



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„Der Einfluss von Photoinitiatoren  
auf die Viabilität von Knochenzellen“

verfasst von / submitted by

Theresa Lettner

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

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2016

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



## Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an 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.



## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die durch ihre fachliche und persönliche Unterstützung zum Gelingen dieser Diplomarbeit beigetragen haben.

Ich danke Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Oskar Hoffmann für die Möglichkeit in seinem Labor auf dem interessanten Gebiet der Knochenforschung zu arbeiten, für die Bereitstellung des Themas und für die gute und freundliche Betreuung.

Ein weiterer Dank geht an Mag. Carina Kamplleitner für ihre große Hilfsbereitschaft und die vielen wertvollen Anregungen.

Danke an Barbara Berger für die kompetente Einschulung in die praktische Arbeit und an Peter Höflich für die tatkräftige Unterstützung im Labor.

Ein großer Dank gilt der orthopädischen Abteilung des sozialmedizinischen Zentrums Ost – Donauespital und dem Institut für Bioprozess- und Analysenmesstechnik Heiligenstadt für die gute Zusammenarbeit.

Weiters danke ich Wolfgang und Judith, die sich die Zeit genommen haben, Teile des Manuskripts zu lesen und auf Fehler zu durchsuchen.

Ich bedanke mich herzlich bei meiner Familie und bei Lukas, die immer für mich da waren und mir den größtmöglichen Rückhalt gegeben haben.

Mein besonderer Dank gilt meiner Mutter. Sie hat mir mein Studium ermöglicht und mich bei all meinen Entscheidungen unterstützt.



## Verwendete Abkürzungen

|                        |                                                                                                          |
|------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 3D .....               | dreidimensional                                                                                          |
| ALP .....              | alkalische Phosphatase                                                                                   |
| AM .....               | Additive Manufacturing                                                                                   |
| ANOVA .....            | analysis of variance, Varianzanalyse                                                                     |
| ARS .....              | Alizarin Rot S                                                                                           |
| BCIP .....             | 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat                                                                       |
| BMP .....              | bone morphogenic protein, knochenmorphogenetisches Protein                                               |
| BSA.....               | bovine serum albumine                                                                                    |
| bspII .....            | Knochen-Sialoprotein II                                                                                  |
| CAD .....              | computer assisted design                                                                                 |
| col1 .....             | Typ 1 Kollagen                                                                                           |
| dlx5 .....             | distal-less homeobox 5                                                                                   |
| DMEM .....             | Dulbecco's Modified Eagle Medium                                                                         |
| DMSO .....             | Dimethylsulfoxid                                                                                         |
| ECE .....              | electrical current exclusion                                                                             |
| EDTA .....             | Ethylendiamintetraacetat                                                                                 |
| et al. ....            | et alii, et aliae, und andere                                                                            |
| EtOH .....             | Ethanol                                                                                                  |
| FCS HI .....           | hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum                                                                   |
| <i>g</i> .....         | mittlere Erdbeschleunigung                                                                               |
| H .....                | Wasserstoff                                                                                              |
| H <sup>+</sup> .....   | Proton                                                                                                   |
| HOB .....              | humane Osteoblasten                                                                                      |
| IC2959 .....           | Irgacure 2959                                                                                            |
| IC369 .....            | Irgacure 369                                                                                             |
| IR .....               | Infrarot                                                                                                 |
| M-CSF.....             | macrophage colony-stimulating factor, Monozytenkolonien-stimulierender Faktor                            |
| MEM .....              | Minimal Essential Medium Eagle                                                                           |
| Mio. ....              | Million(en)                                                                                              |
| MOB.....               | primäre Maus-Osteoblasten                                                                                |
| MSC.....               | Mesenchymale Stammzelle                                                                                  |
| MTS .....              | [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inneres Salz] |
| NAD <sup>+</sup> ..... | Nicotinamadenindinukleotid, oxidierte Form                                                               |
| NADH.....              | Nicotinamadenindinukleotid, reduzierte Form                                                              |
| NBT.....               | Nitroblau Tetrazolium                                                                                    |
| OB.....                | Osteoblasten                                                                                             |

OC .....Osteoclasten  
 OCN.....Osteocalcin  
 OPG.....Osteoprotegerin  
 OPN.....Osteopontin  
 Osx .....Osterix  
 P/S.....Penicillin/Streptomycin  
 PBS .....phosphatgepufferte Salzlösung  
 PEG .....Polyethylenglycol  
 PES .....Phenazinethosulfat  
 PGE2 .....Prostaglandin E<sub>2</sub>  
 PVA .....Polyvinylalkohol  
 RANK.....receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B  
 RANKL.....receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand  
 RGD.....Arginin-Glycin-Asparaginsäure  
 Runx2 .....Runt-related transcription factor 2  
 TGF $\beta$  .....transforming growth factor- $\beta$   
 TNF.....Tumor Nekrose Faktor  
 TNFR .....Tumor Nekrose Faktor Rezeptor  
 TRAP .....tartrat-resistant acid phosphatase, tartratresistente saure Phosphatase  
 UV.....Ultraviolett



# Inhaltsverzeichnis

|                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------|----|
| Eidesstattliche Erklärung.....                                     | 3  |
| Danksagung .....                                                   | 5  |
| Verwendete Abkürzungen .....                                       | 7  |
| Inhaltsverzeichnis.....                                            | 9  |
| Zielsetzung .....                                                  | 13 |
| 1 Einleitung .....                                                 | 15 |
| 1.1 Photopolymerisation .....                                      | 15 |
| 1.2 Knochengewebe.....                                             | 16 |
| 1.2.1 Funktion und Struktur des Knochens .....                     | 16 |
| 1.2.2 Osteoblasten .....                                           | 18 |
| 1.2.3 Osteozyten und Knochen-Saumzellen .....                      | 19 |
| 1.2.4 Osteoklasten.....                                            | 20 |
| 1.3 Bone Tissue Engineering.....                                   | 21 |
| 1.3.1 Scaffolds im Bone Tissue Engineering.....                    | 22 |
| 1.3.2 Additive Manufacturing .....                                 | 23 |
| 1.3.3 Zellverkapselte Hydrogele .....                              | 24 |
| 1.4 Photoinitiatoren.....                                          | 26 |
| 1.4.1 Aktivierung des Photoinitiators .....                        | 26 |
| 1.4.2 Mechanismus der Radikalbildung .....                         | 27 |
| 1.4.3 Radikalische Kettenpolymerisation .....                      | 28 |
| 1.4.4 Auswahlkriterien für Photoinitiatoren.....                   | 28 |
| 1.5 Photopolymerisierbare Materialien im Tissue Engineering.....   | 29 |
| 1.6 Zellschäden aufgrund der Photopolymerisation .....             | 30 |
| 1.7 <i>In vitro</i> Modelle für Studien an Knochenzellen .....     | 31 |
| 1.7.1 Zelllinien versus Primärzellen .....                         | 31 |
| 2 Material und Methoden.....                                       | 33 |
| 2.1 Versuchsaufbau.....                                            | 33 |
| 2.2 Geräte .....                                                   | 35 |
| 2.3 Materialien.....                                               | 35 |
| 2.4 Substanzen .....                                               | 36 |
| 2.5 Herstellung verwendeter Lösungen .....                         | 37 |
| 2.5.1 Alizarin Rot S Färbelösung (ARS-Lösung) .....                | 37 |
| 2.5.2 BCIP/NBT-Färbelösung .....                                   | 37 |
| 2.5.3 Formaldehydlösung (3,7 %).....                               | 38 |
| 2.5.4 Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS).....                     | 38 |
| 2.5.5 Phosphatgepufferte Salzlösung mit Calcium und Magnesium..... | 38 |
| 2.5.6 TRAP-Puffer .....                                            | 38 |
| 2.5.7 TRAP-Färbelösung .....                                       | 38 |

|        |                                                                           |    |
|--------|---------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.5.8  | Trypsin-EDTA Lösung .....                                                 | 38 |
| 2.5.9  | Waschpuffer .....                                                         | 38 |
| 2.6    | Herstellung der Kulturmedien .....                                        | 39 |
| 2.6.1  | 10 % $\alpha$ -MEM.....                                                   | 39 |
| 2.6.2  | 10 % DMEM .....                                                           | 39 |
| 2.6.3  | HOB-Kulturmedium .....                                                    | 39 |
| 2.6.4  | Knochenmark-Kulturmedium 1 .....                                          | 39 |
| 2.6.5  | Knochenmark-Kulturmedium 2 (2x) .....                                     | 40 |
| 2.6.6  | Osteoklastogenese-Medium (2x) .....                                       | 40 |
| 2.7    | Getestete Photoinitiatoren .....                                          | 41 |
| 2.7.1  | Irgacure 2959 .....                                                       | 41 |
| 2.7.2  | Irgacure 369 .....                                                        | 41 |
| 2.7.3  | BA 740 .....                                                              | 43 |
| 2.8    | Osteoblasten-Isolierung.....                                              | 44 |
| 2.8.1  | Primäre Maus-Osteoblasten der Fraktion III .....                          | 44 |
| 2.8.2  | Humane Osteoblasten der Passage 2 .....                                   | 44 |
| 2.8.3  | Charakterisierung der humanen Osteoblasten.....                           | 45 |
| 2.9    | Zytokompatibilität der Photoinitiatoren mit Osteoblasten .....            | 46 |
| 2.9.1  | Zellaussaat und Behandlung .....                                          | 46 |
| 2.9.2  | Ablösen der Zellen mit Trysin/EDTA.....                                   | 47 |
| 2.9.3  | Zellzählung .....                                                         | 47 |
| 2.10   | Einfluss von Ascorbinsäure auf die Überlebensrate der Osteoblasten.....   | 49 |
| 2.11   | Proliferationsrate von humanen und primären Maus-Osteoblasten .....       | 50 |
| 2.12   | Gewinnung von Zellen der Osteoklasten-Linie über Knochenmarkskultur ..... | 50 |
| 2.13   | Potential zur Ausdifferenzierung zu reifen Osteoklasten .....             | 51 |
| 2.13.1 | Zellaussaat und Behandlung .....                                          | 51 |
| 2.13.2 | TRAP-Färbung .....                                                        | 52 |
| 2.14   | Zytokompatibilität der Photoinitiatoren mit Osteoklasten-Vorstufen .....  | 52 |
| 2.14.1 | Zellaussaat und Behandlung .....                                          | 52 |
| 2.14.2 | MTS-Assay.....                                                            | 53 |
| 2.15   | Statistische Auswertung .....                                             | 54 |
| 3      | Resultate.....                                                            | 55 |
| 3.1    | Charakterisierung der humanen Osteoblasten .....                          | 55 |
| 3.2    | Reduktion der Osteoblasten-Zellzahl durch UV-Licht .....                  | 55 |
| 3.3    | Einfluss der verwendeten Lösungsmittel auf Osteoblasten.....              | 56 |
| 3.4    | Zytokompatibilität von Irgacure 2959 mit Osteoblasten.....                | 57 |
| 3.4.1  | Irgacure 2959 mit primären Maus-Osteoblasten .....                        | 57 |
| 3.4.2  | Irgacure 2959 mit humanen Osteoblasten .....                              | 58 |

|       |                                                                                                   |    |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.5   | Zytokompatibilität von Irgacure 369 mit Osteoblasten.....                                         | 59 |
| 3.5.1 | Irgacure 369 mit primären Maus-Osteoblasten .....                                                 | 59 |
| 3.5.2 | Irgacure 369 mit humanen Osteoblasten .....                                                       | 61 |
| 3.6   | Zytokompatibilität von BA 740 mit Osteoblasten .....                                              | 63 |
| 3.6.1 | BA 740 mit primären Maus-Osteoblasten.....                                                        | 63 |
| 3.6.2 | Humane Osteoblasten mit BA 740.....                                                               | 65 |
| 3.7   | Einfluss von Ascorbinsäure auf die Überlebensrate der Osteoblasten .....                          | 66 |
| 3.8   | Proliferationsrate der Maus- und humanen Osteoblasten .....                                       | 68 |
| 3.8.1 | Proliferationsrate von primären Maus-Osteoblasten .....                                           | 68 |
| 3.8.2 | Proliferaionsrate von humanen Osteoblasten .....                                                  | 68 |
| 3.9   | Potential der gewonnenen Knochenmarkszellen zur Ausdifferenzierung<br>zu reifen Osteoklasten..... | 69 |
| 3.10  | Einfluss von UV-Strahlung und Lösungsmitteln auf Osteoklasten-Vorstufen....                       | 70 |
| 3.11  | Zytokompatibilität von Irgacure 2959 mit Osteoklasten-Vorläuferzellen .....                       | 70 |
| 3.12  | Zytokompatibilität von Irgacure 369 mit Osteoklasten-Vorläuferzellen .....                        | 71 |
| 3.13  | Zytokompatibilität von BA 740 mit Osteoklasten-Vorläuferzellen .....                              | 71 |
| 4     | Diskussion.....                                                                                   | 72 |
| 5     | Zusammenfassung.....                                                                              | 77 |
| 6     | Abstract .....                                                                                    | 79 |
| 7     | Literaturverzeichnis .....                                                                        | 81 |
| 8     | Abbildungsverzeichnis.....                                                                        | 85 |
| 9     | Tabellenverzeichnis.....                                                                          | 87 |



## Zielsetzung

Die Photopolymerisation ist ein Verfahren, bei dem es in der Anwesenheit eines Photoinitiators unter der Einwirkung von Strahlung zur Umwandlung einer viskosen Monomerlösung in ein verfestigtes Material kommt. Ein Anwendungsgebiet von photopolymerisierbaren Materialien ist das Bone Tissue Engineering, das sich mit der künstlichen Herstellung von Knochengewebe befasst. Die Photopolymerisation erlaubt die Herstellung von komplex geformten, mit knochenbildenden Zellen und Biomolekülen beladenen Implantaten zur Reparatur und Regeneration von Knochendefekten.

Bei seiner Aktivierung bildet der Photoinitiator reaktive Spezies, die dann die Polymerisationsreaktion auslösen. Sowohl die aktivierende Strahlung als auch die gebildeten Radikale können oxidative Zellschäden hervorrufen. Aber auch die Ausgangssubstanz selbst und verwendete Lösungsmittel können Zellen schädigen. Eine ausreichende Zytokompatibilität der Substanzen, vor und auch nach ihrer Aktivierung, ist Voraussetzung für die Anwendbarkeit von Photoinitiatoren im Tissue Engineering.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem Einfluss von drei Photoinitiatoren auf die Viabilität von Knochenzellen. Die wichtigsten knochenaktiven Zellen sind die knochenbildenden Osteoblasten und die knochenabbauenden Osteoklasten. Der Effekt der Photoinitiatoren auf diese Zelltypen sollte untersucht werden. Als Zellkultur-Modelle sollten primäre Maus-Osteoblasten, humane Osteoblasten und murine Osteoklasten-Vorläuferzellen dienen.

Die Toxizität der drei Photoinitiatoren Irgacure 2959, Irgacure 369 und BA 740 auf die Zellen sollte in unterschiedlichen Konzentrationen mit und ohne UV-Aktivierung getestet werden. Auch der isolierte Effekt der UV-Strahlung und der verwendeten Lösungsmittel sollte untersucht werden.

Weiters sollte ein möglicher Einfluss der Supplementierung des Nährmediums mit dem Antioxidans Ascorbinsäure auf die Überlebensrate der darin kultivierten Osteoblasten unter der Behandlung mit UV-Licht und dem Photoinitiator Irgacure 2959 untersucht werden.

Die Proliferationsrate der Maus- und humanen Osteoblasten sollte ermittelt werden, um einen Zusammenhang zwischen schneller Teilungsrate und hoher Sensitivität zu prüfen.



# 1 Einleitung

## 1.1 Photopolymerisation

Die Photopolymerisation ist eine lösungsmittelfreie, energieeffiziente und rasche Methode zur Umwandlung einer viskos-flüssigen Vorpolymerlösung in ein verfestigtes Material. In Anwesenheit eines Photoinitiators kommt es bei der Einwirkung von Licht zur Polymerisation oder Quervernetzung multifunktioneller Monomere. Der Photoinitiator ist ein kleines Molekül, das bei der Absorption von Licht einer bestimmten Wellenlänge reaktive Spezies bildet, die dann die Polymerisationsreaktion initiieren. Oft wird ultraviolettes Licht zur Aktivierung verwendet. Die größten Vorteile dieser Technologie sind ihre Schnelligkeit und Steuerbarkeit. Bei intensiver Bestrahlung können Polymerisationszeiten von Sekundenbruchteilen erreicht werden. Da nur bestrahlte Areale polymerisiert werden, ist mithilfe von Lasersystemen und Masken die Produktion von hoch aufgelösten Strukturen möglich. Die Photopolymerisation findet breite industrielle Anwendung im Bereich von Graphik, Elektronik, der Beschichtungsindustrie und anderen Sektoren (Decker 1996).

Der Prozess ist bei Raumtemperatur und physiologischem pH-Wert durchführbar. Aufgrund der milden Reaktionsbedingungen und der einfachen Herstellung von Materialien mit maßgeschneiderten Eigenschaften ist die Photopolymerisation auch für biomedizinische Anwendungen attraktiv. In der Zahntechnik hat sich der Einsatz lichthärtender Komposite seit Jahrzehnten bewährt. Weitere biomedizinische Anwendungsmöglichkeiten von Photopolymeren sind der Einsatz als Drug-Delivery-Systeme, als biomimetische Implantat-Beschichtungen oder als chirurgische Klebstoffe sowie die Verkapselung und Transplantation von Zellen und die künstliche Herstellung von Gewebe (Schmocker, et al. 2014). Die Sol-Gel-Konversion kann bei der Photopolymerisation zeitlich und örtlich kontrolliert und sowohl *in vivo* als auch *ex vivo* durchgeführt werden. Dies ermöglicht einerseits die minimalinvasive Implantation von injizierbaren und *in situ* polymerisierbaren Biomaterialien und andererseits die Fertigung von komplex strukturierten Formen. Empfindliche Biomoleküle und lebende Zellen können direkt und gezielt in das Material eingebaut werden (Baroli 2006). Ein potentielles Anwendungsgebiet von photopolymerisierbaren Materialien liegt im Bone Tissue Engineering, das sich mit der künstlichen Herstellung von Knochengewebe beschäftigt. Die Photopolymerisation ermöglicht die Fertigung von Biomaterialien mit spezifischen Eigenschaften, die für Implantate zur Reparatur und Regeneration von Knochendefekten erforderlich sind.

## 1.2 Knochengewebe

### 1.2.1 Funktion und Struktur des Knochens

Das aus über zweihundert Knochen aufgebaute Skelett ist ein zentraler Teil unseres Stütz- und Bewegungsapparats und schützt innere Organe vor Verletzungen. Der Knochen ist zudem wesentlich an der Mineralstoffhomöostase, vor allem von Calcium und Phosphat, beteiligt. In seinem Inneren beherbergt er das Knochenmark, den Ort der Blutzellbildung (Clarke 2008).

Knochengewebe ist aus einer mineralisierten extrazellulären Matrix und darin eingebetteten Zellen aufgebaut. 35 % der extrazellulären Matrix bestehen aus organischem Material, zum größten Teil aus Kollagen Typ 1. Kollagen und weitere im Knochen enthaltene Proteine werden von knochenbildenden Zellen, den Osteoblasten, produziert. Kollagen sorgt für Festigkeit, Elastizität und Härte des Knochens. Nichtkollagenöse Proteine wie Fibronectin, Osteopontin, Osteocalcin und Osteonectin modulieren zelluläre Funktionen wie Adhäsion, Migration, Differenzierung und Apoptose (Baroli 2009).

Der mineralische Anteil macht 65 % der extrazellulären Knochenmatrix aus. Das Knochenmineral besteht vorwiegend aus dem Calciumphosphat Hydroxylapatit mit der chemischen Formel  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ . Zwischen den Kollagenfasern eingelagert dient es zum einen der strukturellen Verstärkung und zum anderen der Mineralstoffhomöostase. Die mineralisierten Kollagenfasern sind parallel in Schichten angeordnet, den Lamellen. In einem Osteon schließen sich diese Lamellen konzentrisch um einen sogenannten Havers-Kanal, in dem Nerven und Blutgefäße verlaufen (Webster 2001).

Makroskopisch betrachtet liegen im Knochen zwei unterschiedliche Strukturen vor. Eine harte Knochenrinde, auch Kompakta oder Kortikalis genannt, umhüllt den porösen Trabekelknochen im Inneren, der auch als Spongiosa bezeichnet wird. Der kortikale Knochen ist dicht und massiv. Im erwachsenen Knochen ist er großteils aus längs verlaufenden Osteonen aufgebaut. Dieser lamellare Knochen zeichnet sich durch eine hohe mechanische Festigkeit aus. Der Trabekelknochen weist eine bienenwabenartige Struktur aus vielen Bälkchen und Platten auf. So wird Gewicht eingespart und Platz für das Knochenmark geschaffen (Clarke 2008).



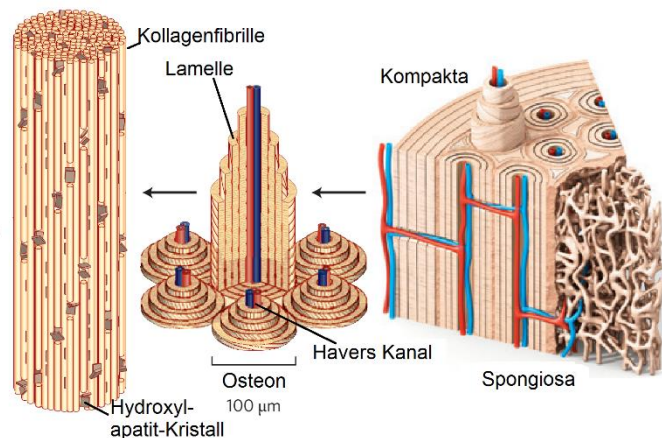


Abb. 1: Struktur des Knochens (Wegst, et al. 2015).

Knochen erscheint zwar als starres Gewebe, weist aber eine hohe Dynamik auf. Je nach aktuellen Anforderungen, wie der mechanischen Belastung oder dem Ernährungsstatus, wird Knochenmineral eingelagert oder freigegeben und die Struktur des Knochens verändert sich (Henkel, et al. 2013). Der Knochen unterliegt einem ständigen Umbau, dem sogenannten „Bone Remodelling“. Dem Knochenabbau (Resorption) durch Osteoklasten folgt der Aufbau neuen Knochens durch Osteoblasten. Dieser präzise ausbalancierte Prozess ereignet sich im Mikromaßstab zugleich an vielen Stellen über das Skelett verteilt. Trabekelknochen ist typischerweise metabolisch aktiver als kortikaler Knochen. Das Bone Remodelling bestimmt die Mineraldichte und mechanische Stärke des Knochens (Clarke 2008). Es ist physiologisch notwendig, um Mikrofrakturen zu heilen, den Knochen an mechanische Anforderungen anzupassen und die Mineralstoffhomöostase zu erhalten. Kommt der Prozess aus dem Gleichgewicht, sind Knochenerkrankungen die Folge. Überwiegt der Knochenabbau, kommt es zu Osteoporose. Ein zu exzessiver Knochenaufbau dagegen führt zur Osteopetrose (Florencio-Silva, et al. 2015).

Die extrazelluläre Matrix wird im Wesentlichen von vier Zelltypen besiedelt. Die wichtigsten knochenaktiven Zellen sind die knochenbildenden Osteoblasten und die knochenresorbierenden Osteoklasten. Aber auch Osteozyten und Knochen-Saumzellen spielen eine bedeutende Rolle in der Homöostase des Knochens (Florencio-Silva, et al. 2015). Die Zellen der osteoblastären Linie entwickeln sich aus der mesenchymalen Stammzelle, während die resorbierenden Osteoklasten von der hämatopoetischen Stammzelle abstammen. Unter der Kontrolle verschiedener Stimuli verlieren diese Vorläuferzellen ihre Multipotenz und prägen einen gewebsspezifischen Phänotyp aus (Katagiri and Takahashi 2002).

### 1.2.2 Osteoblasten

Reife Osteoblasten sind kuboidale Zellen, die in einer einzelligen Schicht an Stellen aktiven Knochenumbaus gefunden werden. Die Hauptfunktion der Osteoblasten ist die Bildung von Knochensubstanz. Durch die Synthese von Kollagen und anderen Proteinen bauen sie das Osteoid auf, die weiche, noch nicht mineralisierte extrazelluläre Knochenmatrix. Auch die Mineralisation des Osteoids, also die Einlagerung von Hydroxylapatit-Kristallen, wird von Osteoblasten gefördert. Das von Osteoblasten exprimierte membrangebundene Enzym alkalische Phosphatase (ALP) spielt dabei eine wichtige Rolle. Osteoblasten sezernieren zudem Zytokine und Wachstumsfaktoren, die verschiedene Knochenfunktionen regulieren und unter anderem die Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten-Progenitorzellen anregen. Über die Produktion von RANKL (Receptor Activator of Nuclear factor  $\kappa$ B Ligand) und Osteoprotegerin (OPG) regeln Osteoblasten aber auch den Knochenabbau durch die Osteoklasten (Florescu-Silva, et al. 2015).

Osteoblasten stammen von der mesenchymalen Stammzelle ab, einer multipotenten Zelle im Knochenmark, die zu Osteoblasten, Fibroblasten, Chondrozyten, Adipozyten, Myozyten und anderen Zellen differenzieren kann. Welcher Differenzierungsweg eingeschlagen wird, hängt von der jeweiligen Mikroumgebung ab. Die Osteoblastogenese und Knochenbildung wird über Hormone, Wachstumsfaktoren, Zytokine und mechanischen Stress reguliert. Osteoblasten können diese äußeren Einflüsse in Signale übersetzen, die über verschiedene Transduktionswege die Expression bestimmter Gene induzieren. Eine zentrale Rolle spielen knochenmorphogenetische Proteine (bone morphogenetic proteins, BMP) und Wnt Proteine. BMP sind Wachstumsfaktoren aus der Superfamilie der transformierenden Wachstumsfaktoren Beta (TGF $\beta$ ), die von Osteoblasten synthetisiert werden. Über BMP und den Wnt-Signalweg werden die Determination von mesenchymalen Stammzellen zu Osteoprogenitoren, die Ausreifung von Osteoblasten und ihre knochenbildende Aktivität reguliert sowie die Kopplung zwischen Osteoblasten und Osteoklasten während dem Bone Remodelling (Chau, et al. 2009).

Die Transkriptionsfaktoren Runx-related transcription factor 2 (Runx2) und Osterix sind essentiell für die osteogene Differenzierung (Chau, et al. 2009). Während der Entwicklung von mesenchymalen Stammzellen zu Osteoblasten werden Stadien unterschiedlichen Phänotyps durchlaufen. Zunächst erfolgt die Determination zu Osteo-/Chondroprogenitoren, die durch die Expression der Transkriptionsfaktoren Runx2, Distal-less homeobox 5 (Dlx 5) und Osterix charakterisiert sind. Osteoprogenitoren proliferieren und erwerben die Fähigkeit zur Expression von alkalischer Phosphatase (ALP), was sie als Präosteoblasten auszeichnet. In weiterer Folge entwickeln sich große Kuboidzellen,

die durch eine hohe ALP-Enzymaktivität und Synthese von Matrixproteinen wie Osteocalcin (OCN) und Typ 1 Kollagen charakterisiert sind (Capulli, et al. 2014).

Die Matrixmineralisation kennzeichnet das Ende der Osteoblastogenese. Haben die Osteoblasten ihre knochenbildende Aufgabe erfüllt, differenzieren sie zu Osteozyten oder Knochen-Saumzellen aus, oder fallen der Apoptose anheim (Jilka, et al. 1998).

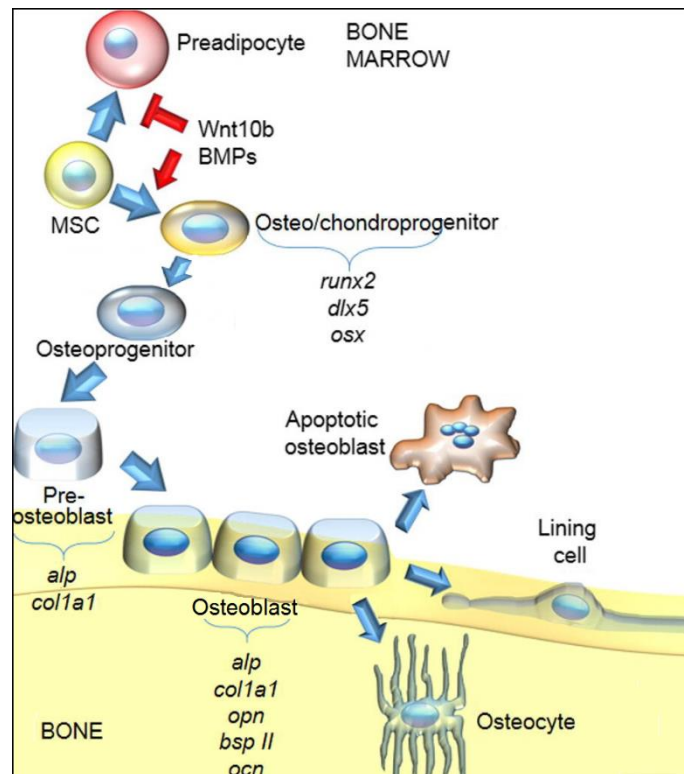


Abb. 2: Differenzierung von MSC zu Osteoblasten, Osteozyten und Knochen-Saumzellen (Capulli, et al. 2014).

Über Signaltransduktionswege der BMPs und Wnt-Proteine wird die Determinierung zur osteogenen Linie gefördert. Die Genexpression für Transkriptionsfaktoren, wie Runt-related transcription factor 2 (*runx2*), distal-less homeobox 5 (*dlx5*) und Osterix (*osx*), das Enzym alkalische Phosphatase (*alp*) und Knochenmatrixproteine, wie Typ 1 Kollagen (*col1a1*), Osteopontin (*opn*), Osteocalcin (*ocn*) und Knochen-Sialoprotein 2 (*bsp II*), charakterisiert die Differenzierungsstadien (Capulli, et al. 2014).

### 1.2.3 Osteozyten und Knochen-Saumzellen

Am Ende eines „Bone Remodelling“-Kreislaufs entwickelt sich eine Subpopulation der Osteoblasten weiter zu Osteozyten, die von der Knochenmatrix eingeschlossen werden. Die Differenzierung geht mit einer morphologischen Veränderung des kuboidalen Osteoblasten hin zu einer dendritischen Zelle einher. Die sternförmigen Osteozyten machen den Großteil der Zellen im Knochen aus. In den mineralisierten Knochen eingemauert, wirken sie dort als Mechanosensoren und Regulatoren des Bone Remodelling (Florencio-Silva, et al. 2015).

Auf einer ruhenden Knochenoberfläche können sich Osteoblasten auch zu Knochen-Saumzellen (bone lining cells) weiterentwickeln. Dabei handelt es sich um abgeflachte

Zellen, die dem Knochen in einer einzelligen Schicht aufliegen. Ihre Funktion ist noch nicht vollständig geklärt, doch scheinen auch sie eine Rolle bei der Kopplung von Knochenresorption und -formation zu spielen (Florencio-Silva, et al. 2015).

