

**Untersuchung des Zelluntergangs humaner mesenchymaler  
Stammzellen in Kontakt mit neuartigen calcium- und  
strontiumhaltigen Knochenersatzstoffen**

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

vorgelegt von Itting, Paul Thomas  
aus Saalfeld (Saale)

Gießen 2024

**Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen**

Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie des  
Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen  
Labor für Experimentelle Unfallchirurgie

Gutachter/in: Frau Prof. Dr. rer. nat. K. S. Lips

Gutachter/in: Herr Prof. Dr. med. M. Rickert

Tag der Disputation: 06. Dezember 2024

## Inhaltsverzeichnis

**Untersuchung des Zelluntergangs humaner mesenchymaler Stammzellen in Kontakt mit neuartigen calcium- und strontiumhaltigen Knochenersatzstoffen .... I**

**Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen ..... II**

**Inhaltsverzeichnis ..... III**

<b>1. Einleitung</b> .....	1
1.1. Osteoporose.....	1
1.2. Mesenchymale Stammzellen (MSC).....	4
1.3. <i>Brain-derived Neurotrophic Factor</i> (BDNF).....	7
1.4. Knochenersatzmaterialien.....	10
1.5. Biokompatibilität und Zytokompatibilität: Apoptose und Nekrose.....	14
<b>2. Ziele der aktuellen Studie</b> .....	18
<b>3. Material und Methoden</b> .....	20
3.1. Materialien.....	20
3.1.1. Geräte.....	20
3.1.2. Verbrauchsmaterialien.....	21
3.1.3. Zellkulturmedien, Lösungen und Puffer.....	21
3.1.4. Präparationssysteme (Kits).....	22
3.1.5. Software.....	22
3.2. Methoden.....	23
3.2.1. Herstellung der Probekörper.....	23
3.2.2. Gewinnung von MSC aus Bohrmehl.....	26
3.2.3. Spenderinnen der MSC.....	26
3.2.4. Herstellung der Zellkulturmedien.....	27
3.2.5. Kultivierung von MSC.....	28
3.2.6. Aussaat der MSC.....	28
3.2.7. Etablierung des Nekroseassays und Apoptoseassays.....	29
3.2.8. Vorbereitung der <i>well</i> -Platten.....	30
3.2.9. Versuch zur Messung der Nekrose- und Apoptosewerte.....	31
3.2.10. Durchführung des Nekrose- und Apoptoseassays.....	32
3.2.11. Statistische Auswertung.....	33
<b>4. Ergebnisse</b> .....	34
4.1. Ergebnisse der Vorversuche.....	34
4.2. Ergebnisse bei Betrachtung des <i>Enrichment Factors</i> .....	42
4.2.1. Vergleich knochengesunder und osteoporotischer MSC.....	42
4.2.1.1. Ergebnisse des Nekroseassays.....	42
4.2.1.2. Ergebnisse des Apoptoseassays.....	43
4.2.2. Vergleich der Knochenersatzmaterialien.....	44

4.2.2.1.	Ergebnisse des Nekroseassays .....	44
4.2.2.2.	Ergebnisse des Apoptoseassays.....	45
4.2.3.	Vergleich der Zellkulturmedien mit und ohne BDNF-Zusatz .....	47
4.2.3.1.	Ergebnisse des Nekroseassays .....	47
4.2.3.2.	Ergebnisse des Apoptoseassays.....	48
4.3.	Lichtmikroskopische Ergebnisse .....	50
4.3.1.	Lichtmikroskopie einer knochengesunden Spenderin.....	50
4.3.2.	Lichtmikroskopie einer osteoporotischen Spenderin.....	56
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>62</b>
5.1.	Ergebnisdiskussion .....	62
5.1.1.	Abhängigkeit des Zelluntergangs vom Knochenstatus .....	62
5.1.2.	Wirkung und Vergleich der unterschiedlichen Knochenersatzstoffe ...	63
5.1.3.	Beeinflussung von MSC durch BDNF .....	68
5.1.4.	Zusammenfassung der Ergebnisse .....	71
5.2.	Methodendiskussion.....	72
5.2.1.	Verwendete Zellen der Spenderinnen.....	72
5.2.2.	Einfluss und Messbarkeit des pH-Wertes .....	75
5.2.3.	Veränderung der Dauer der Experimente .....	77
5.2.4.	Einfluss der Nutzung des verwendeten ELISA-Kits .....	78
5.3.	Ausblick.....	80
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>83</b>
<b>7.</b>	<b>Summary</b> .....	<b>85</b>
<b>8.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>87</b>
<b>9.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>89</b>
<b>10.</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>90</b>
<b>11.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>91</b>
<b>12.</b>	<b>Publikationsverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>13.</b>	<b>Erklärung zur Dissertation</b> .....	<b>VI</b>
<b>14.</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>VII</b>

## 1. Einleitung

### 1.1. Osteoporose

Die Osteoporose ist eine Krankheit, in deren Verlauf sich die Knochenstruktur und die Knochenfestigkeit, durch den Verlust von Knochensubstanz verändert. Treten durch eine Verschlechterung der ossären Mikroarchitektur Frakturen auf, so ist von einer manifesten Osteoporose zu sprechen [32]. Durch verschiedene Einflussfaktoren manifestiert sich die Osteoporose vermehrt im höheren Alter, bei postmenopausalen Frauen noch häufiger als bei Männern. Durch das Risikoprofil osteoporotischer Erkrankungen und den fortschreitenden demografischen Wandel in der Bundesrepublik Deutschland ist davon auszugehen, dass in den nächsten Jahren und Jahrzehnten vermehrt Osteoporose in Deutschland diagnostiziert sowie auch vermehrt osteoporotische Frakturen als Manifestationen der Osteoporose auftreten werden [107,108]. Dies wird nicht nur für Deutschland gelten, sondern ist auf der gesamten Welt zu erwarten mit deutlich steigender Anzahl von osteoporotischen Frakturen [99,125].

Die Diagnose einer Osteoporose ist dann zu stellen, wenn durch eine radiologische Untersuchung ein T-Score kleiner als 2,5 Standardabweichungen unterhalb der Referenzgruppe auftritt [32]. Der T-Score bewertet dabei mittels Densitometrie die Knochendichte eines Patienten, wobei der Referenzwert der Mittelwert der maximalen Knochendichte eines 30-Jährigen ist. Wenn der T-Score zwischen -1 und -2,5 Standardabweichungen liegt, ist noch nicht von einer Osteoporose, sondern von einer Osteopenie zu sprechen. Eine manifeste Osteoporose bezeichnet einen entsprechenden T-Score mit einer einhergehenden Fraktur [32].

Dass das Alter einer der größten Risikofaktoren für die Entwicklung einer Osteoporose ist, zeigten schon mehrere Studien. So bewiesen Daten aus Deutschland, dass die Inzidenz von Hüftfrakturen für Frauen und Männer im Alter über 50 Jahren pro Lebensdekade um das 2–4-fache ansteigt. Daten aus Österreich zeigten, dass die Inzidenz einer Hüftfraktur für Männer ab der zehnten Lebensdekade der 75-fachen Inzidenz der sechsten Lebensdekade entspricht. Bei Frauen zeigten sich noch höhere Inzidenzwerte ab der zehnten Lebensdekade, dort entsprach die Inzidenz der 90-fachen Inzidenz der sechsten Lebensdekade [32]. Weiterhin waren steigende Inzidenzen nicht nur für Frakturen großer Röhrenknochen, der Hüftknochen und Wirbelkörper, sondern auch für andere Frakturen nachweisbar. Alle Frakturen der großen Röhrenknochen ohne entsprechendes Trauma und bei entsprechenden Risikoprofil, insbesondere der Oberschenkel-, Ober- und Unterarmknochen sowie die Frakturen von Hüftknochen und

Wirbelkörpern werden auch in Deutschland als „*Major Osteoporotic Fractures*“ bezeichnet und gelten als Kardinalsymptom einer manifesten Osteoporose [32].

Der demografische Wandel in Deutschland ist in vollem Gange und führt zu einer Veränderung der Bevölkerungsstruktur, das heißt zu einer deutlichen Zunahme des durchschnittlichen Bevölkerungsalters sowie zu einer Zunahme des Anteils der Bevölkerung über 65 Jahren bezogen auf die Gesamtbevölkerung [108]. Im Jahr 2011 waren noch 15,6 Millionen Menschen in Deutschland unter 20 Jahren alt, aber Prognosen zur Folge wird es im Jahr 2030 circa 17 % weniger Menschen im Alter unter 20 Jahren geben. Die einzige Bevölkerungsgruppe, die einen stetigen Zuwachs am Gesamtanteil der Bevölkerung hat, sind die über 65-Jährigen. Diese Bevölkerungsgruppe umfasste 2008 noch 16,7 Millionen Personen, im Jahr 2030 werden es über 22 Millionen Bürger sein [108]. Dadurch kommt es zu einer Zunahme der älteren Bevölkerung, in der sich nicht nur immer mehr Menschen befinden, sondern deren Lebenserwartung auch stetig zunimmt. Dadurch folgt ein weiterer Schritt zu einer größeren Gruppe der älteren Bevölkerung bezogen auf die Gesamtbevölkerung in Deutschland [107]. Auf Grund des zunehmenden Bevölkerungsalters und der Assoziation der Osteoporose mit dem Alter weisen Studien bereits heute auf die zukünftig erhöhte sozioökonomische Bedeutung der Osteoporose nicht nur in Deutschland hin [32].

Bereits mehrere Untersuchungen zeigten, dass das Geschlecht zu den größten Risikofaktoren für die Entwicklung einer Osteoporose zählt, wodurch Frauen häufiger von einer klinisch manifesten Osteoporose betroffen sind als Männer [32]. So beträgt das Lebenszeitrisiko eines 50-jährigen Mannes für eine „*Major Osteoporotic Fracture*“ circa 20 %, wo hingegen das Lebenszeitrisiko einer Frau bei circa 50 % liegt [32]. Die Begründung für diesen Sachverhalt ist, dass bei Frauen nach der Menopause die Serumkonzentrationen von Geschlechtshormonen, vor allem von Östrogen, abfallen, welche direkt und indirekt die Mineralisation des Knochens und die Knochenstruktur beeinflussen. Am wahrscheinlichsten scheint hier die Stimulation der Osteoblasten durch Östrogen, wodurch Östrogen eine antiosteoporotische Wirkung hat und in der frühen Entwicklung des Skeletts auch für den Schluss der Epiphysenfugen verantwortlich ist [49,85].

Es gibt zahlreiche weitere Risikofaktoren für die Entwicklung einer Osteoporose, wobei hier nur einige exemplarisch genannt werden. Zu den Risikofaktoren für die Entwicklung einer Osteoporose zählen Wirbelkörperfrakturen vor dem 50. Lebensjahr, Rauchen, Untergewicht oder Vitamin-D- und Calciummangel, spezielle Krankheiten, wie das

Cushing-Syndrom, Diabetes Mellitus Typ 1 und Typ 2, Erkrankungen des rheumatoiden Formenkreises, aber auch Demenz-Erkrankungen sowie Schlaganfälle. Außerdem gibt es eine Vielzahl von Medikamenten, die das Risiko für eine Osteoporose erhöhen, wie zum Beispiel Aromatasehemmer, eine hormonablativ Therapie bei Männern und Glukokortikoide [32,78].

In Anbetracht der vielen Risikofaktoren, die nur zum Teil beeinflussbar sind, gibt es bereits Therapiemöglichkeiten der Osteoporose. Mit einer erwarteten Zunahme der sozioökonomischen Bedeutung der Osteoporose müssen dennoch weitere Therapieoptionen der Osteoporose gesucht und gefunden werden. Bedingt durch eine Bevölkerungszunahme im höheren Alter ist mit einer zu erwartenden Zunahme an Patienten mit einer manifesten Osteoporose zu rechnen [108]. Um neue Therapieansätze zu finden, ist es notwendig, die grundlegende Pathobiochemie und Pathophysiologie der Osteoporose und die Biochemie und Physiologie des Knochenstoffwechsels zu kennen.

Der physiologische Auf- und Abbau von Knochen findet reguliert durch Hormone, lokale Faktoren und die Beanspruchung des Knochens durch verschiedene Zellen statt. Die knochenaufbauenden Zellen sind Osteoblasten, welche durch direkt oder indirekt wirkende Mechanismen stimuliert werden. Hier zu erwähnen sind erhöhte Konzentrationen von Calcium und Phosphat, welche nötig sind, um den Knochen zu mineralisieren, sowie die Rolle von Östrogenen, welche über Rezeptoren die Osteoblasten direkt stimulieren. Osteoklasten hingegen bauen die Knochensubstanz ab und werden durch Östrogen direkt gehemmt, aber durch fehlendes Calcium und Phosphat im Blut stimuliert. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Östrogen die Apoptose von Osteoklasten induzieren kann [25]. Weiterhin wirkt eine fehlende Beanspruchung des Knochens stimulierend auf Osteoklasten und Zytokine wie Interleukine (IL), beispielsweise IL-1 $\beta$  und IL-6, und Tumor Nekrose Faktoren (TNF), beispielsweise TNF- $\alpha$ , sodass diese Zytokine an der Verstärkung des Knochenabbaus mitwirken. Hemmend auf die Produktion dieser Zytokine wirken hingegen Östrogene [49].

Im osteoporotischen Knochenstoffwechsel ist das Gleichgewicht zwischen Osteoblasten und Osteoklasten und somit dem Auf- und Abbau von Knochenmatrix nicht mehr vorhanden, sondern weit in Richtung der Osteoklasten und damit dem Knochenabbau verschoben [36]. Als größtes Problem ist hier der Wegfall der Östrogen-Wirkung zu sehen, welcher bei Frauen durch die Menopause bedingt ist und bei Männern beispielsweise durch einen senilen Hypogonadismus, wobei ein Mangel an

Sexualhormonen, darunter Testosteron und eben auch Östrogen, auftreten kann [49]. Hierbei greifen vor allem drei Mechanismen, durch die es zu einer Osteoporose kommen kann. Erstens sinkt die direkte Stimulation der Osteoblasten durch Östrogen, zweitens kann das Fehlen des Östrogens auch zu einer Abnahme der Inhibition der Bildung von proosteoporotischen Zytokinen führen. Drittens werden auch die Osteoklasten durch die niedrigeren Östrogenspiegel nicht mehr entsprechend gehemmt. Demzufolge kommt es zu einem vermehrten Abbau von Knochensubstanz. Die geringere Beanspruchung des Knochens im Alter sowie Einflüsse anderer Krankheiten oder deren Therapien sind zusätzliche Faktoren für die Entwicklung einer Osteoporose im Alter. Bei chronisch entzündlichen Erkrankungen, wie zum Beispiel der rheumatoiden Arthritis, wirkt einerseits die Therapie mit Glukokortikoiden proosteoporotisch. Andererseits sind in diesen Fällen auch häufig erhöhte Serumlevel von TNF- $\alpha$  und IL-6 nachweisbar, welche wie oben beschrieben proosteoporotisch wirken [49,74,100].

Aus allen beschriebenen Wegen der Entstehung der Osteoporose ergeben sich dann pathophysiologisch vor allem Defekte der trabekulären Mikroarchitektur, eine fehlerhafte Zusammensetzung des Knochenmaterials, eine unzureichende Reparatur von Mikrotraumen und ein insgesamt gesteigerter Umsatz der Knochensubstanz einhergehend mit einem Verlust der ursprünglichen Stabilität des Knochens und einem Verlust von Knochenmatrix [7]. Dadurch können Manifestationen einer Osteoporose im Sinne von Knochenbrüchen begünstigt werden.

### 1.2. Mesenchymale Stammzellen (MSC)

MSC können durch viele Mechanismen neuartige Ansätze der Therapie der Osteoporose bieten, da viele Zellen des Binde- und Stützgewebes indirekt von MSC abstammen [111]. Embryologisch betrachtet entspringen alle Zellen des Binde- und Stützgewebes dem Mesoderm, darunter auch mesenchymale und hämatopoetische Stammzellen.

MSC sind multipotente Zellen, welche sich sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* durch die äußeren Umstände zu diversen spezielleren Zellformen entwickeln können [12,87]. Zuerst entdeckt wurden sie von *Friedenstein et al. (1966)* und sind seither Bestandteil der Forschung [37,71]. Von anderen Stammzellen unterscheiden sie sich durch die Zelllinien, in welche sie sich differenzieren können und durch spezifische Oberflächenproteine, welche nur von MSC exprimiert werden [72]. Um als MSC definiert zu werden, muss die Zelle fähig sein, sich zu Osteoblasten, Adipozyten und Chondroblasten auch *in vivo* differenzieren zu können [5,98]. Von anderen Zellen des Knochenmarks, aus dem sie meistens isoliert werden, unterscheiden sie sich durch das

Oberflächenantigen *STRO-1* und Zelladhäsionsmoleküle des *Clusters of Differentiation* (CD). Dabei präsentiert die Zellmembran von MSC die Antigene CD106 und CD146, über die eine Klassifizierung als MSC erfolgen darf [5]. Zusätzlich bilden MSC noch weitere CD-Antigene aus, hierunter CD73, CD90 und CD105. Andere Oberflächenantigene wie beispielsweise Histokompatibilitäts-Antigene der Klasse II fehlen [5,35,98].

Allerdings stammen nicht alle Zellen des Knochengewebes von MSC ab. Osteoklasten sind spezialisierte Gewebsmakrophagen, welche von hämatopoetischen Vorläuferzellen abstammen und für den Abbau von Knochensubstanz verantwortlich sind [72]. Die Osteoblasten und Osteozyten als Zellen mesenchymalen Ursprungs sorgen hingegen für den Aufbau und den Erhalt der Knochensubstanz.

Osteoblasten, als indirekte Nachkommen von MSC, dienen der Knochenbildung, indem sie mittels Kollagensynthese und Synthese alkalischer Phosphatase (ALP) für die Bildung neuer extrazellulärer Matrix in Form neuer Knochenlamellen sorgen [73]. Die Bestandteile der neuen extrazellulären Matrix werden dafür zuvor in den Osteoblasten synthetisiert und dann mittels Matrixvesikel oder direkter Sekretion ausgeschleust. Im Extrazellulärraum bilden diese Proteine, darunter vor allem auch die Kollagene I, III, V und XI, zunächst den strukturellen Rahmen für die Bildung von Knochen, das so genannte Osteoid [49]. Für die Mineralisation neuer Knochenlamellen dienen im Extrazellulärraum beispielsweise die ALP, Osteocalcin und andere Enzyme [83]. Hierbei findet die Mineralisierung der extrazellulären Matrix entlang der bereits vorhandenen Kollagenfibrillen statt, sodass dadurch eine Stabilisierung und Verfestigung der extrazellulären Matrix eintritt [41]. Die Heilung von Frakturen verläuft ähnlich, jedoch werden die Bestandteile der extrazellulären Matrix nur zu geringen Teilen von den Osteoblasten gebildet, da hier nicht die oben beschriebene desmale, sondern die chondrale Ossifikation stattfindet. Hierbei entstehen aus MSC zunächst Chondrozyten, welche sich dann jedoch zu hypertrophen Zellen weiter entwickeln und durch ihre Apoptose die extrazelluläre Matrix freisetzen [49]. Durch die Ausschüttung von *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) und die dadurch bedingte Entstehung von Blutgefäßen wandern dann Chondroklasten zum Abbau des restlichen Knorpels und Osteoblasten zum finalen Aufbau des Knochens wie oben bereits beschrieben ein [49]. Osteozyten, als eingeschlossene, differenzierte Nachfolger der Osteoblasten, hingegen wirken als Mechanorezeptoren im Knochen und sezernieren verschiedene Stoffe, welchen den Auf- oder Abbau des Knochens im Gleichgewicht halten. Dazu zählt beispielsweise Sclerostin, welches parakrin zur Hemmung der Knochenbildung dient. Neben sezernierten Botenstoffen können auch exprimierte Oberflächenproteine oder

Rezeptoren von Zellen zur Differenzierung und Entwicklung anderer Zellen beitragen. Beispielsweise exprimieren Osteoblasten auf ihren Oberflächen *Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B-Ligand* (RANKL), was für die Entstehung von Osteoklasten verantwortlich ist. Sollte der Abbau von Knochenmatrix nötig sein, so werden durch die Ausschüttung von Gewebszytokinen undifferenzierte Vorläufer der Osteoklasten angelockt, welche dann unter dem Zytokineinfluss der Osteozyten zu Osteoklasten differenzieren. Die Aktivierung und damit der Start des Abbaus der Knochenmatrix beruht auf dem nötigen Kontakt von RANKL auf den Osteozyten und dem *Receptor for Activation of Nuclear Factor Kappa B* (RANK) auf den Osteoklasten [73]. Aus diesem Grund spielen MSC, als Quelle von osteogenen Zellen, eine Rolle bei der Bildung neuer Knochenstruktur und der Reparatur angegriffener Knochenstruktur.

Die proosteogenen Effekte der MSC haben neben der reinen Differenzierungskomponente in Osteoblasten und Osteozyten weitere unterschiedliche Wirkmechanismen, die in verschiedenen Studien nachgewiesen werden konnten. So konnten *Su et al. (2018)* zeigen, dass die Migration von MSC in Frakturgebiete essenziell für die Heilung der Fraktur ist [111]. Sollte die Migration von MSC ausbleiben, so könnte das zu Erkrankungen des Knochens, darunter auch Osteoporose führen [111]. Den Wirkmechanismus der Migration von MSC in den Frakturspalt konnten *Medhat et al. (2019)* auf immunmodulatorische Effekte der MSC zurückführen [78]. Durch eine Fraktur kommt es zu einem Frakturhämatom, welches Neutrophile anlockt, um das Hämatom abzubauen. Durch die dann beginnende Entzündungsreaktion werden Makrophagen aktiviert, welche durch die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine die Migration von MSC fördern [71]. Migrierte MSC wiederum beginnen über Zytokine und andere Gewebshormone zunächst mehr MSC, Monozyten und Makrophagen zu rekrutieren, damit das Frakturhämatom schneller abgebaut werden kann. Parallel zum Abbau des Frakturhämatoms sorgen von MSC ausgeschüttete Gewebszytokine für einen Switch der Makrophagen zu Makrophagen des Typs 2, welche für die weitere Heilung der Fraktur notwendig sind. Danach beginnt die Heilungsphase, in der die MSC mittels VEGF eine vermehrte Angiogenese stimulieren und über von M2-Makrophagen ausgeschüttetes IL-10 und *Transforming Growth Factor-β* (TGF-β) zur Differenzierung von MSC in die chondrogene Zelllinie beitragen [71,78]. Hierdurch wird die chondrogene Ossifikation der Fraktur gefördert.

Außerdem konnte bewiesen werden, dass durch die Behandlung osteoporotischer Tiermodelle mit MSC die Knochenmineralisierung ansteigt [78]. Hinsichtlich der Wirkung von VEGF und einer verstärkten Vaskularisierung konnte bisher in mehreren präklinischen und klinischen Studien gezeigt werden, dass durch die Behandlung mit

MSC sowohl die Neoangiogenese, als auch die Konzentration von VEGF steigt. In einem Tiermodellversuch einer aseptischen Hüftkopfnekrose konnte durch die Therapie mit MSC eine Regeneration des Knochens und der Gefäßversorgung erreicht werden [69].

Zusätzlich zu den Daten hinsichtlich der Therapie von Knochenerkrankungen mit MSC zeigten Daten von Patienten mit Osteoporose bereits, dass weder die Anzahl, noch die proliferativen Fähigkeiten MSC bei osteoporotischen Patienten eingeschränkt sind. [97] Daraus lässt sich schlussfolgern, dass nicht nur die reine Therapie mit MSC eine Perspektive zur Behandlung der Osteoporose bietet, sondern auch die vorhandenen MSC Ziel möglicher Therapien zur Behandlung der Osteoporose sein könnten. So konnte nachgewiesen werden, dass beispielsweise MSC von Osteoporosepatienten verringerte Reaktionen auf rekrutierende Signalstoffe aus frakturierten Arealen haben. Zusätzlich reagierten MSC von Patienten mit Osteoporose in geringerem Maße auf Signalstoffe, die den Aufbau neuer Knochensubstanz fördern, zum Beispiel *Bone Morphogenetic Protein 2* und *7* (BMP-2/ BMP-7) [46].

### 1.3. Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF)

BDNF gehört zur Familie der Neurotrophine (NT) und wurde 1982 zum ersten Mal aus dem Gehirn von Schweinen als zweites NT nach dem *Nerve Growth Factor* (NGF) isoliert. Seitdem wurden weitere NT, hierunter NT-3, NT-4 und NT-5 entdeckt und beschrieben [14,75]. Circa 50 % der Aminosäuren von BDNF stimmen mit denen der anderen NT überein und auch die Struktur des Proteins ist ähnlich der Struktur der anderen NT [14]. Die Wirkung von BDNF innerhalb der Zelle wird weiterhin untersucht, die beiden bereits bekannten hauptverantwortlichen Rezeptoren sind dabei zum einen die hochsensitive *Tropomyosin-related Kinase B* (TrkB) und zum anderen der mit geringerer Affinität bindende Rezeptor p75, an dem auch andere Proteine der NT-Familie binden [14].

Die intrazellulären Mechanismen der Signalübertragung sind noch Teil von Studien. Über den p75-Rezeptor ist bekannt, dass er über den *Nuclear-Factor Kappa B* (NF-κB) intrazellulär Signale überträgt [14]. Hierbei scheint der p75-Rezeptor Einfluss auf den programmierten Zelltod, aber auch auf die Spezifität der Bindung des BDNF zu haben [14]. Für den TrkB-Rezeptor ist hingegen bekannt, dass die intrazelluläre Signaltransduktion über cRaf-ERK1/2 und Elk 1 läuft und mitunter die Bildung von VEGF und die Zellmigration beeinflusst [58,138,139].

Die Funktion von BDNF beläuft sich aber nicht nur auf die Entwicklung und Erhaltung des Nervensystems und dessen Funktionen. Seit dem Nachweis von *Yamashiro et al.* (2001), dass BDNF und der TrkB-Rezeptor auch im Knochen und im Knorpel exprimiert

werden, ist BDNF Bestandteil der Forschung hinsichtlich der Heilung von Frakturen und der Beeinflussung von MSC [14,133].

Durch erste Studien konnte zunächst die Expression von BDNF und dessen TrkB-Rezeptor nachgewiesen werden. Dabei erfolgte der Nachweis nicht nur in Zonen der enchondralen Ossifikation der Epiphysenplatte, sondern auch in Osteoblasten an der intramembranösen Oberfläche und in Arealen des trabekulären *Remodelings* [133]. In einem *in vitro* Versuch einer Co-Kultur von Schwanzzellen und Osteoblasten gelang der Nachweis, dass die Ausschüttung von BDNF zu einer vermehrten Proliferation, Differenzierung und Mineralisierung von Osteoblasten führt [21]. Weiterhin konnten *Kilian et al. (2014)* beweisen, dass BDNF und TrkB auch in heilenden Frakturen, sowie in *in vitro* Versuchen von Osteoblasten exprimiert werden [58].

Die Effekte des BDNF sind vielfältig und sowohl an MSC, als auch an Osteoblasten zu beobachten. Am unmittelbarsten sind die proosteogenen Effekte zu nennen. Ähnlich den oben genannten Ergebnissen konnten weitere Studien einen positiven Einfluss von BDNF auf die Differenzierung von MSC zu Osteoblasten nachweisen [45,55,70]. Zusätzlich zeigten sich eine erhöhte Aktivität der ALP und eine vermehrte Mineralisation der Zellen [70]. Umgekehrt konnte in einem Mausmodell nachgewiesen werden, dass die BDNF-Expression von MSC während der osteogenen Differenzierung *in vitro* signifikant erhöht war [36]. Der Nachweis der vermehrten BDNF Expression gelang auch für differenzierte Osteoblasten im Vergleich mit Prä-Osteoblasten [45]. Weiterführende Untersuchungen zeigten anhand von Modellexperimenten an Mäusen, dass nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* positive Effekte einer BDNF-Applikation entstehen. *Ida-Yonemochi et al. (2017)* zeigte anhand eines mandibularen Osteotomiemodells, dass BDNF zu einer signifikant stärkeren Knochenmatrix führt [52]. *Kauschke et al. (2018)* konnte nachweisen, dass BDNF-haltiger Knochenzement die Frakturheilung fördert [56].

Abgesehen von den positiven Effekten auf die Differenzierung osteogener Zellen und auf die Produktion von Knochenmatrix konnte auch noch ein positiver Effekt der Migration von Zellen eines Tiermodells durch BDNF gezeigt werden [138]. Hierbei konnte *Zhang et al. (2020)* zeigen, dass die von Mäusen aus einer Präosteoblasten Zelllinie stammenden MC3T3-Zellen, durch die Zugabe von BDNF neben einer vermehrten Bildung von Integrin  $\beta 1$  auch vermehrt migrierten [138]. Die Studienlage hinsichtlich der Rolle des BDNF bei der Migration von Zellen ist allerdings noch kontrovers, da auch entgegengesetzte Daten publiziert wurden [52]. Hierbei nutzte *Ida-Yonemochi et al. (2017)* jedoch eine andere Art des Migrations-Assays, ein *in vitro*

*scratch-assay*, im Vergleich zur Arbeit von *Zhang et al. (2020)* mit einem vorgefertigten Costar Transwell System [52,138].

Zusätzlich gibt es Hinweise, dass BDNF auch indirekt Auswirkungen auf die Knochenstruktur, zum Beispiel durch eine vermehrte Neurogenese und eine vermehrte Ausschüttung von VEGF, hat. Die Neurogenese scheint bei der Heilung der Knochenstruktur eine Rolle zu spielen, da in verschiedenen Studien nachgewiesen wurde, dass eine Denervation des Knochens zu einer geringeren Heilungsrate von Frakturen und geringeren mechanischen Belastbarkeit bei gesenkter Dichte des Kallus führen kann [70,116]. Außerdem hat BDNF einen Einfluss auf die Ausschüttung von VEGF. *Zhang et al. (2017)* konnten nachweisen, dass Osteoblasten eines Mausmodells durch die Stimulation mit BDNF signifikant mehr VEGF exprimierten und ausschütteten [139]. Der Anstieg der VEGF-Konzentration ist, wie oben bereits erwähnt, wichtig für die chondrale Ossifikation, um eine Einwanderung der Osteoblastenprogenitorzellen und der Chondrozyten zur Stabilisierung des Knochens zu gewährleisten [49].

Abgesehen von den Effekten des BDNF auf zellulärer Ebene und die Heilung von Frakturen zeigen Forschungsergebnisse auch, dass BDNF mit Osteoporose oder einem Verlust von Knochenmineralisation assoziiert ist. *Guo et al. (2016)* konnten in einer Analyse von epigenetischen Faktoren und genomweiten Assoziationsstudien beweisen, dass im BDNF-Gen auftretende *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) signifikant mit osteoporotischen Frakturen assoziiert sind [45]. Außerdem konnten sie aufzeigen, dass das BDNF-Gen zumindest mit dem Verlust von Knochenmineralisierung in einem signifikanten Zusammenhang steht [45]. Zusätzlich wurden in einer Studie in Japan die Zusammenhänge zwischen Amenorrhö, der Knochendichte und den Serumleveln von BDNF untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die Serumlevel von BDNF mit der Knochendichte der Probandinnen assoziiert waren [85]. Zusätzlich konnte aufgezeigt werden, dass auch die Östrogen-Serumlevel der Probandinnen mit den Serumleveln des BDNF assoziiert waren und dass durch eine Östrogentherapie der BDNF-Gehalt im Serum ansteigt [85]. Als weitere Evidenz hinsichtlich der Rolle von BDNF im Rahmen einer Osteoporose ist anzuführen, dass in einem osteoporotischem Mausmodell die *long-non-coding* Ribonucleinsäure (RNA) *Brain-derived Neurotrophic Factor-Antisense Transcript* (BDNF-AS) signifikant häufiger in MSC vorkam, als in MSC ohne Osteoporose [36]. Hier ist zu erwähnen, dass die Konzentration der *long-non-coding* RNA BDNF-AS während der Osteogenese sinkt und eine erhöhte Konzentration der *long-non-coding* RNA BDNF-AS zu einer Inhibition der MSC-Differenzierung führt [36].

#### 1.4. Knochenersatzmaterialien

Knochenersatzmaterialien spielen bei der Versorgung osteoporotischer Frakturen eine große Rolle, da durch die Fraktur häufig ein Verlust von Knochenmatrix auftritt. Die Basis für Knochenersatzmaterialien können folgende drei Grundmaterialien bilden: die autologe Knochentransplantation als einzige vitale Option, xenogene Knochenersatzmaterialien und synthetische Knochenersatzstoffe [33,48]. Da der Schwerpunkt dieser Arbeit im Bereich der synthetischen Knochenersatzmaterialien liegt, soll hier nur durch zwei kurze Kommentare auf die beiden anderen Alternativen eingegangen werden. Für die autologe Knochentransplantation gibt es meist nicht genügend Material und der zweite Eingriff zur Gewinnung der autologen Materials, meist aus der Beckenschaufel, birgt weitere Risiken. Bei der Implantation homologen oder xenogenen Materials besteht ein deutlich erhöhtes Risiko der Abstoßung des Implantats und eine deutlich erhöhte Infektionsgefahr.

Aufgrund dieser Einschränkungen und Risikokonstellationen hinsichtlich der anderen beiden grundlegenden Alternativen von Knochenersatzstoffen bedeutet das einen großen Bedarf an künstlichen Knochenersatzmaterialien. Für diese ergeben sich aus den physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen einer Fraktur Anforderungen, welche in *Heinemann und Gelinsky et al. (2011)* zusammengefasst wurden [48]. Da die dort genannten Anforderungen jedoch zumindest in Teilen konträr sind, besonders die Forderung nach hoher Belastbarkeit und Stabilität im Gegensatz zu einer hohen Porosität und Biodegradierbarkeit steht, sollte bei den artifiziellen Knochenersatzstoffen nach *Heinemann und Gelinsky et al. (2011)* in zwei Hauptgruppen unterschieden werden [48]. Zum einen gibt es Massivimplantate, welche eine hohe Belastbarkeit und Stabilität direkt nach der Implantation gewährleisten. Zum anderen gibt es *Scaffolds*, welche das Einwachsen von Knochen und die damit einhergehende Resorption des Knochenersatzmaterials und den Aufbau von eigener knöcherner Matrix ermöglichen.

In dieser Arbeit werden lediglich Knochenersatzmaterialien des zweiten Typs der artifiziellen Knochenersatzstoffe betrachtet, die die Möglichkeit des Einwachsens von Zellen durch ihre Porosität bieten. Eine Gemeinsamkeit dieser Stoffe ist, dass ein Großteil ihrer Substanz aus Calciumphosphaten und Calciumcarbonaten bzw. aus davon abgeleiteten Kompositmaterialien bestehen, da beide Mineralien als Hauptbestandteile des physiologischen Knochens neben der knöchernen Matrix vorhanden sind. Die in dieser Studie betrachteten Knochenersatzstoffe enthalten jedoch nicht nur Calcium, sondern auch Strontium, da dieses als Spurenelement in unserem Körper zu finden ist sowie in chemischer Hinsicht Calcium sehr ähnelt [27,59,119].

Zusätzlich bietet das in den Experimenten verwendete Knochenersatzmaterial den Vorteil einer Vorstrukturierung durch Gelatine. Diese soll hierbei der Funktion einer extrazellulären Matrix im Knochen ähnlich sein und das entsprechende ossäre Grundgerüst aus Kollagenen und anderen Glykoproteinen und Proteoglykanen simulieren. Dadurch wird mittels Gelatine und der Ausfällung von Calcium- und Strontiumphosphaten im Knochenersatzstoff eine große Ähnlichkeit zum Knochen erreicht und der Knochenersatzstoff kann durch den Körper resorbiert werden. Durch das hinzugefügte Strontium wird jedoch die Bildung großer flächiger Kristallstrukturen gestört, wodurch eine größere Oberfläche für Kontakte von Zellen mit dem Knochenersatzstoff erzeugt wird [63]. Diese grobe Beschreibung der werkstoffwissenschaftlichen Vorteile der hier getesteten Knochenersatzstoffe sind für die hiesige Arbeit ausreichend, für die genaueren werkstoffwissenschaftlichen Untersuchungen und Daten soll dennoch auf *Kruppke et al. (2020)* verwiesen werden [63].

Da Strontium sich als geeignet zur Therapie der Osteoporose zeigte, erfolgt aus diesem Grund das Einbringen von Strontium in Knochenersatzmaterialien. Dabei wurde es jedoch in Form von Strontium-Ranelat systemisch verabreicht, wobei sich zwar seltene, aber schwerwiegende Nebenwirkungen im Sinne eines erhöhten kardiovaskulären Risikos zeigten [94,112]. *Komrakova et al. (2015)* konnte für Strontium-Ranelat an einem osteoporotischen Rattenmodell beispielsweise zeigen, dass durch die Therapie mit Strontium-Ranelat proosteogene Effekte stattfanden und diese auch abhängig vom Zeitpunkt der Gabe von Strontiumranelat waren [60]. Doch trotz guter Wirksamkeit ist Strontium-Ranelat nur noch einigen wenigen, sehr strengen Indikationen vorbehalten, da wie oben erwähnt schwerwiegende kardiovaskuläre Nebenwirkungen zu beobachten waren. Daher müssen neue Möglichkeiten für die pharmakologische Nutzung von Strontium gesucht werden, um die Strontiumkonzentration im Bereich osteoporotischer Frakturen zu erhöhen und somit die Knochenheilung zu begünstigen. Die durch Strontium erwarteten Haupteffekte sind dabei die Reduktion der Knochenresorption durch Osteoklasten und die Steigerung der intrinsischen Knochenformation durch Osteoblasten und die vermehrte Differenzierung von Osteoblasten [20,112]. Zugrundeliegende Mechanismen sind noch Bestandteil aktueller Forschung, jedoch wurden schon mehrfach Wege der intrazellulären Signalkaskade beschrieben, über welche Strontium seine Wirkung entfaltet [59,77], beispielsweise die Beeinflussung von Zelldifferenzierungen hinsichtlich erhöhter Anteile von Osteoblasten. Durch vermehrte Osteoblastogenese nimmt auch die Expression proosteogener Gene wie ALP und Runx2 zu [59]. Zusätzlich vermindert Strontium die Differenzierung von Proosteoklasten

und hämatopoetischen Stammzellen zu Osteoklasten durch eine Reduktion der Expression von RANKL, wie *Kruppke et al. (2020)* sie beschreibt [59,63]. Auch eine vermehrte Apoptose von Osteoklasten wurde beschrieben [49,77]. Zusätzlich führt eine erhöhte Strontiumkonzentration noch zu einer vermehrten Produktion von Proteinen der knöchernen Matrix [59].

Neben den auf zellulärer Ebene bereits durchgeführten Studien gibt es auch aus Tierstudien eindeutige Hinweise darauf, dass das Einbringen von Strontiumionen in Form von Knochenersatzstoffen zu einer gesteigerten Resorption des Knochenersatzstoffes und zeitgleichem Aufbau eigener Knochenmatrix führt [77]. *Thormann et al. (2013)* zeigte in Untersuchungen, dass strontiumhaltige Materialien zu einer verbesserten Knochenbildung und zu einem verbesserten *Remodeling* des Knochens in einem Rattenmodell führten, verglichen mit nicht-strontiumhaltigen Materialien, und dass dieser Effekt auch für osteoporotische Knochen gilt [119]. Neben der direkt erhöhten Knochenbildung an der Grenze des strontiumhaltigen Knochenzements verglichen mit einem rein calciumhaltigen Knochenzement konnte in dieser Studie auch nachgewiesen werden, dass zusätzlich eine vermehrte Bildung von Gefäßen auftrat und auch proosteogene Proteine vermehrt exprimiert wurden [119]. Neben *Thormann et al. (2013)* beschrieben auch andere Autoren Vorteile für die Regeneration und Bildung von Knochen durch das Einbringen von Strontium in Knochenersatzstoffe. *Baier et al. (2013)* zeigte, dass Knochenzemente mit einem Strontium-Anteil eine signifikant höhere Knochenneubildung im Knochenzement nach sechs Monaten hatten, als Knochenzemente, die nur aus Calciumphosphaten und Calciumcarbonaten bestanden [9]. Zusätzlich konnte *Cheng et al. (2014)* auch in einem Tiermodell mit Sprague-Dawley Ratten in einer Positronen Emissions Computer Tomographie (PET-CT) Untersuchung eine Zunahme der Knochenbildung durch strontiumhaltigen Knochenzement im Vergleich zu klassischem Calcium-Knochenzement beweisen [26]. Außerdem konnte auch gezeigt werden, dass die Zugabe von Strontium bereits durch ein Sol-Gel-Verfahren ausreicht, um die positiven Wirkungen der Strontiumzugabe zu entfalten. Hier konnte durch das Auftragen einer strontiumhaltigen Schicht auf eine sehr dünne Titanplatte durch das Sol-Gel-Verfahren das osteogene Potential und die anti-inflammatorische Wirkung von Strontium sogar in Abhängigkeit der Strontiumkonzentration gezeigt werden [38]. Eine Zusammenfassung weiterer Arbeiten über die Wirkung von Strontium bietet *Neves et al. (2017)* in einer Übersichtsarbeit [84].

