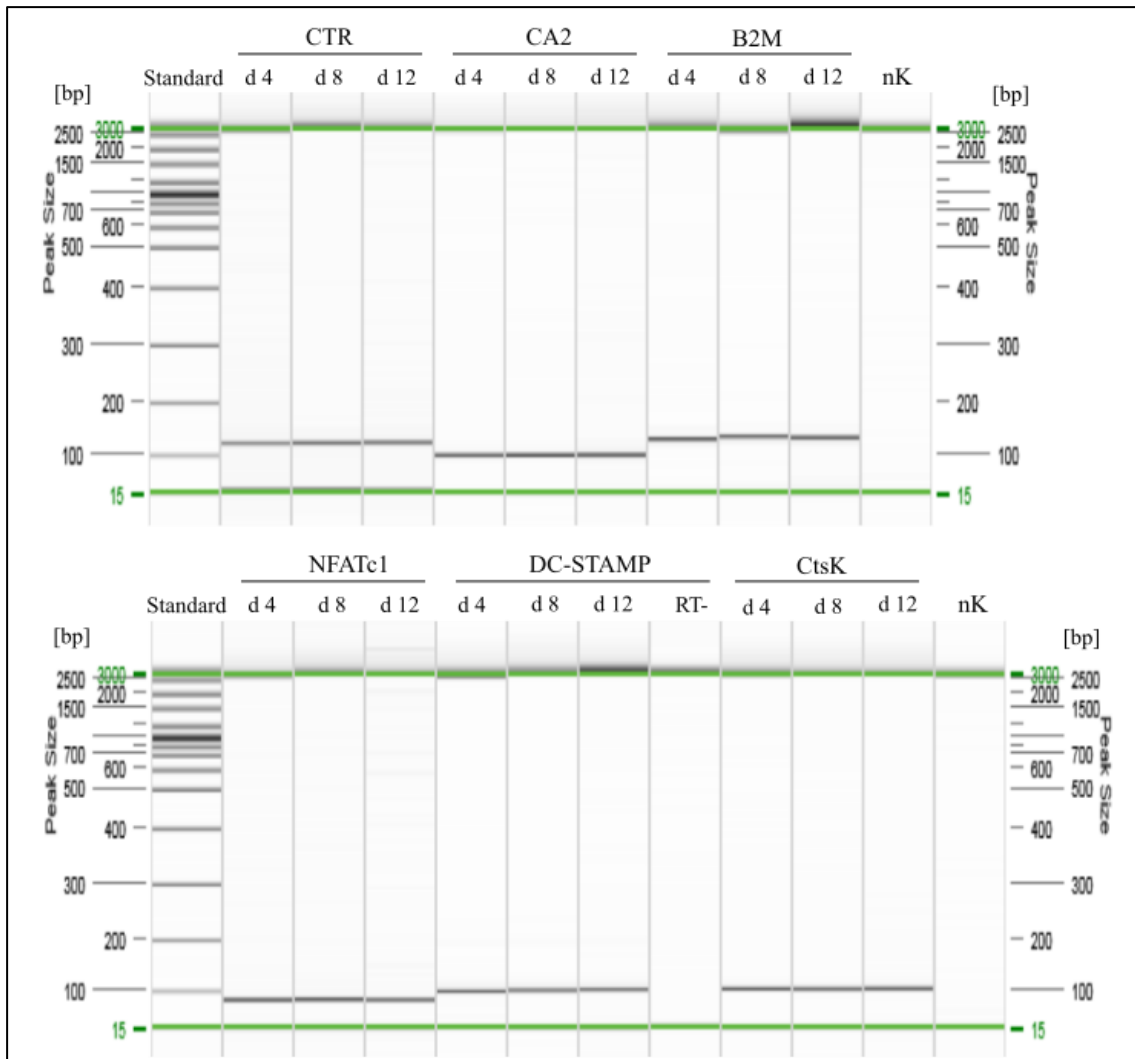


Abbildung 23: Kapillarelektrophoretische Analyse der PCR-Produkte
 Exemplarische Darstellung anhand von Proben der kompakten Scaffolds nach 4, 8 und 12 Tagen (d),
 Angabe der Produktlänge in Basenpaaren (bp). Negativ Kontrolle (nK) mit Wasser bzw. nicht revers
 transkribierte Probe (RT-)

3.2.4 Lichtmikroskopische Beobachtung der Osteoklastogenese

Die Entwicklung und Differenzierung der Monozyten zu Osteoklasten wurde alle zwei Tage lichtmikroskopisch observiert, dokumentiert und exemplarisch in den Abbildungen 24 bis 26 dargestellt. Abhängig von der Zeit konnten unterschiedliche Zellmorphologien beobachtet werden: Anfangs lagen ausschließlich kleine, runde, mononukleäre Zellen vor. Diese entsprechen den Monozyten, welche zuvor aus Spenderblut isoliert und ausgesät wurden. Nach zwei Tagen lagerten sich diese zu traubenförmigen Zellhaufen zusammen und es traten auch schmale, spindelförmige Zellen in Erscheinung. Es folgten runde, zytoplasmareichere, aber noch einkernige Zellen. Diese wurden zunehmend von

großen, multinukleären Riesenzellen abgelöst. Obwohl die Zellen gegenüber den Scaffolds kein Vermeidungsverhalten zeigten und auch auf und unter dem Material zu finden waren, schien die Differenzierung bei den Scaffolds zeitlich verlangsamt abzulaufen. In den Abbildungen 24 bis 26 ist die Entwicklung der Osteoklasten nach zwei, vier, sechs, acht, zehn und zwölf Tagen exemplarisch dargestellt. Während bei den Kontrollen nach vier Tagen bereits mehrkernige Riesenzellen vorlagen, dominierten bei den porösen Scaffolds kleine, einkernige Zellen die Kultur. In Kontakt mit den kompakten Scaffolds waren vorwiegend große mono- und multinukleäre Zellen vorhanden. Diese Beobachtungen setzten sich auch nach acht und zwölf Tagen fort. In Anwesenheit der porösen Scaffolds schienen weniger und kleinere Osteoklasten zu wachsen als in den Kontrollen.

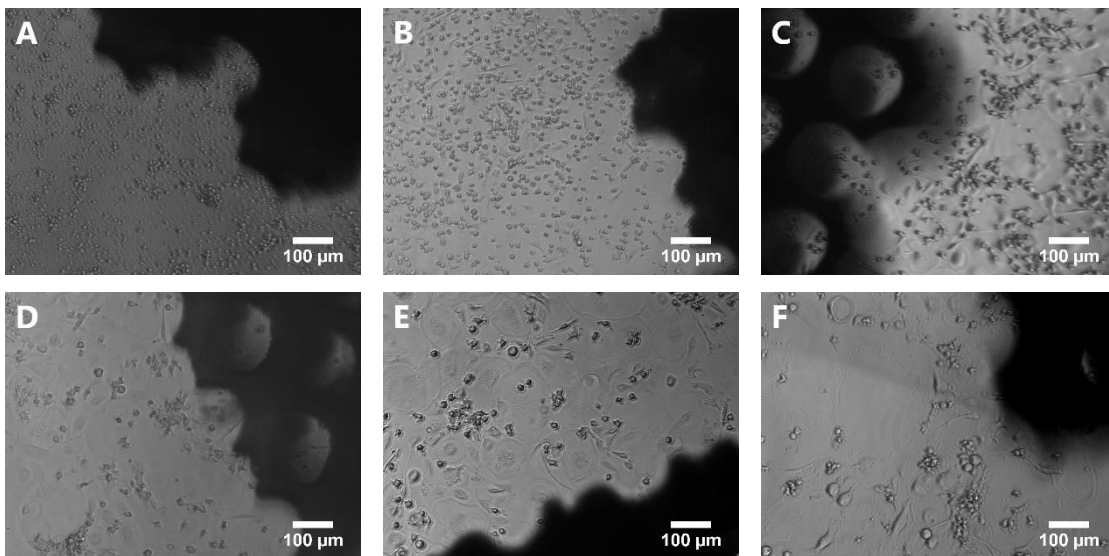


Abbildung 24: Osteoklasten im Kontakt mit porösen Scaffolds
Lichtmikroskopische Aufnahmen nach (A) zwei, (B) vier, (C) sechs, (D) acht, (E) zehn, bzw. (F) zwölf Tagen; modifiziert nach Spreda et al. (2021)

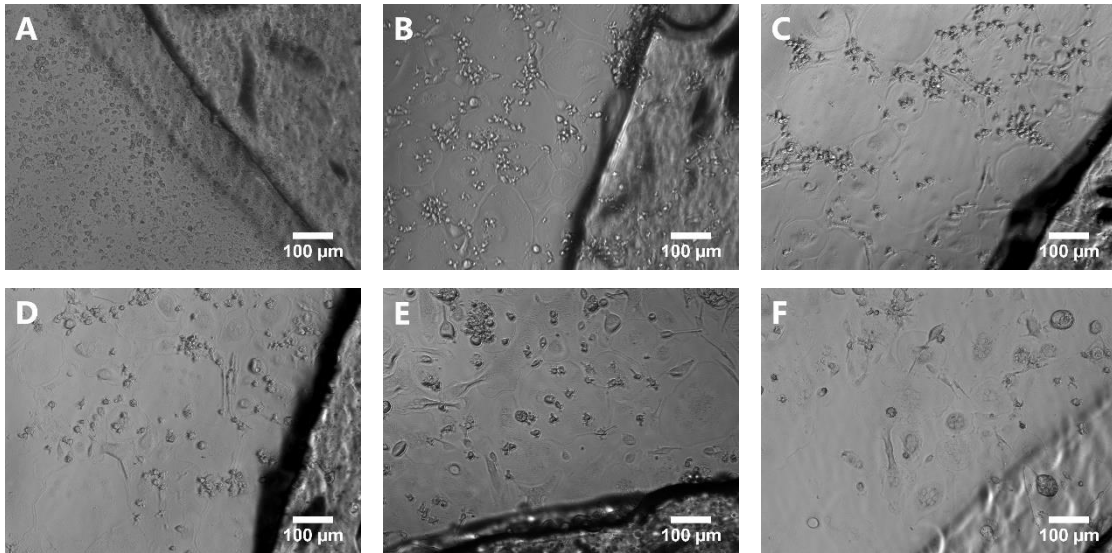


Abbildung 25: Osteoklasten im Kontakt mit kompakten Scaffolds
Lichtmikroskopische Aufnahmen nach (A) zwei, (B) vier, (C) sechs, (D) acht, (E) zehn, bzw. (F) zwölf Tagen; modifiziert nach Spreda et al. (2021)

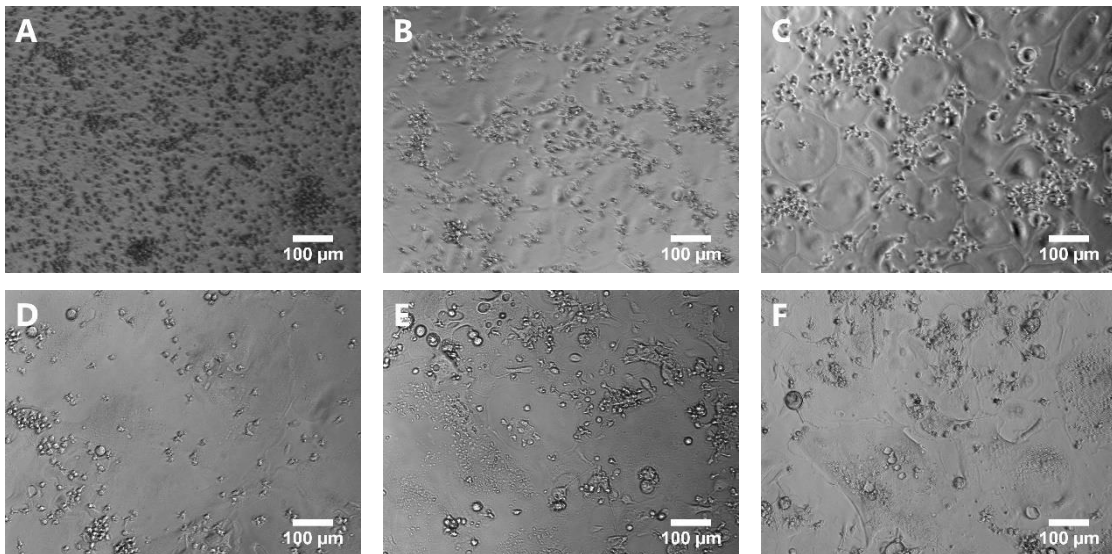


Abbildung 26: Osteoklasten auf Zellkulturplastik
Lichtmikroskopische Aufnahmen nach (A) zwei, (B) vier, (C) sechs, (D) acht, (E) zehn, bzw. (F) zwölf Tagen; modifiziert nach Spreda et al. (2021)

3.2.5 Morphologische Charakterisierung der Osteoklasten

Reife Osteoklasten zeichnen sich zum einen durch ihre Mehrkernigkeit, zum anderen durch ihr typisches Aktingerüst aus. Die Adhärenz aktiver Osteoklasten wird zunächst über fokale, integrinhaltige Aktinstrukturen, sogenannte Podosomen, vermittelt. Mit zunehmender Differenzierung werden die Podosomen von einem dichten Aktinring abgelöst. Dieser bildet zusammen mit weiteren Adhäsionsproteinen die Versiegelungszone und stellt ein Charakteristikum für reife, adhärenzte Osteoklasten dar (Väänänen, 2005).

Da das Differenzierungsverhalten der Osteoklasten unmittelbar auf den Scaffolds mit dem Lichtmikroskop nur kaum zu beurteilen war, wurde nach acht Tagen Zellkultur eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt und in den Abbildungen 27 bis 29 dargestellt. Durch fluoreszenzgekoppelte Antikörper stellten sich unter dem Mikroskop das F-Aktin des Zytoskeletts grün und die DNA des Zellkerns blau dar. Da die Scaffolds ebenfalls Farbe angenommen haben, ergibt sich bei den porösen Scaffolds eine grünliche und bei den kompakten Scaffolds eine bläuliche Hintergrundfluoreszenz. Insgesamt untermauern die Ergebnisse die Beobachtungen aus der Lichtmikroskopie. Sowohl bei den Kontrollen als auch bei den Scaffolds waren mehrkernige Zellen mit einem prominenten F-Aktinring sichtbar. Dieser Zelltyp war jedoch nur in der Kontrolle dominant. Zudem wiesen die Osteoklasten in der Kontrolle Pseudopodien auf. Auffällig war ebenfalls, dass die Zellen der Kontrollgruppe deutlich mehrkerniger waren als die Zellen der anderen Gruppen. Bei den porösen Scaffolds waren hauptsächlich rundliche, mononukleäre Zellen zu beobachten. Zwar existierten auch mehrkernige Zellen mit einem Aktinring, diese waren jedoch nur in spärlicher Anzahl vorhanden. Die Osteoklasten auf den kompakten Scaffolds erschienen größer und zahlreicher als auf dem porösen Material, jedoch dominierten insgesamt mononukleäre, spindelförmige Zellen das Bild.

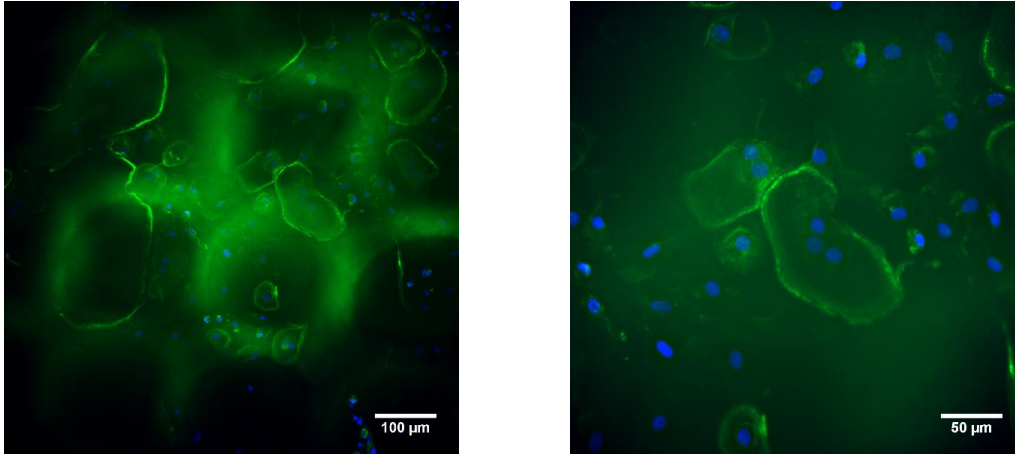


Abbildung 27: Immunfluoreszenzfärbung der Osteoklasten auf porösen Scaffolds
Nach 8 Tagen Zellkultur; blau: DNA, grün: F-Aktin; modifiziert nach Spreda et al. (2021)

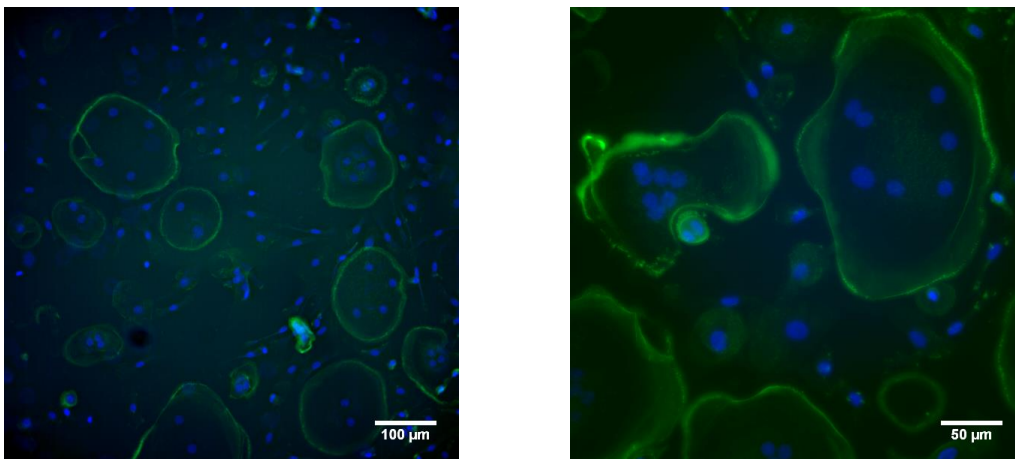


Abbildung 28: Immunfluoreszenzfärbung der Osteoklasten auf kompakten Scaffolds
Nach 8 Tagen Zellkultur; blau: DNA, grün: F-Aktin; modifiziert nach Spreda et al. (2021)

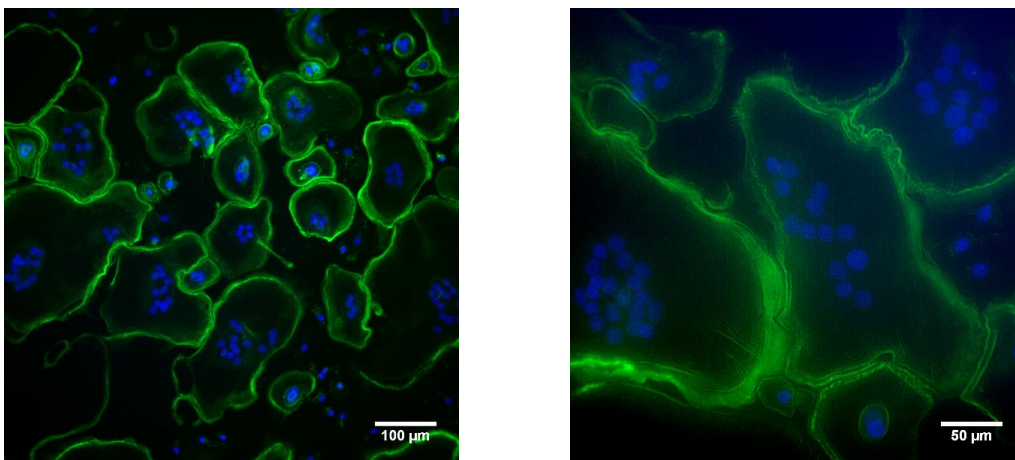


Abbildung 29: Immunfluoreszenzfärbung der Osteoklasten auf Zellkulturplastik
Nach 8 Tagen Zellkultur; blau: DNA, grün: F-Aktin; modifiziert nach Spreda et al. (2021)

4 Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden Scaffolds aus Poly-((D,L)-Lactid- ϵ -Caprolacton)-dimethacrylat (LCM) auf ihre Eignung als Osteophase biphasischer Implantate zur Versorgung osteochondraler Defekte untersucht. Dabei wurde einerseits die Biokompatibilität des Materials LCM im Kontakt mit humanen MSC und Osteoklasten, andererseits der Einfluss der porösen 3D-Struktur bestehend aus Schwarz-P-Zellen auf das Zellverhalten bestimmt.