#### 1.2.4 Osteoklasten

Osteoklasten sind multinukleäre Riesenzellen, die die mineralisierte Knochenmatrix abbauen können. Sie stammen von der hämatopoetischen Stammzelle ab und entstehen durch Differenzierung und Fusion von Vorläuferzellen der Monozyten/Makrophagen-Linie. Zellen der osteoblastären Linie produzieren die für die Osteoklastogenese essentiellen Zytokine RANKL (receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand) und M-CSF (Monozytenkolonie-stimulierender Faktor) und geben so das Signal zum Knochenabbau. RANKL und M-CSF werden von Osteoblasten auf ihrer Membranoberfläche exprimiert und in löslicher Form sezerniert. M-CSF stimuliert die Proliferation determinierter Osteoklasten-Vorläuferzellen und deren Expression des Rezeptors RANK (receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B). Die Osteoklasten-Aktivität wird vor allem über das Zusammenspiel des Tumor Nekrose Faktor (TNF) ähnlichen Proteins RANKL und den TNF-Rezeptor (TNFR) ähnlichen Proteinen Osteoprotegerin (OPG) und RANK gesteuert. Die Interaktion von RANK mit seinem Liganden RANKL, der sowohl in membrangebundener als auch in löslicher Form von Zellen der osteoblastären Linie produziert wird, führt über verschiedene Signalwege zur Ausdifferenzierung und Fusion zu reifen Osteoklasten. OPG ist ein löslicher Rezeptor für RANKL, der ebenfalls von Osteoblasten sezerniert wird. Als Gegenspieler von RANKL fängt OPG diesen sozusagen ab, verhindert die Bindung an RANK und hemmt somit die Osteoklastogenese (Boyle, et al. 2003).

Der reife, aktivierte Osteoklast bindet mittels Integrinen fest an die extrazelluläre Matrix und bildet ein, durch einen Ring aus Adhäsionsmolekülen abgedichtetes, externes Kompartiment zwischen seiner Basalmembran und der Knochenoberfläche. Die basale Membran faltet sich büstensaumartig zum sogenannten ruffled border. Unter der Zelle wird eine Resorptionslakune, auch Howship-Lakune, geformt, deren Inneres vom Umgebungsmilieu abgetrennt ist. Nun werden Protonen durch die gefaltete Basalmembran gepumpt, der pH-Wert in der Resorptionslakune sinkt stark ab und das Knochenmineral löst sich auf. Zum Abbau der extrazellulären Matrix sezerniert der Osteoklast proteolytische Enzyme, wie die tartratesistente saure Phosphatase (TRAP) und Cathepsin K (Cappariello, et al. 2014).

Neuere Erkenntnisse weisen darauf hin, dass Osteoklasten zahlreiche Funktionen erfüllen, die über den Abbau von Knochengewebe hinausgehen. Während des „Bone Remodellings“ geben sie möglicherweise den entscheidenden Impuls zum

Knochenaufbau. Die fein justierte Kopplung von Knochenab- und –aufbau wird nicht nur durch die regulatorischen Funktionen der Osteoblasten bewerkstelligt. Vielmehr findet eine bidirektionale Regulation zwischen Osteoblasten und Osteoklasten über Zell-Zell-Kontakte und parakrine Signale statt. Schon länger ist bekannt, dass bei der Resorption Faktoren wie BMPs und Wnts, die von Osteoblasten in die Knochenmatrix eingelagert wurden, durch Osteoklasten freigesetzt werden. Aber Osteoklasten sezernieren auch zelleigene Produkte, sogenannte Clastokine, die mesenchymale Stammzellen anlocken und ihre osteoblastäre Differenzierung stimulieren (Teti 2013).

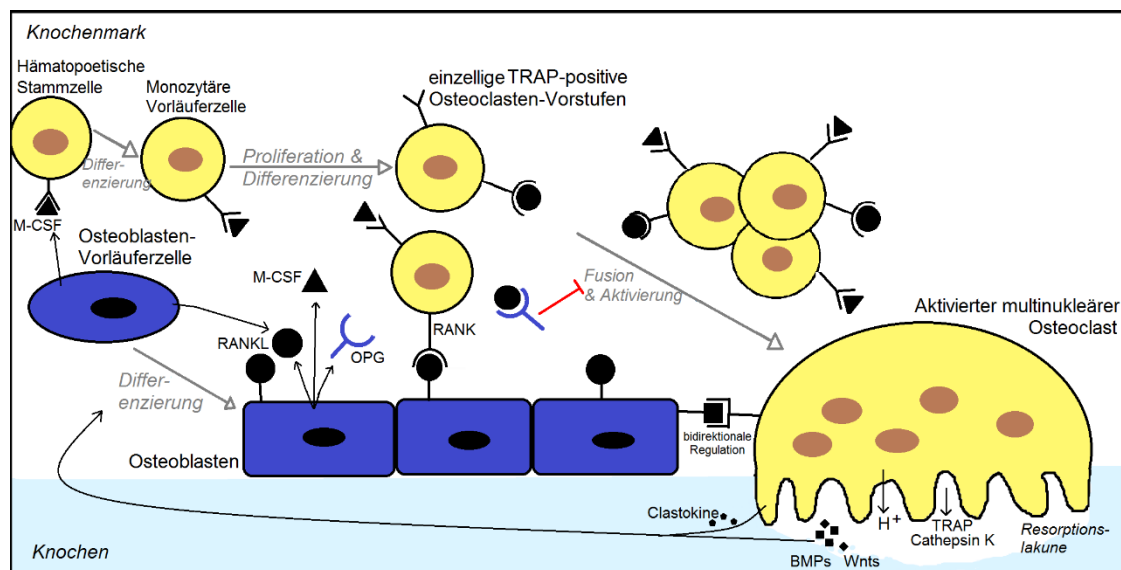


Abb. 3: Bidirektionale Regulation der Differenzierung von OC und OB.  
Die Abbildung wurde auf der Basis von Abbildungen aus verschiedenen Reviews erstellt (Boyle, et al. 2003, Kartsogiannis and Ng 2004, Khosla 2001, Teti 2013).

### 1.3 Bone Tissue Engineering

Trotz der beachtlichen Regenerationsfähigkeit des Knochen kann es durch degenerative Knochenerkrankungen wie Osteoporose, durch Verletzungen oder durch Knochenverluste aufgrund von chirurgischen Eingriffen zu Schäden kommen, die, wenn sie eine kritische Größe überschreiten, nicht mehr von selbst heilen können (Henkel, et al. 2013). Der Defekt muss dann mit einem Knochenersatzmaterial aufgefüllt werden.

Ein solches Material sollte neben allgemeinen Anforderungen betreffend Sicherheit, Unbedenklichkeit und Reproduzierbarkeit die drei Eigenschaften der Osteokonduktivität, Osteoinduktivität und Osteogenität aufweisen. Osteokonduktion ist als die Bildung von Knochensubstanz auf einer Oberfläche definiert. Ein osteokonduktives Material bietet ein Gerüst, das die Einwanderung und Anhaftung von Zellen begünstigt. Osteoinduktion ist der Vorgang, der die Osteogenese auslöst. Osteoinduktive Stoffe rekrutieren undifferenzierte Vorläuferzellen und stimulieren deren Differenzierung zu

Osteoprogenitoren. Osteogenese bezeichnet die Reifung von Osteoprogenitoren zu Osteoblasten, die in Folge Knochensubstanz bilden. Osteogenität ist die Fähigkeit zur Knochenbildung (Shrivats, et al. 2014).

Nur körpereigener Knochen erfüllt alle drei Anforderungen. Die Autotransplantation von körpereigenem Knochenmaterial gilt als Goldstandard in der Knochenersatztherapie. Allerdings ist die Verfügbarkeit begrenzt und die Gewebeentnahme bedeutet eine zusätzliche Belastung für den Patienten. Als zweite Wahl wird meist die Allotransplantation von Knochengewebe aus einer Spenderbank in Betracht gezogen. Das Spendergewebe wird einer standardisierten Bearbeitung unterzogen, bevor es transplantiert werden kann. Dabei gehen seine osteoinduktiven Eigenschaften weitgehend verloren. Zudem birgt die Transplantation von fremdem Gewebe das Risiko von Abstoßungsreaktionen und Infektionen (Shrivats, et al. 2014). Die Entwicklung einer optimalen Alternative, in Form von künstlichem Knochengewebe, ist Ziel des Bone Tissue Engineering.

Tissue Engineering ist ein interdisziplinäres Gebiet, das sich mit der künstlichen Herstellung von Gewebe zur Wiederherstellung, Erhaltung oder Verbesserung der natürlichen Gewebefunktion beschäftigt (Vacanti and Langer 1999).

Das Bone Tissue Engineering befasst sich mit der Konstruktion von Knochengewebe und soll helfen, den weltweit steigenden Bedarf an Knochenersatzmaterial zu decken. Ein vielversprechender und häufig verfolgter Ansatz ist die Kombination eines osteokonduktiven dreidimensionalen Gerüsts (Scaffold) mit osteogenen Zellen wie Osteoblasten oder auch Stammzellen und osteoinduktiven Biomolekülen wie knochenmorphogenetischen Proteinen (BMP). Die Einwanderung neuer Zellen, die Differenzierung zu Osteoblasten und der Aufbau neuen Knochengewebes soll gefördert, und die Vaskularisation ermöglicht werden. Der Abbau des Scaffolds sollte möglichst simultan zum Gewebeaufbau erfolgen, da es ansonsten zur Bildung von Narbengewebe kommen kann. Idealerweise soll wieder funktionell-gesunder Knochen, ohne zurückbleibende Fremdkörper entstehen (Kolk, et al. 2012).

### 1.3.1 Scaffolds im Bone Tissue Engineering

Das Scaffold ist ein dreidimensionales Gerüst und dient als temporäre mechanische Stütze, aber auch zur Förderung der Migration, Proliferation und Differenzierung gewebespezifischer Zellen. Es ersetzt sozusagen die extrazelluläre Matrix. Eine hochporöse Struktur soll die Einwanderung von Zellen und den Transport von Gasen, Nährstoffen und Abfallprodukten ermöglichen. Seine Oberfläche sollte ein idealer Boden für die Anhaftung und das Wachstum der gewünschten Zellen sein. Das Material muss biokompatibel und bioabbaubar sein. Die Degradation soll steuerbar sein und in Abstimmung mit Zellwachstum und Gewebebildung erfolgen. Die mechanischen

Eigenschaften sollten dem zu ersetzenden Gewebe entsprechen. Besonders im Bone Tissue Engineering muss das Scaffold eine ausreichende Stabilität und Festigkeit aufweisen, um die Stützfunktion des Knochengewebes erfüllen zu können (Hutmacher 2000).

Die dreidimensionale Struktur des Scaffolds hat einen wesentlichen Einfluss auf seine osteokonduktiven, osteoinduktiven und osteogenen Eigenschaften. Die äußere Form und Struktur des Scaffolds ist für eine optimale Integration in das umliegende Gewebe entscheidend. Das Scaffold muss dafür exakt an die Form des auszufüllenden Defekts angepasst werden. Von zentraler Bedeutung für die Einwanderung und das Wachstum von Zellen ist aber die innere Mikroarchitektur des Scaffolds (Henkel, et al. 2013).

### 1.3.2 Additive Manufacturing

Neuere Verfahren, die unter dem Begriff Additive Manufacturing (AM) zusammengefasst werden, erlauben die Fertigung präzise geformter Konstrukte mit einem inneren Netzwerk aus Poren und Kanälen von definierter Größe und Geometrie. Diesen Verfahren gemeinsam ist die rasche Fabrikation von Objekten anhand eines digitalen dreidimensionalen Modells. Das Modell wird entweder mittels computer-assistierten Design-Programmen (CAD) manuell entworfen, oder anhand von Daten aus bildgebenden diagnostischen Verfahren wie Magnetresonanz- oder Computertomographie erstellt. Das Objekt wird dann direkt anhand des CAD-Modells computergesteuert aufgebaut. So können unter anderem Photopolymere in Form gebracht werden. AM ermöglicht die einfache Herstellung detailgenauer personalisierter Implantate (Henkel, et al. 2013).

Die Stereolithographie gilt als das erste Additive Manufacturing Verfahren. Objekte werden dabei in einem Flüssigbad aus photopolymerisierbarem Material durch gezielte UV-Härtung schichtweise aufgebaut. Das CAD-Modell wird mithilfe von speziellen Programmen horizontal in zweidimensionale Schichten zerlegt. Ein computergesteuerter Laser oder digitaler Lichtprojektor strahlt das untere Schnittbild auf die Oberfläche des Bades. Dort, wo die Strahlung auf das Photopolymer trifft, wird dieses in einer dünnen Schicht von ca. 25 – 100 µm ausgehärtet. Nach der Photopolymerisation einer Schicht, wird das Objekt mit seiner Trägerplattform abgesenkt und wieder mit Vorpolymerlösung bedeckt, um die nächste Schicht darauf aufzubauen. Mithilfe der Stereolithographie ist die Fabrikation von Strukturen mit einer Auflösung in der Größenordnung von 20 µm möglich (Melchels, et al. 2010).

Eine noch höhere Auflösung bis in den Submikrometerbereich, kann mithilfe der 3D-Laserlithographie erreicht werden, die sich den Mechanismus der Zwei- oder Mehrphotonen-Absorption zunutze macht. Der Unterschied zur Ein-Photonenabsorptions-Polymerisation liegt in der Verwendung von infraroter anstelle von ultravioletter Strahlung

zur Aktivierung. Das Verfahren nutzt ultrakurze Laserimpulse, deren Ein-Photonen-Energie unter der Absorptionsschwelle der Präpolymerlösung liegt. Wird der Laserstrahl stark fokussiert, finden innerhalb des Fokusvolumens Mehrphotonen-Absorptionsprozesse statt, nicht aber entlang des Strahlengangs durch die photopolymerisierbare Lösung. Dies erlaubt die strahlungsinduzierte Polymerisation in der Tiefe einer flüssigen Monomerlösung, ohne dabei Bereiche außerhalb des Fokus zu verfestigen. Wie mit einem Stift, werden mit dem Laserstrahl Objekte direkt in die Lösung „geschrieben“. Dieses echte 3D-Verfahren ermöglicht die einfache Herstellung hochkomplexer präzise strukturierter Scaffolds (Selimis, et al. 2015).

### 1.3.3 Zellverkapselte Hydrogele

Um ein zellbeladenes Scaffold zu erhalten, können Zellen entweder auf einem vorgefertigten porösen Scaffold ausgesät oder während der Fabrikation direkt ins Scaffold eingebaut werden. Während bei der ersten Strategie nur das Endprodukt biokompatibel und zellfreundlich sein muss, muss bei der direkten Zellverkapselung der gesamte Herstellungsprozess unter zytokompatiblen Bedingungen ablaufen. Dieser Ansatz bietet aber Vorteile, da Zellen gezielt und gleichmäßig verteilt in das Polymernetzwerk eingebaut werden können (Nicodemus and Bryant 2008).

Hydrogele sind attraktive Biomaterialien im Tissue Engineering. Durch die hohe Quellfähigkeit mit Wasser und die netzartige Struktur, die den Transfer von Gasen und Nährstoffen ermöglicht, weisen Hydrogele eine hohe Ähnlichkeit zur natürlichen extrazellulären Matrix auf. Für die Verkapselung in ein photopolymerisierbares Hydrogel werden Zellen zunächst in einer wässrigen Präpolymerlösung suspendiert. Diese Lösung enthält die Monomere und den Photoinitiator. Durch UV-Aktivierung kommt es zur Gelbildung. Die makromolekularen Ketten werden über kovalente Bindungen miteinander quervernetzt. Das gebildete Hydrogel muss eine Struktur aufweisen, die das Zellwachstum und die Gewebebildung ermöglicht. Parallel dazu soll der Abbau des Scaffolds erfolgen, sodass die neu synthetisierte extrazelluläre Matrix das Hydrogel ersetzt. Die Komponenten der Vorpolymerlösung, der Polymerisationsprozess sowie gebildete Neben- und Abbauprodukte müssen zytokompatibel sein (Nicodemus and Bryant 2008).

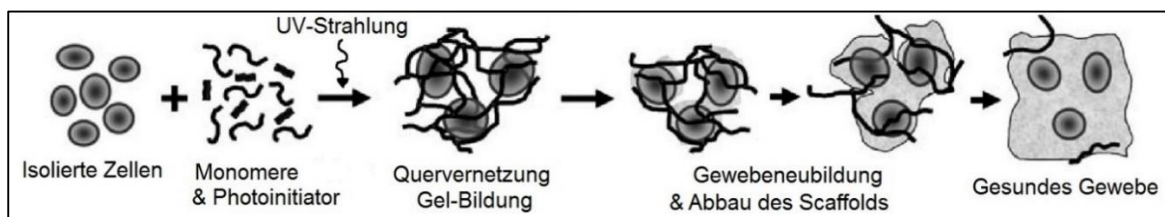


Abb. 4: Verkapselung von Zellen in ein Hydrogel (Nicodemus and Bryant 2008).



Die Vernetzung über den Mechanismus der Photopolymerisation bietet gegenüber thermischen oder Redox-Mechanismen eine Reihe von Vorteilen. Der Prozess ist vergleichsweise mild. Die Konversion der viskos-flüssigen Präpolymerlösung in ein quervernetztes Gel erfolgt innerhalb von Sekunden bis wenigen Minuten. Die schnelle Gelbildung ist bei der Zellverkapselung entscheidend für eine homogene Verteilung der Zellen im Material. Dauert der Prozess zu lange, sinken die Zellen in der Vorpolymerlösung zum Boden ab. Zudem sollten die Zellen der schädlichen UV-Strahlung nur möglichst kurz ausgesetzt werden (Nguyen and West 2002). Über die Konzentration an Monomeren und die Anzahl an photoreaktiven Funktionalitäten kann der Vernetzungsgrad eingestellt werden (Occhetta, et al. 2015). Dieser bestimmt, zusammen mit der Wahl der Monomere, wichtige Materialeigenschaften wie Quellvermögen, Diffusionsfähigkeit, mechanische Festigkeit und Degradationsverhalten (Nicodemus and Bryant 2008).

Die Vorpolymerlösung kann injiziert und *in situ* direkt am Ort des Gewebedefekts polymerisiert werden. Eine solche Implantation kann minimalinvasiv durchgeführt werden. Das Polymer fügt sich exakt in das umliegende Gewebe ein und der komplizierte Formgebungsprozess entfällt (Nicodemus and Bryant 2008). Zellbeladene Hydrogele können aber auch mithilfe von 3D-Druck entsprechend einem Computermodell geformt und strukturiert werden. Bioprinting ist der Aufbau gewebeähnlicher Strukturen durch die Positionierung von Biomolekülen, biologischen Materialien und lebenden Zellen mittels 3D-Druckverfahren (Derby 2008). Ein Verfahren zum Bioprinting von zellbeladenen photopolymerisierbaren Hydrogelen ist die bereits beschriebene Stereolithographie (Melchels, et al. 2010). Aber auch mithilfe eines gewöhnlichen Tintenstrahldruckers und simultaner Photopolymerisation können künstliche Gewebe gefertigt werden. In einem Heizelement werden winzige Tintentröpfchen gebildet, die anhand eines digitalen Musters exakt auf einer Grundlage platziert werden. Die Biotinte, die eine Suspension der Zellen in einer Vorlösung des photopolymerisierbaren Matrixmaterials enthält, wird nur für sehr kurze Zeit leicht erhitzt, wodurch eine minimale Schädigung der Zellen gewährleistet wird. Jede Schicht wird durch UV-Bestrahlung ausgehärtet bevor die nächste Schicht aufgedruckt wird. Gao et al. haben auf diese Weise mit humanen mesenchymalen Stammzellen beladene Hydrogel-Konstrukte mit vielversprechenden Eigenschaften für die Anwendung in der Regenerationsmedizin von Knochen und Knorpeln hergestellt (Gao, et al. 2015).

## 1.4 Photoinitiatoren

Photoinitiatoren sind Substanzen, die bei Einwirkung von Licht zur Polymerisation oder Quervernetzung von photoaktivierbaren Monomeren bzw. Makromolekülen führen.

Je nach Art des Photoinitiators, werden bei der Aktivierung kationische oder Radikal-Verbindungen gebildet. Diese reaktiven Spezies lösen durch Reaktion mit den multifunktionellen Monomeren die Polymerisationsreaktion aus (Andrzejewska 2001).

### 1.4.1 Aktivierung des Photoinitiators

Bei der Absorption von Strahlung geht der Photoinitiator in einen energetisch angeregten Triplet-Zustand über. Oft wird UV-Strahlung zur Aktivierung verwendet. Dabei reicht die Absorption eines einzelnen Photons aus, um die Energiebarriere zwischen dem Grundzustand und dem angeregten Zustand zu überwinden. Der Mechanismus wird folglich als Ein-Photonenabsorption bezeichnet. Eine neuere Technik ist die Aktivierung mit naher Infrarotstrahlung. Die Anregung erfolgt dabei über den Mechanismus der Zwei- oder Mehrphotonen-Absorption. Der Photoinitiator wird durch die simultane Absorption von zwei oder mehr Photonen in einen hochenergetischen Zustand angeregt. Durch Absorption des ersten Photons wird das Molekül auf ein sehr kurzlebiges virtuelles Zwischenniveau gehoben. Nur wenn ein zweites bzw. weitere Photonen absorbiert werden bevor das Molekül innerhalb von Femtosekunden-Bruchteilen in den Grundzustand zurückkehrt, wird die Energiedifferenz zum Erreichen des Triplet-Zustands überwunden. Die Energie der absorbierten Photonen ist in Summe gleich der Energiedifferenz zwischen dem Grundzustand und dem angeregten Triplet-Zustand (Sun and Kawata 2006).

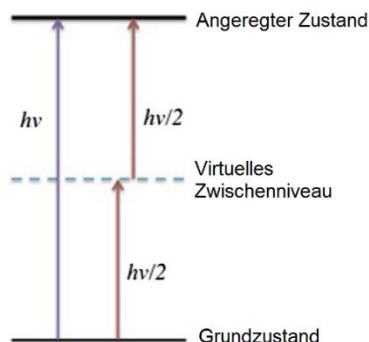


Abb. 5: Ein- und Zwei-Photonenabsorption (Selimis, et al. 2015).

Gegenüber der Anregung mit UV-Licht bietet die Aktivierung mit langwelliger IR-Strahlung über die Zwei-Photonenabsorption den Vorteil einer zielgenauen Photopolymerisation, die nur im Fokus des Lasers stattfindet. Die höhere Eindringtiefe der Strahlung in die Vorpolymerlösung ermöglicht eine echte 3D-Fertigung, im Gegensatz zur schichtweise arbeitenden UV-Photopolymerisation (Sun and Kawata 2006).

### 1.4.2 Mechanismus der Radikalbildung

Ausgehend von seinem hochenergetischen Triplet-Zustand bildet der Photoinitiator reaktive Spezies, die dann die Polymerisationsreaktion initiieren. Grundsätzlich wird zwischen ionischer und radikalischer Photopolymerisation unterschieden. Im Falle der ionischen Photopolymerisation werden bei der Aktivierung des Initiators Protonensäuren generiert, die durch Epoxidöffnung mit den Monomeren reagieren. Wesentlich größere Bedeutung hat aber die radikalische Photopolymerisation. Die Radikalbildung kann über unterschiedliche Reaktionen erfolgen. Die meisten Photoinitiatoren lassen sich in zwei Klassen einteilen. Photoinitiatoren der Klasse 1 werden homolytisch in zwei Radikale gespalten. Bei den Photoinitiatoren der Klasse 2 erfolgt die Radikalbildung durch Wasserstoffabstraktion von einem Donormolekül. Photoinitiatoren der Klasse 1 sind aromatische Carbonylverbindungen, die bei der Photofragmentierung durch  $\alpha$ -Spaltung in ein Paar von Radikalen zerfallen. Beide Radikale können zur Initiation der Polymerisationsreaktion beitragen. Zu dieser Klasse gehören unter anderem Benzoinderivate, Benzilketale, Hydroxyalkylphenone,  $\alpha$ -Aminoketone und Acylphosphinoxide (Andrzejewska 2001).

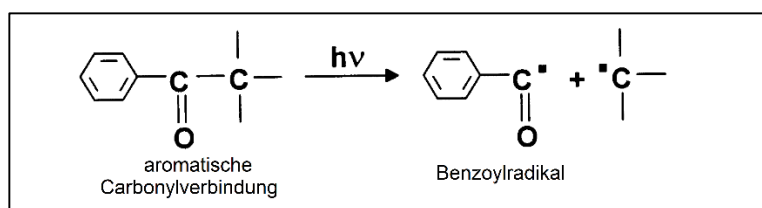


Abb. 6: Photoinitiatoren der Klasse 1.  
Die Radikalbildung erfolgt durch homolytische  $\alpha$ -Spaltung (Decker 1996).

Photoinitiatoren der Klasse 2 sind typischerweise aromatische Ketone, die als Photosensibilisator fungieren. Sie benötigen Wasserstoff-Donormoleküle als Co-Initiatoren. Als Wasserstoff-Donoren werden häufig tertiäre Amine verwendet. Bei der Wasserstoffabstraktion durch den energetisch angeregten Sensibilisator entsteht dann ein  $\alpha$ -Aminoalkylradikal. Das Donormolekül-Radikal initiiert die Kettenreaktion. Das aromatische Ketylradikal ist gegenüber Vinylgruppen inaktiv und reagiert über Radikalkupplungsreaktionen ab. Beispiele für Photoinitiatoren der Klasse 2 sind Benzophenon, Xanthone, Thioxanthone, und Campherchinon (Andrzejewska 2001).

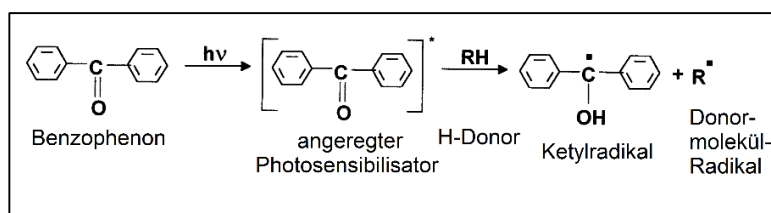


Abb. 7: Photoinitiatoren der Klasse 2.  
Die Radikalbildung erfolgt durch H-Abstraktion von einem Donormolekül (Andrzejewska 2001).

### 1.4.3 Radikalische Kettenpolymerisation

Die im Tissue Engineering am häufigsten angewendete Form der Photopolymerisation ist die radikalische Polymerisation von mehrfach (meth)acrylierten Makromolekülen. Die Polymerisation läuft nach dem Mechanismus der radikalischen Kettenreaktion ab. Die bei Lichteinwirkung vom Photoinitiator generierten Radikale reagieren mit den Monomeren durch radikalische Addition an C=C-Doppelbindungen. In einer Initiationsreaktion wird so ein Primärradikal gebildet. Die Radikalbildung setzt sich während der Vernetzung über die Reaktion mit ungesättigten Gruppen der multifunktionellen Monomere fort. Die makromolekularen Ketten werden dabei untereinander über kovalente Bindungen vernetzt. Reagieren zwei Radikale miteinander, kommt es zum Abbruch der Kettenreaktion (Ifkovits and Burdick 2007).

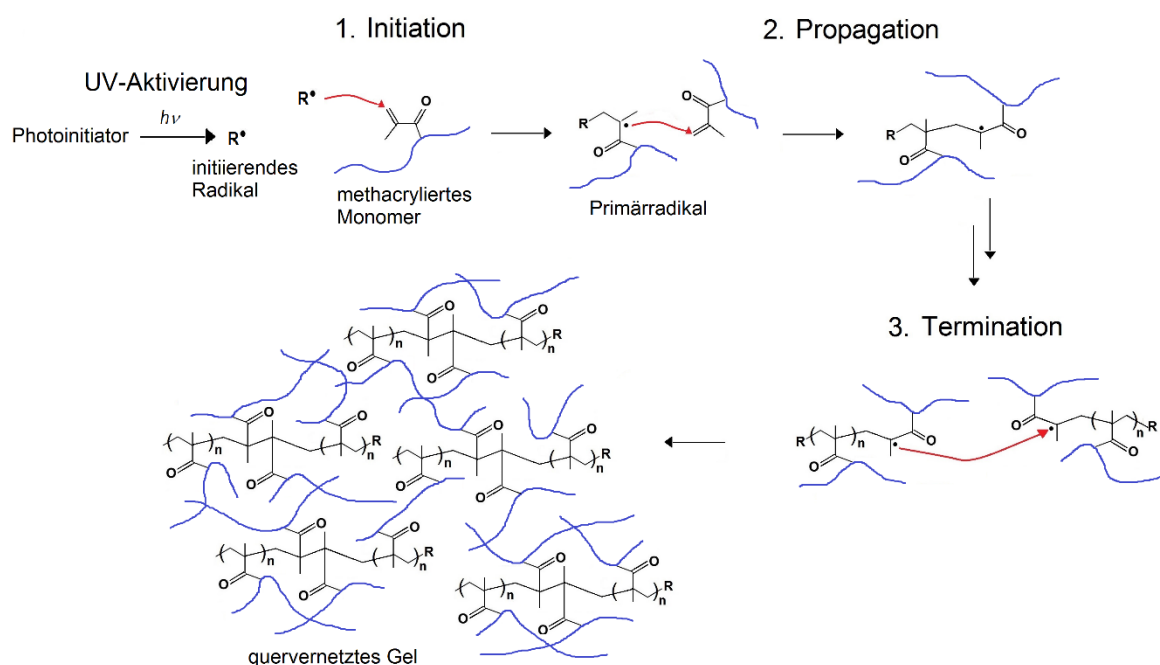


Abb. 8: Ablauf der photoaktivierten radikalischen Kettenpolymerisation. Die Abbildung wurde in Anlehnung an (Yue, et al. 2015) erstellt.

### 1.4.4 Auswahlkriterien für Photoinitiatoren

Ein effizienter Photoinitiator soll eine hohe Absorption im Emissionsbereich der Lichtquelle aufweisen und die initiiierende Spezies mit einer möglichst hohen Quantenausbeute generieren (Decker 1996). Die meisten gebräuchlichen Photoinitiatoren wurden für die Aktivierung mit UV-Licht entwickelt. Ihre Absorptionsmaxima liegen im Bereich von 300 nm. Bei der Anwesenheit von Zellen sollte Licht einer Wellenlänge von über 350 nm zur Anregung verwendet werden, da bei höher energetischer Strahlung zu große Zellschäden erwartet werden. Die meisten kommerziellen Photoinitiatoren zeigen für

dieses Spektrum allerdings nur eine geringe Absorptionssensitivität. Um eine optimale Vernetzung zu erreichen müssen daher relativ hohe Konzentrationen eingesetzt werden (Mironi-Harpaz, et al. 2012). Für die Anwendung zur Zwei-Photonenabsorptionspolymerisation sollte der Photoinitiator einen möglichst hohen Zwei-Photonenabsorptionsquerschnitt aufweisen, ein Maß für die Fähigkeit zur Zwei-Photonenabsorption. Die meisten gebräuchlichen Photoinitiatoren können zwar auch zur Zwei-Photonenabsorption verwendet werden, weisen aber einen sehr geringen Photonenabsorptionsquerschnitt auf. Für ihre Aktivierung mit langwelliger IR-Strahlung sind daher eine hohe Strahlungsintensität und Expositionsdauer nötig (Schafer, et al. 2004).

Besonders für die Verkapselung von Zellen in ein Biomaterial ist eine schnelle und hoch effiziente Polymerisation von Bedeutung, um eine homogene Verteilung der Zellen im Gel zu erreichen und die Belastung der Zellen möglichst gering zu halten (Baroli 2006). Eine höhere Strahlungsintensität führt zu schnelleren Polymerisationsraten. Allerdings können dadurch Zellen und Biomoleküle geschädigt werden. Für Anwendungen im Tissue Engineering sollten Photoinitiatoren eine gewisse Wasserlöslichkeit aufweisen. Die meisten Substanzen sind leider nur sehr schlecht in wässrigen Medien löslich (Mironi-Harpaz, et al. 2012).