Für die Experimente in dieser Studie wurden als Knochenersatzstoff poröse *Scaffolds* genutzt, welche von *Kruppke et al. (2019)* erstbeschrieben wurden [62,64]. Dieser

Knochenersatzstoff, namentlich Phosphat-prästrukturierte Gelatine mit gemischten Calcium- und Strontiumkristallen (PPGC+S), liegt als fester Körper vor und könnte auch so implantiert werden. Aufgrund der Herstellung des Knochenersatzstoffes sind sowohl mineralische, als auch organische Phasen vorhanden. Die organische Phase des getesteten Knochenersatzstoffes entsteht dabei aus Gelatine, welche mittels Phosphatlösung prästrukturiert wird. Am Ende des Herstellungsprozesses entsteht durch eine Fällungsreaktion, wie in *Kruppke et al. (2019)* beschrieben, die anorganisch-mineralische Phase aus Calcium- und Strontiumphosphaten [64]. Auf diesem Herstellungsprozess beruht auch der Name des Knochenersatzstoffes: Phosphat-prästrukturierte Gelatine mineralisiert mit gemischten Lösungen von Calcium und Strontium. Während der Herstellung ist es zusätzlich möglich durch die ablaufenden Reaktionen verschiedene Konzentrationen und Verhältnisse von Calcium- und Strontiumionen auszutesten, um das beste Verhältnis der beiden Mineralien im Knochenersatzstoff herauszufinden. Hierbei ist das Ziel eine ausreichend hohe Endkonzentration im Gewebe ohne eine Überdosierung sowie die größtmögliche Unterstützung der Knochenheilung durch den Knochenersatzstoff zu erreichen.

*Verberckmoes et al. (2003)* zeigte, dass bereits 2-5 µg/ ml Strontium ausreichen, um einen positiven Effekt auf die Knochenbildung zu erreichen. Höhere Konzentrationen von Strontiumionen zeigten jedoch keinen Einfluss auf die Differenzierung von Osteoblasten und führten zu einer Störung der Mineralbildung [121]. Dieser Effekt konnte von *Kruppke et al. (2019)* reproduziert werden, welcher einen Übergang von Calciumphosphatplatten mit einer großen, längeren und flächigen Kristallstruktur in den Knochenersatzstoffen hin zu kleineren, kugelförmigeren Kristallen in Abhängigkeit einer steigenden Strontiumionenkonzentration beschreibt [64]. Im Falle der Nutzung von PPGC+S als Knochenersatzmaterial ist diese Störung der Kristallstruktur mit Bildung vorwiegend kleinerer Kristalle aber eher als positiv zu bewerten, da sich dadurch vermehrte Kontakte mit der Matrix und damit ein vermehrter Abbau des Knochenersatzstoffes ergeben kann [63,64].

Neben den bereits erwähnten Forschungsergebnissen hinsichtlich strontiumhaltiger Knochenersatzstoffe gibt es auch bereits erste Ergebnisse zu dieser neuen Art von Knochenersatzstoffen. *Kruppke et al. (2020)* führte hierzu neben werkstoffwissenschaftlichen Betrachtungen mehrere Experimente mit Osteoblasten/Osteoklasten-Co-Kulturen aus differenzierten MSC und zusätzlich Tierversuche an einem Rattenmodell mit osteoporotischen Knochen und einer Fraktur mit kritischem Knochendefekt durch. Hier konnte gezeigt werden, dass Knochenersatzstoffe mit Anteilen von Strontium und Calcium sowohl *in vivo*, als auch *in vitro* dieselben positiven

Effekte auf die Differenzierung von Osteoblasten und Osteoklasten zeigen und sich ein Vorteil für die Produktion neuer Knochenmatrix zeigte [63]. Daraus wurde geschlussfolgert, dass die biodegradierbaren Knochenersatzstoffe aus PPGCS+S in Zukunft gegebenenfalls ein vielversprechender Ansatz für Patienten mit großen ossären Defekten oder Osteoporose sein können.

#### 1.5. Biokompatibilität und Zytokompatibilität: Apoptose und Nekrose

Neuartige biomedizinische Werkstoffe wie beispielsweise Knochenersatzmaterialien unterliegen wie alle Medikamente oder Medizinprodukte der Pflicht zur Untersuchung ihrer Wirkungen und potentiellen Nebenwirkungen. Hierzu gehört im ersten Schritt vor allem die Gewährleistung der Sicherheit dieser Stoffe, sowie die Testung ihrer grundlegenden Eigenschaften und Wirkung [89]. Die Ergebnisse dieser Tests sollen auf verschiedenen Wegen die Biokompatibilität der geprüften Stoffe aufzeigen und damit die Sicherheit der Stoffe beweisen. Prinzipiell geschieht die primäre Testung neuartiger Implantate oder neuartiger Werkstoffe, die gegebenenfalls einmal Implantate werden sollen, immer *in vitro*, bevor *in vivo* Versuche an Tiermodellen und später gegebenenfalls auch an Patienten durchgeführt werden [47,50,129]. Da die oben bereits erwähnten Knochenersatzmaterialien noch in der Erprobung sind und weitere Daten hinsichtlich der Biokompatibilität benötigt werden, erfolgt die Testung weiterhin mit *in vitro* Versuchen, außerhalb lebender Organismen, lediglich in Zellkulturen, wie auch die Literatur dies für die frühen Phasen der Erprobung neuer Implantate empfiehlt [105].

Tests für die Biokompatibilität von Knochenersatzstoffen beruhen zumeist auf der Messung von Surrogatparametern und lichtmikroskopischen Beobachtungen der Interaktion der Zellen mit den zu testenden Materialien. Da die Testung der Biokompatibilität ein komplexes Feld der Forschung darstellt und auch eine Biokompatibilität durch *in vitro* Versuche nie ganz sichergestellt werden kann, müssen Surrogatparameter, also Parameter als Ersatz für einen gesamten Organismus, betrachtet werden. Zu beachten ist hier jedoch, dass derartige Parameter immer nur eine Aussagekraft zum getesteten Parameter haben, nie aber für einen ganzen Organismus sprechen können, sodass sie nur zur Betrachtung in einzelnen Experimenten herangezogen werden können. Dadurch ergibt sich, dass mehrere Parameter getestet werden müssen, um ein Gesamtbild erhalten zu können. Zudem ist bei der Testung der Knochenersatzstoffe die Biokompatibilität nur ein, wenn auch wichtiger Parameter zur Bewertung der Osseointegration der Knochenersatzstoffe. Zusätzlich gehören hierzu noch die Bioaktivität des untersuchten Biomaterials sowie die Osteokonduktivität, also die Möglichkeit neue Knochenmatrix zu schaffen [89]. Als Surrogatparameter der

Untersuchung der Biokompatibilität neuartiger Knochenersatzstoffe bieten sich beispielsweise Experimente zur Messung der Apoptose und Nekrose von Zellen in Verbindung mit den zu untersuchenden Werkstoffen an [47]. Hierbei kann auch von der Untersuchung der Zytotoxizität der Werkstoffe gesprochen werden, da es sich um Untersuchungen des Zellularuntergangs nach Kontakt der Zellen mit dem zu untersuchenden Stoff handelt [50]. Die Untersuchungen hinsichtlich der Zytotoxizität haben aufgrund der daraus resultierenden Möglichkeit der Implantatlockerung oder des Implantatversagens einen hohen Stellenwert, da es durch erhöhte Zytotoxizität und damit einhergehender Apoptose oder Nekrose, unter Umständen auch zur sekundären Nekrose durch die Minderversorgung der umgebenden Strukturen mit Nährstoffen oder andere physikalische Reize, beispielsweise eine Druckbelastung, kommen kann. Hieraus könnten dann wiederum weitere Knochendefekte entstehen [43,50]. Um diese Nebenwirkungen frühzeitig auszuschließen, sind Tests zur chemischen Reaktivität hinsichtlich einer Zytotoxizität unausweichlich, um die damit einhergehende erhaltene Funktionalität der Implantate zu sichern [50].

Zur Messung der Zytotoxizität des zu testenden Werkstoffes eignen sich Untersuchungen, welche die Integrität der Zelle oder ihre Funktion überprüfen [31]. Der Zelltod kann durch zwei verschiedene Arten auftreten, welche sich sowohl mikroskopisch, als auch biochemisch unterscheiden lassen [43,82]. Einerseits ist der apoptotische Zellularuntergang zu nennen, welcher auch als programmierter Zelltod bezeichnet wird und abhängig von Adenosintriphosphat (ATP), also Energie innerhalb der Zelle, ist [65,90]. Andererseits verläuft die Nekrose hingegen energieunabhängig und ist Ausdruck eines akuten, nicht mehr umkehrbaren Zellschadens [82]. Hier ist außerdem zu erwähnen, dass es durch eine bereits begonnene Apoptose zu einer sekundären Nekrose kommen kann, wenn der Zugang zu Energie oder Sauerstoff eingeschränkt wird [65]. Die Untersuchung dieser beiden Arten des Zellularuntergangs kann zum einen durch spezifische biochemische Tests durchgeführt werden, welche beispielsweise die Integrität der Zellmembran oder eine enzymatische Reaktion untersuchen, und zum anderen durch lichtmikroskopische Beobachtungen [47,82]. Hierbei sind signifikante Unterschiede der beiden Arten des Zelltodes nachzuweisen, da es die erwähnten biochemischen Unterschiede während des Zellularuntergangs gibt.

Die Apoptose wurde bereits mehrfach beschrieben und zeichnet sich biochemisch durch die enzymatische Fragmentation aller Zellorganellen, bis auf Ribosomen und Mitochondrien, und damit auch der Desoxyribonucleinsäure (DNA) aus, wodurch einzelne DNA-Doppelstränge aufgewunden auf Histonen entstehen [31]. Das Zytoplasma wird kondensiert, die Zellmembran bleibt zunächst intakt, es bilden sich im

Verlauf sogenannte Apoptosekörperchen. Die Apoptosekörperchen, auch Apoptosevesikel genannt, werden dann wie Vesikel an die Umgebung abgegeben, bis sich die Zelle vollständig aufgelöst hat. Die abgegebenen Vesikel mit Zellkondensat werden durch Makrophagen aufgenommen und vollständig verwertet. Einen weiterführenden Überblick über die Mechanismen der Apoptose bietet die Arbeit von *Duvall et al.* in *Immunology today* 1986 [34]. Dieser Vorgang ist lichtmikroskopisch zu beobachten, dabei sind die Anzeichen einer Apoptose vielfältig und reichen von klarem Zytoplasma, über einen deutlich kondensierten Nucleus bis zur Beobachtung von apoptotischen Vesikeln [82].

Die Nekrose unterscheidet sich durch einen im Vergleich hierzu deutlich ungeordneteren Untergang von Zellen, welcher zunächst mikroskopisch zu betrachten ist, als beginnende Volumenzunahme der Zelle und gleichzeitig Schwellung von Zellorganellen, bevor es zur Desintegration der Zellmembran ohne Bildung von Vesikeln kommt und jeglicher Zellinhalt in die Umgebung freigesetzt wird. Hier sind im speziellen doppelsträngige DNA aus dem Nucleus, aber auch Ribosomen, Ionen und andere Metaboliten zu nennen, welche normalerweise nur innerhalb der Zellen zu finden sind [31,65].

Hieraus ergeben sich unterschiedlichste Untersuchungsmethoden hinsichtlich der quantitativen Unterscheidung von apoptotisch und nekrotisch untergegangenen Zellen. Eine der am längsten verwendeten quantitativen Methoden betrifft hierbei die Untersuchung der Integrität der Zellmembran, beispielsweise das von *Spangberg et al.* 1973 beschriebene Modell, welches die Freisetzung von radioaktivem Chrom-51 aus Zellen durch eine permeable Membran misst [47,106]. Neuere Methoden untersuchen jedoch vor allem die verschiedenen Metabolite der unterschiedlichen Arten der Zelluntergänge, beziehungsweise ähnliche oder gleiche Metabolite in verschiedenen Kompartimenten. Dies beruht darauf, dass es im Vergleich zur Apoptose, wo die Metabolite weiterhin in apoptotischen Vesikeln vorhanden bleiben, bei der Nekrose zur Freisetzung der Metabolite in die Umgebung kommt. Die Zellmembran ist im Verlauf der Nekrose nicht mehr intakt und somit werden Metabolite und auch Zellorganellen in die Umgebung freigesetzt. Hierzu zählt beispielsweise der Nachweis von DNA und Histonen im Testmedium durch Anti-Histon-Antikörper und Anti-DNA-Antikörper in einem *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) [15]. Die Differenzierung von Nekrose und Apoptose wird hier mittels eines zusätzlichen Waschganges untersucht, welcher die Membran von Apoptosevesikeln auflöst und damit die Stellen für die Reaktion der Antikörper erst freilegt. Dies funktioniert, da es in beiden Fällen des Zelluntergangs zu

einer DNA-Zersetzung und zur Fragmentation des Zellkerns kommt, wodurch DNA und Histonkörper zur Bindung an die benannten Antikörper frei werden [31].

Um Apoptose und Nekrose jedoch sicher voneinander zu unterscheiden, werden zumeist Tests genutzt, welche entweder den einen oder den anderen Weg des Zelluntergangs nachweisen. Zur alleinigen Betrachtung der Nekrose ist daher ein Test auf die Freisetzung von Laktat-Dehydrogenase (LDH), als extrazellulären Nachweis intrazellulärer Bestandteile möglich. Um die Apoptose der Zellen zu untersuchen, kann die Bindung von Annexin V untersucht werden, als Externalisierung von Phosphatidylserin im Laufe des Zelluntergangs [31]. Zur Untersuchung des Zelluntergangs gibt es viele Methoden, welche jedoch nicht Hauptbestandteil dieser Arbeit sind und deshalb hier lediglich auf eine Übersichtsarbeit von *Cummings et al. (2021)* verwiesen sein soll [31].

## **2. Ziele der aktuellen Studie**

Durch die zu erwartende zunehmende Zahl an Osteoporose-Erkrankten und die damit einhergehende steigende sozioökonomische Bedeutung müssen weitere Therapieoptionen für eine Behandlung der Osteoporose erforscht und geschaffen werden. Als vielversprechende Therapien zeigten sich in Vorstudien bereits einige Knochenersatzstoffe und auch die Applikation von BDNF, da es damit zu einer Anregung des erkrankten Knochens zur Bildung neuer Knochenstrukturen kommt. Zu den wahrscheinlich geeigneten Knochenersatzstoffen, die durch ihre Einbringung in den Knochen die dortige Strontiumkonzentration verändern und damit auch die Knochenbildung positiv beeinflussen können, zählt das hier untersuchte PPGC+S. Ein positiver Einfluss auf die Knochenbildung und Regeneration von Knochenstruktur wurde für BDNF schon mehrfach nachgewiesen, dennoch sind Untersuchungen von Knochenersatzmaterialien in Verbindung mit BDNF-Zusätzen weiterhin Teil der Forschung, um Hintergründe und die Effekte beider vielversprechender Therapieansätze tiefer zu ergründen.

Das Hauptziel dieser Studie ist daher, darzustellen, wieviel Apoptose und Nekrose durch die verwendeten Knochenersatzstoffe ausgelöst werden. Hierbei soll vor allem die Frage beantwortet werden, welcher Knochenersatzstoff am meisten oder besonders wenig Nekrose und Apoptose auslöst. Als zweites Hauptziel soll ergründet werden, ob Apoptose und Nekrose durch die Zugabe von BDNF beeinflussen werden. Zudem ist es Ziel dieser Studie, zu beobachten, an welchem Zeitpunkt besonders viel Apoptose und Nekrose besteht, wie sie sich im zeitlichen Verlauf darstellen und durch BDNF beeinflusst werden. Diese Fragestellungen werden an Zellkulturen von MSC von osteoporotischen und knochengesunden Spenderinnen untersucht, um festzustellen, ob sich dabei Unterschiede in der Häufigkeit der Apoptose und Nekrose darstellen. Weiterhin ist es auch Ziel, zu prüfen, ob zwischen diesen beiden Gruppen Unterschiede hinsichtlich der Beeinflussung durch andere Faktoren wie der BDNF-Zugabe bestehen.

Zur Untersuchung dieser Fragestellungen wurden die Stoffe PPGC+S 5:5, PPGC+S 3:7 und PPGS 0:10 in einem 7 Tage dauernden Zellkulturversuch mit MSC osteoporotischer und knochengesunder Spenderinnen kultiviert. Die Nekrose und Apoptose wurde durch ein vorgefertigtes ELISA-Kit (Cell Death Detection ELISA plus) an verschiedenen Zeitpunkten gemessen. Die Probekörper aus PPGC+S unterscheiden sich durch das Verhältnis der jeweils zugegebenen Ionenlösung Calcium oder Strontium zur Gelatinelösung vor der Fällungsreaktion der Calcium- und Strontiumphosphatkristalle (PPGC+S x: y).

Zusätzlich zu den Nativversuchen mit den Knochenersatzstoffen wurden Versuche mit Zugabe von BDNF mit einer Konzentration von 40 ng/ml zum verwendeten Zellkulturmedium durchgeführt. Auch für diese Gruppe wurde der ELISA an den Versuchstagen eins, vier und sieben durchgeführt. Wie in den Nativversuchen soll hiermit der zeitliche Verlauf des nekrotischen Zelluntergangs bewertet und an Tag sieben zusätzlich die Apoptose der Zellen untersucht werden.

Durch weitere Untersuchungen im Rahmen anderer Studien soll letztendlich in Zusammenschau aller Daten dieser Knochenersatzstoffe herausgefunden werden, welcher Knochenersatzstoff sich im Rahmen einer Osteoporosebehandlung als besonders geeignet erweist. Die Daten dieser Studie sollen hierbei insbesondere als Sicherheitsdaten interpretiert werden können. Hieraus sollen dann unter Umständen Anschlussuntersuchungen beispielsweise an Tiermodellen und auch weitere *in vitro* Untersuchungen evaluiert werden.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Materialien

##### 3.1.1. Geräte

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
Sterilwerkbank	Thermo Scientific Safe 2020; Thermo Fischer Scientific Incorporated (Inc.), Schwerte, Deutschland (D) Heraeus HERASafe; Heraeus, Kendro Laboratory Products, Hanau, D
Brutschrank	Thermo Scientific HERAcell 150/ 150i; Thermo Fischer Scientific Inc., Schwerte, D Heraeus HERAcell; Heraeus, Kendro Laboratory Products, Hanau, D
Zentrifugen	Hettich Rotina 380R; Andreas Hettich GmbH & co. KG, Tuttlingen, D
Pipetten	Gilson Pipetman; Gilson, Middleton, Vereinigte Staaten von Amerika (USA)
Dispenser	HIRSCHMANN Ceramus 2-10 ml; Hirschmann Laborgeräte Gesellschaft mit beschränkter Haftung & Compagnie Kommanditgesellschaft (GmbH & Co. KG), Eberstadt, D
Saugpipette	HIRSCHMANN Pipettus; Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, D
Multipipette	Eppendorf Multipipette 4780; Eppendorf Aktiengesellschaft (AG), Hamburg, D
Cell-Counter	Innovatis CASY, Schärfe-System GmbH, Reutlingen, D
Vortexer	Heidolph REAX 2000; Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, D
Laborwaage	Sartorius BC 100; Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG, Göttingen, D
Wasserbad	Grant PB 1; Grant Instruments Ltd., Shepreth, Vereinigtes Königreich (UK)
Mikroskop	Zeiss Axiovert 10; Carl Zeiss AG, Oberkochen, D Allied Stingray; Allied Vision, Stadtroda, D
Mikroskopkamera	TILL Photonics Oligochrome; TILL Photonics, Kaufbeuren, D
Microplate-Reader	BioTek Synergy BT; BioTek Germany, Bad Friedrichshall, D

Autoklav	H+P Varioklav; HP Labortechnik Gesellschaft mit beschränkter Haftung (GmbH), Oberschleißheim, D
Gefriertrockner	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH; Osterode am Harz, D

### 3.1.2. Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Zellkulturplatten (24 well)	Falcon®, Corning Incorporated Life Science, Tewksbury, USA
Zellkulturflaschen (75 cm <sup>2</sup> ; 175 cm <sup>2</sup> )	Sarstedt AG, Nümbrecht, D
Polypropylentubes (15 ml; 50 ml)	Sarstedt AG, Nümbrecht, D/ Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Cryotubes	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Mikroreaktionsgefäß (1,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Pipettenspitzen (0,1-20 µl; 2-200 µl; 100-1000 µl)	Diamond TIPACK (DL10ST; D200ST; D1000ST) Gilson, Middleton, USA
Serologische Pipette (5 ml; 10 ml; 25 ml; 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D

### 3.1.3. Zellkulturmedien, Lösungen und Puffer

	Zusammensetzung
<b>Anzuchtmedium</b>	20 % <i>Fetal Bovine Serum</i> (FBS) ES (PAN Biotech, Aidenbach, D)
<b>MesenPRO RS</b>	10 µg/ml Gentamicin/ 0.25 µg/ml Amphotericin B (Life Technologies; Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA; 500x)
	1 mM GlutaMAX (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA; 100x)
	500 ml MesenPRO RS Basal Medium (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
	10 ml MesenPRO RS Growth Supplement (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA; 50x)

<b>Versuchsmedium</b>	5 % FBS ES (PAN Biotech; Aidenbach, D)
<b><i>Dulbecco's Modified Eagle Medium low glucose</i></b>	10 µg/ ml Gentamicin/ 0.25 µg/ml Amphotericin B (Life technologies; Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA; 500x)
	1 mM GlutaMAX (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA; 100x)
	500 ml ad DMEM low glu (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
<b>Einfriermedium</b>	90 % FBS (PAN Biotech; Aidenbach, D)
	10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma-Aldrich; St. Louis, USA)
<b>Camptothecin-Lösung</b>	100 mM Camptothecin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), gelöst in 1 M Natronlauge (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
<b>Trypsin-Lösung</b>	0,05 % Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
<b>PBS-Puffer</b>	100 ml 10x <i>Phosphate Buffered Saline</i> (PBS) in 900 ml Aqua bidest.

#### 3.1.4. Präparationssysteme (Kits)

<b>Produkt</b>	<b>Produktionsfirma</b>
Cell Death Detection ELISA <sup>PLUS</sup>	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D

#### 3.1.5. Software

<b>Software</b>	<b>Software-Entwickler</b>
Microplate-Reader: <b>ELISA-Reader</b>	BioTek Instruments, Winooski, Vermont, USA
Mikroskopische Bildaufnahme: <b>Life Aquisition</b>	FEI Munich GmbH, München
Statistik-Programm: <b>SPSS V. 24</b>	IBM Corporate, New York, USA
Bildbearbeitungsprogramme: <b>Fiji ImageJ</b>	National Institute of Health, USA
<b>Adobe Photoshop CS6</b>	Adobe Incorporate, San José, USA

## 3.2. Methoden

### 3.2.1. Herstellung der Probekörper

Die Herstellung der Knochenersatzstoffprobekörper (s. Abbildung 1) erfolgte in Handarbeit im Max Bergmann Zentrum für Biomaterialien der Technischen Universität Dresden nach deren Protokoll. Da die Herstellung durch Sedimentation erfolgte und dies nur eine von drei verschiedenen Möglichkeiten zur Herstellung des Knochenersatzstoffes ist, wurde zur Verdeutlichung in einigen Fällen die römische Ziffer III den Bezeichnungen der Probekörper angefügt [61]. Dabei unterscheiden sich die in dieser Untersuchung als PPGC+S und die PPGC+S<sup>III</sup> Probekörper nicht in der Herstellung und auch nicht in der Zusammensetzung, für das Schriftbild wurde lediglich für die bessere Lesbarkeit der Index für die Fertigung weggelassen. Der erste Arbeitsschritt zur Herstellung der Phosphat-prästrukturierten Gelatineprobekörper mit Calcium- und Strontiumphosphaten war die Vorstrukturierung der Gelatine. Dazu wurde zunächst eine Gelatinesuspension aus 15 g Gelatine und 250 ml Wasser hergestellt. Nach 10-minütigem Vorquellen der Gelatine in Wasser wurde die Lösung auf 50 °C in einem Zeitraum von mindestens 30 Minuten (min) erwärmt. Anschließend wurden 1,4167 Liter einer Lösung mit einem Phosphatanteil von 0,106 Mol Dinatriumhydrogenphosphat vorbereitet, in dem 21,32 g Dinatriumhydrogenphosphat in Wasser gelöst wurden. Dann wurde die bereits hergestellte Gelatine-Suspension langsam zur Dinatriumhydrogenphosphatlösung gegeben und danach mittels 3 Molarer (M) Salzsäure auf einen pH-Wert von 7 eingestellt. Nach Abschluss dieser Arbeitsschritte erfolgte die Vorstrukturierung der Gelatine-Suspension über Nacht im Kühlraum bei 4-8 °C.

Am nächsten Tag wurde zunächst die Gelatine-Suspension im Wasserbad auf 30 °C über zwei Stunden erhitzt und danach für 1 Stunde (h) bei 300 Umdrehungen pro Minute (rpm) auf einer Rührplatte gerührt. Parallel hierzu wurden die drei Mineralisationslösungen für die Fällungsreaktion hergestellt. Für jede der Lösungen wurden die entsprechenden Anteile von Calcium- und Strontiumchlorid in 250 ml Wasser bei Raumtemperatur auf einer Rührplatte mit 300 rpm gelöst. Bei PPGC+S 5:5 waren es 18,38 g Calciumchlorid und 33,33 g Strontiumchlorid, dabei ergaben sich jeweils Lösungen von Calcium und Strontium mit einer Konzentration von 0,5 M. Für das PPGC+S 3:7 waren es 11,03 g Calciumchlorid und 46,66 g Strontiumchlorid, hieraus ergaben sich eine 0,3 M Calciumlösung und eine 0,7 M Strontiumlösung. Im Falle des PPGS 0:10 wurde nur 66,65 g Strontiumchlorid in 250 ml Wasser gelöst, woraus sich eine 1 M Lösung ergab. Anschließend erfolgte die Zugabe der Mineralisationslösungen zu der vorher in drei Teile gesplitteten Phosphat-prästrukturierten Gelatinelösung mittels

einer Peristaltikpumpe eingestellt auf eine Laufrate von 2,5 ml/min. Parallel hierzu erfolgte immer das Rühren der Phosphat-prästrukturierten Gelatinelösung auf einer Rührplatte eingestellt auf 300 rpm. Nach der Infusion der Mineralisationslösungen erfolgte weiterhin über drei Stunden das Rühren der Lösungen mit 300 rpm, wobei sich immer mehr Calcium- und Strontiumphosphat sedimentierte, sodass hiernach die überstehende Flüssigkeit mittels Zentrifugation (3000 Relative Zentrifugalbeschleunigung (rcf)/ 5 min/ 20 °C) abgeschieden wurde. Danach erfolgte die Lagerung der Paste über Nacht wieder im Kühlraum.

Am 3. Versuchstag wurde zunächst die Vernetzungslösung aus Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) in 100 mM Konzentration und N-Hydroxysuccinimide (NHS) in 50 mM Konzentration gelöst in 25 ml Wasser auf Eis hergestellt und 50 ml eines 0,5 M HEPES-Puffers, dessen pH-Wert mit einer 1 M Natriumhydroxidlösung auf 8 eingestellt wurde. Anschließend wurde die Mineralpaste im HEPES-Puffer resuspendiert und im Anschluss daran erfolgte die Vernetzung der Mineralpaste mittels der EDC / NHS-Lösung. Der nächste Arbeitsschritt war die so entstandene Lösung in 48-well-Platten mit 96-well-Probekörperereinsätzen zu pipettieren und danach die well-Platten mittels Klebefolie und Parafilm zu verschließen. Die 96-well-Probekörperereinsätze dienen hierbei zur Reduktion der Probekörper auf den Durchmesser von 96-well-Platten, mit dem Vorteil der besseren Entfernbarkeit der Probekörper aus den 48-well-Platten. Daraufhin wurden die Probekörper durch Zentrifugation (1900 rcf/ 15 min/ 20°C/Be-/ Entschleunigen je 1 min) abschließend verdichtet, worauf die Probekörper über Nacht wieder im Kühlraum gelagert wurden, bevor die Tiefkühlung (-80°C) und die abschließende Lyophilisation im Gefriertrockner von Christ zur Haupt- und Nachtrocknung mit Programm 13: Christ\_StaBK erfolgte. Zuletzt wurden die Probekörper in well-Platten zum Transport transferiert und anschließend noch durch Gamma-Strahlung (25 kGy) sterilisiert.

Herstellen der Gelatine-Lösung



Zugabe von Gelatine-Lösung zur Phosphatlösung; gleichzeitige Herstellung der Kationenlösung



Prästrukturierung der Gelatine-Lösung über Nacht im Kühlschrank



Zugabe der Kationenlösungen zur phosphat-prästrukturierten Gelatine-Lösung



Zentrifugation zum Verwerfen der nicht mineralisierten Gelatine



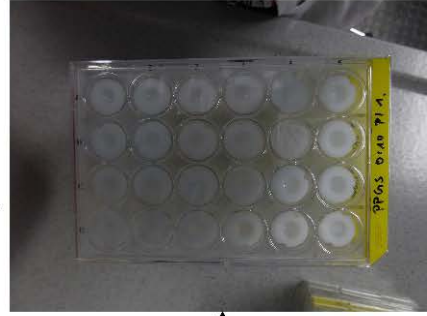
Resuspension der mineralisierten Gelatine-masse in HEPES-Puffer



Crosslinking mittels EDC/ NHS



Sedimentation der Probekörper durch erneute Zentrifugation nach Übertragung der Mineralienpaste in WELL-Platten



min. 8 h

Abschließende Lyophilisation und Sterilisation

Abbildung 1: Darstellung der Herstellung der Probekörper der Knochenersatzstoffe

### 3.2.2. Gewinnung von MSC aus Bohrmehl

Die Gewinnung der MSC erfolgte aus knöchernem Bohrmehl, welches während orthopädischen oder unfallchirurgischen Eingriffen gewonnen wurde. Hierbei erfolgte die Entnahme nach dem Protokoll, welches in *Wenisch et al. (2005)* beschrieben wurde [130].

Notwendig zur Entnahme der Proben war eine chirurgische Prozedur mit Eröffnung und Aufbohrung der medullären Knochenhöhle. Dies geschah jeweils mit fachspezifischen Knochenbohrern, vorwiegend der Firma Stryker (Stryker Howmedica Osteonics GmbH, Kiel) [130].

Das Bohrmehl wurde von den Bohrköpfen entfernt und in F12K-Medium mit 20 % fetalem Kälberserum (FBS), 0,05 U/ml Penicillin und 0,05 µg/ml resuspendiert und im Anschluss kultiviert. Die Zellkultivierung erfolgte auch wie in den späteren Versuchen bei 37°C, in 95 % Luftfeuchte und einem Kohlenstoffdioxidgehalt von 5 %. Das Zellkulturmedium wurde alle zwei bis drei Tage gewechselt, immer dann, wenn die Zellen eine Konfluität von 70-80 % erreicht hatten. Hiernach erfolgte zunächst das Lösen der Zellen von den Zellkulturflaschen mittels 0,25 % Trypsinlösung und einer neuen Passagierung in neue Zellkulturflaschen nach einer Verdünnung 1:2 oder 1:3 [130].

Nach entsprechender Passagierung, meistens bis Passage 3 oder 4, erfolgte sodann die Lagerung in der institutseigenen Biobank. Hierzu wurden die Zellen erneut mit 0,25 % Trypsin aus den Zellkulturflaschen gelöst, nachdem sie mittels PBS-Puffer zweimalig gespült wurden. Im Anschluss wurde die Lösung zentrifugiert, der Überstand verworfen, die sedimentierten Zellen rekonstitutioniert und zuletzt in das Lagermedium bestehend aus 900 µl FBS und 100 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) überführt. Hiernach erfolgte zunächst die initiale Kühlung in Isopropanol bei -80°C für 24 h und dann die Überführung in die Stickstofflagerung.

Die Gewinnung der Zellen aus Spendermaterial erfolgte nicht im Rahmen dieser Studie, hier wurde auf bereits gewonnenes und vorhandenes Material in der institutseigenen Gewebebank zurückgegriffen. Der entsprechende Ethikantrag liegt in der Justus-Liebig-Universität Gießen unter dem Aktenzeichen 74/09 im Archiv vor.

### 3.2.3. Spenderinnen der MSC

Als Spenderinnen der MSC dienten zehn weibliche Patientinnen im Alter von 28-88 Jahren. Dabei wurden zwei Gruppen von je fünf Patientinnen gebildet: die eine Gruppe war an Osteoporose erkrankt und die andere Gruppe war hinsichtlich der Osteoporose knochengesund. Die Zellen der Spenderinnen entstammten der institutseigenen

Gewebebank aus intraoperativ, wie in 3.2.2. beschrieben, gewonnenem Bohrmehl nach orthopädischen oder unfallchirurgischen Eingriffen. Aus dieser, bereits seit längerer Zeit bestehenden, Gewebebank und den zusätzlich vorhandenen Informationen wurden zehn weibliche Patientinnen mit relativ vergleichbaren Vorerkrankungen für diese Studie ausgesucht.

In der Versuchsgruppe der Spenderinnen mit osteoporotischen MSC waren die Patientinnen 66-87 Jahre alt, der Median lag bei 76 Jahren, das durchschnittliche Alter betrug 77 Jahre. Von den fünf Patientinnen mit Osteoporose hatten drei Patientinnen keine weiteren Erkrankungen, eine Patientin hatte als Nebenerkrankung eine arterielle Hypertonie und die fünfte Patientin hatte als Nebenerkrankungen eine Gonarthrose, eine Hypothyreose, eine Hyperlipidämie und eine arterielle Hypertonie.

In der Gruppe der Spenderinnen mit knochengesunden MSC lag das Alter bei Entnahme des Gewebes bei 28-88 Jahren, der Altersmedian ist mit 69 Jahren und das durchschnittliche Alter mit 67,4 anzugeben. Analog zur anderen Versuchsgruppe hatten drei Spenderinnen keine weiteren Vorerkrankungen. Eine Patientin hatte als Nebenerkrankung eine Leberzirrhose, eine Coxarthrose, eine Thrombozytopenie, eine Hashimoto-Thyreoditis und eine arterielle Hypertonie. Die fünfte Spenderin hatte eine Gastritis, eine Hyperlipidämie, eine Herzinsuffizienz, eine Coxarthrose, eine Leukencephalopathie und eine arterielle Hypertonie als Nebenbefunde.

Der Stichprobenumfang betrug pro Experiment  $n=10$ . Vergleichsexperimente mit den MSC männlicher Spender wurden nicht durchgeführt.

#### 3.2.4. Herstellung der Zellkulturmedien

Als Zellkulturmedium zur Anzucht der MSC wurde MesenPRO RS genutzt. Dafür wurde vor jeder Anzucht ein Stock an MesenPRO RS hergestellt. Das MesenPRO RS Medium und GlutaMAX wurden im Wasserbad auf 37°C erwärmt, das Supplement des MesenPRO RS Mediums, sowie FBS ES und Gentamycin/ Amphotericin B wurden im Wasserbad zunächst aufgetaut und dann auf 37°C erwärmt. Anschließend wurde zunächst das Supplement dem Medium mit einem Volumen von 500 ml beigefügt, dann erfolgte die Beimengung von 100 ml FBS ES, sodass sich eine Konzentration von 20 % FBS ergab, bevor auch 5 ml GlutaMAX und 1 ml Gentamycin/ Amphotericin B hinzugefügt wurden. Hiernach wurde das Medium gründlich vermengt.

Als Zellkulturmedium für die Versuche mit MSC wurde DMEM low Glu genutzt. Für diese Versuche wurde ein entsprechender Stock für die Experimente hergestellt. Aufgrund dessen, dass immer eine osteoporotische Zellkultur und eine knochengesunde Zellkultur

parallel inkubierten und für die Versuche dreimal ein Medienwechsel geplant waren, wurden 150 ml Stock pro Versuch angesetzt. Dazu wurden zur Grundlösung des DMEM low Glu 7,5 ml FBS ES beigemischt, sowie 300 µl Gentamycin/ Amphotericin B und 1500 µl GlutaMAX.

Die Medien wurden zwischen den Versuchstagen im Kühlschrank (4-8°C) gelagert und maximal 14 Tage genutzt, solange sie keine Anzeichen einer Verunreinigung zeigten.

### 3.2.5. Kultivierung von MSC

Die zuvor durch die oben benannten Arbeitsschritte gewonnenen MSC wurden vor Beginn der Experimente kultiviert, um eine für die Experimente geeignete Menge der MSC zu gewinnen. Die Kultivierung der MSC erfolgte nach dem Auftauen in 250 ml Zellkulturflaschen mit MesenPRO RS Medium, ein Medienwechsel alle drei bis vier Tage, die lichtmikroskopische Kontrolle des Zellwachstums täglich. Die MSC wurden kultiviert bis ein konfluierender Zellrasen vorhanden war.

Überschüssige MSC, welche nicht für weitere Versuche notwendig waren, wurden aus den Zellkulturflaschen gelöst, zunächst über 24 Stunden wieder eingefroren (-80°C), bevor sie für etwaige spätere Experimente wieder in die Stickstofflagerung zurückgeführt wurden. Dafür wurde das überschüssige Medium der Flaschen abgegossen und dann die Zellen mit PBS-Puffer doppelt gespült. Danach erfolgte mit Hilfe von Trypsin die Lösung der Zellen aus den Zellkulturflaschen. Dafür wurde Trypsin auf 37°C erhitzt, 5 ml pro Zellkulturflasche pipettiert und dann für 6 min im Zellkulturschrank inkubiert. Die Reaktion wurde nach 6 min mittels MesenPRO RS Medium gestoppt, und das erhaltene Volumen in ein Zellkulturröhrchen transferiert. Danach erfolgte die Zentrifugation der Zellkulturröhrchen, bei der sich die kultivierten Zellen sedimentierten. Die Resuspension der Zellen erfolgte zum Einfrieren in 900 µl FBS und 100 µl DMSO, zur Verhinderung der Bildung von Eiskristallen und dem Schutz der Zellen. Daraufhin wurden die Zellen zunächst im -80°C Gefrierschrank für 24 h in Isopropanol eingefroren und danach in einen Flüssigstickstoffbehälter zur längeren Lagerung transferiert.

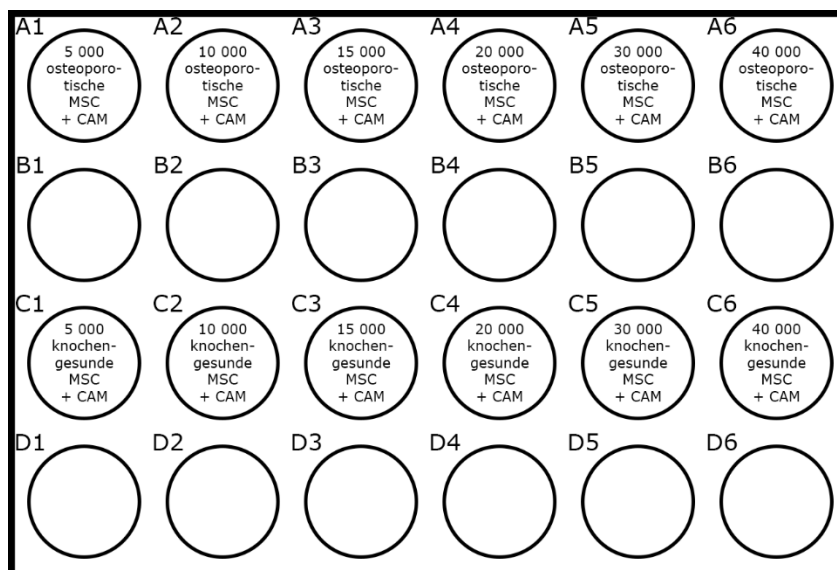
### 3.2.6. Aussaat der MSC

Zur Aussaat der MSC wurde nach der Anzucht der MSC der Zellrasen analog zum Kultivieren mittels Trypsinierung gelöst. Nach dem Lösen wurde die Reaktion mittels MesenPRO RS gestoppt und danach das in der Zellkulturflasche befindliche Medium mit Zellen in ein Zellkulturröhrchen überführt. Danach erfolgte die Zentrifugation, sodass sich die Zellen am Boden des Röhrchens sedimentierten. Im Anschluss wurde das überstehende Volumen verworfen und die Zellen wurden in 1 ml DMEM low Glu-Medium

resuspendiert. Die Analyse der Zellkonzentration erfolgte daraufhin mittels CASY-Cellcounter, wofür 10 µl der Suspension in 10 ml CASY-Tone übertragen wurden. Mittels Dreisatzes wurden dann die benötigten Volumina zur Aussaat der benötigten Zellen berechnet und anschließend durch Pipettieren auf die vorbereiteten *well*-Platten überführt.

