

# Stimulation der Knochenheilung

## Werkstofftestung in der Kultur – Ein Rendezvous von Material und Zellen

Von Sabine Wenisch, Christian Heiß und Reinhard Schnettler

Ein Schwerpunkt der Forschungsarbeiten in der Gießener Unfallchirurgie liegt seit der Berufung von Prof. Reinhard Schnettler im Jahr 1995 an die Justus-Liebig-Universität auf der Untersuchung von Knochenersatzmaterialien. Diese Ersatzstoffe dienen der Behandlung von knöchernen Defekten, die der Körper aus eigener Kraft nicht regenerieren kann. Sie werden tagtäglich bei der Versorgung von Unfallverletzten, aber auch nach der chirurgischen Entfernung von Knochtumoren und -zysten klinisch eingesetzt. Bislang verfügbare Knochenersatzmaterialien sind in ihren Eigenschaften an das gesunde Skelett angepasst. Zur Behandlung von Defekten des systemisch erkrankten Knochens, wie beispielsweise bei der Osteoporose, existieren bis jetzt jedoch noch keine geeigneten Materialien. Dieser Herausforderung stellt sich der Sonderforschungsbereich Transregio 79 „Werkstoffe für die Hartgeweberegeneration im systemisch erkrankten Knochen“, an dem auch die Universitäten Dresden und Heidelberg beteiligt sind.

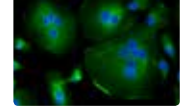
Unter der Vielzahl kommerziell erhältlicher Knochenersatzmaterialien ist die Gruppe der resorbierbaren Materialien auf der Basis von Calciumphosphat hervorzuheben, da sie in ihrer Zusammensetzung der anorganischen Phase des Knochens sehr ähnlich sind. Dadurch heilen sie besonders gut in den Knochen ein und werden sogar im Heilungsverlauf durch die Aktivität der Knochenzellen durch körpereigenes Knochengewebe ersetzt. Die knochenabbauenden Zellen, die Osteoklasten, bauen dann die Materialien ab, während die knochenbildenden Zellen, die Osteoblasten, neues Knochengewebe aufbauen. Dies setzt eine fein abgestimmte Wechselwirkung der Zellen voraus, deren ungestörter Ablauf nur dann gewährleistet ist, wenn die Materialien ein hohes Maß an Gewebeverträglichkeit aufweisen.

Seit der Bewilligung des Verbundforschungsvorhabens Transregio 79 im Jahr 2010 arbeiten verschiedene Arbeitsgruppen der Universität Gießen gemeinsam mit Wissenschaftlern der Standorte Dresden und Heidelberg an der Generierung von Implantaten und Knochenersatzmaterialien, die in ihren Eigenschaften genau an die veränderten biomechanischen

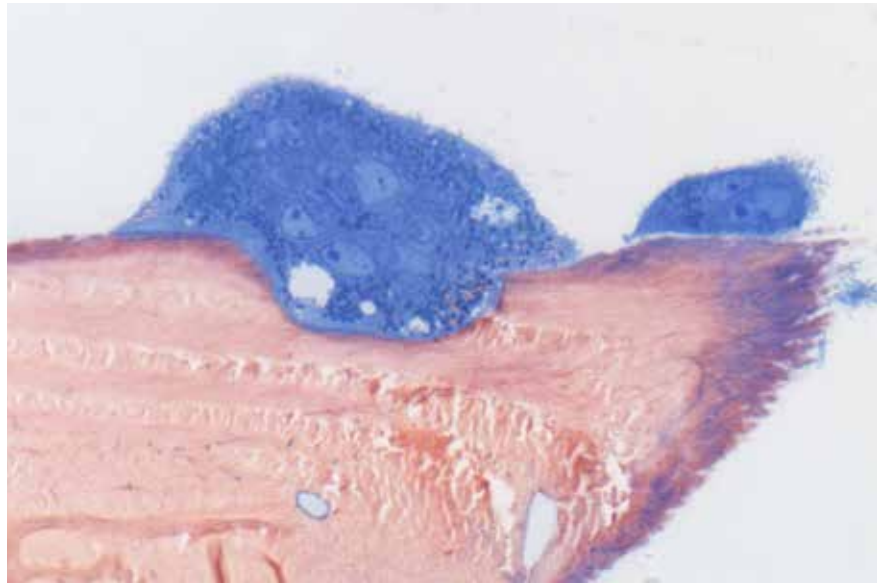
und zellbiologischen Verhältnisse von systemisch erkrankten Knochen angepasst sind. Repräsentativ für systemische Skeletterkrankungen stehen die Osteoporose und das Multiple Myelom, eine Tumorerkrankung, die in ihrem Verlauf zu zahlreichen knöchernen Defekten führt.