Bei der Fertigung von Biomaterialien, die zur Anwendung im menschlichen Körper gedacht sind, muss die Biokompatibilität und Unbedenklichkeit der eingesetzten Substanzen gewährleistet sein. Photoinitiatoren sind nur in geringen Konzentrationen von 0,0125 % bis 2 % in den verwendeten Formulierungen enthalten, dennoch muss ihre Verträglichkeit gesichert sein. Sowohl die gelöste Ausgangssubstanz als auch die bei der Aktivierung gebildeten Produkte müssen in der verwendeten Konzentration zytokompatibel sein, um die Verkapselung von lebenden Zellen zu ermöglichen. Eventuell aus dem Implantat gelöste Substanzen dürfen weder lokale, noch systemische Toxizität zeigen (Baroli 2006).

### 1.5 Photopolymerisierbare Materialien im Tissue Engineering

Im Gegensatz zu anderen Anwendungen der Photopolymerisation können im Tissue Engineering keine niedermolekularen reaktiven Monomere polymerisiert werden, da diese Verbindungen in der Regel zytotoxisch sind. Zur Herstellung biokompatibler Hydrogele werden daher üblicherweise multifunktionelle Makromoleküle miteinander vernetzt (Nguyen and West 2002).

Eine Reihe von Makromolekülen, natürlichen und synthetischen Ursprungs, kann durch chemische Modifikation der Photopolymerisation zugänglich gemacht werden. Dazu werden photoreaktive Vinylgruppen, meist Acrylat oder Methacrylat, eingeführt (Nicodemus and Bryant 2008).

Photopolymerisierbare Hydrogele natürlichen Ursprungs haben den Vorteil einer hohen Biokompatibilität. Nach Derivatisierung mit reaktiven Gruppen können zum Beispiel Proteine wie Collagen oder Gelatine oder Polysaccharide wie Hyaluronsäure, Agarose, Chitosan oder Chondroitinsulfat photopolymerisiert werden. Beispiele für synthetische Bausteine sind Polymere wie Polyethylenglykol (PEG), Polyvinylalkohol (PVA), Polylactid, und Polycaprolacton, die mit (Meth)acrylgruppen derivatisiert werden, und Polypropylen Fumarat. Es können auch Co-Polymere aus zwei oder mehr Komponenten realisiert werden, um die Vorteile verschiedener Materialien zu kombinieren. Vor allem Hydrogele, die aus Bestandteilen der natürlichen extrazellulären Matrix, wie Collagen aufgebaut sind, stellen eine gute Wachstums Umgebung für Zellen dar. Synthetische Polymere können mit bioadhäsiven Gruppen, wie der Peptidsequenz RGD (Arginin-Glycin-Asparaginsäure) derivatisiert werden, um die Anhaftung von Zellen zu verbessern (Short, et al. 2015). Die Wahl der Monomere bestimmt zusammen mit der Anzahl an Quervernetzungen Materialeigenschaften, wie die mechanische Festigkeit oder das Degradationsverhalten. Monomere mit niedrigerem Molekulargewicht bilden dichtere Netze aus, was die Steifheit erhöht und den Abbau verlangsamt (Ifkovits and Burdick 2007). Eine Möglichkeit, um die Degradation des Scaffolds an die Gewebeneubildung anzupassen, ist der Einbau Matrixmetalloproteinase-sensitiver Sequenzen in das Hydrogel. Matrixmetalloproteinasen sind physiologisch sezernierte Enzyme, die durch den Abbau von Proteinen, wie Kollagen die Regeneration und den Umbau von Gewebe ermöglichen (Short, et al. 2015).

### 1.6 Zellschäden aufgrund der Photopolymerisation

Obwohl der Prozess der Photopolymerisation relativ mild ist, werden Zellen dabei immer in einem gewissen Ausmaß beeinträchtigt. Ultraviolette Strahlung führt zu oxidativen Zellschäden über die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und freier Radikale. Auch bei der Polymerisationsreaktion selbst werden Radikale generiert. Freie Radikale können Biomoleküle attackieren und dabei Schäden an Zellmembranen, Nukleinsäuren und Proteinen anrichten, die in weiterer Folge zum Zelltod führen können (Williams, et al. 2005). Aber auch die nicht-aktivierten Photoinitiator-Substanzen und eventuell entstehende Nebenprodukte können toxische Wirkung haben. Zudem muss der Photoinitiator oft mithilfe potentiell schädlicher organischer Solventien in Lösung gebracht werden. Auch wenn es während dem Polymerisationsprozess durch die Lichtquelle oder die frei werdende Reaktionsenergie zu einer starken Wärmebildung kommt, kann dies den Zellen Schaden zufügen (Nguyen and West 2002). Der Temperaturanstieg während der exothermen radikalischen Polymerisationsreaktion kann über die Intensität der Anregungsstrahlung reguliert werden. Dabei muss ein Kompromiss zwischen minimaler Wärmeproduktion bei niedriger und hoher Polymerisationseffizienz bei hoher

Strahlungsintensität gefunden werden (Burdick, et al. 2001).

Unterschiedliche Zelltypen sind gegenüber UV-Strahlung und Photoinitiatoren nicht gleich stark empfindlich. Ein möglicher Grund für die unterschiedliche Sensitivität von Zellen gegenüber oxidativen Einflüssen sind die unterschiedlich ausgeprägte Expression von antioxidativen Enzymen und von Rezeptoren für antioxidative Stoffe, wie Melatonin. Die Proliferationsrate der Zellen scheint einen großen Einfluss auf ihre Empfindlichkeit gegenüber schädlichen Einwirkungen zu haben. Schneller proliferierende Zellen werden im Allgemeinen stärker beeinträchtigt (Williams, et al. 2005).

Zwischen den verschiedenen Photoinitiatoren gibt es erhebliche Unterschiede in der Toxizität. Hydrophobere Substanzen haben aufgrund ihrer Membrangängigkeit im Allgemeinen ein höheres Schädigungspotential (Williams, et al. 2005).

Die Wahl des richtigen Photoinitiator-Systems muss für die jeweilige Anwendung individuell getroffen werden.

### 1.7 In vitro Modelle für Studien an Knochenzellen

Um die Zytokompatibilität von Stoffen mit Knochenzellen zu testen, können verschiedene Zellkultur-Modelle verwendet werden, die sich in der *in vitro* Forschung der Knochenbiologie etabliert haben. Primär isolierte Zellen verschiedener Spezies, immortalisierte und transformierte Zelllinien sowie induzierte Zellen aus pluripotenten Stammzellen können, im Labor kultiviert, Aufschluss über Prozesse im Knochen und ihre Beeinflussung durch zugeführte Substanzen geben (Czekanska, et al. 2014).

#### 1.7.1 Zelllinien versus Primärzellen

Die Verwendung etablierter Zelllinien ist aufgrund ihrer unlimitierten Verfügbarkeit, der einfachen Kultivierung und der Homogenität der Zellpopulationen beliebt. Allerdings sind Beobachtungen an Zelllinien nur bedingt repräsentativ. Bei jeder Passagierung verdrängt die am schnellsten proliferierende Subpopulation alle anderen Zellen. Die so selektionierten Zellen weisen dann nicht mehr alle typischen Eigenschaften der Zellen eines spezifischen Gewebes auf. Zwar gelten Zelllinien als phänotypisch relativ stabil, doch wurde gezeigt, dass sich Zellen niedriger und höherer Passage sehr wohl in der Ausprägung spezifischer Eigenschaften unterscheiden können. Mithilfe von primären Zellen lässt sich das *in vivo* Zellverhalten besser imitieren (Czekanska, et al. 2014). Als Primärzellkulturen werden *in vitro* gezüchtete Zellen bezeichnet, die direkt aus einem Organismus entnommen wurden. Schon nach der ersten Subkultivierung handelt es sich, streng genommen, um eine Zelllinie (Schaeffer 1990).

Aufgrund der erheblichen phänotypischen Unterschiede zwischen den Spezies sind Studien an Humanzellen zu bevorzugen. So können die gewonnenen Erkenntnisse besser

in die klinische Anwendung übertragen werden. Primär isolierte humane Osteoblasten behalten unter richtigen Kulturbedingungen ihren differenzierten Phänotyp bei, stellen jedoch eine heterogene Zellpopulation dar. Die gewonnenen Zellen unterscheiden sich in ihrem Phänotyp je nach Lokalisation des entnommenen Gewebes. Auch Spendereigenschaften, vor allem Alter und Geschlecht, bestimmen die Charakteristika der isolierten Zellen (Czekanska, et al. 2012). Die Methode der Zellisolation nimmt ebenso Einfluss auf Proliferationsrate, Genexpression und Proteinsynthese der erhaltenen Osteoblasten (Jonsson, et al. 2009).

Einen Kompromiss stellen vielleicht primäre Zellen aus tierischem Gewebe dar. Sie sind wesentlich leichter verfügbar und haben gegenüber humanen Primärzellkulturen auch den Vorteil, dass durch die Selektion der Tiere homogenere Zellpopulationen erreicht werden können. Die Tiere können nach Alter, Geschlecht und Gewicht ausgewählt und für die Isolation einer großen Menge an Zellen aus einer homogenen Gruppe herangezogen werden. Im Gegensatz zu humanem Material, dessen Entnahme meist auf Röhrenknochen beschränkt ist, kann Gewebe aus beliebigen Stellen des Skeletts isoliert werden. Aufgrund der speziesbezogenen Unterschiede können Aussagen über das Verhalten von Zellen tierischen Ursprungs allerdings nur bedingt auf den Menschen übertragen werden (Czekanska, et al. 2012).



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Versuchsaufbau

Als Zellkultur-Modelle dienten primäre Maus-Osteoblasten, humane Osteoblasten und monozytäre Vorstufen muriner Osteoklasten. Die primären Maus-Osteoblasten standen bereits, nach einer früheren Isolierung in flüssigem Stickstoff eingelagert, zur Verwendung bereit. Die humanen Osteoblasten sowie die Osteoklasten-Vorläuferzellen mussten erst isoliert werden. Die Fähigkeit der isolierten Osteoklasten-Vorstufen zur Ausdifferenzierung zu mehrkernigen Osteoklasten wurde geprüft.

Die Zytokompatibilität der Photoinitiatoren Irgacure 2959, Irgacure 369 und BA 740 mit Knochenzellen wurde untersucht. Sowohl der Effekt der nicht-aktivierten Substanzen, als auch der Effekt nach UV-Aktivierung wurden getestet. Photoinitiatoren wurden dem Kulturmedium nach der Zellaussaat in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt. Als Kontrolle wurden Zellen in Kulturmedium mit der gleichen Menge an reinem Lösungsmittel, ohne Photoinitiator, sowie in Kulturmedium ohne weiteren Zusatz mitgeführt. Für jeden Versuch wurden eine Platte mit und eine Platte ohne UV-Aktivierung parallel behandelt, kultiviert und untersucht. Die Viabilität der Osteoblasten wurde am Tag 2, die der Osteoklasten-Vorstufen am Tag 5 nach der Aussaat evaluiert.

Zusätzlich wurde ein möglicher Einfluss des Antioxidans Ascorbinsäure-2-phosphat auf das Überleben der Osteoblasten untersucht. Dazu wurden Maus- und humane Osteoblasten jeweils mit und ohne Ascorbinsäure-Zusatz zum Kulturmedium mit UV-Licht und Irgacure 2959 behandelt und die Viabilität der beiden Gruppen verglichen.

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen Proliferationsrate und Sensitivität der Osteoblasten zu untersuchen, wurden in einer weiteren Versuchsreihe Maus- und humane Osteoblasten ausgesät und acht Tage lang kultiviert. Die Zellzahl wurde täglich ermittelt und daraus die Generationszeit berechnet.

Bei allen Experimenten umfasste jede Behandlungs- bzw. Kontrollgruppe drei Wells einer Zellkulturplatte. Jeder Versuch wurde zweimal durchgeführt, um die Ergebnisse zu bestätigen. Bei abweichenden Resultaten wurde der Versuch nochmals wiederholt und die übereinstimmenden Ergebnisse aus zwei Versuchen als gesichert betrachtet.

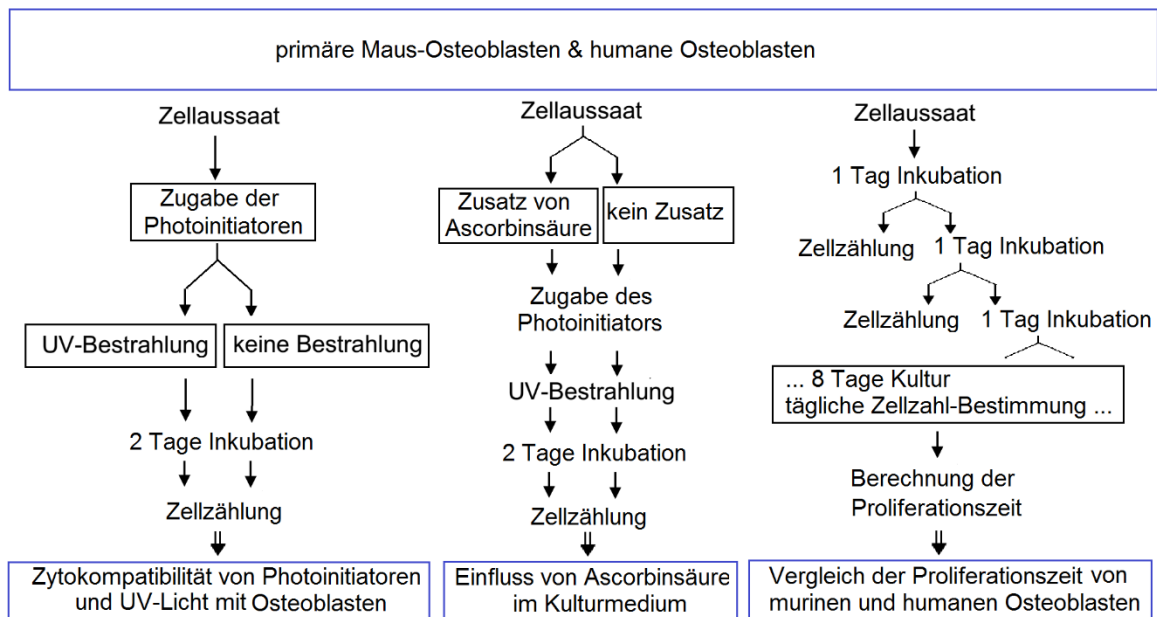


Abb. 9: Übersicht über die durchgeführten Untersuchungen an Osteoblasten.

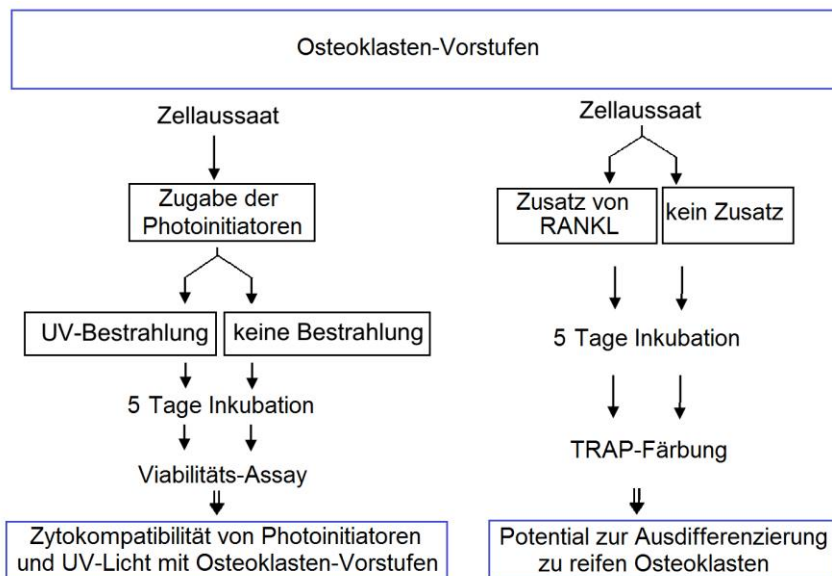


Abb. 10: Übersicht über die durchgeführten Untersuchungen an OC-Vorstufen.

## 2.2 Geräte

| Bezeichnung                                          | Hersteller                                                                    |
|------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| Analysenwaage MC 210 P                               | Sartorius, Deutschland                                                        |
| Autoklav SX-300E                                     | Tomy Digital Biology, Japan                                                   |
| CASY TT Cell Counter & Analyzer                      | OLS OMNI Life Science, Deutschland                                            |
| Inkubator HERA cell 240                              | Heraeus, USA                                                                  |
| Lichtmikroskop H550S                                 | Nikon TMS, Japan                                                              |
| Magnetrührer Ikamag RCT                              | Janke & Kunkel, Deutschland                                                   |
| Mikroliterpipetten                                   | Pipetman, Gilson, Frankreich<br>Finnpipette Digital ACL, Labsystems, Finnland |
| Mikroskop Kamera, ProgRes Speed XT Core5             | Jenoptik, Deutschland                                                         |
| pH-Meter, 713                                        | Metrohm, Schweiz                                                              |
| Pipetboy                                             | Integra Biosciences, Deutschland                                              |
| Scanner Epson Perfection 1200PHOTO                   | Epson, Japan                                                                  |
| Schüttelwasserbad 1083                               | GFL, Deutschland                                                              |
| Schüttler Swip                                       | Edmund Bühler, Deutschland                                                    |
| 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                                                |
| UV-Crosslinker CL-1000L, UVP                         | Analytik Jena, Deutschland                                                    |
| Vortex Genie 2                                       | Bender & Hobein, Deutschland                                                  |
| Zentrifuge Z323 K                                    | Hermle, Deutschland                                                           |

Tabelle 1: Liste der verwendeten Geräte

## 2.3 Materialien

| Bezeichnung                           | Firma                         |
|---------------------------------------|-------------------------------|
| 24 Well-Gewebekulturplatten, Cellstar | Greiner Bio-One, Österreich   |
| 96 Well-Gewebekulturplatte, Cellstar  | Greiner Bio-One, Österreich   |
| CASYCup                               | Roche Diagnostics, Österreich |
| Cell strainer, Falcon 70 µm Nylon     | Corning, USA                  |
| Einmal Injektionskanüle 27G, 0,4x20mm | BD, Irland                    |
| Glaspipetten                          | Brand, Deutschland            |

|                                                                                |                                                              |
|--------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| Kryoröhrchen                                                                   | Simport, Kanada                                              |
| Luer-Einmal-Spritzen, 1 ml                                                     | Henry Schein, USA                                            |
| Luer-Einmal-Spritzen, 10 ml                                                    | BD, USA                                                      |
| Mikrozentrifugenröhrchen, 2 ml                                                 | Brand, Deutschland                                           |
| Pasteurpipetten Glas                                                           | LLG Labware, Deutschland                                     |
| Pasteurpipetten Plastik                                                        | Greiner Bio-One, Österreich                                  |
| Petrischalen                                                                   | Iwaki, Japan<br>Sterilin, UK                                 |
| Pipettenspitzen                                                                | VWR International, Österreich<br>Greiner Bio-One, Österreich |
| Sterilfilter Millex-LG, 0,20 µm, PTFE<br>Sterilfilter Millex-GV, 0,22 µm, PVDF | Merck Millipore, Deutschland                                 |
| Zentrifugenröhrchen, Cellstar (50 ml)                                          | Greiner Bio-One, Österreich                                  |

Tabelle 2: Liste der verwendeten Materialien

## 2.4 Substanzen

| <b>Substanz</b>                                                     | <b>Firmenname</b>                                                                 |
|---------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| 2-Hydroxy-4'-(2-hydroxyethoxy)-2-methylpropiophenon (Irgacure 2959) | Sigma-Aldrich                                                                     |
| Ammoniumhydroxidlösung                                              | Sigma-Aldrich                                                                     |
| BA 740                                                              | Geschenk des Instituts für Bioprozess- und Analysenmesstechnik e.V. Heiligenstadt |
| BSA                                                                 | Roth                                                                              |
| CaCl <sub>2</sub>                                                   | Sigma-Aldrich                                                                     |
| CASYton                                                             | Roche                                                                             |
| Cell Titer 96® AQueous One Solution Reagent                         | Promega                                                                           |
| Dexamethason                                                        | Sigma-Aldrich                                                                     |
| DMEM                                                                | Gibco Life Technologies                                                           |
| DMSO                                                                | Sigma-Aldrich                                                                     |
| EDTA                                                                | Sigma-Aldrich                                                                     |
| Ethanol                                                             | AustrAlco                                                                         |
| Fast Red Violet LB Salt                                             | Sigma-Aldrich                                                                     |
| FCS HI (Lot. 084M3250)                                              | Sigma-Aldrich                                                                     |
| Formaldehydlösung, 37 %                                             | Roth                                                                              |
| Formalin, 10 %                                                      | Sigma-Aldrich                                                                     |
| HCl                                                                 | Merck                                                                             |

|                                                            |                                                                                  |
|------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| Irgacure 369                                               | Geschenk des Institut für Bioprozess- und Analysenmesstechnik e.V. Heiligenstadt |
| KCl                                                        | Merck                                                                            |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                            | Merck                                                                            |
| L(+)-Ascorbinsäure-2-phosphat<br>Sesquimagnesiumsalzhydrat | Sigma-Aldrich                                                                    |
| L-Glutamin                                                 | Gibco Life Technologies                                                          |
| M-CSF (recombinant, murine)                                | R&D Systems                                                                      |
| MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O                       | Sigma-Aldrich                                                                    |
| N,N-Dimethylformamid                                       | Sigma-Aldrich                                                                    |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O        | Merck                                                                            |
| NaCl                                                       | Sigma-Aldrich                                                                    |
| NaHCO <sub>3</sub>                                         | Sigma-Aldrich                                                                    |
| NaOH                                                       | Chemlabs                                                                         |
| Naphthol AS Phosphat                                       | Sigma-Aldrich                                                                    |
| Natriumacetat                                              | Sigma-Aldrich                                                                    |
| Natriumtartrat                                             | Sigma-Aldrich                                                                    |
| Penicillin/Streptomycin-Lösung,<br>10.000 U/10.000 µg/ml   | Biochrom                                                                         |
| PGE <sub>2</sub>                                           | Cayman Chemical Company                                                          |
| RANKL                                                      | R&D Systems                                                                      |
| SigmaFast BCIP/NBT                                         | Sigma-Aldrich                                                                    |
| TrypLE Express (1x)                                        | Gibco Invitrogen                                                                 |
| Trypsin (1:250)                                            | Gibco Life Technologies                                                          |
| Tween 20                                                   | Sigma-Aldrich                                                                    |
| α-MEM                                                      | Gibco Life Technologies                                                          |

Tabelle 3: Liste der verwendeten Substanzen

## 2.5 Herstellung verwendeter Lösungen

### 2.5.1 Alizarin Rot S Färbelösung (ARS-Lösung)

0,1369 g Alizarin Rot S wurden unter Rühren in 10 ml Wasser gelöst. Der pH-Wert wurde mit 1 % Ammoniumhydroxidlösung auf 4,2 eingestellt. Die Lösung wurde filtriert und unter Lichtschutz bis zur Verwendung aufbewahrt.

### 2.5.2 BCIP/NBT-Färbelösung

Eine Tablette SigmaFast BCIP/NBT (5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat/Nitroblau Tetrazolium) wurde in 10 ml bidestilliertem Wasser am Vortex unter Lichtschutz gelöst.

### 2.5.3 Formaldehydlösung (3,7 %)

Formaldehydlösung (37 %) wurde vor der Verwendung mit PBS 1:10 verdünnt.

### 2.5.4 Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)

2 g KCl, 2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 80 g NaCl und 27,07 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  wurden in bidestilliertem Wasser zu 1000 ml gelöst. Diese Lösung wurde mit bidestilliertem Wasser auf 10 l verdünnt und steril filtriert.

### 2.5.5 Phosphatgepufferte Salzlösung mit Calcium und Magnesium (PBS mit Ca/Mg)

2 g KCl, 2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 80 g NaCl, 14,34 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  und 1 g  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  wurden in bidestilliertem Wasser zu 1000 ml gelöst. Der pH-Wert wurde mit 5 M HCl auf 2 bis 3 eingestellt, bevor 1 g  $\text{CaCl}_2$  zugesetzt wurde. Diese Lösung wurde mit bidestilliertem Wasser auf 10 l verdünnt und der pH-Wert wurde mit 5 N NaOH auf 7,2 eingestellt.

### 2.5.6 TRAP-Puffer

Für 100 ml TRAP-Puffer wurden 0,5444 g Natriumacetat in bidestilliertem Wasser gelöst. Nach Einstellen des pH-Werts auf 5 mit 1 M HCl, wurden 0,2302 g Natriumtartrat zugesetzt.

### 2.5.7 TRAP-Färbelösung

5 mg Naphthol AS Phosphat wurden in 500 µl N,N-Dimethylformamid gelöst. 10 ml TRAP-Puffer wurden mit 100 µl dieser Lösung versetzt. 6 mg Fast Red Violet Salz wurden darin für 5 min am Ultraschallbad gelöst. Die Färbelösung wurde für jeden Versuch frisch hergestellt.

### 2.5.8 Trypsin-EDTA Lösung

Zur Herstellung von 100 ml einer 10x Trypsin-EDTA Lösung wurden 155 mg EDTA in bidestilliertem Wasser gelöst. Nach Einstellen des pH-Wert auf 7,7 mit NaOH, wurden 500 mg Trypsin und 900 mg NaCl zugegeben. Der pH-Wert wurde auf 7,4 bis 7,6 eingestellt. Mit bidestilliertem Wasser wurde auf 100 ml aufgefüllt. Die Lösung wurde steril filtriert, portioniert und bei - 25 °C gelagert. Unmittelbar vor Gebrauch wurde die benötigte Menge an 1x Trypsin-EDTA-Lösung durch 1:10 Verdünnung mit PBS hergestellt.

### 2.5.9 Waschpuffer

PBS wurde mit 0,05 % Tween 20 versetzt.

## 2.6 Herstellung der Kulturmedien

### 2.6.1 10 % $\alpha$ -MEM

89 Volumenteile  $\alpha$ -MEM wurden mit 10 Volumenteilen FCS HI und 1 Volumenteil Penicillin/Streptomycin-Lösung gemischt.

### 2.6.2 10 % DMEM

89 Volumenteile DMEM wurden mit 10 Volumenteilen FCS HI und 1 Volumenteil Penicillin/Streptomycin-Lösung gemischt.

### 2.6.3 HOB-Kulturmedium

Das Kulturmedium für die humanen Osteoblasten wurde mit 100  $\mu$ M L-Ascorbinsäure-2-phosphat und 10 nM Dexamethason supplementiert.

Ascorbinsäure ist als Cofaktor für die Hydroxylierung von Prolin und Lysin wichtig für die funktionierende Collagensynthese. Die Verwendung des unter Kulturbedingungen stabilen Derivates L-Ascorbinsäure-2-phosphat hat sich gegenüber Vitamin C als vorteilhaft erwiesen. L-Ascorbinsäure-2-phosphat im Medium steigert die Proliferation, ALP-Aktivität und Kollagensynthese von Osteoblasten (Takamizawa, et al. 2004).

Während Glucocorticoide wie Dexamethason, die beispielsweise zur Behandlung von Entzündungen appliziert werden, die Knochenbildung *in vivo* unterdrücken, kann *in vitro* die Osteoblastogenese und Knochenbildung durch Dexamethason angeregt werden (Imai, et al. 2013). Die Zugabe von Dexamethason im Konzentrationsbereich von 1 nM bis 100 nM stabilisiert den differenzierten Phänotyp von humanen Osteoblasten und stimuliert deren Aktivität (Czekanska, et al. 2012).

Zur Herstellung des HOB-Kulturmediums wurde die benötigte Menge an 10 % DMEM vor jeder Verwendung frisch mit 1 % einer 100x L-Glutamin-Lösung (200 mM L-Glutamin in PBS), 1 % einer 100x L-Ascorbinsäure-2-phosphat-Lösung (1  $\mu$ M L-Ascorbinsäure-2-phosphat in PBS) und 0,1 % einer 1000x Dexamethason-Lösung (10  $\mu$ M Dexamethason in Ethanol) versetzt.

### 2.6.4 Knochenmark-Kulturmedium 1

Für die Isolation von monozytären Osteoklasten-Vorstufen aus dem Knochenmark wurden die Knochenmarkszellen zunächst in  $\alpha$ -MEM mit 10 % FCS, 1 % Streptomycin/Penicillin, 2 mM L-Glutamin, 2,5 ng/ml M-CSF und 100 nM PGE<sub>2</sub> inkubiert.

M-CSF, das physiologisch von Zellen der osteoblastären Linie sezerniert wird, ist essentiell für die Proliferation von Osteoklasten-Progenitoren und für ihre Fähigkeit zur Ausdifferenzierung zu reifen Osteoklasten unter der Einwirkung von RANKL. M-CSF erhöht zudem die Lebenszeit von Progenitor-Zellen und Osteoklasten (Suda, et al. 1995).

Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) stimuliert, durch synergistische Wirkung mit RANKL, die Osteoklastogenese und Knochenresorption (Wani, et al. 1999). Dieses Gewebshormon wirkt aber über die Rekrutierung von Osteoblasten-Progenitoren aus dem Knochenmark auch osteoanabol. In den ersten 24 h der Knochenmarkskultur fördert PGE<sub>2</sub> das Absetzen der primär nicht-adhärenenten mesenchymalen Stammzellen im Knochenmark (Scutt and Bertram 1995).

Zur Herstellung des Knochenmark-Zellkulturmediums 1 wurde die benötigte Menge an 10 % α-MEM frisch mit 1 % einer L-Glutamin-Stammlösung (200 mM L-Glutamin in PBS), 0,025 % einer M-CSF-Stammlösung (10 µg/ml M-CSF in PBS mit 0,1% BSA) und 0,01 % einer PGE<sub>2</sub>-Stammlösung (1 µM PGE<sub>2</sub> in Ethanol) versetzt.

#### 2.6.5 Knochenmark-Kulturmedium 2 (2x)

Ab dem zweiten Tag wurden die aus dem Knochenmark gewonnenen Zellen in Medium mit einer höheren Konzentration an M-CSF von 10 ng/ml weiter kultiviert. M-CSF und PGE<sub>2</sub> wurden in doppelter Menge der Zielkonzentration zugesetzt, da das Medium bei der Zugabe 1:1 verdünnt werden sollte.

10 % α-MEM wurde vor der Verwendung mit 1 % einer L-Glutamin-Stammlösung (200 mM L-Glutamin in PBS), 0,2 % einer M-CSF-Stammlösung (10 µg/ml M-CSF in PBS mit 0,1% BSA) und 0,02 % einer PGE<sub>2</sub>-Stammlösung (1 µM PGE<sub>2</sub> in Ethanol) versetzt. Das Medium enthielt also α-MEM, 10 % FCS, 1 % Streptomycin/Penicillin, 2 mM L-Glutamin, 20 ng/ml M-CSF und 200 nM PGE<sub>2</sub>.

#### 2.6.6 Osteoklastogenese-Medium (2x)

Für die Differenzierung von Osteoklasten ist neben M-CSF RANKL der zweite essentielle Faktor, der *in vivo* ebenfalls von Zellen der osteoblastären Linie produziert wird. (Boyle, et al. 2003)

Zusätzlich zu den Bestandteilen des Knochenmark-Kulturmediums 2 (2x) enthielt das Osteoklastogenese-Medium (2x) 60 ng/ml RANKL. Die Faktoren RANKL, M-CSF und PGE<sub>2</sub> waren wegen der geplanten Verdünnung wieder in der doppelten Zielkonzentration enthalten.

Die benötigte Menge an 10 % α-MEM wurde vor jeder Verwendung mit 1 % der L-Glutamin-Stammlösung (200 mM L-Glutamin in PBS), 0,2 % der M-CSF-Stammlösung (10 µg M-CSF in 1 ml PBS mit 0,1 % BSA), 0,6 % einer RANKL-Stammlösung (10 µg/ml RANKL in 10 % α-MEM) und 0,02 % der PGE<sub>2</sub>-Stammlösung (1 µM PGE<sub>2</sub> in Ethanol) versetzt.



