

Aus dem Institut für Experimentelle Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde des Charité
Centrums 03 für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Medizinischen Fakultät Charité
- Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin

**Charakterisierung des Einflusses neuer schnell resorbierbarer
Calciumalkaliphosphatkeramiken mit definierten Diphosphatanteilen auf die
osteoblastische Zelldifferenzierung *in vitro* im Vergleich zu diphosphatfreien
alkalihaltigen Materialien und klinisch eingesetzten Materialien**

zur Erlangung des akademischen Grades Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Alireza Houshmand
aus Teheran

Gutachter:

1. PD Dr. Christine Knabe
2. Prof. Dr. Dr. Klaus-Dietrich Wolff
3. Univ.-Prof. Dr. med. Dieter Felsenberg

Datum der Promotion: 27.03.2009

Danksagung

Die experimentelle Grundlage der vorliegenden Arbeit wurde zwischen den Jahren 2005-2006 am Institut für Experimentelle Zahnheilkunde der Charité - Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin durchgeführt.

Meinen Dank gilt zuerst meiner Doktormutter Frau PD Dr. med. dent. Christine Knabe für die Bereitstellung des Themas meiner Doktorarbeit sowie für die weitreichende und anhaltende Unterstützung während der Durchführung der Arbeit. Liebe Christine, Du wirst mir stets ein Vorbild bleiben.

Außerdem möchte ich Herrn Dr. Berger und seinen Mitarbeitern der Bundesanstalt für Materialforschung für die Entwicklung und Bereitstellung der Knochenersatzmaterialien danken.

Des Weiteren möchte ich Frau Karin Schulze-Dirksen sowie Frau Edith Rieger-Rüdiger sowie Frau Irene Schwarz für die technische Assistenz bei der Durchführung der Experimente danken.

Besonderen Dank gilt meiner Mutter Shahin Ramanzadeh sowie meinem Vater Mozaffar Houshmand, welche mir das Medizinstudium und die Durchführung dieser wissenschaftlichen Arbeit ermöglichten.

Nicht zuletzt danke ich meiner Freundin Kathrin Scheuch für ihre ermutigende Unterstützung und ihr liebevolles Verständnis.

Inhaltsverzeichnis

1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	6
2. EINLEITUNG	7
2.1 Knochenersatzmaterialien und ihr Stellenwert in der Zahnheilkunde	7
2.2 Allgemeine Eigenschaften von Knochenersatzmaterialien	8
2.3 Systematik von Knochenersatzmaterialien	9
2.4 Aktueller Stand und Ergebnisse des Einsatzes von Knochenersatzmaterialien in der Zahnheilkunde	10
2.5 Neue schnell resorbierbare Calciumalkaliphosphatkeramiken	11
2.6 Osteogene Zelldifferenzierung	11
3. FRAGESTELLUNG	14
4. MATERIAL	16
4.1 Chemikalien	16
4.2 Testmaterialien	16
4.3 Eukaryonte Zellen	17
4.4 Labormaterial	18
4.5 Geräte	18
4.6 Sekundärantikörper	18
4.7 Kits	18
4.8 Primärantikörper	19
5. METHODEN	20
5.1 Zellkultur und Zellaussaat	20
5.2 Quantitative Immunocytochemie	21
5.3 Statistische Auswertung	22
5.4 Bestimmung der Oberflächenrauheit der Knochenersatzmaterialien	23
6. ERGEBNISSE	24
6.1 Oberflächenrauheit der Knochenersatzmaterialien	24
6.2 Zellproliferation in Abhängigkeit von den Knochenersatzmaterialien	25
6.3 Zelldifferenzierung nach 3 Tagen	25
6.4 Zelldifferenzierung nach 7 Tagen	26
6.5 Zelldifferenzierung nach 14 Tagen	27
6.6 Zelldifferenzierung nach 21 Tagen	28
6.7 Zelldifferenzierung im Vergleich von TCP (Cerasorb) zu TCP mit Multiporosität (Cerasorb M)	30

7. DISKUSSION	32
7.1 Einfluss der verschiedenen Knochenersatzmaterialien auf die Osteoblastendifferenzierung	32
7.2 Vergleich der Fähigkeiten von TCP und β -TCP auf die Osteoblastendifferenzierung	35
7.3 Einfluss der Oberflächenbeschaffenheit auf die Osteogenese	36
7.4 Molekulare Grundlagen der Stimulierung der Knochenformation durch Knochenersatzmaterialien	36
8. ZUSAMMENFASSUNG	39
9. ANHANG	40
9.1 Curriculum vitae	40
9.2 Literaturverzeichnis	42

1. Abkürzungsverzeichnis

AP	Alkalische Phosphatase
BMP	Bone Morphogenetic Proteins
BSP	Bone sialoprotein
β -TCP	β -Tricalciumphosphat
Col I	collagen I
Col III	collagen III
CO ₂	Kohlendioxid
Cys	Cystein
Da	Dalton
EZM	Extrazellulärmatrix
FCS	fetal calf serum
FN	Fibronektin
GBR	Guided bone regeneration,
HA	Hydroxyapatit
H ₂ O	Wasser
M	Molar
Mg	Magnesium
min	Minuten
μ l	Mikroliter
ml	Milliliter
mM	Millimolar
NEAA	Nicht-essentielle Aminosäuren
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
O ₂	Sauerstoff
OC	Osteocalcin
ON	Osteonektin
OP	Osteopektin
PBS	phosphate buffered saline
Rpm	rounds per minute
s	Sekunde

2. Einleitung

2.1 Knochenersatzmaterialien und ihr Stellenwert in der Zahnheilkunde

Der Einsatz von oralen Implantaten ist eine ästhetisch und funktionell hochwertige Methode, um fehlende Zähne zu ersetzen (Belser et al. 2000). Nach Verlust eines Zahnes werden der angrenzende Knochen und das Weichgewebe als Folge des natürlichen Resorptionsprozesses ummodelliert. Weiterhin können Infektionen oder Traumata Defekte im Knochen- und Weichgewebe verursachen.

Die prothetischen Anforderungen für das Design der Implantatsuprastruktur bestimmen die Position, in die das Implantat eingesetzt wird. Demzufolge ist eine dreidimensionale Rekonstruktion des Implantatbettes notwendig. Zum Beispiel erfordert eine Resorption des Alveolarkammes nach Zahnextraktion häufig eine Alveolarkammaugmentation, bevor Implantate eingesetzt werden können (Belser et al. 2000, Winkler et al. 2002).

Die autologe Knochentransplantation ist nach wie vor der Goldstandard für die Knochenrekonstruktion in der Implantologie (Buser et al. 1999, von Arx et al. 2001, Zijdeveld et al. 2005). Neben verschiedenen anderen Techniken, um einen defizienten Alveolarkamm zu rekonstruieren, ist das Konzept der gesteuerten Knochenregeneration (guided bone regeneration, GBR) eine etablierte chirurgische Methode (Buser et al. 1999). Bei der GBR werden dünne Membranen eingesetzt. Diese dienen als Barrieren, um die Einwanderung von nicht erwünschten Zellen, wie z. B. Fibroblasten, in das Wundgebiet zu verhindern. Gleichzeitig soll die Proliferation bestimmter Gewebezellen gefördert werden, um eine Wundheilung mit der gewünschten Gewebeart, z. B. Knochen zu erhalten. Aktuell werden diese Membranen mit autogenen Knochentransplantaten kombiniert (Buser et al. 1999, von Arx et al. 2001). Diese Autotransplantate reduzieren das Defektvolumen, stabilisieren das Blutgerinnsel und unterstützen die Membran als eine raumerhaltende Vorrichtung (Buser et al. 2000, Buser et al. 1994). Diese rekonstruktiven Techniken werden aktuell zur Augmentation des Oberkiefer-Sinusbodens, zur Regeneration von dentoalveolären Taschen und zur horizontalen und vertikalen Alveolarkammaugmentation eingesetzt (Stricker et al. 2003).

Die wesentlichen Nachteile des Einsatzes von autogenen Knochentransplantaten sind der zusätzliche chirurgische Eingriff zur Entnahme des Transplantates, welches mit einer erhöhten Morbidität der Entnahmestelle und einer verlängerten Operationsdauer

einhergeht. Beispielsweise tritt in ca. 20 % der Fälle ein Schmerzsyndrom der Entnahmestelle auf (Laurencin et al. 2006). Außerdem erfordert die extraorale Transplantatentnahme eine Allgemeinanästhesie. Der körpereigene Knochen steht zum anderen nicht in unbegrenzter Menge zur Verfügung. Die Verwendung von allogenen Transplantaten aus Knochenbanken ist aufgrund der Übertragbarkeit von Infektionskrankheiten und des erhöhten Risikos einer Abstoßung keine Alternative zur autogenen Knochentransplantation (von Arx et al. 2001, Orsini et al. 2004). So beträgt die HIV-Übertragungsrate durch Allograft-Transplantate 1 : 1,6 Millionen (Laurencin et al. 2006).

Der Einsatz von Knochenersatzmaterialien als Membran-unterstützendes Mittel Einheit könnte die GBR vereinfachen, indem ein zusätzlicher chirurgischer Eingriff zur autogenen Knochenentnahme vermieden wird (Buser et al. 2000, von Arx et al. 2001).

2.2 Allgemeine Eigenschaften von Knochenersatzmaterialien

Alloplastische Knochenersatzmaterialien sind körperfremde, synthetisch hergestellte Materialien, die anstelle von autogenen oder allogenen Materialien verwendet werden. Verschiedene Termini sind gebräuchlich, um die Eigenschaften von Knochenersatzmaterialien zu charakterisieren. Der Begriff *Biokompatibilität* bedeutet, dass das Material eine wechselseitige Toleranz mit dem lebenden Gewebe erlaubt und es zu keiner unerwünschten Gewebereaktion kommt. *Osteokonduktive* Materialien wirken als eine passive Leitstruktur, durch die das Knochengewebe einwachsen kann (Burchardt et al. 1983). Nach einer mesenchymalen zellulären Differenzierung sprossen Gefäße ein und führen über eine Vaskularisation ohne vorherige Resorption des Materials zu einer Knochenregeneration (Katthagen et al. 1993). Zu den osteokonduktiven Substanzen gehören beispielsweise Kalziumphosphatkeramiken wie β -Tricalciumphosphat (β -TCP) und Hydroxyapatit (HA), welche bereits klinische Anwendung finden. Wesentliche Parameter für die Osteokonduktion sind die Porendurchmesser sowie das Vorhandensein von interkonnektierenden Poren. Ein Durchmesser von 5-15 μm ist für das Einwachsen von bindegewebigen Strukturen ausreichend. Mineralisiertes Knochengewebe kann erst ab 100 μm einwachsen. Osteonähnliche Strukturen benötigen entsprechend der natürlich vorkommenden Kanäle Durchmesser von mehr als 200 μm (Schenk et al. 1991).

Bioaktive Materialien stimulieren eine spezifische biologische Antwort an der Grenzschicht zwischen eingebrachtem Material und umgebendem Gewebe und gehen somit eine Bindung mit dem lebenden Gewebe ein. Unter *Osteoinduktion* versteht man die Fähigkeit eines Biomaterials, auch nach heterotoper Implantation, also außerhalb des Knochens, eine Knochenbildung zu bewirken. Diese *de novo* Bildung von Knochen wird durch pluripotente Reservezellen, Stammzellen, die ubiquitär im perivaskulären Bindegewebe und im Knochen vorkommen gewährleistet. Diese Stammzellen werden unter bestimmten Bedingungen durch morphogene Faktoren aktiviert. Zu diesen morphogenen Faktoren zählen z. B. die Bone Morphogenetic Proteins (BMP) (Long, 2001). Unter dem Einfluss der Faktoren tritt eine Proliferation mit anschließender Differenzierung der Stammzellen von Osteoprogenitorzellen in Osteoblasten ein, durch die die Knochenbildung angeregt wird.

Das autogene Transplantat ist sowohl osteokonduktiv als auch osteoinduktiv und vereinigt somit beide erwünschten Eigenschaften (Laurencin et al. 2006).

Eine osteoinduktive Eigenschaft besitzen auch allogene Transplantate. Urist konnte bereits 1965 nachweisen, dass bei ortho- und heterotoper Implantation demineralisierter Knochenmatrices eine Osteoinduktion möglich ist (Urist et al. 1965).

Keramischen Knochenersatzmaterialien werden im Allgemeinen keine osteoinduktiven Eigenschaften zugesprochen (El-Ghannam et al. 2005, Patel et al. 1980). Vereinzelt Studien konnten jedoch eine Osteoinduktion für diese nachweisen. Beispielsweise beschrieben Yuan et al. eine Knochenneubildung nach Implantation von biphasischen Calcium-Phosphat-Keramik (BCP) und HA in den Femoralmuskel von Hunden nach ca. 1 Monat (Yuan et al. 2006).

2.3 Systematik von Knochenersatzmaterialien

Nach Laurencin et al. kann man die Knochenersatzmaterialien in fünf verschiedene Gruppen einteilen: Allograft-basierte, Zell-basierte, Faktor-basierte, Keramik-basierte und Polymer-basierte Transplantate (Laurencin et al. 2006, Tabelle 1).

Nach Rueger et al. unterscheidet man neben den organischen und anorganischen Materialien die Composites, welche aus einer Mischung von organischen und anorganischen Substanzen bestehen. Dazu gehören beispielsweise Kollagen in Verbindung mit Calciumphosphatkeramiken (Rueger et al. 1992).