### 3.2.7. Etablierung des Nekroseassays und Apoptoseassays

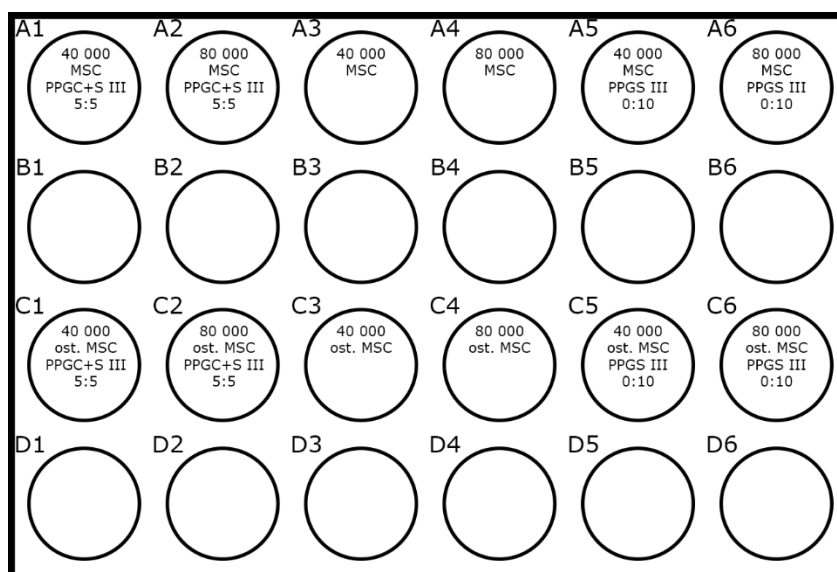
Zur Etablierung des Nekroseassays wurden die Zellen in unterschiedlichen Konzentrationen zunächst auf nativen *well*-Platten mit DMEM low Glu-Medium ausgesät und für 24 Stunden inkubiert. Die dabei genutzten Zellzahlen sind im untenstehenden Schema zu finden. Nach 24 Stunden wurde dem DMEM low Glu-Medium Camptothecin (CAM) hinzugefügt, sodass sich eine Konzentration von 100 µmol ergab. Dies hatte den Sinn, die Nekrose und Apoptose der Zellen zu stimulieren. Nachfolgend wurde die *well*-Platte für weitere drei Tage inkubiert, bevor das Nekroseassay und Apoptoseassay gestartet wurde.



**Abbildung 2: Vorversuche zur Etablierung des Testkits für die Zellkulturen**, Zeile 1 bezeichnet hierbei die verwendeten Zellzahlen, die Zeilen 2-4 geben an, ob MSC von osteoporotischen Spenderinnen oder knochen-gesunden Spenderinnen verwendet wurden und Zeile 5 kennzeichnet die Zugabe von CAM

Zusätzlich zu diesen Experimenten wurde in einem weiteren Etablierungsversuch untersucht, ob die Probekörper überhaupt zu einer Nekrose oder Apoptose führten und ob diese durch das Kit nachweisbar waren. Außerdem sollte durch diesen Vorversuch die Entscheidung fallen, wie groß die Zellkonzentration in den Hauptversuchen sein muss. Dieser Versuch sah vor, dass es neben einer nativen Kontrolle auf Zellkulturplastik zwei Versuchsgruppen gab. Hier wurde einerseits PPGC+S 5:5 verwendet, da in Verbindung mit PPGC+S 5:5 in den bereits publizierten Studien die größte Proliferation

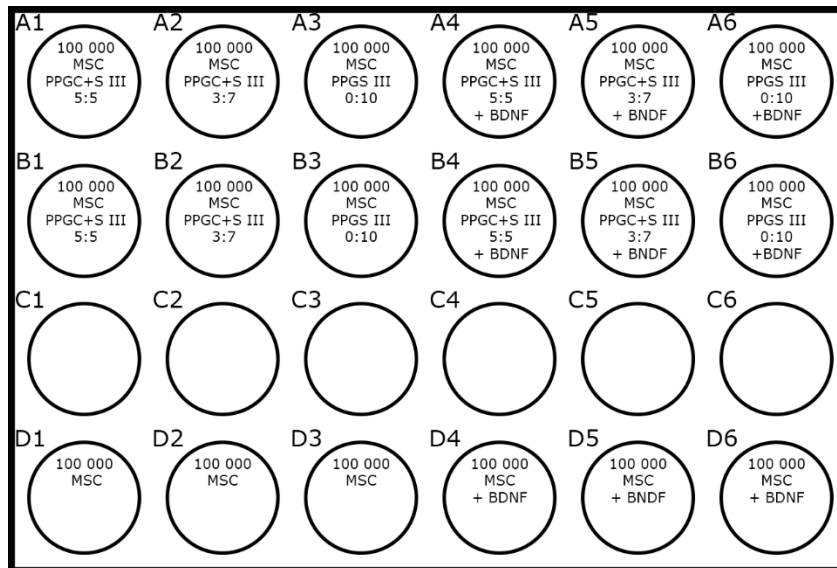
von Zellen stattfand. In der anderen Versuchsgruppe wurde PPGS 0:10 gewählt, da es den Vorstudien zur Folge die geringste Proliferation von Zellen hat und anfänglich zu einem Zelluntergang führt [64]. Die Daten der Proliferation wurden für diese Studie vor Veröffentlichung der Arbeit von *Kruppke et al. (2019)* zur Verfügung gestellt, um möglichst aussagekräftige Daten für die Knochenersatzstoffe hinsichtlich der Auslösung von Apoptose und Nekrose zu erhalten. Für die Vorversuche wurde eine *well*-Platte nach unten abgebildetem Schema mit jeweils 40 000 Zellen oder 80 000 Zellen beimpft und mit den gekennzeichneten Knochenersatzstoffen inkubiert. Anschließend wurde die *well*-Platte vier Tage im Brutschrank inkubiert und dann das Apoptose- und Nekroseassay durchgeführt.



**Abbildung 3: Vorversuch zur Testung der Knochenersatzstoffe**, hierbei zeigt die 1. Zeile jeweils die verwendeten Zellzahlen an, die 2. Zeile gibt an, ob MSC von knochengesunden Spenderinnen oder Spenderinnen mit Osteoporose verwendet wurden und in der 3. und 4. Zeile werden die getesteten Knochenersatzstoffe benannt mit Index für den Fertigungsprozess (röm. III)

### 3.2.8. Vorbereitung der *well*-Platten

Vor Aussaat der Zellen auf den *well*-Platten mussten diese mit den zugehörigen Probekörpern der Knochenersatzstoffe präpariert werden. Dazu wurden die nötigen *well*-Platten nach unten abgebildetem Schema mit den Probekörpern bestückt und die Probekörper vor Zugabe des endgültigen Zellkulturmediums dreimal mit PBS-Puffer in kurzen Zeitabständen gespült. Nachfolgend wurden die *well*-Platten mit dem DMEM low Glu-Medium versehen und zuletzt bei den nötigen *wells* das entsprechende Volumen BDNF zugegeben, sodass eine Zielkonzentration von 40 ng/ml entstand. Letztlich erfolgte die Überführung der Zellen durch Pipettieren der nötigen Volumina wie bereits oben beschrieben.



**Abbildung 4: Versuchsaufbau zur Untersuchung von Nekrose an den einzelnen Knochenersatzstoffen mit und ohne BDNF, auch hier gibt die 1. Zeile die Anzahl an primär ausgesäten Zellen an, die 2. Zeile gibt an, das MSC verwendet wurden, die 3.-4. Zeilen geben im Falle eines verwendeten Knochenersatzstoffes den Typ mit Index für die Fertigungsmethode (röm. III) an, Die letzte Zeile (3. oder 5.) gibt die zusätzliche Verwendung von BDNF an. In wells ohne Typenbezeichnung des Knochenersatzstoffes erfolgte die Kontrolltestung, osteoporotische und knochengesunde MSC wurden jeweils auf separaten well-Platten ausgesät**

### 3.2.9. Versuch zur Messung der Nekrose- und Apoptosewerte

Nach der Etablierung des Assays für alle genutzten Zellkulturen und dem Nachweis, dass das Test-KIT auch mit den Probekörpern ohne Interaktionen genutzt werden kann, fiel die Entscheidung zur Aussaat von je 100 000 Zellen pro well in den Versuchen. Die Zellen wurden auf die nach oben beschriebenen Schema vorbereiteten well-Platten nach dem oben beschriebenen Verfahren ausgebracht. Daraufhin wurde die Vitalität der Zellen sofort lichtmikroskopisch geprüft und dann erfolgte die Inkubation der Versuchsplatten im Brutschrank bei einem Kohlenstoffdioxidgehalt von 5 % und 37°C Umgebungstemperatur. Die Messung der Nekrose erfolgte am ersten, vierten und siebten Versuchstag. Zu diesen Zeitpunkten wurde auch immer ein Medienwechsel durchgeführt. Das Medium ohne BDNF wurde schon vor Beginn der Versuche im nötigen Volumen für alle drei Medienwechsel hergestellt, nur das BDNF wurde an jedem Versuchstag frisch zum schon vorbereiteten Medium hinzugegeben. Zusätzlich erfolgte vor jedem Medienwechsel die lichtmikroskopische Dokumentation der Versuche. Die Messung der Apoptose erfolgte aufgrund des experimentellen Verfahrens und der Notwendigkeit der Zugabe eines Lysepuffers für diese Analyse lediglich am siebten Tag.

### 3.2.10. Durchführung des Nekrose- und Apoptoseassays

In Vorbereitung auf die Assays wurde jeden Versuchstag das Immunreagenz neu angesetzt. Dafür wurden je Versuch 72 µl Inkubationspuffer mit 4 µl Anti-Histon-Biotin und 4 µl Anti-DNA-Peroxidase (POD) vermischt. Außerdem musste in 5 ml destilliertem Wasser die 2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS)-Tablette gelöst werden und danach unter Lichtschutz bis zum Ende des Versuchs gelagert werden. Ein eventueller Bodensatz oder eine eventuelle Trübung der ABTS-Stopp-Lösung wurde durch Erhitzen auf 37°C und schütteln aufgelöst.

Zur Durchführung des Nekroseassays wurde nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 200 rcf aus allen *wells* das überstehende Medium entweder beim Medienwechsel oder nach Ende der Versuche abpipettiert und in vorbereitete Mikroreaktionsgefäße transferiert. Zur Durchführung des Apoptoseassays wurden dann auf die Probekörper bzw. in den Etablierungsversuchen in die nativen *wells* 600 µl Lyse-Puffer aus dem zur Verfügung stehenden Kit hinzugefügt. Die *well*-Platte mit Lyse-Puffer musste dann für 30 min bei Raumtemperatur inkubieren, bevor sie erneut für 10 min bei 200 rcf zentrifugiert wurde. Danach wurde auch hier der überstehende Lyse-Puffer entfernt und in ein vorbereitetes Mikroreaktionsgefäß übertragen. Anschließend wurde mit dem ELISA-Test fortgefahren. Entstanden bis dahin Wartezeiten, so wurden die Lösungen bei 2-8°C gelagert.

Für den ELISA-Test wurde eine 96-*well*-Microplate mit der entsprechenden Anzahl an *wells* vorbereitet, in die jeweils die 80 µl Immunreagenz vorgelegt wurden. Dann erfolgte das Hinzufügen von je 20 µl Testreagenz. Dies war im Falle eines Nekroseassays das überstehende Zellkulturmedium, im Falle des Apoptoseassays der überstehende Lyse-Puffer. Hiernach wurde die 96-*well*-Microplate mittels einer Klebefolie abgedeckt und dann für zwei Stunden auf einer Schüttelplatte bei 300 rpm inkubiert. Zusätzlich zu den Tests wurde immer ein *well* mit einer, vom Hersteller des Kits Roche Diagnostics GmbH vorgegebenen, positiven Kontrolle und mit einem *Blank* befüllt. Nach der zweistündigen Inkubation erfolgte dann das Spülen der 96-*well*-Microplate. Dabei wurden die Lösungen aus Lysepuffer oder Zellkulturmedium zunächst durch Absaugen aus der 96-*well*-Microplate entfernt. Im Anschluss wurde jeweils 3x mit 250-300 µl Inkubationspuffer aus dem Kit gespült, welcher am Ende auch wieder entfernt wurde. Danach erfolgte die Zugabe von 100 µl ABTS-Lösung in jedes *well*, wonach die Platte erneut bis zum Eintreten der Farbreaktion bei 250 rpm auf einer Schüttelplatte inkubiert wurde. Der Hersteller gab hierfür einen Zeitraum von 10 bis 20 min an, in diesen Experimenten wurde die Zeit durch die Voruntersuchungen auf 12 min festgelegt. Anschließend wird in

jedes *well* 100 µl ABTS-Stopp-Lösung hinzu pipettiert, um die Farbreaktion zu beenden. Daraufhin erfolgte die Messung der 96-*well*-Microplate im Spektroskop, nach den Vorgaben des Herstellers. Um die Absorption der einzelnen Versuche zu messen, wurde zunächst jedes *well* bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen und dann erfolgte eine zweite Messung bei 490 nm. Ergebnis war der berechnete Absorptionswert, errechnet aus dem 490 nm-Wert subtrahiert vom 405 nm-Wert:

$$\text{Absorption} = A(405 \text{ nm}) - A(490 \text{ nm})$$

Diese Absorptionsmesswerte sind in der statistischen Auswertung als absolute Werte benannt, der Hersteller empfiehlt jedoch die Verwendung eines sogenannten *Enrichment Factors*, welcher eine Anreicherung und damit ein Verhältnis des Zelltodes der Versuchsgruppe zur Kontrollgruppe darstellt.

$$\text{Enrichment Factor} = \frac{\text{Absorption der Versuchsgruppe}}{\text{Absorption der Kontrollgruppe}}$$

Der *Enrichment Factor* ist daher dimensionslos. Ein *Enrichment Factor* über 1 bedeutet einen vermehrten Zelltod. Ein *Enrichment Factor* kleiner oder gleich 1 ist gleichbedeutend mit einem gleichgroßen oder geringeren Zelltod. In jedem Versuch wurden die Zellen als Kontrollgruppe mitgeführt, welche keine Intervention erhielten, also keinem Knochenersatzstoff und auch nicht der Zugabe von BDNF ausgesetzt waren.

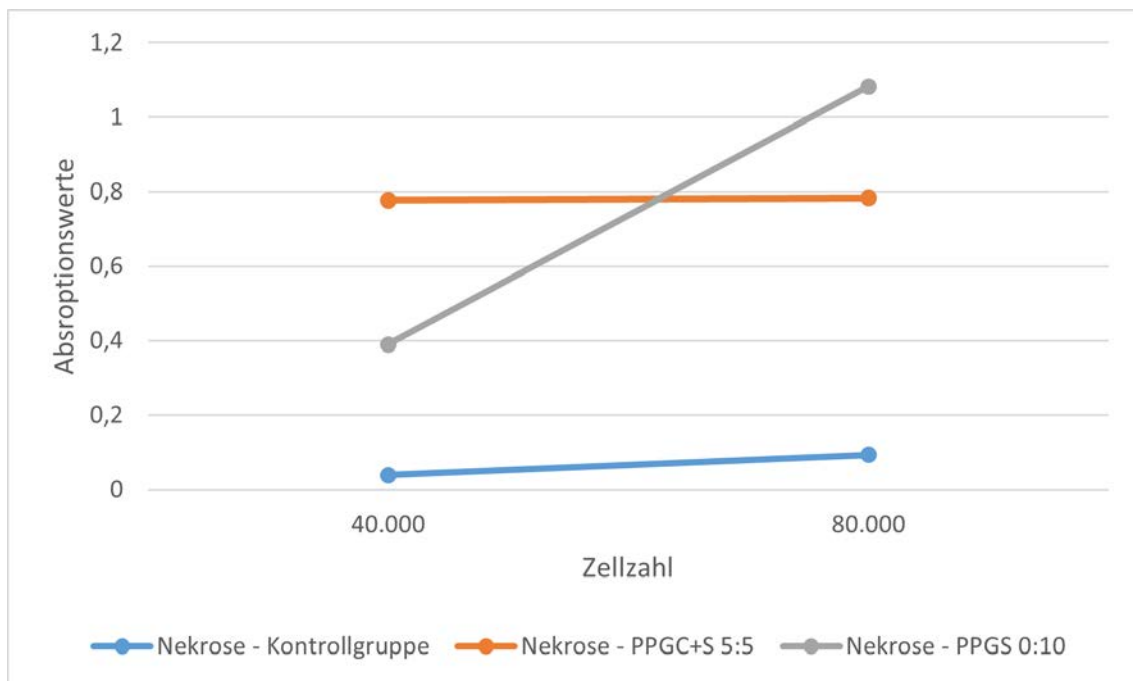
### 3.2.11. Statistische Auswertung

Die statistische Analyse der Messwerte erfolgte mit SPSS (IBM, Version 24). Dabei wurde zunächst die Normalverteilung der Messwerte mittels des Kolmogorov-Smirnov-Tests geprüft. War eine Normalverteilung vorhanden, so wurde mittels T-Test und anschließender Bonferroni-Holm Korrektur die statistische Signifikanz der Ergebnisse untersucht. War keine Normalverteilung gegeben, so erfolgte die Analyse zum Vergleich der osteoporotischen und knochengesunden Versuchsgruppen aufgeteilt auf die Unterbedingungen der verwendeten Knochenersatzmaterialien und des verwendeten BDNF mittels Mann-Whitney-U-Test. Der Vergleich der einzelnen Knochenersatzmaterialien abhängig vom Knochenstatus und dem Zusatz von BDNF erfolgte mittels Friedmanns zweifaktorieller Varianzanalyse. Die statistische Testung auf signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen mit BDNF-Zusatz und ohne BDNF-Zusatz in Abhängigkeit des Knochenstatus und der verwendeten Knochenersatzstoffe erfolgte mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test.

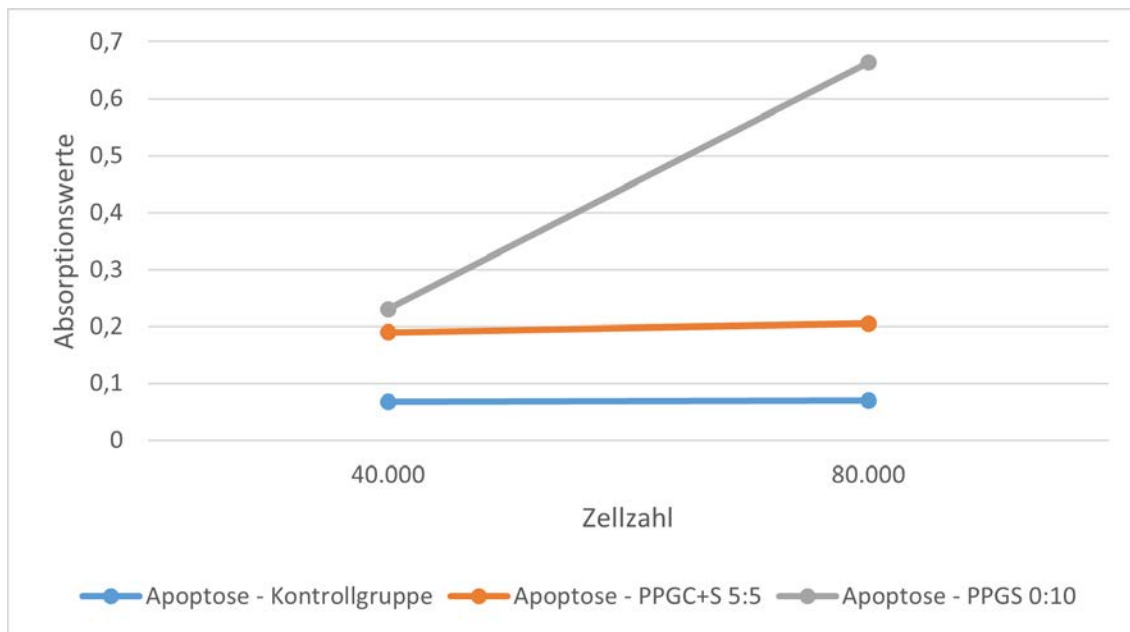
## 4. Ergebnisse

### 4.1. Ergebnisse der Vorversuche

Die Vorversuche sollten nachweisen, dass das Cell Death Detection ELISA-Kit zur prinzipiellen Nutzung für die geplanten Experimente geeignet ist, ohne dass das Kit oder die Reagenzien des Kits mit den zu untersuchenden Knochenersatzmaterialien interagieren. Als weiteres Ziel galt, dabei sicher zu stellen, dass die Beobachtung eines semiquantitativen Zelluntergangs durch das Kit bei proliferierenden Zellen möglich ist. Dabei stellte sich in den ersten Vorversuchen heraus, dass das Kit geeignet ist, den Zelluntergang der MSC zu beobachten und sich dabei auch keine relevanten Interaktionen mit den genutzten Knochenersatzmaterialien ergeben. Zusätzlich zeigte sich schon in den ersten Vorversuchen, dass der Nachweis des nekrotischen und apoptotischen Zelluntergangs in Abhängigkeit von den untergehenden, beziehungsweise ausgesäten Zellen steht (Vgl. Abbildung 5 und 6).

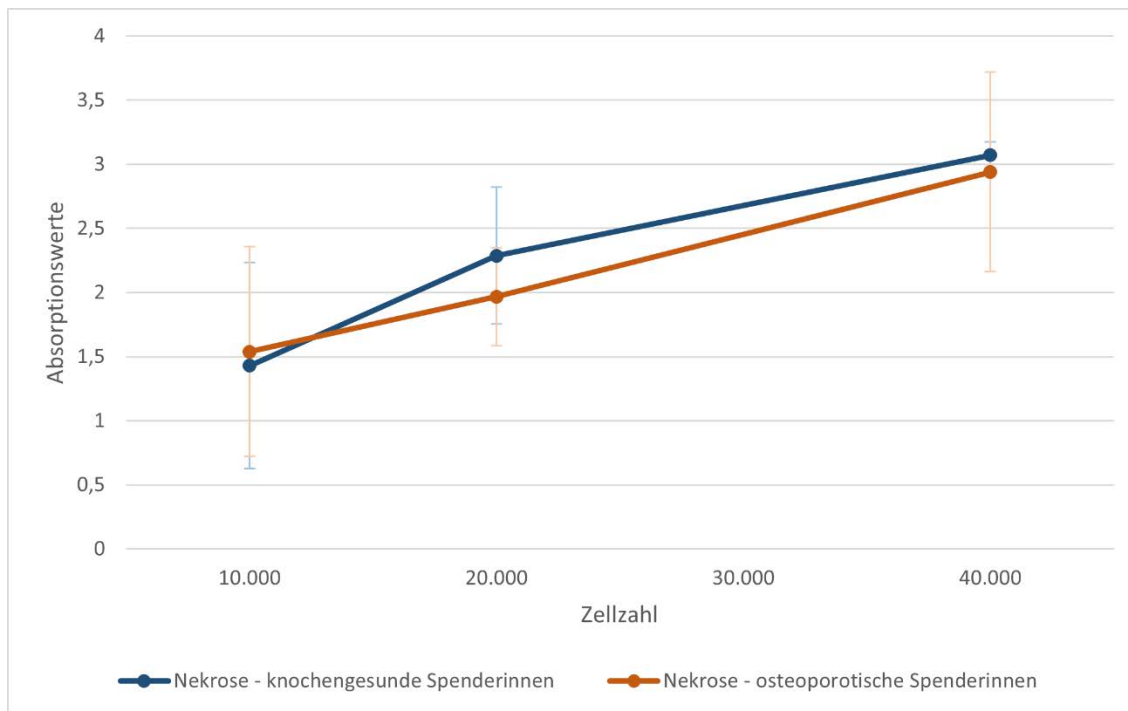


**Abbildung 5: Darstellung der Absorptionswerte der Nekrose im Vorversuch mit den Knochenersatzstoffen:** Etablierung des Kits in Verbindung mit den Knochenersatzstoffen PPGC+S 5:5 und PPGS 0:10 zum Ausschluss relevanter Interaktionen.

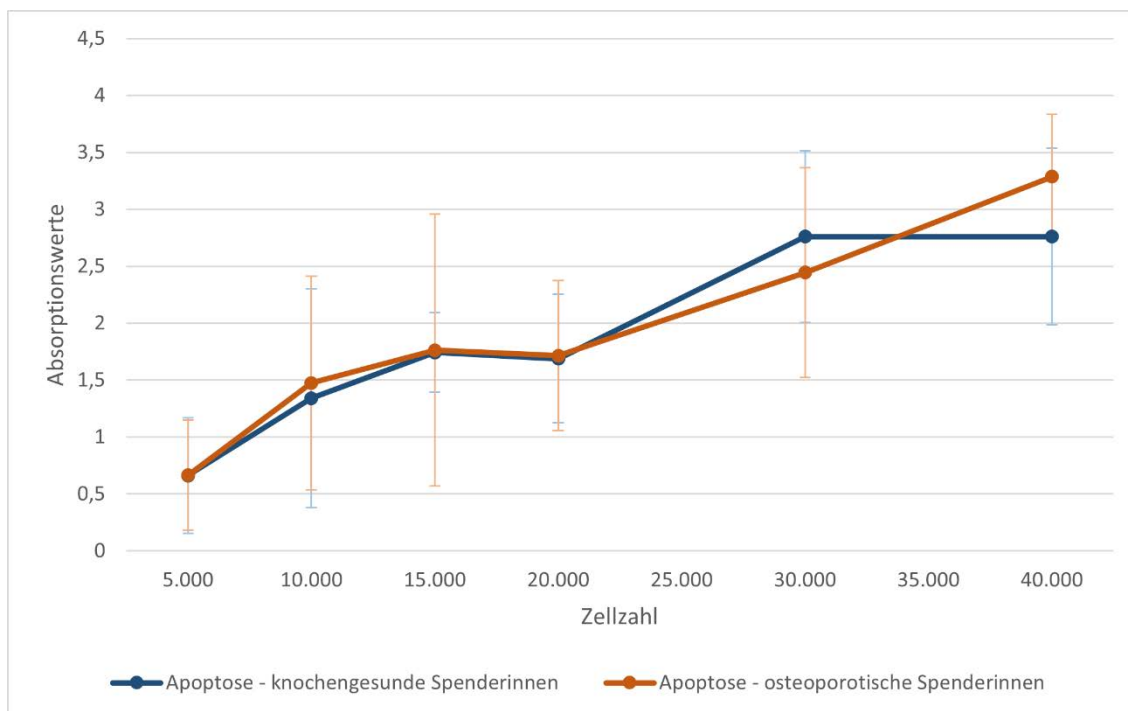


**Abbildung 6: Darstellung der Absorptionswerte der Apoptose im Vorversuch mit den Knochenersatzstoffen:** Etablierung des Kits in Verbindung mit den Knochenersatzstoffen PPGC+S 5:5 und PPGS 0:10 zum Ausschluss relevanter Interaktionen.

Durch diese ersten Ergebnisse fiel der Entschluss, das Kit für die Hauptversuche zu nutzen, jedoch sollte vor den Hauptversuchen die Abhängigkeit der Messergebnisse des Assays von der Anzahl der ausgesäten Zellen nachgewiesen werden, um eine geeignete Zahl an Zellen für den Start der Versuche herauszufinden. Durch die Zugabe von CAM und den damit vorhandenen Zelltod aller MSC konnte dargestellt werden, dass die Messwerte direkt abhängig sind von der Anzahl der ausgesäten Zellen. Dieser Nachweis gelang für Apoptose und Nekrose sowohl an osteoporotischen, als auch an knochengesunden MSC (vgl. Abbildung 7 und 8). Hierbei wurde sichtbar, dass das Assay eine höhere Positivität und damit auch höhere Messwerte für eine höhere Anzahl von verwendeten Zellen aufzeigte.



**Abbildung 7:** Darstellung der zellzahlabhängigen Mittelwerte der Absorptionmesswerte des **Nekroseassays** in der Etablierung aller Zellkulturen mit der Zugabe von CAM zu jedem Versuch. Die eingezeichneten Fehlerindikatoren zeigen eine Standardabweichung von den Mittelwerten der Zellkulturen.



**Abbildung 8:** Darstellung der zellzahlabhängigen Mittelwerte der Absorptionmesswerte des **Apoptoseassays** in der Etablierung aller Zellkulturen mit der Zugabe von CAM zu jedem Versuch. Die eingezeichneten Fehlerindikatoren zeigen eine Standardabweichung von den Mittelwerten der Zellkulturen.

In der Anleitung des Kits wurde jedoch eine Grenzkonzentration von Zellen beschrieben, bei der nur ein qualitativer Nachweis des Zelluntergangs möglich ist, da die Tests sonst eine zu hohe Positivität anzeigen. Hierbei ist die Transmission während der Messung

kaum noch zu detektieren und damit eine Absorption vorhanden, die nicht mehr quantifizierbar ist. Durch dieses Phänomen bedingt, sind auch die teils wieder abfallenden Messwerte in den unten aufgezeigten Diagrammen zu erklären, da es durch einen *Overflow* zu einer scheinbaren Abnahme kommt. Messwerte mit *Overflow* wurden nicht die Berechnung inkludiert, jedoch waren die sonst gemessenen Werte deutlich niedriger, sodass der Effekt des steilen Anstiegs anfangs an dann nicht mehr in die Rechnung eingehenden Zellkulturlinien liegt. Der hier aufgetretene *Overflow* sprach jedoch nicht gegen eine Nutzung dieser Zellkulturlinie in den Hauptversuchen, da die Zunahme der Messwerte auch hierfür nachweisbar war, ein *Overflow* laut Hersteller aufgrund interindividueller Unterschiede jedoch möglich ist. Zur Verdeutlichung sind in Tabelle 1 die entsprechenden Messwerte der Zellkulturen aufgeführt, passend zu den Graphen der knochengesunden Spenderinnen in Abbildung 8.

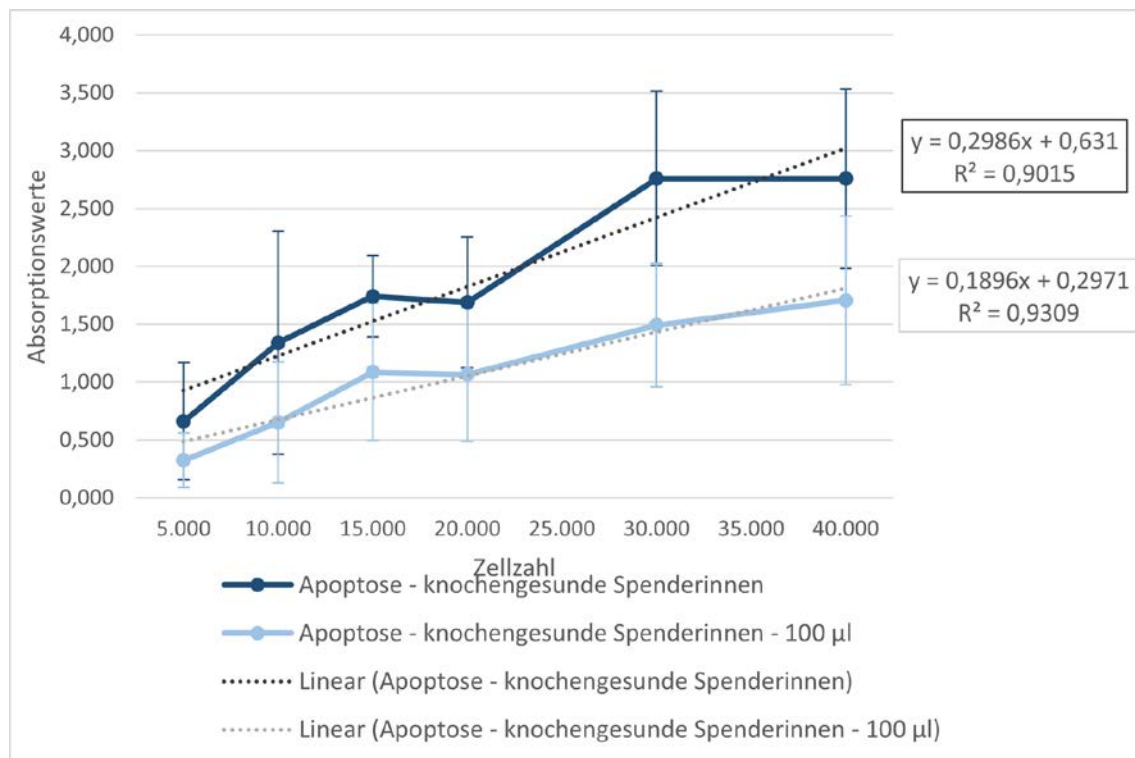
**Ergebnistabelle 1: Absorptionmesswerte der knochengesunden Zellkulturen im Apoptoseassay mit den vorgeschriebenen 200 µl pro well.** OVERFLOW steht für eine nicht mehr messbare Absorption und NA zeigt einen aufgetretenen Messfehler an.

Zellzahl	5.000	10.000	15.000	20.000	30.000	40.000
<b>ZK 48</b>	1,564	3,042	OVERFLOW	OVERFLOW	OVERFLOW	OVERFLOW
<b>ZK 73</b>	0,338	0,753	NA	1,041	1,972	2,022
<b>ZK 76</b>	0,473	0,784	1,938	2,247	3,342	3,568
<b>ZK 94</b>	0,516	1,054	1,953	2,068	3,462	OVERFLOW
<b>ZK 109</b>	0,415	1,067	1,337	1,4	2,264	2,689
<b>Mittelwert</b>	<b>0,661</b>	<b>1,340</b>	<b>1,743</b>	<b>1,689</b>	<b>2,760</b>	<b>2,760</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>0,509</b>	<b>0,963</b>	<b>0,351</b>	<b>0,565</b>	<b>0,752</b>	<b>0,775</b>

Durch das Auftreten einer zu hohen Positivität bereits in den Vorversuchen wurde beschlossen, die Messungen neben den von KIT-Hersteller vorgegebenen 200 µl Testflüssigkeit pro well bedingt durch das Vorgehen mit 100 µl ABTS-Lösung und 100 µl ABTS-Stopp-Lösung auch mit 100 µl pro well durchzuführen. Der Vorteil war eine weitergehende Verfolgbarkeit der Abhängigkeit zwischen den Zellzahlen und den Absorptionmesswerten. Zusätzlich war ein deutlicherer Zusammenhang zwischen den Zellzahlen und den Messwerten zu erkennen, sodass die durchgeführten Regressionsanalysen eine höhere Genauigkeit zeigten. Beispielhaft werden vergleichend mit obenstehender Tabelle die Messwerte derselben Zellkulturen bei 100 µl pro well in Tabelle 2 gezeigt (Abbildung 9).

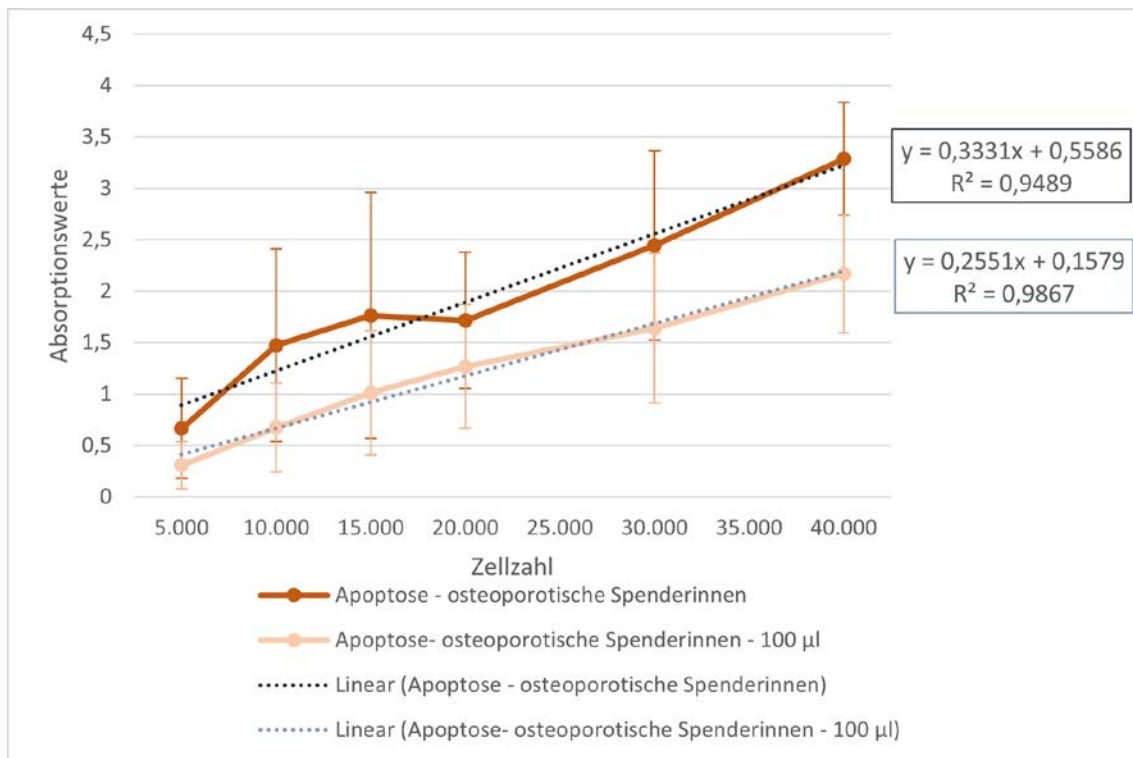
**Ergebnistabelle 2: Absorptionmesswerte der knochengesunden Zellkulturen im Apoptoseassay mit 100 µl pro well.** OVERFLOW steht für eine nicht mehr messbare Absorption und NA zeigt einen aufgetretenen Messfehler an.

Zellzahl	5.000	10.000	15.000	20.000	30.000	40.000
ZK 48	0,74	1,582	1,942	2,024	2,202	2,395
ZK 73	0,167	0,35	NA	0,476	0,912	0,934
ZK 76	0,229	0,369	0,922	1,069	1,65	OVERFLOW
ZK 94	0,303	0,509	0,917	0,971	1,691	2,255
ZK 109	0,187	0,453	0,569	0,795	1,009	1,244
<b>Mittelwert</b>	<b>0,325</b>	<b>0,653</b>	<b>1,088</b>	<b>1,067</b>	<b>1,493</b>	<b>1,707</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>0,238</b>	<b>0,524</b>	<b>0,593</b>	<b>0,581</b>	<b>0,533</b>	<b>0,727</b>



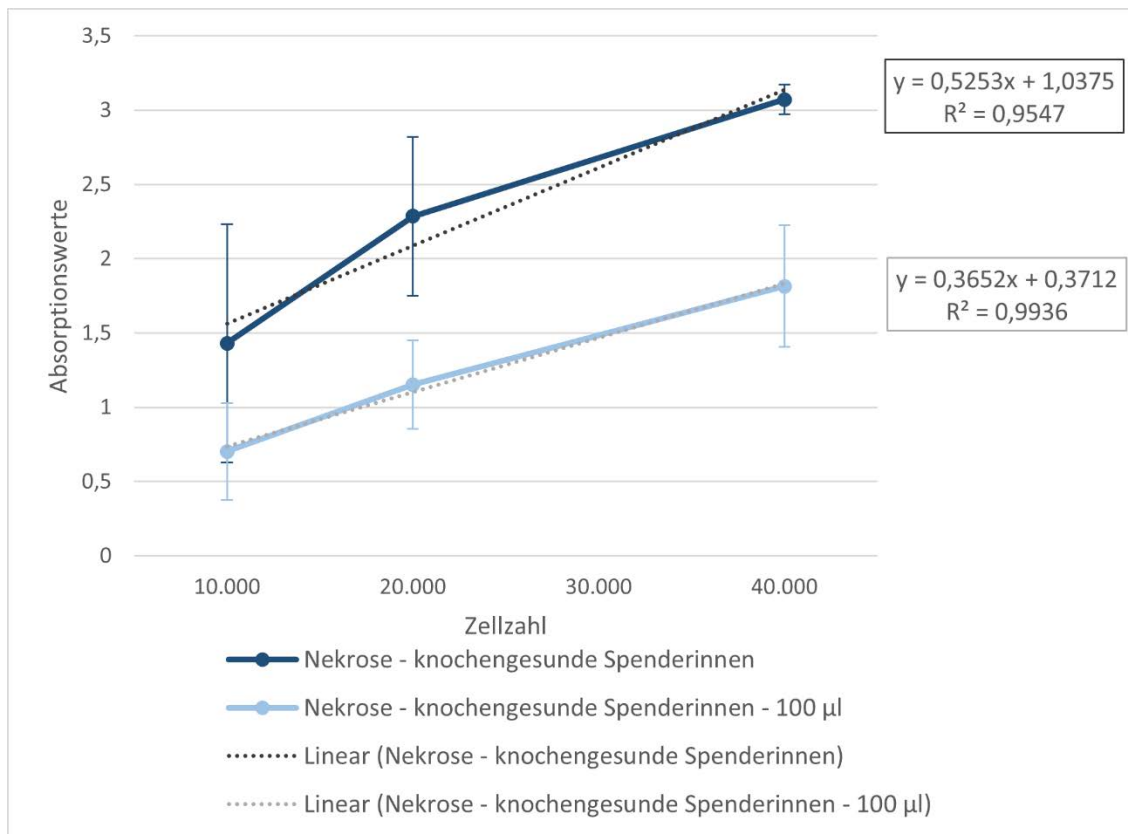
**Abbildung 9: Darstellung der 200 µl Messwerte im Vergleich zu 100 µl Messwerten des Apoptoseassays für die knochengesunden Zellkulturen.** Dargestellt sind neben den Mittelwerten der Messwerte auch die Standardfehler, sowie gepunktet die linearen Regressionsanalysen. Nebstehend sind die errechneten Gleichungen für die lineare Regression mit Genauigkeitsangabe ( $R^2$ )

Die Ergebnisse hinsichtlich der dokumentierten Messwerte und der linearen Regressionsanalysen zeigten sich so auch für die Apoptoseassays der osteoporotischen Kohorte (Abbildung 10).



