

**Der Einfluss von Polyelektrolytkomplex-Nanopartikel-Beschichtung auf die  
osteogene Differenzierung in vitro**

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

vorgelegt von Maximilian Siebert  
aus Braunschweig

Gießen 2019

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

Gutachter: Prof. Dr. Katrin Susanne Lips

Gutachter: Prof. Dr. Dr. Hans-Peter Howaldt

Tag der Disputation: 25. September 2020

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Knochen und Knochenzellen	1
1.1.1	Die basic multicellular unit als zentrales Werkzeug des Knochenstoffwechsels	1
1.1.2	Differenzierung der osteogenen Zelllinie und Mineralisierung	5
1.2	Humane multipotente mesenchymale Stromazellen	7
1.2.1	MSC aus Bohrmehl	9
1.3	Osteoporose	9
1.3.1	Pathophysiologie der Osteoporose	10
1.3.2	Therapie der Osteoporose	12
1.4	Funktionalisierung von Materialien durch Nanopartikel	13
1.5	Zielsetzung der Arbeit	15
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>16</b>
2.1	Material	16
2.1.1	Geräte	16
2.1.2	Verbrauchsmaterialien und Laborbedarf	17
2.1.3	Zusätze, Chemikalien und kommerzielle Kulturmedien	17
2.1.4	Eigene Ansätze	18
2.1.5	Kits und Reagenzien	19
2.1.6	Testmaterialien	19
2.1.7	Software	20
2.2	Methoden	20
2.2.1	Gewinnung von hMSC	20
2.2.2	Einfrieren und Auftauen	21
2.2.3	Übersicht über verwendete ZKs	22
2.2.4	Aussaat und Differenzierung	22
2.2.5	Wiederaufbereiten der Testmaterialien zwischen Kulturexperimenten	24
2.2.6	Phasenkontrastmikroskopie	25

2.2.7	Bestimmung der Zellvitalität mittels MTT-Test.....	25
2.2.8	Messung der Konzentration von Kalziumionen im Überstand.....	25
2.2.9	Bestimmung der Osteokalzinkonzentration im Überstand .....	26
2.2.10	Messung der ALP-Aktivität im Zelllysate .....	28
2.2.11	Messung des Gesamtproteingehalts des Zelllysats.....	29
2.2.12	Normierung der ALP-Aktivität auf den Gesamtproteingehalt.....	30
2.2.13	Färbung der mineralisierten Matrix mittels Alizarinrot S Farbstoff.....	31
2.2.14	Histomorphometrische Bestimmung der mineralisierten Fläche .....	31
2.2.15	Alizarinrot S Farbstoff-Rückgewinnung und -Quantifizierung.....	33
2.2.16	Statistische Analyse .....	34
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>35</b>
3.1	Zellmorphologie in der Phasenkontrastmikroskopie.....	35
3.1.1	Undifferenzierte MSC verschiedener Spender zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Aussaat .....	35
3.1.2	MSC verschiedener Spender im Verlauf der osteogenen Differenzierung im Versuchszeitraum.....	36
3.1.3	Einfluss der Materialien auf Zellwachstum und Morphologie .....	39
3.1.4	Reduktion der verwendeten Risedronatmenge.....	40
3.1.5	Vergleich der risedronatreduzierten Materialien in Bezug auf Wachstum und Zellmorphologie.....	41
3.2	Konzentration von Kalziumionen im Überstand .....	42
3.2.1	Kalziumkonzentration im Kulturmedium zu Versuchsstart .....	43
3.2.2	Veränderung der Kalziumkonzentration nach Mediumwechsel.....	43
3.3	Mineralisierte Matrix nach Alizarinrot S Färbung .....	45
3.3.1	Mineralisierte Fläche .....	45
3.3.2	Farbstoffrückgewinnung und photometrische Quantifizierung .....	47
3.4	Osteokalzinkonzentration im Überstand .....	49
3.5	ALP-Aktivität.....	49
3.6	Zellvitalität .....	51

3.6.1	Einfluss risedronatreicher Materialien auf die Zellvitalität nach 35 Tagen in osteogenem Differenzierungsmedium .....	52
3.6.2	Einfluss risedronatreduzierter Materialien auf die Zellvitalität .....	53
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>55</b>
4.1	Diskussion des Zellkulturmodells und Wirkstoffes .....	55
4.1.1	MSC: ein Name für unterschiedliche Identitäten.....	55
4.1.2	Einordnung der Bohrmehl-MSK .....	61
4.1.3	Risedronat hat Potential .....	64
4.2	Biokompatibilität der PEK-Nanopartikel Beschichtung.....	69
4.3	Wirkung von Risedronat auf das Zellüberleben und die osteogene Differenzierung von MSC.....	70
4.4	Einfluss der PEK-Nanopartikel auf die Risedronatwirkung.....	73
4.5	Limitationen der Studie und Methodenkritik.....	75
4.6	Fazit.....	79
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>82</b>
<b>6</b>	<b>Summary</b> .....	<b>84</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungs-, Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>86</b>
7.1	Abkürzungsverzeichnis .....	86
7.2	Abbildungsverzeichnis.....	89
7.3	Tabellenverzeichnis.....	90
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>91</b>
<b>9</b>	<b>Publikationsverzeichnis</b> .....	<b>103</b>
<b>10</b>	<b>Erklärung zur Dissertation</b> .....	<b>104</b>
<b>11</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>105</b>
<b>12</b>	<b>Tabellarischer Lebenslauf</b> .....	<b>106</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Knochen und Knochenzellen

Knochen bilden das innere Stützsystem unseres Körpers. Dabei übernimmt das Skelett keinesfalls nur eine passive mechanische Funktion, sondern muss vielmehr als lebendes Organ betrachtet werden, welches in physiologischer Weise plastisch auf Reize und Belastung reagiert. Das Knochengewebe ist in aktiver und zentraler Weise an der Kalzium- sowie Phosphathomöostase beteiligt und erfüllt dort eine wichtige Speicherfunktion (Clarke 2008). Die verschiedenen Kompartimente im Knochen bieten darüber hinaus knocheneigenen und -fremden Zellen Nischen, um Funktionen der Blutbildung, Immunabwehr sowie Selbsterneuerung wahrzunehmen (Taichman 2005). Im Rahmen dieser Aufgaben ist der Knochen in autonome, endokrine und neuronale Regulationsmechanismen eingebunden. Pathologien und Erkrankungen des Knochens sind damit zumeist auch ein systemisches Geschehen (Bassett und Williams 2008; Eimar et al. 2013).

### 1.1.1 Die **basic multicellular unit** als **zentrales Werkzeug** des **Knochenstoffwechsels**

Als Ort des aktiven Knochenstoffwechsels gilt eine grundlegende multizelluläre Einheit von Knochenzellen und assoziierten Blutgefäßen (engl. *basic multicellular unit*, BMU), welche als solche zunächst durch H.M. Frost seit den frühen 60er Jahren bezeichnet wurde. Auf dieser Ebene findet die konstante Selbsterneuerung des Knochens, das sogenannte Knochenremodeling statt. Dies erfordert die sequenzielle Aktivität verschiedener Knochenzellen nach dem Schema Aktivierung → Resorption → Formierung (Frost 1969). Die ständige fest gekoppelte Sequenz von Knochenresorption und der Formierung neuen Knochens ist einerseits notwendig, um die Stabilität des Knochens zu erhalten und mikrogeschädigten Knochen zu ersetzen. Andererseits erlaubt sie den Austausch von Kalzium- und Phosphationen zwischen der Knochenmatrix und der Umgebung. Dies geschieht über Stimulation von Umbauprozessen einerseits durch aktive zelluläre Freisetzung, andererseits durch passiven Austausch mit neu formiertem Knochen (Clarke 2008). Die Einflüsse auf die Bilanz zwischen Knochenaufbau und -abbau in der Gesamtheit aller BMUs sind vielfältig und werden komplex reguliert. Das Knochenremodeling ist Ergebnis der koordinierten Aktivität von Osteoklasten, Osteoblasten, Osteozyten und Saumzellen (engl. *bone lining cells*), welche die BMU bilden und als eigenes temporäres anatomisches Kompartiment

(dann auch *bone remodeling compartment*, BRC genannt) begrenzen (Hauge et al. 2001).

An zentraler Stelle stehen die Osteozyten (und ihre Vorläuferzellen) welche in der mineralisierten Matrix in Lakunen liegen und über dendritische Fortsätze in engen Kanälchen (lat. *Canaliculi*) mittels *gap-junctions* mit einander sowie mit den Osteoblasten und *bone lining cells* auf der Knochenoberfläche in Kontakt stehen. *Gap-junctions* bestehen aus Connexonen, welche im Knochen zumeist aus Connexin 43: (Cx43) zusammengesetzt sind. Die Osteozyten sind von extrazellulärer Flüssigkeit umspült, welche gleichzeitig Ernährungs- und vermutlich Signalfunktion u.a. im Rahmen der Mechanozeption besitzt. Es ist dieses lacuno-canaliculäre Netzwerk der Osteozyten, welches systemische und lokale Informationen, seien sie nun chemischer oder mechanischer Natur, integriert und damit den Knochenremodelingzyklus steuert und knochenresorbierende Osteoklasten sowie knochenformierende Osteoblasten selektiv beeinflusst (Chen et al. 2015). Es mehren sich die Hinweise, wonach die Apoptose von Osteozyten signalgebend für die Aktivierung des Knochenremodelingzyklus ist. Apoptose wird etwa durch die Unterbrechung des Osteozytennetzwerks und den Verlust des Zell-Zell-Kontakts bei Mikrofrakturierung infolge übermäßiger Belastung ausgelöst. Weiterhin führen auch Östrogen- oder Androgendefizienz sowie Glukokortikoidtherapie zur Apoptose von Osteozyten. Das Nebeneinander von systemischen und lokalen Auslösern hilft das gleichzeitige Auftreten von im Knochen scheinbar zufällig verteiltem (stochastischem) und gezieltem *remodeling* zu erklären (Burr und Allen 2013). Apoptotische Osteozyten und ihre Nachbarn bilden verstärkt *receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand* (RANKL) sowie weiter entfernt des Schadens vermehrt Osteoprotegerin (OPG). Die RANKL exprimierenden Zellen lassen sich in einem Bereich von 100-300  $\mu$ m um Mikrorisse nachweisen, wohingegen im selben Gebiet der Nachweis OPG positiver Zellen gegenüber unbeschädigtem Knochen vermindert ist. Der hierdurch entstehende Gradient des RANKL/OPG Quotienten ist vermutlich der Auslöser der gezielten Osteoklastenrekrutierung und –reifung während der Aktivierungsphase des Knochenremodelings (Kennedy et al. 2012). Zusätzlich muss durch Abheben der *bone lining cells*, welche alle Knochenoberflächen vor Osteoklastenaktivität abschirmen, das BRC geschaffen werden. Dieses ist ebenfalls mit Blutgefäßen assoziiert, über die mononukleäre Zellen der hämatopoetischen Stammzelllinie rekrutiert werden. Makrophagen *colony-stimulating factor* (M-CSF), der ebenfalls von Osteozyten (aber auch Osteoblasten und deren mesenchymalen Vorläuferzellen) gebildet wird, vermittelt dabei Proliferationssignale und verhindert die Apoptose der Vorläuferzellen. Die Bindung von RANKL an den Rezeptor RANK wiederum ist entscheidend, um die

Osteoklastogenese der mononukleären Vorläuferzellen einzuleiten. OPG gehört wie RANK zur Superfamilie der Tumornekrosefaktor-Rezeptoren und kann daher den Liganden RANKL binden. Dies hat allerdings keine Signalwirkung, wodurch Osteoprotegerin die RANKL/RANK Interaktion verhindert. Somit wird die Osteoklastendifferenzierung und -reifung über das RANKL/OPG Verhältnis beeinflusst. Die Differenzierung schreitet nach der Fusion mehrerer mononukleärer Progenitorzellen und Polarisierung dieser auf exponierten Knochenoberflächen zu knochenresorbierenden reifen mehrkernigen Osteoklasten voran. Der Lebenszyklus des Osteoklasten endet durch Apoptose (Florencio-Silva et al. 2015). Ein Knochenresorbierender Konus aus Osteoklasten wird von einem verschließenden Konus aus Knochenmatrix produzierenden Osteoblasten gefolgt. Die BMU bewegt sich so lokal (in der Kortikalis einen Tunnel und am Trabekel einen Graben formend) voran. Damit ist die Aktivität der BMU sowohl zeitlich als auch örtlich dynamisch. Am Ende bleibt nach Auffüllen des resorbierten Raumes mit neuem Knochen ein neues Osteon bzw. Hemiosteon zurück (Parfitt 1994).

Nach der Resorption muss auf eine Phase der Umkehrung dementsprechend der Aufbau neuen Knochens folgen. Auf der von Osteoklasten zurückgelassenen Oberfläche, welche in der Umkehrphase von alten Matrixresten befreit wurde und mit einer Zement-Grenzschicht aus spezieller Knochenmatrix versehen wurde, beginnen Osteoblasten mit der Synthese von Kollagen-I haltiger Knochenmatrix, genannt Osteoid. Diese organische Knochenmatrix bildet das Gerüst für die folgende Mineralisierung durch Kalziumphosphatkristalle (Hydroxylapatit,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) (Burr und Allen 2013). Osteoblasten initiieren und regulieren ebenfalls die Mineralisierung des Osteoids. Dies geschieht durch die Abschnürung von kleinen Kalzium und Phosphat konzentrierenden Membranvesikeln in die Matrix sowie durch eine Reihe von regulierenden Proteinen und Enzymen (siehe Differenzierung der osteogenen Zelllinie und Mineralisierung Seite 5). Der Kopplungsmechanismus, welcher die Osteoklasten- und Osteoblastenaktivität über die Lebensdauer einer BMU bei ständiger Rekrutierung neuer Vorläuferzellen zeitlich und örtlich aneinanderbindet, ist noch nicht abschließend verstanden. Es werden verschiedene Kopplungssignale wie aus dem Knochen freigesetzte Matrixproteine und Zell-Zell-Interaktion zwischen Osteoklasten und Osteoblasten (insb. über Semaphorine und Ephrine) (Marie und Cohen-Solal 2018) aber auch *bone lining cells* als vermittelndes Element diskutiert (Andersen et al. 2013). Etwa 60 % der aktiven Osteoblasten gehen in Apoptose. Die Übrigen werden nach und nach von Knochenmatrix eingebettet und differenzieren dabei zu Osteozyten oder schließen die Knochenoberfläche letztendlich nach Außen als flache *bone lining cells* ab (Clarke 2008).

Nicht nur die Rekrutierung von Osteoklasten und damit die Initiierung des Remodelingzyklusses, auch die Aktivität der Osteoblasten scheint erheblich durch die eingebetteten Osteozyten gesteuert zu werden. Dies geschieht potent durch Sklerostin, ein Genprodukt des *SOST*-Gens. Die Sekretion von Sklerostin und dessen Transport über das lacuno-canaliculäre Netzwerk erlaubt es Osteozyten die Differenzierung von osteoblastären Vorläuferzellen und die Lebensdauer von Osteoblasten zu beeinflussen, indem sie den pro osteogenen Wnt/ $\beta$ -catenin Signalweg hemmen. Beispielsweise erhöht das Fehlen mechanischer Beanspruchung die osteozytäre *SOST*/Sklerostin Expression. Beides ist mit verringerter Knochenbildung assoziiert. Mechanische Stimulation wiederum bewirkt das Gegenteil (Robling et al. 2008). Auch wird der anabole Effekt von Östrogen und intermittierender Parathormon (PTH) Behandlung teilweise als durch Sklerostin vermittelt betrachtet. Darüber hinaus liegt eine vermehrte Sklerostinausschüttung bei Entzündung und Rheumatoider Arthritis vor. Dickkopfprotein 1 (*Dkk1*), welches in ähnlicher Weise durch Osteozyten freigesetzt wird, wirkt sich ebenfalls in synergistischer Weise zu Sklerostin inhibierend auf den kanonischen Wnt-Signaltransduktionsweg aus (Chen et al. 2015).

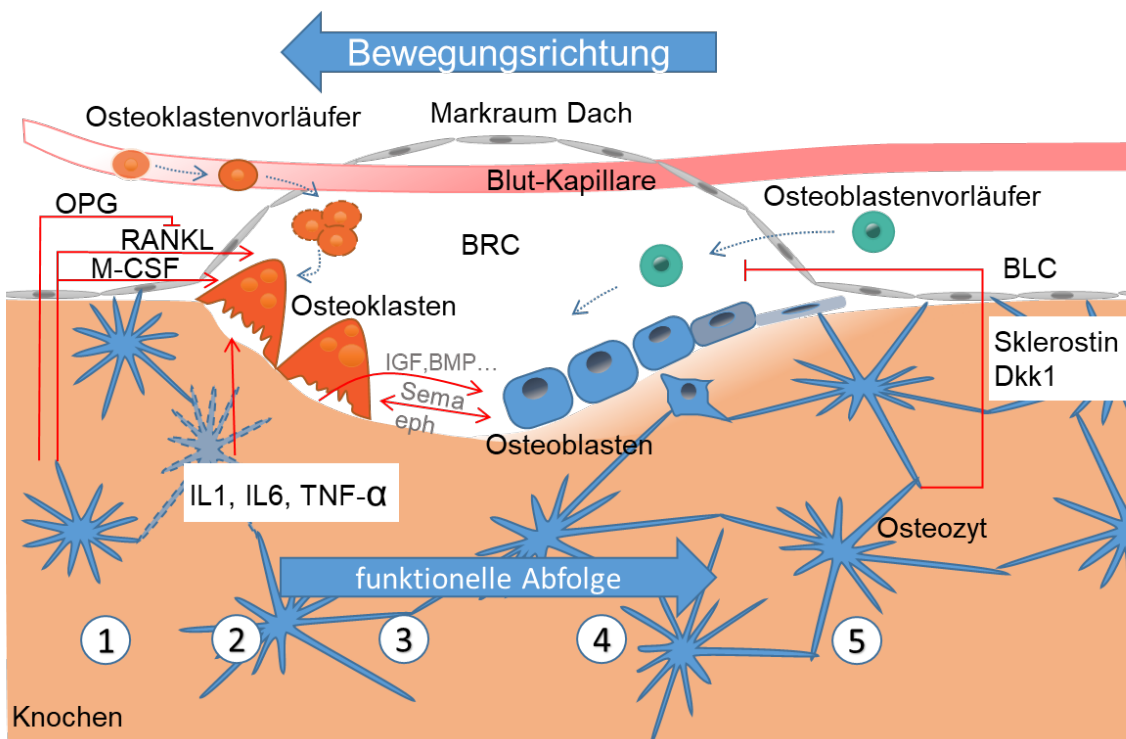


Abbildung 1: Mechanismus des Knochenremodelings durch die bone cellular unit.

Von der Knochenoberfläche ausgehend bewegt sich eine funktionelle Einheit aus knochenresorbierenden Osteoklasten gefolgt von knochenformierenden Osteoblasten in einem zum Markraum begrenzten Kompartiment voran. In der bone cellular unit erfolgt die feste Phasenabfolge von Aktivierung (1), Resorption (2), Umkehr (3), Fomierung (4) und Ruhe (5) durch ein koordiniertes Zusammenspiel aller beteiligten Zellen. Die Rekrutierung und Ausreifung der beteiligten Zellen wird durch Zytokine, Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion gesteuert.

Osteozyten nehmen eine Signalfunktion ein. Osteoklasten werden aus der Zirkulation rekrutiert. Osteoblasten entstammen dem umgebenden Stroma und enden entweder als Osteozyten, bone lining cells oder durch Apoptose. OPG: Osteoprotegerin, RANKL: receptor activator NF- $\kappa$ B ligand, M-CSF: Makrophagen colony stimulating factor, IL: Interleukin, TNF- $\alpha$  Tumornekrosefaktor- $\alpha$ , IGF: Insulin-like growth factor, BMP: bone morphogenic protein, Sema: Semaphorine, eph: Ephrine, BRC: bone remodeling compartment, Dkk1: Dickkopf 1, BLC: bone lining cell. Abbildung modifiziert nach Burr und Allen (2013) sowie Florencio-Silva et al. (2015).

### 1.1.2 Differenzierung der osteogenen Zelllinie und Mineralisierung

Klassischerweise wird davon ausgegangen, dass die osteogene Zelllinie multipotenten Stammzellen im skelettalen Stroma (mesenchymale Stammzellen, MSC) entspringt. Definitionsgemäß können sich solche Stammzellen in sogenannten Stammzellnischen durch asymmetrische Teilung unbegrenzt selbst erhalten und abhängig von der Zusammensetzung ihrer Umgebung verschiedene in ihrer Differenzierung zunehmend festgelegte spezialisierte Tochterzellen hervorbringen (Watt und Hogan 2000). Eine schrittweise Abfolge der Differenzierung in der Osteoblastogenese wurde durch Stein et al. (1990) Anfang der 90er Jahre vorgeschlagen. In ihrem Modell lassen sich Phasen von Proliferation, Matrixproduktion, -reifung und schließlich -mineralisierung unterscheiden. Jeder Schritt geht jeweils mit der Expression charakteristischer Gene durch die Aktivierung gezielter Transkriptionsfaktoren sowie der Ausbildung eines bestimmten Phänotyps einher. Beispielsweise steigt gegen Ende der Proliferationsphase, welche sinnvoll für die Erhaltung eines Vorrats an Osteoprogenitoren ist, die Expression von alkalischer Phosphatase (ALP) stark an (Stein et al. 1990). Die Festlegung einer MSC zur Differenzierung in Richtung einer osteochondrogenen Vorläuferzelle (bei gleichzeitiger Unterdrückung der adipogenen Richtung) wird entscheidend durch das  $\beta$ -Catenin vermittelte *Wnt-Signaling* und *bone morphogenic proteins* (BMPs) ausgelöst. Der zentrale Mediator ist dabei der *runx-related transcription factor 2* (Runx2), welcher zusammen mit dem später in der Kaskade folgenden Osterix (OSX) die Signale integriert und die Expression der für die Osteogenese wichtigen Gene initiiert (Lian et al. 2006). Als Osteo/chondroprogenitor gilt eine Zelle, wenn sie mindestens Runx2, OSX und *distal-less homeobox 5* (Dlx5) exprimiert, was durch BMPs und *insulin-like growth factor-1* (IGF-1) stimuliert wird. Ein Vorrat von Osteoprogenitoren, die Runx2 und Kollagen-I exprimieren, treten in die Proliferationsphase ein, in welcher sie eine ALP-Aktivität entwickeln und nun Präosteoblasten darstellen. Reife Osteoblasten sekretieren größere Mengen an weiteren Matrixproteinen wie Osteokalzin, *bone-sialoprotein* I und II und Osteopontin, welche auf die Matrixmineralisierung Einfluss nehmen. Morphologisch handelt es sich nun um kuboidale einreihige Zellen auf Knochenoberflächen. Die polarisierten, auf Proteinsynthese angepassten Zellen zeigen einen runden basalen Nucleus und prominenten Golgi Apparat hin zum Osteoid (Capulli et al. 2014). Darüber hinaus

vermitteln Wnt-Glycoproteine Überlebenssignale neben dem kanonischen Signalweg (durch  $\beta$ -catenin-induzierte Gentranskription) auch über antiapoptotische kinasevermittelte Signalwege in Osteoblasten verschiedener Reifegrade (Burr und Allen 2013). Weiterhin scheint auch Cx43 eine aktive Rolle für die Differenzierung und das Überleben von Osteoblasten zu spielen (Hebert und Stains 2013; Davis et al. 2018).

Die Mineralisierung des Osteoids wird entscheidend durch seine von den Osteoblasten sezernierten Bestandteile vorangetrieben. Dies sind Kollagene (hiervon vornehmlich Kollagen Typ I), nichtkollagene oft glykosylierte oder an Glutamat  $\gamma$ -carboxylierte Proteine (ALP, Osteokalzin, Osteonektin, *bone-sialoprotein* und Osteopontin) und Proteoglykane. Die Mineralisierung vollzieht sich durch die Einlagerung von Hydroxylapatitkristallen zwischen die Enden von Kollagenfibrillen (Clarke 2008). Im extrazellulären Raum der Knochenmatrix findet die Mineralisierung nicht spontan und ungeordnet statt. Vielmehr bieten von den Osteoblasten abgeschnürte Membranvesikel geschützte Bereiche, in denen Bedingungen herrschen, unter welchen sich Hydroxylapatitkristalle bilden und ausfallen können. Hiernach werden diese bei Ruptur der Vesikel freigesetzt (Anderson 2003). Transporterproteine der Vesikelmembran erhöhen die lokale Konzentration von Kalzium- und Phosphationen, welche sich insbesondere an der inneren Vesikelmembran konzentrieren. Die gebildeten Kristalle penetrieren die Membran und bilden mineralisierte Noduli. Die membrangebundene ALP ist wichtig, um Phosphatester zu spalten und so die lokale Phosphatkonzentration in den Membranvesikeln zu erhöhen sowie phosphathaltige Inhibitoren der Mineralisierung (insbesondere Pyrophosphate) zu hydrolysieren. Diese werden in der Umgebung der Mineralisierung gebildet, um das übergroße Wachstum der Hydroxylapatitkristalle und die Mineralisierung anderer Gewebe zu verhindern. Die ALP neutralisiert damit Mineralisierungsinhibitoren und stellt gleichzeitig Phosphationen für die Apatitbildung bereit (Hasegawa 2018). Proteoglykane binden ionisiertes Kalzium und helfen so nach ihrem Abbau zusätzlich Kalzium zu konzentrieren. Die (ebenfalls kalzium- und phosphatbindenden) nicht kollagenen Proteine beeinflussen evtl. die Menge, Größe und Verteilung der Apatitkristalle beim weiteren nicht vesikelgebundenen Wachstum (Clarke 2008). Das *bone-sialoprotein* fungiert möglicherweise als Inhibitor abnormaler exzessiver Mineralisierung. Osteokalzin, welches aufgrund seiner  $\gamma$ -carboxylierten Glutaminsäuren sehr affin an kristalline Kalziumphosphate bindet, könnte darüberhinaus eine wichtige Rolle in der runden Anordnung der nadelförmigen Apatitkristalle in Noduli spielen, welche dann entlang der kollagenen Suprahelix entlangwachsen (Hasegawa 2018). An die primäre Mineralisierung schließt sich die sekundäre Mineralisierung an, in welcher die Mineraleichte im Laufe der Zeit langsam ansteigt.

## 1.2 Humane multipotente mesenchymale Stromazellen

Ab den späten 1960er Jahren beschrieben Friedenstein et al. nicht hämatopoetische Zellen des Knochenmarks, welche plastikadhärent sind und bei Kultur in niedriger Dichte klonal Kolonien von Fibroblastenvorläufern bildeten (Friedenstein et al. 1976). Diese hier *colony-forming unit*-Fibroblast (CFU-F) genannten Zellen seien die bereits vorher vermuteten stromalen Stammzellen des Knochens, welche sowohl das Knochenmarkstroma inklusive der hämatopoetischen Stammzellnische (engl. *hematopoietic microenvironment*, HME) als auch alle anderen Bestandteile des Knochens mesenchymalen Ursprungs (Knorpel, Fett und osteogene Knochenzellen) hervorbringen (Owen und Friedenstein 1988). Die Existenz einer solchen Stammzelle wurde vermutet, da Transplantate von Stromazellen in vivo ektopen Knochen bildeten, deren Stroma von Empfängergewebe bevölkert war (Friedenstein et al. 1974). Plastikadhärente und rasch expandierende Kulturen des Knochenstromas firmierten fortan häufig unter dem Namen mesenchymale Stammzellen. Für diese wurde gezeigt, dass sie in vitro unter den richtigen Kulturbedingungen gezielt entlang der osteogenen, chondrogenen und adipogenen Reihe differenzieren können. Das Differenzierungspotential einzelner Kolonien kann sich zwar unterscheiden, bleibt aber auch nach Expansion und Passage erhalten (Pittenger et al. 1999).

Die in der darauffolgenden Forschung verwendeten MSC Kulturen stellen keine homogenen Kulturen von klar definierten einheitlichen multipotenten Stammzellen dar. Kulturen, die aus einzelnen koloniebildenden Stämmen gewonnen wurden unterschieden sich allerdings nicht weniger deutlich in ihrem Differenzierungspotential und der Expression von Oberflächenmarkern als gemischte Zellkulturen, die allein aufgrund ihrer Plastikadhärenz aus dem Ursprungsgewebe isoliert wurden (Bianco et al. 2001). Ihre Eigenschaften schienen sich in der Kultur abhängig von Zeit und Umgebung zu ändern und dabei einer eindeutigen Beschreibung zu entgehen (Yang et al. 2018). Die Charakterisierung und Identifizierung eines vielversprechenden Phänotyps dieser Kulturen von differenzierten Zellen, Vorgängern und Stromazell-subpopulationen unterschiedlicher Proliferations- und Differenzierungskapazität (multi- bis unipotent) ist eine Voraussetzung für die Erforschung der ‚MSC‘ (Fernández Vallone et al. 2013).

Die Entwicklung von Stromazell-spezifischen Antikörpern gelang erstmals 1992. Es wurden durch Immunisierung von Mäusen mit MSC drei monokonale Antikörper (von ihren Beschreibern SH-2, SH-3 und SH-4 genannt) gefunden. Diese banden zuverlässig an koloniebildende mesenchymale Zellen im Stroma des Knochens ohne mit den hämatopoetischen Stammzellen des Markraumes zu reagieren. Auch wurde eine

Kreuzreaktivität mit MSC Nachkommen wie Osteoblasten und Osteozyten ausgeschlossen (Haynesworth et al. 1992). Für die Antikörper SH-3 und SH-4 konnte nachgewiesen werden, dass sie unterschiedliche Epitope von CD73 (CD73: *cluster of differentiation 73; lymphocyte-vascular adhesion protein 2*) binden (Barry et al. 2001). Das Ziel von SH-2 wurde als CD105 (Endoglin, auch ein Marker von Endothelzellen) identifiziert (Barry et al. 1999). Beide Oberflächenmarker deuten auf einen perivaskulären Ursprung der MSC hin. In den darauffolgenden Jahren wurden eine Reihe weiterer Oberflächenmarker beschrieben und verschiedene Subpopulationen in MSC Kulturen postuliert. Beispielsweise zeigen CD105-negative mesenchymale Stromazellen verschiedenen Ursprungs ein größeres osteogenes Potential als CD105<sup>+</sup> Zellen (Anderson et al. 2013). Die Vielfalt der MSC Kultivierungsverfahren und die Gewinnung ähnlicher Kulturen aus verschiedenen knochenfremden Geweben veranlasste die International Society for Cellular Therapy 2006 zum Vorschlag von Minimalkriterien, um humane MSC zu definieren. Demnach zeichnet sich eine MSC Kultur durch folgende Eigenschaften aus:

- Plastikadhärenz,
- Expression von CD105, CD73 und CD90, bei gleichzeitiger Negativität für eine Reihe von Oberflächenmarkern hämatopoetischer Stammzellen (CD45, CD34, CD14) und
- multipotentes Differenzierungspotential in Osteoblasten, Adipozyten und Chondrozyten, das durch entsprechende in vitro Kultur und anschließende histologische Färbungen nachzuweisen ist (Dominici et al. 2006).

Infolgedessen wird das Akronym MSC in der Literatur für ‚multipotente mesenchymale Stromazellen‘ vieler Gewebe entsprechend der obigen Definition verwendet, als auch auf strenger definierte ‚echte‘ mesenchymale Stammzellen des Knochens angewandt.

Morphologisch wurden bereits früh zwei Zelltypen in Stromazellkulturen beschrieben, die aus dem Knochenmark kultiviert wurden. Zum einen fanden sich kleinere spindelförmige Zellen und größere flache Zellen mit ausgeprägtem Zytoskelett, wobei erstere schnell proliferierende Vorgänger der reiferen größeren Zellen zu sein schienen (Mets und Verdonk 1981). Colter et al. (2001) postulierten zudem eine dritte sehr kleine ca. 7 µm große schnellteilende Population als ‚*rapidly self-renewing*‘ (RS) -Zellen. Sie bezeichneten die Population größerer langsam teilender Zellen als ‚mature‘ MSC (mMSC) (Colter et al. 2001). Alle drei distinkten Subpopulationen werden in einer einzigen koloniebildenden Einheit etabliert und gehen vermutlich auseinander hervor,

wobei die mMSC eventuell bereits spontan in Richtung der osteogenen Linie festgelegt sind (Haasters et al. 2009).

### 1.2.1 MSC aus Bohrmehl

Als Quelle vitaler Knochenzellen aus der sich MSC gewinnen lassen, eignet sich neben den ursprünglich verwendeten Knochenmarksaspiraten (zumeist aus der Crista iliaca) auch Bohrmehl. Bohrmehl fällt beim Aufbohren von Kortikalis und Markraum im Rahmen der intramedullären Nagelung des Knochens bei der Versorgung geschlossener Frakturen langer Röhrenknochen an. In vergleichenden Studien sind die pro-osteogenen Eigenschaften von Bohrmehl im Frakturspalt auf die Frakturheilung mit Spongiosatransplantaten vergleichbar (Bakker et al. 2011). Es wurde gezeigt, dass kortikales Bohrmehl entgegen früherer Annahmen vitale Zellen enthält, welche die mechanischen Kräfte und Temperaturen während des Bohrvorganges überleben und somit die Frakturheilung beeinflussen können (Frölke et al. 2004).

Ausgehend von morphologischen Vergleichen, in vitro Differenzierungsverhalten und Antigenprofil konnten Zellkulturen aus humanem Bohrmehl als MSC charakterisiert werden (Wenisch et al. 2005). Aus Bohrmehl wachsen plastikadhärente Zellen, die sich erfolgreich osteogen, adipogen und chondrogen differenzieren lassen. Der Immunphänotyp, die Morphologie mit Populationen spindelförmiger Zellen, RS-Zellen und großen flachen mMSC sowie die Proliferationsfähigkeit blieben auch über multiple Passagen erhalten. Die Negativität wurde für die hämatopoetischen Oberflächenantigene CD34 und CD45 gezeigt. Positiv waren die Kulturen für CD90 und Populationen für CD105 (Trinkaus et al. 2005; Wenisch et al. 2006). Die MSC aus Bohrmehl wurden in der vorliegenden Arbeit als in vitro System gewählt.

### 1.3 Osteoporose

Allgemein wird Osteoporose als systemische Skeletterkrankung definiert, welche in charakteristischer Weise mit erniedrigter Knochenmasse und Verschlechterung der Mikroarchitektur des Knochens einhergeht. Die Folge sind Knochenfragilität und Anfälligkeit für Frakturen (Consensus development conference: 1993). Orientierend an den Empfehlungen der World Health Organisation (WHO) wird Osteoporose im klinischen Alltag mittels Knochendichtemessung des Schenkelhalses oder der lumbalen Wirbelsäule diagnostiziert. Ausschlaggebend ist der Wert des röntgenologischen Verfahrens der sogenannten *dual energy X-ray absorptiometry* (DXA). Die hiermit bestimmte Knochendichte (engl. *bone mineral density*, BMD) wird als vielfaches der Standardabweichung von einem Referenzkollektiv bestehend nur aus Frauen im Alter von 20-29 Jahren angegeben und als T-Wert bezeichnet. Demnach liegt eine

verminderte Knochenmasse (Osteopenie) vor, wenn die BMD mehr als eine Standardabweichung bis weniger als 2,5 Standardabweichungen unter dem Mittelwert junger weiblicher Erwachsener liegt ( $-1 < T\text{-Wert} > -2,5$ ). Eine Osteoporose beginnt ab einem BMD Wert von mindestens 2,5 Standardabweichungen unter dem Referenzmittelwert ( $-2,5 \geq T\text{-Wert}$ ). Dieser Wert und dasselbe Referenzkollektiv gelten nach WHO Definition ebenfalls für Männer über 50 Jahren. Als manifest gilt die Osteoporose sobald fragilitätsbedingte Knochenbrüche auftreten (Kanis J. A. on behalf of the World Health Organization Scientific Group 2007).

Knochenbrüche und deren Folgen sind maßgeblich für die klinische und sozioökonomische Bedeutung der Osteoporose. Es wird geschätzt, dass bei anhaltender Alterung der Gesellschaften die jährliche Inzidenz von Hüftfrakturen allein durch die Zunahme der Zahl älterer Menschen weltweit von 2 Millionen im Jahr 1990 auf 6 Millionen bis 2050 ansteigt. In Europa wird eine Zunahme der ökonomischen Belastung durch Osteoporose von 30,7 Milliarden Euro im Jahre 2010 auf 76,7 Milliarden Euro im Jahre 2050 erwartet (Pisani et al. 2016). Gerade osteoporosebedingte hüftkopfnahen Frakturen führen zu chronischen Schmerzen, Immobilität und erhöhter Mortalität. Daher zielt die Diagnostik und Behandlung in erster Linie auf die Verringerung des Frakturrisikos ab, wozu neben der Knochenqualität auch die Fallneigung, der Lebensstil und klinische Faktoren gehören, die das Frakturrisiko in Verbindung mit und unabhängig der Knochenmasse beeinflussen (Sözen et al. 2016). Die meisten Risikofaktoren wie z. B. Alter, weibliches Geschlecht, Inaktivität, fehlende Sonnenexposition, Mangelernährung, rheumatoide Erkrankungen und Schilddrüsenerkrankungen sowie eine Glukokortikoidtherapie jeder Dosis lassen sich dennoch durch ihren Einfluss auf den Knochen erklären (Espallargues et al. 2001). Die Pathophysiologie und die hierauf abzielenden therapeutischen Ansätze lassen sich auf der Ebene des Knochenstoffwechsels und der BMU, auf welcher das Knochenremodeling und die Mineralisierung stattfinden, erläutern.

### **1.3.1 Pathophysiologie der Osteoporose**

Die postmenopausale Osteoporose ist die häufigste Form der Osteoporose und direkte Folge eines Östrogenmangels (bzw. in ähnlicher Weise eines Androgenmangels beim Mann). Physiologischer Weise inhibiert Östrogen die Osteoklastogenese durch die Beeinflussung der RANKL/OPG Expression von Knochenzellen, und die Inhibierung der Zytokinproduktion von IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$ . Zusätzlich wirken Östrogene pro-apoptotisch auf Osteoklasten und begrenzen dadurch ihre Lebensdauer. Entgegengesetzt wirkt Östrogen anti-apoptotisch auf Osteoblasten und Osteozyten (Burr

und Allen 2013). Ein Östrogenmangel bewirkt damit eine große Zunahme des Knochenremodelings auf trabekulären und endokortikalen Oberflächen, also zum einen durch eine enthemmte lokale Regulierung der Zytokinumgebung und zum anderen durch vermehrte Aktivierungssignale infolge einer Apoptose von Osteozyten. Die stark gesteigerte Bildung neuer BMUs und Initiierung vieler Remodelingzyklen insgesamt als auch qualitative Veränderungen der BMU hat Folgen. Einerseits erfolgt die Resorption alten Knochens wesentlich schneller als die Formierung neuer Matrix und deren Mineralisierung (Wochen gegenüber Monaten). Andererseits ist die Knochenbalance einer einzelnen BMU leicht negativ. Alleine die vermehrte Entstehung vieler neuer BMUs führt somit zu einer konstanten Rate an Knochenverlust, da die Osteoblasten außerstande sind, die im Verhältnis effektivere Resorption rechtzeitig auszugleichen. Neugebildeter Knochen ist zudem noch wenig mineralisiert. Die verlängerte Lebensdauer der Osteoklasten führt dazu, dass die BMU tiefer und länger vordringen kann. ‚Frisst‘ sie sich komplett durch einen Trabekel, geht die Oberfläche für die Umkehr zu Knochenformierung verloren. Auf diese Weise gehen Teile der zellulären Struktur und Verbindungen des Trabekelnetzwerks verloren. Nicht zuletzt wegen seiner großen Oberfläche als Ort der Aktivierung ist der Verlust von spongiösem Knochen weitreichend. In gleicher Weise erodieren subendokortikale Räume und konfluieren. Die Kortikalis wird poröser (Weinstein et al. 2000). Zusammengenommen wird der Knochen biomechanisch instabil. Wann die Knochenmasse und -qualität schließlich soweit abgenommen haben, dass minimale Traumata zu Frakturen führen, hängt insbesondere von der zuvor vorliegenden maximalen Knochendichte (*peak bone mass*) ab, die etwa mit Ende der dritten Lebensdekade erreicht ist (Gordon et al. 2017).

