

Aus der Klinik für Mund-, Kiefer-, und Gesichtschirurgie
(Direktor: Prof. Dr. Dr. J. Wiltfang)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**PLGA ALS ZELLTRÄGER FÜR DIE GESTEUERTE
GEWEBEREGENERATION - AUSWIRKUNG VON
OBERFLÄCHENMODIFIKATIONEN AUF DIE BESIEDLUNG
DURCH HUMANE OSTEOGENE ZELLEN**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Würde eines Doktors der Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

DOMINIK HAUKE

aus **Sindelfingen**

Kiel 2013

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Patrick Warnke,
Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Martin Laudien,
Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Kopf- und
Halschirurgie

Tag der mündlichen Prüfung: Montag, 20 Januar 2014

Zum Druck genehmigt, Kiel, 20 Januar 2014

gez.: Prof. Dr. Johann Roeder
(Vorsitzender des Ausschusses für Promotion)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Osteoblasten	2
1.2. Polylactid-co-Glycolid	3
1.3. Kollagen	4
1.4. Chondroitinsulfat.....	5
1.5. Bone morphogenetic Protein	6
1.6. Decorin.....	7
1.7. Osteopontin	7
1.8. Fragestellung	8
2. Material und Methoden	9
2.1. Kulturmedien.....	9
2.2. Probengewinnung.....	9
2.2.1. Osteoblasten	10
2.2.2. MG-63 Zellen.....	10
2.3. Polylactid-co-Glycolid	11
2.3.1. Herstellung von PLGA-Filmen	12
2.3.2. Fixierung der PLGA-Zellträger.....	13
2.4. Kollagenbeschichtungen der PLGA-Zellträger.....	14
2.5. Chondroitinsulfat.....	14
2.5.1. Hochleistungsflüssigkeitschromatographieanalyse von Chondroitinsulfat.....	15
2.5.2. Chondroitinsulfatbeschichtung der PLGA-Zellträger	16
2.6. Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest	16
2.7. Versuchsablauf.....	18
2.7.1. Erste Versuchsreihe: Vergleich von PLGA Typ 1 und 2.....	19
2.7.1.1. FDA/PI-Färbung.....	20
2.7.1.2. LDH-Test.....	21
2.7.1.3. BrdU-ELISA.....	22
2.7.1.4. WST-Test.....	23
2.7.1.5. MTT-Test.....	24
2.7.1.6. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen.....	24
2.7.2. Zweite Versuchsreihe: Vergleich von Kollagen-I und Kollagen-II	25

2.7.2.1. BMP-2, BMP-4 und BMP-7 Immunadsorptionstest.....	26
2.7.2.2. Osteopontin und Decorin Immunadsorptionstest.....	27
2.7.3. Dritte Versuchsreihe: Vergleich von Kollagen-I und Kollagen-II mit Chondroitinsulfat.....	28
2.7.3.1. Zellzahl, Morphologie, fokale Adhäsionskomplexe, Aktinzytoskelett.....	29
2.7.3.2. Auswertung der Mikrofotos.....	31
2.7.3.3. Messung der Zell-Adhäsions-Fläche.....	32
2.7.3.4. Statistische Auswertung.....	32
3. Ergebnisse	33
3.1. Erste Versuchsreihe: Vergleich von PLGA Typ 1 und 2	33
3.1.1. FDA/PI Färbung	33
3.1.2. LDH-Test.....	35
3.1.3. ELSIA, BrdU Test.....	36
3.1.4. WST-Test	37
3.1.5. MTT-Test	38
3.1.6. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen	39
3.2. Zweite Versuchsreihe: Vergleich von Kollagen-I und Kollagen-II	42
3.2.1. Zellzahl.....	42
3.2.2. ELISA-Tests.....	43
3.2.2.1. Decorin.....	43
3.2.2.2. Osteopontin.....	44
3.2.2.3. BMP-2, BMP-4 und BMP-7.....	45
3.3. Dritte Versuchsreihe: Vergleich von Kollagen-I und Kollagen-I mit Chondroitinsulfat.....	48
3.3.1. Zellzahl, Zellform und Zell-Adhäsions-Fläche	48
3.3.2. Verteilung von Integrin, Vinculin und Aktin	51
4. Diskussion	54
5. Zusammenfassung.....	59
6. Literaturverzeichnis.....	60
7. Anhang	65
7.1. Abkürzungsverzeichnis.....	65

7.2. Abbildungsverzeichnis.....	67
7.3. Tabellenverzeichnis.....	68
Danksagung.....	69
Lebenslauf.....	70
Veröffentlichungen.....	70

1. Einleitung

Bei Patienten mit malignen Tumoren ist es im Rahmen der Therapie in der Regel erforderlich, den Tumor als Ganzes zu reseziieren. Entsprechend der Leitlinien der deutschen Gesellschaft für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie wird bei der Tumorsektion ein Sicherheitsabstand von circa 1,5 cm in allen Ebenen angestrebt. Vor allem in der Mund-Kiefer-Region geht dies oftmals mit großem Knochenverlust einher. Nach Möglichkeit wird im Anschluss an die Resektion versucht den Knochendefekt wieder zu ersetzen, um funktionelle und ästhetische Defizite auszugleichen. Zurzeit geschieht dies entweder durch autologe Knochentransplantate, beispielsweise aus dem Beckenkamm, oder durch alloplastische Knochenersatzmaterialien. Da autologer Knochen nicht unbegrenzt zur Verfügung steht und die Knochenrekonstruktion durch alloplastische Materialien auf kleinere Defekte beschränkt ist, ist die Größe des zu ersetzenden Defekts limitiert.

Eine weitere Möglichkeit Knochendefekte zu rekonstruieren, besteht darin, autologen Knochen im Patienten zu kultivieren, welcher dann als Transplantat verwendet werden kann (Warnke et al. 2006). Hierfür werden geeignete Zellträger benötigt, aus denen sich der zu ersetzende Knochen modellieren lässt. Die Zellträger müssen so beschaffen sein, dass sie mit Osteoblasten besiedelt werden können, um sie dann an einer geeigneten Stelle in den Patienten zu implantieren. Außerdem müssen solche Zellträgermaterialien vielen weiteren Anforderungen genügen; dazu gehören Biokompatibilität, Formstabilität sowie Osteokonduktion. Bei bisherigen Versuchen arbeitete man mit nicht resorbierbaren Zellträgern aus Titan sowie resorbierbaren Materialien wie Hydroxylapatit oder Tricalciumphosphat (Warnke et al. 2006). Von besonderem Interesse ist Polylactid-co-Glycolid (PLGA), ein vom menschlichen Organismus zu 100 Prozent resorbierbares Material. Ziel dieser Studie ist es, PLGA als Zellträgermaterial für humane Osteoblasten zu untersuchen. Gelänge es, PLGA-Zellträger herzustellen, die in der gleichen Zeit vom Körper resorbiert werden, in der Osteoblasten neue Knochensubstanz produzieren, hätte man als Resultat ein rein autologes Knochentransplantat. Um dies zu erreichen, ist es wichtig, die Oberflächen der Zellträger so zu modifizieren, dass Osteoblastenadhäsion, -proliferation und -differenzierung optimal gefördert werden (Goldstein et al. 1999; Pamula et al. 2009). Ein Ansatzpunkt bei Oberflächenmodifikationen besteht darin, die Extrazellulärmatrix (EZM) von Knochen mittels Kollagen, der größten organischen Komponente von Knochen, zu imitieren.

In mehreren Publikationen konnte gezeigt werden, dass Kollagene Bindungsstellen für Osteoprogenitorzellen enthalten und dass sie die Proliferation, Adhäsion und Ausbreitung von Osteoblasten positiv beeinflussen (Douglas et al. 2007; Geisler et al. 2000). Diese Kollagenbeschichtungen können optimiert werden, indem sie mit anderen Bestandteilen der EZM von Knochen, zum Beispiel mit dem Glykosaminoglykan Chondroitinsulfat (CS), angereichert werden. In der Literatur finden sich Hinweise darauf, dass CS in der Lage ist, Wachstumsfaktoren wie den Fibroblastenwachstumsfaktor (FGF) zu binden (Nandini und Sugahara, 2006), was wiederum einen positiven Effekt auf die Zellproliferation vermuten lässt. Kombinierte Beschichtungen aus Kollagen und CS kamen bereits auf Titan, bei in vitro und in vivo Experimenten, zur Anwendung, um die biologische Akzeptanz von Titan zu verbessern (Bierbaum et al. 2006).

In dieser Studie werden die Auswirkungen solcher Beschichtungen auf die Adhäsion, Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten untersucht. Im Speziellen handelt es sich um PLGA als zu beschichtendes Zellträgermaterial, welches mit Kollagen Typ I und II sowie mit CS beschichtet ist.

1.1. Osteoblasten

Osteoblasten sind die Zellen im Organismus, die die Knochenmatrix produzieren und das Wachstum sowie den Umbau des Knochens steuern.

Osteoblasten entwickeln sich aus mesenchymalen Stammzellen, die sich, wenn sie diesen Weg der Differenzierung eingeschlagen haben, zunächst zu Osteoprogenitorzellen differenzieren. Lokale Wachstumsfaktoren wie zum Beispiel „bone morphogenic protein 2“ (BMP-2) sowie verschiedene systemische Einflüsse sorgen für einen lebenslangen Nachschub von Osteoblasten aus dem Stammzellenvorrat. Zu den Aufgaben der Osteoblasten innerhalb des Knochens gehören die Kollagensynthese, die Regulation der Mineralisation sowie die Regulierung des Osteoklastenhaushalts (Lüllmann-Rauch, 2003).

1.2. Polylactid-co-Glycolid

PLGA ist ein von der U.S. Food and Drug Administration überprüfetes Polymer aus Laktose und Glucose, welches bereits einen großen Anwendungsbereich auf dem Gebiet der Geweberekonstruktion hat. Es wird unter Zuhilfenahme von Ring öffnenden Copolymerisationen zweier verschiedener Monomere sowie der zyklischen Dimere (1,4-dioxan-2,5-dione) von Laktose- und Glucosesäure synthetisiert. Zur Herstellung dieses Polymers werden herkömmliche Katalysatoren benutzt, welche Zinn (II) 2-Ethylexanoat, Zinn (II) Alkoxid oder Aluminiumisopropoxid enthalten. Während der Polymerisation werden zufällig verschiedene Monomere von Glucose- beziehungsweise Laktosesäure durch Esterverbindungen nacheinander zu PLGA verknüpft. Auf diese Weise entsteht ein linearerer, aliphatischer Polyester (Astete und Sabliov, 2006).

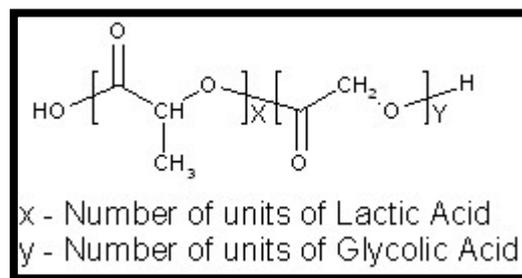


Abb. 1: Schematischer Aufbau von PLGA.

In Abhängigkeit des Verhältnisses von Laktose zu Glucose können verschiedene PLGA-Sorten unterschieden werden: z.B. enthält PLGA 75:25, 75% Laktose- und 25% Glucosesäure. Eine weitere Möglichkeit, die verschiedenen PLGA-Sorten näher zu charakterisieren, liegt in der Bestimmung des spezifischen Molekulargewichts.

Alle PLGA-Sorten sind eher amorph als kristallin und haben eine Glasübergangstemperatur von 40-60°C. PLGA unterliegt im Wasser einer Hydrolyse seiner Esterverbindungen zu Laktosesäure- und Glucosesäuremolekülen. Diese Moleküle können im menschlichen Körper innerhalb des Citratzyklus, einem regulären metabolischen Stoffwechselfvorgang, verstoffwechselt werden (Houchin und Topp, 2008). Somit ist PLGA im Organismus vollständig abbaubar. Die Geschwindigkeit, mit der PLGA sich löst, ist abhängig von seiner Zusammensetzung aus Laktose- und Glukosesäure sowie von seinem Molekulargewicht. PLGA mit einem geringen Molekulargewicht unterliegt in der Regel einem schnelleren Polymerabbau (Jalil und Nixon, 1990; Ravivarapu und DeLuca, 2000).

Aufgrund seiner Eigenschaften hat PLGA einen großen Einsatzbereich in der modernen Medizin. Es fungiert als Trägermaterial für Arzneimittel, zum Beispiel dienen injizierbare, biologisch abbaubare Mikropartikel aus PLGA dazu, die Freisetzung von Impfstoffantigenen zu kontrollieren, die Anzahl der Dosen während der Immunisierung zu reduzieren und die gewünschte Immunantwort zu optimieren, indem die Antigen präsentierenden Zellen gezielt angesteuert werden (Jianga et al. 2005). PLGA dient auch als Nahtmaterial nach operativen Eingriffen und zudem gibt es vielversprechende Versuche mit Gefäßimplantaten aus PLGA (Miller et al. 2004). Ein weiterer großer Einsatzbereich von PLGA ist die Geweberekonstruktion, auch „tissue engineering“ genannt. Dabei wird PLGA als Zellträger zur Geweberekonstruktion beispielsweise von Bandscheiben eingesetzt (Gruber et al. 2004; Gruber et al. 2006). Des Weiteren werden PLGA-Schäume als osteokonduktive Unterstützung für die Entwicklung von Knochengewebe *in vitro* sowie bei *in vivo* Implantaten eingesetzt (Goldstein et al. 2001).

1.3. Kollagen

Die Kollagene bilden eine Protein-Familie mit mehr als 20 verschiedenen Typen. Die am häufigsten vorkommenden Typen I, II und III werden von Bindegewebszellen synthetisiert und im Extrazellulärraum durch Interaktion mit anderen Molekülen immobilisiert. Im Extrazellulärraum lagern sich die einzelnen Moleküle zu Fibrillen zusammen. Neben Glykosaminoglykanen, Proteoglykanen und Adhäsionsproteinen sind Kollagenfibrillen einer der wichtigsten Bestandteile der Extrazellulärmatrix. Kollagenfasern können einen Durchmesser von 2-20 μm haben, sie sind sehr zugfest und können durch Einwirkung von Zugkraft praktisch nicht verlängert werden. Allerdings besitzen Gewebe mit wellig oder schräg verlaufenden Kollagenfasern eine gewisse Dehnungsreserve bis die Fasern parallel ausgerichtet sind (Lüllmann-Rauch, 2003).

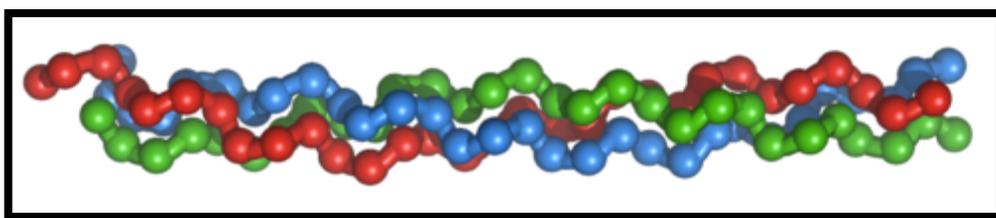


Abb. 2: Kollagen-Tripelhelix.

Kollagen Typ I kommt in den meisten Geweben und Organen, in besonders hoher Konzentration in Haut, Sehnen und Knochen vor. Die circa 300 nm langen Typ I Kollagenmoleküle bestehen aus drei linksgängigen Polypeptidketten ($1\alpha_1$, $2\alpha_2$) die sich zu einer rechtsgängigen Tripelhelix zusammenlagern.

Kollagen Typ II ist ein wichtiger Bestandteil von Knorpel, vom Glaskörper des Auges und von Bandscheiben. Außerdem kommt es während der Entwicklung auch in anderen Geweben vor. Es verleiht Geweben Widerstandsfähigkeit gegen Zug- und Scherkräfte (Ayad et al. 1998).

Weitere wichtige Kollagene sind Kollagen Typ III und IV. Typ III kommt in retikulären Fasern vor, Typ IV bildet das Grundgerüst der Basallamina und ist unter anderem am Muskel-Sehnen-Übergang zu finden.

1.4. Chondroitinsulfat

Chondroitinsulfat ist ein sulfatiertes Glykosaminoglykan (GAG) und besteht aus langen Ketten sich wiederholender Disaccharideinheiten (*N*-Acetyl-D-Galaktosamin und Glucuronsäure).

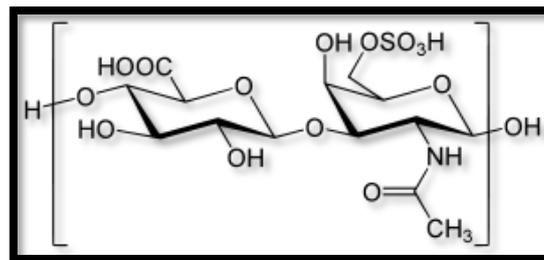


Abb. 3: Schematischer Aufbau von Chondroitinsulfat.

Freie Räume in Binde- und Stützgeweben werden durch GAGs, Proteoglykane und Wasser gefüllt. Proteoglykane sind Proteine mit kovalent daran gebundenen GAG-Ketten. Entscheidend für die Funktion der GAGs ist ihr polyanionischer Charakter. Durch viele negative Ladungen ziehen sie aus Gründen der Elektroneutralität viele Kationen an, welche wiederum aus osmotischen Gründen Wasser nach sich ziehen. Somit besteht eine wichtige Aufgabe dieser Stoffgruppe in der Wasserspeicherung. Die meisten GAGs kommen im

menschlichen Körper in sulfatierter Form vor. Ihre Namen beziehen sich auf die Gewebe, in denen sie zuerst entdeckt wurden, sie sind aber praktisch in fast allen Geweben zu finden. Chondroitinsulfat wurde demzufolge zuerst in Knorpelgewebe beschrieben (Lüllmann-Rauch, 2003).

1.5. Bone morphogenetic Protein

Die Bone morphogenetic proteins (BMP) sind eine Gruppe einander ähnlicher Signalproteine, sogenannte Zytokine. Zytokine werden von Zellen ausgeschüttet, um benachbarte Zellen zu beeinflussen. Die BMPs sind ein Bestandteil des transforming growth factor- β (TGF- β) - Signalweges, eines der grundlegenden Signalsysteme für die Kommunikation zwischen Zellen, und können auf diesem Weg das Wachstum, die Differenzierung, die Chemotaxis sowie die Apoptose verschiedener Zelltypen beeinflussen. BMPs sind parakrine Signalmoleküle und wurden ursprünglich als Regulatorproteine der Knorpel- und Knochenbildung identifiziert. Des Weiteren sind BMPs wichtige Signalmoleküle in der embryonalen Entwicklung, zum Beispiel während der Ausbildung der Extremitätenanlagen. Während der endochondralen Knochenentwicklung werden viele Schritte der Knorpel- und Knochenentwicklung direkt von BMPs beeinflusst. Aber nicht nur in der embryonalen Entwicklung spielen BMPs eine entscheidende Rolle; während des postnatalen longitudinalen Knochenwachstums werden sie ebenso benötigt wie zur Knochenregeneration nach Verletzungen.

BMP-2 wird zum Beispiel in der Wachstumsplatte produziert und reguliert dort die Knorpelentwicklung, indem es Chondrozytenproliferation und -hypertrophie induziert. Außerdem hat BMP-2 vielfältige Funktionen in der Organentwicklung sowie der Knochenbildung und -regeneration. BMP-2 und BMP-4 sind zu 92% identisch und bilden deshalb eine Untergruppe in der BMP-Familie.

BMP-4 ist zusätzlich zur Regulierung der Knochenbildung auch noch in anderen Gebieten der Entwicklung involviert. Zum Beispiel kann BMP-4, welches von der dorsalen Aorta produziert wird, die Differenzierung sympathischer Neuronen dirigieren. Außerdem ist es in der Lage, die Somitenentwicklung zu beeinflussen, indem es das Muskelwachstum hemmt.

BMP-7, auch bekannt als osteogenetisches Protein 1, wird entwicklungsbedingt in vielen menschlichen Geweben produziert, dazu gehören das olfaktorische Epithel, das intestinale

Epithel, das Perichondrium, das Periost, das Rückenmark und die Niere. Bmp-7 ist in vivo für seine Knochenbildung induzierende Wirkung bekannt. Es wird als ein Knochen stimulierendes Agens zur Spondylodese (Wirbelkörperverblockung) und zur Behandlung von Knochenbrüchen mit Heilungsstörungen verwendet.

Mit den BMPs 2, 4 und 7 wurden schon in zahlreichen wissenschaftlichen Arbeiten Versuche durchgeführt, sodass es für sie gut etablierte, sichere Nachweisverfahren gibt. Durch die Bestimmung der Konzentrationen von BMPs im Nährmedium von Zellkulturen lassen sich Erkenntnisse über die Differenzierung der Zellen, zum Beispiel, ob bereits eine osteogene Differenzierung eingetreten ist, gewinnen.

1.6. Decorin

Decorin ist ein kleines zelluläres Matrix, aber auch transmembranäres Proteoglykan, welches in allen Bindegeweben vorkommt. Es bindet Kollagen-I und Kollagen-II Fibrillen und ist dadurch am Aufbau der extrazellulär Matrix beteiligt. Der Nachweis von Decorin in Osteoblastenkulturen lässt auf eine abklingende Proliferationsphase, sowie auf bereits begonnene Produktion von EZM schließen. Die Zellen befinden sich in der Frühphase der osteogenen Differenzierung.

1.7. Osteopontin

Osteopontin wurde als Glykoprotein im Jahre 1986 in Osteoblasten entdeckt und besteht aus etwa 300 Aminosäuren. Es ist als extrazelluläres Struktureiweiß, welches in der Lage ist, Hydroxylapatit zu binden, ein essentieller Teil der Knochenmatrix aller höheren Säugetiere. Ein Nachweis dieses Glykoproteins zeigt in der Regel eine osteogene Differenzierung oder begonnene Mineralisierung der EZM an, da es ein biphasisches Expressionsmuster an den Tag legt. Einem ersten Expressionsgipfel in der Frühphase der Osteoblastendifferenzierung in der EZM sezerniert wird, folgt ein zweiter Gipfel in der Spätphase der Differenzierung, in der es zur Mineralisation der EZM kommt (McKee und Nanci, 1995; Zohar et al. 1998).

1.8. Fragestellung

PLGA ist ein oft benutztes Zellträgermaterial in der Knochengeweberekonstruktion. Um seine Eigenschaften zu optimieren, soll in dieser Studie der Versuch unternommen werden, die Oberfläche der Zellträger so zu modifizieren, dass sie die EZM von Knochen imitiert. Zu diesem Zweck werden vorbereitete PLGA-Zellträger mit Kollagen-I und Kollagen-II sowie mit Chondroitinsulfat beschichtet. Für die Untersuchungen sollen die vorbereiteten Zellträger mit Osteoblasten besiedelt werden. Anschließend werden verschiedene etablierte Zytotoxizitäts-, Biokompatibilitäts- und Proliferationstests durchgeführt, die auch schon in anderen wissenschaftlichen Arbeiten zur Anwendung kamen (Warnke et al. 2009: Clinical oral implants research; Warnke et al. 2009: Tissue engineering). Außerdem sollen die Zellträger rasterelektronenmikroskopisch sowie fluoreszenzmikroskopisch untersucht werden. Zu diesem Zweck muss zunächst eine Methode entwickelt werden, um dünne gleichmäßige PLGA-Filme aus PLGA-Granulat herzustellen. Diese Filme sollen dann zur Herstellung der benötigten Proben benutzt werden. In dieser Arbeit werden zu Vergleichszwecken zwei verschiedene Sorten PLGA der Firma PURAC Biochem verwendet. Anschließend werden aus der präferierten PLGA-Sorte Zellträger hergestellt, mit denen die weitere Arbeit durchgeführt wird. Es soll vor allem die Tauglichkeit von PLGA, beziehungsweise PLGA, welches mit Kollagen Typ I und Typ II sowie mit Chondroitinsulfat beschichtet ist, als Zellträger für humane Osteoblasten überprüft werden.

Folgenden Fragen soll dabei nachgegangen werden:

1. Welche Auswirkung hat die Kollagenbeschichtung auf die Biokompatibilität und Zytotoxizität der Zellträger sowie auf die Proliferation der Osteoblasten.
2. Haben Kollagen Typ I und Typ II unterschiedliche Wirkungen auf die Osteoblastenproliferation.
3. Lassen sich Unterschiede in der Differenzierung der Osteoblasten auf Kollagen Typ I und Typ II durch den Nachweis von Wachstumsfaktoren und extrazellulären Matrixproteinen nachweisen.
4. Welche Auswirkung hat die Kollagenbeschichtung in Verbindung mit Chondroitinsulfat auf die Biokompatibilität und Zytotoxizität der Zellträger sowie auf die Proliferation und Differenzierung der Osteoblasten.
5. Welche Schlussfolgerungen lassen sich für den Einsatz von PLGA, bzw. mit Kollagen und Chondroitinsulfat beschichtetem PLGA für den klinischen Einsatz ziehen.

2. Material und Methoden

2.1. Kulturmedien

Zur Anzucht der Osteoblasten werden die Zellen in 75 cm² Zellkulturflaschen kultiviert. Gefüllt werden diese mit Standardnährmedium, bestehend aus Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium (DMEM; PAA Laboratories GmbH, Österreich, Katalognummer: H15-002) ergänzt mit 10% fetalem Kälberserum (FCS; Biochrom, Deutschland, Katalognummer: S0613), 1% Penicillin/Streptomycin (Biochrom, Deutschland, Katalognummer: A2210), 1 mM Ascorbinsäure sowie 100 nM Dexamethason.

Zur Kultivierung von Zellen der Zelllinie MG-63 wird das gleiche Nährmedium verwendet mit dem Unterschied, dass auf den Zusatz von Ascorbinsäure und Dexamethason verzichtet wird.

2.2. Probengewinnung

Für die Versuche werden zwei verschiedene Zellarten benutzt.

In den ersten zwei Versuchsreihen wird mit humanen Osteoblasten gearbeitet, welche für die Primärkultur aus Beckenkammpongiosa bei operativen Eingriffen zur Rekonstruktion von Knochendefekten in der Abteilung Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Klinik für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde Kiel gewonnen werden. Die gewonnenen Knochenproben werden steril in angesetztem Kulturmedium aufgenommen. Die weitere Verarbeitung findet unter der Laminar Flow (Heraeus Instruments, Osterode, Deutschland) statt.

In der dritten Versuchsreihe wird auf die humane osteoblastenähnliche Zelllinie MG-63 (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK) zurückgegriffen. Der Grund für die Verwendung einer Zelllinie ist, dass Zellen mit den gleichen Eigenschaften annähernd unbegrenzt nachbestellt werden können. Der Vorteil hierbei besteht darin, dass die Versuche leicht reproduzierbar sind ohne dabei die individuellen Unterschiede, wie zum Beispiel in der Proliferation von Osteoblasten verschiedener Spender, berücksichtigen zu müssen.