	Klasse	Beschreibung	Beispiele
A. Organische, biologische	A.1 Allograft-basierte	Verwendung von allogenen Knochen allein oder in Kombination mit anderen Materialien	Demineralisierte Knochenmatrix (Allogro®)
	A.2 Zell-basierte	Verwendung von mesenchymalen Stammzellen, ggf. mit einer Unterstützungsmatrix	Mesenchymale Stammzellen
	A.3 Faktor-basierte	Anwendung von natürlichen und rekombinanten Wachstumsfaktoren allein oder in Kombination mit anderen Materialien	TGF- β , PDGF, FGF, BMP
B. Anorganische, synthetische	B.1 Keramik-basierte	Calciumphosphate, Calciumsulfate, bioaktive Gläser allein oder in Kombination	β -TCP (Cerasorb®), β -TCP M (Cerasorb® mit Multiporosität), Bioglass 45S5 (Biogran®), Hydroxyapatit (Calcitide®)
	B.2 Polymer-basierte	Abbaubare und nicht abbaubare Polymere	Polyactid (OPLA®)

Tabelle 1: Einteilung der Knochenersatzmaterialien. Modifiziert nach Laurencin et al. 2006. TGF- β : Transforming growth factor- β , PDGF: platelet derived growth factor, FGF: fibroblast growth factor, BMP: bone morphogenetic protein

2.4 Aktueller Stand und Ergebnisse des Einsatzes von Knochenersatzmaterialien in der Zahnheilkunde

Ein Knochenersatzmaterial sollte schnell resorbierbar sein und sollte komplett umgebaut (Biodegradation) und durch neu gebildeten Knochen ersetzt werden. In den letzten Jahren hat der Einsatz von TCP und bioaktiven Glaspartikeln (Bioactive glass 45S5) als alloplastische Knochenersatzmaterialien zunehmend an Bedeutung gewonnen bei der Alveolarkammaugmentation sowie bei der Sinusbodenelevation (Wiltfang et al. 2002, Tadjoeidin et al. 2002, Zerbo et al. 2001, Zerbo et al. 2005). Bei dem Einsatz von β -TCP war die Biodegradation 9,5 Monate nach dem Einsatz in den humanen Unterkiefer unvollständig. Histologische Untersuchungen ergaben, dass 34 % der Biopsie aus mineralisierten Knochengewebe und 29 % aus noch erhaltenen β -TCP

bestand (Zerbo et al. 2001). In Bezug auf Bioglas berichteten Tadjoeidin et al., dass Bioglaspartikel innerhalb von ein bis zwei Jahren resorbiert werden nachdem sie in den Sinusboden eingesetzt wurden (Tadjoeidin et al. 2002). Das ideale Knochenersatzmaterial sollte schneller biodegradiert werden, dabei aber trotzdem ausreichend die Osteogenese stimulieren.

2.5 Neue schnell resorbierbare Calciumalkaliphosphatkeramiken

Die Suche nach schnell resorbierbaren Knochenersatzmaterialien führte zur Entwicklung von neuen, bioaktiven Calciumalkaliorthosphatmaterialien (Berger et al. 1995a, Berger et al. 2003). Diese sind glasig-kristalline-Calciumalkaliorthosphosphate, welche stabile kristalline $\text{Ca}_2\text{KNa}(\text{PO}_4)_2$ oder $\text{Ca}_{10}[\text{K/Na}](\text{PO}_4)_7$ Phasen enthalten. Diese Materialien haben eine höhere Löslichkeit als TCP und sind entwickelt worden, um einen höhere Biodegradibilität als TCP zu besitzen. Eine andere Möglichkeit, die Löslichkeit und die Biodegradibilität der Calciumalkaliorthosphosphate zu erhöhen, ist das Hinzufügen eines höheren Phosphatanteils, was zu einer Bildung von kristallinen oder amorphen Diphosphaten führt. Diphosphate haben eine höhere Löslichkeit als Orthosphosphate. Während des Mineralisierungsprozess der Knochenmatrix wird $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ vorübergehend gebildet (Schneider et al. 1994). Einige Studien konnten *in vitro* und *in vivo* zeigen, dass Calciumphosphate, zu denen Diphosphate hinzugefügt wurden, hervorragende Ergebnisse bezüglich der Knochenregeneration erbrachten (Lin et al. 1997, Sun et al. 2004). Deshalb wurde kürzlich ein Calciumalkaliorthosphat entwickelt, welches einen geringen Anteil von Diphosphaten ($\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$) besitzt (Berger et al. 2003). Weiterhin können dreidimensionale Gerüste aus diesen Calciumalkaliorthosphaten (mit und ohne Zusatz von Diphosphaten) hergestellt werden, was vorteilhaft für den Einsatz für das Bone-Tissue Engineering ist (Berger et al. 1997).

2.6 Osteogene Zelldifferenzierung

Die Neubildung von Knochen findet während der Embryonalentwicklung, während des Wachstums, bei Umbauvorgängen und der Frakturheilung statt.

Undifferenzierte Mesenchymzellen des Knochenmarkes (Vorläuferzellen) entwickeln sich zu Präosteoblasten (Stammzellen des Knochens) aus denen die Osteoblasten und später die Osteozyten entstehen. Die Osteoblasten sind für die Knochenneubildung

verantwortlich. Sie sezernieren die organische Knochenmatrix und besitzen daher einen gut entwickelten Golgi-Apparat. Die Entwicklung von einer frühen Vorläuferzelle zu einem funktionstüchtigen, matrixsynthetisierenden Osteoblasten kann man in drei Phasen einteilen: 1. Proliferation, 2. Entwicklung der Extrazellulärmatrix (EZM) und 3. Reifung und Mineralisierung (Aubin 1998). Verschiedene Proteine werden während einer bestimmten Entwicklungssequenz exprimiert und können somit z. B. als Marker für Osteoblasten dienen (Abb. 1). Beispielsweise steigt im Allgemeinen die Expression der Alkalischen Phosphatase (AP) während der ersten beiden Phasen der Proliferation und postproliferativen Matrixreifung und sinkt dann, wenn die Mineralisierung einsetzt. Das Osteopontin hat zwei Expressionshöhepunkte: einmal während der Proliferation und zu einem späteren Zeitpunkt, kurz bevor die Matrixproteine, wie das Bone-Sialoprotein und das Osteocalcin exprimiert werden. Das Bone-Sialoprotein wird vorübergehend in einem sehr frühen Stadium exprimiert und dann erneut im differenzierten, knochenbildenden Osteoblasten, hochreguliert. Osteocalcin-Expression findet man während der Mineralisierung (Aubin, 2000). Tabelle 2 zeigt wichtige Extrazellulärmatrixproteine von humanen Knochenzellen und deren Funktion. In Tabelle 3 ist das zelluläre Protein alkalische Phosphatase aufgeführt, welches als Referenzgen bzw. *housekeeping gene* zur Normalisierung verwendet wurde.

Protein	MW	Funktion	Referenz
Typ I Kollagen (Col I)	~ 70-90 kDa	Grundlegender Bestandteil der Knochen-EZM, Zellhaftung über RGD-Sequenz	Eyre 1980, Glimcher 1989
Type III Kollagen (Col III)		Geringer Anteil an der EZM (2-5%)	Auf'mkolk et al. 1985
Osteonektin (ON)	33 kDa (nach Sequenz)	Phosphoryliertes Glykoprotein, Bindung von Calcium	Termine et al. 1981, Lane & Sage 1990
Osteopontin (OP)	32 kDa (nach Sequenz)	Phosphoprotein, Zelladhäsion über RGD-Sequenz, Bindung von Hydroxyapatit	Franzen & Heinegard 1985, Flores et al. 1982
Osteocalcin (OC)	5,8 kDa	Bindung von Hydroxyapatit und Calcium, Vitamin-D reguliert, Mineralisierung, Rekrutierung und Differenzierung von Osteoklasten	Price et al. 1981, Hauschka et al. 1989

Bone-Sialoprotein (BSP)	33,6 kDa (nach Sequenz)	Phosphoprotein, Bindung von Hydroxyapatit über RGD-Sequenz	Franzen & Heinegard 1985
Fibronektin (FN)	220 kDa	Zelladhäsion über RGD-Sequenz, Interaktion mit Glykosaminoglykanen	Weiss & Reddi 1980, 1981, Heinegard & Oldberg 1989, Grzesik & Robey 1994

Tabelle 2: Extrazelluläre Matrix (EZM)-Proteine, welche von humanen Knochenzellen *in vitro* gebildet werden. MW: Molekulargewicht. RGD-Sequenz: Zelloberflächenbindungsdomäne, welche aus den drei Aminosäuren Arginin (R), Glycin (G), Asparaginsäure (D) besteht.

Alkalische Phosphatase (ALP)	140 kDa (Homodimer)	Mineralisierung, Marker für Präosteoblasten	Eyre 1980, Glimcher 1989
---------------------------------------	------------------------	--	-----------------------------

Tabelle 3: Wichtiges zelluläres Protein.

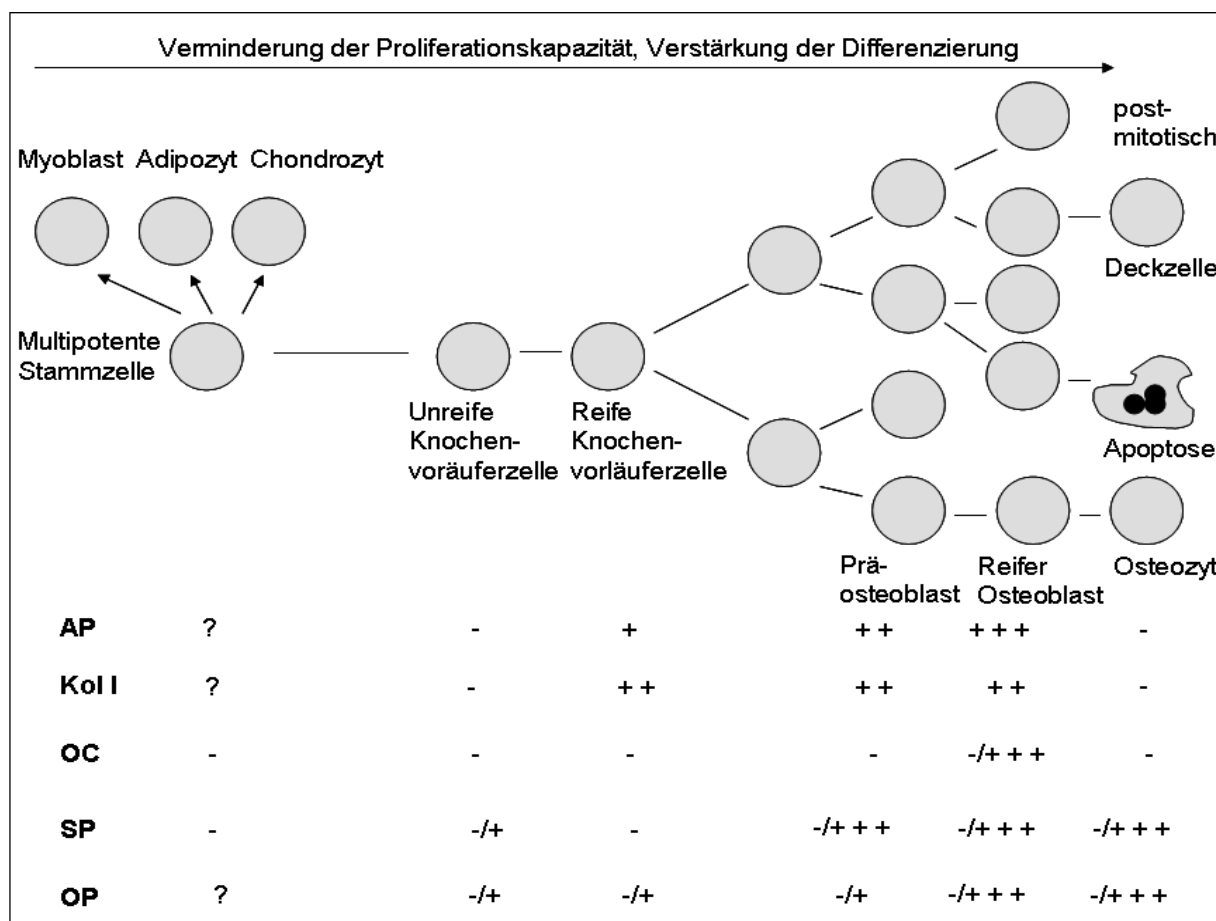


Abbildung 1: Postulierte Schritte in der Osteozyten-Differenzierung. Darstellung einiger gut-etablierter Marker, welche in den verschiedenen Entwicklungsstadien exprimiert werden. – keine Expression, - / + Expression detektierbar bis +++ Expression sehr hoch, - / + + + heterogene Expression in einzelnen Zellen. Abbildung modifiziert nach Aubin, 2001.

3. Fragestellung

Knochenersatzmaterialien sollten die Eigenschaft haben, die Knochenbildung zu aktivieren. Dies ist möglich, indem eine Differenzierung von Knochenvorläuferzellen in Osteoblasten auf der Oberfläche dieser Materialien induziert wird. Daher ist es von großer Bedeutung, das osteogene Potential und damit den Effekt dieser Materialien auf die Osteoblastendifferenzierung von neuen Knochenersatzmaterialien zu untersuchen. Die Differenzierung der Osteoblasten kann anhand von verschiedenen Expressionsmarkern in sechs Stufen eingeteilt werden. Untersuchungen des Effektes von Knochenersatzmaterialien auf diese Expressionsmarker geben somit Auskunft über das osteogene Potential des Materials.

Ein ideales Knochenersatzmaterial sollte schnell resorbierbar sein und sollte umgebaut und durch neu formierten funktionellen Knochen vollständig ersetzt werden, damit an der augmentierten Stelle ein dentales Implantat eingebracht werden kann.

Die klinisch eingesetzten Tricalciumphosphate, wie β -TCP (Cerasorb) haben den Nachteil, dass sie ungenügend abgebaut werden, wie in verschiedenen histologischen Untersuchungen gezeigt werden konnte. Dies führte dazu, dass in jüngerer Vergangenheit verschiedene schnell resorbierbare Calciumalkali-phosphatglaskeramiken entwickelt wurden. Diese haben eine höhere Löslichkeit als β -TCP und können somit besser biodegradiert werden. Das Hinzufügen von zusätzlichen Phosphaten führt zu der Bildung von kristallinen oder amorphen Diphosphaten, welche eine höhere Löslichkeit als die Calciumorthophosphate besitzen. Es stellt sich die Frage, ob diese neuen schnell resorbierbaren Materialien zugleich auch eine ausreichende Stimulation der Osteogenese bewirken.

In dieser Arbeit sollte daher der **Einfluss neuer schnell resorbierbarer Calciumalkaliphosphatkeramiken mit definierten Diphosphatanteilen auf die osteoblastische Zelldifferenzierung *in vitro* im Vergleich zu diphosphatfreien alkalihaltigen Materialien und klinisch eingesetzten Materialien** untersucht werden.

Dafür sollten folgende Aufgabenstellungen bearbeitet werden:

A.

Es sollten sieben verschiedene Knochenersatzmaterialien auf ihr osteogenes Potential getestet werden:

1. zwei schnell resorbierbare Calciumalkaliorthophosphate mit der Hauptkristallphase $\text{Ca}_2\text{KNa}(\text{PO}_4)_2$ (GB14, GB9)
2. ein schnell resorbierbares diphosphathaltiges Material GB9/25)
3. ein schnell resorbierbares Calciumalkaliorthophosphat mit der Hauptkristallphase $\text{Ca}_{10}[\text{K/Na}](\text{PO}_4)_7$ (352i)
4. zwei klinisch eingesetzte Materialien (β -TCP, Bioglass 45S5) sowie
5. ein modifiziertes β -TCP mit Multiporosität (Cerasorb M).

