

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Klinikum rechts der Isar
Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. R. von Eisenhart-Rothe)

Untersuchung des Adhäsionsverhaltens primärer Osteoblasten unter Diclofenaceinfluss

Sarah Brugger

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. R. H. H. Burgkart
2. Univ.-Prof. Dr. A. Imhoff

Die Dissertation wurde am 14.09.2012 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Humanmedizin am 30.01.2013 angenommen.

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1 Verzeichnis der Abkürzungen.....	5
2 Hintergrund und Motivation/Fragestellung.....	7
3 Material.....	14
3.1 Medien und Reagenzien für die Zellkultur.....	14
3.2 Verschiedene Puffer und Waschlösungen für die Zellkultur.....	14
3.3 Reagenzien für die Passagierung.....	15
3.4 Reagenzien zur Zellvergiftung bzw. Zellauflösung.....	15
3.5 Reagenzien für die REM-Untersuchung.....	15
3.6 Reagenzien für die immunzytochemischen Färbungen.....	15
3.7 Titanplättchen.....	17
3.8 Verwendete Kits.....	17
3.9 Mess- und Laborgeräte.....	18
4 Methoden.....	19
4.1 Versuchsaufbau.....	19
4.1.1 Verzögerte Medikamentenzugabe.....	19
4.1.2 Direkte Medikamentenzugabe.....	19
4.1.3 Diclofenac-Konzentrationen.....	20
4.1.4 Untersuchungen mit dem xCELLigence System.....	20
4.1.5 Aussaat auf Titanchips.....	20
4.2 Methoden der Zellkultur.....	21
4.2.1 Knochenmaterial.....	21
4.2.2 Medium und Zusatzstoffe.....	21
4.2.3 Anlegen einer Primärkultur aus humanen Osteoblasten.....	22
4.2.4 Mediumwechsel.....	22
4.2.5 Passagieren.....	22
4.2.6 Kryokonservierung von Zellen.....	23
4.2.7 Auftauen von Zellen.....	23
4.2.8 Immunzytochemische Färbungen.....	24
4.3 Verwendete Tests und Untersuchungen.....	26
4.3.1 MTT-Test.....	26
4.3.2 Laktatdehydrogenase-Test (LDH-Test).....	26
4.3.3 Calcium-Quantifizierung.....	27
4.3.4 Bicinchoninsäure-Test (BCA-Test).....	28
4.3.5 ALP-Test.....	29
4.3.6 Rasterelektronenmikroskop-Untersuchung (REM-Untersuchung).....	30
4.3.7 xCELLigence System.....	31
4.4 Statistik.....	32
5 Ergebnisse.....	33
5.1 Immunhistochemische Färbung.....	33
5.2 Verzögerte Medikamentenzugabe.....	34
5.2.1 Ergebnisse MTT-Test.....	34
5.2.2 Ergebnisse LDH-Test.....	36
5.2.3 Ergebnisse Calciumquantifizierung.....	37
5.2.4 Ergebnisse BCA-Test.....	38
5.2.5 Ergebnisse ALP-Test.....	39
5.3 Direkte Medikamentenzugabe.....	41
5.3.1 Ergebnisse MTT-Test.....	41
5.3.2 Ergebnisse Calciumquantifizierung.....	42

5.3.3 Ergebnisse BCA-Test.....	43
5.3.4 Ergebnisse ALP-Test.....	44
5.4 Vergleich zwischen verzögerter und direkter Medikamentenzugabe.....	46
5.4.1 Ergebnisse MTT-Test.....	46
5.4.2 Ergebnisse Calciumquantifizierung.....	47
5.4.3 Ergebnisse BCA-Test.....	48
5.4.4 Ergebnisse ALP-Test.....	49
5.5 Untersuchungen zur Adhärenz.....	50
5.5.1 Ergebnisse REM-Untersuchung.....	50
5.5.2 Ergebnisse xCELLigence System.....	56
63	
6 Diskussion.....	64
7 Zusammenfassung.....	77
8 Literaturverzeichnis.....	79
9 Abbildungsverzeichnis.....	83
10 Lebenslauf.....	84
11 Danksagung.....	86
86	

1 Verzeichnis der Abkürzungen

%	Prozent
°C	Grad Celcius
μ-	Mikro-
AA	Arachidonsäure
Abb.	Abbildung
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
ALP	Alkalische Phosphatase
Aqua dest.	aqua destillata
BCA	Bicinchoninic Acid
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat
BMP	Bone-Morphogenetic-Protein
BSA	bovine serum albumin
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COX	Cyclooxygenase
DMEM	Dulbeccos modified eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPF	Dimethylphenylfuranon
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FBS	Fetal Bovine Serum
FCS	Fetal Calf Serum
g	Gramm
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HEPES	Hydroxyethyl-1-piperazinethansulfonsäure
HO	Heterotope Ossifikation
Hüft-TEP	Totale Endoprothese des Hüftgelenks
ICC	Immunzytochemie
IOPC	Inducible Osteogenic Progenitor Cells
kg	Kilogramm
l	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
m-	Milli-
M	Molar
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute

MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
n	Anzahl der Proben
n-	Nano-
NAD ⁺	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid, oxidiert
NADH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid, reduziert
NaOH	Natriumhydroxid
NBT	Nitro Tetrazolium Blue Chloride
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
OD	Optische Dichte
OP	Operation
p-	Pico-
PBS	Phosphate buffered saline
PFA	Paraformaldehyd
PG	Prostaglandin
PNP	p-Nitrophenol
p-Wert	Signifikanzwert, probability-value
REM	Rasterelektronenmikroskop
rpm	rounds per minute
SD	Standardabweichung
sec	Sekunde
TRIS	tris(hydroxymethyl)methylamine
v/v	Volumenprozent (volume per volume)
Vgl.	Vergleich
w/v	Gewichtsprozent (weight per volume)

2 Hintergrund und Motivation/Fragestellung

Die Implantation einer Hüftgelenks-Endoprothese zählt heute zu den Operationen, die mit einer äußerst hohen Erfolgsrate verbunden sind. Die Methode ist etabliert, vielfach erprobt und bewährt. Nach Jahren intensiver Forschung haben sich nun Prothesenformen und Operationsmethoden herauskristallisiert, die Standzeiten von 15 bis 20 Jahren ermöglichen und das Operationstrauma sehr gering halten. In Deutschland werden nunmehr ca. 160.000 Hüftgelenksprothesen pro Jahr implantiert.

Aber auch bei einer so häufig und regelmäßig durchgeführten Operation lassen sich Nebenwirkungen und Komplikationen nicht ausschließen.

Zu den Komplikationen im Zuge der Implantation einer Endoprothese zählen neben den allgemeinen Operationsrisiken (Blutung, Infektion, Wundheilungsstörung, Verletzung von Gefäßen und Nerven) unter anderem Knochen-Infektionen, das Versagen des Implantates (Implantatbruch), und die Lockerung des Implantates mit der Folge eines Prothesenwechsels.

Eine weitere mögliche Nebenwirkung oder Komplikation, mit der sich die vorliegende Arbeit intensiv auseinandersetzt, stellt die Ausbildung heterotoper Ossifikationen dar:

Unter der Heterotopen Ossifikation (HO) versteht man eine außerhalb des Knochens im Bereich der Muskeln und/oder des Sehngewebes auftretende Verknöcherung. Dabei handelt es sich um eine tatsächliche Knochenneubildung, das heißt, es entsteht ein von Osteoblasten gebildetes Knochengewebe, welches sich histologisch nicht von orthotopem Knochen unterscheidet. Nach Implantation einer Totalendoprothese im Bereich des Hüftgelenks (Hüft-TEP) ist dabei meist die Glutealmuskulatur Ort der Knochenneubildung.

Am häufigsten tritt die HO im Bereich des Hüftgelenks auf, gefolgt von periartikulären Ossifikationen im Bereich des Ellenbogens und der Schulter. Am Kniegelenk wird die HO nur selten beobachtet.

In der Forschungsliteratur schwanken die Aussagen über die Häufigkeit von HO-Fällen stark. Bei Patienten mit Implantation einer Hüft-TEP ohne prophylaktische Behandlung kommt es in circa 60% der Fällen zur HO. Die periartikulären Ossifikationskerne können erhebliche Größe erlangen. Problematisch wird die Ossifikation dann, wenn die Knochenkerne Schmerzen hervorrufen und zu einer Bewegungseinschränkung führen. Dies ist bei etwa 10-20% der Patienten mit einer HO der Fall. Dabei entwickeln wiederum 10% dieser Patienten eine Ankylose¹⁶.

Die Ursache der heterotopen Ossifikation wird kontrovers diskutiert. Einerseits könnte Knochenmehl, welches beim Durchsägen des Schenkelhalses in der Wunde verbleibt als

Keim für neue Ossifikationsknoten dienen. Andererseits könnte auch die Traumatisierung des Gewebes, insbesondere der Muskeln, zu einer reaktiven Ossifikation führen, wie es bei der traumatisch bedingten Myositis ossificans beobachtet wird. Hierbei können sogenannte Inducible Osteogenic Progenitor Cells (IOPC) durch Differenzierungsfaktoren wie das Bone-Morphogenetic-Protein (BMP) migrieren und sich zu Osteoblasten ausdifferenzieren.

Interessanterweise findet man das Phänomen der periartikulären Ossifikation, wie bereits erwähnt, so gut wie nie nach Implantation einer Knie-TEP, obgleich die Sägeflächen und damit auch die Menge an anfallendem Knochenmehl groß sind. Allerdings wird aus anatomischen Gründen bei Implantation einer Knie-TEP weitaus weniger Muskel traumatisiert.

Mittel der Wahl zur Diagnosestellung und Einteilung der HO ist das konventionelle Röntgenbild. Die Klassifikation erfolgt nach Brooker in vier Stadien:

- Grad I: Knocheninsel innerhalb des periartikulären Weichteilmantels
- Grad II: Knöcherne Ausziehungen vom Os ilium und/oder Trochanter major, Mindestabstand zueinander größer als 1cm
- Grad III: wie Grad II, Abstand jedoch kleiner 1cm
- Grad IV: Ankylose

Neben der Resektion von entstandenen Ossifikationen gibt es zwei etablierte Methoden, um die Ausbildung der HO zu unterdrücken: die perkutane Bestrahlung und die medikamentöse Prophylaxe.

Bestrahlung zur Prophylaxe Heterotoper Ossifikationen

Im angelsächsischen Sprachraum, insbesondere in den USA, wird dem Problem der HO häufig mit perkutanen Bestrahlung begegnet.

Die genaue Wirkungsweise der Strahlentherapie zur Prophylaxe der HO ist noch nicht ganz geklärt. Mehrere Studien haben jedoch gezeigt, dass es sich bei der Wirkung nicht um einen zytotoxischen Prozess mit Zellapoptose handelt, wie dies bei der Tumorbehandlung der Fall ist. Vielmehr scheinen IOPC durch die Bestrahlung nicht mehr in der Lage zu sein, auf osteoinduktive Reize des BMP zu reagieren und können sich folglich nicht zu knochenbildenden Osteoblasten weiterentwickeln^{30 40}.