2.2.1. Osteoblasten

Die Knochenstückchen werden aus dem Probengefäß entnommen und in ca. 1-2 mm große Stücke zerteilt. Anschließend werden die Proben in Zellkulturflaschen (75 cm², Fa. Nunc, Wiesbaden) verteilt, welche zur Vorbereitung mit 10 ml Nährmedium (siehe 2.1. Kulturmedium) gefüllt sind. In jede Kulturflasche werden 3-4 Knochenstückchen verteilt. Die Proben werden im Brutschrank (Fa. Heraeus, Hanau, Deutschland) in wassergesättigter Atmosphäre (98% Luftfeuchtigkeit) bei 37°C und 5% CO² kultiviert. Alle 3-4 Tage wird ein Mediumwechsel durchgeführt, bis die aus den Knochenstückchen ausgewachsenen Zellen nahezu den gesamten Flaschenboden bedecken.

Dann werden die Zellen passagiert. Nach Absaugen des Mediums und Spülen mit 10 ml Phosphatpufferlösung (PBS, Sigma, USA) werden pro Kulturflasche 5 ml 0,05% Trypsin-PBS-Lösung zugegeben und für 5 Minuten im Brutschrank mit dem Ziel inkubiert, dass sich die Zellen vom Flaschenboden lösen. Im nächsten Schritt wird die Zellsuspension 1:1 mit DMEM, welches zuvor mit 10% FCS angereichert wurde, verdünnt, um die Wirkung des Trypsins zu inhibieren. Anschließend wird die Zellsuspension bei 3200 Umdrehungen pro Minute für 3 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und das verbleibende Zellpellet wird in ca. 5 ml Medium resuspendiert. Im Anschluss werden die Zellen in einer Neubauer Zählkammer (Brand, Wertheim, Deutschland) gezählt. Jeweils 10⁵ Zellen werden in eine neue 75 cm² Kulturflasche überführt, in die jeweils 10 ml Medium vorgelegt wurden. Es folgt die weitere Inkubation im Brutschrank, wobei alle 3 Tage das Nährmedium ausgetauscht wird bis ausreichend Zellen vorhanden sind. Falls nötig, werden weitere Passagen durchgeführt.

2.2.2. MG-63 Zellen

Die Zelllinie MG-63 wird von der European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK (Katalognummer: 86051601) bezogen und wird als adäquater Ersatz für Osteoblasten angesehen, da sie wichtige Eigenschaften wie die Aktivität der alkalischen Phosphatase oder die Produktion von Kollagen beibehalten hat. (Diederichs et al. 2010, Zhang et al. 2010). Die Zellen stammen aus einem Osteosarkom eines 14-jährigen männlichen Patienten. Das Osteosarkom ist der häufigste primäre bösartige Knochentumor. Seine proliferierenden Zellen

sind fähig, Knochen und Osteoid (unverkalkte Knochengrundsubstanz) zu bilden und haben somit wichtige Fähigkeiten von Osteoblasten beibehalten. Da diese Zellen von Osteoblasten abstammen und diesen auch noch sehr ähnlich sind, eignen sie sich hervorragend zu Versuchszwecken, bei denen das Verhalten von Osteoblasten untersucht werden soll. MG-63 Zellen wurden bereits in früheren Studien auf dem Gebiet der Knochengeweberegeneration erfolgreich eingesetzt (Amaral et al. 2008, Mansell et al. 2009, Misra et al. 2009).

Bevor die humanen osteoblastenähnlichen MG-63 Zellen auf den PLGA-Filmen ausgesät werden können, müssen diese vorbereitet werden. Zunächst werden die sterilen PLGA-Filme in die ebenfalls im Vorfeld sterilisierten CellCrowns eingespannt, in 12-Loch Zellkulturplatten (Corning Incorporated, USA, Katalognummer: 3512) gegeben und mit 2 ml Nährmedium (siehe 2.1. Kulturmedien) gefüllt. Anschließend wird jeder Zellträger mit 30.000 Zellen besiedelt und für 1, 3 beziehungsweise 7 Tage im Brutschrank (Fa. Heraeus, Hanau, Deutschland) in wassergesättigter Atmosphäre (98% Luftfeuchtigkeit) bei 37°C und 5% CO² inkubiert.

2.3. Polylactid-co-Glycolid

Bei dem verwendeten Material handelt es sich um PLGA der Firma PURAC Biochem bv, 4206 AC Gorinchem, Niederlande. Zu Beginn meiner Arbeit führe ich mit 2 verschiedenen Sorten PLGA Tests durch, um herauszufinden, welche biokompatibler und besser zu handhaben ist.

Die erste Sorte, Purasorb PLG 8523, ist ein Copolymer von L-Lactid und Glykolid mit einem molarem Verhältnis von 85/15 (L-Laktidgehalt:82-88 mol. %, Glykolidgehalt: 18-12 mol. %) und einer mittleren Viskosität von 2 – 2,5 dl/g (CHCl₃, 25°C, 0.1 g/dl). Es ist ein weißes bis leicht bräunliches Granulat mit der chemischen Bezeichnung 1,4-dioxane-2,5-dione, Polymer mit (3S-cis)-3,6-dimethyl-1,4-dioxane-2,5-dione, seine molekulare Formel lautet: (C₆H₈O₄C₄H₄O₄)_n. Im weiteren Text wird diese Sorte PLGA Typ 2 genannt.

Die zweite Sorte, Purasorb PLG 8531, ist ebenfalls ein Copolymer von L-Lactid und Glykolid mit einem molarem Verhältnis von 85/15 (L-Laktidgehalt:82-88 mol. %, Glykolidgehalt: 18-12 mol. %), jedoch beträgt die mittlere Viskosität 2,7 -3,5 dl/g (CHCl₃, 25°C, 0.1 g/dl). Auch bei dieser Sorte handelt es sich um ein weißes bis leicht bräunliches Granulat. Der chemische Name ist 1,4-dioxane-2,5-dione(3S-cis)-3,6-dimethyl-1,4-dioxane-2,5-dione und seine

molekulare Formel lautet: $(C_6H_8O_4C_4H_4O_4)_n$. Im weiteren Text wird diese Sorte PLGA Typ 1 genannt.

2.3.1. Herstellung von PLGA-Filmen



Abb. 4: Herstellung von PLGA-Filmen. 1. PLG Granulat, 2. Methylenchlorid und PLG Granulat in luftdicht verschließbaren Gefäßen, 3. PLGA-Lösung auf Magnetrührer, 4. Gefäße mit PLGA auf einem Rollmischer, 5. Ausstanzen der Proben aus den gewonnenen PLGA-Folien.

Die Zellträger werden basierend auf einer Methode von Pamula et al. (Pamula und Manszek, 2008) angefertigt. Das PLG Granulat (Abb. 4.1) muss zunächst in Methylenchlorid (CH_2Cl_2 , der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH 89555 Steinheim, Deutschland) in einem Gewichtsverhältnis von 1/10 gelöst werden. Dies geschieht bei Zimmertemperatur in einem luftdicht verschließbaren Glasgefäß, um das Verdunsten von Methylenchlorid zu vermeiden (Abb. 4.2). Die zunächst nicht homogene Lösung wird solange auf einen Magnetrührer gestellt, bis sich das gesamte PLG Granulat gelöst hat (Abb. 4.3). Anschließend kommt die

nun homogene, klare, dickflüssige Lösung, immer noch luftdicht verschlossen, für mindestens 6 Stunden auf einen Rollmischer (Gerätebezeichnung: RM 5, Hersteller: Assistent), damit sich die PLGA-Lösung gleichmäßig auf der Innenseite des Gefäßes verteilen kann (Abb. 4.4). Am nächsten Tag wird das Gefäß unter einem Luftabzug geöffnet, um das Methylenchlorid verdampfen zu lassen. Die Schwierigkeit besteht dabei darin, das Methylenchlorid sehr langsam entweichen zu lassen, da sonst weiße unregelmäßige Krusten auf dem PLGA-Film entstehen und das PLGA dann nicht mehr zu Versuchszwecken geeignet ist. Nach 2 Tagen, um sicher zu gehen, dass das restliche Methylenchlorid verdampft ist, kann der entstandene PLGA-Film vorsichtig von der Gefäßwand gelöst werden, um die PLGA-Proben in der gewünschten Größe mit einer Handstanze auszustanzen (Abb. 4.5). Für die Belegung der 24-Loch Platten haben die Proben einen Durchmesser von ca. 1 cm und für die Belegung der 12-Loch Platten einen Durchmesser von ca. 1,5 cm.

2.3.2. Fixierung der PLGA-Zellträger

Bei den ersten Vorversuchen zeigte sich sehr schnell, dass es nicht möglich ist, die vorbereiteten PLGA-Zellträger unfixiert in flüssiges Nährmedium zu legen und sie mit Osteoblasten zu besiedeln. Grund dafür ist, dass sich das PLGA wellt oder zusammenrollt, sobald es feucht wird. Dies hängt vermutlich mit der Herstellungsmethode zusammen, da das PLGA auf der runden Innenseite des Glasgefäßes aushärtet (siehe unter 2.3.1. Herstellung von PLGA-Filmen). Um dieses Problem zu umgehen, werden die PLGA-Zellträger mit Hilfe von sogenannten CellCrowns (Scaffdex, Finnland, Katalognummer: C00001N) fixiert.

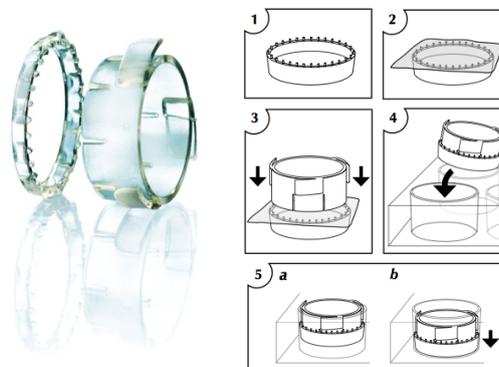


Abb. 5: CellCrown von Scaffdex, Oy. Schematische Darstellung der Fixierung von PLGA-Folien mittels CellCrowns.

Zunächst werden die PLGA-Filme in die CellCrowns eingespannt, anschließend wird beides in 70% Ethanol sterilisiert. Als nächstes erfolgt eine gründliche Wäsche in sterilem PBS, drei Spülgänge, um im darauffolgenden Schritt die PLGA-Filme im Inneren der CellCrowns mit Osteoblasten zu besiedeln oder sie mit Kollagen beziehungsweise CS zu beschichten.

2.4. Kollagenbeschichtungen der PLGA-Zellträger

Bei dem verwendeten Material handelt es sich um Rinderkollagen Typ I und II (BD Biosciences, 01730 MA Bedford USA) mit einer Reinheit von mindestens 95%. Das Kollagen Typ I (Katalognummer: 354231) wird aus Rinderhaut, das Kollagen Typ II (Katalognummer: 354257) aus Rindergelenkknorpel gewonnen.

Zunächst müssen die Kollagenlösungen mit 0,01 M steril filtrierter Essigsäure verdünnt werden, die Kollagen-I-Lösung um den Faktor drei, die Kollagen-II-Lösung um den Faktor 2,88. Anschließend werden die verdünnten Kollagenlösungen jeweils 1:1 mit steril filtriertem 60 mM Phosphatpuffer (50 mM Natrium - Dihydrogenphosphat und 10 mM Kalium - Dihydrogenphosphat, pH 7,4) vermischt. 0,5 ml der auf diese Weise produzierten Lösung wird auf die in CellCrowns eingespannten Zellträger gegeben und für mindestens 2 Stunden belassen. Nach dem Beschichtungsprozess wird die restliche Kollagenlösung abgesaugt. Anschließend werden die Zellträger zweimal mit steril filtrierter Phosphatpuffer Lösung gespült und sind somit für die Osteoblastenbesiedlung vorbereitet.

2.5. Chondroitinsulfat

Bei dem verwendeten Chondroitinsulfat handelt es sich um Chondroitinsulfat A (CS A), auch bekannt als Chondroitin-4-sulfat, der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland. Die Chargennummer lautet 087k1416.

2.5.1. Hochleistungsflüssigkeitschromatographieanalyse von

Chondroitinsulfat

Um die Zusammensetzung des CS A zu analysieren, wird es in einem Verhältnis von 1mg/ml in 0,1 M Ammoniumacetat bei pH 7,0 gelöst. Zu 100 µl (= 100 µg) der hergestellten Lösung werden 10 mU des Enzyms Chondroitinase AC II gegeben und zunächst für 4 Stunden bei 37°C, anschließend für 5 Minuten bei 95°C gelagert. 50 µl der Probe werden gefriergetrocknet, während die verbleibenden 50 µl mit 10 mU des Enzyms Chondroitinase ABC für 4 Stunden bei 37°C und für 5 Minuten bei 95°C behandelt werden.

Anschließend wird auch diese Probe gefriergetrocknet. Die Chondroitinase ABC baut die GAGs komplett ab, während die Chondroitinase AC II nur Glucuronsäure, welche Disaccharide enthält, hinterlässt. Aufgrund der unterschiedlichen enzymatischen Aktivität der zwei Enzyme kann anhand der Differenz zwischen der Gesamtzahl und der AC II verzweigten Disaccharide auf den Iduronsäureanteil in den GAGs geschlossen werden, indem man die Formel von Shirk (Shirk et al. 2000) anwendet. Die aus den zwei Reaktionen erhaltenen Disaccharide werden wie bei Calabro (Calabro et al. 2000) beschrieben derivatisiert.

Zusammengefasst lässt sich das Verfahren wie folgt beschreiben: 2 nmol der hergestellten CS Disaccharide werden zu 40 µl einer 12,5 mM Aminoacridone (AMAC) Lösung in Eisessig / Dimethylsulfoxid (3:17, v/v) gegeben und für 10-15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zu jeder Probe werden 40 µl einer frisch angesetzten Lösung aus 1,25 M NaBH₃CN in Wasser gegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert. Eine adäquat verdünnte Lösung dieser Proben in 0,1 M Ammoniumacetat bei pH 7,0 wird, wie in der Studie von Viola (Viola et al. 2006) beschrieben, für die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) verwendet. 10 µl jeder derivatisierten Probe wird mittels HPLC getestet und mit der Durchschnittskonzentration der Standarddisaccharide verglichen, um die Disaccharidzusammensetzung sowie den Iduronisierungsgrad der Glykosaminoglykane zu analysieren. Die HPLC zeigt, dass der Masseanteil von Iduronsäure bei 34,9% liegt. Die Disaccharide sind zu 44,4% an der C2, zu 48,7% an der C4 und zu 6,9% an der CS Position sulfatiert.

2.5.2. Chondroitinsulfatbeschichtung der PLGA-Zellträger

Chondroitinsulfatbeschichtungen werden nur in Kombination mit der Kollagen-I-Beschichtung durchgeführt. Das Vorgehen ist ähnlich wie bei der Kollagenbeschichtung. Zunächst muss die Kollagenlösungen mit 0,01 M steril filtrierter Essigsäure um den Faktor 3 verdünnt werden. Anschließend wird die verdünnte Kollagenlösung 1:1 mit steril filtriertem 60 mM Phosphatpuffer (50 mM Natrium - Dihydrogenphosphat und 10 mM Kalium-Dihydrogenphosphat, pH 7,4), in welchem das CS (1mg/ml) gelöst ist, vermischt. 0,5 ml der angesetzten Kollagen-CS-Lösung werden auf die in CellCrowns eingespannten Zellträger gegeben und für mindestens 2 Stunden belassen. Nach dem Beschichtungsprozess wird die restliche Kollagenlösung abgesaugt. Anschließend werden die Zellträger zweimal mit steril filtriertem PBS gespült und sind dann für die Osteoblastenbesiedlung vorbereitet.

2.6. Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest

Der enzymgekoppelte Immunadsorptionstest (ELISA) ist ein immunologisches Nachweisverfahren, basierend auf einer enzymatischen Farbreaktion. Mit Hilfe von ELISAs lassen sich Proteine und Viren, aber auch niedermolekulare Stoffverbindungen wie Hormone und Toxine, in wässrigen Proben nachweisen. Das Verfahren basiert dabei auf der Eigenschaft spezifischer Antikörper an das nachzuweisende Molekül, das Antigen, zu binden. Der Antikörper wird dabei vorher mit bestimmten Enzymen markiert. Als Nachweis für das Vorhandensein des Antigens dient dabei die vom Enzym katalysierte Reaktion: Das Substrat wird vom Enzym umgesetzt, wobei das Reaktionsprodukt dann typischerweise durch Farbumschlag, Fluoreszenz oder Chemolumineszenz nachgewiesen werden kann. ELISAs können auch zu quantitativen Nachweisen verwendet werden, da die Signalstärke im Allgemeinen eine Funktion der Antigenkonzentration ist.

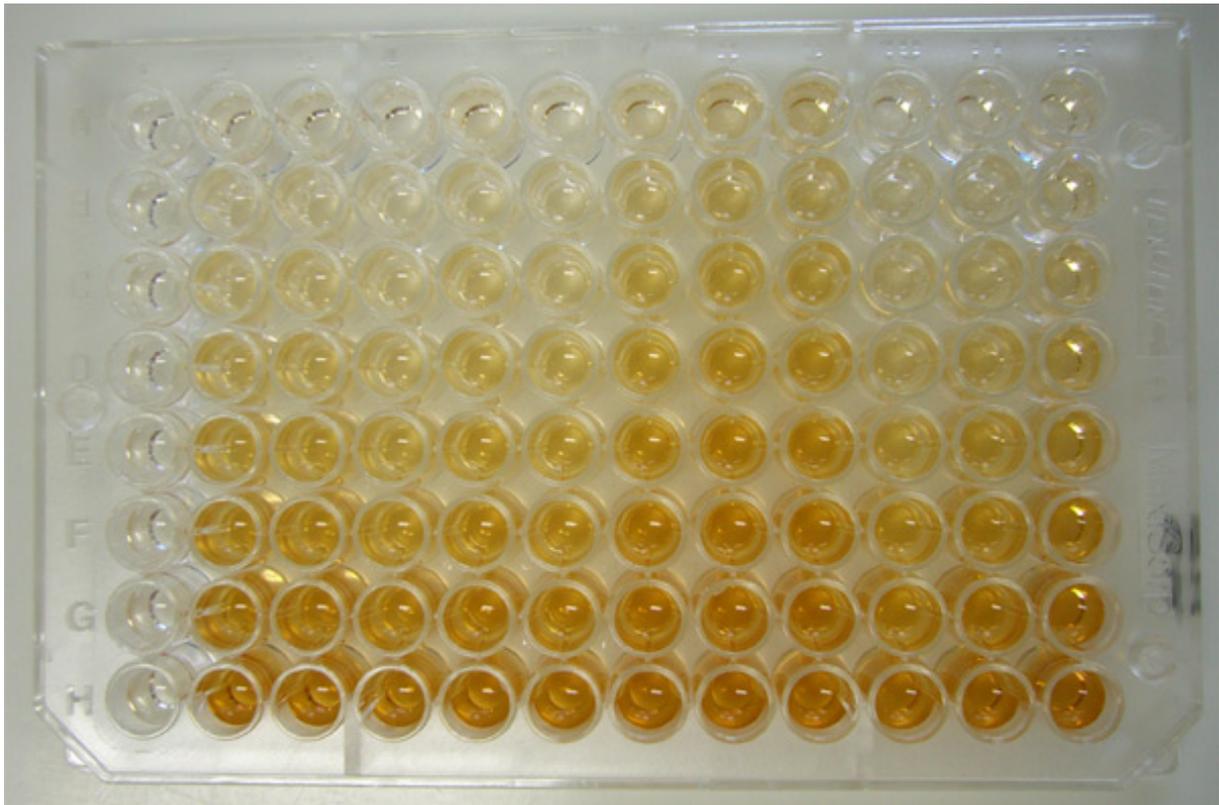


Abb. 6: Typisches Ergebnis eines ELISA-Tests in einer 96-Loch Mikrotiterplatte.

Bei den hier verwendeten ELISAs handelt es sich um Sandwich-ELISAs, da sie aus zwei Antikörpern bestehen. Der erste Antikörper, der sogenannte coating-Antikörper, ist an eine feste Phase, in der Regel eine 96-Loch Mikrotiterplatte, gebunden. An ihn bindet sich nach einer bestimmten Inkubationszeit das gesuchte Antigen. Im nächsten Schritt wird die feste Phase mit einer Spüllösung gewaschen, sodass nur das an den coating-Antikörper gebundene Antigen zurückbleibt. Als nächstes wird der zweite Antikörper, der sogenannte detection-Antikörper, an dessen Ende ein Enzym gebunden ist, hinzugegeben. Er bindet an ein anderes Epitop des Antigens als der coating-Antikörper. Nach erneutem Spülen, um die ungebundenen Antikörper zu entfernen, erhält man das „Sandwich“, nämlich den Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex. Durch dieses Vorgehen ist gewährleistet, dass die Enzymkonzentration gleich der Antigenkonzentration ist. Wenn nun im letzten Schritt das dem Enzym entsprechende Substrat, welches letztlich für den Farbumschlag verantwortlich ist, hinzugegeben wird, kann anhand der Farbintensität auf die Antigenkonzentration geschlossen werden.

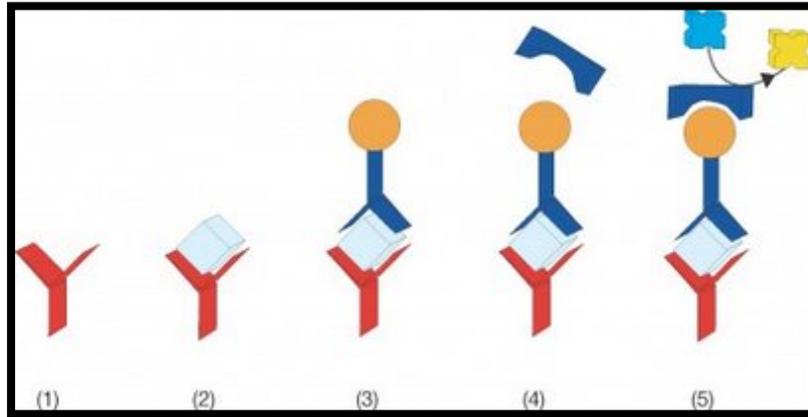


Abb. 7: Sandwich-ELISA. 1. coating-Antikörper; 2. gebundenes Antigen; 3. Sandwichkomplex; 4. Enzymankopplung; 5. Substratumsatz.

In dieser Arbeit werden dabei bereits etablierte und fertig zusammengestellte ELISA-Kits der Firma RnD Systems, Minneapolis USA, verwendet.

2.7. Versuchsablauf

Die Arbeit lässt sich in drei Versuchsphasen gliedern. In der ersten Versuchsreihe sollen die zwei verschiedenen PLGA-Sorten bezüglich ihrer Biokompatibilität und Zytotoxizität verglichen werden. Ziel der zweiten Versuchsreihe ist es, herauszufinden, welche Art der Kollagenbeschichtung, Kollagen-I oder Kollagen-II, sich positiver auf die Osteoblastenproliferation und Differenzierung auswirkt. Die dritte Versuchsreihe soll dem Zweck dienen, herauszufinden, ob sich eine Kollagen-CS-Beschichtung von PLGA positiver auf die Osteoblastenproliferation auswirkt als eine reine Kollagenbeschichtung. Für die ersten zwei Versuchsreihen wird mit humanen Osteoblasten gearbeitet. Diese werden nach Anzucht der Zellen wie beim Passagieren mittels Trypsin (siehe 2.2.1. Osteoblasten) vom Boden der Zellkulturflasche gelöst, abzentrifugiert und in Nährmedium resuspendiert. Nach Zählung der Zellen in einer Neubauer Zählkammer werden sie auf den Zellträgern beziehungsweise in Polystyrolzellkulturplatten (Corning Incorporated, USA) ausgesät, mit Nährmedium versorgt und weiter im Brutschrank inkubiert. In der dritten Versuchsreihe werden humane osteoblastenähnliche Zellen der Zelllinie MG-63 verwendet. Ein Zellträger wird mit jeweils 30.000 Zellen besiedelt, in 12-Loch Zellkulturplatten mit Nährmedium versorgt und im Brutschrank inkubiert.

2.7.1. Erste Versuchsreihe: Vergleich von PLGA Typ 1 und 2

In der ersten Versuchsphase werden zwei verschiedene PLGA-Sorten bezüglich ihrer Biokompatibilität und Zytotoxizität verglichen. Dabei wird das Standardverfahren zur Austestung von Biomaterialien in der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, angewendet. Die Testabfolge wurde von Frau Gisela Otto entwickelt und beinhaltet folgende Tests:

1. FDA/PI-Färbung: Beurteilung der Zellvitalität
2. Lactatdehydrogenase (LDH) -Test: Zytotoxizitätsnachweis
3. BrdU-ELISA: Kolorimetrischer Immuntest zur Quantifizierung der Zellproliferation
4. WST-Test: Quantifizierung der Zellproliferation
5. MTT-Test: Quantifizierung der Zellproliferation
6. Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Zunächst werden PLGA-Filme aus den zwei verschiedenen PLGA-Sorten, wie unter 2.3.1. beschrieben, hergestellt. Anschließend wird das zu untersuchende Material sterilisiert, indem es in 70% Ethanol gewaschen und dreimal mit PBS gespült wird. Im nächsten Schritt werden die PLGA-Filme in einer 24-Loch Zellkulturplatte für jeweils 24 Stunden, 1 Stunde und 10 Minuten in 2,5 ml serumfreien Nährmedium inkubiert, um eventuell enthaltene zytotoxische Stoffe heraus zu lösen. Außerdem befinden sich in der 24-Loch Platte eine Probe für das Rasterelektronenmikroskop und ein mit Osteoblasten besiedeltes Deckglas als Vergleich. Das Eluat wird nach Ablauf der jeweiligen Zeit abpipettiert und in steril verschließbaren Gefäßen bei 4°C aufbewahrt, um es für die folgenden Tests (siehe unten) zu benutzen. Die PLGA-Filme in der 24-Loch Platte werden anschließend mit 1×10^4 Zellen pro Film besiedelt, mit dem Standardnährmedium versorgt und im Brutschrank inkubiert. Nach drei Tagen wird das Nährmedium gewechselt und am siebten Tag werden die Präparate, die für die Rasterelektronenmikroskopie vorgesehen sind, mit Glutaraldehyd fixiert. Die übrigen Proben werden für den WST-Test verwendet. Für die FDA/PI-Färbung werden 8er Objektträger mit 1×10^4 Zellen pro Vertiefung besiedelt. Nach einem Tag Kultivierung wird das Standardnährmedium gegen das zuvor gewonnene Eluat ausgetauscht. Die Zellen werden für einen weiteren Tag kultiviert, um dann die Färbung vorzunehmen. Zur Durchführung des LDH-, MTT- und des ELISA, BrdU-Tests werden zwei Mikrotiterplatte mit jeweils 5×10^3

Zellen pro Vertiefung besiedelt und mit 150 µl Nährmedium versorgt. In jeder Mikrotiterplatte werden zwei Zellverdünnungseihen (8 Vertiefungen, in der ersten befinden sich 10^4 Zellen, in jeder folgenden Vertiefung nur halb so viele Zellen wie in der vor ihr, also in der siebten Vertiefung 156 und in der letzten keine Zellen) angelegt, die der Kontrolle der Ergebnisse dienen sollen. Bei der Mikrotiterplatte für den MTT-Test wird nach 24 Stunden das Nährmedium abgesaugt und durch 100 µl des zuvor gewonnenen Eluats ersetzt. Nach weiteren 24 Stunden wird MTT-Lösung in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben und für 24 Stunden dort belassen. Anschließend wird im Photometer die Extension bei 550 nm abgelesen. Bei der zweiten Mikrotiterplatte wird ebenfalls nach 24 Stunden das Nährmedium abgesaugt und durch 150 µl des Eluats ersetzt. Nach 24 Stunden Inkubation werden 100 µl des Eluats aus jeder Vertiefung abpipettiert, in eine neue Mikrotiterplatte gegeben und der LDH-Test durchgeführt. Die verbleibenden 50 µl Eluat werden abgesaugt und durch frisches Nährmedium ersetzt. Nach 72 Stunden Inkubation der Zellen im Brutschrank wird mit ihnen der ELISA, BrdU-Test durchgeführt.