**Abbildung 10: Darstellung der 200 µl Messwerte im Vergleich zu 100 µl Messwerten des Apoptoseassays für die osteoporotische Zellkulturen.** Dargestellt sind neben den Mittelwerten der Messwerte auch die Standardfehler, sowie gepunktet die linearen Regressionsanalysen. Nebenstehend sind die errechneten Gleichungen für die lineare Regression mit Genauigkeitsangabe ( $R^2$ )

Durch die zusätzliche Messung mit 100 µl sollte sichergestellt werden, dass im Zweifel bei zu hoher Nekrose oder Apoptose die Ergebnisse in den Hauptversuchen auch mit 100 µl ausgewertet werden könnten. Daher wurden die Messungen mit lediglich 100 µl pro well auch im Falle der Experimente zur Nekrose durchgeführt. Auch dort wurde durch diese zusätzliche Messung mit 100 µl pro well eine noch bessere Präzision der linearen Regression bei den knochengesunden MSC erreicht (Abbildung 11).

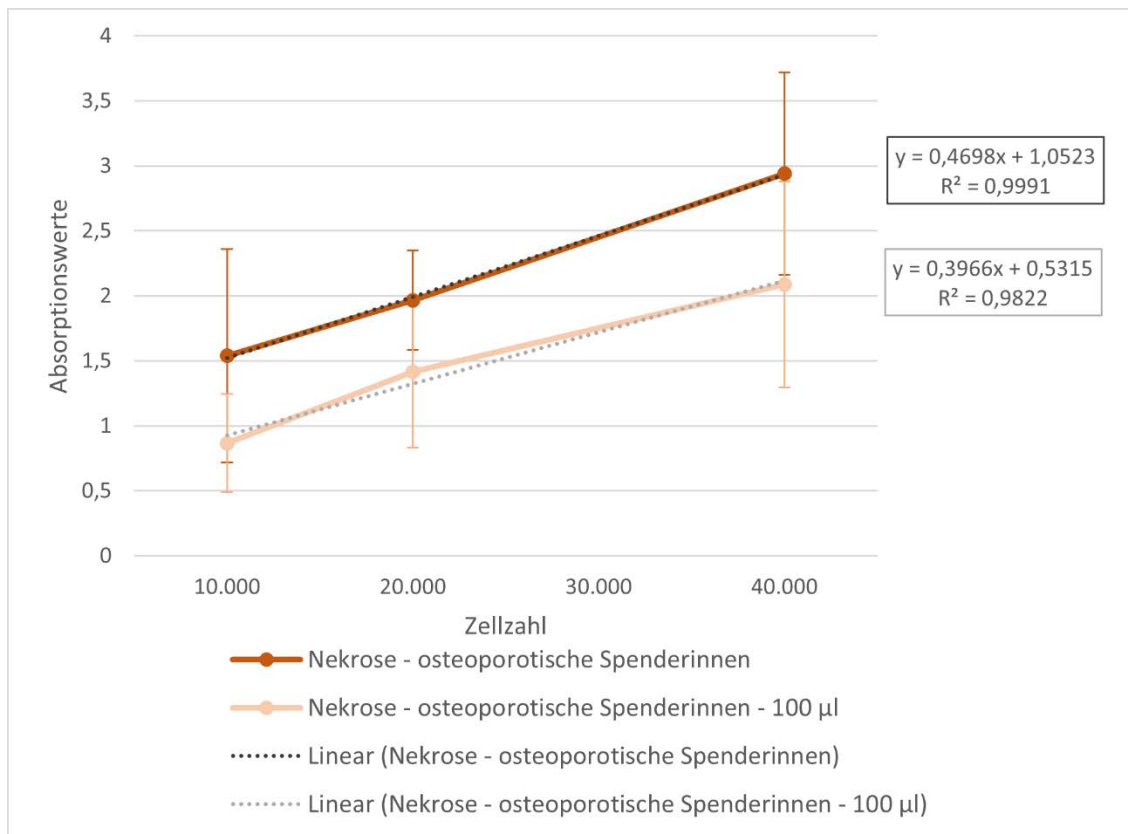


**Abbildung 11:** Darstellung der 200 µl Messwerte im Vergleich zu 100 µl Messwerten des Nekroseassays für die knochengesunden Zellkulturen. Dargestellt sind neben den Mittelwerten der Messwerte auch die Standardfehler, sowie gepunktet die linearen Regressionsanalysen. Nebenstehend sind die errechneten Gleichungen für die lineare Regression mit Genauigkeitsangabe ( $R^2$ )

Lediglich bei den Untersuchungen der Nekrose in Abhängigkeit der ausgesäten Zellen bei den osteoporotisch Vorerkrankten zeigt sich eine leicht geringere Genauigkeit der linearen Regressionsanalyse (siehe Abbildung 12). Dies ist jedoch bedingt durch besonders häufigen Overflow der 200 µl Testreihe, sodass dort lediglich drei komplette Zellkulturen zur Analyse zur Verfügung standen (siehe Tabelle 3).

**Ergebnistabelle 3:** Absorptionmesswerte der knochengesunden Zellkulturen im Nekroseassay mit 200 µl pro well. OVERFLOW steht für eine nicht mehr messbare Absorption. Eine Aussaat mit 30 000 Zellen wurde nicht durchgeführt und war daher auch nicht zu messen

Zellzahl	10.000	20.000	40.000
ZK 69	2,036	OVERFLOW	OVERFLOW
ZK 70	2,651	OVERFLOW	OVERFLOW
ZK 71	1,333	2,332	3,563
ZK 74	0,537	1,57	2,068
ZK 112	1,137	1,999	3,189
<b>Mittelwert</b>	<b>1,539</b>	<b>1,967</b>	<b>2,940</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>0,820</b>	<b>0,382</b>	<b>0,778</b>



**Abbildung 12: Darstellung der 200 µl Messwerte im Vergleich zu 100 µl Messwerten des Nekroseassays für die osteoporotischen Zellkulturen.** Dargestellt sind neben den Mittelwerten der Messwerte auch die Standardfehler, sowie gepunktet die linearen Regressionsanalysen. Nebenstehend sind die errechneten Gleichungen für die lineare Regression mit Genauigkeitsangabe ( $R^2$ )

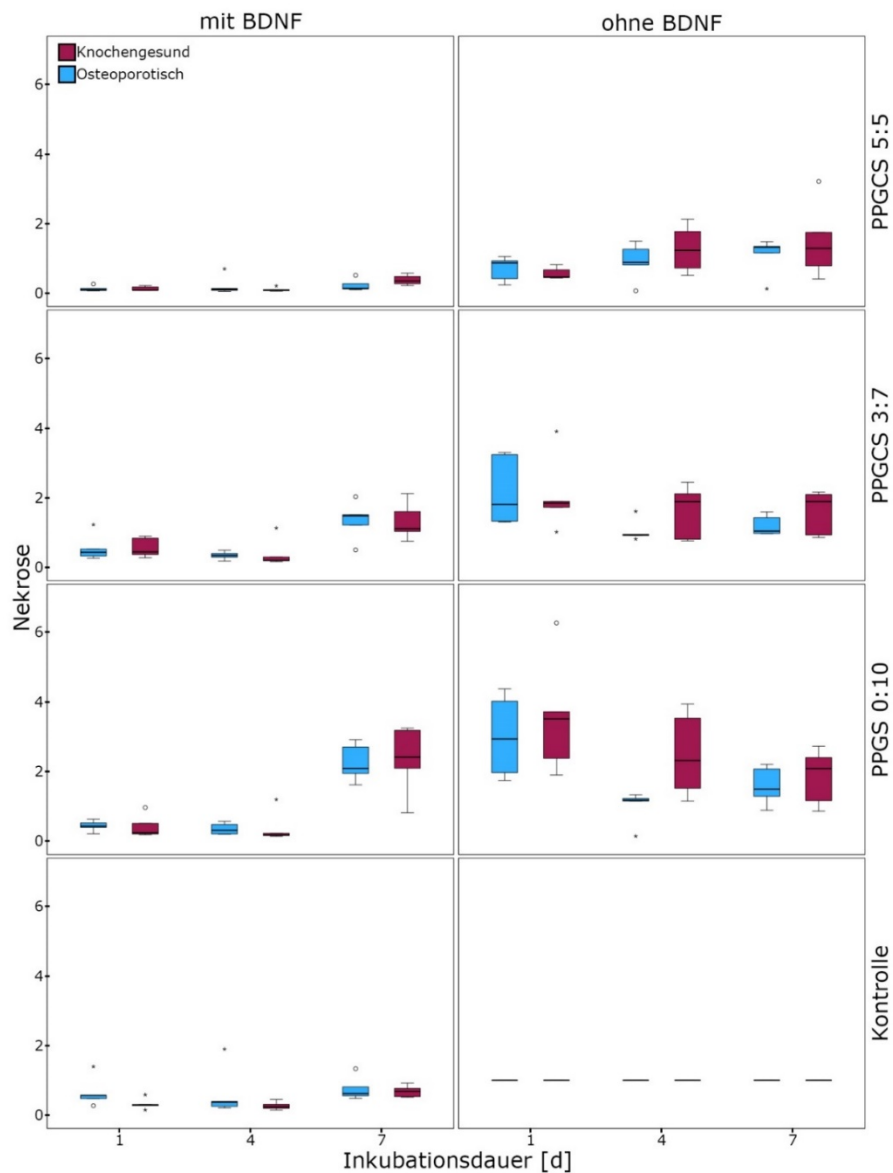
Insgesamt konnten die Vorversuche mit CAM eine lineare Abhängigkeit der Messergebnisse von den zu Grunde gegangenen Zellen nachweisen. Dies war nicht zuletzt durch die lineare Regressionsanalyse darzustellen, jedoch zeigten sich hierbei schon teilweise übermäßig positive Messungen bei 40.000 ausgesäten Zellen. In Anbetracht der Ergebnisse aus den Vorversuchen mit den Knochenersatzstoffen fiel dennoch die Entscheidung zur Aussaat von  $10^5$  Zellen in den Hauptversuchen, da die in Abbildung 6 und 7 dargestellten Vorversuche zwar eine Zytotoxizität der Knochenersatzstoffe nahelegten, aber keine, die mit CAM vergleichbar war. Zusätzlich lässt sich aus den ersten Ergebnissen eine gegebenenfalls beschränkte Zytotoxizität des PPGC+S 5:5 deuten, sodass durch die Aussaat von weniger Zellen unter Umständen die Gefahr einer Unterschätzung der Zytotoxizität durch sehr niedrige Messwerte bestand.

## 4.2. Ergebnisse bei Betrachtung des *Enrichment Factors*

### 4.2.1. Vergleich knochengesunder und osteoporotischer MSC

#### 4.2.1.1. Ergebnisse des Nekroseassays

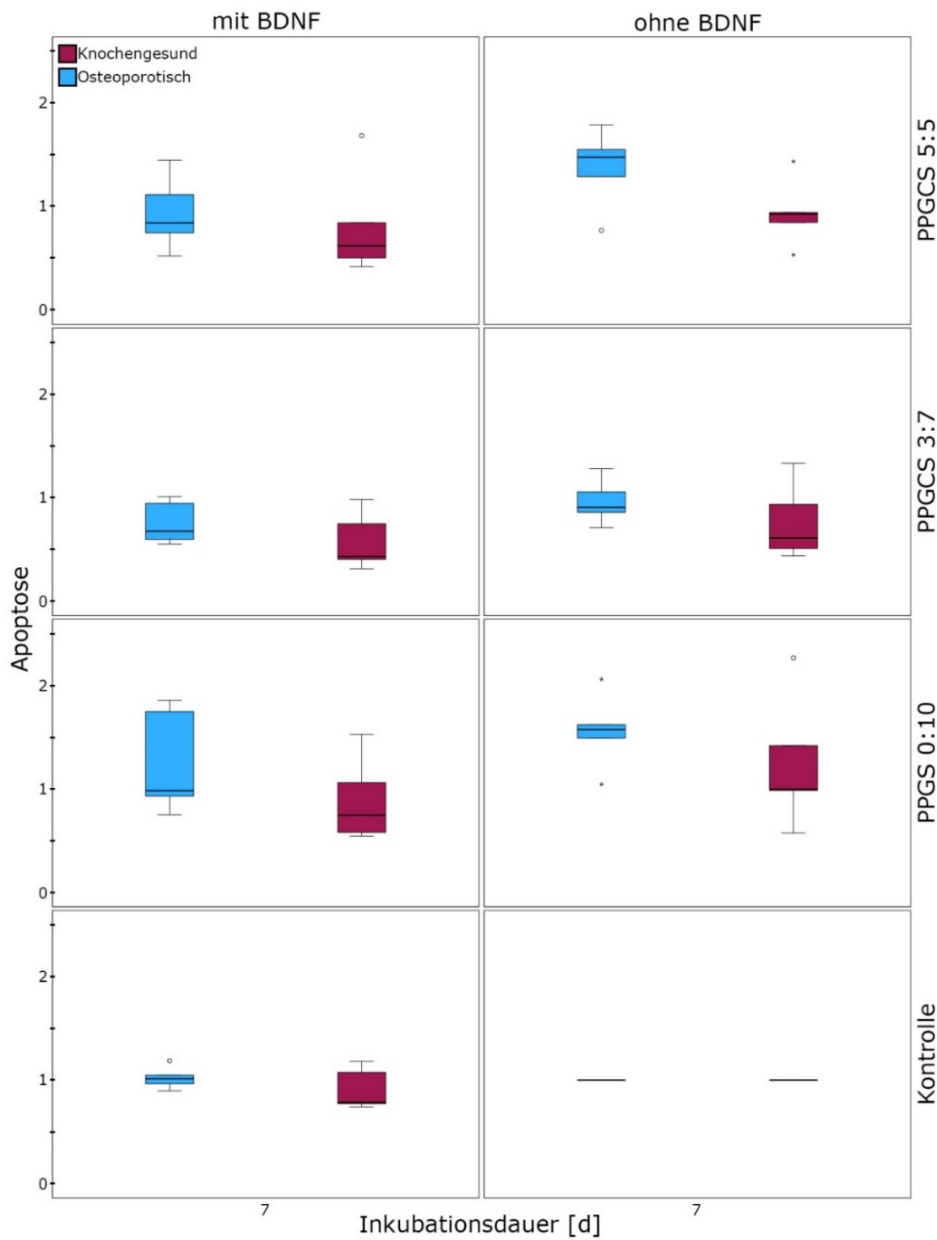
Bei Betrachtung des *Enrichment Factors* der Untersuchungen auf Nekrose hinsichtlich signifikanter Unterschiede zwischen den Versuchen mit osteoporotischen und knochengesunden Zellen ergaben sich keine signifikanten Ergebnisse (Abbildung 13). Lediglich an Tag vier der Versuche mit PPGS 0:10 war eine Tendenz des Unterschiedes zwischen knochengesunden und osteoporotischen MSC zu erkennen ( $p = 0,056$ ).



**Abbildung 13: Einfluss des Knochenstatus der Spenderinnen auf die Nekrose rate (Enrichment Factor) von MSC.** Der Boxplot zeigt jeweils den Median mit den umgebenden Quartilen, zusätzlich ist der Interquartilabstand mit dargestellt. Ausreißer bis maximal 3 Interquartilabstände sind mit Punkten zusätzlich dargestellt, Ausreißer mit mehr als 3 Interquartilabständen mit farbigen Sternen.

#### 4.2.1.2. Ergebnisse des Apoptoseassays

Auch hinsichtlich der am siebten Versuchstag untersuchten Apoptose konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen knochengesunden und osteoporotischen Spenderinnen gezeigt werden. Hier konnten in allen Versuchsgruppen auch keine Tendenzen nachgewiesen werden (Abbildung 14). Insgesamt legen diese Ergebnisse eine vom Knochenstatus unabhängige Verträglichkeit der Knochenersatzmaterialien und des BDNF nahe.



**Abbildung 14: Einfluss des Knochenstatus der Spenderinnen auf die Apoptoserate (Enrichment Factor) von MSC.** Der Boxplot zeigt jeweils den Median mit den umgebenden Quartilen, zusätzlich ist der Interquartilabstand mit dargestellt. Ausreißer bis maximal 3 Interquartilabstände sind mit Punkten zusätzlich dargestellt, Ausreißer mit mehr als 3 Interquartilabständen mit farbigen Sternen.

## 4.2.2. Vergleich der Knochenersatzmaterialien

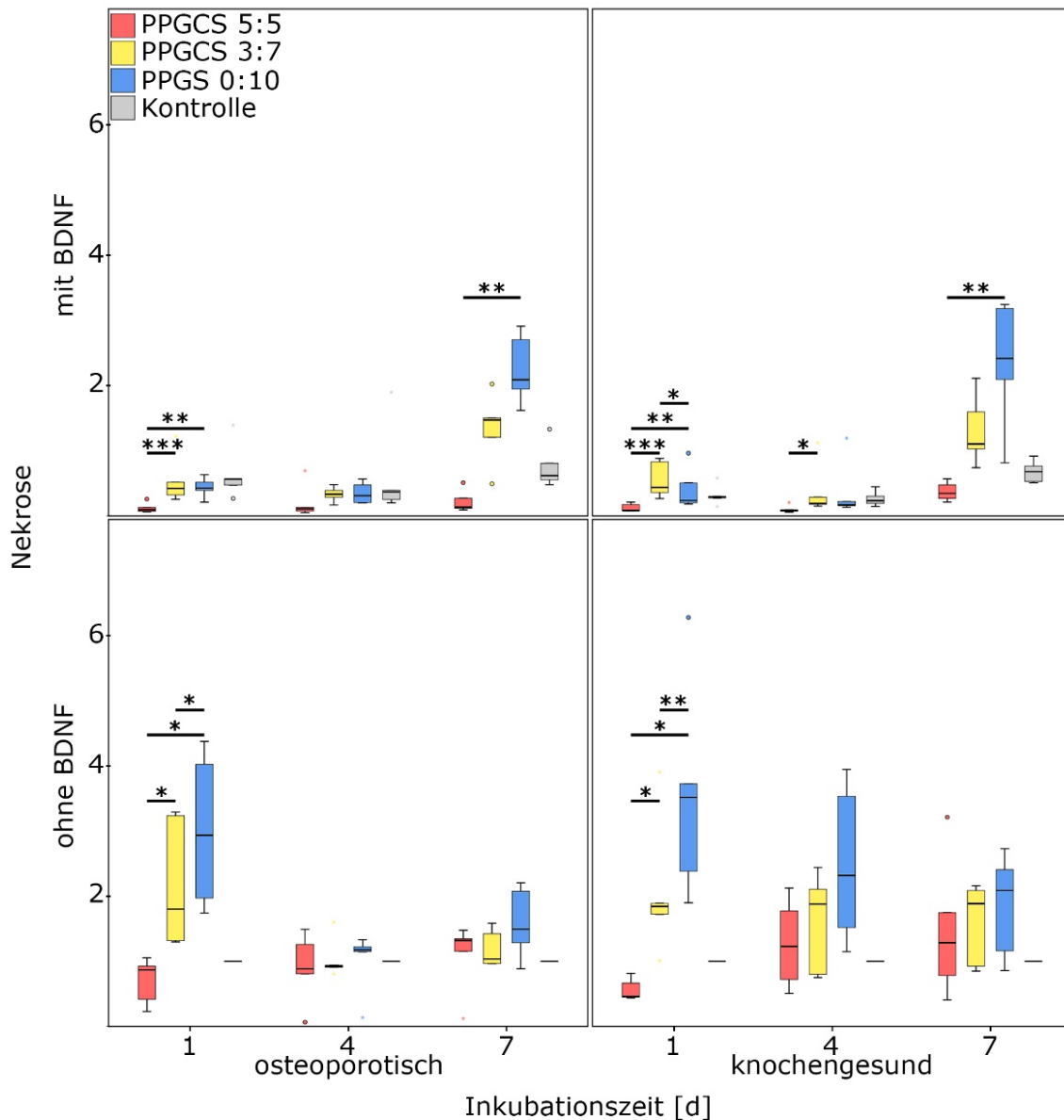
### 4.2.2.1. Ergebnisse des Nekroseassays

Hinsichtlich der Nekrose in Abhängigkeit vom verwendeten Knochenersatzmaterial konnte in den Versuchen der MSC von Spenderinnen mit Osteoporose und Verwendung des Zellkulturmediums mit BDNF festgestellt werden, dass PPGC+S 5:5 eine deutlich geringere Zellnekrose am ersten Versuchstag aufweist als PPGC+S 3:7 ( $p = 0,000$ ) und PPGS 0:10 ( $p = 0,002$ ). Am vierten Versuchstag ergaben sich keine signifikanten Unterschiede, für den siebten Versuchstag konnte ein signifikanter Unterschied zwischen PPGC+S 5:5 und PPGS 0:10 in dieser Versuchsgruppe aufgezeigt werden ( $p = 0,005$ ) (Abbildung 15, Feld oben links).

In den Versuchen der knochengesunden MSC mit BDNF (Abbildung 15, Feld oben rechts) konnten am ersten Versuchstag signifikante Unterschiede der Nekrose zwischen PPGC+S 5:5 und PPGC+S 3:7 ( $p = 0,000$ ), PPGS 5:5 und PPGS 0:10 ( $p = 0,002$ ), sowie zwischen PPGC+S 3:7 und PPGS 0:10 ( $p = 0,049$ ) festgestellt werden. Am vierten Versuchstag im Versuch der knochengesunden MSC mit BDNF-haltigem Medium zeigte sich ein signifikanter Unterschied der Nekrose zwischen PPGC+S 5:5 und PPGC+S 3:7 ( $p = 0,034$ ). Am siebten Versuchstag stellte sich ein signifikanter Unterschied der Nekrose zwischen PPGC+S 5:5 und PPGS 0:10 ( $p = 0,005$ ) dar.

Die Versuche mit osteoporotischen MSC und Zellkulturmedium ohne BDNF-Zusatz zeigten ähnliche Ergebnisse (Abbildung 15, Feld unten links). Auch hier zeigten sich am ersten Versuchstag signifikante Unterschiede der Nekrose im Vergleich der Knochenersatzmaterialien zwischen PPGC+S 5:5 und PPGC+S 3:7 ( $p = 0,045$ ), PPGC+S 5:5 und PPGS 0:10 ( $p = 0,028$ ) und PPGC+S 3:7 und PPGS 0:10 ( $p = 0,032$ ). An den weiteren Versuchstagen stellten sich hier keine weiteren signifikanten Unterschiede heraus.

Die Ergebnisse der knochengesunden MSC inkubiert ohne BDNF (Abbildung 15, Feld unten rechts) konnten signifikante Unterschiede der Nekrose in Abhängigkeit der verwendeten Knochenersatzmaterialien lediglich am ersten Versuchstag darstellen. PPGC+S 5:5 wies dabei eine deutlich geringere Nekrose auf als PPGC+S 3:7 ( $p = 0,014$ ) und PPGS 0:10 ( $p = 0,010$ ). Zusätzlich war auch der Unterschied der Nekrose zwischen PPGC+S 3:7 und PPGS 0:10 ( $p = 0,009$ ) signifikant. Weitere signifikante Unterschiede ergaben sich an den folgenden Versuchstagen nicht.

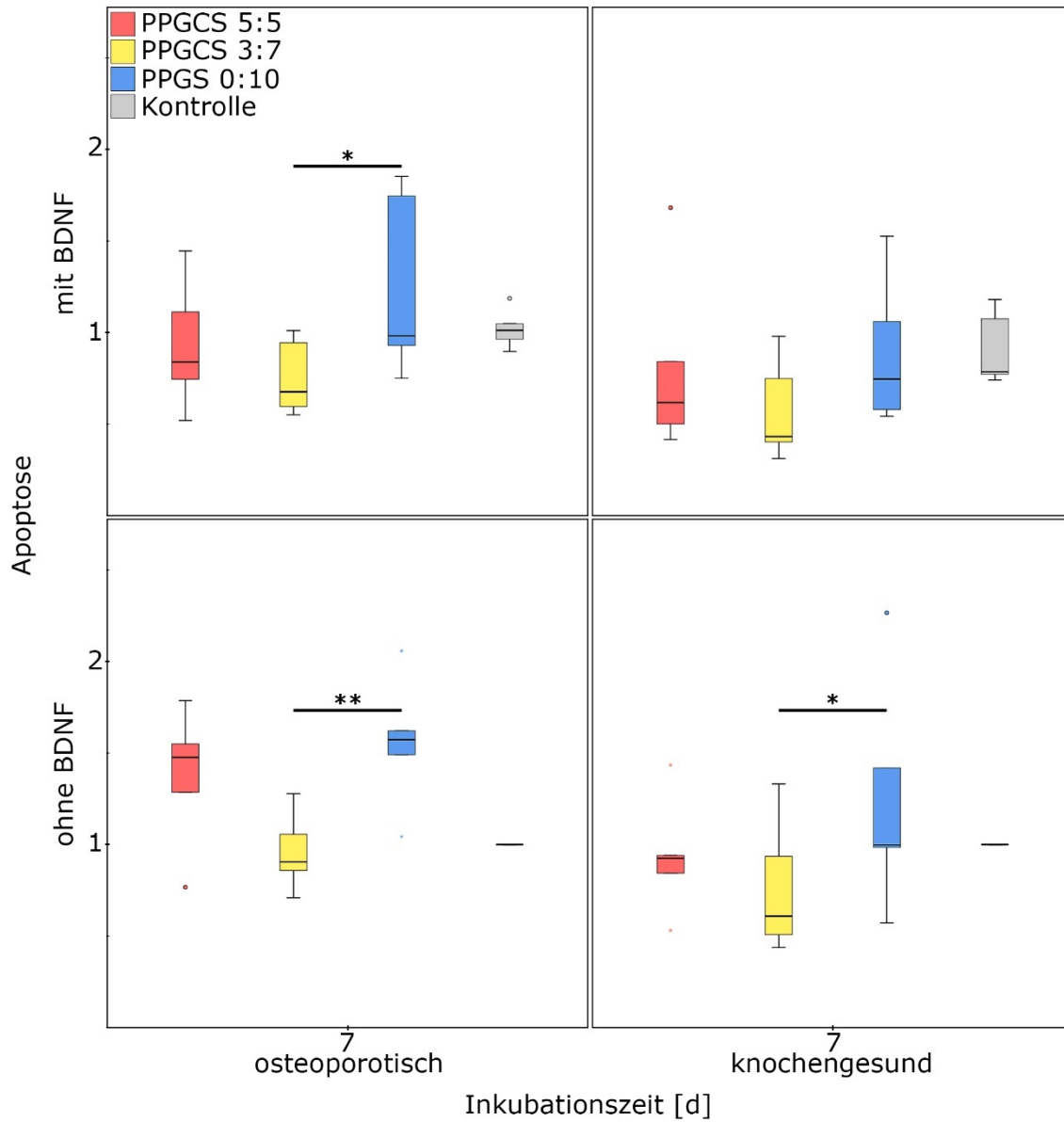


**Abbildung 15: Einfluss des Knochenersatzmaterials auf die Nekroserate (Enrichment Factor) von MSC:** Striche mit schwarzen Sternen (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ) kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede. Boxplot zeigt Median mit den umgebenden Quartilen, Ausreißer bis maximal 3 Interquartilabstände sind mit Punkten dargestellt, Ausreißer mit mehr als 3 Interquartilabständen mit farbigen Sternen.

#### 4.2.2.2. Ergebnisse des Apoptoseassays

Die Betrachtung der Apoptose konnte darstellen, dass PPGC+S 3:7 eine signifikant geringere Apoptose hat als PPGS 0:10. Die signifikanten Unterschiede ergaben sich hier für osteoporotische MSC inkubiert mit BDNF-haltigem Zellkulturmedium ( $p = 0,034$ / Abbildung 16 oben links) und osteoporotische MSC inkubiert ohne BDNF-Zusatz zum Zellkulturmedium ( $p = 0,005$ / Abbildung 16 unten links). Bei den knochengesunden MSC konnte der signifikante Unterschied nur für den Versuch ohne BDNF-haltigem Zellkulturmedium ( $p = 0,013$ / Abbildung 16 unten rechts) gezeigt werden. Weitere

Unterschiede zwischen den Apoptoseraten der Knochenersatzstoffe waren nicht statistisch signifikant.



**Abbildung 16: Einfluss des Knochenersatzmaterials auf die Apoptoserate (Enrichment Factor) von MSC:** Striche mit schwarzen Sternen (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ) kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede. Boxplot zeigt Median mit den umgebenden Quartilen, Ausreißer bis maximal 3 Interquartilabständen sind mit Punkten dargestellt, Ausreißer mit mehr als 3 Interquartilabständen mit farbigen Sternen.

### 4.2.3. Vergleich der Zellkulturmedien mit und ohne BDNF-Zusatz

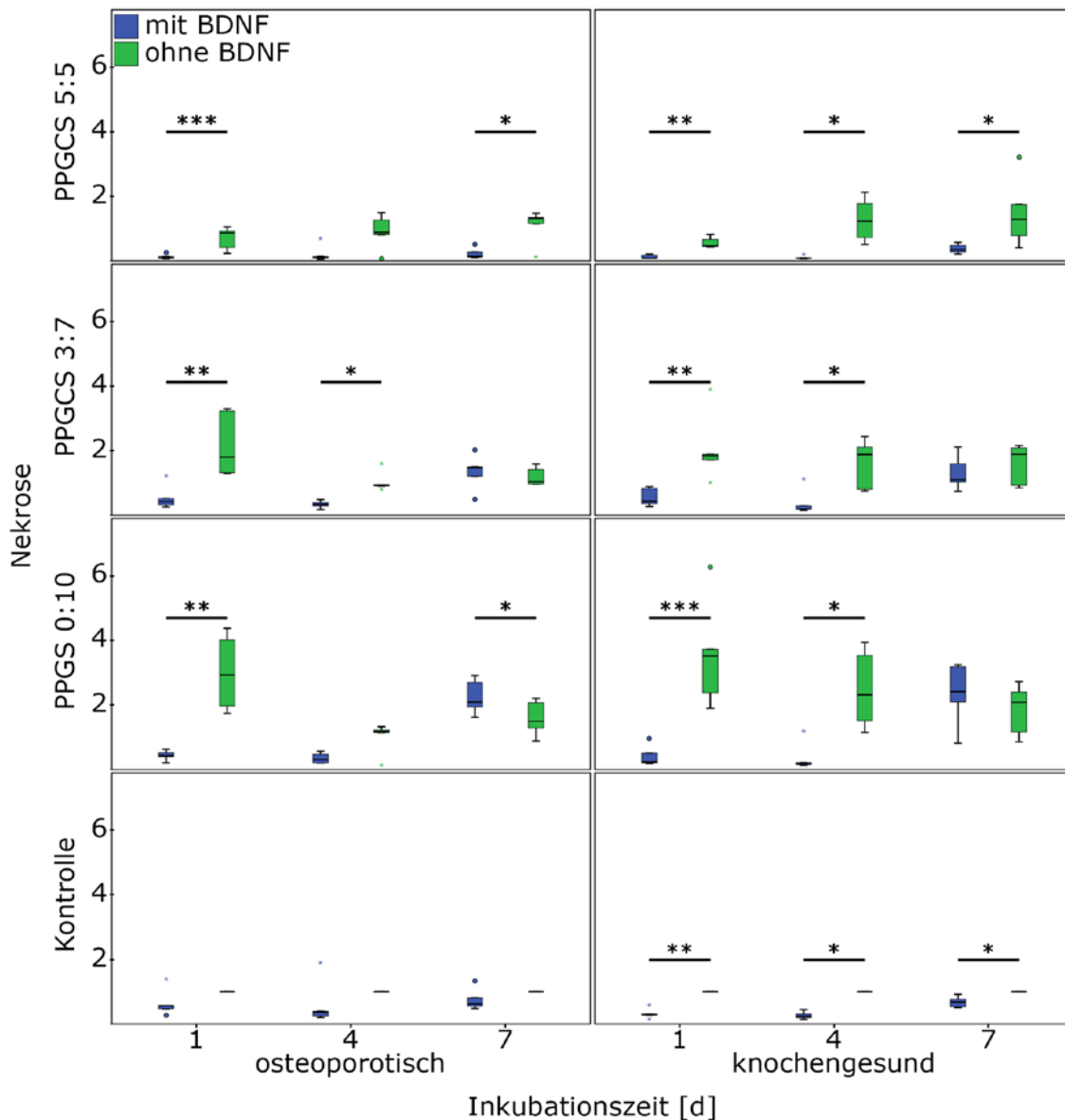
#### 4.2.3.1. Ergebnisse des Nekroseassays

In den Versuchen mit PPGC+S 5:5 stellte sich die Nekrose von osteoporotischen MSC durch die Zugabe von BDNF zum Zellkulturmedium an Tag eins ( $p = 0,001$ ) und Tag sieben ( $p = 0,043$ ) signifikant geringer dar im Vergleich zum Zellkulturmedium ohne BDNF-Zusatz. Für die Versuche mit PPGC+S 5:5 im Zellkulturversuch mit knochengesunden MSC konnte eine signifikante Senkung der Nekrose durch BDNF-Zugabe zum Zellkulturmedium an Tag eins ( $p = 0,007$ ), Tag vier ( $p = 0,043$ ) und Tag sieben ( $p = 0,043$ ) gezeigt werden (Abbildung 17, erste Zeile von oben).

Durch die Zugabe von BDNF zum Zellkulturmedium konnte die Nekrose von osteoporotischen MSC im Kontakt mit PPGC+S 3:7 am ersten Versuchstag ( $p = 0,003$ ) und am vierten Versuchstag ( $p = 0,043$ ) signifikant vermindert werden. Für die MSC von knochengesunden Spenderinnen konnte im Kontakt mit PPGC+S 3:7 auch eine signifikante Senkung der Nekrose durch BDNF-haltiges Medium an den Versuchstagen eins ( $p = 0,003$ ) und vier ( $p = 0,043$ ) erreicht werden (Abbildung 17, zweite Zeile von oben).

Die Versuche osteoporotischer MSC auf PPGS 0:10 zeigten, dass auch hier durch die Zugabe von BDNF zum Zellkulturmedium eine signifikante Abnahme der Nekrose am Versuchstag eins ( $p = 0,006$ ) erreicht wurde. Hingegen ist am letzten Versuchstag die Zellnekrose osteoporotischer MSC in Kontakt mit PPGS 0:10 durch die Zugabe von BDNF signifikant erhöht ( $p = 0,043$ ). Im Vergleich zeigen knochengesunde MSC kultiviert mit PPGS 0:10 an Tag eins ( $p = 0,001$ ) und Tag vier ( $p = 0,043$ ) eine signifikante Verringerung der Nekrose durch die Zugabe von BDNF, für den letzten Versuchstag sind jedoch keine signifikanten Unterschiede festzustellen (Abbildung 17, dritte Zeile von oben).

Auch für die Kontrollversuche ohne Knochenersatzstoff zeigte sich in der Versuchsgruppe der MSC von knochengesunden Spenderinnen eine signifikante Verminderung der Nekrose durch die Zugabe von BDNF an den Versuchstagen eins ( $p = 0,005$ ), vier ( $p = 0,043$ ) und sieben ( $p = 0,043$ ). Die Kontrollgruppe der osteoporotischen MSC konnte keine signifikanten Unterschiede der Nekrose durch die Zugabe von BDNF nachweisen (Abbildung 17, vierte Zeile von oben).

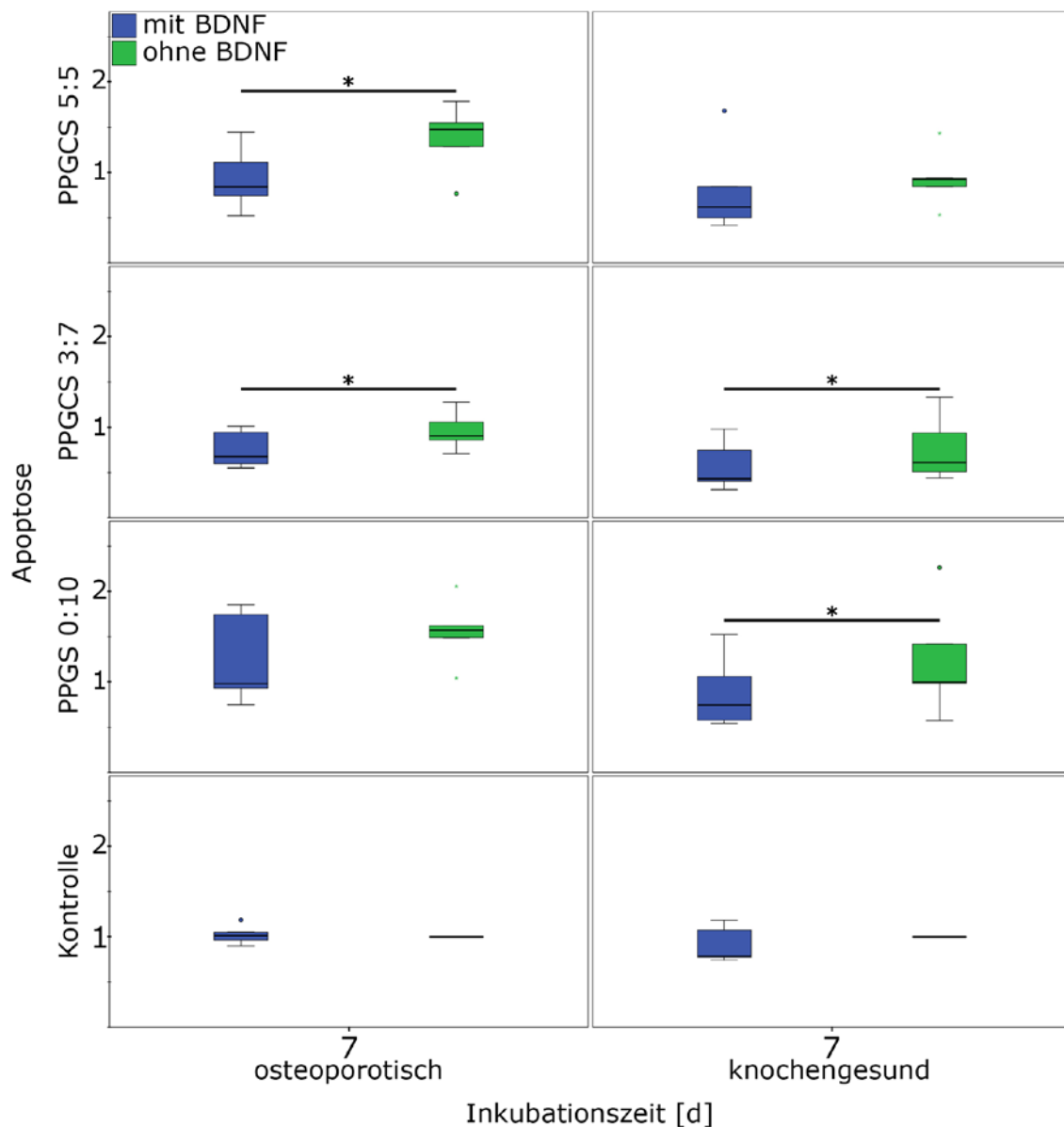


**Abbildung 17: Einfluss der BDNF-Zugabe zum Zellkulturmedium auf die Nekroserate (Enrichment Factor) von MSC:** Striche mit schwarzen Sternen (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ) kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede. Boxplot zeigt Median mit den umgebenden Quartilen, Ausreißer bis maximal 3 Interquartilabstände sind mit Punkten dargestellt, Ausreißer mit mehr als 3 Interquartilabständen mit farbigen Sternen.

#### 4.2.3.2. Ergebnisse des Apoptoseassays

Die Untersuchung der Apoptose erbrachte einen signifikant geringeren apoptotischen Zelluntergang der osteoporotischen MSC in Zellkultur mit PPGC+S 5:5 durch die Zugabe von BDNF ( $p = 0,043$ /Abbildung. 18, erste Zeile von oben). Die Versuche mit PPGC+S 3:7 wiesen sowohl in der Zellkultur osteoporotischer MSC ( $p = 0,043$ ), als auch knochengesunder MSC ( $p = 0,043$ ) eine signifikant geringere Apoptose durch die Zugabe von BDNF nach (Abbildung 18, zweite Zeile von oben). Für PPGS 0:10 konnte ein signifikanter Unterschied durch die Zugabe von BDNF nur für die knochengesunden

MSC festgestellt werden ( $p = 0,043$ / Abbildung 18, dritte Zeile von oben). Signifikante Unterschiede in den Kontrollgruppen konnten für die Apoptose nicht nachgewiesen werden.



**Abbildung 18: Einfluss der BDNF-Zugabe zum Zellkulturmedium auf die Apoptoserate (Enrichment Factor) von MSC:** Striche mit schwarzen Sternen (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ) kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede. Boxplot zeigt Median mit den umgebenden Quartilen, Ausreißer bis maximal 3 Interquartilabstände sind mit Punkten dargestellt, Ausreißer mit mehr als 3 Interquartilabständen mit farbigen Sternen.

### 4.3. Lichtmikroskopische Ergebnisse

Die Zellen wurden an jedem Versuchstag vor der Entnahme der Proben für die Versuche mittels des Kits in einem Durchlichtmikroskop betrachtet und fotodokumentiert.