Frühere Untersuchungen von Implantaten, welche aus ähnlichen Poly-Lactid-Caprolacton (PLCL)-Materialien gefertigt wurden, lieferten vielversprechende Ergebnisse *in vitro* und *in vivo*. PLCL wurde jedoch überwiegend auf seine Eignung als Knorpelersatzmaterial untersucht (Jung et al., 2008). PLCL bewies eine gute Biokompatibilität im Kontakt mit MSC, sowie ihre chondrogene Differenzierung und die Bildung von Knorpelmatrix. Durch eine Modifizierung der Scaffolds mit Glukosaminoglykanen konnte dieser Effekt noch verstärkt werden (Yang et al., 2012). Auch im Tiermodell konnten PLCL-Scaffolds in Kombination mit MSC eine suffiziente Knorpelregeneration von osteochondralen Defekten bewirken (Xie et al., 2010).

4.1 Biokompatibilität im Kontakt mit MSC

Ersatzmaterialien und Implantate im Körper müssen biokompatibel sein. Das bedeutet, dass ein Scaffold eine angemessene zelluläre Aktivität ermöglichen soll, ohne unerwünschte lokale oder systemische Nebeneffekte hervorzurufen (Williams, 2008). Zur Beurteilung der Biokompatibilität der LCM Scaffolds wurden humane MSC im Kontakt mit dem Material untersucht. MSC sind Vorläufer der knochen- bzw. knorpelbildenden Osteoblasten und Chondroblasten. Ihre Einwanderung, Adhäsion und Differenzierung sind für die Heilung osteochondraler Defekte entscheidend (Wang et al., 2013).

In der vorliegenden Studie wurden MSC aus humanem Knochenmaterial isoliert, kultiviert und direkt auf die Oberfläche der LCM Scaffolds bzw. auf Zellkulturplastik ausgesät. Diese Methode der Zellaussaat ist einfach und schnell durchzuführen und wird

daher häufig verwendet. Dynamische Techniken wie die Zellaussaat mittels Perfusion oder Zentrifugation sind deutlich aufwendiger, ermöglichen jedoch eine gleichmäßigere Verteilung sowie ein Eindringen der Zellen in das poröse Netzwerk der Scaffolds (Godbey et al., 2004; Wendt et al., 2003). Um eine toxische Wirkung der Materialien auszuschließen, wurde nach einer Inkubationszeit von drei und sechs Tagen ein Zytotoxizitätsassay durchgeführt. Dieser basiert auf der Messung der LDH-Konzentration im Überstand im Verhältnis zur Gesamtkonzentration von LDH. Die LDH-Konzentration verhält sich proportional zur Zahl der abgestorbenen Zellen. Aufgrund seiner einfachen Auswertung und großer Reliabilität ist der LDH-Assay ein etabliertes Verfahren zur Beurteilung der Zytotoxizität (Fotakis und Timbrell, 2006; Decker und Lohmann-Matthes, 1988; Di Pietro et al., 2022). Nachteilig ist jedoch der hohe und uneinheitliche LDH-Gehalt in FKS, welches Bestandteil des Nährmediums ist. Dadurch kann die gemessene Hintergrund-LDH-Aktivität stark erhöht und die Sensitivität des Assays beeinträchtigt werden (Thomas et al., 2015; Nguyen et al., 2020). Die Reduktion des FKS-Gehaltes sowie die Verwendung von hitzeinaktiviertem FKS mildern diesen Effekt. In der Literatur werden maximale FKS-Konzentrationen von 5 bis 10 % empfohlen (Thomas et al., 2015; Kumar et al., 2018). Der FKS-Gehalt des in dieser Studie verwendeten Kulturmediums betrug 10 %. Ferner wurden Messwerte von Proben erhoben, bei denen die Materialien nur mit Zellkulturmedium ohne Zellen inkubiert wurden. Diese wurden als Background von den Messwerten der zu untersuchenden Proben subtrahiert, um die Messverfälschung durch das Medium zu eliminieren. Weder nach drei, noch nach sechs Tagen wurden signifikante Unterschiede hinsichtlich der Toxizität zwischen porösen Scaffolds, kompakten Scaffolds und Kontrollen (KO) detektiert. Daraus kann gefolgert werden, dass LCM keine zytotoxische Wirkung auf MSC hat.

Als ergänzende Methode zur Beurteilung der Biokompatibilität wurde ein MTT-Assay durchgeführt. Dabei wird ein löslicher gelber Farbstoff im Rahmen metabolischer Aktivität der Zelle zu bläulichem Formazan umgesetzt. Dies wird spektrometrisch erfasst und ist ein anerkanntes Verfahren zur Einschätzung der Vitalität von Zellen. Im Vergleich zu anderen Methoden, wie z. B. dem Trypanblau Assay weist der MTT-Test eine höhere Sensitivität auf (Nguyen et al., 2020; Fotakis und Timbrell, 2006; Di Pietro et al., 2022). Allerdings können verschiedene Faktoren wie z. B. Arzneimittel zu falsch negativen oder falsch positiven Ergebnissen des MTT-Assays führen (Stepanenko und Dmitrenko,

2015). Qi et al. (2011) stellten fest, dass poröse PLGA-basierte Scaffoldmaterialien Formazan adsorbieren und damit eine Unterschätzung der Vitalität der kultivierten Zellen im MTT-Assay bewirken. Da LCM ebenso wie PLGA u. a. auf Lactid-Monomeren basiert, wäre ein ähnlicher Effekt von LCM denkbar. Ungeachtet dessen ergab sich in der vorliegenden Studie nach drei Tagen Inkubation eine signifikant höhere Vitalität der MSC im Kontakt mit porösen Scaffolds im Vergleich zu kompakten Scaffolds. Zwischen den Scaffolds und den Kontrollen, sowie zwischen allen Gruppen nach einer Inkubationszeit von sechs Tagen konnten keine signifikanten Unterschiede in der Vitalität gemessen werden. Angesichts dessen, dass die porösen und kompakten Scaffolds aus dem gleichen Werkstoff gefertigt wurden, lässt sich die gesteigerte Vitalität auf die Schwarz-P-Struktur der porösen Scaffolds zurückführen. Diese bietet den MSC eine größere Wachstumsfläche im Vergleich zu den kompakten Scaffolds. Auch Rampichová et al. (2013) beobachteten eine gesteigerte metabolische Aktivität, sowie verstärkte Zellmigration von MSC auf porösen 3D Scaffolds aus PCL im Vergleich zu 2D Scaffolds. Titanimplantate mit einer hohen Porosität gingen mit einer signifikant gesteigerten Proliferation und Viabilität von MSC im Vergleich zu weniger porösen Tricalciumphosphat-Scaffolds einher (Hirota et al., 2015). Seok et al. kultivierten humane MSC auf porösen und nicht porösen PCL Scaffolds. Die porösen Scaffolds induzierten eine gesteigerte Zelladhäsion, Proliferation und osteogene Differenzierung (Seok et al., 2020). Poröse PCL-Scaffolds zeigten im Vergleich zu allogenem Knochenmaterial eine gesteigerte Integration und Proliferation von humanen MSC (Lawrence et al., 2023). Untersuchungen von Liang et al. (2022) belegten die gute Biokompatibilität der Schwarz-P-Architektur von Hydroxylapatit-Scaffolds im Kontakt mit Ratten MSC im MTT-Test. In der vorliegenden Studie war der positive Effekt der Schwarz-P-Struktur auf die Vitalität nach sechs Tagen nicht mehr nachweisbar. Die Höhe der Scaffolds war mit 1 mm relativ gering, daher kann davon ausgegangen werden, dass die Wachstumsfläche der Scaffolds nach sechs Tagen bereits vollständig besiedelt war und die MSC deshalb keine gesteigerte metabolische Aktivität mehr aufwiesen.

Die Ergebnisse der funktionellen Untersuchungen korrelieren mit den Beobachtungen der Lebendzellbeobachtung der MSC unter dem Lichtmikroskop: Die MSC wuchsen im direkten Kontakt mit den porösen und kompakten Scaffolds und zeigten kein Vermeidungsverhalten. Die Zellen besaßen in allen Gruppen die charakteristische Morphologie der MSC. Es lagen überwiegend flächige, sich langsam vermehrende Zellen

sowie spindelförmige Zellen mit hoher Teilungsrate vor (Prockop et al., 2001). Sehr kleine Zellen mit einem Durchmesser von ca. 7 μm werden als schnell selbsterneuernde (*rapidly self-renewing*) Zellen (RS) bezeichnet. Das Vorliegen dieser Zellmorphologie spricht für eine hohe Proliferationsaktivität (Prockop et al., 2001). RS-Zellen waren in allen Gruppen zu finden, jedoch erschienen sie in den Kontrollen ohne Material am zahlreichsten. Auch die spindelförmigen MSC sprechen für eine hohe Proliferationsrate. Im Kontakt mit den porösen Scaffolds waren deutlich mehr spindelförmige MSC zu finden als im Kontakt mit den kompakten Scaffolds.

Insgesamt zeigt LCM also keine zytotoxische Wirkung im Kontakt mit humanen MSC. Darüber hinaus hat die Schwarz-P-Struktur der porösen Scaffolds einen positiven Einfluss auf die Vitalität und die Proliferationsaktivität der Zellen. Demnach ist von einer exzellenten Biokompatibilität der Scaffolds auszugehen. Diese Annahme steht im Einklang mit früheren Untersuchungen zu LCM und ähnlichen PLCL-Scaffolds. In vitro zeigten humane MSC eine hohe Proliferationsrate und osteogenes Differenzierungspotential auf PLCL (Xue et al., 2010). Vertenten et al. (2008) untersuchten den Einsatz von porösen LCM-Scaffolds bei unikortikalen Defekten im Ziegenmodell. Die Implantate erwiesen sich als sehr gut biokompatibel, jedoch zeigten sie zwölf Wochen nach Implantation keine osteoinduktiven Eigenschaften (Vertenten et al., 2008). Durch eine Kombination der Scaffolds mit osteogen differenzierten MSC konnte eine verbesserte Osteoinduktivität erreicht werden (Vertenten et al., 2009).

Überdies eignen sich LCM Scaffolds besonders gut für biomimetische Oberflächenmodifikationen. Durch eine Beschichtung mit Komponenten der EZM sowie BMP2 konnte eine Steigerung der Proliferation und osteogenen Differenzierung von MSC erzielt werden (Böhrens et al., 2019).

Im Rahmen einer Arbeit von Kamleitner et al. (2020) wurden Scaffolds aus LCM, welche im Verhältnis der Monomere sowie der Kettenlänge variierten, verwendet. Ebenso wie in der vorliegenden Studie wurden diese vom Institut für Bioprozess- und Analysenmesstechnik e.V. (iba, Heilbad Heiligenstadt) mittels 2PP hergestellt und waren aus Schwarz-P-Einheitszellen aufgebaut. Es wurden sowohl in vitro Experimente an murinen Osteoblasten und Osteoklasten, als auch in vivo Versuche im Mausmodell durchgeführt. Vor allem die LCM-Scaffolds im Polymerverhältnis von 16:4, welches auch in der vorliegenden Studie untersucht wurde, schienen für den Einsatz als

Knochenersatzmaterial besonders geeignet. Neben der Proliferation und Differenzierung muriner Osteoblasten *in vitro* zeigte sich ein angemessenes Degradationsverhalten. *In vivo* ermöglichten die LCM-Implantate eine Gewebeeinfiltration, Angiogenese sowie hinreichende Stabilität (Kamplleitner et al., 2020). Dadurch werden zudem die vorteilhaften Eigenschaften (z. B. mechanische Stabilität, Porosität, Permeabilität) der Schwarz-P-Architektur der Scaffolds bestätigt.

Die aktuellen Untersuchungen ergänzen die bestehenden Erkenntnisse von Kamplleitner et al. (2020) zu LCM-Scaffolds nun um eine weitere Zellart: humane MSC. Des Weiteren konnte anhand der Überlegenheit der porösen Scaffolds im Vergleich mit den kompakten Scaffolds der positive Einfluss der Schwarz-P-Struktur auf die Vitalität von MSC bewiesen werden. Um die Auswirkung der untersuchten Implantate sowie ihrer 3D-Struktur auf die osteogene Differenzierung von MSC zu beurteilen, sind weitere Untersuchungen notwendig. Ebenfalls könnte die bereits ausgezeichnete Biokompatibilität der LCM-Scaffolds durch eine biomimetische Beschichtung mit Bestandteilen der EZM optimiert werden.

4.2 Auswirkung der Scaffolds auf Osteoklasten

Während die Rolle vitaler MSC als Vorläufer der knochenbildenden Osteoblasten für eine erfolgreiche Defektheilung leicht verständlich ist, scheint die Bedeutung der knochenresorbierenden Osteoklasten zunächst paradox. Dennoch ist das Vorliegen funktionsfähiger Osteoklasten für die Regeneration osteochondraler Defekte unabdingbar. Knochenheilung ist nur im fein abgestimmten Zusammenspiel von Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten möglich (Detsch und Boccaccini, 2015). Sie läuft in vier, teilweise überlappenden Phasen ab: Auf eine initiale Entzündungsreaktion folgt die Phase des Knochenaufbaus, gefolgt von Vaskularisation und Knochenumbau (Einhorn, 1998; Detsch und Boccaccini, 2015). In der frühen Phase der Defektheilung bildet sich ein Hämatom. Aufgrund der Ausschüttung von Prostaglandinen werden Entzündungszellen sowie Fibroblasten rekrutiert und Granulationsgewebe gebildet. MSC differenzieren zu Chondroblasten und Osteoblasten, welche einen vorerst knorpeligen, dann sukzessive kalzifizierenden Kallus bilden. Dieser wird in der Phase des Knochenumbaus durch Osteoklasten abgebaut und durch Knochen in physiologischer

Struktur und mechanischer Stabilität ersetzt (Einhorn und Gerstenfeld, 2015). Gesteuert werden diese Prozesse sowohl durch Zytokine, welche von den beteiligten Zellen ausgeschüttet werden, als auch durch direkte Zell-Zell-Interaktion. Die Differenzierung der Osteoklasten wird durch unterschiedliche Signale angeregt. Wichtigste Signalmoleküle sind RANKL und M-CSF, welche unter anderem von Osteoblasten gebildet werden. Auch OPG, welches die Differenzierung hemmt, wird von Osteoblasten gebildet. Osteoklasten sezernieren hingegen Zytokine, welche die Knochenbildung durch Osteoblasten stimulieren oder hemmen können (Kim et al., 2020).

Auf Basis dessen ist die Differenzierung von Osteoklasten im Kontakt mit Knochenersatzmaterialien unerlässlich. Eine überschießende Osteoklastenaktivität ist hingegen unerwünscht und könnte zu einer frühzeitigen Degradation des Materials und daraus resultierender Instabilität oder zu einer Lockerung des Implantats führen (Detsch und Boccaccini, 2015; Minkin und Marinho, 1999).

Dementsprechend ist die Auswirkung verschiedener Biomaterialien sowie ihrer Struktur auf die Differenzierung und Aktivität der Osteoklasten von großem wissenschaftlichem Interesse. In der vorliegenden Studie wurde sowohl der Einfluss von LCM als synthetisches Polymermaterial, als auch der Einfluss der Schwarz-P-Geometrie auf humane Osteoklasten untersucht.

