



universität
wien

DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„Effekte von Hydroxyapatit-Nanopartikel
auf Maus-Osteoblasten *in vitro*“

verfasst von / submitted by

Stefan Kanz

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of

Magister der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2020

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

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

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die zum erfolgreichen Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Ganz besonders möchte ich mich bei A.o. Univ.-Prof. Dr. Oskar Hoffmann bedanken, der mir diese Arbeit erst ermöglicht hat und für seine Geduld und fachliche Unterstützung.

Bei Mag.^a Carina Kamleitner möchte ich mich herzlich für die praktische Unterstützung während der experimentellen Arbeit bedanken. Ohne die ausgezeichnete Anleitung in den fundamentalen Labortechniken durch Frau Barbara Berger wäre diese Arbeit wohl nicht zustande gekommen. Auch möchte ich mich bei Peter Höflich für seine Unterstützung und seine aufmunternden Worte im Laboralltag bedanken.

Auch möchte ich mich natürlich bei meiner Familie für die große Unterstützung während des Studiums bedanken. Ein großer Dank gebührt auch allen meinen Freunden, die mich in schwierigen Situationen immer unterstützt und begleitet haben. Ganz besonders möchte ich mich hier bei Cornelia, Raphaela und Felix bedanken.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	9
1.1. Regenerative Medizin	10
1.2. Nanomedizin	10
1.3. Nanomaterialien in der regenerativen Medizin	13
1.3.1. Metall-Nanopartikel	14
1.3.2. Nichtmetall-Nanopartikel	14
1.3.3. Nanotopographie	15
1.3.4. Nanostrukturen als Kompositwerkstoffe	15
1.3.5. Hydroxyapaptit-Nanopartikel	15
1.4. Knochenphysiologie	19
1.4.1. Osteoblasten	22
1.4.2. Osteoklasten	25
1.4.3. Osteozyten	26
1.4.4. Osteoporose	28
2. Fragestellung der Arbeit	30
3. Material und Methoden	31
3.1. Material	31
3.2. Substanzen	32
3.3. Herstellung der Reagenzien	32
3.4. Methoden	34
3.4.1. ALP Assay	34
3.4.2. Sirius Red/Fast Green Assay	35
3.4.3. Presto Blue Assay	36
3.5. Experimentelles Design	37
3.6. Statistische Auswertung	43
4. Resultate	44
4.1. Zellviabilität	44
4.1.1. ST-Experiment – Tag 1	44
4.1.2. LT-Experiment – Tag 1	44
4.1.3. ST-Experiment – Tag 7	45
4.1.4. LT-Experiment – Tag 7	46
4.1.5. ST-Experiment – Tag 14	46
4.1.6. LT-Experiment – Tag 14	47
4.2. Alkalische Phosphatase (ALP)	48

4.2.1. ST-Experiment – Tag 7	48
4.2.2. LT-Experiment – Tag 7	48
4.3. Sirius Red/Fast Green Assay	49
4.3.1. ST-Experiment Tag 7	49
4.3.2. LT-Experiment Tag 7	52
4.3.3. ST-Experiment – Tag 14	53
4.3.4. LT-Experiment Tag 14	56
5. Diskussion.....	59
6. Ausblick.....	63
Zusammenfassung	64
Abstract.....	64
Literaturverzeichnis	65
Abbildungsverzeichnis.....	67
Tabellenverzeichnis.....	68

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit von Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch noch nicht veröffentlicht.

Abkürzungen

ALP	alkalische Phosphatase
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
MEM	Minimal Essential Medium Eagle
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
NP.....	NP
LT.....	long term
ST.....	short term
OB.....	Osteoblasten
HANP.....	Hydroxyapatitnanopartikel
BMP.....	bone morphogenetic protein
MSC.....	mesenchymal stem cells
ECM.....	extracellular matrix
RANKL.....	Receptor Activator of NF- κ B Ligand
M-CSF-1.....	macrophage colony-stimulating factor 1
OPG.....	Osteoprotegerin
TGF- β	transforming growth factor β
OZ.....	Osteozyten
PTH.....	parathyroid hormone, Parathormon
BLC.....	bone lining cells, Knochensaumzellen
IL-1.....	Interleukin-1
TNF.....	Tumornekrosefaktor
mpOB.....	primäre Osteoblasten von der Maus
β -GP.....	beta-Glycerophosphat
LAF.....	Laminar Air Flow
cHA.....	carbonylierte Hydroxyapatitnanopartikel
HA.....	nicht-carbonylierte Hydroxyapatitnanopartikel

1. Einleitung

Forschungen rund um Nanomaterialien und deren Anwendung sind in den letzten Jahrzehnten eine treibende Kraft im Feld der regenerativen Medizin. Durch den Fokus auf Zellinteraktionen im Nanometerbereich ergaben sich neue Perspektiven, Zellen und Gewebe zu modifizieren und zu regenerieren. Eine besondere Herausforderung stellt die Arbeit am Knochengewebe dar. Durch Traumata, Infektionskrankheiten oder durch chirurgische Eingriffe verursachte Defekte im Knochen, können mit Hilfe von Spendergewebe behandelt werden. Dadurch ergeben sich jedoch auch verschiedene Probleme, wie beispielsweise begrenzte Verfügbarkeit oder Infektionsgefahr. Ein ideales Spendergewebe sollte jedoch pathogenfrei und nicht immunogen sowie eine Stabilität im biologischen System aufweisen und natürlich knochenaufbauend sein. Hier kann man nun die Eigenschaften von verschiedenen synthetisch hergestellten Hydroxyapatitnanopartikel (HANP) nutzen. Nanostrukturiertes Hydroxyapatit ist in der natürlichen Knochenmatrix eingebaut und wesentlich für den Knochenaufbau. Dessen Nutzen spiegelt sich vor allem in einer besseren Ansprechbarkeit des Knochengewebes und verringerte Immunogenität. (Chaudhury, et al., 2014)

In dieser Arbeit werden die Wirkungen von HANP in verschiedenen Konzentrationen auf primäre Osteoblasten (OB) in vitro untersucht. In verschiedenen Zeitabschnitten und Settings wurden die Zellviabilität, die Zelldifferenzierung sowie die Zellaktivität im Labor untersucht und analysiert. Im Folgenden wird neben einer Einführung in die regenerative Medizin und die Nanomedizin, anhand von Studien die Relevanz verschiedener Nanomaterialien dargelegt. Außerdem wird der Bereich der Knochenphysiologie Erwähnung finden (Kapitel 1), bevor die leitende Fragestellung der Untersuchung vorgestellt wird (Kapitel 2). Die während der Untersuchung verwendeten Materialien und Methoden und das dabei verwendeten Experimentdesign werden daran anschließend erklärt (Kapitel 3). Die Resultate werden differenziert vorgestellt (Kapitel 4) und in Hinblick auf die generelle Thematik diskutiert (Kapitel 5). Ein Ausblick am Ende zeigt auf, wie weitere Untersuchungen im Bereich der Nanomaterialien einen Beitrag zur regenerativen Medizin leisten könnten (Kapitel 6).

1.1. Regenerative Medizin

Unter regenerativer Medizin versteht man den interdisziplinären Ansatz mithilfe biologischer, chemischer sowie materialwissenschaftlicher Methoden, Wachstum, Regeneration oder Entwicklung beschädigter Organe oder Gewebe zu fördern. (Pina, et al., 2015)

Unter allen Gewebearten unseres Körpers ist das Knochengewebe unter dem Aspekt des *Tissue Engineering* am besten erforscht, vor allem wegen seiner hohen Fähigkeit zu regenerieren. Aufgrund ihrer guten osteoinduktiven Eigenschaften werden Knochenersatzmaterialien, seien sie *Autograft* oder *Allograft*, d.h. vom eigenen Körper oder von einem Spender oder einer Spenderin, oft verwendet, um Knochendefekte zu behandeln. Trotzdem besteht immer das Risiko hoher finanzieller Kosten, Krankheitsübertragungen, Infektionen sowie das Risiko von Immunabwehrreaktionen und chronischen Schmerzen. Um die Geweberegeneration auf zellbiologischer Ebene zu stimulieren, wird vermehrt auf Biomaterialien gesetzt, welche spezifische Zellantworten auslösen, um den Defekt zu beheben. (Pina, et al., 2015)

Ein wichtiges Forschungsfeld der regenerativen Medizin stellt die Nanomedizin bzw. Forschungen an Nanomaterialien dar, weswegen diese im nächsten Kapitel näher behandelt werden.

1.2. Nanomedizin

Der Ansatz Strukturen im Nanometerbereich zu verändern und zu modifizieren, wird durch die Nanotechnologie angestrebt. Viele für uns alltägliche Dinge, wie die Benutzung eines Computers oder Smartphones, wären ohne die Fortschritte der Nanotechnologie unvorstellbar. Aber auch der Einsatz in der Medizin eröffnet ein neues und rapide wachsendes Forschungsfeld – jenes der Nanomedizin. Die Bausteine des Lebens sind nanostrukturell geordnet und somit ein wichtiger Ansatz, um die Diagnostik, die Anwendung hoch spezifischer Wirkstoffe, zu verfeinern oder die regenerative Medizin, personalisierte Medizin und damit auch die Therapie verschiedener Krankheiten, zu verbessern. Damit wird ersichtlich, dass man sich hier in einer stark interdisziplinären Wissenschaft bewegt, deren fachspezifische Grenzen nicht eindeutig zu ziehen sind. Aus diesem Grund ist unter Nanomedizin nicht nur die Anwendung von Nanotechnologie im medizinischen Bereich gemeint, sondern ebenso die Verschmelzung mit anderen Bereichen und ihre gegenseitige, wissenschaftliche Bereicherung. (Bates, 2014)

Um dennoch einen Überblick geben zu können, wird im Folgenden der Versuch unternommen, die Nanomedizin in drei Subdisziplinen zu unterteilen: Nanotechnologie, Nanobiotechnologie und Nanobiomimetik. (Bates, 2014)

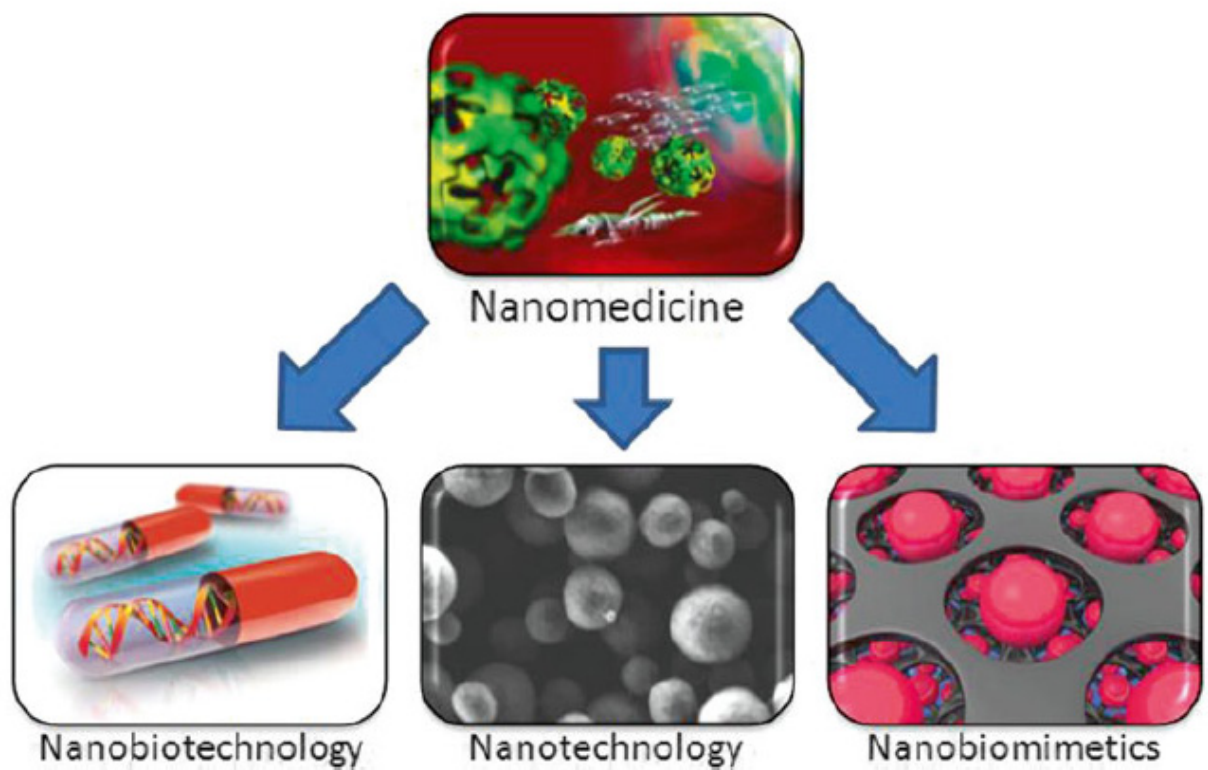


Abbildung 1: Überblick Nanomedizin und Subdisziplinen

Quelle: (Bates, 2014)

Eine der ältesten Anwendungen in der Nanomedizin ist die Nanobiotechnologie. Der Einfluss dieser Technologie wird durch die Entwicklung von monoklonalen Antikörpern, aber auch durch die alltägliche Verwendung eines Schwangerschaftstests oder in der HIV-Diagnostik, welche auf Enzymreaktionen im Nanometerbereich basiert, schnell klar. Die Forschung an sogenannten Nanobodies, die kleineren Geschwister der monoklonalen Antikörper, tragen erste Früchte. Bei deren Herstellung werden die spezifischen Sequenzen der monoklonalen Antikörper, welche für die Interaktion wichtig sind, isoliert und reduziert. Dadurch sind sie stabiler und auch die Möglichkeit einer Immunogenität ist geringer. (Bates, 2014)

Die zweite Subdisziplin ist die Nanotechnologie. Sie beschäftigt sich in erster Linie mit nicht-biologischen Eigenschaften von Stoffen im Nanometerbereich. Die Forschung an Nanopartikel (NP) und deren Anwendung ist ihr Fundament. Eine interessante Eigenschaft dieser Partikel ist, dass sie in ihren Fähigkeiten zu interagieren eher an das Verhalten von Stoffen in der Quantenmechanik und weniger an die klassische Mechanik erinnern. Dies kommt unter anderem dadurch zustande, dass sie ein hohes Oberflächen-

zu-Volumen-Verhältnis besitzen, welches mit Verringerung der Partikelgröße zunimmt. (Bates, 2014)

Das macht es für die NP leichter biologische Barrieren zu überwinden, wie beispielsweise die Blut-Hirn-Schranke oder auch dichte Zell-Zell-Verbindungen wie „tight junctions“. (Bates, 2014)

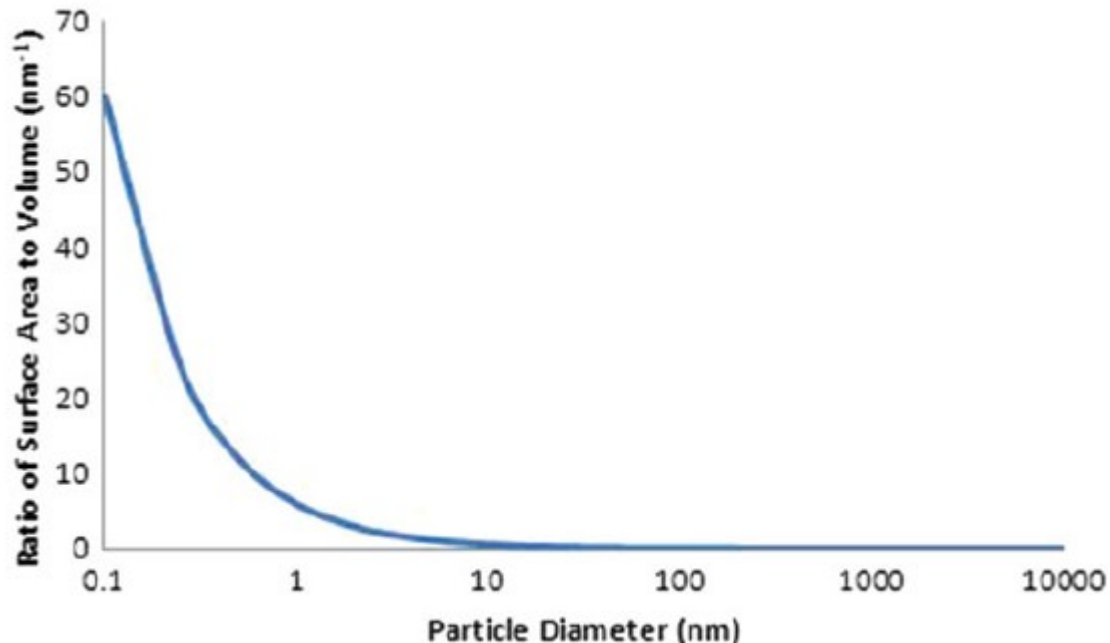


Abbildung 2: Abhängigkeit Oberfläche-Volumen zu Partikeldurchmesser

Quelle: (Bates, 2014)

Ein weiterer Ansatz ist ihre Verwendung als Carrier für therapeutische Wirkstoffe. An magnetische Partikel gekoppelt und mithilfe eines Magnetes, kann so z.B. eine zielgerichtete antineoplastische Therapie erreicht werden. Weitere interessante Aspekte stellen die Umhüllung hydrophober Wirkstoffe durch Liposomen und dadurch eine Erhöhung ihrer Verteilung sowie eine modifizierte Freisetzung des Wirkstoffes, dar. (Bates, 2014)

Auch in der Gentherapie, wo gewöhnlich virale Vektoren verwendet werden, können nanogestützte Vektoren zum Einsatz kommen. All die erwähnten Anwendungen bedeuten vor allem eines – mehr Effizienz und Spezifität. (Bates, 2014)

Die dritte Teildisziplin wird aufgrund der Verwendung von Nanomaterialien und Nachahmung ihrer natürlichen Struktur und deren Mechanismen, als Nanobiomimetik beschrieben. Um ein Beispiel zu nennen, sei hier auf die Verwendung von sog. Aptameren, d.h. synthetisch hergestellte Oligopeptide, welche einen molekularen Erkennungsbereich für diverse Stoffe besitzen und so im therapeutischen, aber auch diagnostischen Bereich

eingesetzt werden können, verwiesen. Auch sind sie im Vergleich zu monoklonalen Antikörpern nicht immunogen und auch chemisch stabiler. (Bates, 2014)

Diese drei Teilbereiche der Nanomedizin sind allesamt relevant, um einen Überblick zu erhalten, welche Einsatzmöglichkeiten vorhanden sind. Im Folgenden werden die Nanomaterialien in der regenerativen Medizin näher erläutert.

1.3. Nanomaterialien in der regenerativen Medizin

Als Nanomaterialien im Allgemeinen werden molekulare Strukturen bezeichnet, welche sich im Größenbereich zwischen 0,1-100 nm bewegen. Deren Einsatzmöglichkeiten decken damit verschiedene Disziplinen ab, wie Chemie, Physik, Biologie und Ingenieurwissenschaften.

