



DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Einfluß der Oberflächenbeschaffenheit von TCP-
Keramiken auf die osteoclastäre Aktinringbildung“

Verfasserin

Astrid Rohrhofer

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, April 2011

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Pharmazie

Betreuerin / Betreuer:

Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Oskar Hoffmann

Ich danke Herrn Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Oskar Hoffmann für seine fachliche Betreuung, sein Engagement und die Schaffung eines angenehmen Arbeitsumfeldes.

Ich danke Frau Barbara Berger für ihre Führung und ihr wachsames Verhalten, das bestimmt schon vielen Diplomanden zu Gute gekommen ist.

Ich danke Herrn Peter Höflich für konstante Hilfsbereitschaft und die gute Laune, die er verbreitet.

Ich danke Frau Barbara Stelzmüller für ihre Unterweisungen und andauernde Geduld.

Ich danke Frau Corinna Nagelreiter und Frau Marlene Illetschko für die freundschaftliche Zusammenarbeit und den fachlichen Austausch.

Letztlich danke ich noch meiner Familie und meinen Freunden ohne deren Einsatz, Hilfe und Geduld während meines gesamten Lebens ich womöglich nie so weit gekommen wäre.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	5
1.1	KNOCHEN UND IHRE ZELLEN	5
1.1.2	<i>Knochenaufbau</i>	5
1.1.2	<i>Bestandteile der Knochenmatrix</i>	9
1.1.2.1	Mineralische Matrix.....	9
1.1.2.2	Proteine	10
1.1.2.2.1	Kollagene	10
1.1.2.2.1.1	Nicht-kollagene Proteine.....	10
1.1.3	<i>Knochenzellen</i>	13
1.1.3.1	Osteoblasten.....	13
1.1.3.2	Osteoclasten.....	14
1.1.3.2.1	Ursprung und Entwicklung	14
1.1.3.2.2	Migration.....	15
1.1.3.2.3	Adhäsion und Resorption.....	17
1.1.3.2.4	Loslösung der Osteoclasten und andere Vorgänge in Abhängigkeit von Calcium	20
1.1.4	<i>Physiologische Abläufe und Frakturheilung.....</i>	22
1.1.4.1	Ossifikation.....	22
1.1.4.2	Knochenmodeling und –remodeling.....	23
1.1.4.3	Heilung von Knochenbrüchen	24
1.2	KNOCHENERSATZMATERIALIEN	25
1.2.1	<i>Anforderungen an Knochenersatz</i>	26
1.2.1.1	Biokompatibilität	26
1.2.1.2	Bioaktivität.....	27
1.2.1.3	Belastbarkeit	27
1.2.2	<i>Materialien.....</i>	28
1.2.2.1	Autograft.....	28
1.2.2.2	Allograft.....	29
1.2.2.3	Natürliche Polymere	29
1.2.2.4	Synthetische Polymere.....	30
1.2.2.5	Metalle	30
1.2.2.6	Biogläser.....	31
1.2.2.7	Calciumphosphatkeramiken.....	32
1.2.2.7.1	Hydroxylapatit $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	32
1.2.2.7.2	Dicalciumphosphatdihydrat $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	33
1.2.2.7.3	Octacalciumphosphat $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	33
1.2.2.7.4	Tricalciumphosphat $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	34
1.2.2.7.5	Biphasische Calciumphosphate.....	35
1.2.2.8	Maritime Substrate.....	35
1.2.2.9	Calciumsulfat.....	36
1.2.2.10	Aluminiumoxid.....	36
1.2.2.11	Composites	37
1.2.2.12	Zellbasierte Substitution.....	37
1.2.3	<i>Physikochemische Parameter, die die Interaktion mit Zellen beeinflussen</i>	39
1.2.3.1	Ionenaustausch, Löslichkeit und Repräzipitation bei Calciumphosphaten..	39
1.2.3.2	Einfluß der Poren	40
1.2.3.3	Rauigkeit, Benetzbarkeit und Zellverhalten.....	41
1.3	ZIELSETZUNG DER DIPLOMARBEIT.....	43
2	MATERIAL UND METHODEN	45
2.1	MATERIAL	45

2.1.1	Substanzen	45
2.1.1	Geräte	46
2.2	METHODEN	48
2.2.1	Herstellung von β -TCP-Oberflächen.....	48
2.2.2	Isolation und Aussaat der Kaninchen-Osteoclasten	48
2.2.3	Zellfixierung	49
2.2.4	TRAP-positive Zellen.....	50
2.2.4.1	TRAP-Färbung.....	50
2.2.4.2	Auswertung	50
2.2.5	Immunfluoreszenz.....	51
2.2.5.1	Färbung des Cytoskeletts und der Zellkerne	51
2.2.5.2	Auswertung	52
2.2.6	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen.....	52
2.2.7	Statistische Überprüfung der Signifikanz	52
3	RESULTATE	53
3.1	VORAUSGEHENDE BEGRIFFSERKLÄRUNGEN	53
3.2	UNTERSUCHUNGEN ZUR MAKROPOROSITÄT UNTER VERWENDUNG EINES POROGENS	
	...	53
3.3	UNTERSUCHUNGEN ZUR MIKROPOROSITÄT	60
4	DISKUSSION.....	75
5	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	81
6	ABKÜRZUNGEN.....	83
4',6-DIAMIDIN-2-PHENYLINDOL		83
7	LEBENS LAUF.....	85
8	ABSTRACT	86

1 Einleitung

1.1 Knochen und ihre Zellen

1.1.2 Knochenaufbau

Das menschliche Skelett umfasst üblicherweise 210 Knochen, welche sich, ihrer Gestalt und Funktion nach, verschiedenen Gruppen zuordnen lassen.

Flache Knochen (*Ossa plana*) wie beispielsweise der Schädeldachknochen, kleine, polygonale Knochen (*Ossa brevia*) wie Hand- und Fußwurzelknochen, unregelmäßige Knochen (*Ossa irregularia*) wie die Wirbel und Röhrenknochen (*Ossa longa*) wie Elle und Speiche sind Teil des Skeletts.

Die verbreiterten Enden der Röhrenknochen (Epiphysen) gehen in eine etwas weniger breite Zone (Metaphyse) und schließlich in einen tunnelförmigen Schaft (Diaphyse) über. Die Metaphyse wird durch die Epiphysenfuge von der Epiphyse getrennt. Sowohl Meta- als auch Epiphyse bestehen zum Großteil aus spongiösem Knochen, der aber am gesamten Skelett nur einen Anteil von etwa 20% ausmacht. Dieser zeichnet sich durch verzweigte, säulen- oder plattenförmige Trabekel aus, die eine locker erscheinende große Oberfläche generieren. Daher spielt die Spongiosa bei Resorptionsvorgängen eine bedeutende Rolle.

Der sehr viel kompaktere kortikale Knochen umgibt den spongiösen Teil der Epi- und Metaphyse in einer sehr dünnen Schicht, kann jedoch in manchen Knochen wie z. B. Femur bis zu 15mm dick sein.

Im diaphysären Bereich der Röhrenknochen findet sich vor allem kompakter Knochen, der die Markhöhle, welche fettreiches, daher gelbes Knochenmark enthält, umschließt. Die Zwischenräume der Spongiosa sind mit rotem, zur Blutbildung befähigtem Knochenmark ausgefüllt. Die Markhöhle und die Gefäßkanäle werden von einer als Endost bezeichneten Hüllstruktur ausgekleidet.

Außen wird der Röhrenknochen von der Knochenhaut (Periost) umschlossen, mit Ausnahme von Flächen, die überknorpelt oder mit Synovialmembranen überzogen sind. Die Verbindung des Periosts mit dem Knochen ist durch Kollagenfibrillen (Sharpey'sche Fasern), die direkt in das Fibrillensystem des kortikalen Knochens übergehen, gegeben.

Die äußere Schicht des Periosts (Stratum fibrosum) besteht aus geflechtartigem, kollagenen Bindegewebe, während die innere Schicht (Stratum osteogenicum) osteogene und chondrogene Progenitorzellen enthält, die im Falle einer Verletzung als Osteoblasten und Chondroblasten zur Kallusbildung beitragen.

Ein Großteil der ausdifferenzierten Knochen eines Erwachsenen gehört dem Typus der Lamellenknochen an. Die Knochenlamellen bestehen aus innerhalb einer Lamelle jeweils gleichartig ausgerichteten Kollagenfibrillen. Diese Lamellen bauen unter anderem die Haupteinheit der Corticalis, das Osteon, auf. Ein Osteon besteht aus durchschnittlich 30 konzentrisch angeordneten Lamellen, in deren Mitte sich ein Gefäßkanal (Haver'scher Kanal) befindet.

Die Haver'schen Kanäle beherbergen fenestrierte Kapillaren, die auch den Austausch von größeren Molekülen ermöglichen, und nicht-myelinisierte Nervenfasern zur Reizübertragung.

Untereinander sind die Haver'schen Kanäle über transversal durch die Kompakta verlaufende Volkmann'sche Kanäle verbunden. Auch besteht über kleine Kanälchen (Canaliculi) eine Verbindung zwischen ellipsoiden Aussparungen, in welchen sich Osteocyten befinden (Osteocyten-Lakunen), und den Haver'schen Kanälen, um den Transport von Substanzen von und zu den Osteocyten zu gewährleisten.

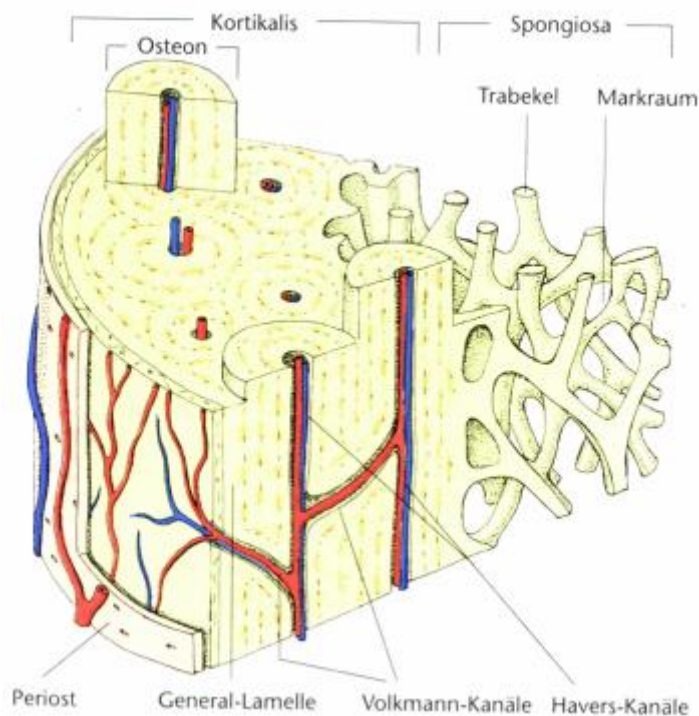


Abbildung 1: Darstellung des Knochenaufbaus (Schäffler und Schmid 1997)

Der kortikale Knochen besitzt aber nicht nur als Osteon angeordnete Lamellen. Die freien Räume zwischen aneinander grenzenden Osteonen werden durch unregelmäßig konfigurierte Lamellenstapel (interstitielle Lamellen) ausgefüllt, die meist bei der Resorption anfallende Überreste von alten Osteonen oder Zirkumferenzlamellen darstellen, die sich üblicherweise an peri- und endostalen Oberflächen des kortikalen Knochens befinden.

Spongioses Knochengewebe besteht überwiegend aus halbmondförmigen Lamellenpaketen (Trabekellamellen), Osteone finden sich nur äußerst selten in besonders großen Trabekel.

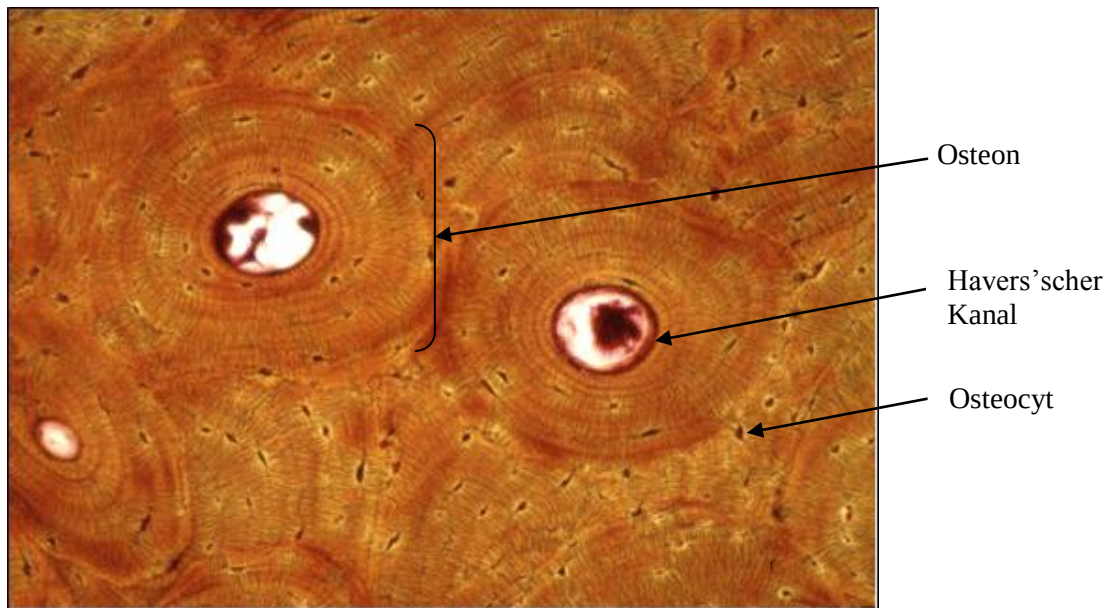


Abbildung 2: Aufsicht auf kompakten Knochen

(<http://www.unifr.ch/anatomy/elearningfree/allemand/stuetzgewebe/knochen/aufbau/d-aufbau.php>)

Bei der Struktur von Geflechtknochen, der vor allem bei Knochenneubildung und Frakturheilung eine Rolle spielt, bilden die Kollagenfibrillen ein Netzwerk ohne höheres Ordnungsmuster aus. Er ist Bestandteil des Kallusgewebes, das sich bei der Frakturheilung bildet und wird später in Lamellenknochen umgebaut. (Benninghoff und Drenckhahn 2008)

1.1.2 Bestandteile der Knochenmatrix

Die Knochenmatrix besteht mit 50 -70% zu einem überwiegenden Anteil aus anorganischen Materialien. Die zweite große Komponente ist mit 20 – 40% die organische Matrix. Der Wasseranteil beschränkt sich auf 5 – 10% und Lipide sind nur mit einem Anteil von unter 3 % vertreten.

Die Lipide sind hauptsächlich an der Steuerung des Ionenflusses beteiligt, während das intra- und extrazelluläre Wasser vor allem der Aufrechterhaltung und Versorgung des Systems dient. (Benninghoff und Drenckhahn 2008)

1.1.2.1 Mineralische Matrix

Den Hauptbestandteil der mineralischen Matrix macht Hydroxylapatit aus. Für schnellere Austauschvorgänge mit interagierenden Flüssigkeiten ist auch ein geringer Anteil des besser löslichen Calciumhydrogenphosphat vorhanden.

Die Bildung von Hydroxylapatitkristallen erfolgt vermutlich indirekt durch Calciumhydrogenphosphatpräzipitate, die sich unter anderem über die Bildung von Octacalciumphosphat in Hydroxylapatitkristalle umwandeln lassen. Je höher der Calciumanteil der Matrix, desto größer ist auch die mechanische Stabilität des Knochens. (Benninghoff und Drenckhahn 2008)

Hydroxylapatit	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$
Fluorapatit	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$
Carbonatapatit (OH-substituiert)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{CO}_3$
Carbonatapatit (PO_4 -substituiert)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_{4,5}(\text{CO}_3)_{1,5}(\text{OH})_{1,5}$
Natriumcarbonapatit	$\text{Ca}_{8,5}\text{Na}_{1,5}(\text{PO}_4)_{4,5}(\text{CO}_3)_{2,5}$
Defektapatit	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$
Octacalciumphosphat	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

Tabelle 1 modifiziert nach Berger und Gildenhaar, mineralische Bestandteile der Knochenmatrix

1.1.2.2 Proteine

1.1.2.2.1 Kollagene

Den Hauptanteil organischer Bestandteile der Knochenmatrix macht Kollagen Typ I aus. Es ist ein tripelhelikales Protein mit 2 strukturell identen $\alpha_1(I)$ -Ketten und einer strukturell ähnlichen $\alpha_2(I)$ -Kette. Kollagen- α -Ketten werden durch die immer wiederkehrende Sequenz Gly-X-Y charakterisiert, wobei die Stelle X in den meisten Fällen von Prolin und Y von Hydroxyprolin besetzt wird. Ein weiteres Charakteristikum sind posttranslationale Modifikationen wie Hydroxylierung von Lysylresten, Glycosylierung von Lysyl- oder Hydroxyllysylresten mit Glucose und beziehungsweise oder Galactose und Bildung von inter- und intramolekularen Verknüpfungen, die sich allerdings von denen im weichen Bindegewebe unterscheiden.

Typ I-Kollagen dient nicht nur als Plattform und Ankerstelle, sondern interagiert auch mit Proteinen, die unter anderem an der Matrixmineralisation beteiligt sind. In bestimmten Stadien der Knochenformation sind auch Spuren von Kollagen III, V und FACIT-Kollagenen vorhanden. (Robey und Boskey 2006)

1.1.2.1.1 Nicht-kollagene Proteine

Die nicht kollagenen Proteine machen 10-15% des menschlichen Knochens aus.

Das Verhältnis von Kollagenen zu nicht-kollagenen Proteinen, die von Knochenzellen sezerniert werden, ist 1:1. Etwa ein Viertel davon entstammt nicht dem Knochen. Diese exogenen Proteine sind unter anderem auch Wachstumsfaktoren, aber zum Großteil Serumproteine wie Albumin und α -HS-Glykoprotein. Letztere binden die Knochenmatrix lediglich aufgrund ihres eigenen sauren Charakters. Obwohl nicht endogen synthetisiert, haben sie möglicherweise Einfluss auf die Knochenzellproliferation.

Im Allgemeinen gliedern sich die nicht-kollagenen Proteine in 4 Hauptgruppen, deren Vertreter auch überlappend zu finden sind.

a) *Proteoglykane*

Proteoglykane bestehen aus einem Kernprotein, an dem saure Polysaccharidseitenketten (Glykosaminglykane) hängen.

Versican (ein großes Proteoglykan mit Chondroitinsulfatanteil) und Hyaluronan (Glykosaminglykan ohne Kern) werden während der Initialphase der Knochformation produziert und grenzen vermutlich Bereiche ab, die zu Knochen werden sollen. Mit fortschreitender Osteogenese ersetzen zwei kleine Proteoglykane, Decorin und Biglykan, Versican. Beide gehören zur Gruppe der SLRP (small leucine rich proteoglykans). Man vermutet, dass sie einen entscheidenden Einfluß auf die Integrität der meisten Bindegewebsarten haben. Überdies sind sie zur Bindung und Modulation von TGF- β befähigt, was zu einer Beeinflussung der Zellproliferation und Differenzierung führt. (Benninghoff und Drenckhahn 2008)

b) *Glykoproteine*

Mit einem Anteil von etwa 2% am Gesamtprotein des Knochens ist Osteonectin das anteilmäßig größte nicht-kollagene Protein. Es reguliert die Kollagenfibrillogenese, bindet Wachstumsfaktoren und hat somit Wirkung auf den Zellzyklus. Überdies setzt es die Zelladhäsion herab, wodurch Zellmigration gefördert wird. (Benninghoff und Drenckhahn 2008) Es wird auch in anderen Geweben produziert, die stark proliferieren oder sich häufig umorganisieren.

Ein weiteres bekanntes Glykoprotein ist die alkalische Phosphatase, ein Enzym, das Knochenumbau kennzeichnet. Es befindet sich hauptsächlich an der Zelloberfläche, wird aber auch innerhalb der Matrix gefunden. Die alkalische Phosphatase dient möglicherweise als Ca^{2+} -Carrier und hydrolysiert Inhibitoren der Mineralisation.

Die Funktionen von Tetranectin sind noch nicht geklärt, allerdings wird ein Einfluß auf die Stabilisierung des vertebralen Systems vermutet.

Tenascin-C und -W scheinen sowohl die Organisation der Matrix als auch die Aktivität der Zellen zu regulieren.

c) *Proteine mit Zellanhaftungspotential*

Knochenzellen synthetisieren verschiedene Proteine, die an der Adhäsion zwischen Zellen und Matrix beteiligt sind:

- SIBLING-Proteine (**S**mall **I**ntegrin **B**inding **L**igand **N**-Glycosylated proteins) wie Osteopontin, Bone Sialoprotein, Dentin-Matrix-Protein-1 und MEPE
- Typ-I-Kollagen
- Fibronectin
- Thrombospondine
- Vitronectin
- Fibrillin
- BAG-75
- Osteoadherin

All diese Proteine beinhalten die Aminosäuresequenz RGD (Arg-Gly-Asn), die für die Bindung an Integrine von Nöten ist. Allerdings gibt es auch andere Mechanismen der Adhäsion. Sowohl Osteopontin als auch Bone Sialoprotein binden Ca^{2+} mit hoher Affinität aufgrund von sauren Aminosäuresequenzen. (Robey und Boskey 2006) Osteopontin hemmt die Hydroxylapatitbildung, während Bone Sialoprotein sie fördert. (Benninghoff und Drenckhahn 2008)

d) *γ -carboxylierte Proteine*

Einige nicht-kollagene Proteine werden durch Vitamin-K-abhängige γ -Carboxylasen posttranslational modifiziert. Diese Modifikation erhöht die Affinität zu Ca^{2+} .

MGP (matrix γ -carboxylic acid protein = matrix gla protein) und Osteocalcin, zwei Proteine dieser Gruppe, hemmen die Mineralisierung. (Benninghoff und Drenckhahn 2008) Während MGP in vielen Bindegewebsarten vorkommt, bleibt Osteocalcin auf Knochen und Dentin begrenzt. (Robey und Boskey 2006)

1.1.3 Knochenzellen

1.1.3.1 Osteoblasten

Die Osteoid sezernierenden Osteoblasten entwickeln sich aus mesenchymalen Stammzellen. Diese Stammzellen kommen in Knochenmark, Periosteum, Fettgewebe, Dermis, Muskel- und Blutgefäßgewebe vor und können je nach Umgebung und Milieu unter anderem auch zu Progenitorzellen von Osteoblasten oder Chondroblasten differenzieren. (Baroli 2009)

Diese spindelförmigen Osteoprogenitorzellen differenzieren ihrerseits weiter zu kuboidalen, reifen Osteoblasten, wobei beide Differenzierungsformen sich in räumlicher Nachbarschaft befinden. Die Osteoblasten sezernieren schließlich Kollagen, das später auch von ihnen mineralisiert wird. (Clarke 2008)

Letzlich entwickeln sich die Osteoblasten zu Osteozyten, die vermutlich eine wichtige Rolle bei Aufrechterhaltung der Knochenmatrix, Kalziumhomöostase, und Initiation von Modeling bzw. Remodeling der Knochen spielen.

Auch Bone-Lining-Cells, die die oberste mineralisierte Schicht vom Periost abgrenzen und das Endosteum bilden, entstammen Osteoblasten oder Osteoprogenitorzellen.

Als Barriere grenzen sie das Canaliculi-Netzwerk von anderen Flüssigkeiten ab, während sie in Kontakt mit Osteozyten stehen. Daher wird ihnen eine Rolle in der Zellkommunikation entlang der Osteozyten zugesprochen. (Baroli 2009)

1.1.3.2 Osteoclasten

1.1.3.2.1 Ursprung und Entwicklung

Die knochenmatrixabbauenden Osteoclasten entwickeln sich aus hämatopoietischen Stammzellen. Sie durchlaufen das Stadium der CFU-GM, die sich zu CFU-M weiterentwickeln. Unter Einfluß der von Osteoblasten und Stromalzellen freigesetzten Faktoren M-CSF und RANKL erfolgt die Differenzierung zu Prä-Osteoclasten. Diese Vorläufer fusionieren unter Beteiligung des Membranproteins DC-STAMP zu mehrkernigen Osteoclasten.