### Zellkultur- und Tiermodelle

Werkstoffe, die für die Therapie knöcherner Substanzverluste des gesunden und erkrankten Skeletts vorgesehen sind, müssen einer gründlichen Prüfung ihrer Gewebeverträglichkeit im Vorfeld des klinischen Einsatzes unterzogen werden. Dazu dienen Untersuchungen in der Zellkultur, denen sich aufwendige tierexperimentelle Studien anschließen. Am Standort Gießen erarbeiten die Forschergruppen in interdisziplinären Kooperationen Zellkultur- und Tiermodelle, die es ermöglichen, genaue Daten über die Gewebeverträglichkeit von Werkstoffen zu erheben. Die Untersuchungen in der Zellkultur geben wichtige Informationen darüber, wie die Zellen des Knochengewebes auf die Materialien für den Knochenersatz reagieren. Darüber hinaus sind sie ein wesentliches Instrument, um die Tierzahlen der ex-



■ Abb. 1: Mikroskopischer Ausschnitt aus der Zellkultur. Die Schnittdicke dieses unentkalkten Präparates beträgt lediglich 1  $\mu\text{m}$  und wurde mit dem 40er Objektiv aufgenommen. Der Knochen ist durch den Farbstoff Safranin rot gefärbt. Seine Oberflächen sind von knochenabbauenden Zellen, den Osteoklasten, besetzt. Diese sind durch den Farbstoff Toluidinblau in unterschiedlichen Blautönen hervorgehoben.



perimentellen Studien auf ein notwendiges Mindestmaß zu reduzieren. Dies stellt jedoch auch hohe Anforderungen an die Untersuchungsmethoden, die eine Mikroumgebung in der Kulturschale simulieren müssen, die den natürlichen Verhältnissen der Zellen innerhalb eines Gewebeverbandes im Organismus sehr nahe kommen.

Werkstoffe für den Knochenersatz müssen aufgrund des Vorkommens von Osteoblasten und Osteoklasten im Knochengewebe in zweifacher Hinsicht in der Kultur getestet werden: Einerseits gilt es zu erforschen, wie die osteoblastäre Aktivität abhängig vom Material beeinflusst wird, andererseits müssen die Effekte der Materialien auf die Osteoklasten genauestens untersucht werden, um abschätzen zu können, ob und wenn ja, wie und in welcher Geschwindigkeit sie von diesen Zellen abgebaut werden. Insbesondere bei systemischen Erkrankungen des Hartgewebes, wie beispielsweise bei der Osteoporose, ist die Geschwindigkeit, mit der ein Material nach der Implantation abgebaut wird, von großer Bedeutung. Durch einen zu schnellen Abbau können die ohnehin in ihrer Leistung geschwächten Osteoblasten im selben Zeitraum nicht die ausreichende Neubildung

von Knochengewebe gewährleisten, was zu Verzögerungen und Komplikationen bei der Einheilung führt.

#### Osteoporose

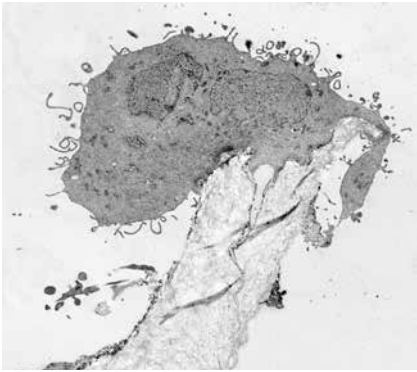
Hinzu kommt, dass bei der Osteoporose im Unterschied zum knochen-gesunden Skelett die Anzahl der Osteoklasten deutlich erhöht ist, was das typische Erscheinungsbild des porösen Knochens zur Folge hat. Der durch die Osteoklasten bewerkstelligte übermäßige Abbau von Knochen-substanz gipfelt bei den betroffenen Personen in so genannten Fragilitätsfrakturen nach Bagateltraumen. Sehr häufig sind die Wirbelkörper und der Schenkelhals davon betroffen.