In den letzten Jahrzehnten wurden sie für eine biologische Anwendung erfolgreich weiterentwickelt und man konnte große Erfolge in Feldern wie dem diagnostischen und therapeutischen Imaging oder auch dem gezielten Wirkstofftransport (*Drug Delivery*) erzielen. Anfänglich wurden die Nanomaterialien in der biomedizinischen Anwendung nur als Carrier angesehen und somit auf deren passive Rolle beschränkt. Weitere Studien ergaben jedoch, dass sie aktiv molekular interagieren und Einfluss auf die Zellregulation nehmen. Im Idealfall sollen sie eine Art künstliche extrazelluläre Matrix darstellen, die gezielt mit den jeweiligen Zellen interagiert. Die physikochemischen Eigenschaften, wie z.B. einem vergrößerten Oberflächen-Volumen-Verhältnis im Vergleich zu den Ausgangsstoffen oder einer Änderung der Größe und Form, spielen eine wichtige Rolle für Ausbreitung und Kontakt zu Zellen. Je genauer diese Eigenschaften definiert und berücksichtigt werden, desto besser ist die Interaktion der Nanomaterialien mit den Zellen. Es sind in jüngster Zeit verschiedene Nanomaterialien und deren Auswirkungen auf Zellen, deren Größe und Chemie erforscht worden. (Liu, et al., 2017)

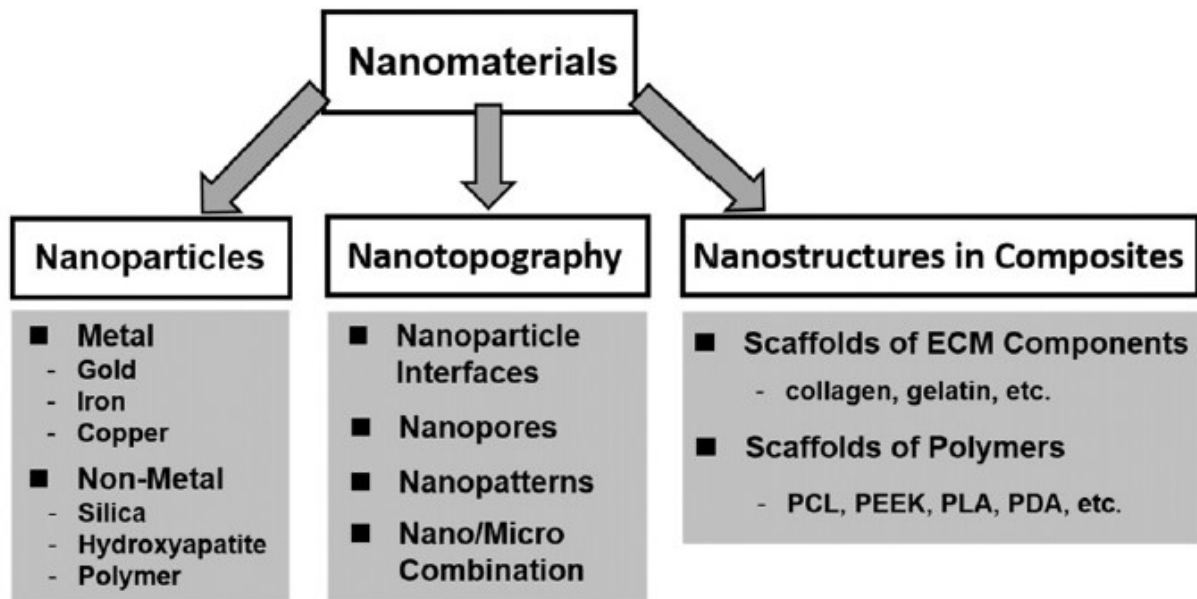


Abbildung 3: Übersicht Nanomaterialien

Quelle: (Bates, 2014)

1.3.1. Metall-Nanopartikel

NP aus Gold haben besonders in der optoelektronischen Anwendung, wie z.B. dem therapeutischen Imaging ihre Vorzüge. Aber auch beim gezielten Wirkstofftransport (*Drug Delivery*) finden sie ihren Einsatz. NP aus Eisen und deren magnetische Eigenschaften werden vor allem als Kontrastmittel in der Magnetresonanzbildgebung geschätzt. Es gibt jedoch wenig Information über deren Verhalten in Zellkulturen. NP aus Kupfer finden aufgrund ihrer antimikrobiellen Wirkung, aber auch aufgrund ihrer apoptoseinduzierenden Eigenschaften, Anwendung in der Medizin. (Liu, et al., 2017)

1.3.2. Nichtmetall-Nanopartikel

Siliziumdioxid-Nanopartikel mit einer großen Oberfläche, einem großen Porenvolumen, einer gleichförmigen Porosität sowie einer stabilen Dispersion im wässrigen Milieu, aber auch einer ausgezeichneten Biokompatibilität und Biodegradabilität, sind ideale Kandidaten für die biomedizinische Anwendung. Polymere NP natürlichen Ursprungs sind z.B. Seiden-Fibroin-Chitosan-Polymere. Ebenso synthetische NP auf Basis von Poly-(ϵ -caprolacton)-polyethylenglycol sind vielversprechende Ansätze in der medizinischen Therapie. (Liu, et al., 2017)

Der damit zusammenhängende Einsatz von HANP wird an einer späteren Stelle beschrieben (Kapitel 1.3.5).

1.3.3. Nanotopographie

Die topografischen Eigenschaften und deren Modifikation von NP sind im Hinblick auf Zelloberflächen-Interaktionen besonders wichtig. Insbesondere werden Zelladhäsion, Differenzierung, Orientierung oder Zellviabilität dadurch beeinflusst. Um dies zu erreichen, werden vor allem verschiedene Beschichtungstechniken (*Coating*) verwendet. Ein weiterer Ansatz ist die Herstellung von nanoporösen Strukturen. Ebenso wurde bereits die Verwendung von fein strukturierten Nanostrukturen (*Nanopatterns*) in Studien untersucht. So wurden z.B. in verschiedenen Verhältnissen rillen- und kammförmige Oberflächen von NP und deren Auswirkungen auf Zellkulturen beschrieben. Damit konnte auch gezeigt werden, dass Zellen spezifisch auf verschieden konstruierte Nanotopografien reagieren und auch bevorzugen oder vermeiden. Außerdem liegt in der Kombination von nano- und mikrostrukturellen Oberflächen ein großes synergistisches Potential. (Liu, et al., 2017)

1.3.4. Nanostrukturen als Kompositwerkstoffe

Um den Bedingungen der Zellinteraktion mit Nanomaterialien nahezukommen, versucht man nun auch, künstliche dreidimensionale extrazelluläre Matrices herzustellen, welche der Komplexität und Funktionalität ihrer natürlichen Vorbilder entsprechen sollen. Zum einen bestehen die Möglichkeiten, Gerüststoffe (*Scaffolds*) aus Kollagen oder auch Gelatine zu verwenden, um in sie anschließend verschiedene NP zu inkorporieren. Diese Gerüste bieten des Weiteren gute Bedingungen, um Zelladhäsion, Migration und Differenzierung zu ermöglichen. Zum anderen wurden auch Gerüste aus synthetischen Polymeren entwickelt, wie z.B. Polyhydroxybutyrate. Inspiriert durch Knochenimplantate, werden auch Gerüststoffe aus Keramiken und Metallen hergestellt. Diese Materialien nützen die Vorteile der Eigenschaften aller Einzelstoffe und werden in verschiedenen Verhältnissen zueinander eingesetzt. (Liu, et al., 2017)

1.3.5. Hydroxyapatit-Nanopartikel

Physikalisch-chemisch gesehen, besteht der Knochen aus ca. 65% mineralischen (Apatitkristalle) und 25% organischen (hauptsächlich Typ I Kollagen, nicht kollagenöse Proteine sowie Citrat) Bestandteilen sowie 10% Wasser. (Delgado-López, et al., 2014)

In seiner Mikroarchitektur weist Knochenapatit einen niedrigen Kristallinitätsgrad sowie ionische Substituenten in seiner Kristallstruktur (4-6% Carbonat, 0,9% Na, 0,5% Mg etc.), als auch eine plättchenförmige Morphologie, auf. (Liu, et al., 2017)

Sie können jedoch auch nadelförmige oder rundliche Strukturen ausbilden. Studien zufolge besitzen die Apatitmoleküle eine Dicke von 2-7 nm, eine Länge von 15-200 nm und eine Breite von ungefähr 10-80 nm. (Kalia, et al., 2014)

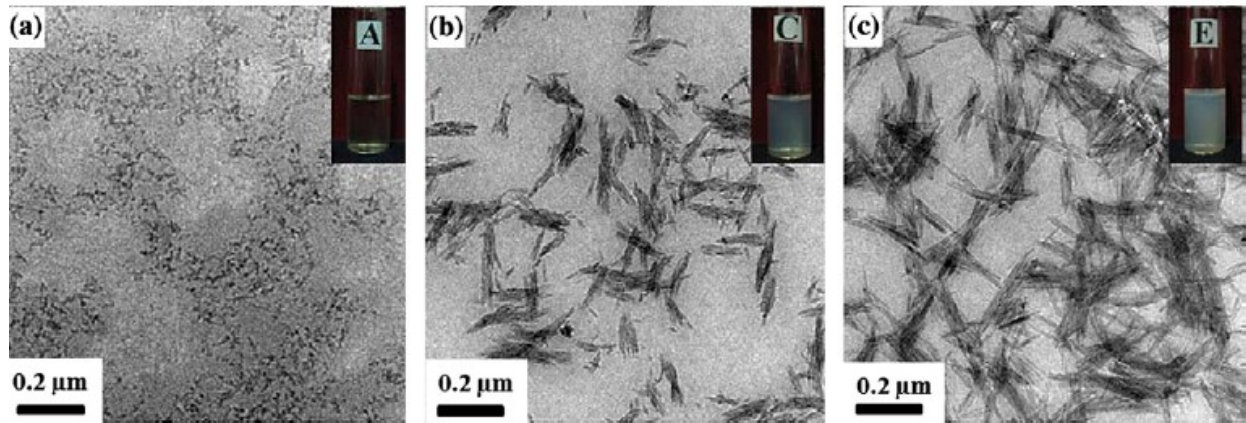


Abbildung 4: TEM Bilder Nanopartikel

Quelle: (Hongjian, et al., 2011)

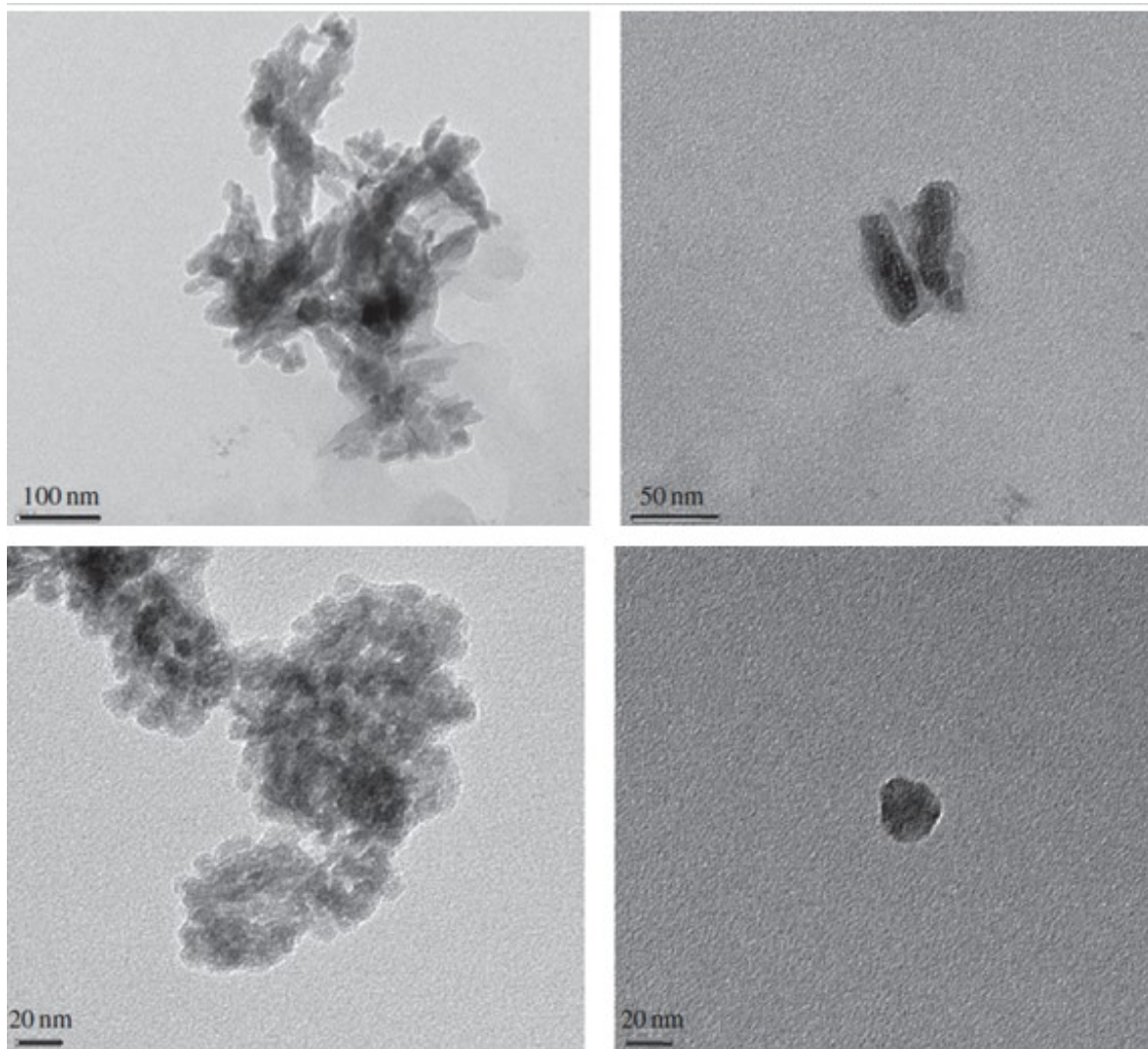


Abbildung 5: Verschiedene Formen Nanopartikel

Oben: reisförmig geformte NP. Unten: rundgeformte NP. (Kalia, et al., 2014)

HANP besitzen ähnliche chemische und kristallographische Strukturen, wie der anorganische Teil des Knochens. In ihrem stöchiometrischen Verhältnis der Calcium-Phosphat-Fraktion weichen sie jedoch ein wenig vom physiologischen Hydroxyapatit $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ ab. Ihr Kristallgitter ist arm an Ca^{2+} sowie OH^- Ionen, was eine Substitution anderer Ionen (Na^+ , Mg^{2+} , K^+ , Sr^{2+} , Zn^{2+} , Carbonat etc.) erlaubt. Auch ihre Oberfläche ist rauer und unregelmäßiger aufgebaut, was auch ihre Tendenz zu einer höheren Proteinbindung während der Mineralisierung sowie eine erhöhte Biokompatibilität und Verringerung von Entzündungsprozessen erklären könnte. Zusammen mit ihrem niedrigeren Kristallinitätsgrad und ihrer kleineren Kristallgröße, sind sie für die höhere Löslichkeit und biomimetischen Eigenschaften verantwortlich. Des Weiteren reifen sie unter feuchten Bedingungen ähnlich wie ihre physiologischen Verwandten. (Delgado-López, et al., 2014)

HANP weisen damit auch eine sehr gute Biokompatibilität auf und lassen sich außerdem in deren Größe sowie Morphologie variieren. (Liu, et al., 2017) Somit sind sie interessante Kandidaten in der Forschung zur Knochenregeneration. Untersuchungen zeigen, dass die NP nicht nur passiv mit Zelloberflächen interagieren, sondern durchaus fähig sind, Zellfunktionen auch zu regulieren. (Liu, et al., 2017)

NP können neben dem natürlichen Vorkommen im Knochen nun auch synthetisch hergestellt werden und spielen aus diesen Gründen eine große Rolle in der Therapie von knochendegenerativen Erkrankungen, wie beispielsweise Osteoporose. (Kalia, et al., 2014)

Um HANP synthetisch herzustellen existieren nun verschiedene Möglichkeiten. Eine davon ist die stöchiometrische Titration einer wässrigen Calcium-Lösung mit Phosphorsäure. Weitere Ansätze sind diverse nasschemische, aber auch mikrowellen-unterstützte oder auf Sol-Gel-basierende Methoden. Ebenso bezüglich der Temperatur lassen sich morphologisch unterschiedliche HANP herstellen: Bei einer erhöhten Temperatur bilden sich oft NP mit höherem Kristallinitätsgrad und nicht gleichmäßig aufgebaute Nanokristalle, was auch ein Nachteil dieses Zugangs ist. Wenn man nun die Temperatur verringert, kann man plättchenförmige und hydratisierte NP erhalten – umhüllt von einer amorphen Schicht. Jedoch zeigt sich, dass die auf diesem Wege synthetisierten NP oftmals metastabil sind. (Delgado-López, et al., 2014)

Außerdem ist der Einfluss des pH-Wertes nicht zu vernachlässigen. So stellte man fest, dass bei einem Anstieg auch die Löslichkeit der HANP abnahm. Auch das Ausfällen von HAN wird durch den pH-Wert oder die Anzahl an freien OH^- Gruppen beeinflusst. Wenn der pH-Wert sinkt, sind die Phosphat-Gruppen protoniert und ein Ausfällen wird schwieriger. Außerdem wird die Oberflächenladung stark durch einen Wechsel des pH-Wertes verändert, weil es zu einer anderen Verteilung von OH^- und H_3O^+ Ionen kommt. (Delgado-López, et al., 2014)

Es konnte zusätzlich dargelegt werden, dass es einen Einfluss organischer Moleküle wie Citrat gibt, welches durch die Umhüllung der HANP ihre Struktur zu kontrollieren und stabilisieren vermag. Für die Herstellung von HANP sind demnach verschiedene Aspekte zu berücksichtigen. Auch wenn es offensichtlich nicht an Möglichkeiten synthetische HANP herzustellen mangelt, bleibt es dennoch eine große technische Herausforderung. (Delgado-López, et al., 2014)

Um den Einfluss von HANP auf primäre OB besser zu verstehen zu können, folgt nun ein kurzer Überblick über die Knochenphysiologie bzw. den Knochenmetabolismus und die daran beteiligten Mechanismen.

1.4. Knochenphysiologie

Knochen sind größtenteils mineralisiertes Gewebe, welches für die Fortbewegung, den Schutz und die Unterstützung verschiedenster Organe zuständig ist. Sie produzieren rote und weiße Blutkörperchen und speichern einen Großteil mineralischer Elemente. Sie erscheinen im Körper in verschiedenen Formen und variieren in ihrer inneren und äußeren Zusammensetzung. Sie sind leichtgewichtig aber doch mechanisch stabil, um den vielfältigen Anforderungen gerecht zu werden. Im Körper von Erwachsenen sind dafür 206 Knochen und im kindlichen Organismus 300 Knochen zuständig. Die Vielfältigkeit in ihrer Struktur beweist eine feine Abstimmung in ihren Funktionen. Knochen sind dadurch äußerst dynamische Gewebe, welche sich ständig im Ab-, Um- bzw. Aufbau befinden. All die verschiedenen Knochentypen haben jedoch eine wesentliche Gemeinsamkeit: In ihrem Fundament bestehen sie aus einer fibrösen Kollagen Typ 1 extrazellulären Matrix, welche mit carbonylierten Apatitnanokristallen mineralisiert ist. (Delgado-López, et al., 2014)

Grundsätzlich gibt es zwei Arten von Knochen während der Gewebebildung: Der primäre Knochen bildet sich schon im Embryonalstadium oder wenn Verletzungen auftreten und neues Knochengewebe synthetisiert werden muss. Dieser besteht hauptsächlich Osteoid (nicht-mineralisierter Teil des Knochens). Später geht diese Knochenform in den sekundären Knochen über, welcher mineralisiert ist und somit fester und weniger elastisch. (Lopes, et al., 2018)

Um die komplizierte Knochenarchitektur genau verstehen zu können, existieren verschiedene Modelle: Eines beschreibt sie als siebenstufigen Aufbau von der Nano- bis zur Makroarchitektur. Die erste Stufe repräsentiert den einfachen molekularen Aufbau, bestehend aus Kollagen Typ 1, carbonylierten Apatitkristallen, Wasser und weiteren nicht kollagenösen Proteinen (non-collagenous proteins, NCP's). (Delgado-López, et al., 2014)

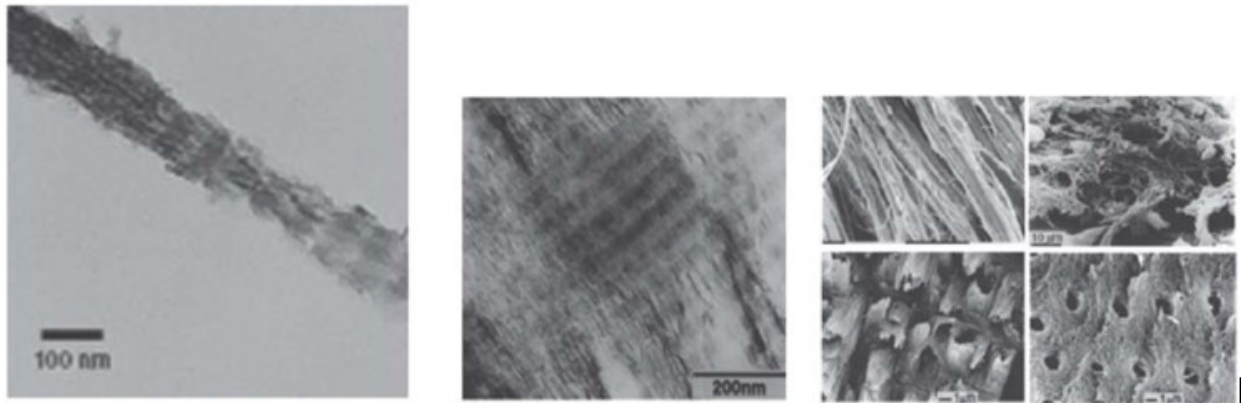


Abbildung 6: Mineralisierte Kollagenmatrix

Quelle: (Delgado-López, et al., 2014)

Es gibt über 200 dieser NCP's, wie Osteonectin, Osteocalcin, Osteopontin, Bone Morphogenetic Protein (BMP), Sialoprotein oder Proteoglycan. Zusammen machen sie aber nur 10% des gesamten Proteingehaltes des Knochens aus. Kollagen Typ 1 als Hauptbestandteil, ist nun zusammengesetzt aus 3 α -Peptiden (zwei α 1-Peptiden und einem α 2-Peptid), welche eine Tripelhelix mit 300 nm Länge und 1,5 nm Durchmesser aufbauen. Sie bestehen wiederum hauptsächlich aus sich wiederholenden Glycin-Prolin-Hydroxyprolin Tripletts. Typ 1 Kollagen ist dadurch unentbehrlich für die mechanische Stärkung sowie für die Integrität des Knochengewebes. Die zweite Stufe wird als mineralisiertes Kollagen beschrieben: Hier werden kleine plättchenförmige Apatitananokristalle in die Kollagenfibrillen eingebaut. Als dritte Stufe wird die Aneinanderreihung genau dieser mineralisierten Kollagenfibrillen beschrieben. Je nach Funktion und Eigenschaften der verschiedenen Knochentypen variieren diese Bündel von Kollagenfibrillen. Hier wird abermals die immense Diversität und Dynamik des Knochenaufbaues erkennbar. In der vierten Stufe werden diese organisierten Kollagenfibrillen in weitere, übergeordnete Strukturen verbaut. (Delgado-López, et al., 2014)