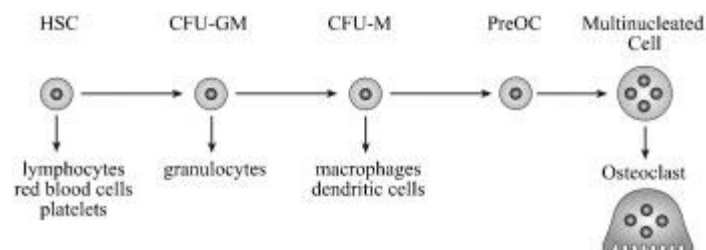


Abbildung 3: Differenzierung des Osteoclasten (Bar Shavit 2007)

Anschließend erfolgt die Migration zum Resorptionsort. Es kommt zur Adhäsion auf der Knochenmatrix, gefolgt von Aktinreorganisation und Bildung der Aktinringes beziehungsweise der Sealing Zone. Nach Ausbildung büstensaumartiger Ausstülpungen der Zellmembran (Ruffled Border) der Osteoclasten werden kollagenolytische Enzyme und Säure in das von der Sealing Zone eingeschlossene Gebiet exozytiert. Die Abbauprodukte der Knochenmatrix werden durch Transzytose entfernt, der Osteoclast löst sich von der Oberfläche und migriert entweder erneut oder wird apoptotisch. (Bar Shavit 2007)

1.1.3.2.2 Migration

Die Osteoclasten migrieren vermutlich aufgrund von chemotaktischen Faktoren, die aus dem Knochen freigesetzt oder von Osteoblasten beziehungsweise Stromalzellen sezerniert werden, zu den für die Resorption vorgesehenen Knochenstellen. Auch die Knochenbeschaffenheit scheint eine nicht unerhebliche Rolle zu spielen. Theorien zufolge werden die Osteoclasten und ihre Vorstufen über Signale der Osteocyten zu kleinen Einrissen der Knochenstruktur gelockt, um diese zu resorbieren. (Bar Shavit 2007)

Migrierende Osteoclasten bilden Lamellipodien an ihren Vorderenden aus, während die Adhäsionsstellen der Hinterenden sich von der Oberfläche lösen. Migrieren die Osteoclasten nicht, wechseln sich unter normalen Bedingungen ein kompaktes, polarisiertes und ein flaches Stadium der Zellerscheinung ab. (Gramoun, Goto et al. 2010)

Lamellipodien sind 1-5 µm breite Zellfortsätze mit ungebündelten Aktinfilamenten, die der Adhäsion im Zuge der Fortbewegung dienen. Vermutlich können durch Aktinbündelung aus den Filamenten der Lamellipodien Filopodien entstehen. (Small, Stradal et al. 2002) Filopodien erfüllen als lange, schmale Fortsätze sensorische und erkundende Aufgaben, wodurch vermutlich die zukünftige Fortbewegungsrichtung der Zellen bestimmt wird. (Mejillano, Kojima et al. 2004) Der Vorgang der Ablösung der Osteoclasten von der Oberfläche wird unter Punkt 1.1.3.2.4 erläutert.

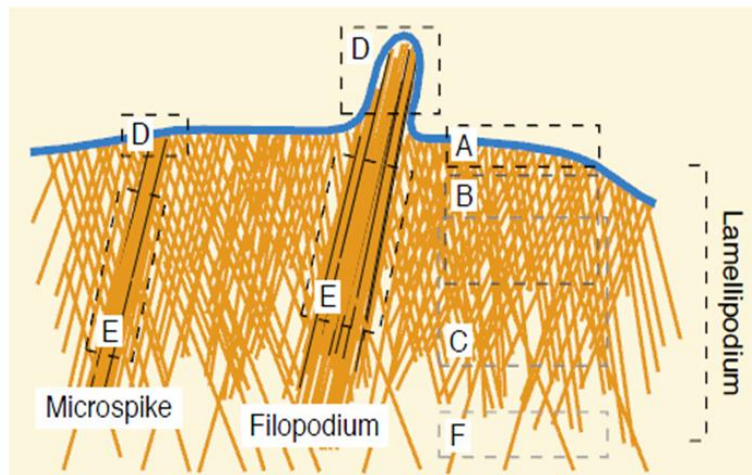


Abbildung 4: Adhäsionsstrukturen in Zellen (Small, Stradal et al. 2002)

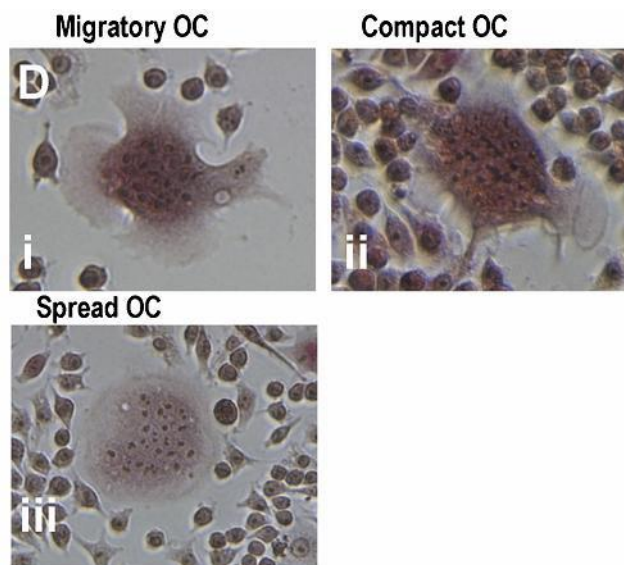


Abbildung 5: Darstellung der 3 morphologischen Phasen des Osteoclasten (Gramoun, Goto et al. 2010)

1.1.3.2.3 Adhäsion und Resorption

Bevor der Osteoclast den Resorptionsprozess einleitet, muss die zu resorbierende Fläche durch eine dichte Barriere, die Sealing Zone, eingegrenzt werden. Die Sealing Zone ist ein Konstrukt aus Podosomen – kleinen, aktinreichen Strukturen, die der Adhäsion dienen. Podosomen bestehen aus einem 0,6 – 1 μm hohen und 0,3 μm breiten Kern aus Aktinfilamenten, der von einer Art Wolke aus F-Aktin, Aktinmonomeren und aktinassoziierten Proteinen umgeben ist. Direkt um den Kern aus Integrinen, assoziierten Adapter- und Signalmolekülen wie Vinculin, Paxillin und Talin. (Luxenburg, Geblinger et al. 2007) $\alpha\text{v}\beta_3$ -Integrin spielt eine wichtige Rolle in der Reorganisation des Aktincytoskeletts und kann durch Bindung an RGD-Proteine einen Beitrag zur Adhäsion leisten. (Faccio, Novack et al. 2003)

Der Kern wird durch ein gewölbeartiges Netzwerk aus Aktin in der Zellmembran verankert. Dieser generelle Aufbau eines Podosoms ist unabhängig von Oberfläche oder Zelltyp.

Die Podosomen der Osteoclasten liegen zu Beginn über die gesamte Zellmembran verteilt, ordnen sich aber auf entsprechenden Oberflächen in Ringen an, die durch Verschmelzung ihrer Grenzen einen Podosomengürtel oder die dichtere Sealing Zone ausbilden können.

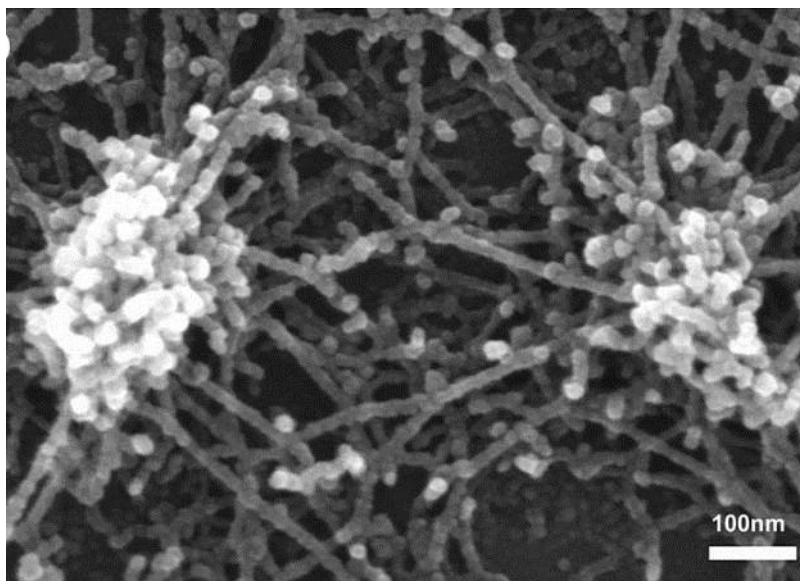


Abbildung 6: Podosomen in Podosomengürtel (Luxenburg, Geblinger et al. 2007)

Bei Bildung von Aktinringen überlappen die Aktinareale der Podosomen und die Ringe um die Aktinkerne vereinigen sich. Die Aktinfilamente der Podosomen bilden Verbindungen zueinander aus, allerdings nicht direkt von Kern zu Kern.

Auf Glasoberflächen ausgebildete Aktinringe zeigen Abstände von 750 ± 170 nm zwischen den Podosomenkernen. Bei Erreichen einer Sealing Zone-artigen Struktur auf Glas verringert sich die Distanz auf 480 ± 140 nm. Der Aktिंगürtel dieser Struktur ist 2-3 μ m breit, wohingegen eine Sealing Zone auf Knochen eine Breite von 3-6 μ m erreicht und die Podosomenkerne nur noch 210 ± 50 nm voneinander entfernt sind. Allerdings zeigen sich bei beiden Strukturen Kern-Kern-Verbindungen. (Luxenburg, Geblinger et al. 2007)

Integrin

Osteoclasten weisen hohe Anteile des $\alpha\beta 3$ -Subtyps der Integrine auf. Säugetierosteoclasten zeigen auch starke Expression des Kollagen/Lamininrezeptors $\alpha 2\beta 1$ -Integrin und des Fibronectin/Vitronectinrezeptors $\alpha\beta 1$ -Integrin. Der Adhäsionsvorgang beinhaltet die Interaktion der Integrine mit Proteinen der Matrix. (Duong, Lakkakorpi et al. 2000)

Allerdings wird lediglich das Haften der Podosomen an der Matrix durch $\alpha\beta 3$ -Integrin gesteuert. Die tatsächliche Formierung einer Sealing Zone bleibt vermutlich der Mediation durch andere Proteine wie CD 44 überlassen. (Vaananen und Laitala-Leinonen 2008)

Durch Bindung von Vitronectin an $\alpha\beta 3$ -Integrin kommt es zu von der Kinase Src unabhängigem intrazellulärem Calciumanstieg und zur Autophosphorylierung der Kinase Pyk2, wodurch an deren SH₂-Domäne Src rekrutiert werden kann. Auch Cbl bindet an den Komplex und wird in Folge phosphoryliert. Diese 3 Moleküle scheinen maßgeblich an der Podosomenaggregation beteiligt zu sein. Die PTB-Domäne von Cbl bindet allerdings im Inaktivierungsbereich von Src, was zu Src-Downregulierung und geringerer integrinvermittelter Adhäsion führt. Daher wird angenommen, dass Cbl eine Schlüsselrolle in der Desaggregation der Podosomen spielt. (Sanjay, Houghton et al. 2001)

Resorptionsprozess

Der von der Sealing Zone isolierte Bereich wird über eine Protonenpumpe und einen Chloridkanal auf einen pH-Wert von 4,5 gebracht. Die so entstandene Salzsäure löst den Hydroxylapatit zu Ca^{2+} , HPO_4^{2-} und Wasser. Die organische Matrix wird von Enzymen abgebaut, deren dominantester Vertreter Cathepsin K ist. Die Abbauprodukte des Resorptionsprozesses werden über die Ruffled Border endocytiert, zur Functional Secretory Domain (FSD) auf der entgegengesetzten Zellseite transportiert und dort exocytiert. Dieser Vorgang wird als Transcytose bezeichnet. (Bar Shavit 2007)

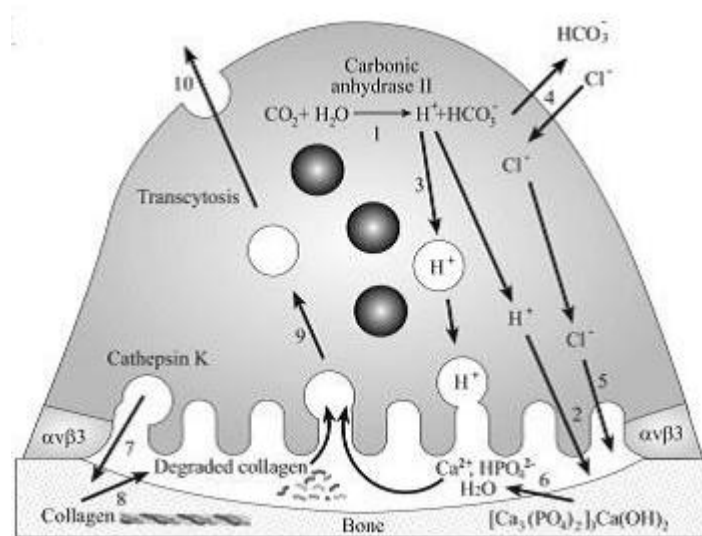


Abbildung 7: Resorptionsprozess (Bar Shavit 2007)

1.1.3.2.4 Loslösung der Osteoclasten und andere Vorgänge in Abhängigkeit von Calcium

Steigt der extrazelluläre Calciumspiegel infolge des Resorptionsvorganges auf eine gewisse Konzentration an, kommt es zur Loslösung der Osteoclasten von der Oberfläche. (Mentaverri, Yano et al. 2006) Diesen Prozess regulieren vermutlich zumindest 2 Typen von Rezeptoren, die auf Calcium reagieren. (Robinson, Blair et al. 2010)

Auf der membranösen Oberfläche der Osteoclasten befindet ein solcher vom Typ des Ryanodinrezeptors. Dieser wird sowohl in Osteoclasten, als auch in deren Vorstufen exprimiert, wobei sich in Untersuchungen an RAW-Zellen herausstellte, dass die Menge um ein 15-faches höher ist. Die Differenzierung von Knochenmarkszellen aus Calciumrezeptor-Knockout-Mäusen zu Osteoclasten zeigte eine 70%-ige Reduktion verglichen mit der des Wildtyps, was die Involvierung des Calciumrezeptors in die Bildung von reifen Osteoclasten nahelegt. Auch auf das Überleben der Osteoclasten scheint der Rezeptor großen Einfluß zu haben. Über hohe Calciumkonzentrationen soll es zu einer Translokation von NFκB gemeinsam mit anderen Transkriptionsfaktoren in den Kern kommen, die im Gegensatz zur RANKL-induzierten Translokation zu osteoclastärer Apoptose unter Beteiligung von Caspasen führt. (Mentaverri, Yano et al. 2006)

Die Apoptose tritt ab Calciumkonzentrationen von 10 mM auf, wobei die Ausprägung des Effekts bei 20 mM auf eine Mortalitätsrate von 80% ansteigt. (Lorget, Kamel et al. 2000)

Vermutlich wird in einer Kaskade über den membranösen Calciumrezeptor ein calciumabhängiger IP₃-Rezeptor aktiviert, was einen intrazellulären Calciumanstieg bedingt, der, abhängig von der Isoform des Rezeptors, Einfluß auf Motilität, Differenzierung und Apoptose hat.

Durch NO-Freisetzung aus Zellen wie Osteoblasten kommt es in Osteoclasten zu Aktivierung der Guanylatcyclase. Der Anstieg an cGMP wiederum aktiviert die Proteinkinase G-I. Über Phosphorylierung von Intermediärproteinen wie VASP, einem aktinbindenden Protein, kommt es zur Desaggregation von Aktin. (Robinson, Blair et al. 2010) Phosphorylierung von IRAG, das im Komplex mit dem IP_3R_1 vorkommt, durch die Proteinkinase G scheint den Calciumanstieg zu verhindern, allerdings wird vermutet, dass die Calciumfreisetzung indirekt über Src gesteigert wird. Diese Src-induzierten Calciumpulse aktivieren auch die Proteinase μ -Calpain, wodurch es zum Loslösen und somit zur Initiation des nächsten mobilen Zyklus kommt. (Yaroslavskiy, Turkova et al. 2010) Abbau von cGMP führt zu Termination des Mobilitätszyklus. (Robinson, Blair et al. 2010)

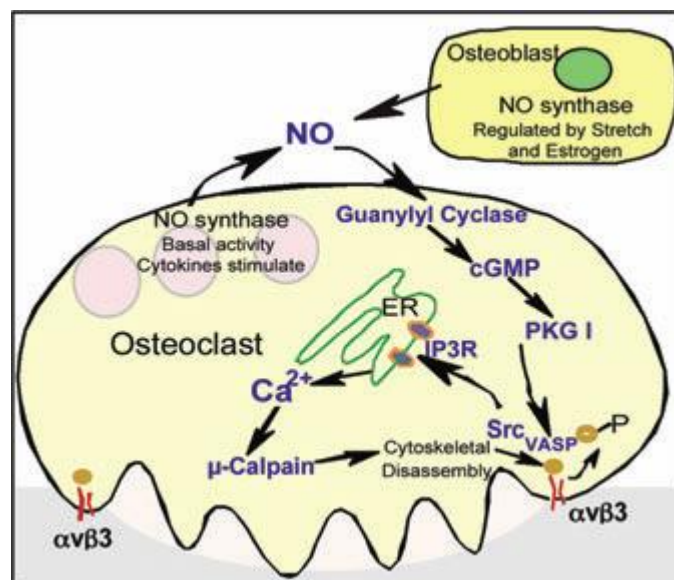


Abbildung 8: Signaltransduktionskaskade durch NO (Robinson, Blair et al. 2010)

1.1.4 Physiologische Abläufe und Frakturheilung

1.1.4.1 Ossifikation

Die Bildung von Knochengewebe kann abhängig vom Typus des gebildeten Knochens auf 2 Arten erfolgen.

Durch *intramembranöse Ossifikation* entstehen flache Knochen wie der Schädeldachknochen. In vaskularisierten Regionen kondensiert das mesenchymale Gewebe und entwickelt sich zu primären Ossifikationszentren, die Netzwerk aus Geflechtknochen trabekel bilden können. Diese Trabekel werden mit Periost überzogen, mineralisiert und das Bindegewebe zwischen ihnen teilweise durch hämatopoietisches ersetzt. Letztlich findet im Remodeling der Ersatz des Geflechtknochens durch Lamellenknochen statt.

Endochondrale Ossifikation tritt bei der Bildung von langen Knochen, Becken und Wirbelsäule aus ihren knorpeligen Vorstufen auf. Dieses knorpelige Knochenmodell entsteht bereits im Foetus durch mesenchymale Stammzellen, die aggregieren, zu Chondroblasten und weiter zu Chondrozyten differenzieren und letztendlich hypertrophieren. Sind diese primären knorpeligen Zentren vorhanden, kommt es über die Verbreitung der Zellen zu einer Expansion des Gebildes. Unterhalb der Region, in der das Wachstum stattfindet, befinden sich die hypertrophen Zellen. Oberhalb der Wachstumsregion proliferieren die Chondrozyten und stehen durch eine Signalkaskade mit der über ihnen liegenden Reservoirregion in Verbindung. Dadurch können sie die Proliferation der Reservoirzellen fördern oder unterbinden.

Schließlich sezernieren die hypertrophen Chondrocyten VEGF, CTGF und Fas, Faktoren, die das Einfließen von Blut, Kollagenresorption durch Chondroblasten, Bildung von Geflechtknochen durch Osteoblasten und Remodeling durch Osteoclasten einleiten sollen. Mit dem Eintritt des Blutes kommt es zum Zelltod der hypertrophen Chondrozyten, gefolgt von einer Resorption des mineralischen Knorpels, Formation der Markhöhle und Ersatz des Knorpels durch Knochen und Knochenmark. Teilweise wird der Knorpel von Osteoblasten als Plattform verwendet, auf der sie beginnen Osteoid zu sezernieren. (Baroli 2009)

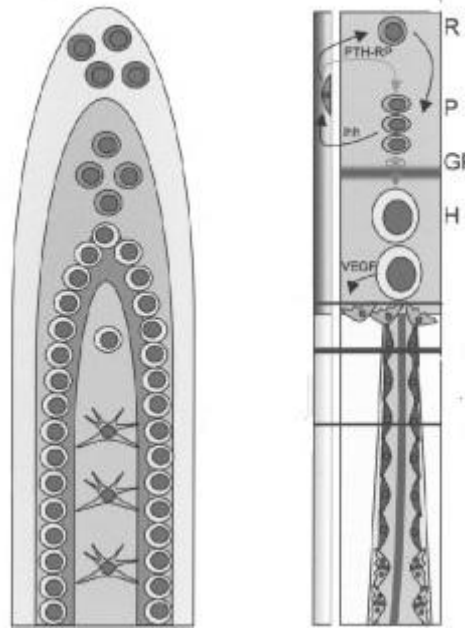


Abbildung 9: Intramembranöse (links) und endochondrale Ossifikation
(Baroli 2009)

1.1.4.2 Knochenmodeling und –remodeling

Die Knochenstruktur muss aufgrund von Wachstum, kleinen Einrissen und Anpassung an Belastungen regelmäßig erneuert werden. Das Remodeling setzt sich aus 4 Phasen zusammen: Aktivierung, Resorption, Reversal und Formation. Die Aktivierung umfasst die Rekrutierung von Vorläuferzellen aus dem Blut bis hin zur Fusion zu reifen Osteoclasten. Die darauf folgende Resorption dauert 2-4 Wochen und führt zu Bildung von Howship-Lakunen bei trabekulärem und Haver'schen Kanälen in kortikalem Knochen. Während der Umkehrphase finden sich in den Resorptionslakunen zahlreiche einkernige Zellen wie Monozyten, aus der Matrix freigelegte Osteozyten und für die Formation rekrutierte Osteoblasten. Wie die Umkehrphase eingeleitet wird, ist noch nicht vollständig geklärt. Während der 4-6 Monate andauernden Formationsphase synthetisieren die Osteoblasten kollagenöse Matrix und regulieren deren Mineralisation. Die eingeschlossenen Osteoblasten werden zu Osteozyten. Der Formationsprozess endet mit der Bildung eines neuen Osteons. (Clarke 2008)

1.1.4.3 Heilung von Knochenbrüchen

Knochen ist das einzige Gewebe, das ohne Narbenbildung heilt. Je nach Art des Bruches kommt es zu primärer oder sekundärer Frakturheilung. Stehen die Bruchenden noch in engem Kontakt miteinander, tritt *primäre Frakturheilung* ein. Sind beide Bruchstücke an ihrem ursprünglichen Platz verblieben, spricht man von „primary contact healing“. In diesem Fall bilden die Osteoclasten durch Resorption Tunnel von einem Knochenstück in das andere. Solche Tunnel werden dann von Osteoblasten mit Knochenmatrix aufgefüllt, sodass biologische Verbindungsstäbe entstehen. Mit dem Remodeling dieser Stäbe ist die Heilung abgeschlossen.

Bei „primary gap healing“ sind, beispielsweise durch Verschiebung der Bruchstücke, Lücken und Überlappungen entstanden. Die Hohlräume werden mit Blut gefüllt und von Osteoprogenitorzellen und Osteoblasten infiltriert, wodurch es zur Bildung von Geflechtknochen kommt, der letztendlich zu Lamellenknochen umgebaut wird. Überlappungen werden nach dem Prinzip des „primary contact healing“ behoben.