4.2.1 LCM-Scaffolds verändern die Morphologie der Osteoklasten

Um die Differenzierung und Aktivität von Osteoklasten *in vitro* untersuchen zu können, werden Vorläuferzellen benötigt. Dazu können sowohl aus dem Knochenmark, als auch aus dem peripheren Blut mononukleäre Zellen gewonnen werden (PBMCs). Auch die Differenzierung aus einkernigen, leukozytären Zellen ist möglich. Unter Zugaben von M-CSF und RANKL erfolgt die Differenzierung zu reifen Osteoklasten (Detsch und Boccaccini, 2015; Hattersley et al., 1991; Hemingway et al., 2011). Auch die direkte Isolation von Osteoklasten aus Knochengewebe ist möglich (Zamboni Zallone et al., 1982). Aufgrund ihrer einfachen Handhabung und hohen Reproduzierbarkeit sind auch leukämische monozytäre Zelllinien beliebt, welche als Progenitorzellen für Osteoklasten dienen (Blottière et al., 1995; Wei et al., 2001). Diese eignen sich jedoch eher zur Untersuchung der Resorptionsaktivität von Osteoklasten. Um den kompletten Prozess der Osteoklastogenese beurteilen zu können, wird, wie in der vorliegenden Studie geschehen,

die Verwendung von primären Monozyten empfohlen (Detsch und Boccaccini, 2015; Kylmäoja et al., 2018).

In Ermangelung eines einzelnen osteoklastenspezifischen Biomarkers erfordert die Analyse der Osteoklastogenese die Betrachtung verschiedener Parameter. Es können morphologische, funktionelle sowie molekularbiologische Untersuchungen angestellt werden.

Ihre Entwicklung von Vorläuferzellen zu ihrer ausgereiften, mehrkernigen Gestalt durchlaufen die Osteoklasten in mehreren Schritten. Zu Beginn migrieren die Monozyten zueinander, was sich lichtmikroskopisch in der traubenartigen Ansammlung kleiner, einkerniger Zellen beobachten lässt. Anschließend verschmelzen die einkernigen Zellen zu größeren, mehrkernigen Zellen. Reife Osteoklasten entsprechen multinukleären Riesenzellen (Jansen et al., 2012). Dieser Prozess erschien im Kontakt mit den porösen Scaffolds verzögert. Während in den Kontrollen und im Kontakt mit den kompakten Scaffolds bereits nach viertägiger Inkubation mehrkernige Zellen vorzufinden waren, waren diese bei den porösen Scaffolds nach sechs Tagen nur vereinzelt zu erkennen. Auch nach zwölf Tagen waren die Osteoklasten bei den porösen Scaffolds deutlich kleiner als bei den kompakten Scaffolds und den Kontrollen ohne Material. Im Einklang damit stehen die Ergebnisse der Immunfluoreszenzmikroskopie. Da sich die Zellen, welche sich direkt auf den Scaffolds befanden, lichtmikroskopisch nicht beurteilen ließen, wurden sie nach acht Tagen Kultur direkt auf dem Material angefärbt. Weiterhin erlauben spezifische Färbungen die eindeutige Charakterisierung der Osteoklasten. Eine weit verbreitete Methode zur Detektion von Osteoklasten ist die histochemische TRAP-Färbung, welche die lichtmikroskopische Unterscheidung zwischen TRAP-positiven Osteoklasten und undifferenzierten Monozyten ermöglicht (Faust et al., 1999; Connor et al., 1995). Auch die immunhistochemische Färbung des von Osteoklasten exprimierten Calcitoninrezeptors ist möglich (Quinn et al., 1999). In der vorliegenden Untersuchung wurden F-Aktin und DNA mit fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern markiert. Dadurch stellten sich in der Immunfluoreszenzmikroskopie die Zellkerne blau und das Aktingerüst des Zytoskeletts grün dar. Charakteristika reifer, adhärenter Osteoklasten sind ihre Mehrkernigkeit sowie die Ausbildung eines Aktinrings in der Peripherie des Zytoplasmas (Väänänen, 2005). Sowohl auf den Scaffolds, als auch in den Kontrollen waren multinukleäre Zellen mit Aktinringen vorzufinden. Daraus kann geschlossen werden, dass im direkten Kontakt mit den porösen und kompakten Scaffolds die Differenzierung

und die Adhärenz maturer Osteoklasten möglich ist. Auffällig war jedoch, dass die Osteoklasten auf den porösen Scaffolds deutlich kleiner und weniger zahlreich waren als in der Kontrolle. Zudem verfügten sie über weniger Zellkerne pro Zelle. Auch die Osteoklasten auf den kompakten Scaffolds waren in ihrer Größe und Mehrkernigkeit den Zellen auf den porösen Scaffolds überlegen. Insgesamt lagen jedoch noch viele mononukleäre Zellen und weniger reife Osteoklasten als in den Kontrollen vor.

Kamplaitner et al. untersuchten bereits den Einfluss von LCM-Scaffolds mit Schwarz-P Architektur auf die Osteoklastogenese. Murine Osteoklasten wurden zusammen mit Osteoblasten auf Scaffolds unterschiedlicher Polymerverhältnisse, bzw. in Kontrollen ohne Material differenziert. Nach sechs Tagen waren in allen Gruppen reife Osteoklasten vorhanden. Im Kontakt mit den LCM Scaffolds waren es jedoch weniger und kleinere Zellen als in den Kontrollen (Kamplaitner et al., 2020). Die Ergebnisse der aktuellen Studie bestätigen daher die Beobachtungen von Kamplaitner et al. an humanen Osteoklasten. Ebenso legen sie nahe, dass die Osteoklastogenese nicht nur durch LCM als Material, sondern auch durch die dreidimensionale Schwarz-P Struktur der porösen Scaffolds verzögert wird. Trotzdem ist die Differenzierung reifer Osteoklasten auf porösen und kompakten LCM Scaffolds möglich.

Zur Erklärung dieses Phänomens können verschiedene Einflussgrößen diskutiert werden. Eine denkbare Ursache ist die Rauheit der Materialoberfläche. Zhang et al. untersuchten den Einfluss unterschiedlich rauer Titanoberflächen auf die Osteoklastogenese muriner RAW264.7 Zellen. Sie stellten fest, dass Größe und Mehrkernigkeit der Osteoklasten abnahmen, je rauer die Oberfläche beschaffen war (Zhang et al., 2018b). Die porösen Scaffolds wurden mittels Zwei-Photonen-Polymerisation hergestellt. Diese Technik gehört zu den *layer-by-layer* Herstellungsverfahren. Daher ist die Oberfläche der porösen Scaffolds rauer als die der kompakten Scaffolds, bzw. des Zellkulturplastiks, welche eine glatte Oberfläche besitzen. Möglicherweise wird die Zellmigration und Ausbreitung durch raue Oberflächen behindert, sodass weniger Vorläuferzellen miteinander verschmelzen (Detsch und Boccaccini, 2015; Marchisio et al., 2005). Andere Publikationen suggerieren jedoch einen positiven Einfluss rauer Oberflächen auf die Osteoklastogenese (Chen et al., 2019; Gross et al., 2012; Shemesh et al., 2017; Kylmäoja et al., 2023). Der tatsächliche Einfluss der Oberflächentopographie auf die Differenzierung der Osteoklasten ist daher nicht abschließend geklärt.

Charakteristisch für die Minimalflächen-Architektur der Schwarz-P-Zellen ist ihre geringe Oberflächenenergie (Blanquer et al., 2017). Redey et al. verglichen das Wachstumsverhalten von Osteoklasten auf synthetischem Hydroxylapatit, karbonisiertem Hydroxylapatit und natürlichem Calciumcarbonat. Diese Materialien unterschieden sich in ihrer Oberflächenenergie, wobei karbonisiertes Hydroxylapatit die geringste und Calciumcarbonat die höchste Oberflächenenergie aufwies. Dabei korrelierte die Adhäsion der Osteoklasten mit der Oberflächenenergie (Redey et al., 1999). Möglicherweise erschwert also die geringe Oberflächenenergie der Schwarz-P Zellen die Adhäsion der Osteoklasten. Bergara-Muguruza et al. veränderten die Oberflächenenergie von Hydroxylapatit und karbonat-substituiertem Apatit durch elektrische Polarisierung. Bezüglich der Mehrkernigkeit und der Aktinringe wurden jedoch keine Unterschiede in Abhängigkeit von der Oberflächenenergie festgestellt (Bergara-Muguruza et al., 2021).

Die diskutierten Studien beziehen sich vordergründig auf die Oberflächen von Metallen und Biokeramiken. Inwiefern diese Ergebnisse auf Oberflächenbeschaffenheit synthetische Polymermaterialien übertragbar sind, ist unklar.

Auch die Steifigkeit von Scaffoldmaterialien kann das Differenzierungsverhalten von Osteoklasten verändern. Untersuchungen von Silikon-Scaffolds aus Polydimethylsiloxan unterschiedlicher Steifigkeit zeigten ein behindertes Migrationsverhalten von Osteoklasten auf weicheren Scaffolds im Vergleich zu steiferen Materialien. Zudem waren die Osteoklasten auf den weicheren Werkstoffen deutlich kleiner (Wang et al., 2022a). Die Steifigkeit beeinflusste die Organisation des Zytoskeletts. Während sich auf festeren Materialien klar abgrenzbare Aktinringe sowie Zellausläufer und Pseudopodien bildeten, schien das Aktingerüst auf weicheren Materialien weniger organisiert. Dies spiegelte sich auch in der Expression und Synthese verschiedener Gene wider, welche am Integrin- $\alpha\beta 3$ -Signalweg beteiligt sind. Steifere Werkstoffe schienen direkt die Funktion der Integrine und die daraus resultierende Organisation des Zytoskeletts zu fördern (Wang et al., 2022a). Die in der vorliegenden Studie untersuchten porösen Scaffolds verfügten über eine geringere Steifigkeit als die kompakten Scaffolds bzw. das Zellkulturplastik. Verglichen mit den Kontrollen wirkte das Aktingerüst der Osteoklasten auf den porösen Scaffolds deutlich weniger organisiert. Eine Verminderung der Integrin-vermittelten Adhäsion und Organisation des Zytoskeletts ist daher denkbar.

Abbildung 30 gibt eine Übersicht über die Expression verschiedener Marker im Verlauf des Differenzierungsprozesses.

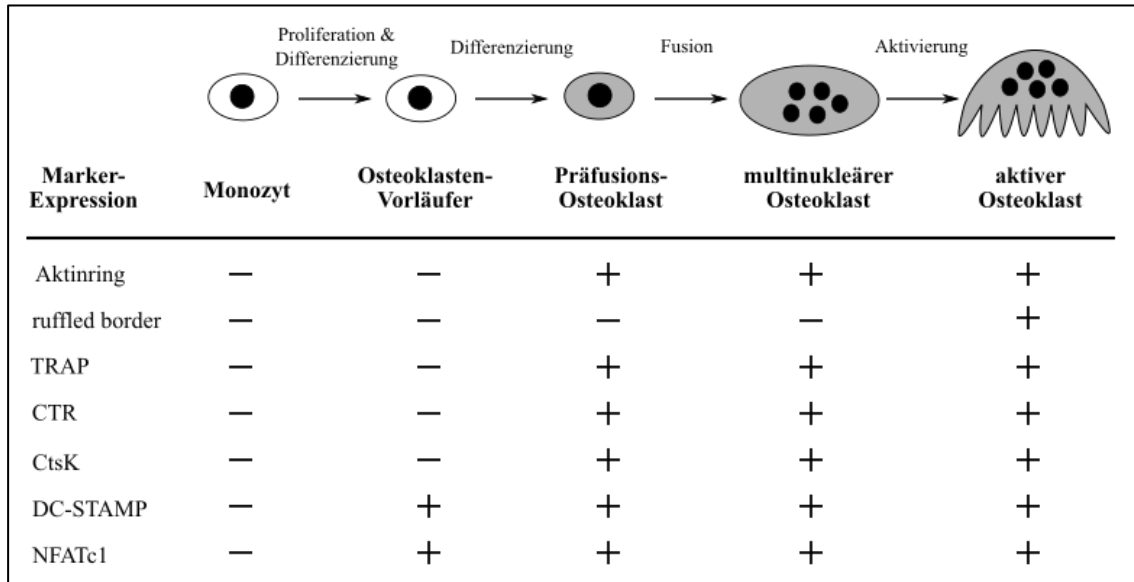


Abbildung 30: Marker-Expression im Verlauf der Osteoklasten-Differenzierung
 Frei nach Detsch und Boccaccini (2015).

4.2.2 Osteoklastogenese molekularbiologisch unverändert

Morphologische Untersuchungen der Osteoklasten auf den LCM-Scaffolds zeigten eine verzögerte Osteoklastogenese auf den porösen Scaffolds. Dementsprechend wäre zu erwarten, dass sich diese Verzögerung in der Expression an der Osteoklastogenese beteiligter Gene widerspiegelte. Um diese zu messen wurde nach vier, acht und zwölf Tagen die RNA der Zellen isoliert und mittels *real-time* RT-PCR quantifiziert. Dieses Verfahren dient nicht nur dem Nachweis von z. B. Viruserbguts, sondern ermöglicht die schnelle und höchst sensitive Analyse der mRNA-Expression bis auf das Niveau einer einzelnen Zelle (Stählberg et al., 2011; Green und Sambrook, 2018). Im Gegensatz zu anderen Techniken zur Untersuchung von mRNA, wie z. B. dem Northern Blot oder der in-situ-Hybridisierung ist die *real-time* RT-PCR schneller durchzuführen und benötigt keine toxischen oder radioaktiven Proben. Um die Variabilität der Messergebnisse zu minimieren und Reproduzierbarkeit zu gewährleisten muss jedoch, vor allem bei der Herstellung der cDNA, auf exaktes und sauberes Arbeiten geachtet werden. Während Rückstände des Mediums oder des Extraktionsreagenz zu falsch negativen Ergebnissen

führen, können Verunreinigungen durch genomische DNA insbesondere bei geringen mRNA-Konzentrationen zu einer Überschätzung des mRNA-Gehaltes führen. Deshalb wird die Verwendung sogenannter Intron-spannender Primer empfohlen (Green und Sambrook, 2018). In der vorliegenden Studie erfüllten alle Primer außer der für DC-STAMP verwendete Primer dieses Kriterium. In diesem Fall wurde jeweils eine Probe ohne reverse Transkriptase gemessen, um eine Verunreinigung durch genomische DNA auszuschließen. Außerdem wurde die spezifische Länge der PCR-Produkte kapillarelektrophoretisch nachgewiesen und damit der Erfolg der RT-PCR überprüft.

Aufgrund seiner Rolle als zentraler Transkriptionsfaktor der Osteoklastogenese wurde die Genexpression von NFATc1 beurteilt. NFATc1 wird u. a. durch RANKL aktiviert und ist an der Expression einer Vielzahl von osteoklastenspezifischen Genen beteiligt (Ono und Nakashima, 2018). Verschiedene Implantatmaterialien können Einfluss auf die NFATc1 Expression in Osteoklasten nehmen. Lanthan/Magnesium-Hydroxide inhibierten die RANKL und NFATc1 vermittelte Osteoklastogenese von Rattenzellen *in vitro* (Chu et al., 2021). Yuan et al. beschichteten poröse Kunststoffcaffolds aus Polyetherketonketon mit Hydroxylapatit. Im Vergleich zu unbeschichteten Scaffolds war die Expression von NFATc1 sowie weiterer an der Osteoklastogenese beteiligter Gene reduziert (Yuan et al., 2020). Inamitsu et al. untersuchten die Auswirkungen methacrylathaltiger Harz-Monomere, welche überwiegend in der Zahntechnik zum Einsatz kommen, auf die Differenzierung muriner Osteoklasten. Die synthetischen Polymermonomere bewirkten eine gehemmte Formation der Osteoklasten sowie eine deutlich reduzierte Expression von NFATc1 (Inamitsu et al., 2017). Eine Beeinträchtigung der NFATc1 Expression durch LCM wäre folglich denkbar. Im Vergleich zu den Kontrollen schienen die LCM-Scaffolds jedoch zu keinem Untersuchungszeitpunkt signifikanten Einfluss auf die relative Genexpression von NFATc1 zu nehmen. Ähnliche Beobachtungen machten Bartnikowski et al. im Vergleich von PCL-Scaffolds mit Zellkulturplastik. Die NFATc1 Expression muriner Osteoklasten auf PCL unterschied sich nicht signifikant von Zellen ohne Material (Bartnikowski et al., 2018). Obwohl die Differenzierung der Osteoklasten besonders auf den porösen Scaffolds gehemmt erschien, konnte dies durch die molekularbiologische Analyse des Transkriptionsfaktors NFATc1 nicht bestätigt werden.

Die Fusion von Vorläuferzellen zu mehrkernigen Riesenzellen erfolgt erst spät im Reifungsprozess der Osteoklasten. Von zentraler Bedeutung für den Fusionsprozess ist

das Transmembranprotein DC-STAMP. Gendefiziente Mäuse zeigten keine mehrkernigen Osteoklasten. Auch einkernige Zellen konnten osteoklastentypische Merkmale wie z. B. eine positive TRAP-Färbung aufweisen, jedoch waren sie mehrkernigen Zellen in ihrer Funktion und Aktivität unterlegen. Interessanterweise waren andere Zellarten, wie z. B. Keimzellen, in ihrer Funktion unbeeinträchtigt. Aufgrund dessen kann von einer gewebespezifischen Regulation durch DC-STAMP ausgegangen werden (Kodama und Kaito, 2020; Iwasaki et al., 2008). Weitere an der Fusion beteiligte Gene sind u. a. OC-STAMP, ATP6v0d2 oder CD47-MFR (Kodama und Kaito, 2020). Obwohl in der vorliegenden Untersuchung die Osteoklasten in den Kontrollen deutlich mehrkerniger waren als auf den Scaffolds, konnten zu keinem Zeitpunkt signifikante Differenzen in der relativen Genexpression von DC-STAMP festgestellt werden. Möglicherweise waren die Untersuchungszeitpunkte von vier, acht und zwölf Tagen zu weit gewählt, sodass der Fusionsvorgang bisher nicht begonnen hatte bzw. schon abgeschlossen war. Untersuchungen der Differenzierung muriner RAW 264.7 Zellen zeigten einen deutlichen Abfall der DC-STAMP Expression nach vier Tagen Kultur unter RANKL-Stimulation (Lampiasi et al., 2021). Zur genaueren Abbildung des Differenzierungsprozesses müssten kleinere Zeitabstände von z. B. 24 oder 48 Stunden gewählt werden.

Auch die Präsentation des Calcitonin-Rezeptors auf der Zellmembran wird als Reifezeichen funktionsfähiger Osteoklasten angesehen. Calcitonin hemmt die Aktivität von Osteoklasten im Rahmen der Calciumhomöostase (Detsch und Boccaccini, 2015; Ono und Nakashima, 2018). In der vorliegenden Arbeit wurde am Tag acht eine Reduktion der Genexpression des CTR auf den porösen Scaffolds im Vergleich zu den Kontrollen gemessen. Nach vier und zwölf Tagen waren die Unterschiede jedoch statistisch nicht signifikant. Dies kann als Hinweis auf eine gehemmte Osteoklastogenese, sowie eine verminderte Osteoklastenaktivität auf den porösen Scaffolds gewertet werden.