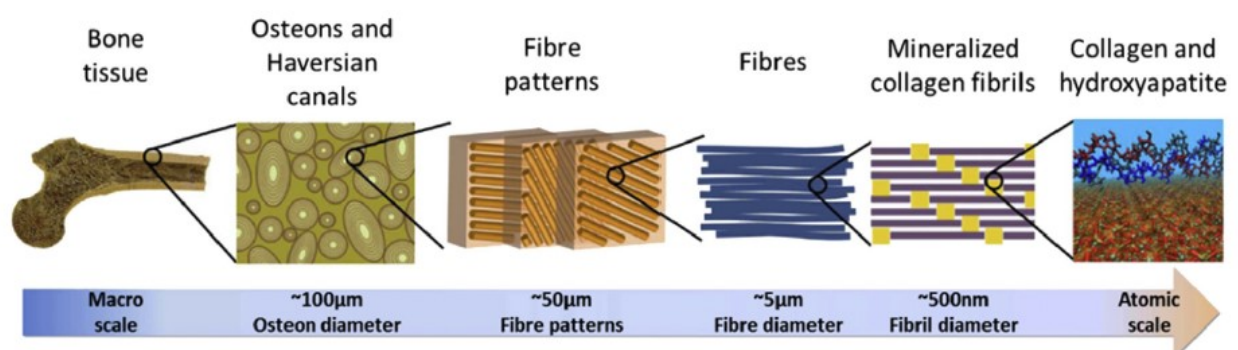


Abbildung 7: Überblick Aufbau Knochen

Quelle: (Wang, et al., 2017)

Es entstehen somit verschiedenste Strukturen, die von parallelen oder gewebten, bis hin zur furnierartigen oder strahlenförmigen Mustern reichen. Die fünfte Stufe ist gekennzeichnet durch zylindrische Strukturen, die man Osteon nennt. (Delgado-López, et al., 2014)

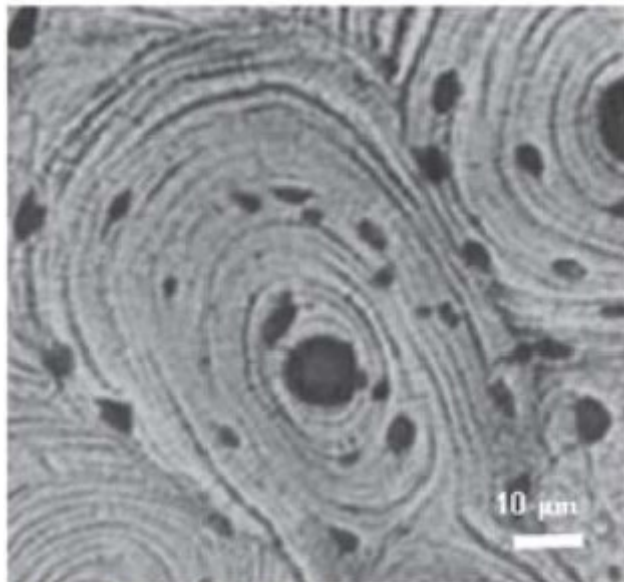


Abbildung 8: Osteon

Quelle: (Delgado-López, et al., 2014)

Die sechste Stufe beschreibt die schwammige (trabekuläre) Struktur sowie die kompakte (kortikale) Struktur des Knochens. Der trabekuläre Teil ist gekennzeichnet von einer extremen Porosität, womit wiederum Platz für Blutgefäße sowie Knochenmark geschaffen wird. In seiner Kompressivität ist er dadurch aber benachteiligt. Der kortikale Teil repräsentiert die dichte und kräftige Außenschicht. Als siebente Stufe wird schlicht der gesamte Knochen bezeichnet. (Delgado-López, et al., 2014)

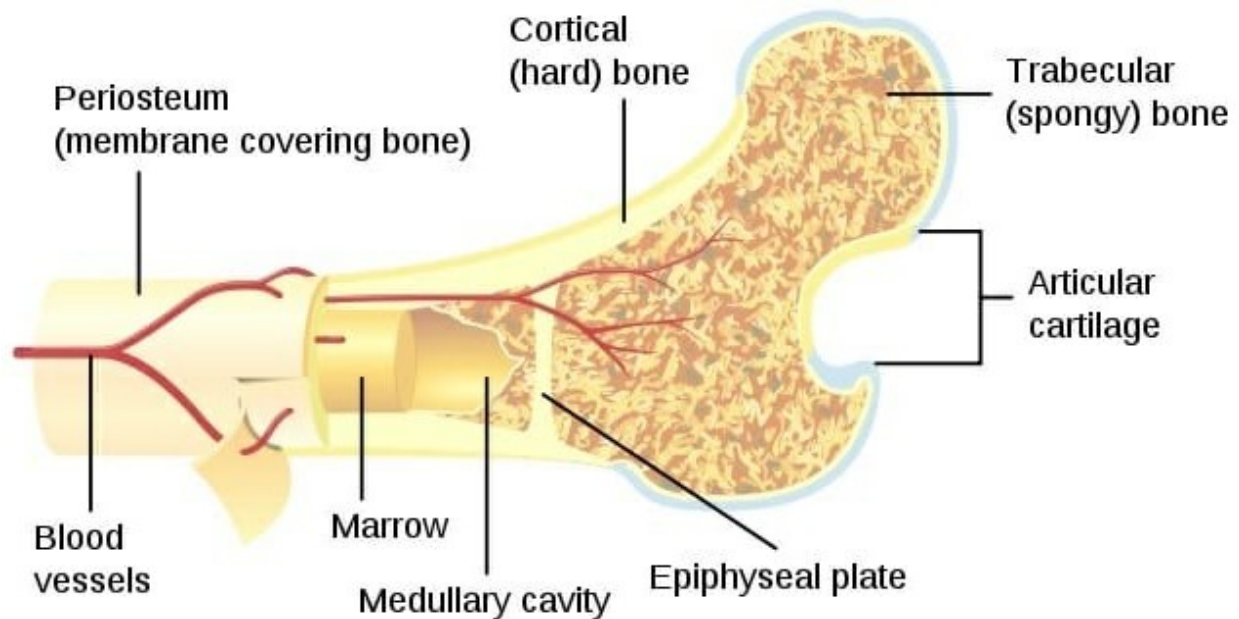


Abbildung 9: Übersicht Knochen

Quelle: (Biologydictionary.net, et al., 2019)

Es wurde bereits erwähnt, dass Knochengewebe äußerst dynamisch ist und Umbaumechanismen unterliegt.

Für den Knochenabbau sind hier spezialisierte Zellen verantwortlich, die Osteoklasten (OK) genannt werden. Diese sind sozusagen für die Abbaumechanismen im Knochen zuständig. OB hingegen sind dafür zuständig das Gewebe wieder aufzufüllen, wie im Weiteren näher ausgeführt wird. (Delgado-López, et al., 2014)

1.4.1. Osteoblasten

OB leiten sich von den MSC (*mesenchymal stem cells*) ab, welche sich aus dem Knochenmark, aber auch aus verschiedensten Geweben, wie Fettgewebe oder Endometrium, isolieren lassen. Sie repräsentieren multipotente fibroblastäre Zellen, die sich selbst erneuern und in verschiedene Zellarten differenzieren können, wie OB, aber auch Myozyten oder Adipozyten. Deren Differenzierung zu osteoanabolen Zellen wird durch verschiedene molekulare Signalwege und Proteine [BMP (bone morphogenetic protein), WNT] aber auch Transkriptionsfaktoren (RUNX2, Osterix) und epigenetische Faktoren (Histonmodifikation) kontrolliert. Ebenso leiten mechanische Reize die MSC's in ihrer Differenzierung in Richtung OB. Die Aufgaben der OB liegen in der Produktion der organischen Bestandteile der extrazellulären Matrix (ECM) und den parakrinen Faktoren, welche wesentlich für die Knochenbildung sind. (Bradley, et al., 2018)

OB überleben normalerweise ca. zwei Wochen bevor sie entweder zu periostalen Zellen oder zu Osteozyten (OZ) werden. OZ sind OB welche in der mineralisierten Knochen-

matrix eingebettet sind. Sie sind vor allem für die Aufnahme von mechanischen Reizen wichtig, welche auf das Skelett von außen wirken. Periostale OB bleiben im nicht-mineralisierten Teil des Knochens (Osteoid), haben nur einen Zellkern und sind basophil. OB sind außerdem durch eine hohe Konzentration an endoplasmatischem Retikulum gekennzeichnet, um den hohen Bedarf an Kollagen Typ 1 zu gewährleisten. (Bradley, et al., 2018)

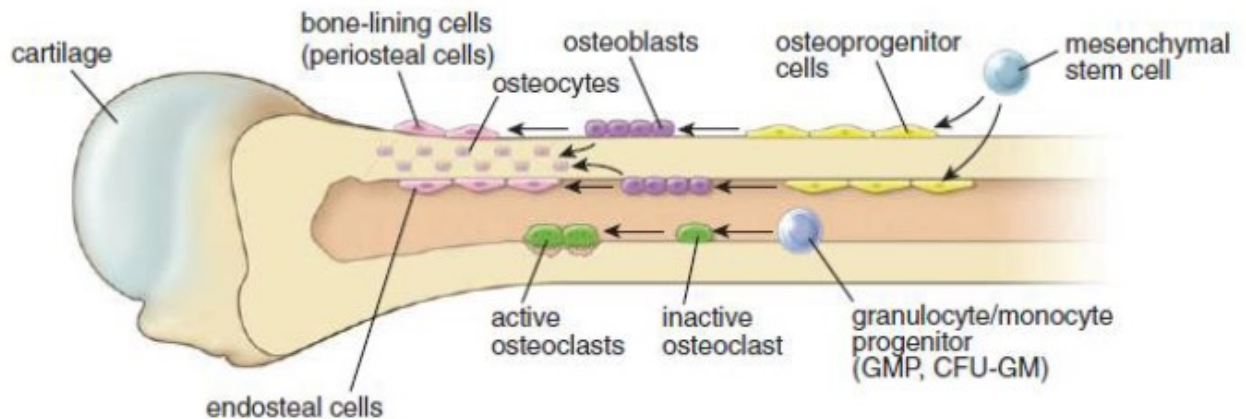


Abbildung 10: Zelltypen Knochenmetabolismus

Quelle: (Mostafa, 2019)

OB produzieren Proteine, die den Zeitpunkt und Grad der Mineralisierung der organischen ECM genau bestimmen. Dazu zählen alkalische Phosphatase (ALP), Osteocalcin, Osteopontin, Osteonectin, Sialoprotein und viele andere Cytokine und Hormone. Der inorganische Teil der ECM besteht hauptsächlich aus Hydroxylapatit, $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$. Die Mineralisierung passiert als aktiver Transport von Matrixvesikeln und der Aktivierung von Phosphatasen. (Bradley, et al., 2018)

Um den Auf- und Abbau des Knochengewebes in einer Balance zu halten, ist eine genaue Abstimmung der biochemischen Kommunikation von OB und OK notwendig. Hierfür zuständig sind vor allem das von den OB sezernierte RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B Ligand) sowie M-CSF-1 (monocyte colony stimulating factor). Sie binden an die jeweiligen Rezeptoren (RANK and CSFR) auf den OK und ermöglichen hiermit deren Differenzierung. Um diese Interaktion zu drosseln wird von den OB Osteoprotegerin (OPG) sezerniert, das RANKL abfängt und somit eine Rezeptorbindung verhindert. Um die Bildung von OB aus deren Vorgängern zu forcieren, können wiederum OK Zytokine wie WNT, BMP sowie TGF- β (transforming growth factor) freisetzen. (Bradley, et al., 2018)

Knochenbildung und Knochenabbau stehen demnach in einem sensiblen Gleichgewicht. Aber auch andere extraskeletale Gewebearten können durch die osteoblastäre Sekretion von Hormonen, wie z.B. Osteocalcin, beeinflusst werden. (Bradley, et al., 2018)

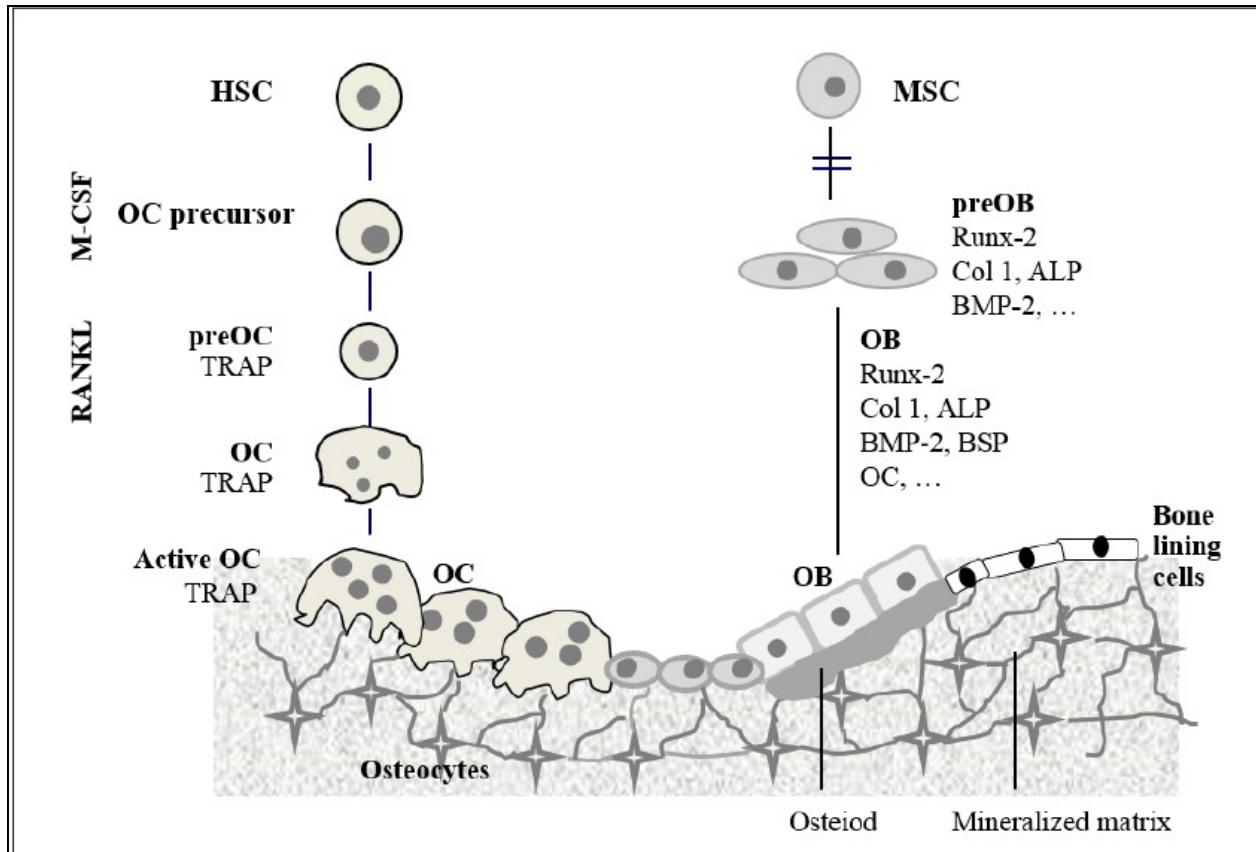


Abbildung 11: Pathways Knochenmetabolismus

Quelle: (Fernandes, et al., 2016)

Die Entwicklung zu knochenaufbauenden Zellen erfolgt in mehreren Reifungsschritten. Von den Präosteoblasten zu OB und schließlich zu OZ. In diesen verschiedenen Stadien sezernieren die Zellen auch spezifische Biomarker. So erreicht z.B. die Sekretion von ALP nach ca. 10 Tagen den Peak. Die Mineralisierung der ECM hingegen tritt erst nach 14-28 Tagen ein. Wie bereits erwähnt, wird die Differenzierung zu reifen OB auch von weniger subtilen Mechanismen beeinflusst. Hierzu zählen vor allem mechanische Reize. Alle Zellen des Körpers reagieren sensibel auf mechanische Signale, wie Druck oder Scherkräfte. Daher ist es nicht überraschend, dass die Knochenmasse beim Ausbleiben solcher Reize abnimmt, wie z.B. bei Immobilisation oder auch in der Raumfahrt durch eine Verringerung der Gravitation. Vermittelt wird die Reizweiterleitung durch Mechano-rezeptoren an der Zelloberfläche. (Bradley, et al., 2018)

Dies löst intrazelluläre Signalkaskaden aus und ermöglicht die Freisetzung von Calcium, was in weiterer Folge die Osteoblastenaktivität steigert. Auch Hormone, wie Östrogen,

haben eine wesentliche Rolle bei der Weiterleitung mechanischer Signale. (Bradley, et al., 2018)

Auf transkriptionaler Ebene wird die Osteoblastendifferenzierung durch Transkriptionsfaktoren wie RUNX2 reguliert. Es verhindert sowohl Knochenbildung als auch Mineralisation, indem es – vermittelt durch die RANKL-Bildung in den OB – die Osteoklastengenesse forciert. Ein zweiter wichtiger Transkriptionsfaktor ist Osterix (Sp7). Er ist RUNX2 nachgeschaltet und stimuliert sowie reguliert mit diversen Cofaktoren die Genexpression für die Osteoblastendifferenzierung. Ein dritter wichtiger Transkriptionsfaktor ist ATF4 (Activating transcription factor 4), der mit RUNX2 einen Komplex bildet und für die Expression osteoanaboler Gene wesentlich ist. Neben diesen Transkriptionsfaktoren gibt es auch noch Steroidrezeptoren wie Vitamin D-Rezeptor, Glucocorticoid-Rezeptor oder Estrogen-Rezeptor (ER- α), die auch Einflüsse auf die Osteoblastendifferenzierung ausüben. Die Transkription und somit auch die Funktion der OB, werden jedoch auch von epigenetischen Mechanismen beeinflusst. Hier spielen vor allem die DNA-Methylierung sowie die Modifikation von Histonmolekülen eine Rolle. Sie steuern so den Zugang von Transkriptionsfaktoren und RNA Polymerase 2 zu DNA. Auch die posttranskriptionale Stabilität der mRNA ist hierbei ein wichtiger Faktor. So führt beispielsweise eine Hypomethylierung der DNA zu einer vermehrten Osteoblastendifferenzierung, während eine Hypermethylierung einen gegenteiligen Effekt hat. Die De- bzw. Acetylierung von Histonmolekülen ist eine weitere Stellschraube epigenetischer Modifikationen. (Bradley, et al., 2018)

1.4.2. Osteoklasten

OK als Gegenspieler der OB sind polykaryotische Zellen, die sich aus Monozyten/Makrophagen der hämatopoetischen Stammzellen entwickeln. (Takayanagi, 2018)

Für die Osteoklastogenese sind zwei Zytokine wichtig: Zum einen RANKL und zum anderen M-CSF. Beide sind sowohl membrangebunden als auch löslich vorhanden. RANKL und M-CSF werden hauptsächlich von OB und OZ gebildet. Um nun knochenresorptiv zu wirken, ist vor allem die Fähigkeit der OK ein Mikromilieu in der Knochenmatrix zu schaffen wichtig. Hierbei wird mithilfe einer Protonenpumpe (H^+ -ATPase) sowie einem Cl^- Kanal ein pH-Wert von 4,5 ermöglicht. In dieser sauren Umgebung wird nun die mineralisierte Matrix abgebaut. Bestandteile der organischen Matrix, hauptsächlich Kollagen Typ 1, wird lysosomal (durch Cathepsin K) abgebaut. Um diese Knochenresorption zu gewährleisten muss eine gewisse Nähe zwischen den OK und der Knochenmatrix bestehen. (Takayanagi, 2018)

Diese wird durch Integrine ermöglicht. Integrine sind $\alpha\beta$ -Heterodimere, die für die Anheftung an die Zellmatrix des Knochens essentiell sind. Das Wichtigste unter ihnen ist $\alpha\beta3$ -Integrin. Wenn zwischen den OK und dem Knochen nun Kontakt herrscht, findet eine Polarisierung der Struktur statt. Vesikeln mit Cathepsin K und anderen MMP (Matrix-Metalloproteasen) werden durch Mikrotubuli und Aktin zum Knochen transportiert. Dort bildet sich eine Art zottige Membran („ruffled membrane“) aus, in welcher in weiterer Folge auch die Ansäuerung und Degradierung des Knochens stattfindet. Zusätzlich bildet sich noch als Kernstruktur der Knochenresorption ein Aktinring aus, der umgeben ist von einer sogenannten „*sealing zone*“. Neben RANKL oder MCS-F existieren außerdem noch weitere Proteine, welche die Osteoklastogenese regulieren. Als RANKL-Inhibitor ist hier vor allem OPG hervorzuheben. Entzündungsauslösende Zytokine hemmen OPG und forcieren als Folge die Osteoklastenaktivität. Das erklärt auch den Knochenverlust bei steigenden Konzentrationen von TNF (Tumor Nekrose Faktor), IL-1 (Interleukin 1) oder PTH (Parathormon). (Takayanagi, 2018)

1.4.3. Osteozyten

Eine weitere Art von Knochenzellen sind OZ. Sie sind über die Knochenmatrix verteilt und verbunden miteinander und ziehen sich mit dendritischen Zellstrukturen zur Knochenoberfläche durch kleine Kanäle – genannt Canaliculi – sowie durch den gesamten Knochen. Sie kommunizieren untereinander via Gap-Junctions und leiten wichtige mechanische Reize weiter. Dadurch partizipieren sie am Knochenmetabolismus. Für die Mineralisation der Knochenmatrix spielen sie eine wichtige Rolle, können aber ebenso an der Knochenresorption beteiligt sein. So setzen OZ beispielsweise bei einer Knochenverletzung und folglich ihrer Apoptose, RANKL frei und initiieren auf diese Weise knochenkatabole Prozesse. Andererseits inhibieren sie den Knochenaufbau, indem sie OB hemmen. (Bonewald, 2013)