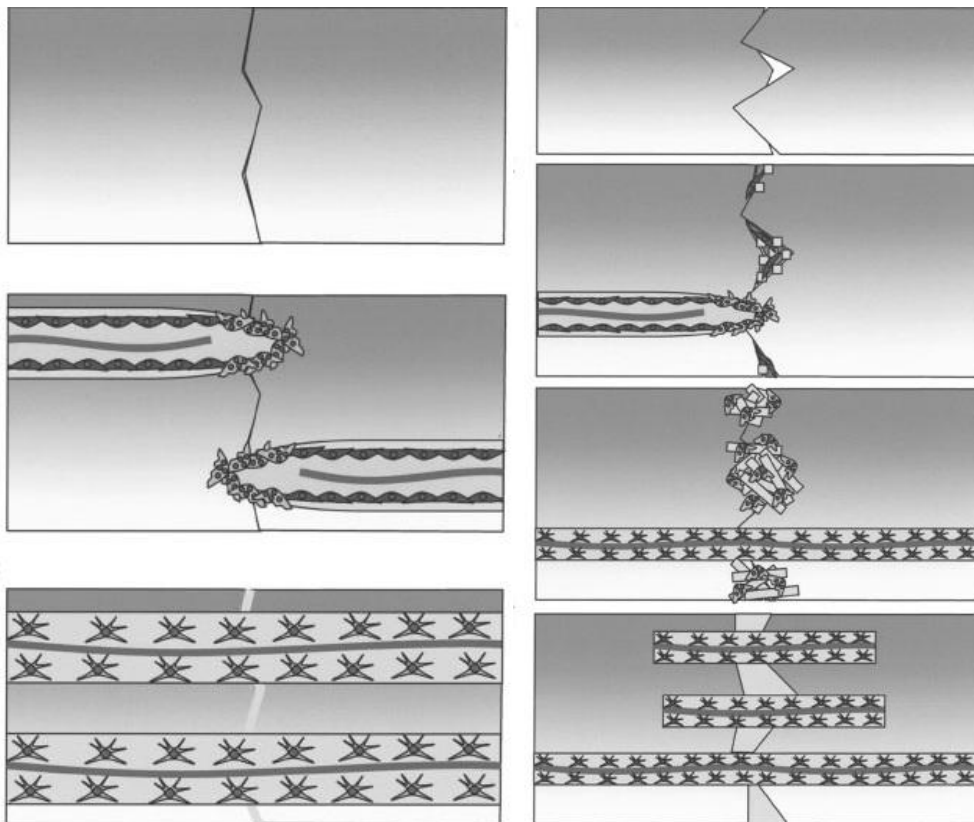


Abbildung 10: “Primary contact healing” und “primary gap healing”, (Baroli 2009)

Sekundäre Frakturheilung zeigt sich nach Brüchen, die große Distanz zwischen den verbleibenden Knochenenden herbeiführen. Nach der Zerstörung des Periosts, des Endosts, der Blutgefäße, des Knochenmarks und benachbarter Strukturen kommt es zum Einfließen von Blut, das zur Hämatombildung führt, während die rupturierten Gefäße thrombotisch werden. Makrophagen und andere Immunzellen wandern ein. Zellen, die die Verletzung des Gewebes überlebt haben, bilden Granulationsgewebe, den primären, weichen Kallus. An den äußeren Knochenrändern wird fibröses Knorpelgewebe gebildet, um die Schadensregion zu stabilisieren. Bildet sich ein Gerinnsel, kann es durch die geringe Sauerstoffversorgung zu einer Nekrose der Frakturoberfläche kommen. Dadurch wird eine Resorption der Knochenfragmente und des Gerinnsels durch Osteoclasten und Makrophagen eingeleitet. 2 Wochen danach kommt es durch Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten und Chondrozyten zur Synthese von knöchiger und knorpeliger Matrix. Eine Woche darauf startet die Mineralisation, die 4-16 Wochen andauern kann. Letztendlich durchläuft dieser harte Kallus das Remodeling, zuerst zu Geflecht-, schließlich zu Lamellenknochen. Dieser Prozess kann bis zu 4 Jahre in Anspruch nehmen. (Baroli 2009)

1.2 Knochenersatzmaterialien

Treten in der Knochenstruktur aufgrund verschiedener Ursachen Defekte oder Instabilitäten auf, die durch körpereigene Prozesse nicht behoben werden können, wird von Knochenersatz Gebrauch gemacht. (Niedhart und Niethard)

Die Eigenschaften der verwendeten Implantate sind divers und müssen der Anwendung angepasst sein.

1.2.1 Anforderungen an Knochenersatz

1.2.1.1 Biokompatibilität

Abgesehen von Sterilität und Pyrogenfreiheit hängt die Verträglichkeit des Implantates sehr stark von anderen Faktoren ab. Direkt nach der Implantation lagern sich Blutproteine an der Oberfläche an, was die Zelladhäsion und folgende Immunantwort reguliert. (Baroli 2009)

Je nach Oberflächenbeschaffenheit erfolgt die Adsorption verschiedener Konzentrationen und Arten von Proteinen. Die Interaktion dieser Proteine mit Adhäsionsmolekülen auf proinflammatorischen Zellen kann zu Fremdkörperreaktionen mit akuter und chronischer Entzündung führen kann. (Anderson, Rodriguez et al. 2008) Sollte es auch noch zur Verkapselung kommen, ist die Verbindung zwischen Knochen und Implantat unterbrochen, was Implantatversagen zur Folge haben kann. (Anderson, Rodriguez et al. 2008)

Auch eine Degradation des Implantates bringt die Möglichkeit einer Fremdkörperreaktion mit sich. Knochenersatz aus Metall, Keramiken und Polymeren kann korrodieren, resorbiert oder durch Hydrolyse abgebaut werden und die dadurch entstehenden Abbauprodukte toxikologisch bedenklich, also teratogen, mutagen, kanzerogen oder metabolisch beeinflussend, sein, ganz abgesehen von der möglichen Verstärkung einer Immunantwort. (Baroli 2009)

Ruft das Material selbst weder immunogene noch toxische Reaktionen hervor, so gilt die Anforderung der Biokompatibilität als erfüllt. Bei bioinerten Materialien bleibt im Gegensatz zu bioaktiven immer eine Grenzschicht zwischen Knochen und Implantat bestehen. (Niedhart und Niethard)

1.2.1.2 Bioaktivität

Knochenersatzmaterialien sollten mit dem umliegenden Gewebe interagieren und zumindest darin integriert werden. Die Mindestanforderung der *Osteokonduktivität* verlangt nach einer Förderung des Eintretens von Kapillaren, perivaskulärem Gewebe und Knochenzellen in den Defektraum. (Niedhart und Niethard)

Für diesen Effekt wird eine Porengröße benötigt, die idealerweise im Bereich von 100µm bis 500µm liegt. (Parikh 2002)

Osteoinduktive Materialien fördern die Umwandlung von undifferenzierten mesenchymalen Stammzellen zu Osteoprogenitorzellen, während *osteostimulative* bereits differenzierte Knochenzellen aktivieren. Als wichtigste osteoinduktive Substanzen gelten die Bone Morphogenic Proteins (BMP), die unter physiologischen Bedingungen in der Knochenmatrix vorhanden sind. (Niedhart und Niethard)

Wachstumsfaktoren wie IGF-1, TGF-β, PDGF und bFGF, die eine wichtige Rolle im Anfangsstadium der Frakturheilung spielt, können osteostimulierend wirken beziehungsweise die Osteoinduktion der BMPs verstärken. (Nandi, Roy et al. 2010)

1.2.1.3 Belastbarkeit

Implantate für Knochenersatz sollten die mechanische Beschaffenheit haben, den Kräften standzuhalten, die auch auf das normalerweise an der Defektstelle vorhandene Gewebe wirken. Sie müssen Zellen bestmöglich vor Zug- und Kompressionsspannungen schützen, unter diesen Bedingungen stabil sein und eventuelle mechanische Signale an nachfolgendes Gewebe weitergeben. Bei resorbierbaren oder andersartig degradierenden Materialien sollte gewährleistet sein, dass die Funktion des abgebauten Teils des Implantates von neugebildetem Gewebe übernommen wird. (Baroli 2009)

1.2.2 Materialien

1.2.2.1 Autograft

Aufgrund der meist schwachen Immunantwort und der Tatsache, dass die osteokonduktiven und –induktiven Eigenschaften denen der Alternativmaterialien überlegen sind, werden Knochenspenden aus dem Gewebe des Empfängers immer noch als Goldstandard im Bereich des Knochenersatzes angesehen. Autografts enthalten noch funktionsfähige osteogene Zellen und Knochenmatrixproteine, wodurch sie vom Körper optimal integriert werden können.

Spongiöse Implantate haben stärkere osteokonduktive Effekte, die vor allem durch das Vorhandensein von Osteoblasten und Endostalzellen verstärkt werden. Die Osteoprogenitorzellen, die zum Ort der Implantation gebracht werden, können zur Produktion von großen Mengen an Osteoblasten führen und somit die Bildung von entsprechend viel Knochen hervorrufen. Begünstigt wird dieser Vorgang durch im Knochen vorhandene osteoinduktive Substanzen wie Bone Morphogenic Protein (BMP), die im Zuge des Resorptionsprozesses freigesetzt werden.

Autologe spongiöse Transplantate werden meist aus dem Beckenkamm, teilweise auch aus Speiche oder Schienbein, entnommen. Ihre Anwendung erfolgt vor allem bei verzögerter Frakturheilung der langen Extremitäten und Rekonstruktion von Depressionsfrakturen unterhalb des Schienbeins.

Kortikale Knochenspenden weisen nur geringe osteoinduktive Tendenzen auf, sind aber osteokonduktiv. Im Gegensatz zu spongiösen Autografts liefern sie sofortige strukturelle Unterstützung. Nicht-vaskularisierte Spenden zeigen durch 6 Wochen nach der Transplantation durch Resorption und Revaskularisation bedingten Stabilitätsverlust. Obwohl nicht-vaskularisierte Knochenstücke direkt nach der Implantation großen Kräften standhalten können, müssen sie durch eine Fixierung vor Brüchen geschützt werden. Vaskularisiertes Knochengewebe besitzt den Vorteil der schnelleren Heilung.

Kortikale Spenden sind ideal für Defekte im Bereich von 5-6 cm, während spongiöser Knochen höhere Erfolgsraten und geringere Gefahr der Krankheitsübertragung aufweist. (Nandi, Roy et al. 2010)

Nachteile wie geringe Verfügbarkeit, Folgeschäden in der Spendenregion, und die doppelte Komplikationsgefahr durch die Entnahme haben schon früh zur Suche nach Alternativen zur autologen Spende. (Niedhart und Niethard)

1.2.2.2 Allograft

Transplantate, die aus menschlichen Kadavern entnommen werden, eliminieren die Problematik bezüglich der Spendenregion. Diese Allografts stehen in verschiedenen Formen und Größen zur Verfügung, allerdings in limitierter Zahl. Demineralisierte Knochenmatrix, kleine spongiöse Plättchen, rein-kortikale und Mischtransplantate, osteochondrale und gesamte Knochensegmente sind Teil der vielfältigen Auswahlmöglichkeiten. Sie sind osteoinduktiv und –konduktiv, beinhalten aber keine lebenden Zellen mehr. Ein großer Nachteil ist die mögliche Infektübertragung, die vermutlich durch entsprechende Vorbehandlung eingedämmt werden kann. (Nandi, Roy et al. 2010)

1.2.2.3 Natürliche Polymere

Natürliche Polymere sind in unterschiedlichem Maß biokompatibel, biodegradierbar und bioaktiv, wodurch sie für die Nutzung als Knochenersatzmaterialien interessant werden. Allerdings weisen sie nur geringe Belastbarkeit auf, was dazu führt, dass sie eher in Verbindung mit anderen Komponenten, als Composite, verwendet werden. Zu den weiteren Nachteilen zählen die potentielle Immunogenität, die biologischen Materialien generell immanenten Chargenunterschiede und geringe Beeinflussbarkeit des Abbauprozesses. Kollagene, Alginate, Chondroitinsulfat, Hyaluronan, Chitosan und Seide machen nur einen geringen Anteil der Vielfalt der verwendeten Polymere aus. (Baroli 2009)

1.2.2.4 Synthetische Polymere

Synthetische Polymere haben gegenüber natürlichen die Vorteile der Vermeidung von Krankheitsübertragung und gezielter Steuerung der chemischen und mechanischen Gegebenheiten. Biodegradation kann durch Einbau hydrolysierbarer chemischer Gruppierungen wie Ester, Ether-Ester-Bindungen, Anhydride oder Amide zwischen den Polymereinheiten erreicht werden. Daher hängt die Abbaurate nicht alleine vom Degradationsmechanismus, sondern auch von der Stärke der Bindungen ab.

Makroporöse, hydrophile Materialien zeigen Stabilitätseinbußen mit fortlaufendem Abbau. Hydrophobe Polymere, die durch Oberflächenerosion degradieren, verlieren zwar an Volumen, nicht jedoch ihre mechanischen Eigenschaften.

Allerdings zeigen synthetische Polymere Nachteile wie potentiell toxische Abbauprodukte, Senkung des pH-Wertes am Implantationsort, Initiation einer chronischen Entzündung, schlechte Clearance und geringe biologische Aktivität. Die meist verwendeten Polymere sind Polymilchsäure (PLA), Polymilchsäure-Polyglykolsäure-Copolymer (PLGA), Polycaprolacton (PCL), Polyethylenglykolverbindungen (PEG), Polyanhydride und photopolymerisierbare Derivate. (Baroli 2009)

1.2.2.5 Metalle

Metalle werden als bioinerte Materialien betrachtet, die sich durch hohe Stabilität auszeichnen. Als Spongiosa ausgebildet weisen sie starke osteokonduktive Effekte auf. Aufgrund ihrer hohen Eigenstabilität erfolgt ihr Einsatz vor allem an der Wirbelsäule und an anderen belastungsintensiven Gebieten. (Niedhart und Niethard) Cobalt-Chrom-Mischungen, Titanlegierungen und Tantal, das durch neue metallurgische Techniken zu einer schaumartigen Struktur mit interkonnektierenden Poren verarbeitet werden kann, sind die überwiegenden Ausgangsstoffe dieser Implantate. (Parikh 2002)

Obwohl man lange von der toxikologischen Sicherheit dieser implantierbaren Metalle ausgegangen ist, zeigte sich in Untersuchungen nach der Implantation eine Verdickung des Oxidfilms und Austausch von Ionen. In das Implantat wurden

Calcium, Phosphor und Schwefel inkorporiert, während Metallionen ins umliegende Gewebe und sogar bis in Blut und Urin der Patienten übertraten. Da zu hohe Blutspiegel pharmakologisch und toxikologisch bedenklich sein können, sind metallische Implantate nur bis zu einem gewissen Grad inert. (Puleo und Nanci 1999)

Als weitere Nachteile werden die Beeinflussung der bildgebenden Diagnostik und je nach Anwendungsgebiet auch die mangelnde Resorbierbarkeit angesehen. (Niedhart und Niethard)

1.2.2.6 Biogläser

Bioaktive Gläser sind solide Materialien aus Siliciumdioxid, Calciumoxiden, Natriumoxiden und Phosphaten. Die Gläser sind osteokonduktiv, biokompatibel und können ohne Bildung von fibrösem Gewebe eine Verbindung mit dem Knochen eingehen. (Nandi, Roy et al. 2010) Diese kommt vermutlich durch Kristalle zustande, die dem Hydroxylapatit der Knochenmatrix gleichen. (Giannoudis, Dinopoulos et al. 2005)

Dieser Hydroxylapatit-Film wird mit der Zeit durch Knochengewebe ersetzt. Das generelle Verhalten bioaktiver Gläser ist abhängig von ihrer Zusammensetzung, dem pH-Wert der Umgebung, der Temperatur und der Oberflächenschicht der Gläser. Die Verbindung mit dem Knochen scheint sich bei Steigerung der Rauigkeit des Materials zu verstärken, wobei die Zusammensetzung der Gläser das Ausmaß dieses Effekts beeinflusst.

Die Biokompatibilität erweist sich als recht hoch, da nur geringe bis gar keine Entzündungsreaktionen im umliegenden Gewebe auftreten. Überdies können Glasfaserimplantate innerhalb von 6 Monaten komplett resorbiert werden. (Nandi, Roy et al. 2010)

Allerdings sind sie nur schwer formbar und können bei Fixierungsprozessen leicht brechen. (Giannoudis, Dinopoulos et al. 2005) Daher erfolgt die Anwendung vor allem in der Kopfregion, zum Beispiel in der Tympanoplastik, und bei Lückenauffüllung nach Gewebeentnahme. (Nandi, Roy et al. 2010)

Um das Material resistenter gegen wechselnde Beanspruchung zu machen, kann unter anderem Einbau von Glasfasern und Zirconia erfolgen. Eine Besonderheit unter

den bioaktiven Gläsern sind die Glasionomerezemente. Die zu Beginn nur in der Zahnmedizin eingesetzte Paste aus Calcium-, Aluminium- und Fluorosilikaten gemischt mit Polycarboxysäuren ist nach dem Härtingsprozess wasserunlöslich. Aufgrund ihrer Biokompatibilität, osseointegrativen Eigenschaften und günstiger Proteinfreisetzungseigenschaften können die Glasionomere als Vehikel für gezielte Proteinfreigabe verwendet werden. (Giannoudis, Dinopoulos et al. 2005)

1.2.2.7 Calciumphosphatkeramiken

1.2.2.7.1 Hydroxylapatit $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$

Sein Vorhandensein in der tatsächlichen Knochenmatrix prädestiniert Hydroxylapatit als Knochenersatzmaterial. Die Ausgangsstoffe für Hydroxylapatitkeramiken entstammen entweder biologischen Quellen wie boviner Spongiosa oder Korallen oder werden synthetisch hergestellt. Bei entsprechender interkonnektierender Porengestaltung sind Hydroxylapatitimplantate auch osteokonduktiv, werden aber kaum resorbiert. (Niedhart und Niethard)

Bei Implantation in Kaninchen zeigte Hydroxylapatit nach 24 Wochen nicht die geringsten Anzeichen von Abbau, was durch geringe osteoclastäre Aktivität auf dem Material in vivo erklärt wird. (Okuda, Ioku et al. 2007)

Obwohl sie über ausreichende Druckfestigkeit verfügen, ist aufgrund der geringen Widerstandskraft gegen Torsionseinwirkungen keine zufriedenstellende Belastungsstabilität gegeben. (Niedhart und Niethard)

Da Knochen über Hydroxylapatitsubstitution als Speicher für Schwermetalle fungieren kann, wurde dieses Prinzip auch auf Knochenersatzmaterialien angewendet. Inkorporierte Elemente haben Auswirkungen auf die Eigenschaften von Hydroxylapatit: Einlagerung von Carbonaten und Strontium erhöht die Löslichkeit, Silikate wirken sich positiv auf die mechanische Stabilität aus. Unter Nutzung dieser Effekte wurde eine Reihe von veränderten Apatiten kreiert. (Vallet-Regí und González-Calbet 2004)

2004 war Hydroxylapatit eines der meist verwendeten Materialien für Knochensubstitution. Die Hauptanwendung erfolgt in Form von gesinterten,

makroporösen Kügelchen, als Zement in nur schwach belasteten Körperregionen und als Überzug von metallischen Implantaten. (Barrère, van Blitterswijk et al. 2006)

1.2.2.7.2 Dicalciumphosphatdihydrat $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Dicalciumphosphatdihydratkristalle sind monoklin, haben demnach nur eine Neigung, und gehören zu den löslichsten Calciumphosphaten. Sie werden meist als Komponenten von Calciumphosphatzementen verwendet. (Barrère, van Blitterswijk et al. 2006)

1.2.2.7.3 Octacalciumphosphat $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

Kristalle des Octacalciumphosphates sind triklin und das Kristallgitter besitzt einen zweischichtigen Aufbau. Eine Apatitschicht und eine hydratisierte Phase sind über Wasserstoffbrücken und Van-der-Waals-Kräfte miteinander verbunden. Octacalciumphosphat tritt auch als Zwischenstufe bei der Bildung des biologischen Hydroxylapatit auf (siehe 1.1.2.1)

Es ist biokompatibel, resorbierbar und osteokonduktiv, wird aber klinisch nicht als Knochenersatz verwendet. (Barrère, van Blitterswijk et al. 2006)

1.2.2.7.4 Tricalciumphosphat $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$

Bei Tricalciumphosphat (TCP) kann man 2 Hauptkristallformen unterscheiden: α -TCP mit monoklinen Kristallen und β -TCP in der rhomboedalen Kristallform. Ab einer Temperatur von 1125 °C beginnt die Umwandlung von β -TCP in die α -TCP-Phase, die bei nach Beendigung des Erhitzungsvorganges sofortiger Abkühlung auf Raumtemperatur stabil bleibt.

Wird auf 1430 °C und höher erhitzt, kommt es zur Bildung einer Super- α -TCP-Phase, die sich nach sofortiger Abkühlung wieder in normales α -TCP rückwandelt. Da α -TCP anscheinend eine Art metastabiler Kristallzustand ist, wird seine Löslichkeit im Vergleich zu β -TCP als besser eingeschätzt. (Berger und Gildenhaar 1995)

Tricalciumphosphat ist biokompatibel und bioaktiv (Nandi, Roy et al. 2010), weniger belastungsstabil, dafür resorbierbarer als Hydroxylapatit. (Niedhart und Niethard)

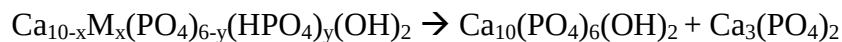
Durch ihre meist schwammartig vernetzte Struktur vermitteln Tricalciumphosphatimplantate starke osteokonduktive Effekte und Resorption, die vom Zeitablauf der von Knochen ähnelt. Studien an Hunden zeigten gute Verträglichkeit, schnelle Gewebsinfiltration und langsame Resorption bei Implantation in spongiöse Knochenabschnitte. (Nandi, Roy et al. 2010)

Untersuchungen von Moncheau et. al zufolge finden sich auf β -TCP-Oberflächen tiefere, weiter verstreute Resorptionslakunen als die auf Hydroxylapatit vorhandenen, länglich ausgebildeten. Vermutlich führt nicht nur die Resorption alleine, sondern eine Kombination von physikalisch-chemischen Effekten (wie Abrieb oder Löslichkeit) mit biologischen (wie pH-Wert-Senkung und osteoclastärer Aktivität) zum Abbau des Implantates. (Lu, Descamps et al. 2002)

Angewendet wird Tricalciumphosphat vor allem als Defektfüller und in der Zahnmedizin. (Nandi, Roy et al. 2010)

1.2.2.7.5 Biphasische Calciumphosphate

Biphasische Calciumphosphate bestehen aus 2 verschiedenen, in ihren Anteilen variierenden Calciumphosphaten, wobei die eine Komponente meist der schlechter lösliche Hydroxylapatit, die zweite hingegen Tricalciumphosphat ist. Hergestellt werden sie durch Sinterung von Defektapatit auf oder über 700 °C. Bei einem Calcium-zu-Phosphat-Verhältnis von weniger als 1,67 läuft dann folgende Reaktion ab:



Durch Variation einiger Faktoren dieses Verfahrens kann man die Löslichkeit und Biodegradation des entstehenden Produktes aktiv beeinflussen. (Barrère, van Blitterswijk et al. 2006)

Kommerziell verwendete Produkte besitzen Hydroxylapatit-zu-Tricalciumphosphat-Verhältnisse im Bereich von 60/40 bis 75/25, wobei sich deren Porosität gemessen am Volumen im Bereich von 70% bewegt. (Daculsi, LeGeros et al. 2008)

1.2.2.8 Maritime Substrate

Koralliner Hydroxylapatit weist ähnliche Strukturen wie sowohl spongiöser als auch kortikaler Knochen auf. Das Verhalten nach der Implantation gleicht dem von spongiösem autologen Knochen. In Tiermodellen war der Einsatz als Träger für Wachstumsfaktoren erfolgreich. Auch Schwammgewebe zeigt durch seinen netzartigen Aufbau und den Kollagenanteil osteokonduktive und -induktive Tendenzen. Jedoch muss dafür große räumliche Nähe zwischen Implantat und Knochen herrschen. (Nandi, Roy et al. 2010)

1.2.2.9 Calciumsulfat

Die Kristalle des medizinisch angewendeten Calciumsulfates zeigen sich in Größe und Form sehr regelmäßig. Calciumsulfat findet breite Anwendung als Lückenfüllstoff bei Knochendefekten und kann durch seine gut einschätzbare Löslichkeit als Carrier für Antibiotika und andere Substanzen fungieren. Durch die Bioabsorption muss es nach der Implantation nicht wieder entfernt werden. (Parikh 2002)

Allerdings stellt sich die Frage, wie ausgeprägt die Eignung als Knochenersatzmaterial in stark belasteten Körperregionen ist, da mit der Biodegradation ein enormer Verlust der mechanischen Eigenschaften einhergeht. (Nandi, Roy et al. 2010)

1.2.2.10 Aluminiumoxid

Aufgrund seiner hohen Festigkeit und seines geringen Abriebes zählt Aluminiumoxid zu den Hartkeramiken. Al_2O_3 ist die einzige thermodynamisch stabile Form. Aluminiumoxid weist gute Biokompatibilität und Osseointegration auf, jedoch kann es trotz dem geringen Abrieb zu schwach ausgeprägten Fremdkörperreaktionen kommen. Die Hartkeramik findet sowohl als Knochen- als auch als zahnmedizinisches Implantat Anwendung. (Thamaraiselvi und Rajeswari)

1.2.2.11 Composites

Um Eigenschaften verschiedener Materialien in einem Implantat zu vereinen, wurden die Composites – Verbindungen aus 2 oder mehreren Komponenten – entwickelt.