Im hohen Alter nimmt die Funktion der Osteoblasten und ihre Fähigkeit zur osteogenen Differenzierung zugunsten der Adipogenese ab. Weiterhin führen Vitamin D Mangel mit verminderter intestinaler Kalziumresorption und renaler Kalziumretention (sekundärer Hyperparathyreoidismus), Bewegungsmangel (mit verringerter Aktivierung des remodeling) und oft Multimedikation zur senilen (involutionellen) Osteoporose. Zwar nimmt die Häufigkeit des Knochenumbaus hierbei ab, die Knochenformierung ist jetzt aber nicht mehr effektiv (Weinstein et al. 2000).

Eine Glukokortikoidtherapie hat kurzfristig antiapoptotische Effekte insbesondere auf Osteoklasten. Langfristige Glukokortikoidgabe führt allerdings zur Apoptose aller Spezies von Knochenzellen. Auch die Differenzierung von Osteoblastenvorgängern wird durch Glukokortikoide gehemmt und damit insbesondere die Formierung neuen Knochens negativ beeinflusst. Eine langfristige hochdosierte Steroideinnahme führt zur Apoptose ganzer Bereiche von Osteozyten und zum Phänomen der

glukokortikoidinduzierten aseptischen Knochennekrose. Einfluss üben Glukokortikoide auch auf den Kalziumstoffwechsel und supprimieren Östrogene und Androgene (Burr und Allen 2013; Weinstein et al. 2000).

### 1.3.2 Therapie der Osteoporose

Die medikamentöse Therapie der Osteoporose in Deutschland greift in die Phasen des Knochenremodelings ein und wird zusammen mit anderen nichtmedikamentösen Maßnahmen und der Sicherstellung ausreichender Kalzium- und Vitamin D Versorgung in der aktuellen S3-Leitlinie zur „Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Osteoporose bei postmenopausalen Frauen und bei Männern“ beschrieben (Dachverband Osteologie e.V. 2017). Besonders häufig kommen Bisphosphonate zum Einsatz, die als Inhibitoren osteoklastischer Knochenresorption gelten. Aus dieser Substanzgruppe werden in Deutschland hinsichtlich ihrer nachgewiesenen Potenz zur Frakturdektion von der Leitlinie für Männer und Frauen Alendronat, Ibandronat (nur Frauen), Risedronat und Zoledronat empfohlen (Dachverband Osteologie e.V. 2017). Trotz ihrer Einordnung als ‚Antiresorptiva‘, werden für diese Substanzen seit geraumer Zeit auch Wirkungen durch gesteigertes Zellüberleben von Osteoblasten und Osteozyten diskutiert (Plotkin et al. 1999).

Andere empfohlene antiresorptive Therapieoptionen sind Denosumab (ein monoklonaler Antikörper gegen RANKL) und für Frauen auch selektive Östrogenrezeptormodulatoren. Die exogene Zufuhr von Östrogenen und Gestagenen stellt gemäß der 2018 angenommenen Leitlinie nur für Hochrisikopatientinnen bei Kontraindikation oder fehlender Verträglichkeit der übrigen Therapeutika und nur im Rahmen der Sekundärprophylaxe unter Abwägung der Risiken noch eine Option dar (Dachverband Osteologie e.V. 2017). Unerwünschte Arzneimittelwirkungen einer Hormontherapie bestehen unter anderem durch erhöhtes Risiko für das Auftreten von Mamakarzinomen, Schlaganfällen, anderen thrombembolischen Ereignissen sowie Demenz (Hilton und Boardman 2018; Gartlehner et al. 2017).

Der Wirkstoff Teriparatid (ein rekombinantes menschliches PTH-Analogon) ist zur Stimulation der osteoblastischen Knochenformierung zur vorübergehenden Therapie zugelassen. Auf der Ebene der einzelnen BMU wurde nach intermittierender PTH Stimulation sogar eine ansonsten ungekannte positive Knochenbilanz am Ende eines Remodelingzyklus beschrieben, wobei der Effekt einer PTH-Gabe eventuell durch Osteozyten über SOST/Sklerostin-Aktivierung vermittelt ist (Bellido 2006).

#### 1.4 Funktionalisierung von Materialien durch Nanopartikel

Die Veränderungen des Knochenstoffwechsels, die geringere mechanische Qualität des Knochengewebes, aber auch die verlängerte Frakturheilung im osteoporotisch erkrankten Knochen erschweren eine stabile Frakturversorgung durch implantiertes Material. Die Verbesserung der Heilung osteoporotischer Frakturen ist daher Gegenstand intensiver klinischer und präklinischer Forschung (Alt et al. 2013). Ein Ansatz stellt dabei die Verwendung von Materialien oder Wirkstoffen dar, um die Frakturheilung zu verbessern. In diesem Zusammenhang wird auch der Einsatz von Bisphosphonaten wie Risedronat bei der Osteosynthese diskutiert (Nauth et al. 2011).

Besonderes Augenmerk liegt ebenfalls darauf, die Materialeigenschaften des Implantatmaterials, welches vorübergehend für die Osteosynthese oder langfristig als Endoprothese in den Knochen eingebracht wird, zu verbessern. Dies geschieht durch Oberflächenmodifikation und Entwicklung neuer Materialien (Asri et al. 2017). Neuartige Titanlegierungen wie  $\beta$ -Typ Legierungen mit 40% Niobanteil (Ti-40Nb) haben sich als besonders korrosionsresistent und in den elastischen Eigenschaften als knochenähnlich erwiesen, was einer Knochenatrophie durch fehlende Belastung aufgrund zu rigider Materialien entgegenwirkt (Helth et al. 2014). Die Biokompatibilität dieses Materials ließ sich bereits für verschiedene Oberflächenmodifikationen zeigen (Kauschke et al. 2018).

Nanopartikel werden in der Medizin zu therapeutischen und diagnostischen Zwecken entwickelt und insbesondere zur gezielten Wirkstofffreisetzung erprobt. Hierfür werden zum Beispiel Liposomen eingesetzt. Die lipidbasierten Träger lassen sich kontrolliert mit schwer löslichen und für Biomembranen nicht permeablen Wirkstoffen beladen. Damit kann die Bioverfügbarkeit von Medikamenten verbessert und die systemische Toxizität etwa von Zytostatika verringert werden (Jain et al. 2012). Die Modifikation von Interferon- $\alpha$  mit Polyethylenglykol (PEG) verbessert dessen Halbwertszeit erheblich, sodass statt dreimaliger wöchentlicher Gabe von konventionellem Interferon eine Therapie mit PEG-Interferon nur einmal wöchentlich erfolgen muss. Zur Therapie der chronischen Hepatitis-B werden seit 2011 daher nur noch PEG-Interferone statt konventionellen Präparaten empfohlen (Cornberg et al. 2011). Für die Behandlung der chronischen Hepatitis-C steht Interferon lediglich in der PEGylierten Variante zur Verfügung (Sarrazin et al. 2018). Nanopartikel auf der Basis von Polymeren sind ebenfalls Gegenstand der Forschung für die Entwicklung von Biomaterialien zum Einsatz im Knochen. Sie können zur Modifikation von Knochenersatzmaterialien verwendet werden, um beispielsweise eine lokale und kontrollierte Medikamentenfreisetzung in die Umgebung zu erreichen (Striegler et al. 2015). Müller und Mitarbeiter beschreiben Nanopartikel aus

Polyelektrolytkomplexen (PEK-P). Solche PEK-P können leicht in wässriger Lösung durch Mischung von gegensätzlich geladenen Polyelektrolyten hergestellt werden. Sie lassen sich in Form und Größe modifizieren, können auf Oberflächen adhäsive Filme bilden und eignen sich zur Beladung mit Wirkstoffen (Müller 2014). Kürzlich wurden durch die Arbeitsgruppe PEK-Partikel aus dem linearen Polypeptid Poly-L-Lysin als Kation und dem Poly-Anion Poly-Zellulosesulphat entwickelt. Für diese ließ sich neben den oben genannten Eigenschaften auch die Ladungskapazität mit dem Wirkstoff Risedronat genauer bestimmen. Die Partikel zeigten eine stabile Adhärenz und es bestand die Möglichkeit, überschüssige Komponenten aufzureinigen. Vorteilhaft erscheint besonders eine langsame Wirkstofffreisetzung des elektrostatisch gebundenen Medikaments aus einer PEK-P Beschichtung auf Ti-40Nb Platten bei physiologischen pH-Werten nach initialem Freisetzungsschub. Mehr als 80 % des Wirkstoffes verblieben nach 24 Stunden (h) in der Partikelbeschichtung. Eine Beschichtung aus Medikament-Film löste sich hingegen sofort (Vehlow et al. 2016). Das Medikament kann somit am ehesten auf die unmittelbare Umgebung und insbesondere Knochen und Zellen wirken, die in direktem Kontakt mit dem Material stehen. Diese Eigenschaften sind für eine weitere Evaluation dieses Biomaterials zum Einsatz im systemisch erkrankten und gesunden Knochen vielversprechend.

## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollen mit dem zur Therapie der Osteoporose verwendeten Bisphosphonat Risedronat beladene Polyelektrolytkomplex-Nanopartikel als funktionalisierende Beschichtung von Knochenersatzmaterial hinsichtlich ihrer Biokompatibilität und ihres Einflusses auf die Knochenbildung untersucht werden. Die Entwicklung effektiver Verfahren zur Behandlung von Frakturen des systemisch erkrankten Knochens ist angesichts der großen sozialen und ökonomischen Belastungen durch Osteoporose von Bedeutung, zumal von einer Zunahme der Prävalenz dieser bei fortgesetzter demografischer Entwicklung ausgegangen werden muss. Essenziell für die Bildung neuen Knochens ist die Ausdifferenzierung mesenchymaler Vorläuferzellen, wie sie als MSC Kulturen aus Bohrmehl gewonnen werden können, entlang der osteogenen Reihe. Der Erhalt der Vitalität der Knochenzellen und eine Förderung der Knochenbildung am implantierten Material wäre von einem Biomaterial wünschenswert. Diese Anforderungen wurden anhand des Einflusses des Materials auf MSC knochengesunder und osteoporotischer Spender verschiedenen Geschlechts und Alters im Verlauf der osteogenen Differenzierung überprüft.

Im Einzelnen ergeben sich folgende Fragestellungen:

- Wirkt sich eine Beschichtung mit PEK-Nanopartikeln auf die Zellvitalität humaner MSC aus?
- Besitzt die PEK-P Beschichtung einen Einfluss auf die osteogene Differenzierung mesenchymaler Stromazellen in vitro?
- Wie verändert die Verbindung der Partikel mit Risedronat die Wirkung des Medikaments auf die Zellkultur?
- Bestehen Unterschiede im Einfluss der Testmaterialien auf MSC osteoporotischer oder knochengesunder Spender?
- Lassen sich Unterschiede in der Bildung mineralisierter extrazellulärer Matrix nachweisen?

Die Beantwortung dieser Fragen erlaubt eine bessere Einschätzung, ob sich eine PEK-Beschichtung zur Funktionalisierung von Implantatmaterial eignet. Ein positiver Einfluss auf Knochenzellen in in vitro Versuchen wäre eine Voraussetzung für die Erprobung und Anwendung solcher Materialien in der Frakturheilung.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

<b>Bezeichnung</b>	<b>Firma</b>	<b>Modell</b>
Absaugpumpe	KNF Neuberger, Inc, Trenton, NJ, USA	Liquiport NF
Ca <sup>2+</sup> -Messgerät/ Electrolyte Analyzer	Roche, Indianapolis, IN, USA	ISE 9180 Typ 21282
Digitaler Heizblock	Labnet International, Inc, Edison, NJ, USA	AccuBlock™ Digital Dry Bath
Photospektrometer	BioTek, Bad Friedrichshall	Synergy HT
Feinwaage	Satorius AG, Göttingen	BP211D
Heißluftschrank	Heraeus, Hanau	UT6
Inkubationsschrank	Heraeus, Hanau	HERAcell® 150
Laminar-Flow Bank	a) Kendro Laboratory Products, Hanau b) Heraeus, Hanau	HS12 HB 2448 K GS
Magnetrührer	IKA Werke, Staufen	RCT basic
Mikroskope	a) Carl Zeiss Microscopy, Jena b) Leica	Axiovert-10 090-135.002
Mikroskopkameras	a) Allied Vision Technologies, Stadtroda b) Nikon Instruments, Amsterdam, NL	Stingray F-145B DS-Fi1
pH-Meter	Schott AG, Mainz	CG 820
Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt	Pipetus®
Schüttler	Edmund Bühler GmbH, Bodelshausen	Kombischüttler
Vortexmixer	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA	Vortex Genie G560E
Wasseraufbereitung	Millipore S.A., Molsheim, FRA	Milli-Q Plus
Wasserbad	Grant Instruments, Cambridge, UK	PB1
Zellzähler	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim	Casy® TT
Zentrifuge für -Zellröhrchen	Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen	Rotina 380R
-Eppendorf Tubes	Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen	a) Mikro 220R b) Mikro 22R

**2.1.2 Verbrauchsmaterialien und Laborbedarf**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Firma</b>
24-Well-Platte	Greiner bio-one, Frickenhausen
96-Well-Mikrotiter Platte	Greiner bio-one, Frickenhausen
CASY®-Cups	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Cell-Scraper	Sarstedt, Nürnbrecht
Cryo-Röhrchen	Greiner bio-one, Frickenhausen
Einfrierbehälter ,Mr. Frosty' <sup>TM</sup>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA
Eppendorf-Tubes	Sarstedt, Nürnbrecht
Hochtemperatur- flaschen	Schott DURAN®, DWK Life Sciences GmbH, Wertheim/Main
Kulturschale	Thermo Scientific Nunc, Waltham, MA, USA
Messbecher	Schott DURAN®, DWK Life Sciences GmbH, Wertheim/Main
Messpipetten	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Messzylinder	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Mikrofilter	Merck Millipore Ltd, Tullagreen, IRL
Mikroliterpipette	Gilson Inc., Middleton, USA
Multipette	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen	Gilson Inc., Middleton, USA
Zellkulturflasche (T- 75)	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Zellröhrchen	Greiner Bio-one, Frickenhausen Sarstedt, Nürnbrecht

**2.1.3 Zusätze, Chemikalien und kommerzielle Kulturmedien**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Firma</b>
25 % HCl	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
2-Propanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Alizarinrot S Farbstoff	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ammoniumhydroxid 25 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Aqua ad injectabilia	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
CaCl <sub>2</sub>	PromoCell, Heidelberg
CASY®-Ton	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Dexamethason	Sigma-Aldrich St Louis, MO, USA

Dulbecco's modifiziertem Eagle Medium (DMEM) low Glucose mit Glutamin ohne Phenolrot	PAN Biotech, Aidenbach
Dimethylsulfoxid (DMSO)	ATCC, Manassas, VA, USA
Essigsäure 100 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
F-12K Medium (Ham's F-12K (Kaighn's) Medium)	Gibco Life Technologies, Carlsbad, CO, USA (jetzt Thermo Fisher Scientific)
fötales bovines Serum (FBS)/ES (ES: Chargen für Stammzellen)	PAN-Biotech, Aidenbach
Gentamycin/Amphotericin	Life Technologies
GlutaMax™ (stabilisiertes Glutamin) 100x	Gibco Life Technologies, Carlsbad, CO, USA (jetzt Thermo Fisher Scientific)
hiFBS (hitzestabilisiertes FBS)	Biochrom, Berlin
lyophilisiertes BSA	Sigma-Aldrich St Louis, MO, USA
MediClean neodisher®	Chemische Fabrik Dr. Weigert, Hamburg
MesenPro RS™ Medium	Gibco Life Technologies, Carlsbad, CO, USA (jetzt Thermo Fisher Scientific)
Natrium-L-Ascorbat	Sigma-Aldrich St Louis, MO, USA
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
<i>phosphate buffered saline</i> (PBS) 10x pH 7,4 ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup>	Gibco Life Technologies, Carlsbad, CO, USA (jetzt Thermo Fisher Scientific)
Penicillin/Streptomycin 100x	Gibco Life Technologies, Carlsbad, CO, USA (jetzt Thermo Fisher Scientific)
Thiazolylblau Tetrazolium Bromid (MTT)	Sigma-Aldrich St Louis, MO, USA
Trypsin EDTA 0,05 %	Gibco Life Technologies, Carlsbad, CO, USA (jetzt Thermo Fisher Scientific)
Vitamin D <sub>3</sub> , Calcitriol	Sigma-Aldrich St Louis, MO, USA
β-Glycerol-Phosphat	Sigma-Aldrich St Louis, MO, USA

#### 2.1.4 Eigene Ansätze

Bezeichnung	Bestandteile
Alizarinrot S Lösung	40 mM Alizarinrot S Farbstoff in H <sub>2</sub> O, auf pH 4,1-4,3 angepasst mit 0,5% Ammoniumhydroxid
Bohrmehlzellmedium	F-12K Medium + 20 % FBS/ES + 1 % Penicillin/Streptomycin 100x (100 U/ml; 100 µg/ml)

Bovines Serum Albumin (BSA) Standards	lyophilisiertes BSA in Triton-X-Lysispuffer Verdünnungsreihe: 1,5 mg/ml, 0,75 mg/ml, 0,375 mg/ml, 0,188 mg/ml, 0,094 mg/ml
Einfriermedium	10 % DMSO in FBS/ES
Kulturmedium	Mesenpro RS Medium + 20 % FBS/ES + 1 % GlutaMax 1 % Penicillin/Streptomycin 100x (100 U/ml; 100 µg/ml)
MTT-Lysispuffer	1 ml 25 % HCl + 170,5 ml 2-Propanol
MTT-Stocklösung	5 mg/mL Thiazolylblau in PBS 1x
Osteogenes Medium	DMEM low Glu mit Glutamin ohne Phenolrot + 10 % hiFBS + Dexamethason $10^{-7}$ M + Natrium-L-Ascorbat $5 \cdot 10^{-5}$ M, + $\beta$ -Glycerol-Phosphat $10^{-2}$ M, + $1.5 \cdot 10^{-3}$ M $\text{CaCl}_2$ + $5 \cdot 10^{-8}$ M Vitamin D <sub>3</sub> , 1 % Gentamycin/Amphotericin (125 µg/5 mg)
Paraformaldehyd (PFA) 4 %	4 % PFA in PBS 1x (bei 60 °C gelöst)
PBS 1x	10 % PBS 10x in H <sub>2</sub> O
Triton-X-Lysispuffer	1 % Triton-X-100 in PBS 1x

### 2.1.5 Kits und Reagenzien

Bezeichnung	Firma
DC Protein Assay	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
hOsteokalzin (humanes Osteokalzin) <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA)	Invitrogen, Eugene, Oregon, USA
Sensolyte® pNPP Alkaline Phosphatase Assay Kit Colorimetric	AnaSpec, Inc, Fremont, CA, USA

### 2.1.6 Testmaterialien

Die Testmaterialien wurden im transregionalen Sonderforschungsbereich 79 (SFB/Transregio 79) der Deutschen Forschungsgemeinschaft durch die verbundenen Teilprojekte M7 und M1 am Leibniz-Institut für Polymerforschung Dresden e.V. (IPF) und am Institut für Metallische Werkstoffe des Leibniz-Institut für Festkörper- und Werkstoffforschung (IFW) in Dresden hergestellt. Grundlage ist eine Platte (1 cm im Durchmesser) aus einer Titanlegierung mit 40% Niob (Ti-40Nb). Die Oberfläche wurde einheitlich geschliffen und anschließend durch Aufbringen von Polyelektrolytkomplex-Nanopartikeln funktionalisiert (Siehe auch Kapitel 1.4, Seite 14). Die PEK-P bestehen aus dem linearen Polykation Poly-L-Lysin und dem Polyanion Poly-Zellulosesulphat.

Beide wurden für die hier verwendeten Partikel im molaren Verhältnis (bezogen auf die sich wiederholenden monomeren Untereinheiten) von Anion zu Kation  $n^-/n^+ = 0,9$  in wässriger Lösung zusammengebracht und bildeten über ionische Wechselwirkungen einen Komplex, welcher weiter aufgereinigt und von Überschüssen befreit wurde. Die PEK-P konnten als dritte Komponente im Komplex den anionischen Wirkstoff Risedronat (in Materialabkürzungen fortan RIS) binden und formten getrocknet auf den Platten einen adhären Film. Der Wirkstoff wurde abhängig von der Salzkonzentration und dem pH-Wert der Umgebungslösung aus dem RIS-PEK-P Komplex freigesetzt. Abhängig von der Risedronatmenge, die in die PEK-P inkorporiert wurde, bildeten sich Partikel verschiedener Größe aus. Höhere Risedronatmengen resultierten dabei in größeren Partikeln bzw. Aggregaten. Im Versuch wurden Ti-40Nb Platten mit folgenden Oberflächen verwendet: unbeschichtete Platten (Ti-40Nb), Platten mit nicht beladenen (wirkstofffreien) PEK-Partikeln (Ti-40Nb + PEK-P), große wirkstoffreiche PEK-P (Ti-40Nb + RIS-PEK-P mikro), kleinere wirkstoffarme PEK-P (Ti-40Nb + RIS-PEK-P nano) sowie mit RIS-Film-Überzug (Ti-40Nb + RIS). Verwendet wurden Materialien mit Wirkstoffmengen von  $2,5 \times 10^{-7}$  und  $2,5 \times 10^{-11}$  mol. In Versuchen mit Materialien mit der geringeren absoluten Wirkstoffmenge ( $2,5 \times 10^{-11}$  mol) kamen wenige wirkstoffreiche große RIS-PEK-P mikro bzw. viele RIS-PEK-P nano zur Anwendung. In diesen Versuchen wurden immer beide Varianten zum Vergleich des Einflusses der Partikelgröße verwendet. Die PEK-P in Materialien mit  $2,5 \times 10^{-7}$  mol Wirkstoffgehalt entsprechen den größeren RIS-PEK-P mikro.

### 2.1.7 Software

Bezeichnung	Firma	Version
Bildaufnahmesoftware (Life Aquisition)	FEI Munich GmbH, München	2.6.0.29
ELISA-Reader	BioTek Instruments, Winooski, VT, USA	Gen 5, 1.1
Fiji ImageJ (Bildanalyse)	National Institute of Health (USA)	
SPSS	IBM, Armonk, NY, USA	23, 24

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Gewinnung von hMSC

Die MSC entstammten Bohrmehl, welches bei der Aufbohrung eines langen Röhrenknochens im Rahmen der intramedullären Nagelung zur Frakturversorgung entsteht. Das Bohrmehl wurde von Patienten am Universitätsklinikum Gießen und Marburg durch das Operationsteam bei der Osteosynthese nach Aufklärung und

schriftlichem Einverständnis der Patienten gewonnen. Ein positives Votum hierzu liegt durch die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Justus-Liebig-Universität Gießen vor (AZ:74/09). Die einzelnen Spender wurden anonymisiert und ihren Gewebeproben eine Zellkulturnummer (ZK) zugeordnet. Das in die Wellen der Bohrköpfe gepresste Bohrmehl ergab ein vitales Gemisch aus Knochenfragmenten, Markinhalt und Blut. Zunächst wurden die Bohrmehlproben noch im OP in Bohrmehlzellmedium überführt. Die Knochenfragmente wurden anschließend mit PBS bis zur Klarheit des Überstandes gespült und mit frischem Bohrmehlzellmedium in 100 mm Kulturschalen bei 37 °C und 6 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Ein Mediumwechsel erfolgte dabei alle 7 Tage. Bei Erreichen eines konfluenten Wachstums der Zellen von 70-80 % wurden die Zellen durch Zugabe von Trypsin EDTA 0,05 % vom Gefäß gelöst, in einem Zellröhrchen bei 1200 *rounds per minute* (rpm) zentrifugiert, das Pellet in neuem Medium resuspensiert und in Zellkulturflaschen in Bohrmehlzellmedium oder MSC Kulturmedium weiter kultiviert. Vor Erreichen eines vollständig konfluenten Wachstums wurden die Zellen gesplittet, expandiert und verschiedene Passagen für alle Versuche eingefroren und in flüssigem Stickstoff konserviert. Frühe Passagen der in dieser Arbeit verwendeten ZKs wurden von den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der experimentellen Unfallchirurgie mittels *fluorescence-activated cell sorting* (FACS) auf das Vorhandensein der Oberflächenantigene CD73 und CD105 getestet, um den Anteil klassischer MSC in der Kultur zu bestimmen (siehe Übersicht über verwendete ZKs Seite 22).

### **2.2.2 Einfrieren und Auftauen**

Zum Einfrieren der Zellen wurde das alte Medium abdekantiert, die Zellen zweimalig mit 20 ml PBS (10 %) gespült und der Rasen durch Zugabe von 3 ml Trypsin EDTA (0,05 %) für 5-6 Minuten (min) bei 27 °C im Kulturschrank vom Flaschenboden gelöst. Die Trypsinaktivität wurde daraufhin mit Kulturmedium abgestoppt und die Suspension in einem Zellröhrchen 5 min bei 1200 rpm und 20 °C zentrifugiert. Der Überstand konnte nun vorsichtig vom Pellet dekantiert werden, woraufhin dieses in 1 ml Einfriermedium resuspensiert und mit derselben Pipettenspitze umgehend in ein verschließbares Cryo-Röhrchen überführt wurde, welche in einem bereits gefriergekühlten Qualifreeze Einfrierbehälter mit konstanter Abkühlrate (1 °C/min) zunächst auf -80 °C gekühlt wurden. Nach 24 bis maximal 48 Stunden wurden die Röhrchen endgültig in flüssigen Stickstoff überführt. Das Einfriermedium bestand aus FBS ES (ES: Variante des fötalen bovinen Serums zur Verwendung mit Stammzellen), dem 10 % DMSO beigefügt wurde. Das DMSO unterdrückt zusammen mit der kontrollierten Kühlung bei konstanter

langsamer Rate auf  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  die Bildung von Eiskristallen und damit Schäden an Zellorganellen.

Zum Auftauen wurde das Röhrchen vorsichtig in einem  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  warmen Wasserbad angetaut und der noch teilgefrorene Inhalt sofort, um Schäden durch das DMSO im Gefriermedium minimal zu halten, unter der Laminar-Flow Bank in eine Zellkulturflasche mit vorgewärmtem Kulturmedium verbracht. Nach mikroskopischer Begutachtung wurde das Kulturmedium am nächsten Tag gewechselt und dabei Reste des Gefriermediums und nicht adhärenente Zellen entfernt. Der gesamte Gefrier- und Tauprozess stellt eine Passagierung der Zellen dar. Die Passagezahl wurde entsprechend angepasst.

### 2.2.3 Übersicht über verwendete ZKs

Verwendet wurden ZKs von jeweils fünf knochengesunden und osteoporotischen Spenderinnen und Spendern. Das Alter des Spenderkollektivs war im Mittel 57,2 Jahre mit einer Standardabweichung von  $\pm 21,22$  Jahren. Insgesamt lag der Anteil der im FACS positiv auf CD73 und CD105 getesteten Zellen bei 51,8 % (Standardabweichung 16,56 %). Systemische Grunderkrankungen des Zuckerstoffwechsels oder des rheumatischen Formenkreises bestanden nicht. Darüber hinaus galt Nikotinabusus als Ausschlusskriterium. Tabelle 1 und gibt einen Überblick über die Kollektive. In den Versuchen wurden die ZKs bis maximal zur sechsten Passage verwendet (Passagezahlen 2 bis 6).

	<b>knochengesunde Gruppe</b>	<b>osteoporotische Gruppe</b>
<b>Alter</b>	45 $\pm$ 23,5 Jahre (21-75 Jahre)	69,4 $\pm$ 9,4 Jahre (60-81 Jahre)
<b>CD73<sup>+</sup> + CD105<sup>+</sup></b>	47,97 % $\pm$ 18,16	55,65 % $\pm$ 15,82
<b>Geschlecht w:m</b>	1:4	5:0

*Tabelle 1 Zusammenfassung der Spenderkollektive*

*Streuungsmaß ( $\pm$ ): Eine Standardabweichung, w:m: Verhältnis weiblich zu männlich, in Klammern: Altersspanne*

### 2.2.4 Aussaat und Differenzierung

Kurz vor Erreichen eines konfluenten Wachstums wurden die Zellen in einer Dichte von 40.000 Zellen pro Well über den Testmaterialien entsprechend des Versuchsplans A oder B ausgesät (Abbildung 2). Die Verwendung risedronatreduzierter Materialien in Layout B ergab sich aus den Ergebnissen der zeitlich zuerst durchgeführten Versuche nach Layout A. Bei hoher Toxizität großer Wirkstoffmengen wurden die Materialien anschließend mit geringeren Wirkstoffmengen in einem kürzeren Versuchszeitraum

erneut getestet. Wie in Kapitel 2.1.6 (S. 19) erklärt wird, lassen sich geringere Risedronatmengen in Form einzelner großer wirkstoffreicher oder vieler kleiner wirkstoffarmer Partikel (RIS-PEK-P mikro und RIS-PEK-P nano) applizieren. Beide Partikelvarianten kommen zum Vergleich des Einflusses der sich hieraus ergebenden unterschiedlichen Oberflächeneigenschaften in Layout B zum Einsatz. Die Kontrollen mit unbehandelter Titanoberfläche und wirkstofffreien Partikeln werden weitergeführt. Die verwendeten Wirkstoffkonzentrationen werden in Kapitel 4.1.3 (S. 64ff) diskutiert.

Zur Aussaat wurde das Medium aus den Kulturflaschen entfernt und die Zellen zweimalig mit 20 ml PBS (10 %) gewaschen. Anschließend wurde der adhärenente Zellrasen mittels 3 ml Trypsin EDTA (0,05 %) für 5-6 min bis zur lichtmikroskopisch sichtbaren vollständigen Suspension der Zellen bei 27 °C im Brutschrank behandelt und die Trypsinaktivität durch Zugabe von 3 ml vorgewärmtem Kulturmedium abgestoppt. Die Zellsuspension wurde im Anschluss in Zellröhrchen überführt und 5 min bei 1200 rpm und 20 °C zentrifugiert. Nach der Resuspension des Pellets in 1 ml frischem Medium wurde die Zellzahl mithilfe des CASY®-Systems (Akronym: cell counter and analyzer system) durchflusszytometrisch bestimmt. Hierfür wurden 10 µl Suspension in 10 ml isotoner CASY®-Ton-Lösung überführt (Verdünnung 1:1000) und mit dem CASY®-TT gemessen. Das Ergebnis der Zellzählung entsprach der Zellzahl pro µl Suspension.

Entsprechend der Formel  $\frac{\text{gewünschte Zellzahl pro Well}}{\text{gemessene Zellzahl pro } \mu\text{L} \left[ \frac{n}{\mu\text{L}} \right]} = \text{Suspension pro Well } [\mu\text{L}]$  wurden

40.000 Zellen pro Well in mit Testmaterial und vorgewärmtem Kulturmedium vorbereitete 24-Well Platten ausgesät. Die Zellzahl und gleichmäßige Verteilung wurde am Lichtmikroskop kontrolliert. Bis zum vollständigen Anwachsen verblieben die Zellen für 48 Stunden im Kulturmedium. Darauf folgte der Wechsel zu osteogenem Differenzierungsmedium, was für die Versuche den Startzeitpunkt Tag 0 definierte.

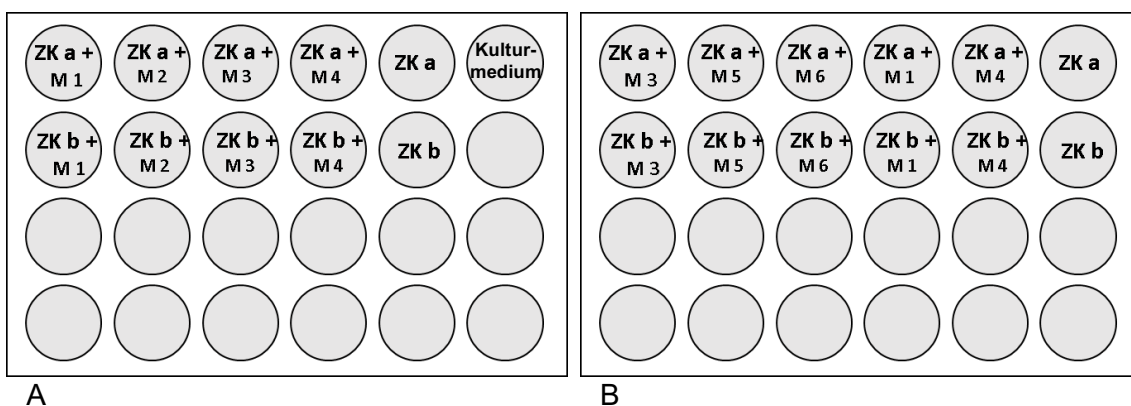


Abbildung 2: Plattenlayout der Zellkulturversuche

**A:** Testmaterialien mit einer Risedronatmenge von  $2,5 \times 10^{-7}$  mol. **B:** Materialien mit einer Risedronatmenge von  $2,5 \times 10^{-11}$  mol; ZK a: knochengesunder Spender, ZK b: osteoporotischer

*Spender, M1: Ti-40Nb unmodifiziert, M2: Ti-40Nb + RIS-PEK-P, M3:Ti-40Nb + RIS, M4: Ti-40Nb + PEK-P, M5: Ti-40Nb + RIS-PEK-P (nano), M6: Ti-40Nb + RIS-PEK-P (mikro), Kulturmedium: Leermedium als Kontrolle für Kalziummessung*

Das Differenzierungsmedium basierte auf mit FBS supplementiertem Dulbecco's modifiziertem Eagle Medium (DMEM). Unter Anwesenheit von Dexamethason, Vitamin C und physiologischen Spiegeln von aktivem Vitamin D<sub>3</sub> (1,25-Dihydroxycholecalciferol) und Kalzium sowie  $\beta$ -Glycerol-Phosphat, welches als Quelle organischen Phosphates für die Bildung mineralisierter Matrix notwendig ist. Mit diesem wurde eine Differenzierung entlang der osteogenen Reihe induziert. Aktives Vitamin D<sub>3</sub> wurde vor dem Mediumwechsel dem vorbereiteten osteogenen Medium jeweils frisch und lichtgeschützt zugegeben.

Zum Mediumwechsel wurde das Medium alle 4 Tage vorsichtig mittels einer sterilen Glaspipette und elektrischen Pumpe abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt.

Die Versuchsdauer betrug für Versuche mit Plattenlayout A (Risedronatgehalt im Material:  $2,5 \times 10^{-7}$  mol) 31 Tage und für Versuche mit Plattenlayout B (Risedronatgehalt im Material:  $2,5 \times 10^{-11}$  mol) 14 Tage. Die Kulturbedingungen im Kulturschrank betragen 37 °C bei 6 % CO<sub>2</sub>-Gehalt der Atmosphäre.

Arbeiten an unbedeckten Zellkulturen sowie die offene Vorbereitung der Testmaterialien und Kulturmedien fand stets unter Verwendung steriler Materialien und keimarmer Bedingungen in Laminar-Flow Arbeitsbänken statt. Medien und Zusätze in der Zellkultur waren steril bzw. wurden steril filtriert. Ausgenommen sind dabei die Beschichtung und der Schliff der Testmaterialplatten am IFW in Dresden. Diese Schritte wurden in dortiger Sorgfalt durchgeführt.

### **2.2.5 Wiederaufbereiten der Testmaterialien zwischen Kulturexperimenten**

Die Materialplatten wurden nach dem Versuch aus den 24-Well-Platten entnommen, in hitzebeständige luftdicht verschließbare Glasfläschchen überführt und in diesen für mindestens zwei Stunden bei 60 °C in MediClean Lösung (1:10 Verdünnung in destilliertem Wasser) auf einem Schüttler geschüttelt, bevor die Flaschen für weitere 30 min in einem Ultraschallbad beschallt wurden. Die Reinigungslösung wurde anschließend verworfen und die Platten mindestens 2 min mit fließendem zweifach destilliertem Wasser gespült. In 50 ml Aqua bidestillata wurden die Platten über Nacht weiter geschwenkt und nach Abgießen des Wassers schließlich für 3 Stunden bei 180 °C trocken hitzesterilisiert. Die Platten wurden anschließend unter sterilen Bedingungen verpackt und zur erneuten Beschichtung ans IPF in Dresden verschickt. Bei sichtbaren Veränderungen der Oberfläche erfolgte zuvor ein erneuter Schliff der Oberseite.

### **2.2.6 Phasenkontrastmikroskopie**

Lichtmikroskopische Beobachtungen wurden regelmäßig am Zeiss Axiovert 10 Lichtmikroskop durchgeführt und Aufnahmen mittels der montierten Stingray F-145B Kamera angefertigt. Die Aufnahmen wurden computergestützt angefertigt und unkomprimiert im Tiff-Format in Graustufen mit 16-Bit Farbtiefe in einer Abmessung von 1388x1038 Pixeln und einer Auflösung von 96 dpi gespeichert. Für die verwendeten Darstellungen wurden die Bilder in 8-Bit Farbtiefe umgewandelt und ein Maßstab eingefügt. Hierfür wurde die Software Fiji ImageJ verwendet.

### **2.2.7 Bestimmung der Zellvitalität mittels MTT-Test**

Die Menge aktiver Zellen kann mittels MTT-Assay, welcher erstmals durch Mosman beschrieben wurde, bestimmt werden (Mosmann 1983). Dabei wird das Membrangängige Tetrazoliumsalz MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) im Inneren der Zellen im Rahmen ihrer Stoffwechselaktivität reduziert. Hierbei entstehen violett-blaue unlösliche Formazankristalle, welche in den Zellen akkumulieren. Nach Zelllyse und Lösung der Kristalle in mit Salzsäure versetztem 2-Propanol ist der Farbstoff vollständig gelöst. Die Extinktion (auch: optische Dichte, OD) im Multi-Well-Photospektrometer (ELISA-Reader) ist direkt proportional zur Anzahl stoffwechselaktiver Zellen.

Nach lichtgeschützter Zugabe von 100 µl MTT-Stock-Lösung zum Kulturmedium in die Wells wurde der Ansatz 4 Stunden unter Kulturbedingungen im Kulturschrank inkubiert, der Überstand abgesaugt und der violett verfärbte Zellrasen mit 1 ml MTT-Lysispuffer 10 min unter Schütteln auf Eis lysiert. Die Farbstärke von 200 µl Triplets auf einer 96-Well Platte wurde photospektrometrisch am ELISA-Reader als Extinktionsdifferenz bei 570-630 nm Wellenlänge gemessen. Eichgeraden für die verschiedenen ZKs ergaben einen linearen Zusammenhang zwischen Zellzahl und Extinktion im Bereich der ausgesäten Zellzahlen.

### **2.2.8 Messung der Konzentration von Kalziumionen im Überstand**

Als Indikator für die Mineralisierung extrazellulärer Matrix wurde die Veränderung der Konzentration gelösten Kalziums im Überstand gegenüber dem reinen Medium bestimmt, welches einem material- und zellfreien Well entnommen wurde. Das Kontrollmedium unterlag den gleichen Bedingungen wie die übrigen Wells. Aus dem Startmedium wurde nach Aussaat sowie jeweils einen Tag nach Mediumwechsel beginnend ab Versuchstag 9 120 µl Überstand entnommen und direkt gemessen. Das Volumen wurde anschließend mit Leermedium aus einem mitgeführten Well substituiert.

Die Kalziummessung erfolgte automatisiert nach Aspiration von 95 µl der Probe durch den Electrolyte Analyzer. Im Gerät wird die Ionenkonzentration der Probe anhand der Änderung des elektrischen Potentials einer ionenselektiven Membran im Vergleich zu einer Referenzelektrode mit bekannter Ionenkonzentration bestimmt.