Sie entstehen aus OB, die sich entweder zu Knochensaumzellen (*bone lining cells - BLC*) oder eben OZ entwickeln. Defekte OZ sind außerdem an der Entwicklung verschiedener Krankheiten wie Glucocorticoid-induzierten Knochenverlust oder Osteoporose beteiligt. (Bonewald, 2013)

Schlussfolgernd ist der Knochen hauptsächlich eine Kombination aus Typ I Kollagen, welches ein schwammförmiges Netzwerk ausbildet, das von OB produziert wird. Um im Knochen Festigkeit sowie Flexibilität zu gewährleisten, wird Calciumphosphat in dieses Netzwerk integriert. OB repräsentieren somit Zellen des Knochenaufbaus. Das Knochengewebe wird langsam aber kontinuierlich ersetzt bzw. erneuert. Als wichtiger Gegenspieler der OB fungieren hierfür die OK, welche für den Abbau der Knochensubstanz

verantwortlich sind und so eine physiologische Balance gewährleisten. (Sree, et al., 2009)

In einem Jahr werden auf diese Weise normalerweise ca. 8-10% Knochensubstanz im Körper ersetzt. Ab einem Lebensalter von ungefähr 30 Jahren, beginnt allerdings ein natürlicher Abbau des Knochens und somit verschiebt sich das Gleichgewicht zugunsten der OK. (Sree, et al., 2009)

Aber auch der Einfluss verschiedener Hormone darf nicht unterschätzt werden. So hat 1,25-Dihydroxyvitamin D₃, welches durch die Hydroxylierung in Leber und Niere in seiner aktiven Form vorliegt, wenn es in zu hoher Konzentration vorkommt, überwiegend knochenresorptive Wirkung. Studien zeigen hier eine erhöhte Expression von RANKL und eine Verminderung von OPG. Gleichzeitig hemmt 1,25-dihydroxyvitamin D₃ jedoch das PTH (und hemmt dadurch die Osteoklastogenese) und fördert die Aufnahme von Calcium. Der Verlust von Östrogen während der Menopause ist ein weiterer Faktor, der sich auf den Knochenstoffwechsel auswirkt. Durch verminderte Konzentrationen von Östrogen wird die Produktion von knochenresorptiven Zytokinen wie IL-6, TNF und IL-1 gesteigert, was zu einem Verlust an Knochensubstanz führt. Auch eine erhöhte Zufuhr oder endogene Synthese von Glucocorticoiden führt zu einem geringeren Knochenaufbau und gesteigerten Knochenresorption. (Takayanagi, 2018)

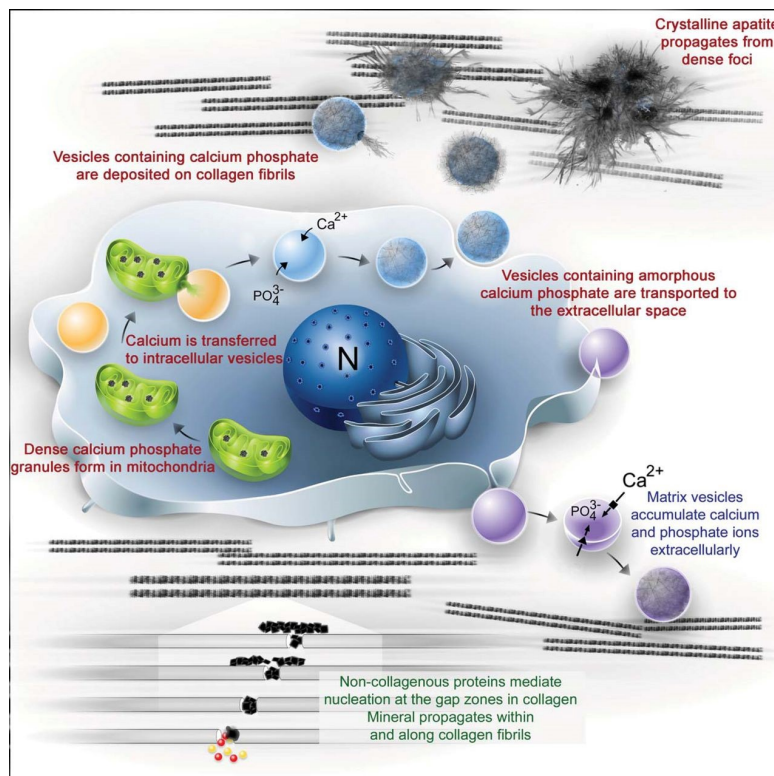


Abbildung 12: Mineralisierung und Calciummobilisierung

Quelle: (Boonrunsimana S., et al., 2012)

1.4.4. Osteoporose

Osteoporose als degenerative Knochenerkrankung ist gekennzeichnet durch eine Abnahme der Knochendichte infolge einer strukturellen Desintegration des Knochenaufbaues. Verantwortlich dafür ist ein Ungleichgewicht zwischen Knochenresorption und Knochenaufbau.

Auch eine genetische Disposition spielt hierbei eine gewisse Rolle. Erleichterte Frakturen, wie Hüft-, Wirbel- oder Handgelenksfrakturen, sind die Folge. Die Fragilität der Knochen bleibt oft unbemerkt, bis ein erster Bruch auftritt. So bleiben die Patienten und Patientinnen bis zum ersten Vorfall oft symptomfrei. Im Vergleich zu Männern sind Frauen häufiger betroffen. (Sree, et al., 2009)

Zusammenfassend kann man zwei Arten von Osteoporose unterscheiden:

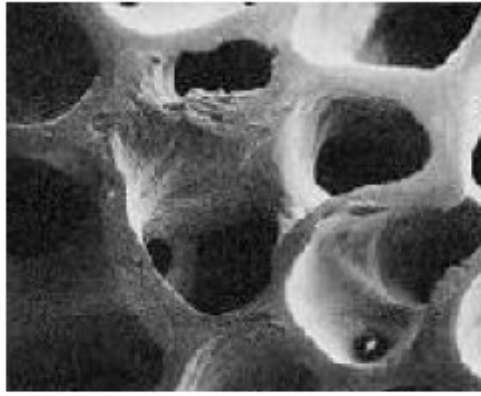
1) Primäre Osteoporose

Darunter versteht man zum einen die senile Osteoporose, aber auch eine idiopathisch juvenile Form. (Sree, et al., 2009)

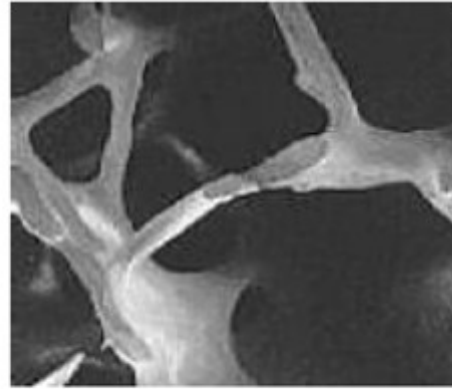
Als Folge des Östrogenabfalls während der Menopause (ab 50 Jahren) sind Frauen oft von einem Calciumdefizit betroffen. Auch ein Vitamin D-Mangel und ein PTH-Abfall trägt zur erhöhten Sensibilität bei (Typ I). Hier können Änderungen des Lebensstils und Supplementierung von Calcium und Vitamin D helfen der Osteoporose vorzubeugen. Die senile Form betrifft jedoch auch Männer ab 70 Jahren (Typ II) und tritt mit einem PTH-Anstieg und Vitamin D-Abfall in Erscheinung. (Sree, et al., 2009)

2) Sekundäre Osteoporose

Ein Ungleichgewicht im Knochenaufbau und Knochenabbau als Konsequenz einer systemischen Erkrankung beschreibt diese zweite Form. Es betrifft Männer gleichermaßen wie Frauen. Die Ursache können Hyperparathyreoidismus, rheumatische Erkrankungen, Alkoholismus, verschiedene Medikamente etc. sein. (Sree, et al., 2009)



Normal Bone



Osteoporotic Bone

Abbildung 13: Vergleich gesunder mit osteoporotischem Knochen

Quelle: (Sree, et al., 2009)

Unter den vielen möglichen therapeutischen Maßnahmen Osteoporose zu lindern, sind die Verwendung von NP eine vielversprechende Option.

Ihre physikalischen sowie chemischen Eigenschaften können dahin verändert werden, um sie z.B. als Vehikel für Arzneistoffe zu verwenden, welche direkt an der defizitären Knochenstruktur ansetzen. (Sree, et al., 2009)

2. Fragestellung der Arbeit

Im Fokus dieser Arbeit steht der Zusammenhang zwischen synthetisch hergestellten HANP und den Auswirkungen dieser auf OB. OB sind hauptsächlich dafür verantwortlich neue extrazelluläre Matrix zu synthetisieren. (Lopes, et al., 2018)

Ziel der Arbeit ist es nun die Effekte verschiedener HANP in unterschiedlichen Konzentrationen auf OB zu untersuchen. Hier wurden als Zellmodell knochenbauende mpOB verwendet (Kapitel 3). Untersucht wurden vorwiegend die Auswirkungen der verschiedenen HANP auf die Zellviabilität bzw. Zellproliferation. Um die osteoanabole Aktivität der Zellen zu beschreiben, wurde deren Fähigkeit untersucht, die extrazelluläre Matrix mit den für den Knochenaufbau spezifischen Proteinen, zu synthetisieren. Außerdem wurden in der vorliegenden Arbeit auch zeitliche Aspekte und Auswirkungen berücksichtigt, indem zwei unterschiedliche experimentelle Ansätze angewendet wurden (Kapitel 3). Die Resultate in Bezug auf die verschiedenen Auswirkungen der HANP auf die mpOP werden dargestellt und diskutiert (Kapitel 4 und 5).

3. Material und Methoden

3.1. Material

Folgende Arbeitsbehelfe wurden für die Experimente verwendet:

Tabelle 1: Material

48 Well Zellkulturplatten	TPP Techno Plastic Products AG, Schweiz
96 Well-Gewebekulturplatte, no bottom, Cellstar	Greiner Bio-One, Österreich
Pasteurpipetten Glas	LLG Labware, Deutschland
Pasteurpipetten Plastik	Greiner Bio-One, Österreich
Pipettenspitzen	VWR International, Österreich Greiner Bio-One, Österreich
Lichtmikroskop H550S	Nikon TMS, Japan
Analysenwaage MC 210 P	Sartorius, Deutschland
Scanner Epson Perfection 1200PHOTO	Epson, Japan
Spektrophotometer Infinite 200 Pro Microplate Reader	Tecan, Schweiz
Sterilwerkbank ET 130 KI.2	Ehret Labor- und Pharmatechnik, Deutschland
Ultraschallbad, Transsonic T570	Elma, AIGNER, Wien, Österreich
Autoklav SX-300E	Tomy Digital Biology, Japan
Mikroskop Kamera, ProgRes Speed XT Core5	Jenoptik, Deutschland
Pipetboy	Integra Biosciences, Deutschland
Schüttler Swip	Edmund Bühler, Deutschland
Vortex Genie 2	Bender & Hobein, Deutschland
Zentrifuge Z323 K	Hermle, Deutschland

3.2. Substanzen

Tabelle 2: Substanzen

α -MEM	Gibco Life Technologies
SigmaFast BCIP/NBT	Sigma-Aldrich
Formaldehydlösung, 37 %	Roth
Tween	Sigma-Aldrich
Ethanol 99,9 %	AustrAlco
Essigsäure, 99,9 %	Sigma Chemical
Extraktionspuffer	Chondrex
Presto Blue Cell Viability Reagent	Invitrogen (Lot. 1632091A)
Sirius Red/Fast Green Färbelösung	Chondrex
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Biochrom
ALP Buffer	Invitrogen
Tween 20	Sigma-Aldrich
Natriumzitat-Dihydrat	Sigma-Aldrich

3.3. Herstellung der Reagenzien

β -Glycerophosphat-Stammlösung (100 x β -GP)

Um 10 ml einer 100 x β -Glycerophosphat-Stammlösung zu erhalten wurden 2,16 g β -Glycerophosphat in 10 ml Milli Q Wasser aufgelöst. Dann wurde durch einen 0,22 μ m Filter sterilfiltriert. Die Stammlösung wurde daraufhin in Vials überführt, beschriftet und im Kühlfach gelagert (-20 °C).

Ascorbinsäure-Stammlösung (100 x Vitamin C)

Um 10 ml einer 100 x Ascorbinsäure-Stammlösung zu erhalten, wurden 50 mg Ascorbinsäure in 10 ml PBS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) aufgelöst. Dann wurde durch einen $0,22\ \mu\text{m}$ Filter sterilfiltriert. Dann wurde die Stammlösung in Vials überführt, beschriftet und im Kühlfach gelagert ($-20\ ^\circ\text{C}$).

BCIP/NBT-Farbreagens

Das BCIP/NBT-Farbreagens musste unter Vermeidung von Lichteinfluss (z.B. mit Alufolie ummantelt) und kurz vor dessen Verwendung hergestellt werden. Dazu wurde eine Tablette (BCIP/NBT SigmaFast™) aus dem Kühlfach geholt und aufgetaut und in einer Eprovette mit 10 ml Milli Q Wasser aufgelöst. Um den Lösungsvorgang zu beschleunigen, wurde die Eprovette vorsichtig gevortext.

3,7% Formaldehydlösung

Um eine 3,7% Formaldehydlösung zu erhalten, wurde eine 37% Formaldehydlösung mit PBS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) 1:10 verdünnt.

Kahle Lösung

Zur Herstellung von 10 ml Kahle Lösung wurden 6 ml destilliertes H_2O mit 2,8 ml Ethanol 96% gemischt. Dann wurden 1 ml Formaldehyd 37% sowie 0,2 ml Essigsäure 99% dazugegeben.

Phosphatgepufferte Salzlösung (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) - PBS (phosphate-buffered saline)

Um 1000 ml einer 10 x PBS-Lösung zu erhalten wurden 2,00 g KH_2PO_4 , 2,00 g KCl, 80,00 g NaCl und 27,07 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ gewogen und in 1000 ml bi-distilliertem H_2O aufgelöst und mit Milli Q Wasser auf 1 x verdünnt. Dann wird durch einen $0,22\ \mu\text{m}$ Filter filtriert und die Lösung im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

3.4. Methoden

Um herauszufinden, inwiefern die HANP Auswirkungen auf die Proliferation der Zellen bzw. die Induktion der Knochensubstanz haben, wurden drei unterschiedliche Methoden gewählt.

Diese Methoden untersuchen verschiedene Eigenschaften der Zellen: Erstens wurde ein Test verwendet, um die Zellproliferation zu beschreiben. Zweitens wurde die Fähigkeit der Zellen sich zu reifen OB zu entwickeln untersucht. Eine weitere Methode untersuchte das Ausmaß der Mineralisation der OB, d.h. die Grundvoraussetzung für das Wachstum neuer Knochensubstanz. Diese Methoden werden im Folgenden zur Nachvollziehbarkeit der Experimente näher erläutert.

3.4.1. ALP Assay

Um die Osteoblastendifferenzierung nachzuweisen, wurde ein Assay verwendet, das mit Hilfe der ALP ein Substrat in einen unlöslichen Farbstoff umsetzt.

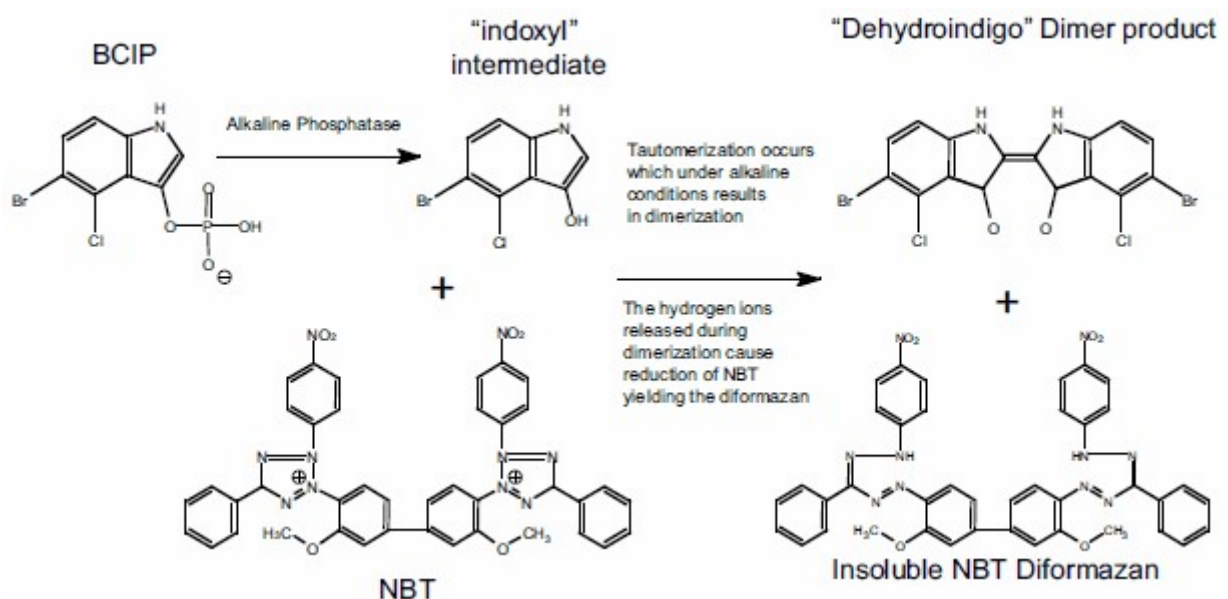


Abbildung 14: Alkalische Phosphatase. Reaktionsmechanismus

Quelle: (Sigma-Aldrich, 2019)

Am Beginn wurde die Färbelösung hergestellt. Hierfür wurde eine Sigma Fast BCIP/NBT Tablette vom Kühlschrank genommen und vorsichtig (ohne sie zu berühren) mit einer Pinzette in eine Eprovette gegeben und mit 10 ml Wasser aufgefüllt. Um den Lichteinfluss zu minimieren, wurde die Eprovette mit einer Alufolie umhüllt. Die Eprovette wur-

de dann für ca. 3 Minuten geschüttelt, um die Tablette aufzulösen. Nach vollständiger Lösung wurde sie an einem dunklen Ort aufbewahrt.

Das Zellmedium wurde vorsichtig abgesaugt und mit 0,25 ml/Well PBS gewaschen. Daran anschließend wurde abgesaugt und mit 0,25 ml/Well einer 3,7 % Formaldehydlösung für 1 Minute lang fixiert. Die Formaldehydlösung wurde entfernt und mit 0,25 ml/Well eines Waschpuffers (0,05% Tween in PBS) gewaschen. Dieser wurde dann wieder entfernt und 0,125 ml/Well der Färbelösung dazugegeben und 10 Minuten zugedeckt inkubiert. Schlussendlich wurde die Färbelösung entfernt und 0,25 ml/Well Waschpuffer zugegeben. Anschließend wurde die Platte eingescannt sowie Fotos unter dem Lichtmikroskop gemacht.

3.4.2. Sirius Red/Fast Green Assay

Um die Synthese von extrazellulären Proteinen durch OB nachzuweisen, wurde eine Färbemethode verwendet. Sowohl kollagenöse wie auch nicht kollagenöse Proteine können damit erfasst und quantifiziert werden. Die Farbstoffkomponente Sirius Red bindet spezifisch an das Glycin von Kollagen I - V, welches sich so rot einfärbt. Die Farbstoffkomponente Fast Green fungiert als Gegenfärbung, bindet die nicht-kollagenösen Proteine und färbt sie grün ein. (Boaks, et al., 2014),(Chondrex, 2019)

Zur Vorbereitung des Waschvorgangs wurde eine PBS/TC Lösung im Wasserbad auf 37°C temperiert. Um den Zelllayer zu fixieren wurde eine Kahle-Lösung verwendet. Die 48 Well Platte wurde aus dem Inkubator genommen und in den LAF gebracht. Das Medium wurde abgesaugt und jedes Well der Zellkultur 3-mal mit 0,250 ml PBS/TC gewaschen. Mit der zuvor hergestellten Kahle-Lösung wurde die 48 Well Platte nun 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Die Fixierlösung wurde daraufhin vorsichtig abpipetiert und zu jedem Well 0,125 ml Färbelösung hinzugefügt und 30 Minuten bei Raumtemperatur gefärbt. Nach der vollständigen Färbung des Zelllayers wurden die Wells solange mit 0,5 ml Milli Q-Wasser vorsichtig gewaschen, bis der Überstand farblos war. Die 48 Well Platte wurde nun eingescannt. Um die Zellen wieder zu entfärben, wurde 0,5 ml einer Extraktionspufferlösung pro Well hinzugefügt und die Platte für 5 Minuten auf den Schüttler gestellt. Danach wurden 0,3 ml jedes Wells des Überstandes in eine 96er Well-Gewebekulturplatte pipettiert und bei 605 nm und 540 nm im Spektrophotometer vermessen. Als Reagenzienleerwert wurde 0,3 ml der Extraktionspufferlösung mitvermessen.