B.

Als Zellsystem wurde die humane osteoblastenähnliche Zelllinie SaOS-2 verwendet, welche auf den verschiedenen Knochenersatzmaterialien kultiviert werden sollte.

C.

Zu den Zeitpunkten 3, 7, 14 und 21 Tage nach Kultivierung der Zellen auf den verschiedenen Knochenersatzmaterialien sollte die Expression der osteoblastischen Differenzierungsmarker (Kollagen Typ I, Alkalische Phosphatase, Osteopontin, Osteocalcin, Osteonectin, Bone Sialoprotein) mittels quantitativer Immuncytochemie bestimmt werden.

D.

Mittels geeigneter statistischer Methoden sollte die Frage beantwortet werden, ob sich die quantitative Expression eines gegebenen Markers zu einem gegebenen Zeitraum in den auf Material 1 kultivierten Zellen im Vergleich zu den auf den anderen Materialien kultivierten Zellen statistisch signifikant unterscheidet.

4. Material

4.1 Chemikalien

Substanz	Hersteller	Katalog-Nummer
α -MEM mit 2,0g/l NaHCO ₃ ohne Nucleoside	Biochrom, Berlin	F0925
bovines Serum-Albumin (BSA), hitzeinaktiviert	Sigma Aldrich, USA)	A-7030
EDTA	AJAX Chemical	From Bio-store
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe	9065.2
Hanks' balanced salt solution (HBSS)	Sigma Aldrich, USA	H 9269
Kälberserum (Newborn)	Biochrom AG	S0123
Hepes-Pufferlösung (1M) (50x)	Biochrom, Berlin	L1613
L-Ascorbic Acid Phosphate Magnesium Salt n-Hydrate	Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japan	013-12061
L-Glutamin (200 mM)	Biochrom, Berlin	K0282
NEAA (100 x)	Biochrom, Berlin	K0293
Nonidet NP40	ICN, USA	155942-49
Phosphat Buffered Saline (PBS)-Lösung ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺	Biochrom, Berlin	L1823
Penicillin/Streptomycin 10.000E/10.000 μ g/ml (Lyophilisiert)	Biochrom, Berlin	A2212
Triton 100-X	Sigma, USA	T-9284
Trypsin (Type III)	Sigma Chemical	T-8253

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien.

4.2 Testmaterialien

Vier neue resorbierbare Calciumalkaliorthosphat-Keramik-Materialien (Berger et al. 1995a, Berger et al. 1995b, Berger et al. 2003, Schneider et al. 1994) wurden im Vergleich zu aktuell klinisch eingesetzten Knochenersatzmaterialien (β -TCP, bioaktives Glas 45S5) untersucht. In Tabelle 5 sind die Zusammensetzungen der einzelnen Materialien aufgeführt. Diese sind glasig-kristalline-Materialien mit einer höheren Löslichkeit als β -TCP und ihre Hauptkristallphase besteht entweder aus der neuen Phase Ca₂KNa(PO₄)₂ (Berger et al. 1995b, Berger et al. 2003, Schneider et al. 1994) oder aus Ca₁₀[K/Na](PO₄)₇ (Berger et al. 2003). 3 Materialien besitzen die kristalline Phase Ca₂KNa(PO₄)₂ mit einem kleinen amorphen Anteil, welcher entweder aus Magnesium-Kaliumphosphat (GB14) oder Siliziumphosphat besteht (GB9 and GB9/25). Des Weiteren wurde das Material 352i, ein Calciumphosphat mit einer kristallinen Phase aus Ca₁₀[K/Na](PO₄)₇ getestet: GB9/25 enthält ebenfalls einen kleinen Anteil an kristallinen und amorphen Diphosphaten (Ca₂P₂O₇), was GB9 nicht besitzt (Knabe et al. 1998, Knabe et al. 2004). Die Kristallbildung entsteht spontan aus der Schmelze und

daher lassen sich diese Materialien einfach herstellen. Die Lösungsrate der Calciumalkaliorthophosphate hängt von der Menge des hinzugefügten MgO, SiO₂ und P₂O₅ ab. In einer physiologischen Lösung (0.2M Tris-HCl) lösen sich GB14, GB9, GB9/25 und 352i schneller als TCP (Berger et al. 1995a, Berger et al. 2003). GB14-, GB9-, GB9/25- und 352i-Scheiben wurden aus CaHPO₄, Na₂CO₃, K₂CO₃, MgCO₃, SiO₂, und H₃PO₄ hergestellt. Diese Bestandteile wurden gemischt und bei 1550°C für 2 Stunden geschmolzen. Das erhaltene Material wurde gebrochen, um ein Granulat herzustellen. Die Materialien β -TCP, GB14, GB9, GB9/25 und 352i wurden durch eine Komprimierung der Granulate (Korngröße 40 μ m) gewonnen und wurden dann durch Sinterung zu Scheiben von 10 mm Durchmesser verarbeitet.

Material	CaO	P ₂ O ₅	Na ₂ O	K ₂ O	MgO	SiO ₂	Ca ₃ (PO ₄) ₂
GB14	30.67	43.14	9.42	14.32	2.45		
GB9	32.25	40.81	8.91	13.54	2.57	1.92	
GB9/25	29.25	44.81	8.41	13.04	2.57	1.92	
352i	40-45	45-48	5-8	1-2	1-1.5	1-2	
TCP							100
Bioglas 45S5	24.5	6.0	24.5			45.0	

Tabelle 5: Chemische Zusammensetzung (in Gew%) der neuen Calciumalkaliphosphatglaskeramiken, TCP und Bioglas 45S5. TCP: Tricalciumphosphat

Bezeichnung des Testmaterials	Hersteller	verwendete Abkürzung
AW-Si	Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung	352i
GB-14	Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung	GB14
GB9/25	Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung	GB9/25
GB9	Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung	GB9
B-TCP (Cerasorb®)	Curasan AG, Kleinostheim	TCP
Bioglass 45S5 (Biogran®)	Implant Innovations Deutschland GmbH, Karlsruhe	BG
β -TCP M (multiporöses Cerasorb® M)	Curasan AG, Kleinostheim	Cerasorb M

Tabelle 6: Bezeichnungen der Testmaterialien

4.3 Eukaryonte Zellen

Eukaryonte Zellen
Saos-2 (humane Osteosarkomzell-Linie)

Tabelle 7: Verwendete Zelllinie

4.4 Labormaterial

Material	Firma	Katalog-Nummer
12-Zellkultur-Loch-Platten	Nunc, Wiesbaden	150628
96-Zellkultur-Mikrotiter- Platten	Costar, USA	3596
Falcon-Röhrchen 50ml	Nunc, Wiesbaden	373687
Falcon-Röhrchen 15ml	Nunc, Wiesbaden	374632
Kulturflaschen mit Filter (75 cm ²)	Nunc, Wiesbaden	156472
Kulturflaschen mit Filter 25 cm ²	Nunc, Wiesbaden	3013
Pipette Eppendorf Reference variabel (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg	4910 000.018, 4910 000.042, 4910 000.069
Reaktionsgefäße mit Verschluss (0,5ml; 1,5ml; 2ml)	Eppendorf, Hamburg	0030 121.147; 0030 120.159; 0030 120.094
Sterile Filterpipetten-Aufsätze	Nunc, Wiesbaden	2065E

Tabelle 8: Labormaterial

4.5 Geräte

Name	Hersteller
Clements Orbital 900 Centrifuge	Phoenix Clements 900 Orbital, Phoenix, Australia
Hommel T 8000 Oberflächen-Profil- Meß-System	Hommel, Inc., Germany
SPECTRA MAX 340 PC Platten Leser	Molecular Devices, Sunnyvale, USA
Umkehrmikroskop	
Variofuge	
Zellkultur-Brutschrank	

Tabelle 9: Geräte

4.6 Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Markierung	Firma (Katalog-Nr.)	Verdünnung
Kaninchen-anti-Maus-F(ab) ₂ -Fragment	Biotin	Dako Cytomation, Dänemark (E413)	1:200

Tabelle 10: Sekundärantikörper

4.7 Kits

Name des Kits	Firma
Streptavidin	Dako Cytomation, Dänemark
Biotinylierte alkalische Phosphatase	Sigma
p-NPP	Sigma

Tabelle 11: Verwendete Kits

4.8 Primärantikörper

Antikörper zum Nachweis von	Wirt	Klonalität	Firma/ Bereitsteller	Katalog-Nummer	Verdünnung
Alkalische Phosphatase	Maus	monoklonal	Sigma	A2951	1:100
Kollagen Typ 1	Maus	monoklonal	Chemicon	AB745	1:100
B-Actin	Maus	monoklonal	Sigma	A5441	1:3000
Humanes Osteopontin	Kaninchen	polyklonal	National Institute for Health	LF-123	1:200
Osteonectin	Kaninchen	polyklonal	National Institute for Health	BON-I	1:200
Bovines Osteocalcin	Kaninchen	polyklonal	National Institute for Health	LF-32	1:200
Humanes Bone Sialoprotein	Kaninchen	polyklonal	National Institute for Health	LF83	1:200

Tabelle 12: Auflistung der verwendeten Primärantikörper. Die Primärantikörper wurden in der Spezies Maus oder Kaninchen hergestellt und reagieren bzw. kreuzreagieren mit den jeweiligen humanen Proteinen.

5. Methoden

5.1 Zellkultur und Zellaussaat

Als Zelllinie verwendeten wir die humane Osteosarkomzelllinie SaOS-2. Da dies eine Tumorzelllinie ist, hat sie ein schnelles Wachstum und steht somit für eine ausreichende Anzahl von Experimenten zur Verfügung. Als Nachteil ist hier zu vermerken, dass diese Zellen genetische Veränderungen aufweisen, die potentiell auch die Osteogenese beeinflussen könnten und somit nicht den physiologischen Umständen entsprechen könnten. Als Alternative würde beispielsweise eine humane Primärkultur von Osteoblasten, welche mittels einer Knochenmarksstanze aus dem Beckenkamm oder aus dem Femurkopf gewonnen werden, in Frage kommen. Dies wurde am Anfang dieser Arbeit versucht. Jedoch zeigten sich diese Zellen sehr anfällig für Infektionen mit Bakterien und Pilzen. Des Weiteren konnte nicht eine ausreichende Anzahl von Zellen mit dieser Methode gewonnen werden, so dass wir die SaOS-2-Zellen für unsere Experimente verwendeten. Die Zellen wurden in Wachstumsmedium (Tabelle 13) mit in einem Zellinkubator bei 37°C, 100 % Luftfeuchtigkeit, 95 % Sauerstoff und 5 % Kohlendioxid kultiviert. Das Medium wurde dreimal wöchentlich gewechselt. Bei Konfluenz der adhärent wachsenden Zellen wurden diese passagiert, indem sie mit PBS (calcium- und magnesiumfrei) gewaschen und anschließend mit 2 ml Trypsinlösung (0,1% Trypsin mit 0,2 mM EDTA) für eine 25 cm² große Kulturflasche versetzt wurden.

Medium	Zusätze
Alpha-MEM	10 % Fetales bovines Serum 25 mM HEPES-Puffer 2 mM L-Glutamin 30 µg/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin 1 x NEAA

Tabelle 13: Wachstumsmedium für die SaOS-2-Zellen

Danach wurde die Flasche für 2 Minuten bei 37°C inkubiert, bis sich die meisten Zellen durch leichtes Beklopfen der Flasche von der Oberfläche ablösen ließen. Die Zellsuspension wurde umgehend in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei Raumtemperatur bei 3000 rpm zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde mit serumfreiem Medium resuspendiert und gewaschen. Um die Zellen weiter zu

kultivieren, wurden diese erneut zentrifugiert und das Pellet wurde in 1 ml Wachstumsmedium aufgenommen und in eine 75 cm² Flasche ausgesät.

Die Zellen, welche für die Experimente verwendet wurden, wurden in einer definierten Zell-Zahl ausgesät. Dafür wurde das Zellpellet ebenfalls in 1 ml serumfreien Medium resuspendiert. Für die Zählung wurden 50 µl der Zellsuspension mit einer Trypan-Blau-Lösung (0,5%) in einem Verhältnis von 1:10 verdünnt und mit einem Hämazytometer gezählt. Es wurde dann eine Zell-Lösung mit einer Konzentration von 5×10^4 Zellen pro ml ausgesät.

Testmaterialien mit einem Durchmesser von 10 mm wurden in 48er-Loch-Polystyrene-Platten platziert und mit 500 µl Kulturmedium für 24 Stunden vorinkubiert. Danach wurden die Zellen in einer Konzentration von $2,83 \times 10^4$ Zellen pro cm² auf den verschiedenen Testmaterialien ausgesät. Jeweils 6 wells wurden für jedes Testmaterial und für jeden Zeitpunkt ausgesät. Danach wurden die Zellen für den festgelegten Zeitraum bei 37°C inkubiert.