2.7.1.1. FDA/PI-Färbung

Die Zellvitalität wird durch eine Färbung mit Fluorescein Diazetat (FDA; Sigma, Katalognummer: F-7378) und Propidium Jodid (PI; Sigma, Katalognummer: P-4170) nachgewiesen. FDA ist ein Substrat für Esterasen, welche in allen Zellen vorhanden sind. FDA kann die Zellmembran von vitalen Zellen durchdringen. Das Produkt der Hydrolyse durch die Esterasen ist Fluorescein (grüne Fluoreszenz), welches in den Zellen enthalten bleibt. PI (rote Fluoreszenz) kann die Membran von vitalen Zellen nicht durchdringen, sondern nur in nekrotische Zellen mit defekter Plasmamembran hinein diffundieren. PI interagiert mit DNA und doppelsträngiger RNA, sodass es nicht mehr aus der Zelle gespült werden kann.

Für die Färbung werden 8-Loch Objektträger, mit Glasboden und somit für die spätere Mikroskopie geeignet, mit 1×10^4 Zellen pro Vertiefung besiedelt und mit Standardnährmedium versorgt. Nach einem Tag Kultivierung im Brutschrank wird das Nährmedium gegen 200 µl Eluat getauscht, welches zuvor hergestellt wird, indem das zu untersuchende Material für jeweils 24 Stunden, 1 Stunde oder 10 Minuten in serumfreien Nährmedium inkubiert wurde. Nach 24 Stunden Inkubation bei 37°C werden die Zellen mit

PBS gewaschen und mit der FDA-Lösung gefärbt. Die Lösung besteht aus 30 µl FDA-Stammlösung (1 mg FDA/ml Aceton) verdünnt in 10 ml PBS. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei 37°C in Dunkelheit wird die FDA-Lösung abgesaugt und durch eine PI-Lösung ersetzt. Die Lösung besteht aus 500 µl PI-Stammlösung (1 mg PI/ml destilliertes Wasser) verdünnt in 10 ml PBS. Nach einer Inkubation von 2 Minuten bei 37°C in Dunkelheit werden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Innerhalb einer Stunde nach der Färbung werden die Zellen fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Bei dem verwendeten Mikroskop handelt es sich um das Axioplan2 in Kombination mit der Digitalkamera AxioCam MRc5 von ZEISS, Deutschland. Beide Farbstoffe können bei 488 nm (blaues Licht, Argon Laser) angeregt werden. Die grüne Fluoreszenz (FDA) wird bei 530 nm, die rote Fluoreszenz (PI) wird bei 620 nm detektiert.

2.7.1.2. LDH-Test

Der LDH-Test ist ein kolorimetrischer Test zur Quantifizierung von Zelltod und Zelllyse durch Messung der Lactatdehydrogenase (LDH)-Aktivität. Der Zelltod geht normalerweise mit Beschädigung der Plasmamembran einher. Dabei gelangt die in der Zelle gebundene Lactatdehydrogenase in den Extrazellulärraum und kann dort durch einen Enzymtest nachgewiesen werden. Folglich beinhaltet ein Nährmedium aus Kulturen mit überwiegend vitalen Zellen wenig LDH, ein Nährmedium aus weniger gesunden Zellkulturen dahingegen viel LDH. Durch den Nachweis von LDH im Nährmedium können demzufolge Rückschlüsse auf die Vitalität der Zellen auf den verschiedenen PLGA Sorten gezogen werden. Die LDH-Konzentration in Nährmedien aus Zellkulturen, angezchtet auf Glaskontrollen, dient dabei als 100% Vitalität Wert. Der 0% Vitalität Wert wurde in Zellkulturen bestimmt in denen alle Zellen devitalisiert wurden.

In meiner Arbeit verwende ich das LDH Detection Kit von Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland (Katalognummer: 11644793001).

Die 96-Loch Mikrotiterplatten (Nunc, Deutschland) werden mit 5×10^3 Osteoblasten pro Vertiefung besiedelt und mit in 150 µl Standardnährmedium versorgt. Nach einer Kultivierung von 24 Stunden im Brutschrank wird das Nährmedium gegen 150 µl Eluat getauscht, welches zuvor hergestellt wurde, indem das zu untersuchende Material für jeweils 24 Stunden, 1 Stunde oder 10 Minuten in serumfreien Nährmedium inkubiert wurde. Zellen,

welche durch Zugabe von 2% Triton-X-100 vollständig lysiert werden, dienen als Positivkontrolle. Zellen, welche in serumfreien Nährmedium kultiviert werden (minimale Enzymaktivität), dienen als Negativkontrolle. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wird 100 µl Eluat in eine neue 96-Loch Mikrotiterplatte überführt. Die Bestimmung der Aktivität von LDH im Überstand erfolgt nach Herstellerangaben mittels des Roche LDH Detection Kits. Eine Zellverdünnungsreihe von 10.000 bis 156 Zellen/Vertiefung dient als Standard. Die optische Dichte der einzelnen Proben wird in einem Mikroplattenleser bei 490 nm Wellenlänge gemessen. Aus den photometrisch ermittelten Werten wird die Zytotoxizität der Proben im Verhältnis zu Positiv- beziehungsweise Negativkontrolle errechnet. Die Zytotoxizität der Positivkontrolle wird als 100% bezeichnet, während die Zytotoxizität der Negativkontrolle als 0 bezeichnet wird. Die Zytotoxizität lässt sich mit folgender Gleichung errechnen:

$$\text{Zytotoxizität (\%)} = (\text{Testwert} - \text{Negativwert}) / (\text{Positivwert} - \text{Negativwert}) \times 100$$

2.7.1.3. BrdU-ELISA

Bromdesoxyuridin (BrdU) ist ein chemisches Analogon des Nukleosids Thymidin beziehungsweise Desoxyuridin. Beides sind Bestandteile der DNA. Es kann zur labordiagnostischen Markierung proliferierender Zellen verwendet werden, da es von vitalen Zellen aufgenommen werden kann und dann anstatt von Desoxythymidintriphosphat in die Zell-DNA eingebaut wird. Das gebundene BrdU kann anschließend durch einen enzymgekoppelten Immunadsorptionstest nachgewiesen werden. Das hier verwendete BrdU Cell Proliferation ELISA Kit ist von Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland (Katalognummer: 11647229001).

Die 96-Loch Mikrotiterplatten (Nunc, Deutschland) werden nunmehr mit 5×10^3 Osteoblasten pro Vertiefung besiedelt und mit 150 µl Standardnährmedium versorgt. Nach einer Kultivierung von 24 Stunden im Brutschrank wird das Nährmedium gegen 150 µl Eluat getauscht, welches zuvor hergestellt wurde, indem das zu untersuchende Material für jeweils 24 Stunden, 1 Stunde oder 10 Minuten in serumfreien Nährmedium inkubiert wurde. Die Kontrollzellgruppen, bei denen der 100% Proliferationswert bestimmt wird, werden weiterhin mit Standardnährmedium versorgt. Nach 48 Stunden wird das Eluat gegen Standardnährmedium getauscht, anschließend werden die Zellen für weitere 72 Stunden im

Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wird in jede Vertiefung 10 µl BrdU-Lösung gegeben und die Zellen für weitere 24 Stunden im Brutschrank kultiviert, damit die Zellen das BrdU in ihre DNA einbauen können. Anschließend wird die Zellproliferation mit Hilfe des BrdU Cell Proliferation ELISA Kits bestimmt. Die optische Dichte der einzelnen Proben wird in einem Mikroplattenleser bei 450 nm Wellenlänge gemessen.

2.7.1.4. WST-Test

WST ist ein Tetrazoliumsalz und kann von zellulären Enzymen, wie zum Beispiel mitochondrialer Dehydrogenase, zu Formazan gespalten werden, wobei sich seine Farbe von Hell- auf Dunkelrot ändert. Umso mehr vitale Zellen sich in einer Probe befinden, umso höher ist auch die Konzentration von mitochondrialer Dehydrogenase. Die Steigerung der Enzymaktivität führt zu einem Anstieg der Formazankonzentration, welche wiederum direkt auf die Zahl der metabolisch aktiven Zellen schließen lässt. Der Farbumschlag in der Probe kann mit einem Spektralfotometer bestimmt werden. Das hier verwendete System ist das Cell Proliferation Reagent WST-1 von Roche Diagnostics, Mannheim (Katalognummer: 116446807001).

Die PLGA-Zellträger werden in 24-Loch Zellkulturplatten, welche 100 µl Standardnährmedium pro Vertiefung enthalten, mit jeweils 1×10^4 Osteoblasten besiedelt. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei 37°C, um die Zelladhäsion zu gewährleisten, werden weitere 2000 µl Nährmedium hinzu gegeben. Nach 7-tägiger Kultivierung, wird die Zellproliferation nachgewiesen. In jede Vertiefung kommen 200 µl WST-1 Reagenz in einem Verhältnis von 1:10 (WST/Nährmedium). Nach einer Inkubation von 4 Stunden im Brutschrank wird das Medium in eine 96-Loch Mikrotiterplatte gegeben. Abschließend erfolgt die Absorptionsmessung bei 450 nm. Zellen, die in Vertiefungen ohne Zellträgermaterial kultiviert werden, dienen als Kontrolle.

2.7.1.5. MTT-Test

MTT ist ein gelbes Tetrazoliumsalz und kann von zellulären Enzymen, wie zum Beispiel mitochondrialer Dehydrogenase, zu rotem Formazan gespalten werden. Umso mehr vitale Zellen sich in einer Probe befinden, umso höher ist auch die Konzentration von mitochondrialer Dehydrogenase. Die Steigerung der Enzymaktivität führt zu einem Anstieg der Formazankonzentration. Diese wiederum lässt direkt auf die Zahl der metabolisch aktiven Zellen schließen. Der Farbumschlag in der Probe kann mit einem Spektralfotometer bestimmt werden. Das hier verwendete System ist das MTT Cell Proliferation Kit von Roche Diagnostics, Mannheim (Katalognummer: 11465007001).

96-Loch Zellkulturplatten (Nunc, Deutschland) werden mit 5×10^3 Osteoblasten pro Vertiefung, in 150 μ l DMEM, besiedelt. Nach einer Kultivierung von 24 Stunden im Brutschrank wird das Nährmedium gegen 100 μ l Eluat getauscht welches zuvor hergestellt wird, indem das zu untersuchende Material für 24 Stunden, 1 Stunde oder 10 Minuten in serumfreien Nährmedium inkubiert wurde. Zellen, kultiviert in serumfreien DMEM, dienen als Low-Kontrolle. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wird die Zellproliferation gemessen. Eine Zellverdünnungseihe mit 10.000 bis 156 Zellen/Vertiefung dient als Standard. Die optische Dichte der einzelnen Proben wird in einem Mikroplattenleser bei 450 nm Wellenlänge gemessen.

2.7.1.6. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen

Die PLGA-Zellträger werden in 24-Loch Platten, welche 100 μ l Nährmedium pro Vertiefung enthalten, mit jeweils 1×10^4 Zellen besiedelt. Nach einer Inkubation von einer Stunde im Brutschrank, um die Zelladhäsion zu gewährleisten, werden weitere 2000 μ l Nährmedium hinzugegeben. 7 Tage später werden die besiedelten PLGA-Zellträger durch Waschen mit PBS, um restliches Nährmedium zu entfernen, auf die Rasterelektronenmikroskopie vorbereitet. Im Anschluss werden die Zellen in 3% Lösung von Glutaraldehyd in PBS bei einem pH-Wert von 7,4 für 24 Stunden fixiert. Nach dem Entfernen der Glutaraldehydlösung werden die Zellen in einer aufsteigenden Alkoholverdünnungsreihe dehydriert.

- 50% Ethanol, 5 Minuten
- 60% Ethanol, 5 Minuten
- 70% Ethanol, 5 Minuten
- 80% Ethanol, 5 Minuten
- 90% Ethanol, 5 Minuten
- 100% Ethanol, 5 Minuten

Im nächsten Schritt erfolgt eine kritische Punkttrocknung mit dem K850 Critical Point Dryer (Emitech, USA) gefolgt von einer Goldbedampfung mit dem SCD 500 (CAL-Tec, Ashford, UK).

Zur Rasterelektronenmikroskopie wird das XL30CP der Firma Philips Electron Optics GmbH, Kassel, Deutschland benutzt. Gearbeitet wird mit Spannungen zwischen 10-15 kV.

2.7.2. Zweite Versuchsreihe: Vergleich von Kollagen-I und Kollagen-II

Ziel ist es, die Proliferation und Differenzierung von humanen Osteoblasten auf zwei verschiedenen Kollagenbeschichtungen zu untersuchen. Hierzu werden die Osteoblasten in 24-Loch Platten auf mit Kollagen beschichteten PLGA-Scheiben für 5, 10 und 15 Tage kultiviert. Nach Ablauf der jeweiligen Zeit wird zum einen die Zellzahl bestimmt, zum anderen werden mit Hilfe von ELISA-Kits die knochenmorphogenetischen Proteine (BMP) BMP-2, BMP-4, BMP-7 sowie Osteopontin und Decorin nachgewiesen. Durch Bestimmung der Konzentrationen dieser Proteine im Nährmedium der Osteoblasten lassen sich Rückschlüsse auf den Differenzierungsgrad der Zellen auf den verschieden beschichteten Proben schließen. Die Anzahl der Zellen auf den Proben gibt Aufschluss über die Proliferation der Osteoblasten.

Zunächst werden PLGA-Filme mit einem Durchmesser von circa 1 cm, wie unter 2.3.1. beschrieben, hergestellt. Aufgrund der Ergebnisse aus der ersten Versuchsreihe (siehe 3.1.) wird hier mit PLGA Typ 1 (Sorte 8531, Lotnummer: 0808001776) gearbeitet. Nachdem die Proben in CellCrowns (siehe 2.3.2.) eingespannt sind, wird das zu untersuchende Material sterilisiert, indem es in 70% Ethanol gewaschen und dreimal mit PBS gespült wird. Anschließend wird die Hälfte der Zellträger mit Kollagen-I und die andere Hälfte mit Kollagen-II beschichtet (siehe 2.4.1.). Nach der Beschichtung werden die Zellträger zweimal

mit sterilem PBS gespült und in 12-Loch Zellkulturplatten, gefüllt mit 2 ml Nährmedium, gegeben. Jeder Zellträger wird mit 10^4 Osteoblasten besiedelt und in einem Brutschrank (Fa. Heraeus, Hanau, Deutschland) für 5, 10 beziehungsweise 15 Tage in wassergesättigter Atmosphäre (98% Luftfeuchtigkeit) bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert. Nach Ablauf der jeweiligen Zeit wird zunächst das Nährmedium aus den einzelnen Vertiefungen abpipettiert und separat, um möglichst viele Proben miteinander vergleichen zu können, in verschließbaren Gefäßen gesammelt. Auf diese Weise erhält man von Kollagen-I und II pro Tag jeweils 8 Proben mit denen die oben erwähnten ELISA-Tests durchgeführt werden können. Zur Bestimmung der Zellzahl müssen die Zellen zunächst von den Proben abgelöst werden. Nach Abpipettieren des Mediums und Spülen mit Phosphatpufferlösung (PBS, Sigma, USA) wird 1 ml 0,05% Trypsin-PBS-Lösung auf die Zellträger gegeben. Anschließend werden sie für 5 Minuten im Brutschrank inkubiert. Nach Ablösen der Zellen wird die Zellsuspension 1:1 mit DMEM, welches zuvor mit 10% FCS angereichert wurde, vermischt um die Wirkung des Trypsins zu inhibieren. $20\mu\text{l}$ der Zellsuspension werden mit $20\mu\text{l}$ Tryptophanblau, einem Zellfärbemittel, vermischt und in einer Zählkammer nach Neubauer (Brand, Wertheim, Deutschland) ausgezählt.

2.7.2.1. BMP-2, BMP-4 und BMP-7 Immunadsorptionstest

Die in dieser Arbeit verwendeten ELISAs stammen von der Firma RnD Systems, Minneapolis USA. Zum einen der Quantikine BMP-2 Immunoassay mit der Katalognummer: DBP200, zum anderen der Quantikine human BMP-4 Immunoassay mit der Katalognummer: DBP400 sowie der Quantikine human BMP-7 Immunoassay mit der Katalognummer: DBP700.

Diese Tests sind Fest-Phasen Sandwich ELISAs, entwickelt, um humanes BMP in Zellkulturnährmedien nachzuweisen. Hierzu ist eine 96-Loch Mikrotiterplatte mit einem für das jeweilige BMP (BMP-2, -4 beziehungsweise -7) spezifischen monoklonalen Antikörper beschichtet worden. Jedes Loch wird mit $50\mu\text{l}$ Eluat befüllt. Es werden zwei Standardverdünnungsreihen mit bekannter BMP Konzentration (im Fall von BMP-2 mit 4000 pg/ml bis $62,5\text{ pg/ml}$ und in einer Konzentration von 2000 pg/ml bis $31,2\text{ pg/ml}$ im Fall von BMP-4 und -7) pro Mikrotiterplatte angelegt. Die restlichen Vertiefungen werden mit dem zu untersuchenden Eluat befüllt und für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf einer Rüttelplatte inkubiert. Nach Ablauf der Zeit ist das freie BMP an die immobilisierten Antikörper

gebunden und die Flüssigkeit aus jeder Vertiefung kann abpipettiert werden. Daraufhin wird jede Vertiefung viermal mit einem speziellem Waschpuffer gespült, um die ungebundenen Substrate zu entfernen. Im nächsten Schritt werden in jede Vertiefung 200 µl Enzym gekoppelter, für das jeweilige BMP spezifische, Antikörper hinzugegeben und für 2 Stunden auf einer Rüttelplatte inkubiert. Nach Wiederholen des Waschvorganges, um ungebundene Antikörper-Enzym-Komplexe zu entfernen, werden 200 µl einer Substratlösung in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben. Die Mikrotiterplatte wird nun für 30 Minuten lichtgeschützt aufbewahrt und im Anschluss werden 50 µl einer Stopp-Lösung hinzugegeben, um die Enzymaktivität zu beenden. Die optische Dichte der einzelnen Proben wird in einem Mikroplattenleser bei 450 nm Wellenlänge gemessen.

2.7.2.2. Osteopontin und Decorin Immunadsorptionstest

Die verwendeten ELISAs stammen ebenfalls von der Firma RnD Systems, Minneapolis USA. Zum einen das DouSet ELISA Development System für humanes Osteopontin mit der Katalognummer: DY1433, zum anderen das DouSet ELISA Development System für humanes Decorin mit der Katalognummer: DY143. Bei diesen Tests handelt es sich um bereits vom Hersteller etablierte Fest-Phasen Sandwich ELISAs, welche entwickelt wurden, um humanes Osteopontin beziehungsweise Decorin in Zellkulturnährmedien nachzuweisen. Anders als bei den ELISAs für BMP müssen hier die Fest-Phasen, also die 96-Loch Mikrotiterplatten (Nunc, Deutschland), für die Nachweise vorbereitet werden. Hierzu werden 100 µl des coating-Antikörpers in einer Konzentration von 2 µg/ml in jede Vertiefung gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wird aus jeder Vertiefung die Flüssigkeit abpipettiert, um anschließend jede Vertiefung dreimal mit einem speziellen Waschpuffer zu waschen. Im nächsten Schritt werden die Mikrotiterplatten mit 300 µl pro Vertiefung mittels des mitgelieferten Verdünnungsreagenz geblockt. Die Inkubationszeit beträgt eine Stunde, danach wird die Lösung abgesaugt und der Waschvorgang wiederholt. Nun sind die Platten für die Zugabe der Proben vorbereitet. Jede Vertiefung wird mit 100 µl Eluat befüllt. Es werden zwei Standardverdünnungsreihen mit bekannter Osteopontin- beziehungsweise Decorinkonzentration (im Fall von Osteopontin mit 4000 pg/ml bis 62,5 pg/ml und in einer Konzentration von 2000 pg/ml bis 31,2 pg/ml im Fall von Decorin) pro Mikrotiterplatte angelegt. Die restlichen Vertiefungen werden mit dem zu

untersuchenden Eluat befüllt und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Zeit ist das freie Antigen an die immobilisierten Antikörper gebunden und die Flüssigkeit aus jeder Vertiefung kann abpipettiert werden. Daraufhin wird jede Vertiefung dreimal mit einem speziellem Waschpuffer gespült, um die ungebundenen Substrate zu entfernen. Im nächsten Schritt werden in jede Vertiefung 100 µl Enzym gekoppelter, für das jeweilige Antigen spezifischer, Antikörper hinzugegeben und für 2 Stunden inkubiert. Nach Wiederholen des Waschvorganges, um ungebundene Antikörper-Enzym-Komplexe zu entfernen, werden 100 µl einer Substratlösung in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben. Das Ganze wird für 20 Minuten lichtgeschützt aufbewahrt und im Anschluss werden 50 µl einer Stopp-Lösung hinzugegeben, um die Enzymaktivität zu beenden. Die optische Dichte der einzelnen Proben wird in einem Mikroplattenleser bei 450 nm Wellenlänge gemessen.

2.7.3. Dritte Versuchsreihe: Vergleich von Kollagen-I und Kollagen-II mit Chondroitinsulfat

In dieser Versuchsreihe werden PLGA-Oberflächen mit Kollagen-I in Verbindung mit CS und ohne CS beschichtet, um die Wirkung von CS auf das Verhalten von osteoblastenähnlichen Zellen der Zelllinie MG-63 zu untersuchen. Zu diesem Zweck wird die Zellzahl bestimmt sowie die Zellmorphologie und die Zell-Adhäsions-Fläche untersucht. Außerdem soll die Ausbildung von Adhäsionskomplexen dargestellt werden, indem Integrin und Vinculin, beides wichtige Bestandteile von Adhäsionskomplexen, nachgewiesen werden. In diesem Zusammenhang soll auch das Aktinzytoskelett untersucht werden, um einen vollständigen Überblick über die Adhäsion der Zellen auf den jeweiligen Oberflächen zu bekommen. Zunächst werden PLGA-Filme wie unter 2.3.1. beschrieben hergestellt. Aufgrund der Ergebnisse aus der ersten Versuchsreihe wird hier mit PLGA Typ 1 (Sorte 8531, Lotnummer: 0808001776) gearbeitet. Die Proben haben eine Fläche von 3,14 cm² und einen Durchmesser von 2 cm. Nachdem die Proben in CellCrowns (siehe 2.3.2.) eingespannt sind, wird das zu untersuchende Material sterilisiert, indem es in 70% Ethanol gewaschen und dreimal mit PBS gespült wird. Danach werden ein Drittel der Zellträger mit Kollagen-I sowie ein Drittel mit Kollagen-I/CS beschichtet (siehe 2.4.1. und 2.5.2.). Das letzte Drittel bleibt unbeschichtet. Nach der Beschichtung werden die Zellträger zweimal mit sterilem PBS gespült und in 12-

Loch Zellkulturplatten, gefüllt mit 2 ml Nährmedium, gegeben. Jede Vertiefung wird mit 30.000 Zellen besiedelt, was circa 17.000 Zellen pro cm^2 entspricht. Als Referenzmaterial werden Mikroskopierdeckgläser mit einem Durchmesser von 1,24 cm und einer Fläche von $1,2 \text{ cm}^2$ (Marienfeld GmbH & Co. KG, Deutschland) benutzt. Die Zellen werden dann jeweils für einen, drei und sieben Tage im Brutschrank kultiviert.

2.7.3.1. Zellzahl, Morphologie, fokale Adhäsionskomplexe, Aktinzytoskelett

An Tag 1 nach Zellaussaat werden die Zellen zweimal mit PBS gespült, mit 70% gefrorenem Ethanol für 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert und mit einer Kombination aus 2 verschiedenen fluoreszierenden Färbemitteln für 2 Stunden bei Raumtemperatur gefärbt mittels eines Zellmembranfärbemittel, Texas Red C2-maleimide (Molecular Probes, Invitrogen, Katalognummer: T6008; 20ng/ml) und einem Zellkern Färbemittel, Hoechst 33342 (Sigma, USA; 5 $\mu\text{g/ml}$). Die Zahl und Form der Zellen auf den PLGA-Filmen wird auf Mikrofotos bestimmt. Aufgenommen werden diese Fotos unter einem Epifluoreszenzmikroskop (Axioplan 2, ZEISS, Deutschland), welches mit einer Digitalkamera (AxioCam Mrc5, ZEISS, Deutschland) ausgestattet ist.

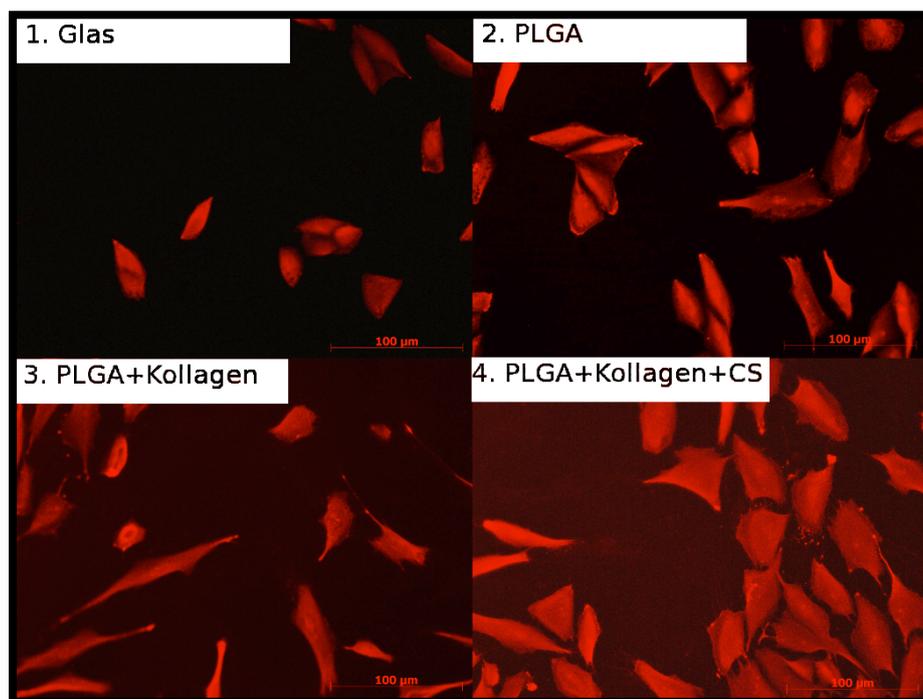


Abb. 8: Typische Aufnahme von MG-63 Zellen, gefärbt mit Texas Red C2-maleimide.