4.2.3 Reduktion der Osteoklastenaktivität

Neben ihrer Entwicklung aus Vorläuferzellen kann auch die Aktivität von Osteoklasten durch Biomaterialien beeinflusst werden. Zur Messung der Aktivität können unterschiedliche Verfahren angewendet werden. Einerseits kann die Resorptionsaktivität auf den entsprechenden Biomaterialien bewertet werden. Dazu ist die Messung von

Abbauprodukten im Überstand mittels Massenspektrometrie oder die mikroskopische Analyse von Degradationsveränderungen in der Oberfläche des Materials möglich. Mit Hilfe von z. B. Rasterelektronen- oder Raman-Mikroskopie kann die Anzahl, Größe und Tiefe der Resorptionslakunen visualisiert und quantifiziert werden. Voraussetzung dafür ist jedoch eine relativ glatte Oberfläche, damit zwischen Resorptionsflächen und Unregelmäßigkeiten der Materialoberfläche unterschieden werden kann. Daher sind diese Verfahren nur schlecht für die Anwendung auf porösen und 3D-Materialien geeignet (Bernhardt et al., 2017; Detsch und Boccaccini, 2015; Zhang et al., 2012). Andererseits können funktionelle Untersuchungen osteoklastentypischer Enzyme wie CtsK, CA2 oder TRAP angestellt werden. Vor allem die Messung die Aktivität der für Osteoklasten spezifischen Isoform TRAP5b ist ein geeignetes Verfahren zur Beurteilung der Osteoklastenaktivität (Bernhardt et al., 2017; Alatalo et al., 2000). Ebenso ist die Analyse der Genexpression mittels *real-time* RT-PCR möglich. CtsK ist eine Cysteinprotease und am Abbau organischer Matrixbestandteile wie Kollagen beteiligt. Durch die Bildung von H⁺-Ionen trägt die CA2 zur Degradation anorganischer Matrix bei. Auch weitere Proteine, wie z. B. MMP-9 sind an der Knochenresorption beteiligt und werden als Marker für die Osteoklastenaktivität in der *real-time* RT-PCR genutzt (Ono und Nakashima, 2018; Yuan et al., 2020; Novinec und Lenarčič, 2013).

Da die Größe und Mehrkernigkeit von Osteoklasten mit ihrer Aktivität korreliert, war eine eingeschränkte Aktivität der Osteoklasten auf den porösen Scaffolds zu erwarten (Kodama und Kaito, 2020; Lees et al., 2001). Im Vergleich zu den Kontrollen war die TRAP5b Aktivität auf den porösen Scaffolds signifikant reduziert. Auch die relative Genexpression von CtsK auf den porösen Scaffolds war den Kontrollen zu allen Untersuchungszeitpunkten signifikant unterlegen. Die TRAP5b Aktivität sowie die Expression von CtsK auf den kompakten Scaffolds erschien höher als auf den porösen Scaffolds, jedoch geringer als in den Kontrollen. Die Unterschiede waren allerdings nicht statistisch signifikant. Trotzdem kann vermutet werden, dass die Aktivität der Osteoklasten sowohl durch LCM als Material, als auch durch die Architektur der porösen Scaffolds gehemmt wird. Die Auswirkungen poröser LCM-Scaffolds mit Schwarz-P-Struktur auf die Aktivität von Osteoklasten wurden bisher nicht untersucht.

Ebenso wie die Osteoklastogenese kann die Osteoklastenaktivität durch die Rauigkeit der Materialoberfläche beeinflusst werden. Yuan et al. modifizierten die Oberfläche von Polyetherketonketon-Scaffolds durch eine Beschichtung mit Hydroxylapatit, wodurch sie

deutlich rauer wurde. Durch diese Modifikation wurde sowohl die Aktivität der TRAP, als auch die Expression von CtsK nach vier und nach sieben Tagen Inkubationszeit vermindert (Yuan et al., 2020). Mehrere Studien stellten eine reduzierte TRAP Aktivität sowie eine geringere Expression von CtsK von Osteoklasten auf rauen im Vergleich mit glatten Titanoberflächen fest (Zhang et al., 2018b; He et al., 2022). Diese Ergebnisse stehen mit den Beobachtungen der vorliegenden Arbeit im Einklang. Ähnlich der Osteoklastogenese wird jedoch auch die Beeinflussung der Aktivität durch die Rauigkeit der Materialoberfläche kontrovers diskutiert. In anderen Studien bewirkte die Kultur auf rauen Metalloberflächen eine gesteigerte Osteoklastenaktivität (Makihira et al., 2007; Sommer et al., 2005; Steffi et al., 2018). Interessanterweise stellten Costa-Rodrigues et al. fest, dass die Auswirkung der Topographie von der Art der Osteoklastenstimulation abhing. Während humane PBMCs unter Stimulation mit RANKL und M-CFS auf rauen Oberflächen eine gesteigerte TRAP Aktivität sowie CtsK-Expression aufwiesen, wurden PBMCs in Co-Kultur mit Knochenmarkzellen durch raue Oberflächen in ihrer Aktivität gehemmt (Costa-Rodrigues et al., 2012).

Weiterhin ist eine Hemmung der Osteoklastenaktivität durch die chemische Zusammensetzung von LCM möglich. LCM setzt sich aus Lactid und Caprolacton zusammen. Zum Einfluss von Caprolacton-Polymeren auf die Aktivität von Osteoklasten ist nur wenig bekannt. In Untersuchungen von Bartnikowski et al. wirkte es sich jedoch nicht negativ aus. Im Vergleich zu Zellkulturplastik war die Expression von TRAP auf PCL nicht signifikant verändert (Bartnikowski et al., 2018). Verschiedene Studien legen hingegen eine Beeinträchtigung der Osteoklasten durch PLA nahe. Jones et al. analysierten das Wachstum von Osteoklasten in Monokultur und Co-Kultur mit Osteoblasten durch immunhistochemische TRAP-Färbung. In beiden Fällen war die TRAP-Aktivität auf PLA im Vergleich zu Filmen aus Chitosan und Seidenprotein gehemmt (Jones et al., 2009). Partale et al. verglichen die Osteointegration von Stahlschrauben mit und ohne PLA-Beschichtung im Schafmodell nach einer Standzeit von neun Wochen. Durch immunhistochemische Färbung war im Kontakt mit den beschichteten Schrauben eine signifikant reduzierte TRAP-Aktivität sowie eine deutlich geringere Anzahl an Osteoklasten vorzufinden. Zudem wurde eine deutlich verbesserte Osteointegration erzielt (Partale et al., 2005). Die gehemmte Aktivität der Osteoklasten auf LCM lässt sich also möglicherweise durch die in LCM enthaltene Lactid-Monomere erklären.

Untersuchungen von Kamleitner et al. verglichen die Biokompatibilität von LCM Scaffolds in unterschiedlichen Polymerverhältnissen. Auffällig war, dass die Scaffolds mit dem höchsten Lactid-Anteil (LCM6.1) die schlechteste Biokompatibilität aufwiesen. Im Kontakt mit den LCM6.1 Scaffolds ließen sich signifikant weniger Osteoklasten mittels immunhistochemischer TRAP-Färbung nachweisen. Da die LCM6.1 Scaffolds zudem über die höchste Degradationsrate verfügten, wurden die ungünstigen Eigenschaften auf eventuell toxische Degradationsprodukte zurückgeführt. Die Zersetzung von LCM erfolgte zeitabhängig und überwiegend durch Hydrolyse. Eine Beteiligung der Osteoklasten an der Degradation ist nicht geklärt (Kamleitner et al., 2020; Felfel et al., 2016). Eine Hemmung der Osteoklastenaktivität durch Degradationsprodukte in der aktuellen Studie liegt auch daher nahe, da die Degradationsrate eines Scaffolds auch von der Oberfläche und Porosität eines Materials abhängt (Felfel et al., 2016). Trotz dessen, dass die Unterschiede nicht statistisch signifikant waren, schien die Aktivität der Osteoklasten auf den kompakten Scaffolds geringer als in den Kontrollen, jedoch höher als auf den porösen Scaffolds. Möglicherweise wurden aufgrund der geringeren Oberfläche weniger toxische Abbauprodukte freigesetzt. Als Ursache der toxischen Wirkung ist eine Beeinflussung des pH-Wertes durch saure Degradationsprodukte denkbar. Die Aktivität von Osteoklasten ist vom pH-Wert des Mediums abhängig, welcher durch verschiedene Werkstoffe beeinflusst werden kann. Welcher pH-Wert für die Aktivität reifer Osteoklasten als ideal gilt, ist nicht abschließend geklärt. Keller et al. kultivierten humane PBMCs auf häufig verwendeten Knochenersatzmaterialien. Sie stellten fest, dass die Reduktion des pH-Wertes durch das Material auf 7,2 mit einer Reduktion der Mehrkernigkeit sowie der Resorptionsaktivität der Osteoklasten einher ging (Keller et al., 2012). Frühere Studien suggerierten jedoch einen positiven Effekt azidotischen Mediums auf die Aktivität von Osteoklasten. Shibutani und Heersche veränderten den pH-Wert des Kulturmediums durch Zugabe von Salzsäure und analysierten die Aktivität von Osteoklasten auf Knochen über die Resorptionsfläche und TRAP-Färbung. Bei einem pH-Wert von 6,5 bis 7,0 zeigten die Zellen die höchste Resorptionsaktivität (Shibutani und Heersche, 1993). Auch Versuche von Arnett und Dempster belegten einen positiven Effekt sauren Mediums auf die Aktivität von Osteoklasten. Durch die Reduktion des pH-Wertes des Kulturmediums von 7,4 auf 6,8 wurde die Zahl und Größe der Resorptionslakunen auf Knochen um ein 14-faches gesteigert (Arnett und Dempster, 1986). Allerdings nehmen auch kleinere Veränderungen, welche eher im Bereich des

physiologischen pH-Wertes liegen, Einfluss auf die Osteoklastenaktivität. Durch eine Verminderung des pH-Wertes von 7,25 auf 7,15 konnte die Anzahl der Resorptionslakunen auf dem Knochen mehr als verfünffacht werden (Arnett und Spowage, 1996). In der vorliegenden Studie wurde der pH-Wert des Kulturmediums nicht gemessen. Experimente von Kampleitner et al. und Felfel et al. prüften das Degradationsverhalten poröser LCM-Scaffolds in Schwarz-P-Architektur bei 37 °C in PBS (pH 7,4). Unabhängig von der Polymerzusammensetzung belief sich der pH-Wert in einem Zeitraum von bis zu 90 Tagen stets im physiologischen Bereich zwischen 7,25 und 7,45. Jedoch waren die Scaffolds mit Volumina von 16 mm³ bzw. 10 mm³ kleiner als in der aktuellen Studie, es wurden jedoch 30 ml PBS pro Scaffold verwendet (Felfel et al., 2016; Kampleitner et al., 2020). In der vorliegenden Studie wurden pro Scaffolds 500 µl Kulturmedium zugegeben, welches alle zwei Tage gewechselt wurde. In der aktuellen Studie wurde also deutlich weniger Flüssigkeit pro Scaffolds verwendet. Eine Veränderung des pH-Wertes im Medium durch die LCM-Scaffolds erscheint aufgrund der Ergebnisse von Kampleitner et al.; Felfel et al. also unwahrscheinlich, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Interessanterweise wurden im Kontakt mit den LCM-Scaffolds keine signifikanten Unterschiede in der Expression der CA2 detektiert. Biskobing und Fan analysierten die Genexpression von CA2 und CTR in Abhängigkeit vom pH-Wert des Mediums. Sie beobachteten eine signifikant gesteigerte Expression beider Gene im sauren Milieu. Dies wurde dadurch erklärt, dass die CA2 nicht nur an der Ansäuerung der Howship-Lakune, sondern auch an der Aufrechterhaltung des intrazellulären pH-Wertes beteiligt ist (Biskobing und Fan, 2000). Da auch die Expression von CTR in der aktuellen Studie lediglich am Tag acht durch die porösen Scaffolds signifikant reduziert wurde, sprechen die Ergebnisse nicht für eine deutliche Beeinflussung des pH-Wertes durch LCM.

Insgesamt zeigte sich also im Kontakt mit den porösen LCM Scaffolds eine signifikante Reduktion der Osteoklastenaktivität. Diese scheint sowohl auf die Schwarz-P-Struktur, als auch auf LCM als Material zurückzuführen sein. Eine eindeutige Zuordnung der Ursache ist jedoch nicht möglich.

4.3 Fazit der Studie und Ausblick

Zusammenfassend bewiesen die neuen LCM-Implantate eine ausgezeichnete in vitro Verträglichkeit. Im Kontakt mit MSC wurde zu keinem Zeitpunkt eine zytotoxische Wirkung festgestellt. Besonders hervorzuheben ist, dass allein durch die poröse 3D-Struktur der Schwarz-P Zellen eine gesteigerte Vitalität der MSC, sowie eine verminderte Aktivität der Osteoklasten erzielt wurde. Um eine Defektheilung zu ermöglichen, müssen sowohl das Einwandern und die Proliferation von MSC als Vorläufer der knochenbildenden Osteoblasten, als auch die Differenzierung funktionsfähiger Osteoklasten möglich sein. Eine überschießende Aktivität der Osteoklasten könnte hingegen aufgrund vorzeitiger Degradation oder Lockerung des Implantats zur Instabilität führen und ist daher unerwünscht. Demnach sind die porösen Scaffolds für den Einsatz als Knochenersatzmaterial und in der Osteophase biphasischer Implantate besonders geeignet. Kritisch ist jedoch anzumerken, dass die Stichprobengröße der Studie mit je fünf Spendern von MSC und PBMC relativ gering war. Insbesondere das Zellverhalten der MSC unterscheidet sich zwischen verschiedenen Spendern beträchtlich, sodass weitere Untersuchungen, z. B. zur osteogenen Differenzierung, wünschenswert sind (Sisakhtnezhad et al., 2017). Da sich die Entwicklung und Aktivität von Osteoklasten im Kontakt mit Implantatmaterialien je nach Zellkulturmodell unterscheiden können, wäre auch eine Co-Kultur von Osteoblasten und Osteoklasten interessant (Costa-Rodrigues et al., 2012).

Im weiteren Verlauf des Poly-IMPLANT-Druck Projektes sind weitere Untersuchungen und Modifikationen der LCM-Scaffolds geplant. Bspw. soll die Bioaktivität durch eine Beschichtung mit EZM-Bestandteilen optimiert werden. Zudem sind in vivo Großtierstudien geplant. Möglicherweise kommen LCM-Scaffolds mit Schwarz-P-Architektur aufgrund ihrer vielversprechenden Biokompatibilität zukünftig im klinischen Alltag zur Anwendung. Durch das Herstellungsverfahren der 2-PP können Implantate mit passgenauen Eigenschaften angefertigt werden, um eine einfache und patientenorientierte Behandlung zu ermöglichen. Die Ergebnisse der Studie werden in Abbildung 31 zusammengefasst.

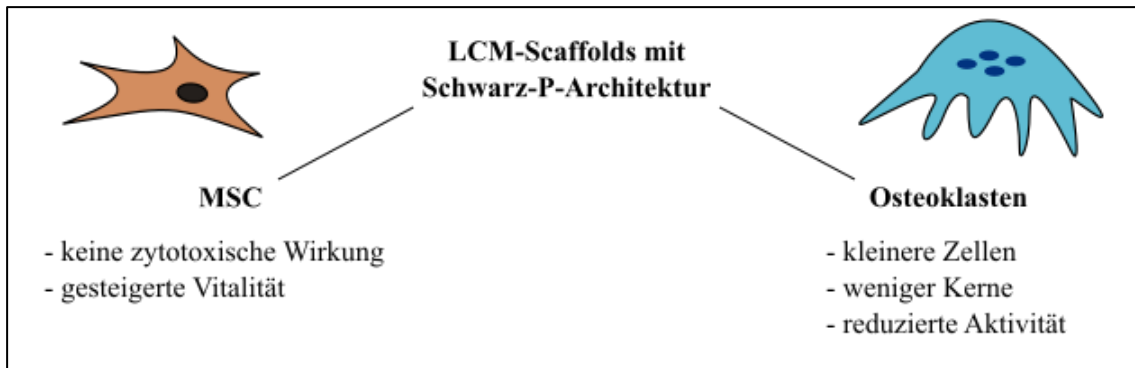


Abbildung 31: Zusammenfassung der Studienergebnisse

5 Zusammenfassung

Tiefe osteochondrale Defekte, welche zum Beispiel im Rahmen von Osteoarthritis oder in Folge von Sportverletzungen auftreten, stellen eine wachsende Herausforderung für Chirurgie und Gesellschaft dar. Herkömmliche Behandlungsoptionen sind zeit- und kostenintensiv sowie häufig nur von unzureichendem Erfolg. Einen vielversprechenden Ansatz bieten biphasische Implantate, welche biokompatibel und biodegradierbar sind. In der vorliegenden Arbeit wurden poröse Scaffolds (PS) aus Poly-((D,L)-Lactid-ε-Caprolacton)-dimethacrylat (LCM) im Vergleich zu kompakten LCM-Scaffolds (KS), sowie Kontrollen ohne Material hinsichtlich ihrer Verträglichkeit beurteilt. PS sollen als Osteophase biphasischer Implantate Anwendung finden und waren aus Schwarz-P-Einheitszellen zusammengesetzt. Die Biokompatibilität der Scaffolds im Kontakt mit humanen mesenchymalen Stromazellen (MSC) wurde nach drei und sechs Tagen Kultivierung mittels MTT- und LDH-Assay analysiert (n = 5). Darüber hinaus wurden humane periphere mononukleäre Zellen (PBMC) direkt auf die Scaffolds ausgesät und unter Zugabe von Wachstumsfaktoren zu Osteoklasten differenziert (n = 5). Nach vier, acht und zwölf Tagen wurden Differenzierungsverhalten und Aktivität der Osteoklasten durch *real-time* RT-PCR osteoklastenspezifischer Gene und Bestimmung der Aktivität der tartratresistenten sauren Phosphatase (TRAP5b) quantifiziert. Zudem wurde die Morphologie der Zellen lichtmikroskopisch bzw. immunfluoreszenzmikroskopisch beurteilt. Es zeigte sich keine zytotoxische Wirkung der LCM Scaffolds. Die Vitalität der MSC im MTT-Test war auf PS nach drei Tagen im Vergleich zu KS gesteigert. Nach sechs Tagen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Für die Osteoklasten ergab sich morphologisch eine gehemmte Differenzierung. Auch die TRAP5b Aktivität sowie die Expression aktivitätsspezifischer Gene wie z. B. Cathepsin K waren im Kontakt mit PS im Vergleich zu den Kontrollen signifikant vermindert. Insgesamt sprechen die Ergebnisse für eine sehr gute Biokompatibilität der LCM-Scaffolds. Interessanterweise konnte allein durch die strukturelle Veränderung der Schwarz-P-Struktur von PS gegenüber KS die Vitalität der MSC gesteigert, sowie die Aktivität der Osteoklasten reduziert werden. Da trotzdem funktionsfähige Osteoklasten vorhanden waren, jedoch keine überschießende Aktivität vorlag, ist von einer besonderen Eignung der porösen Scaffolds für den Einsatz als Osteophase biphasischer Implantate auszugehen.