5.2 Quantitative Immunocytochemie

A. Präparation der Zellen	<p>Ablösen der Zellen von den Testmaterialien durch Zugabe von 1 ml of 0,1 % (w/v) Trypsin mit 0,2 mM EDTA in 1 X PBS zu jedem Loch und Inkubation für bei 37 °C für 2 Minuten</p> <p>Waschen der Zellen mit Wachstumsmedium durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 1200 rpm und Resuspension in warmen PBS</p> <p>Überprüfung der Vitalität der Zellen mittels Trypan-Blau (<98 %)</p> <p>Zellzählung mittels Hämazytometer</p> <p>Herstellung einer Zell-Lösung mit einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml PBS und Aussaat von 100 µl in 96er-Polystyrene-Mikrotiter-Platten</p> <p>Zentrifugation der Platten bei 1200 rpm für 10 Minuten in einer Clements Orbital 900 Centrifuge und Aspiration des Überstandes mit einer feinen Nadel</p>
B. Fixierung der Zellen	<p>Inkubation mit Methanol/Aceton (9:1) für 1 Minute</p> <p>Trocknen der Zellen auf den Platten mit einem Umluft-Inkubator bei 37 °C für 30 Minuten bis 1 Stunde</p>
C. Permeabilisierung der Zellmembran	<p>Inkubation mit 0,25 % Triton 100-X, 0,25 % Nonidet NP40 für 5 Minuten</p>
D. Waschen	<p>2 x Waschen mit 1 x PBS in 0,05 % Triton X-100</p>
E. Blockierung	<p>in 2 % BSA in HBSS für 15-30 Minuten, danach absaugen und verwerfen</p>

F. Primärantikörper	Inkubation mit Primärantikörper-Lösung (50 µl) mit entsprechender Verdünnung (Tab. 5) in 1 % BSA in HBSS über Nacht
G. Waschen	Antikörper-Lösung absaugen und verwerfen. 4 x Waschen in 1 x PBS mit 0,05 % Triton X-100
H. Sekundärantikörper	Inkubation mit Sekundärantikörper-Lösung (50 µl) mit einer Verdünnung von 1:200 in 1 % BSA in HBSS für 30 Minuten
I. Waschen	Wie Schritt D.
J. Waschen mit Puffer 1	2 x Waschen mit Puffer 1 (0,4 g BSA , 1,25 ml Triton X-100 in 2 ml 1 x PBS)
K. Streptavidin	Inkubation mit Streptavidin (DAKO Detektierungs-Kit) 1:200 verdünnt in Puffer 1 für 10 Minuten (50 µl/Loch)
L. Waschen	3 x Waschen in Puffer 1
M. Biotin-markierte Alkalische Phosphatase	Inkubation mit Biotin-markierte Alkalische Phosphatase 1:200 verdünnt in Puffer 1
N. Waschen	2 x Waschen in Puffer 1 2 x Waschen in Puffer 2 (Puffer 1 mit 0,05 % Triton X-100)
O. PNPP-Lösung	Inkubation mit 100 µl PNPP-Lösung bei 37°C für 20 Minuten (PNPP-Lösung: 1 Tablette Alkalische Phosphatase in 5 ml Puffer 2 auflösen und auf 37°C bringen, danach Levamizol in Verdünnung von 1:200 hinzufügen)
P. Stoppen der Reaktion	Hinzufügen von 100 µl 0,5 M NaOH
Q. Messung	Messung im Platten-Leser bei 405 nm

Tabelle 14: Protokoll für die quantitative Immunzytochemie

5.3 Statistische Auswertung

Insgesamt wurden zwei Versuchsdurchläufe durchgeführt, in denen 7 Knochenersatzmaterialien getestet wurden. Die Messungen wurden in Quadruplikaten durchgeführt. Zunächst wurden von den Rohwerten die Werte der Negativkontrolle subtrahiert. Danach wurden die Daten zur β -Actin-Expression normalisiert, indem sie durch den Wert der Positivkontrolle (β -Actin) dividiert wurden. Somit wurden die Proteinexpressionsdaten sowohl zur Zellzahl als auch zur β -Actin-Expression normalisiert. Es wurden dann der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Zum Vergleich der Testmaterialien untereinander wurde der *student's t*-Test durchgeführt. Signifikanz wurde bei $p < 0,05$ angenommen.

5.4 Bestimmung der Oberflächenrauheit der Knochenersatzmaterialien

Die Oberflächenrauheit der verschiedenen Knochenersatzmaterialien wurde mittels Profilometrie (UBM microfocus surface-measuring system, UBM Inc., Ettlingen, FRG) bestimmt. Folgende Parameter wurden dabei verwendet: Ra (Arithmetisches Mittel der Werte der Abweichung des Oberflächenprofils von der Mittellinie), Rt (maximaler Wert vom tiefsten bis zum höchsten Punkt) sowie Rz(DIN) (Durchschnitt von 5 aufeinander folgenden Werten des Rauheitslevels, welches definiert ist als der Abstand zwischen der Spitze des höchsten Punktes und der Boden des tiefsten Punktes).

6. Ergebnisse

6.1 Oberflächenrauheit der Knochenersatzmaterialien

Tabelle 15 führt die Ergebnisse der Messung der Oberflächenrauheit der einzelnen Knochenersatzmaterialien auf. In der Abbildung 2 sind rasterelektronische Aufnahmen dieser dargestellt. Aufgrund des unterschiedlichen Herstellungsprozesses besitzen TCP, GB14, GB9, GB9/25 und 352i signifikant höhere Oberflächenrauheit als BG Materialien.

Biomaterial	R_z (Mittelwert in μm)	R_a (Mittelwert in μm)
TCP	13,89	2,30
GB14	13,03	2,17
GB9	13,37	2,21
GB9/25	13,24	2,18
352i	13,43	2,22
BG	4,02	0,43

Tabelle 15: Oberflächenrauheit der verschiedenen Knochenersatzmaterialien.

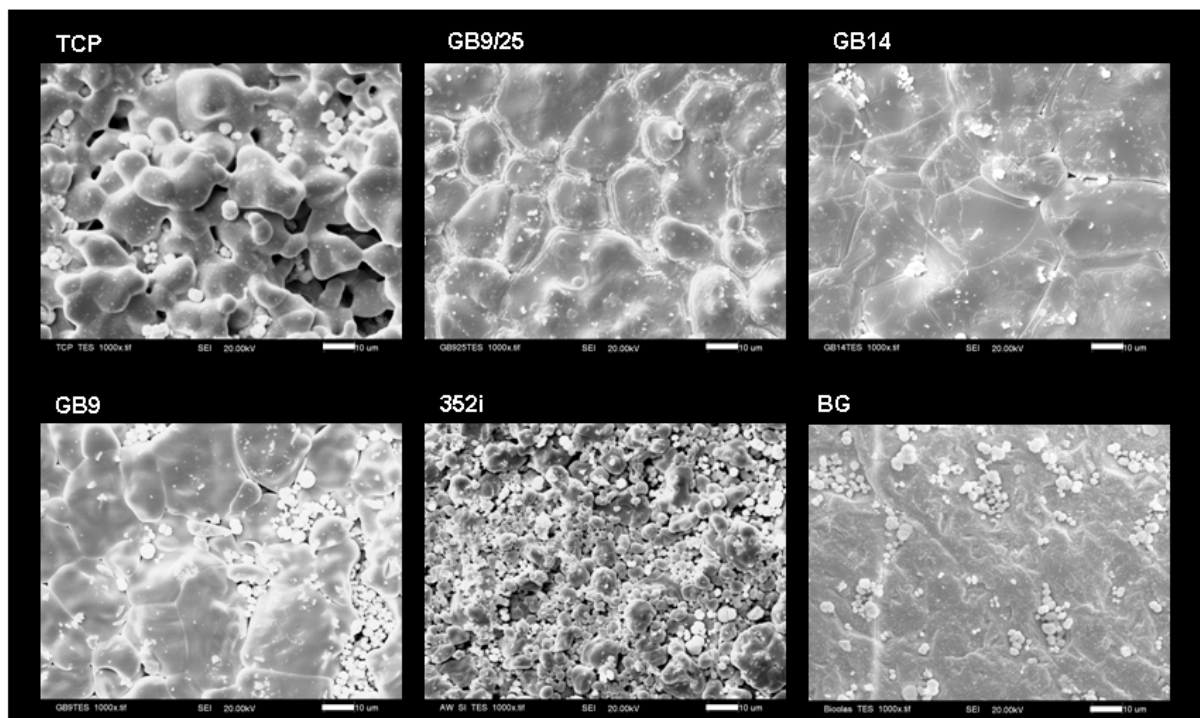


Abbildung 2: Rasterelektronenmikroskop-Aufnahmen der verschiedenen Knochenersatzmaterialien nach 24stündiger Inkubation in Zellkulturmedium mit Serum. 1000fache Vergrößerung. Weißer Skalierungsbalken entspricht 10 μm . Die

getrockneten Materialien wurden nach Goldbesputterung mittels einer CamScan MaXim unter Verwendung von ansteigenden Spannungswerten bis zu 20 kV untersucht.

6.2 Zellproliferation in Abhängigkeit von den Knochenersatzmaterialien

Die Zellproliferation wurde durch Zellzählung nach 3, 4, 14 und 21 Tagen bestimmt. Die Zellen zeigten auf allen Knochenersatzmaterialien ein kontinuierliches Wachstum (Abb. 2). Nach 21 Tagen erreichte die Zellzahl auf GB9 höhere Werte als auf den anderen Materialien.

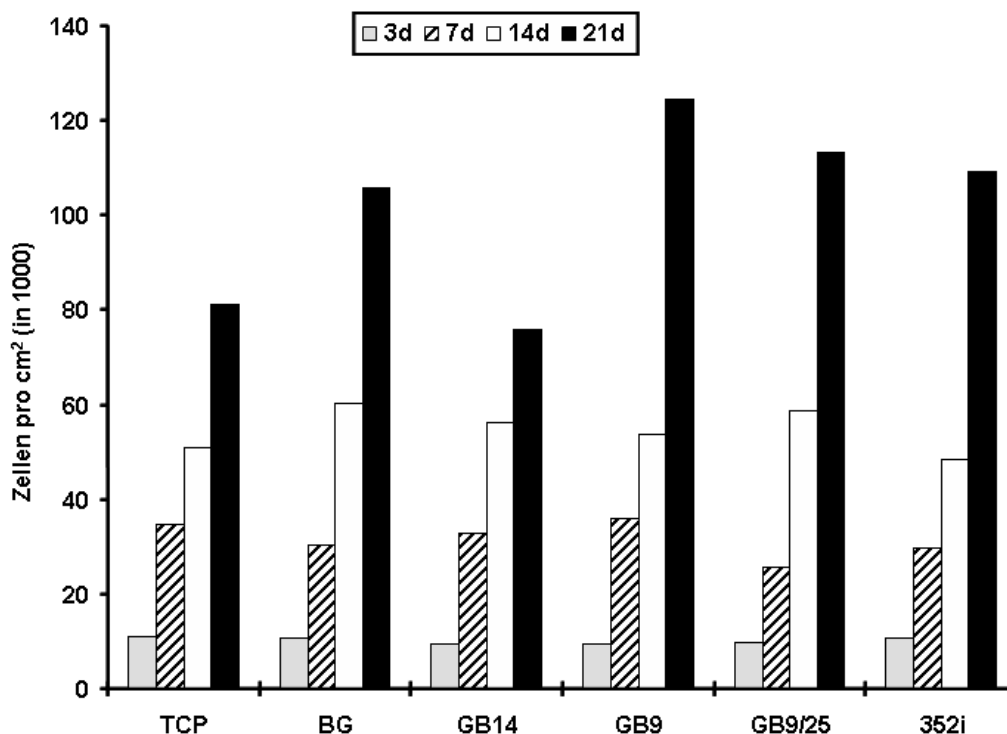


Abbildung 2: Bestimmung der Zellproliferation durch Zellzählung nach 3, 7, 14 und 21 Tagen Inkubation in Abhängigkeit der verschiedenen Knochenersatzmaterialien.

6.3 Zelldifferenzierung nach 3 Tagen

Am 3. Tag zeigten SaOS-Zellen, welche auf GB9 kultiviert wurden, eine signifikant höhere Proteinexpression für ON und BSP im Vergleich zu den anderen Materialien ($p < 0,0006$, Abb. 4). Zusätzlich war die Proteinexpression für Col I und OP signifikant höher, wenn Zellen auf GB9 wuchsen als wenn Zellen auf BG, GB9/25 und 352i

kultiviert wurden ($p < 0,002$). Darüber hinaus wurde eine signifikant höhere ALP-Expression bei den neuen Biomaterialien GB9/25, 352i und BG im Vergleich zu GB14, GB9 und TCP festgestellt ($p < 0,002$).

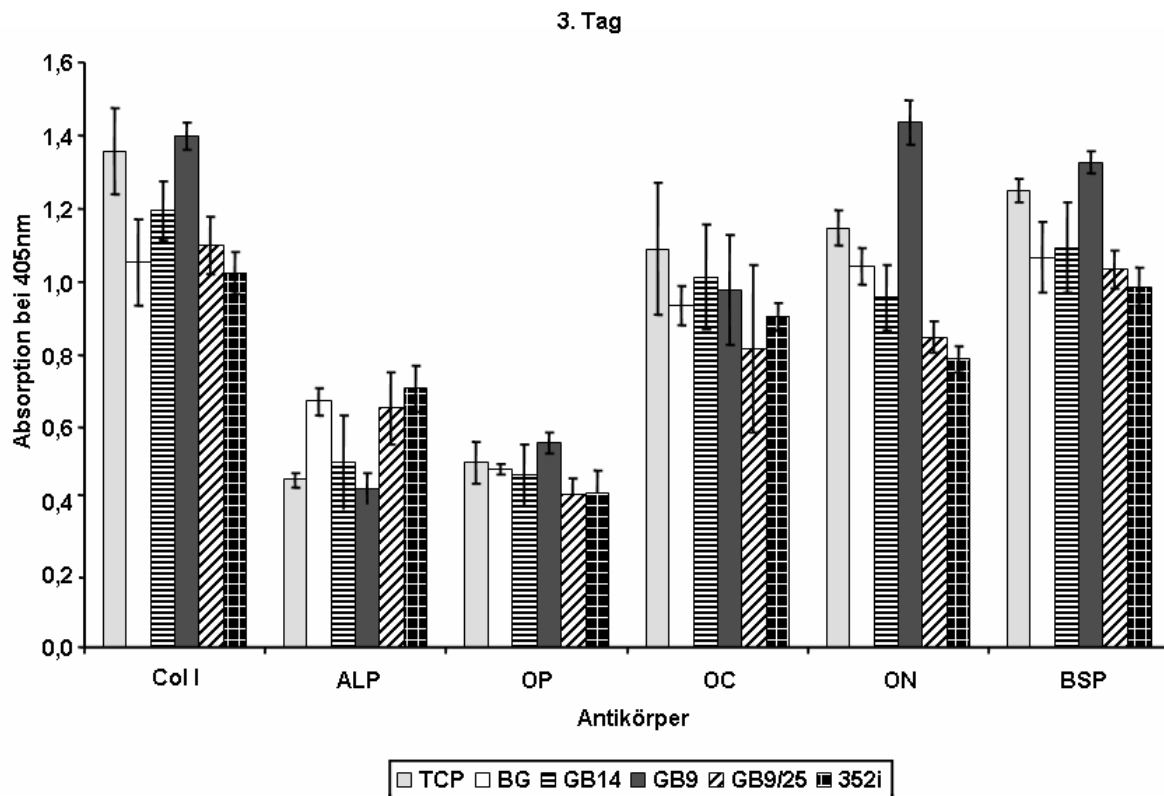


Abbildung 3: Proteinexpression in den SaOS-2-Zellen nach einer Kultivierungszeit von 3 Tagen auf den verschiedenen Knochenersatzmaterialien.