### **2.2.9 Bestimmung der Osteokalzinkonzentration im Überstand**

Um die osteogene Differenzierung der MSC nachzuvollziehen, wurde im Differenzierungsversuch über 31 Tage im Überstand das von Osteoblasten gebildete Protein Osteokalzin bestimmt. 120 µl Überstand wurden alle 7 Tage ab Tag 0 sowie täglich ab Tag 28 entnommen und für die spätere Messung bei -80 °C tiefgefroren. Das entnommene Volumen wurde mit Substitutionsmedium ersetzt. Um die Dynamik der Osteokalzinkonzentration nach Mediumwechsel nachzuvollziehen und einen geeigneten Zeitpunkt zur Auswertung der Proben zu bestimmen wurde zunächst für eine ZK der Verlauf der Osteokalzinkonzentration über 8 Tage bestimmt. Eine Auswertung des auf der Platte mitgeführten Leermediums (vgl. Abbildung 2, S.23) zweier Versuche ergab eine native Osteokalzinkonzentration im osteogenen Medium von im Mittel 47 ng/ml, die dort über mehrere Tage stabil blieb (Abbildung 3). Diese Konzentration fiel bei der Auswertung der letzten 8 Versuchstage zweier Spender in den Versuchswells nach Mediumwechsel jeweils schnell auf ein niedrigeres Plateau (Abbildung 4). Zusammengefasst enthielt das Wechselmedium eine beträchtliche Konzentration an Osteokalzin, welche in den letzten 8 Versuchstagen im Überstand jeweils nach Mediumwechsel im Kontakt zu den MSC sank, bis nach etwa 3 Tagen ein steady state erreicht war. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden für die Auswertung die Proben aller Spender des letzten Versuchstages (Tag 35, 3 Tage nach Mediumwechsel) analysiert.

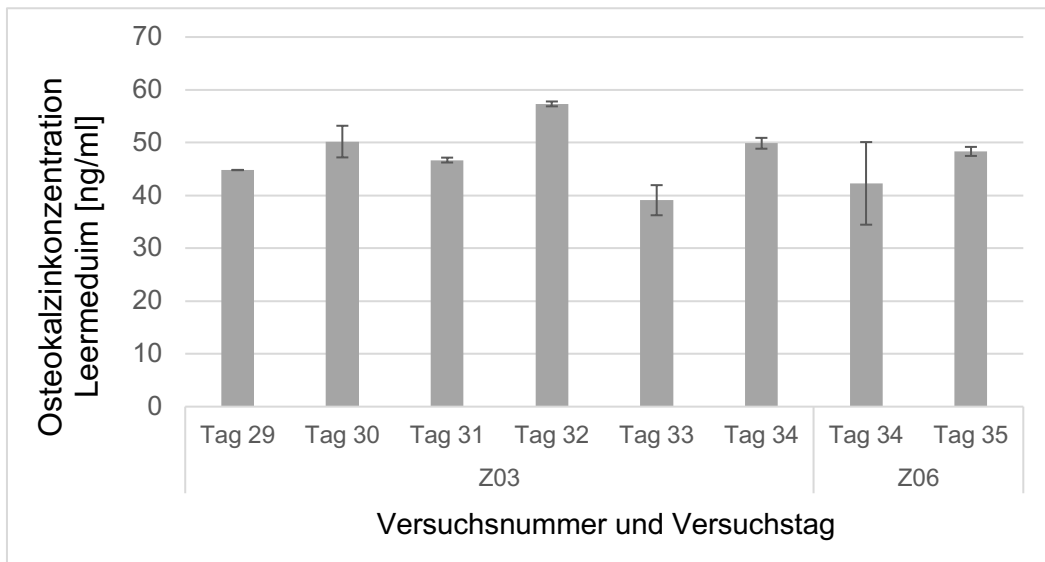


Abbildung 3: Osteokalzinkonzentration gemessen im Leermedium der Versuche Z03 und Z06 an verschiedenen Tagen.

Mittelwert einer Doppelbestimmung (Dublette) aus einem material- und zellfreien Kulturmediumwell. Fehlerindikatoren  $\pm$  eine Standardabweichung.

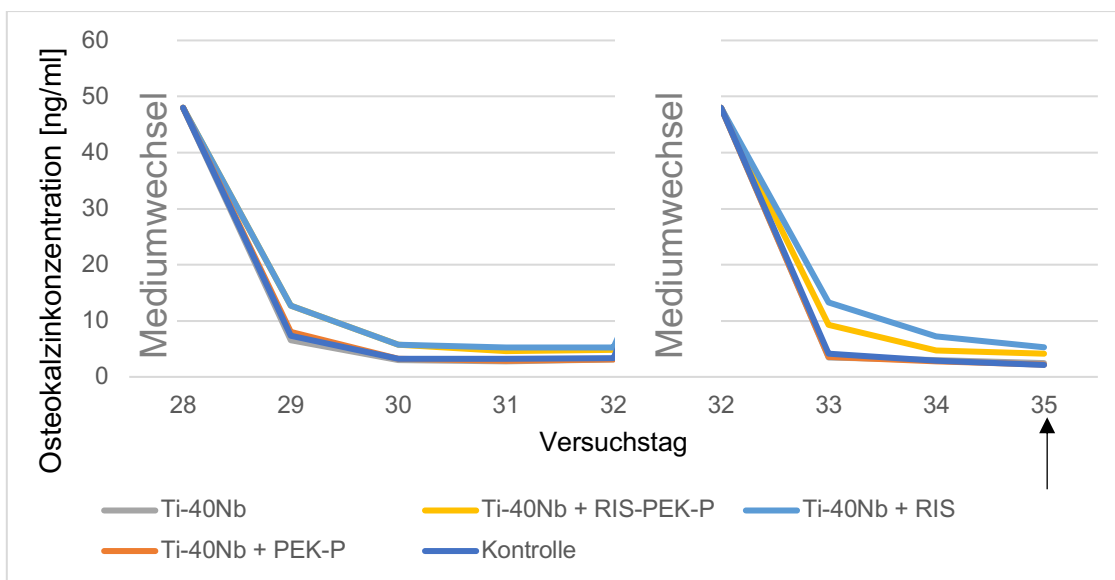


Abbildung 4: Osteokalzinkonzentration in den Versuchswells im Verlauf einer Woche für eine ZK exemplarisch

Dargestellt ist die Osteokalzinkonzentration im Medium für Spender ZK 70 in Versuch Z03. An Tag 28 und 32 fand ein Mediumwechsel statt. Der Wert entspricht hier der mittleren Konzentration im Leermedium. Drei Tage nach Mediumwechsel (am letzten Versuchstag, Tag 35) erfolgte die Auswertung für alle ZKs (Pfeil).

Die Konzentrationsbestimmung des Proteins erfolgte unter Anwendung eines ELISA für humanes Osteokalzin (hOsteokalzin ELISA). Auf dem Boden einer 96-Well Mikrotiterplatte befindet sich eine Beschichtung aus Anti-Osteokalzin Antikörpern, welche das in der Probe vorhandene Osteokalzin banden. Anschließend wurden mit Meerrettich-Peroxidase konjugierte Anti-Osteokalzin-Antikörper (anti-OST-HRP conjugate) hinzugegeben, welche in einem ersten Inkubationsschritt das am Wellboden immobilisierte Osteokalzin sandwichartig banden. Nach Abwaschen aller ungebundenen

Proteine und Antikörper wurde für einen zweiten Inkubationsschritt ein chromogenes Tetramethylbenzidin haltiges Substrat hinzugegeben. Proportional zu dem in der Probe ursprünglich gelösten Osteokalzin setzte die Peroxidase das Substrat in ein farbiges Produkt um, bis die Reaktion mit einer Stopplösung beendet wurde (Abbildung 5). Die Intensität des Farbumschlages konnte photometrisch als Absorption von Licht der Wellenlänge von 450 nm im ELISA-Reader gegen einen Leerwert gemessen werden. Die Osteokalzinkonzentration in der Probe wurde anhand einer Standardkurve aus einer Standardreihe mit bekannten Osteokalzinkonzentrationen berechnet. Eine Standardreihe wurde für jede Messreihe mitgeführt.

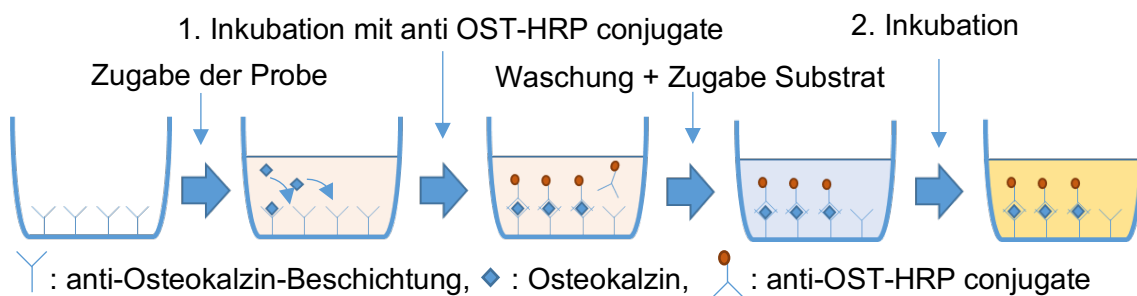


Abbildung 5: Funktionsprinzip des human Osteokalzin Sandwich ELISAs

Folgende Arbeitsschritte wurden eingehalten: nach Vorbereitung der Kitbestandteile entsprechend der Herstellerangaben wurden jeweils 25 µl Probe, Standards für die Konzentrationskurve und interne Kontrollen als Dubletten in die Mikrotiterplatte pipettiert. Es wurden 100 µl anti-OST-HRP conjugate hinzugefügt und der Ansatz 2 Stunden mit Folie bedeckt bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösung wurde abdekantiert. Hierauf folgten fünf Waschvorgänge mit Waschlösung. Auf die Zugabe von 100 µl chromogenem Substrat folgte eine 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln, woraufhin die Umsetzung des Substrates mit 100 µl Stopplösung beendet wurde. Die Messung der Extinktion erfolgte bei 450 nm gegen einen Blank (Chromogenes Substrat + Stopplösung). Konzentrationen wurden anhand der mitgeführten Standards nach Erstellen einer Standardkurve mit vier Parametern A-D im Format

$$Extinktion_{405\text{ nm}} = \frac{A - D}{1 + \left(\frac{Konzentration}{C}\right)^B} + D$$

berechnet. Zur Berechnung der Parameter wurde der Kurvenanpassungsalgorithmus der ELISA-Reader Software genutzt.

### 2.2.10 Messung der ALP-Aktivität im Zellysat

Im Differenzierungsversuch über 14 Tage wurde die ALP-Aktivität im Zellysat nach 7 bzw. 14 Tagen bestimmt. Das verwendete Verfahren machte sich zu Nutze, dass die

ALP neben ihren physiologischen Substraten auch *p*-Nitrophenylphosphat (pNPP) dephosphorylieren kann. Mit Verlust der Phosphatgruppe färbte sich das Substrat gelb. Hierdurch kam es in einem festen Zeitraum proportional zur ALP-Aktivität in der Probe zu einer Farbreaktion, die als Extinktion bei einer Wellenlänge von 405 nm kolorimetrisch nachgewiesen werden konnte. Durch kontinuierliche Erfassung des Farbumschlages nach Zugabe des pNPP-Substrats in fünfminütigen Abständen konnte die Kinetik der ALP-Aktivität gemessen werden.

Für die Messung wurden die Proben zum festgelegten Versuchstag wie folgt behandelt. Das Medium wurde vorsichtig aus den Zellkulturwells abgesaugt und der Wellinhalt einmal mit 1 ml PBS (10 %) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen lysiert, indem 250 µl Triton-X-Lysispuffer hinzugegeben und der Ansatz 10 min auf Eis geschüttelt wurde. Die Proben wurden anschließend für die Auswertung in Eppendorf-Tubes überführt und bei -80 °C eingefroren. Zur Auswertung wurden die Proben langsam auf Eis aufgetaut und zunächst bei 4 °C und 250 g für 4 min zentrifugiert. Jeweils 10 µl des Probenüberstands bzw. Blank (Lysispuffer) oder Kontrollen, wurden zu 40 µl Assaypuffer hinzupipettiert und 15 min im Reader auf 37 °C Reaktionstemperatur gebracht. Mit Zugabe von 50 µl pNPP Substrat begann die Messreihe der Enzymkinetik über 40 min mit Messung der Extinktionen bei 405 nm gegen den Blank (Assaypuffer + Lysispuffer + Substrat) alle 5 Min. Die Enzymaktivität im Zellysate in internationalen Einheiten (engl. international units) pro Liter [IU/l] wurde anhand der nachfolgenden Formel berechnet.

$$ALP \text{ Aktivität } \left[ \frac{IU}{l} \right] = \frac{(\Delta OD_{405 \text{ nm}} * 1000 * \text{Verdünnungsfaktor})}{t * \epsilon * l}$$

( $\Delta OD_{405 \text{ nm}}$ : Extinktionsdifferenz zwischen Messzeitpunkten, *Verdünnungsfaktor* = 10 (da 10 µl Lysat in 100 µl Gesamtvolumen), *t*: Zeitintervall = 5 min,  $\epsilon$ : 18,75 l mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>, *l*: Länge = 0,29 cm für 100 µl Volumen in 96-Well-Platte.

### 2.2.11 Messung des Gesamtproteingehalts des Zellysats

Um die ALP-Aktivität verschiedener Spender von der variierenden Zellzahl unabhängig zu machen, wurde diese auf die Gesamtproteinmenge normiert. Ausgewertet wurden Aliquots derselben Proben, welche für die ALP-Messung gewonnen wurden (Zellysate in 250 µl Triton-X-Lysispuffer). Zur Anwendung kam ein kolorimetrisches Verfahren (BIO-RAD DC™ Protein Assay) zur Bestimmung der Proteinkonzentration im Lysat. Die fargebende Reaktion entsprach im Wesentlichen dem erstmals durch Lowry et al. (Lowry et al. 1951) veröffentlichten Verfahren. Durch Zugabe einer alkalischen Kupferartratlösung (hier Reagenz A) wurde dabei die Proteinstruktur durch die Reaktion

mit den Peptidbindungen mit Kupfer angereichert. Dieses vermittelte in einem nächsten Schritt die Reduktion von Phosphorsäure-Wolfram- oder -Molybdän-Verbindungen, die als Säuregemisch in einem weiteren Reagenz (hier Reagenz B) hinzugegeben wurden. Die entstehenden reduzierten Spezies wiesen eine intensive blaue Farbe auf, welche am Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 750 nm bestimmt wurden. Im Allgemeinen wirken dabei insbesondere die Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan neben weiteren schwächer wirksamen Aminosäuren chromogen. Einen Einfluss üben aber auch die Proteinlänge oder die Exposition von funktionellen Gruppen aus (Peterson 1979). Daher war ein geeigneter Standard zu wählen, der dem Proteingemisch ähnelt. Zum Einsatz kam bovines Serum Albumin im verwendeten Lysispuffer (BSA Standards). Die Messung geschah gemäß dem folgenden Protokoll.

Die Proben wurden langsam auf Eis aufgetaut und bei 250 g und 4 °C 4 min zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurden das Arbeitsreagenz A' und die BSA Standards angesetzt. Das Reagenz A wurde hierfür mit mitgelieferter Surfactant-Lösung (Reagenz S) versetzt (20 µl zu 1 ml), um den Assay mit dem als Lysispuffer verwendeten Triton-X-100 Detergenz kompatibel zu machen. In einer 96-Well Mikrotiter-Platte wurden zu je 10 µl Triplets des Standards, der Probe, oder des Lysispuffers als Blank 25 µl Reagenz A' pipettiert. Anschließend wurden 250 µl Reagenz B hinzugefügt. Eventuelle Luftblasen wurden beseitigt. Im ELISA-Reader fand nach Schütteln und 15-minütiger Inkubation zur vollständigen Farbreaktion die Extinktionsmessung bei einer Wellenlänge von 750 nm gegen den Blankwert statt. Zur Konzentrationsbestimmung des Proteins wurde auf jeder Platte eine Standardreihe mit BSA Standards in den Konzentrationen 1,5 mg/ml, 0,75 mg/ml, 0,375 mg/ml, 0,188 mg/ml, 0,094 mg/ml mitgeführt, anhand derer eine lineare Standardgerade mit der Steigung m und Y-Achsenabschnitt b mittels der Formel  $Extinktion = m * Konzentration + b$  berechnet werden konnte. Aus der gemessenen Extinktion lässt sich so die Konzentration in mg/ml ermitteln.

### 2.2.12 Normierung der ALP-Aktivität auf den Gesamtproteingehalt

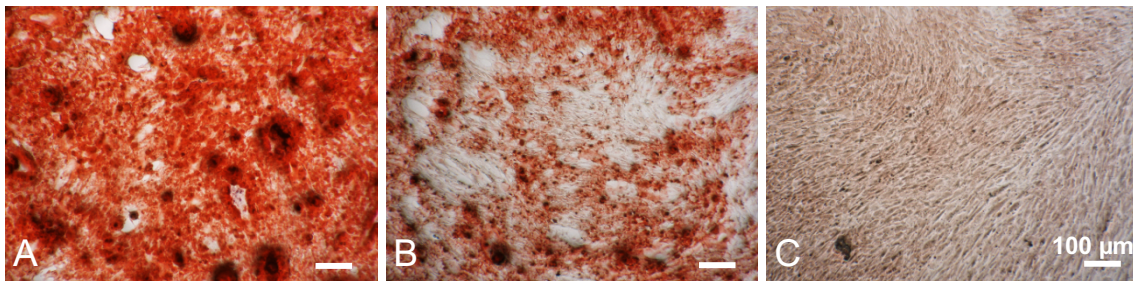
Die ALP-Aktivität im Well wurde anhand des Gesamtproteingehalts im Well normalisiert. Bestimmt wurde damit die ALP-Aktivität pro mg Gesamtprotein in [IU/mg].

Dies geschah gemäß der Formel:

$$\begin{aligned} \frac{ALP \text{ Aktivität}}{gesamt \text{ Protein}} \left[ \frac{IU}{mg} \right] &= \frac{ALP \text{ Aktivität}/l}{gesamt \text{ Protein}/l} \left[ \frac{\frac{IU}{l}}{\frac{mg}{l}} \right] \\ &= \frac{ALP \text{ Aktivität}/l}{1000 * gesamt \text{ Protein}/ml} \left[ \frac{\frac{IU}{l}}{\frac{mg}{ml}} = \frac{IU}{mg} \right] \end{aligned}$$

### 2.2.13 Färbung der mineralisierten Matrix mittels Alizarinrot S Farbstoff

Zur Färbung der mineralisierten Matrix wurde Alizarinrot S Farbstoff verwendet, welcher zum histologischen Nachweis von Kalzium in biologischen Proben und der Zellkultur Anwendung findet. Der Farbstoff bildet mit Kalzium schwer lösliche intensiv gelb-rot gefärbte Salze. Eine 40 mM Alizarinrot S Lösung wurde aus Pulver in Aqua purificata mittels Ammoniumhydroxid 0,5 % auf einen pH-Wert von 4,1 bis 4,5 titriert hergestellt. Zur Färbung der Mineralablagerungen wurde der Wellboden zunächst vorsichtig zweimalig mit gekühltem PBS (4 °C) gespült und anschließend mit 4 % Paraformaldehyd Fixationslösung (4 °C) 10 min auf Eis fixiert. Es folgte eine zweimalige Waschung mit Aqua purificata und hiernach die Zugabe von 1 ml 40 mM Alizarinrot S Lösung. Daraufhin wurde der Ansatz 20 min bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken inkubiert. Der überschüssige Farbstoff wurde aspiriert, der gefärbte Boden viermalig mit 2 ml Aqua purificata bedeckt und jeweils 5 min leicht geschwenkt, bis der Überstand klar blieb, um den restlichen nicht gebundenen Farbstoff zu lösen. Das Wasser wurde jeweils vorsichtig mit einer Pipette vom Rand aspiriert und letzte Flüssigkeitsreste nach zweiminütiger Neigung der Platte entfernt. Anschließend erfolgte die Mikroskopie der gefärbten Flächen.



*Abbildung 6: Gefärbte mineralisierte Ablagerungen nach Alizarinrot S Färbung  
Zeitpunkt: 14 Tage. A und B: Nach Differenzierung in osteogenem Medium. C: Undifferenzierte MSC in Kulturmedium als Negativkontrolle. A: 40.000 Zellen, B: 20.000 Zellen, C: 40.000 Zellen. Nach 14 Tagen in osteogenem Medium lassen sich mineralisierte Noduli und Ablagerungen erkennen (A und B). In einfachem Kulturmedium sind nur Zellen ohne Kalziumablagerungen sichtbar. Kalziumablagerungen: tiefrot bis dunkel (Noduli), unspezifische Färbung des Zellrasens: grünlich bis blassrot.*

### 2.2.14 Histomorphometrische Bestimmung der mineralisierten Fläche

Für die histomorphometrische Bestimmung der mineralisierten Fläche wurden zunächst Aufnahmen des gefärbten Wellbodens der Fläche von fünf Blickfeldern an zuvor festgelegten und für alle untersuchten Proben gleichen Stellen angefertigt. Eingesetzt wurde das Mikroskop der Firma Leica mit einer montierten Nikonkamera. Die fotografierte Fläche entsprach etwa 5 x 1,1 mm x 1,5 mm.

Allgemeines Messprinzip: Mithilfe computergestützter Bildverarbeitung war es möglich, die gefärbte Fläche zu vermessen sofern der Maßstab des Bildes bekannt ist (Abbildung 7). Hierfür wurde der Farbintensität zunächst ein Grauwert zugeordnet, indem das Bild in seine Farbkanäle aufgeteilt wurde. Die Kalziumablagerungen ließen sich im vorliegenden Fall am besten im Grünkanal des Bildes erkennen. Eine bestimmte Farbintensität (Wert zwischen 0 bis 255 im 8-Bit Tiff-Format) wurde nun als Schwelle (engl.: Threshold) gewählt. Ein Pixel mit Wert oberhalb dieser Grenze wurde als ‚gefärbt‘ betrachtet, darunter als ‚ungefärbt‘. Der Threshold wurde unter anderem an Negativkontrollen so angepasst, dass er möglichst keine anderen Strukturen (Zellen/Debris) erfasste, aber gleichzeitig die rote Farbe möglichst vollständig abdeckte. Der Wert wurde einmalig für alle Bilder auf 65 festgelegt. Anschließend konnte das Bild nach Anwendung des Grenzwertes in ein Binärbild umgewandelt werden. Nach einer solchen Operation hatten nun alle ‚gefärbten‘ Stellen den Wert 255 (schwarz) und alle ‚ungefärbten‘ den Wert 0 (weiß). Dies erlaubte der Software diese Pixel zu erkennen und als Fläche oder Prozentwert der Gesamtfläche anzugeben. Verwendet wurde der Mittelwert der 5 Aufnahmen eines Wells.

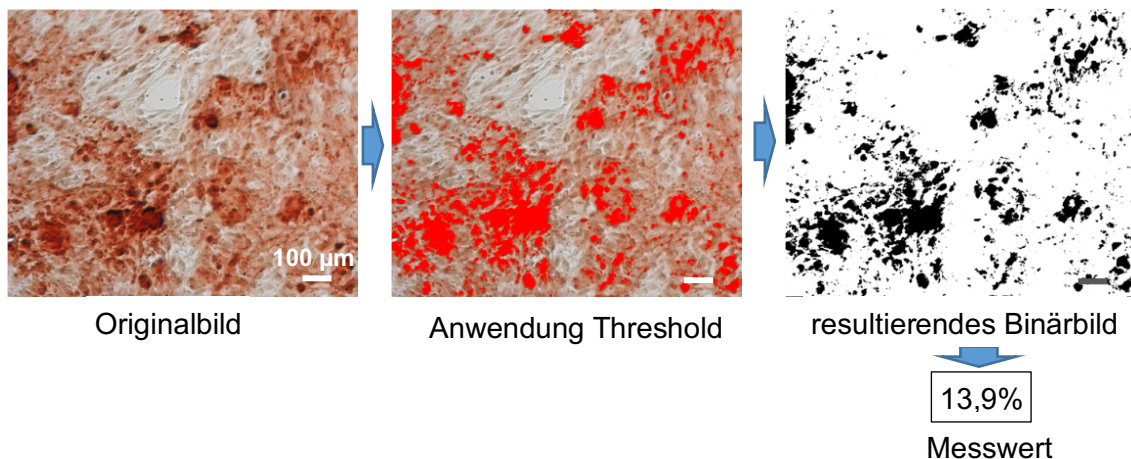


Abbildung 7: Funktionsprinzip der histomorphometrischen Bestimmung der mineralisierten Fläche.

Die Aufnahmen wurden mittels der zur montierten Nikonkamera zugehörigen Software in einer Größe von 2560x1920 Pixeln und einer Bittiefe von 24 Bit unkomprimiert im Tiff-Format aufgenommen. Für die Analyse wurde die Software ImageJ verwendet, welche unter public domain am U.S. National Institute of Health entwickelt wird. Folgende Arbeitsschritte wurden in der Software durchgeführt.

Anfangs wurde der Maßstab eines Pixels festgelegt (1 Pixel entsprach 0,54 µm). Nach der Umwandlung in getrennte Graustufenbilder für jeden Farbkanal wurde der Grünkanal ausgewählt. Hier wurde ein Threshold angepasst (Wert: 65) und auf den Grünkanal

angewendet. Nach Festlegen der Messparameter, Fläche und Flächenanteil wurde die Messung auf das Binärbild angewendet. Der Messwert wurde in einer Tabelle gespeichert und das (Binär-)Bild zu Dokumentationszwecken als Bitmap gespeichert. Nach Festlegen des Maßstabes und der Messgrößen konnten die beschriebenen Schritte für die folgenden Bilder durch folgendes Makro automatisiert werden.

```
run("RGB Stack");
run("Delete Slice");
run("Next Slice [>]");
run("Delete Slice");
run("Threshold...");
setAutoThreshold("Default");
setThreshold(0, 65);
setOption("BlackBackground", false);
run("Convert to Mask");
run("Measure");
close();
```

### **2.2.15 Alizarinrot S Farbstoff-Rückgewinnung und -Quantifizierung**

Zur Quantifizierung des Alizarinrot S Farbstoffes im gesamten Well, inklusive der nicht mikroskopierbaren Anteile auf dem Material, wurde der Farbstoff nach Anfertigen der Aufnahmen für die Histomorphometrie mittels Essigsäure aus dem Well herausgelöst, um nach Anpassung des pH-Werts die Färbung der Lösung kolorimetrisch zu bestimmen. Dabei ist die Extinktion bei 405 nm von Alizarinrot S in Ammoniumacetat bei einem pH-Wert von 4,1 über weite Konzentrationsbereiche linear, was weitere Verdünnungsschritte überflüssig macht (Gregory et al. 2004).

500 µl 10%ige (v/v) Essigsäure (aus reiner Essigsäure in Wasser verdünnt) wurden in die Wells pipettiert und 30 min bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Der Zellrasen wurde anschließend unter Zuhilfenahme eines Cell-Scrapers vom Wellboden und den Testmaterialien abgelöst und zusammen mit der Essigsäure in ein verschließbares 1,5 ml Tube überführt. Diese wurden 30 Sekunden auf einem Vortexmischer gemischt und dicht verschlossen. Nun wurden die Proben 10 min auf 85 °C erhitzt und 5 min auf Eis abgekühlt. Um Verdunstung zu vermeiden, blieben die Proben geschlossen, bis kein Kondensat mehr den Deckel trübte. Nach einer Zentrifugation bei 15.000 g über 15 min wurde der Überstand in ein neues Tube überführt und mit etwa 60 µl 10%igem (v/v) Ammoniumhydroxid (aus 25%iger Ammoniaklösung verdünnt) im pH-Wert angepasst (pH auf 4,1-4,5). Das benötigte Volumen wurde für jeden Spender

einheitlich anhand einer Probe am pH-Meter austitriert. Triplets jeder Probe von 100 µl wurden in einer 96-Well Platte am ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 405 nm ausgelesen.

### **2.2.16 Statistische Analyse**

Zur Datenanalyse und Erstellung der Graphen wurde die Software SPSS Version 23 und 24 der Firma IBM und Microsoft Excel verwendet. Die Verteilungen wurden mittels Kolmogorow-Smirnow Test angepasst nach Lilliefors auf Normalverteilung überprüft. Ließ sich eine Normalverteilung in der Grundgesamtheit annehmen, wurde nach Überprüfung der Varianzhomogenität mittels Levene-Test ( $p > 0.05$ ) eine univariate einfaktorische Varianzanalyse (ANOVA) inklusive post-Hoc Test nach Šidák durchgeführt. Konnte nicht von Normalverteilung ausgegangen werden, erfolgte eine nichtparametrische Analyse nach Kruskal-Wallis mit paarweisen Einzelvergleichen (Signifikanzen nach Bonferroni angepasst). Zur Überprüfung der Veränderungen der normierten ALP-Aktivität zwischen Tag 7 und Tag 14 wurde der Wilcoxon-Vorzeichenrangtest bei verbundenen Stichproben durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p < 0,05$  festgelegt und in den Abbildungen mit \* gekennzeichnet (\*\* für  $p \leq 0,01$ , \*\*\* für  $p \leq 0,001$ ). Abbildungen wurden als Boxplot oder Balkendiagramm mit Fehlerindikatoren mit der Länge des einfachen Standardfehlers erstellt, sofern nicht anders in der Bildbeschreibung angegeben. Die Stichprobengröße ist jeweils im Text genannt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Zellmorphologie in der Phasenkontrastmikroskopie

Das Zellwachstum und die Zellmorphologie der MSC Kulturen wurden im Versuchsverlauf lichtmikroskopisch beurteilt und fotodokumentiert. Als Beobachtungszeitpunkte dienten der Start der Experimente (je nach entsprechendem Versuchsprotokoll) 24-48 h nach Aussaat vor Beginn der osteogenen Differenzierung, wöchentliche Intervalle ab Differenzierungsstart sowie der Endpunkt der Experimente. Beurteilt wurden Zellvitalität, Zelldichte, Intaktheit des Zellrasens und Veränderungen der Zellform, aber auch Beschaffenheit des Mediums und Menge an extrazellulärem Material wie Detritus, Matrix und Mineralablagerungen.

#### 3.1.1 Undifferenzierte MSC verschiedener Spender zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Aussaat

Die Zellkulturen präsentierten sich 24 h nach Aussaat gut adhärent. Es fanden sich in den Wells nur vereinzelt nicht angewachsene oder tote Zellen im klaren Kulturmedium. Morphologisch zeigte sich für die verschiedenen Spender das Bild einer Mischkultur verschiedener Zellformen. Die vorhandenen Zelltypen entsprechen in Form und Verhältnis der einleitend vorgestellten Beschreibung ‚typischer‘ MSC Kulturen. Zum einen fanden sich spindelförmige lang auslaufende Zellen mit schmalen Zellkörpern (20-50  $\mu\text{m}$ ). Andererseits zeigten sich auch größere flache polygonale Zellen (75-150  $\mu\text{m}$ ) (Abbildung 8 Pfeile). Letztere wiesen große Euchromatin-reiche Nuclei und heterogenes Zytoplasma auf, bildeten mitunter Fortsätze aus und entsprachen morphologisch den mMSC. Während die Spindelform sowie flache mMSC in allen Kulturen vorherrschten, fanden sich aber auch vereinzelt kleine runde oder fortsatzreiche Zellen (Abbildung 8 Pfeilspitzen). In ihrer Größe, Form und teilweisem Adhärenzverlust könnten diese den RS-Zellen, welche als schnell proliferierende weitgehend undifferenzierte Teilpopulation der MSC beschrieben wurde, entsprechen. Die Abgrenzung zu Artefakten wie etwa mitotischen, durch den Gefrierprozess geschädigten oder nach der Aussaat nicht adhärerten Zellen ist bei dem vereinzelt Auftreten zu vernachlässigen. Verschiedene Spender unterschieden sich zum einen durch ihre Ausrichtung (konkordantes gegenüber ungeordnetem Wachstum) oder im Verhältnis der verschiedenen eben beschriebenen Zelltypen zueinander. Hierbei schien die spindelförmige Morphologie gegenüber den breiten flachen Zellen nach 48 h zu überwiegen. Andere RS-Zell-ähnliche Formen blieben Ausnahmen. Klare morphologische Unterschiede zwischen knochengesunden und osteoporotischen Spendern ließen sich zu diesem Zeitpunkt nicht erkennen.

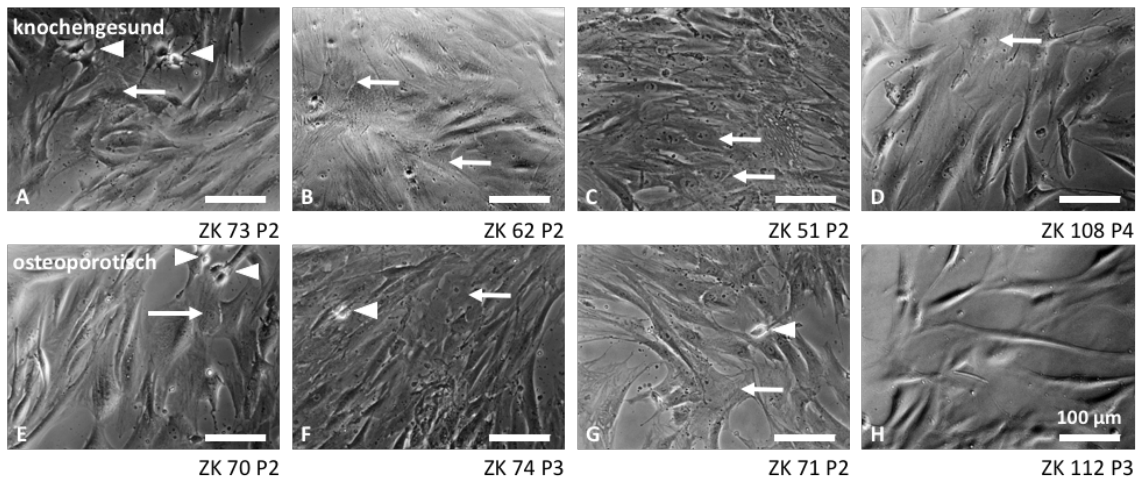


Abbildung 8: Verschiedene knochengesunde (A-D) und osteoporotische (E-H) Spenderkulturen 48 h nach Aussaat in Kulturmedium. ZK: Zellkultur, P: Passagezahl  
Pfeile: mMSC, Pfeilspitzen: mögliche RS-Zellen

### 3.1.2 MSC verschiedener Spender im Verlauf der osteogenen Differenzierung im Versuchszeitraum

Am Ende der ersten Woche nach Zugabe des osteogenen Differenzierungsmediums erschien der Zellrasen zumeist konfluent. Der Anteil spindelförmiger Zellen hatte zugunsten einer breiteren, plumperen Zellform abgenommen. Dieser Effekt zeigte sich jedoch zwischen den einzelnen Spendern unterschiedlich stark ausgeprägt. In höheren Vergrößerungen ließen sich in allen ZKs vermehrt intrazelluläre Granula beobachten.

Zwei Wochen nach Differenzierungsbeginn waren zwischen einzelnen Zellkulturen deutliche Unterschiede in Zelldichte und Morphologie zu beobachten. Während beispielsweise die ZK 70 und ZK 73 ein gleichgerichtetes enges Wachstum spindelförmiger Zellen zeigten, fielen bei anderen Spendern (ZK 62, ZK 74 und ZK 112) deutliche Lücken im Zellrasen auf. Die Zellkulturen variierten dabei eher individuell. Eine deutliche morphologische Unterscheidung der knochengesunden und osteoporotischen Spender war auch hier nicht möglich. Zu diesem Zeitpunkt waren bereits deutlich Ablagerungen extrazellulärer Matrix sowie Mineralablagerungen zu erkennen, welche je nach Position im Phasenkontrast entweder schillernd oder lichtundurchlässig erschienen (Abbildung 9).

Nach 35 Tagen waren die Wells aller ZKs fast vollständig mit mineralischen Ablagerungen bedeckt. Zellstrukturen ließen sich hierunter nur schwer ausmachen. Spindelförmige und rundliche Zellen erschienen im Phasenkontrast besser als flache und breite Zellen, welche unter diesen Bedingungen nicht mehr auszumachen waren.

Der Verlauf der Differenzierung der MSC in vitro zu mineralproduzierenden Osteoblasten-ähnlichen Zellen ist an dieser Stelle exemplarisch an zwei Spendern in

Abbildung 9 dargestellt. Am ersten Tag waren noch nicht adhärenente Zellen und Zeichen mitotischer Aktivität zu erkennen (Abbildung 9 A, F). Im Verlauf der ersten Woche nahm die Dichte des Zellrasens zu. Eine Verbreiterung der Zellen und Zunahme von Zell-Zellkontakten war zu erkennen. Intra- sowie extrazelluläre Granula sowie Detritus wurden als Zeichen verstärkter Stoffwechselaktivität und erhöhten Zellumsatzes gewertet (Abbildung 9 B, G). Am Tag 14 waren dann bereits deutlich mineralisierte lichtundurchlässige Ablagerungen zu erkennen. Diese nehmen im Verlauf zu, bis sie die Zellen bedeckten. Die Zelldichte schien im Verlauf wieder abzunehmen. Allerdings ließen sich einzelne Zellen unter der Schicht mineralisierter Matrix nurmehr schlecht abgrenzen.

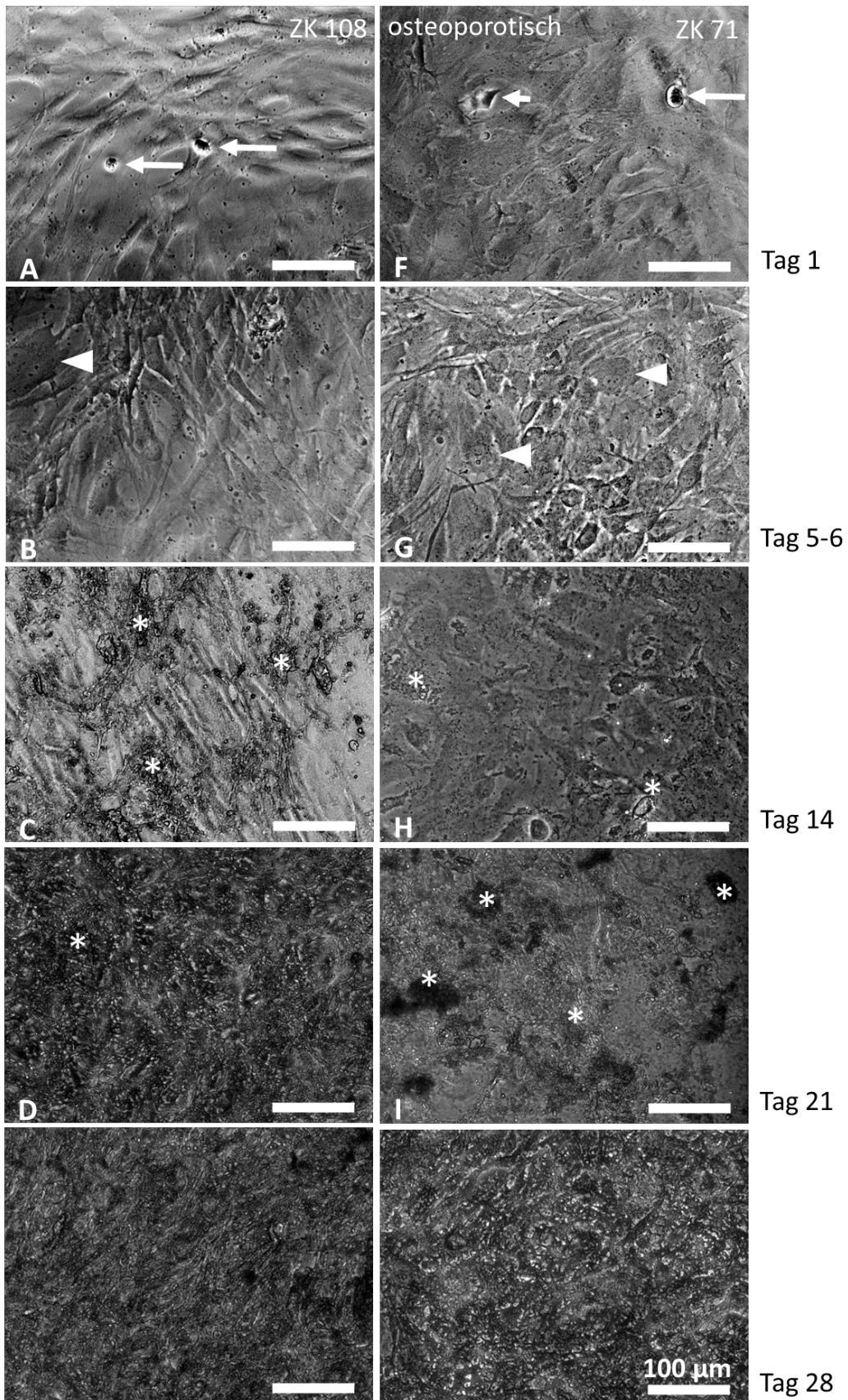


Abbildung 9: Exemplarische Darstellung des Verlaufs der osteogenen Differenzierung anhand der ZK 108 (knochengesund) und ZK 71 (osteoporotisch).  
 Sterne: mineralische Ablagerungen (Tag 28 fast vollständig bedeckt), Pfeilspitzen: große flache kubische Zellen, Pfeile: nicht adhärenente RS-ähnliche Zellen, evtl. in Mitose (kurzer Pfeil).