6 Summary

Osteochondral defects, which can occur as a result of osteoarthritis or trauma, pose a great challenge for surgery and society. Conventional treatment options are time- and cost-intensive and often result in unsatisfactory outcomes. Biphasic, biocompatible, and biodegradable implants seem to be a promising solution. The present study investigated the biocompatibility of porous scaffolds (PS) fabricated of poly-((D,L)-lactide- ϵ -caprolactone)-dimethacrylate (LCM) compared to compact LCM-scaffolds (KS) and controls without material. PS consisted of Schwarz-P unit cells and could serve as osteophase for biphasic implants in the future. The biocompatibility of the scaffolds in contact with human mesenchymal stromal cells (MSC) was analyzed using MTT- and LDH-assay after three and six days of culturing ($n = 5$). Further, human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were seeded directly on the scaffold and differentiated towards osteoclasts while growth factors were added ($n = 5$). After four, eight, and twelve days of incubation, osteoclast differentiation and activity were investigated by measuring the expression of osteoclast-specific genes in real-time RT-PCR and the activity of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP5b). In addition, cell differentiation was evaluated using light microscopy or immunofluorescence microscopy, respectively. LCM-scaffolds did not display cytotoxic effects. On day three, MSC vitality in the MTT-test was enhanced on PS compared to KS. On day six, however, no significant differences were detected. As assessed by morphological aspects, differentiation of osteoclasts seemed to be inhibited on PS. Moreover, TRAP5b activity and expression of specific genes, for example cathepsin K, were significantly reduced on PS compared to controls. Taken together, the results indicate excellent biocompatibility of LCM-scaffolds. Interestingly, the vitality of MSC was enhanced and the activity of osteoclast was inhibited merely by the Schwarz-P architecture of PS compared to KS. Since viable osteoclast still displayed, but their activity was not excessive, PS seems to be particularly suitable for use as osteophase in biphasic implants.

7 Abkürzungs-, Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

7.1 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
Δ CT	Delta-CT-Wert
°C	Grad Celsius
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
2-PP	2-Photonen-Polymerisation
3D	dreidimensional
ADP	Adenosindiphosphat
AMIC	autologe matrix-assoziierte Chondrogenese
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl6	B cell lymphoma 6
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
BMP	bone morphogenic protein
bp	Basenpaare
bspw.	beispielsweise
ca.	circa
CA2	Carboanhydrase 2
Ca ²⁺	Calciumion
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	komplementäre DNA
Cl ⁻	Chloridionen
ClC7	Chloridkanal Typ 7
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CT	cycle threshold
CTR	Calcitoninrezeptor
CtsK	Cathepsin K
DC-STAMP	dendritic cell-specific transmembrane protein
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinacid

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EZM	extrazelluläre Matrix
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
for	forward-Sequenz
G-Protein	Guanosintriphosphat-bindendes Protein
H ⁺	Wasserstoffion
H ₂ CO ₃	Kohlensäure
HCO ₃ ⁻	Hydrogencarbonat
HLA-DR	Human Leucozyte Antigen vom DR Isotyp
HSC	Hämatopoetische Stammzellen
IRF	Interferon-regulatorische Faktor
K	Kontrollen ohne Material
KS	kompakte Scaffolds
LCM	Poly-((D,L)-Lactid-ε-Caprolacton)-dimethacrylat
LDH	Laktat-Dehydrogenase
M-CFS	Macrophage colony stimulating factor
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
MMP	Matrix Metalloproteinasen
MPS	mononukleär-phagozytäres System
mRNA	messenger RNA
MSC	Mesenchymale Stromazellen
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NFATc1	nuclear factor of activated T-cells
NF-κB	nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B-cells
nm	Nanometer
OA	Osteoarthritis
OCD	Osteochondritis dissecans
OC-STAMP	osteoclast-stimulatory transmembrane protein
OL	Osteochondrale Läsionen

OPG	Osteoprotegerin
OSCAR	osteoclast-associated immunoglobulin-like receptor
P	Phosphat
PBMCs	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCL	Polycaprolacton
PE	Phosphatidylethanolamin
PLA	Poly lactid
PLC	Phospholipase C
PLCL	Poly-Lactid-Caprolacton
PLGA	Poly lactid-co-Glycolid
PS	poröse Scaffolds
PU	Polyurethan
RANK	receptor activator of NF- κ B
RANKL	receptor activator of NF- κ B ligand
rev	reverse-Sequenz
RNA	Ribonucleinacid
rpm	revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute
RS	rapidly self-renewing
RT-PCR	Reverse-Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
Schwarz-P	Schwarz's Primitive Minimal Surface
TGF-beta	transforming growth factor beta
TRAP	Tartratresistente saure Phosphatase
u.a.	unter anderem
V-ATPasen	vakuoläre ATPasen
α MEM	Alpha modified Minimal Essential Medium

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Knochen Remodeling.....	3
Abbildung 2: Charakteristika mesenchymaler Stromazellen (MSC).....	6
Abbildung 3: Regulation der Osteoklastogenese	9
Abbildung 4: Molekulare Mechanismen der Osteoklastenfunktion	11
Abbildung 5: Anatomie der osteochondralen Einheit.....	14
Abbildung 6: Periodische Minimalflächen	24
Abbildung 7: LCM Scaffolds.....	28
Abbildung 8: Chemisches Prinzip des MTT-Assays	31
Abbildung 9: Leucosep TM Röhrchen nach Dichtegradientenzentrifugation	34
Abbildung 10: Amplifikationskurve bei real-time PCR	38
Abbildung 11: Schmelzpunkte bei real-time PCR.....	39
Abbildung 12: Schmelzkurven bei real-time PCR.....	39
Abbildung 13: 96-Well-Platte des TRAP5b-ELISA.....	42
Abbildung 14: Absorptionswerte im MTT-Assay der MSC.....	45
Abbildung 15: Toxizitätsbestimmung der MSC	46
Abbildung 16: Lichtmikroskopische Aufnahmen der MSC	47
Abbildung 17: Relative Genexpression von NFATc1	48
Abbildung 18: Relative Genexpression von DC-STAMP	49
Abbildung 19: TRAP5b Aktivität der Osteoklasten	50
Abbildung 20: Relative Genexpression von CtsK	51
Abbildung 21: Relative Genexpression des CTR	52
Abbildung 22: Relative Genexpression der CA2.....	53
Abbildung 23: Kapillarelektrophoretische Analyse der PCR-Produkte	54
Abbildung 24: Osteoklasten im Kontakt mit porösen Scaffolds	55
Abbildung 25: Osteoklasten im Kontakt mit kompakten Scaffolds	56
Abbildung 26: Osteoklasten auf Zellkulturplastik.....	56
Abbildung 27: Immunfluoreszenzfärbung der Osteoklasten auf porösen Scaffolds	58
Abbildung 28: Immunfluoreszenzfärbung der Osteoklasten auf kompakten Scaffolds	58
Abbildung 29: Immunfluoreszenzfärbung der Osteoklasten auf Zellkulturplastik	58
Abbildung 30: Marker-Expression im Verlauf der Osteoklasten-Differenzierung	68
Abbildung 31: Zusammenfassung der Studienergebnisse	76

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Herstellungsverfahren von 3D Scaffolds	25
Tabelle 2: Primer für die real-time RT-PCR	40

8 Literaturverzeichnis

- Alatalo SL, Halleen JM, Hentunen TA, Mönkkönen J, Väänänen HK; *Rapid screening method for osteoclast differentiation in vitro that measures tartrate-resistant acid phosphatase 5b activity secreted into the culture medium*; *Clinical Chemistry*; **2000**; *46*; 1751–1754; DOI: 10.1093/clinchem/46.11.1751.
- Almeida CR, Serra T, Oliveira MI, Planell JA, Barbosa MA, Navarro M; *Impact of 3-D printed PLA- and chitosan-based scaffolds on human monocyte/macrophage responses: unraveling the effect of 3-D structures on inflammation*; *Acta biomaterialia*; **2014**; *10*; 613–622; DOI: 10.1016/j.actbio.2013.10.035.
- Ambu R, Morabito AE; *Modeling, assessment, and design of porous cells based on Schwartz primitive surface for bone scaffolds*; *The Scientific World Journal*; **2019**; *2019*; 7060847; DOI: 10.1155/2019/7060847.
- Arnett TR, Dempster DW; *Effect of pH on bone resorption by rat osteoclasts in vitro*; *Endocrinology*; **1986**; *119*; 119–124; DOI: 10.1210/endo-119-1-119.
- Arnett TR, Spowage M; *Modulation of the resorptive activity of rat osteoclasts by small changes in extracellular pH near the physiological range*; *Bone*; **1996**; *18*; 277–279; DOI: 10.1016/8756-3282(95)00486-6.
- Baron R; *Polarity and membrane transport in osteoclasts*; *Connective tissue research*; **1989**; *20*; 109–120; DOI: 10.3109/03008208909023879.
- Baron R, Neff L, Louvard D, Courtoy PJ; *Cell-mediated extracellular acidification and bone resorption: evidence for a low pH in resorbing lacunae and localization of a 100-kD lysosomal membrane protein at the osteoclast ruffled border*; *The Journal of cell biology*; **1985**; *101*; 2210–2222; DOI: 10.1083/jcb.101.6.2210.
- Bartnikowski M, Moon H-J, Ivanovski S; *Release of lithium from 3D printed polycaprolactone scaffolds regulates macrophage and osteoclast response*; *Biomedical materials (Bristol, England)*; **2018**; *13*; 65003; DOI: 10.1088/1748-605X/aad916.
- Bergara-Muguruza L, Mäkelä K, Yrjälä T, Salonen J, Yamashita K, Nakamura M; *Surface electric fields increase human osteoclast resorption through improved wettability on carbonate-incorporated apatite*; *ACS applied materials & interfaces*; **2021**; *13*; 58270–58278; DOI: 10.1021/acsami.1c14358.

- Bernhardt A, Koperski K, Schumacher M, Gelinsky M; *Relevance of osteoclast-specific enzyme activities in cell-based in vitro resorption assays*; European cells & materials; **2017**; 33; 28–42; DOI: 10.22203/eCM.v033a03.
- Bharadwaz A, Jayasuriya AC; *Recent trends in the application of widely used natural and synthetic polymer nanocomposites in bone tissue regeneration*; Materials science & engineering. C, Materials for biological applications; **2020**; 110; 110698; DOI: 10.1016/j.msec.2020.110698.
- Bisht B, Hope A, Mukherjee A, Paul MK; *Advances in the fabrication of scaffold and 3D printing of biomimetic bone graft*; Annals of biomedical engineering; **2021**; 49; 1128–1150; DOI: 10.1007/s10439-021-02752-9.
- Biskobing DM, Fan D; *Acid pH increases carbonic anhydrase II and calcitonin receptor mRNA expression in mature osteoclasts*; Calcified tissue international; **2000**; 67; 178–183; DOI: 10.1007/s00223001107.
- Blair HC, Teitelbaum SL, Ghiselli R, Gluck S; *Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump*; Science (New York, N.Y.); **1989**; 245; 855–857; DOI: 10.1126/science.2528207.
- Blair HC, Teitelbaum SL, Tan HL, Koziol CM, Schlesinger PH; *Passive chloride permeability charge coupled to H(+)-ATPase of avian osteoclast ruffled membrane*; The American journal of physiology; **1991**; 260; C1315-24; DOI: 10.1152/ajpcell.1991.260.6.C1315.
- Blanquer SBG, Werner M, Hannula M, Sharifi S, Lajoinie GPR, Eglin D, Hyttinen J, Poot AA, Grijpma DW; *Surface curvature in triply-periodic minimal surface architectures as a distinct design parameter in preparing advanced tissue engineering scaffolds*; Biofabrication; **2017**; 9; 25001; DOI: 10.1088/1758-5090/aa6553.
- Blottière HM, Daculsi G, Anegon I, Pouezat JA, Nelson PN, Passuti N; *Utilization of activated U937 monocytic cells as a model to evaluate biocompatibility and biodegradation of synthetic calcium phosphate*; Biomaterials; **1995**; 16; 497–503; DOI: 10.1016/0142-9612(95)98824-x.
- Böhrnsen F, Krier M, Grohmann S, Hauptmann N, Frant M, Liefeth K, Schliephake H; *MSC differentiation on two-photon polymerized, stiffness and BMP2 modified biological copolymers*; Biomedical materials (Bristol, England); **2019**; 14; 35001; DOI: 10.1088/1748-605X/ab0362.

- Buck DW, Dumanian GA; *Bone biology and physiology: Part I. The fundamentals; Plastic and reconstructive surgery*; **2012**; *129*; 1314–1320; DOI: 10.1097/PRS.0b013e31824eca94.
- Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R; *Bone biology. II: Formation, form, modeling, remodeling, and regulation of cell function*; Instructional course lectures; **1996**; *45*; 387–399.
- Bull H, Murray PG, Thomas D, Fraser AM, Nelson PN; *Acid phosphatases*; Molecular pathology : MP; **2002**; *55*; 65–72; DOI: 10.1136/mp.55.2.65.
- Camarero-Espinosa S, Cooper-White J; *Tailoring biomaterial scaffolds for osteochondral repair*; International journal of pharmaceutics; **2017**; *523*; 476–489; DOI: 10.1016/j.ijpharm.2016.10.035.
- Cappariello A, Maurizi A, Veeriah V, Teti A; *The great beauty of the osteoclast*; Archives of biochemistry and biophysics; **2014**; *558*; 70–78; DOI: 10.1016/j.abb.2014.06.017.
- Chaurio RA, Janko C, Muñoz LE, Frey B, Herrmann M, Gaigl US; *Phospholipids: key players in apoptosis and immune regulation*; Molecules (Basel, Switzerland); **2009**; *14*; 4892–4914; DOI: 10.3390/molecules14124892.
- Chen F, Wang M, Wang J, Chen X, Li X, Xiao Y, Zhang X; *Effects of hydroxyapatite surface nano/micro-structure on osteoclast formation and activity*; Journal of materials chemistry. B; **2019**; *7*; 7574–7587; DOI: 10.1039/c9tb01204d.
- Chen Q, Shou P, Zheng C, Jiang M, Cao G, Yang Q, Cao J, Xie N, Velletri T, Zhang X, Xu C, Zhang L, Yang H, Hou J, Wang Y, Shi Y; *Fate decision of mesenchymal stem cells: adipocytes or osteoblasts?*; Cell death and differentiation; **2016**; *23*; 1128–1139; DOI: 10.1038/cdd.2015.168.
- Chen R, Pye JS, Li J, Little CB, Li JJ; *Multiphasic scaffolds for the repair of osteochondral defects: Outcomes of preclinical studies*; Bioactive materials; **2023**; *27*; 505–545; DOI: 10.1016/j.bioactmat.2023.04.016.
- Chu M, Sun Z, Fan Z, Yu D, Mao Y, Guo Y; *Bi-directional regulation functions of lanthanum-substituted layered double hydroxide nanohybrid scaffolds via activating osteogenesis and inhibiting osteoclastogenesis for osteoporotic bone regeneration*; Theranostics; **2021**; *11*; 6717–6734; DOI: 10.7150/thno.56607.
- Clarke B; *Normal bone anatomy and physiology*; Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN; **2008**; *3 Suppl 3*; S131-9; DOI: 10.2215/CJN.04151206.

- Connor JR, Dodds RA, James IE, Gowen M; *Human osteoclast and giant cell differentiation: the apparent switch from nonspecific esterase to tartrate resistant acid phosphatase activity coincides with the in situ expression of osteopontin mRNA*; The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society; **1995**; 43; 1193–1201; DOI: 10.1177/43.12.8537635.
- Costa-Rodrigues J, Fernandes A, Lopes MA, Fernandes MH; *Hydroxyapatite surface roughness: complex modulation of the osteoclastogenesis of human precursor cells*; Acta biomaterialia; **2012**; 8; 1137–1145; DOI: 10.1016/j.actbio.2011.11.032.
- Cui A, Li H, Wang D, Zhong J, Chen Y, Lu H; *Global, regional prevalence, incidence and risk factors of knee osteoarthritis in population-based studies*; EClinicalMedicine; **2020**; 29-30; 100587; DOI: 10.1016/j.eclinm.2020.100587.
- Danilevicius P, Georgiadi L, Pateman CJ, Claeysens F, Chatzinikolaidou M, Farsari M; *The effect of porosity on cell ingrowth into accurately defined, laser-made, polylactide-based 3D scaffolds*; Applied Surface Science; **2015**; 336; 2–10; DOI: 10.1016/j.apsusc.2014.06.012.
- Decker T, Lohmann-Matthes ML; *A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity*; Journal of immunological methods; **1988**; 115; 61–69; DOI: 10.1016/0022-1759(88)90310-9.
- Deng C, Chang J, Wu C; *Bioactive scaffolds for osteochondral regeneration*; Journal of orthopaedic translation; **2019**; 17; 15–25; DOI: 10.1016/j.jot.2018.11.006.
- Detsch R, Boccaccini AR; *The role of osteoclasts in bone tissue engineering*; Journal of tissue engineering and regenerative medicine; **2015**; 9; 1133–1149; DOI: 10.1002/term.1851.
- Di Pietro L, Palmieri V, Papi M, Lattanzi W; *Translating material science into bone regenerative medicine applications: State-of-the art methods and protocols*; International journal of molecular sciences; **2022**; 23; DOI: 10.3390/ijms23169493.
- Ding P, Gao C, Gao Y, Liu D, Li H, Xu J, Chen X, Huang Y, Zhang C, Zheng M, Gao J; *Osteocytes regulate senescence of bone and bone marrow*; eLife; **2022**; 11; DOI: 10.7554/eLife.81480.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E; *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*; Cytotherapy; **2006**; 8; 315–317; DOI: 10.1080/14653240600855905.