6.4 Zelldifferenzierung nach 7 Tagen

Am 7. Tag war die Proteinbildung in den Zellen auf BG und GB9 signifikant höher für Col I, ON und BSP als in den Zellen, welche auf den anderen Materialien kultiviert wurden ($p < 0,003$, Abb.5). Die gleiche Beobachtung wurde bei dem Vergleich der Expression von Col I, ON, BSP in Zellen auf GB9, GB9/25 und GB14 im Vergleich zu TCP gemacht ($p < 0,002$). Weiterhin zeigten Zellen, welche auf Calcium-Alkali-Orthosphosphat-Materialien wuchsen, eine signifikant höhere Expression für OP als Zellen, die auf TCP wuchsen ($p < 0,006$). Die Proteinexpression für ALP war für alle

Biomaterialien ähnlich. SaOS-2-Zellen, kultiviert auf BG, zeigten signifikant höhere Level von OC im Vergleich zu GB9, GB8/25, TCP und 352i ($p < 0,002$). Eine höhere OC-Expression wurde in Zellen auf GB14 und GB9 im Vergleich zu Zellen auf 352i gefunden ($p < 0,006$).

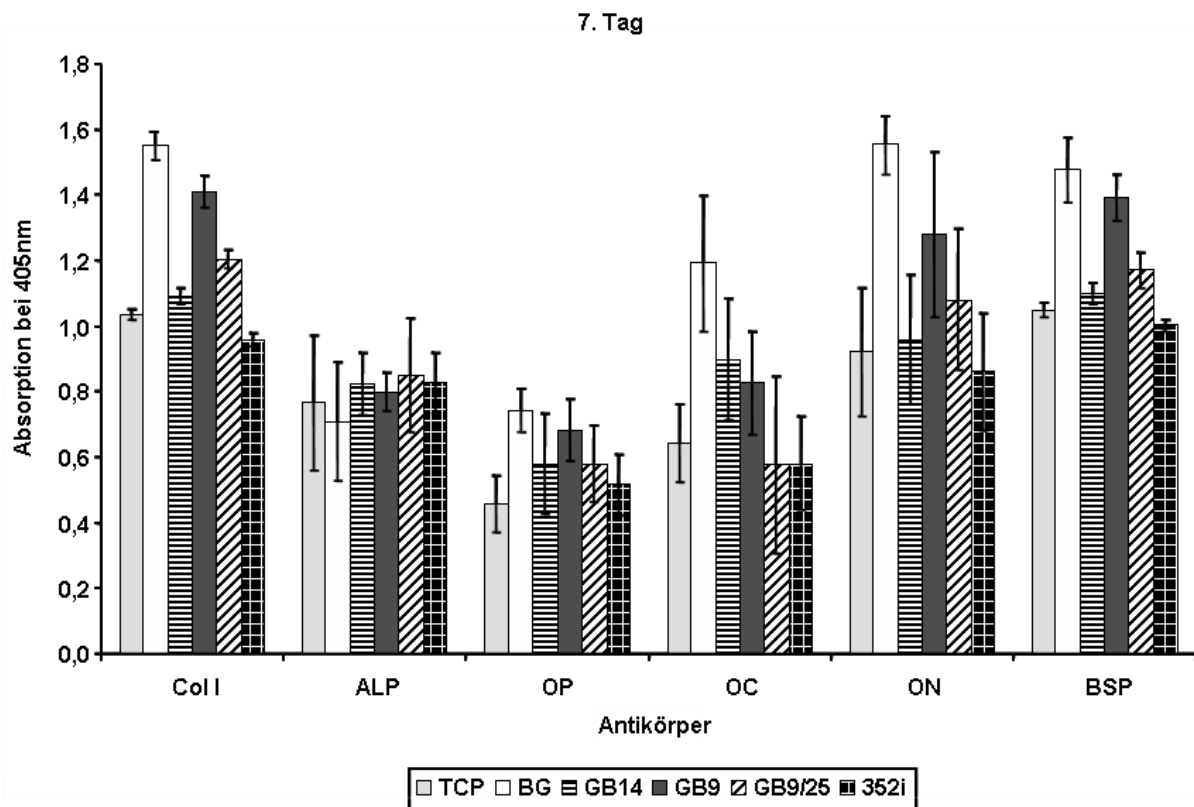


Abbildung 5: Proteinexpression in den SaOS-2-Zellen nach einer Kultivierungszeit von 7 Tagen auf den verschiedenen Knochenersatzmaterialien.

6.5 Zelldifferenzierung nach 14 Tagen

Am Tag 14 wurden signifikant höhere Proteinlevel von Col I, ON, BSP in Zellen auf GB9 im Vergleich zu Zellen auf den anderen Biomaterialien gefunden ($p < 0,0095$, Abb.6). Zellen, welche auf GB9 kultiviert wurden, zeigten ebenfalls eine signifikant höhere Expression von OC im Vergleich zu TCP. Zusätzlich wurde bei BG eine signifikant höhere Expression von Col I, ON, und BSP im Vergleich zu den Materialien GB9/25, GB14, 352i und TCP gefunden. Die Proteinexpression in den Zellen für Col I, OP, ON

und BSP war höher in den Zellen, welche auf Calcium-Alkali-Orthophosphatkermaiken kultiviert wurden, im Vergleich zu denen, die auf TCP wuchsen. Dieser Unterschied war jedoch nur im Vergleich für Col I und BSP statistisch signifikant ($p < 0,004$). Auch war das Zellwachstum höher auf GB9/25, GB14 und GB9 als auf TCP-Oberflächen. Weiterhin wurde eine signifikant höhere Proteinexpression für ALP auf GB9 und GB9/25 im Vergleich zu BG gefunden ($p < 0,01$).

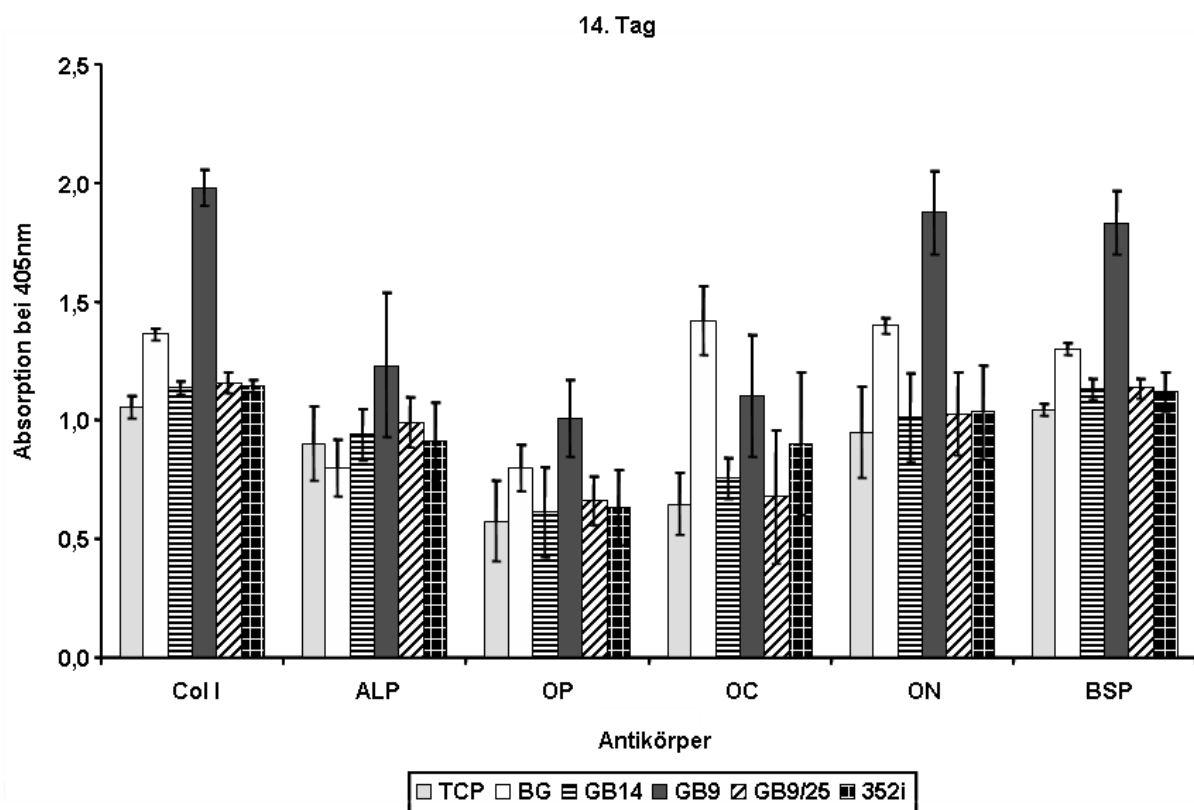


Abbildung 6: Proteinexpression in den SaOS-2-Zellen nach einer Kultivierungszeit von 14 Tagen auf den verschiedenen Knochenersatzmaterialien.

6.6 Zelldifferenzierung nach 21 Tagen

Am 21. Tag wurde auf dem Material GB9 die höchste Zellzahl (Abb.2) sowie die signifikant höchste Expression von Col I und ON festgestellt ($p < 0,002$, Abb.7). Ebenso war die OC Bildung in Zellen auf GB9 größer im Vergleich zu 352i und TCP ($p < 0,0003$). Weiterhin wurden in Zellen, welche auf GB9/25 kultiviert wurden, eine höhere Zellzahl

und signifikant höhere Level von Col I und BSP als auf den GB14, BG-, 352i- und TCP-Materialien gefunden ($p < 0,005$) ebenso signifikant höhere Level von ON im Vergleich zu Zellen auf GB14, 352i und TCP ($p < 0,0003$). Zudem war die Bildung von OC und OP größer in Zellen, welche auf GB9/25 kultiviert wurden, im Vergleich zu Zellen, welche auf TCP wuchsen ($p < 0,0123$). Die Proteinproduktion in SaOS-2-Zellen für Col I, OP, OC, ON und BSP war höher als in Zellen, welche auf BG kultiviert wurden ($p < 0,003$) und für GB14 war diese größer als für 352i und TCP. Hingegen war die Zellzahl niedriger, wobei in Bezug auf GB14 diese Unterschiede nur statistisch signifikant für Col I, ON und BSP ($p < 0,003$) waren. Zellen, welche auf 352i wuchsen, zeigten höhere Expressionslevel für Col I, OP, ON und BSP als Zellen auf TCP. Dabei war jedoch nur der Unterschied für BSP statistisch signifikant ($p < 0,003$).

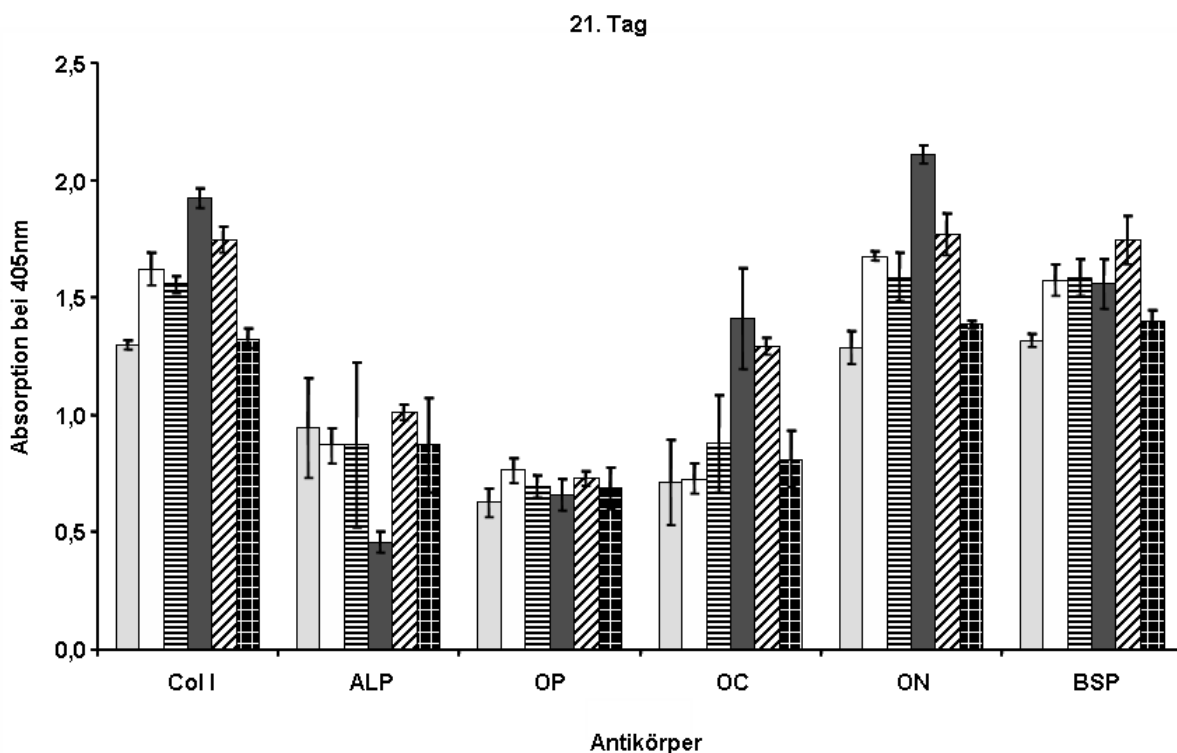


Abbildung 7: Proteinexpression in den SaOS-2-Zellen nach einer Kultivierungszeit von 21 Tagen auf den verschiedenen Knochenersatzmaterialien.

6.7 Zelldifferenzierung im Vergleich von TCP (Cerasorb) zu TCP mit Multiporosität (Cerasorb M)

SaOS-2-Zellen zeigten sowohl auf Cerasorb als auch auf Cerasorb M ein kontinuierliches Wachstum (Abb. 8).

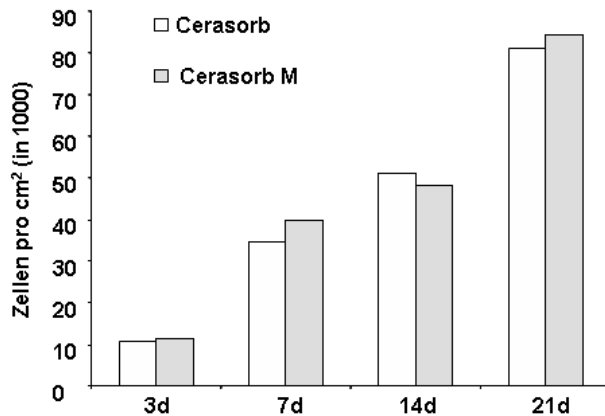


Abbildung 8: Bestimmung der Zellproliferation durch Zellzählung nach 3, 7, 14 und 21 Tagen Inkubation in Abhängigkeit von Cerasorb und Cerasorb M.