Einer der Hauptbestandteile sollte hohe Primärstabilität aufweisen und als Gerüst dienen, um der oder den modifizierenden, meist mechanisch labilen Komponenten als Plattform zu Verfügung zu stehen. Die Gerüststoffe können entweder bioinerte Materialien wie Metalle oder Hartkeramiken, bioaktive stabile Verbindungen wie Keramiken oder Biogläser, biologische Grundstoffe, zum Beispiel aus Korallen, und Polymere sein. Bioinerte Materialien werden oft mit bioaktiven überzogen. Beschichtungen der Gerüststoffe können mit vereinzelt Peptid- oder Proteinsequenzen, die die Adhäsion von Zellen positiv beeinflussen wie beispielsweise Osteopontin, Vitronectin, Fibronectin, Kollagen I oder andere Proteine mit RGD-Sequenz, erfolgen. Osteoinduktive und –stimulierende Komponenten kommen ebenfalls zur Anwendung. (Niedhart und Niethard)

Auch Kombinationen mit zellulären Komponenten wie mesenchymalen Stammzellen zeigen großes osteogenes Potential. (Nandi, Roy et al. 2010)

1.2.2.12 Zellbasierte Substitution

Da die Zellstimulation in vivo durch Freisetzung von Faktoren aus entsprechenden Materialien aufgrund von Dosierungsproblematik, Aktivitätsminderung rekombinanter Faktoren und zeitlicher Unterversorgung nicht immer optimal funktioniert, wurde direkte Integration von Zellen erprobt. Die Kombination von Knochenmarkszellen oder kultivierten mesenchymalen Stammzellen mit Keramiken zeigte sich im Tiermodell erfolgreich. Um Knochen und Knorpel zu regenerieren, wurden mesenchymale Stammzellen in osteochondrale Defekte von Kaninchen eingebracht, was die erwartete Differenzierung zu Chondrozyten zur Folge hatte. Trotz der Schwierigkeiten bei der Isolation, Expansion und Charakterisierung der Stammzellpopulation und Unklarheiten bezüglich einer Immunreaktion zwischen Implantatsmaterial und den Zellen, scheint diese Art der Substitution eine vielversprechende Zukunft zu haben.

Auch durch Einsatz von spezifischen genetischen Sequenzen haben körpereigene Zellen die Möglichkeit entsprechende Proteine sezernieren und so die Regeneration des Gewebes oder Integration beziehungsweise Resorption des Implantates zu beeinflussen. Diese Gene können entweder direkt an entsprechender Stelle eingebracht werden (In-vivo-Technik) oder durch nach Transfektion reimplantierte Zellen (Ex-vivo-Technik) zur Anwendung kommen. Die indirekte Methode ist sicherer, da die Genmanipulation unter kontrollierten Bedingungen außerhalb des Organismus stattfindet. Für die Transfektion können sowohl virale als auch non-virale Vektoren verwendet werden. Übertragungssysteme wie Liposomen sind leichter zu produzieren und weisen geringeres toxisches beziehungsweise immunogenes Potential auf, sind aber bei Weitem nicht so effizient wie virale Vektoren. (Nandi, Roy et al. 2010)

1.2.3 Physikochemische Parameter, die die Interaktion mit Zellen beeinflussen

Die Vorgänge, die die Reaktion der Keramik selbst betreffen, sind gleichermaßen zu beachten wie das Zellverhalten, da sich ersteres unmittelbar auf letzteres auswirkt.

1.2.3.1 Ionenaustausch, Löslichkeit und Repräzipitation bei Calciumphosphaten

Bei Freisetzung von großen Calciummengen aus einer Matrix, kann die angestiegene Konzentration auch einen Einfluß auf Zellen ausüben. Osteoclasten beispielsweise lösen sich aufgrund solcher Gegebenheiten von der entsprechenden Oberfläche, wodurch es zu einer Inhibition der Resorption kommt. (Yaroslavskiy, Turkova et al. 2010)

Je nach Eigenschaften des Knochenersatzmaterials (Partikelgröße, Kristallstruktur, Dichte) und des umgebenden Milieus ändert sich das Lösungsverhalten der Verbindung. Geht man von Bedingungen aus, die denen innerhalb der menschlichen Blutbahn ähneln (37°C, pH 7), so bildet Hydroxylapatit die stabilsten Phase, der Reihe nach gefolgt von Tricalciumphosphat, Octacalciumphosphat und Dicalciumphosphatdihydrat. Allerdings genügen diese Annäherungen nicht um eine Aussage über das Verhalten am Implantationsort zutreffen, da dynamische Vorgänge im Körper dieses mitbeeinflussen.

Herrscht in der umgebenden Lösung eine bestimmte Konzentration an Calcium- und Phosphationen, knapp beim Löslichkeitsprodukt, kann eine metastabile Zone oder eine labile Zone entstehen. In der metastabilen Zone ist spontane Kristallisation möglich, bleibt aber unwahrscheinlich, sofern kein Impfkristall vorhanden ist, während ein metastabiler Bereich die spontane Kristallisation wahrscheinlich, jedoch nicht unumgänglich macht. Demnach kann abhängig vom Milieu eine Rekristallisation der in Lösung gegangenen Bestandteile und, durch Einlagerung von Proteinen oder anderen Ionen, eine Transformation der Biokeramiken erfolgen.

Die Lösungsgeschwindigkeit einer Calciumphosphatkeramik steigt mit der Anwesenheit von Defekten im Kristallgitter, der Abnahme der Kristallgröße, Vorhandensein von Carbonaten, Silicaten oder Strontium in Hydroxylapatit und mit Vorliegen der Substanzen in amorpher Form. Einlagerung von Fluorid in

Hydroxylapatit oder Magnesium und Zink in β -Tricalciumphosphat verlangsamen den Dissolutionsprozess in vitro und in vivo.

Auch durch Proteine aus den Körperflüssigkeiten kann Rekristallisation beeinflusst werden. Je nach Art, Menge und Eigenschaften des Proteins und der Beschaffenheit der Keramik äußert sich die Wirkung. Manche Proteine, wie z.B. Kollagen-I, Osteonectin, Osteocalcin und Bone-Sialo-Protein, haben positiven Einfluß auf die Kristallbildung. Osteopontin hingegen gilt als Kristallisationsinhibitor. Auf der Keramik adsorbierte Proteine können die Bildung von Kristallen dadurch verhindern, dass sie entsprechende Stellen blockieren oder freilassen. Die genauen Auswirkungen der Vielzahl an im Körper vorhandenen Proteinen sind nicht bekannt, allerdings bleibt unbestritten, dass einigen von ihnen eine Rolle im Zuge der Kristallisation zukommt, da sie im Verbund mit der auf Calciumphosphatkeramiken gebildeten nanokristallinen Carbonatapatitschicht auftreten. Letztendlich tragen auch Mikro- und Makroporosität aufgrund der direkt proportional zur Oberfläche ansteigenden Löslichkeit ihren Teil zu den Dissolutionsphänomenen bei. (Barrère, van Blitterswijk et al. 2006)

1.2.3.2 Einfluß der Poren

Die Porosität, Porengestalt und –größe sind relevante Faktoren für die Integration des Implantates ins Knochengewebe. Makroporosität wird oft als Voraussetzung für richtiges Einwachsen von Gewebe betrachtet, allerdings scheint die Größe der Poren allein nicht dafür verantwortlich zu sein. Integration verläuft in kleineren, verzweigten Poren weitaus besser als in Strukturen, die die gleiche Porosität, aber einen höheren Porendurchmesser mit geringerem Vernetzungsgrad aufweisen.

Da Knochengewebe sehr stark von der Versorgung durch Blutgefäße abhängig ist, bedarf es eines schnellen Einwachsens dieser, was durch vernetzte Strukturen gefördert wird. Bei resorbierbaren Materialien wie β -Tricalciumphosphat stellen Vernetzungsgrad und Porosität nicht ganz so kritische Faktoren für die Osteokonduktivität dar, da durch den Abbau die Struktur ohnehin weiter geöffnet werden kann.

Die Poren bilden allerdings nicht nur Leitschienen für Gewebewachstum. Mikroporen haben direkten Einfluß auf das Verhalten der Zellen. (Hing 2005)

Osteoblasten zeigen auf β -Tricalciumphosphat mit hoher Mikroporosität geringere Überlebensraten als im Vergleich zu demselben Material mit nicht so ausgeprägter Mikroporosität. (Isaac, Hornez et al. 2008)

Überdies verändert die Mikroporosität die Nanotopographie und somit die Proteinadsorption, die wiederum auf das adhäsive Verhalten der Zellen Einfluß hat. Durch Oberflächenvergrößerung können so potentiell mehr Faktoren anlagern, die eine Wirkung auf umliegende Zellen ausüben. (Geblinger, Addadi et al. 2010)

1.2.3.3 Rauigkeit, Benetzbarkeit und Zellverhalten

Die Unebenheiten auf Materialien haben ebenfalls Auswirkungen auf die Interaktion mit Zellen. Osteoclasten werden auf rauen Titanoberflächen zu schnellerer Differenzierung stimuliert, zusätzlich steigt ihre resorptive Aktivität. (Geblinger, Addadi et al. 2010)

Auch oberflächliche Kratzer oder Microcracks aktivieren osteoclastäre Zellen (Geblinger, Addadi et al. 2010) und Osteoblasten auf Hydroxylapatit. (Smith, Baumann et al. 2006) Die Aktinringe der Osteoclasten sind auch auf rauen Oberflächen stärker ausgeprägt und länger beständig. Ob dieser Effekt direkt oder indirekt über Proteinadhäsion vermittelt wird, ist nicht genau geklärt. Allerdings erscheint die zweite Möglichkeit sehr wahrscheinlich, da raue Oberflächen generell stärkere Proteinadhäsion aufweisen. Bei Inkubation verschieden gestalteter Materialien mit Vitronectin wurde festgestellt, dass die adsorbierte Proteinmenge auf allen Oberflächen gleich hoch war. Somit kann man von einem konzentrationsunabhängigen Effekt ausgehen. (Geblinger, Addadi et al. 2010)

In Abhängigkeit von der Oberfläche zeigen Osteoclasten ein anderes Resorptionsverhalten. Auf unebenem Pferdeknochen zeigen die Osteoclasten ähnliches Verhalten wie auf β -Tricalciumphosphat. Sie resorbieren nur kleine Stücke, dafür aber besonders tief. Auf Rinderknochen zeigen sich eher längliche Resorptionsspuren. (Perrotti, Nicholls et al. 2009)

Mit zunehmender Rauigkeit sinkt zugleich die Benetzbarkeit, die auch ein Faktor für potentielle Zelladhäsion ist. Sie zeigt nicht nur mögliche Kontaktpunkte für die

Zellen auf, sondern gibt auch an in welchem Ausmaß Proteinadsorption auf der Oberfläche stattfinden kann. (Ranella, Barberoglou et al. 2010)

Oft adsorbiert aus fetalem Kälberserum zuerst Albumin an den diversen Oberflächen und wird erst später von Adhäsionsproteinen der Zellen verdrängt. Je nach chemischen Gruppen ändern sich die Benetzbarkeit und das Adhäsionsverhalten. Aber auch dieses variiert von Zelllinie zu Zelllinie. Andere Faktoren außer Acht lassend, ist für epitheliale Zellen ein anderer Benetzungswinkel ideal als für endotheliale. (Arima und Iwata 2007)

1.3 Zielsetzung der Diplomarbeit

Knochenersatzmaterialien kommen immer häufiger zur Anwendung, vor allem aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit und anderer Nachteile von Auto- und Allografts. (Baroli 2009)

Idealerweise können sie in einem kontinuierlichen Prozess durch Knochengewebe ersetzt werden. Doch bevor neuer Knochen den Platz des Substitutionsmaterials einnehmen kann, muss der Ersatz durch Lösungs- oder Resorptionsvorgänge entfernt werden. Da die Lösung zu Herausbrechen ganzer Stücke und zu Stabilitätsverlust im Implantat führen kann, ist eine Resorption im Zuge eines gleichmäßigen Remodelingvorganges vorzuziehen. (Niedhart und Niethard ; Baroli 2009)

Die Resorbierbarkeit von β -Tricalciumphosphat wird kritisch dokumentiert. Während von mancher Seite der Großteil des Abbaus der Löslichkeit zugeschrieben wird (Komlev, Mastrogiacomo et al.), zeigen andererseits Resorptionslakunen auf vorher genanntem Material, dass es durchaus eine Interaktion mit Osteoclasten gibt. (Monchau, Lefevre et al. 2002; Okuda, Ioku et al. 2007)

Oft kommen diese differierenden Ansichten durch Unterschiede zwischen den Komponenten oder Aufbauten der Versuche zustande. In einer Studie von Wang et al. wurden beispielsweise PMMA-Partikel von Osteoclasten phagozytiert, was zu der Schlußfolgerung führte, PMMA wäre resorbierbar. (Wang, Ferguson et al. 1997) Schilling et al. konnten allerdings keine osteoclastäre Resorption auf PMMA-Oberflächen feststellen. (Schilling, Linhart et al. 2004) In diesem Fall ist die Diskrepanz der Ergebnisse vermutlich auf verschiedene Versuchsabläufe zurückzuführen. Wang et al. setzten die Partikel in Form einer Suspension zu, wodurch die Partikel phagozytiert werden konnten. Dem hingegen war es den Osteoclasten nicht möglich, solche Partikel aus PMMA-Oberflächen heraus zu resorbieren, wofür unter anderem mangelnde Adhäsion verantwortlich sein könnte, da ohne diesen Vorgang auch keine Bildung des Aktinringes beziehungsweise einer Sealing Zone möglich ist.

Ebenso verhält es sich mit Untersuchungen zu β -Tricalciumphosphat. Viele Einflußfaktoren wie Sintertemperatur, Sinterdauer, alternative Herstellungsprozesse, Partikelform, Porosität und Porengestalt haben Auswirkungen auf die Löslichkeit und die Adhäsion der Osteoclasten.

Ziel dieser Arbeit war es, verschiedene Oberflächen mit β -Tricalciumphosphat als Ausgangssubstanz zu generieren und die Reaktion der Osteoclasten auf diese unterschiedlichen Gegebenheiten zu beobachten. Das sollte Aufschluß über den Zusammenhang zwischen Porenbeschaffenheit und Adhäsionsverhalten liefern. Überdies könnten die Ergebnisse dazu beitragen, Erklärungen für die unterschiedlichen Beobachtungen bezüglich Interaktion zwischen Osteoclasten und Tricalciumphosphat zu liefern.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Substanzen

Aceton	Fluka
Alexa-Fluor-488 phalloidin	Invitrogen
DAPI-Stocklösung	Sigma
Ethanol, absolut	Sigma
Ethanol, 70%	Sigma
Fast Red Violet Salt	Sigma
FCS	Sigma
Formaldehyd 3,7%	Sigma
HCl, 1M	Fluka
Penicillin/Streptomycin	Firma Gibco
α -MEM	Firma Gibco
α -Naphtol AS MX	Sigma
N,N-Dimethylformamid	Sigma
Natriumacetat	Sigma
Natriumtartrat	Sigma
Natriumazid	Sigma
PBS-TC	Eigenherstellung
PBS + Ca + Mg	Eigenherstellung
β -Tricalciumphosphat	Plasma Biotol (whitlockite, Batch P225S)

2.1.1 Geräte

Analysenwaage	Firma Sartorius MC 210 P
Camera	Olympus XM 10
Eppendorfgefäße	Firma Eppendorf
Fluoreszenzmikroskop	Olympus BX 51
Inkubator	Firma Kendro HERA Cell 240
Inkubierschrank	Heraeus instruments BFL 3032
Knochensäge Isomet	Firma Buehler Isomet low speed saw
Kulturplatten (12-well, 6-well)	Firma Greiner und Firma Iwaki
Lichtmikroskop	Nikon TMS
Lichtmikroskop	Nikon Diaphot 300
Magnetrührer mit Heizplatte	Ikamag RCT
Mikropipetten	Labsystems
Petrischalen	Firma Sterilin
pH-Meter	Firma Inula Metrohm 713 pH Meter
Pipetboy	Integra Biosciences
Presse für Infrarotpreßlinge	Graseby Specac
Sägeblatt	Firma Buehler Diamond wafering blade/series15
Sterile Kunststoffpipette	Costar
Sterile Pipetten	Brand
Sterilwerkbank	Firma Ehret
Transferpipette	Sterilin
Ultraschallgerät	Elma Transsonic 570
Vortexer	Firma Bender & Hobein AG Vortex Genie 2

Wasserbad	GFL 1066
Zentrifuge	Hermle Z323K
Zentrifugenröhrchen	Greiner

2.2 Methoden

2.2.1 Herstellung von β -TCP-Oberflächen

350 mg β -TCP-Pulver wurde eingewogen und mit Hilfe einer Presse zur Herstellung von Infrarotspektroskopie-Presslingen verarbeitet. Tabletten mit Urea-Beimischung wurden von der Firma Baxter gepresst und anschließend bei 1150 °C für 3h gesintert. Dieser Vorgang führt zur Verflüchtigung des Harnstoffanteils, wodurch größere Poren entstehen.

Bei den Experimenten zur Microporosität erfolgte die Herstellung der Presslinge mit einer hydraulischen Presse durch mich. Das Sintern der Presslinge bei verschiedenen Temperaturen wurde durch Gerald Zimmer (Fa. Baxte)r durchgeführt. Nähere Informationen zu den Brenntemperaturen und -dauern folgen unter Punkt 3.

2.2.2 Isolation und Aussaat der Kaninchen-Osteoclasten

4-5 Tage alte Kaninchen wurden narkotisiert und anschließend dekapitiert. Aus den Hinter- und Vorderbeinen wurden alle Röhrenknochen isoliert.

Die Knochen wurden auf trockener Oberfläche grob zerkleinert und pro Kaninchen in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zugabe von α -MEM mit 5% FCS wurde 2 Minuten lange mit einer Schere zerkleinert. Der Überstand des Mediums wurde anschließend unter Zuhilfenahme einer Transferpipette in ein Zentrifugenröhrchen auf Eis überführt. Es erfolgte Zugabe von α -MEM zu den Knochenfragmenten, gefolgt von abermaliger Überführung in das Zentrifugenröhrchen auf Eis. Der gesamte Vorgang wurde noch zwei weitere Male durchgeführt.

Die Knochenfragmente wurden portionsweise mit einem Gesamtvolumen von 13 ml α -MEM mit 5 % FCS in ein Zentrifugenröhrchen transferiert. Nach Vortexen und Absetzen der Fragmente wurde der Überstand abermals in das Zentrifugenröhrchen auf Eis überführt.

Dieses Röhrchen wurde bei 4 °C und 600 U/min. für 5 Minuten zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet portionsweise mit einem Gesamtvolumen 15 bis 20 ml α -MEM mit 5% FCS aufdispargiert. Pro well einer 12-

well-Platte wurde 0,5 ml beziehungsweise 1 ml Osteoclastensuspension auf die TCP- und Knochenplättchen aufgetragen.

Nach 3 Stunden Vorinkubation wurden die kultivierten Zellen unter dem Mikroskop betrachtet, mit α -MEM mit 5% FCS gewaschen und nach Zugabe von α -MEM mit 5% FCS pro well 48 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

2.2.3 Zellfixierung

Die Zellen wurden vorsichtig mit warmem PBS mit Calcium und Magnesium gewaschen. Mit 0,5 ml 3,7% Formaldehyd wurde erst 3 Minuten lange und anschließend mit 3,7% Formaldehyd weitere 10 Minuten fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS mit Calcium und Magnesium wurden die Zellen bei 4°C in PBS mit Calcium und Magnesium mit Natriumazid in einer Endkonzentration von 0,02% bis zur Durchführung einer Färbung gelagert.

2.2.4 TRAP-positive Zellen

2.2.4.1 TRAP-Färbung

Die auf den Tabletten kultivierten Kaninchen-Osteoclasten wurden einer Färbung des Enzymes TRAP (**T**artrate **R**esistant **A**cid **P**hosphatase) unterzogen, um die Auswirkung der verschiedenen Oberflächen der Gruppen der TCP-Plättchen auf das Wachstum der Osteoclasten quantifizieren zu können. TRAP ist ein Enzym, das zwar nicht nur in Osteoclasten exprimiert wird, aber dennoch einen guten Überblick über deren Zahl zulässt.

Die fixierten Zellen wurden mit TRAP-Puffer 30 Minuten bei 37°C und 5% CO₂ im Inkubator vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen in einer 1:1-Mischung von Aceton und absolutem Ethanol für 30 Sekunden dehydriert um die Aufnahme der Färbelösung zu erleichtern. Nach dem Trocknen der Ethanol-Aceton-Mischung erfolgte die Inkubation mit der TRAP-Färbelösung bei 37°C und 5% CO₂ bis zur ausreichenden Farbintensität (7-10 Minuten). Die Färbelösung wurde abgesaugt und die Knochen- und die TCP-Plättchen in bidestilliertem Wasser bei 4°C gelagert.

2.2.4.2 Auswertung

Unter dem Lichtmikroskop wurden alle rot gefärbten Zellen mit 3 oder Kernen gezählt. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem Statistik-Programm „Prizm“. Es wurden Mittelwert, Standardabweichung und Korrelationskoeffizient der Daten pro TCP-Gruppe gebildet. 4 Knochenplättchen dienten als Vergleich zur Oberfläche eines TCP-Plättchens.

2.2.5 Immunfluoreszenz

2.2.5.1 Färbung des Cytoskeletts und der Zellkerne

Um das Resorptionsverhalten von Osteoclasten beurteilen zu können, wurde eine Färbung des Cytoskeletts durchgeführt.

Die auf den Knochenplättchen und TCP-Plättchen haftenden Zellen wurden für 5 Minuten mit Aceton permeabilisiert. Auf einem Parafilm wurden die Knochenplättchen und Tabletten mit 100 µl einer Lösung von Alexa-Fluor 488 phalloidin in PBS mit Calcium und Magnesium pro Tablette beziehungsweise 4 Knochenplättchen 30 Minuten unter Lichtschutz inkubiert. Anschließend folgte ein Waschschrift in PBS mit Calcium und Magnesium, bevor die Färbung der Zellkerne gestartet wurde, die der späteren eindeutigen Klassifizierung von Zellen als Osteoclasten dienen sollte.

In einer 6-well-Platte wurden 2 Tabletten beziehungsweise 8 Knochenplättchen pro well mit DAPI-Lösung (Konzentration: 0,1 µg/ml) 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach erfolgten 3 Waschschrte in PBS mit Calcium und Magnesium, gefolgt von 3 weiteren in Wasser. Alle Schritte der Färbung wurden bei möglichst geringer Lichteinwirkung durchgeführt, um ein vorzeitiges Ausbleichen der Fluoreszenzfarben zu vermeiden.