## 2.7 Getestete Photoinitiatoren

### 2.7.1 Irgacure 2959

Der Photoinitiator 2-Hydroxy-1-[4-(2-hydroxyethoxy)phenyl]-2-methyl-1-propanon ist bekannt unter dem von der Firma BASF registrierten Handelsnamen Irgacure 2959. Aufgrund seiner Anwendbarkeit in wässrigen Systemen und der relativ geringen Toxizität wird er besonders häufig im Tissue Engineering eingesetzt. Irgacure 2959 ist ein  $\alpha$ -Hydroxyalkylphenon und als solches ein Photoinitiator der Klasse 1. Bei Absorption von Photonen wird das Molekül in einen hochenergetischen Triplet-Zustand angeregt und zerfällt dann in ein para-substituiertes Benzoylradikal und 2-Hydroxy-2-Propylradikal. Die Polymerisationsreaktion scheint in erster Linie durch Reaktion des Ketylradikals mit Vinylgruppen initiiert zu werden, aber auch das Benzoylradikal trägt zur Initiation bei (Vacek, et al. 1999). Das Absorptionsmaximum von Irgacure 2959 liegt bei etwa 275 nm (Allen, et al. 1999).

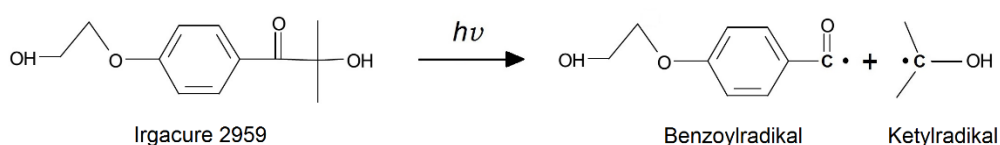


Abb. 11: Irgacure 2959 und seine Aktivierung (Liu, et al. 2014).

Irgacure 2959 ist ein weißes Pulver. Die Substanz ist in Wasser wenig löslich. Eine bessere Löslichkeit ist in Ethanol gegeben. Irgacure 2959 wurde in den sechs Endkonzentrationen von 0,05 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,3 mg/ml, 0,6 mg/ml, 1 mg/ml und 3 mg/ml getestet. Als Testlösungen wurden 100x Stammlösungen des Photoinitiators in Ethanol (70 %) hergestellt, die nach der Zellaussaat dem Kulturmedium im Verhältnis 1:100 (V/V) zugesetzt wurden. Für die Lösung mit der höchsten Konzentration wurden 300 mg des Photoinitiators Irgacure 2959 in 1 ml Ethanol (70 %) für circa 20 min am Ultraschallbad gelöst. Mithilfe einer Verdünnungsreihe wurden die fünf weiteren 100x Testlösungen hergestellt. Dazu wurde jeweils die Lösung mit der nächst höheren Konzentration mit Ethanol (70 %) verdünnt. Die Lösungen wurden bis zur Verwendung unter Lichtschutz aufbewahrt.

### 2.7.2 Irgacure 369

Auch der Photoinitiator 2-Benzyl-2-dimethylamino-1-(4-morpholinyl)phenyl-1-butanon, unter dem von BASF geschützten Handelsnamen Irgacure 369 bekannt, wird seit langem zur Fabrikation von Scaffolds im Tissue Engineering angewendet. Irgacure 369 ist ein hoch effizienter Photoinitiator mit einem Absorptionsmaximum bei etwa 315 nm, bei

dessen UV-Aktivierung besonders kurze Härtingszeiten erreicht werden können.

Irgacure 369 wird als  $\alpha$ -Aminoalkylphenon zur Klasse 1 der Photoinitiatoren gezählt und zeigt bei seiner Aktivierung ein duales Verhalten. Aus dem angeregten Triplet-Zustand werden durch  $\alpha$ -Spaltung ein Benzoylradikal und ein  $\alpha$ -Aminoalkylradikal generiert. Andererseits kann eine Radikalbildung aber auch durch intermolekulare Wasserstoffabstraktion erfolgen. Irgacure 369 kann also sowohl als Klasse 1 als auch als Klasse 2 Photoinitiator wirken (Alberti, et al. 2008).

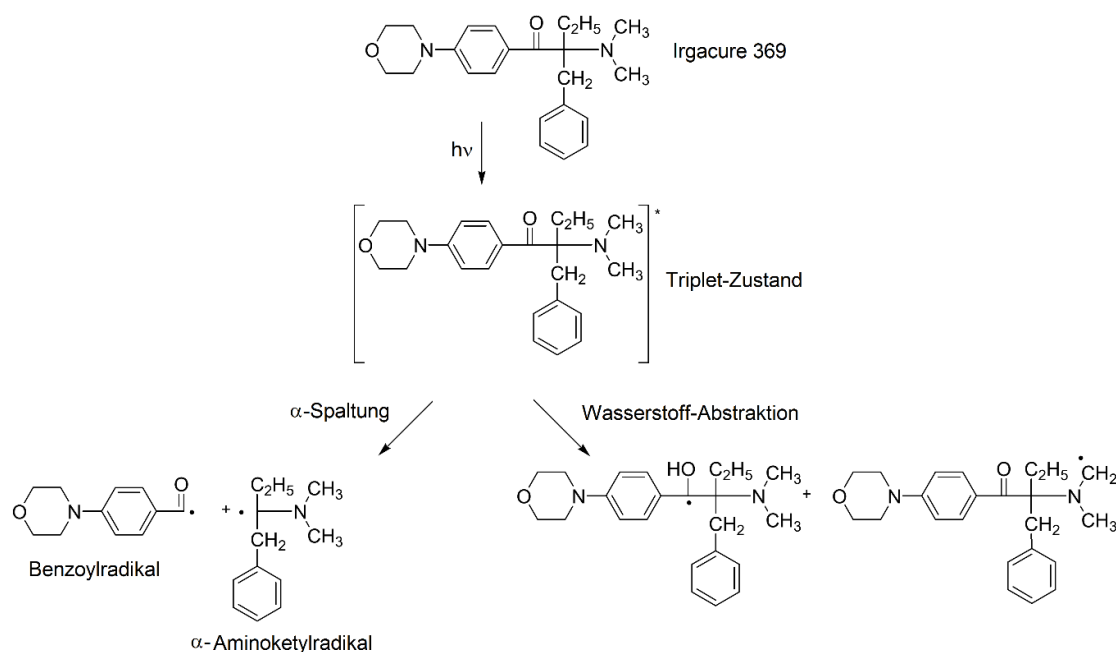


Abb. 12: Irgacure 369 und seine Aktivierung (Alberti, et al. 2008).

Irgacure 369 ist ein hellgelbes, in Wasser kaum lösliches Pulver. Für die Testung von Irgacure 369 wurden niedrigere Konzentrationen als bei Irgacure 2959 gewählt, da sich in einem ersten Versuch gezeigt hat, dass aus Lösungen mit über 10 mg/ml bei Zugabe zum Medium Substanz ausfällt. Zudem zeigte Irgacure 369 auch schon in niedrigen Konzentrationen einen toxischen Effekt auf die Osteoblasten. Irgacure 369 wurde in den sechs Endkonzentrationen von 1  $\mu$ g/ml, 5  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml, 30  $\mu$ g/ml, 50  $\mu$ g/ml und 100  $\mu$ g/ml getestet. Wieder wurden 100x Stammlösungen des Photoinitiators hergestellt. Als Lösungsmittel diente DMSO, das in einem ersten Vorversuch eine tolerable Zytotoxizität in der eingesetzten Konzentration von 1 % gezeigt hatte. 50 mg der Substanz wurden in 1 ml DMSO für 20 min am Ultraschallbad gelöst. Die Lösung wurde durch einen 0,20  $\mu$ m Membranfilter steril filtriert. Diese Lösung wurde 1:5 mit DMSO verdünnt, um die am höchsten konzentrierte Testlösung von 10 mg/ml zu erhalten (Zielkonzentration 100  $\mu$ g/ml). Ausgehend von dieser Lösung wurden die fünf weiteren 100x Testlösungen mithilfe einer Verdünnungsreihe hergestellt.

### 2.7.3 BA 740

2,5-Bis-{4-[bis-(2-acetyloxyethyl)-amino]-benzyliden}cyclopentanon (BA 740) ist ein kürzlich von der Friedrich-Schiller-Universität Jena patentierter Photoinitiator, der speziell für die Anwendung zur Zwei-Photonen-Absorptionspolymerisation in organischen Lösungsmitteln entwickelt wurde.

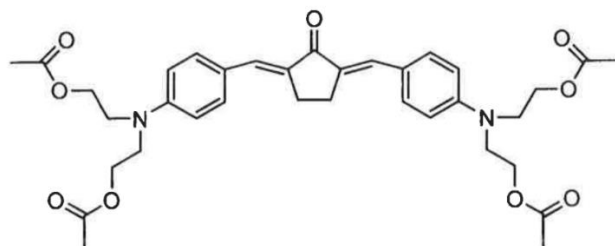


Abb. 13: Strukturformel von BA 740 (Gottschaldt, et al. 2015).

Auch herkömmliche Photoinitiatoren wie Irgacure 2959 und Irgacure 369 können zur Zwei-Photonen-Absorptionspolymerisation verwendet werden. Allerdings weisen diese, für die UV-Aktivierung entwickelten Substanzen bei Aktivierung mit Infrarot-Ultrakurzpulslasern wie sie in der 3D-Laserlithographie verwendet werden, nur eine geringe Photosensitivität und Initiationseffizienz auf. Zur Zwei-Photonenabsorptionspolymerisation stehen bereits verschiedene effiziente Initiatoren zur Verfügung, die jedoch oft eine schlechte Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln zeigen. BA 740 ist ein in organischen Lösungsmitteln anwendbarer Photoinitiator mit hohem Zwei-Photonenabsorptionseffekt und Radikalbildungsvermögen. Er soll zudem nicht toxisch sein (Gottschaldt, et al. 2015).

BA 740 ist ein zähes braunrotes Harz, das kaum löslich in Wasser und auch schlecht löslich in verdünntem Ethanol ist. In einem Vorversuch zur Löslichkeit in DMSO wurde BA 740 zu unterschiedlichen Konzentrationen gelöst und 5 µl dieser Lösung wurden 495 µl α-MEM zugesetzt. 50 µg/ml wurde als die höchste finale Konzentration ermittelt, in der sich bei Zugabe zum Medium kein Niederschlag bildete. Zur Testung der Toxizität wurden zunächst 100x Stammlösungen für die Endkonzentrationen von 1 µg/ml, 3 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 30 µg/ml und 50 µg/ml hergestellt. Dazu wurden 150 mg BA 740 in 500 µl DMSO für 20 min am Ultraschallbad gelöst. Die Lösung wurde steril filtriert und 1:60 mit DMSO verdünnt, um die 100x Testlösung für die höchste Endkonzentration von 50 µg/ml zu erhalten. In einer Verdünnungsreihe wurden die weiteren Testlösungen durch Verdünnen der jeweils nächst höher konzentrierten Lösung mit DMSO hergestellt.

Nachdem sich alle getesteten Lösungen nach UV-Aktivierung als sehr toxisch erwiesen hatten, wurden weitere, niedriger konzentrierte Lösungen von BA 740 getestet, um die höchste tolerable Konzentration an UV-aktiviertem Photoinitiator zu ermitteln. Dazu wurden 100x Stammlösungen für die Zielkonzentrationen von 0,01 µg/ml, 0,03 µg/ml,

0,05 µg/ml, 0,1 µg/ml, 0,3 µg/ml und 1 µg/ml. 50 mg BA 740 wurden in 1 ml DMSO für 20 min am Ultraschallbad gelöst. Die Lösung wurde steril filtriert und mit DMSO in einer Verdünnungsreihe auf die weiteren Konzentrationen verdünnt.

## 2.8 Osteoblasten-Isolierung

### 2.8.1 Primäre Maus-Osteoblasten der Fraktion III

Die primären Maus-Osteoblasten (MOB) wurden im Jahr 2013 in unserem Labor isoliert und in flüssigem Stickstoff gelagert. Die Isolation erfolgte nach einer modifizierten Methode aus den „Bone Research Protocols“ (Bakker and Klein-Nulend 2012). Die Zellen wurden mit einer Enzymlösung von Collagenase und Dispase aus den Calvarien von zwei bis drei Tage alten Mäusen isoliert. Für die Zellkultur-Studien dieser Arbeit wurden Zellen der Fraktion III verwendet.

### 2.8.2 Humane Osteoblasten der Passage 2

Die humanen Osteoblasten (HOB) wurden durch Zellauswanderung aus Knochenexplantaten isoliert. Das verwendete Knochengewebe fiel im Rahmen einer Hüftoperation an und wurde freundlicherweise von der orthopädischen Abteilung des sozialmedizinischen Zentrums Ost - Donauspital zur Verfügung gestellt. Der wissenschaftlichen Verwendung dieses Humanmaterials wurde durch Beschluss der Ethikkommission der Universität Wien vom 6. März 2013 zugestimmt. Das Knochenmaterial stammte vom proximalen Ende der Femur einer 71jährigen Spenderin. Die Zellisolation erfolgte nach Dillon et al. (Dillon, et al. 2012). Die trabekulären Knochenfragmente wurden isoliert, mit PBS gewaschen, und auf Petrischalen mit HOB-Kulturmedium verteilt. Bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurde inkubiert. Um eine störungsfreie Auswanderung der Zellen aus dem Knochengewebe und ihre Anhaftung zu ermöglichen, wurden die Petrischalen während der nächsten 14 Tage nicht berührt. Danach wurde das Medium alle zwei bis drei Tage gewechselt. Einen Monat nach der Knochenpräparation wurden die Zellen im Verhältnis 1:3 gesplittet. Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit TrypLE Express Lösung von der Petrischale gelöst. Die Zellzahl wurde mithilfe des CASY Zellzählgeräts bestimmt. Nach Zentrifugation bei 260 g für 5 min bei Raumtemperatur wurden die Zellen in HOB-Kulturmedium resuspendiert. Pro Petrischale wurden etwa eine halbe Million der erhaltenen Zellen der Passage 1 ausgesät. Bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurde weiter inkubiert, wobei das Medium alle zwei bis drei Tage getauscht wurde. Sobald der Zellrasen annähernd konfluent war, wurden die Zellen wieder wie oben beschrieben gesplittet, um Passage 2 zu erhalten. Kurz vor erreichter Konfluenz wurden die Zellen der zweiten Passage mit TrypLE Express Lösung von den Petrischalen

abgelöst. Die Zellzahl wurde am CASY Zellzählgerät bestimmt. Nach Abzentrifugation des Mediums wurde das Zellpellet in Einfriermedium, bestehend aus 10 % DMSO, 50 % FCS und 40 % DMEM resuspendiert und, zu 1 Mio. Zellen portioniert, bei - 80 °C eingefroren und am folgenden Tag in flüssigen Stickstoff eingelagert.

### 2.8.3 Charakterisierung der humanen Osteoblasten

Um das Vorliegen von Osteoblasten zu bestätigen, und zum Vergleich der Zellen der 1. und 2. Passage, wurde eine ALP- und ARS-Färbung durchgeführt.

Das von Präosteoblasten und reifen Osteoblasten exprimierte Enzym Alkalische Phosphatase (ALP) wird häufig als Identifizierungsmerkmal herangezogen. ALP kann mithilfe eines Substratsystems mit 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat (BCIP) und Nitroblau Tetrazolium (NBT) visualisiert werden. Dabei wird als Endprodukt ein blau gefärbtes NBT Diformazan gebildet. (Sigma-Aldrich 2016)

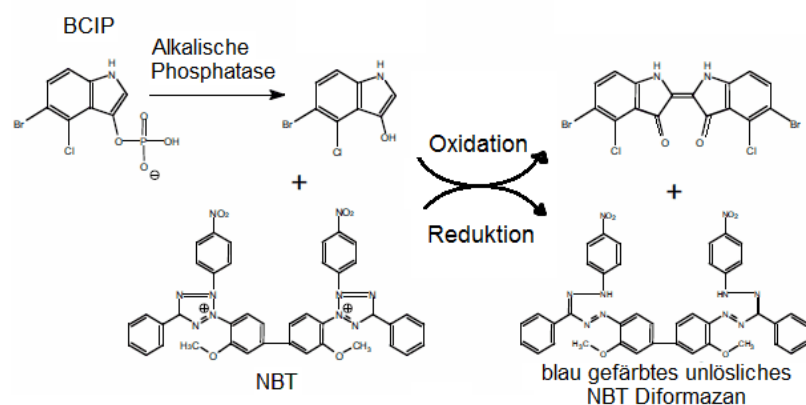


Abb. 14 ALP-Färbung mit BCIP/NBT (Sigma-Aldrich 2016).

Ein sichtbares Zeichen für die knochenbildende Aktivität der Osteoblasten ist die Mineralisation der extrazellulären Matrix. Das abgelegte Mineral kann durch die Anlagerung des Farbstoffs Alizarin Rot S an Calcium sichtbar gemacht werden. (Moriguchi, et al. 2003)

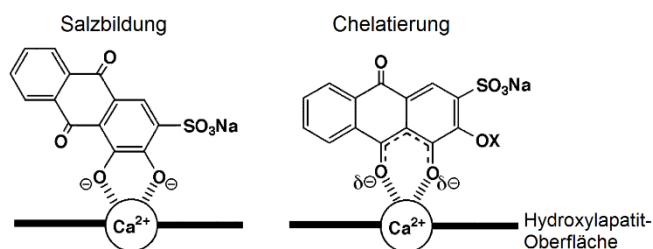


Abb. 15: Möglichkeiten der Adsorption von ARS an Calciumionen im Mineral (Moriguchi, et al. 2003).

Ein Teil der kryokonservierten Zellen wurde wieder aufgetaut, in HOB-Kulturmedium resuspendiert und auf zwei 24-Well-Zellkulturplatten zu ca. 50000 Zellen/Well ausgesät. Beide Platten wurden im Inkubator bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  kultiviert, wobei das Medium

alle zwei bis drei Tage erneuert wurde. Die Zellen der ersten Platte wurden am Tag 7 nach der Aussaat für die ALP-Färbung mit Formaldehyd-Lösung (3,7 %) fixiert. Dazu wurde jedes Well mit 0,5 ml PBS gewaschen, und 0,5 ml der Formaldehyd-Lösung (3,7 %) zugesetzt. Nach 1 min wurde die Formaldehyd-Lösung abgenommen und jedes Well mit 0,5 ml Waschpuffer gewaschen. Zum Färben der ALP-positiven Zellen wurde der Waschpuffer abgenommen und pro Well 0,25 ml der BCIP/NBT-Färbelösung zugesetzt. Die Platte wurde für 10 min vor Licht geschützt stehen gelassen. Danach wurde die Lösung abgenommen und Reste durch Waschen mit Waschpuffer entfernt. Die Blau-Färbung wurde optisch bewertet.

Die Zellen der zweiten Platte wurden am Tag 16 nach der Aussaat mit 10 % Formalin fixiert. Jedes Well wurde mit 0,5 ml PBS gewaschen, bevor 0,5 ml 10 % Formalin zugesetzt wurden. Nach 15 min wurde Formalin abpipettiert, und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Zur Anfärbung von Calcium wurde jedes Well zweimal mit bidestilliertem Wasser gewaschen, und dann mit 0,25 ml ARS-Lösung behandelt. Die Platte wurde für 10 min zugedeckt am Schüttler sanft hin und her bewegt. Dann wurde die Lösung abgenommen und die Wells fünfmal mit je 1 ml bidestilliertem Wasser gewaschen. Danach wurde PBS in die Wells pipettiert und die Platte nochmal für 15 min sanft geschüttelt. Die Rot-Färbung wurde optisch bewertet.

## 2.9 Zytokompatibilität der Photoinitiatoren mit Osteoblasten

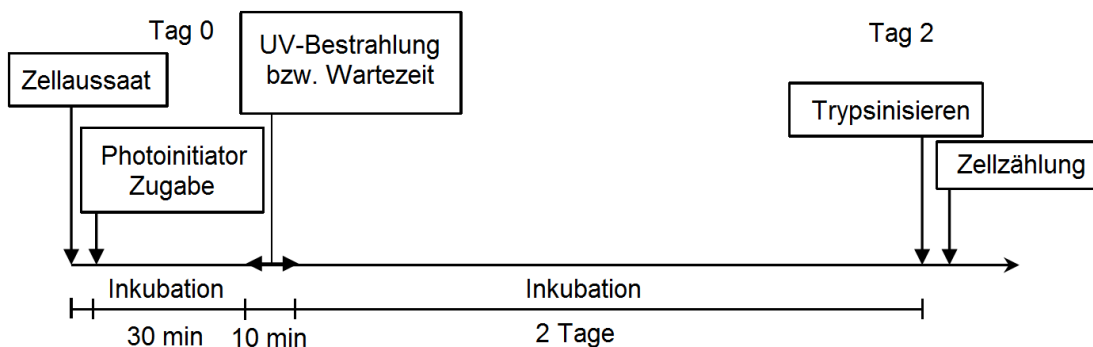


Abb. 16: Versuchsaufbau zur Untersuchung der Zytokompatibilität von Photoinitiatoren mit Osteoblasten

### 2.9.1 Zellaussaat und Behandlung

Für jeden Versuch wurden circa 4 Mio. der kryokonservierten Zellen im Wasserbad aufgetaut. Die Maus-Osteoblasten wurden in 10 %  $\alpha$ -MEM, die humanen Osteoblasten in DMEM, jeweils zu 10 ml resuspendiert. Um DMSO zu entfernen, wurde die Suspension zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet im entsprechenden Kulturmedium resuspendiert. Die Zellen wurden auf zwei 24-Well-Zellkultur-Platten in

einer Dichte von durchschnittlich 100000 Zellen pro Well in 495 µl Medium ausgesät. Jede Platte wurde in acht Gruppen von je drei Wells unterteilt; dies beinhaltete sechs Gruppen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Photoinitiator und zwei Kontrollgruppen.

Unmittelbar nach der Zellaussaat wurden dem Medium in 18 Wells jeder Platte je 5 µl der vorbereiteten Test-Lösungen und in jeweils drei Wells 5 µl reinen Lösungsmittels zugesetzt. Pro Platte wurden so jeweils drei Wells mit jeder der sechs Konzentrationen an Photoinitiator, drei Wells mit 1 % Lösungsmittel und drei Wells ohne weiteren Zusatz zum Kulturmedium erhalten.

Nach 30 min Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurden die Platten aus dem Inkubator genommen. Für die UV-Aktivierung wurde eine Platte im UV-Crosslinker für 10 min mit UV-Licht der Wellenlänge 365 nm und einer Strahlungsleistung von 1,5 mJ/cm<sup>2</sup> bestrahlt. Die andere Platte wurde für 10 min abgedeckt neben dem Gerät stehen gelassen. Dann wurde weiter inkubiert bis zur Trypsinisierung und Zellzählung am Tag 2.

### 2.9.2 Ablösen der Zellen mit Trysin/EDTA

Vor dem Trypsinisieren wurden die Zellen optisch beurteilt. Mit der Mikroskop-Kamera wurden Fotos aufgenommen. Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit 200 µl 1x Trypsin-EDTA-Lösung inkubiert. Sobald sich der Großteil der Zellen gelöst hat, wurden pro Well 600 µl kalten Mediums mit 10 % FCS HI zugegeben, um das Enzym zu inaktivieren. Die Zellsuspension jedes Wells wurde resuspendiert und in ein Mikrozentrifugenröhrchen transferiert. Das Well wurde mit 200 µl des serumhaltigen Mediums nachgespült. Die Mikrozentrifugenröhrchen, die nun jeweils 1 ml Zellsuspension enthielten, wurden bis zur Zählung auf Eis gestellt.

### 2.9.3 Zellzählung

Die Anzahl an lebenden Zellen wurde am CASY TT Cell Counter & Analyzer bestimmt. Dabei werden Zellen in einer elektrisch leitenden isotonen Pufferlösung, genannt CASYton, suspendiert und durch eine kleine Pore in die Messkapillare mit 150 µm Innendurchmesser gesaugt. Zwischen zwei Platinelektroden innerhalb und außerhalb der Kapillare wird eine Spannung angelegt. Der Stromfluss durch die Pore wird mit einer Frequenz von 1 MHz abgetastet. Bei Durchtritt einer Zelle durch die Messpore ändert sich der Stromfluss. Der somit veränderte Widerstand wird elektronisch erfasst.

Um die Viabilität der Zellen zu evaluieren wird das Messprinzip der Stromausgrenzung (Electrical Current Exclusion, ECE®) angewandt. Es beruht darauf, dass die intakte Zellmembran den Strom ausschließt, während eine geschädigte Zellmembran den Strom durchlässt. Lebende Zellen generieren ein Signal, das vom Zellvolumen abhängt. Tote Zellen werden mit dem Volumen ihres Zellkerns erfasst (OLS 2016).

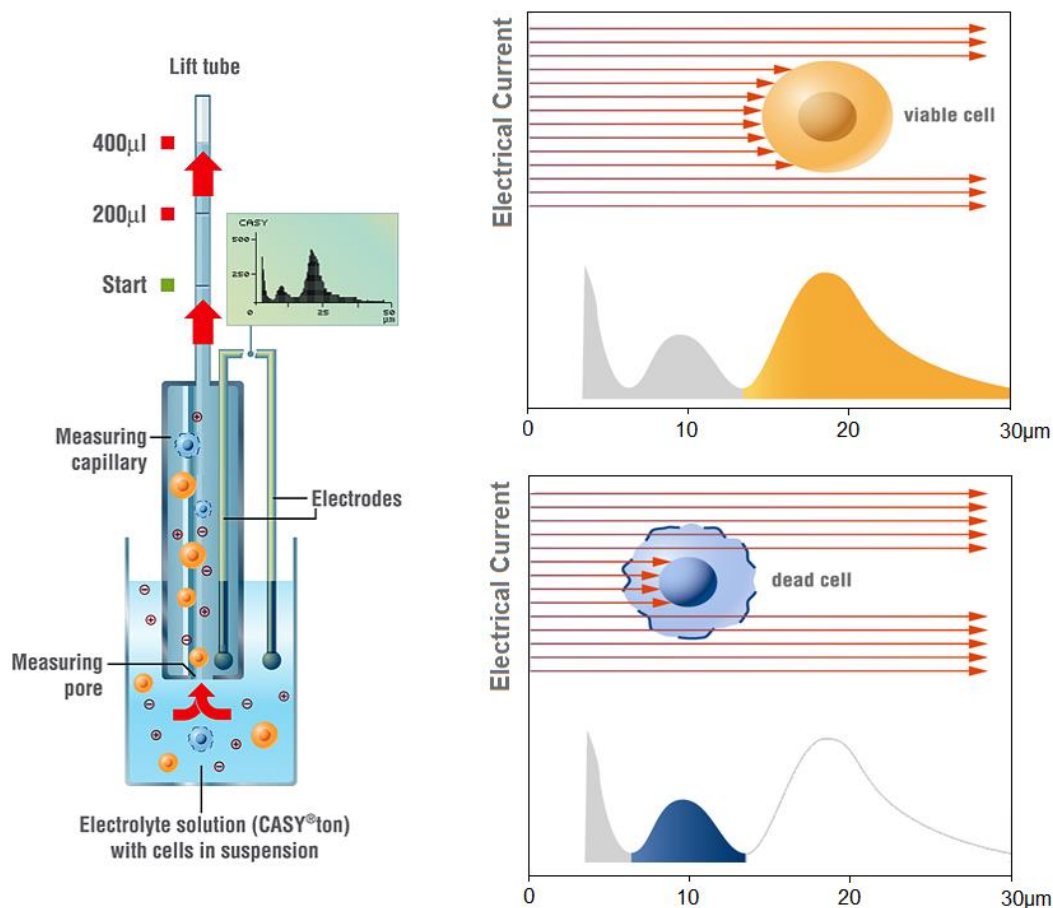


Abb. 17: Aufbau des CASY-Zellzählers (links) und Prinzip der Stromausgrenzung (rechts) (OLS 2016).

Vor der Zellzählung wurde das Zellzählgerät gemäß Bedienungsanleitung gereinigt und die entsprechenden Einstellungen vorgenommen. Zur Messung wurde die Kapillare mit einem Innendurchmesser von 150 µm verwendet. Die Verdünnung von 1:100 wurde gewählt. Für die Erfassung der totalen Zellzahl wurde der Bereich von 7,63 µm bis 50 µm festgelegt (*normalization cursor*). Der Bereich für die Zählung lebender Zellen wurde auf 10,25 µm bis 50 µm eingeschränkt (*evaluation cursor*). Vor der Messung wurde die Zellsuspension kurz am Vortexer gemischt. 100 µl der Zellsuspension wurden in ein CASYcup mit 10 ml CASYton überführt. Das CASYcup wurde dreimal umgeschwenkt und dann die Messung vorgenommen. Die ausgegebenen Werte wurden notiert.



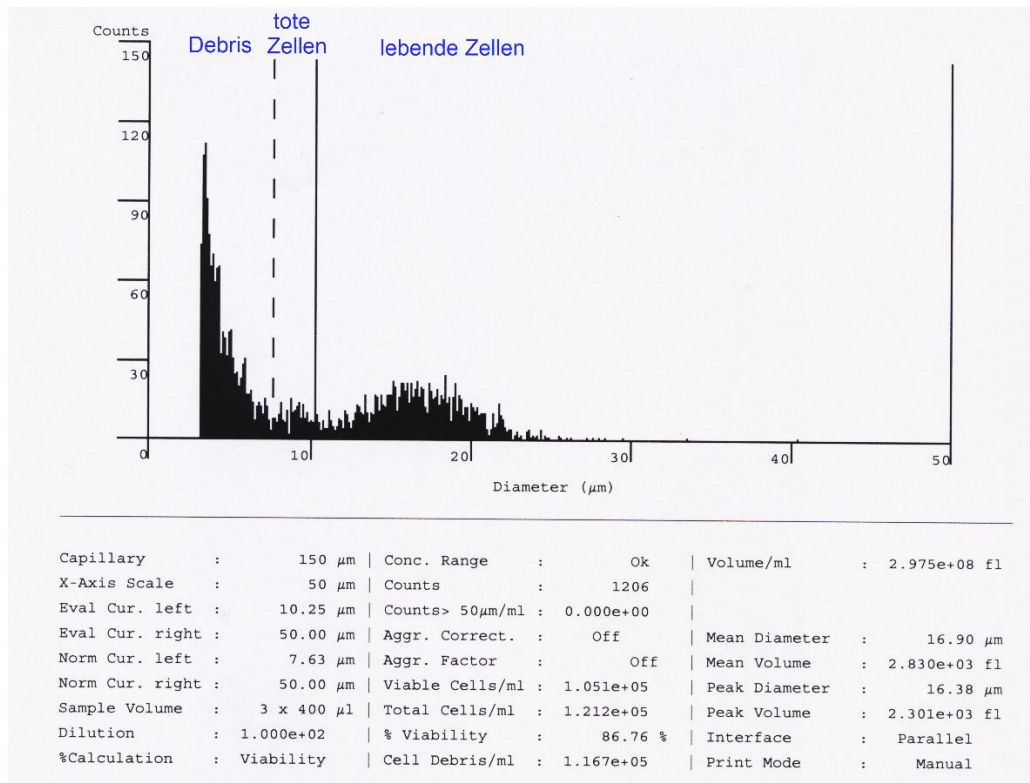


Abb. 18: Exemplarischer Ausdruck einer Messung des CASY-Zellzählers.