Quantifizierung:

Kollagen ($\mu\text{g}/\text{Well}$) = $[540 \text{ nm Wert} - (\text{Absorption bei } 605 \text{ nm} \times 0.291)] / 0.0378$

Nicht-kollagenöses Protein ($\mu\text{g}/\text{Well}$) = $\text{Absorption bei } 605 \text{ nm} / 0.00204$

3.4.3. Presto Blue Assay

Um die Viabilität der primären OB zu messen, wurde ein Resazurin-basiertes Proliferations-Assay verwendet. Nur lebende Zellen, d.h. metabolisch aktive Zellen können das Reagenz zu Resorufin reduzieren. In Folge dessen, kann man die Viabilität semi-quantitativ mit einem Spektrophotometer bestimmen. (Invitrogen™, 2019) (Douglas, et al., 2014)

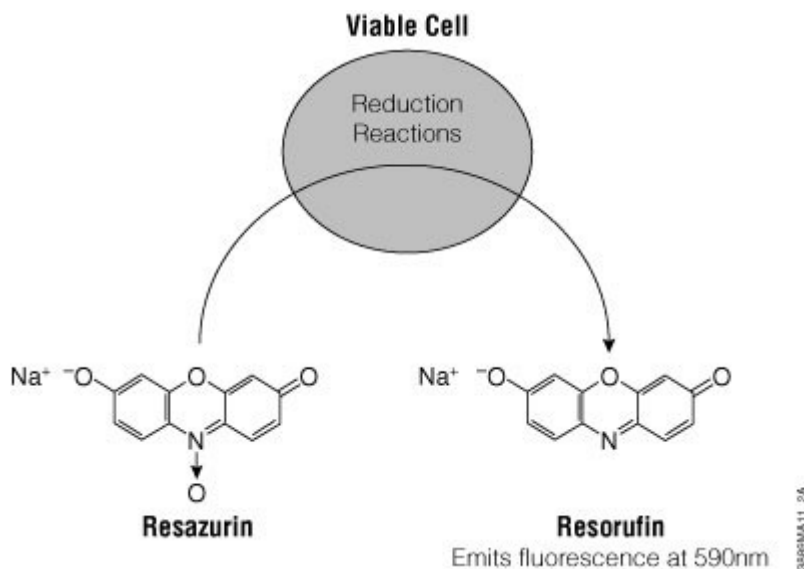


Abbildung 15: Reaktionsmechanismen Presto Blue

Quelle: (Invitrogen™, 2019)

Um die Zellen zu schonen und ein vorzeitiges Ablösens der Zellen zu verhindern, wurde folgenderweise vorgegangen: Nachdem die Wells vorsichtig abgesaugt wurden, wurde 1 Mal mit 0,25 ml vorgewärmtem PBS/TC/Well gewaschen und daraufhin wieder 0,25 ml frisches warmes Medium/Well hinzugefügt. Dann wurde 0,025 ml Presto Blue Reagenz/Well im Laminar Air Flow (LAF) unter Lichtausschluss hinzugefügt. Als Kontrolle wurden jeweils 3 Wells mit Mineralisationsmedium sowie 3 Wells mit normalem Medium verwendet. Anschließend wurde 30 Minuten bei 37 °C inkubiert.

In dieser Zeit wurden wieder frische Nanosuspensionen hergestellt, um für die Zugabe nach der Vermessung bereit zu sein. Nach der Inkubation wurde 0,150 ml des Überstandes/Well in eine 96 Well-Gewebekulturplatte pipettiert, mit Alufolie abgedeckt und zügig

mit einem Spektrophotometer vermessen. Hierbei betrug die Exzitationswellenlänge 560 nm und die Emissionswellenlänge 590 nm.

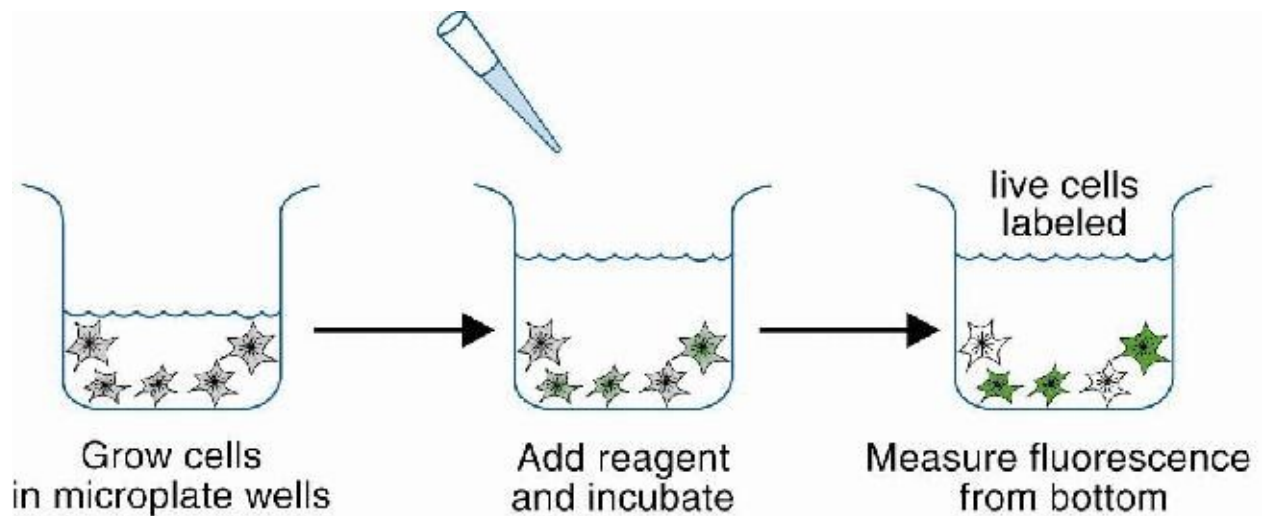


Abbildung 16: Presto Blue Assay

Quelle: (Invitrogen™, 2019)

Wie die genannten Methoden samt Materialien innerhalb der Experimente eingesetzt wurden, erläutert das nachfolgende Design der Experimente.

3.5. Experimentelles Design

Für die zellbiologische Arbeit wurden mpOB verwendet, die schon isoliert und kryokonserviert in flüssigem Stickstoff zur Verfügung standen. Für das Experiment wurden 2 verschiedene Typen von NP getestet: carbonyl-substituierte (10wt%) Hydroxyapatit-Nanopartikel (cHA) sowie unsubstituierte Hydroxyapatit-Nanopartikel (HA). Diese wurden in Epprouvetten mit einem Gehalt von 2% (m/V) zur Verfügung gestellt. Um eine Homogenisierung der Suspension zu gewährleisten, wurden die Epprouvetten für 5 Minuten im Ultraschallbad behandelt. Die Nanosuspension wurde mit 2% Natriumcitrat versetzt, damit eine unerwünschte Aggregation der Partikel vermieden wird.

Zellaussaat

Für eine Gewebekulturplatte mit 48 Wells wurden 2 Millionen kryokonservierte Zellen in einem Zellvial genommen. Da mehrere Reihen von Experimenten durchgeführt wurden, mussten die Menge an Zellen wie folgt angepasst werden:

Zur Verwendung bei den Experimenten kamen 10 Gewebepplatten und pro Gewebepplatte jedoch nur 36 Wells. Folglich ergaben sich 360 Wells und ein Bedarf von 15 Millionen Zellen. Pro Well wurden 0,125 ml Kulturmedium [α -MEM, Serum Gibco (10%), Streptomycin/Penicillin (1%)] vorgelegt und ergaben somit letztlich 45 ml Kulturmedium. Da jedoch für die Aussaat der Zellen weiteres Kulturmedium benötigt wurde, musste die Menge verdoppelt (pro Well insgesamt 0,25 ml Volumen) und somit 90 ml Kulturmedium als Gesamtmenge vorbereitet werden. Um die Zellen für die Aussaat vorzubereiten, wurden 20 ml Kulturmedium in einem Zentrifugenröhrchen vorbereitet und mit den Zellen versetzt. Daraufhin wurde bei 4° Celsius und 1500 U/min für 5 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend mit 10 ml Kulturmedium resuspendiert und noch einmal mit 2,5 ml Kulturmedium nachgespült, um die Zellausbeute zu erhöhen. Die Zellfraktion wurde folglich mit 32,5 ml Kulturmedium auf 45 ml aufgefüllt. Außerdem wurden auf jeweils 0,125 ml des vorgelegten Kulturmedium pro Well 0,125 ml Zellsuspension vorsichtig aufgetragen und anschließend für 2 h bei einer Temperatur von 37° Celsius und 5% CO₂ inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das Treatment mit den NP hergestellt. Die NP wurden den Zellen nach deren Aussaat (Tag 0) in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt (20 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml und 250 µg/ml). Um die jeweiligen Konzentrationen zu erhalten, wurde pro Gruppe eine Verdünnungsreihe hergestellt.

Treatment-Herstellung - Verdünnungsreihe

Es gab 10 Gewebekulturplatten mit jeweils 3 Wells pro Konzentration.

Daher gab es $10 \times 3 \times 0,25 = 7,5$ ml Bedarf an Treatment (es wurden 8 ml angenommen) pro NP-Gruppe (cHA/HA)

Konzentration 20 µg/ml: $50 \times v_1 = 20 \times 8$

$$= 3,2 \text{ ml } 50 \mu\text{g/ml} + 4,8 \text{ ml +MM}$$

Konzentration 50 µg/ml: $100 \times v_1 = 11,5 \times 50$

$$= 5,75 \text{ ml } 100 \mu\text{g/ml} + 5,75 \text{ ml +MM}$$

Konzentration 100 µg/ml: $250 \times v_1 = 100 \times 14$

$$= 5,6 \text{ ml } 250 \mu\text{g/ml} + 8,4 \text{ ml +MM}$$

Konzentration (cHA) 250 µg/ml: $24096 \times v_1 = 250 \times 14$

$$= 0,145 \text{ ml Stocklösung NP (2,40\%)} + 13,855 \text{ ml +MM}$$

Konzentration (HA) 250 µg/ml: $23529 \times v_1 = 250 \times 14$

$$= 0,149 \text{ ml Stocklösung NP (2,35\%)} + 13,851 \text{ ml +MM}$$

Bedarf gesamt: +MM: 125 ml + 1250 µl Vit C (100x)

$$+ 625 \mu\text{l b-GP (100x)}$$

Natriumcitrat: +MM/-MM> jeweils 8 ml

$$V = \frac{250 \times 8}{20000} = 0,1 \text{ ml Stock 2\%} + 7,9 \text{ ml +MM}$$

Um die zeitliche Dimension des Einflusses der NP auf die Osteoblastendifferenzierung zu untersuchen, wurden zwei verschiedene Experimente durchgeführt: Das erste Experiment wurde als „short-term“ (ST) bezeichnet, um die kurzzeitige Exposition der NP zu erfassen und das zweite als „long-term“ (LT), für die längerfristige Exposition.

Im ST-Experiment wurden am Tag 3 die NP entfernt und nur mehr normales Mineralisationsmedium (+MM/CI) zugesetzt. Im LT-Experiment wurden stattdessen die NP über den gesamten Untersuchungszeitraum (14 Tage) beibehalten.

Überblick der beiden Experimente

ST-Experiment



Abbildung 17: Überblick Experiment ST

Treatment bezeichnet die Nanopartikelsuspensionen in den verschiedenen Konzentrationen (20 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml und 250 µg/ml).

LT-Experiment



Abbildung 18: Überblick Experiment LT

Treatment bezeichnet die Nanopartikelsuspensionen in den verschiedenen Konzentrationen (20 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml und 250 µg/ml).

Das Medium sowie die NP wurden alle 3 Tage gewechselt. Im LAF wurden sie auf kleinere Epruvetten portioniert, mit einem Wattepropfen verschlossen und bei 121°C für 15

Minuten autoklaviert. Um die richtige Konzentration der Nanosuspensionen zu erhalten, mussten die durch die Autoklavierung verdampften Volumina korrigiert werden.

Volumenkorrektur

Tabelle 3: Pipettiervolumina

Nr.	cHA	HA
1	1000 µl	1000 µl
2	1000 µl	1000 µl
3	1000 µl	1000 µl
4	500 µl	1000 µl

Konzentrationskorrektur

20000 µg V (Pipettivolumen in µl)

xV (Volumen gemessen in µl)

$$x = \frac{20000 \mu\text{g} \times V \text{ (Pipettivolumen in } \mu\text{l)}}{V \text{ (Volumen gemessen in } \mu\text{l)}}$$

Tabelle 4: Konzentrationskorrektur

	cHA(Volumen)	HA(Volumen)	cHA(µg bzw. %)	HA(µg bzw. %)
1	770µl	840µl	25974,02 (2,59)	23809,52 (2,38)
2	830µl	850µl	24096,38 (2,40)	23529,41(2,35)
3	790µl	850µl	25316,45 (2,53)	23529,41 (2,35)
4	350µl	855µl	28571,42 (2,85)	23391,81 (2,33)

Konzentrationen der Nanosuspensionen:

Lösung 1 (250µg/ml)

Lösung 2 (100µg/ml)

Lösung 3 (50µg/ml)

Lösung 4 (20µg/ml)

Mischung der Nanosuspension (Lösung 1): $c_1 \times v_1 = c_2 \times v_2$

c1..... korrigierte Konzentration (in μg) (je nach verwendetem Vial unterschiedlich)
v1..... gesucht
c2..... Lösung 1 (in μg)
v2..... Zielvolumen (in μl)

Als Kontrollgruppe diente ein Mineralisationsmedium (+MM/CI), welches aus α -MEM, Serum Gibco (10%), Streptomycin/Penicillin (1%), β -Glycerophosphat (β -GP) sowie Vitamin C und Natriumcitrat 2% bestand. Pro Gruppe und Konzentration wurden jeweils 3 Wells auf einer 48 Well Platte verwendet. Um eine homogene Verteilung der Nanosuspension zu gewährleisten, wurde die Epruvette vor jeder Zugabe für 1 Minute geschüttelt. Die Zellviabilität wurde an den Tagen 1, 7 und 14 gemessen.

Um die Osteoblastendifferenzierung zu erfassen, wurde am Tag 7 zusätzlich ein ALP-Assay gemacht. Die extrazelluläre Proteinsynthese der OB wurde sowohl am Tag 7, als auch Tag 14 mit Hilfe eines Sirius Red/Fast Green-Assays untersucht und gemessen.

3.6. Statistische Auswertung

Die Auswertung der in den Experimenten ermittelten Daten, wurden mithilfe des Softwareprogrammes Prism (Graph Pad) statistisch ausgewertet. Von den durchgeführten Experimenten wurde jenes zur näheren Auswertung herangezogen, welches inhaltsreiche und detaillierte Ergebnisse lieferte. Die Grundgesamtheit war pro Experiment $n=3$. Die Werte einer Gruppe wurden als Mittelwert $\pm$ Stichprobenfehler des Mittelwerts dargestellt. Mithilfe des „One-Way ANOVA-Test“ sowie des „Post-hoc-Tukey-Tests“ konnten signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (Varianzen) ausgerechnet werden. Die statistisch signifikanten Unterschiede wurden folgendermaßen bezeichnet:

Tabelle 5: Statistische Signifikanzen

p-Wert	Bezeichnung in der Grafik der Resultate
$\leq 0,05$ signifikant	*
$\leq 0,01$ sehr signifikant	**
$\leq 0,001$ hoch signifikant	***

Die Resultate dieser statistischen Auswertung werden im Folgenden inklusiver ihrer Signifikanzwerte dargestellt.

4. Resultate

4.1. Zellviabilität

Um die Zellproliferation bzw. Zellviabilität zu messen, wurde ein Presto Blue Assay zu bestimmten Zeitpunkten durchgeführt.

4.1.1. ST-Experiment – Tag 1

Am Tag 1 gab es im ST-Experiment in allen Konzentrationen der NP (250 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml sowie 20 µg/ml) durch die cHA als auch HA keine signifikanten Unterschiede gegenüber der Kontrollgruppe (Control).

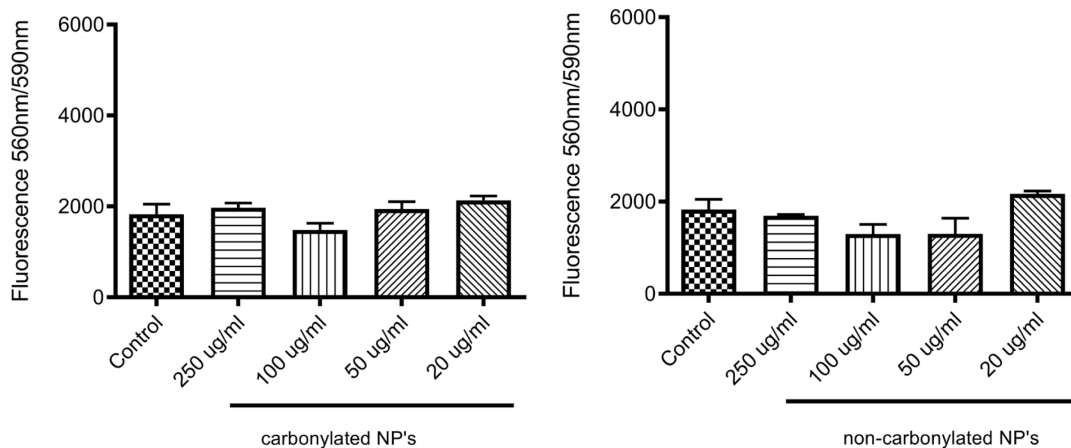


Abbildung 19: Einfluss der NP auf die Zellproliferation im ST-Experiment Tag 1

Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (Control) wurden mit * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$) gekennzeichnet.

4.1.2. LT-Experiment – Tag 1

Am Tag 1 gab es im LT-Experiment durch die cHA hoch signifikante ($p \leq 0,001$) Unterschiede in den Konzentrationen 250 µg/ml, 100 µg/ml und 50 µg/ml gegenüber der Kontrollgruppe (Control). Sehr signifikante ($p \leq 0,01$) Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe (Control) wurden in der Konzentration 20 µg/ml beobachtet.

Durch die HA konnten sehr signifikante Unterschiede ($p \leq 0,01$) in den Konzentrationen 250 µg/ml und 100 µg/ml gegenüber der Kontrollgruppe (Control) festgestellt werden. Hoch signifikante Unterschiede ($p \leq 0,001$) gegenüber der Kontrollgruppe (Control) wa-

ren in der Konzentration 50 µg/ml bemerkbar. Als signifikant ($p \leq 0,05$) stellte sich der Unterschied zur Kontrollgruppe (Control) in der Konzentration 20 µg/ml heraus.

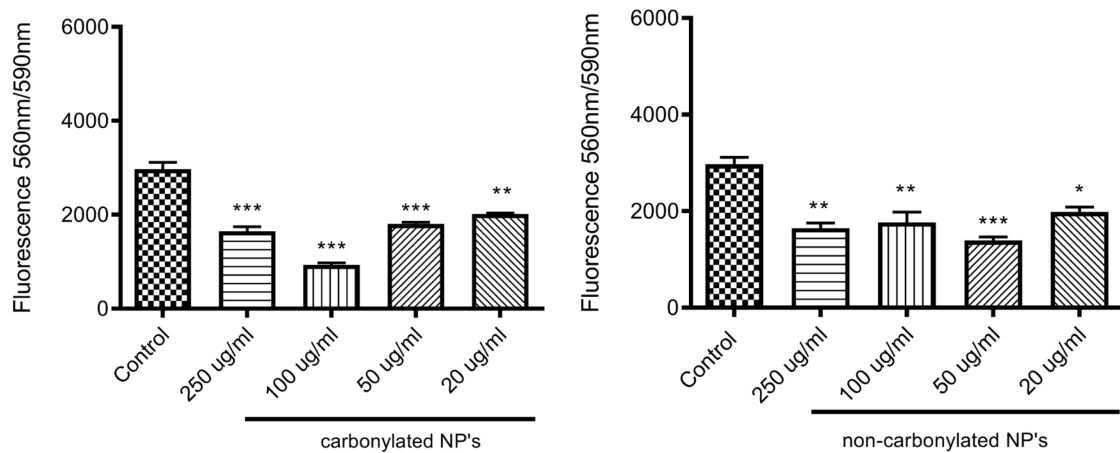


Abbildung 20: Einfluss der NP auf die Zellproliferation im LT-Experiment Tag 1

Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (Control) wurden mit * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$) gekennzeichnet.

4.1.3. ST-Experiment – Tag 7

Am Tag 7 gab es im ST-Experiment in allen Konzentrationen der NP (250 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml sowie 20 µg/ml) durch die cHA als auch HA keine signifikanten Unterschiede gegenüber der Kontrollgruppe (Control).

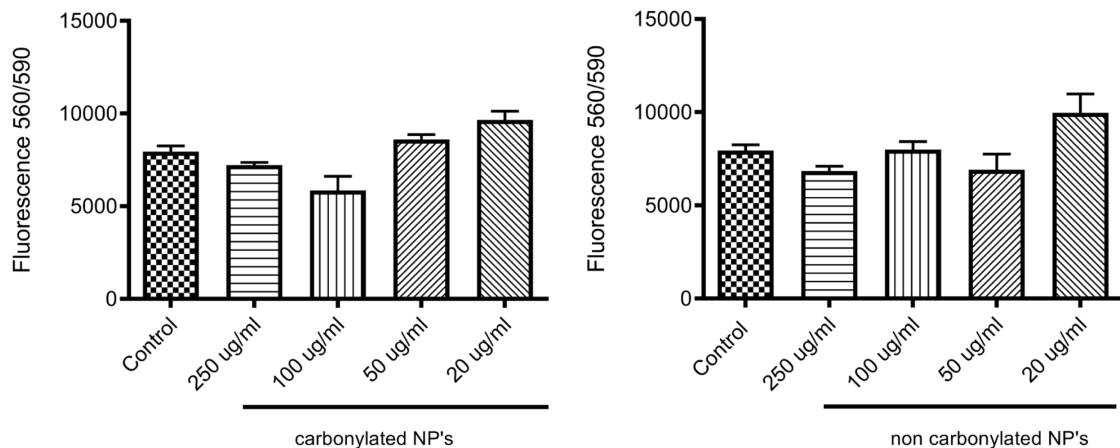


Abbildung 21: Einfluss der NP auf die Zellproliferation im ST-Experiment Tag 7

Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (Control) wurden mit * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$) gekennzeichnet.