Am dritten Tag wurden auf dem Material Cerasorb M signifikant höhere Werte für BSP im Vergleich zu Cerasorb festgestellt ($p < 0,001$, Abb.9). Col I wurde signifikant verstärkt in Zellen, welche auf Cerasorb M kultiviert wurden, exprimiert ($p < 0,007$). Des Weiteren wurden erhöhte Level für ALP, OP und OC auf Cerasorb M gefunden ($p < 0,02$).

Nach 7 Tagen wurden erhöhte Zellzahlen sowie erhöhte Level für Col I, OC und BSP bei Cerasorb M ($p < 0,0005$) im Vergleich zu Cerasorb gemessen. Die Expression von ON war ebenso bei Cerasorb M erhöht ($p < 0,001$). Kein Unterschied im Expressionslevel wurde für OC und OP festgestellt.

Am 14.Tag wurde nur für BSP ein signifikant erhöhtes Expressionslevel bei Cerasorb M gefunden ($p < 0,02$), wobei die Zellzahlen etwas geringer waren als im Vergleich zu Cerasorb.

Nach 21 Tagen war die Expression von Col I, OP und BSP signifikant höher in Zellen, welche auf Cerasorb M kultiviert wurden ($p < 0,0005$), wobei die Zellzahl bei Cerasorb etwas höher war.

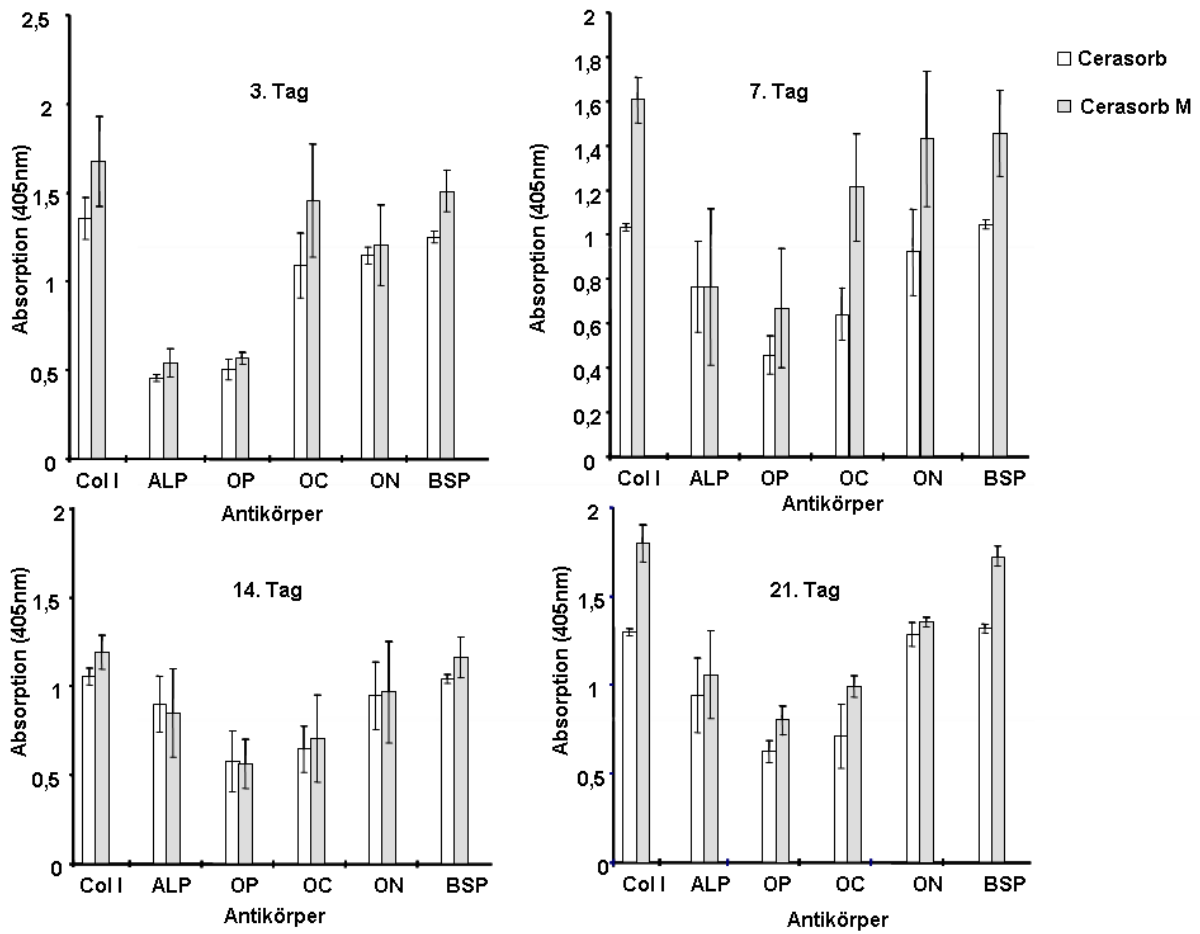


Abbildung 9: Proteinexpression in den SaOS-2-Zellen im Vergleich von Cerasorb zu Cerasorb M nach 3, 7, 14 und 21 Tagen.

7. Diskussion

7.1 Einfluss der verschiedenen Knochenersatzmaterialien auf die Osteoblastendifferenzierung

Die Osteoblastendifferenzierung kann in drei biologische Perioden eingeteilt werden: die zelluläre Proliferation, die zelluläre Reifung und die Matrix-Mineralisierung (Aubin et al. 2000, Fisher et al. 1985). Es ist bekannt, dass differenzierende Osteoblasten Col I, AP und Matrixproteine wie ON, OC, OP und BSP synthetisieren und sezernieren (Aubin et al. 2000, Fisher et al. 1985, Xynos et al. 2001). Diese Knochenmatrixproteine haben sich als osteogene Marker, welche die verschiedenen Stadien der Osteoblastendifferenzierung anzeigen, erwiesen (Aubin et al. 2000).

Col I wird während der initialen Periode der Proliferation und der Extrazellulär-Matrix-Biosynthese exprimiert. Hingegen wird die ALP während der postproliferativen Periode der Extrazellulär-Matrix-Reifung exprimiert. Die Expression von OP, ON, OC und BSP findet später, während der dritten Periode der Extrazellulär-Matrix-Mineralisierung, statt (Ducheyne et al. 1994, Xynos et al. 2001).

In dieser Arbeit wurde das Expressionsprofil dieser Marker in humanen osteogenen Zellen quantitativ in Abhängigkeit von den verschiedenen Knochenersatzmaterialien bestimmt. Dabei sollten insbesondere die neuen schnell resorbierbaren Calciumalkaliorthophosphate mit den bereits klinisch eingesetzten Knochenersatzmaterialien (β -TCP und BG) verglichen werden.

Die verschiedenen getesteten Calciumorthophosphate beeinflussten signifikant das zelluläre Wachstum und die Expression der Markerproteine. GB9 zeigte den größten Effekt auf die Proliferation und die Differenzierung der SaOS-2-Zellen, indem es die Formation sowohl von Col I, als auch die Expression von OP, BSP und ON an den Tagen 3,7 und 14 induzierte, was ein spätes Stadium der Osteoblasten-differenzierung anzeigt. Dieses Muster blieb am Tag 21 für Col I, ON und OC erhalten. Es wurde bereits mehrfach gezeigt, dass die Expression von OP, ON und BSP im Zusammenhang mit der Osteoid-Produktion und Matrixmineralisierung steht (Aubin et al. 2000, Ducheyne et al. 1994, Xynos et al. 2001). Diese Ergebnisse legen nahe, dass GB9 eine höhere Potenz besitzt, die Osteogenese und die Matrixmineralisation voranzutreiben als TCP, BG und die anderen Materialien.

GB9/25, BG und 352i induzierten eine verstärkte ALP-Expression im Vergleich zu TCP am dritten Tag, was den Übergang zwischen der proliferativen und der postproliferativen Phase anzeigt. Das lässt vermuten, dass diese Materialien fähig sind, eine schnelle Differenzierung von osteogenen Zellen in Osteoblasten im Vergleich zu TCP zu bewirken.

Nach 1 bis 2 Wochen wurde bei BG eine verstärkte Expression von COL I, BSP, ON und OC im Vergleich zu GB9/25, GB14, 352i, und TCP beobachtet.

Ebenfalls waren nach drei Wochen, ähnlich wie bei GB9, die Zellzahlen und die Col I-, BSP-, ON- und OC-Produktion bei BG höher als bei TCP und 352i. Diese Ergebnisse unterstreichen die Fähigkeit von BG, die Osteoblastendifferenzierung zu einem frühen Zeitpunkt zu induzieren. Diese Befunde sind in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von anderen Studien, welche zeigten, dass bioaktives Glas (45S5) die osteoblastische Zelldifferenzierung *in vitro* stimuliert (El-Ghannam et al. 1997, Ducheyne et al. 1999, Radin et al. 2005, Xynos et al. 2000, Yao et al. 2005).

Nach 7 Tagen wurde bei den Zellen, welche auf GB9/25 wuchsen, eine stärkere Expression von COL I und BSP im Vergleich zu TCP gemessen. Dieses Muster zeigte sich auch nach 14 Tagen und war mit einer verstärkten zellulären Proliferation im Vergleich zu TCP verbunden. Darüber hinaus wurde am 21. Tag, ähnlich wie bei GB9, BG, GB9/25, eine höhere Zellzahl und ein erhöhtes Expressionslevel für OP, ON, OC und BSP gefunden. Da diese Marker die späten Stadien der Osteoblastendifferenzierung anzeigen, lässt dieses Ergebnis vermuten, dass GB9/25 eine höhere Potenz zur Osteogenese und Matrixkalzifizierung besitzt als TCP.

Weiterhin wurde am 21. Tag ein höhere Zellzahl und eine höhere Expression von Col I und BSP bei GB9/25 im Vergleich zu GB14, 352i und BG bemerkt, was vermuten lässt, dass GB9/25 ein exzellentes Material zur Unterstützung von Osteogenese und Knochenregeneration darstellt.

An den Tagen 7, 14 und 21 wurde bei GB14 eine erhöhte Expression von Col I, ON und BSP im Vergleich zu TCP gefunden. Dies deutet an, dass GB14 die Expression des osteoblastischen Phänotyps stärker stimuliert als TCP.

Am Tag 3 induzierte 352i eine höhere ALP-Expression als TCP. Am Tag 7 exprimierten die Zellen auf 352i signifikant höhere Level von OP als auf TCP, währenddessen die Expression von ALP und OC ähnlich war. Weiterhin wurde am Tag 14 eine erhöhte Expression von Col I und BSP als bei TCP gemessen, was auch am Tag 21 erhalten blieb. Ähnliche Level von OP, OC und ON wurden an den Tagen 14 und 21 in Zellen auf 352i und TCP gefunden. Jedoch waren die Zell-Zahlen auf 352i nach 3 Wochen etwas höher. Diese Befunde lassen vermuten, dass das neue Calciumalkaliorthosphat 352i ähnlich gut, die Expression des osteoblastischen Phänotyps induziert, wie TCP.

In unserer Studie stimulierte GB9 am stärksten die Osteoblastenproliferation und – Differenzierung. Dies lässt vermuten, dass dieses Material die höchste Potenz zur Osteogenese und Matrixkalzifizierung besitzt. Unsere Beobachtungen für GB14 legen nahe, dass dieses einen größeren Effekt auf die Osteoblastendifferenzierung hat als TCP. Diese Beobachtungen sind in Übereinstimmung mit den Ergebnissen einer vorausgegangenen Studie (Knabe et al. 2004), in der primäre humane Knochenzellen und *in vivo* – Befunde nach Implantation von GB14 in den Kaninchen-Femur untersucht wurden. Histomorphometrische Untersuchungen zeigten, dass ein signifikant größerer Knochenkontakt nach 7,18 und 84 Tagen nach Implantation bei GB14 bestand im Vergleich zu Bioglaspartikeln sowie eine höhere Degradationsrate nach 84 Tagen. GB14-Partikel zeigten eine höhere Degradationsrate aufgrund von verschiedenen Prozessen, hauptsächlich durch Auswaschprozesse und Partikeldegradierung. Dies führt zu einer GBR indem die Balance zwischen Degradierung und Osteogenese gegeben ist (Müller-Mai et al. 1997). 84 Tage nach Implantation zeigten GB14-Partikel ein gutes Knochenbindungsvermögen, indem ein über 84%iger Knochenkontakt an der Oberfläche bestand (Müller-Mai et al. 1997).

352i unterstützte die Expression des osteoblastischen Phänotyps in ähnlichem Ausmaß wie TCP. Unsere Ergebnisse zeigen Evidenzen auf, dass dieses neue Calciumalkaliorthosphat biokompatibel *in vitro* ist und als ein neues Knochenersatzmaterial zukünftig in Betracht kommen könnte.

7.2 Vergleich der Fähigkeiten von TCP und β -TCP auf die Osteoblastendifferenzierung

β -TCP (Cerasorb[®] M) ist eine Neuentwicklung auf Basis von TCP (Cerasorb[®]). Es verfügt über eine interkonnektierende, offene Multiporosität mit Mikro-, Meso- und Makroporen (5 μ m - 500 μ m) und eine Gesamtporosität von ca. 65%. Die Granula sind polygonal, d.h. unregelmäßig geformt und begünstigen das Verkanten und die Verzahnung in der Defekthöhle. Mikrobewegungen werden weitgehend verhindert. Eine gesteigerte Osteokonduktivität entsteht durch die große Oberfläche mit hoher Rauigkeit. Des Weiteren sollen Dank der speziellen offenen Multiporosität eine aktive, ständige Zellversorgung sowie eine verkürzte Resorptionszeit (da die Struktur aus Mikro-, Meso- und Makroporen die zügige Durchbauung mit ortsständigem Knochen fördert) von Vorteil sein.

In dieser Studie untersuchten wir den Unterschied von TCP (Cerasorb) und TCP mit Mutiporosität (Cerasorb[®] M) auf die Osteogenese *in vitro*.