### 3.1.3 Einfluss der Materialien auf Zellwachstum und Morphologie

Es folgt zunächst ein Vergleich der Materialien Ti-40Nb unmodifiziert, Ti-40Nb mit Risedronat beladenen Partikeln, mit Risedronatfilm und mit unbeladenen Partikeln. Als Abbildung dient exemplarisch ein knochengesunder und osteoporotischer Spender. Die verwendete Risedronatmenge lag bei  $2,5 \times 10^{-7}$  mol.

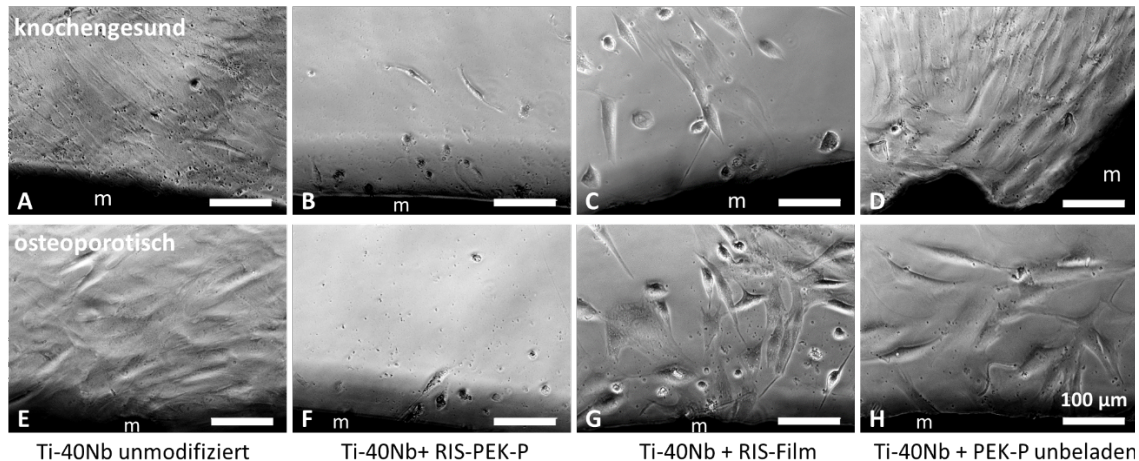


Abbildung 10: Übersicht der Zellmorphologie am Interface verschiedener Materialien am ersten Tag nach Versuchsstart.

Exemplarisch ein osteoporotischer (ZK 112) und knochengesunder (ZK 108) Spender, m: Material, Risedronatmenge:  $2,5 \times 10^{-7}$  mol.

Der Einfluss der einzelnen Materialien auf die Zellkultur trat bereits zu Versuchsbeginn deutlich in Erscheinung. Am ersten Tag nach Differenzierungsbeginn war in den risedronathaltigen Wells eine deutlich verringerte Zelldichte sichtbar (Abbildung 10 B,C,F,G). Es fanden sich hier vermehrt Zelltrümmer. Viele Zellen rundeten sich ab, verloren den Kontakt zur Wellplatte und bildeten häufig miteinander Aggregate in Suspension. Die noch adhären Zellen erschienen häufig kleiner und spitz auslaufend. Breite Zelltypen kamen äußerst selten vor. Am Interface zwischen unmodifizierten Titanplatten oder mit risedronatfreien PEK Partikeln beschichteten Platten (Abbildung 10 A,E,D,H) fand sich zumeist dichter Zellrasen ähnlich der materialfreien Kontrolle. ZK 70 zeigte zum Zeitpunkt Tag 1 noch Zeichen der Proliferation mit einem sehr kleinen Zelltyp, welcher im Phasenkontrast stark reflektierte (Übersicht aller ZKs im Anhang).

Die Anwesenheit von Risedronat im Material war nicht nur zu Versuchsbeginn, sondern auch zu späteren Zeitpunkten im Verlauf der Differenzierung ersichtlich. Die Zellen, welche dem Bisphosphonat ausgesetzt waren, blieben arm an Zell-Zell-Kontakten, klein und spitz auslaufend. Die Menge mineralisierter Matrix schien zudem im Vergleich mit den risedronatfreien Wells geringer. In den Materialkontrollen und bei Anwesenheit von PEK Partikeln war im Verlauf der ersten Woche ab Start der Differenzierung eine

Zunahme der Konfluenz zu beobachten, welche entweder durch die fortgesetzte Proliferation zu Beginn der osteogenen Differenzierung oder die Größenzunahme der einzelnen Zellen erklärbar ist (vgl. Abbildung 11: E und F). Der Zellrasen blieb häufig dicht geschlossen, sodass einzelne Zellen unter den Mineralablagerungen nur schwer auszumachen waren.

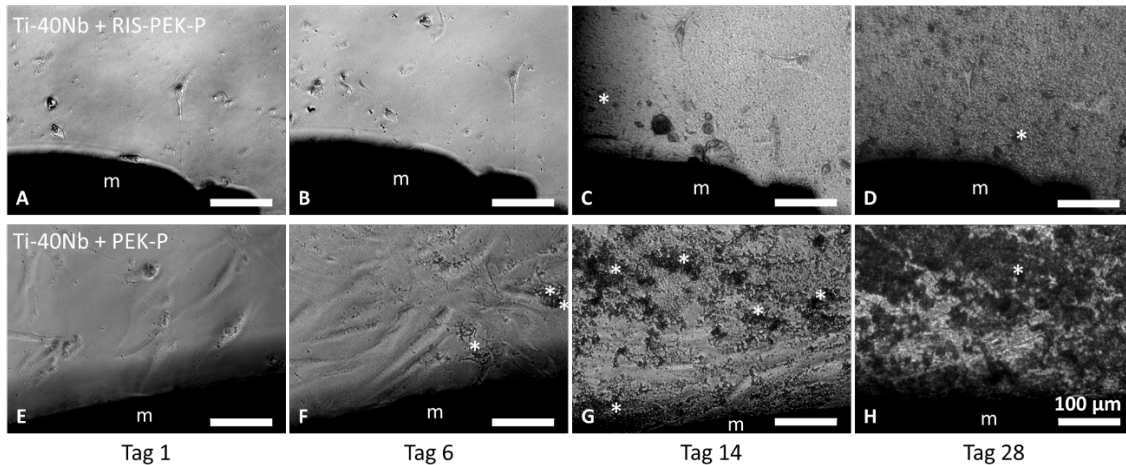


Abbildung 11: Vergleich der Differenzierung am Interface zwischen Ti-40Nb + risedronatbeladenen PEK-Partikeln (oben) und Ti-40Nb + PEK-Partikel ohne Wirkstoff (unten). Korrespondierende Bildausschnitte zu verschiedenen Zeitpunkten; ZK 73 knochengesund. m: Material, Sternchen: Mineral, Risedronatmenge:  $2,5 \times 10^{-7}$  mol

### 3.1.4 Reduktion der verwendeten Risedronatmenge

Nach Reduktion der Menge an Risedronat im Material, gingen die morphologischen Veränderungen dosisabhängig zurück und glichen sich der Kontrolle an. Eine geringere Menge Risedronat lässt sich applizieren, indem entweder der Wirkstoffgehalt in den einzelnen Partikeln verringert wird. Dies hat kleinere Partikel zur Folge (in der Folge: als RIS-PEK-P nano bezeichnet). Alternativ lassen sich weniger wirkstoffreiche große Partikel verwenden (RIS-PEK-P mikro). Abbildung 12 zeigt den Einfluss verschiedener Risedronatmengen, welche unter Verwendung beider Partikelvarianten bzw. aus einer direkt auf die Platte aufgetragenen Risedronatbeschichtung (RIS Film) freigesetzt wurden auf die Zellmorphologie am Beispiel einer MSC Kultur exemplarisch. Dieser Versuch wurde mit lediglich 2 ZKs zur Illustration der Dosisabhängigkeit der Zytotoxizität durchgeführt. Morphologisch schien die Kombination des Wirkstoffes mit PEK-P (sowohl in der mikro als auch in der nano Variante) bei hohen Wirkstoffmengen eine gesteigerte Zytotoxizität zu bewirken.

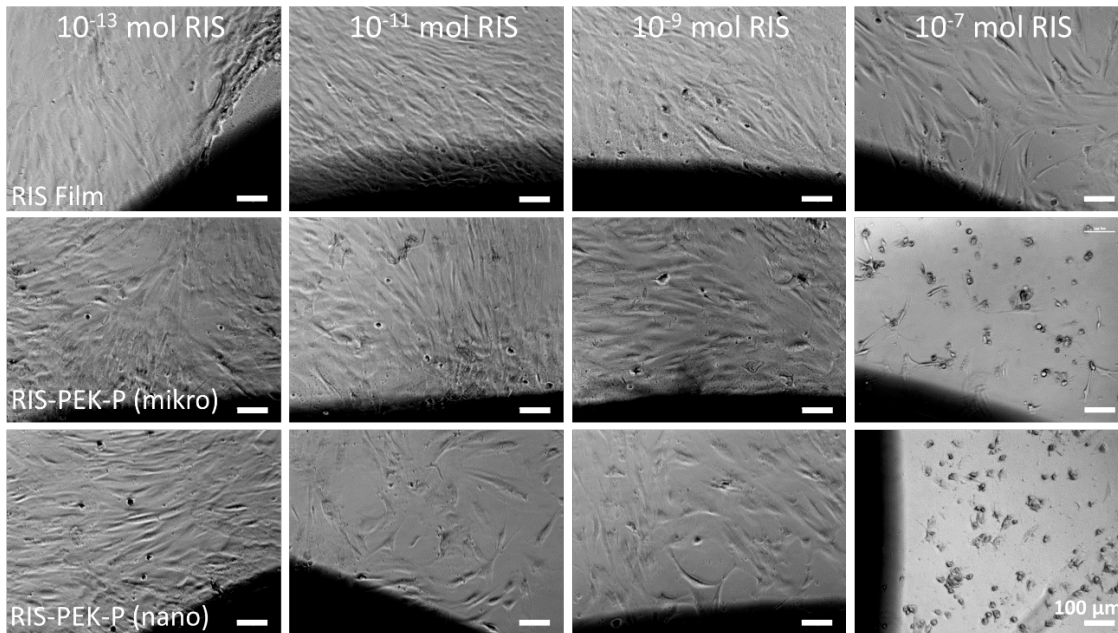


Abbildung 12: Einfluss geringerer Risedronatmengen auf die Zellmorphologie. Materialvarianten: Ti-40Nb Platten mit Risedronatfilm (RIS Film), verringerte Menge großer risedronatreicher Partikel (RIS-PEK-P mikro), Reduktion der Risedronatmenge im dadurch kleineren Partikel (RIS-PEK-P nano). Zeitpunkt: 72 h.

### 3.1.5 Vergleich der risedronatreduzierten Materialien in Bezug auf Wachstum und Zellmorphologie

Zur Untersuchung des Einflusses einer geringeren Wirkstoffmenge im Differenzierungsverlauf wurden folgende Materialien verglichen: Ti-40Nb Platten beschichtet mit: direkt als Flüssigkeitsfilm aufgebrachtem Risedronat, kleinen risedronatarmen PEK-Partikeln (RIS-PEK-P nano), größeren risedronatreichen PEK-Partikeln (RIS-PEK-P mikro) und unbeladenen PEK-Partikeln (PEK-P unbeladen). Als Kontrolle diente die unmodifizierte Ti-40Nb Platte. Der Risedronatgehalt des Materials betrug jeweils  $2,5 \times 10^{-11}$  mol. Die Zellen wurden zu Differenzierungsbeginn nach 6 und zu Versuchsende nach 14 Tagen beurteilt. Abbildung 13 zeigt dies für eine Zellkultur exemplarisch.

Zwischen den verschiedenen Materialien ließ sich am Interface zum Well kein eindeutiges morphologisches Korrelat erkennen. Deutliche Unterschiede traten aber erneut zwischen den einzelnen ZKs zu Tage. Zwischen verschiedenen ZKs bestanden individuell deutliche Unterschiede in der Menge mineralisierter Matrix. Tendenziell überwog nach 14 Tagen in knochengesunden Patienten die mineralisierte Fläche. Aber auch hier gab es Ausnahmen. So fand sich bei der knochengesunden ZK 51 nach 14 Tagen fast kein Mineral. Die ZK 62 verhielt sich hierzu ähnlich. Bei den osteoporotischen

Zellkulturen zeigte sich bei ZK 71 hingegen viel Material im Well. Im Versuchsverlauf traten teilweise große Löcher im Zellrasen auf. Dies war häufiger in osteoporotischen Kulturen der Fall.

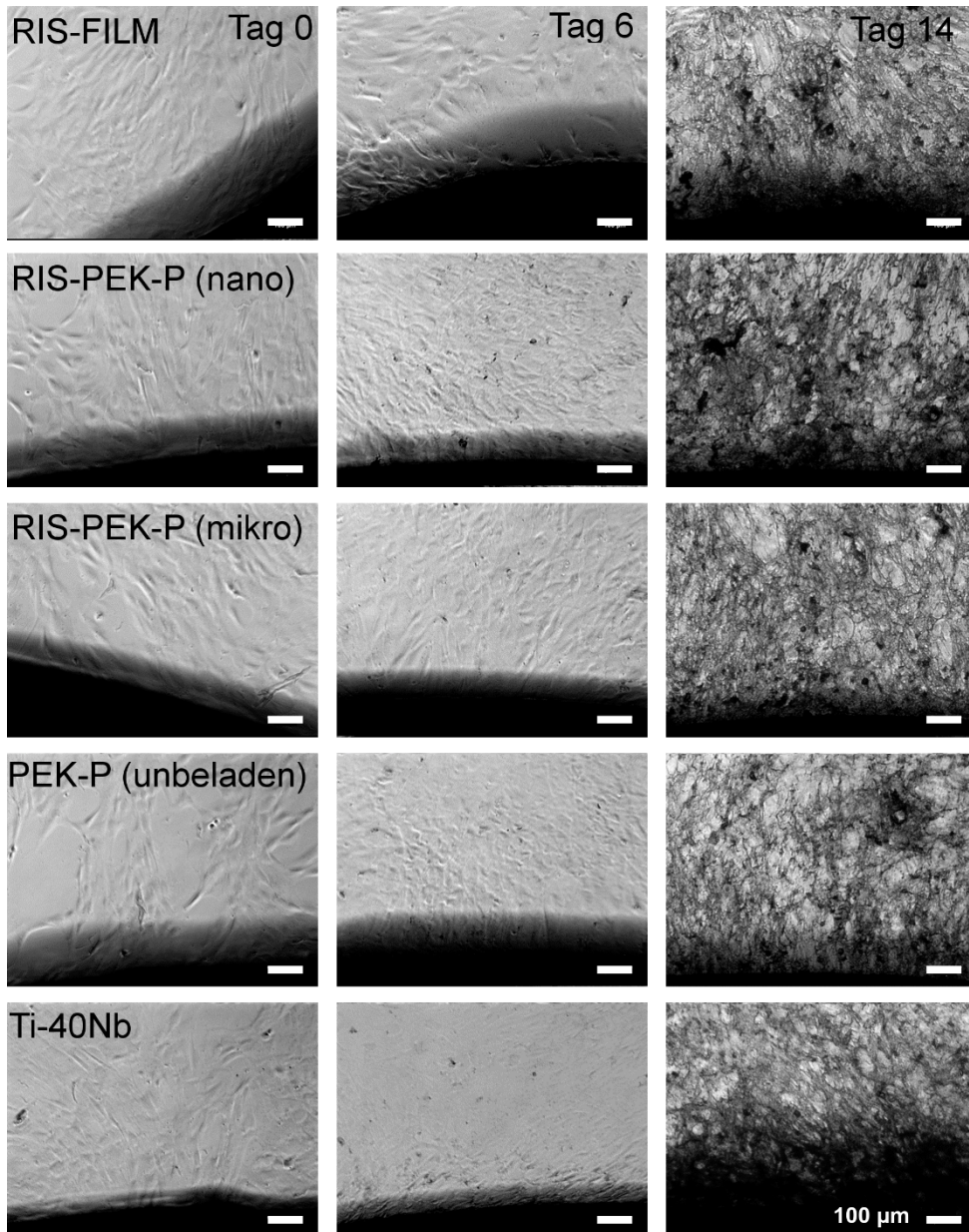


Abbildung 13: Übersicht über die Zellmorphologie am Interface der risedronatreduzierten Materialien im Versuchsverlauf.

Exemplarisch anhand der ZK 71: osteoporotisch.

### 3.2 Konzentration von Kalziumionen im Überstand

Zu Versuchsbeginn und im Verlauf der osteogenen Differenzierung wurde die Konzentration von gelöstem Kalzium im Überstand gemessen.

### 3.2.1 Kalziumkonzentration im Kulturmedium zu Versuchsstart

Beim Erstkontakt des untersuchten Materials mit dem Kulturmedium bei der Aussaat der Zellen ließen sich bereits unterschiedliche Kalziumkonzentrationen im Überstand messen (Abbildung 14).

Die Konzentration gelösten Kalziums lag in den Wells, in welchen sich risedronathaltige Partikel befanden, deutlich unter denjenigen der anderen risedronatfreien Wells. Letztere unterschieden sich im Kalziumgehalt nicht von der materialfreien Kontrolle, die nur Zellen enthielt. Die verschiedenen ZKs zeigten keinen Einfluss auf das Startmedium unabhängig von Spender oder Knochenstatus. Hierbei war die Konzentration von Kalziumionen im Überstand in Anwesenheit von risedronatbeladenen Partikeln und Risedronatfilm gegenüber der materialfreien Kontrolle signifikant verringert ( $p=0,018$  für mit risedronatbeladene Partikel,  $p\leq 0,001$  für RIS-Film). Den niedrigsten Kalziumgehalt im Überstand zeigte dabei das Material, welches mit einem Risedronatfilm überzogen war. Dieser war ebenfalls hochsignifikant gegenüber der unmodifizierten Titanplatte ( $p\leq 0,001$ ) und der PEK-Partikel beschichteten Platte ( $p=0,002$ ) verringert.

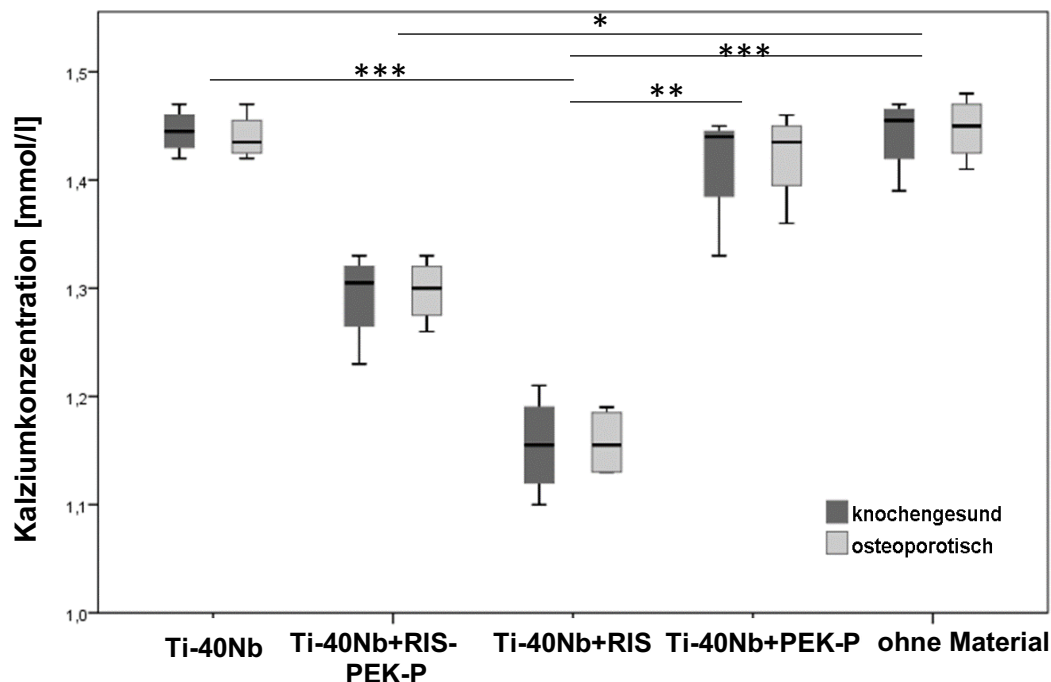


Abbildung 14: Konzentration von Kalziumionen im Überstand an Tag 0. Vor Wechsel zum osteogenen Medium, Risedronatmenge:  $2,5 \times 10^{-7}$  mol,  $n=4$ .

### 3.2.2 Veränderung der Kalziumkonzentration nach Mediumwechsel

Im Verlauf des Differenzierungsversuchs über 35 Tage wurde jeweils einen Tag nach Mediumwechsel mit frischem kalziumhaltigem Differenzierungsmedium die

Veränderung der Kalziumkonzentration in den Wells gegenüber dem reinen Medium bestimmt. Der Kalziumverbrauch aus dem Wechselmedium diente als Indikator für Mineralisierungsprozesse. Hierbei zeigte sich nach 9 und nach 17 Tagen noch eine breite Varianz der Ergebnisse mit Schwankungen von starker Abnahme bis Zunahme der Kalziumkonzentration im Überstand. Im Versuchsverlauf war schließlich am Tag 25 in jedem Well eine Abnahme der Kalziumkonzentration im Differenzierungsmedium festzustellen. Während sich die einzelnen ZKs innerhalb der Materialien sowohl im osteoporotischen als im knochengesunden Kollektiv weiter anglichen, stieg der Kalziumverbrauch im Medium weiter an (Abbildung 15).

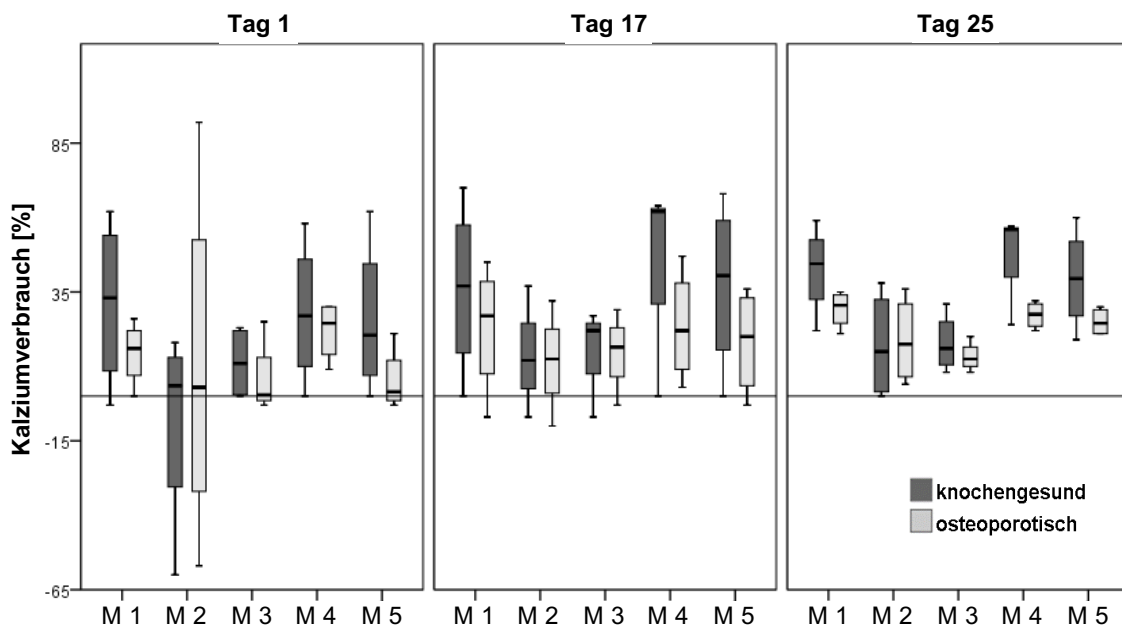


Abbildung 15: Prozentuale Abnahme der Kalziumkonzentration im Medium einen Tag nach Mediumwechsel im Versuchsverlauf bis Versuchstag 25.

**M1:** Ti-40Nb, **M2:** Ti-40Nb + RIS-PEK-P, **M3:** Ti-40Nb + RIS, **M4:** Ti-40Nb + PEK-P, **M5:** ohne Material, Risedronatmenge  $2,5 \times 10^{-7}$  mol,  $n=4$ .

An Tag 33 (Abbildung 16) ist der Kalziumverbrauch vor allem in der knochengesunden Gruppe deutlich angestiegen, während die osteoporotischen ZKs einen eher einheitlich niedrigen Kalziumverbrauch zeigen und sich voneinander auch statistisch nicht unterscheiden. Risedronat im Material verringerte den Kalziumverbrauch aus dem Medium deutlich. Am Geringsten fiel dieser aus, wenn der Wirkstoff aus PEK-Partikeln freigesetzt wurde. Sowohl die knochengesunde als auch osteoporotische Gruppe zeigten eine signifikant geringere Mineralisierung als alle knochengesunden wirkstofffreien Kontrollen. Den höchsten Kalziumverbrauch wiesen die knochengesunden ZKs zusammen mit nicht beladenen PEK-Partikeln auf. Als einzige zeigten diese einen signifikant höheren Kalziumverbrauch als osteoporotische und knochengesunde ZKs unter dem Einfluss der Risedronatbeschichtung. Die übrigen

knochengesunden Kontrollen (ohne Material und unbeschichtetes Ti-40Nb) unterschieden sich lediglich von der osteoporotischen Gruppe am Risedronat-beschichteten Material, nicht jedoch von der knochengesunden Gruppe. Zusammengefasst zeigten nach 33 Tagen knochengesunde ZKs gegenüber den risedronathaltigen Materialien einen deutlich höheren Kalziumverbrauch, während sich die osteoporotischen Kulturen auf niedrigerem Niveau voneinander nicht unterschieden. Insbesondere die Kombination von Risedronat mit PEK-Partikeln hatte eine Verringerung der Mineralisierung zur Folge, während PEK-Partikel allein im Vergleich mit anderen Materialien die Günstigsten Ergebnisse zeigten.

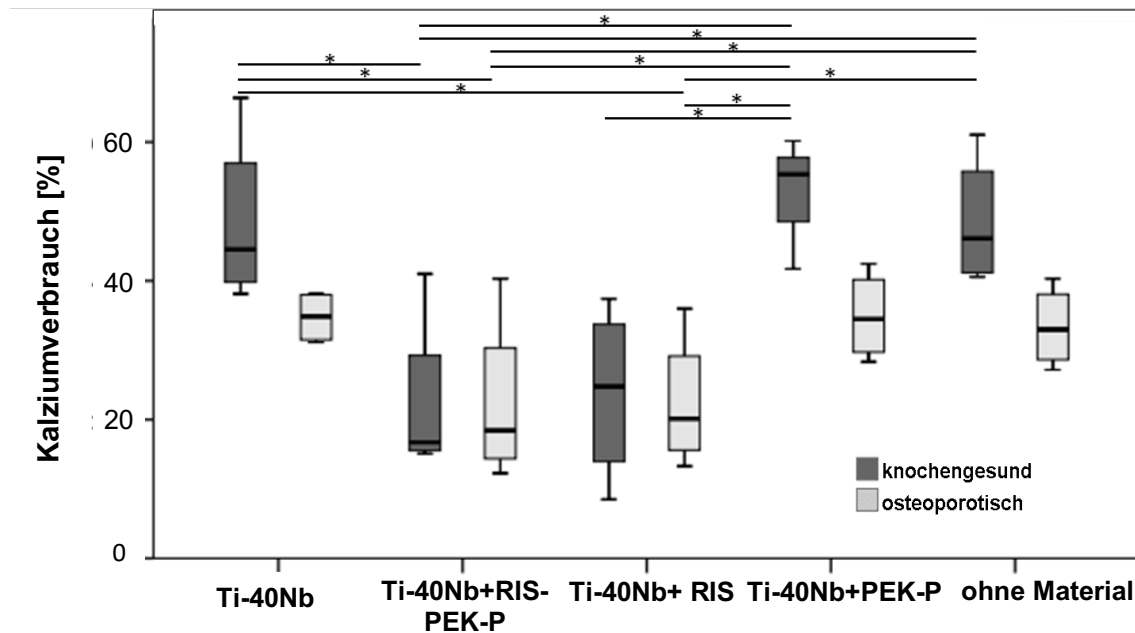


Abbildung 16: Prozentuale Abnahme der Kalziumkonzentration im Kulturmedium gemessen einen Tag nach Mediumwechsel. Zeitpunkt: Versuchstag 33. Risedronatmenge  $2,5 \times 10^{-7}$  mol,  $n=4$  (abweichend hiervon Material Ti-40Nb+PEK-P knochengesund:  $n=3$ ).

### 3.3 Mineralisierte Matrix nach Alizarinrot S Färbung

#### 3.3.1 Mineralisierte Fläche

Zur Ermittlung des Einflusses der risedronatreduzierten Materialien auf die Bildung mineralisierter Matrix im Well wurden nach 14 Tagen Kalziumablagerungen mit Alizarinrot S Farbstoff gefärbt und zunächst histomorphometrisch ausgewertet.

Die mit angefärbter kalzifizierter Matrix bedeckte Fläche im erfassten Bereich schwankte stark zwischen einzelnen Kulturen, sodass sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Patientenkollektiven oder Materialien nicht erkennen ließ (Abbildung 17).

Die Mittelwerte suggerierten in der knochengesunden Gruppe allerdings einen Anstieg der mineralisierten Fläche für Materialien gegenüber der materialfreien Kontrolle.

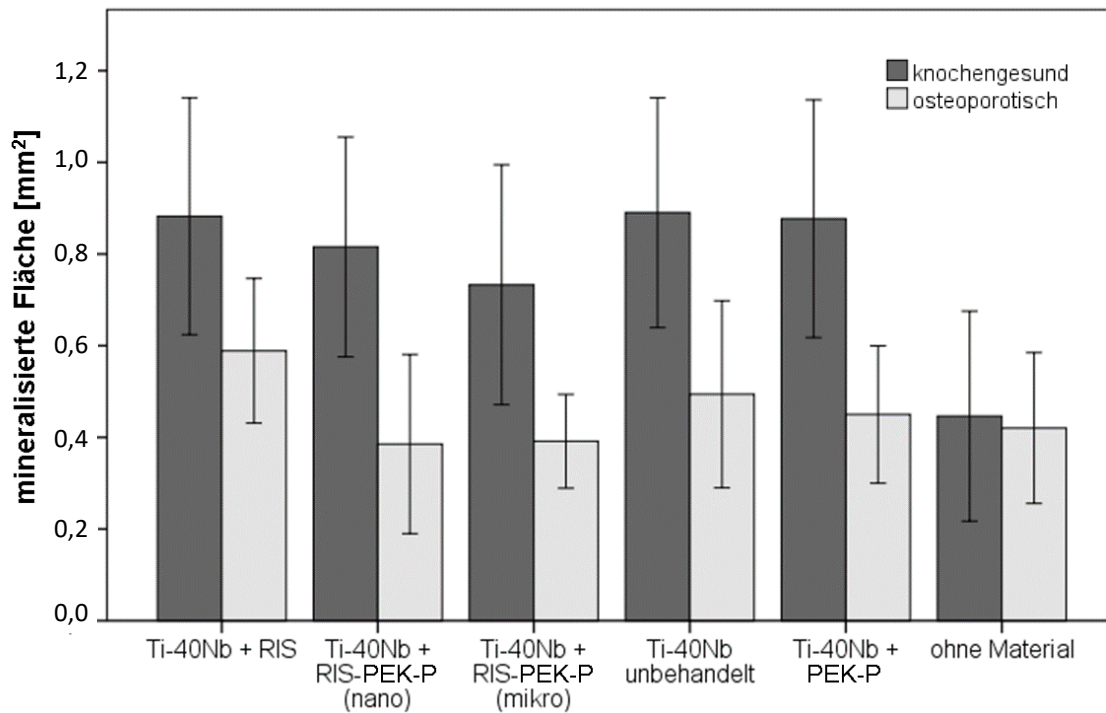


Abbildung 17: Mittelwert der mineralisierten Fläche im repräsentativen Ausschnitt des Wells für osteoporotische und knochengesunde Kulturen zum Zeitpunkt: 14 Tage. Risedronatmenge:  $2,5 \times 10^{-11}$  mol,  $n=5$ .

Um den Einfluss des Materials auf die stark unterschiedlich mineralisierenden ZK sichtbar zu machen, wurde innerhalb jeder ZK die Fläche an gefärbtem Kalzium in Bezug zur materialfreien Kontrolle gesetzt (Abbildung 18). Keines der untersuchten Materialien übte hierbei einen signifikanten Einfluss auf die mit Kalziumablagerungen bedeckte Fläche um die Materialien herum aus. In knochengesunden Kulturen erreichte die mineralisierte Fläche in Anwesenheit einer Materialplatte im Mittel jedoch mindestens den doppelten Wert der Kontrolle ohne Material. Demgegenüber wichen osteoporotische Kulturen insgesamt noch weniger von der Kontrolle ab.

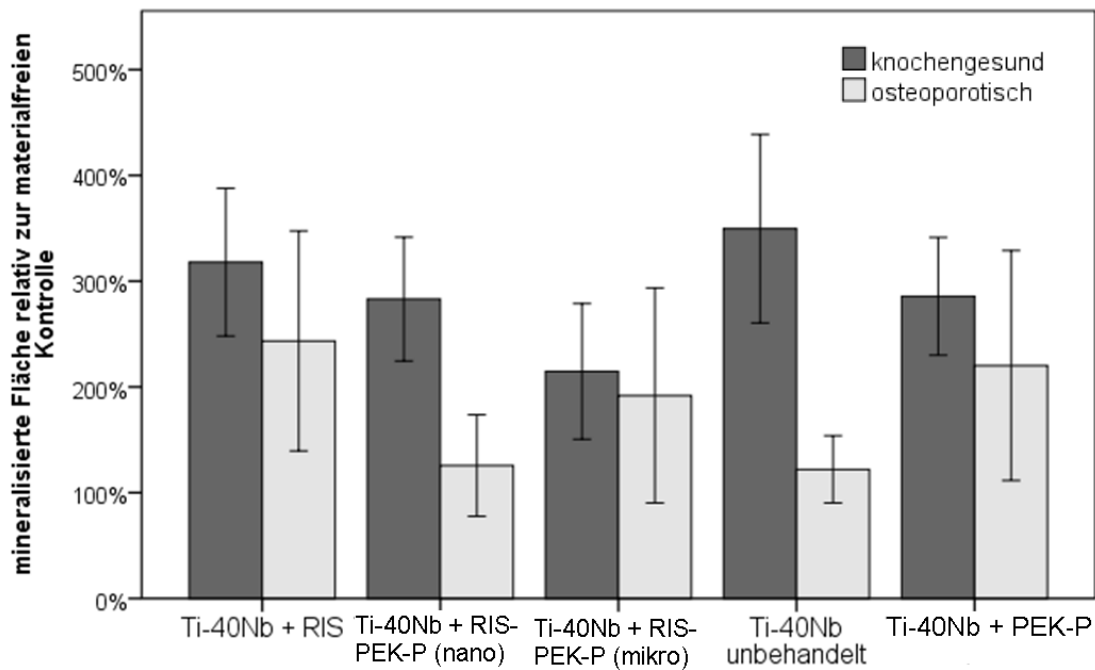


Abbildung 18: Mineralisierte Fläche in Prozent der materialfreien Kontrolle. Für osteoporotische und knochengesunde Kulturen zum Zeitpunkt: 14 Tage. Risedronatmenge:  $2,5 \times 10^{-11}$  mol,  $n=5$ .

### 3.3.2 Farbstoffrückgewinnung und photometrische Quantifizierung

Nach Herauslösen des Farbstoffes aus den gefärbten Wells ließ sich dieser semiquantitativ photometrisch bestimmen (Abbildung 19). Im Unterschied zur vorrausgegangenen Methode, sollte hiermit eine Einschätzung des im gesamten Well abgelagerten Kalziums (nicht nur im Bereich um die Materialien herum) stattfinden. Die Varianz der Mineralisierung zwischen den verschiedenen Spender war auch hier groß. Zwischen der knochengesunden und der osteoporotischen Gruppe ließ sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied feststellen. Der Unterschied zwischen der materialfreien Kontrolle und den titanhaltigen Gruppen fiel aber unabhängig des Knochenstatus größer aus.

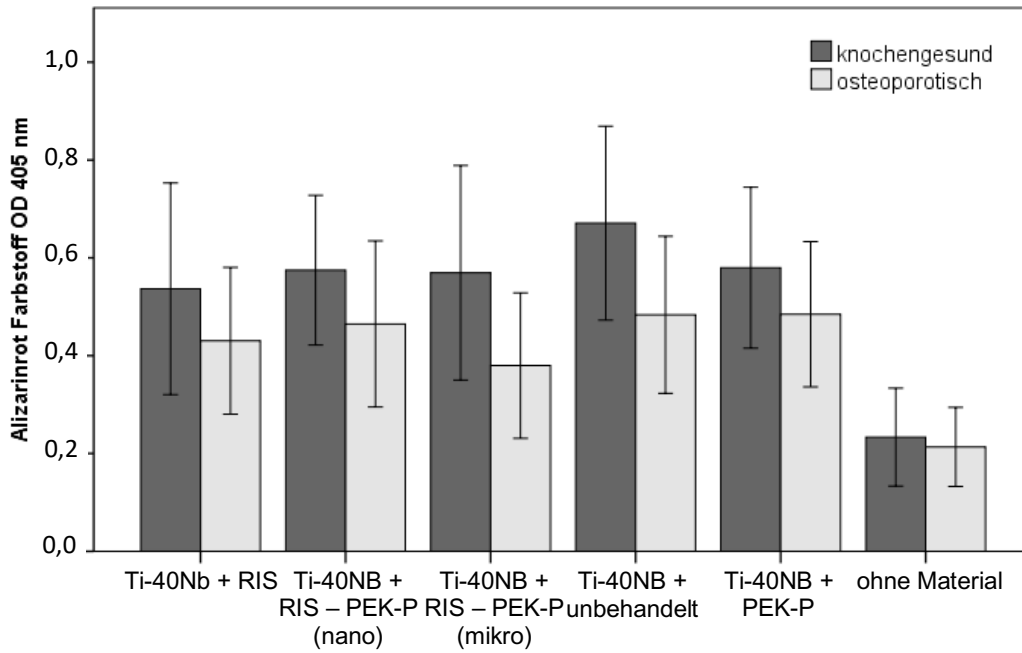


Abbildung 19: Extinktionswerte nach Rückgewinnung des Alizarinrot S Farbstoffes aus dem Well. Für osteoporotische und knochengesunde Kulturen zum Zeitpunkt 14 Tage. Risedronatmenge:  $2,5 \times 10^{-11}$  mol,  $n=5$ .

Innerhalb der ZKs ließ sich aus der mineralisierten Matrix in Anwesenheit von risedronatfreiem Material gegenüber der materialfreien Kontrolle insgesamt signifikant mehr Farbstoff zurückgewinnen. Für risedronathaltige Materialien war kein Unterschied sicher nachweisbar (Abbildung 20).