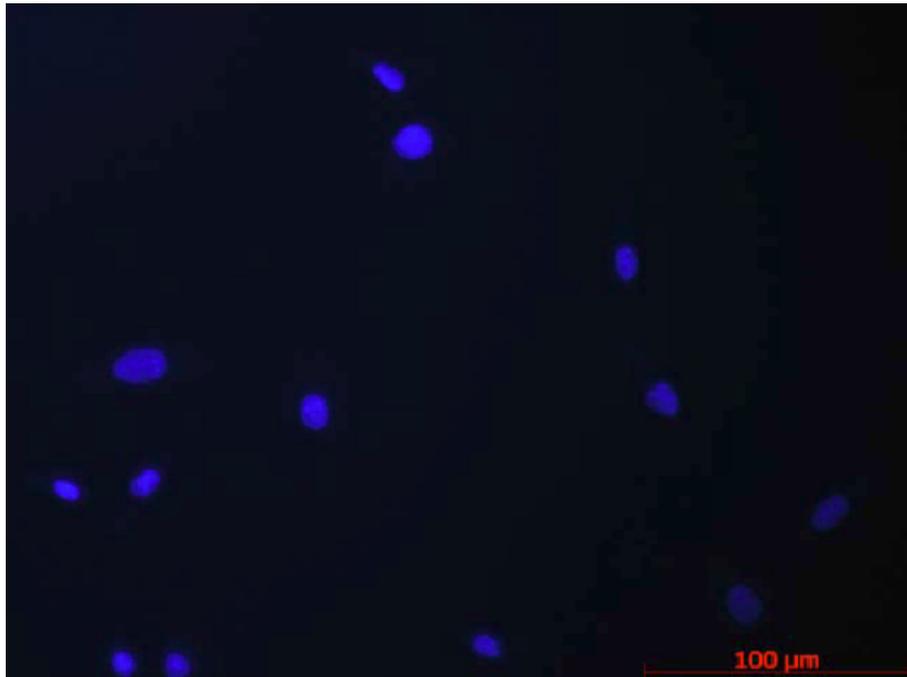


Abb. 9: Typische Aufnahme von MG-63 Zellen gefärbt mit Hoechst 33342. Blaue Punkte repräsentieren Zellkerne, welche manuell gezählt werden können.

Am dritten Tag nach Zellaussaat werden die Zellen mit einem Immunfluoreszenz-Färbemittel für Integrin, Vinculin und Aktin behandelt. Die Zellen werden zweimal mit PBS gespült und mit 70% Ethanol für 10 Minuten bei minus 20°C fixiert. Anschließend werden sie für 20 Minuten bei Raumtemperatur mit einer Lösung aus 1% Rinderserumalbumin (bovine serum albumin: BSA; Serva, Deutschland, Katalognummer: 11930) in PBS inkubiert, um die unspezifischen Antikörperbindungsstellen der Zellen zu blockieren. Außerdem enthält die Lösung 0,05% Triton X-100 (Serva, Deutschland, Katalognummer: 37195), um die Permeabilität der Zellmembran zu gewährleisten. Nach Ablauf der Zeit wird die Lösung abgesaugt und die Proben für 20 Minuten mit 1% Tween (Merck, USA, Katalognummer: 822184) benetzt. Im Anschluss werden die Zellen über Nacht bei 4°C mit humanem anti Integrin (Chemicon International Inc., Temecula, CA, USA; Katalognummer: MAB1981), humanem anti Vinculin und synthetischem anti β -Aktin (beide Antikörper kommen von Sigma, St. Louis, MO, USA; Katalognummern: V9131 und A5441) behandelt. Diese primären Antikörper werden in einem Verhältnis von 1:400 in PBS gelöst. Am nächsten Tag werden die Zellen mit einer Lösung aus PBS mit 0,05% Tween (Merck, USA, Katalognummer: 822184) gespült, um dann den sekundären Antikörper, ein aus Ziegen gewonnenes anti Maus F(ab')₂ Fragment von Immunglobulin G konjugiert mit der

Fluoreszenzsonde Alexa Fluor® 488 (Molecular Probes, Invitrogen, USA, Katalognummer: 57466A; 1:400 in PBS verdünnt), für 1 Stunde bei Raumtemperatur hinzugeben. Im Anschluss werden die Zellen zweimal mit PBS gespült. Die Proben werden dann mit einem wässrigen Fluoreszenz konservierenden Gel (Biomedica Corporation, USA) bedeckt und unter einem Mikroskopdeckglas fixiert. Im Anschluss werden die Adhäsionskomplexe, die zytoskelettalen Moleküle sowie die Zellzahl auf Mikrofotos ausgewertet. Aufgenommen werden die Bilder unter einem Epifluoreszenzmikroskop (Axioplan2, ZEISS, Deutschland), welches mit einer Digitalkamera (AxioCam Mrc5, ZEISS, Deutschland) ausgestattet ist. Konfokale Laserscanmikroskopie, eine Technik, die es ermöglicht, horizontale optische Schnitte durch Zellen zu legen, kommt zusätzlich zum Einsatz. Die Bilder werden mit dem Carl ZEISS Microimaging LSM 510 gemacht.

Am siebten Tag nach Zellaussaat, wenn die Zellzahl stark zugenommen hat und die Zellen in mehreren Schichten wachsen, werden sie mit Hilfe von in PBS gelöstem Trypsin-EDTA (Biochrom, Deutschland, Katalognummer: L2153) von den PLGA-Filmen gelöst. Gezählt werden die Zellen unter Zuhilfenahme der Neubauerzählkammer und einem Lichtmikroskop (IM35, ZEISS, Deutschland; Zehnfache Vergrößerung). Für jede Versuchsgruppe (PLGA, PLGA + Kollagen-I, PLGA + Kollagen-I + CS) werden drei Proben verwendet und jede Probe wird 12 Messungen unterzogen.

2.7.3.2. Auswertung der Mikrofotos

Aus jeder Versuchsgruppe (PLGA, PLGA + Kollagen-I, PLGA + Kollagen-I + CS) werden nach dem ersten und dritten Tag nach Zellaussaat 3 Proben ausgesucht. Von jeder Probe werden 9 Fotos in zufällig ausgewählten, gleichmäßig auf der Zellträgeroberfläche verteilten Bereichen gemacht. Die Zellen werden dann auf den vorliegenden Fotos gezählt. Bei dem dabei verwendeten Programm handelt es sich um Photoshop (Microsoft Office).

2.7.3.3. Messung der Zell-Adhäsions-Fläche

Zellen, die am ersten Tag nach Zellaussaat mit dem Zellmembran Färbemittel Texas Red C2-Maleimide gefärbt werden, werden zur Analyse der Zell-Adhäsions-Fläche herangezogen. Die Zellen werden unter Zuhilfenahme eines Mikroskops fotografiert (Größe des fotografierten Bereichs: $8.63 \times 10^{-4} \text{ cm}^2$). Die Zellfläche, projiziert auf das Untergrundmaterial, wird mit der Software Atlas (Tescan Ltd., Brno, Tschechische Republik) gemessen. Zellen, die interzellulär Kontakte entwickelt haben, werden von der Messung ausgeschlossen. Aus jeder Versuchsgruppe werden drei verschiedene Proben mit jeweils circa 100 bis 150 Zellen ausgewertet.

2.7.3.4. Statistische Auswertung

Die quantitativen Daten werden als Durchschnitt \pm SFA (Standard Fehler Abweichung) von 20 bis 150 Messungen angegeben. Zur Bestimmung der Zellzahl an Tag 1 und 3 nach Zellaussaat auf Mikrofotos sind insgesamt 27 Messungen nötig. 100 bis 150 Zellen werden am ersten Tag nach Zellaussaat zur Bestimmung der Zell-Adhäsions-Fläche gemessen. Am siebten Tag nach Zellaussaat werden 20 Zellzahlbestimmungen mittels des Lichtmikroskops durchgeführt. Mehrfaktorielle Varianzanalysen werden mit ANOVA (analysis of variance) durchgeführt, indem die Student-Newman-Keuls Methode angewandt wird. Ein Wert von $p \leq 0,05$ wird dabei als signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3.1. Erste Versuchsreihe: Vergleich von PLGA Typ 1 und 2

3.1.1. FDA/PI Färbung

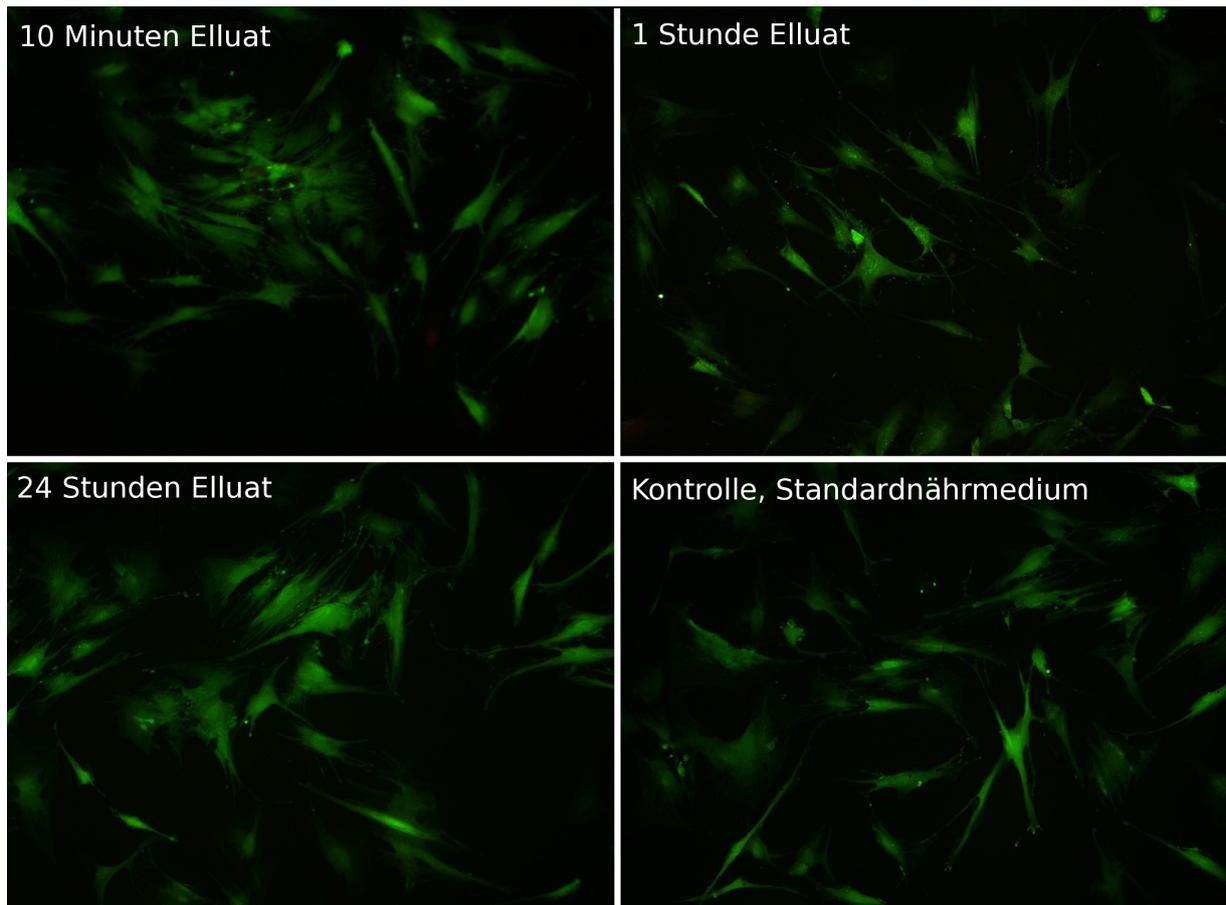


Abb. 10: FDA/PI Färbung von humanen Osteoblasten, PLGA Typ 1. Axioplan2 Mikroskop, AxioCam MRc5 Digitalkamera (ZEISS, Deutschland). Grün gefärbte Zellen sind vital, rote wären devital (siehe 2.7.1.1.). Auf den untersuchten Proben ließen sich ausschließlich grün gefärbte vitale Zellen finden.

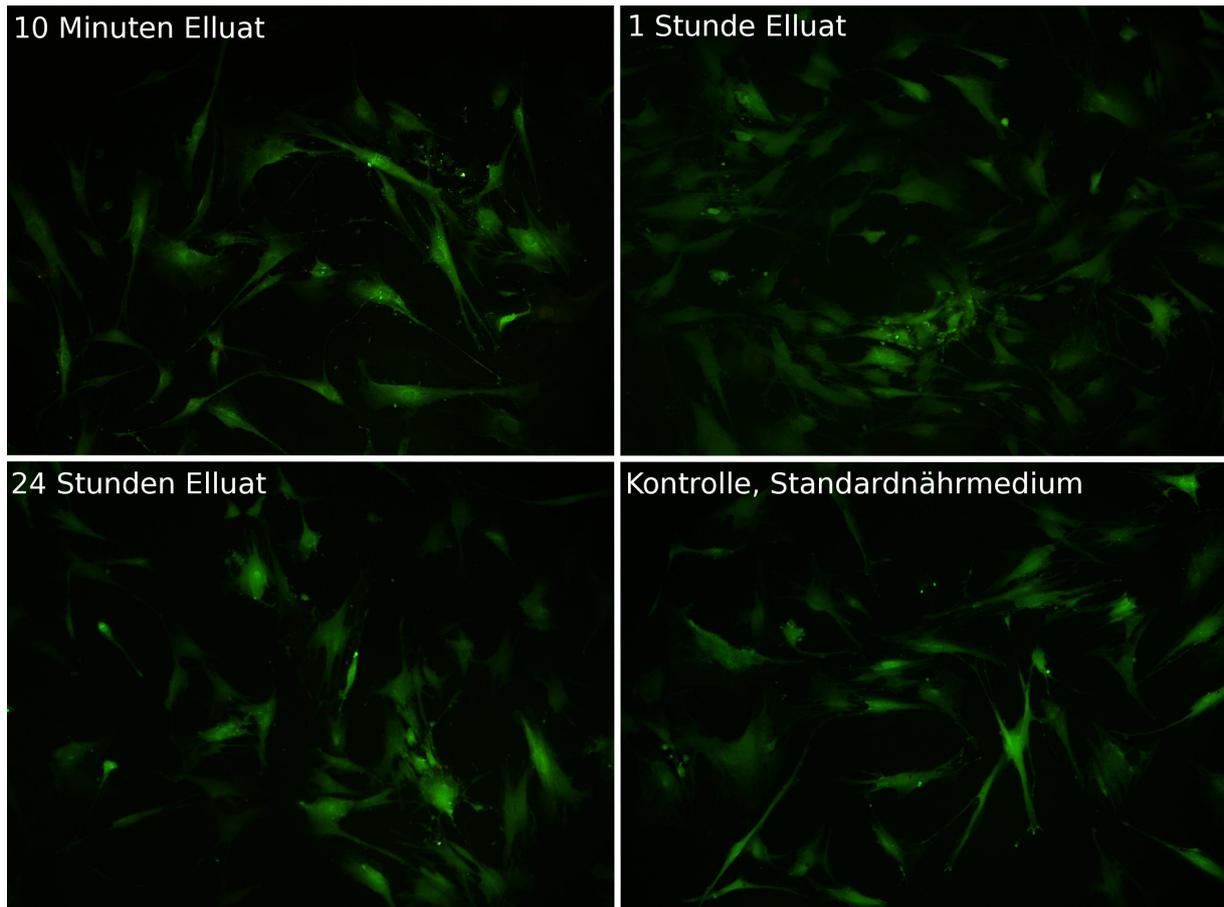
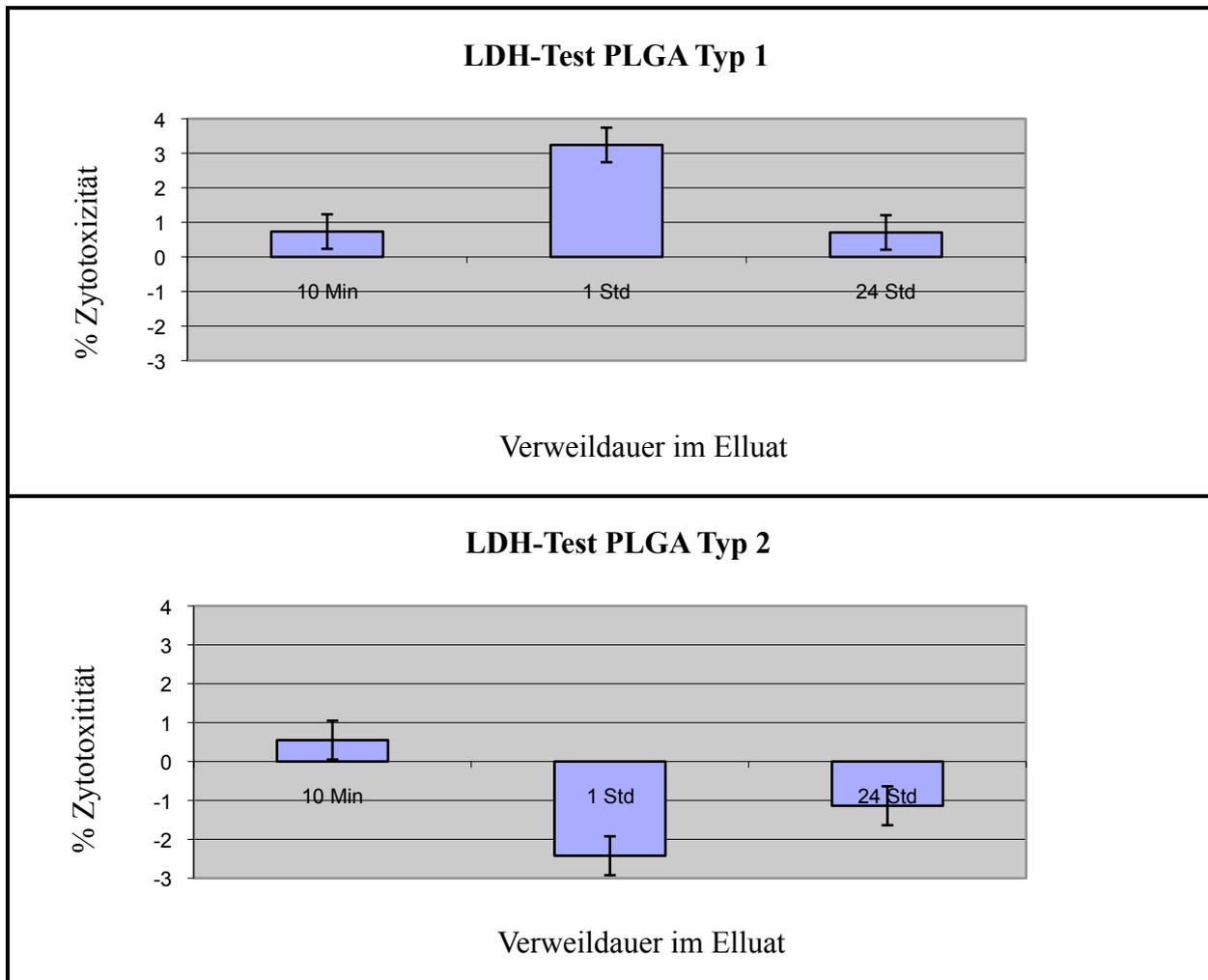


Abb. 11: FDA/PI Färbung von humanen Osteoblasten, PLGA Typ 2. Axioplan2 Mikroskop, AxioCam MRc5 Digitalkamera (ZEISS, Deutschland). Grün gefärbte Zellen sind vital, rote wären devital (siehe 2.7.1.1.). Auf den untersuchten Proben ließen sich ausschließlich grün gefärbte vitale Zellen finden.

Auf keiner der untersuchten Proben lassen sich rot gefärbte Zellen nachweisen. Dass alle Zellen grün gefärbt sind, zeigt, dass keines der beiden Materialien negative Auswirkung auf die Zellvitalität hat.

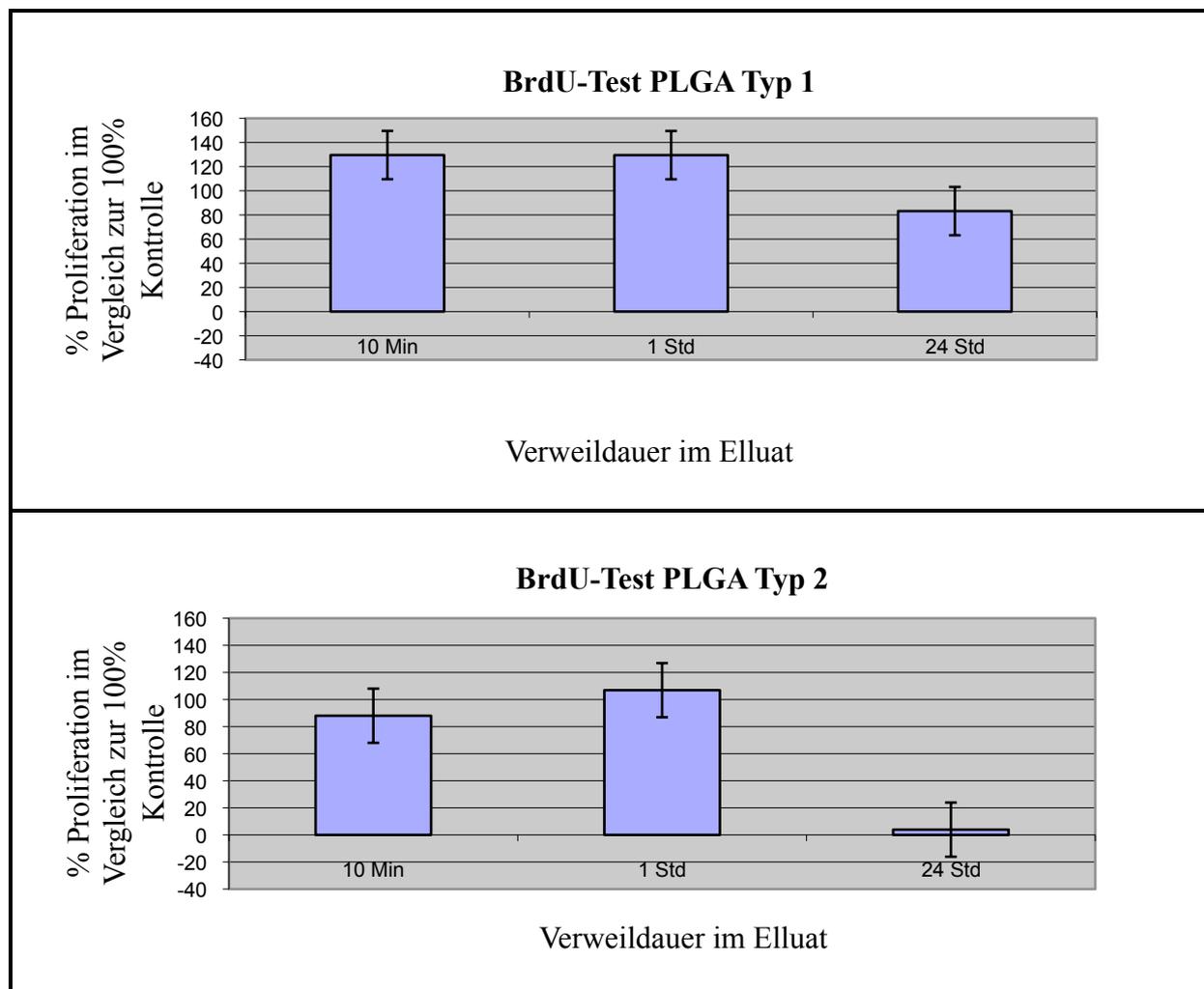
3.1.2. LDH-Test



Tab. 1: LDH-Test, PLGA Typ 1 und 2. Vitalität der Osteoblasten kultiviert in Nährmedium, in welchem zuvor für jeweils 10 Minuten, 1 Stunde und 24 Stunden die jeweiligen PLGA-Filme inkubiert wurden. Die Zellvitalität wurde mit dem LDH Detection Kit von Roche Diagnostics, Mannheim bestimmt. Die Abweichungen der LDH - Konzentration zwischen den PLGA Proben und der Kontrolle liegen im Normbereich. Somit sind die Proben als nicht zytotoxisch einzustufen.

In den obigen Tabellen ist die Zytotoxizität der verschiedenen Zellkulturen bereits errechnet worden (siehe 2.7.1.2. LDH-Test). Es konnten keine gravierenden Abweichungen der LDH-Konzentration zwischen den PLGA Proben und der Glaskontrolle nachgewiesen werden.

3.1.3. ELSIA, BrdU Test

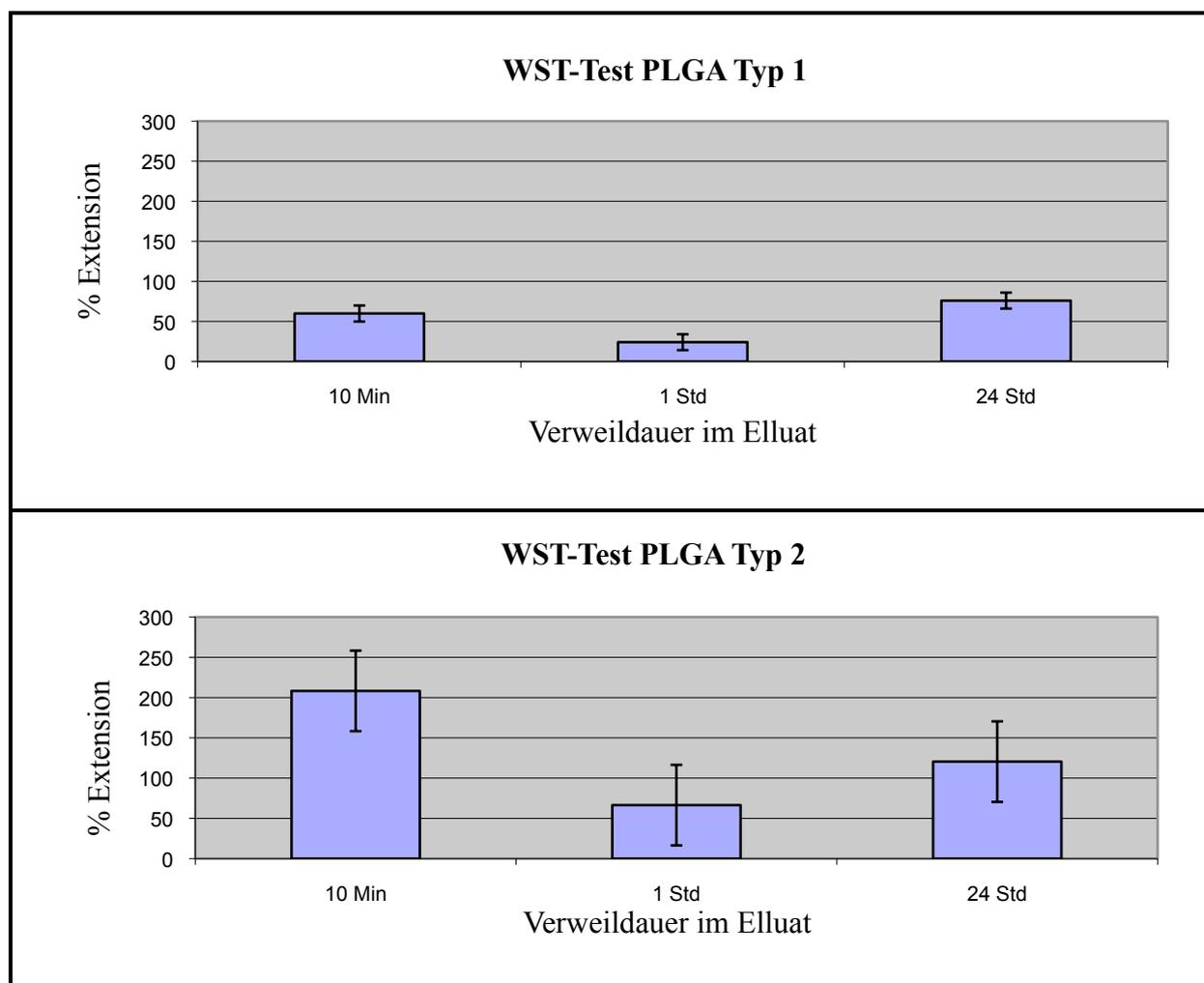


Tab. 2: BrdU-Test, PLGA Typ 1 und 2. Zellproliferationsbestimmung mittels des BrdU Cell Proliferation ELISA Kits von Roche Diagnostics, Mannheim. Die Osteoblasten wurden in Nährmedium kultiviert, in welchem zuvor die jeweiligen PLGA-Proben für jeweils 10 Minuten, 1 Stunde und 24 Stunden inkubiert wurden. Die Proliferationswerte für PLGA Typ 1 sind durchweg höher als die für Typ 2. Die extrem niedrigen Werte für die 24 Stunden Proben von PLGA Typ 2 lassen sich vermutlich auf Pipettierfehler zurückführen und sollten nicht berücksichtigt werden.