In einer Studie von Maloney wurde 1992 gezeigt, dass eine niedrig-dosierte postoperative Bestrahlung mit 7,5 Gy in drei aufeinander folgenden Sitzungen eine geeignete Maßnahme darstellt, um die ektopische Knochenbildung bei Hochrisikopatienten zu verhindern³³. Im klinischen Alltag wird bei vorliegenden Kontraindikationen zur medikamentösen Prophylaxe

die gesamte Strahlendosis von 7,5 Gy in einer Sitzung unmittelbar vor oder bis zu 48 Stunden nach der OP verabreicht.

Medikamentöse Prophylaxe Heterotoper Ossifikationen

Als Alternative bietet sich die medikamentöse Prophylaxe der HO mittels nicht-steriodaler Antirheumatika (NSAR) an. Durch ihre antiinflammatorische und analgetische Wirkungen, welche auf einem Eingriff in den Stoffwechsel der Cyclooxygenase (COX) beruhen, spielen NSAR im Bereich der Orthopädie vor allem zur Linderung von Schmerzen bei Frakturen oder chronischen Beschwerden wie Rheuma eine große Rolle.

Die Wirkungsweise der NSAR im Bezug auf die Prophylaxe der HO erklärt sich durch eine Reduktion der Menge an synthetisierten Prostaglandinen (PG).

Prostaglandine spielen eine wichtige Rolle in der frühen Kallusbildung durch den von ihnen eingeleiteten Entzündungsprozess. Beim Auftreten einer Fraktur kommt es zur vermehrten Freisetzung von Prostaglandinen der E- und F-Reihe, die den Prozess der Frakturheilung unterstützen. Dabei kommt vor allem dem Prostaglandin E₂ eine besondere Funktion zu, da es die periostale und endostale Knochenneubildung aktiviert^{15 48}.

Zur gleichen Zeit aber fördern Prostaglandine auch die Resorption von Knochen und regen somit das Remodeling an^{38 41}.

Aus diesem Grund wirken Hemmer der Prostaglandinsynthese, die eine antiinflammatorische Wirkung entfalten, der Kallusbildung entgegen.

Nach einer Arbeit von Reikeraas und Hogevoold haben allerdings antientzündliche Medikamente, die nach der Bildung eines stabilen Kallus eingenommen werden, keine negativen Auswirkungen mehr auf die sekundäre Knochenheilung^{22 42}.

Zusammenspiel von COX und Prostaglandinen

COX ist das Schlüsselenzym in der Umsetzung von Arachidonsäure (AA) zu Prostaglandinen (PG) und stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Prostaglandinsynthese dar⁴⁷.

Es gibt zwei Isoformen der Cyclooxygenase: Zum einen die COX-1, die konstitutiv exprimiert wird: sie ist unabhängig von Zelltyp, Zellstadium und Wachstumsbedingungen dauerhaft exprimiert und für die physiologische Synthese von Prostaglandinen (z.B. im Magen, in den Thrombozyten oder in der Niere) verantwortlich.

Die andere Isoform der COX ist die COX-2, welche durch viele Faktoren (z.B. Zytokine) schnell induziert werden kann. Beispielsweise wird die COX-2 bei akuten Geschehen wie Entzündungen, Schmerzen oder Gewebsschädigungen exprimiert und führt so zu einem schnellen Anstieg der Prostaglandin-Produktion²¹.

Da die Cyclooxygenasen (besonders die COX-1) eine wichtige Rolle im Körper spielen, da sie durch viele Ereignisse exprimiert und bei vielen Stoffwechselfvorgängen benötigt werden, führt eine Hemmung der COX-1 zu vielen Nebenwirkungen in den COX-1 exprimierenden Organen (z.B. gastrointestinale Blutungen, hämatologische Nebenwirkungen, Störungen des Nierenstoffwechsels). Hingegen beruht die erwünschte antiphlogistische, analgetische und antipyretische Wirkung der NSARs auf einer Hemmung der COX-2.

Im Knochen wird vor allem Prostaglandin E₂ exprimiert, welches zum Großteil mit der Induktion der COX-2 assoziiert wird³⁹.

Medikamente zur Prophylaxe Heterotoper Ossifikationen

Für die medikamentöse Prophylaxe der HO mittels NSAR stehen verschiedene Medikamente zur Verfügung, die über eine Hemmung der Cyclooxygenase wirken:

Vor allem in den USA hat sich **Indomethacin** durchgesetzt:

Kneller et al. fanden 1997 in einer Studie heraus, dass es durch eine Verabreichung von Indomethacin (zweimal 50 mg) über einen Zeitraum von sieben Tagen zu einer signifikanten Reduktion des Auftretens der HO kommt²⁹.

In Skandinavien wurden mehrere Studien mit **Ibuprofen** durchgeführt. Koorevaar et al. konnten 1999 zeigen, dass das Auftreten der HO bei einer Ibuprofen-Gabe (jeweils täglich dreimal 400 mg oral appliziert) über acht Tagen reduziert wird, so dass nur bei 22% des Patientengutes eine HO festgestellt werden konnte. Hingegen lag der Anteil der Patienten mit HO bei einer Gabe über nur fünf Tagen bei 72%³¹.

Gebuhr et al. zeigten 1995 in ihrer Studie, dass auch eine Behandlung mit **Naproxen** über acht Tage in einer Dosierung von 1000 mg pro Tag zu einer Verringerung des Auftretens der HO führte¹⁸.

Neuerdings werden auch selektive Hemmer der COX₂ zur HO-Prophylaxe verwendet. Die Anwendung dieser Medikamentengruppe ist vielversprechend im Bezug auf das geringere Auftreten von gastrointestinalen Nebenwirkungen, allerdings steigt das Risiko von kardiovaskulären Nebenwirkungen. Die prophylaktische Wirksamkeit der selektiven COX₂-Hemmer in Bezug auf die Ausbildung von Heterotopen Ossifikationen konnte zwar nachgewiesen werden, doch fiel diese im Vergleich mit Indomethacin signifikant geringer aus⁵.

Vor allem in Deutschland kommt das Medikament **Diclofenac** zur HO-Prophylaxe zur Anwendung. Mehrere Studien belegen die gute Wirksamkeit des Medikaments zur Prophylaxe von heterotopen Ossifikationen nach Implantation einer Hüft-Endoprothese.

So konnten Sell et al. in ihrer Studie 1998 feststellen, dass es durch die Gabe von drei mal täglich 50 mg Diclofenac über einen Zeitraum von drei Wochen nur bei 23% der 77 untersuchten Patienten zu einer HO kam⁴⁴.

Die Tagesdosis von Diclofenac, die zur Vermeidung von Ossifikationen verabreicht wird, beträgt in allen Studien 150 mg (zweimal täglich 75 mg oder dreimal täglich 50 mg).

In der Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie am Klinikum rechts der Isar - an der die vorliegende Untersuchung durchgeführt wurde - wird nach Implantation einer Hüft-TEP als Ossifikationsprophylaxe Diclofenac in einer Dosierung von 75 mg zweimal täglich verabreicht. Die Therapie wird am ersten postoperativen Tag gestartet und für sechs Wochen fortgesetzt. Zur Minimierung des Risikos von gastrointestinalen Nebenwirkungen wird dieses Medikament durch einen Protonenpumpeninhibitor ergänzt.

In Fällen, in denen die Gabe von NSAR kontraindiziert ist, und bei denen ein hohes Risiko zur periartikulären Ossifikation besteht (beispielsweise da nach einem entsprechenden Eingriff auf der Gegenseite eine solche vorliegt) wird dem Patienten die perkutane Bestrahlung einmalig mit 7,5 Gy unmittelbar präoperativ angeboten.

Diclofenac

Bei dem Medikament Diclofenac handelt es sich um ein Phenyllessigsäurederivat mit der Strukturformel $C_{14}H_{11}Cl_2NO_2$, welches in unterschiedlichen Darreichungsformen oral, intravenös oder intramuskulär verabreicht werden kann.

Das Anwendungsspektrum entspricht den oben erwähnten Gebieten der NSAR.

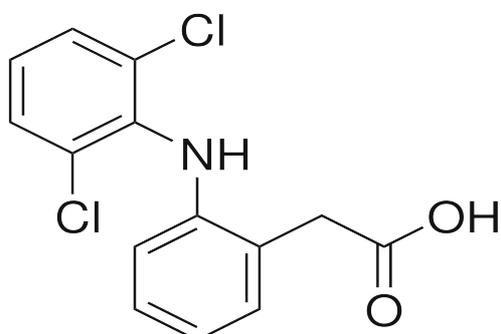


Abb. 1, Strukturformel des Medikamentes Diclofenac

Diclofenac hemmt nachgewiesenermaßen (siehe unten) den Stoffwechsel von Osteoblasten und die Ausbildung von heterotopen Ossifikationen. Dieses Ergebnis wirft eine für die Osteointegration (das heißt, das Festwachsen der Prothese im Knochen) bedeutsame Frage auf:

Wenn Diclofenac den Knochenstoffwechsel hemmt und das Auftreten der Häufigkeit der HO reduziert, beeinträchtigt der Eingriff des Diclofenac in den Stoffwechsel der Osteoblasten auch deren Adhäsionspotential auf Titanoberflächen?

Diese Fragestellung ist umso ausschlaggebender, als eine suffiziente Verankerung der Prothese im Knochen nur gegeben ist, wenn die Osteoblasten fest an der Implantatoberfläche adhären und eine erfolgreiche Osseointegration erfolgen kann.

In der Literatur sind bereits Studien über den Einfluss des Medikaments Diclofenac auf den Stoffwechsel der Knochenzellen bekannt. Allerdings sind Ergebnisse bezüglich der Änderung des Verhaltens von Osteoblasten unter Diclofenaceinfluss kontrovers.

In einer Studie von Akman et al. konnte gezeigt werden, dass die Verabreichung des Medikaments Diclofenac in Bezug auf die Frakturheilung in therapeutisch gängigen Dosen im Tierversuch nicht zur negativen Beeinträchtigung des Zusammenschlusses von Knochen führte¹.

In einer 1999 veröffentlichten Forschungsarbeit von Sell et al. ergaben sich jedoch bereits ab einer Konzentration von 1 µg/ml Diclofenac eine Störung in der Funktion der Osteoblasten, die sich in einer Verminderung der Proliferation und der Kollagen-I-Synthese zeigen konnte⁴⁵.

In größeren Mengen als klinisch üblich hat Diclofenac gemäß einer Studie von Jacobsson et al. nach Einbringung einer Hydroxyapatit-beschichteten, zementlosen Prothese die Verbindung und Vernetzung zwischen Knochen und Prothese verringert. In einem Tierversuch, den die Forschergruppe durchführte, wurde Kaninchen 8 mg/kg Diclofenac für sieben Tage postoperativ (nach Metallimplantation) verabreicht. Dies entspricht der drei- bis vierfachen maximalen Tagesdosis beim Menschen²⁵.

Ein ähnliches Ergebnis ist bereits aus anderen Studien bekannt. Untersuchungen von Kaspar et al. weisen Effekte, die auf eine in-vivo-Hemmung der Frakturheilung durch NSAR hindeuten, nur bei unphysiologisch hohen Konzentrationen von Diclofenac nach²⁷.

Eine Erklärung für die oben aufgeführten, unterschiedlichen Ergebnisse in Bezug auf das Verhalten der Osteoblasten unter dem Einfluss von Diclofenac lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass die verschiedenen Arbeitsgruppen ihre Versuche mit verschiedenen Zellen und unterschiedlichen Versuchsansätzen durchgeführt haben.