Die gefärbten Knochenplättchen und Tabletten wurden auf Objektträgern mit Einbettungsmedium versehen, mit Deckgläsern abgedeckt und die Ränder mit Klebstoff verschlossen, um ein Austrocknen zu vermeiden. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C in Alufolie und unter Lichtschutz.

2.2.5.2 Auswertung

Die Osteoclasten der gefärbten Zellen wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop mit besonderer Gewichtung auf die Aktinringe betrachtet. Es wurden Photographien der Aktinringe angefertigt, um deren Ausprägung zu dokumentieren. Dickere, vollkommen geschlossene Aktinringe in Form einer Sealing Zone deuten auf gute Interaktion der Osteoclasten mit der β -TCP-Oberfläche hin.

Zusätzlich zur visuellen Dokumentation wurden auch die Aktinringe pro Tablette beziehungsweise auf 4 Knochenplättchen ausgezählt.

Auch nicht stark ausgeprägte, unvollständige Aktinringe wurden in die Zählung eingeschlossen. Mehrere Aktinringe pro Zelle wurden als ein Ring gewertet.

2.2.6 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen

Von den Oberflächen wurden vor der Inkubation, von einer Versuchsreihe auch danach, rasterelektronenmikroskopische Bilder angefertigt. Diese Anfertigung dieser Aufnahmen erfolgte durch Gerald Zimmer von der Firma Baxter.

2.2.7 Statistische Überprüfung der Signifikanz

Die erhaltenen Daten wurden mit dem Programm „StatView“ hinsichtlich ihrer Signifikanz ausgewertet.

3 Resultate

3.1 Vorausgehende Begriffserklärungen

Makroporosität: Die Porengröße liegt vorwiegend über 50 μm .

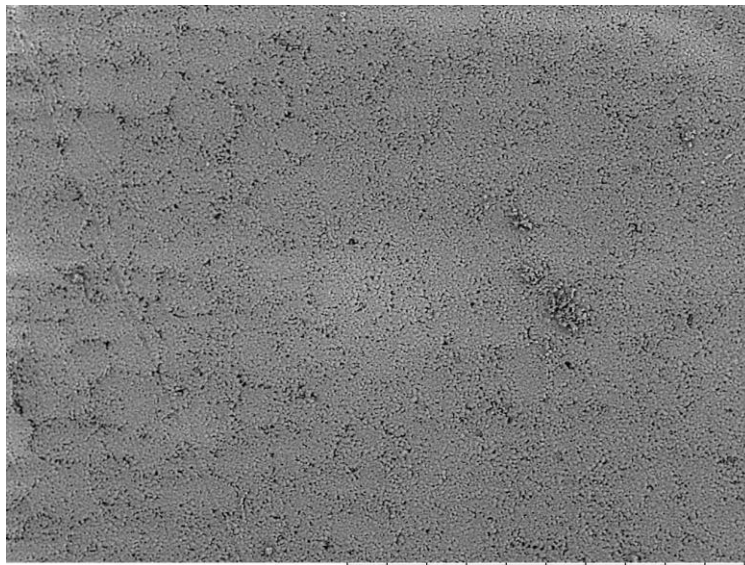
Mikroporosität: Die Porengröße liegt vorwiegend unter 10 μm .

3.2 Untersuchungen zur Makroporosität unter Verwendung eines Porogens

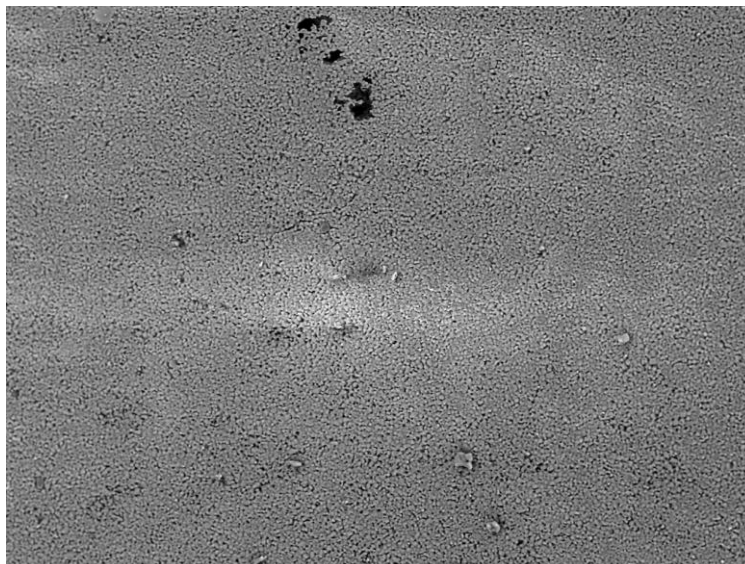
Zur Untersuchung der Auswirkung der Makroporosität auf das Verhalten von Osteoclasten wurden in einer ersten Testreihe 2 Gruppen von bei 1150 °C gesinterten β -TCP-Preßlingen im Vergleich mit Rinderknochen untersucht. Einer Gruppe war ein Anteil von 33% Harnstoff beigemischt, der sich durch den Sinterungsprozess verflüchtigt und somit Löcher im Bereich von 30-300 μm Durchmesser erzeugt hatte. Die zweite Gruppe wurde ohne Zugabe von Porogen gepresst und gesintert, sodass keine Makroporen vorhanden waren. Durch den Sinterprozess fand teilweise Umwandlung des rhomboedalen β -TCP in das monokline α -TCP statt.

Die Tabletten zeigten eine hohe Anzahl an TRAP⁺ Zellen mit mehr als 3 Kernen, wobei die Zelldichte sehr hoch und die Kerne nicht immer eindeutig zu erkennen waren, da die Oberflächen der Tabletten mit 33% Harnstoff in der Pulvermischung leicht rosa gefärbt erschienen. Die Anzahl der TRAP-positiven Zellen auf den Tabletten mit 0% Harnstoff in der Pulvermischung lag im Bereich der Ergebnisse der Knochen, während die makroporösen Tabletten mehr TRAP-positive Zellen aufwiesen. Auch die Formation von Aktinringen war auf den Tabletten möglich. Die makroporösen Tabletten wiesen die höchste Aktinringzahl auf.

Diesen ersten Ergebnissen folgend wurde eine Versuchsreihe mit verschiedenen Porositätsgraden der Tabletten, erzeugt durch Harnstoffbeimengung von 0%, 15%, 30% und 50%, durchgeführt. Pro Gruppe wurden je 2 Tabletten einer TRAP-Färbung und 2 Tabletten einer Immunfluoreszenzfärbung unterzogen. Die Tabletten zeigten innerhalb ihrer Gruppe eine Vielfalt an Porengrößen und unregelmäßige Verteilung dieser Poren über die Oberfläche. Bei den Tabletten mit 50% Harnstoff in der Pulvermischung zeigten sich Poren mit 10-100 μm Durchmesser.

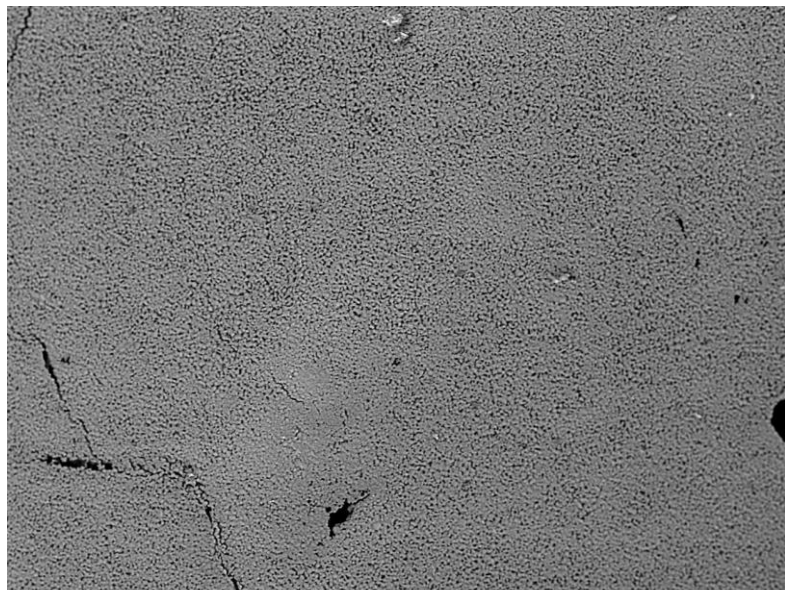


A



B

Abb. 11: Oberflächen der TCP-Tabletten ohne (A) und mit 15% Harnstoff im Pulvergemisch (B) unter dem Rasterelektronenmikroskop. Der oberflächliche Unterschied ist noch nicht so gravierend.

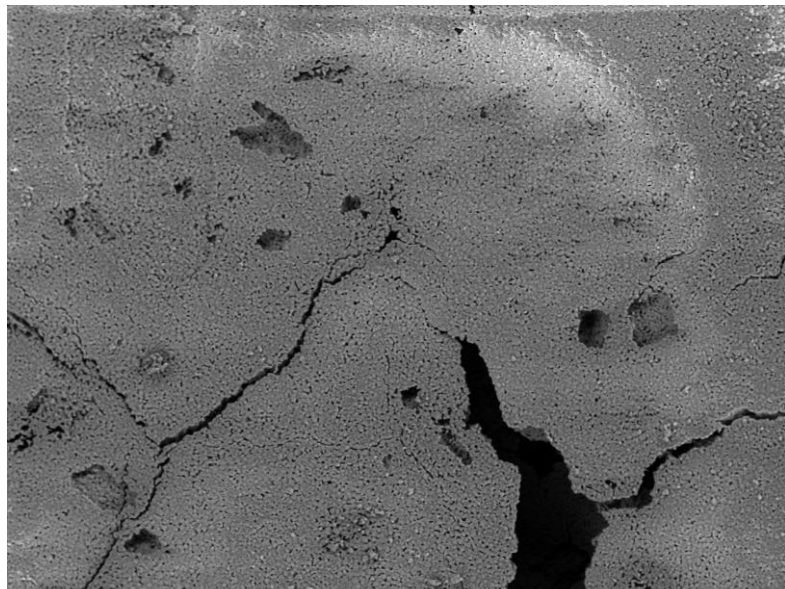


A

2010.11.29

x500

200 µm



B

2010.11.29

x500

200 µm

Abb. 12: Oberflächen der TCP-Tabletten mit 30% und 50% Harnstoffanteil im Pulvergemisch unter dem Rasterelektronenmikroskop. Man erkennt deutlich die stärker ausgebildeten Unregelmäßigkeiten in B

Die TRAP-Färbung zeigte ein Höchstmaß an Osteoclasten bei den Tabletten mit 0% Harnstoffgehalt in der Pulvermischung. Bei den folgenden Gruppen mit Harnstoffbeimischung verhielt sich die Anzahl an TRAP-positiven Zellen indirekt proportional zur Porosität. Die Tabletten mit 50% Harnstoffanteil in der Pulvermischung wiesen eine stark rosafarbene Oberfläche auf.

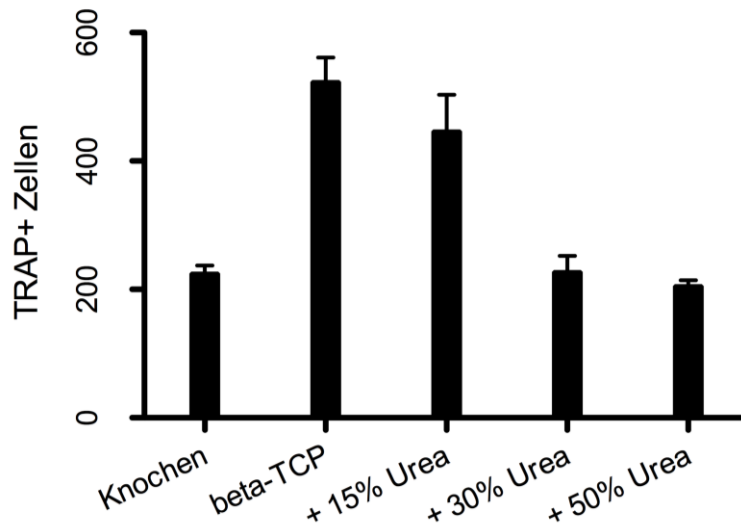


Abb. 13: Gegenüberstellung der TRAP-positiven Zellen auf Knochen, β -TCP mit 0%, 15%, 30% und 50% Harnstoffanteil in der Pulvermischung

Die TCP-Plättchen mit 50% Harnstoffgehalt in der Pulvermischung waren aufgrund der großen Poren nicht gut mit der Antikörperlösung der Immunfluoreszenzfärbung benetzbar. Die Färbung war aber dennoch erfolgreich. Tendenziell ähnelten die Ergebnisse der Immunfluoreszenz denen der TRAP-Färbung, allerdings waren die meisten Aktinringe auf den Plättchen mit 15% Harnstoffanteil in der Pulvermischung aufzufinden. Außer zwischen den Plättchen mit 0% und 30% Harnstoffgehalt in der Pulvermischung konnte zwischen allen Gruppen bezüglich der Aktinringzählung ein signifikanter Unterschied beobachtet werden. Die Struktur der Ringe auf den 0% und 15% Harnstoffplättchen war vergleichbar mit der auf Knochen, allerdings zeigten die Osteoclasten auf den TCP-Plättchen vor allem nicht vollständig geschlossene Ringe. Auf den porösesten Plättchen waren so gut wie keine Aktinringe zu sehen. Stattdessen zeigten sich viele kleine, ein- und zweikernige Zellen mit aktinringartigen Rändern, die vermutlich Osteoclastenvorläuferzellen darstellen. Da durch die Sinterung keine vollständige Elimination der Mikroporen durchgeführt werden konnte, sollte die unter Punkt 3.3 folgende Versuchsreihe den Einfluß der Mikroporosität aufzeigen.

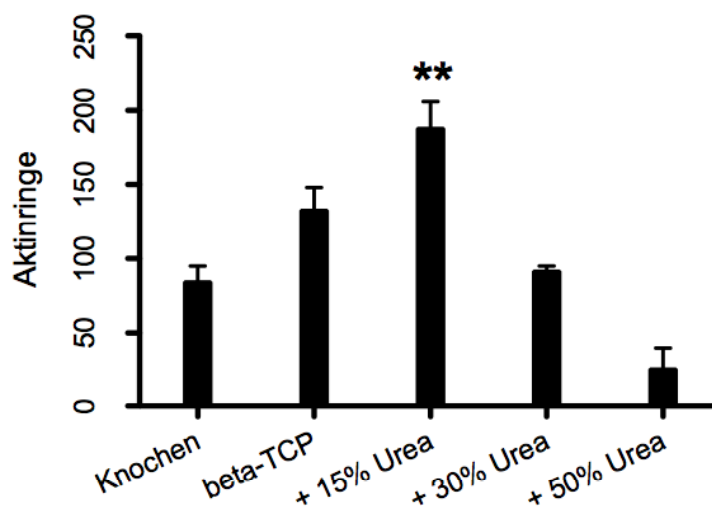


Abb. 14: Gegenüberstellung der Aktinringzahlen auf Knochen, β -TCP mit 0%, 15%, 30% und 50% Harnstoffanteil in der Pulvermischung. Verglichen mit Knochen war lediglich die Aktinringzahl der Oberfläche mit 15% Ureabeimischung als signifikant (Signifikanzniveau: 0,01) unterschiedlich zu bezeichnen.

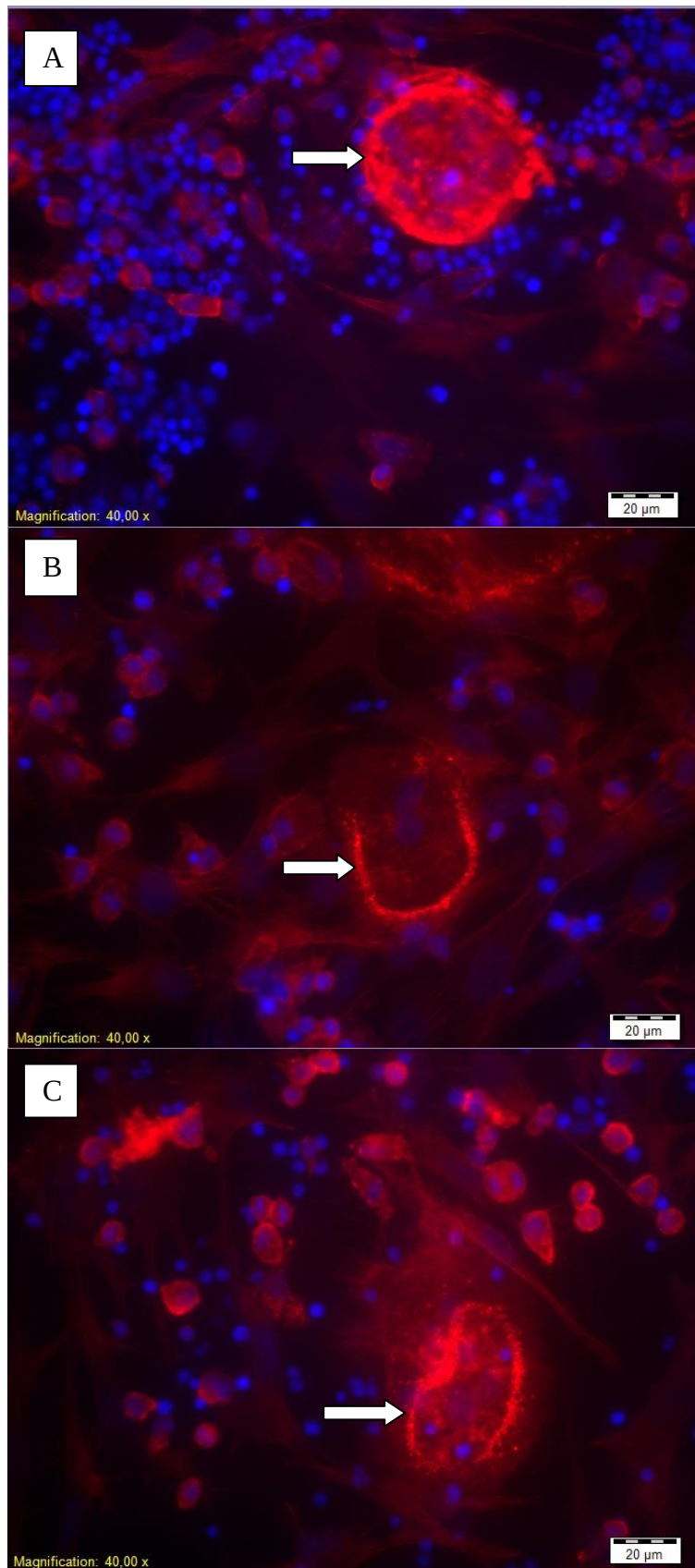


Abb. 15: Sealing Zone auf Knochen (A) und Podosomengürtelansätze auf TCP-Tabletten (B) und auf TCP-Tabletten mit 15% Ureaanteil (C)

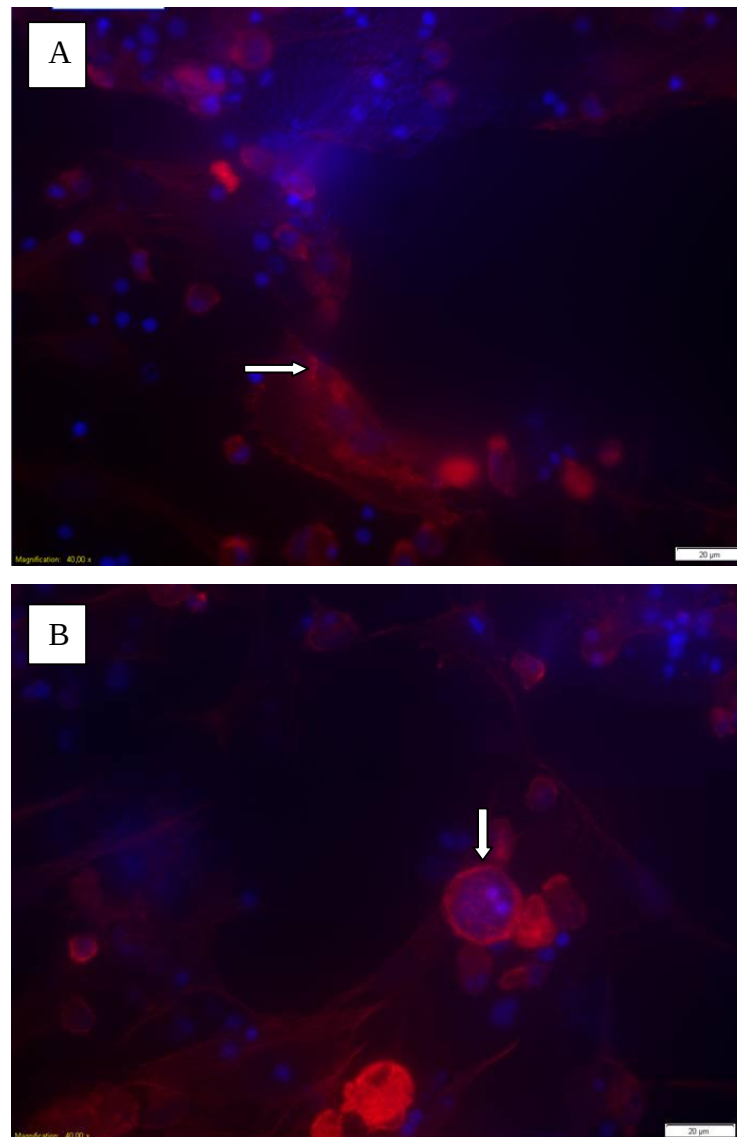


Abb. 16: Osteoclast in einer Pore der TCP-Tablette mit 30% Harnstoffanteil in der Pulvermischung (A), der einen Aktinring ausbildet (Pfeil) und runde kleine Zelle mit aktinringartiger Struktur auf TCP-Tablette mit 50% Harnstoffanteil in der Pulvermischung (B)

3.3 Untersuchungen zur Mikroporosität

Präliminäre Versuche

Für einen Vorversuch wurden bei 900 °C und bei 1250 °C für eine Stunde gesinterte β -TCP-Presslinge verwendet. Der Porendurchmesser der bei 900 °C gebrannten Tabletten bewegten sich in einem Bereich von 3-10 μm , während die bei 1250 °C gebrannten Tabletten 100 nm-5 μm breite Poren aufwiesen.

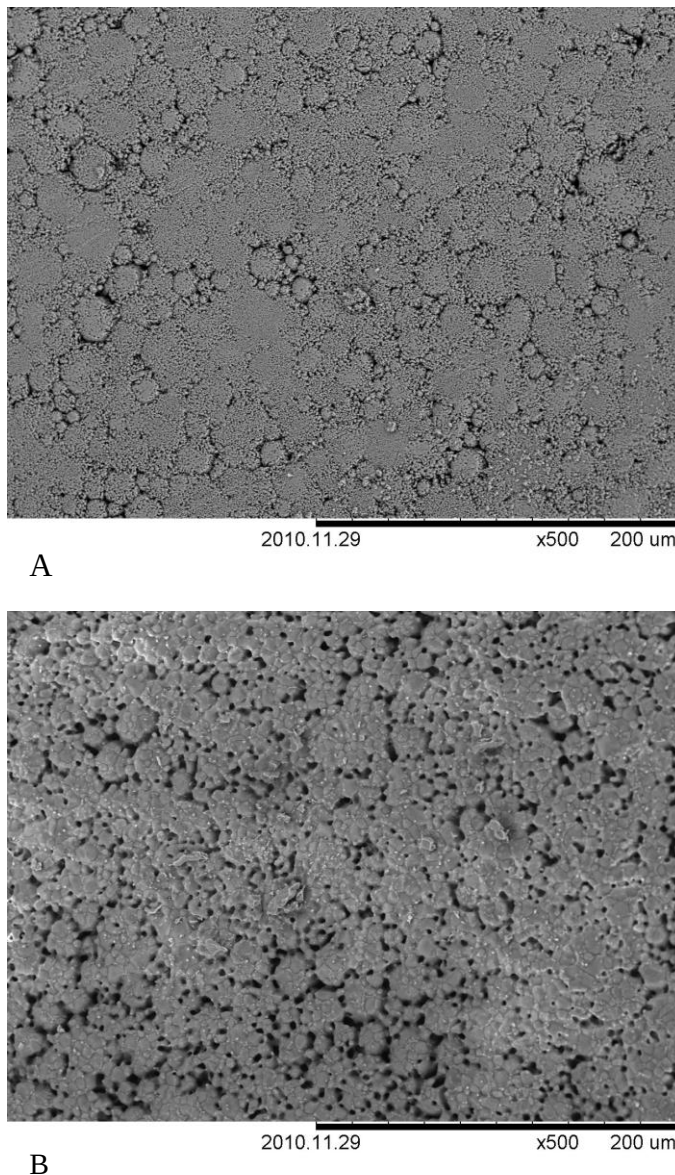


Abb. 17: Die Oberflächen der bei 900°C (A) und 1250°C (B) gesinterten TCP-Tabletten unter dem Rasterelektronenmikroskop (Exp. 68-10)

Die bei 900 °C gesinterten, TRAP-gefärbten Tabletten zeichneten sich durch eine rosa wirkende Oberfläche aus, was die Erkennbarkeit der Kernanzahl beeinträchtigte. Auf den bei höherer Temperatur gesinterten Tabletten waren eher größere Zellen zu beobachten. Im Hinblick auf die Anzahl der TRAP-positiven Zellen zeigten sich keine allzu großen Unterschiede zwischen den Gruppen, allerdings wiesen beide Gruppen eine höhere Zahl an TRAP-positiven Zellen auf als Rinderknochen.