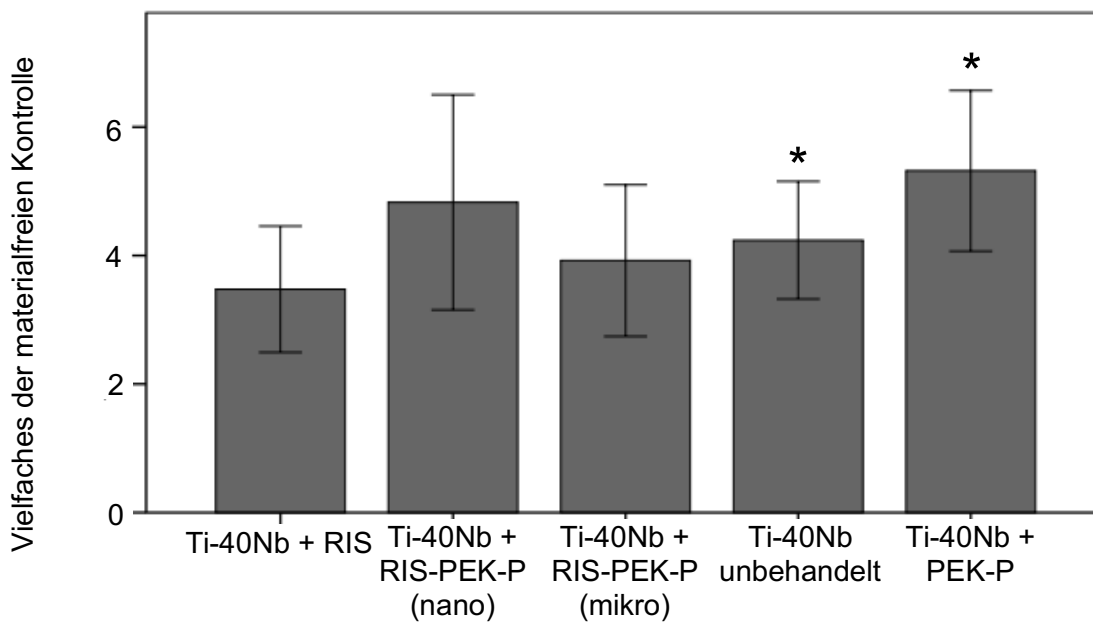


Abbildung 20: Farbstoff aus mineralisierter Matrix nach Alizarinrot S Rückgewinnung als Vielfaches der materialfreien Kontrolle für einzelne Materialien. Zeitpunkt: 14 Tage, Risedronatmenge:  $2,5 \times 10^{-11}$  mol,  $n=10$ .

### 3.4 Osteokalzinkonzentration im Überstand

Im Verlauf der osteogenen Differenzierung wurden die Überstände für die Bestimmung der Osteokalzinkonzentration zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen. Die Osteokalzinkonzentrationen im Kulturmedium am Ende des Differenzierungsversuchs an Tag 35 (3 Tage nach Mediumwechsel) sind in Abbildung 21 dargestellt. Über alle Materialien hinweg zeigten die Kulturmedien eine große Streuung der Osteokalzinkonzentration im Bereich zwischen 4 und 35 ng/mL. Die Verteilungen unterschieden sich weder zwischen den osteoporotischen und knochengesunden Gruppen noch zwischen den verschiedenen Materialien signifikant voneinander.

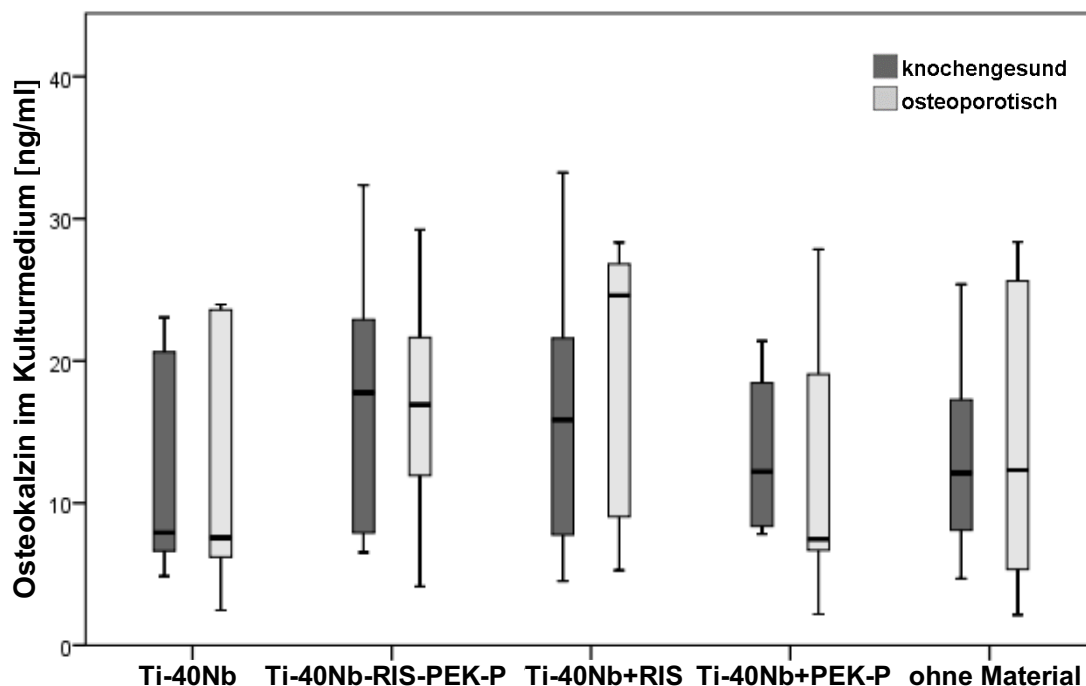


Abbildung 21: Osteokalzinkonzentration im Kulturmedium für knochengesunde und osteoporotische Spender.

Versuchstag 35. Risedronatmenge:  $2,5 \times 10^{-7}$  mol.

### 3.5 ALP-Aktivität

Im kürzeren Differenzierungsversuch der risedronatärmeren Materialien über 14 Tage wurde als früher Marker der osteogenen Differenzierung anstatt des Osteokalzins die Aktivität der ALP am Ende der ersten bzw. zweiten Woche im Zellysate bestimmt und auf die Menge an Gesamtprotein normiert (Abbildung 22). Im Versuchsverlauf stiegen sowohl die ALP-Aktivitäten als auch deren Streuung zwischen den einzelnen Kulturen an. Eine signifikante Zunahme der ALP-Aktivität im Gesamtprotein war für die unbeschichtete Titankontrolle und die Zellen im materialfreien Well nachzuweisen. Nach sieben Tagen ab Zugabe des osteogenen Differenzierungsmediums zeigten die verschiedenen Spender noch eine ähnliche Aktivität pro Menge an Gesamtprotein. Am

Ende der zweiten Woche hatte die Varianz der ALP-Aktivität zwischen verschiedenen Spendern besonders innerhalb der knochengesunden Gruppe stark zugenommen, was den statistischen Nachweis erschwerte.

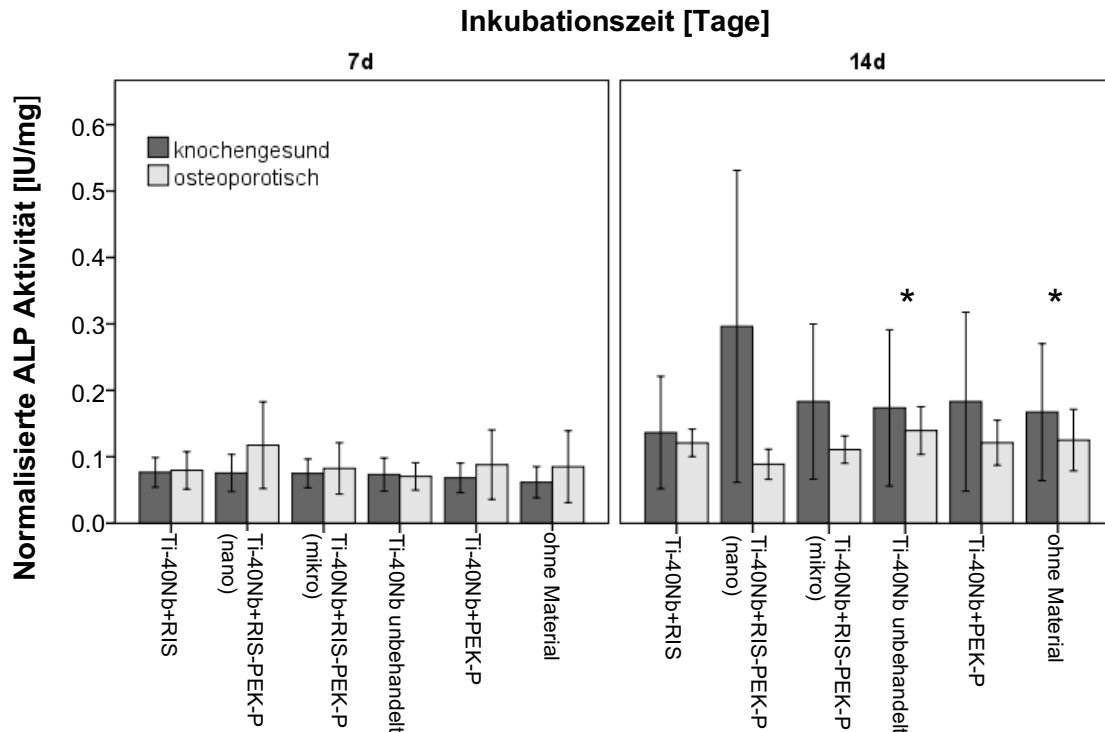


Abbildung 22: Auf Gesamtprotein normalisierte ALP-Aktivität an Tag 7 bzw. 14 der osteogenen Differenzierung.

Osteoporotische und knochengesunde ZKs. Risedronatmenge:  $2,5 \times 10^{-11}$  mol,  $n=5$ . Sterne (\*) markieren einen signifikanten Anstieg der normierten ALP-Aktivität zwischen Tag 7 und Tag 14 im Gesamtkollektiv aller ZKs.

Während sich der Gesamtproteingehalt in den Wells im Versuchszeitraum wenig veränderte, variierte vor allem die ALP-Aktivität im Zellysate der verschiedenen Kulturen. Es waren jeweils einzelne Spenderkulturen, welche über die Materialien und Messzeitpunkte hinweg in ihrer eigenen ALP-Aktivität von denen der übrigen ZKs abwichen (Abbildung 23). Besonders die knochengesunde ZK 108 zeigte eine Aktivität der ALP, welche die der anderen Spender bei weitem übertraf. In der osteoporotischen Gruppe war dies für die ZK 74 der Fall, welche in der Messwertverteilung der Gruppe Ausreißer nach oben zeigte. Die Abweichungen von der Verteilung der übrigen Aktivitäten blieben auch nach Normalisierung auf das Gesamtprotein für beide ZKs zu beiden Messzeitpunkten bestehen. Bezogen auf die gesamte Proteinmenge zeigte die ZK 74 vor allem nach einer Woche eine ALP-Aktivität, die jene sämtlicher (auch der knochengesunden) Spender in allen Materialien überstieg und eine extreme Abweichung von den Werten der anderen osteoporotischen ZKs darstellt. Nach zwei Wochen hat die ALP-Aktivität im Gesamtprotein der knochengesunden ZK 108 die der

anderen deutlich übertroffen und nimmt hier durchgängig Extremwerte an. Die ZK 15 (knochengesund) und ZK 69 (osteoporotisch) fallen zu beiden Zeitpunkten in der normalisierten ALP-Aktivität mit Ausreißern und einzelnen Extremwerten nach unten auf. Als Ausreißer werden hier Werte definiert, welche sich von den mittleren 50% der Werte der Spender um mindestens das 1,5- bis 3-fache unterschieden. Als Extremwerte werden jene bezeichnet, die von den mittleren 50% der Verteilung um mindestens das 3-fache abweichen.

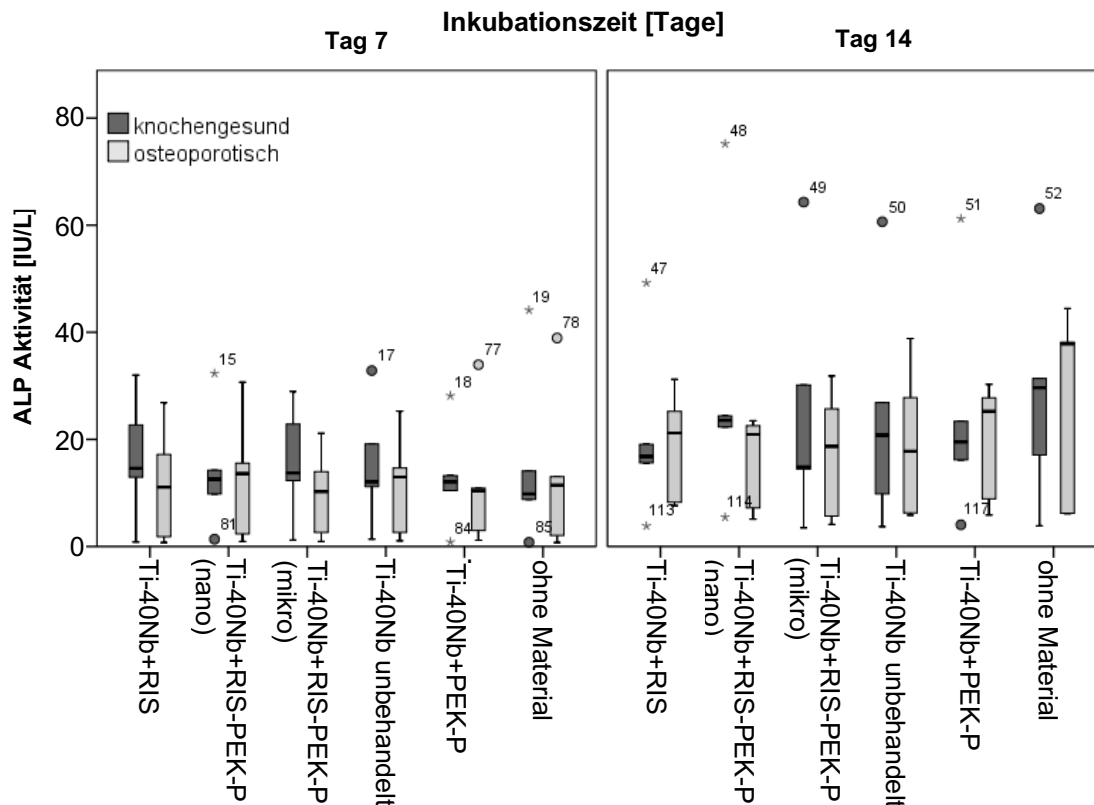


Abbildung 23: Verteilungen der ALP-Aktivität, für osteoporotische und knochengesunde Spender an Tag 7 und 14.

**Kreise:** Ausreißer: 1,5- bis 3-mal Interquartilweite, **Sternchen:** Extremwerte >3-mal Interquartilweite. **Werte 15-19 und 47-52:** ZK 108, **Werte 77-78:** ZK 74, **Werte 81-85 und 113-117:** ZK 51.

### 3.6 Zellvitalität

Die Vitalität der Kulturen wurde anhand ihres Stoffwechsels in Anwesenheit der Materialien mit einer Risedronatmenge von  $2,5 \times 10^{-7}$  mol nach 35 Tagen und für Materialien mit reduzierter Risedronatmenge von  $2,5 \times 10^{-11}$  mol nach 14 Tagen mittels MTT Test bestimmt. Zur Verringerung verzerrender Einflüsse während langer Differenzierungszeiten wurde in den Versuchen mit geringerer Risedronatmenge ein kürzerer Versuchszeitraum gewählt. Entsprechend wurde anstatt von Osteokalzin die früh nachweisbare ALP als Marker osteogener Differenzierung verwendet, sowie statt

des spät erkennbaren Kalziumverbrauches die Alizarinrot S Färbung zur Messung der Mineralisierung eingesetzt. Ein Vergleich der Stoffwechselaktivität der Kulturen zu beiden Zeitpunkten gibt weiterhin Hinweise, wie die Kulturen auf lange Differenzierungszeiten reagieren.

### 3.6.1 Einfluss risedronatreicher Materialien auf die Zellvitalität nach 35 Tagen in osteogenem Differenzierungsmedium

Sowohl die knochengesunden als auch osteoporotischen Kulturen variieren nach 35 Tagen individuell stark in ihrer Stoffwechselaktivität mit vitalen und kaum vitalen Kulturen. Die Verteilungen unterschieden sich dabei nicht signifikant zwischen osteoporotischen und knochengesunden Kulturen (Abbildung 24). Der Median der Testergebnisse lag in Anwesenheit von Risedronat im Material unter dem der risedronatfreien Gruppen. Die Materialien Ti-40Nb+RIS-PEK-P und Ti-40Nb+PEK-P unterschieden sich dabei signifikant voneinander ( $p < 0,05$ ). Zu beachten ist, dass die gemessenen Extinktionswerte nicht direkt z. B. mit Zellzahl gleichgesetzt werden können, da verschiedene ZKs etwas unterschiedlich effizient im Umsatz des MTT-Salzes arbeiten. Da eine Standardgerade der MTT Extinktion zur Zellzahl bei nicht genau quantifizierbarer Proliferation und Aktivitätsänderung für ZKs nach 35 Tagen nicht erstellbar war, wurde zur Bestätigung der Ergebnisse, die Vitalitätsänderung der einzelnen ZK in Relation zur Kontrolle bestimmt (Abbildung 25).

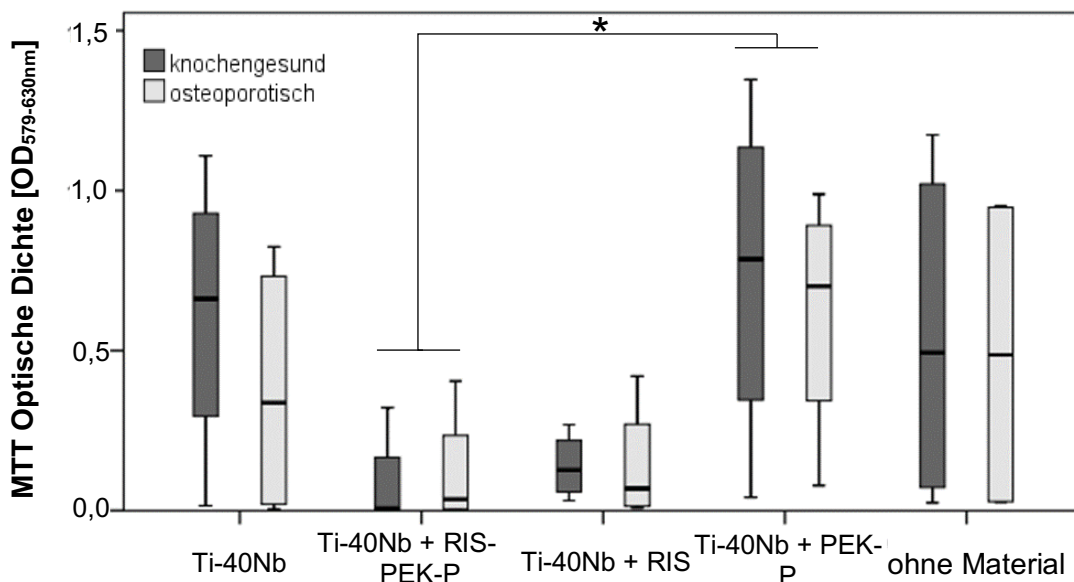


Abbildung 24: Verteilungen der Extinktionen im MTT Test für knochengesunde und osteoporotische Spender.

Versuchstag 35, Risedronatmenge:  $2,5 \times 10^{-7}$  mol, osteoporotisch:  $n=5$ , knochengesund  $n=4$ .

Zur Bestimmung des Einflusses der Materialien auf die Zellvitalität innerhalb der unterschiedlich stoffwechselaktiven ZKs wurde für jede Kultur die Stoffwechselaktivität in Bezug zur materialfreien Kontrolle gesetzt (Abbildung 25). Wurde RIS aus PEK-P freigesetzt, war die Zellvitalität gegenüber der nicht beladenen PEK-P Beschichtung signifikant vermindert ( $p=0,002$ ). Die PEK-P Beschichtung selbst fiel mit der höchsten Vitalitätssteigerung auf (Mittel der MTT Ergebnisse 4-fach über materialfreier Kontrolle).

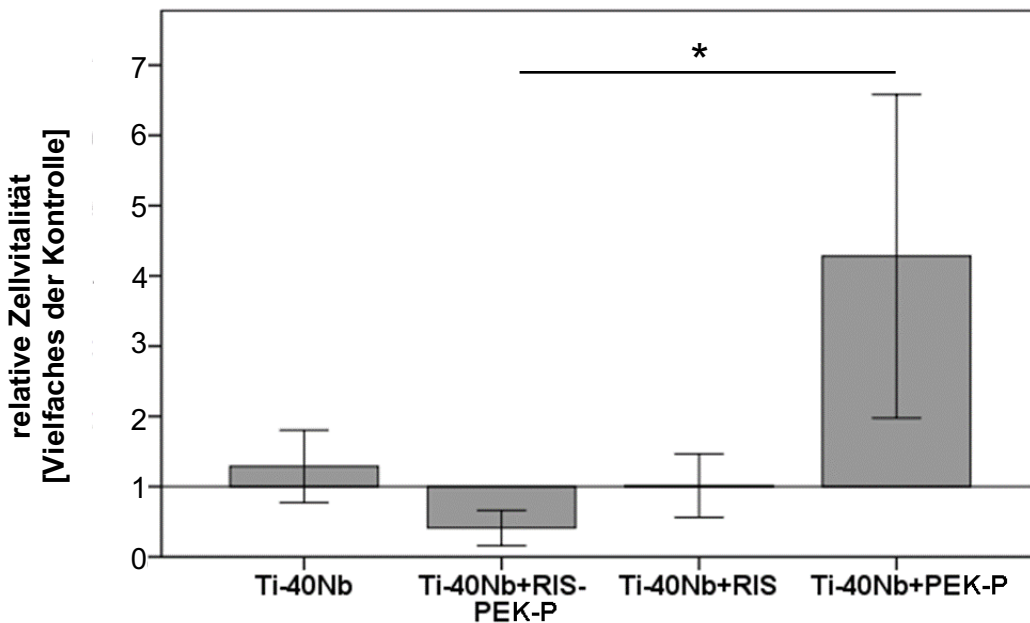


Abbildung 25: Zellvitalität einzelner ZKs als Vielfaches der materialfreien Kontrolle. Versuchstag 35, Risedronatmenge  $2,5 \cdot 10^{-7}$  mol,  $n=9$ . Ursprungsgrade entspricht Zellvitalität der materialfreien Kontrolle.

### 3.6.2 Einfluss risedronatreduzierter Materialien auf die Zellvitalität

Nach vierzehn Tagen im osteogenen Differenzierungsmedium zeigten sich in jeder Kultur vitale Zellen, wobei sich osteoporotische und knochengesunde Kulturen ebenfalls nicht signifikant voneinander unterschieden (Abbildung 26). Im Vergleich der nativen MTT Ergebnisse an Tag 14 und 35 lagen die Ergebnisse der ZKs zum frühen Zeitpunkt noch wesentlich näher beieinander. Auch unterschieden sich die osteoporotischen Kulturen, obwohl auch hier nicht signifikant, noch deutlicher von der knochengesunden Vergleichsgruppe. Nach 35 Tagen hatte nicht nur die Streuung zwischen den ZKs erheblich zugenommen, sondern auch die Höhe der Messwerte insgesamt. Im Vergleich zur materialfreien Kontrolle (Abbildung 27) übte keines der Materialien einen signifikanten Einfluss auf die Zellvitalität aus. Sowohl in der knochengesunden als auch in der osteoporotischen Gruppe entsprachen die ZKs am Material in etwa der Kontrolle. Trotzdem zeigte auch nach 14 Tagen die ZKs am Material mit wirkstofffreier PEK-P

Beschichtung im Vergleich zur Kontrolle nur hier in beiden Gruppen im Mittel eine Steigerung der Vitalitätsergebnisse.

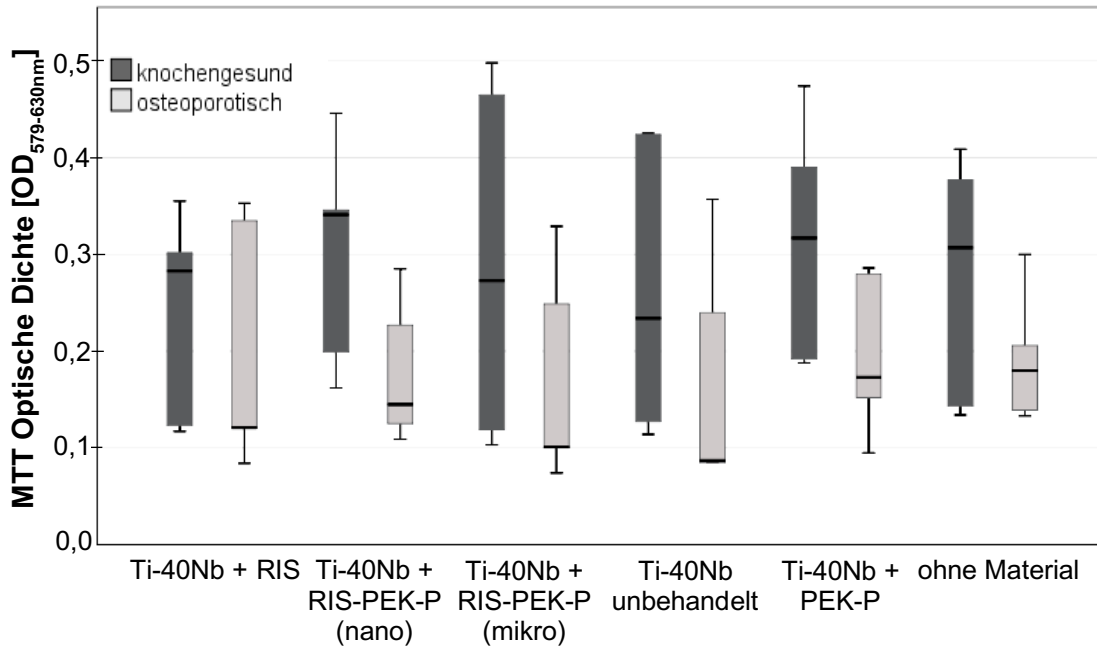


Abbildung 26: MTT Extinctionsdifferenzen für knochengesunde und osteoporotische Spender. Versuchstag 14, Risedronatmenge:  $2,5 \times 10^{-11}$  mol,  $n=5$ .

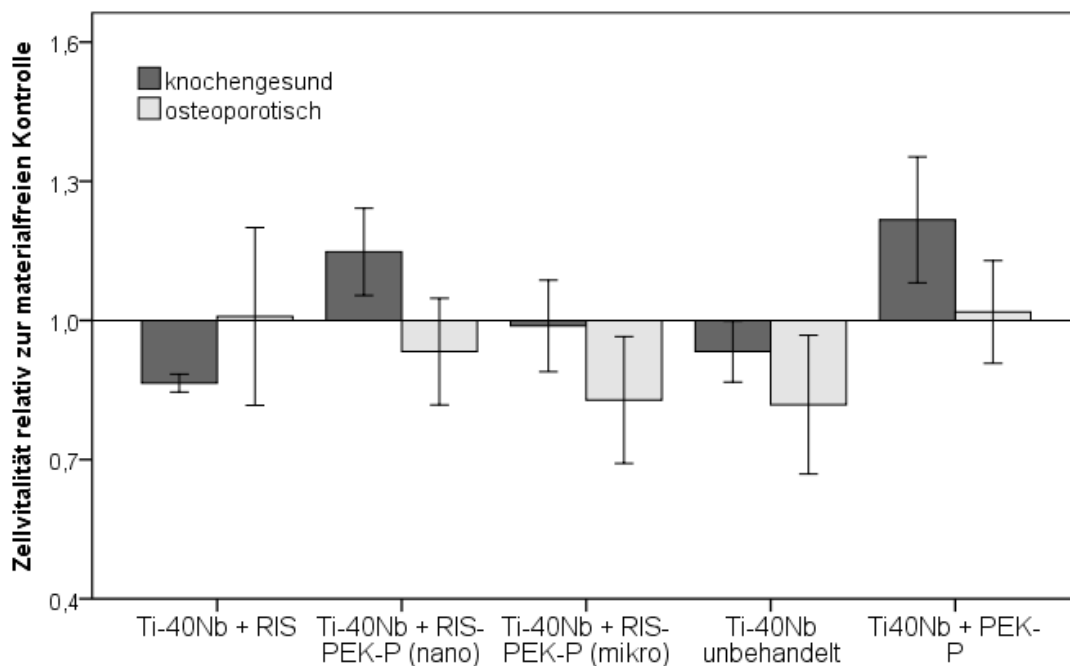


Abbildung 27: Zellvitalität jeder ZK relativ zur materialfreien Kontrolle für osteoporotische und knochengesunde Spender. Versuchstag 14. Risedronatmenge:  $2,5 \times 10^{-11}$  mol,  $n=5$ . Ursprungsgrade (1,0 auf der y-Achse) entspricht Zellvitalität der materialfreien Kontrolle.

## 4 Diskussion

### 4.1 Diskussion des Zellkulturmodells und Wirkstoffes

Ziel dieser Arbeit war es, die Eignung einer Beschichtung aus mit Risedronat beladenen PEK-P zur Funktionalisierung von Ti-40Nb Oberflächen zu untersuchen, da jene Beschichtung zur lokalen Applikation von knochenaktiven Wirkstoffen diskutiert wird. Um diese Fragestellung zu beantworten, wurden aus Bohrmehl gewonnene MSC auf entsprechenden Materialien ausgesät, um anschließend die Ausprägung der osteogenen Differenzierung und Knochenbildung sowie die Vitalität der Zellen am Ende der Versuchszeit zu bestimmen. Zunächst gilt es zu diskutieren, inwiefern die Kulturen aus Bohrmehl-MSK in Kombination mit dem gewählten Wirkstoff Rückschlüsse auf RIS-PEK-P als Biomaterial im menschlichen Knochen zulassen. Zur Klärung dessen muss noch näher auf die Rolle der MSC im Rahmen des Knochenaufbaus und im Remodelingzyklus eingegangen und darüber hinaus gezeigt werden, ob die verwendeten Kulturen die beteiligten Vorgänge abbilden. Ebenso ist der Einsatz von RIS in Verbindung mit MSC nur dann sinnvoll, wenn der Wirkstoff auch auf diese Zellen wirkt. Die sinnvolle Verwendung von RIS auf Implantaten setzt außerdem einen Nutzen in Bezug auf die Implantatfunktion und Frakturheilung voraus.

#### 4.1.1 MSC: ein Name für unterschiedliche Identitäten

Die Auffassungen darüber, was MSC eigentlich sind, aber auch solche über ihren Nutzen und ihre Aufgaben gehen auseinander. Der Begriff ‚mesenchymale Stammzelle‘ für koloniebildende plastikadhärente Zellen, wie sie durch Friedenstein und Owens beschrieben wurden und ortsfremd vollständige Ossikel ausbilden können, meint ursprünglich eine mögliche Skelettstammzelle für das Knochengewebe mesenchymalen Ursprungs (Friedenstein et al. 1974; Owen und Friedenstein 1988). Der Begriff ‚mesenchymale Stammzelle‘ leistete der Hoffnung Vorschub, eine adulte Ursprungszelle für alle Gewebe mesenchymalen Ursprungs gefunden zu haben. Dieses Konzept unterscheidet sich von der konservativen Auffassung nicht nur dahingehend, dass diese Zellen fast überall zu finden seien (wie in Herz, Leber, Synovia, Pankreas und Nabelschnurblut), sondern dass ihre Fähigkeit zur Differenzierung nicht nur auf skeletale Gewebe beschränkt sei. Die Potenz dieser Zellen sollte sich ebenfalls auf andere Abkömmlinge des mesodermalen Keimblatts wie Herz, Endothel und Muskelzellen und möglicherweise darüber hinaus erstrecken (Kolf et al. 2007; Fernández Vallone et al. 2013). Der Beweis einer solchen Differenzierung über die Grenzen des Ursprungsgewebes aus dem die MSC isoliert wurden hinaus gelang anders als durch Manipulationen des Phänotyps in der Zellkultur oder aber durch gezielte Aktivierung von

Transkriptionsfaktoren jedoch nicht, wobei letzteres eher als ‚Umprogrammieren der Zelle‘ mit Änderung des Differenzierungspotentials, anstatt Ausdruck eines der Zelle ursprünglich eigenen Differenzierungspotentials gesehen werden muss (Bianco et al. 2013). Die hohen Erwartungen in die Idee einer gemeinsamen Ursprungszelle für unterschiedlichste Gewebe im adulten Organismus mit entsprechendem Potential zur Gewebereparatur ergaben sich aus (und mündeten in) einem Nebeneinander von ‚MSC Kulturen‘ aus unterschiedlichen Ursprungsgeweben und verschiedenen Isolations- oder ‚Anreicherungsverfahren‘. Beispielsweise sollten potentiell gleichwertige Kulturen aus Fettgewebe (Zuk et al. 2002) oder Synovia und anderen Geweben gewonnen werden können (Bari et al. 2001). Dies vermittelt in der Tat den Eindruck erstaunlicher Plastizität. Es werden dabei durchweg Zellen mit Aussehen und in vitro Differenzierungsverhalten wie Knochenmarks-MSC beschrieben. Die Einführung der Minimal Kriterien (siehe auch Kapitel 1.2, Seite 8) für MSC (Dominici et al. 2006) erlaubte entsprechend die Einordnung all dieser Kulturen als MSC. Es wird hier ein Phänotyp identifiziert, der gemeinsame Oberflächenmarker verschiedener Bindegewebszellen mit dem Anschein von Differenzierung in vitro unter speziellen (nur hier existierenden) Bedingungen vereint. Auch die Fähigkeit Kolonien zu bilden ist kein definierendes Merkmal mehr, sodass alle Arten von heterogenen Kulturen auch ohne CFU hinzugezogen werden können. Selektionsbedingung ist dabei die Adhärenz an Plastikoberflächen. Auf diese Weise entstehen beispielsweise komplette primäre Kulturen des mesenchymalen Knochenstromas. Diese enthalten neben stark proliferierenden CFU-F unterschiedlich differenzierte Zellen und in frühen Passagen auch noch solche mit stark eingeschränktem Teilungspotential. Eine Mittelposition nehmen Kulturen ein, welche aus der Zusammenführung multipler schnell proliferierender CFU-F Kolonien entstehen (genannt: *multi-colony derived strains*). Nach Aussaat einer vereinzelt Zellsuspension setzen sich diese gegenüber langsam teilenden Zellen durch und werden bei der ersten Passage zusammengeführt (Kuznetsov et al. 1997). Eine solche ungefähre Festschreibung einer ganzen Gruppe von unterschiedlichen Zellen und Zellkulturarten als ‚MSC‘ stellte das Ergebnis eines fehlenden Konsensus über die tatsächliche Lokalisation, Identität und Funktion der MSC dar.

Bianco et al. (2010) werben aktiv für eine Rückkehr zur strengen Definition einer skeletalen Stammzelle (SSC), welche nicht mit anderen mesenchymalen Zellen identisch ist. Um ‚echte‘ Stammzeleigenschaften, wie der Zelle innewohnendes Differenzierungspotential und Selbsterneuerung nachzuweisen, seien ähnlich der Erstbeschreibung Transplantationsassays klonaler Linien nötig. Auf diese Weise könnten tatsächliche Stammzellen auch in anderen Geweben identifiziert werden.

Um eine multipotente mesenchymale Stammzelle für den Knochen zu sein, müsse eine aus einer einzelnen Zelle gewonnene klonale Linie in vivo nach Transplantation Knochengewebe (von Bianco et al. heterotopes Ossikel genannt) inklusive einer mit vom Spender stammenden Stromazellen gefüllten Höhle, welche die Hämatopoese des Empfängertieres beherbergen kann, bilden. Hierfür werden einzelne Zelllinien verwendet, indem entweder einzelne Zellen prospektiv anhand ihres Phänotyps aus dem Stroma, oder nach Kultivierung in geringer Dichte anhand ihrer Fähigkeit zur Koloniebildung ausgewählt werden. Durch Aussaat in geringer Dichte bilden Zellen, welche dichteunabhängig wachsen können Kolonien, die nur aus Klonen ihrer Ursprungszelle bestehen. Diese Zelllinien sind daher monoklonal und den Transplantationsassays zugänglich (Bianco et al. 2013). Hierdurch erfolgte mehrfach der Beweis der Multipotenz für einzelne CFU-F aus Knochen (Kuznetsov et al. 1997).

Es gelangen schließlich Sacchetti et al. (2007) eine solche vermutete Stammzelle anhand serieller Transplantationsassays, stringent sowohl als Subpopulation in der Knochenmarks-MSK Kultur als auch ihr anatomisches Gegenstück zu beschreiben.

Die CD146 exprimierende CFU-F wurde als retikuläre Zelle der sinusoidalen Adventitia im Knochenmark identifiziert. Aus ihr gingen nach Implantation in vivo alle ausdifferenzierten Knochengewebe inklusive dem Bindegewebsanteil des hämatopoetischen Stromas hervor. Darüber hinaus besitzt sie die Fähigkeit sich dort im neuen Organ in gleicher Position und alter Form, in der sie ursprünglich explantiert wurde, erneut selbst auszubilden. Von hier konnte sie erneut anhand ihres Phänotyps extrahiert, kultiviert und mit demselben Ergebnis transplantiert werden. Damit erfüllt sie alle Anforderungen einer adulten Stammzelle (Multipotenz und Selbsterneuerung) vergleichbar mit der unbestrittenen hämatopoetischen Stammzelle (Sacchetti et al. 2007). Durch diese Eigenschaften grenzt sich der subendotheliale Retikulozyt oder auch Knochenmarksperizyt als bona fide SSC von den übrigen MSC, welche eine Gruppe mesenchymaler Stromazellen sind, ab. Weiterhin zeichnete sich ab, dass anstatt ubiquitärer gewebsunabhängiger MSC, wie verbreitet angenommen wurde und welche später mit allen Perizyten gleichgesetzt wurden, gewebespezifische CD146<sup>+</sup> mesenchymale Vorläuferzellen mit jeweils verschiedenem Differenzierungspotential für ihr distinktes Ursprungsgewebe auch im Knochen, im Muskel und in Nabelschnurblut existieren. Ihnen ist die Fähigkeit zur Assoziation mit und Organisation von Blutgefäßen gemein, was diese Perizyten zu lokalen aber nicht generellen Progenitorzellen macht (Sacchetti et al. 2016). Der perizytär lokalisierte CD146<sup>+</sup> Phänotyp scheint demnach in vielen Geweben eine Zellpopulation zu beschreiben, welche für das jeweilige Gewebe ein Regenerationspotential besitzt und generell trophische und immunmodulatorische

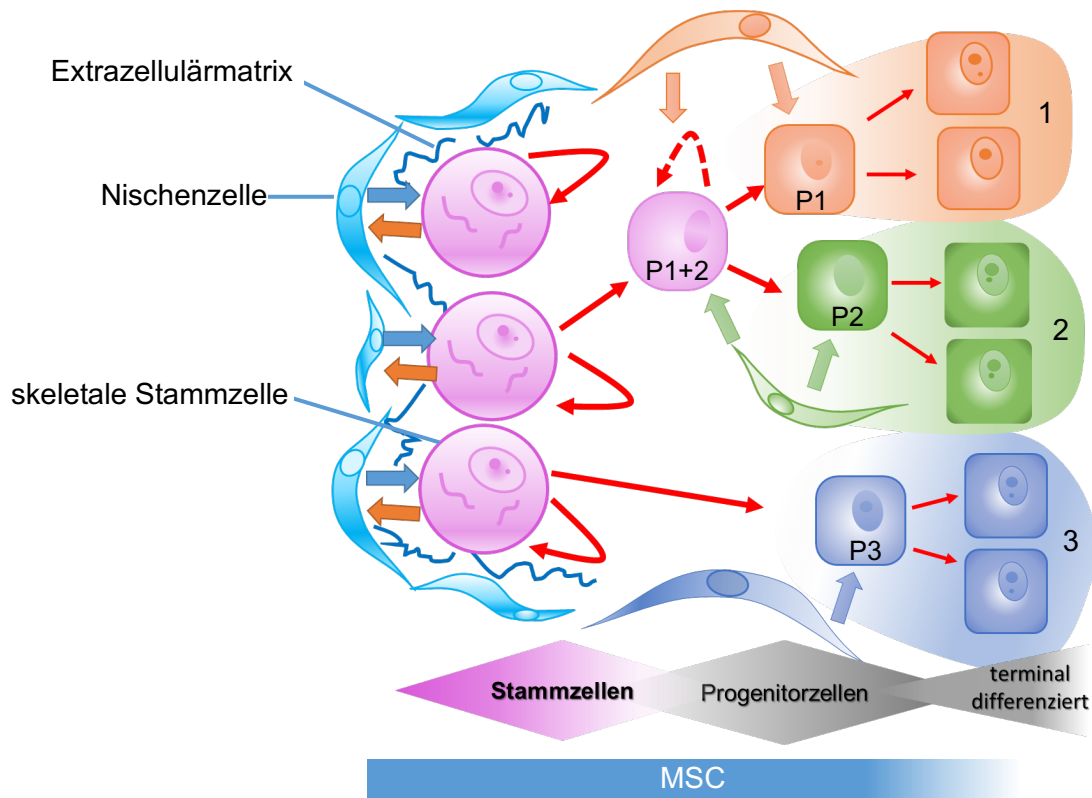
Eigenschaften zeigt (Caplan 2017). Auch diese Neuinterpretation von Perizyten als gewebespezifische Stammzellen im ganzen Körper bleibt weiter umstritten (Guimarães-Camboa et al. 2017).