## 2.10 Einfluss von Ascorbinsäure auf die Überlebensrate der Osteoblasten

Der Einfluss von L-Ascorbinsäure-2-phosphat als Zusatz zum Kulturmedium auf die Auswirkungen des Photoinitiators Irgacure 2959 und von UV-Licht auf die Viabilität von Osteoblasten wurde in einer eigenen Versuchsreihe untersucht.

Die kryokonservierten Zellen wurden aufgetaut, resuspendiert, zentrifugiert und dann im entsprechenden Kulturmedium resuspendiert. Für die humanen Osteoblasten diente dazu HOB-Kulturmedium, jedoch ohne Ascorbinsäure-Zusatz. Für die Maus-Osteoblasten wurde 10 %  $\alpha$ -MEM verwendet. Die Zellen wurden auf einer 24-Well-Zellkulturplatte ausgesät. Dazu wurden in 18 Wells je 490 µl der Zellsuspension pipettiert. In einer Hälfte der Wells wurden dem Kulturmedium jeweils 5 µl einer L-Ascorbinsäure-2-phosphat-Lösung (10 mM) zugesetzt. Der anderen Hälfte der Wells wurden je 5 µl Kulturmedium zugesetzt. Nun wurden die Zellen beider Gruppen mit 1 mg/ml oder 0,3 mg/ml Irgacure 2959 oder mit dem reinen Lösungsmittel Ethanol (70 %) behandelt. Dazu wurden in je drei Wells der beiden Gruppen 5 µl der 100x Photoinitiator-Testlösungen oder 5 µl Ethanol (70 %) zupipettiert. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurde die Platte für 10 min mit UV-Licht der Wellenlänge 365 nm und einer Strahlungsleistung von 1,5 mJ/cm<sup>2</sup> im UV-Crosslinker bestrahlt. Danach wurde weiter inkubiert, bis zur Trypsinisierung und Zellzählung am Tag 2, was wie unter Absatz 2.9.2 bzw. 2.9.3 beschrieben, erfolgte.

### 2.11 Proliferationsrate von humanen und primären Maus-Osteoblasten

Die Proliferationsrate gibt die Geschwindigkeit an, mit der sich Zellen vermehren. Die Generationszeit ist die Zeit, die für die Verdopplung der Zellzahl benötigt wird. Wenn eine Kultur gestartet wird, benötigen die Zellen zuerst eine gewisse Zeit, um an der Wachstumsfläche zu adhären und sich an die Kulturbedingungen anzupassen. Auf diese Anlaufphase folgt die exponentielle Wachstumsphase, während der sich die Zellen in regelmäßigen Abständen teilen, die Population also mit einer konstanten minimalen Generationszeit wächst. Wenn die Zellen konfluent werden, folgt eine stationäre Phase. Die Teilungsrate sinkt stark ab, bis die Zellzahl schließlich in etwa konstant bleibt (Gstraunthaler and Lindl 2013).

Um die Proliferationsrate der humanen und Maus-Osteoblasten zu vergleichen, wurden Zellen auf 24-Well-Zellkulturplatten in einer Dichte von ca. 10000 - 20000 Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät. Die humanen Osteoblasten wurden in HOB-Kulturmedium und die Maus-Osteoblasten in 10 % α-MEM acht Tage lang kultiviert. Das Medium wurde jeden zweiten Tag getauscht. Jeden Tag wurden die Zellen von drei Wells trypsinisiert und die Anzahl an lebenden Zellen mithilfe des CASY Zellzählgerätes bestimmt. Dieser Vorgang wurde bereits detailliert unter Absatz 2.9.2 bzw. 2.9.3 beschrieben. Nach Ende der Kultur wurde eine Wachstumskurve gezeichnet.

Die Generationszeit während der exponentiellen Wachstumsphase wurde durch die Anwendung folgender Formel (Gstraunthaler and Lindl 2013) berechnet:

$$t_g = \frac{\log 2 \times t}{\log N - \log N_0}$$

$t_g$ .....Generationszeit  
 $t$ .....Dauer der log-Phase  
 $N_0$ ...Anzahl der Zellen zu Beginn der log-Phase  
 $N$ ....Anzahl der Zellen am Ende der log-Phase

### 2.12 Gewinnung von Zellen der Osteoklasten-Linie über Knochenmarkskultur

Osteoklasten können *in vitro* aus hämatopoetischen Progenitoren in Knochenmark oder Milz gewonnen werden. Die Faktoren M-CSF und RANKL sind essentiell für die Differenzierung der primär nicht adhärenen monozytären Vorläuferzellen zu reifen Osteoklasten. In einer Co-Kultur mit Osteoblasten geben diese die stimulierenden Signale zur Osteoklastogenese ab. Durch direkte Zugabe der Differenzierungsfaktoren M-CSF und RANKL zum Kulturmedium können Osteoklasten auch ohne die Anwesenheit von osteogenen Zellen generiert werden (Kartsogiannis and Ng 2004). Für diese Arbeit wurde die zweite Methode gewählt, um Zellen der osteoklastären Linie aus dem Knochenmark von Mäusen zu gewinnen, da der Effekt auf diese Zellen ohne die Anwesenheit von Osteoblasten studiert werden sollte.

Für jeden Versuch wurde das Knochenmark aus den Hinterbeinen von zwei männlichen Mäusen im Alter von sechs bis acht Wochen gewonnen. Femur und Tibia wurden ausgelöst. Das Knochenmark wurde unter Verwendung einer Spritze aus dem Markkanal gespült und in PBS suspendiert. Die Knochenmark-Suspension wurde bei 300 g für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die Zellen wurden in Knochenmark-Kulturmedium 1 resuspendiert, auf zwei Zellkultur-beschichteten Petrischalen (10 cm) ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Unter dem Einfluss von M-CSF und PGE<sub>2</sub> sollte es zu einer gesteigerten Proliferation von Osteoklasten-Progenitorzellen, und zur Adhäsion mesenchymaler Stammzellen an der Kulturoberfläche kommen. (Scutt and Bertram 1995, Suda, et al. 1995)

Am nächsten Tag wurde das Medium mit den enthaltenen nicht-adhären Zellen in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Die Petrischalen mit den abgesetzten Zellen wurden verworfen. Die Zellsuspension wurde bei 300 g für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet aufgeklopft und in 10 ml 10 %  $\alpha$ -MEM resuspendiert. Ein Aliquot von 10  $\mu$ l wurde in ein CASYcup mit 10 ml CASYton überführt. Die Zellzahl wurde am CASY Zellzählgerät bestimmt. Normierungs- und Evaluationscursor wurden auf 0 – 50  $\mu$ m eingestellt. Das Medium wurde wiederum abzentrifugiert und die Zellen in der entsprechenden Menge an Kulturmedium resuspendiert, um die gewünschte Zellkonzentration von 10<sup>6</sup> Zellen/Well zu erreichen.

### 2.13 Potential zur Ausdifferenzierung zu reifen Osteoklasten

Die wesentlichen Charakteristika, die zur Identifikation von reifen Osteoklasten herangezogen werden, sind das Vorliegen von mindestens drei Zellkernen, ein positiver Nachweis von TRAP und Cathepsin K, die Expression von Calcitonin-Rezeptoren und die Fähigkeit mineralisierte Knochenmatrix zu resorbieren. Eine einfache Methode zum Abschätzen der Anzahl an Osteoklasten ist die Färbung des von Präosteoklasten und reifen Osteoklasten produzierten Enzyms tartratresistente saure Phosphatase (TRAP) und das Zählen der gefärbten, mehrkernigen Zellen (Kartsogiannis and Ng 2004).

#### 2.13.1 Zellaussaat und Behandlung

Um das Potential der verwendeten Zellen zur Ausdifferenzierung zu reifen Osteoklasten zu prüfen, wurden in 3 Wells einer 96-Well-Zellkulturplatte je eine Million Zellen in 200  $\mu$ l Osteoklastogenese-Medium mit 100 nM PGE<sub>2</sub>, 10 ng/ml M-CSF, 30 ng/ml RANKL ausgesät. Als Kontrolle dienten in der gleichen Dichte ausgesäte Zellen in Kulturmedium ohne RANKL. Dazu wurden in drei Wells je 100  $\mu$ l Osteoklastogenese-Medium (2x) und in drei weiteren Wells je 100  $\mu$ l Knochenmark-Kulturmedium 2 (2x) vorgelegt und dann 100  $\mu$ l der Zellsuspension von 10<sup>6</sup> Zellen/ml zupipettiert.

### 2.13.2 TRAP-Färbung

Die Zellen wurden mit 10 % Formalin fixiert. Dazu wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und die Zellen mit gewärmter PBS gewaschen. Dann wurden pro Well 200 µl 10 % Formalin zugegeben. Nach 10 min Einwirkung bei Raumtemperatur, wurde die Formalinlösung abgenommen. Die Zellen wurden dreimal mit PBS mit Ca/Mg gewaschen. Zur Färbung der fixierten Zellen wurde PBS abgenommen, und pro Well wurden 200 µl des TRAP-Puffers zugegeben. Die Platten wurden für 30 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Dann wurde der TRAP-Puffer abgenommen. Pro Well wurden 200 µl einer Mischung gleicher Volumenteile von Aceton und Ethanol zugegeben, nach 30 s wieder abgenommen und 2 min getrocknet. Danach wurden pro Well 200 µl der TRAP Färbelösung zugegeben. Nach Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 10 min, wurde die Färbelösung abgenommen. Jedes Well wurde einmal mit 200 µl bidestilliertem Wasser gewaschen. Die Färbelösung enthielt das TRAP-Substrat Naphthol AS Phosphat, das nach seiner Umsetzung und Kupplung an das Diazoniumsalz Fast Red Violet eine rotviolette Färbung gibt. Die Zellen wurden unterm Mikroskop optisch bewertet. Mithilfe der Mikroskop-Kamera wurden Fotos aufgenommen. Rotviolett gefärbte Zellen mit mindestens drei Zellkernen wurden als Osteoklasten definiert.

### 2.14 Zytokompatibilität der Photoinitiatoren mit Osteoklasten-Vorstufen

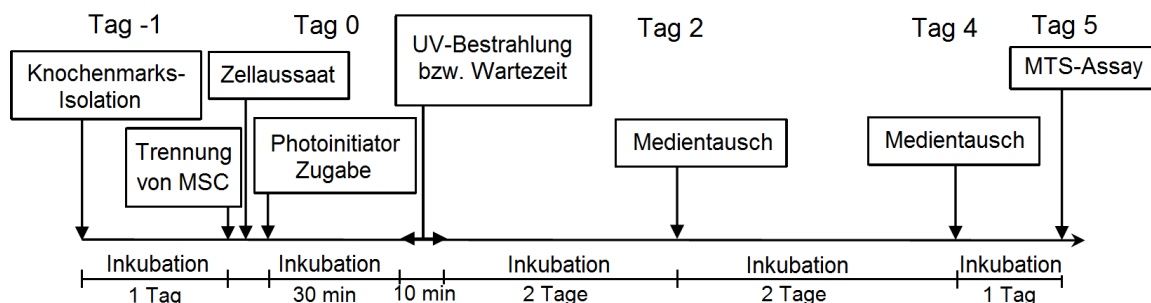


Abb. 19: Versuchsaufbau zur Studie der Zytokompatibilität der Photoinitiatoren mit Osteoklasten-Vorstufen.

#### 2.14.1 Zellaussaat und Behandlung

Zur Untersuchung der Zytotoxizität der Photoinitiatoren auf die Osteoklasten-Vorläuferzellen wurden die Zellen in Medium mit 100 nM PGE<sub>2</sub> und 10 ng/ml M-CSF ausgesät. Der Einfluss von Irgacure 2959 in den Konzentrationen von 1 mg/ml und 0,1 mg/ml, von Irgacure 369 in den Konzentrationen von 10 µg/ml und 1 µg/ml und von BA 740 in den Konzentrationen 0,3 µg/ml und 0,03 µg/ml wurde untersucht. Als Kontrolle dienten Gruppen mit den Lösungsmitteln Ethanol (70 %) und DMSO sowie eine Gruppe ohne Zusatz zum Kulturmedium. Diese neun Gruppen wurden zu je drei Wells auf zwei

96-Well-Zellkulturplatten realisiert, wobei eine der Platten zusätzlich mit UV-Licht behandelt wurde.

In je 27 Wells zweier 96-Well-Zellkulturplatten wurden 100 µl Knochenmark-Kulturmedium 2 (2x) vorgelegt. Dann wurden 98 µl der, wie unter Abschnitt 2.12 beschrieben, erhaltenen Zellsuspension der Konzentration von  $10^6$  Zellen/ml zupipettiert. Unmittelbar nach der Aussaat wurden pro Well 2 µl der 100x Photoinitiator-Testlösungen bzw. der reinen Lösungsmittel zugesetzt. Die Platten wurden für 30 min bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37 °C inkubiert, um eine Gleichgewichtseinstellung zu ermöglichen. Dann wurden beide Platten aus dem Inkubator entnommen. Eine Platte wurde im UV-Crosslinker für 10 min mit UV-Licht der Wellenlänge 365 nm und einer Strahlungsleistung von 1,5 mJ/cm<sup>2</sup> bestrahlt. Die andere Platte wurde währenddessen bedeckt neben dem Gerät stehen gelassen. Danach wurden beide Platten weitere fünf Tage im Inkubator bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37 °C kultiviert. Alle zwei Tage wurde die Hälfte des Mediums gewechselt. 100 µl des verbrauchten Mediums wurden dabei durch Knochenmark-Kulturmedium 2 (2x) ersetzt.

#### 2.14.2 MTS-Assay

Der CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay ist ein kolorimetrischer Test zur Bestimmung der Zellviabilität. Die Lösung beinhaltet die Verbindung [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazoliumsalz] (MTS) und das Elektronenkupplungs-Reagens Phenazinethosulfat (PES). In Anwesenheit von metabolisch aktiven Zellen wird das innere Tetrazoliumsalz MTS zu einem löslichen Formazan Produkt reduziert. PES dient als intermediärer Elektronenakzeptor, der ins Zellinnere eindringen kann und Elektronen von NADH auf MTS im Medium überträgt. Die gemessene Absorption des gefärbten Formazan Produkts bei 490 nm ist direkt proportional zur Anzahl an lebenden Zellen (Promega 2012, Riss, et al. 2013).

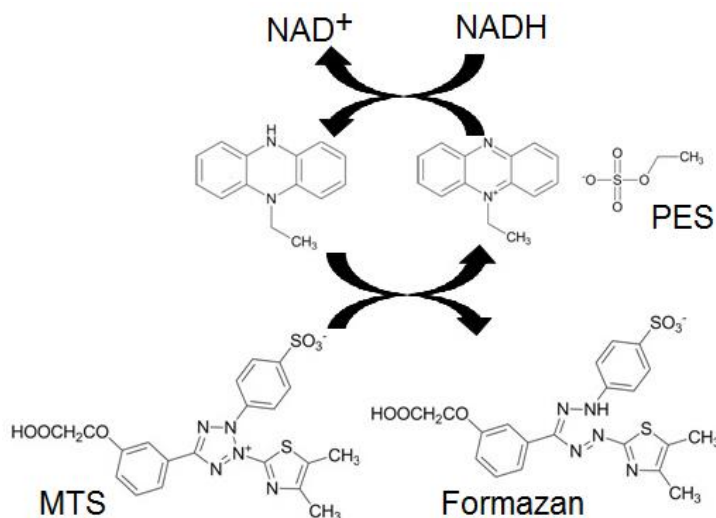


Abb. 20: Reduktion von MTS zum gefärbten Formazan Produkt durch metabolisch aktive Zellen (Riss, et al. 2013).

Zur Durchführung des MTS-Assays wurde das Medium abgesaugt und pro Well wurden 100 µl 10 %  $\alpha$ -MEM mit 2 mM L-Glutamin zupipettiert. Für die Hintergrund-Messung wurden in drei zusätzliche Wells je 100 µl Medium pipettiert. Nach 30 min Inkubation bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37 °C wurden pro Well 20 µl des CellTiter 96 AQueous One Solution Reagens zugesetzt. Nach einer weiteren Stunde Inkubation, wurde die Absorption bei 490 nm am Spektrophotometer gemessen. Aus den drei Messwerten der Hintergrund-Absorption des Mediums wurde der arithmetische Mittelwert gebildet. Dieser Wert wurde von den Messwerten aus jedem Well abgezogen, um die Absorption durch das proportional zur Zellaktivität gebildeten Formazans zu erhalten.

## 2.15 Statistische Auswertung

Die experimentell ermittelten Daten wurden mithilfe des GraphPad Software-Pakets Prism ausgewertet. Die Messwerte jedes Experiments wurden normiert. Das arithmetische Mittel der Werte für die Kontrollgruppe, mit der die Daten verglichen wurden, wurde als 100 % definiert. Die normierten Werte aus zwei individuell durchgeführten übereinstimmenden Experimenten wurden zusammengefasst. (n = 6)

Die Daten wurden in Form von Mittelwert  $\pm$  Standardfehler dargestellt.

Mittels einfaktorieller Varianzanalyse, dem one-way ANOVA-Test (ANalysis Of VAriance), wurde festgestellt, ob zwischen den Mittelwerten signifikante Unterschiede bestanden. Der Post-hoc-Tukey-Test wurde durchgeführt, um zu ermitteln, welche Mittelwerte sich signifikant voneinander unterschieden.

Ein p-Wert von  $\leq 0,05$  wurde als statistisch signifikant definiert und wurde in den Graphen mit einem Sternchen (\*) gekennzeichnet. Ein p-Wert von  $\leq 0,01$  galt als sehr signifikant (\*\*) und ein p-Wert von  $\leq 0,001$  als hochsignifikant (\*\*\*).

### 3 Resultate

#### 3.1 Charakterisierung der humanen Osteoblasten

Die isolierten humanen Osteoblasten der ersten und zweiten Passage waren ALP-positiv. Optisch war kein Unterschied in der Intensität der Färbung zwischen den Zellen der ersten und zweiten Passage festzustellen.

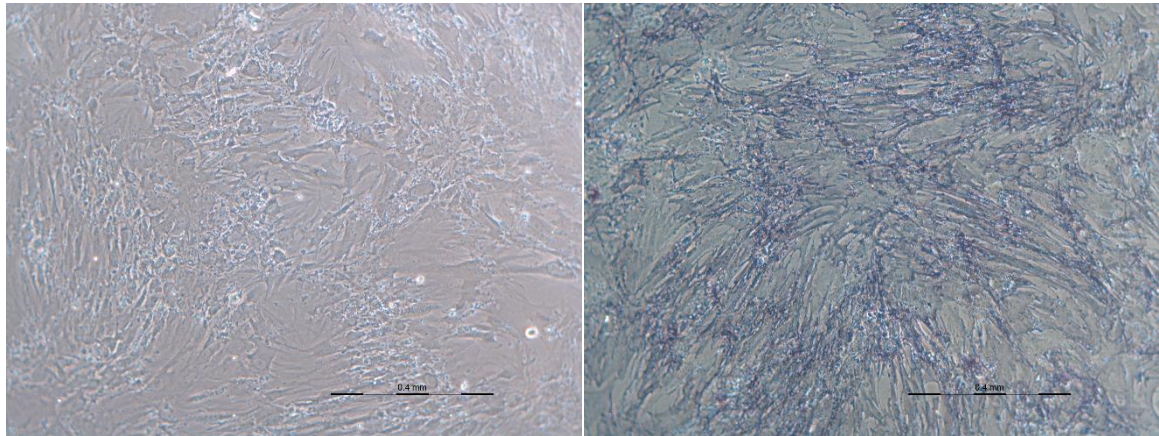


Abb. 21: Humane Osteoblasten der Passage 2 am Tag 7 vor Fixierung und Färbung (links) und nach der ALP-Färbung (rechts). Der Balken entspricht einem Maßstab von 0,4 mm.

Mithilfe der Alizarin Rot Färbung konnte keine Matrixmineralisation festgestellt werden.

#### 3.2 Reduktion der Osteoblasten-Zellzahl durch UV-Licht

Allein die UV-Bestrahlung führte zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl an lebenden Zellen. Die primären Maus-Osteoblasten wurden um über 40 % vermindert. Bei den humanen Osteoblasten war eine geringere Zellzahlreduktion um ca. 12 % zu beobachten.

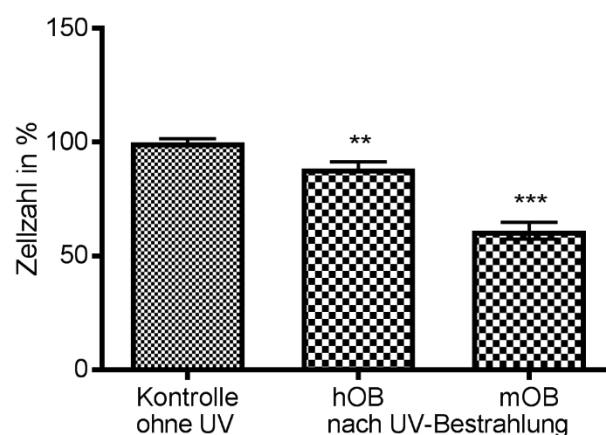


Abb. 22: Einfluss von UV-Strahlung auf die Anzahl lebender Zellen. Die Zellzahlen wurden normiert. Die gemittelte Anzahl lebender Zellen in den Gruppen ohne UV-Bestrahlung wurde als 100 % definiert. Die durchschnittliche Anzahl humaner OB in dieser Gruppe betrug 31380 Zellen/Well im ersten und 30480 Zellen/Well im zweiten Versuch, die der primären Maus-OB betrug 215900 Zellen/Well bzw. 232500 Zellen/Well. Nach der Normierung wurden die Werte zusammengefasst. \*\*\* (p-Wert  $\leq 0,001$ ) und \*\* (p-Wert  $\leq 0,01$ ) kennzeichnen signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe.



### 3.3 Einfluss der verwendeten Lösungsmittel auf Osteoblasten

Die Photoinitiatoren wurden dem Medium in Form von 100x-Stammlösungen zugesetzt. Als Lösungsmittel für Irgacure 2959 diente Ethanol (70 %). Irgacure 369 und BA 740 wurden in DMSO gelöst. Um den Effekt der Photoinitiatoren getrennt vom Einfluss des Lösungsmittels beurteilen zu können, wurden bei allen Versuchen Kontrollgruppen mit 1 % reinen Lösungsmittels mitgeführt. Ein Vergleich dieser Gruppen mit den Kontrollgruppen ohne Zusatz zum Medium zeigte eine signifikante Reduktion der Zellzahl durch 1 % DMSO. Ethanol (70 %) zeigte in der eingesetzten Konzentration keinen signifikanten Einfluss.

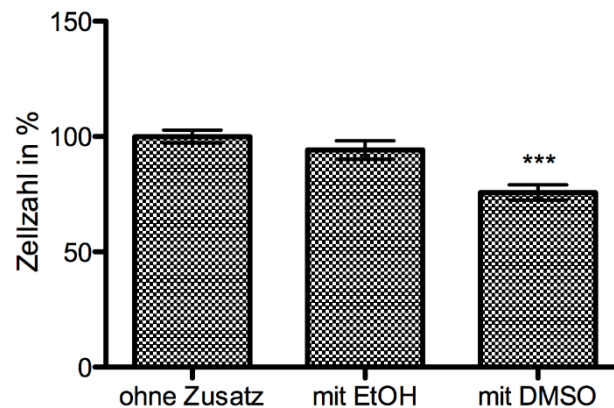


Abb. 23: Einfluss der verwendeten Lösungsmittel auf die primären Maus-OB. Die Zellzahlen wurden normiert. Die durchschnittliche Anzahl lebender Zellen in der Kontrollgruppe ohne Zusatz wurde jeweils als 100 % definiert. Diese betrug 232500 und 215900 Zellen/Well in den beiden Versuchen zum Vergleich mit Ethanol, bzw. 285300 und 287867 Zellen/Well in den Versuchen zum Vergleich mit DMSO. Nach der Normierung wurden die Werte aus den vier Versuchen zusammengefasst. Ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe ist mit \*\*\* (p-Wert  $\leq 0,001$ ) gekennzeichnet.

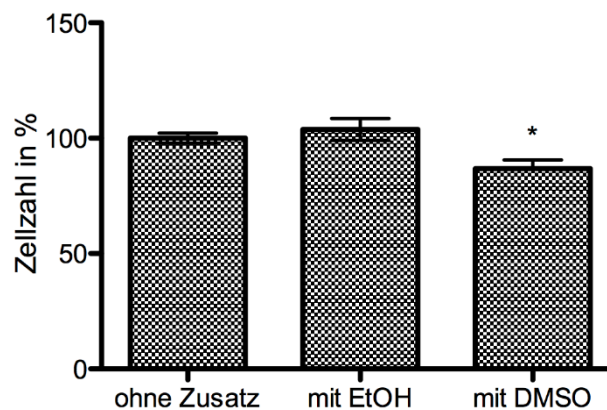


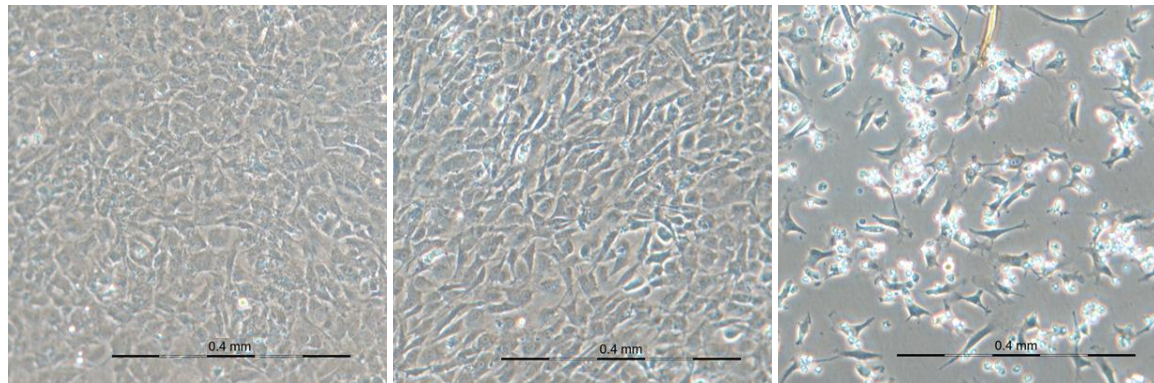
Abb. 24: Einfluss der verwendeten Lösungsmittel auf die humanen OB. Die Zellzahlen wurden normiert. Die durchschnittliche Anzahl lebender Zellen in der Kontrollgruppe ohne Zusatz wurde als 100 % definiert. Diese betrug 31380 und 30480 Zellen/Well in den beiden Versuchen zum Vergleich mit Ethanol, bzw. 36610 und 59983 Zellen/Well in den Versuchen zum Vergleich mit DMSO. Nach der Normierung wurden die Werte zusammengefasst. Ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe ist mit \* (p-Wert  $\leq 0,05$ ) gekennzeichnet.



### 3.4 Zytokompatibilität von Irgacure 2959 mit Osteoblasten

#### 3.4.1 Irgacure 2959 mit primären Maus-Osteoblasten

Schon ein Blick durch das Mikroskop zeigte eine konzentrationsabhängige Reduktion der Zahl an lebenden Maus-Osteoblasten in der Kultur nach Behandlung mit Irgacure 2959.



Kontrollgruppe ohne Bestrahlung

0,1 mg/ml Irgacure 2959 und UV

1 mg/ml Irgacure 2959 und UV

Abb. 25: Zellmorphologie primärer Maus-OB mit und ohne Behandlung mit Irgacure 2959. Der Balken entspricht einem Maßstab von 0,4 mm.

Ohne UV-Bestrahlung wurde die Zellzahl, verglichen mit der Kontrollgruppe mit reinem Ethanol (70 %), durch Irgacure 2959 in den Konzentrationen von 0,3 – 3 mg/ml signifikant reduziert. In allen UV-bestrahlten Gruppen waren die Zellzahlen niedriger als in den korrespondierenden Gruppen ohne UV-Behandlung. Verglichen mit der UV-bestrahlten Kontrollgruppe mit reinem Lösungsmittel, führte Irgacure 2959 auch nach UV-Aktivierung in den Konzentrationen von 0,3 – 3 mg/ml zu einer signifikant verringerten Zellzahl. Sowohl in nicht-aktivierter Form, als auch nach UV-Aktivierung war 0,1 mg/ml also die höchste getestete Konzentration, in der Irgacure 2959 noch zu keiner signifikanten Reduktion der lebenden Maus-Osteoblasten führte.

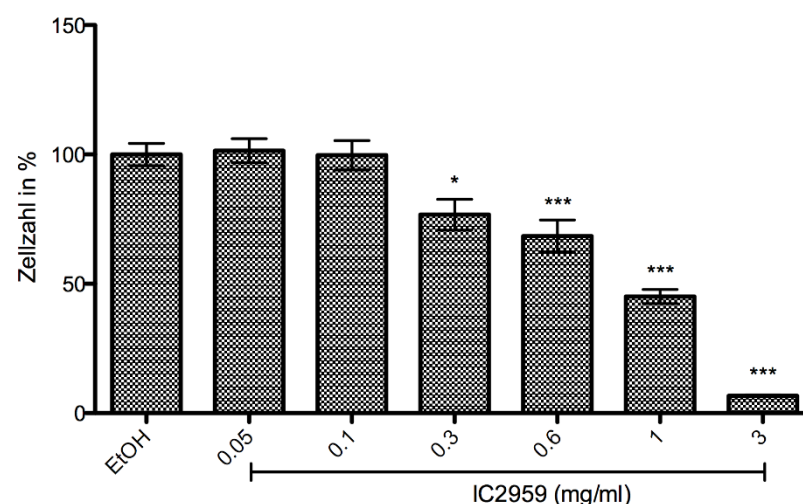


Abb. 26: Primäre Maus-OB mit Irgacure 2959 ohne UV-Bestrahlung. Die Anzahl an lebenden Zellen wurde normiert. Die gemittelte Zellzahl in der Kontrollgruppe mit 1 % Ethanol (70 %, EtOH) wurde als 100 % definiert. Sie betrug 204867 Zellen/Well im ersten und 217067 Zellen/Well im zweiten Versuch. Nach der Normierung wurden die Werte aus beiden Versuchen zusammengefasst. \*\*\* (p-Wert  $\leq 0,001$ ) und \* (p-Wert  $\leq 0,05$ ) kennzeichnen einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe.