Die Expression von Col I war nach 7 und nach 21 Tagen signifikant höher auf Cerasorb M. Des Weiteren fanden wir eine stärkere Expression von OC (3. und 7. Tag) als auch für BSP (7., 14., 21.Tag) in den Zellen, welche auf Cerasorb[®] M kultiviert waren. Diese Ergebnisse legen nahe, dass TCP mit Multiporosität (Cerasorb[®] M) eine höhere Potenz besitzt, die Osteogenese und die Matrixkalzifizierung voranzutreiben als TCP (Cerasorb). Beyen et al. untersuchten den Einfluss der Porosität bei TCP und fanden heraus, dass die Porosität die osteogene Differenzierung *in vivo* sowie die Proliferation von mesenchymalen Stammzellen *in vitro* fördern. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen fanden sie jedoch keinen Unterschied auf die osteogene Differenzierung *in vitro* (Beyen et al. 2006). Histologische Untersuchungen von humanen Proben 6 Monate nach Sinusbodenaugmentation mit TCP-Partikeln zeigten, dass TCP-Partikel die Knochenregeneration fördern und einen stimulatorischen Effekt auf die Osteoblastendifferenzierung haben (Zerbo et al. 2001, 2004, 2005; Szabo et al. 2005). Es konnte gezeigt werden, dass TCP-Partikel Osteoprogenitorzellen anziehen, welche dann in die interkonnektierenden Mikroporen des Knochenersatzmaterial einwandern (Zerbo et al. 2004, 2005). Diese Zellen differenzierten dann zu Osteoblasten und führen zur Knochenneubildung. Weiterhin wurde eine gute Knochenbindung, eine

Knochenneubildung innerhalb des degradierten Knochenersatzmaterial beobachtet, sowie eine Expression der osteogenen Marker Col I, BSP, OC in der neu formierten Knochenmatrix in Kontakt mit den TCP-Partikeln gefunden (Ducheyne et al. 1993, Kokubo et al. 1992, Knabe et al. 2008). In einer kürzlich veröffentlichten histologischen Studie wurde der Einfluss von Cerasorb M mit Cerasorb ohne Multiporosität auf die Knochenbildung nach Sinusbodenaugmentation miteinander verglichen. 6 Monate nach Sinusbodenaugmentation war die Knochenbildung und die Matrixmineralisation stärker vorangeschritten bei Patienten, bei denen Cerasorb M verwendet wurde im Vergleich zu den Patienten, die mit Cerasorb ohne Multiporosität augmentiert wurden (Knabe et al. 2008) Dies steht im Einklang mit unseren in vitro Ergebnissen. Darüberhinaus war die Partikeldegradation in den apikalen Abschnitten signifikant vorangeschritten bei den mit Cersorb M augmentierten Patienten.

7.3 Einfluss der Oberflächenbeschaffenheit auf die Osteogenese

Neben der Chemie der Oberfläche spielt auch die Oberflächenmorphologie eine wichtige Rolle für die Interaktion zwischen Zelle und Biomaterial. Obwohl TCP, GB9, GB9/25, GB14 und 352i eine ähnliche Oberflächenrauheit besitzen, wurden signifikante Unterschiede in der Expression von osteogenen Markern in dieser Studie gefunden. Hingegen war die Expression des osteoblastischen Phänotyps auf BG trotz geringerer Oberflächenrauheit größer im Vergleich zu 352i und TCP. Diese Beobachtungen legen nahe, dass bei den hier untersuchten Knochenersatzmaterialien die zelluläre Differenzierung mehr durch die Zusammensetzung der chemischen Bestandteile des Knochenersatzmaterials, als durch die Oberflächenrauheit bestimmt wird.

7.4 Molekulare Grundlagen der Stimulierung der Knochenformation durch Knochenersatzmaterialien

Es ist bekannt, dass Calciumphosphat-Keramiken und Biogläser die Knochenbildung stimulieren (Ducheyne et al. 1999, Aubin et al. 1998). Die zu Grunde liegenden Mechanismen sind bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht vollständig aufgeklärt. In den letzten Jahren wurde versucht, die molekularen Wege an der Materialoberfläche sowie die Effekte auf die umgebenden Zellen und deren Signalwege zu entschlüsseln. Insbesondere spielen dabei zelluläre Aktivitäten, die zu einer Gewebeformation, Zellhaftung, Differenzierung und zur Bildung der Extrazellulärmatrix führen eine wichtige

Rolle. Bioaktive Keramiken induzieren eine lösungsvermittelten Oberflächenreaktion, nachdem sie in Kontakt mit biologischen Flüssigkeiten gekommen sind. Diese Reaktionen beinhalten Dissolution, Repräzipitation-, Ionenaustauschphänomene in Kombination mit Proteinadsorptionsphänomenen (Ducheyne et al. 1999, Radin et al. 2005, Davis et al. 1998). Eine wichtige Schlüsselfunktion ist die Bildung einer Karbonat-Apatit-Oberflächenschicht nach Einbettung in das biologische Gewebe (Davis et al. 1998, El-Ghannam et al. 1999). Ein weiterer wichtiger Aspekt ist, dass diese Oberflächenzusammensetzung und -struktur sowie die Serumproteinadsorption beeinflusst. In Studien wurde Evidenz gefunden, dass eine verstärkte zelluläre und Gewebeantwort auf bioaktive Keramiken im Zusammenhang mit einer verstärkten Fibronektinadsorption stehen (Keselowsky et al. 2003, Postiglione et al. 2004).

Interaktionen zwischen den Osteoblasten und dem Biomaterial werden wahrscheinlich primär über membranassoziierten Adhäsionsrezeptoren, welche zu der Integrin-Familie gehören, vermittelt (Gronowicz et al. 1996, Krause et al. 2000, Cowles et al. 2000, Hynes et al. 1992). Neben ihrer Rolle als Adhäsionsrezeptoren sind Integrine auch an der Signaltransduktion von der Extrazellulärmatrix zum Zellinneren beteiligt. Sie aktivieren Signalmoleküle, regulieren die Genexpression und modulieren die zelluläre Migration, Proliferation, Differenzierung und Apoptose (Krause et al. 2000, Cowles et al. 2000, Hynes et al. 1992, Grigoriou et al. 2005, Adams et al. 2003). Während viele Studien die zellulären Antworten auf bioaktive Keramiken untersuchten, ist wenig über die intrazellulären Vorgänge, welche in den Osteoblasten nach einem Kontakt mit bioaktiver Keramik passieren, bekannt.

In dieser Arbeit wurden deutliche Unterschiede zwischen der Expressionsstärke von osteogenen Markern in Zellen, welche auf unterschiedlichen Knochenersatzmaterialien kultiviert wurden, gefunden. Weiterhin konnten wir zeigen, dass die verschiedenen schnell resorbierbare Calciumalkaliorthosphat-Keramiken fähig sind, die Osteoblastendifferenzierung zu stimulieren. Welche intrazellulären Signalwege nach dem Anhaften der Osteoblasten an die bioaktiven Keramiken folgen und Unterschiede in der Osteoblastenaktivität hervorrufen sind jedoch unklar. Da intrazelluläre Signalwege die Proliferation und die Differenzierung beeinflussen, ist es wichtig diese Wege, welche durch eine Osteoblasten-Impantat-Interaktion hervorgerufen wird, zu verstehen (Cowles et al. 2000). Es ist bekannt, dass es durch die Interaktion zwischen

Osteoblasten und Knochenmatrixproteinen über Integrine zu einem Rearrangement der zytoskelettalen Komponenten und zu einer Aktivierung von spezifischen Signalproteinen, wie z. B. der fokalen Adhäsionskinase (FAK) kommt (Cowles et al. 2000). Neuere Studien konnten demonstrieren, dass es bei an Titan adhärierenden Osteoblasten zu einer Aktivierung der FAK sowie des Mitogen-aktivierende-Protein-Kinase-Signaltransduktionsweges kam, welche die zelluläre Differenzierung moduliert (Cowles et al. 2000). Des Weiteren spielt die Apoptose eine entscheidende Rolle (Adams et al. 2003). Eine Aktivierung der PI3K/Akt (Phosphatidylinositol-3-kinase/protein Kinase B) führt zu einer Aktivierung des Überlebenssignalweges und zu einer Depression der Apoptose (Risbud et al. 2005). Es wird erwartet, dass Biomaterialien, welche die Osteogenese stimulieren, diesen Signalweg aktivieren.

Es wird angenommen, dass die *in vitro*-Daten mit den *in vivo*-Daten korrelieren. Das würde bedeuten, dass eine verstärkte Osteoblastendifferenzierung *in vitro* zu einer besseren Knochenformation an der Knochen-Biomaterial-Interaktionsfläche führt. Um diese Hypothese zu testen, muss man die quantitative Genexpression der osteogenen Marker *in vitro* mit der Menge der neu formierten Knochen nach Implantation korrelieren. Des Weiteren sollte die Expression der Marker in histologischen Schnitten, welche von *in vivo* Experimenten erhalten wurden mit den *in vitro*-Daten verglichen werden. Zu diesem Zweck wurde in einer *in vivo*-Studie, in der Knochenersatzmaterialien, welche auch in dieser Arbeit untersucht wurden, in die Mandibula des Schafes implantiert (Knabe et al. 2006). Die histologische Auswertung findet derzeit statt.

8. Zusammenfassung

Knochenersatzmaterialien sollten die Eigenschaft haben, die Knochenbildung zu aktivieren. Dies ist möglich, indem eine Differenzierung von Knochenvorläuferzellen in Osteoblasten auf der Oberfläche dieser Materialien induziert wird. Die Differenzierung der Osteoblasten kann anhand von verschiedenen Expressionsmarkern untersucht werden. Untersuchungen des Effektes von Knochenersatzmaterialien auf diese Expressionsmarker geben somit Auskunft über das osteogene Potential des Materials. Die klinisch eingesetzten Tricalciumphosphate, wie β -TCP (Cerasorb) haben den Nachteil, dass sie ungenügend abgebaut werden, wie in verschiedenen histologischen Untersuchungen gezeigt werden konnte. Dies führte dazu, dass in jüngerer Vergangenheit verschiedene schnell resorbierbare Calciumalkaliphosphatglas-keramiken entwickelt wurden. Diese haben eine höhere Löslichkeit als β -TCP und können somit besser biodegradiert werden. Das Hinzufügen von zusätzlichen Phosphaten führt zu der Bildung von kristallinen oder amorphen Diphosphaten, welche eine höhere Löslichkeit als die Calciumorthophosphate besitzen. In dieser Arbeit wurde die Wirkung der schnell resorbierbaren Calciumalkaliphosphatglaskeramiken auf die osteogene Differenzierung einer Osteoblastenzelllinie untersucht. Alle hier getesteten Calcium-Phosphat-Knochenersatzmaterialien beeinflussten signifikant das zelluläre Wachstum und die Expression des osteoblastischen Phänotyps in SaOS-2-Zellen. Von den verschiedenen Knochenersatzmaterialien zeigte GB9 den größten stimulatorischen Effekt auf die osteoblastische Proliferation und Differenzierung. Das lässt vermuten, dass GB9 die höchste Osteogenesepotenz hat. Einen vergleichbaren stimulatorischen Effekt auf die Osteoblastendifferenzierung wie das bioaktive Glas 45S5 zeigte GB9/25, was nahe legt, dass GB9/25 ein vergleichbar gutes Knochenersatzmaterial sein könnte, um die Osteogenese und Knochenregeneration zu verbessern. Weiterhin zeigten GB14 und 352i eine ähnliche oder stärkere Expression des osteoblastischen Phänotyps im Vergleich zu TCP, so dass diese neueren Biokeramiken ebenfalls als potentielle Knochenersatzmaterialien in Betracht kommen. Weiterhin konnte in dieser Studie die Biokompatibilität der neuen Calciumalkaliorthophosphat-Materialien auf molekularer Ebene gezeigt werden.

9. Anhang

9.1 Curriculum vitae

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version
meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationen Knabe C, **Houshmand A**, Berger G, Ducheyne P, Gildenhaar R, Kranz I, Stiller M (2008): Effect of rapidly resorbable bone substitute materials on the temporal expression of the osteoblastic phenotype in vitro, *J Biomed Mater Res A* 84:856-868

**Aktuelle
Drittmittelprojekte**

Einsatz von schnell resorbierbaren Knochenzementen für die zahnärztliche Implantologie, Kieferchirurgie und die Unfallchirurgie und Bewertung der Wirkung dieser Zemente auf die osteoblastische Zelldifferenzierung in vivo. Programm zur Förderung von Forschung, Innovationen und Technologien (ProFIT).

MOZET - Modellierbare resorbierbare anorganischen Knochenzemente mit differenzierter Löslichkeit mit den Teilprojekten:

MOZET-BAM: Modellierbare anorganische Knochenzemente mit differenzierter Löslichkeit: Untersuchungen zum Abbindeverhalten unter simulierten physiologischen Bedingungen (BAM)

MOZET-Charité: Modellierbare anorganische Knochenzemente mit differenzierter Löslichkeit: Untersuchungen zum Einfluß auf die Osteogenese und Knochenregeneration von Konturdefekten in vivo (Charité Universitätsmedizin Berlin)

9.2 Literaturverzeichnis

Adams CS, Shapiro IM (2003): Mechanisms by which extracellular matrix components induce osteoblast apoptosis, *Connect Tissue Res* 44: Suppl 1:230-239. Review

Aubin JE (1998): Bone stem cells, *J Cell Biochem Suppl*:30-31:73-82. Review

Aubin JE: Osteogenic Cell Differentiation, In: Davies JE, editor. Bone Engineering. Toronto, Canada: em squared Inc, 2000:19-30

Aubin JE (2001): Regulation of osteoblast formation and function, *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* 2:81-94

Aufmkolk B, Hauschka PV, Schwartz ER (1985): Characterization of human bone cells in culture, *Calcif Tissue Int* 37:228-235

Belser UC, Mericske-Stern R, Bernard JP, Taylor TD (2000): Prosthetic management of the partially dentate patient with fixed implant restorations, *Clin Oral Implants Res* 11 Suppl 1:126-145, Review

Berger G, Gildenhaar R, Ploska U (1995a): Rapid resorbable, glassy crystalline materials on the basis of calcium alkali orthophosphates, *Biomaterials* 16:1241-1248

Berger G, Gildenhaar R, Ploska U: Rapid resorbable materials based on a new phase: $\text{Ca}_2\text{KNa}(\text{PO}_4)_2$, In: Wilson J, Hench LL, Greenspan DC, editors. *Bioceramics*, Vol. 8. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1995b:453-456

Berger G, Gildenhaar R, Ploska U, Willfahrt M. Syntheses of rapidly resorbable calcium phosphate ceramics with high macro or high microporosity. In: Sedel L, Rey C, editors. *Bioceramics*, Vol. 10. Oxford, UK: Elsevier Science, 1997:367-370

Berger G (2003): Glassy crystalline materials with high solubility, and their fabrication, German Patent No. DE 120249627.7

Burchardt H (1983): *The biology of bone graft repair*, *Clin Orthop* 174: 28-42

Buser D, Dula K, Hirt HP, Berthold H (1994). Localized ridge augmentation using guided bone regeneration. In: Buser D, Dahlin C, Schenk RK, editors. Guided bone regeneration in implant dentistry. Chicago, USA: *Quintessenz*:189-233.