- Ebrahimi M; *Porosity parameters in biomaterial science: Definition, impact, and challenges in tissue engineering*; *Frontiers of Materials Science*; **2021**; *15*; 352–373; DOI: 10.1007/s11706-021-0558-4.
- Einhorn TA; *The cell and molecular biology of fracture healing*; *Clinical orthopaedics and related research*; **1998**; *S7-21*; DOI: 10.1097/00003086-199810001-00003.
- Einhorn TA, Gerstenfeld LC; *Fracture healing: mechanisms and interventions*; *Nature reviews. Rheumatology*; **2015**; *11*; 45–54; DOI: 10.1038/nrrheum.2014.164.
- Ek-Rylander B, Andersson G; *Osteoclast migration on phosphorylated osteopontin is regulated by endogenous tartrate-resistant acid phosphatase*; *Experimental cell research*; **2010**; *316*; 443–451; DOI: 10.1016/j.yexcr.2009.10.019.
- Engelmayr GC, Papworth GD, Watkins SC, Mayer JE, Sacks MS; *Guidance of engineered tissue collagen orientation by large-scale scaffold microstructures*; *Journal of biomechanics*; **2006**; *39*; 1819–1831; DOI: 10.1016/j.jbiomech.2005.05.020.
- Eriksen EF; *Cellular mechanisms of bone remodeling*; *Reviews in endocrine & metabolic disorders*; **2010**; *11*; 219–227; DOI: 10.1007/s11154-010-9153-1.
- Faust J, Lacey DL, Hunt P, Burgess TL, Scully S, Van G, Eli A, Qian Y, Shalhoub V; *Osteoclast markers accumulate on cells developing from human peripheral blood mononuclear precursors*; *Journal of cellular biochemistry*; **1999**; *72*; 67–80; DOI: 10.1002/(sici)1097-4644(19990101)72:1<67::aid-jcb8>3.0.co;2-a.
- Felfel RM, Pooza L, Gimeno-Fabra M, Milde T, Hildebrand G, Ahmed I, Scotchford C, Sottile V, Grant DM, Liefelth K; *In vitro degradation and mechanical properties of PLA-PCL copolymer unit cell scaffolds generated by two-photon polymerization*; *Biomedical materials (Bristol, England)*; **2016**; *11*; 15011; DOI: 10.1088/1748-6041/11/1/015011.
- Fenton HJH; *LXXIII.—Oxidation of tartaric acid in presence of iron*; *J. Chem. Soc., Trans.*; **1894**; *65*; 899–910; DOI: 10.1039/CT8946500899.
- Filardo G, Andriolo L, Angele P, Berruto M, Brittberg M, Condello V, Chubinskaya S, Girolamo L de, Di Martino A, Di Matteo B, Gille J, Gobbi A, Lattermann C, Nakamura N, Nehrer S, Peretti GM, Shabshin N, Verdonk P, Zaslav K, Kon E; *Scaffolds for knee chondral and osteochondral defects: Indications for different clinical scenarios. A consensus statement*; *Cartilage*; **2020**; DOI: 10.1177/1947603519894729.

- Florencio-Silva R, Da Sasso GRS, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS; *Biology of bone tissue: Structure, function, and factors that influence bone cells*; BioMed research international; **2015**; 2015; 421746; DOI: 10.1155/2015/421746.
- Fotakis G, Timbrell JA; *In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride*; Toxicology letters; **2006**; 160; 171–177; DOI: 10.1016/j.toxlet.2005.07.001.
- Fox AJS, Bedi A, Rodeo SA; *The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function*; Sports health; **2009**; 1; 461–468; DOI: 10.1177/1941738109350438.
- Fuchs J, Kuhnert R, Scheidt-Nave C; *12-month prevalence of osteoarthritis in Germany*; Journal of Health Monitoring; **2017**; 2; 51–56; DOI: 10.17886/RKI-GBE-2017-066.
- Gariboldi MI, Best SM; *Effect of ceramic scaffold architectural parameters on biological response*; Frontiers in bioengineering and biotechnology; **2015**; 3; 151; DOI: 10.3389/fbioe.2015.00151.
- Godbey WT, Hindy SBS, Sherman ME, Atala A; *A novel use of centrifugal force for cell seeding into porous scaffolds*; Biomaterials; **2004**; 25; 2799–2805; DOI: 10.1016/j.biomaterials.2003.09.056.
- Gorbachova T, Melenevsky Y, Cohen M, Cerniglia BW; *Osteochondral lesions of the knee: Differentiating the most common entities at MRI*; Radiographics: a review publication of the Radiological Society of North America, Inc; **2018**; 38; 1478–1495; DOI: 10.1148/rg.2018180044.
- Green MR, Sambrook J; *Quantification of RNA by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)*; Cold Spring Harbor protocols; **2018**; 2018; DOI: 10.1101/pdb.prot095042.
- Gross KA, Muller D, Lucas H, Haynes DR; *Osteoclast resorption of thermal spray hydroxyapatite coatings is influenced by surface topography*; Acta biomaterialia; **2012**; 8; 1948–1956; DOI: 10.1016/j.actbio.2012.01.023.
- Halleen JM, Räsänen S, Salo JJ, Reddy SV, Roodman GD, Hentunen TA, Lehenkari PP, Kaija H, Vihko P, Väänänen HK; *Intracellular fragmentation of bone resorption products by reactive oxygen species generated by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase*; The Journal of biological chemistry; **1999**; 274; 22907–22910; DOI: 10.1074/jbc.274.33.22907.
- Hattersley G, Owens J, Flanagan AM, Chambers TJ; *Macrophage colony stimulating factor (M-CSF) is essential for osteoclast formation in vitro*; Biochemical and

- biophysical research communications; **1991**; 177; 526–531; DOI: 10.1016/0006-291x(91)92015-c.
- Hauptmann N, Lian Q, Ludolph J, Rothe H, Hildebrand G, Liefelth K; *Biomimetic designer scaffolds made of D,L-lactide-ε-caprolactone polymers by 2-photon polymerization*; Tissue engineering. Part B, Reviews; **2019**; 25; 167–186; DOI: 10.1089/ten.teb.2018.0284.
- He Y, Li Z, Ding X, Xu B, Wang J, Li Y, Chen F, Meng F, Song W, Zhang Y; *Nanoporous titanium implant surface promotes osteogenesis by suppressing osteoclastogenesis via integrin β1/FAKpY397/MAPK pathway*; Bioactive materials; **2022**; 8; 109–123; DOI: 10.1016/j.bioactmat.2021.06.033.
- Heir S, Nerhus TK, Røtterud JH, Løken S, Ekeland A, Engebretsen L, Arøen A; *Focal cartilage defects in the knee impair quality of life as much as severe osteoarthritis: a comparison of knee injury and osteoarthritis outcome score in 4 patient categories scheduled for knee surgery*; The American journal of sports medicine; **2010**; 38; 231–237; DOI: 10.1177/0363546509352157.
- Hemingway F, Cheng X, Knowles HJ, Estrada FM, Gordon S, Athanasou NA; *In vitro generation of mature human osteoclasts*; Calcified tissue international; **2011**; 89; 389–395; DOI: 10.1007/s00223-011-9530-0.
- Hirota M, Hayakawa T, Shima T, Ametani A, Tohnai I; *High porous titanium scaffolds showed higher compatibility than lower porous beta-tricalcium phosphate scaffolds for regulating human osteoblast and osteoclast differentiation*; Materials science & engineering. C, Materials for biological applications; **2015**; 49; 623–631; DOI: 10.1016/j.msec.2015.01.006.
- Hirotsu H, Tuohy NA, Woo J-T, Stern PH, Clipstone NA; *The calcineurin/nuclear factor of activated T cells signaling pathway regulates osteoclastogenesis in RAW264.7 cells*; The Journal of biological chemistry; **2004**; 279; 13984–13992; DOI: 10.1074/jbc.M213067200.
- Howell M, Liao Q, Gee CW; *Surgical management of osteochondral defects of the knee: An educational review*; Current reviews in musculoskeletal medicine; **2021**; 14; 60–66; DOI: 10.1007/s12178-020-09685-1.
- Hunter DJ, Bierma-Zeinstra S; *Osteoarthritis*; Lancet (London, England); **2019**; 393; 1745–1759; DOI: 10.1016/S0140-6736(19)30417-9.

- Hunter DJ, Schofield D, Callander E; *The individual and socioeconomic impact of osteoarthritis*; Nature reviews. Rheumatology; **2014**; *10*; 437–441; DOI: 10.1038/nrrheum.2014.44.
- Im GI, Shin YW, Lee KB; *Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells?*; Osteoarthritis and cartilage; **2005**; *13*; 845–853; DOI: 10.1016/j.joca.2005.05.005.
- Inamitsu H, Okamoto K, Sakai E, Nishishita K, Murata H, Tsukuba T; *The dental resin monomers HEMA and TEGDMA have inhibitory effects on osteoclast differentiation with low cytotoxicity*; Journal of applied toxicology : JAT; **2017**; *37*; 817–824; DOI: 10.1002/jat.3429.
- Irie A, Yamamoto K, Miki Y, Murakami M; *Phosphatidylethanolamine dynamics are required for osteoclast fusion*; Scientific reports; **2017**; *7*; 46715; DOI: 10.1038/srep46715.
- Ishibashi O, Inui T, Mori Y, Kurokawa T, Kokubo T, Kumegawa M; *Quantification of the expression levels of lysosomal cysteine proteinases in purified human osteoclastic cells by competitive RT-PCR*; Calcified tissue international; **2001**; *68*; 109–116; DOI: 10.1007/BF02678149.
- Iwasaki R, Ninomiya K, Miyamoto K, Suzuki T, Sato Y, Kawana H, Nakagawa T, Suda T, Miyamoto T; *Cell fusion in osteoclasts plays a critical role in controlling bone mass and osteoblastic activity*; Biochemical and biophysical research communications; **2008**; *377*; 899–904; DOI: 10.1016/j.bbrc.2008.10.076.
- Jackson DW, Lalor PA, Aberman HM, Simon TM; *Spontaneous repair of full-thickness defects of articular cartilage in a goat model. A preliminary study*; The Journal of bone and joint surgery. American volume; **2001**; *83*; 53–64; DOI: 10.2106/00004623-200101000-00008.
- Jacob G, Shimomura K, Nakamura N; *Osteochondral injury, management and tissue engineering approaches*; Frontiers in cell and developmental biology; **2020**; *8*; 580868; DOI: 10.3389/fcell.2020.580868.
- Jagodzinski M, Drescher M, Zeichen J, Hankemeier S, Krettek C, Bosch U, van Griensven M; *Effects of cyclic longitudinal mechanical strain and dexamethasone on osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells*; European cells & materials; **2004**; *7*; 35-41; DOI: 10.22203/ecm.v007a04.
- James AW; *Review of signaling pathways governing MSC osteogenic and adipogenic differentiation*; Scientifica; **2013**; 684736; DOI: 10.1155/2013/684736.

- Jansen IDC, Vermeer JAF, Bloemen V, Stap J, Everts V; *Osteoclast fusion and fission; Calcified tissue international*; **2012**; 90; 515–522; DOI: 10.1007/s00223-012-9600-y.
- Jones GL, Motta A, Marshall MJ, El Haj AJ, Cartmell SH; *Osteoblast: osteoclast co-cultures on silk fibroin, chitosan and PLLA films*; *Biomaterials*; **2009**; 30; 5376–5384; DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.07.028.
- Jung Y, Park MS, Lee JW, Kim YH, Kim S-H, Kim SH; *Cartilage regeneration with highly-elastic three-dimensional scaffolds prepared from biodegradable poly(L-lactide-co-epsilon-caprolactone)*; *Biomaterials*; **2008**; 29; 4630–4636; DOI: 10.1016/j.biomaterials.2008.08.031.
- Kamleitner C, Changi K, Felfel RM, Scotchford CA, Sottile V, Kluger R, Hoffmann O, Grant DM, Epstein MM; *Preclinical biological and physicochemical evaluation of two-photon engineered 3D biomimetic copolymer scaffolds for bone healing*; *Biomaterials science*; **2020**; 8; 1683–1694; DOI: 10.1039/c9bm01827a.
- Kapfer SC, Hyde ST, Mecke K, Arns CH, Schröder-Turk GE; *Minimal surface scaffold designs for tissue engineering*; *Biomaterials*; **2011**; 32; 6875–6882; DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.06.012.
- Kashirina A, Yao Y, Liu Y, Leng J; *Biopolymers as bone substitutes: a review*; *Biomaterials science*; **2019**; 7; 3961–3983; DOI: 10.1039/c9bm00664h.
- Keller J, Brink S, Busse B, Schilling AF, Schinke T, Amling M, Lange T; *Divergent resorbability and effects on osteoclast formation of commonly used bone substitutes in a human in vitro-assay*; *PloS one*; **2012**; 7; e46757; DOI: 10.1371/journal.pone.0046757.
- Kelly CN, Miller AT, Hollister SJ, Guldberg RE, Gall K; *Design and structure-function characterization of 3D printed synthetic porous biomaterials for tissue engineering*; *Advanced healthcare materials*; **2018**; 7; e1701095; DOI: 10.1002/adhm.201701095.
- Kessler JJ, Nikizad H, Shea KG, Jacobs JC, Bebhuk JD, Weiss JM; *The demographics and epidemiology of osteochondritis dissecans of the knee in children and adolescents*; *The American journal of sports medicine*; **2014**; 42; 320–326; DOI: 10.1177/0363546513510390.
- Kim JM, Lin C, Stavre Z, Greenblatt MB, Shim JH; *Osteoblast-osteoclast communication and bone homeostasis*; *Cells*; **2020**; 9; DOI: 10.3390/cells9092073.
- Kim K, Lee SH, Ha Kim J, Choi Y, Kim N; *NFATc1 induces osteoclast fusion via up-regulation of Atp6v0d2 and the dendritic cell-specific transmembrane protein (DC-*

- STAMP*); Molecular endocrinology (Baltimore, Md.); **2008**; 22; 176–185; DOI: 10.1210/me.2007-0237.
- Kisiday JD, Frisbie DD, McIlwraith CW, Grodzinsky AJ; *Dynamic compression stimulates proteoglycan synthesis by mesenchymal stem cells in the absence of chondrogenic cytokines*; Tissue engineering. Part A; **2009**; 15; 2817–2824; DOI: 10.1089/ten.TEA.2008.0357.
- Kloppenburg M, Berenbaum F; *Osteoarthritis year in review 2019: epidemiology and therapy*; Osteoarthritis and cartilage; **2020**; 28; 242–248; DOI: 10.1016/j.joca.2020.01.002.
- Kodama J, Kaito T; *Osteoclast multinucleation: Review of current literature*; International journal of molecular sciences; **2020**; 21; DOI: 10.3390/ijms21165685.
- Kon E, Filardo G, Brittberg M, Busacca M, Condello V, Engebretsen L, Marlovits S, Niemeyer P, Platzer P, Posthumus M, Verdonk P, Verdonk R, Victor J, van der Merwe W, Widuchowski W, Zorzi C, Marcacci M; *A multilayer biomaterial for osteochondral regeneration shows superiority vs. microfractures for the treatment of osteochondral lesions in a multicentre randomized trial at 2 years*; Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy : official journal of the ESSKA; **2018**; 26; 2704–2715; DOI: 10.1007/s00167-017-4707-3.
- König; *Ueber freie Körper in den Gelenken*; Deutsche Zeitschrift für Chirurgie; **1888**; 27; 90–109; DOI: 10.1007/BF02792135.
- Kornak U, Kasper D, Bösl MR, Kaiser E, Schweizer M, Schulz A, Friedrich W, Delling G, Jentsch TJ; *Loss of the ClC-7 chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man*; Cell; **2001**; 104; 205–215; DOI: 10.1016/s0092-8674(01)00206-9.
- Kukita T, Wada N, Kukita A, Kakimoto T, Sandra F, Toh K, Nagata K, Iijima T, Horiuchi M, Matsusaki H, Hieshima K, Yoshie O, Nomiyama H; *RANKL-induced DC-STAMP is essential for osteoclastogenesis*; The Journal of experimental medicine; **2004**; 200; 941–946; DOI: 10.1084/jem.20040518.
- Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD; *Analysis of cell viability by the lactate dehydrogenase assay*; Cold Spring Harbor protocols; **2018**; 2018; DOI: 10.1101/pdb.prot095497.
- Kylmäoja E, Abushahba F, Holopainen J, Ritala M, Tuukkanen J; *Monocyte differentiation on atomic layer-deposited (ALD) hydroxyapatite coating on titanium substrate*; Molecules (Basel, Switzerland); **2023**; 28; DOI: 10.3390/molecules28083611.