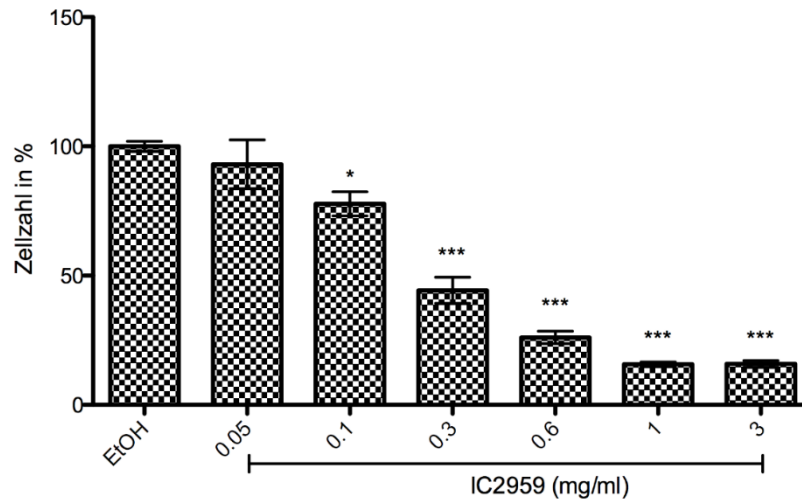
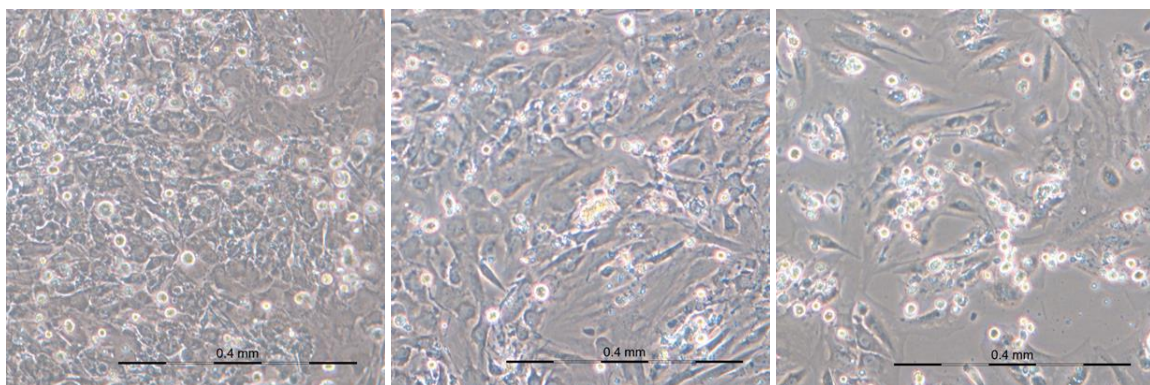


Abb. 27: Primäre Maus-OB mit Irgacure 2959 nach UV-Aktivierung. Die Anzahl an lebenden Zellen wurde normiert. Die gemittelte Zellzahl in der mit 1 % Ethanol (70 %, EtOH) und UV-Licht behandelten Kontrollgruppe wurde als 100 % definiert. Sie betrug 121233 Zellen/Well im ersten und 140933 Zellen/Well im zweiten Versuch. Nach der Normierung wurden die Werte aus beiden Versuchen zusammengefasst. \*\*\* (p-Wert  $\leq 0,001$ ) und \* (p-Wert  $\leq 0,05$ ) kennzeichnen einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe.

### 3.4.2 Irgacure 2959 mit humanen Osteoblasten

Auch die Anzahl an lebenden humanen Osteoblasten wurde durch Irgacure 2959, in Abhängigkeit von der Dosis, verringert. Der Effekt war allerdings schwächer ausgeprägt als bei den Maus-Osteoblasten.

Die Zellzahlen in den UV-bestrahlten Gruppen waren durchwegs niedriger als in den entsprechenden Gruppen, die keiner Bestrahlung ausgesetzt worden waren.



Kontrollgruppe ohne Bestrahlung

1 mg/ml Irgacure 2959 ohne UV

1 mg/ml Irgacure 2959 mit UV

Abb. 28: Zellmorphologie humaner OB mit und ohne Behandlung mit Irgacure 2959.

Der Balken entspricht einem Maßstab von 0,4 mm.

Ohne UV-Aktivierung bewirkte nur die höchste getestete Konzentration von 3 mg/ml Irgacure 2959 eine signifikante Zellzahl-Reduktion. Nach UV-Aktivierung führte Irgacure 2959 in den Konzentrationen von 1 mg/ml und 3 mg/ml zu einer signifikanten Zellzahlreduktion verglichen mit der UV-behandelten Kontrollgruppe mit Ethanol (70 %).

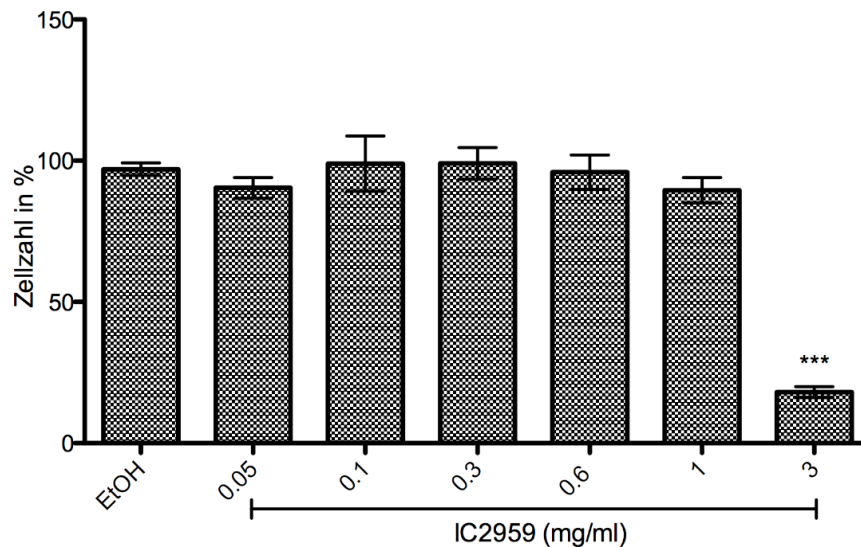


Abb. 29: Humane OB mit Irgacure 2959 ohne UV-Bestrahlung. Die Anzahl an lebenden Zellen wurde normiert. Die gemittelte Zellzahl in der Kontrollgruppe mit 1 % Ethanol (70 %, EtOH) wurde als 100 % definiert. Sie betrug 35650 Zellen/Well im ersten und 30480 Zellen/Well im zweiten Versuch. Nach der Normierung wurden die Werte aus beiden Versuchen zusammengefasst. \*\*\* kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe (p-Wert  $\leq 0,001$ ).

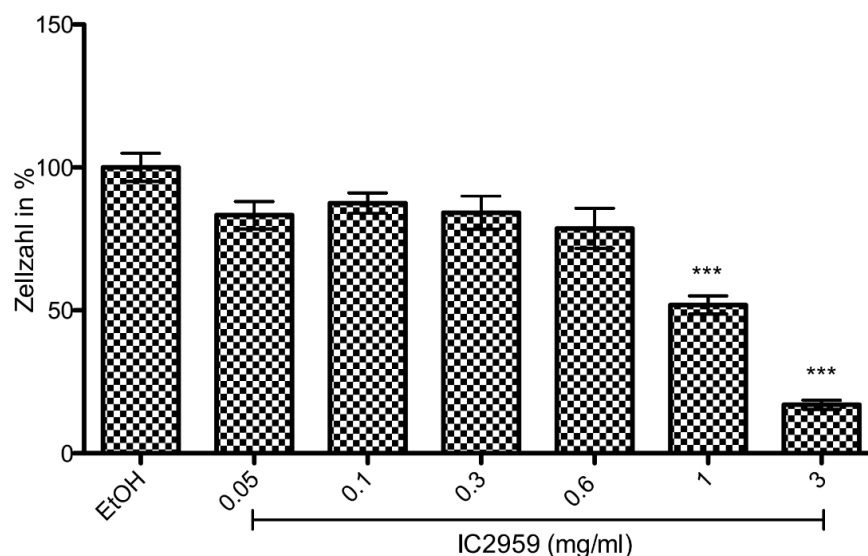


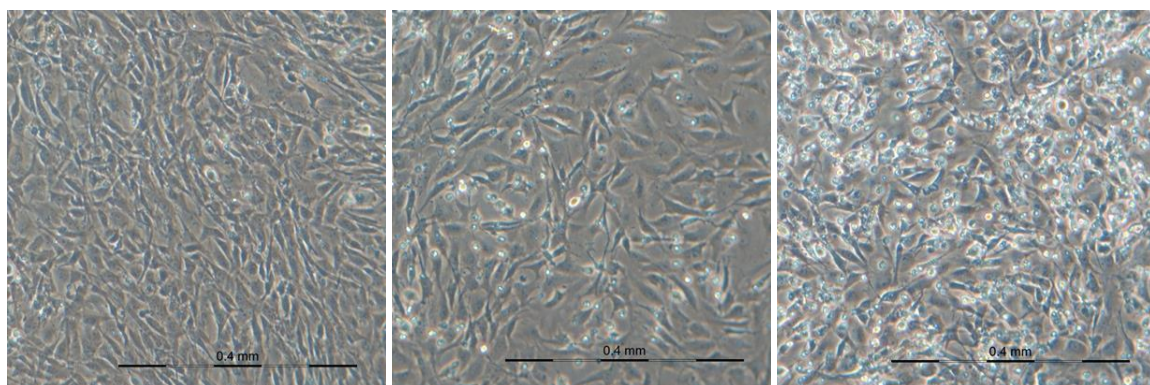
Abb. 30: Humane OB mit Irgacure 2959 nach UV-Aktivierung. Die Anzahl an lebenden Zellen wurde normiert. Die gemittelte Zellzahl in der mit 1 % Ethanol (70 %, EtOH) und UV-Licht behandelten Kontrollgruppe wurde als 100 % definiert. Sie betrug 33733 Zellen/Well im ersten und 25073 Zellen/Well im zweiten Versuch. Nach der Normierung wurden die Werte aus beiden Versuchen zusammengefasst. \*\*\* kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe (p-Wert  $\leq 0,001$ ).

### 3.5 Zytokompatibilität von Irgacure 369 mit Osteoblasten

#### 3.5.1 Irgacure 369 mit primären Maus-Osteoblasten

Irgacure 369 führte bereits in niedrigeren Konzentrationen zu einer Reduktion der Anzahl an lebenden Osteoblasten als Irgacure 2959. In den Gruppen, die mit UV-Licht bestrahlt wurden, wurden die Zellen stärker beeinträchtigt als in den entsprechenden Gruppen, die keiner UV-Strahlung ausgesetzt wurden.





Kontrollgruppe ohne Bestrahlung

10 µg/ml Irgacure 369 ohne UV

10 µg/ml Irgacure 369 mit UV-Licht

Abb. 31: Zellmorphologie primärer Maus-OB mit und ohne Behandlung mit Irgacure 369. Der Balken entspricht einem Maßstab von 0,4 mm.

Schon das Lösungsmittel DMSO ohne Photoinitiator bewirkte in der eingesetzten Konzentration von 1 % eine signifikante Reduktion der Zellzahl, verglichen mit der Kontrollgruppe ohne Zusatz.

In den Konzentrationen von 5 - 100 µg/ml führte Irgacure 369 sowohl in nicht-aktivierter Form, als auch nach UV-Aktivierung zu einer signifikanten Reduktion der Zellzahl. 1 µg/ml war die höchste getestete Konzentration, in der Irgacure 369 keinen signifikanten Einfluss auf die Viabilität zeigte.

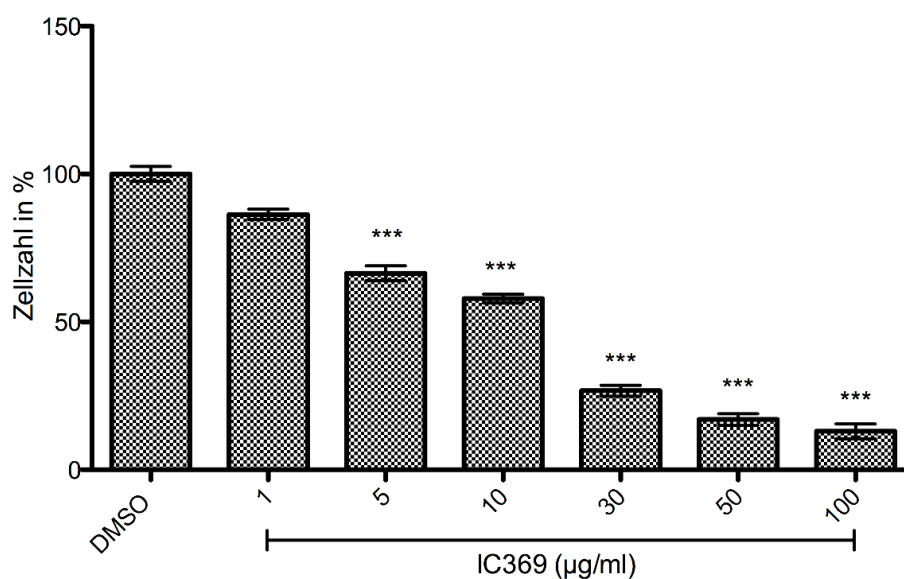


Abb. 32: Primäre Maus-OB mit Irgacure 369 ohne UV-Bestrahlung. Die Anzahl an lebenden Zellen pro Well wurde normiert auf die gemittelte Zellzahl in der Kontrollgruppe mit 1 % DMSO ohne UV-Bestrahlung (= 100 %). Diese betrug 232867 Zellen/Well im ersten und 200933 Zellen/Well im zweiten Versuch. Nach der Normierung wurden die Werte aus beiden Versuchen zusammengefasst. Ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe ist mit \*\*\* gekennzeichnet (p-Wert  $\leq 0,001$ ).

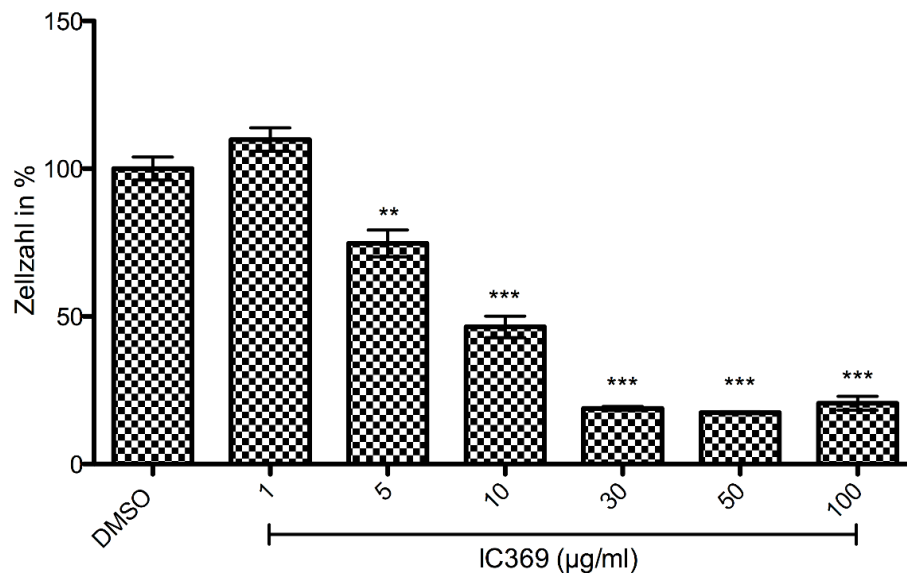
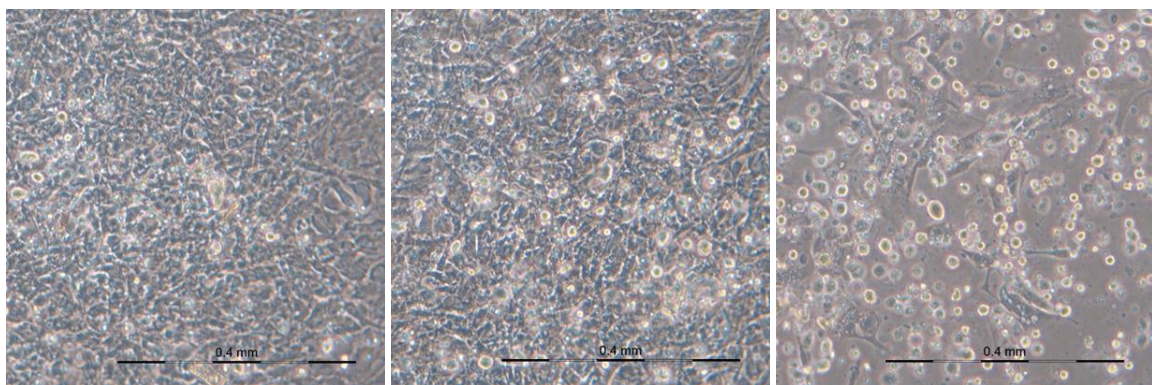


Abb. 33: Primäre Maus-OB mit Irgacure 369 nach UV-Aktivierung. Die gemittelte Zellzahl in der UV-bestrahlten Kontrollgruppe mit 1 % DMSO wurde als 100 % definiert. Sie betrug 101183 Zellen/Well im ersten und 80046 Zellen/Well im zweiten Versuch. Die Zellzahl jedes Wells wurde auf diesen Wert normiert. Nach der Normierung wurden die Werte aus beiden Versuchen zusammen-gefasst. \*\*\* (p-Wert  $\leq 0,001$ ) und \*\* (p-Wert  $\leq 0,01$ ) kennzeichnen einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe.

### 3.5.2 Irgacure 369 mit humanen Osteoblasten

Der Photoinitiator Irgacure 369 führte zu einer dosisabhängigen Reduktion der Anzahl an lebenden humanen Osteoblasten. Die Reduktion war prozentuell geringer ausgeprägt, als bei den Maus-Osteoblasten. Wieder war die Anzahl an überlebenden Osteoblasten in den Gruppen, die keiner UV-Bestrahlung ausgesetzt höher als in den entsprechenden bestrahlten Gruppen.



Kontrollgruppe ohne Bestrahlung

10 µg/ml Irgacure 369 ohne UV

10 µg/ml Irgacure 369 mit UV

Abb. 34: Zellmorphologie humaner OB mit und ohne Behandlung mit Irgacure 369.

Der Balken entspricht einem Maßstab von 0,4 mm.

Ohne UV-Bestrahlung bewirkte Irgacure 369 in den Konzentrationen von 30 – 100 µg/ml eine um etwa 40 % reduzierte Viabilität. In Konzentrationen bis 10 µg/ml kam es in den Gruppen ohne Bestrahlung zu keiner signifikanten Reduktion der Zellzahl.

Nach UV-Aktivierung führte der Photoinitiator in den Konzentrationen von 5 – 100 µg/ml zu einer signifikanten Reduktion, wobei die Zellzahl ab der eingesetzten Konzentration von 10 µg/ml bereits auf weniger als die Hälfte gesenkt wurde. Nur die niedrigste Testkonzentration von 1 µg/ml bewirkte nach UV-Aktivierung keine signifikante Reduktion.

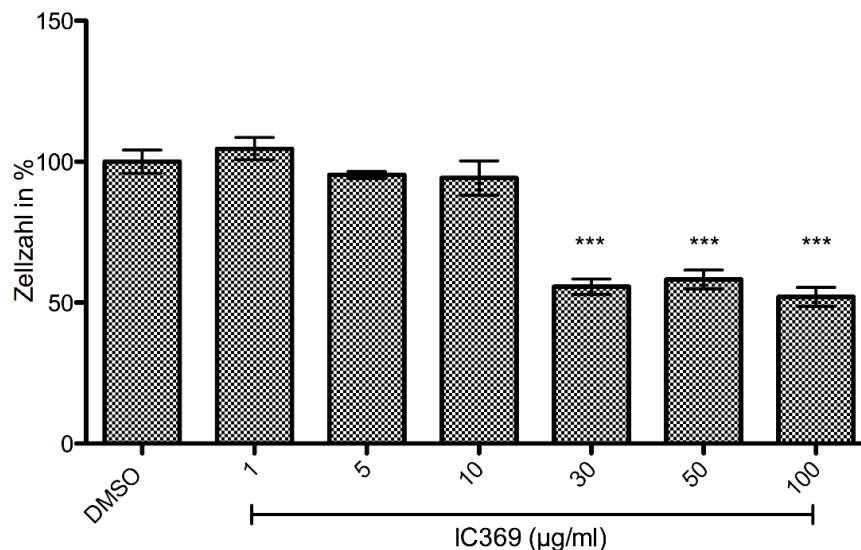


Abb. 35: Humane OB mit Irgacure 369 ohne UV-Bestrahlung. Die Anzahl an lebenden Zellen wurde normiert. Die gemittelte Zellzahl in der Kontrollgruppe mit 1 % DMSO wurde als 100 % definiert. Sie betrug 32893 Zellen/Well im ersten und 50293 Zellen/Well im zweiten Versuch. Nach der Normierung wurden die Werte aus beiden Versuchen zusammengefasst. \*\*\* kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe (p-Wert  $\leq 0,001$ ).

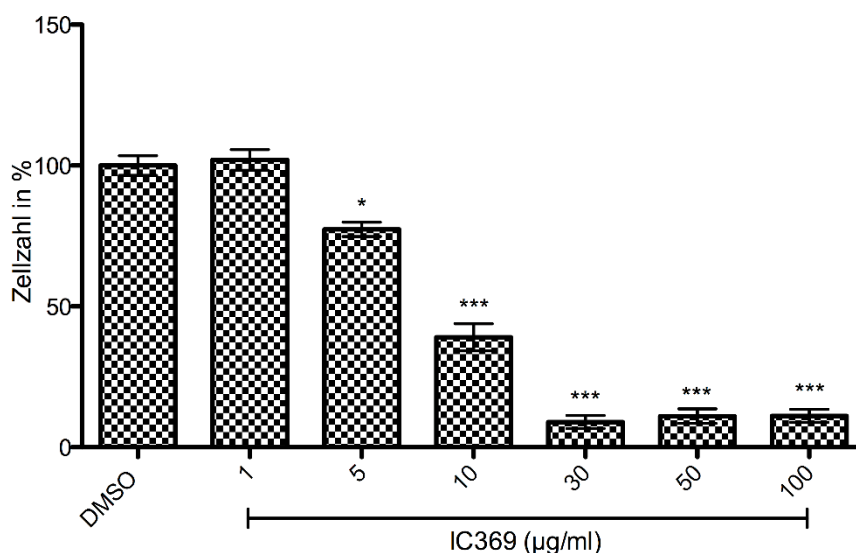
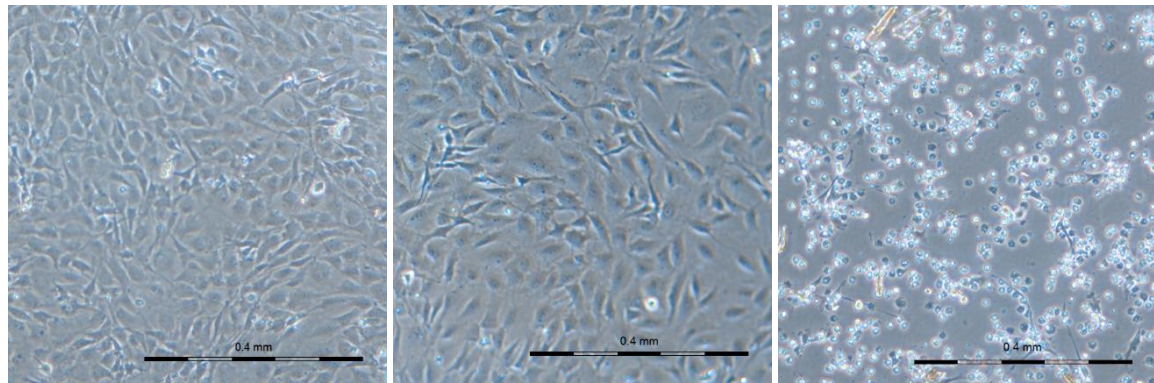


Abb. 36: Humane OB mit Irgacure 369 nach UV-Aktivierung. Die Zellzahlen wurden normiert. Die gemittelte Anzahl an lebenden Zellen in der UV-bestrahlten Kontrollgruppe mit 1 % DMSO wurde als 100 % definiert. Sie betrug 26670 Zellen/Well im ersten und 52213 Zellen/Well im zweiten Versuch. Nach der Normierung wurden die Werte aus beiden Versuchen zusammengefasst. Ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe ist mit \*\*\* (p-Wert  $\leq 0,001$ ) bzw. \* (p-Wert  $\leq 0,05$ ) gekennzeichnet.

### 3.6 Zytokompatibilität von BA 740 mit Osteoblasten

#### 3.6.1 BA 740 mit primären Maus-Osteoblasten

In den zunächst getesteten Konzentrationen von 1 – 50 µg/ml führte BA 740 nach UV-Aktivierung zu einer massiven Zellschädigung. Ohne UV-Bestrahlung bewirkte BA 740 dagegen bis zu einer Konzentration von 3 µg/ml keine signifikante Zellreduktion.



Kontrollgruppe ohne Bestrahlung

Mit 1 µg/ml BA 740 ohne UV-Licht

Mit 1 µg/ml BA 740 und UV-Licht

Abb. 37: Zellmorphologie primärer Maus-OB mit und ohne Behandlung mit BA 740.  
Der Balken entspricht einem Maßstab von 0,4 mm.

Ohne UV-Aktivierung bildeten sich in den Konzentrationen von 30 und 50 µg/ml nach einiger Zeit nadelförmige Kristalle aus.

BA 740 wurde in weiteren niedrigeren Konzentrationen getestet, um die höchste tolerable Konzentration nach UV-Aktivierung zu ermitteln. In den Konzentrationen von 0,3 bis 1 µg/ml kam es mit BA 740 nach UV-Bestrahlung zu einer signifikant niedrigeren Zellzahl, als in der Kontrollgruppe mit der gleichen Menge des verwendeten Lösungsmittels DMSO. Die Gruppen mit 0,01 bis 0,05 µg/ml unterschieden sich nicht signifikant von der UV-bestrahlten Kontrollgruppe mit DMSO. Ohne UV-Bestrahlung zeigte BA 740 in Konzentrationen bis 3 µg/ml keinen signifikanten Einfluss auf die Zellzahl. Nur in den Gruppen mit 5 und 10 µg/ml BA 740 kam es zu einer signifikanten Verringerung der lebenden Zellen.



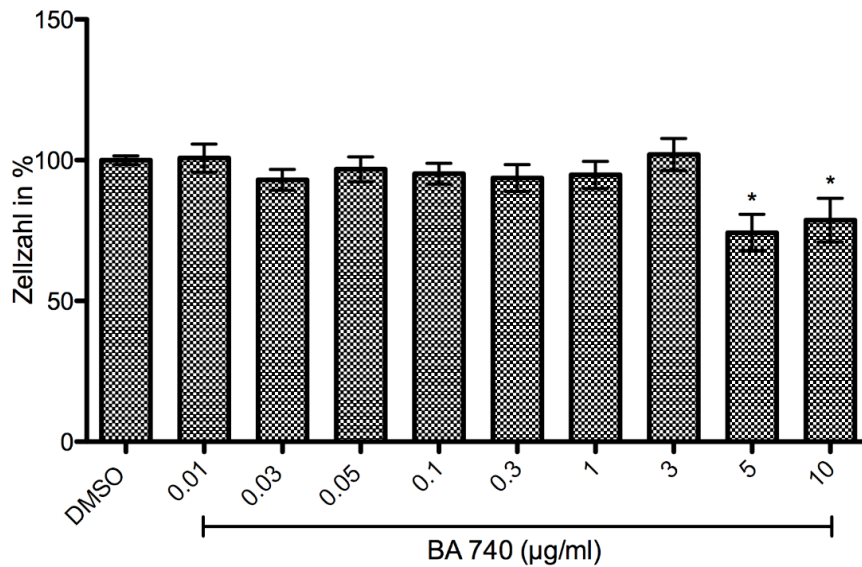


Abb. 38: Primäre Maus-OB mit BA 740 ohne UV-Bestrahlung. Die Zellzahlen wurden normiert. Die gemittelte Anzahl an lebenden OB in der Kontrollgruppe mit 1 % DMSO wurde als 100 % definiert. Sie betrug in den beiden Experimenten mit niedrigeren Konzentrationen an BA 740 111600 Zellen/Well und 214967 Zellen pro Well und in den Versuchen mit höheren Konzentrationen an BA 740 167967 Zellen/Well und 98456 Zellen/Well. Nach der Normierung wurden die Werte zusammengefasst. \* kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe (p-Wert  $\leq 0,05$ ).

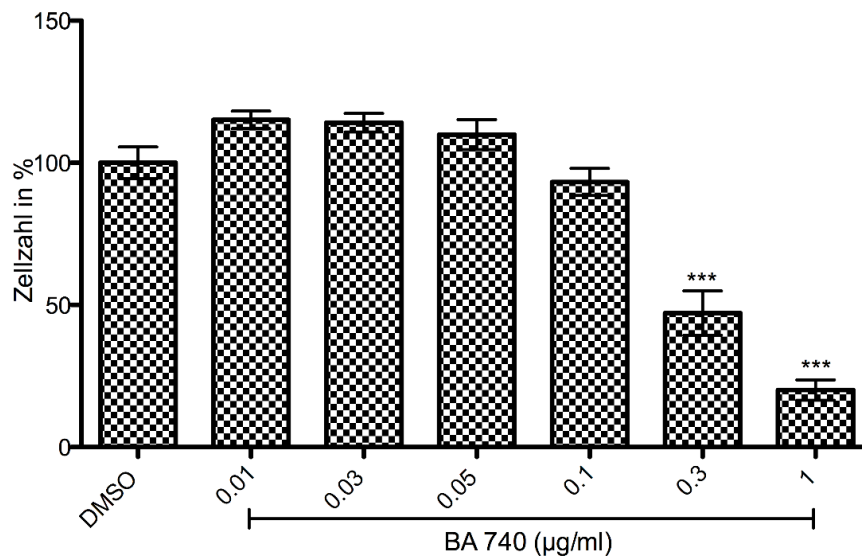
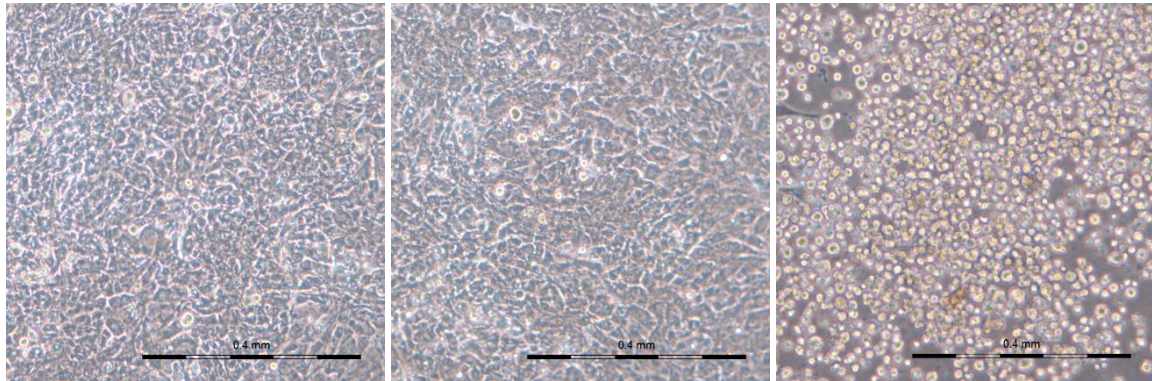


Abb. 39: Primäre Maus-OB mit BA 740 nach UV-Aktivierung. Die Zellzahlen wurden normiert. Die gemittelte Anzahl an lebenden Zellen in der UV-bestrahlten Kontrollgruppe mit 1 % DMSO wurde als 100 % definiert. Sie betrug 69123 Zellen/Well im ersten und 145800 Zellen/Well im zweiten Versuch. Nach der Normierung wurden die Werte aus beiden Versuchen zusammengefasst. Ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe ist mit \*\*\* gekennzeichnet (p-Wert  $\leq 0,001$ ).



### 3.6.2 Humane Osteoblasten mit BA 740

Auch die Zahl an lebenden humanen Osteoblasten wurde durch UV-aktivierten BA 740 in Konzentrationen ab 1 µg/ml dramatisch reduziert. Ohne UV-Bestrahlung zeigte BA 740 in den Konzentrationen bis 10 µg/ml keine signifikante Auswirkung auf die Zellzahl.



Kontrollgruppe ohne Bestrahlung

Mit 1 µg/ml BA 740 ohne Bestrahlung

Mit 1 µg/ml BA 740 und UV-Licht

Abb. 40: Zellmorphologie humaner OB mit und ohne Behandlung mit BA 740.

Der Balken entspricht einem Maßstab von 0,4 mm.