So betrug in dem Ansatz von Sell et al. die Inkubation der Zellen mit Diclofenac 48 Stunden, wohingegen in dem Versuch von Kaspar et al. die Zellen nur für 24 Stunden dem Medikament ausgesetzt waren.

Zusätzlich muss beachtet werden, dass Kaspar et al. nicht mit primären Osteoblasten arbeiteten (wie in dieser Arbeit), sondern mit einer osteosarkomähnlichen Zellreihe, die sich

zwar ähnlich wie Osteoblasten verhält, aber dennoch nicht ganz identische Merkmale aufweist.

Ziel der Arbeit

Um einen besseren Einblick in die Veränderung der Stoffwechselprozesse von Osteoblasten unter dem Einfluss von Diclofenac zu bekommen, war es Ziel der vorliegenden Untersuchung, das Adhäsionsverhalten primärer Osteoblasten in Echtzeit zu untersuchen. Ferner sollte der Einfluss von Diclofenac auf die Morphologie von Osteoblasten beobachtet werden.

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden die Einflüsse von Diclofenac in unterschiedlichen Konzentrationen auf den hier verwendeten Pool von Osteoblasten untersucht.

Außerdem sollte herausgefunden werden, ob der Zeitpunkt der Medikamentenzugabe einen Einfluss auf die Eigenschaften der Osteoblasten hat. Dabei wird geprüft, ob die Osteoblasten unterschiedlich in ihrem Adhärenzverhalten reagieren, wenn sie bereits vor Aussaat mit Diclofenac in Verbindung standen (etwa in einem Patienten, der bis zum Tag der Operation Diclofenac zur Schmerzreduktion einnimmt) oder erst nach Aussaat mit Diclofenac behandelt wurden (dies entspricht einem Patienten, der erst am Abend nach der Operation Diclofenac zur Ossifikationsprophylaxe bekommt).

3 Material

3.1 Medien und Reagenzien für die Zellkultur

- DMEM (= Dulbeccos modified eagle Medium) - Biochrom
Berlin, Deutschland
- Alpha-Medium - Biochrom
Berlin, Deutschland
- DMSO (= Dimethylsulfoxid) – Sigma
St. Louis, USA
- MEM-Vitamin - Biochrom
Berlin, Deutschland
- L-Glutamin - Biochrom
Berlin, Deutschland
- Primocin - InvivoGen
San Diego, USA
- FBS Superior - Biochrom
Berlin, Deutschland
- Ascorbinsäure - Sigma
St. Louis, USA
- Dexamethason - Sigma
St. Louis, USA
- beta-Glycerophosphat (Salzhydrat) - Sigma
St. Louis, USA
- Diclofenac-Natrium (75 mg/3 ml) - Hexal
Holzkirchen, Deutschland

3.2 Verschiedene Puffer und Waschlösungen für die Zellkultur

- HEPES-Puffer (Hydroxyethyl-1-piperazinethansulfonsäure) - Biochrom
Berlin, Deutschland
- Dulbeccos PBS (ohne Calcium und Magnesium) - Biochrom
Berlin, Deutschland
- TRIS-Puffer (0,1M)
 - Aqua dest. - Delta Select - Dreireich, Deutschland
 - Natriumchlorid - Sigma - St. Louis, USA
 - TRIS HCl 1M - Sigma - St. Louis, USA

- **900 ml 0,9%ige Kochsalzlösung plus 100 ml TRIS HCl 1M = TRIS Puffer (0,1M)**
 - Aqua.dest - Delta Select
Dreireich, Deutschland
 - Brij - Sigma
St. Louis, USA
- **0,01% Brij-Konzentration in PBS = PBS/ Brij-Puffer**

3.3 Reagenzien für die Passagierung

- Trypsin/ EDTA - Biochrom
Berlin, Deutschland

3.4 Reagenzien zur Zellvergiftung bzw. Zellauflösung

- Triton X-100 - Sigma
St. Louis, USA

3.5 Reagenzien für die REM-Untersuchung

Lösung A:

- 22,6g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ auf 1000 ml Aqua.dest - Merck
Darmstadt, Deutschland

Lösung B:

- 25,2 g NaOH auf 1000 ml Lösung A - Merck
Darmstadt, Deutschland
- Glutaraldehyd 25% in Wasser (high purity) - Serva
Heidelberg, Deutschland

3.6 Reagenzien für die immunzytochemischen Färbungen

Fixierung:

- 4% PFA (Paraformaldehyd) - Serva
Heidelberg, Deutschland
- NaOH - Merck
Darmstadt, Deutschland

Andau:

- Pepsin - Sigma
St. Louis, USA
- **0,4% in 0,01M HCl**
- Proteinase K - Qiagen

Düsseldorf, Deutschland

➤ **1:1000 in PBS**

Antikörper:

- Kollagen I, rabbit - Quartett
Berlin, Deutschland
- Osteocalcin, rabbit - Biotrend
Köln, Deutschland
- Fibronectin, rabbit - Dako Cytomation
Glostrup, Dänemark

Färbung:

- DaktoProteinBlock - Dako Cytomation
Glostrup, Dänemark
- Biotinylierter Brückenantikörper, rabbit - Laboratories
Burlingame, Kanada
- **1:200 in PBS Vector**
- Avidin/Biotin-Komplex (Vectastain ABC Kit) - Vector Laboratories
Burlingame, Kanada
- AEC - Dako Cytomation
Glostrup, Dänemark
- Haemalaun - nach Meyers
München, Deutschland
- Kaiser Glyceringelatine - Merck
Darmstadt, Deutschland
- 0,01M HCl - Merck
Darmstadt, Deutschland
- Proteinase K - Qiagen
Düsseldorf, Deutschland
- **1:1000 in PBS**
- NBT/ BCIP Test - Roche
Mannheim, Deutschland

Herstellung der Färbelösung:

0,4 mg/ml	NBT (Nitroblautetrazoliumchlorid),
0,19 mg/ml	BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat, Toluidine-Salz),
100mM	TRIS-Puffer, pH 9,5,

50mM

MgSO₄

3.7 Titanplättchen

- Ti 6Al4V ELI - Biomet
Berlin, Deutschland

Durchmesser: 10mm

Dicke: 2mm

3.8 Verwendete Kits

- MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) Cell Proliferation Kit
- Roche
Mannheim, Deutschland
- BCA (Bicinchoninic Acid) Protein Assay Kit - Pierce
Rockford, USA
- Cytotoxicity Detection Kit, LDH (Laktatdehydrogenase) - Roche
Mannheim, Deutschland
- Ecoline S + Kit - DiaSys Diagnostic Systems
Holzheim, Germany
- p-Nitrophenol Standard Solution, 10µM - Sigma
St. Louis, USA
- QuantiChrom Calcium Assay Kit - Biotrend
Köln, Deutschland
- Hexosaminidase-Test

Substrat:

4-Nitrophenyl-N-Acetyl-beta-D-Glucosaminide (98-100%) - Sigma
St. Louis, USA

Stopplösung:

0,2M NaOH - Merck
Darmstadt, Deutschland

5mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA) - Sigma
St. Louis, USA

3.9 Mess- und Laborgeräte

- Eppendorf Centrifuge - Eppendorf
Hamburg, Deutschland
- Rasterelektronenmikroskop (REM) Leo 440i – Fa. Zeiss
Oberkochen, Deutschland
- Zellkulturflaschen (750 ml) - BD Biosciences
Bedford, USA
- Petrischalen (100 x 20 mm) - Sarstedt
Newton, USA
- Falconröhrchen (15 ml, 50 ml) - BD Biosciences
Bedford, USA
- Reaktionsgefäße (2 ml) - Biozym Scientific
Oldendorf, Deutschland
- Zellsieb, 40 µm - BD Biosciences
Bedford, USA
- Falcon, Multiwell-Platten (48er, 96er) - BD Biosciences
Bedford, USA
- Nunc, Multiwell-Platten - Nunc A/S
Roskilde, Dänemark
- Mikroskop, Wilovert 30 Standard HF - Helmut Hund
Wetzlar, Deutschland
- Inkubator, Titramax 1000 - Heidolph Instruments
Schwabach, Deutschland
- Plattenleser, Multiskan Ascent - Thermo
Waltham, USA
- xCELLigence System – Roche Applied Sciences
Mannheim, Deutschland
- E-Plate 96 – Roche Applied Sciences
Mannheim, Deutschland

4 Methoden

Mit unten aufgeführten Versuchsansätzen wurde in vorliegender Arbeit das Verhalten primärer Osteoblasten auf unterschiedliche Diclofenac-Konzentrationen dargestellt.

Dafür wurde das Proliferationsverhalten getestet, die morphologischen Veränderungen mit Hilfe von REM-Aufnahmen veranschaulicht und der Adhäsionsprozess in Echtzeit untersucht.

Für das zweite Ziel der Studie, die Frage, ob der Zeitpunkt der Medikamentenzugabe einen Einfluss auf die Eigenschaften der Osteoblasten hat, wurde ein Teil der Zellen immer direkt mit dem Medikament ausgesät und für 48 Stunden inkubiert, während der andere Teil der Zellen erst nach einer „stressfreien“ Adhärenzphase von 24 Stunden für erneute 24 Stunden mit dem Medikament in Kontakt kam (verzögerte Medikamentenzugabe).

4.1 Versuchsaufbau

4.1.1 Verzögerte Medikamentenzugabe

Die für die Versuche verwendeten Zellen wurden wie unter 4.2.5 beschrieben mit Hilfe von Trypsin von der Zellkulturoberfläche abgelöst und zentrifugiert.

Das Zellpellet wurde mit Alpha-Medium, das zuvor mit osteogenen Zusätzen versetzt wurde, resuspendiert, so dass sich in 300 µl Alpha-Medium 10.000 Zellen befanden. Anschließend wurden jeweils 300 µl von der hergestellten Zellsuspension in je ein Well einer 48er-Multiwellplatten ausgesät. Die Höhe der Zellzahl erfolgt dabei analog zu dem Versuchsaufbau von Matziolis et al., bei dem 10.000 Zellen in 48er-Multiwellplatten ausgesät wurden³⁴. Nach Inkubation über Nacht wurde ein Mediumwechsel mit den entsprechenden Diclofenac-Konzentrationen (siehe 4.1.3) vorgenommen und wiederum über Nacht inkubiert, bevor die verschiedenen Untersuchungen am nächsten Tag begonnen wurden.

4.1.2 Direkte Medikamentenzugabe

Die Aussaat der Zellen bei den entsprechenden Versuchen erfolgte analog zu 4.1.1. Allerdings wurden in jedes Well einer 48er-Multiwellplatte die 10.000 Zellen (suspendiert in 300 µl) direkt mit den entsprechenden Diclofenac-Konzentrationen (siehe 4.1.3) ausgesät.

Nach 24 Stunden Inkubationszeit wurde ein Mediumwechsel mit den gleichen Diclofenac-Konzentrationen vorgenommen. Am nächsten Tag wurden die verschiedenen Versuche vorgenommen.

Der Unterschied zur verzögerten Diclofenaczugabe liegt somit darin, dass die gesamten Adhäsionsvorgänge bei der direkten Medikamentenzugabe unter dem Einfluss von

Diclofenac abliefen, wohingegen bei verzögerter Medikamentenapplikation die Zellen zuerst ungestört adhären konnten, bevor mit Diclofenac inkubiert wurden.