Der BrdU Nachweis in den einzelnen Zellkulturen ergibt für PLGA Typ 1 durchweg höhere Werte als für Typ 2. Dies lässt auf eine bessere Zellproliferation schließen. Bei Typ 1 ließen sich für die 10 Minuten und 1 Stunde Proben sogar höhere Proliferationswerte als bei der Kontrollgruppe detektieren. Das Gleiche gilt für die 1-Stunde-Probe von Typ 2. Mit 83% Proliferation bei der 24-Stunden-Probe von Typ 1 und 88% bei der 10-Minuten-Probe von Typ 2 liegen die Wert noch in der zu erwartenden Streuung. Die extrem niedrigen Werte für

die 24-Stunden-Proben des PLGA Typs 2 lassen sich vermutlich auf Pipettierfehler zurückführen und sollten nicht berücksichtigt werden.

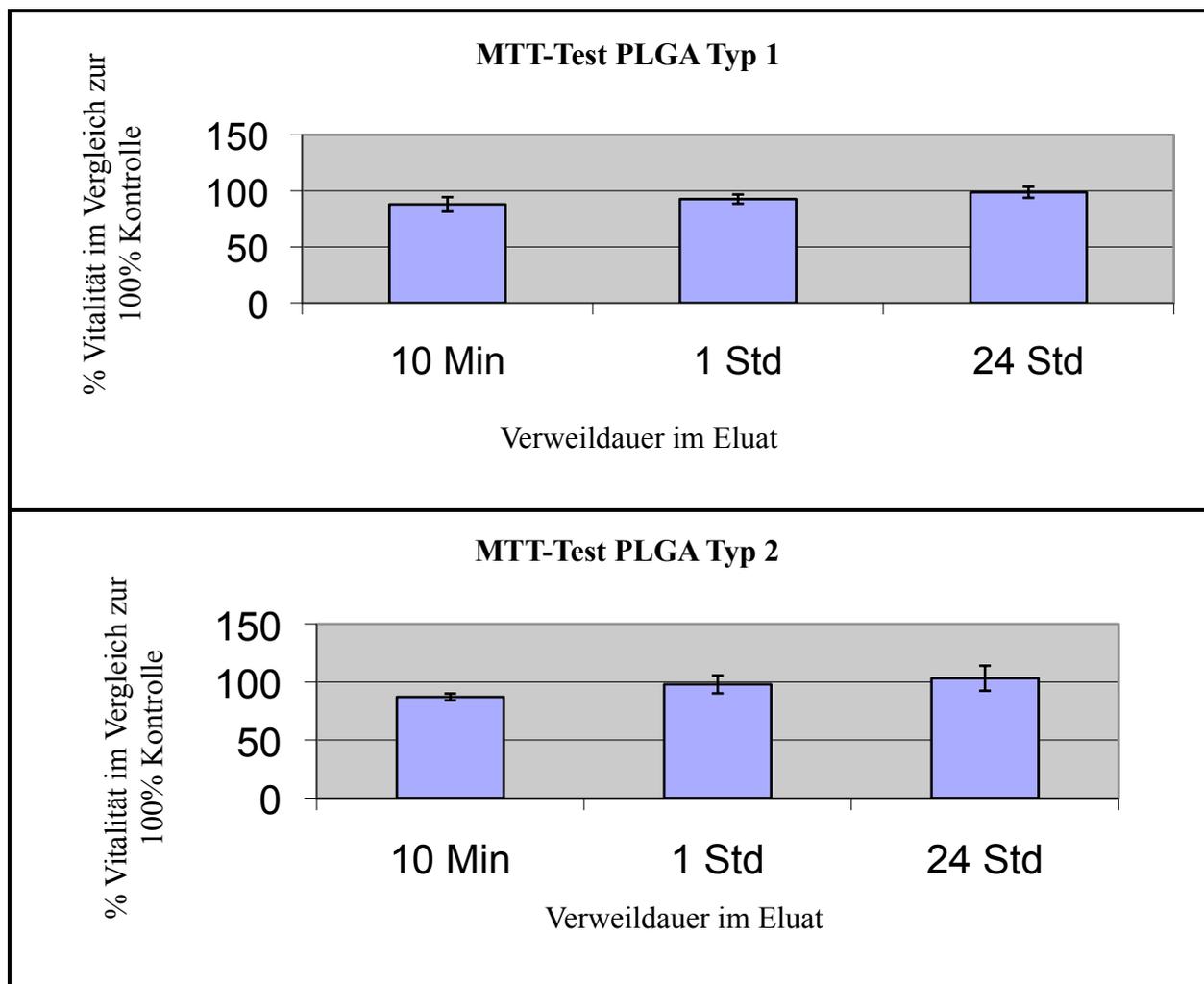
3.1.4. WST-Test



Tab. 3: WST-Test, PLGA Typ 1 und 2. Zellproliferationsbestimmung mittels des Cell Proliferation Reagent WST-1 von Roche Diagnostics, Mannheim. Die Osteoblasten wurden auf Zellträgern kultiviert, welche zuvor für jeweils 10 Minuten, 1 Stunde und 24 Stunden in Nährmedium inkubiert wurden. Prozentangaben im Verhältnis zur Kontrolle. Auf beiden PLGA Sorten lässt sich metabolische Aktivität nachweisen. Die Werte für Osteoblasten auf PLGA des Typs 2 sind im Schnitt höher als für Osteoblasten auf Typ 1.

Die gewonnenen Ergebnisse lassen keine konkreten Aussagen zu. Zwar sind die Proliferationswerte für Osteoblasten auf PLGA vom Typ 2 im Schnitt höher als für Osteoblasten auf Typ 1, es lässt sich jedoch auf allen Proben Proliferation nachweisen.

3.1.5. MTT-Test



Tab. 4: MTT-Test, PLGA Typ 1 und 2. Zellproliferationsbestimmung mittels des MTT Cell Proliferation Kits von Roche Diagnostics, Mannheim. Die Osteoblasten wurden in Nährmedium kultiviert, in welchem zuvor die jeweiligen PLGA-Proben für 10 Minuten, 1 Stunde und 24 Stunden inkubiert wurden. Alle Werte liegen im Bereich der 100% Kontrolle. Mithin lassen sich keine negativen Auswirkungen auf die metabolische Aktivität der Osteoblasten feststellen.

Die Proliferationsbestimmung mittels des MTT-Tests ergibt durchweg Werte, die im Bereich der 100%-Kontrolle liegen. Es kann also gefolgert werden, dass sowohl PLGA Typ 1 als auch Typ 2 keine negative Auswirkung auf die metabolische Aktivität der Osteoblasten hat.

3.1.6. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen

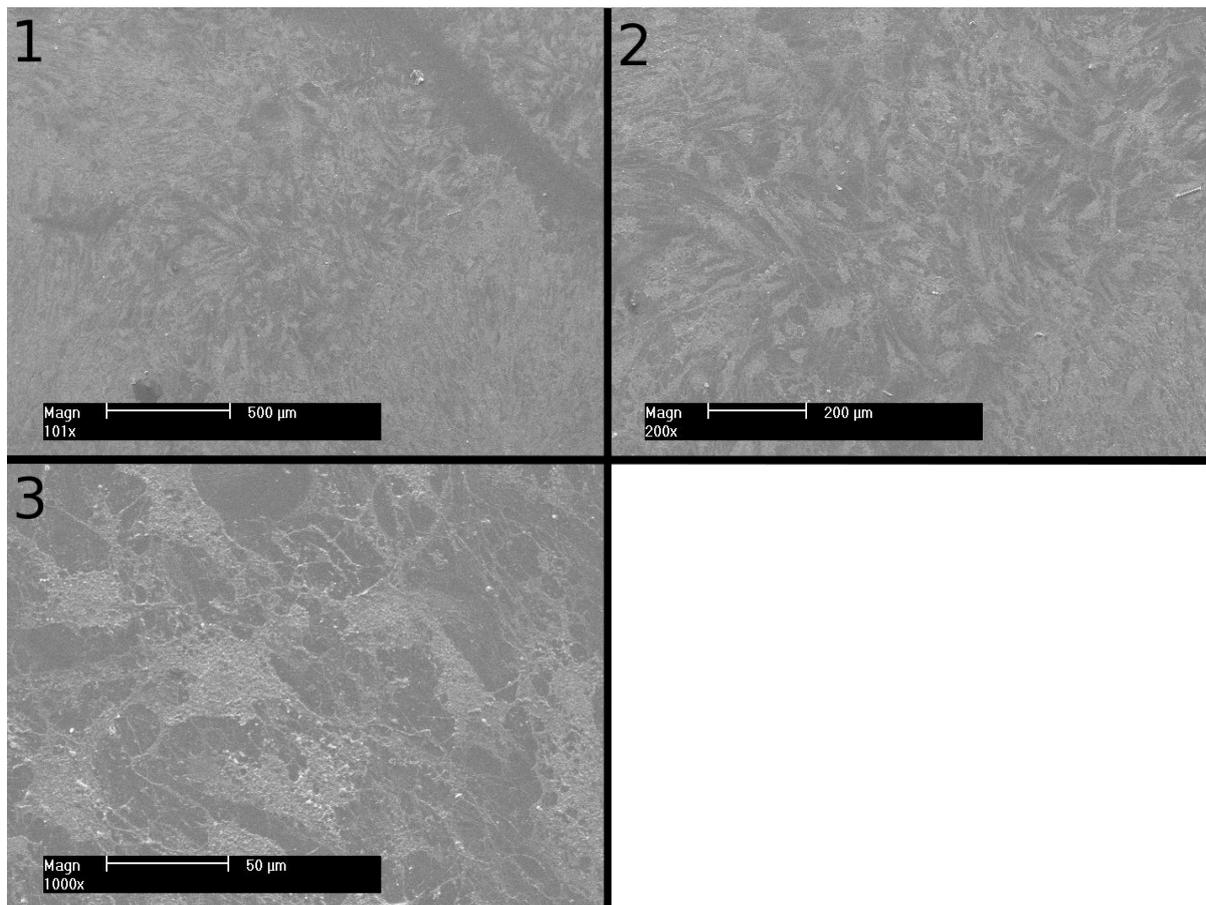


Abb. 12: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen einer 7 Tage alten Osteoblastenkultur auf Glas. Rasterelektronenmikroskop XL30CP der Firma Philips Electron Optics GmbH, Kassel. Abb. 12.1.: 101 fache Vergrößerung, Abb. 12.2.: 200 fache Vergrößerung, Abb. 12.3.: 1000 fache Vergrößerung.

Die Zellen sind netzartig ausgewachsen und haben einen dichten Zellteppich gebildet. Mit ihren vielen Fortsätzen stehen sie untereinander in Kontakt und adherieren am Untergrund.

Die Aufnahmen zeigen typische Osteoblastenkulturen wie sie aufgrund von Erfahrungswerten zu erwarten waren.

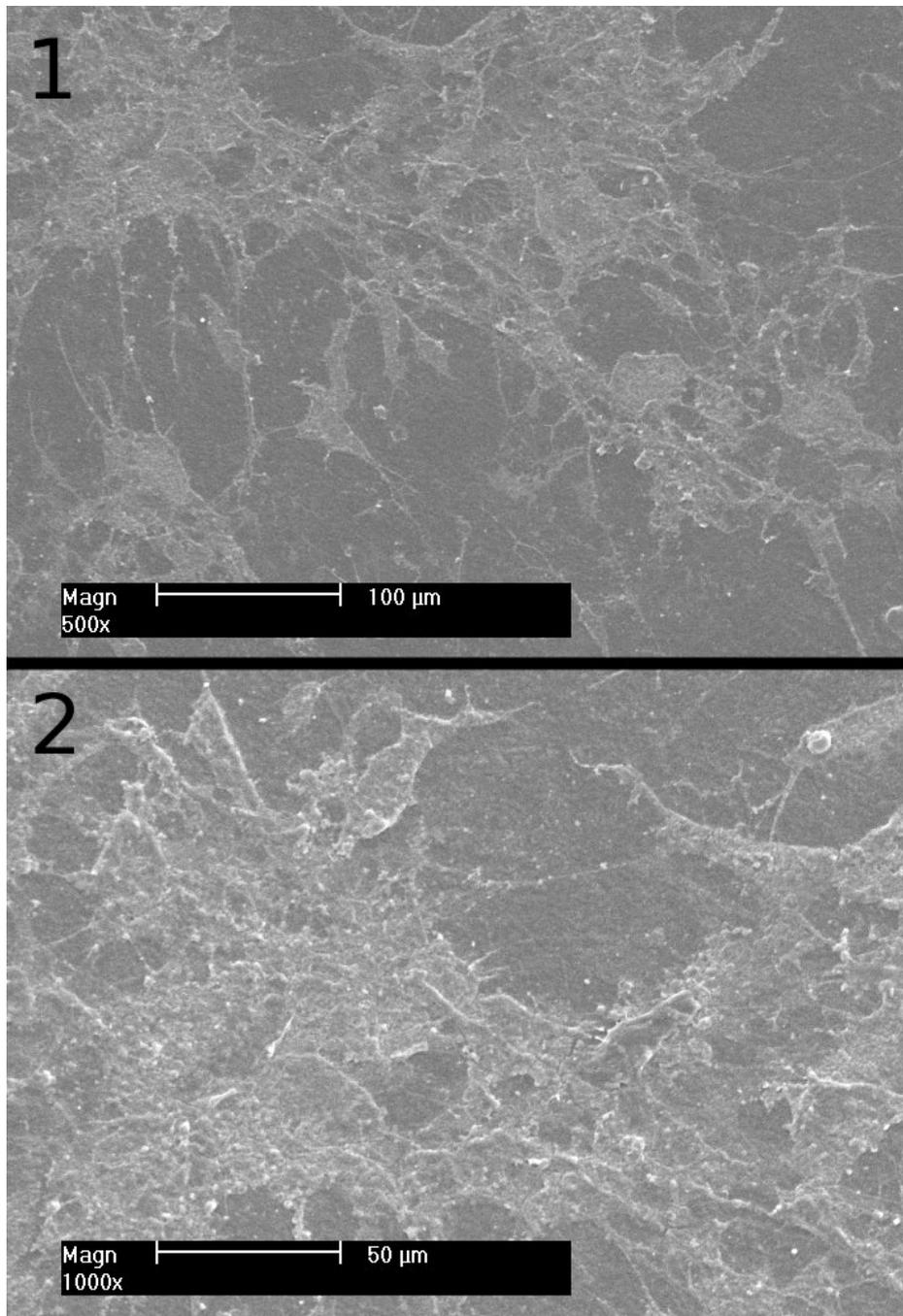


Abb. 13: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen einer 7 Tage alten Osteoblastenkultur auf PLGA-Zellträgern des Typ 1. Rasterelektronenmikroskop XL30CP der Firma Philips Electron Optics GmbH, Kassel. Abb. 13.1.: 500 fache Vergrößerung, Abb. 13.2.: 1000 fache Vergrößerung. Die Zellen bilden einen relativ dichten Zellteppich. Hinsichtlich der Morphologie lassen sich keine Unterschiede zur Positivkontrolle feststellen.

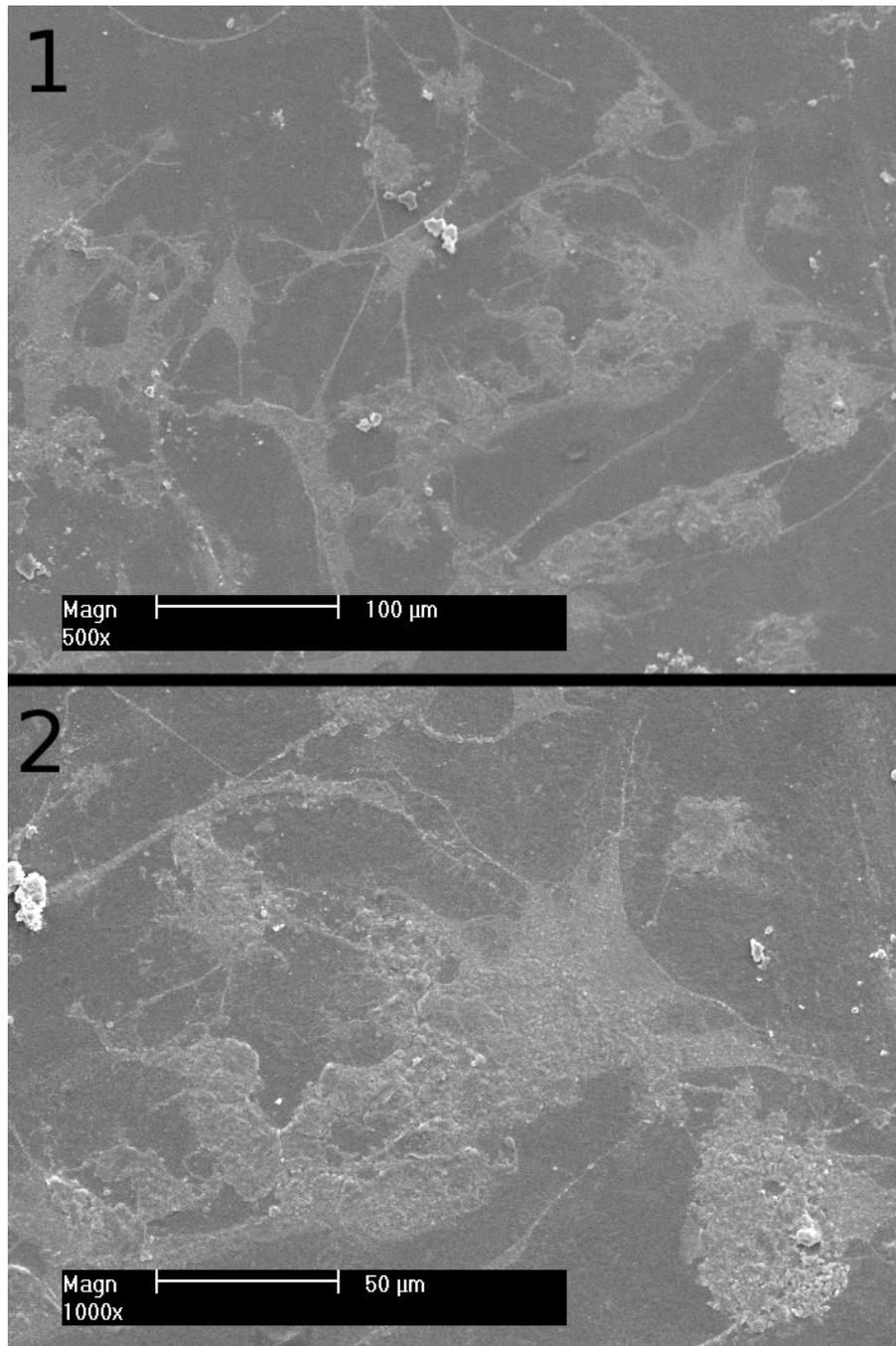


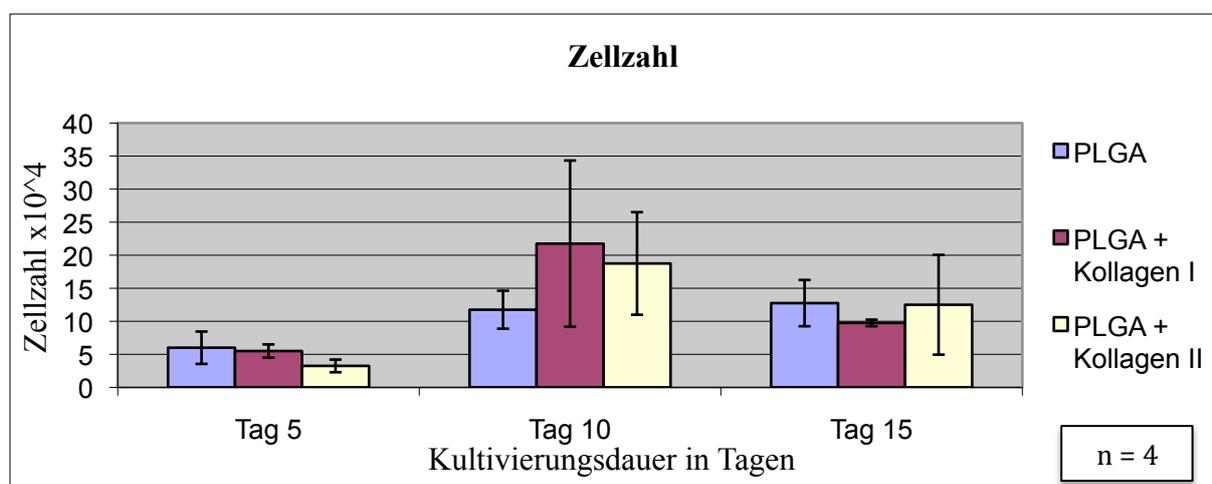
Abb. 14: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen einer 7 Tage alten Osteoblastenkultur auf PLGA-Zellträgern des Typ 2. Rasterelektronenmikroskop XL30CP der Firma Philips Electron Optics GmbH, Kassel. Abb. 14.1.: 500 fache Vergrößerung, Abb. 14.2.: 1000 fache Vergrößerung. Die Zellen haben einen relativ dichten Zellteppich gebildet. Hinsichtlich der Morphologie lässt sich erkennen, dass die Zellen weniger Ausläufer und somit auch weniger Interzellulärkontakte als auf der Positivkontrolle haben.

Die Osteoblasten bilden sowohl auf Glas als auch auf beiden PLGA-Oberflächen dichte Zellteppiche aus. Die Zellen weisen eine ausgedehnte Oberfläche auf und stehen untereinander mit diversen Ausläufern in Kontakt. Dennoch soll darauf hingewiesen werden,

dass der Eindruck entsteht, als ob die Morphologie der Osteoblasten auf Typ 1 der Morphologie der Zellen auf der Kontrolle mehr ähnelt, als die Morphologie der Osteoblasten auf Typ 2. Dies bezieht sich vor allem auf die Anzahl der Zellausläufer und der Interzellulärkontakte.

3.2. Zweite Versuchsreihe: Vergleich von Kollagen-I und Kollagen-II

3.2.1. Zellzahl

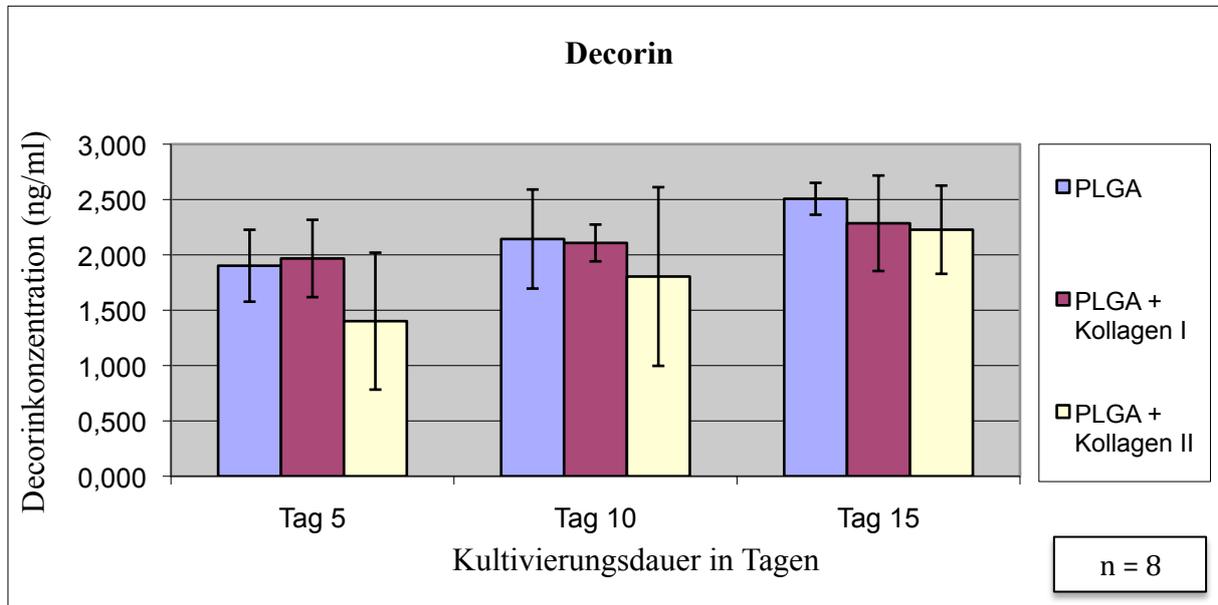


Tab. 5: Zellzahl auf PLGA-Folien, PLGA mit Kollagen-I und PLGA mit Kollagen-II beschichtet nach 5, 10 und 15 Tagen der Zellkultur. Jede Probe wurde mit 1×10^4 Zellen besiedelt. An allen Tagen wurden von jeder Beschichtung 4 Proben ausgezählt. Auf allen Proben zeigt sich ein Anstieg der Zellzahl im Vergleich zum ersten Tag.