Wieder wurden noch niedrigere Konzentrationen von BA 740 getestet, von denen ohne UV-Aktivierung keine die Zellzahl signifikant beeinflusste. In den Konzentrationen von 0,01 bis 0,1 µg/ml führte BA 740 auch nach UV-Aktivierung zu keiner signifikanten Reduktion der Anzahl an lebenden humanen Osteoblasten. In den Konzentrationen von 0,3 und 1 µg/ml wurde die Viabilität durch den UV-aktivierten Photoinitiator signifikant beeinträchtigt.

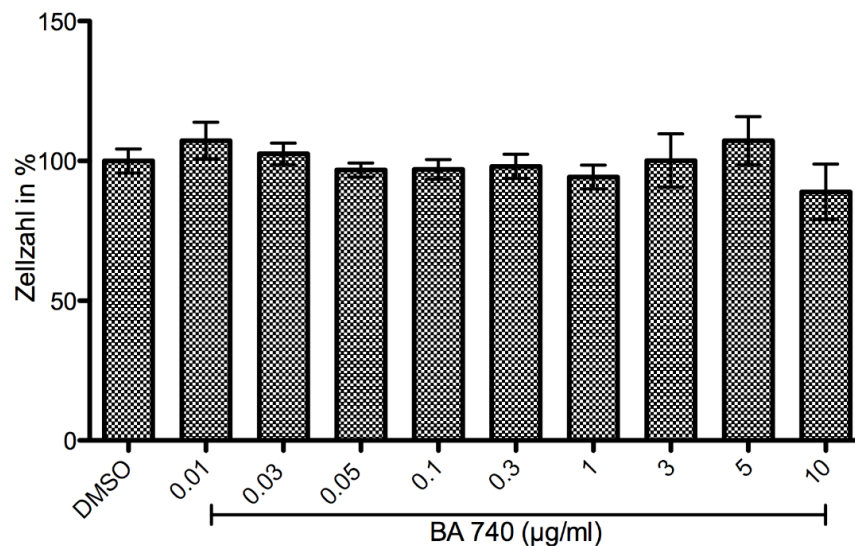


Abb. 41: Humane OB mit BA 740 ohne UV-Bestrahlung. Die Zellzahlen auf die gemittelte Zellzahl in der Kontrollgruppe mit 1 % DMSO (= 100 %) normiert. In den Versuchen mit niedrigeren BA 740 Konzentrationen betrug diese 42140 Zellen/Well, bzw. 60873 Zellen/Well. In den Versuchen mit höheren Konzentrationen an BA 740 betrug sie 12408 Zellen/Well bzw. 44683 Zellen/Well. Nach der Normierung wurden die Werte zusammengefasst. Es bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (p-Wert > 0,05).

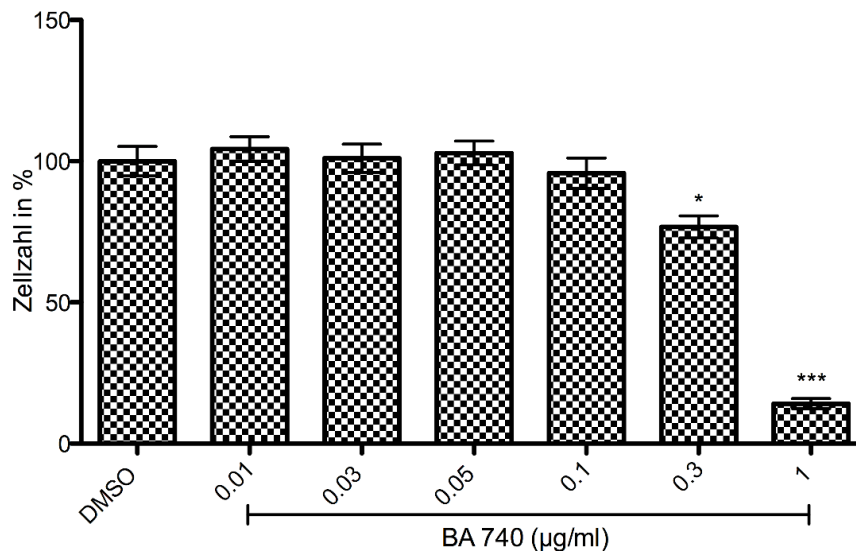


Abb. 42: Humane OB mit BA 740 nach UV-Aktivierung. Die Zellzahlen wurden normiert. Die gemittelte Anzahl an lebenden Zellen in der UV-bestrahlten Kontrollgruppe mit 1 % DMSO wurde als 100 % definiert. Sie betrug 36956 Zellen/Well im ersten und 52780 Zellen/Well im zweiten Versuch. Nach der Normierung wurden die Werte aus beiden Versuchen zusammengefasst. \*\*\* (p-Wert  $\leq 0,001$ ) und \* (p-Wert  $\leq 0,05$ ) kennzeichnen einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe.

### 3.7 Einfluss von Ascorbinsäure auf die Überlebensrate der Osteoblasten

Die Zytokompatibilitätsstudien mit Maus- und humanen Osteoblasten wurden in unterschiedlichen Nährmedien durchgeführt. Nur dem Kulturmedium der humanen Osteoblasten war L-Ascorbinsäure-2-phosphat zugesetzt worden. Um einen möglichen Einfluss des Antioxidans Ascorbinsäure auf das Überleben der Zellen zu prüfen, wurden beide Zelltypen in Medium mit und ohne Zusatz von 100 µM L-Ascorbinsäure-2-phosphat mit dem Photoinitiator Irgacure 2959 und UV-Strahlung behandelt. Irgacure 2959 führte nach UV-Aktivierung in den getesteten Konzentrationen von 0,3 und 1 mg/ml zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl an lebenden Maus-Osteoblasten, wobei die Zellen in Medium mit und ohne Ascorbinsäure fast gleich stark geschädigt wurden. In der Kontrollgruppe, die nur mit reinem Ethanol (70 %) behandelt und mit UV-Licht bestrahlt wurde, wurde die Zellzahl mit Ascorbinsäure signifikant weniger stark verringert als ohne Ascorbinsäure. Bei den humanen Osteoblasten gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen mit und ohne Ascorbinsäure-Zusatz.

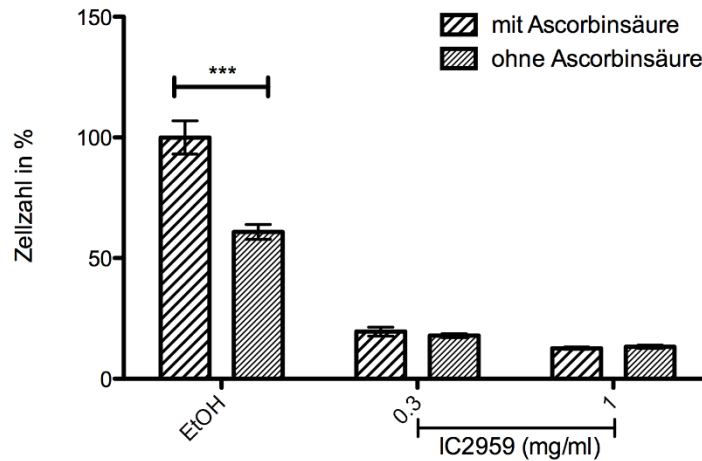


Abb. 43: Maus-OB und der Einfluss von Ascorbinsäure im Medium auf die Zellschädigung. Die Zellzahlen wurden normiert. Die Anzahl lebender Zellen in der mit 1 % Ethanol (70 %) und UV-Licht behandelten Kontrollgruppe mit 100  $\mu$ M L-Ascorbinsäure-2-phosphat im Medium wurde als 100 % definiert. Sie betrug 58400 Zellen/Well im ersten und 77200 Zellen/Well im zweiten Versuch. Nach der Normierung wurden die Werte aus beiden Versuchen zusammengefasst. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ist mit \*\*\* ( $p$ -Wert  $\leq 0,001$ ) gekennzeichnet.

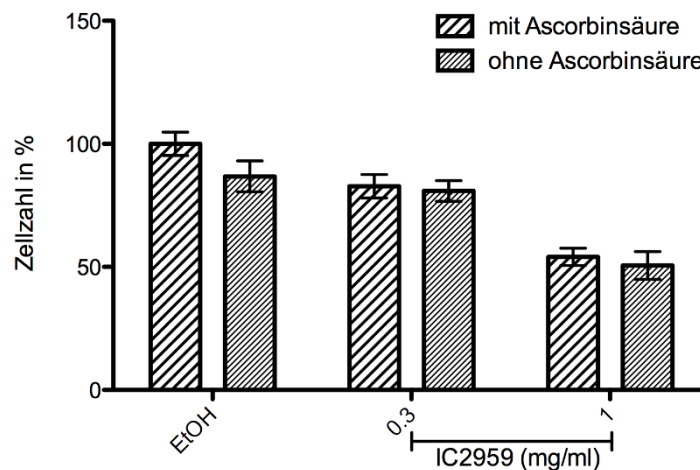


Abb. 44: Humane OB und der Einfluss von Ascorbinsäure im Medium auf die Zellschädigung. Die Zellzahlen wurden normiert. Die durchschnittliche Anzahl lebender Zellen in der mit 1 % Ethanol (70 %) und UV-Licht behandelten Kontrollgruppe mit 100  $\mu$ M L-Ascorbinsäure-2-phosphat im Medium wurde als 100 % definiert. Sie betrug 27020 Zellen/Well im ersten und 33326 Zellen/Well im zweiten Versuch. Nach der Normierung wurden die Werte aus beiden Versuchen zusammengefasst. Zwischen den Gruppen besteht kein signifikanter Unterschied ( $p$ -Wert  $> 0,05$ ).

### 3.8 Proliferationsrate der Maus- und humanen Osteoblasten

Die Generationszeit von humanen und Maus-Osteoblasten wurde verglichen, um zu prüfen, ob die unterschiedliche Sensitivität der Zelltypen gegenüber UV-Strahlung und Photoinitiatoren mit einem Unterschied in der Proliferationsrate korreliert. Die Zellen wurden acht Tage lang kultiviert und die Zellzahl täglich bestimmt.

#### 3.8.1 Proliferationsrate von primären Maus-Osteoblasten

Im ersten Versuch zeigten die Maus-Osteoblasten von Tag 1 bis Tag 5 ein annähernd exponentielles Wachstum. Am Tag 5 war der Zellrasen konfluent, die Kurve flachte ab. Am Tag 1 wurde für 3 Wells eine durchschnittliche Zellzahl von 11443 Zellen/Well ermittelt, am Tag 5 von 119466 Zellen/Well. Durch Einsetzen in die Formel wurde eine Generationszeit von 1,18 Tagen berechnet.  $t_g = \frac{\log 2 \times 4 \text{ d}}{\log 119466 - \log 11443} = 1,18 \text{ d}$

Im zweiten Experiment war von Tag 1 bis Tag 4 ein annähernd exponentieller Anstieg der Zellzahl zu beobachten, bevor das Wachstum stagnierte. Am Tag 1 betrug die aus 3 Wells bestimmte, gemittelte Zellzahl 16940 Zellen/Well. Am Tag 4 wurde eine durchschnittliche Zellzahl von 200633 Zellen/Well bestimmt. Durch Einsetzen in die Formel wurde die Generationszeit auf 0,84 Tage berechnet.  $t_g = \frac{\log 2 \times 3 \text{ d}}{\log 200633 - \log 16940} = 0,84 \text{ d}$

Gerundet auf ganze Tage wurde also in beiden Versuchen eine Generationszeit von einem Tag für die primären Maus-Osteoblasten ermittelt.

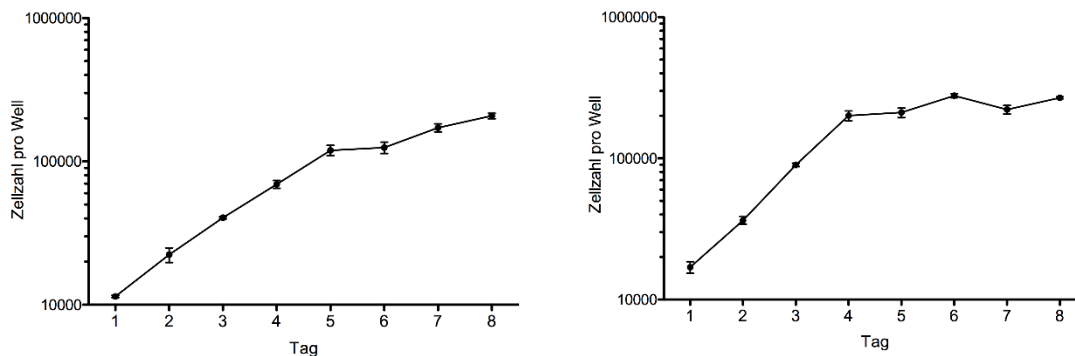


Abb. 45: Proliferation der Maus-OB von Tag 1 bis Tag 8. Der Anstieg der Anzahl an lebenden Zellen ist logarithmisch dargestellt. Im ersten Experiment (links) war der Anstieg von Tag 1 bis Tag 5, im zweiten Experiment von Tag 1 bis Tag 4 annähernd exponentiell (rechts).

#### 3.8.2 Proliferationsrate von humanen Osteoblasten

Im ersten Experiment zeigten die humanen Osteoblasten von Tag 2 bis Tag 6 ein annähernd exponentielles Wachstum. Die aus drei Wells ermittelte durchschnittliche Zellzahl betrug 15163 Zellen/Well am Tag 2, und 29346 Zellen/Well am Tag 6. Die Generationszeit wurde auf 4,2 Tagen berechnet.  $t_g = \frac{\log 2 \times 4 \text{ d}}{\log 29347 - \log 15163} = 4,2 \text{ d}$

Im zweiten Experiment stieg die Zellzahl von Tag 2 bis Tag 7 annähernd exponentiell, bevor die Kurve leicht abflachte. Die gemittelte Zellzahl aus drei Wells betrug 24406 Zellen/Well am Tag 2 und 58083 Zellen/Well am Tag 7.

Die Generationszeit wurde auf 4,0 Tage berechnet.  $t_g = \frac{\log 2 \times 5 \text{ d}}{\log 58083 - \log 24406} = 4,0 \text{ d}$

Auf ganze Tage gerundet wurde also in beiden Experimenten eine Generationszeit von vier Tagen für die humanen Osteoblasten ermittelt.

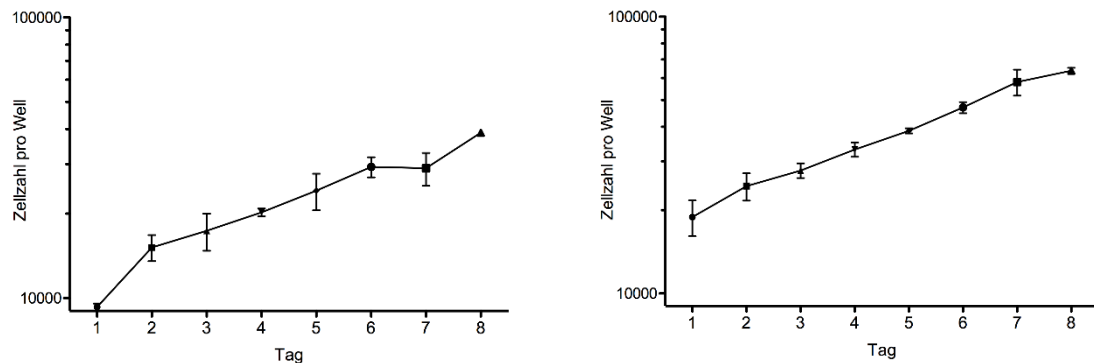


Abb. 46: Proliferation der humanen Osteoblasten von Tag 1 bis Tag 8. Der Anstieg der Anzahl an lebenden Zellen ist logarithmisch dargestellt. Im ersten Experiment (links) zeigten die Zellen von Tag 2 bis Tag 6 ein annähernd exponentielles Wachstum, im zweiten Experiment (rechts) von Tag 2 bis Tag 7.

### 3.9 Potential der gewonnenen Knochenmarkszellen zur Ausdifferenzierung zu reifen Osteoklasten

Am Tag 5 nach der Zellaussaat wurden die Zellen fixiert und eine TRAP-Färbung durchgeführt. TRAP-positive Zellen wurden rot-violett gefärbt. TRAP-positive Zellen mit drei oder mehr Zellkernen wurden als Osteoklasten definiert. Es wurden erfolgreich Osteoklasten generiert.

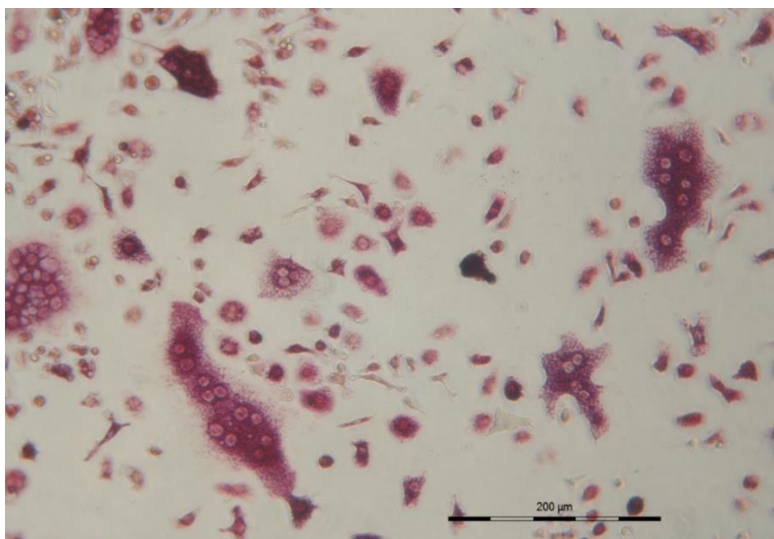


Abb. 47: TRAP-positive Zellen wurden rot-violett gefärbt. Der Balken entspricht einem Maßstab von 200 µm.



### 3.10 Einfluss von UV-Strahlung und Lösungsmitteln auf Osteoklasten-Vorstufen

Zur Beurteilung der Viabilität der monozytären Osteoklasten-Vorläuferzellen wurde am Tag 5 ein MTS-Assay durchgeführt und die Absorption bei 490 nm gemessen. Die Netto-Absorption, von der die Hintergrundabsorption durch das Medium abgezogen wurde, ist proportional zur Zellviabilität. Die Viabilität wurde durch UV-Strahlung nicht-signifikant reduziert. Die zum Lösen der Photoinitiatoren verwendeten Lösungsmittel Ethanol (70 %) und DMSO zeigten in der dem Medium zugesetzten Konzentration von 1 % keinen signifikanten Einfluss auf die Viabilität.

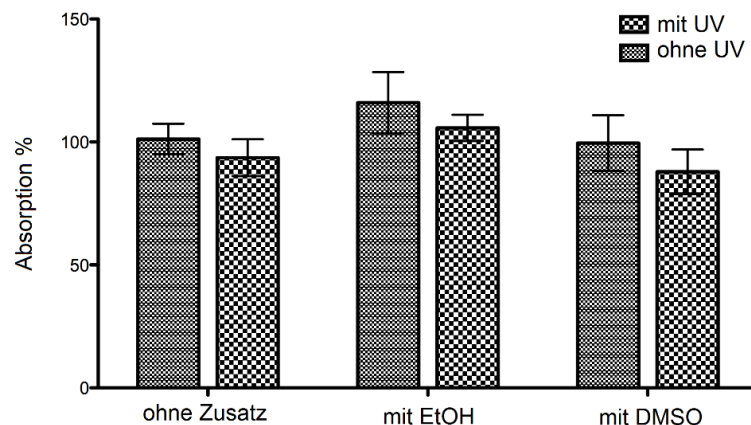


Abb. 48: Einfluss von UV-Strahlung und den verwendeten Lösungsmitteln auf OC-Vorstufen. Die Netto-Absorption jedes Wells wurde auf die gemittelte Netto-Absorption der Kontrollgruppe, die weder mit Lösungsmitteln noch UV-Strahlung behandelt wurde (= 100 %), normiert.

### 3.11 Zytokompatibilität von Irgacure 2959 mit Osteoklasten-Vorläuferzellen

Sowohl ohne UV-Bestrahlung als auch nach UV-Aktivierung wurde die Viabilität der monozytären Osteoklasten-Vorläuferzellen durch Irgacure 2959 in der Konzentration von 1 mg/ml drastisch reduziert. Die Behandlung mit 0,1 mg/ml Irgacure 2959 beeinflusste die Zellviabilität weder mit noch ohne UV-Bestrahlung signifikant.

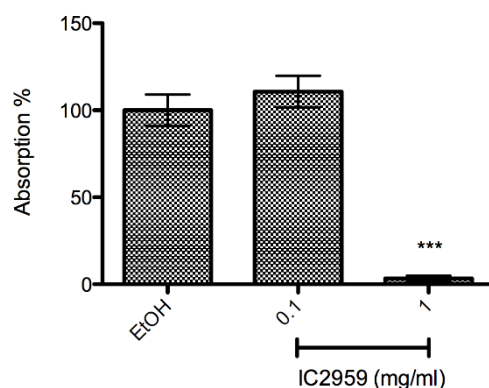


Abb. 49: OC-Vorstufen mit Irgacure 2959 ohne UV-Bestrahlung.

Die gemessenen Absorptionswerte der Wells wurden nach Abzug der Hintergrundabsorption durch das Medium normiert. Die Netto-Absorption in der Kontrollgruppe mit 1 % des Lösungsmittels Ethanol (70 %, EtOH) wurde als 100 % definiert. \*\*\* kennzeichnen einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe (p-Wert  $\leq 0,001$ ).

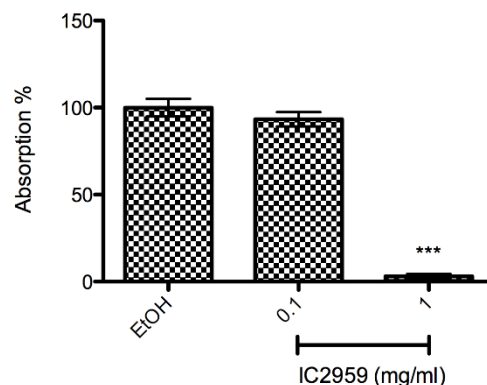


Abb. 50: OC-Vorstufen mit Irgacure 2959 nach UV-Aktivierung.

### 3.12 Zytokompatibilität von Irgacure 369 mit Osteoklasten-Vorläuferzellen

Ohne UV-Bestrahlung wurde die Viabilität durch Irgacure 369 in den getesteten Konzentrationen von 1 und 10 µg/ml nicht signifikant beeinflusst. In der Gruppe mit 1 µg/ml Irgacure 369 wurde eine leicht erhöhte, mit 10 µg/ml eine etwas schwächere Absorption als in der Kontrollgruppe mit der entsprechenden Menge des Lösungsmittels DMSO gemessen. Nach UV-Aktivierung führte Irgacure 369 in beiden getesteten Konzentrationen zu einer signifikant beeinträchtigten Viabilität. In der UV-bestrahlten Gruppe mit 10 µg/ml Irgacure 369 lag die gemessene Absorption im Intensitätsbereich der Hintergrundabsorption. Auch bei der optischen Kontrolle durch das Mikroskop waren in dieser Gruppe keine lebenden Zellen zu sehen.

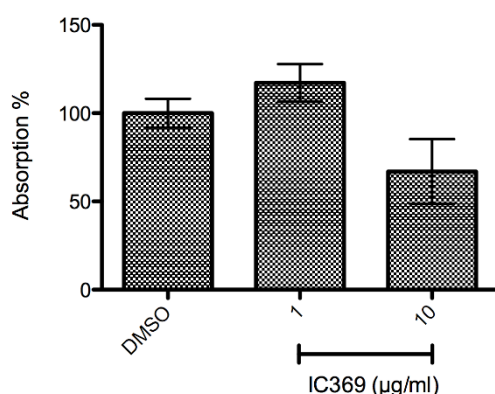


Abb. 51: OC-Vorstufen mit Irgacure 369 ohne UV-Bestrahlung.

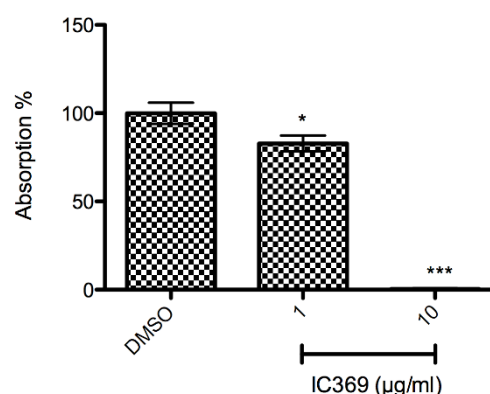


Abb. 52: OC-Vorstufen mit Irgacure 369 nach UV-Aktivierung.

Die Absorptionswerte der Wells, abzüglich der Hintergrundabsorption, wurden normiert. Die Netto-Absorption der Kontrollgruppe mit 1 % des Lösungsmittels DMSO wurde als 100 % definiert. \*\*\* (p-Wert  $\leq 0,001$ ) und \* (p-Wert  $\leq 0,05$ ) kennzeichnen einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe.

### 3.13 Zytokompatibilität von BA 740 mit Osteoklasten-Vorläuferzellen

Die Absorptionswerte der Gruppen ohne UV-Bestrahlung unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Mit 0,3 und 0,03 µg/ml BA 740 wurde eine nicht-signifikant höhere Absorption gemessen als in der Kontrollgruppe mit der entsprechenden Menge des reinen Lösungsmittels DMSO. Nach UV-Aktivierung führte BA 740 in der Konzentration von 0,3 µg/ml zu einer dramatischen Reduktion der Viabilität. 0,03 µg/ml BA 740 führte nach UV-Bestrahlung zu einer nicht-signifikant geringeren Absorptionsintensität gegenüber der UV-bestrahlten Kontrollgruppe mit 1 % DMSO.

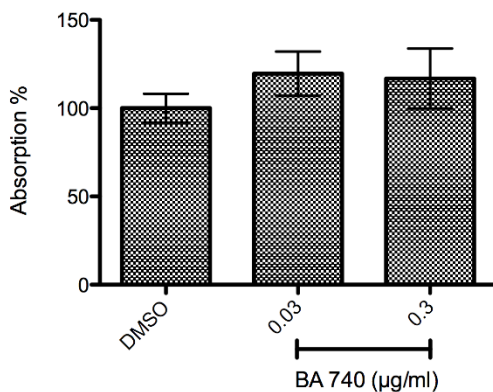


Abb. 53: OC-Vorstufen mit BA 740 ohne UV-Bestrahlung.

Die gemessenen Absorptionswerte wurden, nach Abzug der Hintergrundabsorption, normiert. Die Netto-Absorption in der Kontrollgruppe mit 1 % des Lösungsmittels DMSO wurde als 100 % definiert. Ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe ist mit \*\*\* gekennzeichnet (p-Wert  $\leq 0,001$ ).

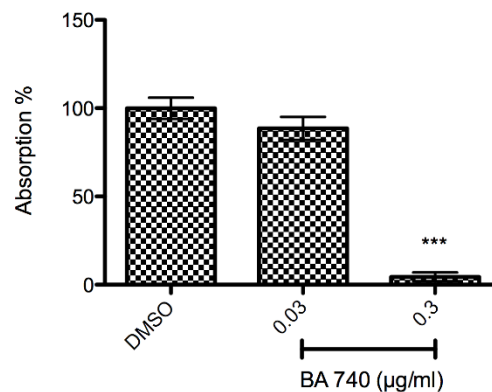


Abb. 54: OC-Vorstufen mit BA 740 nach UV-Aktivierung.

## 4 Diskussion

Ein wichtiges Kriterium für die Anwendbarkeit von Photoinitiatoren im Tissue Engineering, insbesondere zur Verkapselung von Zellen in ein Photopolymer, ist ihre Zytokompatibilität. In dieser Diplomarbeit wurde der Einfluss der drei Photoinitiatoren Irgacure 2959, Irgacure 369 und BA 740 auf Knochenzellen untersucht. Als Zellkultur-Modelle dienten primäre Maus-Osteoblasten, humane Osteoblasten, und Maus-Osteoklasten-Vorläuferzellen. Die Photoinitiatoren wurden sowohl in Form der gelösten Ausgangssubstanzen, als auch nach ihrer Aktivierung mit UV-Licht getestet. Die Zellen wurden dabei einer Extrembedingung ausgesetzt, unter der ein Angriff von Zellstrukturen durch reaktive Initiator-Spezies besonders wahrscheinlich ist. Während der Quervernetzung eines Photopolymers würden die gebildeten Radikale in erster Linie mit reaktiven Gruppen der Monomere reagieren. Bei der Verkapselung von Zellen in ein photopolymerisierbares Material wäre also eine wesentlich geringere Zellschädigung zu erwarten, als in diesen Versuchen gezeigt wurde (Williams, et al. 2005).

Die drei Photoinitiatoren zeigten eine konzentrationsabhängige, schädigende Wirkung auf alle untersuchten Zelltypen. Nach UV-Bestrahlung war die Viabilität in allen Gruppen niedriger als in den nicht-bestrahlten Gruppen. Einerseits führte schon die Strahlung allein zu einer erheblichen Zellschädigung, andererseits waren auch die Photoinitiatoren nach ihrer Aktivierung, bei der die freien Radikale gebildet werden, aggressiver. Besonders ausgeprägt war dieser Unterschied bei der Substanz BA 740. Dieser Photoinitiator wird in der Patentschrift als nicht toxisch bezeichnet. *In vitro* Toxizitätstudien wurden an Maus-



Fibroblasten, humanen Hepatozyten, humanen embryonalen Nierenzellen sowie bovinen Chondrozyten durchgeführt. Allerdings wurden lediglich die in DMSO gelösten, nicht-aktivierten Substanzen getestet (Gottschaldt, et al. 2015). Ohne Aktivierung konnte in den Tests mit humanen Osteoblasten bis 10 µg/ml, mit primären Osteoblasten bis 3 µg/ml und mit Osteoklasten-Vorläufern bis 0,3 µg/ml BA 740 keine signifikante Reduktion der Viabilität festgestellt werden. Nach UV-Aktivierung waren die maximalen tolerierten Konzentrationen an BA 740 mit 0,1 µg/ml für die Osteoblasten und 0,03 µg/ml für die Osteoklasten-Vorläuferzellen jedoch deutlich niedriger.

Bisher wurden systematische Studien zur Toxizität von Photoinitiatoren vor allem an Zelllinien durchgeführt (Bryant, et al. 2000, Williams, et al. 2005). Von besonderem Interesse im Bone Tissue Engineering ist der Einfluss der Substanzen auf die knochenbildenden Osteoblasten. Williams et al. untersuchten unter anderem den Einfluss von Irgacure 2959 und anderen Photoinitiatoren auf humane fetale Osteoblasten (Williams, et al. 2005). In dieser Diplomarbeit wurde die Zytokompatibilität von drei Photoinitiatoren mit primären Maus-Osteoblasten und humanen Osteoblasten untersucht. Primäre Zellen sind im Allgemeinen besser geeignet als Zelllinien, um Aussagen über das *in vivo* Zellverhalten zu treffen. Für die Versuche mit humanen Osteoblasten wurden die Zellen der 2. Passage verwendet. Streng genommen handelt es sich dabei um keine Primärzellen, jedoch sollten bei dieser niedrigen Passage noch alle ursprünglichen phänotypischen Ausprägungen primärer humaner Osteoblasten erhalten sein (Dillon, et al. 2012). Die gewonnen humanen Zellen zeigten zwar keine Matrixmineralisation, konnten aber mittels ALP-Färbung als Zellen der Osteoblasten-Linie identifiziert werden. Für die Prüfung eines speziesbezogenen Unterschieds in der Sensitivität der Osteoblasten, wurde diese Charakterisierung als ausreichend befunden. Die humanen Osteoblasten wurden durch UV-Licht und Photoinitiatoren wesentlich weniger stark geschädigt, als die Maus-Osteoblasten. Da die isolierten humanen Osteoblasten nur von einer einzigen Spenderin stammen, kann aber keinesfalls von einem repräsentativen Ergebnis gesprochen werden. Dennoch konnte gezeigt werden, dass zwischen Osteoblasten unterschiedlicher Herkunft erhebliche Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber schädlichen oxidativen Einflüssen bestehen.