4.1.3 Diclofenac-Konzentrationen

In den Versuchen wurden in Anlehnung an die Studie von Kaspar et al. folgende Diclofenac-Konzentrationen verwendet²⁷:

- 25 µg/ml
- 50 µg/ml
- 100 µg/ml

Für den Test auf Zytotoxizität (LDH-Test) wurde zusätzlich zur 25 µg/ml Diclofenac-Konzentration, eine 2,5 µg/ml (1:10.000 Verdünnung) und eine 250 µg/ml Konzentration (1:100 Verdünnung) hergestellt.

Als Kontrollgruppe wurde jeweils eine Versuchsreihe mit 0 µg/ml Diclofenac angesetzt.

Für die Versuche wurde in Wasser gelöstes Diclofenac verwendet. Hierzu stand handelsübliches Diclofenac in Glasampullen (75 mg Diclofenac in 3 ml Lösung, 25 mg/ml) zur Verfügung. Durch entsprechende Verdünnungen mit alpha-Medium (angereichert mit osteogenen Zusätzen) wurden die Versuchslösungen hergestellt.

Zuerst wurden 10 ml einer 1:100-Verdünnung hergestellt (100 µl der reinen Diclofenac-Lösung aus der Ampulle und 9,9 ml des alpha-Mediums mit osteogenen Zusätzen).

Diese Verdünnung wurde dann jeweils weiter verdünnt, bei der 25 µg/ml-Konzentration in einem Verhältnis von 1:10, bei 50 µg/ml von 1:5 und bei 100 µg/ml von 1:2,5.

Für die 2,5 µg/ml Diclofenac-Konzentration beim LDH-Test wurde die 1:100er Verdünnung erneut im Verhältnis 1:100 mit alpha-Medium (inklusive osteogener Zusätze) verdünnt.

Für die 250 µg/ml Konzentration wurde die 1:100er Verdünnung verwendet.

4.1.4 Untersuchungen mit dem xCELLigence System

Da für die Untersuchungen mit dem xCELLigence System speziell beschichtete 96er-Multiwellplatten nötig waren, betrug das Suspensions-Volumen nur 150 µl pro Well bei 5.000 Zellen.

Die Diclofenac-Konzentrationen wurden direkt bzw. verzögert hinzugegeben.

4.1.5 Aussaat auf Titanchips

Sowohl für die rasterelektronische Untersuchung als auch für die Calciumquantifizierung erfolgte die Aussaat der Osteoblasten auf runden Titanchips der Firma Biomet.

Dafür wurden jeweils 10.000 Zellen in 300 µl Medium in 48er-Multiwellplatten auf die Titanchips ausgesät und mit verschiedenen Diclofenackonzentrationen auf verzögerte und direkte Weise inkubiert.

4.2 Methoden der Zellkultur

4.2.1 Knochenmaterial

Für die Anzucht einer Primärkultur von Osteoblasten wurden aus Hüftköpfen, die im Rahmen der endoprothetischen Versorgung entfernt wurden und im Normalfall der Vernichtung zugeführt worden wären, Zellen herangezüchtet. Die Patienten haben ihr Einverständnis dazu gegeben, dass der Hüftkopf nicht vernichtet wird, sondern der Forschung zur Verfügung gestellt wird. Die Verwendung für wissenschaftliche Zwecke wurde von der Ethikkommission des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München anerkannt.

Die in den Versuchen verwendeten Zellen waren herangezüchtete Knochenzelllinien von fünf Patienten aus denen ein Zellpool erstellt wurde.

Bei den verschiedenen Patienten handelt es sich um je einen 18-jährigen, 42-jährigen und 44-jährigen Mann, sowie um je eine 39-jährige und 52-jährige Frau.

4.2.2 Medium und Zusatzstoffe

Zu Beginn der Aussaat wurde alpha-Medium ohne Zusätze zur Anzucht der Zellen verwendet. Hierzu wurden die Spongiosachips mit Medium bedeckt und die Schalen bei 37°C im Brutschrank bebrütet (100% Luftfeuchte, 5% CO₂).

Um eine Redifferenzierung der Osteoblasten zu Fibroblasten zu verhindern, wurde zum Zeitpunkt des unter dem Lichtmikroskop sichtbaren Auswachsens der Zellen das Medium auf normales DMEM (Dulbeccos modified eagle Medium) gewechselt, welches 16% FCS, 1% MEM Vitamine, 1% L-Glutamin, 2% HEPES-Puffer, sowie 0,2% Primocin enthält. Die Petrischalen wurden täglich lichtmikroskopisch auf ausgewachsene Zellen untersucht.

Zusätzlich zu den oben erwähnten Inhaltsstoffen wurde das DMEM-Medium für die Osteogenese ab diesem Zeitpunkt mit osteogenen Zusätzen versetzt, welche die osteogene Differenzierung unterstützen. Auf 50 ml DMEM wurden 0,5% Ascorbinsäure, sowie 0,02% Dexamethason gegeben.

4.2.3 Anlegen einer Primärkultur aus humanen Osteoblasten

In dieser Arbeit wurde das von Jones & Boyde beschriebene Verfahren zur Gewinnung von Osteoblasten aus Knochenchips verwendet, das auf der Fähigkeit von Osteoblasten beruht, unter geeigneten Kulturbedingungen aus Gewebe auszuwachsen²⁶.

Nach Entnahme des Hüftkopfes im OP-Saal wurde dieser zerkleinert und die Knochenstücke in sterilen Gefäßen unmittelbar ins Labor überführt.

Das noch blutige Knochenstück wurde sofort mit alpha-Medium gewaschen. Hierbei wurde mittels Pipetten das Medium direkt auf die Spongiosa gegeben, um die darin enthaltenen Zellen auszulösen. Die dadurch entstandene blutige Suspension (Alpha-Medium, Knochenzellen etc.) wurde gesammelt und in Zellkulturflaschen ausgesät. Die Spongiosa des Knochens wurde mit geeignetem Werkzeug zerkleinert und die Knochenstücke (ca. 0,5 cm³) gleichmäßig auf Petrischalen verteilt⁴. In die Petrischalen wurde ebenfalls alpha-Medium gegeben, so dass die Knochenchips bedeckt waren.

Sowohl die Petrischalen mit den Knochenchips als auch die Zellkulturflaschen mit der blutigen Waschlösung wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

4.2.4 Mediumwechsel

Zunächst wurde sowohl das alpha-Medium der Petrischalen als auch das der Zellkulturflaschen in wöchentlichen Abständen jeweils zur Hälfte gewechselt. Sobald lichtmikroskopisch festgestellt wurde, dass einzelne Zellen auswachsen, erfolgte der Mediumwechsel mit DMEM (plus osteogenen Zusätzen) etwa alle drei bis vier Tage.

4.2.5 Passagieren

Sobald der Zellrasen auf den Zellkulturflaschen zu 70% konfluent war, wurden die Zellen mit Hilfe von Trypsin passagiert, um eine Wachstumshemmung durch Kontaktinhibition zu verhindern⁴⁵.

Hierzu wurde das Medium abpipettiert und die Flaschen mit 10 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden 5 ml Trypsin (0,05%/ 0,02% (w/v) in PBS) zugegeben und bei 37°C für sieben Minuten inkubiert.

Gelöste, noch an der Oberfläche haftende Zellen, wurden nach dieser Zeit durch Klopfen auf die Unterseite der Gefäße abgelöst.

Das Trypsin wurde nach einer Einwirkzeit von sieben Minuten durch Zugabe serumhaltigen Mediums im Verhältnis 1:1 inaktiviert. Aus dieser Suspension von Medium, inaktiviertem Trypsin und den Zellen wurde die Zellzahl bestimmt (1:1 Verdünnung mit Trypanblau und

Auszählung der Zellen in der Neubauer-Zählkammer). Anschließend wurden die Zellen in einem Falconröhrchen bei 250 rpm für zehn Minuten abzentrifugiert.

Der Überstand wurde nach dem Zentrifugieren verworfen und das Zellpellet mit neuem Medium je nach gewünschter Konzentration resuspendiert.

Die Zellen wurden entweder neu auf Flaschen verteilt oder nach Bedarf für die Versuche ausgesät.

4.2.6 Kryokonservierung von Zellen

Da es sich als hilfreich erweisen kann, von einem Zellpool in früher Passage mehrere Portionen für spätere Versuche einzufrieren, wurden die Zellen nach der von Mazur et al. beschriebenen Methode konserviert³⁵.

Hierfür wurden die einzufrierenden, adhärenen Zellen wie oben beschrieben mit Hilfe von Trypsin abgelöst, gezählt und zentrifugiert. Der Überstand wurde vom Zellpellet möglichst vollständig abpipettiert und das Pellet auf Eis gestellt.

Die Zellen wurden mit kaltem Einfriermedium in einer Dichte von $5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ ml resuspendiert und in die Einfrierröhrchen aliquotiert.

Innerhalb von fünf Minuten nach Zugabe des Einfriermediums wurde mit dem Einfriervorgang begonnen (zuerst 24 Stunden bei -80°C in flüssigem 1-Propanol, anschließend Überführen der Einfrierröhrchen in flüssigen Stickstoff).

4.2.7 Auftauen von Zellen

Der Prozess des Auftauens musste zügig von statten gehen, da das Einfriermedium DMSO bei einer Temperatur über 4°C toxisch für die Zellen ist.

Dafür wurden die Einfrierröhrchen aus dem Stickstofftank geholt und die Zellen mit leichten Schwenkbewegungen im Wasserbad aufgetaut, bis nur noch ein kleiner Eisklumpen im Röhrchen sichtbar war. Die Zellsuspension aus dem Einfrierröhrchen wurde in ein mit 10 ml DMEM-Medium gefülltes Falcon-Röhrchen überführt und schonend zentrifugiert (fünf Minuten bei 200 rpm) Nach Entfernen des Überstandes wurden die Zellen resuspendiert, gezählt und erneut ausgesät.

Die Vitalität der Zellen wurde anhand verschiedener Kriterien beurteilt:

- Adhärenz nach 24 Stunden
- Vitalität der Zellen (Färbung mit Trypanblau und Zellzählung)
- Morphologie
- Proliferationsverhalten
- Veränderung der Differenzierung.

4.2.8 Immunzytochemische Färbungen

Mit Hilfe von immunzytochemischen Färbungen können Zellen auf osteoblastentypische Merkmale geprüft werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Zellen für die immunzytochemischen Färbungen auf Chamberslides angezchtet. Pro Kammer wurden 40.000 Zellen, suspendiert in 1 ml DMEM-Medium mit osteogenen Zusätzen, pipettiert. Die Zellen wurden für drei Tage bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert.

Danach wurden die Slides dreimal jeweils für fünf bis zehn Minuten mit PBS-Puffer gewaschen und die Zellen mit 4%iger PFA-Lösung für 10-20 Minuten fixiert. Nach einem erneuten fünfminütigen Waschschrift mit PBS wurden die Zellen anschließend entweder luftgetrocknet (10 Tage haltbar), in PBS gelagert (1 Tag haltbar) oder bei -20°C aufbewahrt (Monate haltbar).

Je nach gewünschter Untersuchung wurden die fixierten Zellen gefärbt.

4.2.8.1 Kollagen Typ I

Mit einem Anteil von über 90% der organischen Matrix ist Kollagen (v. a. Kollagen Typ I) das Hauptstrukturprotein des Knochens⁷.