Die Zellzahl auf unbeschichteten PLGA-Folien am fünften Tag nach Zellaussaat beträgt im Schnitt 6×10^4 , am zehnten Tag $11,75 \times 10^4$ und am fünfzehnten Tag $12,75 \times 10^4$. Somit lässt sich eine konstante Zunahme der Zellzahl erkennen. Auf mit Kollagen-I beschichteten PLGA-Folien beträgt die durchschnittliche Zellzahl am fünften Tag $5,5 \times 10^4$, am zehnten Tag $21,75 \times 10^4$ und am fünfzehnten Tag $9,75 \times 10^4$. Die maximale Zellzahl liegt am zehnten Tag nach Aussaat. Am fünfzehnten Tag ist die Zellzahl jedoch höher als am fünften Tag. Ein ähnliches Bild zeigt sich auf Kollagen-II beschichteten PLGA-Folien. Auch hier ist die maximale Zellzahl am zehnten Tag nach Zellaussaat mit $18,75 \times 10^4$ Zellen zu verzeichnen. Am fünften Tag sind es mit $3,25 \times 10^4$ Zellen deutlich weniger als am fünfzehnten Tag mit $12,25 \times 10^4$ Zellen.

3.2.2. ELISA-Tests

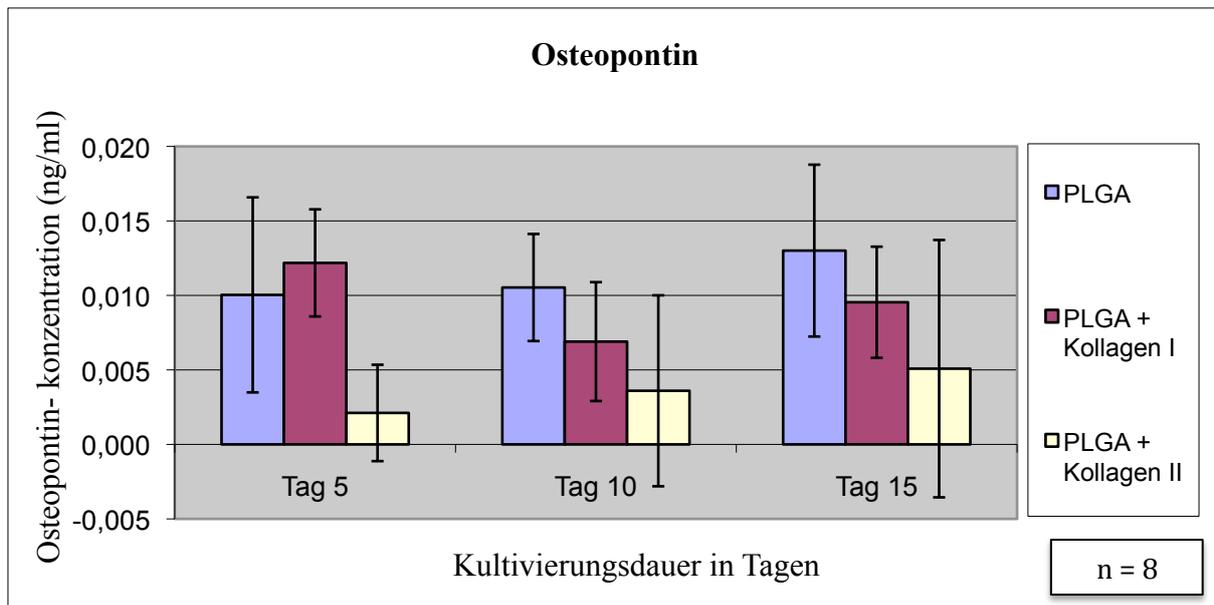
3.2.2.1. Decorin



Tab. 6: Decorinkonzentration im Nährmedium von Osteoblastenkulturen auf PLGA Filmen, PLGA mit Kollagen-I und PLGA mit Kollagen-II beschichtet nach 5, 10 und 15 Tagen der Zellkultur. Die Proben wurden mit 1×10^4 Zellen besiedelt. Jede Datenreihe stellt sich als der durchschnittliche Wert aus 8 Proben dar. In allen Proben lässt sich Decorin nachweisen. Je länger die Zellen in Kultur sind, umso höher ist die Decorinkonzentration.

Die Decorinkonzentration auf reinem PLGA steigt kontinuierlich von 1,902 ng/ml an Tag 5 über 2,143 ng/ml an Tag 10 auf 2,507 ng/ml an Tag 15 nach Zellaussaat. Sehr ähnliche Konzentrationen finden sich auf mit Kollagen-I beschichtetem PLGA. In diesem Fall steigt die Decorinkonzentration von 1,967 ng/ml an Tag 5 über 2,108 ng/ml an Tag 10 auf 2,285 ng/ml an Tag 15. Etwas niedrigere Decorinkonzentrationen, nämlich 1,401 ng/ml an Tag 5, 1,804 ng/ml an Tag 10 und 2,227 ng/ml an Tag 15, werden in den mit Kollagen-II beschichteten Proben detektiert. Im Nährmedium aller untersuchten Oberflächen steigt die Decorinkonzentration kontinuierlich an. Bei Kollagen-I beschichteten PLGA Folien und reinem PLGA sind die Konzentrationen annähernd identisch, bei Kollagen-II beschichteten Zellträgern sind sie an allen drei Tagen niedriger.

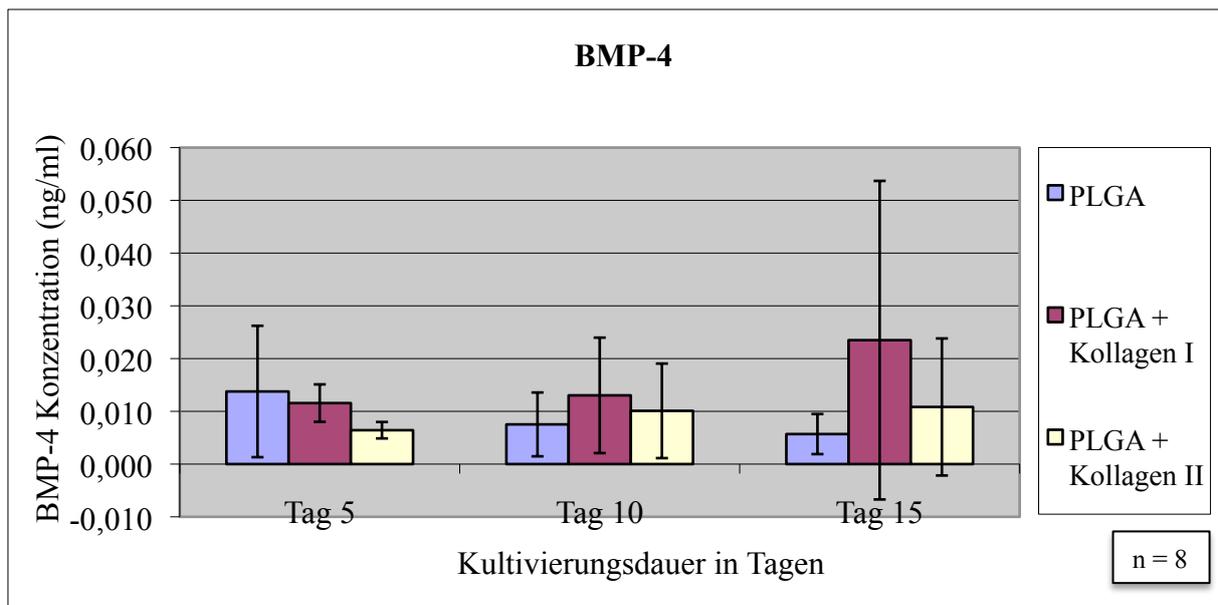
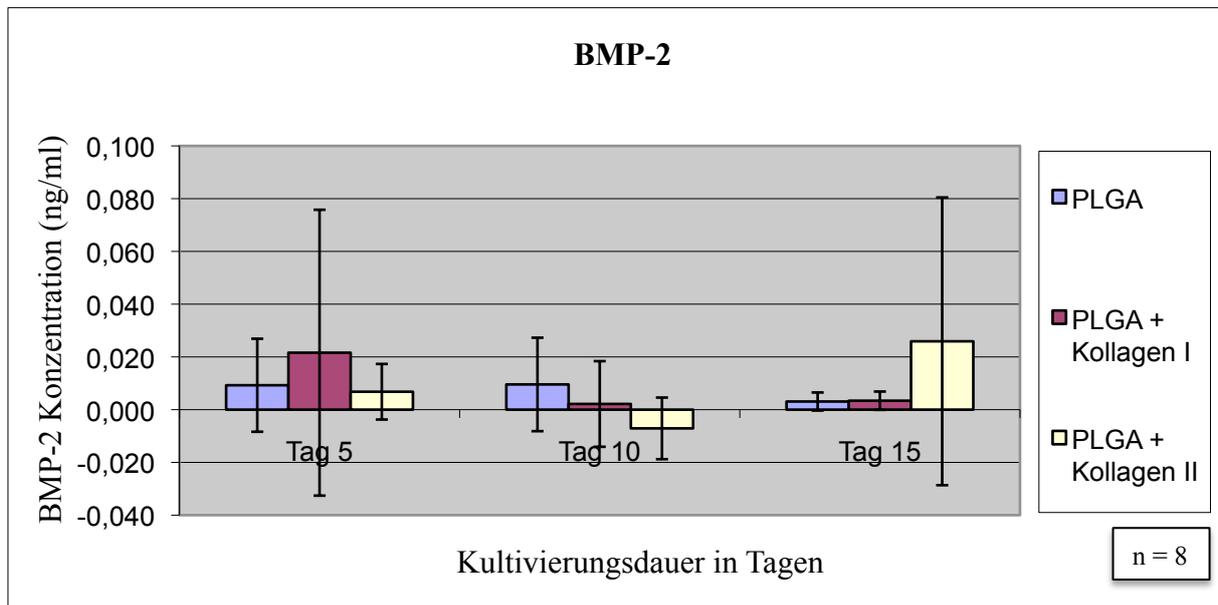
3.2.2.2. Osteopontin

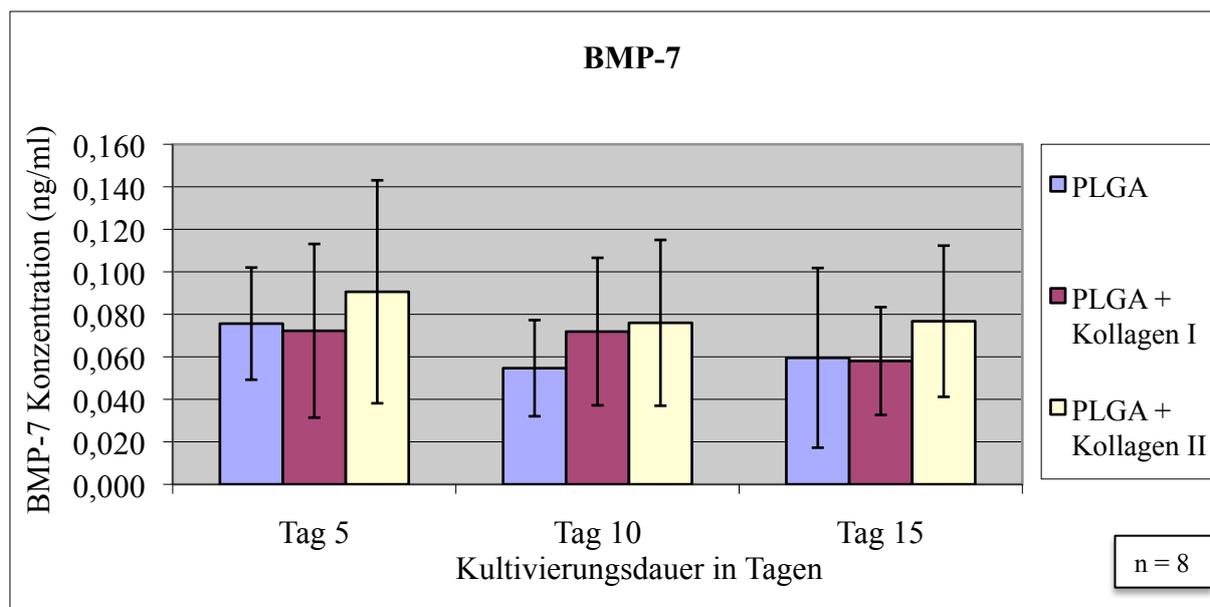


Tab. 7: Osteopontinkonzentration im Nährmedium von Osteoblastenkulturen auf PLGA Filmen, PLGA mit Kollagen-I und PLGA mit Kollagen-II beschichtet nach 5, 10 und 15 Tagen der Zellkultur. Die Proben wurden mit 1×10^4 Zellen besiedelt. Jede Datenreihe stellt sich als der durchschnittliche Wert aus 8 Proben dar.

Die Osteopontinkonzentration auf unbeschichteten PLGA Zellträgern steigt von Tag 5 mit 0,01 ng/ml, über 0,011 ng/ml an Tag 10 auf 0,013 ng/ml an Tag 15 kontinuierlich an. Auch bei den mit Kollagen-II beschichteten PLGA Folien ist eine kontinuierliche Zunahme der Osteopontinkonzentration von 0,002 ng/ml an Tag 5 auf 0,005 ng/ml an Tag 15 festzustellen. Bei Zellträgern, welche mit Kollagen-I beschichtet sind, beträgt die höchste Osteopontinkonzentration 0,012 ng/ml an Tag 5 nach Zellaussaat. An Tag 10 lassen sich 0,009 ng/ml und an Tag 15 0,01 ng/ml Osteopontin nachweisen. Auffällig ist, dass die gemessenen Osteopontinkonzentrationen auf mit Kollagen-II beschichteten Zellträgern deutlich niedriger sind als auf den anderen Zellträgern. Auf reinem PLGA sind die Konzentrationen an Osteopontin an Tag 10 und 15 am höchsten, auf mit Kollagen-I beschichtetem PLGA hingegen sind sie an Tag 5 am höchsten. Der Unterschied zwischen den beiden zuletzt genannten Proben ist nicht signifikant. Insgesamt ist die Osteopontinkonzentration auf allen Proben niedrig.

3.2.2.3. BMP-2, BMP-4 und BMP-7





Tab. 8: Konzentration von BMP-2, BMP-4 und BMP-7 im Nährmedium von Osteoblastenkulturen auf PLGA-Filmen, PLGA mit Kollagen-I und PLGA mit Kollagen-II beschichtet nach 5, 10 und 15 Tagen der Zellkultur. Jede Probe wurde mit 1×10^4 Zellen besiedelt. Jede Datenreihe stellt sich als der durchschnittliche Wert von 8 Proben dar. BMP-2 und BMP-4 können nur in sehr geringen Mengen nachgewiesen werden, wodurch auch die hohen Abweichungen innerhalb einer Datenreihe erklärt werden können. Die BMP-7 Konzentration ist um ein Mehrfaches höher als die von BMP-2 und -4.

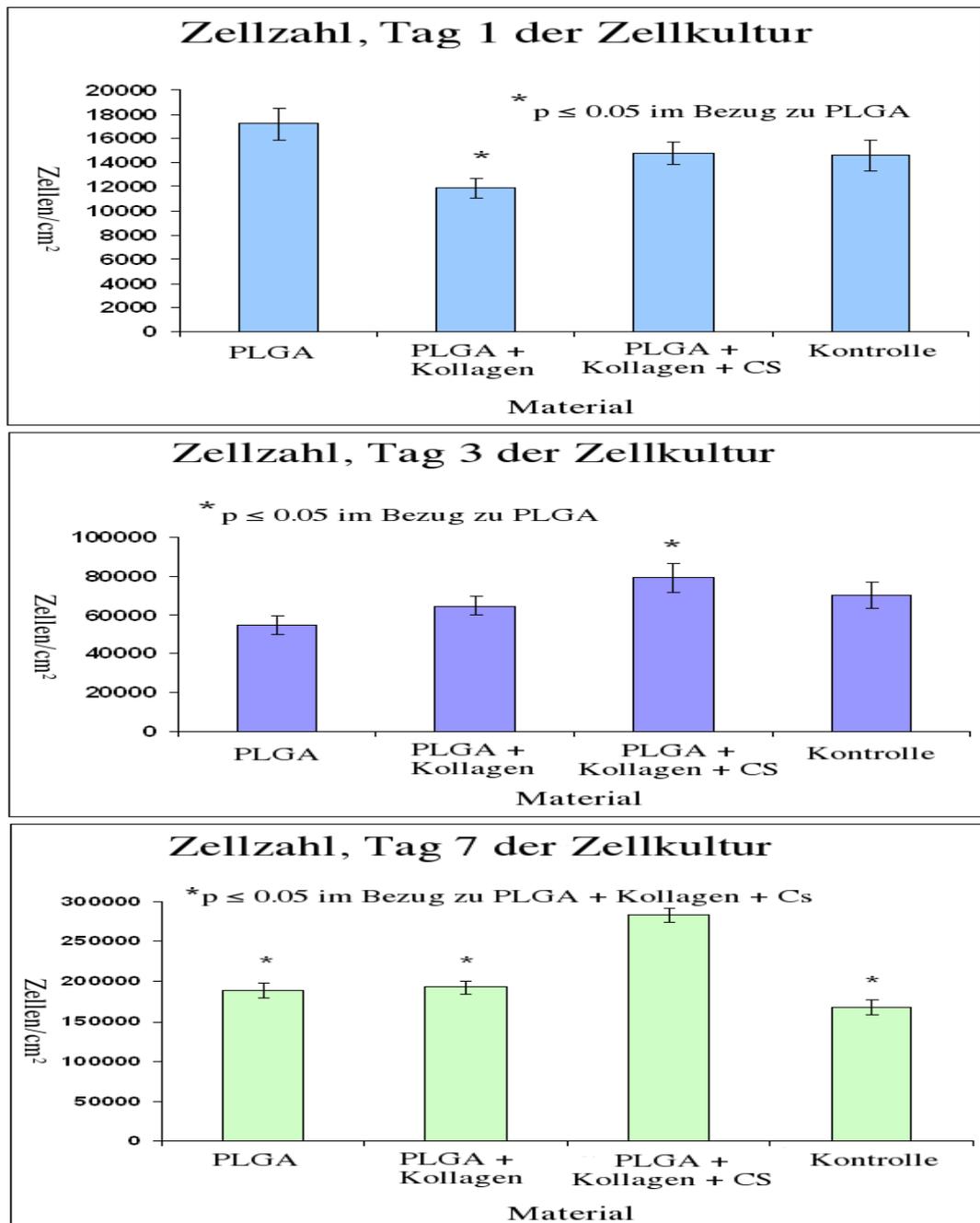
Die BMP-2 Konzentration in den untersuchten Nährmedien ist sehr gering. Auf reinem PLGA beträgt sie an Tag 5 0,014 ng/ml, an Tag 10 0,01 ng/ml und an Tag 15 0,003 ng/ml. Ähnliche Werte ergaben die Messungen für Kollagen-I Beschichtungen: 0,022 ng/ml an Tag 5, 0,002 ng/ml an Tag 10 sowie 0,003 ng/ml an Tag 15. Bei den mit Kollagen-II beschichteten Zellträger ist die BMP-2 Konzentration am 5.Tag 0,007 ng/ml und am 15. Tag 0,026 ng/ml. Dass der Wert an Tag 10 negativ ist, hängt mit dem Messverfahren zusammen. Die BMP-2 Konzentration an diesem Tag beträgt 0 ng/ml. Auch für BMP-4 lassen sich keine hohen Konzentrationen nachweisen. Die höchsten Werte werden hier auf mit Kollagen-I beschichteten Zellträgern festgestellt: am 5.Tag 0,012 ng/ml, am 10.Tag 0,013 ng/ml und am 15.Tag 0,023 ng/ml. Bei Kollagen-II Beschichtungen liegen die BMP-4 Konzentrationen bei 0,006 ng/ml an Tag 5, 0,01 ng/ml an Tag 10 und 0,011 ng/ml an Tag 15. Die BMP-4 Konzentrationen auf reinem PLGA liegen mit 0,014 ng/ml an Tag 5, 0,008 ng/ml an Tag 10 und 0,006 ng/ml an Tag 15 auf einem ähnlichen Niveau. Es können also keine Unterschiede in der Osteoblastendifferenzierung festgestellt werden. Die BMP-7 Konzentrationen sind deutlich höher als die von BMP-2 und -4. Auf reinem PLGA betragen sie am 5.Tag 0,076 ng/ml, am 10.Tag 0,055 ng/ml und am 15.Tag 0,06 ng/ml. Im Elluat der mit Kollagen-I

beschichteten Zellträger sind die Konzentrationswerte ähnlich: am 5.Tag 0,072 ng/ml, am 10.Tag 0,072 ng/ml und am 15.Tag 0,058 ng/ml. Die BMP-7 Konzentration im Elluat der mit Kollagen-II beschichteten Zellträger beträgt am 5.Tag 0,091 ng/ml, am 10.Tag 0,076 ng/ml und am 15.Tag 0,077 ng/ml. Auf allen drei Zellträgersorten sind die BMP-7 Konzentrationen somit auf einem ähnlichen Niveau.

Auffällig ist, dass die BMP-7 Konzentrationen deutlich höher sind als diejenigen für BMP-2 und -4. Die Konzentrationen im Elluat der drei verschiedenen Proben weisen keine signifikanten Unterschiede auf. Folglich können nach 15 Tagen, anhand der Bestimmung von BMP-2, -4 und -7, keine Unterschiede in der Zelldifferenzierung zwischen Kollagen-I und Kollagen-II Beschichtungen sowie reinem PLGA festgestellt werden.

3.3. Dritte Versuchsreihe: Vergleich von Kollagen-I und Kollagen-I mit Chondroitinsulfat

3.3.1. Zellzahl, Zellform und Zell-Adhäsions-Fläche



Tab. 9: Zellzahl auf PLGA-Filmen, an Tag 1, 3 und 7 der Zellkultur. PLGA mit Kollagen und Kollagen + CS beschichtet. Mikroskopiedeckgläser dienen als Kontrolle. Auf PLGA mit Kollagen und CS Beschichtung lassen sich signifikant höhere Zellzahlen feststellen.

Beschichtungen mit Kollagen-I sowie Kollagen-I/CS führen nach einem Tag nicht zu einer erhöhten Zellzahl. Die initiale Zellzahl auf Kollagen-I/CS war am ersten Tag mit ca. 31 % (± 5 %) signifikant geringer als auf reinem PLGA. Nach 3 Tagen ist jedoch eine signifikant höhere Zellzahl auf Kollagen-I/CS als auf reinem PLGA festzustellen (ca. 45 % ± 14 %). An Tag 7 ist die Zellzahl auf Kollagen-I/CS um ca. 50 % (± 5 %) höher als auf reinem PLGA, um ca. 47 % (± 4 %) höher als auf Kollagen-I und ca. 69 % (± 5 %) höher als auf der Glasskontrolle. Es ist eine signifikant höhere Zellzahl auf Kollagen-I/CS als auf Kollagen-I sowie auf reinem PLGA festzustellen. Beschichtungen nur mit Kollagen-I führen im Vergleich mit reinem PLGA nicht zu einem Anstieg der Zellzahl.

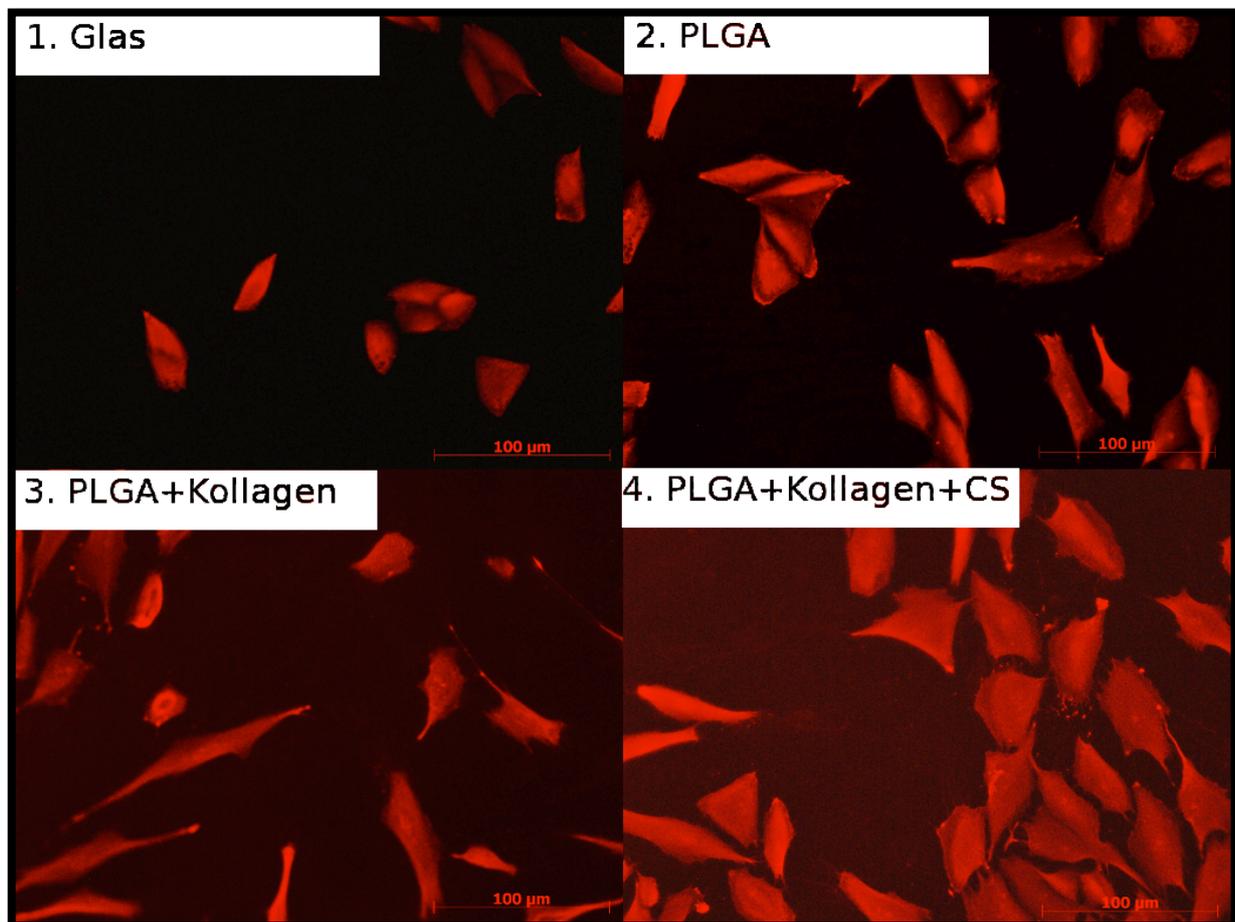
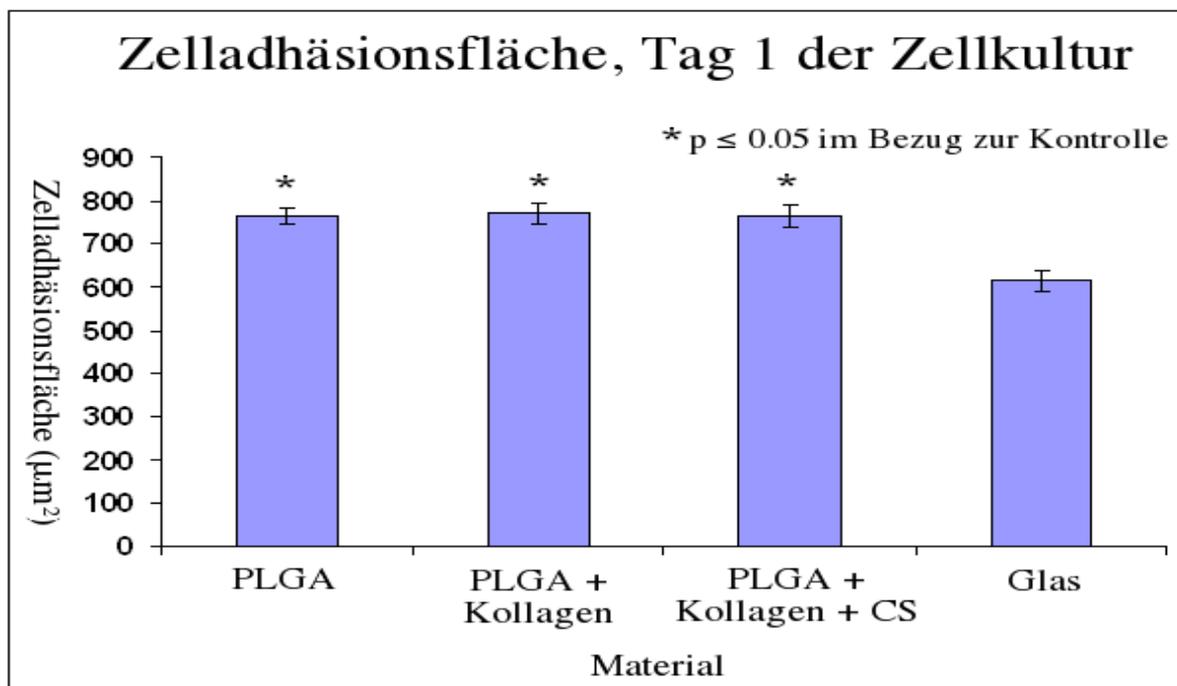


Abb. 15: Aufnahme von 1 Tag alten MG-63 Zellkulturen, gefärbt mit Texas Red C2-maleimide auf Mikroskopiedeckgläsern, PLGA-Filmen, PLGA mit Kollagen und Kollagen + CS beschichtet. Zellen auf PLGA und beschichtetem PLGA zeigen eine ausgedehntere Oberfläche mit mehr Ausläufern. Axioplan2 Mikroskop, AxioCam MRc5 Digitalkamera (ZEISS, Deutschland). Die rote Markierung entspricht 100 µm.