#### 4.3.1. Lichtmikroskopie einer knochengesunden Spenderin

Insgesamt ist eine Zunahme der Dichte des Zellrasens im lichtmikroskopischen Bild bei den Kontrollversuchen der knochengesunden Spenderin mit und ohne BDNF im Zellkulturmedium über die sieben Tage Versuchsdauer zu beobachten (Abbildung 19 und 20).

In den Versuchen mit PPGC+S 5:5 ohne BDNF zeigt sich am ersten Tag und am vierten Tagen eine relativ homogene Dichte des Zellrasens mit einzelnen Interaktionen mit dem Knochenersatzstoff (Abbildung 19). Ab Tag sieben scheint die Dichte des Zellrasens im lichtmikroskopischen Bild abzunehmen sowie auch die Interaktionen der Zellen der knochengesunden Spenderin mit dem Knochenersatzmaterial (Abbildung 19). Die Zellen sehen dennoch über den Versuchszeitraum hinweg vital aus und es zeigen sich auch in der höheren Vergrößerung (Abbildung 21) die Zellen mit einer deutlichen Abgrenzung zur Umgebung, im Sinne einer intakten Zellmembran. Die Größe, beziehungsweise Ausdehnung der Zellen der knochengesunden Spenderin ist hierbei an allen drei Versuchstagen als ähnlich zu beschreiben (Abbildung 19 und 21). Im Vergleich zum Anfang zeigte sich der Knochenersatzstoff nach 7 Tagen weiter verbreitet im *well*.

Vergleichsweise hierzu ist bei den Versuchen mit PPGC+S 5:5 mit BDNF im Zellkulturmedium festzustellen, dass die Zelldichte bis zum Tag vier zunimmt um dann wie auch im Versuch ohne BDNF bis zum siebten Versuchstag wieder abzufallen. Es scheint jedoch vermehrt Interaktionen der Zellen mit dem Knochenersatzstoff zu geben (Abbildung 20 und 22). Die Vitalität und auch die Größe der Zellen sind als ähnlich wie in den Versuchen ohne BDNF zu beschreiben.

Die Versuche mit PPGC+S 3:7 ohne BDNF zeigen von Beginn an eine abnehmende Dichte des Zellrasens bis zum Tag sieben. Über den Versuchszeitraum scheinen sich die Zellen der knochengesunden Spenderin vermehrt zu kondensieren, gegebenenfalls im Sinne einer einsetzenden Apoptose (Abbildung 19 und 21). Die Interaktionen der Zellen mit den Knochenersatzstoffen sind als ähnlich häufig, wie auch im Falle des PPGC+S 5:5 zu bewerten und auch hier zeigt sich im Laufe der Zeit eine zunehmende Verteilung des Knochenersatzstoffes. In der größeren Vergrößerung (Abbildung 21) sind dabei am ersten Versuchstag besonders durchsichtige intrazelluläre Vesikel auffällig

sowie die ab Tag vier vermehrt auftretenden kondensierten extrazellulären Vesikel (Abbildung 21, weiße Kreise).

Die Ergebnisse von PPGC+S 3:7 inkubiert mit einem BDNF-haltigen Zellkulturmedium zeigen jedoch bis zum vierten Tag wieder eine zunehmende Dichte des Zellrasens, bevor sie dann bis zum siebten Tag wieder abfallen (Abbildung 20 und 22). Interaktionen der Zellen mit den Partikeln des Knochenersatzstoffes treten auch hier eher vermehrt auf, verglichen mit der Versuchsgruppe ohne BDNF-Zusatz. Die Vitalität und die Größe der knochengesunden MSC sind hingegen als gleichwertig zur Kultur ohne BDNF zu beschreiben (Abbildung 20 und 22). In der höheren Vergrößerung ist hier im Vergleich zu den Bildern der MSC inkubiert ohne BDNF-Zusatz auffällig, dass die beschriebenen extrazellulären Vesikel scheinbar weniger häufig sind (Abbildung 22, weiße Kreise).

In den Versuchen mit PPGS 0:10 ohne BDNF-Zugabe zum Zellkulturmedium zeigt sich bereits ab Tag eins eine deutlich abnehmende Besiedelung mit Zellen. Die Interaktionen der Zellen mit dem Knochenersatzstoff sind dadurch bedingt als eher abnehmend über den Versuchszeitraum zu beschreiben (Abbildung 19 und 21). Zusätzlich sind in der höheren Vergrößerung eine deutlichere Kondensation und sichtbar weniger differenzierte Fortsätze zu erkennen (Abbildung 21).

In den Kulturen mit BDNF ist eine langsamer abnehmende Zelldichte bei PPGS 0:10 zu erkennen im Vergleich zu den Versuchen ohne BDNF (Abbildung 20 und 22). Hier sehen die Zellen inkubiert mit PPGS 0:10 am Tag vier zwar auch bereits angegriffen aus und die Vitalität ist im Vergleich zu den anderen Knochenmaterialien eher geringer, dennoch ist sie mit BDNF eher besser als ohne BDNF-Zusatz. Weiterhin haben die mit BDNF inkubierten Zellen auf PPGS 0:10 Zellfortsätze, welche auch in höheren Vergrößerungen kaum noch zu erkennen sind (Abbildung 22). Unabhängig von der Zugabe von BDNF sind die im Versuch mit PPGC+S 3:7 beschriebenen dichten Vesikel im Fall des PPGS 0:10 auch nicht so zahlreich wie im Versuch mit PPGC+S 3:7.

# ohne BDNF

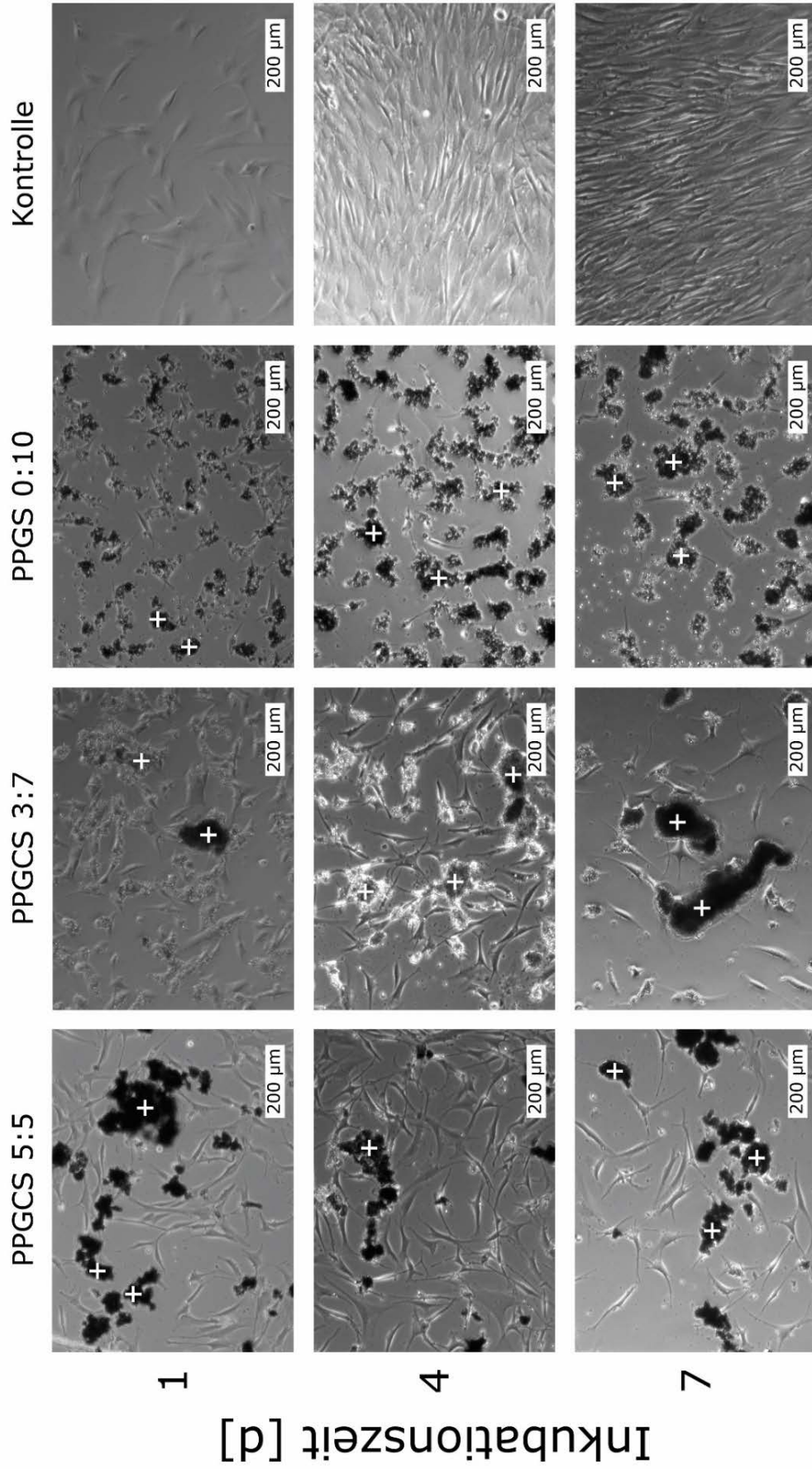


Abbildung 19: Knochengesunde MSC ohne Zugabe von BDNF, mit weißem + gekennzeichnet sind Anteile des Knochenersatzstoffes

# mit BDNF

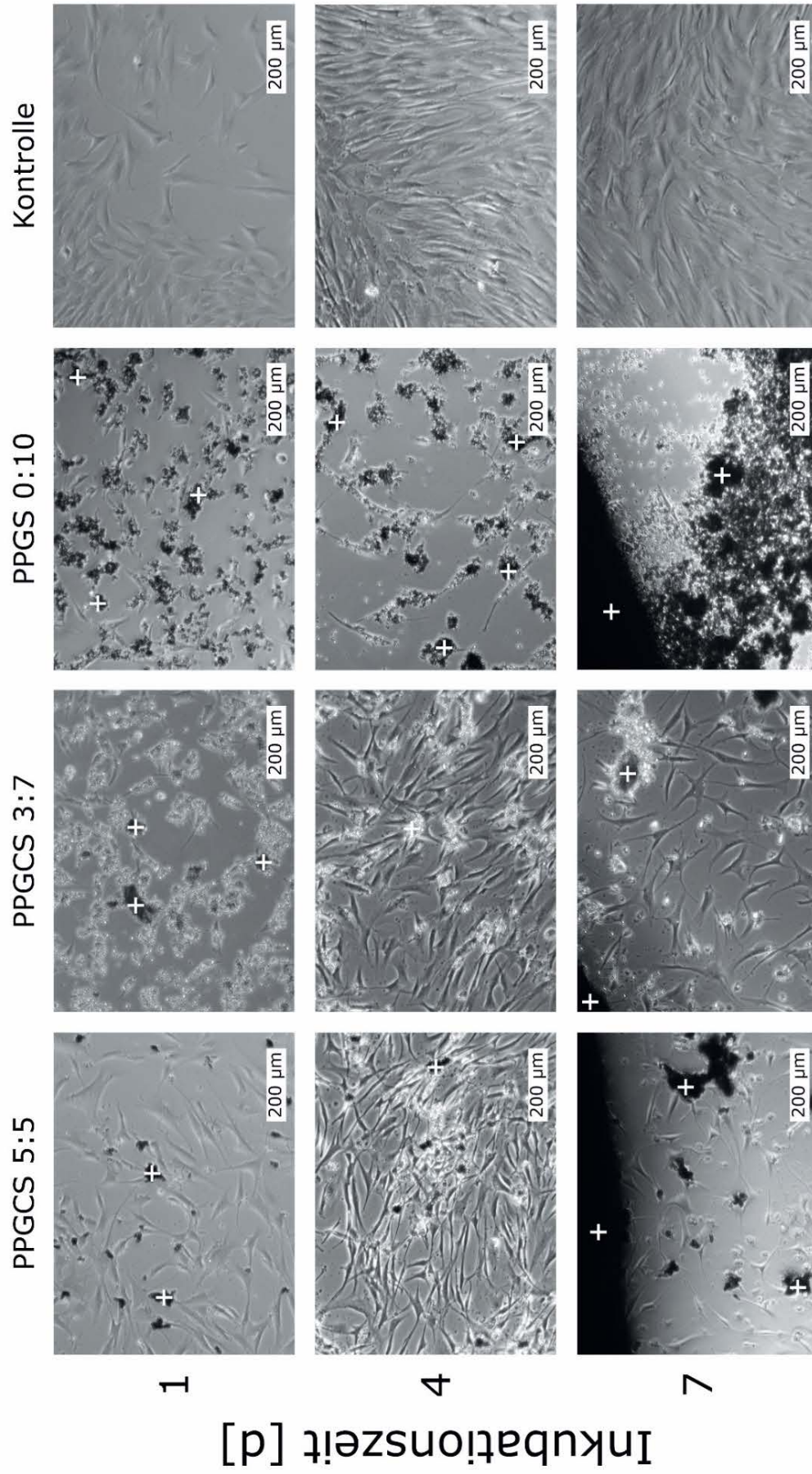


Abbildung 20: Knochengesunde MSC mit Zugabe von BDNF, mit weißem + gekennzeichnet sind Anteile des Knochenersatzstoffes

# ohne BDNF

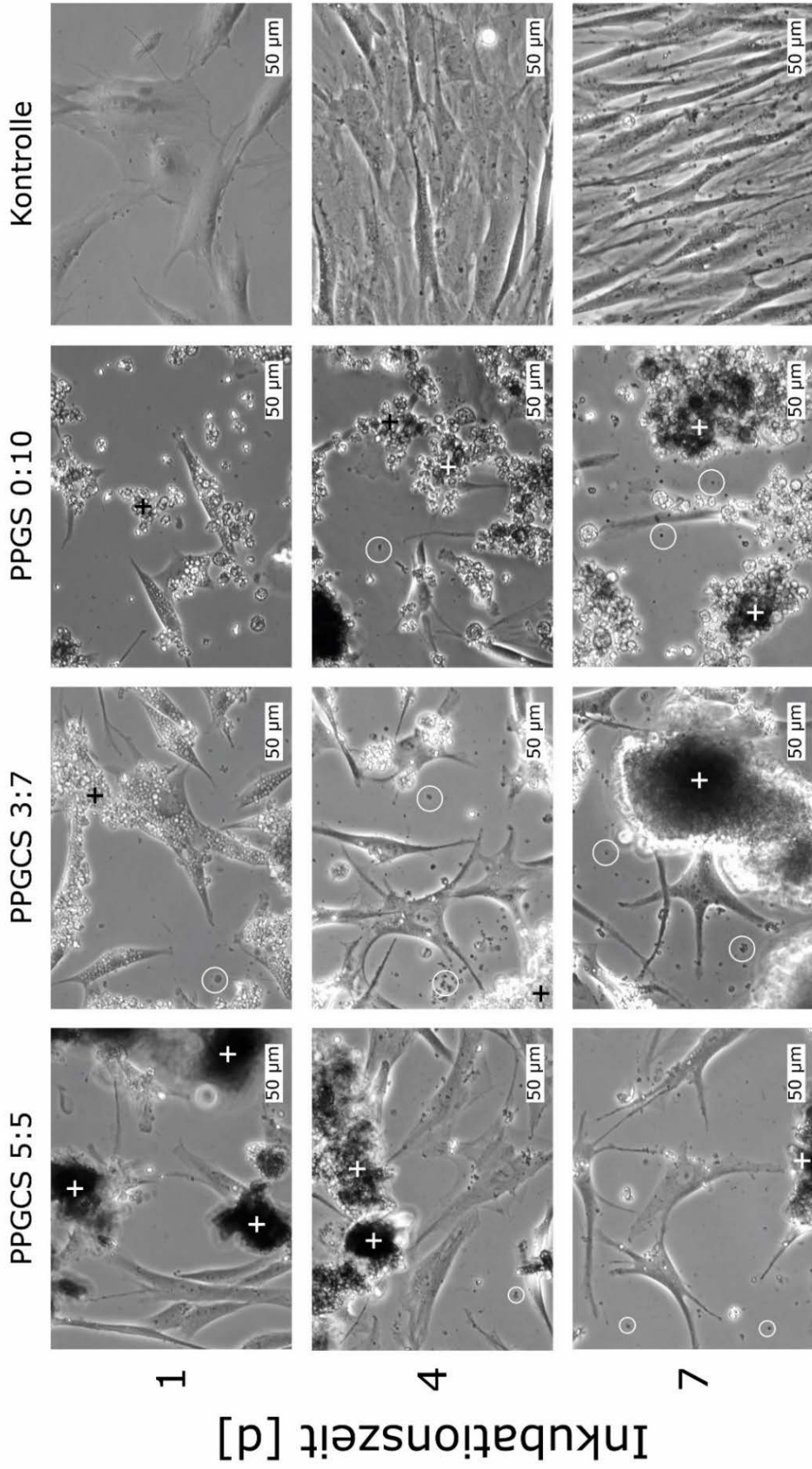
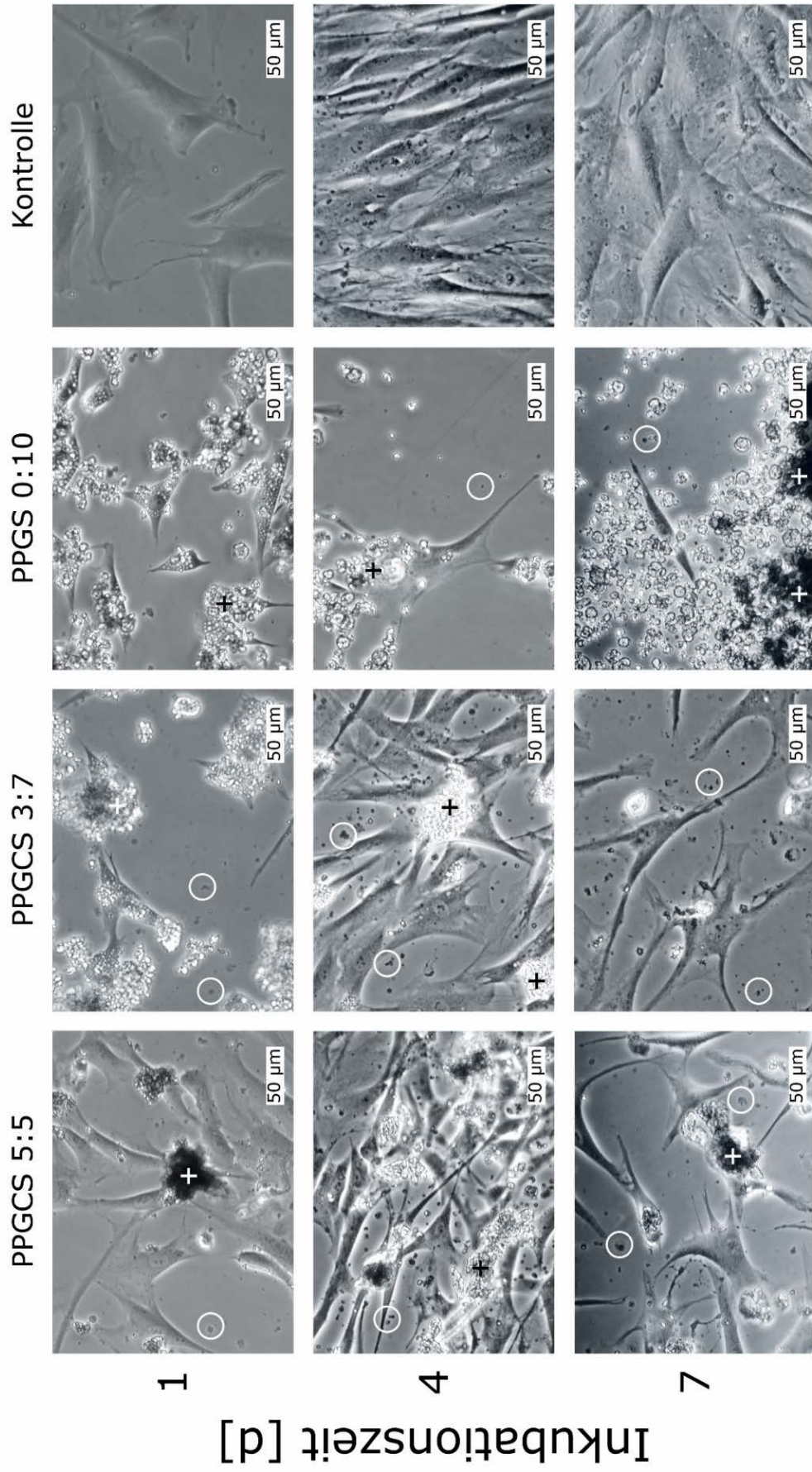


Abbildung 21: Detailaufnahme der knochengesunden MSC ohne Zugabe von BDNF, mit weißem und schwarzem + gekennzeichnet sind Anteile des Knochensatzstoffes, mit weißen Kreisen gekennzeichnet sind die beschriebenen Vesikel

## mit BDNF



Inkubationszeit [d]

**Abbildung 22: Detailaufnahmen der knochengesunden MSC nach Zugabe von BDNF; mit weißem + gekennzeichnet sind Anteile des Knochenersatzstoffes, mit weißen Kreisen gekennzeichnet sind die beschriebenen Vesikel**

#### 4.3.2. Lichtmikroskopie einer osteoporotischen Spenderin

Lichtmikroskopisch zeigte sich bei den MSC der osteoporotischen Spenderinnen im Kontrollversuch ohne Knochenersatzstoff ein Zellrasen, der mit zunehmender Versuchsdauer an Dichte zunimmt. Im Versuch mit BDNF sind an Tag eins deutlich mehr Zellen zu erkennen, als im Versuch ohne BDNF (Abbildung 23 und 24).

Bei Betrachtung des Versuches mit PPGC+S 5:5 fällt auf, dass der Zellrasen bereits an Tag eins und anhaltend für die vollständige Versuchszeit nicht so dicht ist, wie bei den knochengesunden MSC. Dies gilt für die Versuche mit und ohne BDNF. Auch hier sind Interaktionen der osteoporotischen Zellen mit dem Knochenersatzmaterial deutlich zu erkennen ähnlich wie in den Bildern der Versuche mit knochengesunden MSC (Abbildung 23 und 25). Durch die Zugabe von BDNF kommt es zu einer Vermehrung der Interaktionen der osteoporotischen MSC mit PPGC+S 5:5 und es ist auch ein etwas dichter Zellrasen zu erkennen. Außerdem wirken die auf PPGC+S 5:5 inkubierten MSC der osteoporotischen Spenderin mit BDNF größer, als die ohne BDNF inkubierten MSC. Auffällig ist zudem, dass in der größeren Vergrößerung bereits vermehrt dichte Vesikel, die ab Tag eins bis Tag sieben eher zunehmen, zu erkennen sind. Die beschriebenen Vesikel sind bei Zugabe von BDNF etwas häufiger zu beobachten, als ohne die Zugabe von BDNF.

In den Versuchen mit PPGC+S 3:7 und MSC einer osteoporotischen Spenderin ist unabhängig der Zugabe von BDNF im Gegensatz zu den vorher beschriebenen Ergebnissen bereits ab Tag eins eine Abnahme der Zellrasendichte zu erkennen, (Abbildung 23 und 24). Zusätzlich stellt sich ab Tag vier ein Bild mit kondensierten Zellen dar und es sind kaum noch Interaktionen der Zellen mit dem Knochenersatzmaterial erkennbar (Abbildung 25 und 26). Unabhängig davon sind aber für beide Versuchsgruppen noch einige Zellen mit Vitalitätszeichen für alle Versuchstage zu erkennen und zu beschreiben. Die bereits mehrfach beschriebenen Vesikel treten auch hier auf und ähnlich wie bei den Versuchen der osteoporotischen MSC vermehrt in den Versuchen mit BDNF (Abbildung 25 und 26, weiße Kreise). Hierbei nehmen die Vesikel im Zeitraum ab Tag vier bis Tag sieben definitiv nicht weiter zu, sondern sind eher konstant, wenn nicht sogar minimal abnehmend.

Die Versuche mit PPGS 0:10 zeigen bereits an Tag eins einen kaum noch vorhandenen Zellrasen mit Zellen. Bedingt durch eine Kondensierung des Zellplasmas, durch kleine Ausdehnung, keine Ausbildung von Zellausläufern, etc. sehen die Zellen lichtmikroskopisch eher nicht vital aus (Abbildung 23-26). Dieses Bild zeigt sich über alle sieben Tage, jedoch scheint es bis Tag sieben zu einer leichten Erholung der Zellen zu

kommen, da dann die Zellen wieder mehr Zytoplasma in weniger kondensierter Form zeigen und sich wieder Zellausläufer bilden (Abbildung 25). Die Zellen mit viel Knochenersatzmaterialexposition wirken recht avital, obwohl Interaktionen mit dem Knochenersatzstoff sichtbar sind (Abbildung 25 und 26). Ein weiteres Ergebnis ist, dass die Zellen der osteoporotischen Spenderin bis an Tag eins inkubiert mit BDNF-Zusatz vitaler erscheinen, als die Zellen ohne BDNF. Dies kehrt sich jedoch bis zu Tag sieben um, sodass die Zellen der osteoporotischen Spenderin ohne BDNF-Zusatz im Zellkulturmedium eine erhöhte Vitalität zeigen und auch zahlenmäßig mehr nachzuweisen sind, als im Versuch mit BDNF (Abbildung 25 und 26). Die bereits mehrfach beschriebenen kondensierten Vesikel sind wieder nachweisbar und treten vermehrt in den Versuchen mit BDNF auf (Abbildung 25 und 26, weiße Kreise).

# ohne BDNF

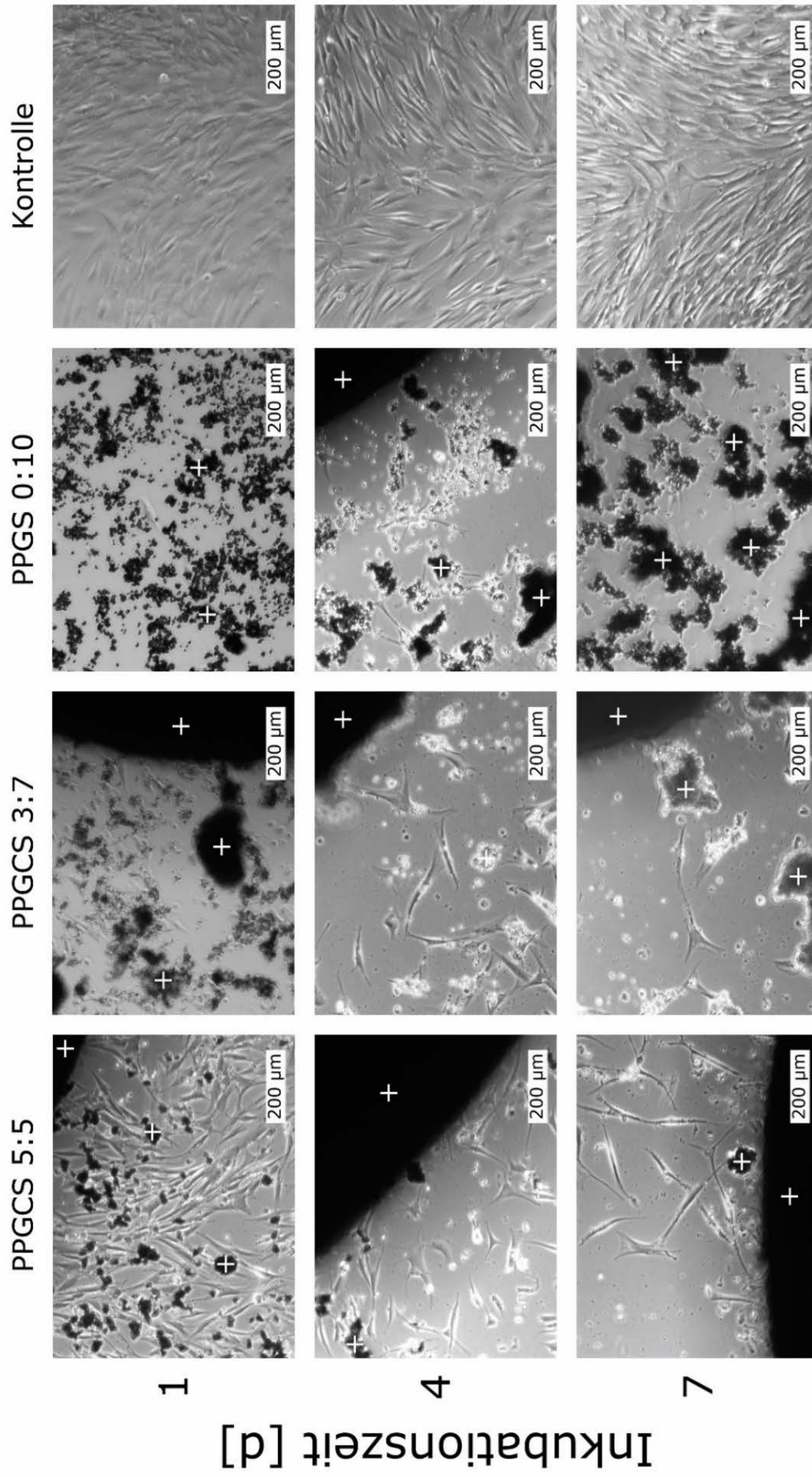


Abbildung 23: Osteoporotische MSC ohne Zugabe von BDNF; mit weißem + gekennzeichnet sind Anteile des Knochenersatzstoffes

# mit BDNF

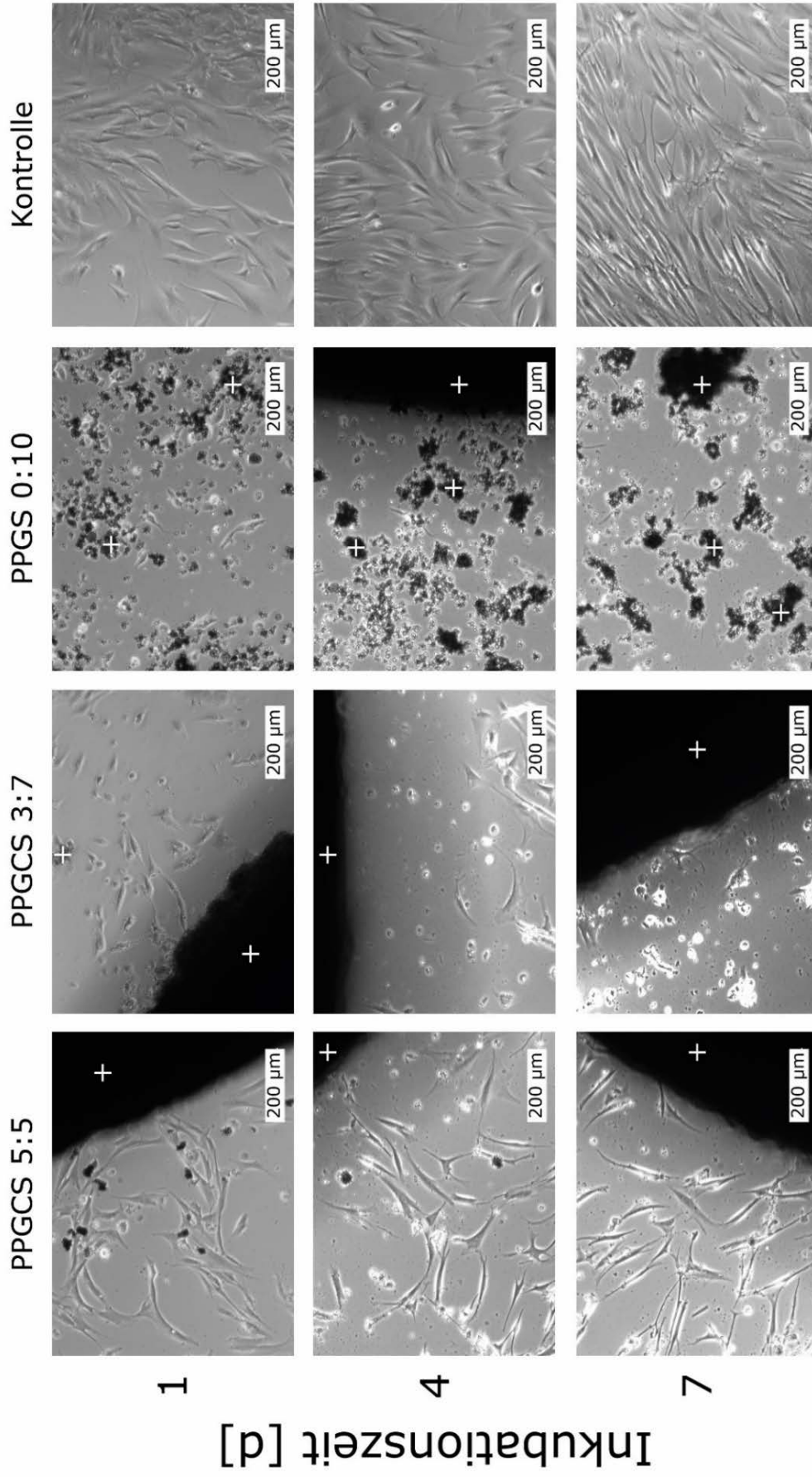


Abbildung 24: Osteoporotische MSC mit Zugabe von BDNF; mit weißem + gekennzeichnet sind Anteile des Knochenersatzstoffes

# ohne BDNF

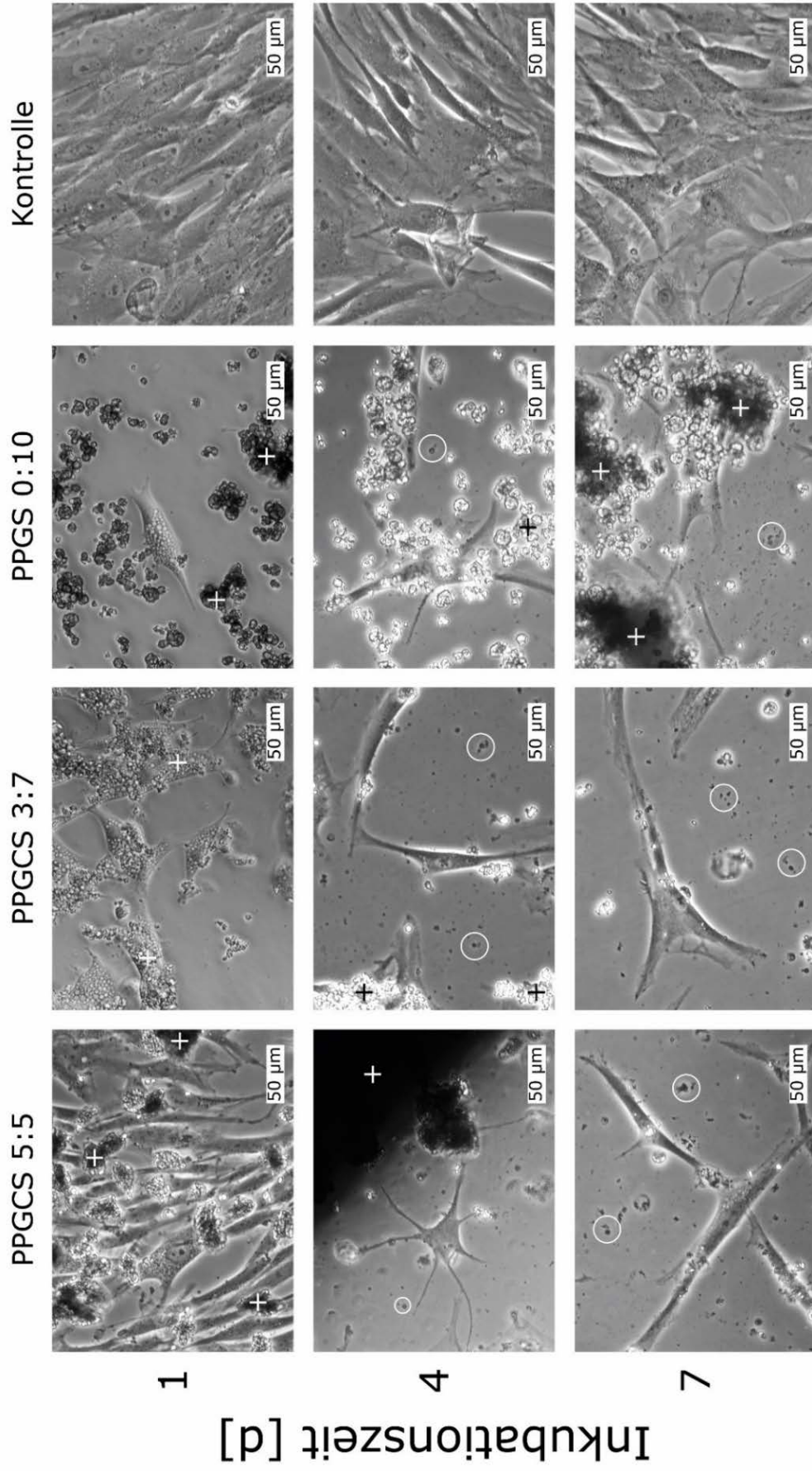
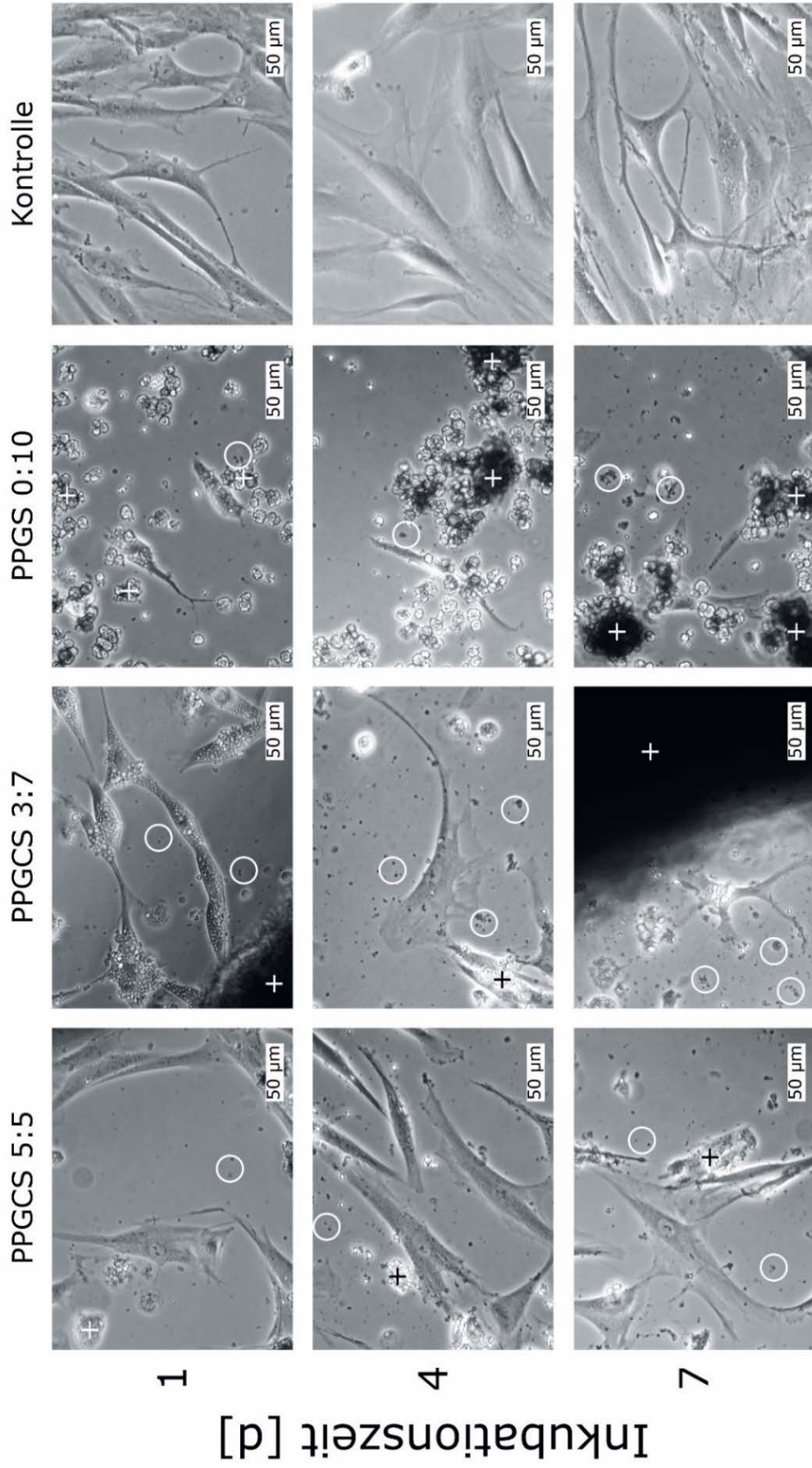


Abbildung 25: Detailaufnahme osteoporotischer MSC ohne Zugabe von BDNF; mit weißem und schwarzem + gekennzeichnet sind Anteile des Knochenersatzstoffes, mit weißen Kreisen gekennzeichnet sind die beschriebenen Vesikel

# mit BDNF



**Abbildung 26: Detailaufnahme osteoporotischer MSC mit Zugabe von BDNF; mit weißem und schwarzem + gekennzeichnet sind Anteile des Knochenersatzstoffes, mit weißen Kreisen gekennzeichnet sind die beschriebenen Vesikel**

## 5. Diskussion

### 5.1. Ergebnisdiskussion

#### 5.1.1. Abhängigkeit des Zelluntergangs vom Knochenstatus

Die vorliegende Studie konnte zeigen, dass alle untersuchten Knochenersatzmaterialien zunächst zu einem Zelluntergang führen. Dabei wird die aufgetretene Apoptose und Nekrose der MSC von den unterschiedlichen Knochenersatzmaterialien und zusätzlich hinzugegebenem BDNF beeinflusst, jedoch nicht vom Knochenstatus der MSC-Spenderinnen. In dieser Studie gab es keine Unterschiede hinsichtlich der Nekrose und Apoptose von MSC in Anbetracht des unterschiedlichen Knochenstatus der Spenderinnen. Somit könnte eine Schlussfolgerung sein, dass knochengesunde und osteoporotische MSC zumindest eine vergleichbare Aktivität und Reaktion auf Zytotoxizität aufweisen.