Williams et al. beobachteten eine Korrelation zwischen Proliferationsrate und oxidativer Schädigung (Williams, et al. 2005). Dieser Zusammenhang konnte auch in den vorliegenden Versuchen bestätigt werden. Die primären Maus-Osteoblasten proliferierten wesentlich schneller und wurden von UV-Licht und Photoinitiatoren stärker beeinträchtigt als die humanen Osteoblasten. Es muss eingeräumt werden, dass die gewonnen Ergebnisse keine allgemeine Aussage über die speziesbezogenen Unterschiede in

Proliferationszeit und Sensitivität zwischen Maus- und humanen Osteoblasten zulassen. Abgesehen von der Spezies, beeinflussen eine Reihe anderer Faktoren, wie das Alter des Spenders, der Ort der Gewebeentnahme und die Methode der Isolation die Eigenschaften der gewonnenen Osteoblasten (Czekanska, et al. 2012). Die Maus-Osteoblasten wurden aus Calvarien von neugeborenen Mäusen über enzymatischen Verdau, die humanen Osteoblasten durch Auswanderung aus Knochenfragmenten des Hüftknochens einer älteren Spenderin gewonnen. Die beiden Zellmodelle sind also nur bedingt vergleichbar. Humane Zellen aus dem Trabekelknochen von Spendern im Alter von über 60 Jahren weisen im Allgemeinen eine geringere Teilungsrate auf (Czekanska, et al. 2012). Möglicherweise würden humane Zellen von jüngeren Spendern, bzw. durch eine andere Methode oder aus einem anderen Knochen gewonnene Osteoblasten ebenso schnell proliferieren und genauso empfindlich auf die oxidativen Einflüsse reagieren wie die hier getesteten Maus-Osteoblasten.

Williams et al. stellten in ihrer Studie die Hypothese auf, dass der Zusatz von Ascorbinsäure zu manchen Kulturmedien zur höheren Überlebensrate der in diesen Medien kultivierten Zellen beigetragen haben könnte (Williams, et al. 2005). Ascorbinsäure ist ein bekanntes Antioxidans. Dem Kulturmedium der humanen Osteoblasten wurde, im Gegensatz zum Kulturmedium der Maus-Osteoblasten, das langlebige Vitamin C Derivat L-Ascorbinsäure-2-phosphat zugesetzt. Um zu untersuchen, ob dies zur geringeren Schädigung der humanen Zellen beigetragen hat, wurde in einer separaten Versuchsreihe der Einfluss von UV-Licht und Irgacure 2959 auf humane und Maus-Osteoblasten mit und ohne L-Ascorbinsäure-2-phosphat-Zusatz zum Kulturmedium verglichen. Ein schützender Effekt vor dem negativen Einfluss der UV-Strahlung durch das Antioxidans konnte gezeigt werden. Wie schon die Schädigung durch Strahlung und Photoinitiatoren, wirkte sich auch dieser positive Effekt der Ascorbinsäure auf die Maus-Osteoblasten stärker aus als auf die humanen Osteoblasten. Dies könnte darauf hinweisen, dass schneller proliferierende Osteoblasten im Allgemeinen stärker auf äußere Einflüsse reagieren.

In dieser Arbeit wurde auch der Effekt der Photoinitiatoren auf osteoklastäre Zellen untersucht. Zwar sind Zellen der Osteoklasten-Linie keine potentiellen Kandidaten für die Beladung von Scaffolds zur Knochenregeneration, aber auch sie sind für ein funktionell gesundes Knochengewebe von wesentlicher Bedeutung. Die Generierung von reifen Osteoklasten in einer Knochenmarkskultur ist aufgrund des erforderlichen Faktors RANKL relativ kostenaufwändig. Für die Zytokompatibilitätstests wurden daher murine Vorläufer-Zellen verwendet, die das Potential zur Ausdifferenzierung zu mehrkernigen Osteoklasten zeigten. Die drei Photoinitiatoren wurden in je zwei Konzentrationen mit und ohne UV-Aktivierung getestet. Auch auf die Osteoklasten-Vorstufen konnte eine dosisabhängige

Toxizität der Photoinitiatoren gezeigt werden, die nach UV-Aktivierung stärker ausgeprägt war. Die Viabilität der Zellen wurde mithilfe eines metabolischen Assays beurteilt. Im Gegensatz zur Bestimmung der Anzahl an lebenden Zellen, kann dabei nicht zwischen einer niedrigen Zellzahl und einer niedrigen metabolischen Aktivität unterschieden werden. Da die Quantifizierung mithilfe einer Absorptionsmessung erfolgt, kann eine Eigenabsorption der Substanzen das Ergebnis verfälschen. Die leicht erhöhte Absorption der Gruppen mit höheren Konzentrationen der Testsubstanzen kam möglicherweise durch eine Eigenabsorption der Photoinitiatoren zustande. Die Plausibilität der Messergebnisse wurde aber durch eine optische Beurteilung der Zellen am Mikroskop vor Durchführung des Assays bestätigt.

Beim Vergleich der unterschiedlichen Photoinitiatoren, schien Irgacure 2959 den beiden anderen Substanzen überlegen zu sein. Ein erster Vorteil liegt in seiner Löslichkeit. Irgacure 2959 wurde mit Ethanol (70 %) in Lösung gebracht und blieb nach Zugabe zum Medium auch in der höchsten finalen Testkonzentration von 3 mg/ml in Lösung. Das reine Lösungsmittel Ethanol (70 %) hatte in der zugegebenen Menge von 1 % im Medium keinen Effekt auf die Zellviabilität. Dagegen mussten Irgacure 369 und BA 740 mit DMSO in Lösung gebracht werden, das schon alleine zu einer reduzierten Viabilität der Osteoblasten führte. Bei der Zugabe der Lösungen zum Medium blieb Irgacure 369 nur in einer Endkonzentration bis 100 µg/ml und BA 740 bis 50 µg/ml in Lösung. Ein Vergleich der Toxizität auf die Knochenzellen zeigte große Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Photoinitiatoren. Wie schon in früheren Studien, erwies sich der Photoinitiator Irgacure 2959 als besonders gut verträglich. Dies könnte mit seiner Hydrophilie und damit einhergehender schlechter Membrangängigkeit assoziiert sein (Bryant, et al. 2000, Williams, et al. 2005). Ohne UV-Aktivierung waren die höchsten Konzentrationen, die noch keine signifikante Reduktion der Zellviabilität hervorriefen, von Irgacure 2959 etwa 100fach höher als von Irgacure 369 und BA 740. Nach UV-Aktivierung waren die maximalen tolerierten Konzentrationen von Irgacure 2959 um den Faktor 100 höher als von Irgacure 369 und sogar um den Faktor 1000 höher als von BA 740.

Allerdings muss die potentielle Toxizität der einzelnen Photoinitiatoren im Kontext mit der jeweiligen Initiationseffizienz betrachtet werden. Je höher die Effizienz, desto niedrigere Konzentrationen sind für die Photopolymerisation nötig. Die Effizienz der Initiation hängt unter anderem davon ab, wie stark das zur Aktivierung verwendete Strahlungsspektrum vom Photoinitiator absorbiert wird. Zur Zwei-Photonenabsorptions-Polymerisation müssten beispielsweise von BA 740 wesentlich geringere Konzentrationen eingesetzt werden, als von Irgacure 369 und Irgacure 2959 (Gottschaldt, et al. 2015). Um entscheiden zu können, welcher Photoinitiator für eine bestimmte Anwendung am besten

geeignet ist, müsste die für eine optimale Vernetzung benötigte Menge des Photoinitiators ermittelt werden. Diese ist nicht nur für jede Substanz unterschiedlich, sondern variiert auch je nach Bestrahlungsbedingungen und zu vernetzendem Photopolymer. Liegt die nötige Menge an Photoinitiator unter der minimalen toxischen Konzentration, werden keine erheblichen Zellschäden erwartet. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurden, ist die Zytokompatibilität eines Photoinitiators je nach Zelltyp sehr unterschiedlich. Die verträgliche Konzentration muss also für die betroffenen Zellen bestimmt werden. Oft muss ein Kompromiss zwischen Vernetzungseffizienz und Verträglichkeit gefunden werden.

## 5 Zusammenfassung

Photoinitiatoren sind Substanzen, die bei Einwirkung von Strahlung zur Umwandlung einer viskosen Monomerlösungen in ein verfestigtes Material führen. Die Photopolymerisation ist zeitlich und räumlich kontrollierbar und läuft innerhalb kürzester Zeit bei Raumtemperatur und physiologischem pH-Wert ab. Die milden Reaktionsbedingungen ermöglichen den Einbau von Biomolekülen und lebenden Zellen. Im Bone Tissue Engineering können mithilfe der Photopolymerisation exakt geformte und komplex strukturierte Konstrukte gefertigt werden, die mit knochenbildenden Zellen und Biomolekülen kombiniert, als künstliche Gewebe zur Reparatur und Regeneration von Knochendefekten dienen. Photopolymisierbare Biomaterialien können auch injiziert und direkt am Ort des Gewebedefekts verfestigt werden. Bei der Aktivierung bildet der Photoinitiator reaktive Spezies, die dann die Polymerisationsreaktion auslösen. Sowohl die aktivierende Strahlung als auch die gebildeten Radikale können oxidative Zellschäden hervorrufen.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Zytokompatibilität von Photoinitiatoren mit Knochenzellen. Die drei Photoinitiatoren Irgacure 2959, Irgacure 369 und BA 740 wurden in unterschiedlichen Konzentration mit und ohne UV-Aktivierung getestet. Als Zellkultur-Modelle dienten primäre Maus-Osteoblasten, humane Osteoblasten und Maus-Osteoklasten-Vorläuferzellen. Schon die UV-Bestrahlung alleine bewirkte eine Reduktion der Zellviabilität. Eine dosisabhängige Toxizität der drei Substanzen auf alle getesteten Zelltypen, die durch die UV-Aktivierung verstärkt wurde, wurde gezeigt. Die Maus-Osteoblasten wurden stärker beeinträchtigt, als die humanen Osteoblasten. Ein Vergleich der Verdopplungszeiten von Maus- und humanen Osteoblasten bestätigte einen zuvor beobachteten Zusammenhang zwischen schneller Proliferationsrate und hoher Sensitivität unterschiedlicher Zelltypen. Die unterschiedliche Zusammensetzung der Kulturmedien könnte sich auf das Ausmaß der Zellschädigung ausgewirkt haben. Der Einfluss des Antioxidans Ascorbinsäure, das nur dem Medium der humanen Osteoblasten zugesetzt worden war, wurde in einer eigenen Versuchsreihe geprüft. Ein Schutz der Maus-Osteoblasten gegenüber UV-Schädigung konnte gezeigt werden. Irgacure 2959 zeigte sich aufgrund seiner besseren Wasserlöslichkeit und geringeren Toxizität als vorteilhaft. Irgacure 2959 wurde in etwa 100fach höheren Konzentrationen von den Knochenzellen toleriert als Irgacure 369 und BA 740. Nach UV-Aktivierung war die höchste verträgliche Konzentration sogar um den Faktor 1000 höher als von BA 740. Für die endgültige Auswahl des am besten geeigneten Photoinitiators ist die jeweilige Anwendung mitentscheidend. Auch die Effizienz der einzelnen Photoinitiatoren unter den entsprechenden Bedingungen muss bei ihrer Bewertung berücksichtigt werden.



## 6 Abstract

Photoinitiators are chemicals which induce the conversion of a viscous-liquid monomer solution to a crosslinked polymer, when exposed to specific wavelengths of light. The main advantages of photopolymerization are the spatial and temporal control over the gelation process and the fast curing rates under room temperature and physiological pH. The mild conditions allow for the encapsulation of biomolecules and living cells. In the field of bone tissue engineering photopolymerizable materials can be used to fabricate tailor-made scaffolds with complex structures. Scaffolds are combined with bone forming cells and biomolecules to serve as grafts for the regeneration of bone defects. Biomaterials can be injected and photopolymerized *in situ* on the site of defect. During activation the photoinitiator produces reactive species which induce the polymerization reaction. Irradiation itself as well as the generated radicals can cause oxidative cell damage. This thesis investigates the cytocompatibility of photoinitiators with bone cells. Different concentrations of three Photoinitiators, Irgacure 2959, Irgacure 369 and BA 740 with and without UV-activation were tested. Primary mouse osteoblasts, human osteoblasts and murine osteoclast precursors served as cell culture models. Irradiation with UV-light caused a reduction in cell viability. A dose-dependent toxic effect of the three photoinitiators was observed, which increased due to UV-activation. Mouse osteoblasts were more affected than human osteoblasts. The comparison of the doubling times of murine and human osteoblasts showed a correlation between proliferation rate and sensitivity to photoinitiators, which was also observed in other studies. The osteoblasts were cultured in different media. The antioxidant ascorbic acid was added to the human osteoblast medium only and may have contributed to the lower toxic effect on these cells. Therefore the effect of ascorbic acid in the culture medium was further investigated. When mouse osteoblasts were cultured in medium supplemented with ascorbic acid, a protective effect against UV-light was observed. Due to the higher water solubility and lower toxicity, Irgacure 2959 seemed to be the most favourable photoinitiator tested. The highest concentrations tolerated by bone cells were 100 folds higher for Irgacure 2959 than for Irgacure 369 and BA 740 and after UV-activation even 1000 folds higher compared to BA 740. However, to decide which photoinitiator is most suitable, the polymerization efficiency of the compounds under applied conditions must also be considered.





## 7 Literaturverzeichnis

- Alberti A, Benaglia M, Macciantelli D, Rossetti S, Scoconi M. Further EPR-spin trapping studies of the photoinitiating activity of Irgacure 369. *European Polymer Journal*. 2008;44(9):3022-7.
- Allen NS, Segurolo J, Edge M, Santamari E, McMahon A, Wilson S. A comparative kinetic study of commercial photoinitiators for UV/visible curable acrylate clear coatings. *Surface Coatings International*. 1999;82(2):67-76.
- Andrzejewska E. Photopolymerization kinetics of multifunctional monomers. *Progress in Polymer Science*. 2001;26(4):605-65.
- Bakker AD, Klein-Nulend J. Osteoblast Isolation from Murine Calvaria and Long Bones. In: Helfrich HM, Ralston HS, editors. *Bone Research Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press; 2012. p. 19-29.
- Baroli B. Photopolymerization of biomaterials: issues and potentialities in drug delivery, tissue engineering, and cell encapsulation applications. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 2006;81(4):491-9.
- Baroli B. From natural bone grafts to tissue engineering therapeutics: Brainstorming on pharmaceutical formulative requirements and challenges. *J Pharm Sci*. 2009;98(4):1317-75.
- Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 2003;423(6937):337-42.
- Bryant SJ, Nuttelman CR, Anseth KS. Cytocompatibility of UV and visible light photoinitiating systems on cultured NIH/3T3 fibroblasts in vitro. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2000;11(5):439-57.
- Burdick JA, Peterson AJ, Anseth KS. Conversion and temperature profiles during the photoinitiated polymerization of thick orthopaedic biomaterials. *Biomaterials*. 2001;22(13):1779-86.
- Cappariello A, Maurizi A, Veeriah V, Teti A. Reprint of: The Great Beauty of the osteoclast. *Arch Biochem Biophys*. 2014;561:13-21.
- Capulli M, Paone R, Rucci N. Osteoblast and osteocyte: games without frontiers. *Arch Biochem Biophys*. 2014;561:3-12.
- Promega. CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay System Protocol. 2012; Retrieved 20.05.2016, from <https://at.promega.com/~media/files/resources/protocols/technical%20bulletins/0/celltiter%2096%20aqueous%20one%20solution%20cell%20proliferation%20assay%20system%20protocol.pdf>
- Chau JF, Leong WF, Li B. Signaling pathways governing osteoblast proliferation, differentiation and function. *Histol Histopathol*. 2009;24(12):1593-606.
- Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008;3 Suppl 3:S131-9.
- Sigma-Aldrich. Colorimetric Alkaline Phosphatase and Peroxidase Substrate Detection Systems. 2016; Retrieved 26.06.2016, from <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biofiles/colorimetric-alkaline.html>
- Czekanska E, Stoddart M, Richards R, Hayes J. In search of an osteoblast cell model for in vitro research. *Eur Cell Mater*. 2012;24(4):1-17.

- Czekanska EM, Stoddart MJ, Ralphs JR, Richards RG, Hayes JS. A phenotypic comparison of osteoblast cell lines versus human primary osteoblasts for biomaterials testing. *J Biomed Mater Res A*. 2014;102(8):2636-43.
- Decker C. Photoinitiated crosslinking polymerisation. *Progress in Polymer Science*. 1996;21:593-650.
- Dillon JP, Waring-Green VJ, Taylor AM, et al. Primary Human Osteoblast Cultures. In: Helfrich HM, Ralston HS, editors. *Bone Research Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press; 2012. p. 3-18.
- Florencio-Silva R, Sasso GR, Sasso-Cerri E, Simoes MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int*. 2015;2015:421746.
- Gao G, Schilling AF, Hubbell K, et al. Improved properties of bone and cartilage tissue from 3D inkjet-bioprinted human mesenchymal stem cells by simultaneous deposition and photocrosslinking in PEG-GelMA. *Biotechnol Lett*. 2015;37(11):2349-55.
- Gottschaldt M, Bader C, Poczka L, et al. Zwei-Photonenpolymerisations-Initiatoren für die Anwendung in organischen Lösungsmitteln. *Google Patents*; 2015.
- Gstraunthaler G, Lindl T. *Zell- und Gewebekultur*. 7 ed. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum; 2013.
- Henkel J, Woodruff MA, Epari DR, et al. Bone Regeneration Based on Tissue Engineering Conceptions - A 21st Century Perspective. *Bone Res*. 2013;1(3):216-48.
- Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*. 2000;21(24):2529-43.
- Ifkovits JL, Burdick JA. Review: photopolymerizable and degradable biomaterials for tissue engineering applications. *Tissue Eng*. 2007;13(10):2369-85.
- Imai Y, Youn MY, Inoue K, Takada I, Kouzmenko A, Kato S. Nuclear receptors in bone physiology and diseases. *Physiol Rev*. 2013;93(2):481-523.
- Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Parfitt AM, Manolagas SC. Osteoblast Programmed Cell Death (Apoptosis): Modulation by Growth Factors and Cytokines. *Journal of Bone and Mineral Research*. 1998;13(5):793-802.
- Jonsson KB, Frost A, Nilsson O, Ljunghall S, Ljunggren Ö. Three isolation techniques for primary culture of human osteoblast-like cells: A comparison. *Acta Orthopaedica Scandinavica*. 2009;70(4):365-73.
- Kartsogiannis V, Ng KW. Cell lines and primary cell cultures in the study of bone cell biology. *Mol Cell Endocrinol*. 2004;228(1-2):79-102.
- Katagiri T, Takahashi N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Diseases*. 2002;8(3):147-59.
- Khosla S. Minireview: The OPG/RANKL/RANK System. *Endocrinology*. 2001;142(12):5050-5.
- Kolk A, Handschel J, Drescher W, et al. Current trends and future perspectives of bone substitute materials - from space holders to innovative biomaterials. *J Craniomaxillofac Surg*. 2012;40(8):706-18.
- Liu M, Li MD, Xue J, Phillips DL. Time-resolved spectroscopic and density functional theory study of the photochemistry of Irgacure-2959 in an aqueous solution. *J Phys Chem A*. 2014;118(38):8701-7.

- OLS. Meet the Legend in Cell-based Research - CASY TT and CASY TTC Brochure. 2016; Retrieved 15.05.2016, from [http://cellcounting.de/wp-content/uploads/2014/06/CASY\\_CellCounter-Analyzer\\_OLS.pdf](http://cellcounting.de/wp-content/uploads/2014/06/CASY_CellCounter-Analyzer_OLS.pdf)
- Melchels FPW, Feijen J, Grijpma DW. A review on stereolithography and its applications in biomedical engineering. *Biomaterials*. 2010;31(24):6121-30.
- Mironi-Harpaz I, Wang DY, Venkatraman S, Seliktar D. Photopolymerization of cell-encapsulating hydrogels: crosslinking efficiency versus cytotoxicity. *Acta Biomater*. 2012;8(5):1838-48.
- Moriguchi T, Yano K, Nakagawa S, Kaji F. Elucidation of adsorption mechanism of bone-staining agent alizarin red S on hydroxyapatite by FT-IR microspectroscopy. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2003;260(1):19-25.
- Nguyen KT, West JL. Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications. *Biomaterials*. 2002;23(22):4307-14.
- Nicodemus GD, Bryant SJ. Cell encapsulation in biodegradable hydrogels for tissue engineering applications. *Tissue Eng Part B Rev*. 2008;14(2):149-65.
- Occhetta P, Visone R, Russo L, Cipolla L, Moretti M, Rasponi M. VA-086 methacrylate gelatine photopolymerizable hydrogels: A parametric study for highly biocompatible 3D cell embedding. *J Biomed Mater Res A*. 2015;103(6):2109-17.
- Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Benink HA, Worzella TJ, Minor L. Cell Viability Assays. In: Sittampalam GS, Coussens NP, Nelson H, et al., editors. *Assay Guidance Manual [Internet]*: Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2013. p. 260-70.
- Schaeffer WI. Terminology Associated with Cell, Tissue and Organ Culture, Molecular Biology and Molecular Genetics. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*. 1990;26(1):97-101.
- Schafer KJ, Hales JM, Balu M, Belfield KD, Van Stryland EW, Hagan DJ. Two-photon absorption cross-sections of common photoinitiators. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 2004;162(2-3):497-502.
- Schmocker A, Khoushabi A, Schizas C, Bourban PE, Pioletti DP, Moser C. Photopolymerizable hydrogels for implants: Monte-Carlo modeling and experimental in vitro validation. *J Biomed Opt*. 2014;19(3):35004.
- Scutt A, Bertram P. Bone marrow cells are targets for the anabolic actions of prostaglandin E2 on bone: Induction of a transition from nonadherent to adherent osteoblast precursors. *Journal of Bone and Mineral Research*. 1995;10(3):474-87.
- Selimis A, Mironov V, Farsari M. Direct laser writing: Principles and materials for scaffold 3D printing. *Microelectronic Engineering*. 2015;132:83-9.
- Short AR, Koralla D, Deshmukh A, et al. Hydrogels That Allow and Facilitate Bone Repair, Remodeling, and Regeneration. *J Mater Chem B Mater Biol Med*. 2015;3(40):7818-30.
- Shrivats AR, McDermott MC, Hollinger JO. Bone tissue engineering: state of the union. *Drug Discov Today*. 2014;19(6):781-6.
- Suda T, Udagawa N, Nakamura I, Miyaura C, Takahashi N. Modulation of osteoclast differentiation by local factors. *Bone*. 1995;17(2, Supplement 1):S87-S91.
- Sun H-B, Kawata S. Two-Photon Photopolymerization and 3D Lithographic Microfabrication. 2006;170:169-273.

- Takamizawa S, Maehata Y, Imai K, Senoo H, Sato S, Hata R. Effects of ascorbic acid and ascorbic acid 2-phosphate, a long-acting vitamin C derivative, on the proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells. *Cell Biol Int.* 2004;28(4):255-65.
- Teti A. Mechanisms of osteoclast-dependent bone formation. *Bonekey Rep.* 2013;2:449.
- Vacanti JP, Langer R. Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *The Lancet.* 1999;354:S32-S4.
- Vacek K, Geimer J, Beckert D, Mehnert R. Radical generation from photoinitiator (IC 2959) decomposition and radical addition to acrylate. A laser photolysis Fourier transform electron paramagnetic resonance study. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2.* 1999(11):2469-71.
- Wani MR, Fuller K, Kim NS, Choi Y, Chambers T. Prostaglandin E2 Cooperates with TRANCE in Osteoclast Induction from Hemopoietic Precursors: Synergistic Activation of Differentiation, Cell Spreading, and Fusion. *Endocrinology.* 1999;140(4):1927-35.
- Webster SSJ. Integrated Bone Tissue Physiology. *Bone Mechanics Handbook*, Second Edition: CRC Press; 2001. p. 1-68.
- Wegst UG, Bai H, Saiz E, Tomsia AP, Ritchie RO. Bioinspired structural materials. *Nat Mater.* 2015;14(1):23-36.
- Williams CG, Malik AN, Kim TK, Manson PN, Elisseeff JH. Variable cytocompatibility of six cell lines with photoinitiators used for polymerizing hydrogels and cell encapsulation. *Biomaterials.* 2005;26(11):1211-8.
- Yue K, Trujillo-de Santiago G, Alvarez MM, Tamayol A, Annabi N, Khademhosseini A. Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels. *Biomaterials.* 2015;73:254-71.

## 8 Abbildungsverzeichnis

|                                                                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abb. 1: Struktur des Knochens.....                                                                                  | 17 |
| Abb. 2: Differenzierung von MSC zu Osteoblasten, Osteozyten und Knochen-<br>Saumzellen.....                         | 19 |
| Abb. 3: Bidirektionale Regulation der Differenzierung von OC und OB.....                                            | 21 |
| Abb. 4: Verkapselung von Zellen in ein Hydrogel .....                                                               | 24 |
| Abb. 5: Ein- und Zwei-Photonenabsorption .....                                                                      | 26 |
| Abb. 6: Photoinitiatoren der Klasse 1. ....                                                                         | 27 |
| Abb. 7: Photoinitiatoren der Klasse 2. ....                                                                         | 27 |
| Abb. 8: Ablauf der photoaktivierten radikalischen Kettenpolymerisation. ....                                        | 28 |
| Abb. 9: Übersicht über die durchgeführten Untersuchungen an Osteoblasten.....                                       | 34 |
| Abb. 10: Übersicht über die durchgeführten Untersuchungen an OC-Vorstufen.....                                      | 34 |
| Abb. 11: Irgacure 2959 und seine Aktivierung .....                                                                  | 41 |
| Abb. 12: Irgacure 369 und seine Aktivierung .....                                                                   | 42 |
| Abb. 13: Strukturformel von BA 740 .....                                                                            | 43 |
| Abb. 14 ALP-Färbung mit BCIP/NBT.....                                                                               | 45 |
| Abb. 15: Möglichkeiten der Adsorption von ARS an Calciumionen im Mineral.....                                       | 45 |
| Abb. 16: Versuchsaufbau zur Untersuchung der Zytokompatibilität von<br>Photoinitiatoren mit Osteoblasten .....      | 46 |
| Abb. 17: Aufbau des CASY-Zellzählers und Prinzip der Stromausgrenzung .....                                         | 48 |
| Abb. 18: Exemplarischer Ausdruck einer Messung des CASY-Zellzählers. ....                                           | 49 |
| Abb. 19: Versuchsaufbau zur Studie der Zytokompatibilität der Photoinittiatoren mit<br>Osteoklasten-Vorstufen. .... | 52 |
| Abb. 20: Reduktion von MTS zum gefärbten Formazan Produkt durch metabolisch<br>aktive Zellen .....                  | 53 |
| Abb. 21: Humane Osteoblasten der Passage 2 am Tag 7 vor Fixierung und Färbung<br>und nach der ALP-Färbung .....     | 55 |
| Abb. 22: Einfluss von UV-Strahlung auf die Anzahl lebender Zellen. ....                                             | 55 |
| Abb. 23: Einfluss der verwendeten Lösungsmittel auf die primären Maus-OB.....                                       | 56 |
| Abb. 24: Einfluss der verwendeten Lösungsmittel auf die humanen OB.....                                             | 56 |
| Abb. 25: Zellmorphologie primärer Maus-OB mit und ohne Behandlung mit<br>Irgacure 2959. ....                        | 57 |
| Abb. 26: Primäre Maus-OB mit Irgacure 2959 ohne UV-Bestrahlung. ....                                                | 57 |
| Abb. 27: Primäre Maus-OB mit Irgacure 2959 nach UV-Aktivierung.....                                                 | 58 |
| Abb. 28: Zellmorphologie humaner OB mit und ohne Behandlung mit Irgacure 2959. ....                                 | 58 |
| Abb. 29: Humane OB mit Irgacure 2959 ohne UV-Bestrahlung. ....                                                      | 59 |
| Abb. 30: Humane OB mit Irgacure 2959 nach UV-Aktivierung.....                                                       | 59 |
| Abb. 31: Zellmorphologie primärer Maus-OB mit und ohne Behandlung mit Irgacure 369.<br>.....                        | 60 |

|                                                                                                  |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abb. 32: Primäre Maus-OB mit Irgacure 369 ohne UV-Bestrahlung. ....                              | 60 |
| Abb. 33: Primäre Maus-OB mit Irgacure 369 nach UV-Aktivierung. ....                              | 61 |
| Abb. 34: Zellmorphologie humaner OB mit und ohne Behandlung mit Irgacure 369. ....               | 61 |
| Abb. 35: Humane OB mit Irgacure 369 ohne UV-Bestrahlung. ....                                    | 62 |
| Abb. 36: Humane OB mit Irgacure 369 nach UV-Aktivierung. ....                                    | 62 |
| Abb. 37: Zellmorphologie primärer Maus-OB mit und ohne Behandlung mit BA 740. ....               | 63 |
| Abb. 38: Primäre Maus-OB mit BA 740 ohne UV-Bestrahlung. ....                                    | 64 |
| Abb. 39: Primäre Maus-OB mit BA 740 nach UV-Aktivierung. ....                                    | 64 |
| Abb. 40: Zellmorphologie humaner OB mit und ohne Behandlung mit BA 740. ....                     | 65 |
| Abb. 41: Humane OB mit BA 740 ohne UV-Bestrahlung. ....                                          | 65 |
| Abb. 42: Humane OB mit BA 740 nach UV-Aktivierung. ....                                          | 66 |
| Abb. 43: Maus-OB und der Einfluss von Ascorbinsäure im Medium auf die<br>Zellschädigung. ....    | 67 |
| Abb. 44: Humane OB und der Einfluss von Ascorbinsäure im Medium auf die<br>Zellschädigung. ....  | 67 |
| Abb. 45: Proliferation der Maus-OB von Tag 1 bis Tag 8. ....                                     | 68 |
| Abb. 46: Proliferation der humanen Osteoblasten von Tag 1 bis Tag 8. ....                        | 69 |
| Abb. 47: TRAP-positive Zellen wurden rot-violett gefärbt. ....                                   | 69 |
| Abb. 48: Einfluss von UV-Strahlung und den verwendeten Lösungsmitteln auf OC-<br>Vorstufen. .... | 70 |
| Abb. 49: OC-Vorstufen mit Irgacure 2959 ohne UV-Bestrahlung. ....                                | 70 |
| Abb. 50: OC-Vorstufen mit Irgacure 2959 nach UV-Aktivierung. ....                                | 70 |
| Abb. 51: OC-Vorstufen mit Irgacure 369 ohne UV-Bestrahlung. ....                                 | 71 |
| Abb. 52: OC-Vorstufen mit Irgacure 369 nach UV-Aktivierung. ....                                 | 71 |
| Abb. 53: OC-Vorstufen mit BA 740 ohne UV-Bestrahlung. ....                                       | 72 |
| Abb. 54: OC-Vorstufen mit BA 740 nach UV-Aktivierung. ....                                       | 72 |

## 9 Tabellenverzeichnis

|                                                    |    |
|----------------------------------------------------|----|
| Tabelle 1: Liste der verwendeten Geräte.....       | 35 |
| Tabelle 2: Liste der verwendeten Materialien ..... | 36 |
| Tabelle 3: Liste der verwendeten Substanzen.....   | 36 |