Zellen, die auf verschiedenen präparierten Zellträgern angezchtet werden, zeigen eine unterschiedliche Morphologie. Zellen auf PLGA sowie die Zellen auf beiden Beschichtungen haben eine ausgedehntere Oberfläche als Zellen, die auf Glas kultiviert werden. Zellen, welche auf Kollagen-I beschichtetem PLGA beziehungsweise mit Kollagen-I in Verbindung mit CS beschichtetem PLGA kultiviert werden, bilden mehr Ausläufer als Zellen, die auf unbehandeltem PLGA kultiviert wurden. Hinzu kommt, dass Zellen auf Kollagen-I + CS Beschichtungen flach und polygonal erscheinen, während sie auf reinem PLGA sowie auf PLGA mit Kollagen-I Beschichtung eher spindelförmig sind.



Tab. 10: Zelladhäsionsfläche an Tag 1 der Zellkultur auf Mikroskopiedeckgläsern, PLGA-Filmen, PLGA mit Kollagen und Kollagen + CS beschichtet.

In Übereinstimmung mit den Beobachtungen der Zellmorphologie ergibt die Berechnung der Zell-Adhäsions-Fläche nach einem Tag größere Werte für Zellen auf PLGA, PLGA beschichtet mit Kollagen-I und Kollagen-I + CS als für Zellen auf Glaskontrollen. Es kann somit ebenfalls gezeigt werden, dass weder Kollagen-I noch Kollagen-I in Verbindung mit CS die Zell-Adhäsions-Fläche in Vergleich zu reinem PLGA beeinflussen. Die Auswertung der Zell-Adhäsions-Fläche nach 3 und 7 Tagen ist aufgrund der vielen interzellulären Kontakte sowie einem Anstieg der Zellpopulationsdichte nicht möglich, da sich die genauen Zellgrenzen nicht mehr bestimmen lassen.

3.3.2. Verteilung von Integrin, Vinculin und Aktin

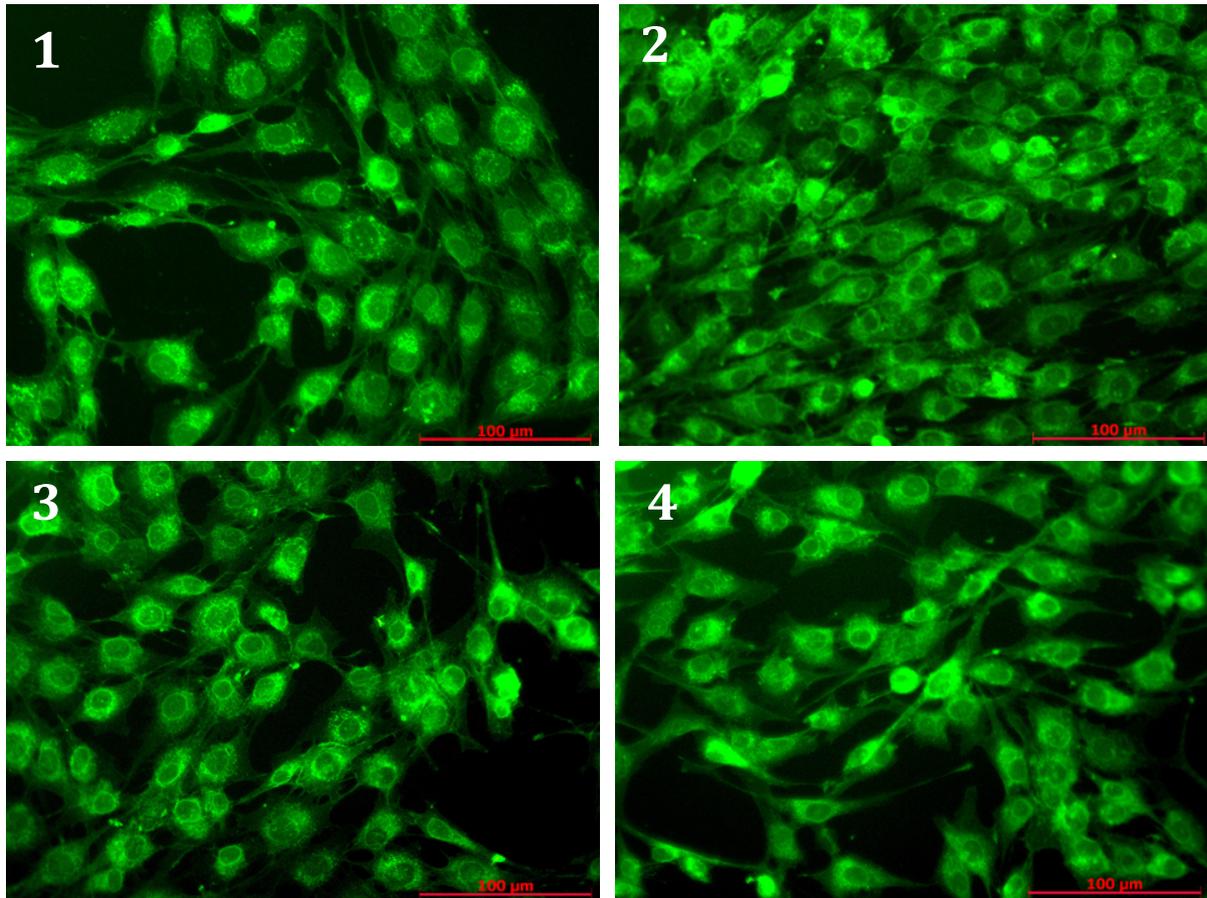


Abb. 16: Integrinfärbung, Immunfluoreszenzfärbung von Integrin in humanen osteoblastenähnlichen MG-63 Zellen aus einer drei Tage alten Zellkultur. Axioplan2 Mikroskop, AxioCam MRc5 Digitalkamera (ZEISS, Deutschland). Die rote Markierung entspricht 100 μm . Abb. 16.1.: Zellen auf Glas, Abb. 16.2.: Zellen auf PLGA, Abb. 16.3.: Zellen auf PLGA + Kollagen-I, Abb. 16.4.: Zellen auf PLGA + Kollagen-I + CS.

Mittels konventioneller Immunfluoreszenzmikroskopie kann gezeigt werden, dass Integrinadhensionsrezeptoren vorwiegend in der Mitte der Zellen lokalisiert sind, wo sie punktartige Strukturen ausbilden. Besonders helle und große Strukturen zeigen sich in Zellen, welche auf Kollagen-I/CS angezüchtet wurden.

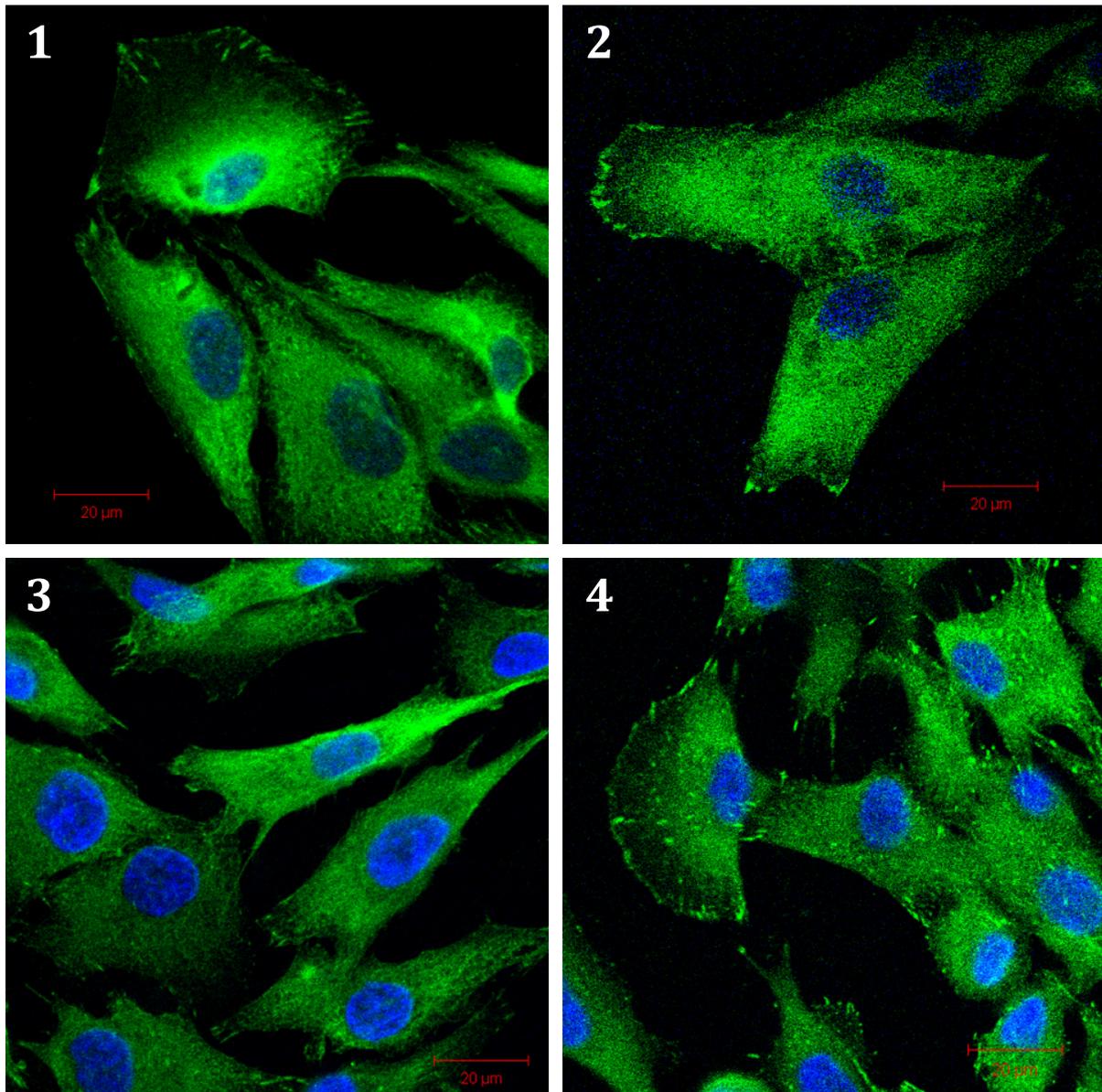


Abb. 17: Vinculinfärbung, Immunfluoreszenzfärbung von Vinculin in humanen osteoblastenähnlichen MG-63 Zellen aus einer drei Tagen alten Zellkultur. Konfokales Laserscanmikroskop, Carl ZEISS Microimaging LSM 510. Abb. 17.1.: Zellen auf Glas, Abb.17.2.: Zellen auf PLGA, Abb. 17.3.: Zellen auf PLGA + Kollagen-I, Abb. 17.4.: Zellen auf PLGA + Kollagen-I + CS. Die rote Markierung entspricht 20 μm . Zellen kultiviert auf Kollagen-I + CS Beschichtungen zeigen die ausgedehnteste Zellmorphologie sowie die meisten und größten Adhäsionskomplexe an den Zellecken und der Innenseite der Zellmembran.

Untersuchungen mittels konfokaler Laserscanmikroskopie machen deutlich, dass Vinculin, das heißt strukturelle Proteine fokaler Adhäsionsplaques in Verbindung mit Integrin, streifenartige fokale Adhäsionskomplexe bilden. Diese Komplexe sind besonders häufig in den Ecken der Zellen aber auch im Zellzentrum zu finden. Besonders ausgeprägt sind sie auf Zellen, kultiviert auf Kollagen-I/CS – Beschichtungen. Die zuletzt erwähnten Zellen zeigen

mehr und größere vinculinhaltige Adhäsionskomplexe im Vergleich zu Zellen auf den anderen Beschichtungen.

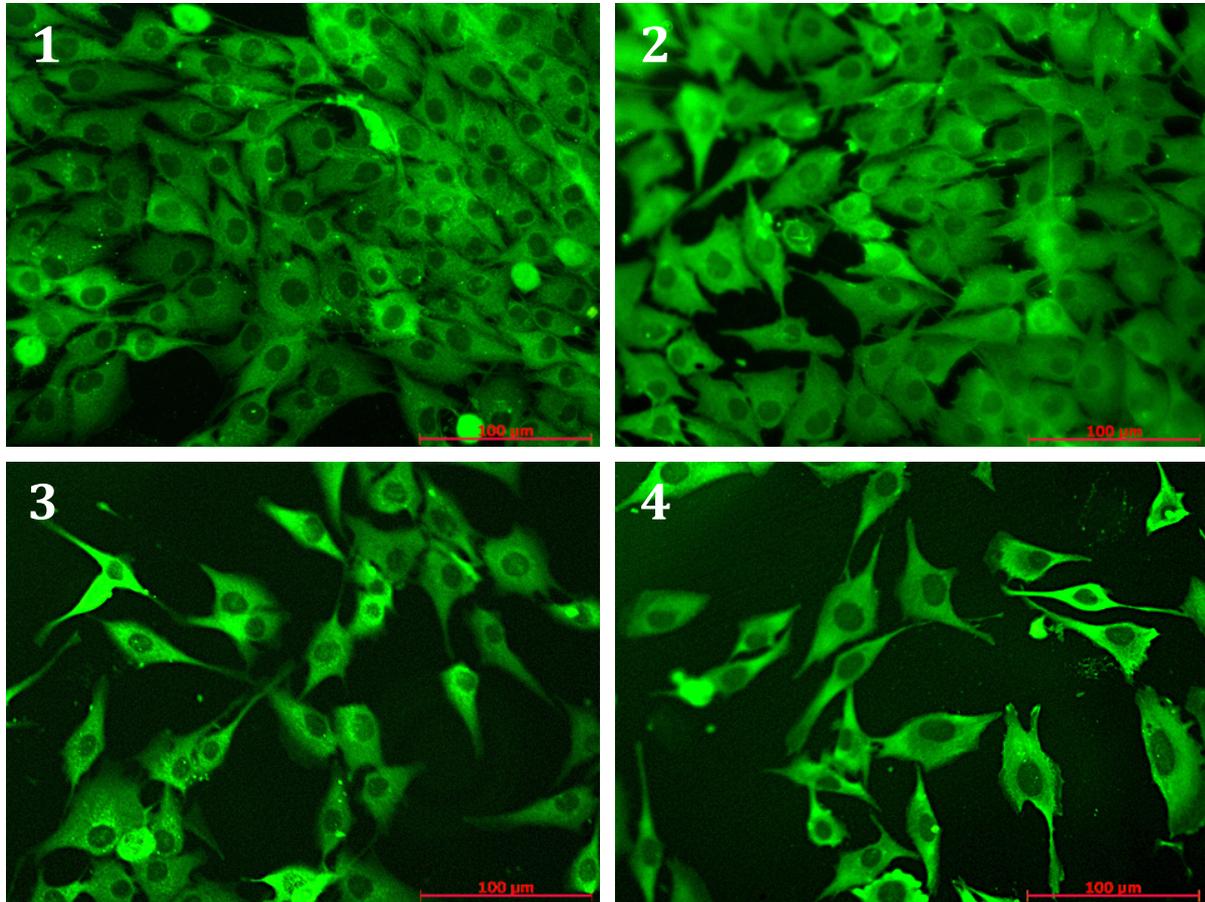


Abb. 18: Aktinfärbung, Immunfluoreszenzfärbung von Aktin in humanen osteoblastenähnlichen MG-63 Zellen aus einer drei Tage alten Zellkultur. Axioplan2 Mikroskop, AxioCam MRc5 Digitalkamera (ZEISS, Deutschland). Die rote Markierung entspricht 100 µm. Abb. 18.1: Zellen auf Glas, Abb. 18.2.: Zellen auf PLGA, Abb. 18.3.: Zellen auf PLGA + Kollagen-I, Abb. 18.4.: Zellen auf PLGA + Kollagen-I + CS.

Das Zytoskelettprotein Aktin ist im gesamten Zytoplasma gleichmäßig verteilt. Hier bildet es Filamente in Verbindung mit einer körnigen Struktur. Sowohl auf Glas als auch auf reinem PLGA sind die Filamente fein. Auf Glas sind diese Filamente parallel ausgerichtet und verlaufen zwischen den gegenüberliegenden Zellecken, während sie auf reinem PLGA eher ein gitterartiges Netzwerk in Kombination mit körnigen Strukturen ausbilden. Auf Kollagen-I formen die Aktinfilamente relativ kurze, aber dicke und hell gefärbte Bündel. Ein ähnliches Muster zeigt sich auf Kollagen-I/CS, allerdings sind die Aktinfilamentbündel hier kürzer und mit einer körnigen Struktur kombiniert.

4. Diskussion

PLGA ist ein von der U.S. Food and Drug Administration überprüfetes Polymer aus Laktose und Glucose und findet bereits vielfältigen Einsatz in der Medizin. In Wasser unterliegt PLGA einer Hydrolyse seiner Esterverbindungen zu Laktosesäure- und Glucosesäuremolekülen. Diese Moleküle können im menschlichen Körper innerhalb des Citratzyklus verstoffwechselt werden (Houchin und Topp, 2008). Somit ist es theoretisch ein geeigneter Zellträger in der Knochengeweberekonstruktion, wenn das Ziel darin liegt, einen Ersatzknochen, beziehungsweise ein Ersatzgelenk nur aus körpereigenem Gewebe herzustellen. Die in dieser Arbeit im Umgang mit PLGA gewonnenen Erkenntnisse zeigen, dass PLGA in Kontakt mit Wasser dazu neigt, sich zu verformen (siehe 2.3.1. Herstellung von PLGA-Filmen). Da die Formstabilität von Zellträgern in der Knochengeweberekonstruktion jedoch von entscheidender Bedeutung ist, muss noch ein Weg gefunden werden, dieses Problem zu umgehen bzw. eine Lösung desgleichen aufzuzeigen. Ebenso wichtig ist die Biokompatibilität der Zellträger. In dieser Studie kann gezeigt werden, dass PLGA nicht zytotoxisch auf humane Osteoblasten wirkt. Auf keiner der beiden untersuchten PLGA-Sorten lassen sich nach einer FDA/PI Färbung rote Zellen nachweisen (Abb. 10 und 11). Rotgefärbte Zellen wären ein Nachweis für Zellen mit defekter Plasmamembran, also für nekrotische Zellen. Auf den untersuchten Proben lassen sich ausschließlich grün gefärbte, vitale Zellen finden. Außerdem kann anhand der FDA/PI Färbung kein Unterschiede hinsichtlich der Zytotoxizität der beiden PLGA Sorten festgestellt werden. Dasselbe Ergebnis liefert der LDH-Test. Auf keiner Probe lassen sich deutlich erhöhte LDH Konzentrationen im Nährmedium nachweisen, was ein Hinweis auf devitale Zellen wäre (Tab. 1). Auch die labordiagnostische Markierung proliferierender Zellen mittels des BrdU-ELISAs (Tab.2) zeigt die gute Biokompatibilität von PLGA. Osteoblasten auf PLGA der Sorte 8531 (Typ 1) zeigen eine bessere Proliferation als Osteoblasten auf PLGA 8523 (Typ 2). Untermauert werden diese Ergebnisse durch den Nachweis metabolisch aktiver Zellen mittels des MTT-Tests (Tab. 4). Die Proliferationsbestimmung ergibt für beide PLGA-Sorten Werte, die im Bereich der 100% Kontrolle liegen. Demzufolge hat PLGA keinen negativen Einfluss auf die Osteoblastenproliferation. Kritisch anzumerken ist die große Streuung der Ergebnisse des WST-Tests (Tab. 3). Die Ergebnisse von PLGA Typ 1 liegen zwischen 24 % und 75 %. Bei der Typ 2 ist die Streuung sogar noch größer. Hier liegen die gemessenen Werte zwischen 66 % und 208 %. Auf Grund der Ergebnisse der anderen Tests und der Ergebnisse der

Vorversuche lassen sich keine logischen Schlussfolgerungen aus dem Ergebnis des WST-Tests ziehen. Vielmehr ist anzunehmen, dass es während des Versuchsablaufs zu Fehlern, beispielsweise beim Pipettieren, gekommen ist. Aus diesem Grund werden die Daten des WST-Tests vernachlässigt. Rasterelektromikroskopische Aufnahmen von Osteoblastenkulturen bestätigen die bereits beschriebenen Ergebnisse. Die Osteoblasten bilden sowohl auf Glas (dient aufgrund von Erfahrungswerten als positiv Kontrolle) als auch auf beiden PLGA-Oberflächen dichte Zellteppiche aus. Die Zellen weisen eine ausgedehnte Oberfläche auf und stehen untereinander mit diversen Ausläufern in Kontakt. Dies alles deutet auf einen Untergrund hin, der die Zelladhäsion begünstigt. Das für alle weiteren Versuche mit PLGA Typ 1 gearbeitet wurde, liegt an den besseren Ergebnissen beim BrdU-Test sowie an der Auswertung der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen. Aufgrund der gewonnenen Ergebnisse lässt sich resümieren, dass keine der beiden PLGA-Sorten zytotoxisch ist und negative Auswirkungen auf die Zellproliferation hat. Dies war wegen der weitverbreiteten Anwendung von PLGA in der Medizin auch so zu erwarten. Des Weiteren lassen sich keine gravierenden Unterschiede zwischen der PLGA Typ 1 und 2 bezüglich Biokompatibilität und Zytotoxizität feststellen. Die Viskosität, der Unterschied zwischen den beiden Sorten, hat demzufolge keinen Einfluss auf die Biokompatibilität. Vermutlich gilt Gleiches für die das Verhältnis von L-Lactid zu Glykolid. Genau sagen lässt sich das allerdings nur durch eine Wiederholung der Tests mit anderen PLGA-Sorten. PLGA scheint als Zellträgermaterial im Bereich der Knochengeweberekonstruktion in Frage zu kommen. Weitere Überlegungen auf diesem Gebiet könnten in die Richtung führen, herauszufinden, wie schnell sich PLGA auflöst und wie schnell Osteoblasten Knochen auf PLGA-Zellträgern in vivo produzieren können, sodass sich ein Gleichgewicht im Abbau des Zellträgermaterials und Aufbau des Knochens einstellt. Hierzu ist es notwendig, die Oberflächen der Zellträger so zu modifizieren, dass Osteoblastenadhäsion, -proliferation und -differenzierung optimal gefördert werden (Goldstein et al. 1999; Pamula et al. 2009). Eine Möglichkeit, dies zu erreichen, besteht im Versuch der Imitation der EZM von Knochen, zum Beispiel durch Kollagenbeschichtung der Zellträger. In mehreren Publikationen konnte gezeigt werden, dass Kollagen Bindungsstellen für Osteoprogenitorzellen enthält und dass es die Proliferation, Adhäsion und Ausbreitung von Osteoblasten positiv beeinflusst (Douglas et al. 2007; Geisler et al. 2000). In meiner Studie jedoch konnte der Vergleich von Kollagen I - und Kollagen II - Beschichtungen mit unbeschichtetem PLGA keinen positiven Einfluss von Kollagen auf die Osteoblastenproliferation und Differenzierung belegen. Es lassen sich sowohl auf reinem PLGA, als auch auf mit Kollagen I und Kollagen II beschichtetem PLGA eine Zunahme der

Zellzahl nach 5, 10 und 15 Tagen der Zellkultur feststellen. Die Osteoblastenproliferation auf reinem PLGA ist dabei aber auf einem ähnlichen Niveau, wie die bei den Kollagen beschichteten PLGA Zellträgern (Tab. 5).

Die osteoblastäre Differenzierung kann in drei Stadien eingeteilt werden. Die erste Phase ist die Proliferation, die zweite umfasst die Synthese der extrazellulär Matrix und Differenzierung zu reifen Osteoblasten und die dritte ist die Mineralisation. Die Proliferationsphase ist durch die Produktion von Kollagen I charakterisiert. Der Nachweis von Decorin in Osteoblastenkulturen lässt auf eine abklingende Proliferationsphase sowie auf bereits begonnene Produktion von EZM schließen. Die Zellen befinden sich in der Frühphase der osteogenen Differenzierung. Ein Nachweis von BMP und Osteopontin zeigt in der Regel osteogene Differenzierung oder begonnene Mineralisierung der EZM an. Osteopontin legt ein biphasisches Expressionsmuster an den Tag. Einem ersten Expressionsgipfel in der Frühphase der Osteoblastendifferenzierung, in der EZM sezerniert wird, folgt ein zweiter Gipfel in der Spätphase der Differenzierung, in der es zur Mineralisation der EZM kommt (McKee und Nanci, 1995; Zohar et al. 1998). In meiner Studie konnten relativ hohe Decorinkonzentrationen nachgewiesen werden (Tab.6), sodass sich die Zellen während des beobachteten Zeitfensters vermutlich noch in einer frühen Phase der osteogenen Differenzierung befinden und noch dabei sind, Komponenten der EZM zu produzieren. Gestützt wird diese Annahme durch die sehr niedrigen nachweisbaren Osteopontinkonzentrationen (Tab.7), welche ebenfalls darauf hindeuten, dass die Osteoblasten noch nicht gänzlich ausdifferenziert sind und noch keine Mineralisation der EZM stattfindet. Die teilweise hohen Schwankungen der Osteopontinkonzentration innerhalb einer Gruppe lassen sich durch die geringen detektierbaren Osteopontinmengen erklären, da schon kleine Abweichungen der Konzentration eine Verdopplung des Werts bedeuten können.