- Kylmäoja E, Nakamura M, Turunen S, Patlaka C, Andersson G, Lehenkari P, Tuukkanen J; *Peripheral blood monocytes show increased osteoclast differentiation potential compared to bone marrow monocytes*; Heliyon; **2018**; 4; e00780; DOI: 10.1016/j.heliyon.2018.e00780.
- Lampiasi N, Russo R, Kireev I, Strelkova O, Zhironkina O, Zito F; *Osteoclasts differentiation from murine RAW 264.7 cells stimulated by RANKL: Timing and behavior*; Biology; **2021**; 10; DOI: 10.3390/biology10020117.
- Lavrentieva A, Hatlapatka T, Neumann A, Weyand B, Kasper C; *Potential for osteogenic and chondrogenic differentiation of MSC*; Advances in biochemical engineering/biotechnology; **2013**; 129; 73–88; DOI: 10.1007/10_2012_133.
- Lawrence LM, Salary RR, Miller V, Valluri A, Denning KL, Case-Perry S, Abdelgaber K, Smith S, Claudio PP, Day JB; *Osteoregenerative potential of 3D-printed poly ϵ -caprolactone tissue scaffolds in vitro using minimally manipulative expansion of primary human bone marrow stem cells*; International journal of molecular sciences; **2023**; 24; DOI: 10.3390/ijms24054940.
- Le Yu, Cavelier S, Hannon B, Wei M; *Recent development in multizonal scaffolds for osteochondral regeneration*; Bioactive materials; **2023**; 25; 122–159; DOI: 10.1016/j.bioactmat.2023.01.012.
- Lees R, Sabharwal V, Heersche J; *Resorptive state and cell size influence intracellular pH regulation in rabbit osteoclasts cultured on collagen-hydroxyapatite films*; Bone; **2001**; 28; 187–194; DOI: 10.1016/S8756-3282(00)00433-6.
- Lesage C, Lafont M, Guihard P, Weiss P, Guicheux J, Delplace V; *Material-assisted strategies for osteochondral defect repair*; Advanced science (Weinheim, Baden-Wurttemberg, Germany); **2022**; 9; e2200050; DOI: 10.1002/advs.202200050.
- Li H, Ghazanfari R, Zacharaki D, Lim HC, Scheduling S; *Isolation and characterization of primary bone marrow mesenchymal stromal cells*; Annals of the New York Academy of Sciences; **2016**; 1370; 109–118; DOI: 10.1111/nyas.13102.
- Liang H, Wang Y, Chen S, Liu Y, Liu Z, Bai J; *Nano-hydroxyapatite bone scaffolds with different porous structures processed by digital light processing 3D printing*; International journal of bioprinting; **2022**; 8; 502; DOI: 10.18063/ijb.v8i1.502.
- Livak KJ, Schmittgen TD; *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*; Methods (San Diego, Calif.); **2001**; 25; 402–408; DOI: 10.1006/meth.2001.1262.

- Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR, Goldring MB; *Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ*; Arthritis and rheumatism; **2012**; 64; 1697–1707; DOI: 10.1002/art.34453.
- Lydon H, Getgood A, Henson FMD; *Healing of osteochondral defects via endochondral ossification in an ovine model*; Cartilage; **2019**; 10; 94–101; DOI: 10.1177/1947603517713818.
- Madry H, van Dijk CN, Mueller-Gerbl M; *The basic science of the subchondral bone*; Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy : official journal of the ESSKA; **2010**; 18; 419–433; DOI: 10.1007/s00167-010-1054-z.
- Makihira S, Mine Y, Kosaka E, Nikawa H; *Titanium surface roughness accelerates RANKL-dependent differentiation in the osteoclast precursor cell line, RAW264.7*; Dental materials journal; **2007**; 26; 739–745; DOI: 10.4012/dmj.26.739.
- Marchisio M, Di Carmine M, Pagone R, Piattelli A, Miscia S; *Implant surface roughness influences osteoclast proliferation and differentiation*; Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials; **2005**; 75; 251–256; DOI: 10.1002/jbm.b.30287.
- Minkin C, Marinho VC; *Role of the osteoclast at the bone-implant interface*; Advances in dental research; **1999**; 13; 49–56; DOI: 10.1177/08959374990130011401.
- Minor M, Alcedo KP, Battaglia RA, Snider NT; *Cell type- and tissue-specific functions of ecto-5'-nucleotidase (CD73)*; American journal of physiology. Cell physiology; **2019**; 317; C1079-C1092; DOI: 10.1152/ajpcell.00285.2019.
- Miyamoto H, Suzuki T, Miyauchi Y, Iwasaki R, Kobayashi T, Sato Y, Miyamoto K, Hoshi H, Hashimoto K, Yoshida S, Hao W, Mori T, Kanagawa H, Katsuyama E, Fujie A, Morioka H, Matsumoto M, Chiba K, Takeya M, Toyama Y, Miyamoto T; *Osteoclast stimulatory transmembrane protein and dendritic cell-specific transmembrane protein cooperatively modulate cell–cell fusion to form osteoclasts and foreign body giant cells*; Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research; **2012**; 27; 1289–1297; DOI: 10.1002/jbmr.1575.
- Mulari M, Vääräniemi J, Väänänen HK; *Intracellular membrane trafficking in bone resorbing osteoclasts*; Microscopy research and technique; **2003**; 61; 496–503; DOI: 10.1002/jemt.10371.

- Nelson L, McCarthy HE, Fairclough J, Williams R, Archer CW; *Evidence of a viable pool of stem cells within human osteoarthritic cartilage*; *Cartilage*; **2014**; 5; 203–214; DOI: 10.1177/1947603514544953.
- Nguyen PAH, Clark ER, Ananthakrishnan S, Lenz K, Canavan HE; *How to select the appropriate method(s) of cytotoxicity analysis of mammalian cells at biointerfaces: A tutorial*; *Biointerphases*; **2020**; 15; 31201; DOI: 10.1116/6.0000136.
- Nooeaid P, Salih V, Beier JP, Boccaccini AR; *Osteochondral tissue engineering: scaffolds, stem cells and applications*; *Journal of cellular and molecular medicine*; **2012**; 16; 2247–2270; DOI: 10.1111/j.1582-4934.2012.01571.x.
- Novinec M, Lenarčič B; *Cathepsin K: a unique collagenolytic cysteine peptidase*; *Biological chemistry*; **2013**; 394; 1163–1179; DOI: 10.1515/hsz-2013-0134.
- Ono T, Nakashima T; *Recent advances in osteoclast biology*; *Histochemistry and cell biology*; **2018**; 149; 325–341; DOI: 10.1007/s00418-018-1636-2.
- Partale K, Klein P, Schell H, Schmidmaier G, Wildemann B, Bail H, Schiller R, Bragulla H, Duda GN; *Poly(D,L-lactide) coating is capable of enhancing osseous integration of Schanz screws in the absence of infection*; *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials*; **2005**; 74; 608–616; DOI: 10.1002/jbm.b.30254.
- Picke AK, Campbell GM, Blüher M, Krügel U, Schmidt FN, Tsourdi E, Winzer M, Rauner M, Vukicevic V, Busse B, Salbach-Hirsch J, Tuckermann JP, Simon JC, Anderegg U, Hofbauer LC, Saalbach A; *Thy-1 (CD90) promotes bone formation and protects against obesity*; *Science translational medicine*; **2018**; 10; DOI: 10.1126/scitranslmed.aao6806.
- Polak SJ, Rustom LE, Genin GM, Talcott M, Wagoner Johnson AJ; *A mechanism for effective cell-seeding in rigid, microporous substrates*; *Acta biomaterialia*; **2013**; 9; 7977–7986; DOI: 10.1016/j.actbio.2013.04.040.
- Prockop DJ, Sekiya I, Colter DC; *Isolation and characterization of rapidly self-renewing stem cells from cultures of human marrow stromal cells*; *Cytherapy*; **2001**; 3; 393–396; DOI: 10.1080/146532401753277229.
- Qi R, Shen M, Cao X, Guo R, Tian X, Yu J, Shi X; *Exploring the dark side of MTT viability assay of cells cultured onto electrospun PLGA-based composite nanofibrous scaffolding materials*; *The Analyst*; **2011**; 136; 2897–2903; DOI: 10.1039/c0an01026j.

- Quinn J, Morfis M, Lam M, Elliott J, Kartsogiannis V, Williams E, Gillespie M, Martin T, Sexton P; *Calcitonin receptor antibodies in the identification of osteoclasts*; Bone; **1999**; 25; 1–8; DOI: 10.1016/S8756-3282(99)00094-0.
- Ramot Y, Haim-Zada M, Domb AJ, Nyska A; *Biocompatibility and safety of PLA and its copolymers*; Advanced drug delivery reviews; **2016**; 107; 153–162; DOI: 10.1016/j.addr.2016.03.012.
- Rampichová M, Chvojka J, Buzgo M, Prosecká E, Mikeš P, Vysloužilová L, Tvrđík D, Kochová P, Gregor T, Lukáš D, Amler E; *Elastic three-dimensional poly (ϵ -caprolactone) nanofibre scaffold enhances migration, proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells*; Cell proliferation; **2013**; 46; 23–37; DOI: 10.1111/cpr.12001.
- Redey SA, Razzouk S, Rey C, Bernache-Assollant D, Leroy G, Nardin M, Cournot G; *Osteoclast adhesion and activity on synthetic hydroxyapatite, carbonated hydroxyapatite, and natural calcium carbonate: relationship to surface energies*; Journal of biomedical materials research; **1999**; 45; 140–147; DOI: 10.1002/(sici)1097-4636(199905)45:2<140::aid-jbm9>3.0.co;2-i.
- Rodan GA, Martin TJ; *Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption—a hypothesis*; Calcified tissue international; **1981**; 33; 349–351; DOI: 10.1007/BF02409454.
- Roseti L, Parisi V, Petretta M, Cavallo C, Desando G, Bartolotti I, Grigolo B; *Scaffolds for bone tissue engineering: State of the art and new perspectives*; Materials science & engineering. C, Materials for biological applications; **2017**; 78; 1246–1262; DOI: 10.1016/j.msec.2017.05.017.
- Rumpler M, Woesz A, Dunlop JWC, van Dongen JT, Fratzl P; *The effect of geometry on three-dimensional tissue growth*; Journal of the Royal Society, Interface; **2008**; 5; 1173–1180; DOI: 10.1098/rsif.2008.0064.
- Samsonraj RM, Raghunath M, Nurcombe V, Hui JH, van Wijnen AJ, Cool SM; *Concise review: Multifaceted characterization of human mesenchymal stem cells for use in regenerative medicine*; Stem cells translational medicine; **2017**; 6; 2173–2185; DOI: 10.1002/sctm.17-0129.
- Schachtner H, Calaminus SDJ, Thomas SG, Machesky LM; *Podosomes in adhesion, migration, mechanosensing and matrix remodeling*; Cytoskeleton (Hoboken, N.J.); **2013**; 70; 572–589; DOI: 10.1002/cm.21119.

- Seita J, Weissman IL; *Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation*; Wiley interdisciplinary reviews. Systems biology and medicine; **2010**; 2; 640–653; DOI: 10.1002/wsbm.86.
- Seok JM, Rajangam T, Jeong JE, Cheong S, Joo SM, Oh SJ, Shin H, Kim SH, Park SA; *Fabrication of 3D plotted scaffold with microporous strands for bone tissue engineering*; Journal of materials chemistry. B; **2020**; 8; 951–960; DOI: 10.1039/c9tb02360g.
- Shapiro F, Koide S, Glimcher MJ; *Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage*; The Journal of bone and joint surgery. American volume; **1993**; 75; 532–553; DOI: 10.2106/00004623-199304000-00009.
- Shemesh M, Addadi L, Geiger B; *Surface microtopography modulates sealing zone development in osteoclasts cultured on bone*; Journal of the Royal Society, Interface; **2017**; 14; DOI: 10.1098/rsif.2016.0958.
- Shibutani T, Heersche JN; *Effect of medium pH on osteoclast activity and osteoclast formation in cultures of dispersed rabbit osteoclasts*; Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research; **1993**; 8; 331–336; DOI: 10.1002/jbmr.5650080310.
- Shin J, Kim S, Jeong D, Lee HG, Lee D, Lim JY, Kim J; *Finite element analysis of Schwarz P surface pore geometries for tissue-engineered scaffolds*; Mathematical Problems in Engineering; **2012**; 2012; 1–13; DOI: 10.1155/2012/694194.
- Sisakhtnezhad S, Alimoradi E, Akrami H; *External factors influencing mesenchymal stem cell fate in vitro*; European journal of cell biology; **2017**; 96; 13–33; DOI: 10.1016/j.ejcb.2016.11.003.
- Sommer B, Felix R, Sprecher C, Leunig M, Ganz R, Hofstetter W; *Wear particles and surface topographies are modulators of osteoclastogenesis in vitro*; Journal of biomedical materials research. Part A; **2005**; 72; 67–76; DOI: 10.1002/jbm.a.30202.
- Spreda M, Hauptmann N, Lehner V, Biehl C, Liefelth K, Lips KS; *Porous 3D scaffolds enhance MSC vitality and reduce osteoclast activity*; Molecules (Basel, Switzerland); **2021**; 26; DOI: 10.3390/molecules26206258.
- Ståhlberg A, Kubista M, Aman P; *Single-cell gene-expression profiling and its potential diagnostic applications*; Expert review of molecular diagnostics; **2011**; 11; 735–740; DOI: 10.1586/erm.11.60.

- Steffi C, Shi Z, Kong CH, Wang W; *Modulation of osteoclast interactions with orthopaedic biomaterials*; Journal of functional biomaterials; **2018**; 9; DOI: 10.3390/jfb9010018.
- Stepanenko AA, Dmitrenko VV; *Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability*; Gene; **2015**; 574: 193–203; DOI: 10.1016/j.gene.2015.08.009.
- Stern LJ, Calvo-Calle JM; *HLA-DR: molecular insights and vaccine design*; Current pharmaceutical design; **2009**; 15: 3249–3261; DOI: 10.2174/138161209789105171.
- Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ; *Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families*; Endocrine reviews; **1999**; 20: 345–357; DOI: 10.1210/edrv.20.3.0367.
- Supanchart C, Kornak U; *Ion channels and transporters in osteoclasts*; Archives of biochemistry and biophysics; **2008**; 473: 161–165; DOI: 10.1016/j.abb.2008.03.029.
- Takayanagi H, Kim S, Koga T, Nishina H, Isshiki M, Yoshida H, Saiura A, Isobe M, Yokochi T, Inoue J, Wagner EF, Mak TW, Kodama T, Taniguchi T; *Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts*; Developmental Cell; **2002**; 3: 889–901; DOI: 10.1016/s1534-5807(02)00369-6.
- Teti A, Blair HC, Teitelbaum SL, Kahn AJ, Koziol C, Konsek J, Zamboni-Zallone A, Schlesinger PH; *Cytoplasmic pH regulation and chloride/bicarbonate exchange in avian osteoclasts*; The Journal of clinical investigation; **1989**; 83: 227–233; DOI: 10.1172/JCI113863.
- Thomas MG, Marwood RM, Parsons AE, Parsons RB; *The effect of foetal bovine serum supplementation upon the lactate dehydrogenase cytotoxicity assay: Important considerations for in vitro toxicity analysis*; Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA; **2015**; 30: 300–308; DOI: 10.1016/j.tiv.2015.10.007.
- Tsuji-Takechi K, Negishi-Koga T, Sumiya E, Kukita A, Kato S, Maeda T, Pandolfi PP, Moriyama K, Takayanagi H; *Stage-specific functions of leukemia/lymphoma-related factor (LRF) in the transcriptional control of osteoclast development*; Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America; **2012**; 109: 2561–2566; DOI: 10.1073/pnas.1116042109.

- Tuan RS, Boland G, Tuli R; *Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering*; Arthritis research & therapy; **2003**; 5; 32–45; DOI: 10.1186/ar614.
- Väänänen HK; *Mechanism of osteoclast mediated bone resorption - rationale for the design of new therapeutics*; Advanced drug delivery reviews; **2005**; 57; 959–971; DOI: 10.1016/j.addr.2004.12.018.
- Vaes G; *Enzymatic and other biochemical events accompanying bone resorption in tissue culture*; Calcified tissue research; **1970**; Suppl:57-60; DOI: 10.1007/BF02152351.
- Verma SK, Leikina E, Melikov K, Gebert C, Kram V, Young MF, Uygur B, Chernomordik LV; *Cell-surface phosphatidylserine regulates osteoclast precursor fusion*; The Journal of biological chemistry; **2018**; 293; 254–270; DOI: 10.1074/jbc.M117.809681.
- Vertenten G, Lippens E, Gironès J, Gorski T, Declercq H, Saunders J, van den Broeck W, Chiers K, Duchateau L, Schacht E, Cornelissen M, Gasthuys F, Vlaminc L; *Evaluation of an injectable, photopolymerizable, and three-dimensional scaffold based on methacrylate-endcapped poly(D,L-lactide-co-epsilon-caprolactone) combined with autologous mesenchymal stem cells in a goat tibial unicortical defect model*; Tissue engineering. Part A; **2009**; 15; 1501–1511; DOI: 10.1089/ten.tea.2008.0367.
- Vertenten G, Vlaminc L, Gorski T, Schreurs E, van den Broeck W, Duchateau L, Schacht E, Gasthuys F; *Evaluation of an injectable, photopolymerizable three-dimensional scaffold based on D: ,L: -lactide and epsilon-caprolactone in a tibial goat model*; Journal of materials science. Materials in medicine; **2008**; 19; 2761–2769; DOI: 10.1007/s10856-008-3404-7.
- Vina ER, Kwoh CK; *Epidemiology of osteoarthritis: literature update*; Current opinion in rheumatology; **2018**; 30; 160–167; DOI: 10.1097/BOR.0000000000000479.
- Wang Q, Xie J, Zhou C, Lai W; *Substrate stiffness regulates the differentiation profile and functions of osteoclasts via cytoskeletal arrangement*; Cell proliferation; **2022a**; 55; e13172; DOI: 10.1111/cpr.13172.
- Wang T, Xu W, Zhao X, Bai B, Hua Y, Tang J, Chen F, Liu Y, Wang Y, Zhou G, Cao Y; *Repair of osteochondral defects mediated by double-layer scaffolds with natural osteochondral-biomimetic microenvironment and interface*; Materials today. Bio; **2022b**; 14; 100234; DOI: 10.1016/j.mtbio.2022.100234.