Mit Hilfe der Kollagen Typ I-Färbung können die Differenzierungsstadien der transitorischen, sekretorischen und osteozytischen Osteoblasten nachgewiesen werden.

Für die Bestimmung des Kollagen Typs I wurde der ABC Kit Vectastain Elite verwendet.

Die Chamberslides mit den darauf angewachsenen, zuvor fixierten Zellen wurden für 10 Minuten in einem Reaktionsgefäß mit 50 ml PBS-Puffer gewaschen.

Danach wurde für den enzymatische Andau 100 µl 0,4%iges Pepsin (in 0,01M HCl) auf die Chamberslides pipettiert und für 40 Minuten bei 37°C inkubiert. Durch zwei jeweils fünfminütige Waschschriffe in PBS-Puffer (jeweils 50 ml) wurde die Reaktion gestoppt. Um eine unspezifische Hintergrundfärbung zu reduzieren, wurden die Proben anschließend mit einem Blockierungsreagenz versetzt. Hierfür wurden jeweils drei Tropfen DakoProteinBlock auf die Chamberslides gegeben und für zehn Minuten inkubiert. Nach dieser Zeit wurde das Blockierungsreagenz abgekippt und die Slides mit 600 µl eines 1:25 (in Dako Antibody Diluent) verdünnten polyklonalen Rabbit-Kollagen Typ I-Antikörper versetzt.

Die Slides mit dem Antikörper wurden über Nacht bei Raumtempertur in der feuchten Kammer inkubiert.

Nach zwei zehnminütigen Waschschriffen mit 50 ml PBS/Brij-Puffer (0,01% Brij-Konzentration in PBS) wurde ein 1/200 (in PBS) verdünnter biotinylierter Rabbit-Brücken-Antikörper der Firma Laboratories dazugegeben und für 30 Minuten inkubiert.

Nach erneuten Waschschritten mit PBS/Brij (dreimal für fünf Minuten) wurden 60 µl des Avidin/Biotin-Komplex (Vecastain) pro Kammer dazu verteilt und für 30 Minuten inkubiert. Die Proben wurden anschließend mit PBS/Brij und PBS-Puffer gewaschen, bevor durch Zugabe von ein bis zwei Tropfen des AEC-Substrats (Daktocytomatin) die Färbereaktion gestartet wurde. Die Farbtintensität wurde unter dem Lichtmikroskop überprüft. Gestoppt wurde diese Reaktion durch Waschen in PBS-Puffer.

Für die noch notwendige Kernfärbung wurden die Slides für eine Minute in der Hämalaun-Färbelösung inkubiert und im Anschluss unter fließendes Leitungswasser gehalten.

Zum Fixieren der Färbeergebnisse wurden die Slides mit Glyceringelatine eingedeckt.

4.2.8.2 Alkalische Phosphatase

Die hohe Aktivität der alkalischen Phosphatase ist ein charakteristisches Merkmal von Osteoblasten. Die Messung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase wurde mit Hilfe des NBT/BCIP-Test (Roche) bestimmt.

Die fixierten und luftgetrockneten Zellen auf den Chamberslides wurden fünf Minuten in 50 ml 0,1M Tris-Puffer rehydriert.

Eine Tablette des NBT/BCIP-Tests von Roche wurde in 10 ml Aqua dest. aufgelöst.

Jeweils 100 µl dieser Lösung wurden in die Kammern der Chamberslides pipettiert. Ausgenommen davon war die vierte Kammer, die als Kontrollansatz verwendet und mit 100 µl PBS-Puffer versetzt wurde.

Unter Sicht des Lichtmikroskops wurde die Umformung des Substrats BCIP ($C_8H_6NO_4BrCIP \times C_7H_9N$) durch das Oxidationsmittel NBT ($C_4OH_3OCl_2N_{10}O_6$) in einen blauen Indigofarbstoff nach circa 30 Minuten kontrolliert.

Nach erfolgter Färbung wurde die Lösung auf den Chamberslides verworfen. Nach Trocknung an der Luft wurden die Slides mit Glyceringelatine und einem Glasplättchen eingedeckt.

4.2.8.3 Fibronectin

Das Prinzip der Fibronectin-Färbung entspricht wiederum dem der oben ausführlich beschriebenen Kollagen Typ I-Färbung.

Im Unterschied zur Kollagen Typ I-Färbung erfolgte der enzymatische Andau bei der Fibronectin-Färbung mit Protein K (1:1000 in PBS) für fünf Minuten bei Raumtemperatur.

Als Antikörper wurde ein spezieller Rabbit-Fibronectin-Antikörper in verschiedenen Konzentrationen verwendet (1:3000, 1:4000, 1:5000 in Dako Antibody Diluent), der für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurde.

4.2.8.4 Osteokalzin

Osteokalzin ist ein nicht-kollagenes Knochenprotein, welches von Osteoblasten gebildet wird und eine essentielle Rolle bei der Knochenbildung spielt, in dem es zum Beispiel das Wachstum und die Größe der Hydroxylapatit-Kristalle kontrolliert²⁴.

Das Prinzip der immunzytochemischen Osteokalzinfärbung entspricht der bereits für Kollagen Typ I beschriebenen Vorgehensweise.

Im Unterschied zu der Kollagen Typ I-Färbung erfolgte der enzymatische Andau bei der Osteokalzin-Färbung mit Protein K (1:1000 in PBS) für 20 Minuten bei Raumtemperatur. Als Antikörper wurde ein spezieller Osteokalzin-Rabbit-Antikörper in verschiedenen Konzentrationen (1:25, 1:50, 1:75 in Dako Antibody Diluent) verwendet, der für 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurde.

4.3 Verwendete Tests und Untersuchungen

4.3.1 MTT-Test

Der MTT Proliferationstest ist ein quantitativ kolorimetrischer Test, der die Proliferation lebender Zellen durch ihre mitochondriale Stoffwechselaktivität nachweist. Der den Zellen angebotene, gelbe, wasserlösliche Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) wird von den Mitochondrien vitaler Zellen in einer NADH-abhängigen Reduktion zu violetter, wasserunlöslichem Formazan umgebaut.

Die Durchführung des MTT-Tests erfolgte in 48er-Zellkulturplatten, bei einem Wellvolumen von 300 µl. Hierfür wurden die Zellen angezüchtet und auf verzögerte (siehe 4.1.1) und direkte Art (siehe 4.1.2) mit dem Medikament Diclofenac versetzt. Nach Anzucht der Zellen wurden diese mit 30 µl MTT-Reagenz, welches zuvor in einem Verhältnis von 1:10 mit DMEM-Medium (inklusive osteogener Zusätzen) verdünnt wurde, für vier Stunden inkubiert (37°C und 5% CO₂). Im Anschluss an die Inkubationsperiode wurden 300 µl des gebrauchsfertigen Lösungspuffers für 16 Stunden hinzupipettiert, um die violetten wasserunlöslichen Formazansalzkrystalle, die sich während der Inkubationszeit gebildet hatten, aufzulösen.

Nach dieser Zeit wurden jeweils 100 µl der Wells in eine 96er-Multiwellplatte pipettiert und die Extinktion mit Hilfe eines ELISA-Messgerätes bei einer Wellenlänge von 550 nm gemessen. Die gemessene Farbveränderung war dabei direkt proportional zur Zellzahl^{10, 11}.

4.3.2 Laktatdehydrogenase-Test (LDH-Test)

Die Laktatdehydrogenase (LDH) findet sich im Cytoplasma fast aller Zellen. Beim LDH-Test handelt es sich um einen in-vitro-Zytotoxizitätstest, bei dem die Enzymaktivität der

Laktatdehydrogenase (LDH) bestimmt wird. In vitro ist die Laktatdehydrogenase im Überstand des Zellkulturmediums nachweisbar, wenn es zu einer Zellschädigung (apoptotisch oder durch eine exogene Noxe) gekommen ist. Um die Aktivität des Enzyms zu bestimmen wurde der Cytotoxicity Detection Kit von Roche verwendet werden, dessen Prinzip auf der Kopplung zweier katalytischer Reaktionen beruht. Bei der ersten Reaktion wird Laktat, bei gleichzeitiger Reduktion von NAD^+ zu NADH , zu Pyruvat oxidiert.

Am zweiten Schritt der Reaktion ist der im Testreagenz enthaltene Katalysator beteiligt, welcher Wasserstoff von NADH auf das Tetrazolium-Salz INT (2-[4-Iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazoliumchlorid) transferiert. Bei dieser Reduktion kommt es zu einem Farbumschlag von schwach gelben Tetrazoliumsalz zu rot gefärbten Formazan-Salz. Gleichzeitig wird NADH zu NAD^+ oxidiert. Für den Versuch wurden die Zellen wie bereits in 4.1 ausführlich beschrieben in 48er-Multiwellplatten ausgezchtet.

Das Medikament Diclofenac wurde für die zytotoxische Untersuchung auf verzögerte Art (4.1.1) hinzugegeben. Zusätzlich zu den verschiedenen Diclofenac-Konzentrationen und der Kontrolle wurde eine Zellreihe für die Positivkontrolle mit jeweils 10.000 Zellen ($n = 2$) angesetzt. Fünf Stunden vor Messung der Ergebnisse wurde diese Zellreihe mit 300 μl 1%iger Tritonlösung (verdünnt in alpha-Medium) vergiftet. Der Mittelwert dieser beiden Positivkontroll-Werte wurde als Referenz für die maximal freisetzbare LDH-Aktivität verwendet. Als Negativkontrolle wurden Zellen im normalen Zellkulturmedium ohne Medikamentenzugabe verwendet.

Nach Anzucht der Zellen wurden die Platten für zehn Minuten bei 250 rpm zentrifugiert.

Im Anschluss wurden 100 μl des Überstand der Proben und Kontrollen in eine 96er-Multiwellplatte pipettiert und mit 100 μl des Reaktionsmix (Katalysator:Farblösung = 2:1) versetzt. Nach einer Inkubationsperiode von 30 Minuten unter lichtgeschützten Bedingungen bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 492 nm gemessen.

Dabei korreliert die Menge an LDH direkt mit der Menge des bei der Reaktion gebildeten Formazansalzes und ist daher direkt proportional zur Anzahl geschädigter Zellen¹⁴.

4.3.3 Calcium-Quantifizierung

Die Calciumquantifizierung wurde mit Hilfe des Quanti-Chrom Calcium Assay (Biotrend Nr. DICA-500) bestimmt.

Durch Zugabe von Phenolsulphonephalein entstand mit freiem Calcium in Lösung ein sehr stabiler blauer Komplex. Photometrisch konnte dadurch die Calciummenge bestimmt werden.

Für den Versuchsansatz wurden jeweils 10.000 Osteoblasten (suspendiert in 1 ml) in ein 24er-Multiwell auf einen runden Titanchip der Firma Biomet ausgesät.

Bei den zu untersuchenden Proben wurde wöchentlich ein Mediumwechsel mit Alpha-Medium vorgenommen. Das Alpha-Medium wurde im Gegensatz zum Gebrauch bei den anderen Versuchen, bei denen nur die unter 4.2.2 beschriebenen Zusätzen hinzugefügt wurden, bei der Calcifizierung zusätzlich noch mit β -Glycerophosphat (1% β -Glycerophosphat/ 50 ml Alpha-Medium) versetzt. Der Calcifizierungsprozess der Osteoblasten wurde durch das β -Glycerophosphat induziert und trat nach sechs Wochen ein. Zusätzlich zu den Zellproben auf Titanchips wurde eine Zellreihe ohne Titanchips (Kontrolle auf Plastik ohne Diclofenaczugabe) angelegt. So konnte unter dem Lichtmikroskop der Prozess der Calcifizierung beurteilt werden.