Ähnlich wie bei den Beobachtungen zur Osteoblastenproliferation macht es auch für die Osteoblastendifferenzierung keinen Unterschied, ob die Zellen auf mit Kollagen beschichteten Zellträgern oder auf reinem PLGA kultiviert werden. Zu erwähnen ist, dass sowohl die Decorinkonzentration als auch die Osteopontinkonzentration auf Kollagen II Beschichtungen niedriger sind als auf Kollagen I Beschichtungen und reinem PLGA. Da die Decorinkonzentrationen auf Kollagen II deutlich höher sind als die Osteopontinkonzentrationen, können die gleichen Rückschlüsse auf den Differenzierungsgrad der Osteoblasten gezogen werden. Auch die Bestimmung von BMP-2, -4 und -7 (Tab. 8) zeigt

keine Unterschiede in der Zelldifferenzierung zwischen Kollagen-I und Kollagen-II Beschichtungen sowie reinem PLGA.

Eventuell ist ein längerer Beobachtungszeitraum nötig, um Unterschiede in der Differenzierung feststellen zu können. Vor allem wäre es interessant, zu sehen, ob die Differenzierung bei Osteoblasten auf Kollagen II Beschichtungen auf der einen Seite und Osteoblasten auf Kollagen I Beschichtungen, beziehungsweise reinem PLGA auf der anderen Seite, bei einer längeren Kultivierungszeit als 15 Tagen, in gleicher Geschwindigkeit verläuft, da es schon nach 15-tägiger Kultivierung Unterschiede in der Konzentration osteogener Differenzierungsmarker gibt.

In der Literatur ist zu lesen, dass Kollagenbeschichtungen auf Polymeroberflächen und Zellträgern die Ausbreitung von Zellen begünstigen (Hea et al. 2005; Keresztes et al. 2006; Zuwei et al. 2005). Allerdings kann in meiner Studie nicht gezeigt werden, dass eine Kollagen-I-Beschichtung im Vergleich zu reinem PLGA die Zell-Adhäsions-Fläche beeinflusst (Tab. 10). Dahingegen können viele Zellausläufer, ein Indikator für gute Adhäsion, auf PLGA mit Kollagen-I und Kollagen-I/CS beschichtet, nachgewiesen werden (Abb. 15). Osteoblasten auf Kollagen-I/CS Beschichtungen sind flach und polygonal, während sie auf reinem PLGA sowie auf PLGA mit Kollagen-I Beschichtung eher spindelförmig sind. Dies könnte der Tatsache geschuldet sein, dass Kollagenfibrillen in kombinierten Beschichtungen aus Kollagen-I und CS dünner, kürzer und zufälliger verteilt sind als Kollagenfibrillen in reinen Kollagen-I Beschichtungen, was bereits in anderen Arbeiten gezeigt wurde (Douglas et al. 2007). Es ist durchaus vorstellbar, dass solche unterschiedlichen Materialoberflächen einen Einfluss auf die Zellmorphologie haben. Zum Beispiel könnten relativ dicke Kollagenfibrillen Zellen dazu bringen, an ihnen entlang zu wachsen und sich somit parallel zu ihnen auszurichten. Folglich lassen die Ergebnisse den Schluss zu, dass ein Vergleich der Zell-Adhäsions-Fläche parallel zu einer Untersuchung der Zellmorphologie durchgeführt werden sollte, um die Proliferation und Differenzierung von Zellen zu untersuchen.

Kollagen-I in Kombination mit CS (Kollagen-I/CS) begünstigt die Proliferation von MG-63 Zellen nach 3 und 7 Tagen nach Zellaussaat im Vergleich zu den anderen Materialien (Tab. 9). Es konnte schon in früheren Versuchen gezeigt werden, dass Glykosaminoglykane als Bestandteile von Zellträgern, eingesetzt auf dem Gebiet der Geweberekonstruktion, einen positiven Effekt auf die Osteoblastenproliferation haben (Benoit und Anseth, 2005; Ekaputra, 2008). Außerdem konnte eine Verbesserung der Proliferation bei Fibroblasten und Chondrozyten durch CS als Bestandteil von Zellträgern in der Geweberekonstruktion

nachgewiesen werden (Zhong et al. 2005). Nach meinem Wissensstand ist dies allerdings die erste Studie, die einen positiven Effekt von CS als Biomaterialkomponente auf die Proliferation osteoblastenähnlicher Zellen nachweist. Dieser Effekt könnte sich auf an CS bindende Wachstumsfaktoren, welche sich im Nährmedium befinden oder von den Osteoblasten selbst produziert werden, zurückführen lassen. Dies wiederum erhöht die biologische Verfügbarkeit der Wachstumsfaktoren für Osteoblasten und steigert somit die Bioaktivität. Schon in früheren Versuchen konnte gezeigt werden, dass CS in der Lage ist, Wachstumsfaktoren zu binden (Asade et al. 2009) und es wurde spekuliert, dass CS einen stabilisierenden Effekt auf Wachstumsfaktoren haben könnte (Mi et al. 2006).

Bei Kollagen-I/CS Beschichtungen können ausgeprägtere vinculinhaltige fokale Adhäsionskomplexe als auf den anderen Oberflächen nachgewiesen werden (Abb. 17), was auf eine verbesserte Zelladhäsion deutet. Bereits in früheren Arbeiten konnte bei CS in Kollagenbeschichtungen auf Titan ein Anstieg der fokalen Adhäsionskomplexe beschrieben werden (Bierbaum et al. 2006; Douglas et al. 2007). Dieses Phänomen könnte auf eine Bindung von Kalziumionen durch CS auf der Oberfläche zurückzuführen sein, da diese für fokale Adhäsionskomplexe nötig sind. Integrine mit β 1-Ketten repräsentieren eine große Gruppe von Zelladhäsionsmolekülen, welche Rezeptoren für Kollagen, Laminin und Fibronectin besitzen. Außerdem können β 1-Integrine Chondroitinsulfatproteoglykane erkennen und mit diesen interagieren, sodass sie die Zelladhäsion induzieren und diese auch stabilisieren. In dieser Studie formen die Integrine punktartige Strukturen im Zentrum der Zellen (Abb. 16), während Vinculin strichförmige fokale Adhäsionskomplexe hauptsächlich in der Peripherie (auf Glas, PLGA, oder Kollagen-I) oder in der Peripherie und im Zentrum (Kollagen/CS) der Zellen ausbildet (Abb. 17). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass nicht alle Integrine Vinculin zur Signaltransduktion nutzen und dass außerdem Vinculin mit anderen Adhäsionsrezeptoren als Integrinrezeptoren interagieren könnte.

In den osteoblastenähnlichen Zellen stellt sich das Aktin in kurzen feinen Filamenten dar, anders als in zum Beispiel glatten Muskelzellen von Gefäßen oder Endothelzellen, wo es dicke lange Fäden ausbildet die von einer Seite der Zelle zur andern verlaufen (Grausova et al. 2009). Interessanterweise stehen bei Osteoblasten schwach ausgeprägte Aktinfilamente in Zusammenhang mit Zelldifferenzierung. Die Tatsache, dass sich Aktinfilamente auf Kollagen und Kollagen/CS-Beschichtungen in dieser Studie weniger definiert darstellen als auf reinen PLGA-Filmen, kann also mit einer fortgeschritteneren osteoblastenspezifischen Differenzierung zusammenhängen.

5. Zusammenfassung

Bei beiden hier getesteten PLGA-Sorten kann gezeigt werden, dass sie absolut biokompatibel sind und somit keine zytotoxischen Auswirkung auf humane Osteoblasten haben. Des Weiteren zeigen humane Osteoblasten auf unbehandelten PLGA-Folien rasterelektronenmikroskopisch viele Zellausläufer und Interzellulärkontakte, was ein Zeichen für gute Zelladhäsion ist.

Der Vergleich zwischen Zellträgern aus reinem PLGA und solchen, die mit Kollagen I, beziehungsweise mit Kollagen II beschichteten worden sind, zeigt keine Unterschiede hinsichtlich der Osteoblastenproliferation und Osteoblastendifferenzierung. Eine deutliche Zunahme der Zellzahl im Vergleich zum Tag der Zellaussaat ist auf allen drei Zellträgersorten nach 5, 10 und 15 Tagen nachweisbar. Des Weiteren können im Nährmedium der Osteoblasten aller drei Proben die osteogenen Differenzierungsmarker Decorin und Osteopontin nachgewiesen werden. Im Nährmedium der Osteoblasten, welche auf mit Kollagen II beschichteten PLGA Zellträgern kultiviert wurden, allerdings in geringerer Konzentration als im Nährmedium von Osteoblasten kultiviert auf mit Kollagen I beschichteten Zellträgern sowie bei reinem PLGA. Hier liegen die Konzentrationen auf einem Niveau.

Eine Beschichtung aus Chondroitinsulfat in Kombination mit Kollagen I auf PLGA fördert die Proliferation von humanen osteoblastenähnlichen MG-63 Zellen. Beschichtungen mit reinem Kollagen führen dahingegen nicht zu einem Anstieg der Zellproliferation verglichen mit den Zellen auf unbeschichtetem PLGA beziehungsweise auf Glas kultivierten Kontrollzellen. Dies bestätigt die Resultate der zweiten Versuchsreihe mit humanen Osteoblasten. Des Weiteren führt Kollagen I in Kombination mit CS zu einem Anstieg spezifischer Marker der Zelladhäsion, was sich in vielen Zellausläufern und ausgeprägten vinculinhaltigen fokalen Adhäsionsplaques darstellt.

Zukünftige Arbeiten könnten sich mit dem Vergleich unterschiedlicher CS Typen beschäftigen, welche unterschiedliche Wirkung auf das Zellverhalten haben könnten. Auch könnte der Fokus darauf gelegt werden, den Einfluss von Beschichtungen mit CS auf Marker der Osteoblastendifferenzierung zu untersuchen. Da die Versuche mit Chondroitinsulfatbeschichtungen mit humanen MG-63 Zellen durchgeführt wurden, könnte über eine Verifizierung der Ergebnisse mit Osteoblasten, gewonnen von menschlichen Spendern, nachgedacht werden.

6. Literaturverzeichnis

Amarel M., Dias A.G., Gomes P.S., Lopes M.A., Silvia R.F., Santos J.D., Fernandes M.H. (2008): Nanocrystalline diamond: In vitro biocompatibility assessment by MG 63 and human bone marrow cells cultures. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 87, 91-99

Asada M., Shinomiya M., Suzuki M., Honda E., Sugimoto R., Ikekita M. und Imamura T. (2009): Glycosaminoglycan affinity of the complete fibroblast growth factor family. *Biochim. Biophys. Acta*, 1790, 40-48

Astete C.E., Sabliov C.M. (2006): Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles. *J. Biomat. Sci. Polym. Ed.*, 17, 247-289

Aubin J.E., Triffitt J. (2002): Mesenchymal stem cells and osteoblast differentiation. In: Bilezikian J.P., Raisz L.G., Rodan G.A. (Hrsg.): *Principles of bone biology*, Bd. 1, Aufl. 2, 59-81. Elsevier, Nordholland, Amsterdam

Ayad S., Boot-Handford R.P., Humphries M.J., Kadler K.E., Shuttleworth C.A. (1998): *The extracellular matrix facts book*, Aufl. 2. Academic Press, Kalifornien, San Diego

Benoita D.S.W., Anseth K.S. (2005): Heparin functionalized PEG gels that modulate protein adsorption for hMSC adhesion and differentiation. *Acta Biomater.*, 1, 461-470

Bierbaum S., Douglas T., Hanke T., Scharnweber D., Tippelt S. (2006): Collageneous matrix coatings on titanium implants modified with decorin and chondroitin sulfate: characterization and influence on osteoblastic cells. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 77, 551-562

Calabro A., Benavides M., Tammi M., Hascall V.C., Midura R.J. (2000): Microanalysis of enzyme digests of hyaluronan and chondroitin/dermatan sulfate by fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis (FACE). *Glycobiology*, 10, 273-281

Diedrichs S., Böhm S., Peterbauer A., Kasper C., Scheper T., Van Griensven M. (2010): Application of different strain regimes in two-dimensional and three-dimensional adipose

tissue-derived stem cell cultures induces osteogenesis: Implications for bone tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 94, 927-936

Douglas T., Heinemann S., Mietrach C., Hempel U., Bierbaum S., Scharnweber D., Worch H. (2007): Interactions of collagen types I and II with chondroitin sulfates A-C and their effect on osteoblast adhesion. *Biomacromolecules*, 8, 1085-1092

Ekaputra A.K., Prestwich G.D., Cool S.M., Hutmacher D.W. (2008): Combining electrospun scaffolds with electrosprayed hydrogels leads to three-dimensional cellularization of hybrid constructs. *Biomacromolecules*, 9, 2097-2103

Geissler U., Hempel U., Wolf C., Scharnweber D., Worch H., Wenzel K. (2000): Collagen Typ I - coating of Ti6Al4V promotes adhesion of osteoblasts. *J. Biomed. Mater. Res.*, 51, 752-760

Goldstein A.S., Juarez T.M., Helmke C.D., Gustin M.C., Mikos A.G. (2001): Effect of convection on osteoblastic cell growth and function in biodegradable polymer foam scaffolds. *Biomaterials*, 22, 1279-1288

Goldstein A.S., Zhu G., Morris G.E., Meszlenyi R.K. Mikos A.G. (1999): Effect of osteoblastic culture conditions on the structure of poly (DL-lactic-coglycolic acid) foam scaffolds. *Tissue Eng.*, 5, 421-434

Grausova L., Bacakova L., Kromka A., Potocky S., Vanecek M., Nesladek M., Lisa V. (2009): Nanodiamond as promising material for bone tissue engineering. *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 9, 3524-3534

Gruber H.E., Hoelscher G.L., Kelly L., Ingram J.A., Henley E.N. Jr. (2006): Three-dimensional culture of human disc cells within agarose or a collagen sponge: Assessment of proteoglycan production. *Biomaterials*, 27, 371-376

Gruber H.E., Kelly L., Ingram J.A., Norton H.J., Henley E.N. Jr. (2004): Cell-based tissue engineering for the intervertebral disc: In vitro studies of human disc cell gene expression and matrix production within selected cell carriers. *The Spine Journal*, 4, 44-55

Hea W., Mab Z., Yonga T., Teoc W.E., Ramakrishna S. (2005): Fabrication of collagen-coated biodegradable polymer nanofiber mesh and its potential for endothelial cells growth. *Biomaterials*, 26, 7606-7615

Houchin M.L., Topp E.M. (2008): Chemical degradation of peptides and proteins in PLGA: a review of reactions and mechanisms. *J. Pharm. Sci.*, 97, 2395-2404

Jalil R., Nixon J.R. (1990): Microencapsulation using poly (L-lactic acid) III: Effect of polymer molecular weight on the microcapsule properties. *J. Microencapsul.*, 7, 41-52

Jianga W., Guptab R.K., Deshpandec M.C., Schwendeman S.P. (2005): Biodegradable poly (lactic-co-glycolic acid) microparticles for injectable delivery of vaccine antigens. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 57, 391-410

Keresztes Z., Rouxhet G.P., Remacle C., Dupont-Gillain C. (2006): Supramolecular assemblies of adsorbed collagen affect the adhesion of endothelial cells. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 76, 223-233

Lüllmann-Rauch, R. (2003): *Histologie*. Thieme, Baden-Württemberg, Stuttgart

Ma Z., Gao C., Gong Y., Shen J. (2005): Cartilage tissue engineering PLLA scaffold with surface immobilized collagen and basic fibroblast growth factor. *Biomaterials*, 26, 1253-1259

Mansell J.P., Farrar D., Jones S., Nowaghni M. (2009): Cytoskeletal reorganisation, 1alpha,25-dihydroxy vitamin D3 and human MG63 osteoblast maturation. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 305, 38-46

McKee M.D., Nanci A. (1995): Osteopontin and the bone remodeling sequence. Colloidal-gold immunocytochemistry of an interfacial extracellular matrix protein. *An. N.Y. Acad. Sci.*, 760, 177-189

- Mi F.L., Shyu S.S., Peng C.K., Wu Y.B. (2006): Fabrication of chondroitin sulfate-chitosan composite artificial extracellular matrix for stabilization of fibroblast growth factor. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 76, 1-15
- Miller D.C., Thapa A., Haberstroh K.M., Webster T.J. (2004): Endothelial and vascular smooth muscle cell function on poly(lactic-co-glycolic acid) with nano-structured surface features. *Biomaterials*, 25, 53-61
- Misra S.K., Aansari T., Mohn D., Valappil S.P., Brunner T.J., Stark W.J., Roy I., Knoweles J.C., Sibbons P.D. (2010): Effect of nanoparticulate bioactive glass particles on bioactivity and cytocompatibility of poly(3-hydroxybutyrate) composites. *J. R. Soc. Interface*, 7, 453-465
- Nandini C.D., Sugahara K. (2006): Role of the sulfation pattern of chondroitin sulfate in its biological activities and in the binding of growth factors. *Adv. Pharmacol.*, 53, 253-279
- Pamula E., Filová E., Bacakova L., Lisá V., Adamczyk D. (2009): Resorbable polymeric scaffolds for bone tissue engineering: The influence of their microstructure on the growth of human osteoblast-like MG 63 cells. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 89, 432-443
- Pamula E., Menaszek E. (2008): In vitro and in vivo degradation of poly (l-lactide-co-glycolide) films and scaffolds. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 19, 2063-2070
- Ravivarapu H.B., Burton K., DeLuca P.P. (2000): Polymer and microsphere blending to alter the release of a peptide from PLGA microspheres. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 50, 263-270
- Shirk R.A., Parthasarathy N., San Antonio J.D., Church F.C., Wagner W.D. (2000): Altered dermatan sulfate structure and reduced heparin cofactor II-stimulating activity of biglycan and decorin from human atherosclerotic plaque. *J. Biol. Chem.*, 275, 18085-18092
- Viola M., Karousou E.G., Vigetti D., Genasetti A., Pallotti F., Guidetti G.F., Tira E. (2006): Decorin from different bovine tissues: Study of glycosaminoglycan chain by PAGEFS. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 41, 36-42

Warnke P.H., Douglas T., Sivananthan S., Wiltfang J., Springer I., Becker S.T. (2009): Tissue engineering of periosteal cell membranes in vitro. *Clin. Oral Implants Res.*, 20, 761-766

Warnke P.H., Douglas T., Wollny P., Sherry E., Steiner M., Galonska S., Becker S.T., Springer I., Wiltfang J., Sivananthan S. (2009): Rapid prototyping: Porous titanium alloy scaffolds produced by selective laser melting for bone tissue engineering. *Tissue Eng. Part C Methods*, 15, 115-124

Warnke P.H., Wiltfang J., Springer I., Acil Y., Bolte H., Kosmahl M., Russoa P.A.J., Sherry E., Lützen U., Wolfart S., Terheyden H. (2006): Man as living bioreactor: Fate of an exogenously prepared customized tissue-engineered mandible. *Biomaterials*, 27, 3163-3167

Zhang Y., Schedle E.A., Matejka M., Rausch-Fan X., Andrukhov O. (2010): The proliferation and differentiation of osteoblasts in co-culture with human umbilical vein endothelial cells: An improved analysis using fluorescence-activated cell sorting. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 15, 517-529

Zhong S., Teo W.E., Zhu X., Beuerman R., Ramakrishna S., Yung L.Y. (2005): Formation of collagen- glycosaminoglycan blended nanofibrous scaffolds and their biological properties. *Biomacromolecules*, 6, 2998- 3004

Zohar R., Cheifetz S., McCulloch C.A., Sodek J. (1998): Analysis of intracellular osteopontin as a marker of osteoblastic cell differentiation and mesenchymal cell migration. *Eur. J. Oral Sci.*, 106, 401-407

7. Anhang

7.1. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AMAC	Aminoacridone
BMP	bone morphogenetic protein
BrdU	5-Brom-2'-Desoxyuridin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
c	zenti (10^{-2})
Coll	Kollagen englisch: collagen
CS	Chondroitinsulfat
d	dezi (10^{-1})
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzymgekoppelter Immunadsorptionstest englisch: enzyme linked immunosorbent assay
engl.	Englisch
Fa.	Firma
EZM	Extrazellulärmatrix
FCS	fetales Kälberserum englisch: fetal calf serum
FDA	Fluorescein Diacetat
FGF	Fibroblastenwachstumsfaktor englisch: fibroblast growth factor
g	Gramm
GAG	Glykosaminoglykan
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
h	Stunde englisch: hour

HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie englisch: high performance liquid chromatography
k	Kilo (10^3)
l	Liter
LDH	Lactatdehydrogenase
m-	Milli (10^{-3})
-m	Meter (10^1)
M	Mol / l
min	Minute
mol	6,022 x 10 ²³ Teilchen (Avogadro-Zahl)
MTT	3-(4,5-Dimethyl-2-Thiazolyl)-2,5-Diphenyl- 2-Tetrazoliumbromid
n	Nano (10^{-9})
p	Piko (10^{-12})
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung englisch: phosphate buffered saline
pH	potentia Hydrogenum
PI	Propidium Iodid
PLGA	Polylactid-co-Glycolid englisch: polylactid-co-glycolid-acid
PLGA Typ 1	Polylactid-co-Glycolid der Sorte Purasorb, PLG 8531
PLGA Typ 2	Polylactid-co-Glycolid der Sorte Purasorb, PLG 8523
REM	Rasterelektronenmikroskop
SFA	Standard Fehler Abweichung
Tab.	Tabelle
TGF- β	transforming growth factor- β
Tween	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat
U	Unit (Enzymaktivität: 1 U = 1 μ mol/min)
UK	United Kingdom
USA	United States of America
WST	4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-Nitrophenyl)-2H-5-Tetrazolio]- 1,3-Benzol-Disulfonat
μ	Mikro (10^{-6})
%	Prozent

7.2. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1 Schematischer Aufbau von PLGA
Quelle: www.wikipedia.de
- Abb. 2 Kollagen-Tripelhelix
Quelle: www.wikipedia.de
- Abb. 3 Schematischer Aufbau von Chondroitinsulfat
Quelle: www.wikipedia.de
- Abb. 4 Herstellung von PLGA-Filmen
- Abb. 5 CellCrown von Scaffdex, Finnland
Quelle: www.scaffdex.com
- Abb. 6 typisches Ergebnis eines ELISA-Tests in einer 96-well Mikrotiterplatte
- Abb. 7 Sandwich-ELISA
Quelle: <http://veryviciousviruses.blogspot.de/2009/02/enzyme-linked-immunosorbent-assay-elisa.html>
- Abb. 8 Typische Aufnahme von MG-63 Zellen gefärbt mit Texas Red C2-maleimide
- Abb. 9 Typische Aufnahme von MG-63 Zellen gefärbt mit Hoechst 33342
- Abb. 10 FDA/PI Färbung von humanen Osteoblasten, PLGA der Sorte 8531
- Abb. 11 FDA/PI Färbung von humanen Osteoblasten, PLGA der Sorte 8523
- Abb. 12: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen einer 7 Tage alten Osteoblastenkultur auf Glas.
- Abb. 13: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen einer 7 Tage alten Osteoblastenkultur auf PLGA - Zellträgern der Sorte 8531
- Abb. 14: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen einer 7 Tage alten Osteoblastenkultur auf PLGA - Zellträgern der Sorte 8523

Abb. 15:	Aufnahme von 1 Tag alten MG-63 Zellkulturen
Abb. 16:	Integrinfärbung
Abb. 17:	Vinculinfärbung
Abb. 18:	Aktinfärbung

7.3. Tabellenverzeichnis

Tab. 1	LDH-Test, PLGA 8531 und 8523
Tab. 2	BrdU-Test, PLGA 8531 und 8523
Tab. 3	WST-Test, PLGA 8531 und 8523
Tab. 4	MTT-Test, PLGA 8531 und 8523
Tab. 5	Zellzahl
Tab. 6:	Decorinkonzentration
Tab. 7:	Osteopontinkonzentration
Tab. 8:	Konzentration von BMP-2, BMP-4 und BMP-7
Tab. 9:	Zellzahl auf PLGA-Filmen, an Tag 1, 3 und 7 der Zellkultur
Tab. 10:	Zelladhäsionsfläche

Danksagung

Mein Dank gilt meinem Doktorvater, Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Patrick Warnke, für die Planung des Versuchsvorhabens sowie für die Überlassung des Themas, für Motivation, Gespräch und Hilfe über die Dissertation hinaus.

Ebenfalls möchte ich Herrn Dr. Timothy Douglas für die intensive Betreuung bei der Durchführung dieses Projektes sowie Marta Vandrovcová für die gute Zusammenarbeit danken.

Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Jörg Wiltfang, Direktor der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgischen Klinik des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel und Herrn Prof. Dr. Yahya Açil, Leiter des Forschungslabors, gilt mein Dank für die Schaffung der notwendigen Voraussetzungen zur Durchführung dieser Arbeit.

Ich danke den medizinisch technischen Angestellten Gisela Otto, Gabi Neßenius und Mojgan Paymard-Stolz für die wertvolle Einarbeitung und tatkräftige Unterstützung im Labor. Ihre Ratschläge und Anregungen waren mir stets eine große Hilfe.

Prof. Jürgen Hering und Stefanie Schöwe danke ich für die Korrektur meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt meiner Mutter, Olga Hauk, sowie Steffen Hering. Durch ihre Hilfe und Unterstützung in den vergangenen Jahren haben sie die vorliegende Dissertation erst ermöglicht.

Lebenslauf

<u>Persönliches</u>	Name	Dominik Hauk
	Geburtsdatum	14.02.1984
	Geburtsort	Sindelfingen
	Familienstand	ledig
<u>Aktuell</u>	April 2012 -	Assistenz Zahnarzt, Klinik für zahnärztliche Prothetik, Propädeutik und Werksstoffkunde. Universitätsklinikum Schleswig Holstein, Campus Kiel
<u>Studium</u>	Okt. 2005 - Dez. 2011	Studium der Zahnmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
<u>Dissertation</u>	2008 - 2013	Arbeit an der vorliegenden Dissertation in der Klinik für Mund, Kiefer und Gesichtschirurgie. Universitätsklinikum Schleswig Holstein, Campus Kiel
<u>Zivildienst</u>	2004 - 2005	Zivildienst als Rettungssanitäter beim Arbeiter-Samariter-Bund, Heilbronn
<u>Schulbildung</u>	1990 - 1994	Eduard-Mörke-Grundschule, Böblingen
	1994 - 2004	Albert-Schweitzer-Gymnasium, Neckarsulm

Veröffentlichungen

1. Douglas T., Pamula E., Hauk D., Wiltfang J., Sivananthan S., Sherry E., Warnke P.H. (2009): Porous polymer/hydroxyapatite scaffolds: characterization and biocompatibility investigations. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 20, 1909-1915
2. Vandrovcová M., Douglas T., Hauk D., Grössner-Schreiber B., Wiltfang J., Bačáková L., Warnke P.H. (2011): Influence of collagen and chondroitin sulfate (CS) coatings on poly-(lactide-co-glycolide) (PLGA) on MG 63 osteoblast-like cells. *Physiol. Res.*, 60, 797-813