Doch ist nun nur die auf die oben beschriebene Weise identifizierbare SSC zur Untersuchung der Knochenbildung geeignet?

Die entscheidende Funktion der SSC als Teilpopulation weiter gefasster MSC scheint entsprechend ihres Nachweises die Etablierung und der Erhalt des Kompartimentes für die Hämatopoese zu sein. Hierfür besitzt sie notwendigerweise das Potential alle osteogenen Zellen des Knochens und des Knochenstromas (in dem sie schließlich als Perizyt residiert) hervorzubringen. Dies wäre physiologischer Weise der Fall, wenn diese Zellen möglicherweise während der embryonalen Knochenentstehung aus dem primitiven Periost/Perichondrium der äußeren Knochenlamelle mit einsprossenden Blutgefäßen assoziiert in den Knorpelkern eindringen, um das Ossifikationszentrum und die sich formende Markhöhle zu bilden (Bianco et al. 2013; Maes et al. 2010; Ono et al. 2014). Postnatal befindet sie sich anschließend in der Form einer gefäßassoziierten retikulären Zelle als konstituierender Teil der hämatopoetischen Stammzellnische. An den Prozessen des Knochenremodelings oder der Frakturheilung wäre sie damit als ‚stromaufwärts‘ sitzende Zelle allerdings nur mittelbar beteiligt.

Anzunehmen ist, dass aus frühen multipotenten Vorgängern wie der SSC weitere in ihrem Differenzierungspotential zunehmend eingeschränkte bis unipotente Vorgänger als selbsterhaltende Stammpopulationen hervorgehen, die im Bedarfsfall neue Osteoblasten hervorbringen, bzw. dass solche als andere Subspezies in MSC Kulturen vorhanden sind (Abbildung 28). Dies ist notwendig, da sich ausgereifte Osteoblasten selbst nicht mehr nennenswert teilen (Owen und MacPherson 1963). Nur auf die osteogene Linie festgelegte (in vivo nicht selbstständig adipogene oder chondrogene) Vorgänger sind in multi-colony derived MSC Kulturen mit hoher Sicherheit vorhanden. Kuznetsov et al. verwendeten solche in Transplantationsassays zur Charakterisierung verschiedener CFU-F gar als Positivkontrolle, da sie sicher zu ektopter Knochenbildung in vivo führten (Kuznetsov et al. 1997). Darüberhinausgehend bleibt der Ursprung der Osteoblasten im Knochenremodeling und zur Frakturheilung weiter Gegenstand intensiver Forschung. In Versuchen zur Populationsdynamik von Zellen der osteogenen Linie in lebenden Tieren war eine markierte Population das Osteokalzingen-exprimierender Osteoblasten etwa nach 60 Tagen vollständig durch neue Zellen ersetzt, was den postmitotischen Charakter und die begrenzte Lebensdauer reifer Osteoblasten bestätigt. Markierte OSX-exprimierende Präosteoblasten proliferierten zwar, wurden

aber ebenfalls im Verlauf durch neue Zellen anderen Ursprungs ersetzt (Park et al. 2012). Dementsprechend stellt auch der Präosteoblast keinen dauerhaften selbsterneuernden Vorrat von Vorgängerzellen dar, sondern erhöht als zwischengeschaltete amplifizierende Zelle (sog. Transitzelle) die Ausbeute differenzierter Zellen pro Stammzellteilung.



**Abbildung 28: Stammzellendifferenzierung und Populationsasymmetrie**  
 Nachfolgezellen der Stammzellen sind entweder selbst Stammzellen oder Progenitorzellen (P), welche in unterschiedliche Richtungen (1,2 oder 3) differenzieren können, je nachdem, welche extrinsischen Faktoren sie ausgesetzt sind. Der Erhalt des Stammzellphänotyps erfordert den gegenseitigen Kontakt und Austausch (dicke Pfeile) mit der Stammzellnische (benachbarte Zellen, Extrazellulärmatrix, Tochterzellen). Die nachfolgenden Zellen sind in ihrem Teilungs- und Differenzierungspotential eingeschränkt. Zwischenstufen im Spektrum von multipotenten unbegrenzt selbsterhaltenden Stammzellen und festgelegten Vorgängerzellen sind möglich. Abbildung modifiziert nach Watt und Hogan (2000).

Die Rekrutierung neuer Osteoblasten speist sich letzten Endes womöglich aus unterschiedlichen Quellen von Vorgängerzellen und von anderen Orten als dem sinusoidalen Knochenmark. Auch einzelne monoklonale MSC Linien aus trabekulärem Knochen sowie periostalen Ursprungs formen Knochen in vivo, besitzen aber nicht die Fähigkeit hämatopoetisches Stroma auszubilden und entsprechen damit weiter eingeschränkter Progenitoren (Sacchetti et al. 2007). In Mäusen ist die Aktivierung des *myxovirus resistance-1* (*Mx-1*) Promotors beispielsweise ein Marker für eine Subpopulation von MSC, die ex vivo alle gängigen MSC Kriterien (inklusive Multipotenz) erfüllt, deren Nachfolger sich verfolgen lassen und welche in vivo ausschließlich

osteogen festgelegt ist. Ihren Beschreibern zufolge stellt diese Gruppe eine direkte Quelle von Vorgängerzellen dar, die an den Ort eines Traumas migrieren und dort neue differenzierte Osteoblasten und Osteozyten bilden, was durch intravitale Bildgebung gezeigt werden konnte. Diese Zellen lassen sich in Transplantationsassays aus ektopem Knochen zurückgewinnen und sequenziell transplantieren. Somit existieren wohl unter den MSC auch monopotent festgelegte selbsterneuernde osteogene Vorläufer (Park et al. 2012). Verschiedene Vertreter der osteogenen Reihe wurden im Verlauf genauer identifiziert. Fraglich ist auch, in welchem Maße im peripheren Blut zirkulierende osteogene Progenitorzellen des Menschen (Eghbali-Fatourehchi et al. 2005) zur Knochenbildung beitragen, ob sie eine eigene Subspezies sind oder Knochenmarks MSC, die über Blutgefäße in das Remodelingkompartiment gelangen und dabei auch im peripheren Blut erscheinen (Otsuru et al. 2008). Kristensen et al. (2014) beschrieben infolge histologischer und histomorphometrischer Studien der BMU in allen Phasen des Knochenremodelings ein Modell mit drei wesentlichen Rekrutierungsrouten für Osteoblastenvorläuferzellen. Demnach sollen zum einen rückverlagerte *bone lining cells* ruhender Knochenoberflächen nach dem Abheben von der Knochenoberfläche für die Resorption durch Osteoklasten eine Quelle für die osteogenen Zellen sein, die sich in der Umkehrphase versammeln und dort ohne wesentliche Proliferation ausdifferenzieren. Route eins verläuft damit entlang der Knochenoberfläche. Ein zweiter Herkunftsweg für die Zellen auf Osteoidflächen in der Umkehr- und Knochenbildungsphase sind die Zellen der Überdachung des BRC zum Markraum hin. Die Beschreiber proklamieren diese als Teil eines den Markraum umgebenden Umschlags, der sich während der Resorptionsphase abhängig von Osteoklastenaktivität und Kapillarkontakten von den *bone lining cells* löst. Dieser abdeckende mesenchymale Zelllayer enthält stärker proliferierende, wenig differenzierte osteogene Vorläuferzellen, die ebenfalls zur Osteoblastenpopulation beitragen sollen. Wegen vermutlich nicht ausreichender lokaler Kapazität stellen als dritte Route die mit dem BRC assoziierten Kapillaren die Verbindung zwischen gefäßassoziierten Vorläuferzellen des Knochenmarks und der Knochenoberfläche über zunehmende Kapillarkontakte zwischen dem BRC und dem Markraumdach während des Remodelings her (Kristensen et al. 2014).

In der Betrachtung anderer Situationen als der Knochenhomöostase, wie etwa der Frakturheilung im Knochenkallus welche beispielsweise auch enchondrale Knochenbildung beinhaltet, zeichnet sich neben anderen Quellen für Progenitorzellen (z. B. Periost) auch eine höhere Plastizität von bereits differenzierten Zellen als angenommen (etwa Transdifferenzierung von Chondrozyten) oder Wechselwirkungen

mit anderen Geweben (z. B. Muskel) ab (Bragdon und Bahney 2018; Marie und Cohen-Solal 2018). Abschließend ist noch zu erwähnen, dass die heterogenen Zellpopulationen, welche als MSC beschrieben werden und insbesondere solche, die dem perizytischen Phänotyp entsprechen, an den Prozessen der Frakturheilung in erster Linie als sekretorische Zentren mit trophischen und modulatorischen Eigenschaften teilnehmen und auf diese Weise die Geweberegeneration vorantreiben. Aufgrund solcher Effekte nach MSC Administration wurde vorgeschlagen, MSC als ‚*medicinal signaling cells*‘ zu bezeichnen (Bragdon und Bahney 2018; Caplan 2017). Eine weitere (nicht notwendigerweise Stammzell-) Funktion der MSC wäre die Angiogenese während des Heilungsprozesses mitzugestalten, da sie an der Röhrenbildung sich entwickelnder Blutgefäße und der vaskulären Organisation teilnehmen (Sacchetti et al. 2016). Diese funktionellen Eigenschaften der MSC sollten als Beitrag zur Geweberegeneration unabhängig ihrer Progenitorfunktion in Bezug auf Knochenheilung Berücksichtigung finden.

#### 4.1.2 Einordnung der Bohrmehl-MSK

Die vorausgegangenen Betrachtungen zur Herkunft und Spezifizierung unterschiedlicher MSC Kulturen erlaubt eine genauere Einordnung von Art und Inhalt der verwendeten Bohrmehl-MSK Kultur. Zunächst wurden komplette primäre Kulturen der mesenchymalen Zellvertreter aus kortikalem Bohrmehl, welches darüber hinaus Anteile trabekulären Knochens und des Markraumstromas enthielt, gewonnen. Diese wuchsen per continuitatem aus den Knochenfragmenten. Durch Passagierung und Expansion in größeren Kulturgefäßen wurden zudem jene Vertreter selektiert, welche teilungsfähig waren. Damit unterscheidet sich diese Kultur von jenen klassischen skeletalen MSC Kulturen aus Knochenmarksaspiraten ihrem Ursprung entsprechend, in der vermehrten Selektion von Zellen, die Knochenoberflächen und deren direkter Umgebung entstammen. Es wurden keine klonalen Zelllinien einzelner CFU-F oder *multi-colony derived* MSC Kulturen gewonnen, welche die Aussaat vereinzelter Zellen (bis 1,6 Zellen pro cm<sup>2</sup>) zur sicheren Etablierung von distinkten Kolonien erfordert (Bianco et al. 2010). Zwar zeigten die Bohrmehl-MSK hohes Replizierungspotential, jedoch wurden Zelldichten eingehalten, welche zusätzlich zu koloniebildenden Zellen auch dichteabhängig wachsenden Zellspezies in der Kultur erhalten können. Zelllinien rein klonalen Ursprungs werden zwar benötigt, um einzelne Subspezies der MSC sicher und stringent untersuchen zu können, etwa für die Identifizierung einzelner Stammzellen und Marker (Bianco et al. 2013), doch sind diese dadurch nicht das bessere Modell für Knochenbildung. Zum einen unterscheiden sich selbst einzelne CFU-F Kolonien in derselben Ursprungskultur stark in ihrem osteogenen Differenzierungspotential

(Kuznetsov et al. 1997), was wiederum die Identifikation von prospektiven Identifikationsmarkern zur Auswahl der richtigen Klone erforderlich macht. Dies hat bisher zwar geholfen, Marker für verschiedene Vorgängerzellen mit osteogenen Abkömmlingen voneinander abzugrenzen, wie etwa „Mx-1, VCam-1, Nestin, Prx1, CAR, PDGFRa, LEPR, Gremlin“, und „CD146“ (Marie und Cohen-Solal 2018). Doch angesichts der Unsicherheit aus welchen Quellen in verschiedenen Situationen Osteoblasten letztendlich rekrutiert werden, ist eine willkürliche Auswahl eines speziellen Typs wenig sinnvoll. In den heterogenen Kulturen der Bohrmehl-MSK sind hingegen am ehesten sowohl verschiedene Arten osteogener Vorläuferzellen, als auch MSK mit eher regulativer Funktion vorhanden. Letztendlich sind die Zellen der BMU (und ihre direkten mesenchymalen Vorläufer), deren veränderte Funktion und Lebensdauer das Krankheitsbild der Osteoporose hervorruft, auf Knochenoberflächen und eher nicht im medullären Stroma zu finden. Ein Einfluss auf Zellvitalität und in vitro Differenzierungsverhalten in dieser Zellkultur sollte entsprechende Wirkungen auf ebene Zellen im Knochen vermuten lassen.

Trotz des Vorhandenseins heterogener Zellspezies in den Bohrmehl-MSK müssen verschiedene Kulturen unterschiedlicher Spender vergleichbar sein, und es muss sichergestellt werden, dass tatsächlich MSK und nicht etwa adhärenz Endothelzellen oder Bindegewebsfibrozyten in der Kultur vorherrschen. Hierfür war die prospektive Auswahl der Kulturen anhand eines einheitlichen Profils notwendig. Dies ist über die Auswahl eines Oberflächenantigenprofils geschehen. Hierdurch wird die phänotypische Vielfalt zugunsten einheitlicherer Kulturen eingeschränkt. Die Auswahl typischer (vgl. hierzu Kolf et al. 2007; Bragdon und Bahney 2018), aber wenig spezifischer MSK Marker ließ dennoch eine Mischkultur unterschiedlicher Populationen zu. Bei der Charakterisierung der in diesem Labor verwendeten Bohrmehl-MSK wurde für die in der Kultur vertretenen Zellen u.a. Positivität für die verbreiteten MSK Marker CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 und CD106 bei gleichzeitiger Negativität für die hämatopoetischen Stammzellmarker CD44 und CD34 gezeigt. Breite ‚mature mMSC‘ waren abweichend teilweise CD34<sup>+</sup> (Trinkaus et al. 2005 und Kapitel 2.2.3). Dieses Profil (CD105<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD73<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup> und CD45<sup>-</sup>) stimmt mit nachweislich in vivo knochenbildenden menschlichen trabekulären und periostalen Zellen, multipotenten selbsterhaltenden Knochenmarksperizyten, multipotenten gefäßassoziiierende Zellen aus Nabelschnurblut und damit verschiedenen osteogenen Vorgängerzellen überein (Sacchetti et al. 2007; Sacchetti et al. 2016). Die Kultur weicht allerdings vom 2006 vorgeschlagenen Minimalprofil für MSK ab. Diese fordern neben einer Tripelpositivität von  $\geq 95\%$  für CD105, CD90 und CD73 sowie ebenso vollständiger Negativität für CD34 und CD45,

zusätzlich den Negativitätsnachweis für CD14, welcher ansonsten in den überwiegenden Studien zu MSC keine Berücksichtigung findet und auch in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht wurde. Hierzu bleibt anzumerken, dass diese Minimalkriterien den Versuch darstellen, unterschiedliche Kulturen verschiedener Gewebe zusammenzufassen und die mittlerweile wiederlegte Auffassung widerspiegeln, es gäbe einheitliche MSC in unterschiedlichen Geweben. Zum einen wird keine gemeinsame tatsächlich multipotente Vorgängerezelle, sondern eine Zellgruppe mit durchaus verschiedenen Eigenschaften selektiert, zum anderen interessiert in dieser Arbeit nicht der Vergleich MSC verschiedener Gewebe, sondern die Identifikation osteogener Vorläufer. Solche sind in auf diese Weise definierten MSC Kulturen zwar zu finden, können aber durchaus von den Minimalkriterien abweichen. Auch CD34<sup>+</sup> Zellen (wie sie teilweise unter den breiten mMSC im Bohrmehl zu finden sind) können nachweislich ektopen Knochen bilden (Eghbali-Fatourehchi et al. 2007). In der Maus wurde eine Subpopulation von MSC beschrieben, bei der der Verlust der CD105-Expression den Beschreibern zufolge den osteogenen Differenzierungsweg begünstigt (Anderson et al. 2013). Letztendlich sei das Expressionsmuster dieser Oberflächenantigene selbst für unterschiedliche multipotente CFU-F verschieden und ändere sich zudem selbst in Klonen einzelner Ursprungszellen ‚als Funktion der Zeit‘, womit die Bestimmung eines ‚phänotypischen Fingerabdrucks‘ gemischter MSC bei sich ‚abhängig ihrer Umgebung ständig verändernden Zellen‘ dem ‚Schuss auf ein bewegliches Ziel‘ gleiche (Bianco et al. 2001).

Um bei derartiger Heterogenität dennoch vergleichbare Kulturen zu verwenden, wurden solche ausgewählt, die den höchsten Anteil an doppelt CD105 und CD73 positiven Zellen in der Primärkultur oder der ersten bis zweiten Passage aufwiesen. Sowohl im knochengesunden als auch osteoporotischen Kollektiv lag dieser bei etwa der Hälfte. Hierdurch sollte ein einheitlich hoher Anteil an MSC mit ähnlichem Differenzierungszustand gewährleistet werden. Andere Zellen repräsentieren entweder andere MSC Subspezies, bereits ausdifferenzierte Knochenzellen (Osteozyten, Osteoblasten, *bone lining cells*) oder andere im Knochen vorkommende Zellen und können, sofern sie nicht ebenfalls zur osteogenen Differenzierung als Ko-Zellen der Mikroumgebung oder direkt zur Knochenbildung beitragen, zumindest geduldet werden.

In diesem Zusammenhang muss das Phänomen der Seneszenz oder in vitro Alterung berücksichtigt werden. Für MSC Kulturen wurden die Abnahme der Telomerlänge verlängerte Zellverdoppelungszeiten, morphologische Veränderungen mit Zunahme der Zellgröße, zunehmende Zellablösung und abnehmende Kapazität zur osteogenen Differenzierung beschrieben. Die Expression der MSC Marker blieb mindestens bis zur

achten Passage stabil (Yang et al. 2018). Hinzu kommen in der hier verwendeten heterogenen Kultur verschiedene Selektionseffekte durch jede neue Passage. Bei unterschiedlichem Replikationspotential werden zum einen pro Passage vermehrt schnell replizierende Zellen ausgewählt. Aufgrund der Populationsasymmetrie, die entsteht, wenn eine Stammzelle aufgrund asymmetrischer Teilung neben einer eigenen Kopie differenzierende proliferierende Transitzellen hervorbringt, aus denen letztendlich viele enddifferenzierte Effektorzellen entspringen, nimmt der Anteil von Stammzellen durch Teilung nicht zu. Stattdessen akkumulieren nachfolgende Zellen in der Kultur. Mit jeder Passage werden entsprechend weniger Stammzellen transferiert (Sherley 2002). Aus diesen Gründen wurde die maximale Passagezahl der in dieser Arbeit verwendeten Kulturen auf sechs begrenzt.

#### **4.1.3 Risedronat hat Potential**

Zunächst soll diskutiert werden, wie sich die Gabe von Risedronat (und anderen Bisphosphonaten) auf die Funktion von Fremdmaterialien auswirkt, die dauerhaft als Gelenkprothesen oder vorübergehend als Implantat zur Stabilisierung von Frakturen in den Knochen eingebracht werden. Dies gibt Anhaltspunkte, welche Patienten von einem mit Risedronat modifizierten Biomaterial profitieren könnten.

In Deutschland wird derzeit empfohlen, die systemische Therapie der Osteoporose mit Bisphosphonaten aufgrund einer Endoprothesenimplantation nicht auszusetzen. Grundsätzlich sei der Einsatz dieser Wirkstoffgruppe „nach Ansicht der Leitliniengruppe nicht kontraindiziert“ (Dachverband Osteologie e.V. 2017). Eine Empfehlung zur Risedronattherapie aufgrund einer Prothesenimplantation wird im Umkehrschluss aber nicht gegeben. Die osteoprotektiven Effekte auch in der Umgebung von Implantaten sind demnach gegen die Nebenwirkungen einer systemischen Risedronattherapie abzuwägen und überwiegen nach Einschätzung der Arbeitsgruppe also nur bei bereits bestehender Therapieindikation im systemisch erkrankten Knochen. Diese Einschätzung wurde aufgrund einer englischen retrospektiven Kohortenstudie getroffen, welche den Einfluss von Bisphosphonaten auf das Überleben von Knie- und Hüftprothesen untersuchte. Die Einnahme von Bisphosphonaten war mit einer insgesamt signifikant geringeren Revisionsrate und etwa zweifach längerem Implantatüberleben assoziiert (Prieto-Alhambra et al. 2011). Aus der Studie geht allerdings nicht hervor aus welcher Indikation, in welcher Dosis und Dauer Bisphosphonate verabreicht wurden. Darüber hinaus ist ebenfalls der Knochenstatus und das jeweilig verwendete Bisphosphonat in den Kohorten unbekannt und eine Unterscheidung nach Geschlecht nicht erfolgt. All dies sind Determinanten für

Komplikationen einer Bisphosphonattherapie. Der Grund für die Implantatrevision (z. B. aseptische Lockerung oder implantatnahe Fraktur) wurde ebenfalls nicht unterschieden. Es wäre eine Subgruppenanalyse erforderlich um jene Patientengruppen zu identifizieren, welche am ehesten von Bisphosphonaten im Zusammenhang mit Implantaten profitieren würden. Unter Risedronattherapie ist etwa das vermehrte Auftreten atypischer Femurfrakturen bekannt (Schilcher et al. 2011). Das Risiko für diese Komplikation ist für beide Geschlechter vor allem aber für Frauen sowie für Alendronat gegenüber Risedronat erhöht und steigt mit zunehmender Einnahmedauer. Hierbei scheint eher die zum Zeitpunkt fortdauernde Einnahme als eine Langzeitakkumulation der Risikofaktor zu sein (Schilcher et al. 2014). Im Zusammenhang mit Implantaten sollte daher grade in Bezug auf die orale Bisphosphonattherapie eine konkrete Indikation bestehen. Auf die Studien von Prieto-Alhambra et al. (2011) aufbauend ließ sich in weiteren Registerstudien ein signifikant verringertes Gesamtrevisionsrisiko von Implantaten insbesondere durch aseptische Lockerung nach Bisphosphonattherapie bestätigen. Allerdings zeigten jüngere Patienten mit hoher BMD ein häufigeres Auftreten von periprothetischen Frakturen. Von einer Bisphosphonattherapie profitierten in Bezug auf das Implantatüberleben bei stratifiziertem Alter vor allem Patienten mit niedriger BMD und bei stratifizierter Mineraleichte vor allem ältere Patienten (Khatod et al. 2015). Systemische Bisphosphonatgabe wurde schließlich als unabhängiger Risikofaktor für atypische periprothetische Frakturen, wie es bereits für atypische Femurfrakturen beschrieben wurde, identifiziert (Leclerc et al. 2018). Unklar bleibt auch in der kanadischen Kohorte weiterhin die genaue Behandlungsdauer mit Bisphosphonaten. Vor allem eine kurze Behandlungsdauer scheint sich dennoch positiv auf den periprothetischen Knochenerhalt auszuwirken. Interessanterweise ist das Frakturrisiko auch für atypische periprothetischen Frakturen entsprechend wie bei atypischen Femurfrakturen unter Verwendung von Risedronat gegenüber Alendronat geringer. Die Autoren machen deutlich, dass für osteoporotische Patienten die Vorteile einer Therapie das geringe absolute Risiko einer atypischen periprothetischen Fraktur (welche vor allem junge Patienten mit Langzeittherapie betrifft) übertreffen (Leclerc et al. 2018). Nicht nur Gelenkprothesen können von perioperativer Bisphosphonatgabe profitieren. Diese führte bei postmenopausalen Frauen mit Osteoporose (ohne antiresorptiver Langzeittherapie) unter anderem zu verbesserter Schraubeneinheilung bei externer Stabilisierung peritrochantärer Femurfrakturen (Moroni et al. 2007). Titanimplantate werden ebenfalls häufig im Rahmen von Zahnbehandlungen im Kiefer verankert. Hier kommt insbesondere die Nebenwirkung der Bisphosphonat-assoziierten Kiefernekrose zum Tragen. Während für eine osteoporosegerechte niedrigdosierte Bisphosphonattherapie keine negativen Auswirkungen erkennbar waren, führte eine

Hochdosistherapie etwa bei Malignomen oder die sehr langfristige orale Einnahme zu Implantatkomplikationen (Stavropoulos et al. 2018). Dies spricht auch in diesem Zusammenhang für eine kurzfristige, besser noch lokale Therapie. Metaanalysen bestätigen bei lokaler Anwendung von Bisphosphonaten in knochengesunden Individuen ohne systemische Therapie mit antiresorptiven Medikamenten eine verbesserte Implantatstabilität, -überlebenszeit und einen geringeren periimplantären Knochenverlust von zahnmedizinischen Titanimplantaten (Khamis und Elsharkawy 2018). Insgesamt scheint lokal eine vorübergehende Risedronattherapie die Implantatfunktion zu verbessern, während eventuelle Komplikationen eher systemische Nebenwirkungen einer lang fortgesetzten Medikamentengabe darstellen. Dies stützt für sich genommen die lokale Anwendung des Wirkstoffes über Biomaterialien gegenüber zusätzlicher systemischer Gabe, insbesondere für ansonsten gesunde Individuen.

Ein Erklärungsansatz für atypische Femurfrakturen und Osteolysen ist das Unterbleiben speziell des gezielten Knochenremodelings unter fortdauernder Bisphosphonattherapie (Burr 2002). Dies führe schließlich zur Akkumulation von Mikrotraumen und verschlechtere die mechanischen Eigenschaften des Knochens (Mashiba et al. 2000).

Risedronat beeinträchtigt in erster Linie die Funktion und das Überleben von Osteoklasten und somit die Resorptionsphase und die hiermit einhergehende Initiierung des Remodelingzyklus unspezifisch. Die Initiierung des gezielten Remodelings als Antwort auf Scherkräfte und mikroskopische Beschädigungen wird jedoch als Aufgabe der Osteozyten und des lacuno-caniculären Netzwerks angesehen. Insbesondere die Apoptose von Osteozyten ist ein auslösender Faktor. Nicht zuletzt geht der katabole Effekt von andauernder Glukokortikoidtherapie, fehlender mechanischer Stimulation und umgekehrt der anabole Effekt intermittierender PTH-Gabe mit veränderter Lebensdauer der Knochenzellen einher (Burr 2002; Weinstein et al. 2000). Die Beeinflussung der Lebensdauer und Apoptosewahrscheinlichkeit von Osteoblasten und Osteozyten sowie ein besseres Verständnis der Risedronatwirkung sind damit vielversprechende Ansatzpunkte der Osteoporosetherapie. Das Verständnis der Osteozytenfunktion entwickelt sich beständig weiter. Die wiederentdeckte Osteozytenfunktion der Osteolyse zur physiologischen Anpassung der Lakunen trägt vermutlich auch zum Knochenverlust um Implantate und pathologischem Mineralverlust in Situationen wie Glukokortikoidtherapie bei (Tsourdi et al. 2018). Da die pathophysiologischen Mechanismen der Risedronattherapie und der Osteoporose beide maßgeblich in Zusammenhang mit der Osteoblasten- und Osteozytenfunktion bzw. deren Überleben stehen und nur diese in der MSC Kultur abgebildet werden kann, soll nun die Wirkung von Risedronat insbesondere auf die Zellen der osteogenen Reihe diskutiert werden.

Die antiresorptive Wirkung von Risedronat als Vertreter der stickstoffhaltigen Amino-Bisphosphonate auf Osteoklasten geht auf die Freisetzung und Akkumulation hoher Konzentrationen des Wirkstoffes während der Resorption von Knochenoberflächen, an welchen er mittels seiner Phosphatgruppen akkumuliert, zurück. Dort inhibiert Risedronat potent die Farnesylpyrophosphat-Synthase und verhindert so die posttranslationale Prenylierung (den Transfer von Farnesyl- oder Geranylgeranylgruppen auf C-terminale Cysteinabschnitte) kleiner Guanosintriphosphat (GTP)-bindender Proteine. Dies wiederum führt letztendlich zur Störung des Zytoskeletts, dem Verlust der *ruffled border* und schließlich zur Apoptose der Osteoklasten (Dunford et al. 2001).

Darüber hinaus ist durch Ko-Kulturversuche bereits seit Anfang der neunziger Jahre bekannt, dass ein Teil der Risedronatwirkung durch den Einfluss der Knochenzellen auf Rekrutierung und Funktion der Osteoklasten vermittelt wird und somit auch eine Wirkung auf Osteoblasten bzw. Osteozyten vorliegen muss (Sahni et al. 1993; Fleisch 1998).

Die Wirkung von Bisphosphonaten auf Zellen der osteogenen Linie wurde im Menschen mit widersprüchlichen Ergebnissen mit unterschiedlichen Zellmodellen wie primären trabekulären Osteoblastenkulturen, periostalen und fetalen osteoblastischen Zellen, osteoblastenähnlichen Zelllinien z. B. MG-63 oder Knochenmarks-MSC untersucht. Grundsätzlich konnten mehrheitlich antiapoptotische und proliferative Effekte, sowie Einflüsse auf die Differenzierungsfähigkeit in nanomolaren Konzentrationsbereichen zwischen  $10^{-11}$  M bis maximal  $10^{-6}$  M gezeigt werden. Die Wirkstoffkonzentration liegt damit mehrere Größenordnungen unter jener, die zur Verringerung von Osteoklastenaktivität benötigt wird (Bellido und Plotkin 2011). Demgegenüber führten Bisphosphonatkonzentrationen ab  $10^{-5}$  M auch zur Apoptose und Funktionsverschlechterung von knochenbildenden Zellen. Die gegensätzliche Wirkung in osteogenen Zellen bei niedrigen Konzentrationen ist am ehesten durch einen anderen Mechanismus als jenem erklärbar, der in Osteoklasten und bei hohen Konzentrationen wirkt. Auch nicht stickstoffhaltige Bisphosphonate (unabhängig ihrer unterschiedlichen antiresorptiven Wirkstärke) und solche ohne Wirkung in Osteoklasten entfalten in osteogenen Zellen in ähnlichen Konzentrationsbereichen eine antiapoptotische Wirkung (Plotkin et al. 1999; Plotkin et al. 2006). Die Wirkungsweise von Risedronat und anderen Bisphosphonaten steht im engen Zusammenhang mit den Signalwegen, welche die Signaltransduktion über *gap-junctions* oder Connexone (engl. *hemichannels*) des Transmembranproteins Cx43 vermitteln. Cx43 spielt eine zentrale Rolle im Erhalt der Knochenhomöostase und der Funktion des Osteozytennetzwerkes. Neben dem Austausch von ‚*second messenger*‘ Molekülen zwischen allen knocheneigenen Zellen

und mit der Umgebung, fungiert Cx43 selbst als Interaktionspartner und Ausgangspunkt für verschiedene Signalwege. Dies geschieht über Porenöffnung und die Versammlung von Proteinkomplexen über den C-Terminus des einzelnen Connexinmoleküls (Moorer und Stains 2017). Insbesondere gilt Cx43 als Kernkomponente zur Vermittlung der Wirkung von Hormonen, einiger Wachstumsfaktoren und mechanischer Stimuli (Plotkin und Bellido 2013). Über *gap-junctions* zwischen zwei Zellen, bestehend aus jeweils zwei *hemichannels*, wird die *Runx2* und *OSX* Promotoraktivierung und folglich die osteogene Differenzierung als Antwort auf Wachstumsfaktoren beeinflusst (Hebert und Stains 2013). Zellüberleben wird zudem durch *hemichannels* (unabhängig von der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren) über die Aktivierung und Retention der *extracellular-signal-regulated* Kinase (ERK) im Zytosol vermittelt. Auch hier ist die Eigenschaft von Cx43, Komplexe aus Proteinkinasen und Effektorproteinen am C-terminalen Ende zu versammeln entscheidend. Dies führt zur Phosphorylierung und somit Aktivierung antiapoptotischer Effektorproteine (Plotkin und Bellido 2013). Schließlich ist noch die Cx43 vermittelte Mechanotransduktion zu nennen, welche zur Öffnung von Connexonen (nach Assoziation von Integrinen mit den Halbkanälen) und anschließender parakriner Stimulation führt (Buo und Stains 2014). Insgesamt hilft eine Steigerung der Cx43 Signalwirkung die Osteozytenfunktion und Knochenformierung langfristig zu erhalten (Davis et al. 2018).

Bisphosphonate entfalten ihre Wirkung über die antiapoptotischen Cx43-abhängigen Signalwege. Es kommt zu einer transienten Öffnung von Cx43 Halbkanälen, was die Interaktion und Aktivierung der Proteinkinase Src (kurz für Sarcoma) am C-Terminus von Cx43 ermöglicht (Plotkin et al. 2002). Dies wiederum führt zu ERK Aktivierung, welche im Komplex verbleibt. Deren zytosolische Effektorinasen inaktivieren schließlich proapoptotische Proteine bzw. bewirken die Bindung von Procaspasen (Plotkin et al. 2005). Das Ziel der Bisphosphonate sind dabei nicht die Cx43 Connexone selbst, sondern Proteintyrosinphosphatasen (PTP), welche die antiapoptotischen Signalkaskaden als Gegenspieler regulieren und eventuell die Signalaktivität von Cx43 durch Dephosphorylierung an dessen C-Terminus beeinflussen (Lezcano et al. 2012). Die Verbindung zu Connexonen wird eventuell durch membranständige rezeptorähnliche PTP hergestellt, welche mit Cx43 ko-lokalisieren und durch Bisphosphonate gehemmt werden. Die unspezifische Hemmung von PTPs wirkt sich auch auf andere nicht Cx43-vermittelte mitotische Signalwege aus. Dadurch lassen sich auch nicht Cx43-abhängige proliferative Effekte auf Knochenzellen erklären (Lezcano et al. 2014).

Vor dem Hintergrund der konzentrationsabhängigen biphasischen Wirkung von Risedronat erscheint es sinnvoll, die Testmaterialien auch mit unterschiedlichen Risedronatmengen zu testen. Die effektivste antiresorptive Dosis von Risedronat liegt bei  $10^{-5}$  M bis  $10^{-4}$  M (Rogers et al. 2011; Plotkin et al. 2006), welche auch nach systemischer Applikation auf Knochenoberflächen während der Resorptionsphase und in Resorptionslakunen erreicht werden kann (Sato et al. 1991). Bisher wurden die stärksten antiapoptotischen und proliferativen Wirkungen von Risedronat auf verschiedene osteoblastenähnliche Zelllinien im Bereich von  $10^{-8}$  M beobachtet (Plotkin et al. 2006; Im et al. 2004). Für diese Konzentration wurden proliferative Effekte von Risedronat und Hinweise auf verbesserte osteogene Differenzierung ebenfalls für Knochenmarks-MSC beschrieben (Knoch et al. 2005; Casado-Díaz et al. 2013).

In der vorliegenden Studie wurden Partikelbeschichtungen mit Risedronatmengen von insgesamt  $2,5 \times 10^{-7}$  mol und  $2,5 \times 10^{-11}$  mol verwendet. Bei vollständiger Freisetzung in 1 ml Medium konnten rechnerisch maximal Konzentrationen im Mediumüberstand von  $2,5 \times 10^{-4}$  M bzw.  $2,5 \times 10^{-8}$  M erreicht werden. Damit entsprachen die möglichen Mediumkonzentrationen den Bereichen, welche als Wirkkonzentrationen zur Inhibierung der osteoklastischen Knochenresorption bzw. in ihrer überlebensfördernden Wirkung auf osteogene Zellen als effektiv beschrieben werden.

#### **4.2 Biokompatibilität der PEK-Nanopartikel Beschichtung**

Um den Einfluss der wirkstofffreien PEK-P auf das Zellüberleben am Material zu bewerten, eignet sich der Vergleich der Zellvitalität und der Zellmorphologie an der Grenzfläche zur nicht beschichteten Ti-40Nb Platte und an der PEK-P beschichteten Platte.

Während die Wirkung des Wirkstoffs bei Anwesenheit von Risedronat in hoher Konzentration bereits einen Tag nach Versuchsstart ersichtlich wurde (siehe nächstes Kapitel), ließen sich lichtmikroskopisch an Platten mit und ohne Partikelbeschichtung keine morphologischen Unterschiede feststellen. Der Zellrasen war einheitlich dicht und die Zellform entsprach dem für die jeweilige ZK typischen Aussehen (Abbildung 10 in Kapitel 3.1.3, A und D bzw. E und H). Auch im Versuchsverlauf entwickelten sich die Kulturen an beiden Materialien parallel in Bezug auf Form, Dichte des Zellrasens sowie Zeitpunkt und Menge von mineralischen Ablagerungen (siehe auch Abbildung 13 unten). Die Zellvitalität, welche mittels MTT Assay nach 14 bzw. 31 Tagen für alle Materialien als Vielfaches der materialfreien Kontrolle ermittelt wurde, lässt keine Unterscheidung zwischen Ti-40Nb mit oder ohne PEK-P Beschichtung zu. Nach einem Monat zeigten die Zellen im PEK-P Well noch im Mittel die höchsten Vitalitätswerte (Abbildung 25). Im

gegebenen Versuchsaufbau ließ sich demnach keine direkt toxische Wirkung auf die MSC feststellen. Grundsätzlich ist in Bezug auf die Zellvitalität anzumerken, dass die Stoffwechselaktivität nach 31 Tagen im osteogenen Differenzierungsmedium zwischen den einzelnen ZKs stark auseinanderwich. Die MTT Ergebnisse am gleichen Material variierten zwischen verschiedenen ZKs (z. B. ZK 62 und 108) bis um das Hundertfache (Abbildung 24). Demgegenüber liegen die ZKs nach 14 Tagen noch relativ nahe beieinander (Abbildung 26). Die Streuung ist dabei für die Kulturen sowohl knochengesunder als auch osteoporotischer Spender ähnlich. Die lange Zeit im osteogenen Differenzierungsmedium hatte demnach einen starken individuellen Einfluss auf das Zellüberleben bzw. den Aktivitätszustand der einzelnen Kultur, nicht jedoch die PEK-P.

Darüber hinaus hatte die Beschichtung der Platten mit PEK-P gegenüber der unmodifizierten Titan-40Nb Oberfläche keinen Einfluss auf die osteogene Differenzierung und Mineralisierung.

Kauschke et al. (2018) zeigten den Einfluss der Veränderung der Oberflächenbeschaffenheit von Ti-40Nb auf die Zellzahl und Osteoblastendifferenzierung in MSC Kulturen. Grundsätzlich sind Zell-Zell-Kontakte und solche zur extrazellulären Matrix mitentscheidend für das Zellüberleben und die Differenzierung der Vorläuferzellen (Datta et al. 2005). Die PEK-Partikel sind reich an exponierten sowohl positiv als auch negativ geladenen Gruppen (insgesamt überwiegen positive Ladungsträger), welche die Aggregation der Elektrolytkomponenten miteinander als auch mit dem Wirkstoff vermitteln. Dies wirkte sich in der Versuchsumgebung auf das Zellüberleben aber nicht nachweisbar negativ aus. Bei erstmaliger Exposition zum Medium konnten weiterhin keine Veränderungen des freien Kalziums festgestellt werden. Die Verteilung der Kalziumkonzentrationen wurde durch das Ti-40Nb oder die PEK-P nicht beeinflusst (Abbildung 14). Die Partikelgröße und Anzahl der mit niedrigen Risedronatmengen beladenen Partikel hatte im Versuch keinen nachweisbaren Einfluss auf Zellüberleben oder –funktion.