Jedoch ist die Studienlage zum Thema der Aktivität von MSC in osteoporotischen und knochengesunden Patienten noch Teil einer kontroversen Diskussion, sodass die hier ermittelten Ergebnisse als Hinweise, keinesfalls als Beweise für eine vergleichbare Aktivität von osteoporotischen und knochengesunden MSC gesehen werden dürfen. In mehreren Vorstudien wurden ähnliche Ergebnisse festgestellt, beispielsweise zeigte *Stenderup et al.* bereits 2001, dass sich die proliferative Kapazität und die Anzahl von Osteoprogenitorzellen in knochengesunden und osteoporotischen Patienten nicht signifikant unterscheidet [109]. Hier wurde bereits die These geäußert, dass eine verminderte Knochenbildung bei Patienten mit Osteoporose entweder von einer mangelhaften Rekrutierung von Osteoblasten sowie einer verminderten Differenzierung von MSC oder einer verminderten Osteoblastenaktivität abhängt. Hinsichtlich der Rekrutierung von MSC konnte *Haasters et al. (2014)* nachweisen, dass MSC von Patienten mit Osteoporose deutlich schlechter migrieren [46]. Zusätzlich ist hier auch zu erwähnen, dass Osteoporose meist auch mit erhöhten Serumleveln an proinflammatorischen Zytokinen einhergeht. Hierunter sind beispielsweise auch IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$  assoziiert mit erhöhten Serumleveln für reaktive Sauerstoffverbindungen, welche wiederum eine Differenzierung von MSC in Osteoprogenitorzellen hemmen und eher eine Differenzierung in Adipozyten begünstigen [8,78,97,127].

Die Ergebnisse dieser Studie sind vereinbar mit den genannten Vorergebnissen, da es im Falle von Osteoporose-Patienten nicht um die Zu- oder Abnahme der reinen Zahl von MSC geht, sondern die Differenzierung und Aktivität osteogener Zellen sich von knochengesunden Menschen unterscheidet. Somit sind in Betrachtung der Vitalität als Maß der Aktivität in Kontakt zu den getesteten Knochenersatzstoffen keine Unterschiede

hinsichtlich der osteoporotischen und knochengesunden MSC zu erwarten. Ob diese Daten aus Voruntersuchungen jedoch auch die hier beschriebene vergleichbare Reaktion auf Zytotoxizität untermauern, ist aufgrund der unterschiedlichen Methoden zu hinterfragen. Zur Bestätigung dieser These sollten hierzu weitere Untersuchungen in Zukunft durchgeführt werden. Die genannten Beobachtungen hinsichtlich der verminderten Differenzierung, bedingt durch vermehrte Konzentration von proinflammatorischen Zytokinen passten auch zu den Risikofaktoren einer Osteoporose, welche meist mit einer chronischen Inflammation assoziiert sind. Hier sind beispielsweise arterielle Hypertension, Diabetes Mellitus, aber auch rheumatoide Arthritis und ein systemischer Lupus erythematodes zu nennen [10,18,78]. Hieraus kann eine verminderte Differenzierung von MSC in von Osteoporose Betroffenen als auch ein Pathomechanismus zur Entwicklung einer Osteoporose abgeleitet werden. Dennoch sind die Pathomechanismen weiterhin klärungsbedürftig und Gegenstand aktueller Forschung, da die Regulation der Differenzierung von MSC von mehreren Faktoren abhängt und einige Interleukine, wie auch IL-6 und IL-1 sowohl bei der Differenzierung von MSC zu Osteoblastenprogenitorzellen oder Adipozyten als auch bei der Rekrutierung von MSC eine Rolle spielen sowie bei der Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen zu Osteoklasten [3,24].

#### 5.1.2. Wirkung und Vergleich der unterschiedlichen Knochenersatzstoffe

Durch die Betrachtung von Apoptose und Nekrose von MSC im Umfeld der getesteten Knochenersatzstoffe sollten weitere Daten hinsichtlich einer Integration der Knochenersatzstoffe in das Knochengewebe zusammengetragen werden. Dies diene vor allem der weiteren Unterscheidung und Evaluierung der Knochenersatzstoffe, da unter Umständen einige der Knochenersatzstoffe durch geringere Zytotoxizität besser geeignet sind als andere. In dieser Studie zeigte sich, dass in vielen Versuchen mit knochengesunden und osteoporotischen Zellen das PPGC+S 5:5 zu einem geringeren Zelluntergang durch Nekrose führt als PPGC+S 3:7 und PPGS 0:10. Diese Effekte konnten auch in den Versuchen mit BDNF-Zusatz vermehrt beobachtet werden. Hinsichtlich des apoptotischen Zelluntergang ist festzustellen, dass PPGC+S 3:7 den geringsten Zelluntergang zeigte, die Unterschiede waren jedoch meist nur zwischen PPGC+S 3:7 und PPGS 0:10 statistisch signifikant. Zusammenfassend ist damit zu erwähnen, dass mit einer ansteigenden Konzentration von Strontium im Knochenersatzstoff der nekrotische Zelluntergang scheinbar zunimmt, sodass PPGS 0:10 in fast allen Fällen die stärkste Nekrose auslöst und PPGC+S 5:5 zur geringsten Nekrose führt. Bei der Apoptose stellt es sich so dar, dass PPGC+S 3:7 in fast allen Fällen eine geringere Apoptose auslöst als die beiden anderen

Knochenersatzmaterialien. Diese Ergebnisse waren durch die Häufigkeit der oben beschriebenen Vesikel und die Messwerte des Assays zu schlussfolgern, da beide Methoden eine Aussage über die Häufigkeit von Apoptose und Nekrose zulassen [31].

Aus diesen Studienergebnissen kann geschlussfolgert werden, dass hinsichtlich der Apoptose und Nekrose eine Überlegenheit der beiden calciumhaltigen Knochenersatzstoffe festzustellen ist im Vergleich zum lediglich Strontium enthaltenden PPGS 0:10. Aufgrund der Unterschiede von PPGC+S 5:5 und PPGC+S 3:7 scheint das PPGC+S 5:5 dem PPGC+S 3:7 hinsichtlich der Gesamtzytotoxizität überlegen, auch wenn PPGC+S 5:5 zu einer vermehrten Apoptose führt. Von den hier getesteten Knochenersatzstoffen scheint PPGC+S 5:5 der am wenigsten zytotoxische Knochenersatzstoff zu sein. Begründung hierfür könnten die von *Verbeckmoes et al. (2003)* postulierten Störungen der kristallinen Struktur und Veränderung des lokalen chemischen Milieus durch einen erhöhten Strontiumanteil im Knochenersatzstoff sein [121]. Diese Arbeit stützt diese These dahingehend, dass auch hier mit höherem Strontiumanteil ein vermehrter Zelluntergang und eine verminderte Zellvitalität sichtbar und messbar waren. Ähnliche Ergebnisse zeigte auch die Arbeit von *Andersen et al. (2013)*, der bis zu einer gewissen Konzentration eine Zunahme der proliferativen Aktivität von Zellen beschrieb, darüber hinaus es jedoch zu einer Abnahme der Dichte des beschriebenen Zellrasens, wie in den hier durchgeführten Experimenten, kam [4]. Hier können jedoch die Schlussfolgerungen aus *Andersen et al. (2013)* in einem gewissen Maß widerlegt werden. *Andersen et al.* sah die abnehmende Dichte des Zellrasens in Effekten der Differenzierung und nicht des Zelluntergangs begründet, welcher hier jedoch dargestellt werden konnte.

Daher wurden die beschriebenen dichten Vesikel (Abbildung 21, 22, 25 und 26) als Apoptosevesikel gedeutet und beschrieben. Dies beruht auf dem Nachweis von aufgetretener Apoptose durch das entsprechende Assay, welcher erst nach der Lyse einer den Vesikel umgebenden Membran stattfinden konnte. Die beschriebenen Vesikel wurden hier jedoch nicht einzeln untersucht, sodass lediglich die Dichte der Vesikel und der Nachweis der Apoptose durch das Assay zu der Beschreibung als Apoptosevesikel führten. Gestützt wird diese These durch andere Beschreibungen von Apoptosevesikeln als besonders dichte, jedoch kaum Zytoplasma enthaltende Vesikel umgeben von einer Art Zellmembran [2,57,66]. Eine weitergehende Untersuchung der hier beschriebenen Vesikel wäre in Zukunft jedoch interessant, um die Bezeichnung als Apoptosevesikel zu verifizieren, da ähnliche Vesikel auch im Rahmen des Knochenstoffwechsels und der Differenzierung von Zellen auftreten [2]. Zusätzliche könnte durch die Analyse der beschriebenen Vesikel unter Umständen dargestellt werden, ob weiterhin Anteile der

genutzten Knochenersatzstoffe nachweisbar sind und durch neue Verfahren könnte es gegebenenfalls möglich sein über den Nachweis von noch vorhandenen Zellorganellen auf den Auslöser der Apoptose schließen zu können [135]. Zusätzlich sind mittlerweile Wirkungen von Apoptosevesikeln auf die Systeme des menschlichen Körpers beschrieben, sodass gegebenenfalls auch regulierende Wirkungen auf MSC in Zukunft evaluiert werden könnten [135].

Ein weiterer Einflussfaktor hinsichtlich der Überlegenheit des PPGC+S 5:5 könnte im lokalen chemischen Milieu begründet liegen. So konnte bereits *Kruppke et al. (2021)* einen Einfluss von PPGC+S auf den lokalen pH-Wert und damit das chemische Milieu verdeutlichen [62]. Gestützt wird diese These durch Daten von *Shen et al. (2012)*, der einen deutlichen Effekt von strontiumhaltigen Knochenersatzstoffen auf das pH-Milieu assoziiert mit einem vermehrten Untergang von Zellen zeigen konnte [103]. Zusätzlich stützen auch die Untersuchungen von *Borcianni et al. (2021)* die These des weniger zytotoxischen Milieus bei einer geringeren Konzentration von Strontium [17]. Dort wurden, um eine potentielle Zytotoxizität durch Strontium auszuschließen, Experimente mit Zellkulturmedium durchgeführt, welches bereits dem strontiumhaltigen Knochenersatzstoff ausgesetzt war. Dabei zeigte sich bei den größten Konzentrationen des Strontiums eine Abnahme der intakten Zellen und bei den Lösungen mit größeren Verdünnungen jedoch kein Unterschied hinsichtlich der Zellvitalität im Vergleich mit der Kontrollgruppe [17]. Insgesamt erwecken die Ergebnisse hier den Eindruck einer Zytotoxizität abhängig von der Strontiumkonzentration oder Strontiumdosis, wie sie schon mehrfach beobachtet wurden. Neben den bereits genannten Vordaten konnte beispielsweise auch *Schumacher et al. (2016)* eine dosisabhängige Wirkung des Strontiums zeigen. Hier wie in *Schumacher et al. (2016)* zeigte sich bis zu einem Wendepunkt eine zunehmende Zellzahl in Kontakt mit strontiumhaltigen Knochenersatzstoffen, die dann jedoch ab einer Grenzkonzentration in eine signifikante Abnahme der Zellzahl umschlug [101].

Ähnliche Ergebnisse, wie diese hier, wurden auch von *Kruppke et al. (2019)* für einen Versuch mit durchgeführter osteogener Differenzierung von Zellen aus MSC und peripheren mononuklearen Zellen des Blutes bereits publiziert [64]. Neben einer dort durchgeführten osteogenen Differenzierung der Zellen war in den Untersuchungen von *Kruppke et al. (2019)* auch nicht der Zelluntergang die primär erhobene Untersuchungsgröße, sondern die Adhäsion und Proliferation der differenzierten Zellen. *Kruppke et al. (2019)* untersuchte seine Proben daher mit einem LDH-Test, ALP-Test zur Einschätzung der osteogenen Differenzierung, *real-time PCR* und durch Fluoreszenzmikroskopie [64]. Zusätzlich wurden durch *Kruppke et al. (2019)* neben den

auch hier untersuchten Knochenersatzstoffen auch noch PPGC ohne Zugabe von Strontium, untersucht. Dabei konnte *Kruppke et al. (2019)* nicht nur die durch Zugabe von Strontium veränderte kristalline Struktur für die hier getesteten Knochenersatzstoffe zeigen, sondern auch die größte Proliferation und Differenzierung der Zellen in Verbindung mit PPGC+S [64]. Durch die Zunahme der Zytotoxizität der getesteten Knochenersatzstoffe durch die oben beschriebenen Mechanismen konnte hier zusätzlich ein Effekt in Abhängigkeit von der Konzentration des Strontiums gezeigt werden. Als ein Maß der Biokompatibilität konnte der untersuchte Zelluntergang durch Apoptose und Nekrose zeigen, dass durch die Zugabe von Strontium unterschiedliche Biokompatibilitäten der getesteten Knochenersatzstoffe zu erwarten sind. Diese These wird unterstützt durch die Untersuchungen von *Zhang et al. (2011)*, in denen festgestellt wurde, dass Strontium eine Schlüsselrolle in der Biokompatibilität und Bioaktivität von Implantaten einnehmen könnte [137]. Die hier gemessene Zytotoxizität ist dabei nur ein Anhaltspunkt für die Biokompatibilität der Knochenersatzstoffe und damit nicht als direkter Parameter für die Biokompatibilität zu werten. Dennoch konnte auch hier in gewissen Maßen eine Abhängigkeit der Zytokompatibilität von der Konzentration des Strontiums in den verwendeten Knochenersatzstoffen dargestellt werden. Dabei ist zu erwähnen, dass auch erhöhte Raten von Apoptose und Nekrose als erhöhte Bioaktivität gewertet werden können, da beispielsweise im Rahme einer Differenzierung immer eine Selektion von Zellmaterial eintritt.

Im Zusammenhang dieser Ergebnisse mit den weiteren lichtmikroskopischen Aspekten unserer Ergebnisse, welche vor allem bei PPGC+S 5:5 und etwas weniger bei PPGC+S 3:7 auf eine vermehrte Proliferation von MSC hindeuten, zeigen die hiesigen Daten für eben jene Knochenersatzstoffe einen verminderten Zelluntergang. Diese mikroskopischen Beobachtungen, unterstützt durch den gemessenen signifikant geringeren Zelluntergang, sind gleichbedeutend mit einem erhöhten Zellüberleben an den Knochenersatzstoffen PPGC+S 5:5 und PPGC+S 3:7 im Vergleich zu PPGS 0:10. Daten für ein vermehrtes Zellüberleben an strontiumhaltigen Knochenersatzstoffen sind bereits vielfach publiziert [16,22,28]. Dennoch sind die Ergebnisse hinsichtlich der proliferativen Tätigkeit von MSC in Verbindung mit Strontium nicht ganz eindeutig, da es auch immer wieder Studien gab, welche eher eine verminderte Proliferation von MSC in Verbindung mit Strontium feststellten. Die beobachteten proosteogenen Effekte der strontiumhaltigen Materialien wurden in diesen Studien jedoch eher auf eine vermehrte Differenzierung von Zellen zurück geführt [68,126]. Übereinstimmend sind dennoch die Ergebnisse hinsichtlich der Dosisabhängigkeit der proosteogenen Aktivität von Strontium [40,51]. Diese Daten stehen jedoch keinesfalls im Gegensatz zu den hier

gemachten Beobachtungen, da eine Differenzierung von Zellen auch immer mit einer Selektion und damit einem Zelluntergang einhergehen [102,116]. Dennoch sind die hier gewonnenen Daten nur bedingt für eine Einordnung hinsichtlich der proosteogenen Aktivität von strontiumhaltigen Knochenersatzmaterialien geeignet, da die durchgeführten Tests lediglich eine Bewertung eines Aspektes der Zytokompatibilität bieten. Die Einordnung in das Bild der proosteogenen Aktivität der getesteten unterschiedlichen Knochenersatzstoffe war nicht das Ziel der hier durchgeführten Versuche. In Untersuchungen anderer Publikationen sind Knochenersatzstoffe, wie die hier getesteten, bereits mehrfach auf die proosteogene Aktivität untersucht wurden. Dabei stellte sich mehrfach dar, dass eine Addition von Strontium zu Knochenersatzstoffen zu einer vermehrten Bildung neuen Knochens führte [81,93,123]. Diese Ergebnisse sind zum einen definiert durch ein erhöhtes Volumen von neuem Knochen wie beispielsweise in *Vestermark et al. (2011)*, zum anderen bestätigen auch die Ergebnisse von *Rohnke et al. (2017)* diese These, der eine deutlich verminderte Knochenresorption durch Strontiumionen zeigen konnte [96]. Eine verminderte Knochenresorption durch eine Inhibierung der Osteoklasten in Kontakt mit strontiumhaltigen Knochenersatzmaterialien konnte auch *Schumacher et al. (2016)* feststellen [101]. Jedoch zeigte sich auch dort eine dosisabhängige Wirkung, wie schon oben erwähnt, bis zu einem Wendepunkt, ab dem eine signifikante Abnahme der Zellzahl in Kontakt mit strontiumhaltigen Knochenersatzmaterial stattfand [101].

Zuletzt sollte noch erwähnt werden, dass auch durch Strontium eine Senkung von proinflammatorischen Stoffen erreicht wird, insbesondere von IL-6 [84]. Durch eine Quervernetzung aller Stoffwechselwege im Körper könnte die oben beschriebene Migration von MSC und deren Differenzierung beeinflusst werden, sowie beispielsweise eine erhöhte Gefahr von bakteriellen Infektionen auftreten. Einschränkend sollte hier erwähnt werden, dass es sich bei allen beschriebenen Knochenersatzmaterialien nicht nur um wie hier getestete Phosphat-prästrukturierte Gelatine Testkörper handelte, sondern auch andere Knochenersatzstoffe mit einer Strontiumphase in die Betrachtung mit einbezogen wurden. Insgesamt zeigt sich durch die aufgeführten Vordaten und die hier neu gewonnenen Ergebnisse, dass die Addition von Strontium zu Knochenersatzstoffen eine Wirkung auf den Knochenmetabolismus *in vivo* und *in vitro* hat. Durch die hier gewonnenen Daten wird verdeutlicht, dass weiterhin an der Findung einer optimalen Dosierung von Strontium geforscht werden sollte, da sonst gegebenenfalls negative Effekte der Knochenersatzstoffe beispielsweise durch den hier untersuchten Zelluntergang überwiegen. Zusätzlich ist weiterhin die Frage offen, ob eine lokale Administration von Strontium beispielsweise durch Knochenersatzstoffe zu

systemischen Effekten führt. Lediglich *Rohnke et al. (2017)* führte dazu bereits simulierende Untersuchungen durch, nahm dabei aber an, dass kein Effekt des lokal eingebrachten Strontiums im Gesamtsystem entsteht [96]. Für andere Knochenersatzstoffe ist jedoch bereits seit längerem bekannt, dass sie sowohl direkt nach Einbau, als auch teilweise noch Jahre nach der Implantation zu erhöhten Serumleveln ihrer Bestandteile wie beispielsweise Titan oder Cobalt führen [53,54,67]. Der Nachweis ob und wie lang dies für Strontium der Fall ist, ist allerdings weiterhin zu erbringen und ist, wie auch die anderen beschriebenen Wirkungen von Strontium, im Rahmen von weiteren Versuchen und der Erhebung von Sicherheitsdaten zu untersuchen [84]. Da weiterhin viele Fragen hinsichtlich der Biokompatibilität oder anderer Funktionen, wie einem *drug-delivery* System bisher nicht vollständig zu beantworten sind, bieten Knochenersatzstoffe in Zukunft ein bedeutendes Forschungsfeld [16,92].

#### 5.1.3. Beeinflussung von MSC durch BDNF

Die beschriebenen Experimente konnten zusätzlich nachweisen, dass auch BDNF einen positiven Einfluss auf den Zelluntergang von MSC in Kontakt mit calcium- und strontiumhaltigen Knochenersatzstoffen hat und durch die Zugabe von BDNF sowohl der apoptotische und nekrotische Zelluntergang vermindert werden können. Hier scheint der Effekt des BDNF sich vermehrt in der Reduktion der Nekrose von MSC zu äußern, da hierfür deutlich häufiger signifikante Unterschiede gefunden wurden. Diese Reduktion des Zelluntergangs konnte in dieser Studie sowohl für MSC von osteoporotischen Spenderinnen und knochengesunden Spenderinnen mehrfach gezeigt werden.

Die Auswirkungen von BDNF auf den Zelluntergang sind bisher nicht vermehrt beschrieben, allerdings sind Daten vorhanden, die die hier erhobenen Ergebnisse stützen. Am deutlichsten wird dies in der Publikation von *Liu et al. (2018)*, in welcher festgestellt wurde, dass die Zugabe von BDNF zumindest keine negativen Auswirkungen auf das Zellwachstum haben [70]. Zusätzlich zeigen auch Untersuchungen von Frakturstellen einen vermehrten Nachweis von BDNF in der Umgebung der Fraktur und sprechen dadurch für einen Einfluss von BDNF auf die Frakturheilung oder gar auf MSC. *Brohlin et al. (2012)*, *Su et al. (2018)* und *Taghi et al. (2012)* konnten alle BDNF oder andere NT im Knochenmark nachweisen. Andere Studien zeigten, dass durch NT die Differenzierung und Proliferation von Zellen im Knochenmark beeinflusst wird [19,114,117,118]. Dabei scheint BDNF jedoch nicht immer positive Auswirkungen auf die Knochenbildung zu haben, wie von *Kauschke et al. (2018)* oder *Kilian et al. (2014)* beschrieben. Es gibt auch Daten für eine Mitwirkung von BDNF an der

Knochendestruktion durch multiple Myelome und auch andere Arbeiten beschreiben eine Auswirkung auf die Differenzierung von Osteoklasten [1,56,58,115]. Hierfür sprechen auch die von *Feng et al. 2018* publizierten Daten, die eine Inhibition der Stammzellendifferenzierung durch körpereigene Bildung von BDNF und die damit einhergehende Produktion der BDNF-AS-RNA nachweisen [36]. In Zusammenschau dieser gegensätzlichen Ergebnisse lässt sich letztlich schlussfolgern, dass weitere Untersuchungen zur Wirkung von BDNF auf den Knochen nötig sind, um gegebenenfalls auftretende Gefahren durch BDNF im Körper auszuschließen. Zudem sollte untersucht werden, ob es durch die exogene BDNF-Zufuhr dennoch zu dem zuletzt geschilderten Effekt der verminderten Differenzierung von MSC kommt oder aber dieser Effekt ausbleibt.

Hinsichtlich der Auswirkung von BDNF ist außerdem noch kein eindeutiger Mechanismus der intrazellulären Wirkung bekannt, auch wenn, wie bereits in der Einleitung erwähnt, die zwei Rezeptoren TrkB und p75NTR bekannt sind. So konnten *Rezaee et al. (2010)* die These aufstellen, dass BDNF zu einer erhöhten IL-6 Expression führt und hierdurch ein Einfluss auf die Knochenstruktur entstehen könnte. Zusätzlich konnte *Sharma et al. (2021)* zeigen, dass durch die Zugabe von BDNF bei bestrahlten Knochen die Regeneration schneller abläuft [95,102]. Interessant daran ist, dass *Sharma et al. (2021)* durch einen gezielten TrkB Stimulator, 7,8-Dihydroxyflavon, eine sehr ähnliche Wirkung aufzeigen konnte und es durch die Stimulation des TrkB Rezeptors von MSC zu einer vermehrten Ausschüttung von beispielsweise IL-6 kommt, wodurch die Erholung der Myelosuppression nach Bestrahlung schneller stattfindet, als ohne Zugabe derartiger Substanzen [102]. Andere Studien jedoch postulieren eine ebenso vorhandene antiinflammatorische Komponente der BDNF-Wirkung [56,132]. Hier ist beispielsweise auf *Kauschke et al. (2018)* zu verweisen, wo nachgewiesen wurde, dass es durch die Zugabe von BDNF zur Reduktion proinflammatorischer Moleküle und Zellen kommt. Daraus könnten gegebenenfalls vermehrt Komplikationen hinsichtlich Infektionen entstehen [56]. Andererseits könnten durch die oben bereits geschilderten Signalwege der MSC-Migration eine niedrigere Rekrutierung von MSC und anderen Zellen der inflammatorischen Phase stattfinden. In der Folge würden unter Umständen nicht genügend MSC zur Verfügung stehen, um eine ausreichende zelluläre Differenzierung und Proliferation zur Neoosteogenese sicherzustellen.

Eine Studie, welche alveolares Epithel nach einer Lungenverletzung betrachtete, zeigte, dass BDNF über den benannten TrkB Rezeptor eine Erholung des Epithels bewirkte, sodass auch dies ein Indiz für eine Funktion des BDNF bei der Erholung von Gewebe ist [86]. Weiterhin scheinen auch andere NT proosteogene Wirkungen zu haben, da

beispielsweise auch für NT-3 nachgewiesen wurde, dass es die Expression von BMP, vor allem BMP-2 induziert und damit die osteogene Differenzierung unterstützt. Zusätzlich zeigte sich bei NT-3, wie auch bei BDNF eine erhöhte Kapillarisation und schnellere Wundheilung an der Frakturstelle [113]. Aus den Ergebnissen dieser Studie lässt sich zudem schlussfolgern, dass der Vorteil durch BDNF nicht erst nach einiger Zeit, sondern bereits direkt nach der Nutzung des Pharmakons entsteht, da signifikante Unterschiede bereits ab dem ersten Versuchstag nachweisbar waren. Andere Studien belegen auch diese Ergebnisse, insbesondere *Rezaee et al. (2010)* konnte nachweisen, dass bereits direkt nach BDNF-Zugabe die intrazellulären Signalwege stimuliert werden [95,102]. Hinsichtlich der Apoptose wurde eine Verminderung des Zelluntergangs durch die Zugabe von BDNF nachgewiesen. Hier zeigen andere Forschungsergebnisse jedoch diesen Ergebnisse konträr einen erhöhten Zellumsatz und erklären diesen mit einer zunehmenden Differenzierung der Zellen [102,115]. Der von anderen Forschungsgruppen beobachtete vermehrte Zellumsatz bezieht sich jedoch im Vergleich zu dieser Studie meist auf differenzierte Zellen, sodass durch die Verwendung von MSC auch eine verminderte Apoptose erklärt sein könnte. Daten hierzu wurden bisher nicht publiziert. Weiterhin ist festzustellen, dass sich der BDNF-Effekt auch in den Kontrollgruppen zeigt und auch als signifikant zu bezeichnen ist. Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass BDNF einen positiven Einfluss auf das Zellüberleben von MSC haben sollte und daher auch zu einer besseren Osseointegration von Fremdkörpern, wie beispielsweise Knochenersatzstoffen, beitragen könnte.

Insgesamt ist festzustellen, dass deutlich mehr Daten aus präklinischer Forschung über BDNF bereits vorliegen, sodass es mittlerweile eine Vielzahl von Hinweisen auf die Effektivität von BDNF hinsichtlich der Behandlung einer Osteoporose gibt [58,70,138]. Neben den bereits beschriebenen präklinischen Daten sind auch klinische Daten aus Beobachtungsstudien vorhanden, in denen *Nose et al. (2019)* beispielsweise eine Korrelation der Knochendichte mit den zu messenden Serumleveln von BDNF bei Patientinnen zeigen konnten [85]. Zusätzlich publizierte *Yang et al. (2017)* Daten der Analyse von SNPs im BDNF-Gen und konnte einige der analysierten SNPs mit einer Osteoporose assoziieren [134]. Aus den vorliegenden Daten präklinischer und klinischer Studien könnte geschlussfolgert werden, dass mit BDNF ein wirksames Pharmakon als Therapie der Osteoporose gefunden ist. Jedoch fehlen bisher weitere Sicherheitsdaten um Interaktionen von BDNF, wie beispielsweise im Falle des multiplen Myeloms beschrieben, zu vermeiden. Auf der anderen Seite muss zusätzlich ein geeignetes Trägersystem für die Verabreichung von BDNF gefunden werden. Als Trägersysteme wurden bisher in präklinischen Studien meist funktionalisierte, also mit BDNF versetzte

Knochenersatzmaterialien verwendet, wodurch eine höhere Konzentration des BDNF in ossären Defekten erreicht werden konnte [56]. Wie bei Strontium könnten sich bei einer systemischen Administration im Gegensatz zu einer lokalen Freisetzung dann auch systemische und somit vermehrt unerwünschte Effekte ergeben, so wie es bei Strontium-Ranelat der Fall war [94]. Hieraus ergibt sich für die Abgabe von BDNF das zusätzliche Problem, dass auch die in den Versuchen genutzten Knochenersatzmaterialien noch Teil von Untersuchungen sind und damit keine bereits zur Verfügung stehende Applikationsmethode darstellen. Im Moment sind damit die beiden Probleme der Verabreichung und der zu testenden Sicherheit noch zu lösen. Wenn in Zukunft jedoch sowohl eine geeignete Administration von BDNF gefunden wird und ausreichend Sicherheitsdaten vorliegen, könnte BDNF für die Behandlung von Osteoporose bei Patienten und Patientinnen an Bedeutung gewinnen.

#### 5.1.4. Zusammenfassung der Ergebnisse

Durch die in dieser Studie erlangten Erkenntnisse hinsichtlich des unterschiedlichen Zelluntergangs von MSC in Abhängigkeit des hinzugegebenen Knochenersatzstoffes oder von zusätzlichem BDNF, scheinen die getesteten Knochenersatzstoffe für weitere Untersuchungen, gegebenenfalls auch mit einer BDNF-Funktionalisierung, geeignet zu sein. Zu ähnlichen Ergebnissen ist, wie oben bereits erwähnt, auch *Kruppke et al.* in mehreren anderen Untersuchungen der getesteten Knochenersatzstoffe gekommen [63,64]. Auch bereits durchgeführte Kleinterversuche mit den hier getesteten Knochenersatzmaterialien zeigten positive Auswirkungen auf Zellen des Knochens und auf die Knochenstruktur und bieten somit vielversprechende Ansätze [63]. Dennoch zeigten die Ergebnisse dieser Studie, dass durch den ausgelösten Zelluntergang insbesondere PPGC+S 5:5 insgesamt günstiger erscheint als PPGS 0:10, eben durch die beschriebene Dosisabhängigkeit eines Effektes durch Strontium. Auch die hier beobachteten positiven Effekte von BDNF konnten bereits mehrfach in Studien nachgewiesen werden, sodass die hier dargestellten Ergebnisse durch frühere Arbeiten unterstützt werden können [56,58]. Die hier durchgeführten Experimente mit den getesteten Knochenersatzstoffen scheinen Behandlungsansätze für Menschen mit Osteoporose zu bieten, allerdings ist zu beachten, dass auf der Ebene der Zytotoxizität sich die Knochenersatzstoffe nicht als gleichwertig herausgestellt haben. Hier soll erneut erwähnt sein, dass die erhobenen Daten PPGC+S 5:5 als den geeignetsten Knochenersatzstoff für weitere Untersuchungen darstellen. PPGS 0:10 hingegen löste in diesen Untersuchungen vor allem deutlich vermehrt Nekrose aus, sodass ein Implantatversagen in *in vivo* Versuchen für PPGS 0:10 möglich erscheint. Daher sind weitere Untersuchungen hinsichtlich der Verwendbarkeit der hier getesteten

Knochenersatzstoffe nötig, um ihre Wirkung in der Therapie der Osteoporose zu beweisen und weitere Erkenntnisse hinsichtlich Nebenwirkungen und Sicherheit zu erlangen. Zunächst sollten dabei weiterhin *in vitro* Versuche im Fokus stehen, um weitere Daten über die Osseointegration und die Stimulierung ossärer Zellen hinsichtlich des Knochenmetabolismus zu erhalten.

## 5.2. Methodendiskussion

### 5.2.1. Verwendete Zellen der Spenderinnen

Durch die hier gewählten Methoden sind sowohl die Ergebnisse, als auch die Schlussfolgerungen dieser Arbeit dennoch kritisch zu diskutieren. Die Messungen dieser Studie wurden anhand von Knochenzellspenderinnen gemacht, welche zwar ähnlich, jedoch nicht identisch vorerkrankt waren. Hinsichtlich des Nebenerkrankungsprofils der einzelnen Spenderinnen der hier genutzten MSC muss erwähnt werden, dass bereits einige der von den Spenderinnen bekannten Nebenerkrankungen wie eine Herzinsuffizienz oder aber die Therapie der Vorerkrankungen mit einer Osteoporose assoziiert sein können [32]. Zusätzlich ist hier erneut über das Alter der Patientinnen zu diskutieren, da wie oben geschildert sowohl Altersmedian als auch Altersdurchschnitt deutlich divergieren, auch wenn dies nicht signifikant ist. Hervorzuheben ist das jüngste Alter in der knochengesunden Gruppe von 28 Jahren, wohingegen die jüngste Probandin in der osteoporotischen Versuchsgruppe ein Alter von 66 Jahren aufwies. Somit ist die These aufzustellen, dass in der osteoporotischen Gruppe wahrscheinlich alle Probandinnen postmenopausal waren, wohingegen in der knochengesunden Gruppe mindestens eine Probandin prämenopausal als Teilnehmerin ausgewählt wurde. Hierbei spielen dann sowohl der Altersunterschied als bekanntes Risiko einer Osteoporose, als auch der hormonelle Status eine Rolle. Abgesehen von diesen Unterschieden sind andere Daten wie beispielsweise Gewicht, Niereninsuffizienz, Nikotin- und Alkoholkonsum, welche auch Risikofaktoren für die Entwicklung einer Osteoporose sind, in unserer Datenbank nicht erhoben, sodass sich hier erneut unterschiedliche Risikoprofile der Probandinnen ergeben könnten [7,32]. Da jedoch in dieser Studie nur ein signifikanter Unterschied zwischen osteoporotischen und knochengesunden MSC beobachtet wurde, scheinen die geschilderten Effekte hier vernachlässigbar zu sein, auch wenn ihre Bedeutung in zukünftigen oder anderen Studien unter Umständen größere Auswirkungen auf die Ergebnisse zeigen könnte.

Außerdem sollte hier erwähnt werden, dass es sich um eine Studie lediglich für weibliche Probandinnen handelte. In Anbetracht der Fragestellung hinsichtlich der Auswirkung der getesteten Knochenersatzstoffe und BDNF auf eine postmenopausale Osteoporose ist

dieses Vorgehen legitim. Sollten die getesteten Knochenersatzstoffe jedoch auch für eine Therapie beispielsweise der senilen Osteoporose genutzt werden, so müssten die Wirkungen und Nebenwirkungen auch für männliche Probanden erforscht werden. Dies beruht auf der Vermutung, dass Wirkung und Nebenwirkung bei männlichen Patienten andere sein könnten als bei weiblichen Patienten, wie es bereits von anderen Pharmaka bekannt ist [6,11,29,44,120]. Hieraus ist zu schlussfolgern, dass bei weiteren Studien männliche Probanden oder Zellen dieser in die Untersuchungen eingeschlossen werden sollten, obwohl bei Männern deutlich seltener eine manifeste Osteoporose auftritt und diese pathophysiologisch nicht einer postmenopausalen Osteoporose entspricht [32]. Dennoch ist durch die fortschreitende Alterung der Bevölkerung, wie in der Einleitung beschrieben, davon auszugehen, dass in Zukunft auch mehr männliche Patienten eine manifeste Osteoporose entwickeln werden [32,107,108]. Zudem ist auch das Risiko durch hormonelle Therapien im Rahmen von Geschlechtsumwandlungen in beide Richtungen und von Krankheiten mit einhergehender Hormonablation zu evaluieren. Aktuelle Daten deuten zwar auf keine Häufung von Risiken für diese Bevölkerungsgruppen hin, weisen aber insgesamt auf zu wenige Untersuchungen für eine realistische Einschätzung der Risiken hin [39,110,122]. Um jedes mögliche Patientenkontinuum in weiteren Studien abzubilden, sollten zukünftige Therapiekonzepte gleichermaßen zwischen den Geschlechtern, oder zumindest risikoadaptiert an das geschlechtsspezifische Lebenszeitrisko, getestet werden. Da diese Studie das Ziel hatte, lediglich osteoporotische MSC von postmenopausalen Frauen zu untersuchen und für diese Daten hinsichtlich der Apoptose und Nekrose an den genannten Knochenersatzstoffen zu testen, ist ein Ausschluss anderer Patientenkollektive damit begründbar und zu verteidigen. Dennoch sind die hier genannten Ergebnisse somit lediglich auf dieses Patientenkollektiv limitiert. Weitere breitere Untersuchungen für andere Patientenkollektive wären notwendig, sollten die hier verwendeten Knochenersatzstoffe oder auch BDNF für andere Patientengruppen als postmenopausale Frauen in Frage kommen.

Neben dem Problem der Geschlechtsverteilung der Osteoporose ergibt sich die Frage über das Auftreten und die Verteilung in anderen Ethnien, sodass auch diese in zukünftigen Studien berücksichtigt werden sollten, um ein bestmögliches Bild der Risiken einer Behandlung zu erhalten. Dieser Gedanke wird untermauert, da bereits für einige Medikamente wie QT-Zeit-verlängernde Medikamente deutliche ethnische Unterschiede herausgefunden wurden [76]. Neben dem Vergleich der pharmakologischen Wirkung der getesteten Substanzen auf verschiedene Bevölkerungsgruppen sollten zusätzlich Tests hinsichtlich der Pharmakokinetik und

Pharmakodynamik erfolgen. Erst dadurch kann ein umfassendes Risikoprofil der Therapeutika erstellt und eine bestmögliche Behandlung für Individuen unterschiedlichen Geschlechts und unterschiedlicher Ethnien gewährleistet werden [30,120].

In dieser Studie wurde lediglich mit MSC gearbeitet. Stammzellen spielen als Vorläuferzellen eine Rolle in der Frakturheilung, aber nicht direkt im Sinne von Auf- und Abbau der Knochenmatrix, sondern eher als Ausgangspunkt der Differenzierung zu Osteoblasten [7,87,98]. Bedingt durch Interleukine und andere Mediatoren migrieren MSC zur geschädigten Knochenstelle. Dort übernehmen MSC dann ihre Hauptaufgabe im Sinne der Proliferation und Differenzierung zu Präosteoblasten und Osteoblasten bedingt durch lokale Regulation und teilweise auftretende Autoregulation [83,111,124,127]. Hieraus folgt, dass die Osteogenese vor allem von differenzierten Osteoblasten und die Aufrechterhaltung der Knochenhomöostase von Osteoblasten und Osteoklasten abhängig ist [37,73,87]. Daher ist zu schlussfolgern, dass diese Studie insgesamt wichtige Daten zum Überleben von MSC liefert, aber hinsichtlich des Überlebens anderer wichtiger Zellen für die Knochenhomöostase nur sehr eingeschränkt Erkenntnisse erbringt. Dahingehend wären zukünftige Untersuchungen der Knochenersatzmaterialien in einer Zellkultur mit Osteoblasten und Osteoklasten nach Differenzierung aus MSC sinnvoll, um weitere Daten für die Sicherheit der Knochenersatzstoffe zu erbringen. In dieser Studie sollten lediglich erste Erkenntnisse hinsichtlich eines Überlebens von Zellen in Zellkultur mit den genannten Knochenersatzstoffen geliefert werden. Aufgrund ihrer Relevanz für die Frakturheilung und ihrer Möglichkeit der Migration, welche differenzierte Zellen des Knochens nur noch in beschränkten Maßen aufweisen, wurde sich daher hier für MSC entschieden.

Zusätzlich zur Frage der Differenzierung der Stammzellen muss die Frage gestellt werden, ob und wie es zu einer Erhöhung der MSC-Konzentration im Bereich der Fraktur beziehungsweise des geschädigten Knochens kommen soll. Prinzipiell wären dafür zwei Mechanismen denkbar, zum einen eine Transplantation von MSC und zum anderen eine vermehrte Rekrutierung von MSC. Da Transplantationen von Stammzellen beispielsweise bedingt durch die immunsuppressive Behandlung mit einem deutlich erhöhten Risiko für den Patienten einhergehen, sowie zusätzlich eine Gefährdung der Spender durch die Entnahme entsteht, sind sie zwar Teil von Untersuchungen, jedoch nicht von diesen Versuchen und stehen auch nicht in absehbarer Zeit als Therapieoption der Osteoporose zur Verfügung. Durch die Untersuchungen von *Stenderup et al. (2001)* ist zudem bekannt, dass Patienten mit Osteoporose keinen signifikanten Unterschied der Anzahl von MSC im Vergleich zu knochengesunden Patienten zeigen, sodass hierdurch

zusätzlich in Frage zu stellen ist, ob eine Transplantation von MSC bei dem benannten Risikoprofil notwendig und zielführend ist [109]. Daher sind vor allem die Möglichkeiten einer vermehrten Rekrutierung und Migration von MSC an den *point of interest* Gegenstand von aktuellen Studien [111,127].