4.1.4. LT-Experiment – Tag 7

Am Tag 7 gab es im LT-Experiment durch die cHA signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) zur Kontrollgruppe (Control) in der Konzentration 250 $\mu\text{g/ml}$. In den Konzentrationen 100 $\mu\text{g/ml}$ und 20 $\mu\text{g/ml}$ wurden hoch signifikante Unterschiede ($p \leq 0,001$) gegenüber der Kontrollgruppe (Control) bemerkt. Sehr signifikante Unterschiede ($p \leq 0,01$) konnten in der Konzentration 50 $\mu\text{g/ml}$ gegenüber der Kontrollgruppe (Control) festgestellt werden. Durch die HA wurden in den Konzentrationen 250 $\mu\text{g/ml}$ und 100 $\mu\text{g/ml}$ signifikante ($p \leq 0,05$), bei der Konzentration 50 $\mu\text{g/ml}$ hoch signifikante ($p \leq 0,001$) und bei der Konzentration 20 $\mu\text{g/ml}$ sehr signifikante ($p \leq 0,01$) Unterschiede gegenüber der Kontrollgruppe (Control) festgestellt.

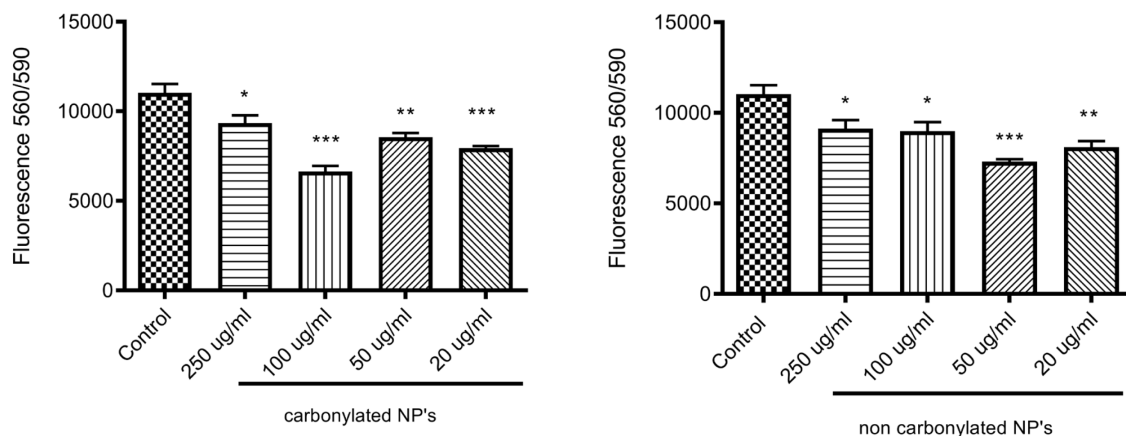


Abbildung 22: Einfluss der NP auf die Zellproliferation im LT-Experiment Tag 7

Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (Control) wurden mit * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$) gekennzeichnet.

4.1.5. ST-Experiment – Tag 14

Am Tag 7 gab es im ST-Experiment in allen Konzentrationen der NP (250 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ sowie 20 $\mu\text{g/ml}$) durch die cHA als auch HA keine signifikanten Unterschiede gegenüber der Kontrollgruppe (Control).

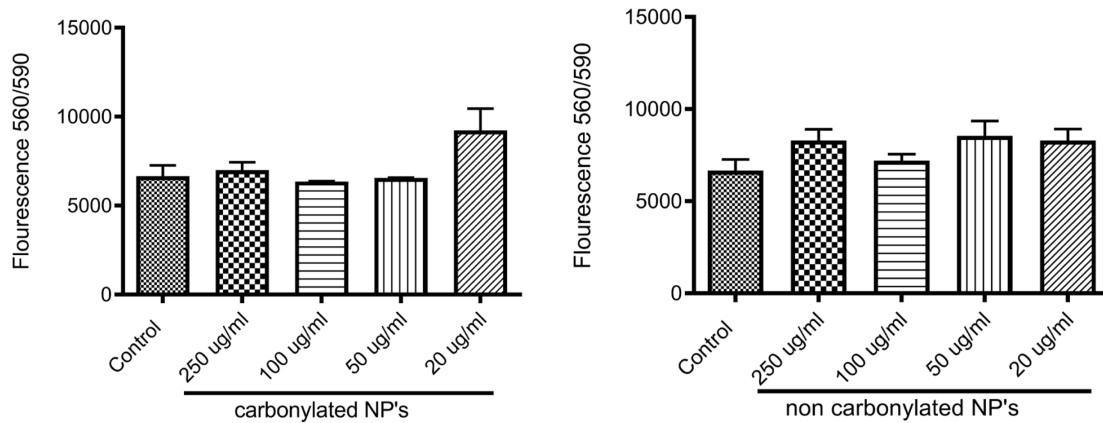


Abbildung 23: Einfluss der NP auf die Zellproliferation im ST-Experiment Tag 14

Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (Control) wurden mit * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$) gekennzeichnet.

4.1.6. LT-Experiment – Tag 14

Am Tag 14 gab es im LT-Experiment durch die cHA signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) zur Kontrollgruppe (Control) in der Konzentration 20 $\mu\text{g/ml}$.

Durch die HA gab es in allen Konzentrationen keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe (Control)

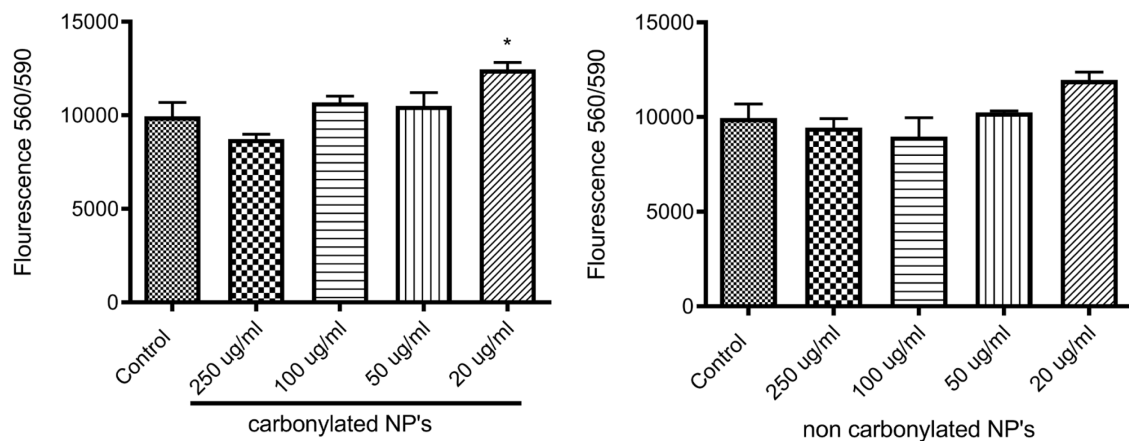


Abbildung 24: Einfluss der NP auf die Zellproliferation im LT-Experiment Tag 14

Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (Control) wurden mit * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$) gekennzeichnet

4.2. Alkalische Phosphatase (ALP)

Um die Osteoblastendifferenzierung beurteilen zu können, wurde ein ALP-Assay am Tag 7 des Experimentes durchgeführt. Aufgrund der Intensität der Färbung konnte auf die ALP-Aktivität geschlossen werden.

4.2.1. ST-Experiment – Tag 7

Im ST-Experiment zeigte sich aufgrund der Intensität der Färbung in allen Konzentrationen nur eine geringe Aktivitätssteigerung der ALP. Am ehesten war eine geringe Steigerung der Aktivität in den höchsten Konzentrationen (250 µg/ml) durch die cHA als auch HA gegenüber der Kontrolle (+MM/CI) bemerkbar.

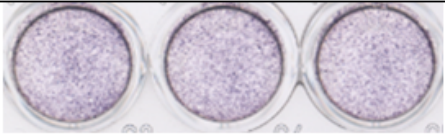
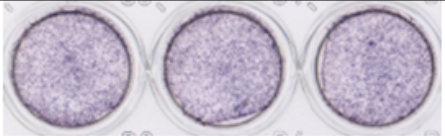
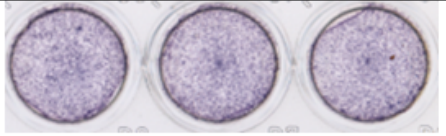
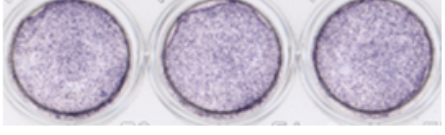
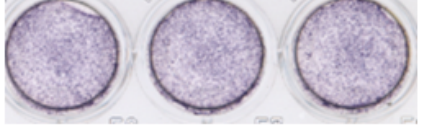
+MM-CI			
cHA 250			HA 250
cHA 100			HA 100
cHA 50			HA 50
cHA 20			HA 20

Abbildung 25: Einfluss der NP des ST-Experimentes auf die ALP-Aktivität der OB

+MM (normales Mineralisationsmedium). CI (Citrat). cHA (carbonylierte Hydroxyapatitnanopartikel). HA (nicht-carbonylierte Hydroxyapatitnanopartikel).

4.2.2. LT-Experiment – Tag 7

Im LT-Experiment wurde eine Aktivitätsminderung der ALP aufgrund einer weniger intensiven Färbung gegenüber der Kontrolle (+MM/CI) in allen Konzentrationen (250 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml und 20 µg/ml) durch die cHA als auch HA festgestellt.

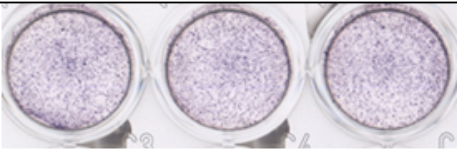
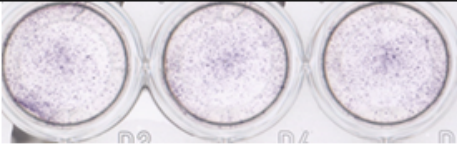
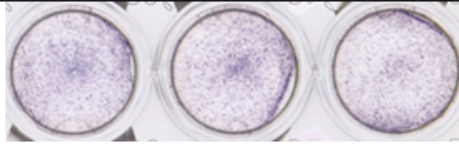
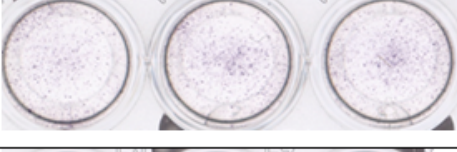
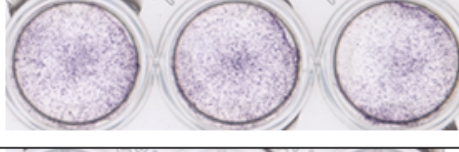
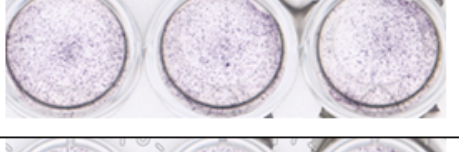
+MM-CI			
cHA 250			HA 250
cHA 100			HA 100
cHA 50			HA 50
cHA 20			HA 20

Abbildung 26: Einfluss der NP des LT-Experimentes auf die ALP-Aktivität der OB

+MM (normales Mineralisationsmedium). CI (Citrat). cHA (carbonylierte Hydroxyapatitnanopartikel). HA (nicht-carbonylierte Hydroxyapatitnanopartikel).

4.3. Sirius Red/Fast Green Assay

Um die Synthese kollagenöser und nicht kollagenöser Proteine in der ECM der OB nachweisen zu können, wurden am Tag 7 und am Tag 14 in den ST- und LT-Experimenten ein Sirius Red/Fast Green Assay durchgeführt. Kollagenöse Proteine zeigen eine rosa Färbung, nicht-kollagenöse Proteine zeigen eine grünliche Färbung. Neben der Färbung der Gewebekulturplatte wurde auch eine quantitativ-spektrophotometrische Auswertung gemacht.

4.3.1. ST-Experiment Tag 7

Im ST-Experiment wurden am Tag 7 geringere Intensitäten der rosa Färbung gegenüber der Kontrolle (+MM/CI) in allen Konzentrationen (250 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml und 20 µg/ml) und durch die cHA als auch HA festgestellt.

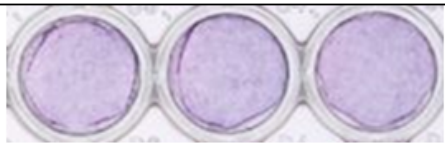
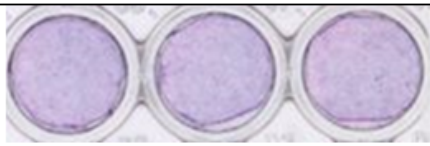
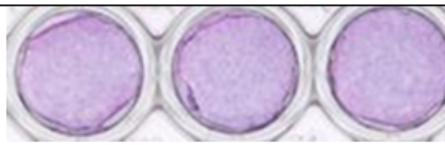
+MM-CI			
cHA 250			HA 250
cHA 100			HA 100
cHA 50			HA 50
cHA 20			HA 20

Abbildung 27: Einfluss der NP auf die Kollagensynthese und nicht-kollagenösen Proteinen der OB im ST-Experiment Tag 7

+MM (normales Mineralisationsmedium). CI (Citrat). cHA (carbonylierte Hydroxyapatitnanopartikel). HA (nicht-carbonylierte Hydroxyapatitnanopartikel).

Spektrophotometrische Auswertung – Kollagenöse Proteine

Am Tag 7 wurden im ST-Experiment durch die cHA in der Konzentration 250 µg/ml sehr signifikante Unterschiede und in der Konzentration 100 µg/ml signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (Control) festgestellt. Bei den HA wurden in den Konzentrationen 250 µg/ml hochsignifikante ($p \leq 0,001$), in 100 µg/ml signifikante ($p \leq 0,05$) und in 50 µg/ml sehr signifikante ($p \leq 0,01$) Unterschiede bemerkt.

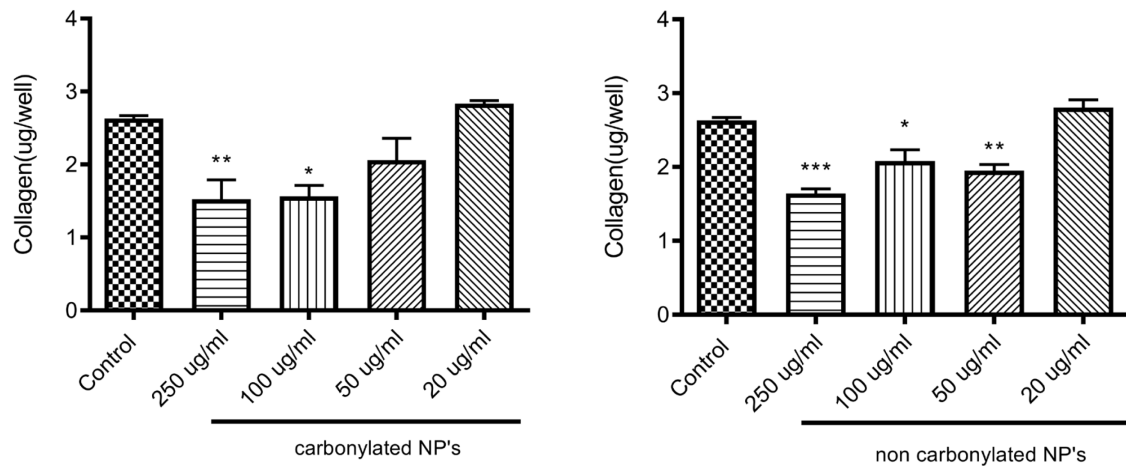


Abbildung 28: Einfluss der NP auf die Kollagensynthese der OB im ST-Experiment Tag 7

Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (Control) wurden mit * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$) gekennzeichnet.

Spektrophotometrische Auswertung – nicht-kollagenöse Proteine

Am Tag 7 wurden im ST-Experiment durch die cHA in allen Konzentrationen (250 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ und 20 $\mu\text{g/ml}$) keine signifikanten Unterschiede gegenüber der Kontrollgruppe (Control) festgestellt. Durch die HA wurde in der Konzentration 250 $\mu\text{g/ml}$ ein sehr signifikanter ($p \leq 0,01$) und in der 50 $\mu\text{g/ml}$ ein signifikanter ($p \leq 0,05$) Unterschied zur Kontrollgruppe (Control) bemerkt.

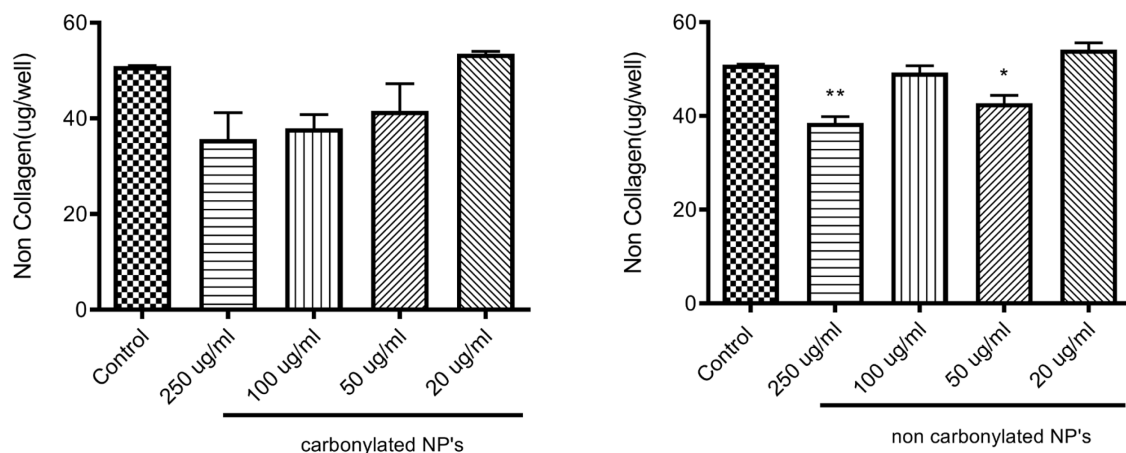


Abbildung 29: Einfluss der NP auf die Synthese nicht-kollagenöser Proteine der OB im ST-Experiment Tag 7

Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (Control) wurden mit * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$) gekennzeichnet.

4.3.2. LT-Experiment Tag 7

Im LT-Experiment wurden am Tag 7 geringere Intensitäten der rosa Färbung gegenüber der Kontrolle (+MM/CI) in allen Konzentrationen (250 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml und 20 µg/ml) durch die cHA als auch HA festgestellt.

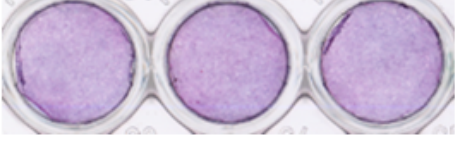
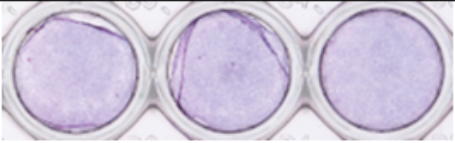
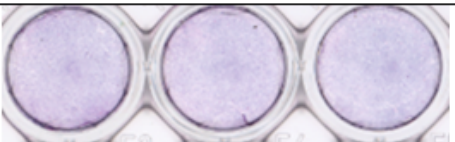
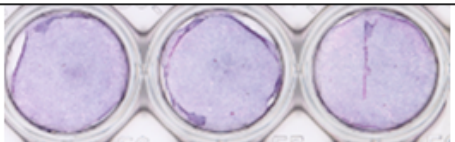
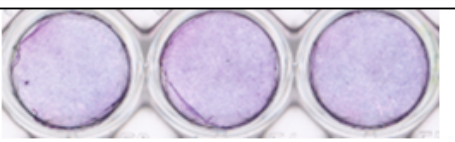
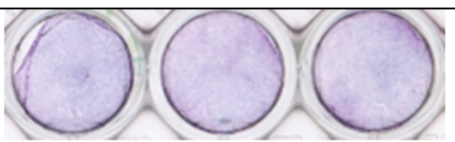
+MM-CI			
cHA 250			HA 250
cHA 100			HA 100
cHA 50			HA 50
cHA 20			HA 20

Abbildung 30: Einfluss der NP auf die Synthese von Kollagen und nicht-kollagenöser Proteine der OB im LT-Experiment Tag 7

+MM (normales Mineralisationsmedium). CI (Citrat). cHA (carbonylierte Hydroxyapatitnanopartikel). HA (nicht-carbonylierte Hydroxyapatitnanopartikel).

Spektrophotometrische Auswertung – Kollagenöse Proteine (collagen)

Am Tag 7 wurden im LT-Experiment durch die cHA in allen Konzentrationen (250 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml, 20 µg/ml) gegenüber der Kontrollgruppe (Control) keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Durch die HA wurden in den Konzentrationen 250 µg/ml, 100 µg/ml sowie 50 µg/ml signifikante ($p \leq 0,05$) Unterschiede zur Kontrollgruppe (Control) festgestellt.