#### **4.3 Wirkung von Risedronat auf das Zellüberleben und die osteogene Differenzierung von MSC**

Als Indikatoren für den Erfolg der osteogenen Differenzierung wurden zum einen die Aktivität oder Menge von Markerproteinen der Osteoblasten und ihrer Vorgänger bestimmt, welche für ihre Funktion notwendig sind. Zum anderen wurde die Bildung kalziumhaltiger extrazellulärer Matrix als Nachweis herangezogen. Weiterhin sollte die Veränderung der Kalziumkonzentration im Medium Hinweise auf die Mineralisierung der

Matrix erbringen. Ein definitiver Beweis für die erfolgreiche Differenzierung zu funktionsfähigen Osteoblasten läge beispielsweise dann vor, würde das Endprodukt Knochengewebe sicher identifiziert. Alle hier verwendeten Verfahren in der Zellkulturumgebung erlauben daher für sich alleingegenommen keine absolut sichere Einschätzung der osteogenen Funktion in natürlichem Zellverband unter nicht manipulierten Bedingungen. Beispielsweise ließ sich für murine MSC Linien anhand der Expression von Markern weitgehend undifferenzierter Vorgänger wie ALP oder Kollagen 1 bzw. dem Markergen *RUNX2* die Knochenbildung in vivo nicht vorhersagen. Auch das Fehlen von Mineralablagerungen in der Zellkultur war alleinig kein Prädiktor für fehlende osteogene Kapazität (Satomura et al. 2000). Zwar kann unter den gegebenen Bedingungen keine Aussage zur Differenzierung im physiologischen Zusammenhang getroffen werden, dennoch sollte durch das verwendete Differenzierungsmedium der osteogene Differenzierungsvorgang artifiziell induziert werden. Die Konditionierung des Kulturmediums mit Dexamethason und Vitamin C erhöhte auch die Wahrscheinlichkeit und das Ausmaß ektooper Knochenbildung von MSC Kolonien nach Transplantation und bahnte somit den Differenzierungsprozess (Kuznetsov et al. 1997). Nur die Zusammenschau der verwendeten Methoden erlaubt vor diesem Hintergrund die Einschätzung der osteogenen Funktion der MSC unter Kulturbedingungen und des Einflusses der Testmaterialien auf diese. Beispielsweise werden etwa durch Alizarinrot S Färbung sicher Kalziumablagerungen durch Bildung von roten Salzen nachgewiesen (Puchtler et al. 1969). Jedoch ist keine Unterscheidung zwischen korrekt formiertem Hydroxylapatit und dystropher Kalzifizierung anderen Ursprungs möglich. Für diese wären ultrastrukturelle Aufnahmen der Kristallstrukturen an der kollagenen Matrix oder Methoden wie die *Fourier transform infrared spectroscopy* (FTIR) notwendig (Bonewald et al. 2003). Die gleichzeitige Zunahme kalziumhaltiger Ablagerungen mit dem Anstieg etablierter Marker osteoblastärer Mineralisierung wie ALP und Osteokalzin zusammen mit der raschen Utilisierung freien Kalziums, machen hingegen eine zellvermittelte Mineralisierung wahrscheinlich.

Lichtundurchlässige Ablagerungen, welche gemäß Alizarinrot S Färbung kalzifiziert waren, traten etwa ab dem 6. Tag nach Zugabe des osteogenen Differenzierungsmediums auf. Sie nahmen im Versuchsverlauf kontinuierlich an Menge zu, bis sie den Zellrasen nach einem Monat fast vollständig bedeckten. Während die Kalziumkonzentration im Medium für etwas mehr als 2 Wochen noch zwischen Freisetzung ins Medium und Abnahme im Medium schwankte, wurde ab Versuchstag 25 beständig ein Kalziumverbrauch aus dem Medium nachgewiesen (Abbildung 15). Dementsprechend hatte zwischen Medium und Zellen bzw. der Matrix zunächst ein

Austausch von Kalzium in beide Richtungen stattgefunden, wohingegen gegen Ende der Versuchszeit ein Großteil des im Medium gelösten Kalziums vermutlich im Rahmen aktiver oder passiver Mineralisierungsprozesse aus dem neu hinzugefügten Medium verschwand. Von der ersten auf die zweite Woche wurde darüber hinaus im Differenzierungsmedium insgesamt ein Anstieg der ALP-Aktivität im Gesamtproteingehalt beobachtet, wobei insbesondere einzelne Spender mit hoher oder niedriger ALP-Aktivität auffielen. Dies kann im Zusammenhang als Ausdruck osteogener Differenzierung *in vitro* gedeutet werden. Interessanterweise wurde für Osteokalzin, welches als spätes Markerprotein für ausgereifte Osteoblasten dienen sollte, anstatt der Freisetzung in den Überstand eine Abnahme im Kulturmedium nach Mediumwechsel auf ein Plateau beobachtet. Als Gründe kommen neben der Aufnahme oder dem Abbau auch die Bindung von Osteokalzin, welches wohl dem Serumanteil des Mediums entstammt, an extrazelluläre Matrix in Frage. Die Osteokalzinkonzentration im Überstand an Tag 35 schwankte zusätzlich stark zwischen einzelnen Spendern. Ein Zusammenhang zwischen Knochenstatus, Mineralisierung oder Zellvitalität konnte nicht gefunden werden und der genaue Mechanismus bleibt ungeklärt.

Unter Verwendung hoher Risedronatkonzentrationen, wie sie physiologischer Weise nur kurzzeitig oder nach Freisetzung aus dem Knochen vorkommen und im Differenzierungsversuch über 31 Tage Anwendung fand, bestätigt sich die funktionshemmende und toxische Wirkung des Wirkstoffes. Die Zellvitalität am Ende des einmonatigen Differenzierungsversuchs unterschied sich wie oben angesprochen stark zwischen einzelnen ZKs, war dabei aber nicht maßgeblich vom Knochenstatus der Spender beeinflusst. Die Verteilungen waren in erster Linie vom Material abhängig und wurden durch Risedronat stark erniedrigt (Abbildung 24). Um einen Vergleich zwischen den einzelnen Materialien bei stark spenderabhängiger Vitalität zu ermöglichen, wurden diese für jeden Spender auf die materialfreie Kontrolle normiert. Die Kombination des Wirkstoffes wirkte sich gegenüber nicht beladener Partikelbeschichtung signifikant verschlechternd auf die Zellvitalität aus (Abbildung 25).

Verringerte Mengen von Risedronat im Material hatten hingegen nach 2 Wochen Differenzierung keinen nachweisbaren Einfluss auf die Zellvitalität. Auf die Bildung von mineralisierter Matrix ließ sich ein verringernder Einfluss des Wirkstoffes allerdings für beide Risedronatmengen erkennen.

Im Rahmen der Quantifizierung des im gesamten Well abgelagerten Kalziums ließen sich für die risedronatfreien Materialien (PEK-P Beschichtung und unbehandeltes Ti-40Nb) gegenüber der materialfreien Kontrolle vermehrt kalzifizierte Ablagerungen

nachweisen. Eine signifikante Zunahme an mineralisierter Matrix war hingegen unter Verwendung von Materialien mit der geringsten Risedronatmenge nicht mehr signifikant erhöht (Abbildung 20). Es schien insbesondere die bloße Anwesenheit der Ti-40Nb Platte die Bildung von mineralischen Ablagerungen zu fördern, da die Menge an Mineral in allen plattenhaltigen Wells über der materialfreien Kontrolle lag. Es ist vorstellbar, dass diese Zunahme an Ablagerungen durch die Platte auch artifiziell durch z. B. Schutz der Ablagerungen vor Fortspülen während des Mediumwechsels oder während Waschschritten im Rahmen des Färbeprotokolls hervorgerufen wurde. Nichtsdestotrotz ist der Effekt bereits bei geringen Mengen Risedronat im Material statistisch nicht mehr nachweisbar.

Der Kalziumverbrauch aus dem Medium, der als indirekter Indikator von Mineralisierungsprozessen verwendet wurde, zeigte den Einfluss größerer Risedronatmengen auf die Mineralisierung. Das knochengesunde Kollektiv zeigte einen hohen Kalziumverbrauch, der bei RIS-PEK-P Beschichtung gegenüber allen risedronatfreien knochengesunden Kontrollen signifikant verringert war. Die Verwendung einer RIS-Film Beschichtung ging mit einer Verringerung der Kalziumabnahme gegenüber der PEK-P Beschichtung einher (Abbildung 16). Welche Prozesse Einfluss auf die Kalziumkonzentration im Medium nahmen, ist im Einzelnen nicht nachvollziehbar. Es ist nicht sicher, ob diese durch die vitalen Zellen direkt beeinflusst wurde oder sich Kalziumionen abhängig von der bereits gebildeten Mineralmenge an diese anlagerten. Die Abnahme der Kalziumkonzentration spiegelte jedoch auffallend die Ergebnisse des MTT Tests am Ende des Versuches wider (Abbildung 24), welche für RIS exponierte Zellen deutlich erniedrigt waren. Obwohl sich die geringere Mineralisierung nach einem Monat bei hohen Risedronatkonzentrationen durch den direkt toxischen Einfluss des Wirkstoffes erklären lässt, war auch ein Einfluss des Knochenstatus sichtbar. Während der Kalziumverbrauch im osteoporotischen Kollektiv für alle Materialien eher einheitlich gering war, wurden in den knochengesunden Kulturen, welche zusammen einen hohen Kalziumverbrauch aufwiesen, die Unterschiede zwischen den Materialien sichtbar. Hierin wich das knochengesunde Kollektiv von den Ergebnissen im MTT Test ab, welche nicht nachweisbar vom Knochenstatus beeinflusst wurden.

#### **4.4 Einfluss der PEK-Nanopartikel auf die Risedronatwirkung**

Bei Verwendung einer Risedronatmenge von  $2,5 \times 10^{-7}$  mol in den Testmaterialien konnte eine Verminderung der Zellvitalität und –funktion am Ende der Versuchszeit von 35 Tagen beobachtet werden. Seine stärkste toxische Wirkung entfaltete das

Bisphosphonat vermutlich aber direkt zu Versuchsbeginn, wenn ein großer Teil des Wirkstoffes in das Medium zur Aussaat freigesetzt wurde und dort seine höchste Konzentration erreichte. Lichtmikroskopisch waren eine verringerte Zelldichte sowie abgerundete und abgelöste Zellen bereits zu Versuchsbeginn zu sehen (Abbildung 10: B,C und F,G). Der Einfluss der PEK-P Beschichtung manifestierte sich zu diesem Zeitpunkt vor allem in der Wirkstofffreisetzung. Vehlow et al. (2016) beschrieben für RIS-PEK-P Beschichtungen eine initiale Freisetzung des Wirkstoffes bei etwa physiologischem pH-Wert des Spülpuffers von 18 %, wobei ca. 64 % des Wirkstoffes letztlich nach 48 h Spülung in der Beschichtung verblieben. Eine RIS-Film Beschichtung wurde hingegen fast vollständig gelöst. In der vorliegenden Arbeit wurde eine solche unvollständige initiale Risedronatfreisetzung aus den Partikeln gegenüber der RIS-Film Beschichtung indirekt anhand der Bestimmung Kalziumionenkonzentration nach erstem Mediumkontakt sichtbar (Abbildung 14). Nach 48 h Mediumkontakt mit dem Material ließ sich bei vermutlich annähernd vollständiger Freisetzung des Wirkstoffes aus dem RIS-Film gegenüber den Kontrollen eine signifikant verringerte Kalziumkonzentration im Medium messen. Auch eine RIS-PEK-P Beschichtung verringerte die Konzentration von gelöstem Kalzium signifikant, allerdings nur etwa halb so stark.

Ein im Partikel gebundener Anteil von mindestens der Hälfte des ursprünglich eingesetzten Wirkstoffes verlängerte die Wirkung über den ersten Mediumwechsel hinaus auch in die Phase der osteogenen Differenzierung. Nach 35 Tagen wichen zwar die einzelnen Spender am Ende der Differenzierungszeit im MTT Test stark voneinander ab, dennoch ließ sich eine signifikant geringere Zellvitalität für RIS-PEK-P Beschichtungen gegenüber Materialien mit nicht beladenen PEK-P feststellen. Trotz oder gerade wegen des geringeren initialen Freisetzungsschubs zeigte Risedronat, wenn es aus den PEK-Partikeln freigesetzt wurde, am Ende der Versuchszeit die stärkste zytotoxische Wirkung. Nicht beladene PEK-Partikel zeigten nach 35 Tagen das höchste Vitalitätsniveau, welches gegenüber der RIS-PEK-P Kombination als einziges Material signifikant besser abschnitt. Der Kalziumverbrauch im Medium am Ende der Differenzierungszeit verhielt sich hierzu ähnlich. Die Freisetzung von RIS aus PEK-P hatte einen signifikant verringerten Kalziumverbrauch gegenüber allen Kontrollen zur Folge. Für PEK-P allein lag dieser am höchsten und als einziges Material signifikant über allen risedronathaltigen Gruppen. Die Kombination von Risedronat und Partikeln ging mit einer Verstärkung der Risedronatwirkung auf Zellvitalität und Mineralisierung nach einem Monat einher, während eine PEK-Partikel Beschichtung verglichen mit den übrigen Materialien am stärksten abschnitt.

Zwar zeigte auch nach 14 Tagen die risedronatfreie PEK-P Beschichtung die höchsten Vitalitätswerte, keines der Materialien wich aber in besonderem Maß von der materialfreien Kontrolle ab (Abbildung 26). Ein Effekt der geringeren Risedronatmenge verschwand hinter den Unterschieden zwischen den ZKs, der im Differenzierungsverlauf noch zunahm, sodass auch der Einfluss der PEK-Partikel hierauf nicht erkennbar war.

Die Wirkung geringer Risedronatdosen auf die Zellen wäre vor allem zu Beginn nach der initialen Freisetzung ins Medium sinnvoll zu untersuchen gewesen, da nur hier das Erreichen nennenswerter Konzentrationen zu erwarten war. Die Exposition gegenüber dem Wirkstoff bei geringer Risedronatmenge betraf im längsten Teil des Versuchs vermutlich nur noch einen kleinen Teil der Zellen im direkten Kontakt zum Material. Dann wäre die Untersuchung der osteogenen Differenzierung aber nicht mehr möglich gewesen. Der Einfluss der PEK-P Beschichtung und die effektive Wirkstofffreisetzung waren bei größeren Risedronatmengen auch nach 35 Tagen noch nachweisbar.

#### **4.5 Limitationen der Studie und Methodenkritik**

Die Experimente waren darauf ausgelegt, die Biokompatibilität der PEK-P Beschichtung und deren Effektivität als Wirkstofflieferant auf einem relevanten Biomaterial im Verlauf der osteogenen Differenzierung von MSC Kulturen zu untersuchen, was unter Verwendung langer Differenzierungszeiten und einer Risedronatmenge im für MSC toxischen Bereich gelang. Eine Einschätzung der Risedronatwirkung, insbesondere bei Verwendung von Wirkstoffmengen, für welche antiapoptotische, proliferative und differenzierungsfördernde Effekte beschrieben wurden, war in diesem Versuchsaufbau allerdings nicht aussichtsreich. Zum einen wurde Risedronat effektiv nur initial aus dem Material freigesetzt, zum anderen war auch die genaue Konzentration im Medium weder steuerbar noch überprüfbar. Hierfür wäre ein grundsätzlich anderes Versuchsdesign mit konstanter Risedronatkonzentration im Medium über den gesamten Versuchsverlauf und nicht die Applikation über die Testmaterialien notwendig gewesen.

Die Wirkung der Testmaterialien wird insbesondere im Versuchsverlauf und bei geringeren Wirkstoffmengen am Ehesten im direkten Kontakt mit den Zellen und nicht durch die Beeinflussung des Kulturmediums vermittelt. Eine Direktbeobachtung der Zellen, war mittels Durchlichtmikroskopie außer am Interface des Materials nicht möglich. Da sich nur ein Teil der Zellen auf dem Material oder daran befand, gingen in den übrigen Methoden die Zellen mit Materialkontakt nur anteilig in das Ergebnis ein. Beim Versuch die Mineralisierung zu quantifizieren, wurden nach Färbung mit Alizarinrot S zwei verschiedene Verfahren angewendet. In der histomorphometrischen Herangehensweise wurden dabei 5 Bildausschnitte ausgewertet, die allesamt um das

Material herum verteilt lagen und damit eine Oberfläche wie die Kontrolle repräsentieren. Durch Lösen des gesamten Farbstoffes konnte hingegen die gesamte Welloberfläche abgebildet werden. Je nach Festlegung des Thresholds wurden in der Bildanalyse geringe Mengen gefärbten Kalziums nicht als gefärbte Fläche einbezogen. Das Ausmaß der Alizarinansammlung über den Threshold hinaus spielt ebenfalls keine Rolle, was einen deutlichen Informationsverlust darstellt. Die kolorimetrische Bestimmung ist hingegen auch anfällig für unspezifisch angefärbte Zellen oder Farbstoffablagerungen am Wellrand. Der Zuwachs an Kalziumablagerungen an risedronatfreien Materialien gegenüber der materialfreien Kontrolle war letztlich in signifikantem Maße nur nach Auswertung des Gesamtwells nach Farbstoffrückgewinnung sichtbar. Dieses Ergebnis ist eher frei von zufälligen Selektionseffekten durch den Bildausschnitt und Threshold und bezieht die Fläche, welche in direktem Kontakt zum risedronathaltigen Material stand mit ein.

Da die ALP-Aktivität im Gesamtprotein innerhalb der ersten zwei Wochen zumindest in den Kontrollen signifikant anstieg und kalzifizierte Matrix sowie Kalziumverbrauch aus dem Medium nachgewiesen wurde, liegen Hinweise auf eine frühe osteogene Differenzierung vor. Nicht sicher ist, wieweit die Differenzierung fortschritt, da keine aktive Sezernierung von Osteokalzin, welches erst von ausgereiften Osteoblasten im Rahmen der Anordnung und Ausreifung der Kalziumphosphatkristalle freigesetzt wird (Hasegawa 2018), nachgewiesen werden konnte. Da auch eine Färbung nach von Kossa, welche anorganische Phosphate im Kalziumsalz darstellt (Meloan und Puchtler 1985), in Vorversuchen ähnliche Ergebnisse wie Alizarinrot S ergaben, handelte es sich bei den mineralischen Ablagerungen mit großer Sicherheit um ein Kalziumphosphat. Ob es aber zu geordneter Mineralisierung von Kollagenfibrillen mittels vesikelvermittelter Kristallbildung und kontrollierter Reifung kam, ist nicht sicher. Hierauf hätte die Osteokalzinfreisetzung hingedeutet. Diese war aber aufgrund der exogenen Osteokalzinzufuhr über das Kulturmedium (bei Messung im Leermedium etwa 47 ng/ml) nicht erkennbar. Da die Osteokalzinmessung zu verschiedenen Zeitpunkten im Versuchsverlauf durchgeführt werden sollte, kam eine Zelllyse und Nachweis des Markers etwa auf Transkriptionsebene nicht infrage. Stattdessen ergibt sich nun die Frage, wieso die Proteinmenge im Medium nach Mediumwechsel abnimmt. Denkbar ist eine Bindung an die Matrix, da es aufgrund seiner  $\gamma$ -Carboxylierung eine hohe Affinität zu Kalzium besitzt. Aber auch ein aktiver Abbau wäre vorstellbar.

Auffallend ist weiterhin die starke Heterogenität der einzelnen Spenderkulturen.

Eine Normierung der im MTT gemessenen Stoffwechselaktivität der individuellen ZK auf die Zellzahl (analog zur ALP-Aktivität auf das Gesamtprotein) war nach der Differenzierungsphase nicht mehr sinnvoll. Auch die Ergebnisse der Alizarinrot S Färbungen waren durch Verdünnung nach pH Anpassung in jedem Spender nicht direkt vergleichbar. Deshalb erfolgte für diese Methoden eine Berechnung der Ergebnisse der einzelnen Experimente innerhalb jeder ZK in Relation zur materialfreien Kontrolle. Hierdurch kann zwar der Einfluss der Materialien vom Spenderniveau unabhängig dargestellt werden, zufällige Abweichungen zwischen Kontrolle und Material werden aber künstlich verstärkt, was wiederum eine zusätzliche Streuung der Ergebnisse und Fehlerquelle bedeutet. Weiterhin werden absolute Unterschiede zwischen den Kollektiven etwa durch den Knochenstatus verschleiert.

Die einzelnen Spender wichen etwa in der Zellvitalität aber auch in der ALP-Aktivität oder Menge an mineralisierter Matrix individuell stark auseinander. Zwischen den einzelnen Kulturen innerhalb eines Kollektivs bestanden teils Abweichungen um mehrere Größenordnungen, was den Nachweis von Unterschieden zwischen den Kollektiven oder Materialien erschwerte. Dabei waren es beispielsweise in der ALP-Aktivität die gleichen ZKs, die zu beiden Zeitpunkten durch außerordentliche Ergebnisse auffielen, wohingegen im Zellvitalitätsassay vor allem im Verlauf der einmonatigen Kulturdauer die Spender individuell stark auseinanderwichen. Da sich die Zusammensetzung der MSC Mischkulturen der einzelnen Spender aus anfangs diskutierten Gründen nicht exakt kontrollieren lässt, bedingt bereits die Heterogenität der Zellpopulationen eine größere Streuung der Markerausprägungen und unterschiedliche Reaktionen auf das Zelldifferenzierungsmedium. Aus diesem Grund wurden die Spender erstrangig nach ihrem Oberflächenantigenprofil ausgewählt und ein möglichst großer Anteil einheitlich positiver Zellen angestrebt. Zwar entsprachen die Kulturen der bekannten Morphologie aus spindelförmigen schnell proliferierenden Zellen und mMSC. Die ausgewählten Marker ließen dennoch verschiedene Zelltypen zu.

Die Auswahlkriterien führten darüber hinaus zur Auswahl nicht vollkommen einheitlicher Patientenkollektive. Im osteoporotischen Kollektiv fanden sich ausschließlich Frauen ab 60 Jahren, während die knochengesunde Vergleichsgruppe im Schnitt jünger und vorherrschend männlich war. Dabei vielen sowohl zwei weibliche und männliche Patienten beider Gruppen mit Extremwerten in der normierten ALP-Aktivität auf, sodass ein Zusammenhang mit dem Geschlecht hier eher unwahrscheinlich ist. Die beiden Kulturen mit der höchsten ALP-Aktivität in jeder Gruppe waren interessanterweise aber zugleich diejenigen, die den höchsten Anteil an MSC mit typischem Antigenprofil aufwiesen. Zudem bestand zwischen Alter und FACS-Ergebnissen für die verwendeten

Spender insgesamt ein signifikanter positiver Zusammenhang (Korrelationskoeffizient nach Pearson 0,746,  $p=0,013$ ), sodass ein Einfluss durch die Kollektivzusammensetzung nicht auszuschließen ist. Abbildung 29 stellt die Zusammensetzung der Spender welche in Tabelle 1 im Kapitel 2.2.3 zusammengefasst ist noch einmal graphisch dar.

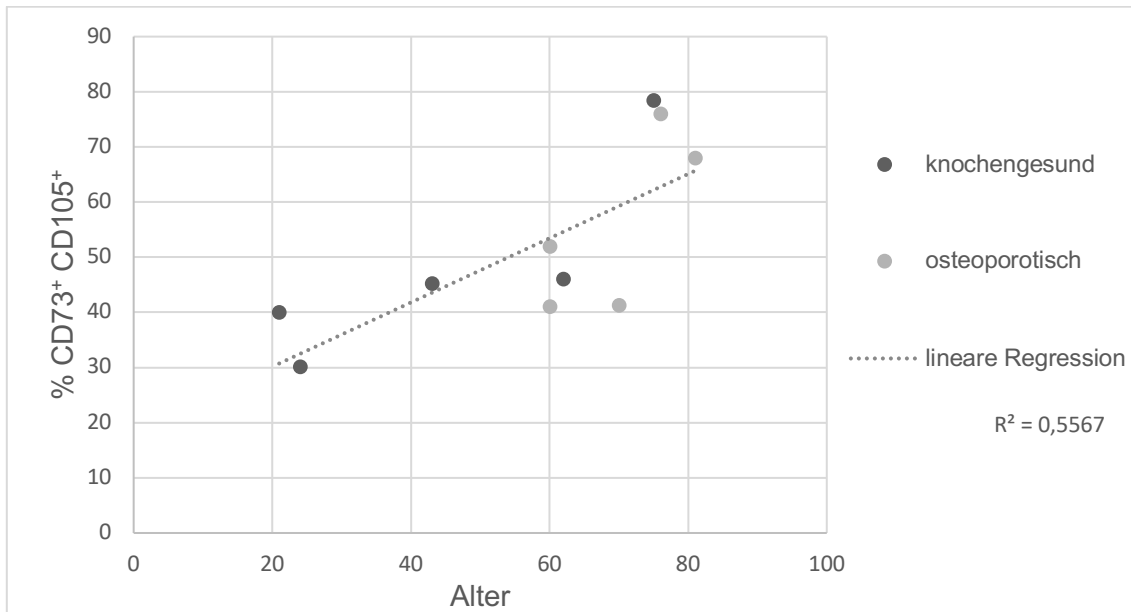


Abbildung 29: Vergleich von Alter und Ergebnissen der FACS Charakterisierung der verwendeten Kulturen

Tatsächlich hatte die Zugehörigkeit zur knochengesunden bzw. osteoporotischen Gruppe am Material in keinem Versuch angesichts der großen Unterschiede zwischen den ZKs einen signifikanten Einfluss. Dennoch lagen die absoluten Ergebnisse der knochengesunden Gruppe für Zellvitalität, mineralisierte Fläche und ALP-Aktivität nach 14 Tagen im Mittel immer über ihren osteoporotischen Vergleichspartnern. Nach 33 Tagen ließ sich nur in den knochengesunden Kulturen, welche insgesamt einen höheren Kalziumverbrauch zeigten, der Einfluss der Testmaterialien erkennen.

Da die Versuche mit Testmaterialien niedrigen Risedronatgehalts nach jenen mit höheren Wirkstoffmengen durchgeführt wurden, wurden hier andere zum Teil spätere Passagen verwendet. Somit handelt es sich um möglicherweise unterschiedlich zusammengesetzte Kulturen, was beim Vergleich der beiden Versuche beachtet werden sollte. Seneszenzphänomene sind aber bei den verwendeten Passagen noch nicht zu erwarten.

Die Auswahl variierender Spender und die Zusammensetzung der Gruppen ist aber nicht nur kritisch zu betrachten. Insbesondere das osteoporotische Kollektiv spiegelt in seiner Zusammenstellung die Epidemiologie der postmenopausalen Osteoporose wider. Bei

Männern oder jungen Frauen mit osteoporotischem Knochenstatus müsste mit hoher Wahrscheinlichkeit von einer anderen Ätiologie der Osteoporose als der Östrogendefizienz ausgegangen werden. Somit spiegelt die osteoporotische Gruppe zugleich die häufigste und relevanteste Patientengruppe wider. Der Einschluss von Männern und auch jüngeren Frauen im knochengesunden Vergleichskollektiv hingegen stellt sicher, dass tatsächlich ein gesunder Knochenstatus vorliegt. So bestünde bei der Auswahl älterer Frauen aus Stratifizierungsgründen die Gefahr, dass bereits ein veränderter Knochenstoffwechsel vorliegt, der aber aufgrund einer hohen initialen BMD noch nicht zur Diagnose der Osteoporose geführt hat. Wann der Krankheitsverlauf durch Verschlechterung der Knochenmineralisierung und –architektur klinisch auffällig wird, hängt nicht zuletzt von der zuvor erreichten maximalen Knochendichte ab, sodass die Pathophysiologie, die zur Osteoporose führt, möglicherweise unerkannt bereits eingesetzt hat.

Zwar erschwert die Auswahl verschiedener Spender und heterogener Kulturen und Gruppen aufgrund multipler Einfluss- und Störfaktoren bei dieser Kollektivgröße den statistisch sicheren Nachweis einzelner Effekte. Der Nachweis der Biokompatibilität der PEK-P Beschichtung ist auf diese Weise aber in einem differenzierten Patientenkollektiv und in repräsentativen Bohrmehlkulturen gelungen, welche einen relativ großen Ausschnitt der Population und das relevante Patientengut abbilden.

#### **4.6 Fazit**

Die zu Beginn gestellte Fragestellung kann zusammenfassend wie folgt beantwortet werden:

Im untersuchten Gesamtkollektiv ließen sich keine Anhaltspunkte für eine direkt zytotoxische Wirkung der PEK-P Beschichtung von Ti-40Nb Platten auf die verwendeten MSC erkennen. Im Differenzierungsmedium wiesen morphologische Veränderungen eine Steigerung der ALP-Aktivität im Gesamtprotein, die Kalzifizierung der extrazellulären Matrix sowie ein steigender Kalziumverbrauch aus dem Medium auf eine osteogene Differenzierung der MSC Kulturen hin. Eine Beeinflussung der Differenzierung durch PEK-Partikel wurde nicht beobachtet. Die Verwendung einer Ti-40Nb Platte schien die Menge an Kalziumablagerungen positiv zu beeinflussen. Höhere Dosen von Risedronat wirkten sich vor allem zu Versuchsbeginn toxisch auf die MSC aus. Der Wirkstoff wurde durch PEK-P nachhaltig freigesetzt und in Kombination mit den Partikeln in seiner Wirkung verstärkt. Während die Kulturen nach einmonatigem Versuchsverlauf sehr unterschiedliche Stoffwechselliveaus und osteogene Aktivität zeigten, traten Unterschiede zwischen einzelnen Testmaterialien stärker in Kulturen

knochengesunder Spender zu Tage, welche häufiger höhere Aktivität zeigten. Insbesondere wirkstofffreie PEK-P beschichtete Platten zeigten gegenüber anderen Kontrollen nach 31 Tagen die günstigeren für Vitalität und Differenzierung ermittelten Werte.

Zur besseren Einschätzung des Differenzierungserfolges und Validität der Alizarinrot S Färbung als Indikator für Knochenmatrix sollte in Zukunft eine Charakterisierung der kalzifizierten Matrix, welche von den MSC Kulturen gebildet wurde, erfolgen. Dies könnte z. B. durch einmalige elektronenmikroskopische Darstellung der Ablagerungen und den Vergleich mit mineralisierender Knochenmatrix oder durch Analyse der genauen chemischen Zusammensetzung geschehen. Damit wäre sichergestellt, dass es sich nicht um amorphe Kalzifizierungen oder Aggregate von Kalzium und Monophosphat aus Spaltprodukten des Glycerophosphats im Medium durch die ALP handelt.

Um Anhaltspunkte für die Ausreifung der MSC zu erhalten, sollte in Zukunft Osteokalzinfreies Medium verwendet werden oder alternativ der Marker auf Expressionsebene nachgewiesen werden. Osteokalzin und andere nicht kollagene Matrixproteine sind für korrektes Wachstum und globulare Anordnung der Mineralkristalle essenziell. Hierbei verhindert Osteokalzin die überschießende Mineralisierung dieser kalzifizierenden Noduli, bevor diese nach Kontakt mit Kollagenfibrillen die Mineralisierung dieser entlang der Superhelices initiieren (Hasegawa 2018). Eine Regulation der Menge dieses Proteins durch Osteoblasten in ihrer Umgebung wäre vorstellbar. Eine mögliche Regulation des Osteokalzins durch MSC wären ebenfalls eine interessante Fragestellung für weiterführende Versuche etwa durch Nachverfolgung und Lokalisation des markierten Proteins.

Eine weitere Einschränkung der Zusammensetzung der MSC Kulturen erscheint angesichts der großen Heterogenität der Ergebnisse zwischen einzelnen ZKs sinnvoll. Hierfür wäre allerdings zuvor die sichere Identifizierung einer dezidiert osteogenen Progenitorzelle und ihre Entsprechung in der Bohrmehlkultur notwendig. Auch das Zusammenspiel der Mikroumgebung der Knochenbildung darf dabei nicht außer Acht gelassen werden. Anhand einheitlicherer Zellkulturen ließe sich aber z. B. der Einfluss des Knochenstatus oder Geschlechtes der Spender besser untersuchen.

Eine Untersuchung geringerer Risedronatdosen auf MSC sollte in Zukunft in kontrollierter Weise an einem einheitlicheren Kollektiv unabhängig von PEK-P Applikation erfolgen. Sollte sich hier eine osteoanabole Wirkung im niedrigen Konzentrationsbereich auf Bohrmehl-MSK bestätigen, wäre der Wirkstoff ein idealer Kombinationspartner für PEK-Partikel, welche den Wirkstoff effektiv freisetzen. Eine

noch gleichmäßigere Wirkstofffreisetzung über längere Zeiträume wäre hierfür aber noch eine Voraussetzung, um die Kumulation antiresorptiver zytotoxischer Dosen, wie sie bei systemischer Gabe und während der Knochenresorption entstehen, zu verhindern. Zur Vermeidung der Nebenwirkungen systemischer Risedronatgabe erscheint eine lokale Applikation von Risedronat über Beschichtungen auf Polyelektrolytkomplexpartikelbasis bei weiter optimierter langanhaltender Wirkstofffreisetzung anhand der vorliegenden Ergebnisse vielversprechend. PEK-Partikel bildeten eine adhärente Beschichtung, setzten den Wirkstoff im Vergleich zum einfachen Film langfristig frei und zeigten zu jedem Zeitpunkt eine uneingeschränkte Biokompatibilität mit Bohrmehl-MSD.

## 5 Zusammenfassung

Die Versorgung von Frakturen mit Osteosynthesematerial und der erfolgreiche Einsatz von Implantaten stellt vor dem Hintergrund systemischer Knochenerkrankungen, insbesondere der Osteoporose, eine Herausforderung dar. Gerade in einer zunehmend älteren Gesellschaft ist eine steigende Inzidenz von Frakturen zu erwarten. Nicht zuletzt bedeuten durch Osteoporose bedingte Knochenbrüche eine gesamtgesellschaftliche ökonomische Belastung und für die Betroffenen oftmals eine dauerhafte Einschränkung ihrer Lebensqualität. Die Verbesserung der Materialeigenschaften von Implantat- und Osteosynthesematerialien ist ein Ansatz, um den Behandlungserfolg weiter zu verbessern. In dieser Arbeit wurden Polyelektrolytkomplex-Nanopartikel, welche mit dem zur Behandlung der Osteoporose zugelassenen Wirkstoff Risedronat beladen wurden, hinsichtlich ihrer Eignung als funktionalisierende Beschichtung für Titanoberflächen evaluiert.

Anhand von Kulturen mesenchymaler Stromazellen aus Bohrmehlproben jeweils fünf knochengesunder und osteoporotischer Individuen verschiedenen Alters und Geschlechts wurde der Einfluss der Testmaterialien auf die osteogene Differenzierung, Lebensdauer und Funktion von Zellen der osteogenen Reihe untersucht. Gerade diese Zellen sind von Interesse, da eine gegenüber der Knochenresorption zu geringe Knochenformierung durch Osteoblasten und eine gesteigerte Apoptose von Osteozyten zu pathologischem Knochenschwund führen.

Auf Platten aus einer für Knochenersatzmaterialien entwickelten Titan-Niob Legierung mit einer Beschichtung aus risedronathaltigen Polyelektrolytkomplex-Nanopartikeln wurden mesenchymale Stromazellen kultiviert. Nach Zugabe von osteogenem Differenzierungsmedium wurde zu verschiedenen Zeitpunkten die Zellvitalität, der Erfolg der osteogenen Differenzierung sowie das Ausmaß der Mineralisierung extrazellulärer Matrix für das oben beschriebene Material im Vergleich zu Platten mit einer Beschichtung aus direkt aufgebrachtem Risedronat und unbeladenen Nanopartikeln, mit unbeschichteten Platten sowie mit materialfreien Zellkulturen bestimmt. Hierfür wurden MTT-Zellvitalitätsassays und mikroskopische Lebendzellbeobachtungen durchgeführt, die Kalzium- und Osteokalzinkonzentration im Überstand gemessen, die Aktivität der alkalischen Phosphatase in Bezug auf das Gesamtprotein im Zellysat bestimmt sowie extrazelluläre Kalziumablagerungen mit Alizarinrot S Farbstoff gefärbt und quantifiziert.

Risedronat wirkte unter Verwendung größerer Mengen von  $2,5 \times 10^{-7}$  mol bereits zu Beginn der Versuchszeit toxisch auf die Zellkulturen. Dies wurde früh mikroskopisch sowie am Ende der einmonatigen Versuchszeit anhand des Vitalitätsassays und der

durch Kalziummessungen nachvollzogenen Mineralisierung sichtbar. Die Wirkung des Medikaments wurde dabei durch eine Applikation über die Polyelektrolytkomplex-Nanopartikelbeschichtung verstärkt und trat insbesondere im knochengesunden Kollektiv zum Vorschein. Die wirkstofffreie Polyelektrolytkomplex-Nanopartikelbeschichtung selbst hatte hierbei zu keinem Zeitpunkt einen toxischen Einfluss.

Nach starker Verringerung der Risedronatmenge auf  $2,5 \times 10^{-11}$  mol in einen Bereich, in welchem protektive Effekte auf Osteoblasten erwartet werden, konnten bei starker individueller Abweichung einzelner Zellkulturen voneinander keine Auswirkungen des Wirkstoffes nachgewiesen werden. Ein signifikanter Anstieg an Kalziumablagerungen unter Verwendung wirkstofffreier Titan-Niob-Platten blieb für Kombinationen mit selbst geringen Risedronatmengen jedoch aus.

Einen beobachteten Abfall der Osteokalzinkonzentration im Überstand gegen Ende der Versuchszeit gilt es weiter zu untersuchen.

Insgesamt zeigten Polyelektrolytkomplex-Nanopartikel als adhärente Beschichtung eine uneingeschränkte Biokompatibilität mit mesenchymalen Stromazellen im Verlauf ihrer osteogenen Differenzierung. Zudem setzten sie ihren Wirkstoff effektiv frei. Vorbehaltlich einer weiter verbesserten Freisetzungskinetik und Bestätigung osteoprotektiver Effekte in nanomolaren Konzentrationsbereichen wären risedronathaltige Polyelektrolytkomplex-Nanopartikel zur lokalen Funktionalisierung von Titanoberflächen vielversprechend und könnten Nebenwirkungen einer systemischen Risedronattherapie an Implantaten vermeiden helfen.

## 6 Summary

Even today, the successful treatment of bone fractures or joint replacement using implant materials poses a great challenge under osteoporotic conditions. Further improvement of implant material properties is needed considering the rising number of fractures caused by population aging in most societies. The functionalization of material surfaces is one approach to ease the immense costs and individual suffering of unsuccessful therapy for frail patients. Hence, this study investigated the suitability of polyelectrolyte complex nanoparticles containing the bone therapeutic risedronate as an interfacial drug delivery system, by evaluating its biocompatibility and influence on mesenchymal bone cells, also known as stromal cells. The differentiation of osteogenic precursor cells found in mesenchymal stromal cell cultures and prevention of osteoblast apoptosis are important therapeutic targets to preserve bone formation.

Cultures of reaming debris derived mesenchymal stromal cells representing five bone healthy and five osteoporotic donors were seeded on test materials. The test materials consisted of Titan-Niob alloy discs that were coated with risedronate loaded polyelectrolyte complex nanoparticles. Comparisons were made between the test material and the untreated disc as well as coatings of drug-free particles or dried risedronate solution, and material free cultures. After differentiation along the osteogenic lineage, the successful differentiation, cell viability and osteogenic function were evaluated. For this purpose MTT-cell viability assays, microscopic examination, soluble calcium and osteocalcin marker-protein quantification, alkaline phosphatase kinetics and Alizarinred S staining of calcium deposits were performed.

Higher levels ( $2,5 \times 10^{-7}$  mol) of incorporated risedronate showed toxic effects visible under the microscope as early as day one and lead to decreased cell viability and mineralization 35 days later. Drug released from particles had a greater impact compared to dried risedronate coatings. Differences were more notable in bone-healthy cultures. However, drug-free polyelectrolyte particles alone showed no cytotoxicity or adverse effects on differentiation.

Reduced drug content of  $2,5 \times 10^{-11}$  mol resulting in concentrations consistent with reported antiapoptotic effects on osteogenic cells, yielded no conclusive results. Donor dependent variability exceeded possible material effects by far and increased over experimental time. The depletion of osteocalcin after media change towards the end of the experiments needs further investigation.