Neben dem Forschungsfeld der vermehrten Rekrutierung von MSC an die geschädigte Stelle des Knochens, beeinflussen zusätzlich die lokalen Umgebungsbedingungen an dieser Stelle die Proliferation und Differenzierung positiv und negativ, sodass letztlich auch hier noch weitere Möglichkeiten zur verbesserten Knochenheilung vorhanden sein können. So konnte *Atashi et al. (2015)* zeigen, dass eine Induktion der Osteogenese in Umgebungen ohne reaktive Sauerstoffspezies eher stattfindet, hingegen eine Adipogenese in Umgebungen mit reaktiver Sauerstoffspezies, also beispielsweise in Bereichen mit Inflammation, stattfindet [8]. Zusätzlich konnte *Basu et al. (2001)* nachweisen, dass reduzierter oxidativer Stress eine Assoziation mit einer erhöhten Knochenmineralisierung zeigt und die regelmäßige Einnahme von Vitamin C bei postmenopausalen Frauen zu einer erhöhten Knochenmineralisierung führt [10]. Die Betrachtung des oxidativen Stresses scheint auch dahingehend ein wichtiger Punkt in der Differenzierung zu sein, dass MSC selbst eine anti-inflammatorische Wirkung zeigen und dabei immunmodulatorisch wirken. Daraus könnten Effekte zur besseren Differenzierung der MSC von MSC selbst ausgehen und eine Differenzierung positiv beeinflusst werden [13,104,125].

Zusammenfassend ist festzustellen, dass bei den hier durchgeführten Untersuchungen MSC in Zellkultur mit den Knochenersatzstoffen sowohl apoptotischen, als auch nekrotischen Zelluntergang aufweisen. Für ein vollständigeres Bild der Zytokompatibilität der hier untersuchten Werkstoffe sind jedoch zukünftige Untersuchungen mit differenzierten Zellkulturen und Zellkulturen, die in Kontakt mit den Knochenersatzstoffen differenzieren, notwendig. Dabei könnten neben den hier durchgeführten Untersuchungen auf Apoptose und Nekrose andere Analysen, beispielsweise auf Inflammationsmarker, ein vollständigeres Bild der Biokompatibilität liefern. Hierfür sollte mit dieser Arbeit jedoch nur ein Anfang gemacht werden.

### 5.2.2. Einfluss und Messbarkeit des pH-Wertes

Wie bereits oben beschrieben könnte eine Einflussgröße auf die Apoptose und Nekrose der MSC pH-Wert des Zellkulturmediums gewesen sein. Die von *Kruppke et al. 2019-21* publizierten Daten zeigten einen vor allem bei PPGC+S 3:7 und PPGS 0:10 eher in den basischen Bereich und damit auch außerhalb des physiologischen Bereiches von Zellen verschobenen pH-Wert [62–64]. Bereits *Shen et al. (2012)* konnte einen vermehrten

Zelluntergang mit einem erhöhten pH-Wert in Verbindung mit Strontium aufzeigen [103]. *Borciani et al. (2021)* zeigte eine vermehrte Abnahme der Zellvitalität in Verbindung mit Medien, welche bereits vorher mit den strontiumhaltigen Knochenersatzstoffen in Kontakt waren. Hier war der Effekt erneut abhängig von der Verdünnung des Zellkulturmediums [17]. *Borciani et al. (2021)* publizierte jedoch keine Messung des pH-Wertes und einer etwaigen Assoziation der Zellvitalität mit dem pH-Wert des Mediums. Daher sind die Ergebnisse der genannten Studien inkonsistent und ein etwaiger Effekt des pH-Wertes muss weiter untersucht werden.

Aufgrund dessen, dass zum Zeitpunkt der Durchführung der Experimente noch keine Daten zu den pH-Wert Veränderungen bei den hier getesteten Knochenersatzstoffen publiziert waren, wurde hier von einer Messung des pH-Wertes abgesehen. Zwar wäre die Betrachtung des pH-Wertes interessant gewesen, jedoch sind dauerhafte Messungen des pH-Wertes in *wells* kompliziert. Es wäre maximal eine intermittierende Messung an den Zeitpunkten des ELISA-Tests möglich gewesen. Zusätzlich wäre dann auch neben der Bestimmung des pH-Wertes des umliegenden Zellkulturmediums auch die Messung des intrazellulären pH-Wert zum Vergleich zu notwendig gewesen, um zu betrachten, ob eine Pufferung des extrazellulären pH-Wertes noch möglich wäre. Hieraus würden sich jedoch Interferenzen und Verzögerung für das eigentliche Ziel der Darstellung von Nekrose und Apoptose durch das genutzte Kit ergeben. Aufgrund der Darstellung der publizierten Daten von *Kruppke et al. (2021)* und den genannten unterstützenden Daten der anderen Studien sollte somit in folgenden Studien eine Messung des pH-Wertes des Zellkulturmediums erfolgen, auch um die hier dargestellten Hypothesen zu be- oder widerlegen [17,62,103].

Beispielsweise sind hierfür Versuche mit Kontrollmedium wie von *Borciani et al. (2021)* pH-Messung denkbar [17]. Unter anderem wäre auch zu evaluieren, ob die hier durchgeführte Spülung der Probekörper ausreichend lang war, um einen pH-Effekt so gering wie möglich zu halten. Hier ist wieder auf *Kruppke et al. (2021)* zu verweisen, wo demonstriert wird, dass der pH-Effekt vor allem für die Knochenersatzstoffe mit höherem Strontiumanteil auch an Tag 28 noch nachweisbar war sowie der stärkste Effekt bis zum Versuchstag sieben auftrat [62]. Hieraus resultiert, dass eine längere Spülung der Probekörper beispielsweise über 7 Tage eine sinnvolle Referenzgruppe bilden und in der sich dann die Ergebnisse der Apoptose und Nekrose verändern könnten. Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Messung des pH-Wertes eine sinnvolle Ergänzung zu den hier erhobenen Daten hätte sein können. Durch die beschriebenen Effekte in anderen Studien sollten in zukünftigen Experimenten Daten zum pH-Wert mit erhoben werden.

### 5.2.3. Veränderung der Dauer der Experimente

In Anbetracht der gemachten Untersuchungen zur Apoptose und Nekrose als Maß für die Zytotoxizität der verwendeten Knochenersatzstoffe ist zu diskutieren, dass hier nur ein sehr kurzer Zeitraum untersucht wurde. Da Implantate unter normalen Umständen deutlich länger im Knochen verbleiben, sollten langfristige Untersuchungen auch in Zellkulturen zusätzlich durchgeführt werden. In den meisten Publikationen sind hierbei Zeiträume von 7-28 Tagen üblich [17,56,68]. Diese Daten wären zusätzlich interessant, um die reale Freisetzung der Pharmaka aus den Knochenersatzstoffen einschätzen zu können, so wie es *Borciani et al. (2021)*, *Quade et al. (2018)* und *Kruppke et al. (2019)* bereits für die Freisetzung von Strontium aus ihren Werkstoffen, jedoch nur *in vitro* in Zellkulturmedium untersucht haben [17,64,91]. Außerdem sind die hier gemessenen Parameter der Zytotoxizität sozusagen lediglich Momentaufnahmen der Versuchstage, wobei eine allgemeine Biokompatibilität mehr ein dynamischer und langanhaltender Prozess ist [129]. Die Entscheidung gegen einen längeren Zellkulturversuch fiel hier, da proliferierende Zellen genutzt wurden. Bedingt durch die Proliferation hätte es bei längeren Versuchen zu einer Apoptose beziehungsweise Nekrose allein durch eine zu hohe Konzentration von Zellen kommen können, ähnlich dem in den Kontrollen nachvollziehbaren Zelluntergang. Für langfristige Zellkulturversuche hätten daher entweder differenzierte Zellen ähnlich den Daten von *Kruppke et al. (2019)* genutzt oder eine deutlich geringere Zellanzahl ausgesät werden müssen. Bei geringen Zellkonzentrationen wäre jedoch das Risiko der durch das Kit kaum detektierbaren Apoptose und Nekrose deutlich erhöht gewesen, so wie es bereits in der Ergebnisdarstellung gezeigt wurde. Zudem hätte das Risiko bestanden, dass eine Interferenz der Apoptose- und Nekroseassays zwar einen vermehrten Zelluntergang bei längerer Dauer der Experimente gezeigt hätte, diese jedoch mit geringerer Sicherheit auf die Knochenersatzstoffe zurückzuführen gewesen wäre. Daher zeigen die hier erhobenen Daten weitere relevante Daten zur Zytokompatibilität der untersuchten Knochenersatzstoffe und der Modifikation dieser durch die Zugabe von BDNF. Diese Daten sind daher als ein weiteres Puzzlestück zur Untersuchung der Zytokompatibilität und später Biokompatibilität der untersuchten Knochenersatzstoffe zu verstehen, haben aber aufgrund der Dynamik der Biokompatibilität nur eine beschränkte Aussagekraft. Wenn in einer Studie wie dieser nur ein Parameter, wie hier die Apoptose und Nekrose, untersucht wird, so kann erst durch eine Vielzahl von Untersuchungen *in vitro* und *in vivo* ein umfassenderes Bild der Sicherheit und Biokompatibilität gebildet werden [47,80,128]. Dennoch ist es unwahrscheinlich, allein durch eine umfassende Testung in Modellen mit

100-prozentiger Sicherheit die Biokompatibilität beschreiben zu können, auch wenn die geeignetsten Modelle gewählt werden [42,129,131].

#### 5.2.4. Einfluss der Nutzung des verwendeten ELISA-Kits

Das hier verwendete ELISA-Kit zur Untersuchung von Apoptose und Nekrose ist laut dem Hersteller geeignet, diese beiden Formen des Zelluntergangs zu beobachten. Diese Unterscheidung der beiden Arten des Zelluntergangs ist wichtig für die Bewertung der Biokompatibilität, da es bei nekrotischem Zelluntergang im Vergleich zum apoptotischen Zelluntergang zu Entzündungsreaktionen im Körper kommt, auch wenn diese dann steril, ohne bakterielle Besiedlung sind [31,88]. Der geordnete Zelluntergang der Apoptose löst diese Reaktion nicht aus, da die untergegangenen Zellen keine intrazellulären Bestandteile in den extrazellulären Raum freisetzen [31]. An der Methodik der hier publizierten Daten ist jedoch zu kritisieren, dass zwar dem Konsens von mindestens zwei Untersuchungen zur Unterscheidung von Apoptose und Nekrose nachgekommen wurde, aber insgesamt weitere Untersuchungen im Rahmen der Studie zur Unterscheidung von Apoptose und Nekrose wünschenswert gewesen wären. Zu dem hier genutzten ELISA-Assay und der parallel immer stattgefundenen lichtmikroskopischen Betrachtung hätten beispielsweise ein *LDH-Release Assay*, ein Annexin-V-Bindungs Assay oder ein Assay zur Untersuchung der Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenase weitere Daten zur Apoptose und Nekrose der MSC liefern können [31]. In Anbetracht dessen, dass der Hersteller des ELISA-Kits darauf hinweist, dass das Kit besonders für nicht proliferierende Zellen geeignet ist, wären weitere biochemische Nachweismethoden auch zur Bestätigung der Ergebnisse durch die Nachweisteknik des ELISA-Assays positiv gewesen. So konnte hier lediglich gezeigt werden, dass die Nachweismethode auch für proliferierende Zellen des Knochens für Apoptose und Nekrose und deren Unterscheidung funktioniert. Durch das Fehlen anderer Nachweisverfahren ist jedoch nicht zu validieren, dass die hier erhobenen Daten mit anderen Methoden genau dieselben Ergebnisse erbracht hätten, wie mit dem genutzten ELISA-Kit. Zudem ist das ELISA-Kit bei proliferierenden Zellen ohne weitere Nachweismethode wie beispielsweise einem *LDH-Release Assay* lediglich für eine relative Bewertung des Zelluntergangs zu nutzen, nicht jedoch, um einen absoluten Wert abgestorbener Zellen zu benennen. Dies beruht darauf, dass durch die Berechnung bei einem *LDH-Release Assay* eine Aussage über die ungefähre Zellzahl gemacht werden könnte trotz Proliferation der MSC. Hier ist jedoch nur die Ausgangszahl, nicht jedoch die Gesamtzahl der Zellen an den Versuchstagen bekannt gewesen. Eine Begründung der Entscheidung, das entsprechende ELISA-Kit zu nutzen, ist, dass die Nachweismethode bereits recht lang erprobt ist und auch Daten für

proliferierende Zellen anderer Organe, teilweise im Zusammenhang mit MSC, vorlagen [23,31,79]. Hervorzuheben ist hierbei die mittels des hier genutzten Kits durchgeführte Studie von *Zhang et al. (2011)*, welcher durch mit MSC produziertem konditioniertem Medium nachweisen konnte, dass der Zellertergang von kanzerösen Prostatazellen auf das mit MSC konditionierte Medium zurückzuführen ist und dabei auch eine Dosisabhängigkeit zeigt [136].

Hinsichtlich der hier durchgeführten zusätzlichen lichtmikroskopischen Beobachtungen der Zellen ist festzustellen, dass zwar kein zweiter biochemischer Nachweis der Apoptose und Nekrose erfolgte, aber eine Unterscheidung von Apoptose und Nekrose prinzipiell lichtmikroskopisch möglich ist. Daher stellt die lichtmikroskopische Beobachtung nach *Cummings et al. (2021)* eine legitime Methode der Beobachtung eines Zellertergangs dar [31]. Die dabei erhobenen Daten sind kritisch zu hinterfragen, da hier lediglich eine ungefärbte Beobachtung der Zellen und eine qualitative Analyse, jedoch keine quantitative Analyse durchgeführt wurden. Dies war notwendig, da vom Hersteller des ELISA-Kits eine Lyse für die Feststellung der Apoptose notwendig war und eine Farbreaktion gemessen wurde. Daraus ist zu schlussfolgern, dass aufgrund des *modus operandi* keine Färbung möglich gewesen ist, jedoch eine quantitative Analyse, beispielsweise durch eine mikroskopische Zellzählung in einer Zellkammer gegebenenfalls hätte angestrebt werden können. Hiervon wurde abgesehen, da die Versuche insgesamt 7 Tage dauerten und eine adäquate Zellzählung bei Proliferation der ausgesäten Zellen am Ende der Versuche anfangs nicht möglich erschien. Zusätzlich ist es am Ende durch die assaybedingte Lyse zu einer Vernichtung der Zellen gekommen. Unter Umständen wäre die längere Betrachtung durch Zellzählung unter einem Mikroskop und Veränderungen der Umgebungsbedingungen gegebenenfalls selbst ein Trigger für den Zellertergang gewesen. Die praktikabelste Lösung dahingehend wären parallele Versuche zur lichtmikroskopischen und biochemischen Beobachtung gewesen. Zusätzlich hätte die Erweiterung der Methodik, beispielsweise immunhistochemische Färbungen, ein *Real-Time PCR* Verfahren oder auch Elektronenmikroskopie, im Rahmen der durchgeführten Experimente zu mehr Erkenntnissen hinsichtlich der Interaktionen zwischen Zellen und Knochenersatzstoffen, der Degradierbarkeit der Knochenersatzstoffe und der Proliferation beziehungsweise Differenzierung der Zellen im Rahmen des untersuchten Zellertergangs führen können [68,93]. Hier ist zu erwähnen, dass *Kruppke et al. (2019)* bereits mehrere Vorversuche machte und damit auch bereits die Biokompatibilität der Knochenersatzstoffe *in vitro* testete. Diese Daten zum Zellertergang standen jedoch zum Zeitpunkt der hier durchgeführten Messungen noch nicht zur Verfügung [64]. Die von *Kruppke et al.*

erhobenen Daten wurden bereits oben in die Ergebnisse dieser Studie eingeordnet und diskutiert. Ergänzend ist hier lediglich zu erwähnen, dass *Kruppke et al.* Teile der vorgeschlagenen zusätzlichen Untersuchungen wie eine Elektronenmikroskopie bereits durchführte und seine Daten hinsichtlich der Zytotoxizität auf einem LDH-Assay beruhten [64]. Da das Ziel der Studie, jedoch wie oben bereits erwähnt, lediglich die Untersuchung von Nekrose und Apoptose der Zellen in Verbindung mit den Knochenersatzstoffen bei postmenopausaler Osteoporose war, wurde eine Beobachtung der Interaktionen zwischen MSC und Knochenersatzstoff von vornherein nicht geplant.

Der Erkenntnisgewinn dieser Studie liegt vor allem darin, welchen zusätzlichen Einfluss das BDNF auf die Zytotoxizität der Knochenersatzstoffe hat, ohne aber den Einfluss von BDNF auf die Degradation der Knochenersatzstoffe oder die Interaktionen der Knochenersatzstoffe mit den MSC zu untersuchen. Durch das Fehlen von einem zweiten biochemischen Assay und einer Methode zur Zählung der Zellen sind dabei die entstandenen Ergebnisse jedoch auf eine vergleichende, relative Aussage der Nekrose und der Apoptose der Zellen limitiert. Um absolute Zahlen herausfinden zu können, hätten zählende Verfahren oder Verfahren mit einem bekannten linearen Zusammenhang angewendet werden müssen. Im Rahmen dieser Studie wurden diese Verfahren aufgrund des Einflusses auf die Ergebnisse durch daraus entstehende Trigger für einen Zelluntergang oder die Methoden dieser Studie sowie der damit einhergehenden Auflösung von Zellen durch Lyse nicht durchgeführt. Sollten weitere Studien zur Betrachtung von Apoptose und Nekrose mit dem genutzten Kit für proliferierende MSC geplant sein, sind daher neben einem Validierungs-Assay beispielsweise durch *LDH-Release Assays* auch parallele Versuche für zu färbende Lichtbildpräparate oder Präparate für die Elektronenmikroskopie zu empfehlen.

### 5.3. Ausblick

Abschließend ist für die hier gezeigten Ergebnissen zu schlussfolgern, dass durch diese Studie erneut weitere Hinweise und Beweise für die Wirksamkeit von BDNF und den getesteten Knochenersatzstoffen erbracht werden konnten. Dabei sind die Hinweise für die Wirksamkeit von BDNF wie oben gezeigt für alle Versuchsgruppen vorhanden und auch durch weitere Studien belegt. Da die Zusammenhänge von BDNF und Osteoporose auch durch klinische Studien wie von *Nose et al. (2019)* oder *Yang et al. (2017)* belegt werden können, ist daher die weitere Forschung an diesem Thema unerlässlich, um in Zukunft unter Umständen ein wirksames Pharmakon als Therapie der Osteoporose entwickeln zu können [85,134]. Hierfür müssen jedoch weitere

grundlegende Forschungsarbeiten geleistet werden, um die Wirkung und Wechselwirkungen von BDNF besser zu verstehen. Zusätzlich sollten erhobene Daten auch immer als Sicherheitsdaten verstanden werden können, um eine zukünftige Nutzung von BDNF als Therapeutikum oder als Ziel einer Therapie möglich zu machen. Sollte eine Nutzung von BDNF als Therapeutikum in Betracht kommen, müssten zusätzlich noch entsprechende Trägersysteme zur sicheren Administration von BDNF erforscht werden. Nach Erhebung der Sicherheitsdaten und unter Einbeziehung aller vorhandenen Daten zum Thema der Wirkung und Wirksamkeit von BDNF bei postmenopausaler Osteoporose könnten dann in einigen Jahren die Evaluation von ersten klinischen Untersuchungen erfolgen, jedoch ist bis dahin noch einige Grundlagenarbeit an BDNF und geeigneten Trägersystemen zu leisten.

Hinsichtlich der Wirksamkeit der Knochenersatzstoffe konnte nachgewiesen werden, dass diese bei verschiedenen Konzentrationen von Mineralien zu unterschiedlichen Reaktionen mit den MSC führen. Aufgrund der Ergebnisse dieser Studie und der genannten anderen Publikationen ist daher zu empfehlen, die Mineraliengemische und dabei insbesondere das, auch schon von *Kruppke et al.* als höchst bioaktives beschriebenes PPGC+S 5:5 für weitere Versuche zu nutzen [63]. Dabei sollten vor der Evaluation in Klein- und Großtiermodellen weitere Grundlagenarbeiten mit *in vitro* Versuchen stattfinden, um möglichst ressourcenschonend und entsprechend den Tierschutzregularien und dem Tierwohl ein umfassendes Bild der Vor- und Nachteile des hier zu empfehlenden PPGC+S 5:5 zu erhalten. Die weiteren Versuche sollten frühzeitig Untersuchungen zur Sicherheit der Knochenersatzstoffe beinhalten, um eventuell auftretende Komplikationen frühzeitig zu erkennen und zukünftige Versuche an Tiermodellen so sicher wie möglich zu machen.

Ein eindeutiger Ausblick ist für die hier verwendeten MSC nicht zu geben, da es Kontroversen um die Nutzung von MSC gibt. Dabei geht es zum einen um den Einsatz als therapeutisches Mittel und andererseits um die Nutzung der MSC als Ziel von Therapeutika. In beiden Fällen ist jedoch zu ermitteln, wie dies im Sinne des Patienten am besten und sichersten funktioniert. Da diese Arbeit, wie auch andere, nahelegt, dass MSC von Patienten mit postmenopausaler Osteoporose durch eine entsprechende Regulation weiterhin zum Knochenaufbau fähig sind, würde hieraus eine sinnvolle Therapiemöglichkeit resultieren [8,109,125]. Als Alternative der therapeutischen Nutzung von MSC steht zumindest theoretisch eine Transplantation im Raum. Diese ist jedoch aufgrund der Daten für entsprechende Anzahl und Funktionalität der MSC auch bei an Osteoporose Erkrankten und erhöhter Nebenwirkung aktuell kaum noch Teil von Untersuchungen, so auch hier nicht [13,109]. Durch die Daten hinsichtlich einer deutlich

verminderten Migration von MSC bei Patienten mit Osteoporose und ihrer gegebenenfalls fehlerhaften Regulation und Differenzierung sind hier eher Therapieansätze für die Zukunft zu sehen [8,46,124]. Um jedoch wirksame und nebenwirkungsarme Therapien zu finden, müssen zunächst weitere Untersuchungen der Regulationsmöglichkeiten von MSC *in vivo* und *in vitro* durchgeführt werden. Zusätzlich muss bei Therapien, die Stammzellen regulieren sollen, besonders auf die Sicherheit dieser geachtet werden. Um auch die Wechselwirkungen solcher Therapien zu ergründen, sollte die MSC-Forschung auf nicht absehbare Zeit fortgesetzt werden.

## 6. Zusammenfassung

Osteoporose und osteoporotische Frakturen gehören schon jetzt zu häufigen Krankheitsbildern und werden in der Zukunft durch eine fortschreitende Alterung der Gesellschaft immer zahlreicher werden. Daher müssen die Alternativen der Behandlung einer Osteoporose erweitert werden. Hierfür bieten sich beispielsweise neuartige strontiumhaltige Knochenersatzstoffe wie Phosphat-prästrukturierte Gelatine mit Calcium- und Strontiumphosphaten (PPGC+S) an, welche durch ihre Strukturierung und biochemischen Eigenschaften zu einer vermehrten Integration in den Knochen beitragen können. Andererseits zeigten auch lokal eingesetzte Pharmaka, wie beispielsweise BDNF, positive Effekte auf die Knochenstruktur. Das Ziel dieser Studie war, den Einfluss auf die Apoptose und Nekrose von humanen mesenchymalen Stammzellen (MSC) osteoporotischer und knochengesunder Spenderinnen durch PPGC+S in Zellkulturen zu untersuchen. Zusätzlich wurde geprüft, ob durch die Zugabe von BDNF eine Veränderung der Apoptose und Nekrose an den Knochenersatzstoffen stattfand.

Dafür wurden im siebentägigen Zellkulturversuch mit MSC von je fünf knochengesunden und osteoporotischen Spenderinnen insgesamt drei Knochenersatzstoffe PPGC+S 5:5, PPGC+S 3:7 und PPGS 0:10 mit unterschiedlichen Verhältnissen von Calcium- und Strontiumphosphaten (PPGC+S x:y) getestet. Durch die zusätzliche Zugabe von BDNF (40 ng/ml) zum Zellkulturmedium wurde geprüft, ob es zu einer Veränderung der Nekrose und Apoptose kommt. Die Messung der Apoptose- und Nekroseraten erfolgte mittels des Cell Death Detection ELISA Kit von Roche (Mannheim, Deutschland). Dabei wurde an drei Zeitpunkten die Nekrose bestimmt (Tag 1, 4, 7) und an einem Zeitpunkt die Apoptose (Tag 7). Zusätzlich erfolgte an allen Versuchstagen eine lichtmikroskopische Untersuchung der Zellen. Die erhobenen Daten wurden nach Abschluss der Experimente statistisch analysiert, dabei erfolgte nach einem Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung im Falle einer Normalverteilung ein T-Test mit Bonferroni-Holm-Korrektur. War keine Normalverteilung gegeben wurde stattdessen mittels Mann-Whitney-U-Test, Friedmanns zweifaktorieller Varianzanalyse oder Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test analysiert (SPSS, v. 24, IBM).

Bei der Verwendung von PPGC+S 5:5 zeigte sich eine signifikant geringere Nekroserate der knochengesunden MSC im Vergleich zu den Materialien PPGC+S 3:7 und PPGS 0:10 ( $p < 0,05$ ). Das Material PPGC+S 3:7 löste in der knochengesunden MSC-Gruppe eine geringere Apoptoserate im Vergleich zu PPGS 0:10 ( $p < 0,05$ ) aus. Durch die zusätzliche Applikation von BDNF zu knochengesunden MSC auf PPGC+S 5:5 konnte die Nekroserate an allen Versuchstagen signifikant gesenkt werden ( $p < 0,05$ ).

Wurden osteoporotische MSC eingesetzt so konnte durch Zugabe von BDNF eine signifikante Reduktion der Apoptose im Kontakt mit den Knochenersatzmaterialien PPGC+S 5:5 und PPGC+S 3:7 ( $p < 0,05$ ) erreicht werden. Zusätzlich nahm die Nekroserate beim Einsatz osteoporotischer MSC im Kontakt mit dem Knochenersatzmaterial PPGC+S 3:7 an den ersten zwei Versuchstagen durch die Zugabe von BDNF signifikant ab ( $p < 0,05$ ). Zwischen knochengesunden und osteoporotischen MSC wurden keine relevanten Unterschiede gemessen.

Die Ergebnisse dieser Studie bezüglich Apoptose und Nekrose zeigen, dass von den drei untersuchten Knochenersatzmaterialien, das Material PPGC+S 5:5 mit dem geringsten Strontiumanteil die geringste Nekroserate aufwies. Der Wachstumsfaktor BDNF wirkte auf die MSC beider Versuchsgruppen zusätzlich zytoprotektiv und konnte sowohl Nekrose als auch Apoptose signifikant senken. Die hier erhaltenen Ergebnisse erweitern das Bild der Wirkung und Wirksamkeit von PPGC+S und BDNF und sind insgesamt als weiterführende Sicherheitsdaten einzuordnen. Durch weitere Untersuchungen *in vitro* und *in vivo* müssen jedoch weitere Daten gewonnen werden, um ein vollständigeres Bild der Zytokompatibilität und Biokompatibilität von PPGC+S und BDNF zu gewinnen.

## 7. Summary

Osteoporosis and osteoporotic fractures are diseases that already affect many parts of our society, and the numbers will increase in the future as our society is aging. Therefore, we need to look for new treatment options. New bone substitution materials, such as phosphate-prestructured gelatine with calcium- and strontium phosphates (PPGC+S), seem to be a good option because of their structure and biochemical properties, which may allow them to better integrate into the bone and promote new bone formation. On the other hand, drugs such as brain derived neurotrophic factor (BDNF) have also shown a positive effect on new bone formation. Therefore, the aim of this study is to look for differences in apoptotic and necrotic cell death of mesenchymal stem cells (MSC) from osteoporotic women or women without a history of bone disease, depending on the type of bone substitute material used, and whether BDNF influences necrosis or apoptosis.

For this purpose, a 7-day long cell culture study was carried out using cells from five donors without bone disease and five donors with osteoporosis in combination with three different types of PPGC+S. The three different concentrations were PPGC+S 5:5, PPGC+S 3:7 and PPGS 0:10. The experiments with all types of bone substitution materials were performed with culture media without any pharmaceuticals and with added BDNF (40 ng/ml). The assays for necrosis were performed on day 1, day 4 and day 7 and the test for apoptosis was performed on day 7. The Cell Death Detection ELISA Kit from Roche (Mannheim, Germany) was used for the tests. In addition, the cells were examined by light microscopy each test day. The test results were statistically analysed after all experiments were completed. Normal distribution of data was analyzed first. In case of normal distribution, further analyses were performed with t-test and Bonferroni-Holm correction. Mann-Whitney-U-test, Friedman's two-factor analysis of variance and Wilcoxon signed rank test (SPSS, v. 24, IBM) were used when the data were not normally distributed.

The experiments with PPGC+S 5:5 without BDNF on MSC without any history of osteoporosis showed a significantly lower rate of necrosis compared to PPGC+S 3:7 and PPGS 0:10 ( $p < 0.05$ ). In this case, PPGC+S 3:7 compared to PPGS 0:10 ( $p < 0.05$ ) also showed less apoptosis. In the case of added BDNF to MSC without any history of osteoporosis there was significantly less necrosis in the PPGC+S 5:5 experiment on all days where necrosis was tested ( $p < 0.05$ ). Additionally, PPGC+S 5:5 and PPGC+S 3:7 showed a significantly lower rate of apoptosis ( $p < 0.05$ ). In addition, PPGC+S 3:7 showed a significant reduction in necrosis for the first two days of necrosis

measurements ( $p < 0.05$ ). In all the experiments performed there were no significant differences between MSC from osteoporotic donors and those from donors without history of osteoporosis.

The results of this study regarding apoptosis and necrosis show that PPGC+S 5:5 is the bone substitute material with the lowest necrosis among those tested. The results for BDNF also showed a cytoprotective effect on MSC and influenced necrosis and apoptosis. The results lead to the conclusion that PPGC+S 5:5 may be the most suitable material for further investigation and that these results should be considered as additional safety data for BDNF and PPGC+S 5:5.

## **8. Abkürzungsverzeichnis**

MSC	Mesenchymale Stammzellen
BDNF	<i>Brain-derived Neurotrophic Factor</i>
IL	Interleukin
TNF	Tumor Nekrose Faktor
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
ALP	Alkalische Phosphatase
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
RANKL	<i>Receptor Activator of Nuclear Factor kappa B-Ligand</i>
RANK	<i>Receptor Activator of Nuclear Factor kappa B</i>
TGF- $\beta$	<i>Transforming Growth Factor <math>\beta</math></i>
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>
NGF	<i>Nerve Growth Factor</i>
NT	Neurotrophine
TrkB	<i>Tropomyosin-related Kinase B</i>
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear-Factor kappa B</i>
SNPs	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>
BDNF-AS	<i>Brain-derived Neurotrophic Factor-Antisense Transcript</i>
RNA	Ribonucleinsäure
PET-CT	Positronen Emissions Computer Tomographie
PPGC+S	Phosphat-prästrukturierte Gelatine mit Calcium und Strontium
ATP	Adenosintriphosphat
DNA	Desoxyribonucleinsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
LDH	Laktat-Dehydrogenase
<i>Inc.</i>	<i>Incorporated</i>
D	Deutschland
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
GmbH & Co. KG	Gesellschaft mit beschränkter Haftung & Compagnie Kommanditgesellschaft
AG	Aktiengesellschaft
UK	Vereinigtes Königreich (United Kingdom)

GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
min	Minuten
g	Gramm
M	Molare Konzentration
h	Stunde
d	Tage
rpm	Umdrehungen pro Minute
rcf	relative Zentrifugalbeschleunigung
EDC	Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
NHS	N-Hydroxysuccinimide
FBS	Fetales Kälberserum ( <i>Fetal Bovine Serum</i> )
DMSO	Dimethylsulfoxid
CAM	Camptothecin
POD	Peroxidase
ABTS	2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
PCR	Polymerase Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )

## 9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung der Herstellung der Probekörper der Knochenersatzstoffe ..	25
Abbildung 2: Vorversuche zur Etablierung des Testkits für die Zellkulturen .....	29
Abbildung 3: Vorversuch zur Testung der Knochenersatzstoffe .....	30
Abbildung 4: Versuchsaufbau zur Untersuchung von Nekrose an den einzelnen Knochenersatzstoffen mit und ohne BDNF .....	31
Abbildung 5: Darstellung der Absorptionswerte der Nekrose im Vorversuch mit den Knochenersatzstoffen.....	34
Abbildung 6: Darstellung der Absorptionswerte der Apoptose im Vorversuch mit den Knochenersatzstoffen.....	35
Abbildung 7: Darstellung der zellzahlabhängigen Mittelwerte der Absorptionsmesswerte des Nekroseassays .....	36
Abbildung 8: Darstellung der zellzahlabhängigen Mittelwerte der Absorptionsmesswerte des Apoptoseassays .....	36
Abbildung 9: Darstellung der 200 µl Messwerte im Vergleich zu 100 µl Messwerten des Apoptoseassays für die knochengesunden Zellkulturen .....	38
Abbildung 10: Darstellung der 200 µl Messwerte im Vergleich zu 100 µl Messwerten des Apoptoseassays für die osteoporotische Zellkulturen .....	39
Abbildung 11: Darstellung der 200 µl Messwerte im Vergleich zu 100 µl Messwerten des Nekroseassays für die knochengesunden Zellkulturen.....	40
Abbildung 12: Darstellung der 200 µl Messwerte im Vergleich zu 100 µl Messwerten des Nekroseassays für die osteoporotischen Zellkulturen.....	41
Abbildung 13: Einfluss des Knochenstatus der Spenderinnen auf die Nekroserate von MSC .....	42
Abbildung 14: Einfluss des Knochenstatus der Spenderinnen auf die Apoptoserate von MSC .....	43
Abbildung 15: Einfluss des Knochenersatzmaterials auf die Nekroserate von MSC ...	45
Abbildung 16: Einfluss des Knochenersatzmaterials auf die Apoptoserate von MSC .	46
Abbildung 17: Einfluss der BDNF-Zugabe zum Zellkulturmedium auf die Nekroserate von MSC .....	48
Abbildung 18: Einfluss der BDNF-Zugabe zum Zellkulturmedium auf die Nekroserate von MSC .....	49
Abbildung 19: Knochengesunde MSC ohne Zugabe von BDNF.....	52
Abbildung 20: Knochengesunde MSC mit Zugabe von BDNF.....	53
Abbildung 21: Detailaufnahme der knochengesunden MSC ohne Zugabe von BDNF	54
Abbildung 22: Detailaufnahmen der knochengesunden MSC nach Zugabe von BDNF .....	55
Abbildung 23: Osteoporotische MSC ohne Zugabe von BDNF .....	58
Abbildung 24: Osteoporotische MSC mit Zugabe von BDNF.....	59
Abbildung 25: Detailaufnahme osteoporotischer MSC ohne Zugabe von BDNF.....	60
Abbildung 26: Detailaufnahme osteoporotischer MSC mit Zugabe von BDNF .....	61

## **10. Tabellenverzeichnis**

Geräte .....	20
Verbrauchsmaterial .....	21
Zellkulturmedien, Lösungen und Puffer.....	21
Präparationssysteme.....	22
Software .....	22
Tabelle 1: Absorptionsmesswerte der knochengesunden Zellkulturen im Apoptoseassay.....	37
Tabelle 2: Absorptionsmesswerte der knochengesunden Zellkulturen im Apoptoseassay.....	38
Tabelle 3: Absorptionsmesswerte der knochengesunden Zellkulturen im Nekroseassay .....	40

## 11. Literaturverzeichnis

- [1] **Ai, L.-S., Sun, C.-Y., Zhang, L., Zhou, S.-C., Chu, Z.-B., Qin, Y., et al.**, Inhibition of BDNF in multiple myeloma blocks osteoclastogenesis via down-regulated stroma-derived RANKL expression both in vitro and in vivo, **PLoS ONE** **2012**;7:e46287; doi.org/10.1371/journal.pone.0046287 ; Epub 15. Oktober 2012
- [2] **Akers, J.C., Gonda, D., Kim, R., Carter, B.S., Chen, C.C.**, Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies, **J Neurooncol.** **2013**;113:1–11; doi.org/10.1007/s11060-013-1084-8 ; Epub 02. März 2013
- [3] **Almalki, S.G., Agrawal, D.K.**, Key transcription factors in the differentiation of mesenchymal stem cells, **Differentiation** **2016**;92:41–51; doi.org/10.1016/j.diff.2016.02.005 ; Epub 21. März 2016
- [4] **Andersen, O.Z., Offermanns, V., Sillassen, M., Almtoft, K.P., Andersen, I.H., Sørensen, S., et al.**, Accelerated bone ingrowth by local delivery of strontium from surface functionalized titanium implants, **Biomaterials** **2013**;34:5883–5890; doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.04.031 ; Epub 11. Mai 2013
- [5] **Andrzejewska, A., Lukomska, B., Janowski, M.**, Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: From Roots to Boost, **Stem Cells** **2019**;37:855–864; doi.org/10.1002/stem.3016 ; Epub 30. April 2019
- [6] **Anthony, M.**, Male/female differences in pharmacology: safety issues with QT-prolonging drugs, **J Womens Health (Larchmt)** **2005**;14:47–52; doi.org/10.1089/jwh.2005.14.47 ; Epub 02. Februar 2005
- [7] **Armas, L.A.G., Recker, R.R.**, Pathophysiology of osteoporosis: new mechanistic insights, **Endocrinol Metab Clin North Am** **2012**;41:475–486; doi.org/10.1016/j.ecl.2012.04.006 ; Epub 09. Juni 2012
- [8] **Atashi, F., Modarressi, A., Pepper, M.S.**, The role of reactive oxygen species in mesenchymal stem cell adipogenic and osteogenic differentiation: a review, **Stem Cells Dev.** **2015**;24:1150–1163; doi.org/10.1089/scd.2014.0484 ; Epub 10. März 2015
- [9] **Baier, M., Staudt, P., Klein, R., Sommer, U., Wenz, R., Grafe, I., et al.**, Strontium enhances osseointegration of calcium phosphate cement: a histomorphometric pilot study in ovariectomized rats, **J Orthop Surg Res** **2013**;8:16; doi.org/10.1186/1749-799X-8-16 ; Epub 07. Juni 2013
- [10] **Basu, S., Michaëlsson, K., Olofsson, H., Johansson, S., Melhus, H.**, Association between oxidative stress and bone mineral density, **Biochem Biophys Res Commun** **2001**;288:275–279; doi.org/10.1006/bbrc.2001.5747 ; Epub 25. Mai 2002
- [11] **Beierle, I., Meibohm, B., Derendorf, H.**, Gender differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics, **Int J Clin Pharmacol Ther** **1999**;37:529–547; doi.org/Review
- [12] **Benayahu, D., Akavia, U.D., Shur, I.**, Differentiation of bone marrow stroma-derived mesenchymal cells, **Curr Med Chem** **2007**;14:173–179; doi.org/10.2174/092986707779313363
- [13] **Berebichez-Fridman, R., Gómez-García, R., Granados-Montiel, J., Berebichez-Fastlicht, E., Olivos-Meza, A., Granados, J., et al.**, The Holy Grail of Orthopedic Surgery: Mesenchymal Stem Cells-Their Current Uses and Potential Applications, **Stem Cells Int** **2017**;2017:2638305; doi.org/10.1155/2017/2638305 ; Epub 18. Juni 2017