- Wang X, Wang Y, Gou W, Lu Q, Peng J, Lu S; *Role of mesenchymal stem cells in bone regeneration and fracture repair: a review*; International orthopaedics; **2013**; 37; 2491–2498; DOI: 10.1007/s00264-013-2059-2.
- Wei S, Teitelbaum SL, Wang MW, Ross FP; *Receptor activator of nuclear factor-kappa b ligand activates nuclear factor-kappa b in osteoclast precursors*; Endocrinology; **2001**; 142; 1290–1295; DOI: 10.1210/endo.142.3.8031.
- Wendt D, Marsano A, Jakob M, Heberer M, Martin I; *Oscillating perfusion of cell suspensions through three-dimensional scaffolds enhances cell seeding efficiency and uniformity*; Biotechnology and bioengineering; **2003**; 84; 205–214; DOI: 10.1002/bit.10759.
- Williams DF; *On the mechanisms of biocompatibility*; Biomaterials; **2008**; 29; 2941–2953; DOI: 10.1016/j.biomaterials.2008.04.023.
- Witkowska-Zimny M, Wrobel E; *Perinatal sources of mesenchymal stem cells: Wharton's jelly, amnion and chorion*; Cellular & molecular biology letters; **2011**; 16; 493–514; DOI: 10.2478/s11658-011-0019-7.
- Wong SH, Hamel L, Chevalier S, Philip A; *Endoglin expression on human microvascular endothelial cells association with betaglycan and formation of higher order complexes with TGF-beta signalling receptors*; European journal of biochemistry; **2000**; 267; 5550–5560; DOI: 10.1046/j.1432-1327.2000.01621.x.
- Xie J, Han Z, Naito M, Maeyama A, Kim SH, Kim YH, Matsuda T; *Articular cartilage tissue engineering based on a mechano-active scaffold made of poly(L-lactide-co-epsilon-caprolactone): In vivo performance in adult rabbits*; Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials; **2010**; 94; 80–88; DOI: 10.1002/jbm.b.31627.
- Xue Y, Danmark S, Xing Z, Arvidson K, Albertsson A-C, Hellem S, Finne-Wistrand A, Mustafa K; *Growth and differentiation of bone marrow stromal cells on biodegradable polymer scaffolds: an in vitro study*; Journal of biomedical materials research. Part A; **2010**; 95; 1244–1251; DOI: 10.1002/jbm.a.32945.
- Yagi M, Miyamoto T, Sawatani Y, Iwamoto K, Hosogane N, Fujita N, Morita K, Ninomiya K, Suzuki T, Miyamoto K, Oike Y, Takeya M, Toyama Y, Suda T; *DC-STAMP is essential for cell-cell fusion in osteoclasts and foreign body giant cells*; The Journal of experimental medicine; **2005**; 202; 345–351; DOI: 10.1084/jem.20050645.
- Yamashita T, Yao Z, Li F, Zhang Q, Badell IR, Schwarz EM, Takeshita S, Wagner EF, Noda M, Matsuo K, Xing L, Boyce BF; *NF-kappaB p50 and p52 regulate receptor*

- activator of NF-kappaB ligand (RANKL) and tumor necrosis factor-induced osteoclast precursor differentiation by activating c-Fos and NFATc1*; The Journal of biological chemistry; **2007**; 282; 18245–18253; DOI: 10.1074/jbc.M610701200.
- Yang Z, Wu Y, Li C, Zhang T, Zou Y, Hui JHP, Ge Z, Lee EH; *Improved mesenchymal stem cells attachment and in vitro cartilage tissue formation on chitosan-modified poly(L-lactide-co-epsilon-caprolactone) scaffold*; Tissue engineering. Part A; **2012**; 18; 242–251; DOI: 10.1089/ten.TEA.2011.0315.
- Yuan B, Wang L, Zhao R, Yang X, Yang X, Zhu X, Liu L, Zhang K, Song Y, Zhang X; *A biomimetically hierarchical polyetherketoneketone scaffold for osteoporotic bone repair*; Science advances; **2020**; 6; DOI: 10.1126/sciadv.abc4704.
- Zachowski A; *Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement*; The Biochemical journal; **1993**; 294 (Pt 1); 1–14; DOI: 10.1042/bj2940001.
- Zadpoor AA; *Bone tissue regeneration: the role of scaffold geometry*; Biomaterials science; **2015**; 3; 231–245; DOI: 10.1039/c4bm00291a.
- Zamboni Zallone A, Teti A, Primavera MV; *Isolated osteoclasts in primary culture: first observations on structure and survival in culture media*; Anatomy and embryology; **1982**; 165; 405–413; DOI: 10.1007/BF00305576.
- Zhang K, Fan Y, Dunne N, Li X; *Effect of microporosity on scaffolds for bone tissue engineering*; Regenerative biomaterials; **2018a**; 5; 115–124; DOI: 10.1093/rb/rby001.
- Zhang Y, Chen SE, Shao J, van den Beucken JJJP; *Combinatorial surface roughness effects on osteoclastogenesis and osteogenesis*; ACS applied materials & interfaces; **2018b**; 10; 36652–36663; DOI: 10.1021/acsami.8b10992.
- Zhang Z, Egaña JT, Reckhenrich AK, Schenck TL, Lohmeyer JA, Schantz JT, Machens H-G, Schilling AF; *Cell-based resorption assays for bone graft substitutes*; Acta biomaterialia; **2012**; 8; 13–19; DOI: 10.1016/j.actbio.2011.09.020.
- Zhao B, Takami M, Yamada A, Wang X, Koga T, Hu X, Tamura T, Ozato K, Choi Y, Ivashkiv LB, Takayanagi H, Kamijo R; *Interferon regulatory factor-8 regulates bone metabolism by suppressing osteoclastogenesis*; Nature medicine; **2009**; 15; 1066–1071; DOI: 10.1038/nm.2007.

9 Appendix

Die folgenden Tabellen stellen eine statistische Zusammenfassung aller Messwerte dar.

Table A. Detailed results of parameters regarding MSC toxicity (Cytotox96 Assay) and vitality (MTT-Assay) of MSC in contact with porous scaffolds (PS), compact scaffolds (CS) and controls without material (C) after three and six days of cultivation. Data represent mean (\bar{x}), standard deviation of mean (SD), median (\tilde{x}), range (R), minimum (x_{min}) and maximum (x_{max}).

Statistical analysis was performed using Friedman test (1) or Wilcoxon Rank Sum test (2).

Parameter	Day	Statistic	Unit	PS (n=5)	CS (n=5)	C (n=5)	p-values			
							PS vs. CS	PS vs. C	CS vs. C	
toxicity ¹	3	\bar{x} (SD)		7.71 (8.996)	7.82 (7.389)	8.81 (6.482)				
		\tilde{x} (R)	%	4.27 (22)	8.4 (18)	7.03 (16)		0.504		
		x_{min}		0	0	2				
		x_{max}		22	18	18				
	6	\bar{x} (SD)		16.11 (8.027)	16.18 (15.111)	13.6 (6.616)				
		\tilde{x} (R)	%	14.98 (20)	8.6 (36)	9.29 (15)		0.165		
		x_{min}		9	7	9				
		x_{max}		29	43	24				
	vitality ²	3	\bar{x} (SD)		0.146 (0.077)	0.1 (0.095)	0.122 (0.052)			
			\tilde{x} (R)		0.123 (0.19)	0.069 (0.239)	0.098 (0.127)	0.043	0.618	0.618
x_{min}				0.092	0.028	0.075				
x_{max}				0.282	0.267	0.201				
6		\bar{x} (SD)		0.175 (0.115)	0.137 (0.085)	0.15 (0.064)				
		\tilde{x} (R)		0.145 (0.282)	0.141 (0.204)	0.12 (0.153)	0.08	0.247	0.247	
		x_{min}		0.039	0.042	0.099				
		x_{max}		0.321	0.246	0.252				

Appendix

Table B1. Detailed results of parameters in real-time reverse transcriptase PCR regarding osteoclast differentiation and activity of osteoclasts in contact with porous scaffolds (PS), compact scaffolds (CS) and controls without material (C) after four, eight and twelve days of cultivation. Data represent mean (\bar{x}), standard deviation of mean (SD), median (x), range (R), minimum (x_{min}) and maximum (x_{max}). Abbreviations: Cathepsin K (CtsK), Nfatc1 (Nuclear factor of activated t-cells 1), DC-STAMP (dendritic cell specific transmembrane protein).

Statistical analysis was performed using Friedman test (1) or general linear model (3).

Parameter	Day	Statistic	Unit	PS	CS	C	p-values		
							PS vs. CS	PS vs. C	CS vs. C
relative gene-expression CtsK ⁻¹	4	n		5	5	5			
		\bar{x} (SD)		0.047 (0.034)	0.614 (0.359)	1.44 (1.136)			
		\tilde{x} (R)	2 ⁻ $\Delta\Delta CP$	0.068 (0.07)	0.586 (0.94)	1.299 (3.08)	0.173	0.013	1.0
		x_{min}		0.01	0.24	0.16			
		x_{max}		0.07	11.18	3.24			
	8	n		5	5	5			
		\bar{x} (SD)		0.357 (0.295)	0.557 (0.155)	1.373 (0.976)			
		\tilde{x} (R)	2 ⁻ $\Delta\Delta CP$	0.255 (0.75)	0.577 (0.41)	1.037 (2.4)	0.618	0.034	0.618
		x_{min}		0.1	0.3	0.19			
		x_{max}		0.85	0.71	2.59			
	12	n		5	5	5			
		\bar{x} (SD)		0.54 (0.52)	0.799 (0.242)	1.065 (0.399)			
		\tilde{x} (R)	2 ⁻ $\Delta\Delta CP$	0.497 (1.31)	0.735 (0.61)	1.157 (1.02)	1.0	0.013	0.173
		x_{min}		0.08	0.48	0.56			
		x_{max}		1.4	1.09	1.58			

Appendix

		n	5	5	5			
relative gene-expression Nfatc1 ³	4	\bar{x} (SD)	0.627 (0.85)	1.662 (2.144)	2.33 (3.54)			
		\tilde{x} (R)	0.359 (2.07)	0.731 (5.21)	0.961 (8.48)	0.453	0.692	1.0
		x_{min}	0.05	0.21	0.14			
		x_{max}	2.12	5.42	8.62			
		n	5	5	5			
		\bar{x} (SD)	1.978 (2.999)	1.572 (1.59)	2.114 (3.348)			
		\tilde{x} (R)	0.544 (6.92)	0.902 (3.79)	0.759 (7.7)	1.0	1.0	1.0
		x_{min}	0.41	0.59	0.4			
		x_{max}	7.32	4.38	8.09			
		n	5	5	5			
		\bar{x} (SD)	2.066 (3.47)	1.195 (1.006)	1.778 (2.555)			
		\tilde{x} (R)	0.569 (8.01)	0.892 (2.43)	0.693 (5.84)	1.0	1.0	1.0
	x_{min}	0.25	0.53	0.51				
	x_{max}	8.26	2.96	6.35				
relative gene-expression DC-STAMP ³	4	\bar{x} (SD)	0.647 (0.621)	1.235 (0.849)	1.341 (1.044)			
		\tilde{x} (R)	0.456 (1.55)	1.196 (1.83)	1.006 (2.78)	0.523	0.187	1.0
		x_{min}	0.11	0.36	0.23			
		x_{max}	1.66	2.19	3.02			
		n	5	4	5			
		\bar{x} (SD)	1.757 (1.138)	1.3 (0.664)	1.124 (0.603)			
		\tilde{x} (R)	1.388 (3.04)	1.241 (1.56)	1.056 (1.63)	1.0	0.675	1.0
		x_{min}	0.52	0.58	0.46			
		x_{max}	3.55	2.14	2.09			
		n	5	5	5			
		\bar{x} (SD)	1.475 (0.772)	1.164 (0.408)	1.07 (0.45)			
		\tilde{x} (R)	1.792 (1.73)	1.111 (1.05)	1.111 (1.15)	0.423	0.823	1.0
	x_{min}	0.5	0.72	0.62				
	x_{max}	2.23	1.76	1.77				

Table B2. Detailed results of parameters in real-time reverse transcriptase PCR and EIA regarding osteoclast activity of osteoclasts in contact with porous scaffolds (PS), compact scaffolds (CS) and controls without material (C) after four, eight and twelve days of cultivation. Data represent mean (\bar{x}), standard deviation of mean (SD), median (\tilde{x}), range (R), minimum (x_{min}) and maximum (x_{max}). Abbreviations: Calcitonin-Receptor (CTR), carbonic anhydrase 2 (CA2), tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRAP5b). Statistical analysis was performed using Friedman test (1), Wilcoxon Rank Sum test (2) or general linear model (3).

Parameter	Day	Statistic	Unit	PS	CS	C	p-values		
							PS vs. CS	PS vs. C	CS vs. C
relative gene-expression CTR ³	4	n		5	5	5			
		\bar{x} (SD)		0.18 (0.087)	1.07 (0.778)	1.376 (0.862)			
		\tilde{x} (R)	2 ⁻ $\Delta\Delta CP$	0.174 (0.22)	1.19 (2.09)	1.506 (2.35)	0.23	0.119	1.0
		x_{min}		0.05	0.04	0.15			
		x_{max}		0.28	2.14	2.5			
		8	n		5	5	5		
	\bar{x} (SD)		0.241 (0.202)	0.744 (0.336)	1.121 (0.504)				
	\tilde{x} (R)	2 ⁻ $\Delta\Delta CP$	0.182 (0.48)	0.799 (0.89)	1.165 (1.29)	0.059	0.041	0.293	
	x_{min}		0.01	0.19	0.38				
	x_{max}		0.49	1.08	1.67				
	12	n		5	5	5			
	\bar{x} (SD)		0.597 (0.688)	1.042 (0.279)	1.086 (0.453)				
	\tilde{x} (R)	2 ⁻ $\Delta\Delta CP$	0.368 (1.77)	1.012 (0.7)	0.991 (1.22)	0.454	0.333	1.0	
	x_{min}		0.02	0.68	0.48				
	x_{max}		1.79	1.38	1.7				

Appendix

		n	5	5	5			
relative gene-expression CA2 ²	4	\bar{x} (SD)	0.551 (0.266)	0.866 (0.927)	1.889 (1.576)			
		\tilde{x} (R)	0.533 (0.69)	0.42 (2.25)	2.132 (3.88)	0.138	0.893	0.08
		x_{min}	0.17	0.13	0.07			
		x_{max}	0.85	2.38	3.95			
		n	5	5	5			
		\bar{x} (SD)	1.165 (1.19)	0.792 (0.452)	1.393 (1.115)			
		\tilde{x} (R)	0.444 (2.57)	1.013 (1.05)	0.975 (2.53)	0.686	0.5	0.345
		x_{min}	0.08	0.15	0.27			
		x_{max}	2.65	1.2	2.8			
		n	5	5	5			
		\bar{x} (SD)	0.828 (1.312)	1.02 (0.945)	1.402 (1.039)			
		\tilde{x} (R)	0.138 (3.06)	1.064 (2.36)	1.682 (2.44)	0.686	0.225	0.225
	x_{min}	0.06	0.12	0.27				
	x_{max}	3.12	2.48	2.71				
TRAP5b activity ¹	4	\bar{x} (SD)	0.305 (0.141)	3.411 (2.595)	13.55 (8.391)			
		\tilde{x} (R)	0.331 (0.36)	3.195 (6.89)	16.557 (20.2)	0.342	0.005	0.342
		x_{min}	0.07	0.45	0.58			
		x_{max}	0.43	7.33	20.78			
		n	5	5	5			
		\bar{x} (SD)	2.878 (2.848)	5.209 (3.815)	10.884 (7.455)			
		\tilde{x} (R)	2.003 (7.07)	4.536 (10.18)	10.398 (20.89)	0.081	0.034	1.0
		x_{min}	0.78	1.46	0.98			
		x_{max}	7.85	11.64	21.87			
		n	5	5	5			
		\bar{x} (SD)	4.848 (2.948)	7.258 (2.131)	10.811 (7.494)			
		\tilde{x} (R)	6.258 (7.33)	7.815 (5.23)	11.06 (19.9)	0.165		
	x_{min}	0.48	4.78	2.7				
	x_{max}	7.81	10.02	22.6				

10 Publikationsverzeichnis

10.1 Originalpublikation

Spreda M, Hauptmann N, Lehner V, Biehl C, Liefeith K, Lips KS; *Porous 3D scaffolds enhance MSC vitality and reduce osteoclast activity*; *Molecules* (Basel, Switzerland); **2021**; 26; DOI: 10.3390/molecules26206258.

10.2 Kongressbeitrag

Spreda M, Hauptmann N, Heiß C, Lehner V, Biehl C, Liefeith K, Lips KS; *Einfluss der 3D-Struktur von Knochenimplantaten auf ihre Zytokompatibilität in vitro*; Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie (DKOU 2021); Berlin; **2021**.

11 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

Unterschrift

12 Danksagung

Zunächst gilt mein großer Dank meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Katrin Susanne Lips dafür, dass Sie mir dieses spannende Projekt anvertraut hat, stets ein offenes Ohr für mich hatte und mich während des gesamten Prozesses mit Rat, wertvollen Anregungen und Diskussionen ausgezeichnet betreut hat.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Experimentellen Unfallchirurgie danke ich für ihre Hilfe und kollegiale Zusammenarbeit. Besonders möchte ich mich bei Ivonne Bergen und Olga Dakischew bedanken. Ohne ihre ausführliche Einarbeitung, unerschöpfliche Geduld, Unterstützung bei Problemen und Fragestellungen jedweder Natur, sowie den motivierenden Gesprächen wäre die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen. Zudem danke ich meiner Mitdotorandin Hanna Baitinger, die mir durch ihre gute Freundschaft und andauernde Hilfsbereitschaft praktisch und moralisch jederzeit zur Seite stand. Mit ihr gestalteten sich die vielen Stunden im Labor deutlich angenehmer, wodurch sie wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Ich bedanke mich beim Institut für Bioprozess- und Analysenmesstechnik in Heilbad Heiligenstadt, insbesondere bei Frau Dr. Nicole Hauptmann, Herrn Prof. Dr. Klaus Liefeith und Herrn Dr. Gerhard Hildebrand, für die gute und freundliche Zusammenarbeit sowie die Anfertigung und Bereitstellung der Scaffoldmaterialien.

Herrn Dr. Christoph Biehl aus der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie des UKGM danke ich für die Bereitstellung der Knochenmaterialien zur Isolation der MSC.

Weiterhin bedanke ich mich beim Bundesministerium für Bildung und Forschung für die finanzielle Förderung des Projekts.

Bei meinen Freunden, meinen Brüdern und meinem Opa Rainer bedanke ich mich für die kontinuierliche Ermutigung und den Rückhalt, sodass ich immer wieder neue Motivation finden konnte. Besonders bedanke ich mich bei Christoph, der mir sowohl in Höhen und Tiefen eine emotionale Stütze war, als auch bei der Anfertigung der Dissertation durch konstruktive Anregungen und Rat bei technischen Problemen eine große Hilfe war.

Zuletzt, aber eigentlich zuerst, danke ich ganz herzlich meiner Ziehmutter Diana. Ihre liebevolle, uneingeschränkte und bedingungslose Unterstützung in jeder Lebenslage hat mir die Absolvierung des Studiums und der Promotion überhaupt ermöglicht.

Danke für Alles!