In conclusion, this study confirmed the compatibility of polyelectrolyte complex nanoparticles as a drug-delivering surface modification for implant materials with mesenchymal stromal cells during osteogenic differentiation as well as their ability to effectively release bone therapeutics. To be used together with risedronate, a stable release kinetic that prevents toxic initial concentrations and further testing in the low concentration range are needed. Keeping that in mind, risedronate loaded polyelectrolyte complex nanoparticles could help to locally improve implant stability and reduce complications of systemic drug administration.

## 7 Abkürzungs-, Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

aktives Vitamin D <sub>3</sub>	1,25-Dihydroxycholecalciferol
ALP	alkalische Phosphatase
ANOVA	univariate einfaktorielle Varianzanalyse
anti-OST-HRP conjugate	mit Meerrettich-Peroxidase konjugierte Anti-Osteokalzin-Antikörper
BMD	bone mineral density
BMP	bone morphogenic protein
BMU	basic multicellular unit
BRC	bone remodeling compartment
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
Ca <sup>2+</sup>	Kalziumionen
CD	cluster of differentiation
CFU-F	colony-forming unit-fibroblast
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Cx43	Connexin 43
Dkk 1	Dickkopfprotein 1
Dlx5	distal-less homeobox
DMEM	Dulbecco's modifiziertem Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DXA	dual energy X-ray absorptiometry
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
eph	Ephrine
ERK	extracellular-signal-regulated Kinase
F-12K Medium	Ham's F-12K (Kaighn's) Medium
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FBS	Fötales bovines Serum
FTIR	Fourier transform infrared spectroscopy
GTP	Guanosintriphosphat
HME	hematopoietic microenvironment
hOsteokalzin	humanes Osteokalzin

IFW	Institut für Metallische Werkstoffe des Leibniz-Institut für Festkörper- und Werkstoffforschung
IGF-1	Insulin-like growth factor-1
IL	Interleukin
IPF	Leibniz-Institut für Polymerforschung Dresden e.V.
M-CSF	Makrophagen colony-stimulating factor
mMSC	mature MSC
MSC	Verwendung synonym für mesenchymale Stammzelle und multipotente mesenchymale Stromazelle
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
Mx-1	myxovirus resistance-1
OPG	Osteoprotegerin
OSX	Osterix
PBS	Phosphate buffered saline phosphatgepufferte Salzlösung
PEG	Polyethylenglykol
PEK-P	Polyelektrolytkomplex-Nanopartikel
PFA	Parafomaldehyd
pNPP	<i>p</i> -Nitrophenylphosphat
PTH	Parathormon
PTP	Proteintyrosinphosphatasen
RANKL	receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand
RIS	Risedronat
RIS-PEK-P	Risedronatbeladene Polyelektrolytkomplex-Nanopartikel
rpm	rounds per minute
RS-Zellen	rapidly self-renewing Zellen
Runx2	runt-related transcription factor
sema	Semaphorine
Src	eine Tyrosinkinase (Sarcoma)
SSC	skelettale Stammzelle
Ti-40Nb	Titanlegierung mit 40 % Niobanteil

Ti-40Nb + PEK-P	mit wirkstofffreien PEK-Partikeln beschichtete Ti-40Nb Platten
Ti-40Nb + RIS	Ti-40Nb Platten mit Risedronatfilm
Ti-40Nb + RIS-PEK-P	mit risedronathaltigen PEK-P beschichtete Ti-40Nb Platten (Gesamtwirkstoffmenge $2,5 \times 10^{-7}$ )
Ti-40Nb + RIS-PEK-P mikro	Wirkstoffarme Ti-40Nb + RIS-PEK-P Variante mit großen Partikeln (Gesamtwirkstoffmenge $2,5 \times 10^{-11}$ )
Ti-40Nb + RIS-PEK-P nano	Wirkstoffarme Ti-40Nb + RIS-PEK-P Variante mit kleinen Partikeln (Gesamtwirkstoffmenge $2,5 \times 10^{-11}$ )
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
WHO	World Health Organisation
ZK	Zellkultur

### Einheiten

Gebräuchliche Einheiten wurden im Text nicht gesondert eingeführt.

%	Prozent
°C	Grad Celsius
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ m	Mikrometer
h	Stunden
IU	international units
l	Liter
M	mol pro Liter
m	Meter
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimol pro Liter
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
pH	power of Hydrogen

## 7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Mechanismus des Knochenremodelings durch die bone cellular unit.....	4
Abbildung 2: Plattenlayout der Zellkulturversuche .....	23
Abbildung 3: Osteokalzinkonzentration gemessen im Leermedium der Versuche Z03 und Z06 an verschiedenen Tagen.....	27
Abbildung 4: Osteokalzinkonzentration in den Versuchswells im Verlauf einer Woche für eine ZK exemplarisch.....	27
Abbildung 5: Funktionsprinzip des human Osteokalzin Sandwich ELISAs.....	28
Abbildung 6: Gefärbte mineralisierte Ablagerungen nach Alizarinrot S Färbung.....	31
Abbildung 7: Funktionsprinzip der histomorphometrischen Bestimmung der mineralisierten Fläche. ....	32
Abbildung 8: Verschiedene knochengesunde (A-D) und osteoporotische (E-H) Spenderkulturen 48 h nach Aussaat in Kulturmedium. ZK: Zellkultur, P: Passagezahl	36
Abbildung 9: Exemplarische Darstellung des Verlaufs der osteogenen Differenzierung anhand der ZK 108 (knochengesund) und ZK 71 (osteoporotisch).....	38
Abbildung 10: Übersicht der Zellmorphologie am Interface verschiedener Materialien am ersten Tag nach Versuchsstart.....	39
Abbildung 11: Vergleich der Differenzierung am Interface zwischen Ti-40Nb + risedronatbeladenen PEK-Partikeln (oben) und Ti-40Nb + PEK-Partikel ohne Wirkstoff (unten).....	40
Abbildung 12: Einfluss geringerer Risedronatmengen auf die Zellmorphologie. ....	41
Abbildung 13: Übersicht über die Zellmorphologie am Interface der risedronatreduzierten Materialien im Versuchsverlauf.....	42
Abbildung 14: Konzentration von Kalziumionen im Überstand an Tag 0.....	43
Abbildung 15: Prozentuale Abnahme der Kalziumkonzentration im Medium einen Tag nach Mediumwechsel im Versuchsverlauf bis Versuchstag 25.....	44
Abbildung 16: Prozentuale Abnahme der Kalziumkonzentration im Kulturmedium gemessen einen Tag nach Mediumwechsel.....	45
Abbildung 17: Mittelwert der mineralisierten Fläche im repräsentativen Ausschnitt des Wells für osteoporotische und knochengesunde Kulturen zum Zeitpunkt: 14 Tage. ...	46
Abbildung 18: Mineralisierte Fläche in Prozent der materialfreien Kontrolle. Für osteoporotische und knochengesunde Kulturen zum Zeitpunkt: 14 Tage.....	47
Abbildung 19: Extinktionswerte nach Rückgewinnung des Alizarinrot S Farbstoffes aus dem Well. Für osteoporotische und knochengesunde Kulturen zum Zeitpunkt 14 Tage. ....	48

Abbildung 20: Farbstoff aus mineralisierter Matrix nach Alizarinrot S Rückgewinnung als Vielfaches der materialfreien Kontrolle für einzelne Materialien.....	48
Abbildung 21: Osteokalzinkonzentration im Kulturmedium für knochengesunde und osteoporotische Spender.....	49
Abbildung 22: Auf Gesamtprotein normalisierte ALP-Aktivität an Tag 7 bzw. 14 der osteogenen Differenzierung. ....	50
Abbildung 23: Verteilungen der ALP-Aktivität, für osteoporotische und knochengesunde Spender an Tag 7 und 14.....	51
Abbildung 24: Verteilungen der Extinktionen im MTT Test für knochengesunde und osteoporotische Spender.....	52
Abbildung 25: Zellvitalität einzelner ZKs als Vielfaches der materialfreien Kontrolle. ...	53
Abbildung 26: MTT Extinktionsdifferenzen für knochengesunde und osteoporotische Spender. ....	54
Abbildung 27: Zellvitalität jeder ZK relativ zur materialfreien Kontrolle für osteoporotische und knochengesunde Spender. Versuchstag 14. ....	54
Abbildung 28: Stammzeldifferenzierung und Populationsasymmetrie.....	59
Abbildung 29: Vergleich von Alter und Ergebnissen der FACS Charakterisierung der verwendeten Kulturen .....	78

### **7.3 Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1 Zusammenfassung der Spenderkollektive .....	22
---	----

## 8 Literaturverzeichnis

- Alt, V.; Thormann, U.; Ray, S.; Zahner, D.; Dürselen, L.; Lips, K. S. et al. (2013): A new metaphyseal bone defect model in osteoporotic rats to study biomaterials for the enhancement of bone healing in osteoporotic fractures. In: *Acta Biomater* 9 (6), S. 7035–7042.
- Andersen, T. L.; Abdelgawad, M. E.; Kristensen, H. B.; Hauge, E. M.; Rolighed, L.; Bollerslev, J. et al. (2013): Understanding coupling between bone resorption and formation: are reversal cells the missing link? In: *Am J Pathol* 183 (1), S. 235–246.
- Anderson, H. C. (2003): Matrix vesicles and calcification. In: *Curr Rheumatol Rep* 5 (3), S. 222–226.
- Anderson, P.; Carrillo-Gálvez, A. B.; García-Pérez, A.; Cobo, M.; Martín, F. (2013): CD105 (endoglin)-negative murine mesenchymal stromal cells define a new multipotent subpopulation with distinct differentiation and immunomodulatory capacities. In: *PLoS ONE* 8 (10), e76979.
- Asri, R. I. M.; Harun, W. S. W.; Samykano, M.; Lah, N. A. C.; Ghani, S. A. C.; Tarlochan, F.; Raza, M. R. (2017): Corrosion and surface modification on biocompatible metals: A review. In: *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 77, S. 1261–1274.
- Bakker, A. D.; Kroeze, R. J.; Korstjens, C.; Kleine, R. H. de; Frölke, J. P. M.; Klein-Nulend, J. (2011): Reaming debris as a novel source of autologous bone to enhance healing of bone defects. In: *J Biomed Mater Res A* 97 (4), S. 457–465.
- Bari, C. de; Dell'Accio, F.; Tylzanowski, P.; Luyten, F. P. (2001): Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. In: *Arthritis Rheum* 44 (8), S. 1928–1942.
- Barry, F.; Boynton, R.; Murphy, M.; Haynesworth, S.; Zaia, J. (2001): The SH-3 and SH-4 antibodies recognize distinct epitopes on CD73 from human mesenchymal stem cells. In: *Biochem Biophys Res Commun* 289 (2), S. 519–524.
- Barry, F. P.; Boynton, R. E.; Haynesworth, S.; Murphy, J. M.; Zaia, J. (1999): The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epitope on endoglin (CD105). In: *Biochem Biophys Res Commun* 265 (1), S. 134–139.
- Bassett, J. H. D.; Williams, G. R. (2008): Critical role of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in bone. In: *Bone* 43 (3), S. 418–426.

- Bellido, T. (2006): Downregulation of SOST/sclerostin by PTH: a novel mechanism of hormonal control of bone formation mediated by osteocytes. In: *J Musculoskelet Neuronal Interact* 6 (4), S. 358–359.
- Bellido, T.; Plotkin, L. I. (2011): Novel actions of bisphosphonates in bone: preservation of osteoblast and osteocyte viability. In: *Bone* 49 (1), S. 50–55.
- Bianco, P.; Cao, X.; Frenette, P. S.; Mao, J. J.; Robey, P. G.; Simmons, P. J.; Wang, C.-Y. (2013): The meaning, the sense and the significance: translating the science of mesenchymal stem cells into medicine. In: *Nat Med* 19 (1), S. 35–42.
- Bianco, P.; Riminucci, M.; Gronthos, S.; Robey, P. G. (2001): Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. In: *Stem Cells* 19 (3), S. 180–192.
- Bianco, P.; Robey, P. G.; Saggio, I.; Riminucci, M. (2010): “Mesenchymal” stem cells in human bone marrow (skeletal stem cells): a critical discussion of their nature, identity, and significance in incurable skeletal disease. In: *Hum Gene Ther* 21 (9), S. 1057–1066.
- Bonewald, L. F.; Harris, S. E.; Rosser, J.; Dallas, M. R.; Dallas, S. L.; Camacho, N. P. et al. (2003): von Kossa staining alone is not sufficient to confirm that mineralization in vitro represents bone formation. In: *Calcif Tissue Int* 72 (5), S. 537–547.
- Bragdon, B. C.; Bahney, C. S. (2018): Origin of reparative stem cells in fracture healing. In: *Curr Osteoporos Rep* 16 (4), S. 490–503.
- Buo, A. M.; Stains, J. P. (2014): Gap junctional regulation of signal transduction in bone cells. In: *FEBS Lett* 588 (8), S. 1315–1321.
- Burr, D. B. (2002): Targeted and nontargeted remodeling. In: *Bone* 30 (1), S. 2–4.
- Burr, D. B.; Allen, M. R. (2013): Basic and applied bone biology. Burlington: Elsevier Science; Elsevier.
- Caplan, A. I. (2017): Mesenchymal stem cells: time to change the name! In: *Stem Cells Transl Med* 6 (6), S. 1445–1451.
- Capulli, M.; Paone, R.; Rucci, N. (2014): Osteoblast and osteocyte: games without frontiers. In: *Arch Biochem Biophys* 561, S. 3–12.
- Casado-Díaz, A.; Santiago-Mora, R.; Dorado, G.; Quesada-Gómez, J. M. (2013): Risedronate positively affects osteogenic differentiation of human mesenchymal stromal cells. In: *Arch Med Res* 44 (5), S. 325–334.

- Chen, H.; Senda, T.; Kubo, K.-y. (2015): The osteocyte plays multiple roles in bone remodeling and mineral homeostasis. In: *Med Mol Morphol* 48 (2), S. 61–68.
- Clarke, B. (2008): Normal bone anatomy and physiology. In: *Clin J Am Soc Nephrol* 3 Suppl 3, S131-9.
- Colter, D. C.; Sekiya, I.; Prockop, D. J. (2001): Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (14), S. 7841–7845.
- Consensus development conference: diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis (1993). In: *Am J Med* 94 (6), S. 646–650.
- Cornberg, M.; Protzer, U.; Petersen, J.; Wedemeyer, H.; Berg, T.; Jilg, W. et al. (2011): Aktualisierung der S 3-Leitlinie zur Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Hepatitis-B-Virusinfektion. In: *Z Gastroenterol* 49 (7), S. 871–930.
- Dachverband Osteologie e.V. (2017): Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Osteoporose bei postmenopausalen Frauen und bei Männern. Leitlinie des Dachverbands der Deutschsprachigen Wissenschaftlichen Osteologischen Gesellschaften e.V. Online verfügbar unter [https://www.dv-osteologie.org/uploads/Leitlinie%202017/Finale%20Version%20Leitlinie%20Osteoporose%202017\\_end.pdf](https://www.dv-osteologie.org/uploads/Leitlinie%202017/Finale%20Version%20Leitlinie%20Osteoporose%202017_end.pdf), zuletzt geprüft am 08.11.2018.
- Datta, N.; Holtorf, H. L.; Sikavitsas, V. I.; Jansen, J. A.; Mikos, A. G. (2005): Effect of bone extracellular matrix synthesized in vitro on the osteoblastic differentiation of marrow stromal cells. In: *Biomaterials* 26 (9), S. 971–977.
- Davis, H. M.; Aref, M. W.; Aguilar-Perez, A.; Pacheco-Costa, R.; Allen, K.; Valdez, S. et al. (2018): Cx43 overexpression in osteocytes prevents osteocyte apoptosis and preserves cortical bone quality in aging mice. In: *JBMR Plus* 2 (4), S. 206–216.
- Dominici, M.; Le Blanc, K.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, F.; Krause, D. et al. (2006): Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. In: *Cytotherapy* 8 (4), S. 315–317.
- Dunford, J. E.; Thompson, K.; Coxon, F. P.; Luckman, S. P.; Hahn, F. M.; Poulter, C. D. et al. (2001): Structure-activity relationships for inhibition of farnesyl diphosphate synthase in vitro and inhibition of bone resorption in vivo by nitrogen-containing bisphosphonates. In: *J Pharmacol Exp Ther* 296 (2), S. 235–242.

- Eghbali-Fatourehchi, G. Z.; Lamsam, J.; Fraser, D.; Nagel, D.; Riggs, B. L.; Khosla, S. (2005): Circulating osteoblast-lineage cells in humans. In: *N Engl J Med* 352 (19), S. 1959–1966.
- Eghbali-Fatourehchi, G. Z.; Mödder, U. I. L.; Charatcharoenwitthaya, N.; Sanyal, A.; Undale, A. H.; Clowes, J. A. et al. (2007): Characterization of circulating osteoblast lineage cells in humans. In: *Bone* 40 (5), S. 1370–1377.
- Eimar, H.; Tamimi, I.; Murshed, M.; Tamimi, F. (2013): Cholinergic regulation of bone. In: *J Musculoskelet Neuronal Interact* 13 (2), S. 124–132.
- Espallargues, M.; Sampietro-Colom, L.; Estrada, M. D.; Solà, M.; del Rio, L.; Setoain, J.; Granados, A. (2001): Identifying bone-mass-related risk factors for fracture to guide bone densitometry measurements: a systematic review of the literature. In: *Osteoporos Int* 12 (10), S. 811–822.
- Fernández Vallone, V. B.; Romaniuk, M. A.; Choi, H.; Labovsky, V.; Otaegui, J.; Chasseing, N. A. (2013): Mesenchymal stem cells and their use in therapy: what has been achieved? In: *Differentiation* 85 (1-2), S. 1–10.
- Fleisch, H. (1998): Bisphosphonates: mechanisms of action. In: *Endocr Rev* 19 (1), S. 80–100.
- Flores-Silva, R.; Sasso, G. R. d. S.; Sasso-Cerri, E.; Simões, M. J.; Cerri, P. S. (2015): Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells. In: *Biomed Res Int* 2015.
- Friedenstein, A. J.; Chailakhyan, R. K.; Latsinik, N. V.; Panasyuk, A. F.; Keiliss-Borok, I. V. (1974): Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. In: *Transplantation* 17 (4), S. 331–340.
- Friedenstein, A. J.; Gorskaja, J. F.; Kulagina, N. N. (1976): Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. In: *Exp Hematol* 4 (5), S. 267–274.
- Frölke, J. P. M.; Nulend, J. K.; Semeins, C. M.; Bakker, F. C.; Patka, P.; Haarman, H. J. T. M. (2004): Viable osteoblastic potential of cortical reamings from intramedullary nailing. In: *J Orthop Res* 22 (6), S. 1271–1275.
- Frost, H. M. (1969): Tetracycline-based histological analysis of bone remodeling. In: *Calcif Tissue Res* 3 (1), S. 211–237.

- Gartlehner, G.; Patel, S. V.; Feltner, C.; Weber, R. P.; Long, R.; Mullican, K. et al. (2017): Hormone therapy for the primary prevention of chronic conditions in postmenopausal women: Evidence report and systematic review for the US preventive services task force. In: *JAMA* 318 (22), S. 2234–2249.
- Gordon, C. M.; Zemel, B. S.; Wren, T. A. L.; Leonard, M. B.; Bachrach, L. K.; Rauch, F. et al. (2017): The determinants of peak bone mass. In: *J Pediatr* 180, S. 261–269.
- Gregory, C. A.; Gunn, W. G.; Peister, A.; Prockop, D. J. (2004): An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. In: *Anal Biochem* 329 (1), S. 77–84.
- Guimarães-Camboa, N.; Cattaneo, P.; Sun, Y.; Moore-Morris, T.; Gu, Y.; Dalton, N. d. et al. (2017): Pericytes of multiple organs do not behave as mesenchymal stem cells in vivo. In: *Cell Stem Cell* 20 (3), 345-359.e5.
- Haasters, F.; Prall, W. C.; Anz, D.; Bourquin, C.; Pautke, C.; Endres, S. et al. (2009): Morphological and immunocytochemical characteristics indicate the yield of early progenitors and represent a quality control for human mesenchymal stem cell culturing. In: *J Anat* 214 (5), S. 759–767.
- Hasegawa, T. (2018): Ultrastructure and biological function of matrix vesicles in bone mineralization. In: *Histochem Cell Biol* 149 (4), S. 289–304.
- Hauge, E. M.; Qvesel, D.; Eriksen, E. F.; Mosekilde, L.; Melsen, F. (2001): Cancellous bone remodeling occurs in specialized compartments lined by cells expressing osteoblastic markers. In: *J Bone Miner Res* 16 (9), S. 1575–1582.
- Haynesworth, S. E.; Barer, M. A.; Caplan, A. I. (1992): Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. In: *Bone* 13 (1), S. 69–80.
- Hebert, C.; Stains, J. P. (2013): An intact connexin43 is required to enhance signaling and gene expression in osteoblast-like cells. In: *J Cell Biochem* 114 (11), S. 2542–2550.
- Helth, A.; Gostin, P. F.; Oswald, S.; Wendrock, H.; Wolff, U.; Hempel, U. et al. (2014): Chemical nanoroughening of Ti40Nb surfaces and its effect on human mesenchymal stromal cell response. In: *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater* 102 (1), S. 31–41.

- Hilton, C.; Boardman, H. (2018): Hormone therapy should not be prescribed for primary prevention of chronic medical conditions in asymptomatic postmenopausal women. In: *BMJ Evid Based Med* 23 (6), S. 231–232.
- Im, G.-I.; Qureshi, S. A.; Kenney, J.; Rubash, H. E.; Shanbhag, A. S. (2004): Osteoblast proliferation and maturation by bisphosphonates. In: *Biomaterials* 25 (18), S. 4105–4115.
- Jain, S.; Kumar, D.; Swarnakar, N. K.; Thanki, K. (2012): Polyelectrolyte stabilized multilayered liposomes for oral delivery of paclitaxel. In: *Biomaterials* 33 (28), S. 6758–6768.
- Kanis J. A. on behalf of the World Health Organization Scientific Group (2007): Assessment of osteoporosis at the primary health-care level. Technical Report. World Health Organization Collaborating Centre for Metabolic Bone Diseases, University of Sheffield UK. Online verfügbar unter [https://www.sheffield.ac.uk/FRAX/pdfs/WHO\\_Technical\\_Report.pdf](https://www.sheffield.ac.uk/FRAX/pdfs/WHO_Technical_Report.pdf), zuletzt geprüft am 08.11.2018.
- Kauschke, V.; Gebert, A.; Calin, M.; Eckert, J.; Scheich, S.; Heiss, C.; Lips, K. S. (2018): 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. In: *PLoS ONE* 13 (2), e0193468.
- Kennedy, O. D.; Herman, B. C.; Laudier, D. M.; Majeska, R. J.; Sun, H. B.; Schaffler, M. B. (2012): Activation of resorption in fatigue-loaded bone involves both apoptosis and active pro-osteoclastogenic signaling by distinct osteocyte populations. In: *Bone* 50 (5), S. 1115–1122.
- Khamis, A. K.; Elsharkawy, S. (2018): The influence of local delivery of bisphosphonate on osseointegration of dental implants. In: *Evid Based Dent* 19 (3), S. 82–83.
- Khatod, M.; Inacio, M. C. S.; Dell, R. M.; Bini, S. A.; Paxton, E. W.; Namba, R. S. (2015): Association of bisphosphonate use and risk of revision after THA: Outcomes from a US total joint replacement registry. In: *Clin Orthop Relat Res* 473 (11), S. 3412–3420.
- Knoch, F. von; Jaquiere, C.; Kowalsky, M.; Schaeren, S.; Alabre, C.; Martin, I. et al. (2005): Effects of bisphosphonates on proliferation and osteoblast differentiation of human bone marrow stromal cells. In: *Biomaterials* 26 (34), S. 6941–6949.

- Kolf, C. M.; Cho, E.; Tuan, R. S. (2007): Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. In: *Arthritis Res Ther* 9 (1), S. 204.
- Kristensen, H. B.; Andersen, T. L.; Marcussen, N.; Rolighed, L.; Delaisse, J.-M. (2014): Osteoblast recruitment routes in human cancellous bone remodeling. In: *Am J Pathol* 184 (3), S. 778–789.
- Kuznetsov, S. A.; Krebsbach, P. H.; Satomura, K.; Kerr, J.; Riminucci, M.; Benayahu, D.; Robey, P. G. (1997): Single-colony derived strains of human marrow stromal fibroblasts form bone after transplantation in vivo. In: *J Bone Miner Res* 12 (9), S. 1335–1347.
- Leclerc, J.-T.; Michou, L.; Vaillancourt, F.; Pelet, S.; Simonyan, D.; Belzile, E. L. (2018): Prevalence and characteristics of atypical periprosthetic femoral fractures. In: *J Bone Miner Res*.
- Lezcano, V.; Bellido, T.; Plotkin, L. I.; Boland, R.; Morelli, S. (2012): Role of connexin 43 in the mechanism of action of alendronate: dissociation of anti-apoptotic and proliferative signaling pathways. In: *Arch Biochem Biophys* 518 (2), S. 95–102.
- Lezcano, V.; Bellido, T.; Plotkin, L. I.; Boland, R.; Morelli, S. (2014): Osteoblastic protein tyrosine phosphatases inhibition and connexin 43 phosphorylation by alendronate. In: *Exp Cell Res* 324 (1), S. 30–39.
- Lian, J. B.; Stein, G. S.; Javed, A.; van Wijnen, A. J.; Stein, J. L.; Montecino, M. et al. (2006): Networks and hubs for the transcriptional control of osteoblastogenesis. In: *Rev Endocr Metab Disord* 7 (1-2), S. 1–16.
- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. In: *J Biol Chem* 193 (1), S. 265–275.
- Maes, C.; Kobayashi, T.; Selig, M. K.; Torrekens, S.; Roth, S. I.; Mackem, S. et al. (2010): Osteoblast precursors, but not mature osteoblasts, move into developing and fractured bones along with invading blood vessels. In: *Dev Cell* 19 (2), S. 329–344.
- Marie, P. J.; Cohen-Solal, M. (2018): The expanding life and functions of osteogenic cells: from simple bone-making cells to multifunctional cells and beyond. In: *J Bone Miner Res* 33 (2), S. 199–210.
- Mashiba, T.; Hirano, T.; Turner, C. H.; Forwood, M. R.; Johnston, C. C.; Burr, D. B. (2000): Suppressed bone turnover by bisphosphonates increases microdamage

- accumulation and reduces some biomechanical properties in dog rib. In: *J Bone Miner Res* 15 (4), S. 613–620.
- Meloan, S. N.; Puchtler, H. (1985): Chemical mechanisms of staining methods: von Kossa's technique: what von Kossa really wrote and a modified reaction for selective demonstration of inorganic phosphates. In: *J Histotechnol* 8 (1), S. 11–13.
- Mets, T.; Verdonk, G. (1981): In vitro aging of human bone marrow derived stromal cells. In: *Mech Ageing Dev* 16 (1), S. 81–89.
- Moorer, M. C.; Stains, J. P. (2017): Connexin43 and the intercellular signaling network regulating skeletal remodeling. In: *Curr Osteoporos Rep* 15 (1), S. 24–31.
- Moroni, A.; Faldini, C.; Hoang-Kim, A.; Pegreff, F.; Giannini, S. (2007): Alendronate improves screw fixation in osteoporotic bone. In: *J Bone Joint Surg Am* 89 (1), S. 96–101.
- Mosmann, T. (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. In: *J Immunol Methods* 65 (1-2), S. 55–63.
- Müller, M. (2014): Sizing, shaping and pharmaceutical applications of polyelectrolyte complex nanoparticles. In: Martin Müller (Hg.): *Polyelectrolyte complexes in the dispersed and solid state II*, Bd. 256. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (Advances in Polymer Science), S. 197–260.
- Nauth, A.; Miclau, T.; Bhandari, M.; Schemitsch, E. H. (2011): Use of osteobiologics in the management of osteoporotic fractures. In: *J Orthop Trauma* 25 Suppl 2, S51-5.
- Ono, N.; Ono, W.; Nagasawa, T.; Kronenberg, H. M. (2014): A subset of chondrogenic cells provides early mesenchymal progenitors in growing bones. In: *Nat Cell Biol* 16 (12), S. 1157–1167.
- Otsuru, S.; Tamai, K.; Yamazaki, T.; Yoshikawa, H.; Kaneda, Y. (2008): Circulating bone marrow-derived osteoblast progenitor cells are recruited to the bone-forming site by the CXCR4/stromal cell-derived factor-1 pathway. In: *Stem Cells* 26 (1), S. 223–234.
- Owen, M.; Friedenstein, A. J. (1988): Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. In: *Ciba Found Symp* 136, S. 42–60.

- Owen, M.; MacPherson, S. (1963): Cell population kinetics of an osteogenic tissue. II. In: *J Cell Biol* 19, S. 33–44.
- Parfitt, A. M. (1994): Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. In: *J Cell Biochem* 55 (3), S. 273–286.
- Park, D.; Spencer, J. A.; Koh, B. I.; Kobayashi, T.; Fujisaki, J.; Clemens, T. L. et al. (2012): Endogenous bone marrow MSCs are dynamic, fate-restricted participants in bone maintenance and regeneration. In: *Cell Stem Cell* 10 (3), S. 259–272.
- Peterson, G. L. (1979): Review of the folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. In: *Anal Biochem* 100 (2), S. 201–220.
- Pisani, P.; Renna, M. D.; Conversano, F.; Casciaro, E.; Di Paola, M.; Quarta, E. et al. (2016): Major osteoporotic fragility fractures: Risk factor updates and societal impact. In: *World J Orthop* 7 (3), S. 171–181.
- Pittenger, M. F.; Mackay, A. M.; Beck, S. C.; Jaiswal, R. K.; Douglas, R.; Mosca, J. D. et al. (1999): Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. In: *Science* 284 (5411), S. 143–147.
- Plotkin, L. I.; Aguirre, J. I.; Kousteni, S.; Manolagas, S. C.; Bellido, T. (2005): Bisphosphonates and estrogens inhibit osteocyte apoptosis via distinct molecular mechanisms downstream of extracellular signal-regulated kinase activation. In: *J Biol Chem* 280 (8), S. 7317–7325.
- Plotkin, L. I.; Bellido, T. (2013): Beyond gap junctions: Connexin43 and bone cell signaling. In: *Bone* 52 (1), S. 157–166.
- Plotkin, L. I.; Manolagas, S. C.; Bellido, T. (2002): Transduction of cell survival signals by connexin-43 hemichannels. In: *J Biol Chem* 277 (10), S. 8648–8657.
- Plotkin, L. I.; Manolagas, S. C.; Bellido, T. (2006): Dissociation of the pro-apoptotic effects of bisphosphonates on osteoclasts from their anti-apoptotic effects on osteoblasts/osteocytes with novel analogs. In: *Bone* 39 (3), S. 443–452.
- Plotkin, L. I.; Weinstein, R. S.; Parfitt, A. M.; Roberson, P. K.; Manolagas, S. C.; Bellido, T. (1999): Prevention of osteocyte and osteoblast apoptosis by bisphosphonates and calcitonin. In: *J Clin Invest* 104 (10), S. 1363–1374.
- Prieto-Alhambra, D.; Javaid, M. K.; Judge, A.; Murray, D.; Carr, A.; Cooper, C.; Arden, N. K. (2011): Association between bisphosphonate use and implant survival after

- primary total arthroplasty of the knee or hip: population based retrospective cohort study. In: *BMJ* 343, d7222.
- Puchtler, H.; Meloan, S. N.; Terry, M. S. (1969): On the history and mechanism of alizarin and alizarin red S stains for calcium. In: *J Histochem Cytochem* 17 (2), S. 110–124.
- Robling, A. G.; Niziolek, P. J.; Baldrige, L. A.; Condon, K. W.; Allen, M. R.; Alam, I. et al. (2008): Mechanical stimulation of bone in vivo reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin. In: *J Biol Chem* 283 (9), S. 5866–5875.
- Rogers, M. J.; Crockett, J. C.; Coxon, F. P.; Mönkkönen, J. (2011): Biochemical and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. In: *Bone* 49 (1), S. 34–41.
- Sacchetti, B.; Funari, A.; Michienzi, S.; Di Cesare, S.; Piersanti, S.; Saggio, I. et al. (2007): Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. In: *Cell* 131 (2), S. 324–336.
- Sacchetti, B.; Funari, A.; Remoli, C.; Giannicola, G.; Kogler, G.; Liedtke, S. et al. (2016): No identical “Mesenchymal Stem Cells” at different times and sites: human committed progenitors of distinct origin and differentiation potential are incorporated as adventitial cells in microvessels. In: *Stem Cell Reports* 6 (6), S. 897–913.
- Sahni, M.; Guenther, H. L.; Fleisch, H.; Collin, P.; Martin, T. J. (1993): Bisphosphonates act on rat bone resorption through the mediation of osteoblasts. In: *J Clin Invest* 91 (5), S. 2004–2011.
- Sarrazin, C.; Zimmermann, T.; Berg, T.; Neumann, U. P.; Schirmacher, P.; Schmidt, H. et al. (2018): S3-Leitlinie „Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Hepatitis-C-Virus (HCV) -Infektion“. In: *Z Gastroenterol* 56 (7), S. 756–838.
- Sato, M.; Grasser, W.; Endo, N.; Akins, R.; Simmons, H.; Thompson, D. D. et al. (1991): Bisphosphonate action. Alendronate localization in rat bone and effects on osteoclast ultrastructure. In: *J Clin Invest* 88 (6), S. 2095–2105.
- Satomura, K.; Krebsbach, P.; Bianco, P.; Gehron Robey, P. (2000): Osteogenic imprinting upstream of marrow stromal cell differentiation. In: *J Cell Biochem* 78 (3), S. 391–403.
- Schilcher, J.; Koeppen, V.; Aspenberg, P.; Michaëlsson, K. (2014): Risk of atypical femoral fracture during and after bisphosphonate use. In: *N Engl J Med* 371 (10), S. 974–976.

- Schilcher, J.; Michaëlsson, K.; Aspenberg, P. (2011): Bisphosphonate use and atypical fractures of the femoral shaft. In: *N Engl J Med* 364 (18), S. 1728–1737.
- Sherley, J. L. (2002): Asymmetric cell kinetics genes: the key to expansion of adult stem cells in culture. In: *Stem Cells* 20 (6), S. 561–572.
- Sözen, T.; Özişik, L.; Başaran, N. Ç. (2016): An overview and management of osteoporosis. In: *Eur J Rheumatol* 4 (1), S. 46–56.
- Stavropoulos, A.; Bertl, K.; Pietschmann, P.; Pandis, N.; Schiødt, M.; Klinge, B. (2018): The effect of antiresorptive drugs on implant therapy: Systematic review and meta-analysis. In: *Clin Oral Implants Res* 29 Suppl 18, S. 54–92.
- Stein, G. S.; Lian, J. B.; Owen, T. A. (1990): Bone cell differentiation: A functionally coupled relationship between expression of cell-growth- and tissue-specific genes. In: *Current Opinion in Cell Biology* 2 (6), S. 1018–1027.
- Striegler, C.; Schumacher, M.; Effenberg, C.; Müller, M.; Seckinger, A.; Schnettler, R. et al. (2015): Dendritic glycopolymer as drug delivery system for proteasome inhibitor bortezomib in a calcium phosphate bone cement: First steps toward a local therapy of osteolytic bone lesions. In: *Macromol Biosci* 15 (9), S. 1283–1295.
- Taichman, R. S. (2005): Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. In: *Blood* 105 (7), S. 2631–2639.
- Trinkaus, K.; Wenisch, S.; Siemers, C.; Hose, D.; Schnettler, R. (2005): Bohrmehl: Eine Quelle vitaler Zellen! Erste Ergebnisse von humanen Proben. In: *Unfallchirurg* 108 (8), S. 650–656.
- Tsourdi, E.; Jähn, K.; Rauner, M.; Busse, B.; Bonewald, L. F. (2018): Physiological and pathological osteocytic osteolysis. In: *J Musculoskelet Neuronal Interact* 18 (3), S. 292–303.
- Vehlow, D.; Schmidt, R.; Gebert, A.; Siebert, M.; Lips, K. S.; Müller, M. (2016): Polyelectrolyte complex based interfacial drug delivery system with controlled loading and improved release performance for bone therapeutics. In: *Nanomaterials (Basel)* 6 (3).
- Watt, F. M.; Hogan, B. L. (2000): Out of Eden: stem cells and their niches. In: *Science* 287 (5457), S. 1427–1430.
- Weinstein, R. S.; Manolagas, S. C.; Weinstein, R. S.; Manolagas, S. C. (2000): Apoptosis and osteoporosis. In: *Am J Med* 108 (2), S. 153–164.

- Wenisch, S.; Trinkaus, K.; Hild, A.; Hose, D.; Heiss, C.; Alt, V. et al. (2006):  
Immunochemical, ultrastructural and electrophysiological investigations of bone-  
derived stem cells in the course of neuronal differentiation. In: *Bone* 38 (6), S.  
911–921.
- Wenisch, S.; Trinkaus, K.; Hild, A.; Hose, D.; Herde, K.; Heiss, C. et al. (2005): Human  
reaming debris: a source of multipotent stem cells. In: *Bone* 36 (1), S. 74–83.
- Yang, Y.-H. K.; Ogando, C. R.; Wang See, C.; Chang, T.-Y.; Barabino, G. A. (2018):  
Changes in phenotype and differentiation potential of human mesenchymal stem  
cells aging in vitro. In: *Stem Cell Res Ther* 9 (1), S. 131.
- Zuk, P. A.; Zhu, M.; Ashjian, P.; Ugarte, D. A. de; Huang, J. I.; Mizuno, H. et al. (2002):  
Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. In: *Mol Biol Cell* 13  
(12), S. 4279–4295.

## 9 Publikationsverzeichnis

### **Im Zusammenhang mit dieser Arbeit entstandene Publikation:**

Vehlow, D.; Schmidt, R.; Gebert, A.; **Siebert, M.**; Lips, K. S.; Müller, M. (2016): Polyelectrolyte complex based interfacial drug delivery system with controlled loading and improved release performance for bone therapeutics. In: *Nanomaterials* (Basel, Switzerland) 6 (3). DOI: 10.3390/nano6030053.

### **Kongressbeitrag:**

**Siebert M.**, Vehlow D., Schmidt, R., Gebert A., Dakischew O., Heiß C., Müller M., Lips K. S., (2016, September). Cellular compatibility of risedronate loaded polyelectrolyte-complex nanoparticles in vitro. Vortrag auf: MSE-Congress 2016. *Deutsche Gesellschaft für Materialkunde e.V. Darmstadt, Deutschland*

## 10 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 nachstehend spezifiziert. 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.“

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

## 11 Danksagung

Ich danke an dieser Stelle Frau Prof. Dr. Katrin Lips für ihre hervorragende Betreuung über den gesamten Zeitraum während der Erstellung dieser Arbeit, der tatkräftigen Unterstützung bei allen Problemen inhaltlicher oder praktischer Natur und die gute und warmherzige persönliche Zusammenarbeit! Auch für die Möglichkeit die Arbeit in der Experimentellen Unfallchirurgie verfassen zu können, will ich mich bedanken.

Der Deutschen Forschungsgesellschaft (DFG) danke ich für die Förderung des Sonderforschungsbereichs/Transregio 79, Teilprojekt B7 in dessen Rahmen dieses Projekt entstanden ist. Im Zuge dessen gilt mein Dank auch den überregionalen Partnern im Sonderforschungsbereich insbesondere Herrn Dr. Martin Müller und Herrn David Vehlow am Leibniz-Institut für Polymerforschung Dresden e.V. sowie Frau Dr. Annett Gebert und Romy Schmidt am Institut für Metallische Werkstoffe, Leibniz-Institut für Festkörper- und Werkstoffforschung Dresden für die enge Zusammenarbeit und Bereitstellung der Testmaterialien.

Weiterhin möchte ich Herrn Prof. Dr. Dr. Christian Heiß sowie den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Experimentellen Unfallchirurgie danken, ohne deren Unterstützung diese Dissertation nicht zustande gekommen wäre. Insbesondere gilt mein Dank Frau Olga Dakischew für die kompetente Einarbeitung, ihre Hilfsbereitschaft und tatkräftige Anleitung in allen Belangen der Zellkultur und methodischen Feinheiten.

Schließlich danke ich meiner Familie und meinen Freunden für ihre Unterstützung weit über diese Arbeit hinaus.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the electronic version of the paper.**