Als die Calcifizierung genügend fortgeschritten war, wurden die Proben, nach zweimaligem Waschen mit jeweils 50 ml PBS, in 200 μ l 0,5M HCl-Lösung für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Oberfläche der Titanchips, auf der die Osteoblasten adhärirt haben, gründlich mit einer Pipettenspitze abgekratzt und mit dem in dem Well befindlichen Zelllysat mehrfach abgespült. Das Zelllysat wurde in einem Eppendorfcup gesammelt und bei 10°C und 1000 rpm im Thermomixer für drei Stunden inkubiert.

Anschließend wurden die Eppendorfcups erneut bei 1000 rpm für fünf Minuten zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abpipetiert, ohne dabei das entstandene Pellet zu zerstören.

Für den Versuch wurde eine Verdünnungsreihe als Eichkurve benötigt, um die später gemessene Extinktion der Probe einer definierten Calciummenge zuordnen zu können.

Hierzu wurde zuerst eine Standardlösung aus Calciumchlorid und 0,5M HCl hergestellt. Aus dieser Stammlösung wurden nun durch serielle Verdünnung verschiedene Konzentrationen erstellt.

Von den Proben (abzentrifugierter Überstand siehe oben) und den Eichlösungen wurden jeweils 5 μ l in eine 96er-Multiwellplatte pipettiert und mit 200 μ l der Arbeitslösung aus dem Quantichrom Calcium Assay Kit (Reagenz A und B im Verhältnis 1:1) versetzt.

Je 5 μ l von den Proben und den hergestellten Standards (Calciumchlorid + 0,5N HCl) für die Verdünnungsreihe wurden mit 200 μ l der Arbeitslösung versetzt und vorsichtig gemischt. Nach 3 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Farbextinktion bei 612 nm mit Hilfe eines ELISA-readers gemessen.

4.3.4 Bicinchoninsäure-Test (BCA-Test)

Die BCA-Reaktion wird in der Biochemie zur quantitativen, photometrischen, aber unselektiven Bestimmung von Proteinen verwendet. Dabei reagieren zweiwertige Kupferionen quantitativ mit Proteinen zu einwertigen Kupferionen. Diese ergeben zusammen mit der Bicinchoninsäure einen violetten Farbstoff, dessen Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm photometrisch bestimmt werden kann.

Für den BCA-Test wurden die Zellen wie unter 4.1 beschrieben auf verzögerte (4.1.1) und direkte (4.1.2) Weise angezüchtet.

Für die Kalibrierung wurde eine Standardkurve mit verschiedenen BSA-Konzentrationen (verdünnt in Triton X-100 5% (v/v) in PBS) verwendet.

Von den 48er-Multiwellplatten wurde das Medium abpipettiert und die Zellen zweimal mit jeweils 50 ml PBS gewaschen.

Anschließend wurde in jedes der Wells 100 µl Triton X-100 5% (v/v) in PBS hinzugegeben. Die Zellen wurden für 30 min bei 37°C und 300 rpm inkubiert. Anschließend wurden sie für 30 Minuten bei -80°C aufbewahrt. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Danach wurden die Zellen in den Platten über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

Im Anschluss wurden von den Proben sowie den Verdünnungen für die Kalibrierung jeweils 50 µl in eine 96er-Multiwellplatte überführt und mit 175 µl der Arbeitslösung aus dem BCA Protein Assay Kit (50 Teile Reagenz A und 1 Teil Reagenz B) versetzt. Nach einer Inkubationsperiode von 30 Minuten bei 37°C und einem darauf folgenden Abkühlungsprozess von 15 min wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 560 nm gemessen.

4.3.5 ALP-Test

Die Alkalische Phosphatase bezeichnet eine Gruppe von Enzymen, die die Hydrolyse von Phosphorsäureestern katalysieren. Das Enzym ist von Bedeutung für die Knochenmineralisierung und ein spezifischer Marker für Knochenzellen. Für die Untersuchung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase wurde in vorliegender Arbeit ein photometrisch ausgewerteter Enzym-Aktivitäts-Test der Firma DiaSys Diagnostics Systems verwendet. Die Ermittlung der Aktivität der membrangebundenen ALP beruht auf einer enzymatischen Reaktion, in der das farblose p-Nitrophenylphosphat unter der ALP-Katalyse in ein gelb gefärbtes p-Nitrophenol umgesetzt wird.

Die Anzucht der Zellen erfolgte wie unter 4.1.1 und 4.1.2 beschrieben. Die Standardkurve wurde mit einer p-Nitrophenol Standard Solution von Sigma-Aldrich ermittelt. Diese wurde zu unterschiedlichen Teilen mit dem Reagenz 1 aus dem verwendeten Kit verdünnt. Für die Bestimmung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase wurde das Medium von den Multiwellplatten abpipettiert und der adhärenente Zellrasen zweimal mit TRIS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden 150 µl einer 1%igen Tritonlösung (verdünnt mit TRIS-Puffer) in jedes Well pipettiert. Die mit Parafilm überdeckten Multiwellplatten wurden für eine Stunde bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert und danach bei -70°C eingefroren. Der Einfrier- und Auftauprozess, der das Aufbrechen der Zellmembran zum Ziel hat, wurde zweimal wiederholt. Jeweils 50 µl der Proben wurden in ein Well einer 96er-Multiwellplatte pipettiert und mit 50 µl der hergestellten Arbeitslösung (4 Teile Reagenz 1 und 1 Teil

Reagenz 2) versetzt. Die kinetische Messung der Enzymaktivität startete sofort nach Zugabe der Arbeitslösung und wurde mit einem auf 37°C aufgewärmten ELISA-reader bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen. Der Endpunkt der Messung wurde nach 30 Minuten erreicht. Die Intensität der Färbung, die spektralphotometrisch gemessen wurde, ist direkt proportional zur Aktivität der ALP.

4.3.6 Rasterelektronenmikroskop-Untersuchung (REM-Untersuchung)

Für die elektronenmikroskopische Untersuchung erfolgte die Anzucht der Osteoblasten auf Titanchips in 24er-Multiwellplatten. Dafür wurden wie bereits unter 4.1.5 erläutert, jeweils 10.000 Osteoblasten in jedes Multiwell auf einen runden Titanchip der Firma Biomet ausgesät.

Die Zellen wurden wie unter 4.1.1 und 4.1.2 beschrieben auf verzögerte und direkte Weise mit Diclofenac inkubiert.

Bevor die biologischen Proben untersucht wurden, mussten sie für 24 Stunden bei 4°C in einer Fixierlösung fixiert werden.

Die Fixierlösung wurde folgendermaßen hergestellt:

1. Lösung A

16,4M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ in Aqua dest.

22,6 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ auf 1000 ml Aqua dest.; $M(\text{NaH}_2\text{PO}_4) = 137,99 \text{ g/mol}$;
 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$;

2. Lösung B

0,63M NaOH in Lösung A

25,2 g NaOH auf 1000 ml Lösung A; $M(\text{NaOH}) = 40,01 \text{ g/mol}$

3. Glutaraldehyd 25 %

4. Fixierlösung

4,88/1 Mischung aus Lösung A und Lösung B

830 ml Lösung A und 170 ml Lösung B;

5. 24/1 Fixierlösung und Glutaraldehyd mischen

Nach der Fixierung erfolgte die Wässerung, Trocknung und im Anschluss die Kritisch-Punktrocknung.

Für die Wässerung wurden die Proben dreimal für jeweils 15 Minuten mit Aqua dest. gewässert. Das Wellvolumen betrug wie bei allen folgenden Schritten 1 ml.

Im Anschluss wurden die Proben in aufsteigender Alkoholverdünnung (50%, 70%, 80%) wieder für je 15 Minuten entwässert.

Die Lagerung der Proben erfolgte in 80%-igem Alkohol.

Unmittelbar vor der REM-Untersuchung erfolgte die Dehydrierung mit 90%-igem und 100%-igem Alkohol, wieder jeweils für 15 Minuten.

Die Kritisch-Punkttrocknung erfolgte über mehrere Zyklen mit flüssigem CO₂. Anschließend wurden die Proben mit 6 nm Gold-Paladium-Partikeln besputtert.

Die Auflösung des REM reicht nicht aus, um diese Partikel zu sehen. Es ergab sich also im Bild eine homogen erscheinende Beschichtung.

4.3.7 xCELLigence System

Das xCELLigence System ermöglicht die Aufnahme zellulärer Prozesse in vitro in Echtzeit.

Das Messprinzip beruht dabei auf einer elektrischen Messung von Veränderungen von Wechselstromwiderständen. Gemessen wird also eine Impedanzänderung.

Im Boden von speziellen Zellkulturplatten eingelassene Elektroden dienen hierbei als Messfühler. Adhärenz von Zellen auf der Oberfläche, kommt es durch die Wechselwirkung der Adhäsionsmoleküle mit der Beschichtung des Bodens der Multiwellplatte, an den Elektroden zu einer Impedanzänderung.

Dabei gilt: Die Änderung der Impedanz ist umso stärker, je fester die Zellen auf der Platte haften, das heißt, je mehr Bindungsmoleküle die einzelne Zelle ausbildet. Außerdem wird die Änderung der Impedanz natürlich auch durch die absolute Zahl der gebundenen Zellen gemessen. Das System kann also sowohl eine Aussage über die Quantität als auch über die Qualität der Zelladhäsion machen.

Da es sich bei der Messung um eine Echtzeitaufnahme handelt, können Veränderungen zu unterschiedlichen Zeiten besonders gut herausgefiltert werden^{2 28}.

Die Anzucht der Zellen erfolgte wie unter 4.1.4 bereits beschrieben. Für den Versuchsansatz mit verzögerter Diclofenac-Zugabe wurden 5.000 Zellen ausgesät.

Nach einer Adhäsionszeit von circa 20 Stunden (Inkubation über Nacht) wurde ein Mediumwechsel mit den entsprechenden Diclofenac-Konzentrationen vorgenommen.

Beim direkten Versuchsansatz wurden ebenso 5.000 Zellen ausgesät. Die Diclofenac-Zugabe erfolgte in den unterschiedlichen Versuchsansätzen sofort bei Aussaat, nach einer, zwei sowie nach vier Stunden.

4.4 Statistik

Zur statistischen Auswertung wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Hierbei handelt es sich um einen parameterfreien statistischen Test für normal- oder ordinalverteilte Stichproben, der überprüft, ob zwei unabhängige Verteilungen A und B zur selben Grundgesamtheit gehören.

Ein p-Wert (Signifikanzniveau) kleiner gleich 0,05 wurde als statistisch signifikant angenommen und in unten aufgeführten Schaubildern mit einem Stern (*) markiert. Ein Signifikanzniveau kleiner gleich 0,01 wurde mit zwei Sternen (**), eines kleiner gleich 0,001 mit drei Sternen (***) markiert. Alle Angaben zur Statistik sind aufgrund der niedrigen n-Zahlen nur explorativen Charakters. Die Werte für die Statistik wurden mit Hilfe des Programms WinStat für Microsoft Excel berechnet.