Buser D, Dula K, Hess D, Hirt HP, Belser UC (2000): Localized ridge augmentation with autografts and barrier membranes, *Periodontol 2000* 19:151-163. Review

Beyen I, Kasten P, Vogel J, Niemeyer P, Luginbühl R, Richter W (2006): Porosity influences osteogenic differentiation in vivo and proliferation of mesenchymal stem cells in vitro on beta-tricalcium phosphate solid body scaffolds, but not osteogenic differentiation in vitro, *BIOmaterialien* 7:119

Cowles EA, Brailey LL, Gronowicz GA (2000): Integrin-mediated signaling regulates AP-1 transcription factors and proliferation in osteoblasts, *J Biomed Mater Res* 52:725-737

Davies JE (1998): Mechanisms of endosseous integration, *Int J Prosthodont* 11:391-401, Review

Ducheyne P, El-Ghannam A, Shapiro I (1994): Effect of bioactive glass templates on osteoblast proliferation and in vitro synthesis of bone like tissue, *J Cell Biochem* 56:162–167

Ducheyne P, Bianco P, Radin S, Schepers E. Bioactive materials: mechanisms and bioengineering considerations. In: Bone-Bioactive Biomaterials, Ducheyne P, T. Kokubo T, van Blitterswijk CA, editors. Leiderdorp, Netherlands: Reed Healthcare Communications, 1993:1-12

Ducheyne P, Qiu Q (1999): Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function, *Biomaterials* 20:2287-303, Review

El-Ghannam A, Ducheyne P, Shapiro IM (1997): Formation of surface reaction products on bioactive glass and their effects on the expression of the osteoblastic phenotype and the deposition of mineralized extracellular matrix, *Biomaterials* 18:295-303

El-Ghannam A, Ducheyne P, Shapiro IM (1999): Effect of serum protein adsorption on osteoblast adhesion to bioactive glass and hydroxyapatite, *J Orthop Res* 17:340-345

El-Ghannam A (2005): Bone reconstruction: from bioceramics to tissue engineering, *Expert Rev Med Devices* 2:87-101

Eyre DR (1980): Collagen: molecular diversity in the body's protein scaffold, *Science* 207:1315-1322

Fisher LW, Termine JD (1985): Noncollagenous proteins influencing the local mechanisms of calcification, *Clin Orthop* 200:362-85

Flores ME, Norgard M, Heinegard D, Reinholt FP, Andersson G (1992): RGD-directed attachment of isolated rat osteoclasts to osteopontin, bone sialoprotein, and fibronectin, *Exp Cell Res* 201:526-530

Franzen A, Heinegard D (1985): Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bone calcified matrix, *Biochem J* 232:715-724

Glimcher MJ (1989): Mechanism of calcification: role of collagen fibrils and collagen-phosphoprotein complexes in vitro and in vivo, *Anat Rec* 224:139-153, Review

Grigoriou V, Shapiro IM, Cavalcanti-Adam EA, Composto RJ, Ducheyne P, Adams CS (2005): Osteoblast apoptosis and survival is regulated by integrin-mediated surface attachment, *J Biol Chem* 280:1733-1739

Gronowicz G, McCarthy MB (1996): Response of human osteoblasts to implant materials: integrin-mediated adhesion, *J Orthop Res* 14:878-887.

Grzesik WJ, Robey PG (1994): Bone matrix RGD glycoproteins immunolocalization and interaction with human primary osteoblastic bone cells in vitro. *J Bone Miner Res* 1994;9:487-496.

Hauschka PV, Lian JB, Cole DE, Gundberg CM (1989): Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone, *Physiol Rev* 69:990-1047, Review

Heinegard D, Oldberg A (1989): Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules. *FASEB J* 3:2042-2051. Review

Hynes RO (1992): Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion, *Cell* 69:11-25, Review

Katthagen BD: *Bedeutung der Knochentransplantation in der orthopädischen Chirurgie.* Hrsg.: Pesch HJ, Stöß H, Kummer B: *Osteologie aktuell 7.* Berlin Heidelberg New York, Springer 1993:151

Keselowsky BG, Collard DM, Garcia AJ (2003): Surface chemistry modulates fibronectin conformation and directs integrin binding and specificity to control cell adhesion, *J Biomed Mater Res A* 66:247-59

Knabe C, Gildenhaar R, Berger G, Ostapowicz W, Fitzner R, Radlanski RJ, Gross U (1998): In vitro investigation of novel calcium phosphates using osteogenic cultures, *J Mater Sci Mater Med* 9:337-345

Knabe C, Berger G, Gildenhaar R, Meyer J, Howlett CR, Markovic B, Zreiqat H (2004): The effect of rapidly resorbable calcium phosphates and a calcium phosphate bone cement on the expression of bone-related genes and proteins in vitro, *J Biomed Mater Res A* 69:145-154

Knabe C, Kraska B, Koch Ch, Gross U, Zreiqat H, Stiller M (2006): A novel method for immunohistochemical detection of osteogenic markers in undecalcified sawed sections of bone, *Biotechnic & Histochemistry* 81:31-39

Knabe C, Koch C, Rack A, Stiller M (2008): Effect of b-tricalcium phosphate particles with varying porosity on osteogenesis after sinus floor augmentation in humans, *Biomaterials* 29:2249-2258

Kokubo T, Kushitani H, Ohtsuki C, Sakka S, Yamamuro T (1992): Chemical-Reaction of Bioactive Glass and Glass-Ceramics with a Simulated Body-Fluid, *J Mater Sci Mater Med Sci* 3:79-83

Krause A, Cowles EA, Gronowicz G (2000): Integrin-mediated signaling in osteoblasts on titanium implant materials, *J Biomed Mater Res* 52:738-47

Lane TF, Sage EH (1990): Functional mapping of SPARC: peptides from two distinct Ca²⁺-binding sites modulate cell shape, *J Cell Biol* 111:3065-3076

Laurencin C, Khan Y, El-Amin SF (2006): Bone graft substitutes, *Expert Rev Med Devices* 3:49-57

Lin FH, Liao CJ, Chen KS, Sun JS, Liu HC (1997): Degradation behaviour of a new bioceramic: Ca₂P₂O₇ with addition of Na₄P₂O₇ · 10H₂O, *Biomaterials* 18:915-921

Long MW (2001): Osteogenesis and bone-marrow-derived cells, *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 27:677-690

Müller-Mai C, Berger G, Voigt C, Bakki B, Gross U. The bony reaction to rapidly degradable glass-ceramics based on the new phase Ca₂KNa(PO₄)₂, In: Sedel, L, Rey, C editors, *Bioceramics* 10 Oxford: Butterworth-Heinemann, 1997: 53-56

Orsini G, Ricci J, Scarano A, Pecora G, Petrone G, Lezzi G, Piattelli A (2004): Bone-defect healing with calcium-sulfate particles and cement: an experimental study in rabbit, *J Biomed Mater Res* 68B:199-208

Patel A, Honnart F, Guillemin G, Patat JL (1980): *Use of Madreporic Skeletal Fragments in Orthopedic and Reconstructive Surgery*, *Calcif Tissue Int* 31:108

Postiglione L, Di Domenico G, Ramaglia L, di Lauro AE, Di Meglio F, Montagnani S (2004): Different titanium surfaces modulate the bone phenotype of SaOS-2 osteoblast-like cells, *Eur J Histochem* 48:213-222

Price PA, Lothringer JW, Baukol SA, Reddi AH (1981): Developmental appearance of the vitamin K-dependent protein of bone during calcification. Analysis of mineralizing tissues in human, calf, and rat, *J Biol Chem* 256:3781-3784

Radin S, Ducheyne P, Rothman B, Conti A (1997): The effect of in vitro modeling conditions on the surface reactions of bioactive glass, *J Biomed Mater Res* 37:363-375

Radin S, Reilly G, Bhargava G, Leboy PS, Ducheyne P (2005): Osteogenic effects of bioactive glass on bone marrow stromal cells, *J Biomed Mater Res* 73A:21-29

Risbud MV, Fertala J, Vresilovic EJ, Albert TJ, Shapiro IM (2005): Nucleus pulposus cells upregulate PI3K/Akt and MEK/ERK signaling pathways under hypoxic conditions and resist apoptosis induced by serum withdrawal, *Spine* 30:882-9

Rueger JM (1992): Knochenersatzmittel, *Hefte Unfallheilkd* 213:32

Schenk RK (1991): Zur Problematik der Knochenersatzstoffe: Histophysiologie des Knochenumbaus und der Substitution von Knochenersatzstoffen. Hrsg.: Huggler AH, Kuner EH: Aktueller Stand beim Knochenersatz. *Hefte Unfallheilkd* 216:23

Schneider M, Gildenhaar R, Berger G (1994): Investigations of phase relations in the system CaO-Na₂O-K₂O-P₂O₅. I. Characterization of the compound Ca₂KNa(PO₄)₂, *Cryst Res Technol* 29:671-675

Stricker A, Voss PJ, Gutwald R, Schramm A, Schmelzeisen R (2003): Maxillary sinus floor augmentation with autogenous bone grafts to enable placement of SLA-surfaced implants: preliminary results after 15-40 months, *Clin Oral Implants Res* 14:207-212

Sun JS, Chang WH, Chen LT, Huang YC, Juang LW, Lin FH (2004): The influence on gene-expression profiling of osteoblasts behavior following treatment with the ionic products of sintered β -dicalcium pyrophosphate dissolution, *Biomaterials* 25:607-616

Szabo G, Huys L, Coulthard P, Maiorana C, Garagiola U, Barabas J, Nemeth Z, Hrabak K, Suba Z (2005): A prospective multicenter randomized clinical trial of autogenous bone versus beta-tricalcium phosphate graft alone for bilateral sinus elevation: histologic histomorphometric evaluation, *Int J Oral Maxillofac Implants* 20:371-381

Tadjoedin ES, de Lange GL, Lyaruu DM, Kuiper L, Burger EH (2002): High concentrations of bioactive glass material (BioGran) vs. autogenous bone for sinus floor elevation, *Clin Oral Implants Res* 13:428-436

Termine JD, Kleinman HK, Whitson SW, Conn KM, McGarvey ML, Martin GR (1981): Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen, *Cell* 26:99-105

Urist MR (1965): *Bone formation by autoinduction*, *Science* 150:893

von Arx T, Cochran DL, Hermann JS, Schenk RK, Buser D (2001): Lateral ridge augmentation using different bone fillers and barrier membrane application. A histologic and histomorphometric pilot study in the canine mandible, *Clin Oral Implants Res* 12:260-269

Weiss RE, Reddi AH (1981): Appearance of fibronectin during the differentiation of cartilage, bone, and bone marrow, *J Cell Biol* 88:630-636

Weiss RE, Reddi AH (1980): Synthesis and localization of fibronectin during collagenous matrix-mesenchymal cell interaction and differentiation of cartilage and bone in vivo, *Proc Natl Acad Sci U S A* 77:2074-2078

Wiltfang J, Merten HA, Schlegel KA, Schultze-Mosgau S, Kloss FR, Rupprecht S, Kessler P (2002): Degradation characteristics of alpha and beta-tri-calcium-phosphate (TCP) in minipigs, *J Biomed Mater Res* 63:115-121

Winkler S (2002): Implant site development and alveolar bone resorption patterns, *J Oral Implantol* 28:226-229

Xynos ID, Edgar AJ, Buttery LD, Hench LL, Polak JM (2000): Ionic products of bioactive glass dissolution increase proliferation of human osteoblasts and induce insulin-like growth factor II mRNA expression and protein synthesis, *Biochem Biophys Res Commun* 276:461-465

Xynos ID, Edgar AJ, Buttery LD, Hench LL, Polak JM (2001): Gene-expression profiling of human osteoblasts following treatment with the ionic products of Bioglass 45S5 dissolution, *J Biomed Mater Res* 55:151-157

Yao J, Radin S, Leboy PS, Ducheyne P (2005): Solution mediated effect of bioactive glass in poly (lactic-co-glycolic acid)- bioactive glass composites on osteogenesis of marrow stromal cells, *J Biomed Mater Res A* 75:794-801

Yuan H, van Blitterswijk CA, de Groot K, de Bruijn JD (2006): A comparison of bone formation in biphasic calcium phosphate (BCP) and hydroxyapatite (HA) implanted in muscle and bone of dogs at different time periods, *J Biomed Mater Res A* 87:139-147

Zerbo IR, Bronckers AL, de Lange GL, van Beek GJ, Burger EH (2001): Histology of human alveolar bone regeneration with a porous tricalcium phosphate. A report of two cases, *Clin Oral Implants Res* 12:379-384

Zerbo IR, Zijdeveld SA, de Boer A, Bronckers AL, de Lange G, ten Bruggenkate CM, Burger EH (2004): Histomorphometry of human sinus floor augmentation using a porous beta-tricalcium phosphate: a prospective study, *Clin Oral Implants Res* 15:724-732

Zerbo IR, Bronckers AL, de Lange G, Burger EH (2005): Localisation of osteogenic and osteoclastic cells in porous beta-tricalcium phosphate particles used for human maxillary sinus floor elevation, *Biomaterials* 26:1445-1451

Zijdeveld SA, Zerbo IR, van den Bergh JP, Schulten EA, ten Bruggenkate CM (2005): Maxillary sinus floor augmentation using a beta-tricalcium phosphate (Cerasorb) alone compared to autogenous bone grafts, *Int J Oral Maxillofac Implants* 20:432-40

Erklärung

“Ich, Alireza Houshmand, erkläre dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: [Charakterisierung des Einflusses neuer schnell resorbierbarer Calciumalkaliphosphatkeramiken mit definierten Diphosphatanteilen auf die osteoblastische Zelldifferenzierung *in vitro* im Vergleich zu diphosphatfreien alkalihaltigen Materialien und klinisch eingesetzten Materialien] selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 08.09.2008

Unterschrift