Auf molekularer Ebene sind im gesunden Knochengewebe Signalmoleküle für die ausgewogene Anzahl von Osteoblasten und Osteoklasten verantwortlich. Diese werden von Osteoblasten und ihren Präkursoren produziert und regulieren dann die Bildung und Aktivität der Osteoklasten. Die Signalmoleküle vermitteln die fein abgestimmte Kommunikation zwischen den Zellen, die im gesunden Skelett die Bildung und Aufrechterhaltung eines mechanisch stabilen Gewebes gewährleisten. Die vermehrte Bildung

von Osteoklasten stimulierenden Signalmolekülen führt bei der Osteoporose zu einer hohen Anzahl der knochenabbauenden Zellen.

Osteoklasten sind nicht nur in der Lage, Knochengewebe abzubauen, sondern auch Knochenersatzmaterialien zu degradieren. Daher muss die osteoklastäre Aktivität und Leistungsfähigkeit nach der Anwendung eines Knochenersatzmaterials genauestens untersucht werden, um zu gewährleisten, dass sich der Materialabbau in einer Geschwindigkeit vollzieht, die exakt an die Eigenschaften des Knochengewebes angepasst ist. Da sich der gesunde vom porösen Knochen in seinen Eigenschaften – von der mechanischen über die zelluläre bis hin zur molekularen Ebene – deutlich unterscheidet, stellt die Generierung von passgenauen Knochenersatzmaterialien große Anforderungen an die Werkstoffwissenschaftler. In diesem Sinne müssen Erkenntnisse auf zellbiologischer und molekularer Ebene in die Materialgenerierung einfließen und sich für die erfolgreiche klinische Anwendung in differenziellen Materialeigenschaften widerspiegeln.

Die Interpretation und Abschätzung der Zellreaktionen von Osteoklasten auf bestimmte Eigenschaften von



■ Abb. 2: Mit Hilfe des Transmissions-elektronenmikroskops angefertigte Darstellung einer knochenabbauenden Zelle in der Kultur. In dieser Abbildung haftet die mehrkernige Zelle der Spitze des Knochenfragmentes an. Aufgrund unterschiedlicher Elektronendichte erscheint die Zelle dunkler als der Knochen (Vergrößerung: circa 4750-fach).

■ Abb. 3: Mehrkernige Osteoklasten in der Zellkultur. Das Zytoplasma ist durch einen speziellen Fluoreszenzfarbstoff grün und gelb angefärbt, während sich die Zellkerne als dunkelgraue, meist ovale Gebilde hervorheben. Die Bereiche zwischen den Zellen sind als leuchtend blaue Areale dargestellt. Die Aufnahme erfolgte mit dem 20er Objektiv.