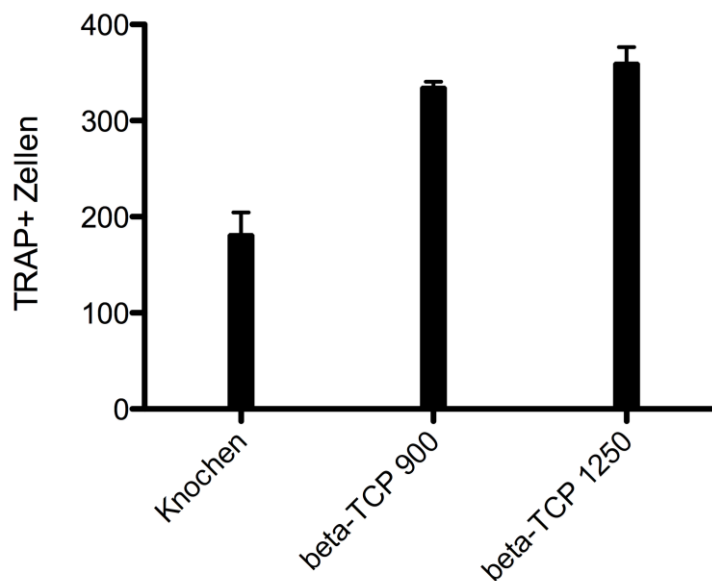


Abb. 18: Gegenüberstellung der TRAP-positiven Zellen auf Knochen, β -TCP gesintert bei 900 °C und 1250 °C

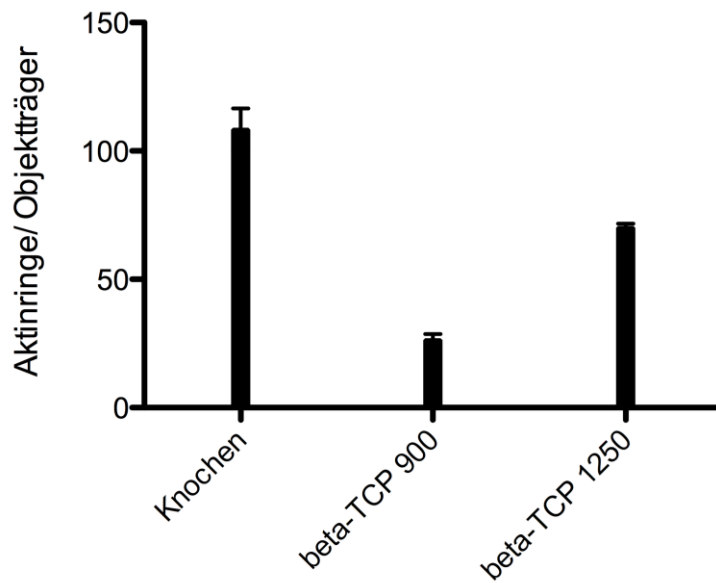


Abb. 19: Gegenüberstellung der Aktinringzahlen nach 48h Inkubation mit Osteoclasten auf Knochen, β -TCP gesintert bei 900 °C und 1250 °C

Auf den bei 900 °C gesinterten Tabletten zeigten sich Osteoclasten mit lediglich punktförmigen Aktinkondensationen, die nur selten ringartige Anordnung besaßen. Die bei 1250 °C gebrannten Tabletten wiesen breite Aktinringe auf, die zahlenmäßig aber unter denen der Kontrollgruppe lagen.

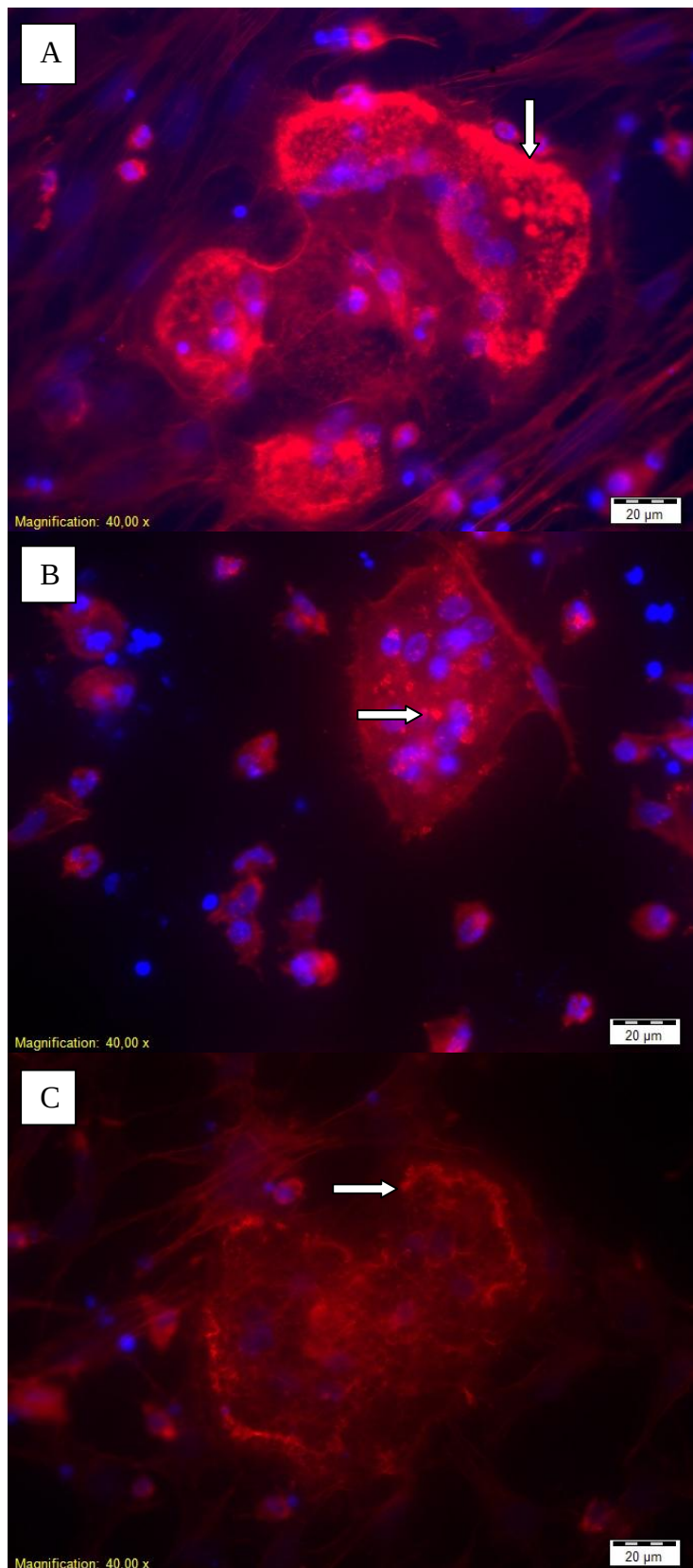


Abb. 20: Teile einer Sealing Zone auf Knochen (A), Osteoclast mit vereinzelt Adhäsionspunkten (Pfeil) auf bei 900°C gesinterten Tabletten (B) und Osteoclast mit Ansätzen eines Aktinringes (Pfeil) auf bei 1250°C gesinterten Tabletten (C).

Da die bei 1250 °C gesinterte Tablette noch immer eine poröse Oberfläche hatten, wurden in einen Pilotversuch Tabletten bei 1280 °C für eine Dauer von 2 Stunden gebrannt und mit Zellen inkubiert, um eine Vergleichsoberfläche zu haben, bei der die Mikroporosität keinen Einfluß auf die Osteoclasten ausüben kann. Bei der TRAP-Färbung zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Rinderknochen und den Tabletten, wobei anzumerken ist, dass die TRAP-Färbung bei diesem Experiment generell recht schwach ausgefallen war.

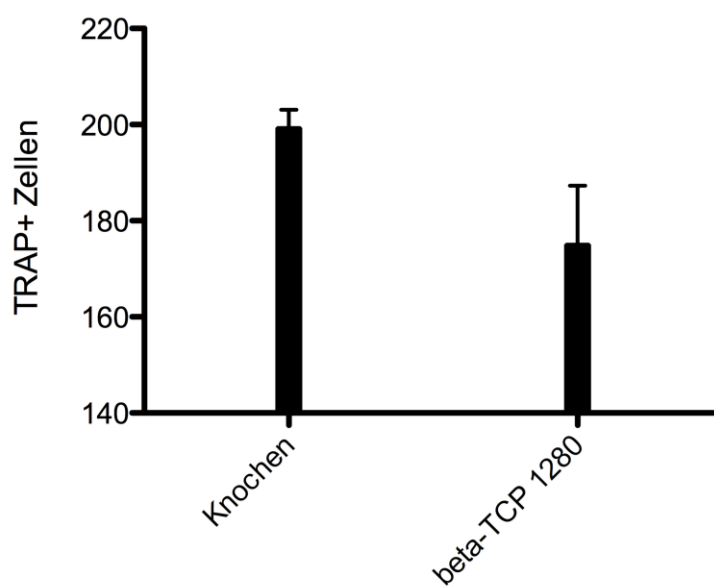


Abb. 21: Gegenüberstellung der TRAP-positiven Zellen nach 48h Inkubation mit Osteoclasten auf Knochen und β -TCP gesintert bei 1280 °C

Die Zählung der Aktinringe ergab, verglichen mit den vorangegangenen Experimenten, eine große Differenz zwischen den Knochen und den Tabletten, was vermutlich auf die Verwendung eines anderen Knochenstückes zurückzuführen war. Einige der Aktinringe auf den TCP-Oberflächen waren fast ganz geschlossen, die Breite allerdings nicht ausreichend um sie als Sealing Zone zu bezeichnen.

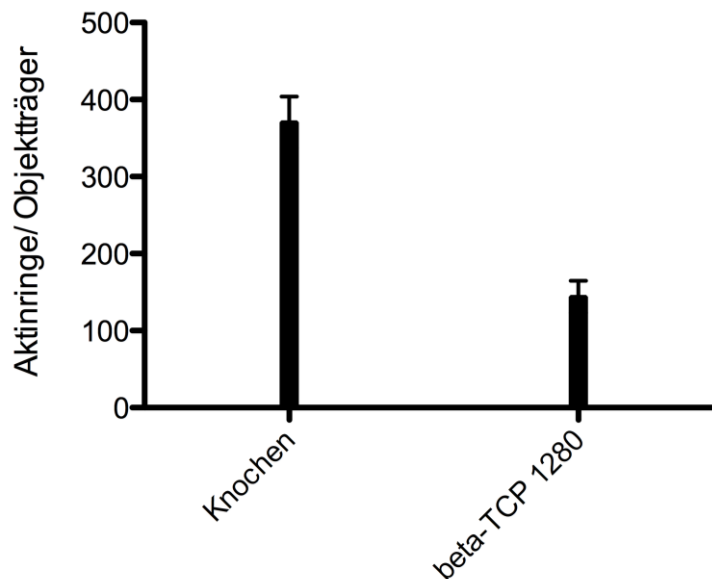


Abb. 22: Gegenüberstellung der Aktinringzahlen nach 48h Inkubation mit Osteoclasten auf Knochen und β -TCP gesintert bei 1280 °C

Finale Experimente zur Untersuchung des Effekts der Porengröße auf Aktinringe

Um die Porengröße zu ermitteln, die die Bildung der Aktinringe am meisten begünstigt, wurde ein großes Experiment mit 9 Gruppen von bei verschiedenen Temperaturen für 1 Stunde gesinterten Tabletten im Vergleich mit Knochen durchgeführt. Lediglich die bei 1280°C gebrannten Exemplare wurden für 2 Stunden diesen Bedingungen ausgesetzt.

Es war eine temperaturabhängige Verringerung des Tablettendurchmessers durch den Sintervorgang zu bemerken. Oberhalb von 1150°C ist die Verschmelzung sowie die Transformation von β - zu α -TCP in immer stärkerem Ausmaß erfolgt. Mit zunehmender Verschmelzung kam es anscheinend zur Bildung von kleinen Einrissen in der Oberfläche.

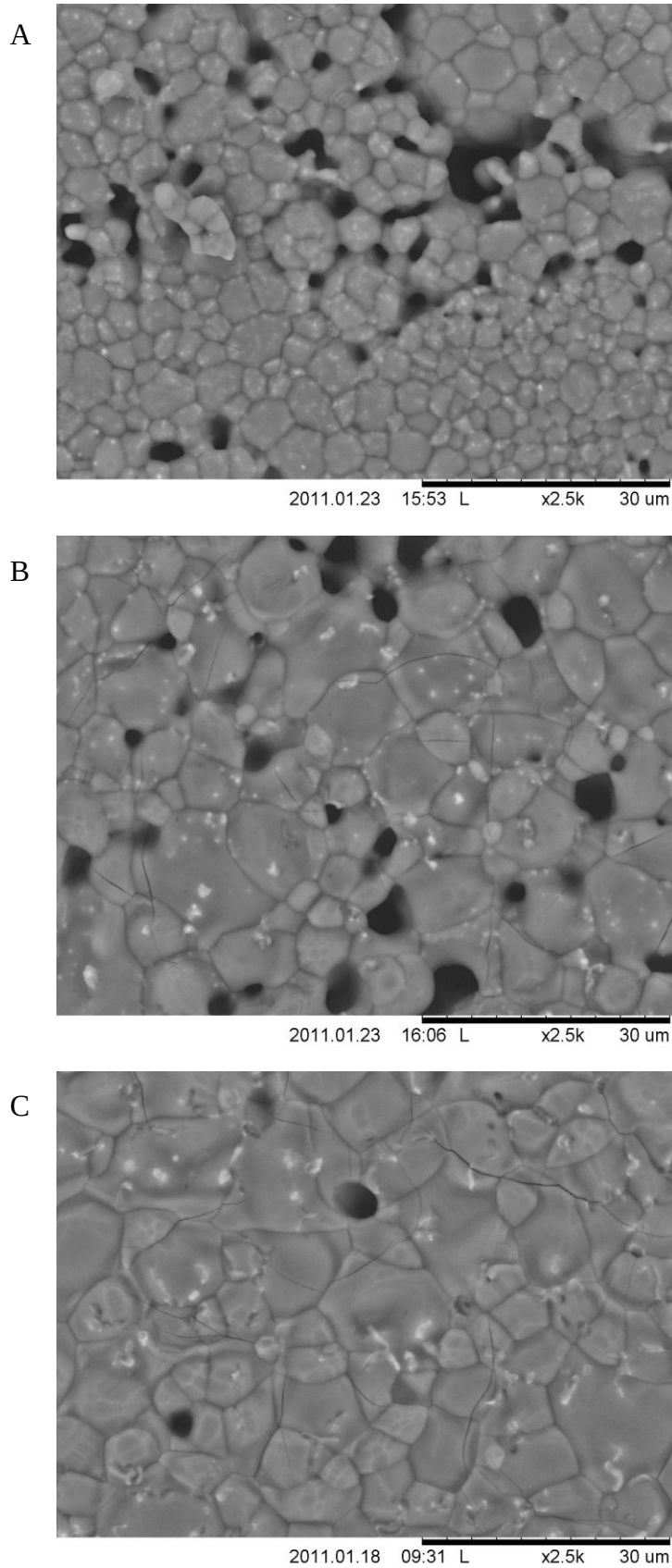


Abb. 23: Oberfläche der TCP-Tabletten gesintert bei 1200°C (A), 1250°C (B) und 1280 °C (C) unter dem Rasterelektronenmikroskop. Auf B und C erkennt man deutlich kleine Einrisse.

Pro Gruppe wurden 4 Tabletten der TRAP-Färbung und 4 der Immunfluoreszenzfärbung unterzogen. Die Auswertung der TRAP-Färbung ermöglichte keine eindeutigen Schlüsse, da die Werte mit aufsteigender Sintertemperatur nicht konstant anstiegen oder absanken, sondern vielmehr um einen gewissen Bereich schwankten. Die bei niedrigen Temperaturen gesinterten Tabletten zeigten erneut eine rötliche Oberflächenfärbung, die bis zu den bei 1100 °C gebrannten Tabletten immer schwächer ausgeprägt und bei den mit höheren Temperaturen behandelten komplett verschwunden war. Auf den Tabletten mit niedrigeren Sintertemperaturen (< 1150 °C) waren eher kleine Zellen zu beobachten, während ab 1150 °C die TRAP-positiven Zellen größer waren und tendenziell mehr Kerne aufwiesen.

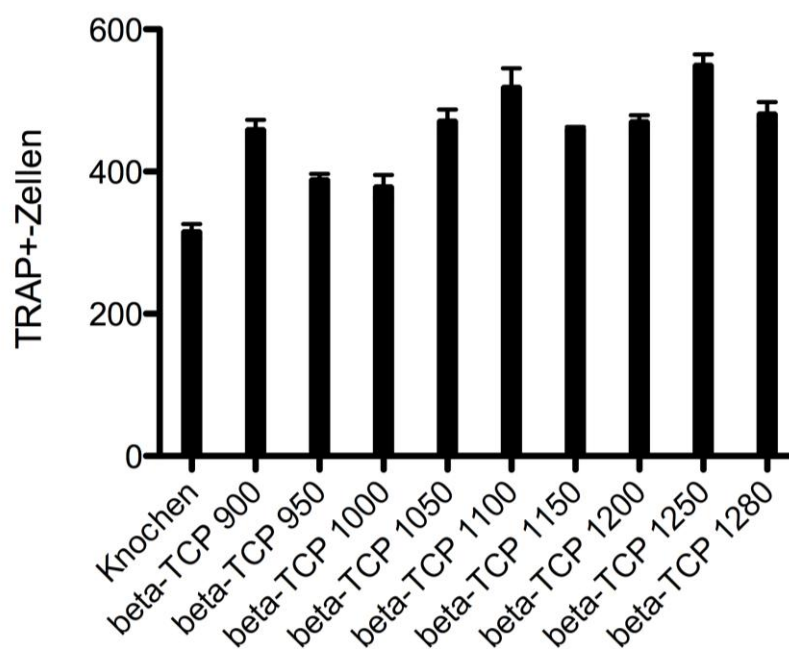


Abb. 24: Gegenüberstellung der TRAP-positiven Zellen auf den verschiedenen Oberflächen gebrannt zwischen 900°C und 1280°C

Die Aktinfärbung zeigte im niedrigen Sinterbereich ($< 1150^{\circ}\text{C}$) keine nennenswerten Aktinringe. Allerdings waren wie bei den Untersuchungen zur Makroporosität kleine einkernige Zellen sichtbar, die stellenweise sogar bei der Fusion fotografiert werden konnten. Die Unterschiede der Aktinringzahlen zwischen den Gruppen des höheren Sinterbereichs waren signifikant. Die Gesamtzelldichte schien mit steigender Sintertemperatur zu sinken, lediglich bei den bei 1280°C gesinterten Tabletten ist wieder ein leichter Anstieg zu erkennen.

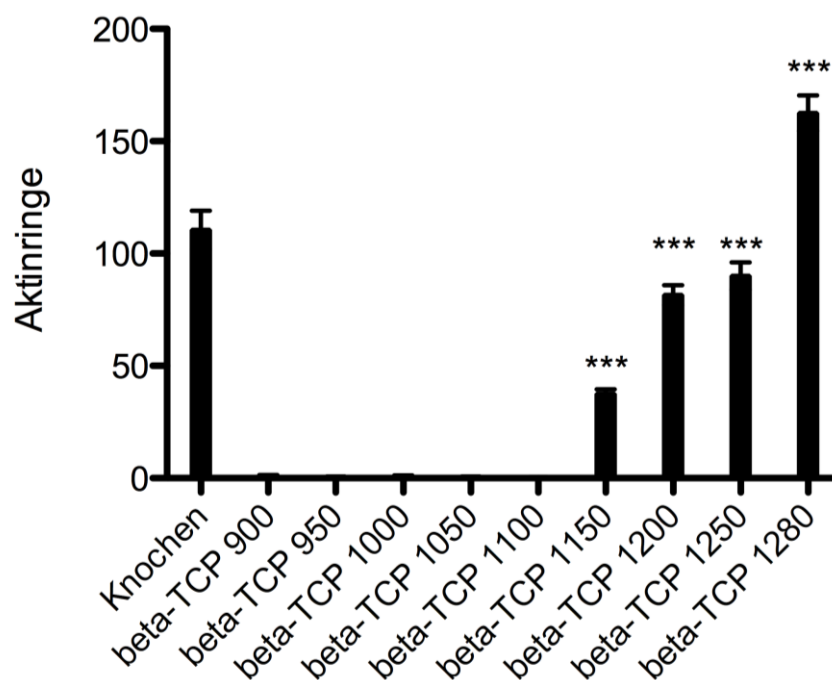


Abb. 25: Gegenüberstellung der Aktinringzahlen auf den TCP-Oberflächen gebrannt von 900°C bis 1280°C . Alle Gruppen weisen hochsignifikante (Signifikanzniveau: 0,001) Differenzen zur Aktinringzahl auf Knochen auf, dargestellt durch 3 Sterne.

Nur äußerst selten waren auf den bei niedrigen Temperaturen gesinterten Tabletten Anordnungen sichtbar, die als Aktinring interpretiert werden könnten. Die allerdings auf diesen Oberflächen ubiquitär vorkommenden rundlichen, einkernigen Zellen mit teilweise aktinringartigen Rändern wurden häufig in räumlicher Nachbarschaft zueinander beobachtet.