5 Ergebnisse

5.1 Immunhistochemische Färbung

Die durchgeführten Färbungen zum Nachweis von Osteoblasten fielen alle positiv aus. Sowohl die Kollagen I-Färbung, wie auch die Alkalische-Phosphatase-Färbung, die Fibronectin-Färbung und die Osteocalzinfärbung zeigten einen deutlichen Farbumschlag. Die unten aufgeführten Bilder zeigen beispielhaft, dass es sich bei den in den Versuchen verwendeten Zellen um Osteoblasten handelt.

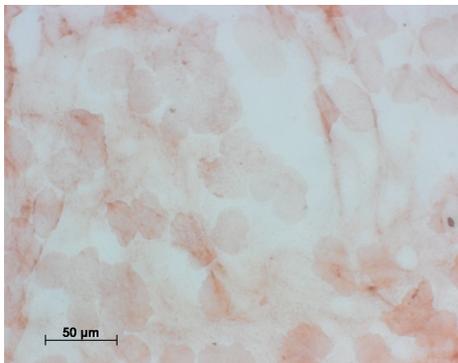


Abb. 2, ICC, Kollagen I

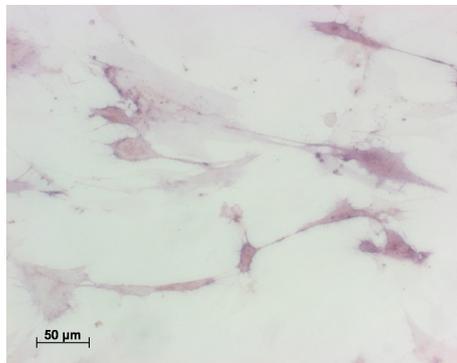


Abb. 3, ICC, Alkalische Phosphatase

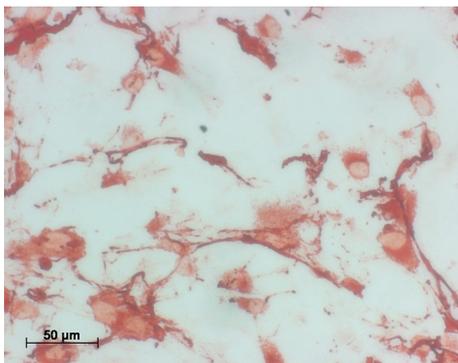


Abb. 4, ICC, Fibronectin

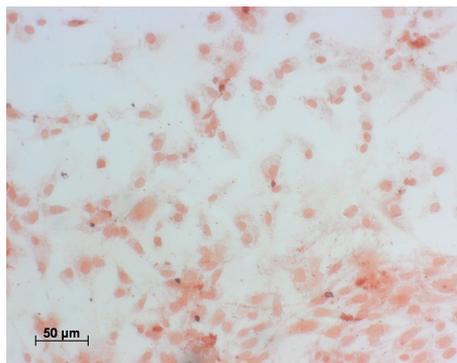


Abb. 5, ICC, Osteocalzin

5.2 Verzögerte Medikamentenzugabe

5.2.1 Ergebnisse MTT-Test

Für diesen Versuch wurden die Zellen (Passage 9), wie in 4.1 beschrieben, angezchtet. Im ersten Teil des Versuches wurde das Diclofenac verzögert hinzugegeben (d.h. nachdem die Zellen adhären konnten, siehe 4.1.1).

Es wurden zunächst verschiedenen Zellzahlen bei gleichen Diclofenac-Konzentrationen untersucht (2.500 Zellen, 5.000 Zellen, 10.000 Zellen und 25.000 Zellen). Der Test wurde mit Diclofenac-Konzentrationen von 0 µg/ml (Kontrolle), 25 µg/ml, 50 µg/ml und 100 µg/ml durchgeführt.

Die Anzahl der Proben betrug jeweils $n = 5$ und die verschiedenen Messungen wurden dreifach wiederholt.

Abbildung 6 zeigt die Ergebnisse. In der Tabelle unterhalb der Balkendiagramme sind der jeweilige prozentuale Wert angegeben, wobei die entsprechenden Teilergebnisse auf die Negativ-Kontrolle umgerechnet wurden (Zellvitalität beträgt 100% bei 0 µg/ml Diclofenac).

Eine hohe prozentuale Zellvitalität entspricht einer hohen Proliferation lebender Zellen.

Bei einer Zellzahl von 2.500 Zellen bestehen keine wesentlichen Unterschiede zwischen der Kontrolle und den Diclofenac-Konzentrationen bei 25 bzw. 50 µg/ml (103% (+/- 4,4%) bzw. 104% (+/-7,2%), $p = 0,09$ bzw. $0,02$). Diese Konzentrationen bedingen keine Abnahme der Zellvitalität. Bei 100 µg/ml kommt es allerdings zu einer signifikanten Abnahme der Vitalität um 21%. (79% (+/- 4,0%), $p = 0,009$).

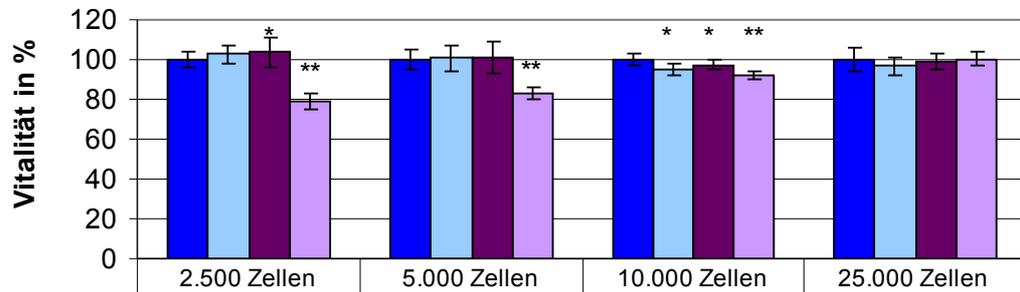
Ähnliche Ergebnisse zeigen sich bei Verwendung von 5.000 Zellen (25 µg/ml bzw. 50 µg/ml, 101% (+/- 6,8%) bzw. 101% (+/- 8,0%), $p = 0,92$ bzw. $0,83$). Auch hier zeigt sich eine deutliche Abnahme um 17% bei 100 µg/ml (83% (+/- 2,6%), $p = 0,01$).

Dieses Muster lässt sich so bei 10.000 Zellen nicht wiederfinden:

Hier zeigt sich für Diclofenac-Konzentrationen von 25 bzw. 50 µg/ml eine Abnahme der Vitalität auf 95% (+/- 3,1%) bzw. 97% (+/-2,6%) ($p = 0,03$ bzw. $0,04$). Für 100 µg/ml liegt sie um knapp 10% unter derjenigen der Kontrollgruppe (92% (+/- 2,0%), $p = 0,01$).

Bei Verwendung von 25.000 Zellen fallen die Unterschiede zwischen den einzelnen Konzentrationen und der Kontrolle am geringsten aus, es kommt zu keiner statistisch signifikanten Abnahme der Vitalität (25 µg/ml bzw. 50 µg/ml bzw. 100 µg/ml, 97% (+/-4,4%) bzw. 99% (+/- 3,9%) bzw. 100% (+/- 3,7%), $p > 0,05$ für alle Konzentration).

**Vitalität der Zellen (MTT-Test) bei variiertes Zellzahl und verschiedenen Diclofenac-Konzentrationen, n = 5
(verzögerte Medikamentenzugabe)**



	2.500 Zellen	5.000 Zellen	10.000 Zellen	25.000 Zellen
■ 0 µg/ml (Negativkontrolle)	100	100	100	100
■ 25 µg/ml	103	101	95	97
■ 50 µg/ml	104	101	97	99
■ 100 µg/ml	79	83	92	100

Abb. 6, MTT-Test - verzögerte Medikamentenzugabe

(variiertes Zellzahlen und verschiedene Diclofenac-Konzentrationen (Zellpassage 9, n = 5), Signifikanzniveau bezogen auf die Kontrolle (0 µg/ml) (* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$))

5.2.2 Ergebnisse LDH-Test

Für diesen Versuch wurden 10.000 Zellen (Passage 9) wie in 4.1 beschrieben angezüchtet. Die Überprüfung auf Zytotoxizität erfolgte durch verzögerte Zugabe von Diclofenac (das heißt, nachdem die Zellen adhären konnten, siehe 4.1.1).

Die Messung wurde einfach durchgeführt, die Probenanzahl betrug $n = 4$, außer bei der vergifteten Positivkontrolle ($n = 2$), deren Zellen zuvor mit einprozentiger Tritonlösung (Triton X-100 in Aqua. dest.) für 4 Stunden lysiert worden sind.

Der Test wurde mit Diclofenac-Konzentrationen von $0 \mu\text{g/ml}$ (Kontrollgruppe), $2,5 \mu\text{g/ml}$, $25 \mu\text{g/ml}$ und $250 \mu\text{g/ml}$ durchgeführt. Abbildung 7 zeigt die Ergebnisse: Die Höhe der Extinktion bei einer Optischen Dichte von 492 nm ist direkt proportional zur Anzahl geschädigter Zellen.

Alle gemessenen Werte bei den verschiedenen Diclofenac-Konzentrationen bleiben unter dem Wert der Kontrollgruppe ($0 \mu\text{g/ml}$ Diclofenac):

Der Unterschied zwischen der Positivkontrolle und den Proben sowie der Kontrollgruppe erwiesen sich als signifikant (bei $0 \mu\text{g/ml}$ bzw. $2,5 \mu\text{g/ml}$ bzw. $25 \mu\text{g/ml}$ bzw. $250 \mu\text{g/ml}$: $p = 0,02$ bzw. $p = 0,04$ bzw. $p = 0,02$ bzw. $p = 0,02$).

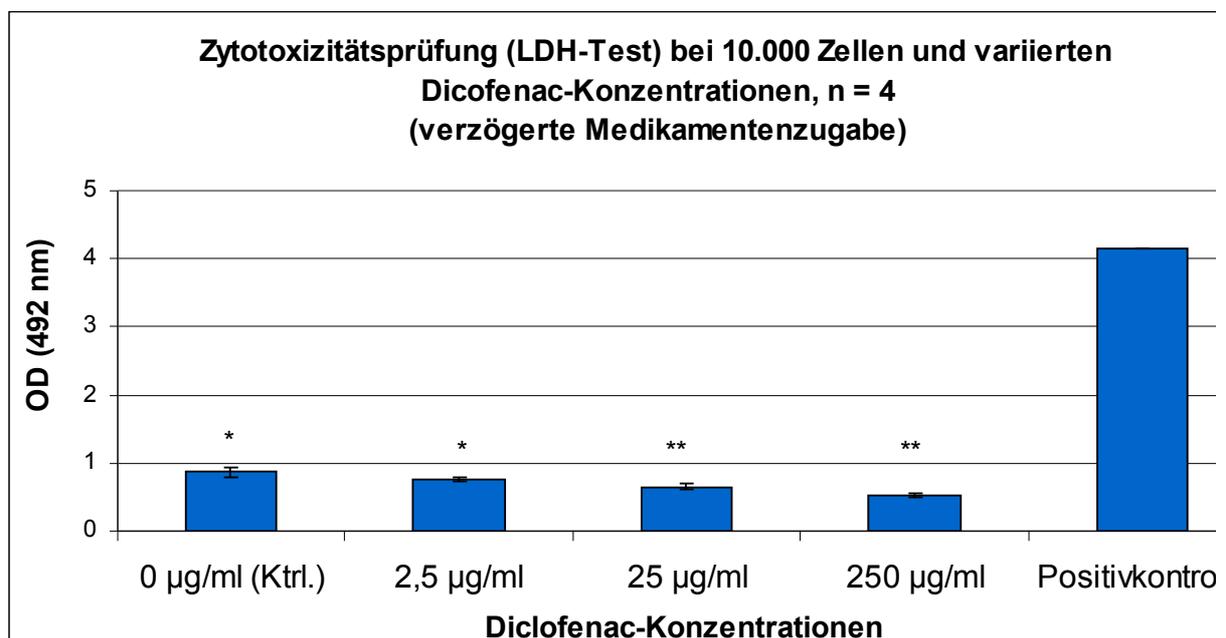


Abb. 7, LDH-Test - verzögerte Medikamentenzugabe

(10.000 Zellen und variierte Diclofenac-Konzentrationen (Zellpassage 9, $n = 4$), Signifikanzniveau bezogen auf die Positivkontrolle (* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$))