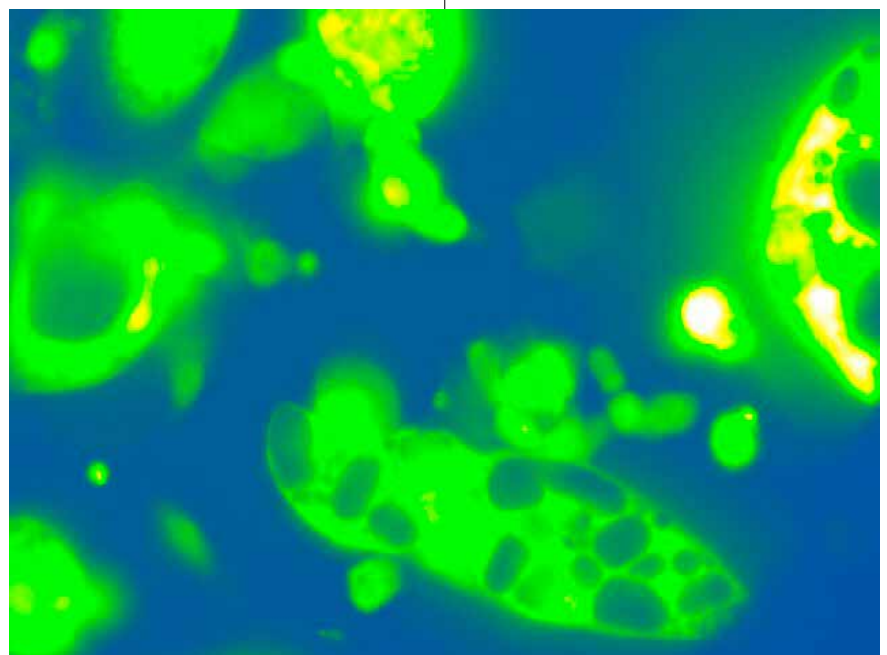
Werkstoffen setzt die Kenntnis voraus, wie sich diese Zellen in Gegenwart ihres natürlichen Substrats, dem Knochen, verhalten. Diese Kontrollkulturen liefern uns somit entscheidende Daten darüber, inwieweit sich das osteoklastäre Verhalten in Gegenwart der zu testenden Materialien von ihrem naturgemäßen Verhalten unterscheidet.

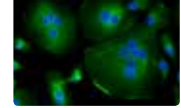
### Mehrkernigkeit von Osteoklasten

Osteoklasten sind nicht nur wegen ihrer Fähigkeiten, Gewebe abzubauen, ein ganz besonderer Zelltyp, sondern auch in Bezug auf ihre Mehrkernigkeit. Dieses Merkmal unterscheidet sie von den meisten Zelltypen, die in den Geweben und Organen der Säugetiere vorkommen. Die zahlreichen Zellkerne verstärken die funktionelle Kapazität der Osteoklasten, die diese zur Bewältigung ihrer Funktion im Gewebeverband benötigen. Die Mehrkernigkeit ist die Folge einer Sequenz von Differenzierungsschritten, die wir in unseren Zellkulturen nachvollziehen können.

Osteoklasten entwickeln sich aus einkernigen Präkursoren, die Be-

standteil des blutbildenden Systems sind. Diese Präkursoren gewinnen wir aus peripherem Blut mittels standardisierter Aufreinigungsverfahren und überführen die so isolierten einkernigen Zellen in die Kultur. Deren Fusion wird anschließend durch die Applikation stimulierender Faktoren, die auch natürlicherweise die Verschmelzung der Zellen bedingen, induziert. Der in der Kultur nachvollziehbare Fusionsprozess, der zur Entstehung der reifen mehrkernigen Zelle führt, ist der wesentliche Teilschritt während der Entwicklung eines Osteoklasten. Auf zellulärer Ebene ist dieser Vorgang noch lange nicht geklärt, und am Gießener Standort wird intensiv darüber geforscht, welche Moleküle sich an der Fusion beteiligen und inwieweit Werkstoffe durch chemische und Struktureigenschaften die Produktion dieser Fusionsmoleküle modulieren können. Gelingt es uns, über zuvor definierte Werkstoffeigenschaften das osteoklastäre Verhalten gezielt zu kontrollieren, ermöglicht uns dies den Abbau von implantierten Knochenersatzmaterialien im gesunden und im systemisch erkrankten Skelettsystem genau zu steuern. Erfolge auf diesem





Gebiet sind bereits zu verzeichnen. Durch Veränderungen der Calciumionenkonzentration in der Umgebung eines Werkstoffes ist es möglich, die Differenzierung der Osteoklasten zu beeinflussen. Chemische Werkstoffeigenschaften gewährleisten die

Einstellung der gewünschten Konzentration, die je nach Höhe die Zelldifferenzierung stimuliert oder unterdrückt.