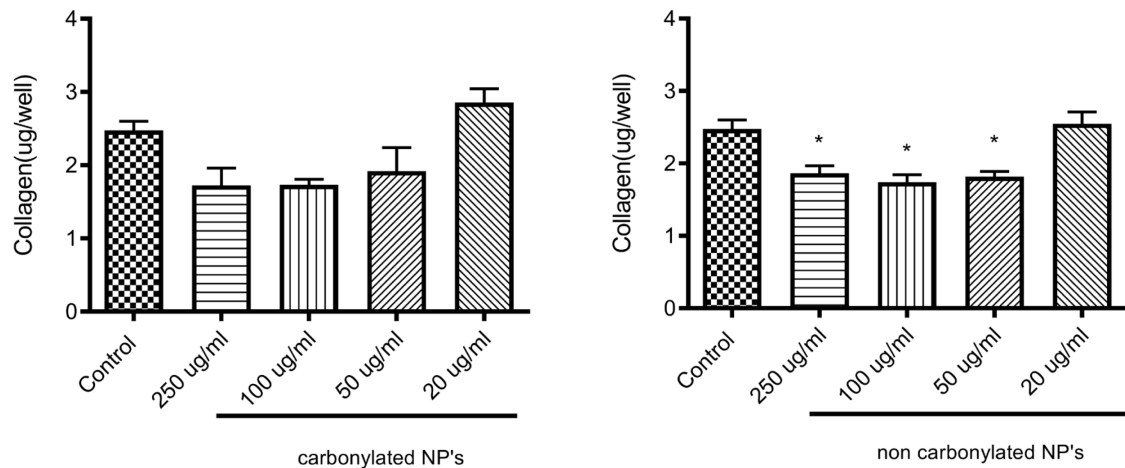


Abbildung 31: Einfluss NP auf die Synthese von Kollagen der OB im LT-Experiment Tag 7

Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (Control+MM/CI) wurden mit * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$) gekennzeichnet.

Spektrophotometrische Auswertung – nicht-kollagenöse Proteine (non collagen)

Am Tag 7 wurden im LT-Experiment sowohl durch die cHA als auch HA in allen Konzentrationen (250 μ g/ml, 100 μ g/ml, 50 μ g/ml und 20 μ g/ml) keine signifikanten Unterschiede gegenüber der Kontrollgruppe (Control) festgestellt.

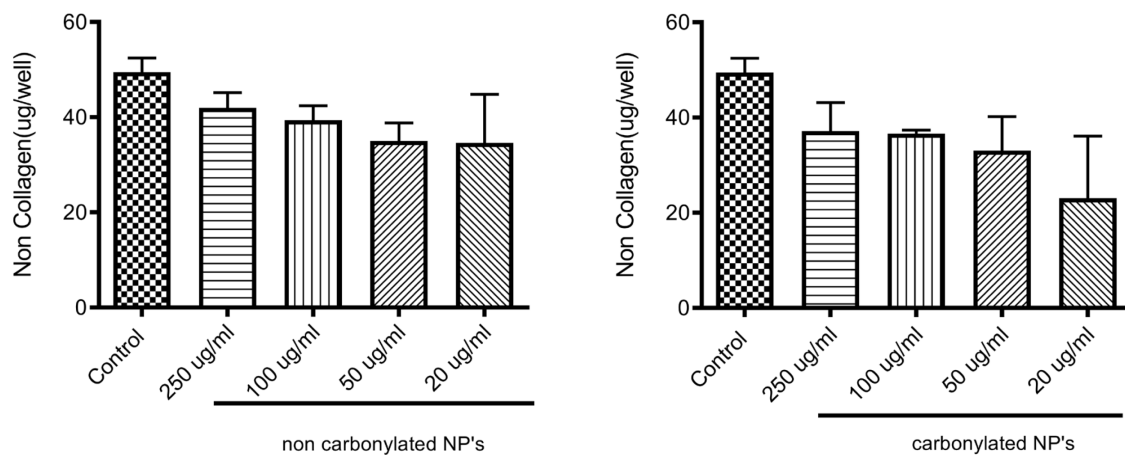


Abbildung 32: Einfluss der NP auf die Synthese von nicht-kollagenösen Proteinen der OB im LT-Experiment Tag 7

Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (Control) wurden mit * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$) gekennzeichnet.

4.3.3. ST-Experiment – Tag 14

Im ST-Experiment wurden am Tag 14 geringere Intensität der Rosafärbung in allen Konzentrationen (250 μ g/ml, 100 μ g/ml, 50 μ g/ml und 20 μ g/ml) durch die cHA als auch HA

gegenüber der Kontrollgruppe (Control+MM/CI) bemerkt. Durch die cHA war eine intensivere Grünfärbung in den Konzentrationen 50 µg/ml sowie 20 µg/ml feststellbar, worauf man auf eine vermehrte Synthese von nicht-kollagenösen Proteinen gegenüber der Kontrollgruppe (Control +MM/CI) schließen könnte. Auch durch die HA war eine intensivere Grünfärbung über alle Konzentrationen (250 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml und 20 µg/ml) hinweg erkennbar. Durch die cHA als auch HA war die Grünfärbung in der geringsten Konzentration (20 µg/ml) am intensivsten zu erkennen.

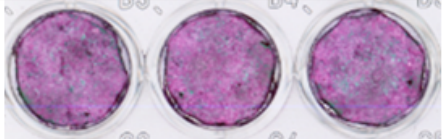
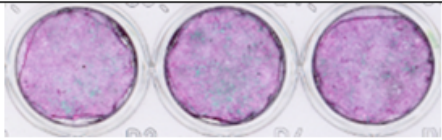
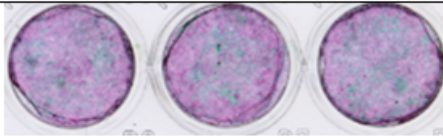
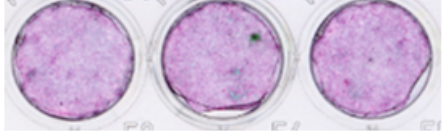
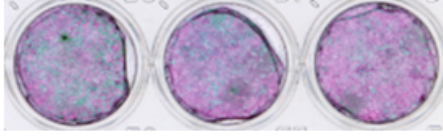
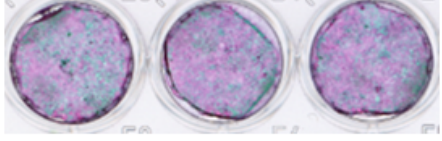
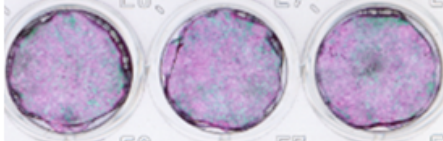
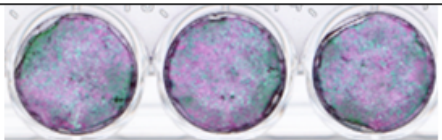
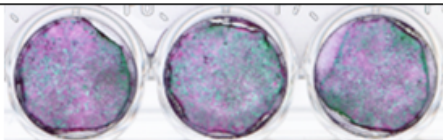
Control +MM-CI			
cHA 250			HA 250
cHA 100			HA 100
cHA 50			HA 50
cHA 20			HA 20

Abbildung 33: Einfluss NP auf die Synthese von Kollagen und nicht-kollagenösen Proteinen der OB im ST-Experiment Tag 14

+MM (normales Mineralisationsmedium). CI (Citrat). cHA (carbonylierte Hydroxyapatitnanopartikel). HA (nicht-carbonylierte Hydroxyapatitnanopartikel).

Spektrophotometrische Auswertung – Kollagenöse Proteine

Am Tag 14 wurden im ST-Experiment durch die cHA in den Konzentrationen 250 µg/ml und 100 µg/ml signifikante ($p \leq 0,05$) Unterschiede gegenüber der Kontrollgruppe (Control) festgestellt. Durch die HA wurden bei allen Konzentrationen (250 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml und 20 µg/ml) keine signifikanten Unterschiede zu Kontrollgruppe (Control) bemerkt.

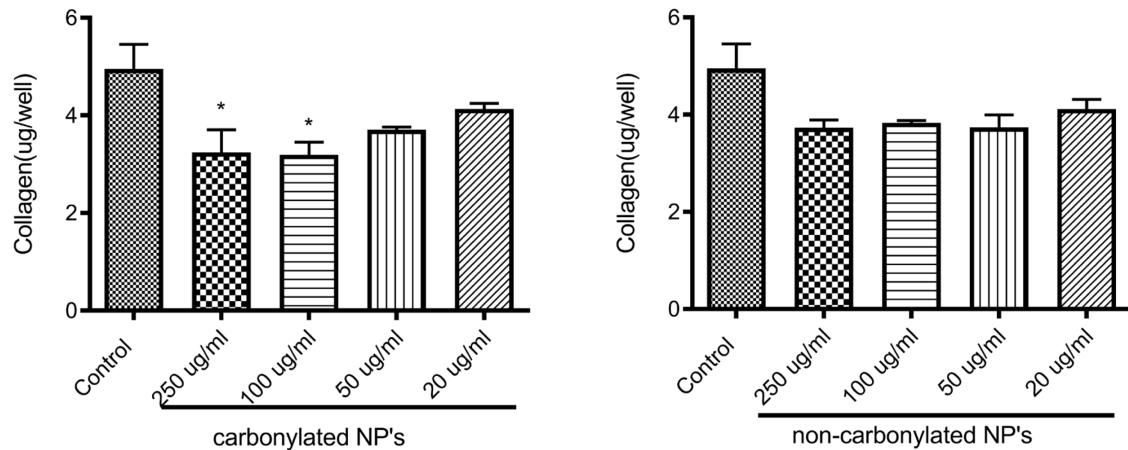


Abbildung 34: Einfluss der NP auf die Synthese von Kollagen der OB im ST-Experiment Tag 14

Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (Control) wurden mit * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$) gekennzeichnet.

Spektrophotometrische Auswertung – nicht-kollagenöse Proteine

Am Tag 14 wurde im ST-Experiment durch die cHA in den Konzentrationen 250 µg/ml und 100 µg/ml signifikante ($p \leq 0,05$) Unterschiede gegenüber der Kontrollgruppe (Control) festgestellt. Durch die HA wurden bei allen Konzentrationen (250 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml und 20 µg/ml) keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe (Control) bemerkt.

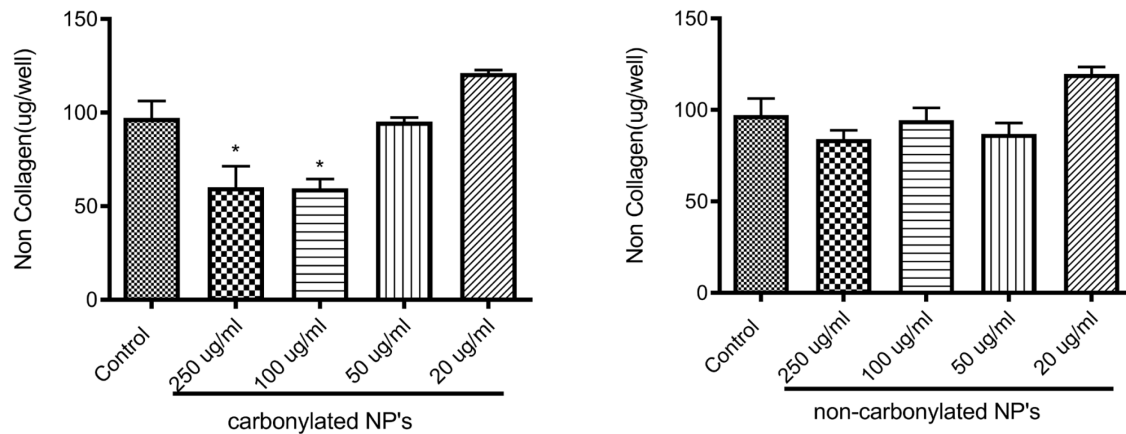


Abbildung 35: Einfluss der NP auf die Synthese von nicht-kollagenösen Proteinen der OB im ST-Experiment Tag 14

Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (Control) wurden mit * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$) gekennzeichnet.

4.3.4. LT-Experiment Tag 14

Im LT-Experiment wurden am Tag 14 geringere Intensitäten der rosa Färbung gegenüber der Kontrolle (+MM/CI) in allen Konzentrationen (250 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ und 20 $\mu\text{g/ml}$) und durch die cHA als auch HA festgestellt.

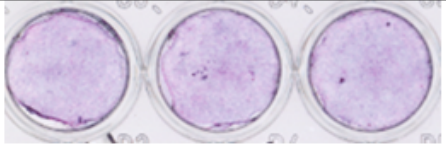
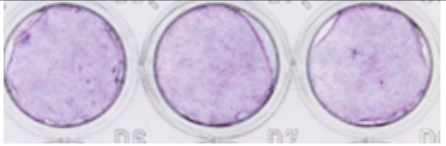
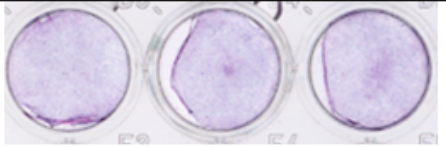
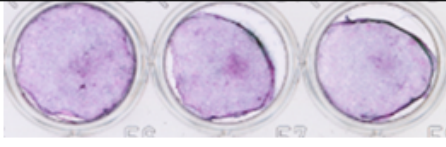
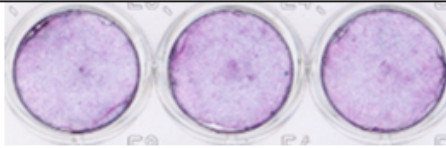
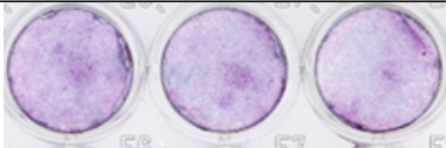
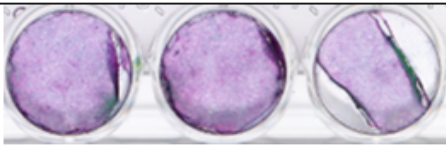
Control +MM-CI			
cHA 250			HA 250
cHA 100			HA 100
cHA 50			HA 50
cHA 20			HA 20

Abbildung 36: Einfluss der NP auf die Synthese von Kollagen und nicht-kollagenösen Proteinen der OB im LT-Experiment Tag 14

+MM (normales Mineralisationsmedium). CI (Citrat). cHA (carbonylierte Hydroxyapatitnanopartikel). HA (nicht-carbonylierte Hydroxyapatitnanopartikel).

Spektrophotometrische Auswertung – Kollagenöse Proteine

Am Tag 14 des LT-Experimentes wurde durch die cHA in der Konzentration 250 µg/ml ein sehr signifikanter ($p \leq 0,01$), in der 100 µg/ml ein hoch signifikanter ($p \leq 0,001$) und in der 50 µg/ml ein signifikanter ($p \leq 0,05$) Unterschied gegenüber der Kontrollgruppe (Control) festgestellt.

Durch die HA wurden in der Konzentration 250 µg/ml ein sehr signifikanter ($p \leq 0,01$), in 100 µg/ml sowie in 50 µg/ml ein signifikanter ($p \leq 0,05$) Unterschied zur Kontrollgruppe (Control) bemerkt.

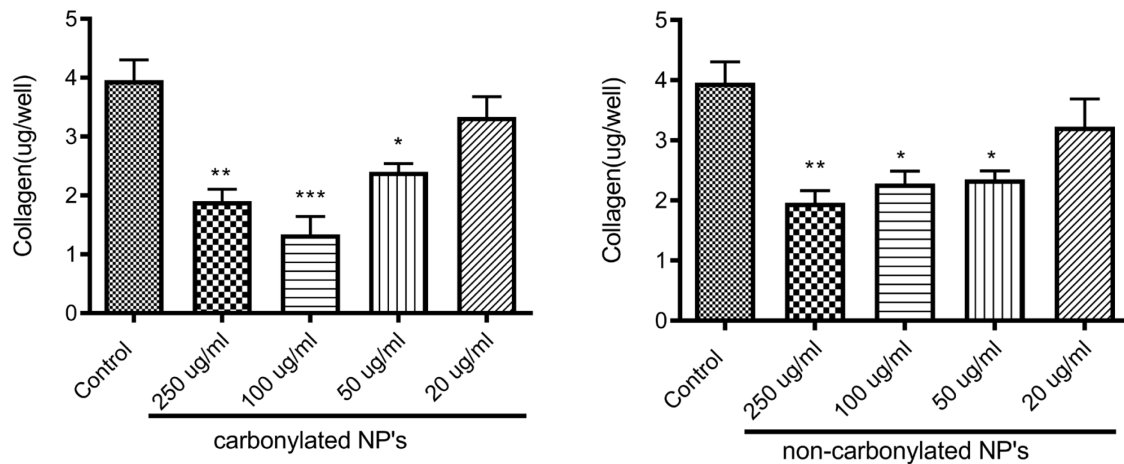


Abbildung 37: Einfluss der NP auf die Synthese von Kollagen der OB im LT-Experiment Tag 14

Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (Control) wurden mit * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$) gekennzeichnet.

Spektrophotometrische Auswertung – nicht-kollagenöse Proteine

Am Tag 14 des LT-Experimentes wurde durch die cHA in den Konzentrationen 250 $\mu\text{g/ml}$ und 100 $\mu\text{g/ml}$ ein hoch signifikanter ($p \leq 0,001$) und in der 50 $\mu\text{g/ml}$ ein sehr signifikanter ($p \leq 0,01$) Unterschied gegenüber der Kontrollgruppe (Control) festgestellt. Durch die HA gab es in den Konzentrationen 250 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ sowie 50 $\mu\text{g/ml}$ sehr signifikante ($p \leq 0,01$) Unterschiede zur Kontrollgruppe (Control).

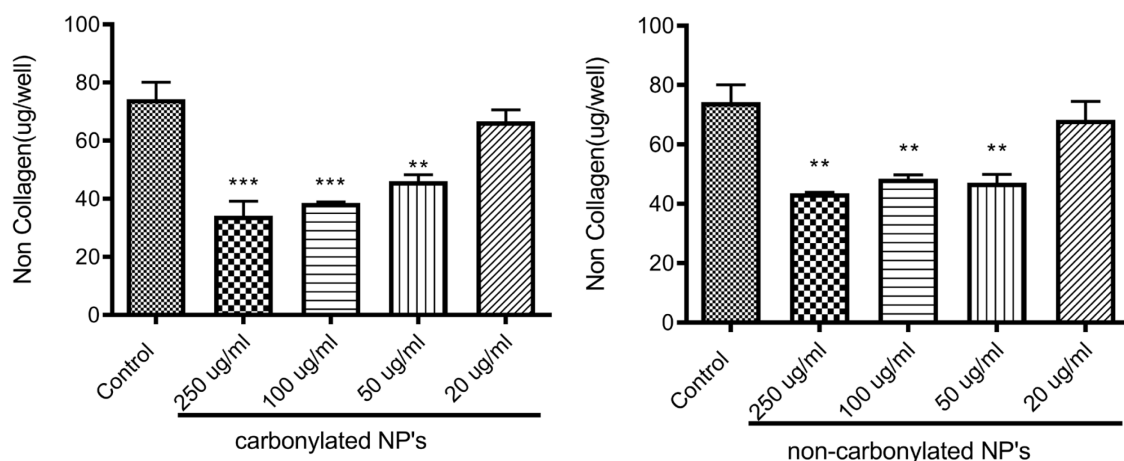


Abbildung 38: Einfluss der NP auf die Synthese von nicht-kollagenösen Proteinen der OB im LT-Experiment Tag 14

Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (Control) wurden mit * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$) gekennzeichnet.

5. Diskussion

Zur Beantwortung der Fragestellung, wie sich verschiedene synthetisch hergestellte und in unterschiedlichen Konzentrationen verabreichte HAN auf mpOB über einen zeitlichen Verlauf auswirken, wurde folgendes experimentelle Design ausgewählt: Um einen initialen Effekt der HAN zu untersuchen wurde eine Kurzzeitexposition gewählt, für die längeren Auswirkungen der HAN wurde eine Langzeitexposition durchgeführt.

Hinsichtlich der Zellviabilität, konnte in dem ST-Experiment am Tag 1, sowohl durch die cHA als auch HA und allen Konzentrationen, kein gesteigertes Wachstum gegenüber der Kontrollgruppe festgestellt werden. Im LT-Experiment am Tag 1 konnte eine Reduzierung des Wachstums in allen Konzentrationen im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden. Die Hemmung der Proliferation war jedoch in der Konzentration 20 µg/ml am geringsten.

Am Tag 7 konnte im ST-Experiment keine signifikante Steigerung des Wachstums der Zellen, sowohl unter Einfluss der cHA als auch HA, gegenüber der Kontrollgruppe beobachtet werden. Wobei eine Tendenz erkennbar war, dass die Zellen mit der geringsten Konzentration (20 µg/ml) am wenigsten von der Wachstumshemmung betroffen waren. Im LT-Experiment konnte am Tag 7 eine Wachstumshemmung durch die cHA, als auch HA beobachtet werden. Die Verminderung der Proliferation fiel in den Konzentrationen (100 µg/ml, 50 µg/ml, 20 µg/ml) stärker aus.

In der Studie von Zhao et al. wird eine ähnliche Hemmung des Wachstums in den verwendeten Konzentrationen beschrieben. Jedoch wurden in dieser Studie primäre OB aus Ratten isoliert und verwendet, was die Vergleichbarkeit limitiert. (Zhao, et al., 2017)

Am Tag 14 konnten im ST-Experiment keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe beobachtet werden. Jedoch ist erwähnenswert, dass eine tendenziell geringere Wachstumshemmung in der Konzentration 20 µg/ml durch die cHA gegenüber der Kontrolle zu beobachten war. Auch im LT-Experiment gab es am Tag 14 keine Unterschiede im Wachstum bezogen auf die Kontrollgruppe. Allenfalls in der geringsten Konzentration (20 µg/ml) fiel durch die cHA als auch HA tendenziell ein leichter Anstieg der Proliferation auf.