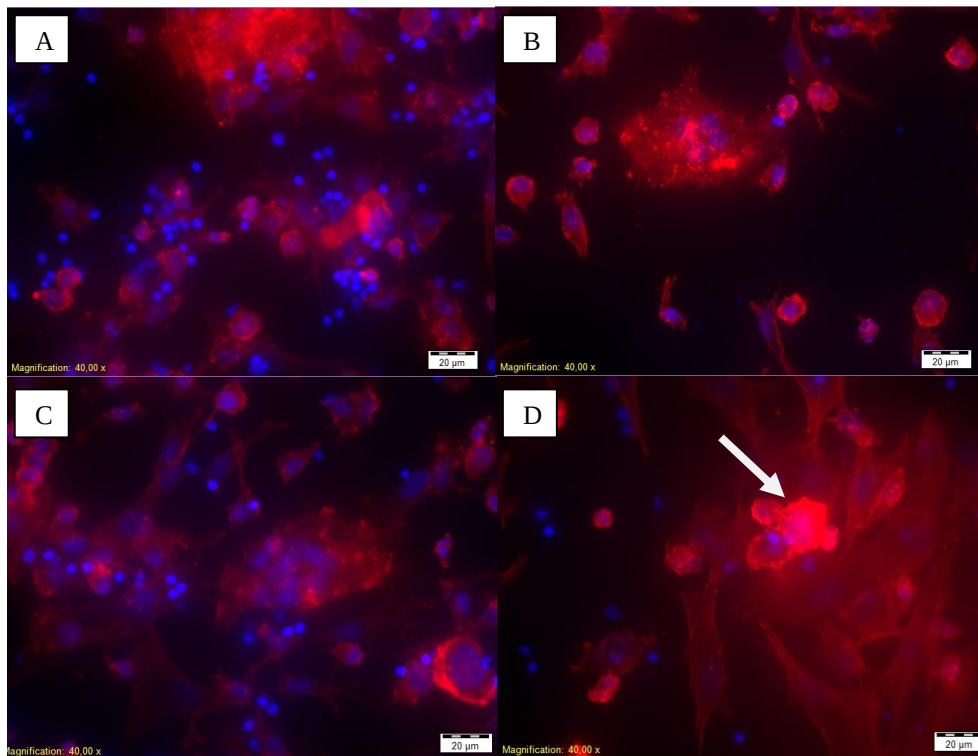


Abb. 26: Verhältnisse auf den bei niedrigeren Temperaturen gesinterten Tabletten; Osteoclasten ohne Aktinringe und umgeben von kleinen Zellen auf bei 900°C gesinterte Tabletten (A), bei 950°C gesinterte Tabletten (B) und bei 1000°C gesinterte Tabletten (C). Bei 1100°C gesinterte Tabletten (D) zeigen kleine Zellen, die zu fusionieren scheinen (Pfeil)

Ab einer Sintertemperatur von 1150 °C waren breite Aktingürtel sichtbar, die beinahe wie eine Sealing Zone wirkten, vor allem da sich die Dicke der Ringe im Bereich von 3 µm bewegte. Bei 1200 °C gesinterte Tabletten zeigten die Ringe, die zu denen auf Rinderknochen die größte Ähnlichkeit aufwiesen.

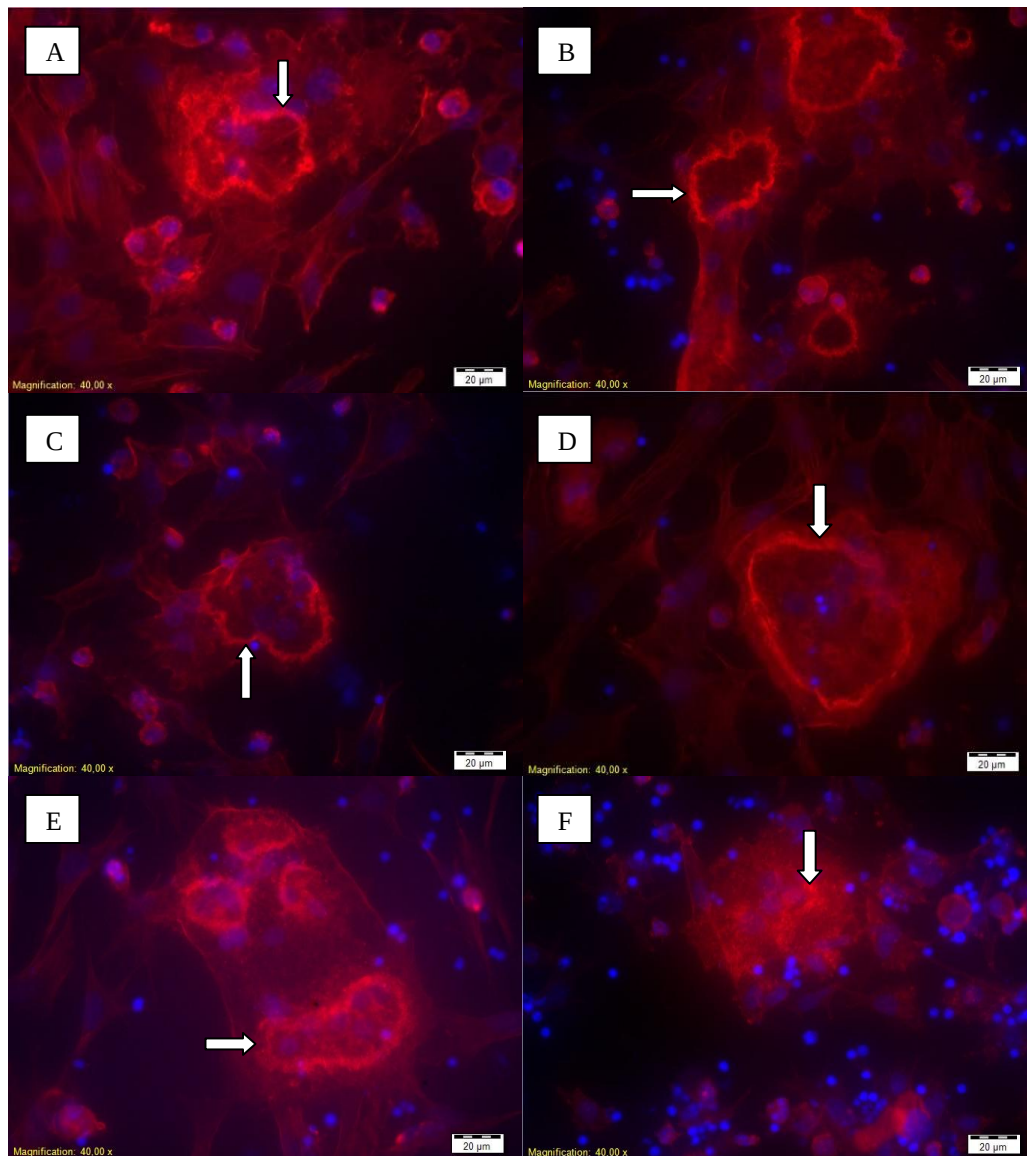


Abb. 27: Osteoclasten auf TCP-Tabletten, gesintert bei 1150°C (A), 1200°C (B), 1250°C (C), 1280°C (D), Knochen (E) und auf 950 °C (F). Im Vergleich erkennt man deutlich die Aktinringe (Pfeile) im Gegensatz zu nur stellenweiser Aktinansammlung (Pfeil in Bild F).

Die nach der Inkubation angefertigten rasterelektronenmikroskopischen Bilder zeigten bei den Tabletten ab einer Sintertemperatur von 1250 °C Oberflächenveränderungen, die zumindest partielle Resorption anzeigen könnten. Allerdings war nicht eindeutig zu erkennen ob die dunklen Bereiche auf den Aufnahmen nach Inkubation mit Kaninchenosteoclasten Relikte von Zellen, Ansätze von Resorption oder beides darstellen.

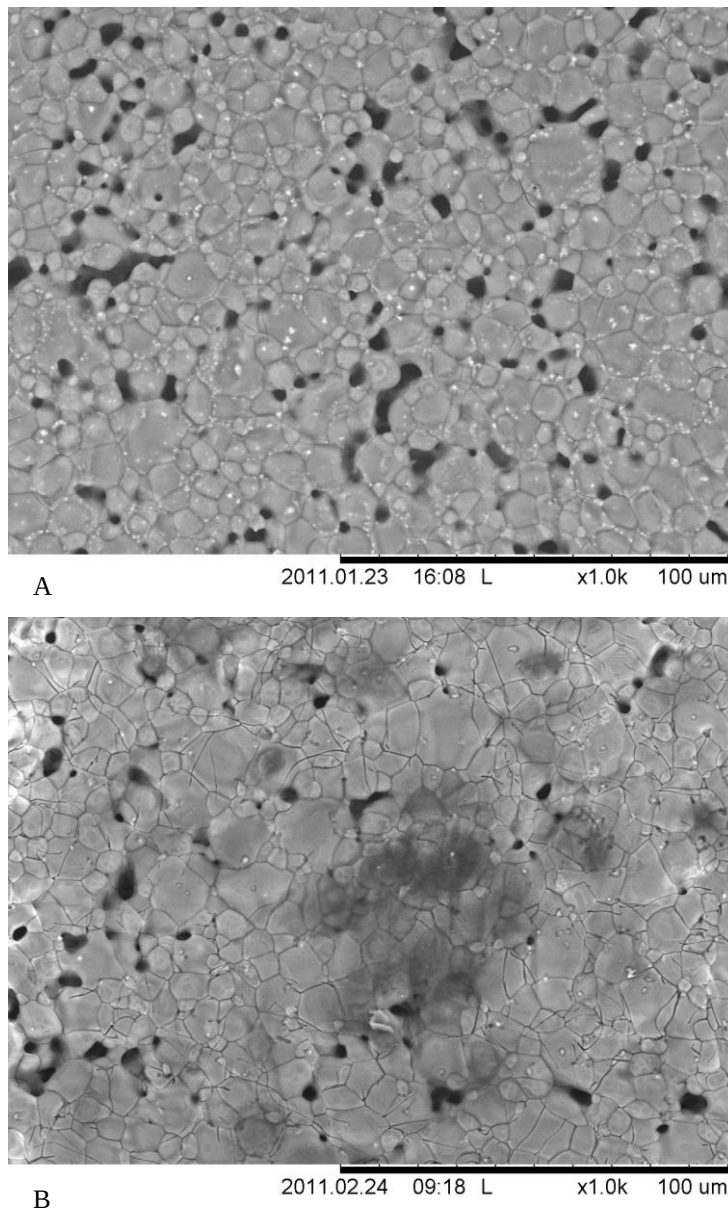


Abb. 28: Gegenüberstellung der Oberflächen gebrannt bei 1250 °C vor (A) und nach 48 h Inkubation (B) mit Osteoclasten unter dem Rasterelektronenmikroskop. Die Zellen auf der Oberfläche konnten aufgrund der Vorbehandlung nicht als Osteoclasten identifiziert werden.

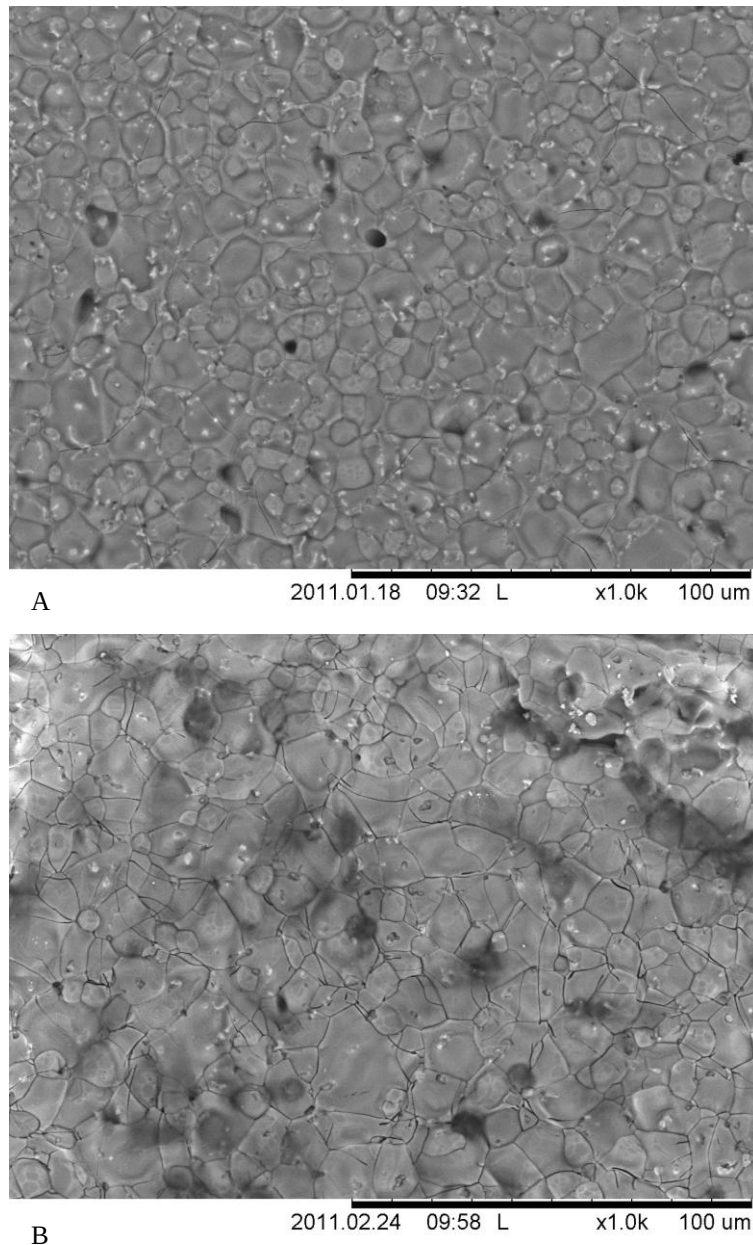


Abb. 29: Gegenüberstellung der Oberflächen gebrannt bei 1280 °C vor (A) und nach der Inkubation (B) unter dem Rasterelektronenmikroskop. Die Schatten stellen wahrscheinlich großteils Zellen dar, könnten aber auch stellenweise Resorption repräsentieren.

Um die Ergebnisse des Versuches zu überprüfen, wurden einzelne Fragestellungen wiederholt. Da die TRAP-Färbung keine aussagekräftigen Informationen geliefert hatte, wurde lediglich die Aktindetektion in Kombination mit DAPI-Färbung auf TCP-Plättchen mit einer Sinter Temperatur von 1100°C oder höher durchgeführt.

Bei der Wiederholung ergab sich ein ähnlicher Trend wie beim Vorversuch, wobei auf den bei 1100°C gesinterten Tabletten mehr Aktinringe als zu sehen waren. Allerdings war die Anzahl im Vergleich zu den anderen Gruppen so gering, dass keine große Differenz zum Erstexperiment bestand. Die Ringe waren größtenteils unvollständig und desorganisiert. Auch kleine fusionierende Zellen (wie in Abb. 26) konnten wieder beobachtet werden.

Oberhalb von 1100°C zeigte sich eine ansteigende Tendenz in Bezug auf die Aktinringzahl. Die Verhältnisse der Gruppen zueinander waren verglichen mit dem vorangehenden Versuch etwas verändert. Die Struktur der Ringe war auf den bei 1200°C und 1250°C gebrannten Oberflächen der auf Knochen am ähnlichsten. Es wurden stärker ausgebildete Sealing Zones als beim Vorversuch beobachtet. Auf den fast komplett verschmolzenen TCP-Plättchen fanden sich auch viele Aktinringe, die sich möglicherweise schon in der Desorganisation befanden. Die bei 1150°C gesinterten Tabletten zeigten auch Ringbildung bei zweikernigen Zellen.

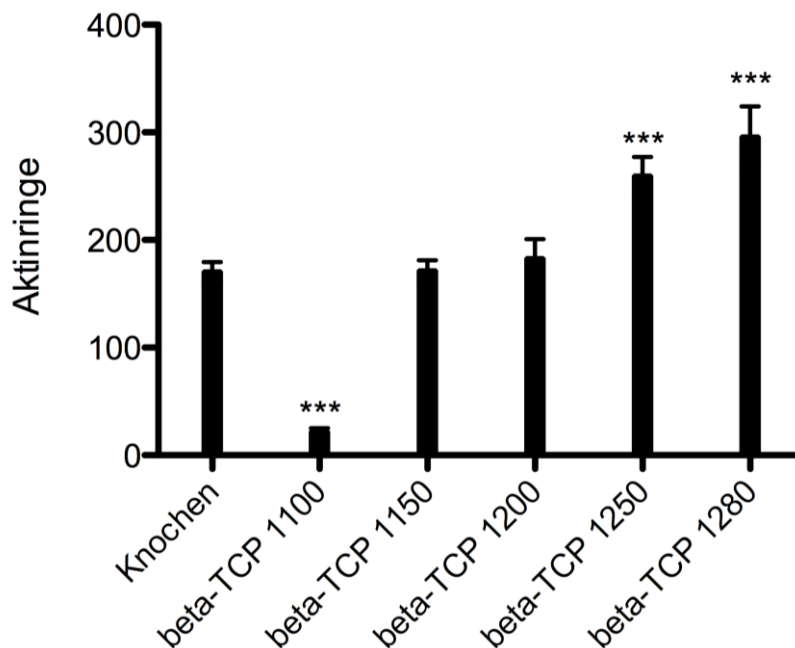


Abb. 30: Aktinringzahlen auf den bei 1100°C, 1150°C, 1200°C und 1280°C verglichen mit Knochen. In 3 Gruppen hochsignifikanter Unterschied (Signifikanzniveau: 0,001) zu Knochen, gekennzeichnet durch 3 Sterne

4 Diskussion

Untersuchungen zur Makroporosität

Makroporosität ist entscheidend für Einwachsen von Gewebe und Nährstofftransport. (Parikh 2002; Baroli 2009) Welchen Einfluß sie auf das Verhalten der Osteoclasten hat, wurde bisher nur spärlich untersucht.

Unsere ersten Versuche bezüglich dieses Themas zeigten eine gesteigerte Anzahl an mehrkernigen TRAP-positiven auf den makroporösen Oberflächen, wobei auch die Zählung der Aktinringe diesen Trend bestätigte. Die makroporösen Tabletten wiesen eine leicht rötliche Färbung auf, was vermuten lässt, dass sich Osteoclasten auch in die Porensysteme unterhalb der Oberfläche begeben können.

Um bessere Einblicke in die Zusammenhänge zwischen Poren und Osteoclastenverhalten zu erhalten, wurde ein Experiment mit Porengradient durchgeführt. Dabei war zu beobachten, dass sowohl TRAP-positive Zellen als auch Aktinringe bis zu einem gewissen Maß an Porosität und Porengröße zunahmen und danach wieder absanken, wodurch man auf die Existenz einer idealen Porenbeschaffenheit schließen kann. Besonders bei den Tabletten mit 50% Harnstoffanteil in der Pulvermischung war zwar eine sehr starke Rosafärbung zu erkennen, jedoch nicht wirklich gut ausgeprägte Aktinringe. Stattdessen zeigten sich in großen Mengen kleine, runde Zellen mit aktinringartigen Rändern.

Da die Isolationsmethode nicht nur reife Osteoclasten liefert, liegt die Vermutung nahe, dass es sich um nicht oder teilweise fusionierte Vorläuferzellen handelt. Anhand der optischen Ähnlichkeit zu den bei unseren Experimenten auftretenden kleinen Zellen konnte durch die Experimente von Detsch et al., die Differenzierung von monocytären Zellen zu Osteoclasten auf Hydroxylapatit und Tricalciumphosphat behandelten (Detsch, Mayr et al. 2008), der Verdacht bezüglich der Anwesenheit von Vorläuferzellen erhärtet werden. Auch bei Perotti et al. (Perrotti, Nicholls et al. 2009) zeigten sich auf Pferdeknochen zusätzlich Osteoclastenvorstufen.

Da die Resorptionsspuren auf β -TCP denen auf Pferdeknochen ähneln (Yamada, Heymann et al. 1997; Perrotti, Nicholls et al. 2009), ist es nicht unwahrscheinlich, dass beide Oberflächen ebenso die Adhäsion von Vorläuferzellen fördern.

Allerdings stellt sich die Frage, aus welchem Grund auf den porösesten Oberflächen so viel mehr ein- und zweikernige Zellen, als vollständig mehrkernige Osteoclasten zu finden sind.

Eine Möglichkeit wäre zu geringe Adhäsion oder, bedingt durch die Poren, die auch eine schlechte Benetzbarkeit mit sich brachten, verursachtes Durchrutschen durch die Tabletten, während die Vorstufen wahrscheinlich leichter Haftkontakte knüpfen konnten.

Andererseits könnte eine durch die Porosität verursachte zu hohe Calciumkonzentration zum Ablösen oder sogar zur Apoptose der Osteoclasten geführt haben, während die Vorstufen in ihrer Fusion unterbunden wurden. (Robinson, Blair et al. 2010; Yaroslavskiy, Turkova et al. 2010)

Weiters könnten die anderen Oberflächen die Fusion der Vorstufen oder durch andere Proteinadsorptionscharakteristika die Adhäsion anderer Zelltypen stärker begünstigt haben.

Die Aktinringe auf den Tricalciumphosphat-Tabletten ohne und mit 15% Harnstoffanteil in der Pulermischung wiesen gut strukturierte Form auf. Komplette geschlossene Sealing Zones waren allerdings nicht auffindbar, was mehrere Ursachen haben kann. Die Ringe könnten sich auf Tricalciumphosphat später formiert, früher gebildet und daher früher desorganisiert haben, da ja auch oberflächenabhängige Aktinringbildung einem individuellen Zeitmuster folgt (Monchau, Lefevre et al. 2002), oder schlichtweg geringere Stabilität aufweisen als ihre Pendanten auf Rinderknochen.

Untersuchungen zur Mikroporosität in Verbindung mit den vorherigen Experimenten

Durch den Sintervorgang verändert sich nicht nur die Porengröße, sondern auch der Durchmesser der Tabletten und ihre Porosität. Tanimoto et al. zeigten in ihrer Arbeit der Porosität von 35,8% bei 900 °C auf nur mehr 3,38% bei 1200 °C, wobei der größte Verlust von 1100°C auf 1200°C von statten geht. (Tanimoto und Nishiyama 2008) Somit fließt auch die Variation der Porosität mit in die Untersuchungen ein.

Überdies entstehen durch die verschiedenen Sintertemperaturen andere Kristallformen. Oberhalb von 1125 °C beginnt die Umwandlung von β - in α -Tricalciumphosphat. Okuda et al. bewiesen in ihrer In-vivo-Studie die Abhängigkeit des Osteoclastenverhaltens von der Kristallstruktur, indem sie 2 verschieden ausgebildete β -TCP-Formen entwickelten und Implantate aus diesen in Kaninchen bezüglich ihrer Resorbierbarkeit und ihrer Interaktion mit Osteoclasten untersuchten. (Okuda, Ioku et al. 2007)

Die im ersten Vorversuch erhaltenen Ergebnisse zeigten zwar keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl an TRAP-positiven Zellen zwischen den bei 900 °C und den bei 1250 °C gesinterten Tabletten. Die Aktinringe jedoch sind auf den bei niedrigerer Temperatur gebrannten Oberflächen in viel geringerer Zahl vorhanden und nicht so gut ausgebildet. Die Tatsache, dass mehr Aktinringe als TRAP-positive Zellen auf Knochen vorzukommen scheinen, lässt sich auf eine schwache Ausprägung der TRAP-Färbung zurückführen, die es nicht möglich machte, die Knochenplättchen eindeutig auszuzählen.

Das schlechte Adhäsionsverhalten der Osteoclasten auf den bei 900 °C gesinterten Tabletten könnte mit der höheren Porosität und der wegen der schwächeren Hitzeeinwirkung stärker erhalten gebliebenen Unebenheiten in Zusammenhang stehen, da das Aktincytoskelett eher vereinzelte Kontaktpunkte zeigt. Allerdings könnten sich ein Großteil der Osteoclasten auch gerade in der Migrationsphase befinden und daher keine Aktinringe ausbilden.

Bei dem nachfolgenden Versuch war es gelungen, Tricalciumphosphatplättchen zu produzieren, die fast keine Poren mehr aufwiesen, um sie als lückenfreie Vergleichsoberfläche verwenden zu können. Die Oberfläche wies allerdings immer noch leichte Unebenheiten auf, was den Ausschluß dieses Einflusses verhinderte. Das Experiment zeigte, dass die Oberfläche von den Osteoclasten durchaus angenommen wurde und somit als zusätzliche Kontrolle neben Knochen verwendet werden konnte.

Bei Sinterung der Tabletten in einem Temperaturbereich von 900° C bis 1280 °C fand starke Oberflächenveränderung durch Verringerung der Porosität und Porengröße, Änderung der Kristallstruktur und Entstehung von Microcracks bei den höher gebrannten Tabletten.

Die Zählung der TRAP-positiven Zellen zeigte keine klar interpretierbaren Unterschiede zwischen den Gruppen, was darauf schließen lässt, dass die Oberflächenveränderung keine sonderlich großen Effekte bezüglich der Osteoclastenanzahl mit sich bringt.