Die von den Calciumionen abhängige Differenzierung der Osteoklasten wird daher am Gießener Standort ge-

nauestens untersucht, um die zellulären und molekularen Zielstrukturen zu identifizieren, die letztlich von den Werkstoffen beeinflusst werden und die Veränderungen des Zellverhaltens hervorrufen. Hierzu dienen molekularbiologische Techniken, aber auch

## DIE AUTOREN

**Sabine Wenisch**, Jahrgang 1962, studierte an der Universität Gießen Veterinärmedizin und arbeitete bis zu ihrer Habilitation über die Entwicklung und Zelldifferenzierung des zentralen Nervensystems am



Institut für Veterinär-Anatomie. Seit 2010 ist sie Professorin am Fachbereich Veterinärmedizin der Universität Gießen und Standortsprecherin des Transregio 79 „Werkstoffe für die Geweberegeneration im systemisch erkrankten Knochen“. Zu ihren aktuellen wissenschaftlichen Arbeitsgebieten zählen Knochenersatzstoffe, zellvermittelte Abwehr- und Regenerationsmechanismen nach Implantation von Biomaterialien sowie die Charakterisierung multipotenter Stammzellen.

**Christian Heiß**, Jahrgang 1970, studierte an der Universität Mainz Humanmedizin und arbeitete bis zu seiner Habilitation im Jahre 2006 an der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand-, und Wiederherstellungschi-



rurgie am Universitätsklinikum Gießen und Marburg (UKGM) in Gießen. Seit 2009 ist er apl-Professor am Fachbereich Veterinärmedizin der Universität Gießen, stellvertretender Direktor und Leitender Oberarzt der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand-, und Wiederherstellungschirurgie am UKGM in Gießen sowie designierter Sprecher des Transregio 79 „Werkstoffe für die Geweberegeneration im systemisch erkrankten Knochen“. Zu den aktuellen wissenschaftlichen Arbeitsgebieten zählen Testung und Entwicklung von Biomaterialien/Knochenersatzstoffen und Implantaten im Knochen, Pathophysiologie und Therapiekonzepte der Osteoporose, Entwicklung von osteoporotischen Tiermodellen.

**Reinhard Schnettler**, Jahrgang 1945, studierte von 1974 bis 1980 Humanmedizin an der Universität Frankfurt. Nach der Habilitation folgte er dem Ruf nach Gießen und ist seit 1995 Direktor der Klinik und

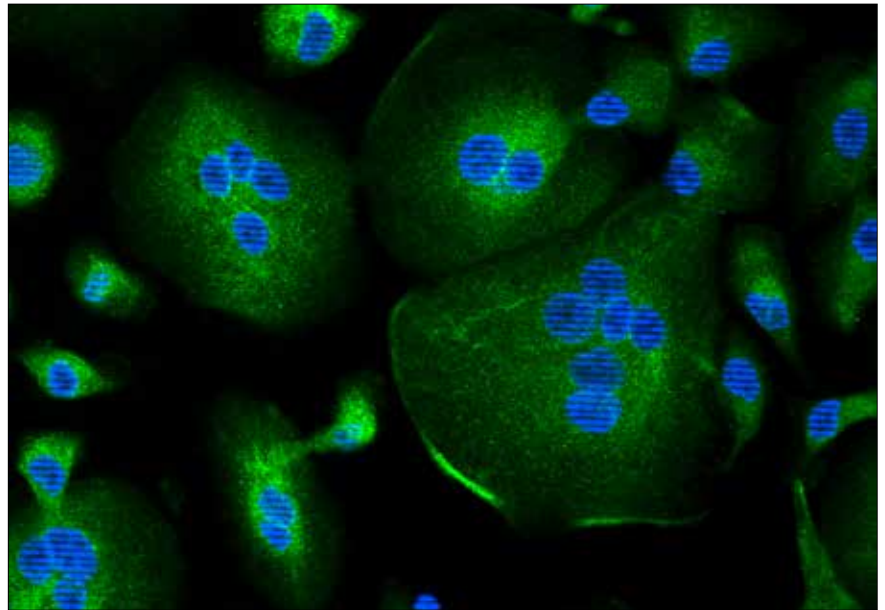


Poliklinik für Unfallchirurgie am Fachbereich Medizin der Universität Gießen. Neben seinen Verpflichtungen in Klinik und Lehre sowie im Rahmen von DFG-Gutachtertätigkeiten widmet er sich mit großem Engagement der Forschung. Wirkungsstätte ist das von ihm gegründete Labor für experimentelle Unfallchirurgie, wo sich die wissenschaftlichen Arbeitsgebiete auf die Themen Knochenersatzstoffe, Knorpeltransplantate, Knochenklebstoffe und Stammzellen fokussieren. Seit 2010 ist er Sprecher des Transregio 79 „Werkstoffe für die Geweberegeneration im systemisch erkrankten Knochen“.