- [14] **Binder, D.K., Scharfman, H.E.**, Brain-derived neurotrophic factor, **Growth Factors** **2004**;22:123–131; doi.org/10.1080/08977190410001723308 ; Epub 11. Juli 2009
- [15] **Bonfoco, E., Krainc, D., Ankarcona, M., Nicotera, P., Lipton, S.A.**, Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures, **Proc Natl Acad Sci USA** **1995**;92:7162–7166; doi.org/10.1073/pnas.92.16.7162
- [16] **Borciani, G., Ciapetti, G., Vitale-Brovarone, C., Baldini, N.**, Strontium Functionalization of Biomaterials for Bone Tissue Engineering Purposes: A Biological Point of View, **Materials (Basel)** **2022**;15; doi.org/10.3390/ma15051724 ; Epub 25. Februar 2022
- [17] **Borciani, G., Montalbano, G., Melo, P., Baldini, N., Ciapetti, G., Vitale-Brovaron, C.**, Assessment of Collagen-Based Nanostructured Biomimetic Systems with a Co-Culture of Human Bone-Derived Cells, **Cells** **2021**;11; doi.org/10.3390/cells11010026 ; Epub 23. Dezember 2021
- [18] **Briot, K., Geusens, P., Em Bultink, I., Lems, W.F., Roux, C.**, Inflammatory diseases and bone fragility, **Osteoporosis Int.** **2017**;28:3301–3314; doi.org/10.1007/s00198-017-4189-7 ; Epub 15. September 2017
- [19] **Brohlin, M., Kingham, P.J., Novikova, L.N., Novikov, L.N., Wiberg, M.**, Aging effect on neurotrophic activity of human mesenchymal stem cells, **PLoS ONE** **2012**;7:e45052; doi.org/10.1371/journal.pone.0045052 ; Epub 17. September 2012
- [20] **Bussola Tovani, C., Gloter, A., Azaïs, T., Selmane, M., Ramos, A.P., Nassif, N.**, Formation of stable strontium-rich amorphous calcium phosphate: Possible effects on bone mineral, **Acta Biomater** **2019**;92:315–324; doi.org/10.1016/j.actbio.2019.05.036 ; Epub 22. Mai 2019
- [21] **Cai, X., Luo, E., Yuan, Q.**, Interaction between Schwann cells and osteoblasts in vitro, **Int J Oral Sci** **2010**;2:74–81; doi.org/10.4248/IJOS10039 ; Epub 01. Juni 2010
- [22] **Canalis, E., Hott, M., Deloffre, P., Tsouderos, Y., Marie, P.J.**, The divalent strontium salt S12911 enhances bone cell replication and bone formation in vitro, **Bone** **1996**;18:517–523; doi.org/10.1016/8756-3282(96)00080-4
- [23] **Chandrasekar, B., Boylston, W.H., Venkatachalam, K., Webster, N.J.G., Prabhu, S.D., Valente, A.J.**, Adiponectin blocks interleukin-18-mediated endothelial cell death via APPL1-dependent AMP-activated protein kinase (AMPK) activation and IKK/NF-kappaB/PTEN suppression, **J Biol Chem** **2008**;283:24889–24898; doi.org/10.1074/jbc.M804236200 ; Epub 15. Juli 2008
- [24] **Chen, Q., Shou, P., Zheng, C., Jiang, M., Cao, G., Yang, Q., et al.**, Fate decision of mesenchymal stem cells: adipocytes or osteoblasts?, **Cell Death Differ** **2016**;23:1128–1139; doi.org/10.1038/cdd.2015.168 ; Epub 12. Februar 2016
- [25] **Chen, X., Wang, Z., Duan, N., Zhu, G., Schwarz, E.M., Xie, C.**, Osteoblast-osteoclast interactions, **Connective Tissue Res** **2018**;59:99–107; doi.org/10.1080/03008207.2017.1290085 ; Epub 21. März 2017
- [26] **Cheng, C., Alt, V., Pan, L., Thormann, U., Schnettler, R., Strauss, L.G., et al.**, Application of F-18-sodium fluoride (NaF) dynamic PET-CT (dPET-CT) for defect healing: a comparison of biomaterials in an experimental osteoporotic rat model, **Med Sci Monit** **2014**;20:1942–1949; doi.org/10.12659/MSM.891073 ; Epub 15. Oktober 2014
- [27] **Christoffersen, J., Christoffersen, M.R., Kolthoff, N., Bärenholdt, O.**, Effects of strontium ions on growth and dissolution of hydroxyapatite and on bone mineral

- detection, **Bone** **1997**;20:47–54; doi.org/10.1016/S8756-3282(96)00316-X ; Epub 05. Januar 1998
- [28] **Codrea, C.I., Croitoru, A.-M., Baciuc, C.C., Melinescu, A., Ficai, D., Fruth, V., et al.**, Advances in Osteoporotic Bone Tissue Engineering, **J Clin Med** **2021**;10; doi.org/10.3390/jcm10020253 ; Epub 12. Januar 2021
- [29] **Colombo, D., Banfi, G., Cassano, N., Graziottin, A., Vena, G.A., Fiori, G.G., et al.**, The GENDER ATTENTION Observational Study: Gender and Hormonal Status Differences in the Incidence of Adverse Events During Cyclosporine Treatment in Psoriatic Patients, **Adv Ther** **2017**;34:1349–1363; doi.org/10.1007/s12325-017-0526-7 ; Epub 21. April 2017
- [30] **Conti, V., Izzo, V., Russillo, M.C., Picillo, M., Amboni, M., Scaglione, C.L.M., et al.**, Gender Differences in Levodopa Pharmacokinetics in Levodopa-Naïve Patients With Parkinson's Disease, **Front Med (Lausanne)** **2022**;9:909936; doi.org/10.3389/fmed.2022.909936 ; Epub 31. Mai 2022
- [31] **Cummings, B.S., Schnellmann, R.G.**, Measurement of Cell Death in Mammalian Cells, **Curr Protoc** **2021**;1:e210; doi.org/10.1002/cpz1.210 ; Epub 20. August 2021
- [32] **Dachverband Osteologie e.V.**, Evidenz-basierte Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Osteoporose: Leitlinie des Dachverbandes der Deutschsprachigen Wissenschaftlichen Osteologischen Gesellschaften e.V.; doi.org/10.1055/a-1024-3214; **2017**
- [33] **Dorozhkin, S.V., Epple, M.**, Biological and Medical Significance of Calcium Phosphates, **Angew Chem Int Ed** **2002**;114:3260–3277; doi.org/10.1002/1521-3773(20020902)41:17<3130:AID-ANIE3130>3.0.CO;2-1 ; Epub 30. August 2002
- [34] **Duvall, E., Wyllie, A.H.**, Death and the cell, **Immunol Today** **1986**;7:115–119; doi.org/10.1016/0167-5699(86)90152-0 ; Epub 26. Juli 2004
- [35] **Dvorakova, J., Wiesnerova, L., Chocholata, P., Kulda, V., Landsmann, L., Cedikova, M., et al.**, Human cells with osteogenic potential in bone tissue research, **Biomed Eng Online** **2023**;22:33; doi.org/10.1186/s12938-023-01096-w ; Epub 03. April 2023
- [36] **Feng, X., Lin, T., Liu, X., Yang, C., Yang, S., Fu, D.**, Long non-coding RNA BDNF-AS modulates osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells, **Mol Cell Biochem** **2018**;445:59–65; doi.org/10.1007/s11010-017-3251-2 ; Epub 15. Dezember 2017
- [37] **Friedenstein, A.J., Piatetzky-Shapiro, I.I., Petrakova, K.V.**, Osteogenesis in transplants of bone marrow cells, **J Embryol Exp Morphol** **1966**;16:381–390
- [38] **García-Arnáez, I., Cerqueira, A., Romero-Gavilán, F., Elortza, F., Azkargorta, M., Iloro, I., et al.**, Development and characterisation of strontium-doped sol-gel coatings to optimise the initial bone regeneration processes, **Mater Today Commun** **2022**;33:104674; doi.org/10.1016/j.mtcomm.2022.104674 ; Epub 13. Oktober 2022
- [39] **Giacomelli, G., Meriggiola, M.C.**, Bone health in transgender people: a narrative review, **Ther Adv Endocrinol Metab** **2022**;13:20420188221099346; doi.org/10.1177/20420188221099346 ; Epub 27. Mai 2022
- [40] **Ginebra, M.-P., Canal, C., Espanol, M., Pastorino, D., Montufar, E.B.**, Calcium phosphate cements as drug delivery materials, **Adv Drug Deliv Rev** **2012**;64:1090–1110; doi.org/10.1016/j.addr.2012.01.008 ; Epub 25. Januar 2012
- [41] **Giraud Guille, M.M., Mosser, G., Helary, C., Eglin, D.**, Bone matrix like assemblies of collagen: from liquid crystals to gels and biomimetic materials, **Micron** **2005**;36:602–608; doi.org/10.1016/j.micron.2005.07.005 ; Epub 01. September 2005

- [42] **Goldberg, M., Lasfargues, J.J., Legrand, J.M.**, Clinical testing of dental materials— histological considerations, **J Dent** **1994**;22:S25-S28; doi.org/10.1016/0300-5712(94)90036-1 ; Epub 21. März 2004
- [43] **Granchi, D., Cenni, E., Ciapetti, G., Savarino, L., Stea, S., Gamberini, S., et al.**, Cell death induced by metal ions: necrosis or apoptosis?, **J Mater Sci Mater Med** **1998**;9:31–37; doi.org/10.1023/a:1008878527233
- [44] **Greaves, L., Poole, N., Brabete, A.C.**, Sex, Gender, and Alcohol Use: Implications for Women and Low-Risk Drinking Guidelines, **Int J Environ Res Public Health** **2022**;19; doi.org/10.3390/ijerph19084523 ; Epub 08. April 2022
- [45] **Guo, Y., Dong, S.-S., Chen, X.-F., Jing, Y.-A., Yang, M., Yan, H., et al.**, Integrating Epigenomic Elements and GWASs Identifies BDNF Gene Affecting Bone Mineral Density and Osteoporotic Fracture Risk, **Sci Rep** **2016**;6:30558; doi.org/10.1038/srep30558 ; Epub 28. Juli 2016
- [46] **Haasters, F., Docheva, D., Gassner, C., Popov, C., Böcker, W., Mutschler, W., et al.**, Mesenchymal stem cells from osteoporotic patients reveal reduced migration and invasion upon stimulation with BMP-2 or BMP-7, **Biochem Biophys Res Commun** **2014**;452:118–123; doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.08.055 ; Epub 21. August 2014
- [47] **Hanks, C.T., Wataha, J.C., Sun, Z.**, In vitro models of biocompatibility: A review, **Dent Mater** **1996**;12:186–193; doi.org/10.1016/s0109-5641(96)80020-0 ; Epub 18. Juli 2003
- [48] **Heinemann, S., Gelinsky, M., Worch, H., Hanke, T.**, Resorbierbare Knochenersatzmaterialien: Eine Übersicht kommerziell verfügbarer Werkstoffe und neuer Forschungsansätze auf dem Gebiet der Komposite, **Orthopäde** **2011**;40:761–773; doi.org/10.1007/s00132-011-1748-z ; Epub 16. März 2011
- [49] **Heinrich, P.C., Müller, M., Graeve, L.** (Hrsg.), Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie; S. 952-960; 9. Auflage; ISBN: 978-3-642-17971-6; doi.org/10.1007/978-3-642-17972-3 ; **Berlin, Heidelberg: Springer; 2014**
- [50] **Homsy, C.A.**, Bio-compatibility in selection of materials for implantation, **J Biomed Mater Res** **1970**;4:341–356; doi.org/10.1002/jbm.820040306 ; Epub 13. September 2004
- [51] **Hurtel-Lemaire, A.S., Mentaverri, R., Caudrillier, A., Courmarie, F., Wattel, A., Kamel, S., et al.**, The calcium-sensing receptor is involved in strontium ranelate-induced osteoclast apoptosis. New insights into the associated signaling pathways, **J Biol Chem** **2009**;284:575–584; doi.org/10.1074/jbc.M801668200 ; Epub 16. Oktober 2008
- [52] **Ida-Yonemochi, H., Yamada, Y., Yoshikawa, H., Seo, K.**, Locally Produced BDNF Promotes Sclerotic Change in Alveolar Bone after Nerve Injury, **PLoS ONE** **2017**;12:e0169201; doi.org/10.1371/journal.pone.0169201 ; Epub 10. Januar 2017
- [53] **Jacobs, J.J., Skipor, A.K., Black, J., Urban, R.m., Galante, J.O.**, Release and excretion of metal in patients who have a total hip-replacement component made of titanium-base alloy, **J Bone Joint Surg Am** **1991**;73:1475–1486; doi.org/10.2106/00004623-199173100-00005
- [54] **Jacobs, J.J., Skipor, A.K., Patterson, L.M., Hallab, N.J., Paprosky, W.G., Black, J., et al.**, Metal release in patients who have had a primary total hip arthroplasty. A prospective, controlled, longitudinal study, **J Bone Joint Surg Am** **1998**;80:1447–1458; doi.org/10.2106/00004623-199810000-00006
- [55] **Kauschke, V., Gebert, A., Calin, M., Eckert, J., Scheich, S., Heiss, C., et al.**, Effects of new beta-type Ti-40Nb implant materials, brain-derived neurotrophic factor, acetylcholine and nicotine on human mesenchymal stem cells of

- osteoporotic and non osteoporotic donors, **PLoS ONE** **2018**;13:e0193468; doi.org/10.1371/journal.pone.0193468 ; Epub 28. Februar 2018
- [56] **Kauschke, V., Schneider, M., Jauch, A., Schumacher, M., Kampschulte, M., Rohnke, M., et al.**, Effects of a Pasty Bone Cement Containing Brain-Derived Neurotrophic Factor-Functionalized Mesoporous Bioactive Glass Particles on Metaphyseal Healing in a New Murine Osteoporotic Fracture Model, **Int J Mol Sci** **2018**;19; doi.org/10.3390/ijms19113531 ; Epub 09. November 2018
- [57] **Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R.**, Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, **Br J Cancer** **1972**;26:239–257; doi.org/10.1038/bjc.1972.33
- [58] **Kilian, O., Hartmann, S., Dongowski, N., Karnati, S., Baumgart-Vogt, E., Härtel, F.V., et al.**, BDNF and its TrkB receptor in human fracture healing, **Ann Anat** **2014**;196:286–295; doi.org/10.1016/j.aanat.2014.06.001 ; Epub 16. Juni 2014
- [59] **Kołodziejaska, B., Stępień, N., Kolmas, J.**, The Influence of Strontium on Bone Tissue Metabolism and Its Application in Osteoporosis Treatment, **Int J Mol Sci** **2021**;22; doi.org/10.3390/ijms22126564 ; Epub 18. Juni 2021
- [60] **Komrakova, M., Weidemann, A., Dullin, C., Ebert, J., Tezval, M., Stuermer, K.M., et al.**, The Impact of Strontium Ranelate on Metaphyseal Bone Healing in Ovariectomized Rats, **Calcif Tissue Int** **2015**;97:391–401; doi.org/10.1007/s00223-015-0019-0 ; Epub 18. Juni 2015
- [61] **Kruppke, B., Farack, J., Wagner, A.-S., Beckmann, S., Heinemann, C., Glenske, K., et al.**, Gelatine modified monetite as a bone substitute material: An in vitro assessment of bone biocompatibility, **Acta Biomater** **2016**;32:275–285; doi.org/10.1016/j.actbio.2015.12.035 ; Epub 28. Dezember 2015
- [62] **Kruppke, B., Heinemann, C., Gebert, A., Rohnke, M., Weiß, M., Henß, A., et al.**, Strontium substitution of gelatin modified calcium hydrogen phosphates as porous hard tissue substitutes, **J Biomed Mater Res A** **2021**;109:722–732; doi.org/10.1002/jbm.a.37057 ; Epub 23. Juli 2020
- [63] **Kruppke, B., Ray, S., Alt, V., Rohnke, M., Kern, C., Kampschulte, M., et al.**, Gelatin-Modified Calcium/Strontium Hydrogen Phosphates Stimulate Bone Regeneration in Osteoblast/Osteoclast Co-Culture and in Osteoporotic Rat Femur Defects-In Vitro to In Vivo Translation, **Molecules** **2020**;25; doi.org/10.3390/molecules25215103 ; Epub 03. November 2020
- [64] **Kruppke, B., Wagner, A.-S., Rohnke, M., Heinemann, C., Kreschel, C., Gebert, A., et al.**, Biomaterial based treatment of osteoclastic/osteoblastic cell imbalance - Gelatin-modified calcium/strontium phosphates, **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl** **2019**;104:109933; doi.org/10.1016/j.msec.2019.109933 ; Epub 03. Juli 2019
- [65] **Lemasters, J.J.**, V. Necrapoptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis, **Am J Physiol** **1999**;276:G1-6; doi.org/10.1152/ajpgi.1999.276.1.G1 ; Epub 01. Januar 1999
- [66] **Lemasters, J.J., DiGuseppi, J., Nieminen, A.L., Herman, B.**, Blebbing, free Ca<sup>2+</sup> and mitochondrial membrane potential preceding cell death in hepatocytes, **Nature** **1987**;325:78–81; doi.org/10.1038/325078a0
- [67] **Levine, B.R., Hsu, A.R., Skipor, A.K., Hallab, N.J., Paprosky, W.G., Galante, J.O., et al.**, Ten-year outcome of serum metal ion levels after primary total hip arthroplasty: a concise follow-up of a previous report\*, **J Bone Joint Surg Am** **2013**;95:512–518; doi.org/10.2106/JBJS.L.00471 ; Epub 20. März 2013
- [68] **Li, Y., Li, J., Zhu, S., Luo, E., Feng, G., Chen, Q., et al.**, Effects of strontium on proliferation and differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells,

- Biochem Biophys Res Commun** 2012;418:725–730; doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.01.088 ; Epub 27. Januar 2012
- [69] **Li, Z., Liao, W., Zhao, Q., Liu, M., Xia, W., Yang, Y., et al.**, Angiogenesis and bone regeneration by allogeneic mesenchymal stem cell intravenous transplantation in rabbit model of avascular necrotic femoral head, **J Surg Res** 2013;183:193–203; doi.org/10.1016/j.jss.2012.11.031 ; Epub 11. Dezember 2012
- [70] **Liu, Q., Lei, L., Yu, T., Jiang, T., Kang, Y.**, Effect of Brain-Derived Neurotrophic Factor on the Neurogenesis and Osteogenesis in Bone Engineering, **Tissue Eng Part A** 2018;24:1283–1292; doi.org/10.1089/ten.TEA.2017.0462 ; Epub 10. April 2018
- [71] **Liu, Z.-J., Zhuge, Y., Velazquez, O.C.**, Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells, **J Cell Biochem** 2009;106:984–991; doi.org/10.1002/jcb.22091 ; Epub 17. März 2009
- [72] **Lopes, D., Martins-Cruz, C., Oliveira, M.B., Mano, J.F.**, Bone physiology as inspiration for tissue regenerative therapies, **Biomaterials** 2018;185:240–275; doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.09.028 ; Epub 17. September 2018
- [73] **Lüllmann-Rauch, R., Asan, E.** (Hrsg.), Taschenlehrbuch Histologie; S. 182-210; 6. Auflage; ISBN: 978-3-13-242532-3; doi.org/10.1055/b-006-163361 ; **Stuttgart: Thieme; 2019**
- [74] **Madhok, R., Crilly, A., Watson, J., Capell, H.A.**, Serum interleukin 6 levels in rheumatoid arthritis: correlations with clinical and laboratory indices of disease activity, **Ann Rheum Dis** 1993;52:232–234; doi.org/10.1136/ard.52.3.232 ; Epub 13. April 2016
- [75] **Maisonpierre, P.C., Belluscio, L., Squinto, S., Ip, N.Y., Furth, M.E., Lindsay, R.M., et al.**, Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF, **Science** 1990;247:1446–1451; doi.org/10.1126/science.247.4949.1446
- [76] **Manini, A.F., Stimmel, B., Vlahov, D.**, Racial susceptibility for QT prolongation in acute drug overdoses, **J Electrocardiol** 2014;47:244–250; doi.org/10.1016/j.jelectrocard.2013.12.002 ; Epub 04. Dezember 2013
- [77] **Marx, D., Rahimnejad Yazdi, A., Papini, M., Towler, M.**, A review of the latest insights into the mechanism of action of strontium in bone, **Bone Rep** 2020;12:100273; doi.org/10.1016/j.bonr.2020.100273 ; Epub 24. April 2020
- [78] **Medhat, D., Rodríguez, C.I., Infante, A.**, Immunomodulatory Effects of MSCs in Bone Healing, **Int J Mol Sci** 2019;20; doi.org/10.3390/ijms20215467
- [79] **Mei, S., Gu, H., Yang, X., Guo, H., Liu, Z., Cao, W.**, Prolonged exposure to insulin induces mitochondrion-derived oxidative stress through increasing mitochondrial cholesterol content in hepatocytes, **Endocrinology** 2012;153:2120–2129; doi.org/10.1210/en.2011-2119 ; Epub 28. Februar 2012
- [80] **Möller, B., Terheyden, H., Açil, Y., Purcz, N.M., Hertrampf, K., Tabakov, A., et al.**, A comparison of biocompatibility and osseointegration of ceramic and titanium implants: an in vivo and in vitro study, **Int J Oral Maxillofac Surg** 2012;41:638–645; doi.org/10.1016/j.ijom.2012.02.004 ; Epub 08. März 2012
- [81] **Montalbano, G., Borciani, G., Pontremoli, C., Ciapetti, G., Mattioli-Belmonte, M., Fiorilli, S., et al.**, Development and Biocompatibility of Collagen-Based Composites Enriched with Nanoparticles of Strontium Containing Mesoporous Glass, **Materials (Basel)** 2019;12; doi.org/10.3390/ma12223719 ; Epub 11. November 2019
- [82] **Muppidi, J., Porter, M., Siegel, R.M.**, Measurement of apoptosis and other forms of cell death, **Curr Protoc Immunol** 2004;Chapter 3:Unit 3.17; doi.org/10.1002/0471142735.im0317s59 ; Epub 01. Mai 2004

- [83] **Nasir, N.J.N., Arifin, N., Noordin, K.B.A.A., Yusop, N.,** Bone repair and key signalling pathways for cell-based bone regenerative therapy: A review, **J Taibah Univ Med Sci** **2023**;18:1350–1363; doi.org/10.1016/j.jtumed.2023.05.015 ; Epub 24. Mai 2023
- [84] **Neves, N., Linhares, D., Costa, G., Ribeiro, C.C., Barbosa, M.A.,** In vivo and clinical application of strontium-enriched biomaterials for bone regeneration: A systematic review, **Bone Joint Res** **2017**;6:366–375; doi.org/10.1302/2046-3758.66.BJR-2016-0311.R1 ; Epub 01. Juni 2017
- [85] **Nose, S., Yoshino, O., Nomoto, K., Harada, M., Dohi, M., Kawahara, T., et al.,** Serum Brain-derived Neurotrophic Factor Levels Mirror Bone Mineral Density in Amenorrhic and Eumenorrhic Athletes, **Int J Sports Med** **2019**;40:276–282; doi.org/10.1055/a-0835-6119 ; Epub 21. Februar 2019
- [86] **Paris, A.J., Hayer, K.E., Oved, J.H., Avgousti, D.C., Toulmin, S.A., Zepp, J.A., et al.,** STAT3-BDNF-TrkB signalling promotes alveolar epithelial regeneration after lung injury, **Nat Cell Biol** **2020**;22:1197–1210; doi.org/10.1038/s41556-020-0569-x ; Epub 28. September 2020
- [87] **Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., et al.,** Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells, **Science** **1999**;284:143–147; doi.org/10.1126/science.284.5411.143 ; Epub 02. April 1999
- [88] **Proskuryakov, S.Y., Gabai, V.L.,** Mechanisms of tumor cell necrosis, **Curr Pharm Des** **2010**;16:56–68; doi.org/10.2174/138161210789941793
- [89] **Przekora, A., Kazimierzczak, P., Wojcik, M.,** Ex vivo determination of chitosan/curdlan/hydroxyapatite biomaterial osseointegration with the use of human trabecular bone explant: New method for biocompatibility testing of bone implants reducing animal tests, **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl** **2021**;119:111612; doi.org/10.1016/j.msec.2020.111612 ; Epub 09. Oktober 2020
- [90] **Pulido, M.D., Parrish, A.R.,** Metal-induced apoptosis: mechanisms, **Mutat Res** **2003**;533:227–241; doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2003.07.015 ; Epub 04. November 2003
- [91] **Quade, M., Schumacher, M., Bernhardt, A., Lode, A., Kampschulte, M., Voß, A., et al.,** Strontium-modification of porous scaffolds from mineralized collagen for potential use in bone defect therapy, **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl** **2018**;84:159–167; doi.org/10.1016/j.msec.2017.11.038 ; Epub 28. November 2017
- [92] **Ray, S., Thormann, U., Eichelroth, M., Budak, M., Biehl, C., Rupp, M., et al.,** Strontium and bisphosphonate coated iron foam scaffolds for osteoporotic fracture defect healing, **Biomaterials** **2018**;157:1–16; doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.11.049 ; Epub 01. Dezember 2017
- [93] **Ray, S., Thormann, U., Sommer, U., Khassawna, T.E., Hundgeburth, M., Henß, A., et al.,** Effects of macroporous, strontium loaded xerogel-scaffolds on new bone formation in critical-size metaphyseal fracture defects in ovariectomized rats, **Injury** **2016**;47:S52-S61; doi.org/10.1016/S0020-1383(16)30013-4 ; Epub 05. Januar 2016
- [94] **Reginster, J.-Y.,** Cardiac concerns associated with strontium ranelate, **Expert Opin Drug Saf** **2014**;13:1209–1213; doi.org/10.1517/14740338.2014.939169 ; Epub 14. Juli 2014
- [95] **Rezaee, F., Rellick, S.L., Piedimonte, G., Akers, S.M., O'Leary, H.A., Martin, K., et al.,** Neurotrophins regulate bone marrow stromal cell IL-6 expression through the MAPK pathway, **PLoS ONE** **2010**;5:e9690; doi.org/10.1371/journal.pone.0009690 ; Epub 15. März 2010

- [96] **Rohnke, M., Pfitzenreuter, S., Mogwitz, B., Henß, A., Thomas, J., Bieberstein, D., et al.**, Strontium release from Sr<sup>2+</sup>-loaded bone cements and dispersion in healthy and osteoporotic rat bone, **J Control Release** **2017**;262:159–169; doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.07.036 ; Epub 27. Juli 2017
- [97] **Saeed, H., Ahsan, M., Saleem, Z., Iqtedar, M., Islam, M., Danish, Z., et al.**, Mesenchymal stem cells (MSCs) as skeletal therapeutics - an update, **J Biomed Sci** **2016**;23:41; doi.org/10.1186/s12929-016-0254-3 ; Epub 16. April 2016
- [98] **Saeedi, P., Halabian, R., Imani Fooladi, A.A.**, A revealing review of mesenchymal stem cells therapy, clinical perspectives and Modification strategies, **Stem Cell Investig** **2019**;6:34; doi.org/10.21037/sci.2019.08.11 ; Epub 25. September 2019
- [99] **Sambrook, P., Cooper, C.**, Osteoporosis, **Lancet** **2006**;367:2010–2018; doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68891-0 ; Epub 17. Juni 2006
- [100] **Schmidt, R.F., Lang, F., Heckmann, M.** (Hrsg.), Physiologie des Menschen: Mit Pathophysiologie; S. 688/ 689; 31. Auflage; ISBN: 978-3-642-01650-9 ; **Berlin, Heidelberg: Springer; 2017**
- [101] **Schumacher, M., Wagner, A.S., Kokesch-Himmelreich, J., Bernhardt, A., Rohnke, M., Wenisch, S., et al.**, Strontium substitution in apatitic CaP cements effectively attenuates osteoclastic resorption but does not inhibit osteoclastogenesis, **Acta Biomater** **2016**;37:184–194; doi.org/10.1016/j.actbio.2016.04.016 ; Epub 12. April 2016
- [102] **Sharma, G.P., Frei, A.C., Narayanan, J., Gasperetti, T., Veley, D., Amjad, A., et al.**, Brain-derived neurotrophic factor promotes immune reconstitution following radiation injury via activation of bone marrow mesenchymal stem cells, **PLoS ONE** **2021**;16:e0259042; doi.org/10.1371/journal.pone.0259042 ; Epub 25. Oktober 2021
- [103] **Shen, Y., Liu, W., Wen, C., Pan, H., Wang, T., Darvell, B.W., et al.**, Bone regeneration: importance of local pH—strontium-doped borosilicate scaffold, **J Mater Chem** **2012**;22:8662; doi.org/10.1039/c2jm16141a ; Epub 21. März 2012
- [104] **Shi, Y., Wang, Y., Li, Q., Liu, K., Hou, J., Shao, C., et al.**, Immunoregulatory mechanisms of mesenchymal stem and stromal cells in inflammatory diseases, **Nat Rev Nephrol** **2018**;14:493–507; doi.org/10.1038/s41581-018-0023-5 ; Epub 12. Juni 2018
- [105] **Souza Costa, C.A. de, Hebling, J., Scheffel, D.L.S., Soares, D.G.S., Basso, F.G., Ribeiro, A.P.D.**, Methods to evaluate and strategies to improve the biocompatibility of dental materials and operative techniques, **Dent Mater** **2014**;30:769–784; doi.org/10.1016/j.dental.2014.04.010 ; Epub 28. Mai 2014
- [106] **Spangberg, L.**, Kinetic and quantitative evaluation of material cytotoxicity in vitro, **Oral Surg Oral Med Oral Pathol** **1973**;35:389–401; doi.org/10.1016/0030-4220(73)90077-7 ; Epub 15. Mai 2005
- [107] **Statistische Ämter des Bundes und der Länder**, Demografischer Wandel in Deutschland, Heft 1, 2011 **2011**
- [108] **Statistische Ämter des Bundes und der Länder**, Bevölkerung im Wandel: Annahmen und Ergebnisse der 14. koordinierten Bevölkerungsvorausberechnung **2019**
- [109] **Stenderup, K., Justesen, J., Eriksen, E.F., Rattan, S.I., Kassem, M.**, Number and proliferative capacity of osteogenic stem cells are maintained during aging and in patients with osteoporosis, **J Bone Miner Res** **2001**;16:1120–1129; doi.org/10.1359/jbmr.2001.16.6.1120 ; Epub 02. Dezember 2009
- [110] **Stevenson, M.O., Tangpricha, V.**, Osteoporosis and Bone Health in Transgender Persons, **Endocrinol Metab Clin North Am** **2019**;48:421–427; doi.org/10.1016/j.ecl.2019.02.006 ; Epub 23. März 2019

- [111] **Su, P., Tian, Y., Yang, C., Ma, X., Wang, X., Pei, J., et al.**, Mesenchymal Stem Cell Migration during Bone Formation and Bone Diseases Therapy, *Int J Mol Sci* **2018**;19; doi.org/10.3390/ijms19082343
- [112] **Su, Y., Cappock, M., Dobres, S., Kucine, A.J., Waltzer, W.C., Zhu, D.**, Supplemental mineral ions for bone regeneration and osteoporosis treatment, *Engineered Regeneration* **2023**;4:170–182; doi.org/10.1016/j.engreg.2023.02.003 ; Epub 17. Februar 2023
- [113] **Su, Y.-W., Chung, R., Ruan, C.-S., Chim, S.M., Kuek, V., Dwivedi, P.P., et al.**, Neurotrophin-3 Induces BMP-2 and VEGF Activities and Promotes the Bony Repair of Injured Growth Plate Cartilage and Bone in Rats, *J Bone Miner Res* **2016**;31:1258–1274; doi.org/10.1002/jbmr.2786 ; Epub 16. Februar 2016
- [114] **Su, Y.-W., Zhou, X.-F., Foster, B.K., Grills, B.L., Xu, J., Xian, C.J.**, Roles of neurotrophins in skeletal tissue formation and healing, *J Cell Physiol* **2018**;233:2133–2145; doi.org/10.1002/jcp.25936 ; Epub 23. Mai 2017
- [115] **Sun, C.-Y., Chu, Z.-B., She, X.-M., Zhang, L., Chen, L., Ai, L.-S., et al.**, Brain-derived neurotrophic factor is a potential osteoclast stimulating factor in multiple myeloma, *Int J Cancer* **2012**;130:827–836; doi.org/10.1002/ijc.26059 ; Epub 28. Mai 2011
- [116] **Sun, S., Diggins, N.H., Gunderson, Z.J., Fehrenbacher, J.C., White, F.A., Kacena, M.A.**, No pain, no gain? The effects of pain-promoting neuropeptides and neurotrophins on fracture healing, *Bone* **2020**;131:115109; doi.org/10.1016/j.bone.2019.115109 ; Epub 09. November 2019
- [117] **Taghi, G.M., Ghasem Kashani Maryam, H., Taghi, L., Leili, H., Leyla, M.**, Characterization of in vitro cultured bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and their ability to express neurotrophic factors, *Cell Biol Int* **2012**;36:1239–1249; doi.org/10.1042/CBI20110618 ; Epub 02. Januar 2013
- [118] **Takeda, K., Shiba, H., Mizuno, N., Hasegawa, N., Mouri, Y., Hirachi, A., et al.**, Brain-derived neurotrophic factor enhances periodontal tissue regeneration, *Tissue Eng* **2005**;11:1618–1629; doi.org/10.1089/ten.2005.11.1618 ; Epub 31. Oktober 2005
- [119] **Thormann, U., Ray, S., Sommer, U., Elkhassawna, T., Rehling, T., Hundgeburth, M., et al.**, Bone formation induced by strontium modified calcium phosphate cement in critical-size metaphyseal fracture defects in ovariectomized rats, *Biomaterials* **2013**;34:8589–8598; doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.07.036 ; Epub 29. Juli 2013
- [120] **Titulaer, J., Gottfridsson, R., Nordling, D., Fagerström, E., Eberhard, J., Konradsson-Geuken, Å.**, Sex-specific differences and similarities of olanzapine and risperidone on avoidance suppression in rats in the conditioned avoidance response test, *Brain Res* **2023**;1818:148527; doi.org/10.1016/j.brainres.2023.148527 ; Epub 09. August 2023
- [121] **Verberckmoes, S.C., Broe, M.E. de, D'Haese, P.C.**, Dose-dependent effects of strontium on osteoblast function and mineralization, *Kidney Int* **2003**;64:534–543; doi.org/10.1046/j.1523-1755.2003.00123.x ; Epub 31. März 2003
- [122] **Verroken, C., Collet, S., Lapauw, B., T'Sjoen, G.**, Osteoporosis and Bone Health in Transgender Individuals, *Calcif Tissue Int* **2022**;110:615–623; doi.org/10.1007/s00223-022-00972-2 ; Epub 02. April 2022
- [123] **Vestermark, M.T., Hauge, E.-M., Soballe, K., Bechtold, J.E., Jakobsen, T., Baas, J.**, Strontium doping of bone graft extender, *Acta Orthop* **2011**;82:614–621; doi.org/10.3109/17453674.2011.618909 ; Epub 06. September 2011

- [124] **Wang, C., Meng, H., Wang, X., Zhao, C., Peng, J., Wang, Y.**, Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Osteoblasts and Adipocytes and its Role in Treatment of Osteoporosis, *Med Sci Monit* **2016**;22:226–233; doi.org/10.12659/msm.897044 ; Epub 21. Januar 2016
- [125] **Wang, J., Zhang, Y., Cao, J., Wang, Y., Anwar, N., Zhang, Z., et al.**, The role of autophagy in bone metabolism and clinical significance, *Autophagy* **2023**;19:2409–2427; doi.org/10.1080/15548627.2023.2186112 ; Epub 08. März 2023
- [126] **Wang, W., Yeung, K.W.K.**, Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review, *Bioact Mater* **2017**;2:224–247; doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.05.007 ; Epub 07. Juni 2017
- [127] **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, *Int Orthop* **2013**;37:2491–2498; doi.org/10.1007/s00264-013-2059-2 ; Epub 15. August 2013
- [128] **Wataha, J.C.**, Biocompatibility of dental casting alloys: a review, *J Prosthet Dent* **2000**;83:223–234; doi.org/10.1016/s0022-3913(00)80016-5 ; Epub 08. Februar 2007
- [129] **Wataha, J.C.**, Principles of biocompatibility for dental practitioners, *J Prosthet Dent* **2001**;86:203–209; doi.org/10.1067/mpr.2001.117056 ; Epub 25. Mai 2002
- [130] **Wenisch, S., Trinkaus, K., Hild, A., Hose, D., Herde, K., Heiss, C., et al.**, Human reaming debris: a source of multipotent stem cells, *Bone* **2005**;36:74–83; doi.org/10.1016/j.bone.2004.09.019 ; Epub 24. November 2004
- [131] **Wilmowsky, C. von, Moest, T., Nkenke, E., Stelzle, F., Schlegel, K.A.**, Implants in bone: part II. Research on implant osseointegration: material testing, mechanical testing, imaging and histoanalytical methods, *Oral Maxillofac Surg* **2014**;18:355–372; doi.org/10.1007/s10006-013-0397-2 ; Epub 21. Februar 2013
- [132] **Xu, D., Di Lian, Wu, J., Liu, Y., Zhu, M., Sun, J., et al.**, Brain-derived neurotrophic factor reduces inflammation and hippocampal apoptosis in experimental Streptococcus pneumoniae meningitis, *J Neuroinflammation* **2017**;14:156; doi.org/10.1186/s12974-017-0930-6 ; Epub 04. August 2017
- [133] **Yamashiro, T., Fukunaga, T., Yamashita, K., Kobashi, N., Takano-Yamamoto, T.**, Gene and protein expression of brain-derived neurotrophic factor and TrkB in bone and cartilage, *Bone* **2001**;28:404–409; doi.org/10.1016/S8756-3282(01)00405-7 ; Epub 27. April 2001
- [134] **Yang, M., Lu, B.-J., Duan, Y.-Y., Chen, X.-F., Ma, J.-G., Guo, Y.**, Genetics association study and functional analysis on osteoporosis susceptibility gene BDNF, *Yi Chuan* **2017**;39:726–736; doi.org/10.16288/j.ycz.17-145
- [135] **Yu, L., Zhu, G., Zhang, Z., Yu, Y., Zeng, L., Xu, Z., et al.**, Apoptotic bodies: bioactive treasure left behind by the dying cells with robust diagnostic and therapeutic application potentials, *J Nanobiotechnology* **2023**;21:218; doi.org/10.1186/s12951-023-01969-1 ; Epub 12. Juli 2023
- [136] **Zhang, C., Soori, M., Miles, F.L., Sikes, R.A., Carson, D.D., Chung, L.W.K., et al.**, Paracrine factors produced by bone marrow stromal cells induce apoptosis and neuroendocrine differentiation in prostate cancer cells, *Prostate* **2011**;71:157–167; doi.org/10.1002/pros.21231 ; Epub 22. Dezember 2010
- [137] **Zhang, W., Shen, Y., Pan, H., Lin, K., Liu, X., Darvell, B.W., et al.**, Effects of strontium in modified biomaterials, *Acta Biomater* **2011**;7:800–808; doi.org/10.1016/j.actbio.2010.08.031 ; Epub 06. September 2010
- [138] **Zhang, Z., Hu, P., Wang, Z., Qiu, X., Chen, Y.**, BDNF promoted osteoblast migration and fracture healing by up-regulating integrin  $\beta$ 1 via TrkB-mediated

- ERK1/2 and AKT signalling, *J Cell Mol Med* 2020;24:10792–10802; doi.org/10.1111/jcmm.15704 ; Epub 16. August 2020
- [139] **Zhang, Z., Zhang, Y., Zhou, Z., Shi, H., Qiu, X., Xiong, J., et al.**, BDNF regulates the expression and secretion of VEGF from osteoblasts via the TrkB/ERK1/2 signaling pathway during fracture healing, *Mol Med Rep* 2017;15:1362–1367; doi.org/10.3892/mmr.2017.6110 ; Epub 12. Januar 2017

## **12. Publikationsverzeichnis**

### **Kongressbeitrag:**

**Paul T. Itting**, Benjamin Kruppke, Thomas Hanke, Vivien Kauschke, Christian Heiß, Katrin S. Lips; (2019, Oktober).

**Das Neurotrophin BDNF steigert das Überleben von MSC auf gelatinemodifizierten Calcium-Strontium-Phosphat-Knochenersatzmaterialien *in vitro*.**

Posterbeitrag: Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie (DKOU), *Deutsche Gesellschaft für Orthopädie und Unfallchirurgie e.V. Berlin, Deutschland*

### **13. Erklärung zur Dissertation**

„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, oder habe diese nachstehendspezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. 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.“

Göttingen, den 07. Januar 2025

Ort, Datum

\_\_\_\_\_  
Paul T. Itting

## 14. Danksagung

An erster Stelle möchte ich meiner Betreuerin Frau Prof. Dr. rer. nat. Katrin S. Lips danken, die mir die Möglichkeit geboten hat, für meine Doktorarbeit im von ihr geführten Labor zu forschen und auch diese Arbeit mit Hilfe ihrer Betreuung fertig zu stellen. Hierbei möchte ich mich neben den praktischen und inhaltlichen Dingen dieser Arbeit auch für die offene und gute persönliche Zusammenarbeit bedanken!

Mein Dank gilt weiterhin der Deutschen Forschungsgesellschaft (DFG), welche durch die Förderung des Sonderforschungsbereiches/ Transregio 79, Teilprojekte B7 und M3 dieses Forschungsprojekt erst möglich machten. Hier sind insbesondere unsere überregionalen Partner aus dem Max Bergmann Zentrum für Biomaterialien in Dresden, namentlich Prof. Dr. rer. nat. Thomas Hanke und Hr. Dr. rer. nat. Benjamin Krupke zu nennen, die durch ihre Forschung an den hier getesteten Knochenersatzstoffen diese Arbeit ermöglichten und uns die Probekörper zur Verfügung stellten.

Danken möchte ich zusätzlich Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. Christian Heiß, sowie allen Mitarbeitern des Labors für Experimentelle Unfallchirurgie der Justus-Liebig-Universität Gießen, ohne deren Unterstützung diese Dissertation nicht zustande gekommen wäre. Mein Dank gilt im Labor für experimentelle Unfallchirurgie insbesondere Frau Vivien Kauschke und Frau Olga Dakischew, welche besonders bei Problemen praktischer Natur zu jederzeit hilfsbereit waren und immer mit gutem Rat und auch tatkräftig unterstützt haben.

Schließlich möchte ich mich noch bei Frau Prof. Dr. Monika Wimmer für Ihre Unterstützung und Ihre Ratschläge in den ersten Semestern bedanken, ohne die ich mich nicht früh genug um eine Möglichkeit für eine Dissertation gekümmert hätte.

Mein besonderer Dank gilt auch meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und meiner Schwester, sowie meinen Freunden für Ihre Unterstützung hinsichtlich dieser Arbeit und weit darüber hinaus.