Die tendenziell leichter ansteigende Proliferation in der geringeren Konzentration (20 µg/ml) konnte auch in der Studie von Zhao et al. festgestellt werden. (Zhao, et al., 2017) Es konnte also ein Hemmeffekt auf die Proliferation der mpOB beobachtet werden, welcher in der Gruppe, die einer Dauerexposition der NP ausgesetzt war, höher ausfiel.

Um die Differenzierung, der mpOB zu reifen OB, beurteilen zu können und damit auch deren Fähigkeit osteoanabol zu wirken, wurde in beiden Experimenten (ST und LT) ein ALP-Assay am Tag 7 durchgeführt. Die ALP ist somit ein wichtiger Indikator für den knochenbauenden Prozess. (Blair, et al., 2017)

Im ST-Experiment konnte man eine geringe Steigerung der ALP in der Konzentration 250 µg/ml durch die cHA und HA gegenüber der Kontrollgruppe erkennen. Eine weniger intensive Färbung gegenüber der Kontrollgruppe konnte im LT-Experiment beobachten werden. Durch die cHA fiel die Intensitätsminderung im Vergleich zu den HA stärker aus. Durch die cHA konnte man auch konzentrationsabhängige Unterschiede in der Verminderung der Färbung, welche am stärksten bei 250 µg/ml und 100 µg/ml ausgeprägt war, feststellen. Was die zeitliche Exposition betrifft, kann auch hier angenommen werden, dass eine kontinuierliche Behandlung der Zellen (LT-Experiment) mit den NP im Vergleich zu einer kurzzeitigen Behandlung (ST-Experiment) die Aktivität der ALP vermindert.

Auch dieser Effekt wurde in der Studie von Zhao et al. bemerkt. Eine überwiegende Hemmung der ALP wurde auch hier festgestellt. Zum Unterschied der hier vorliegenden Arbeit, wurde jedoch die Genexpression der ALP untersucht und nicht die ALP-Aktivität gemessen. (Zhao, et al., 2017)

Nicht nur der zeitliche Aspekt scheint berücksichtigt werden zu müssen. Die ALP-Aktivität war – wenn auch nicht stark erhöht – im ST-Experiment direkt proportional zur Konzentration, und dies nicht nur durch die cHA, sondern auch durch die HA. Somit kann davon ausgegangen werden, dass eine kurzzeitige Behandlung der OB mit den NP die ALP-Aktivität geringfügig erhöhen kann.

Durch die Sezernierung von Kollagen Typ 1 und weiteren, die ECM organisierenden Proteinen, wird ein wichtiger Schritt für den Mineralisierungsvorgang eingeleitet. (Blair, et al., 2017)

Um diese Synthese der für die Mineralisierung des Knochengewebes wesentlichen, extrazellulären Matrix durch die Osteoblasten nachweisen zu können, wurde ein Sirius-Red/Fast Green Assay am Tag 7 und 14 durchgeführt. Damit konnte die Kollagensynthese und auch die Anwesenheit nicht-kollagenöser Proteine der ECM nachgewiesen werden.

Im ST-Experiment konnte man am Tag 7 makroskopisch, mithilfe der Zellfärbung, eine leichte Verminderung in der Intensität gegenüber der Kontrollgruppe feststellen. Dies betraf alle Gruppen von cHA und HA gleichermaßen. Die quantitative Auswertung der Kollagenmenge im ST-Experiment lässt auf eine Reduktion von Kollagen am Tag 7 schließen.

Die Synthese von Kollagen war hierbei in den höheren Konzentrationen durch die cHA und HA (250 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml) stärker inhibiert.

Was die Synthese von nicht-kollagenösen Proteinen betrifft, gab es zwischen den cHA und HA kaum Unterschiede zur Kontrollgruppe.

Nur durch die HA gab es eine geringe Verminderung in der höchsten Konzentration (250 µg/ml). Auch im LT-Experiment, konnte durch die cHA und HA makroskopisch am Tag 7 eine Verminderung in allen Konzentrationen (250 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml, 20 µg/ml) beobachtet werden. In der spektrophotometrischen Auswertung der Kollagensynthese konnte eine Reduktion durch cHA als auch HA gegenüber der Kontrollgruppe festgestellt werden. Die Minderung der Kollagensynthese fiel dabei in der Konzentration (20 µg/ml) am geringsten aus.

Was die Menge an nicht-kollagenösen Proteinen betrifft, konnte nur eine leichte Tendenz verminderter Synthese proportional zu geringeren Konzentrationen, festgestellt werden.

Im ST-Experiment am Tag 14 konnten nicht-kollagenöse Proteine an ihrer Grünfärbung makroskopisch erkannt werden, was auf deren vermehrte Synthese durch die OB hinweist. Sie war auch im Vergleich zur Kontrollgruppe in den geringsten Konzentrationen der NP (20 µg/ml) am intensivsten ausgeprägt. Eine schwache Verminderung der Grünfärbung gegenüber der Kontrolle bewirkten die cHA in den Konzentrationen 250 µg/ml sowie 100 µg/ml. Was die Kollagensynthese betrifft, so war dies durch die Gegenfärbung der nicht-kollagenösen Proteine makroskopisch schwer abzuschätzen, tendenziell ergab sich gegenüber der Kontrolle jedoch eine Reduzierung der Farbtintensität. Die spektrophotometrische Auswertung der Kollagenmenge zeigte nur geringe Unterschiede zur Kontrollgruppe. Nur ein leichter Abfall konnte durch cHA in den Konzentrationen 250 µg/ml und 100 µg/ml festgestellt werden.

In der Quantifizierung der nicht-kollagenösen Proteine konnte man durch cHA eine Verminderung feststellen, die in den Konzentrationen 250 µg/ml sowie 100 µg/ml am ausgeprägtesten war. Durch cHA und HA gab es in der Konzentration 20 µg/ml die geringste Reduktion von nicht-kollagenösen Proteinen. Dies bestätigt auch der makroskopische Eindruck der Färbintensität. In der LT-Gruppe am Tag 14 konnte man makroskopisch anhand der Zellfärbung eine stark verminderte Färbung feststellen. Dies betraf alle Konzentrationen und die cHA und HA gleichermaßen. Es konnte auch eine Minderung der Zelladhäsion bemerkt werden, sodass sich die Haftung am Well der Gewebekultur zu verringern begann.

Die quantitative Auswertung der Kollagensynthese ergab eine starke Reduktion in den Konzentrationen 250 µg/ml und 100 µg/ml durch cHA gegenüber der Kontrollgruppe. Aber auch in der Konzentration 50 µg/ml gab es eine Verminderung der Kollagenmenge.

Durch HA fiel die Abnahme in diesen Konzentrationen vergleichsweise geringer aus. Die geringste Abnahme an Kollagen gegenüber der Kontrollgruppe konnte die Konzentration 20 µg/ml verzeichnen und dies sowohl durch die cHA, als auch HA.

Diese Tendenz konnte auch bei der Quantifizierung der nicht-kollagenösen Proteinen beobachtet werden.

Eine starke Minderung betraf die Konzentrationen 250 µg/ml, 100 µg/ml und 50 µg/ml beider Arten von NP. In der Konzentration 20 µg/ml der cHA und HA konnte die geringste Abnahme festgestellt werden.

Was die Proteinsynthese in der extrazellulären Matrix betrifft, so kann man davon ausgehen, dass eine längere Exposition der NP eine stärkere Hemmwirkung auf die OB hat, als eine kurzzeitige Intervention. Es kann somit angenommen werden, dass die untersuchten NP die Proliferation der OB, vor allem unter Langzeiteinwirkung, in einer konzentrationsabhängigen Weise vermindern können.

In der Studie von Dai et al. konnte jedoch ein Anstieg der Kollagensynthese in der Konzentration 80 µg/ml festgestellt werden, was den Ergebnissen dieser Arbeit widerspricht. (Dai, et al., 2019)

Bei Xu et al. hingegen wird auf den dosisabhängigen inhibierenden Effekt von NP mit verschiedener Morphologie hingewiesen. Anders als in dieser Arbeit, wurden dort jedoch primäre OB der Ratte verwendet. Trotzdem kann dies ein Hinweis sein, warum in der Langzeitexposition die Hemmwirkung in dieser Arbeit auffällig war. (Xu, et al., 2012)

Die ALP-Aktivität und damit die Differenzierung bzw. Reifung der OB, waren jedoch von der Wachstumshemmung nicht sehr beeinflusst. Es konnte gezeigt werden, dass eine Kurzanwendung der NP durchaus Potential hat, die osteoanabolen Eigenschaften der OB zu steigern und damit eine Möglichkeit für deren Einsatz in der regenerativen Medizin darstellen könnte. Auch die Entstehung von extrazellulären Proteinen ist in der Langzeitexposition stärker supprimiert und unterlegt eine eher hemmende Wirkung der NP über einen längeren Zeitraum.

6. Ausblick

Die hier ausgeführten Experimente können als Grundlage dienen, weitere Untersuchungen über die Effekte von HANP durchzuführen. Es muss angemerkt werden, dass es sich hier um *in vitro*-Experimente handelt und somit schwer vorausgesagt werden kann, wie sich die behandelten HANP *in vivo* verhalten.

Es wäre außerdem interessant, inwiefern sich die ermittelten Ergebnisse auf der Ebene der Genexpression der OB bestätigen lassen. Aber auch die verschiedenen Formulierungen und die Morphologie der HANP sowie deren zellulären Auswirkungen auf die Interaktion mit den OB müssen noch genauer untersucht werden.

Auch die kombinierte Anwendung mit verschiedenen organischen oder anorganischen Materialien könnten vielversprechende Ansätze sein, um das Potential der HANP auf OB zu nutzen.

Zusammenfassung

Die Anwendung von synthetischen Hydroxyapatitnanopartikeln (HANP) hat aufgrund ihrer guten Biokompatibilität großes Potential in der regenerativen Medizin. Hier ist vor allem ihr Einsatz im *bone tissue engineering* hervorzuheben. Der biologische Effekt ist dabei abhängig von verschiedenen physikalisch-chemischen Parametern, wie der Größe, der Form und der Konzentration. In dieser Arbeit wurden die Effekte von carbonyliertem HANP (cHA, 10% wt) sowie nicht-carbonyliertem (HA) HANP auf primären Osteoblasten der Maus (mpOB) in Konzentrationen von 250 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml und 20 µg/ml untersucht. Dabei wurde zwischen einer Langzeitexposition (LT) und Kurzzeitexposition (ST) unterschieden. Es wurde ein Zellviabilitätstest durchgeführt, um die Proliferation zu bestimmen. Außerdem wurde die Aktivität der alkalischen Phosphatase (ALP) sowie die Biosynthese von Kollagen und nicht-kollagenösem Proteinen zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht. In Abhängigkeit von der Expositionsdauer und Konzentration konnten unterschiedliche Effekte der HANP auf die Proliferation, die ALP-Aktivität wie auch die Synthese von Kollagen und nicht kollagenösen Proteinen der mpOB beobachtet werden. Die ALP-Aktivität war in der ST-Experiment im Vergleich zum LT-Experiment erhöht. Dies kann hilfreich sein für weitere *in vivo* Untersuchungen und in zukünftigen Forschungen in der regenerativen Medizin seine Berücksichtigung finden.

Abstract

The use of synthetic hydroxyapatite-nanoparticles (HANP) has great potential, due to their good biocompatibility, especially in the field of regenerative medicine and furthermore, bone tissue engineering. Their biological effect depends on different physical and chemical properties, such as size, shape and concentration. In this study we investigated the effects of two different HANP. One of them is carbonylated (cHA, 10% wt), the other one is non-carbonylated (HA). They were used in concentrations of 250 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml and 20 µg/ml. The impact on the proliferation, differentiation and biosynthesis of collagen and non-collagenous proteins of primary mouse osteoblasts (mpOB) were examined. There were two experimental settings. One of them investigated a long time influence (LT) of the HANP, the other one a short time influence (ST). The results showed different effects, depending on the duration of exposition and concentration, on the mpOB's proliferation, ALP activity and collagen/non-collagenous proteins synthesis as well. ALP activity showed a slight increase in the short time influenced experiment (ST). This should be taken into consideration for further *in vivo* studies and applications in regenerative medicine.

Literaturverzeichnis

- Bates F. Nanomedicine : Principles and Perspectives. Ge Y, Li S, Wang S, Moore S, editors. New York, NY: Springer New York; 2014. X, 413 p. 73 illus., 45 illus. in color p.
- Biologydictionary.net, Editors. Compact Bone. In: Li L, editor. 2019.
- Blair HC, Quitterie CL, Yanan L, Hang L, Beer-Stoltz D, Liu L, et al. Osteoblast Differentiation and Bone Matrix Formation In Vivo and In Vitro. *Tissue Eng Part B-Rev.* 2017;23:+.
- Boaks A, Siwek D, Mortazavi F. The temporal degradation of bone collagen: A histochemical approach. *Forensic Science International.* 2014;240:110.
- Bonewald LF. Osteocytes. In: Rosen CJ, Bouillon R, Compston J, Rosen V, editors. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism* 2013. p. 34-41.
- Boonrunsimana S., Gentlemana E., Carzanigad R., Evansa N. D., McComba D. W., Portera A. E., et al. The role of intracellular calcium phosphate in osteoblast-mediated bone apatite formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2012;109.
- Bradley EW, Westendorf JJ, van Wijnen AJ, Dudakovic A. Osteoblasts. In: Bilezikian JP, Bouillon R, Clemens C, Compston J, editors. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism* 2018. p. 31-7.
- Chaudhury K, Kumar V, Kandasamy J, Choudhury RS. Regenerative nanomedicine: Current perspectives and future directions. *International Journal of Nanomedicine.* 2014;9:4167.
- Chondrex I. Sirius Red/Fast Green Collagen Staining KitCatalog # 9046. 2019.
- Dai C, Zhu L, Chen G, Haddleton DM. Defect-related luminescent nanostructured hydroxyapatite promotes mineralization through both intracellular and extracellular pathways. *RSC Adv.* 2019;9:35947.
- Delgado-López JM, Iafisco M, Drouet C. Nanocrystalline apatites: Synthesis, physical-chemical and thermodynamic characterization. In: Iafisco M, Delgado-López JM, editors. *Apatite: Synthesis, Structural Characterization and Biomedical Applications.* Hauppauge, New York: Nova Science Publishers, Inc; 2014. p. 49-80.
- Douglas TEL, Wlodarczyk M, Pamula E, Declercq HA, de Mulder ELW, Bucko MM, et al. Enzymatic mineralization of gellan gum hydrogel for bone tissue-engineering applications and its enhancement by polydopamine. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine.* 2014;8:918.
- Fernandes M, Gomes P. Bone Cells Dynamics during Peri-Implantitis: a Theoretical Analysis. *Journal of oral & maxillofacial research.* 09/09 2016;7:e6.
- Hongjian Z, Jaebeom L. Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia.* 2011;7:2781.

- Invitrogen™. CyQUANT™ NF Cell Proliferation Assay 2019.
- Invitrogen™. Invitrogen™ PrestoBlue™ Cell Viability Reagent 2019.
- Kalia P, Vizcay-Barrena G, Fan JP, Warley A, Di Silvio L, Huang J. Nanohydroxyapatite shape and its potential role in bone formation: an analytical study. *Journal of the Royal Society, Interface*. Apr 6 2014;11(93):20140004. Epub 2014/01/31.
- Liu XQ, Tang RZ. Biological responses to nanomaterials: understanding nano-bio effects on cell behaviors. *Drug Deliv*. Dec 2017;24(sup1):1-15. Epub 2017/10/27.
- Lopes D, Martins-Cruz C, Oliveira MB, Mano JF. Bone physiology as inspiration for tissue regenerative therapies. *Biomaterials*. Dec 2018;185:240-75. Epub 2018/09/28.
- Mostafa H. Structure and Function of Periosteum with Special Reference to its Clinical Application. *Egyptian Journal of Histology*. 01/14 2019.
- Pina S, Oliveira JM, Reis RL. Natural-based nanocomposites for bone tissue engineering and regenerative medicine: a review. *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla)*. Feb 18 2015;27(7):1143-69. Epub 2015/01/13.
- Sigma-Aldrich. Colorimetric Alkaline Phosphatase and Peroxidase Substrate Detection Systems
BioFiles 2008, 3.4, 6.
<https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biofiles/colorimetric-alkaline.html>. 30.10.2019 2019.
- Sree N, Udayasri P, Suresh V, Sambasiva Rao KRS. Osteoporosis: Use of nanoparticles for the treatment of osteoporosis. *Biomedical and Pharmacology Journal*. 12/01 2009;2:477-88.
- Takayanagi H. Osteoclast Biology and Bone Resorption. In: Bilezikian JP, Bouillon R, Clemens T, Compston J, editors. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism* 2018. p. 46-53.
- Wang W, Yeung KWK. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. *Bioactive Materials*. 2017/12/01/ 2017;2(4):224-47.
- Xu Z, Liu CS, Wei J, Sun J. Effects of four types of hydroxyapatite nanoparticles with different nanocrystal morphologies and sizes on apoptosis in rat osteoblasts. *J Appl Toxicol*. 2012;32:435.
- Zhao R, Pengfei X, Zhang K, Tang Z, Chen X, Zhu X, et al. Selective effect of hydroxyapatite nanoparticles on osteoporotic and healthy bone formation correlates with intracellular calcium homeostasis regulation. *Acta Biomaterialia*. 2017;59:350.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Überblick Nanomedizin und Subdisziplinen	11
Abbildung 2: Abhängigkeit Oberfläche-Volumen zu Partikeldurchmesser	12
Abbildung 3: Übersicht Nanomaterialien	14
Abbildung 4: TEM Bilder Nanopartikel.....	16
Abbildung 5: Verschiedene Formen Nanopartikel	17
Abbildung 6: Mineralisierte Kollagenmatrix.....	20
Abbildung 7: Überblick Aufbau Knochen	20
Abbildung 8: Osteon	21
Abbildung 9: Übersicht Knochen	22
Abbildung 10: Zelltypen Knochenmetabolismus.....	23
Abbildung 11: Pathways Knochenmetabolismus	24
Abbildung 12: Mineralisierung und Calciummobilisierung.....	27
Abbildung 13: Vergleich gesunder mit osteoporotischem Knochen	29
Abbildung 14: Alkalische Phosphatase. Reaktionsmechanismus	34
Abbildung 15: Reaktionsmechanismen Presto Blue	36
Abbildung 16: Presto Blue Assay	37
Abbildung 17: Überblick Experiment ST	40
Abbildung 18: Überblick Experiment LT	40
Abbildung 19: Einfluss der NP auf die Zellproliferation im ST-Experiment Tag 1	44
Abbildung 20: Einfluss der NP auf die Zellproliferation im LT-Experiment Tag 1	45
Abbildung 21: Einfluss der NP auf die Zellproliferation im ST-Experiment Tag 7	45
Abbildung 22: Einfluss der NP auf die Zellproliferation im LT-Experiment Tag 7	46
Abbildung 23: Einfluss der NP auf die Zellproliferation im ST-Experiment Tag 14	47
Abbildung 24: Einfluss der NP auf die Zellproliferation im LT-Experiment Tag 14	47
Abbildung 25: Einfluss der NP des ST-Experimentes auf die ALP-Aktivität der OB	48
Abbildung 26: Einfluss der NP des LT-Experimentes auf die ALP-Aktivität der OB	49
Abbildung 27: Einfluss der NP auf die Kollagensynthese und nicht-kollagenösen Proteinen der OB im ST-Experiment Tag 7	50
Abbildung 28: Einfluss der NP auf die Kollagensynthese der OB im ST-Experiment Tag 7	51
Abbildung 29: Einfluss der NP auf die Synthese nicht-kollagenöser Proteine der OB im ST-Experiment Tag 7	51

Abbildung 30: Einfluss der NP auf die Synthese von Kollagen und nicht-kollagenöser Proteine der OB im LT-Experiment Tag 7	52
Abbildung 31: Einfluss NP auf die Synthese von Kollagen der OB im LT-Experiment Tag 7	53
Abbildung 32: Einfluss der NP auf die Synthese von nicht-kollagenösen Proteinen der OB im LT-Experiment Tag 7	53
Abbildung 33: Einfluss NP auf die Synthese von Kollagen und nicht-kollagenösen Proteinen der OB im ST-Experiment Tag 14	54
Abbildung 34: Einfluss der NP auf die Synthese von Kollagen der OB im ST-Experiment Tag 14	55
Abbildung 35: Einfluss der NP auf die Synthese von nicht-kollagenösen Proteinen der OB im ST-Experiment Tag 14	56
Abbildung 36: Einfluss der NP auf die Synthese von Kollagen und nicht-kollagenösen Proteinen der OB im LT-Experiment Tag 14	57
Abbildung 37: Einfluss der NP auf die Synthese von Kollagen der OB im LT-Experiment Tag 14	58
Abbildung 38: Einfluss der NP auf die Synthese von nicht-kollagenösen Proteinen der OB im LT-Experiment Tag 14	58

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Material	31
Tabelle 2: Substanzen	32
Tabelle 3: Pipettiervolumina	41
Tabelle 4: Konzentrationskorrektur	41
Tabelle 5: Statistische Signifikanzen	43