die Elektronenmikroskopie, die es uns ermöglicht, die einzelnen Zellkomponenten bis in den Nanometer-Bereich zu erforschen. Besonderes Augenmerk der elektronenmikroskopischen Untersuchungen liegt auf dem „Endoskelett“ der Osteoklasten. Dessen Struktur und Verteilung liefern Informationen über den Aktivitätsgrad der Zellen. Das hängt mit der Funktion dieser kleinen Proteine zusammen, die nicht ausschließlich der Stabilisierung der Zellen dienen, sondern auch deren Haftung und Fortbewegung auf einem Untergrund, einem so genannten Substrat, vermitteln. Das Endoskelett ist somit eine Struktur, über die die Zelle mit ihrer Umgebung kommuniziert. So vollziehen sich in Abhängigkeit unterschiedlicher Konzentrationen von Calciumionen außerhalb der Zellen und verschiedener Substrate charakteristische Veränderungen des Zellskeletts, die uns wiederum wichtige Informationen über die Kapazitäten der Zellen zum Abbau eines Werkstoffs liefern.

Je bessere Voraussetzungen zur Haftung ein Substrat bietet, umso höher sind die Kapazitäten eines Osteoklasten, dieses abzubauen. Durch definierte Oberflächeneigenschaften von Werkstoffen, die sich durch Oberflächenvariationen im Nanometerbereich abbilden, werden die Haftungseigenschaften der Osteoklasten wie gewünscht beeinflusst.

Grundlagenwissenschaftliche, am Beispiel der Osteoklasten-Thematik dargelegte Forschungsaspekte vollziehen mit interdisziplinärer Ausrichtung somit einen wesentlichen Brückenschlag zur anwendungsbezogenen Thematik des Transregio 79 und zum erfolgreichen klinischen Einsatz von Knochenersatzmaterialien im Allgemeinen.



■ Abb. 4 Vorläuferzellen der kochenabbauenden Zellen wurden zunächst aus dem Blut isoliert und anschließend in einem speziellen Differenzierungsmedium inkubiert. Das Ergebnis der Inkubation zeigt mehrkernige Zellen, die zum Abbau von Knochen befähigt sind. Die Zellkerne sind blau angefärbt. Die grüne Färbung beruht auf dem Nachweis eines spezifischen Proteins. Die Aufnahme erfolgte mit dem 40er Objektiv.

#### KONTAKT

**Prof. Dr. Sabine Wenisch**  
Justus-Liebig-Universität  
Klinik für Kleintiere  
c/o Institut für Veterinär-Anatomie,  
-Histologie und-Embryologie  
Frankfurter Straße 98  
35392 Giessen  
Telefon: 0641 99-38111  
Sabine.Wenisch@vetmed.uni-giessen.de  
R.S.Transregio@chiru.med.uni-giessen.de

**Prof. Dr. Dr. Reinhard Schnettler**  
Universitätsklinikum Giessen und Marburg  
Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie  
Rudolf-Buchheim-Straße 7  
35392 Giessen  
R.S.Transregio@chiru.med.uni-giessen.de

#### SIEHE AUCH

**Reinhard Schnettler, Christian Heiß, Volker Alt, Alexander C. Langheinrich, Jürgen Janek und Sabine Wenisch:** Werkstoffe für die Geweberegeneration im systemisch erkrankten Knochen – Neuer Transregio-Sonderforschungsbereich in der Medizin, in: Spiegel der Forschung-Sonderheft, Dezember 2010, Seite 42-49; [http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2011/7994/pdf/Sdf\\_2010\\_SdrH\\_42\\_49.pdf](http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2011/7994/pdf/Sdf_2010_SdrH_42_49.pdf)