Die Aktinringzählung lieferte aussagekräftigere Ergebnisse. Die unter 1150 °C gesinterten Tabletten zeigten so gut wie keine Aktinringe, während ab 1150 °C deren Anzahl stetig zunahm. Diese Tendenz bestätigte sich auch in der Wiederholung des Experiments. Auf den bei niedrigen Temperaturen gesinterten Tabletten waren wieder kleine, runde Zellen aufzufinden, was den Einfluß der Poren auf deren Adhäsion vermuten lässt.

Die bei höheren Temperaturen vorhandenen Aktinringe gleichen in der Breite denen auf Knochen und könnten Vorstufen von Sealing Zones darstellen. Die eindeutige Oberflächenveränderung nach Inkubation auf den bei 1250 °C und 1280 °C gebrannten Tabletten untermauert diese Vermutung.

Verantwortlich für diese Unterschiede zwischen den bei hohen und den bei niedrigen Temperaturen gesinterten Oberflächen könnte die strukturelle Änderung der Kristalle von β - auf α -Tricalciumphosphat sein, da die Aktinringe genau ab der Temperatur der Umwandlung auftreten. Bereits bei Okuda et al. zeigten die Osteoclasten auf den Materialien aus länglichen Partikeln gesteigerte Aktivität verglichen mit denen aus konventionellem β -TCP, was auch das Auftreten ähnlicher Ergebnisse bezüglich β - und α -TCP wahrscheinlich macht.

Da bei den Untersuchungen zur Makroporosität allerdings immer nur eine einzige Sintertemperatur angewendet wurde und trotzdem porenabhängige Effekte auftraten, kann die Kristallstruktur keineswegs der einzig relevante Faktor sein.

Strukturelle Veränderungen spielen auch eine wichtige Rolle bei der Proteinadsorption und dadurch bei der Zelladhäsion. Größere Oberfläche bedeutet üblicherweise Adsorption von größeren Proteinmengen. Allerdings scheint die Konzentration der adsorbierten Proteine per se nicht so entscheidend zu sein wie ursprünglich angenommen. (Geblinger, Addadi et al. 2010)

Allerdings kann die Proteinadsorption aus FCS so stark sein, dass kein oder nur unzureichender Zugriff der zelleigenen Adhäsionsproteine auf die Grundstruktur mehr möglich ist. (Arima und Iwata 2007)

Bedingt durch die starken Unebenheiten kann ein Benetzungswinkel entstanden sein, der die Adhäsion anderer Zelltypen stärker fördert als die der Osteoclasten.

Abgesehen davon könnte auch die Löslichkeit der entscheidende Faktor für die geringe Aktinringbildung auf den poröseren Tabletten sein. α -Tricalciumphosphat weist zwar höhere Löslichkeit auf als β -Tricalciumphosphat (Berger und Gildenhaar 1995), doch mit der Porosität steigt die Oberfläche und somit die Lösungsgeschwindigkeit.

Bei zu hohen Calciumkonzentrationen lösen sich die Osteoclasten von den Oberflächen, wodurch Resorption unterbunden wird. (Yaroslavskiy, Turkova et al. 2010) Dadurch wäre die Abwesenheit charakteristischer Aktinringe auf den bei niedrigen Temperaturen gebrannten Tabletten erklärbar. Auch die Wirkung hoher Calciumspiegel auf die Apoptose der Osteoclasten (Mentaverri, Yano et al. 2006; Robinson, Blair et al. 2010) könnte einen Teil der Ergebnisse hervorrufen. Die Tabletten bei den Untersuchungen zur Mikroporosität zeigen zwar über die Sintertemperaturen hinweg keine signifikanten Unterschiede zwischen der Anzahl an TRAP-positiven Zellen, die Tabletten aus den Versuchen zu Makroporosität, besonders die porösesten, hingegen schon.

Da im Vergleich zu den nur gesinterten Tabletten eine größere Angriffsfläche für die Lösung vorliegt, ist es wahrscheinlich, dass auch schneller eine kritische Menge Calcium freigesetzt werden kann. Mentaverri et al. zeigten konzentrationsabhängige Apoptose bei steigenden Calciumspiegel, wodurch die geringe Anzahl sowohl an Aktinringen als auch an TRAP-positiven Zellen auf den Tabletten mit 50%

Harnstoffgehalt in der Pulvermischung zu erklären wäre. In vivo darf man allerdings nicht automatisch dieselben Entwicklungen vermuten, da durch physiologische Prozesse kontinuierlich Calcium entfernt werden kann.

Einen weiteren Ansatzpunkt liefern die Untersuchungen von Moncheau et al.. Der zeitliche Ablauf der Ringbildung könnte sich auf den verschiedenen Oberflächen unterscheiden, sodass sich einerseits noch Ringe zeigen, die auf den anders beschaffenen Tabletten vielleicht schon desorganisiert oder noch nicht vorhanden sind. Dafür sprechen auch die Unterschiede bezüglich der Verhältnisse der Aktinringzahlen oberhalb von 1100 °C zwischen den letzten beiden Versuchen. Die unterschiedlich starke Ausbildung von Sealing Zones könnte ebenfalls darauf zurückzuführen sein, dass die Stabilität der Aktinringe oberflächenabhängig ist und die beim Wiederholungsversuch beobachteten Osteoclasten auf den bei 1200°C und 1250°C gebrannten Tabletten noch stabile Ringformen aufwiesen, während auf den bei 1280°C gesinterten Oberflächen schon Desorganisation stattgefunden hat, da sie eine glattere Oberfläche aufweisen.

Letztlich bleibt anzumerken, dass in vivo das Zusammenspiel regulatorischer Mechanismen des gesamten Körpers eine Rolle spielt. Osteoblasten beispielsweise haben andere Anforderungen an Oberflächen als Osteoclasten. Daher sollte auch bei der Gestaltung eines Knochersatzmaterials eine Balance gefunden werden, die die Koexistenz zu gleichen Maße wie echter Knochen ermöglicht, wodurch ein gleichmäßiger Ab- und Aufbau erreicht werden kann.

Es gibt zahlreiche Faktoren, die durch Porosität und Porengröße beeinflusst werden und ihrerseits Effekte bei Osteoclasten hervorrufen könnten. Adsorption von Wachstumsfaktoren, durch Calciumfreisetzung vermittelte Signalwege und Rauigkeit haben alle einen Anteil an porositätsvermittelten Effekten, obwohl unklar ist in welchem Ausmaß.

Offensichtlich ist jedoch, dass Osteoclasten in vitro ein von der Porengröße abhängiges Verhalten bezüglich Aktinringbildung zeigen, deren genaue Erforschung in Hinblick auf Resorbierbarkeit und Implantatversagen Verbesserungen im Gebiet des Knochenersatzes bringen könnte.

5 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1	Darstellung des Knochenaufbaus	Seite 7
Abbildung 2	Aufsicht auf kompakten Knochen	Seite 8
Abbildung 3	Differenzierung des Osteoclasten	Seite 14
Abbildung 4	Adhäsionsstrukturen in Zellen	Seite 16
Abbildung 5	Darstellung der 3 morphologischen Phasen des Osteoclasten	Seite 16
Abbildung 6	Podosomen in Podosomengürtel	Seite 17
Abbildung 7	Resorptionsprozess	Seite 19
Abbildung 8	Signaltransduktionskaskade durch NO	Seite 21
Abbildung 9	Intramembranöse und endochondrale Ossifikation	Seite 23
Abbildung 10	„Primary contact healing“ und „primary gap healing“	Seite 24
Abbildung 11	Oberflächen der TCP-Tabletten ohne und mit 15% Harnstoff im Pulvergemisch	Seite 54
Abbildung 12	Oberflächen der TCP-Tabletten mit 30% und 50% Harnstoffanteil im Pulvergemisch	Seite 55
Abbildung 13	Gegenüberstellung der TRAP-positiven Zellen auf Knochen, β -TCP mit 0%, 15%, 30% und 50% Harnstoffanteil in der Pulvermischung	Seite 56
Abbildung 14	Gegenüberstellung der Aktinringzahlen auf Knochen, β -TCP mit 0%, 15%, 30% und 50% Harnstoffanteil in der Pulvermischung	Seite 57
Abbildung 15	Sealing Zone auf Knochen und Podosomengürtel auf TCP-Tabletten und auf TCP-Tabletten mit 15% Ureaanteil	Seite 58
Abbildung 16	Osteoclast in einer Pore der TCP-Tablette mit 30% Harnstoffanteil in der Pulvermischung, der einen Aktinring ausbildet und runde kleine Zelle mit aktinringartiger Struktur auf TCP-Tablette mit 50% Harnstoffanteil in der Pulvermischung	Seite 59

Abbildung 17	Die Oberflächen der bei 900°C und 1250°C gesinterten TCP-Tabletten	Seite 60
Abbildung 18	Gegenüberstellung der TRAP-positiven Zellen auf Knochen, β -TCP gesintert bei 900 °C und 1250 °C	Seite 61
Abbildung 19	Gegenüberstellung der Aktinringe auf Knochen, β -TCP gesintert bei 900 °C und 1250 °C	Seite 62
Abbildung 20	Teile einer Sealing Zone auf Knochen, Osteoclast mit vereinzelt Adhäsionspunkten auf bei 900°C gesinterten Tabletten und Osteoclast mit Ansätzen eines Aktinringes auf bei 1250°C gesinterten Tabletten	Seite 63
Abbildung 21	Gegenüberstellung der TRAP-positiven Zellen auf Knochen und β -TCP gesintert bei 1280 °C	Seite 64
Abbildung 22	Gegenüberstellung der Aktinringzahlen auf Knochen und β -TCP gesintert bei 1280 °C	Seite 65
Abbildung 23	Oberfläche der TCP-Tabletten gesintert bei 1200°C, 1250°C und 1280 °C	Seite 67
Abbildung 24	Gegenüberstellung der TRAP-positiven Zellen auf den verschiedenen Oberflächen	Seite 68
Abbildung 25	Gegenüberstellung der Aktinringzahlen auf den verschiedenen Oberflächen	Seite 69
Abbildung 26	Verhältnisse auf den bei niedrigeren Temperaturen gesinterten Tabletten	Seite 70
Abbildung 27	Osteoclasten auf TCP-Tabletten, gesintert bei 1150°C, 1200°C, 1250°C, 1280°C, Knochen und 950 °C	Seite 71
Abbildung 28	Gegenüberstellung der Oberflächen gebrannt bei 1250 °C vor und nach der Inkubation	Seite 72
Abbildung 29	Gegenüberstellung der Oberflächen gebrannt bei 1280 °C vor und nach der Inkubation	Seite 73
Abbildung 30	Aktinringzahlen auf den bei 1100°C, 1150°C, 1200°C und 1280°C verglichen mit Knochen	Seite 74

6 Abkürzungen

BAG-75	Bone Acidic Glykoprotein 75
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
BMP	Bone Morphogenic Protein
Cbl	Casitas B-lineage lymphoma
CFU-GM	Granulocyte Macrophage – Colony Forming Unit
CFU-M	Macrophage – Colony Forming Unit
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DC-STAMP	Dendritic Cell-Specific Transmembrane Protein
FACIT-	Fibrillen assoziierte -
FCS	Fetal Calf Serum
IGF-1	Insulinlike Growth Factor
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IP ₃ R	Inositol-1,4,5-trisphosphat-Rezeptor
IRAG	IP(3) Receptor Associated cGKI substrate
M-CSF	Macrophage – Colony Stimulating Factor
MEPE	Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein
MGP	Matrix γ -carboxylic acid Protein
NF κ B	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NO	Stickstoffmonoxid
PBS(-TC)	Phosphate Buffered Saline (-Tissue Culture)
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PMMA	Polymethylmethacrylat
PTB-	Phosphotyrosine Binding-
Pyk	Pyruvatkinase
RANKL	Receptor Activator of NF κ B – Ligand
RAW-	RAW 264.7; Monocyten/Makrophagen - Zelllinie
RGD	Arginin- Glycin – Asparagin

SH-	Src Homology -
SLRP	Small Leucine Rich Proteoglykans
Src	Rous Sarcoma Virus
TGF- β	Transforming Growth Factor $-\beta$
TRAP	Tartrate Resistant Acid Phosphatase
VASP	Vasodilator-stimulated phosphoprotein
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
α/β -TCP	α/β -Tricalciumphosphat
α -MEM	α -Minimal Essential Medium

7 Lebenslauf

Name :	Astrid Rohrhofer
Geburtsdatum:	04.09. 1987
Vater:	Gerhard Rohrhofer
Mutter:	Agnes Rohrhofer
Geschwister:	Andreas Rohrhofer
Kinder:	Theodor Vincent Kazuya Rohrhofer
Staatsangehörigkeit:	Österreich
Religionsbekenntnis:	Römisch-katholisch

Ausbildung

Seit Oktober 2006	Studium der Pharmazie an der Universität Wien
09/1998 – 06/2006	BRG Radetzkystraße, 1030 Wien
09/1994 – 06/1998	VS Leopoldsgasse, 1020 Wien

8 Abstract

Osteoclasts are multinucleated cells whose role in the course of bone remodeling and fracture healing is considerable.

Since the use of bone substitutes constantly increases and their implantation is followed by a healing process involving osteoclasts, the examination of their interactions with the utilized materials seems necessary.

Bone substitutes exist in various materials and types. Above all, porosity is an attribute not to be underestimated regarding osseointegration, but its effects on osteoclasts have hardly been studied. In this thesis the influence of micro- and macroporosity of TCP-surfaces on osteoclast adhesion, which represents the first step of a resorption cycle, will be outlined.

After cultivating rabbit osteoclasts for 2 days TRAP- and immunofluorescence staining were performed. Macropores were obtained through addition of urea as a porogen. Variation in microporosity occurred owing to the application of different sintering temperatures. Throughout the macroporous discs an increase of actin rings was perceivable up to a certain point of porosity and pore size followed by a constant decrease, while the macroporous discs did not produce significant numbers of rings on discs sintered below 1150 °C.

It can therefore be concluded that pore size and extent of porosity influence the resorptive behaviour of osteoclasts.

Zusammenfassung

Osteoclasten sind vielkernige Zellen, denen im Zuge des Knochenremodelings und der Frakturheilung eine bedeutende Rolle zukommt. Da die Anwendung von Knochenersatzmaterialien stetig zunimmt und deren Implantation von einem Heilungsprozess mit Osteoclastenbeteiligung gefolgt ist, erscheint es notwendig die Interaktion der Osteoclasten mit den angewendeten Oberflächen zu untersuchen. Knochenersatz existiert in vielfältiger Form. Vor allem die Porosität ist eine nicht zu unterschätzende Eigenschaft in Bezug auf die Osseointegration. Welche Auswirkungen sie auf Osteoclasten hat wurde bisher kaum untersucht. In dieser Diplomarbeit wird der Einfluß von Mikro- und Makroporosität von β -TCP-Oberflächen auf Osteoclastenadhäsion, die den ersten Schritt zu einem erfolgreichen Resorptionszyklus darstellt, behandelt.

Unter Verwendung von Kaninchen-Osteoclasten wurden nach 2 Tagen Kultivierungsdauer TRAP- und Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Die Makroporen wurden durch Beigabe eines Porogens geschaffen, wohingegen die Variation der Mikroporen durch unterschiedliche Brenntemperaturen zustande kam. Unter den makroporösen Tabletten zeigte sich ein Anstieg an Aktinringen bis zu einem gewissen Grad an Porogenbeimischung, anschließend gefolgt von einer stetigen Verringerung, während bei den mikroporösen Tabletten erst ab einer bestimmten Sintertemperatur signifikante Ringzahlen auftraten.

Daher kann darauf geschlossen werden, dass Porengröße und der Grad der Porosität einer Oberfläche einen Einfluß auf das osteoclastäre Resorptionsverhalten ausüben.

Literaturverzeichnis

- Anderson, J M, Rodriguez, A, et al. (2008). Foreign body reaction to biomaterials, Elsevier.
- Arima, Y and Iwata, H (2007). "Effect of wettability and surface functional groups on protein adsorption and cell adhesion using well-defined mixed self-assembled monolayers." *Biomaterials* **28**(20): 3074-3082.
- Bar Shavit, Z (2007). "The osteoclast: A multinucleated, hematopoietic origin, bone resorbing osteoimmune cell." *Journal of cellular biochemistry* **102**(5): 1130-1139.
- Baroli, B (2009). "From natural bone grafts to tissue engineering therapeutics: Brainstorming on pharmaceutical formulative requirements and challenges." *Journal of pharmaceutical sciences* **98**(4): 1317-1375.
- Barrère, F, van Blitterswijk, C A, et al. (2006). "Bone regeneration: molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics." *international Journal of Nanomedicine* **1**(3): 317.
- Benninghoff, A and Drenckhahn, D (2008). Allgemeine Gewebelehre, Skelett- und Muskelsystem. Anatomie. D Drenckhahn. München, Elsevier. **1**: 133-137, 266-267.
- Berger, G and Gildenhaar, R (1995). "Resorbierbarer Knochenersatz auf der Basis von Calciumphosphaten." *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik* **26**(7): 379-385.
- Clarke, B (2008). "Normal bone anatomy and physiology." *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* **3**(Supplement 3): S131.
- Daculsi, G, LeGeros, R Z, et al. (2008). "Effect of Sintering Process of HA/TCP Bioceramics on Microstructure, Dissolution, Cell Proliferation and Bone Ingrowth." *Key Engineering Materials* **361**: 1139-1142.
- Detsch, R, Mayr, H, et al. (2008). "Formation of osteoclast-like cells on HA and TCP ceramics." *Acta Biomaterialia* **4**(1): 139-148.
- Duong, L T, Lakkakorpi, P, et al. (2000). "Integrins and signaling in osteoclast function." *Matrix Biology* **19**(2): 97-105.
- Faccio, R, Novack, D V, et al. (2003). "Dynamic changes in the osteoclast cytoskeleton in response to growth factors and cell attachment are controlled by 3 integrin." *The Journal of cell biology* **162**(3): 499.
- Geblinger, D, Addadi, L, et al. (2010). "Nano-topography sensing by osteoclasts." *Journal of Cell Science* **123**(9): 1503–1510.
- Giannoudis, P V, Dinopoulos, H, et al. (2005). "Bone substitutes: an update." *Injury* **36**(3): S20-S27.

Gramoun, A, Goto, T, et al. (2010). "Bone matrix proteins and extracellular acidification: Potential co regulators of osteoclast morphology." *Journal of cellular biochemistry* **111**(2): 350-361.

Hing, K A (2005). "Bioceramic bone graft substitutes: influence of porosity and chemistry." *International Journal of Applied Ceramic Technology* **2**(3): 184-199.

Isaac, J, Hornez, J C, et al. (2008). "TCP microporosity decreases the viability and osteoblast differentiation of human bone marrow stromal cells." *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **86**(2): 386-393.

Komlev, V, Mastrogiacomo, M, et al. "BIODEGRADATION OF POROUS CALCIUM PHOSPHATE SCAFFOLDS IN AN ECTOPIC BONE FORMATION MODEL STUDIED BY X-RAY COMPUTED MICROTOMOGRAPHY." *European Cells and Materials* **19**.

Lorget, F, Kamel, S, et al. (2000). "High extracellular calcium concentrations directly stimulate osteoclast apoptosis." *Biochemical and Biophysical Research Communications* **268**(3): 899-903.

Lu, J, Descamps, M, et al. (2002). "The biodegradation mechanism of calcium phosphate biomaterials in bone." *Journal of biomedical materials research* **63**(4): 408-412.

Luxenburg, C, Geblinger, D, et al. (2007). "The architecture of the adhesive apparatus of cultured osteoclasts: from podosome formation to sealing zone assembly." *PLoS One* **2**(1): 271-298.

Mejillano, M R, Kojima, S, et al. (2004). "Lamellipodial Versus Filopodial Mode of the Actin Nanomachinery:: Pivotal Role of the Filament Barbed End." *Cell* **118**(3): 363-373.

Mentaverri, R, Yano, S, et al. (2006). "The calcium sensing receptor is directly involved in both osteoclast differentiation and apoptosis." *The FASEB journal* **20**(14): 2562.

Monchau, F, Lefevre, A, et al. (2002). "In vitro studies of human and rat osteoclast activity on hydroxyapatite,[beta]-tricalcium phosphate, calcium carbonate." *Biomolecular engineering* **19**(2-6): 143-152.

Nandi, S, Roy, S, et al. (2010). "Orthopaedic applications of bone graft & graft substitutes: a review." *Indian Journal of Medical Research* **132**(7): 15–30.

Niedhart, C and Niethard, F "2.1 Klinische Anforderungen an Knochenersatzstoffe."

Okuda, T, Ioku, K, et al. (2007). "The effect of the microstructure of [beta]-tricalcium phosphate on the metabolism of subsequently formed bone tissue." *Biomaterials* **28**(16): 2612-2621.

- Parikh, S (2002). "Bone graft substitutes: past, present, future." *Journal of postgraduate medicine* **48**(2): 142.
- Perrotti, V, Nicholls, B M, et al. (2009). "Human osteoclast formation and activity on an equine spongy bone substitute." *Clinical Oral Implants Research* **20**(1): 17-23.
- Puleo, D and Nanci, A (1999). "Understanding and controlling the bone-implant interface." *Biomaterials* **20**(23-24): 2311-2321.
- Ranella, A, Barberoglou, M, et al. (2010). "Tuning cell adhesion by controlling the roughness and wettability of 3D micro/nano silicon structures." *Acta Biomaterialia* **6**(7): 2711-2720.
- Robey, P and Boskey, A (2006). *Extracellular Matrix and Biomineralization of Bone. Primer on the Metabolic Bone Diseases And Disorders of Mineral Metabolism*. M J Favus. New York, American Society of Bone and Mineral Research.
- Robinson, L J, Blair, H C, et al. (2010). "Regulation of bone turnover by calcium regulated calcium channels." *Annals of the New York Academy of Sciences* **1192**(1): 351-357.
- Sanjay, A, Houghton, A, et al. (2001). "Cbl associates with Pyk2 and Src to regulate Src kinase activity, v 3 integrin-mediated signaling, cell adhesion, and osteoclast motility." *The Journal of cell biology* **152**(1): 181.
- Schäffler, A and Schmid, S (1997). *Mensch, Körper, Krankheit. Mensch, Körper, Krankheit*. A Schäffler and S Schmid. Bad Homburg v. d. Höhe, Verlag Jungjohann: 50.
- Schilling, A F, Linhart, W, et al. (2004). "Resorbability of bone substitute biomaterials by human osteoclasts." *Biomaterials* **25**(18): 3963-3972.
- Small, J V, Stradal, T, et al. (2002). "The lamellipodium: where motility begins." *Trends in cell biology* **12**(3): 112-120.
- Smith, I O, Baumann, M J, et al. (2006). "Induced microcracking affects osteoblast attachment on hydroxyapatite scaffolds for tissue engineering." *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* **2**(3): 105-110.
- Tanimoto, Y and Nishiyama, N (2008). "Preparation and physical properties of tricalcium phosphate laminates for bone tissue engineering." *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **85**(2): 427-433.
- Thamaraiselvi, T and Rajeswari, S "Biological evaluation of bioceramic materials-a review." *Carbon* **24**(31): 172.
- Vaananen, H K and Laitala-Leinonen, T (2008). "Osteoclast lineage and function." *Archives of Biochemistry and Biophysics* **473**(2): 132-138.
- Vallet-Regí, M and González-Calbet, J M (2004). "Calcium phosphates as substitution of bone tissues." *Progress in Solid State Chemistry* **32**(1-2): 1-31.

Wang, W, Ferguson, D J P, et al. (1997). "Biomaterial particle phagocytosis by bone-resorbing osteoclasts." *Journal of Bone and Joint Surgery-British* Volume **79**(5): 849.

Yamada, S, Heymann, D, et al. (1997). "Osteoclastic resorption of calcium phosphate ceramics with different hydroxyapatite/[beta]-tricalcium phosphate ratios." *Biomaterials* **18**(15): 1037-1041.

Yaroslavskiy, B B, Turkova, I, et al. (2010). "Functional osteoclast attachment requires inositol-1, 4, 5-trisphosphate receptor-associated cGMP-dependent kinase substrate." *Laboratory Investigation* **90**(10): 1533-1542.