5.2.3 Ergebnisse Calciumquantifizierung

Wie bereits in 4.1.5 beschrieben wurden 10.000 Zellen in eine 48er-Multiwellplatte bei einem Zellvolumen von 300 µl auf Titanchips auf verzögerte Weise (vgl. 4.1.1) ausgesät. Zusätzlich zur Kontrolle auf Titan (0 µg/ml Diclofenac) wurde eine Kontrolle auf Plastik (0 µg/ml Diclofenac) angesetzt. Die Anzucht der Zellen auf der Plastikoberfläche der Zellkulturplatte wurde lediglich mitangesetzt, um den Prozess der Calcifizierung unter dem Mikroskop sichtbar zu machen. Die Anzucht der Proben (25 µg/ml, 50 µg/ml und 100 µg/ml Diclofenac) sowie der Kontrolle (0 µg/ml Diclofenac) erfolgte jeweils auf Titanchips. Der Versuch wurde einfach durchgeführt, die Anzahl der Proben betrug n = 4.

Je höher der prozentuale Wert der Calcifizierung im unten aufgeführten Schaubild ist, desto mehr Zellen verfügen über die Fähigkeit der Calciumquantifizierung, die ein Merkmal von Osteoblasten darstellt.

Wenn die Calcifizierung auf Titan in der Kontrollgruppe (0 µg/ml Diclofenac) gleich 100% gesetzt wird, nimmt sie mit steigender Diclofenac-Konzentration stetig ab (25 µg/ml bzw. 50 µg/ml bzw. 100 µg/ml, 92,9% (+/- 7,0%) bzw. 89,2% (+/- 6,0%) bzw. 85,0% (+/- 3,1%), p = 0,03 bzw. 0,02 bzw. 0,02).

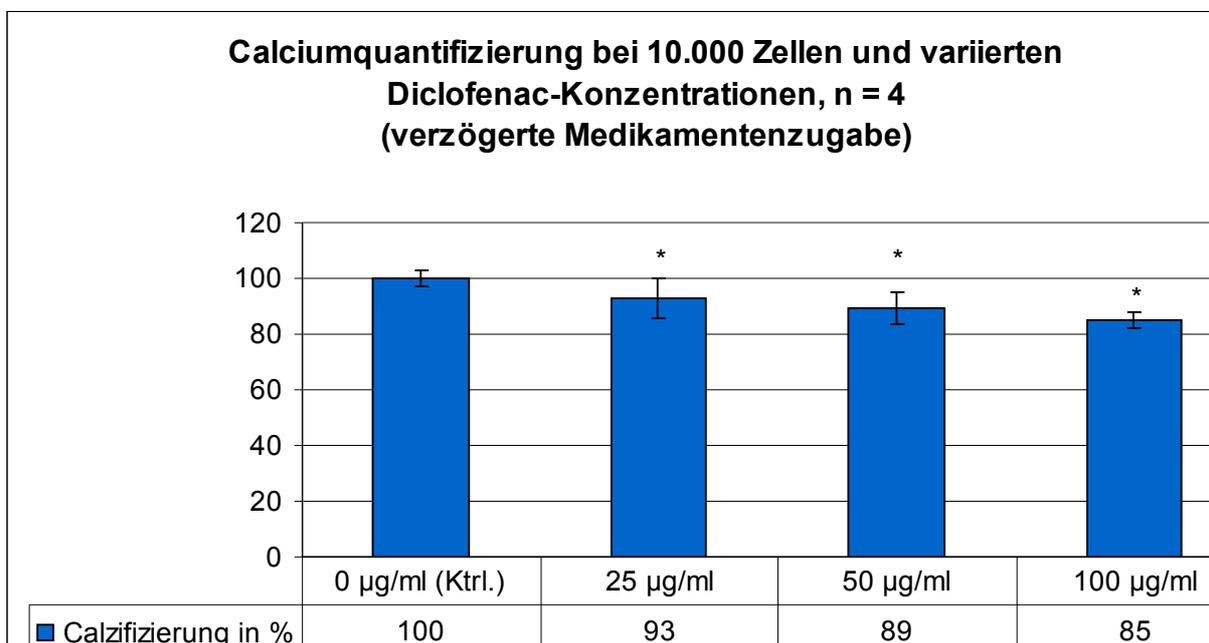


Abb. 8, Calciumquantifizierung - verzögerte Medikamentenzugabe

(10.000 Zellen und variierte Diclofenac-Konzentrationen (Zellpassage 9, n = 4),

Signifikanzniveau bezogen auf die Kontrolle (0 µg/ml) (* = p ≤ 0,05))

5.2.4 Ergebnisse BCA-Test

Für diesen Versuch wurden die Zellen (Passage 9), wie in 4.1 beschreiben, angezchtet. Im ersten Teil des Versuches wurde das Diclofenac verzögert hinzugegeben, das heißt nachdem die Zellen adhären konnten (siehe 4.1.1).

Es wurden 10.000 Zellen ausgesät und mit Diclofenac-Konzentrationen von 0 µg/ml (Kontrollgruppe), 25 µg/ml, 50 µg/ml und 100 µg/ml versetzt.

Die Anzahl der Proben betrug jeweils $n = 5$ und die verschiedenen Messungen wurden dreifach wiederholt.

Dabei entspricht in unten aufgeführtem Schaubild ein hoher Prozentwert einer hohen zellulären Proteinbiosynthese.

Abbildung 9 zeigt, dass sich die Proteinmenge pro Well bei unterschiedlichen Diclofenac-Konzentrationen und verzögerter Medikamentenzugabe nur geringfügig unterscheidet. Auch hier wurde die Kontrollgruppe (0 µg/ml Diclofenac) als 100% gesetzt. Es konnten nur geringe Unterschiede in den Proteinmengen der Kontrollgruppe und der Proben festgestellt werden. Im Vergleich zur Kontrollgruppe wurde der größte Unterschied bei 25 µg/ml (94% (+/- 3,0%), $p = 0,02$) festgestellt. Bei einer Diclofenac-Konzentration von 50 µg/ml betrug der Unterschied nur ein Prozent (99% (+/-3,2%), $p = 0,56$), was sich als statistisch nicht signifikant herausstellte. Die geringe Abnahme der Proteinmenge pro Well bei einer Konzentration von 100 µg/ml erwies sich als statistisch signifikant (98% (+/- 2,0%), $p = 0,04$).

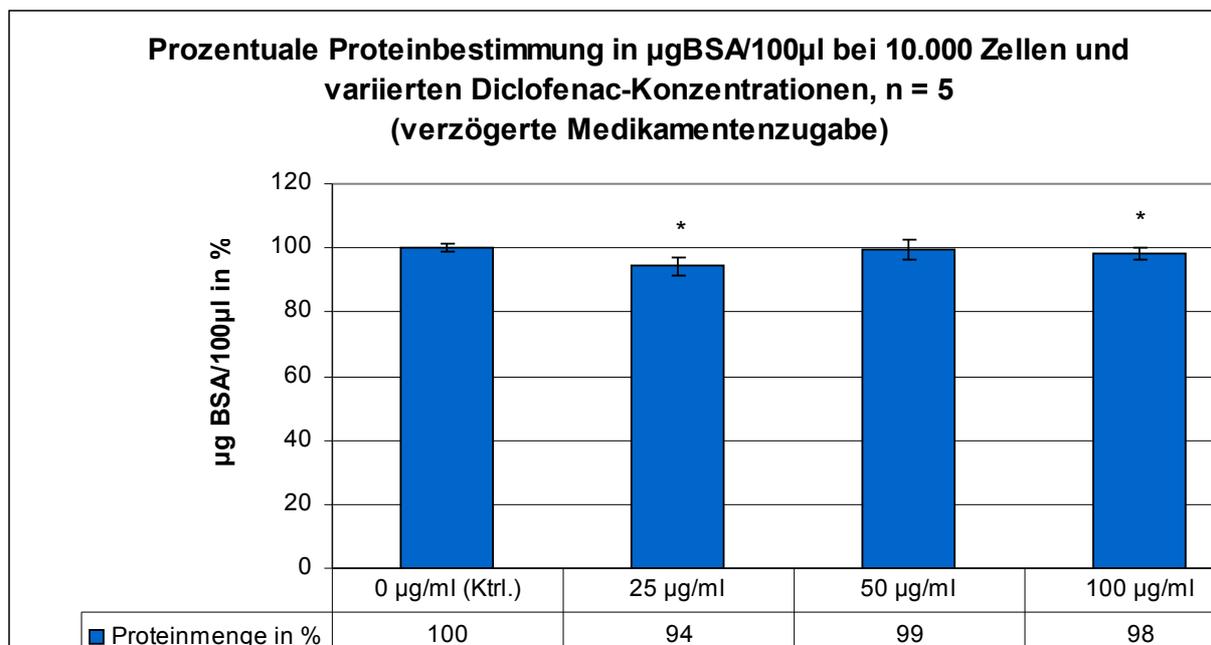


Abb. 9, Proteinbestimmung pro Well - verzögerte Medikamentenzugabe

(10.000 Zellen und variierte Diclofenac-Konzentrationen (Zellpassage 9, $n = 5$), Signifikanzniveau bezogen auf die Kontrolle (0 µg/ml) (* = $p \leq 0,05$))

5.2.5 Ergebnisse ALP-Test

Für diesen Versuch wurden die Zellen (Passage 9) wie in 4.1 beschreiben angezchtet. Im ersten Teil des Versuches wurde das Diclofenac verzögert hinzugegeben (siehe 4.1.1).

Es wurden 10.000 Zellen ausgesät und mit Diclofenac-Konzentrationen von 0 µg/ml (Kontrollgruppe), 25 µg/ml, 50 µg/ml und 100 µg/ml versetzt.

Die Anzahl der Proben betrug jeweils n = 6 und die verschiedenen Messungen wurden dreifach wiederholt.

Da die Messung der Alkalischen Phosphatase ein spezifischer Marker für die Stoffwechselaktivität von Knochenzellen ist, entspricht ein hoher Wert einem guten Stoffwechsel gesunder Osteoblasten.

Die Aktivität der Alkalischen Phosphatase ist in Abbildung 10 über den Zeitverlauf einer halben Stunde erkennbar. Die Werte entsprechen der Menge an p-Nitrophenol (in Nanomol) die pro Zeiteinheit von einem Mikrogramm des Enzyms Alkalische Phosphatase verstoffwechselt werden.

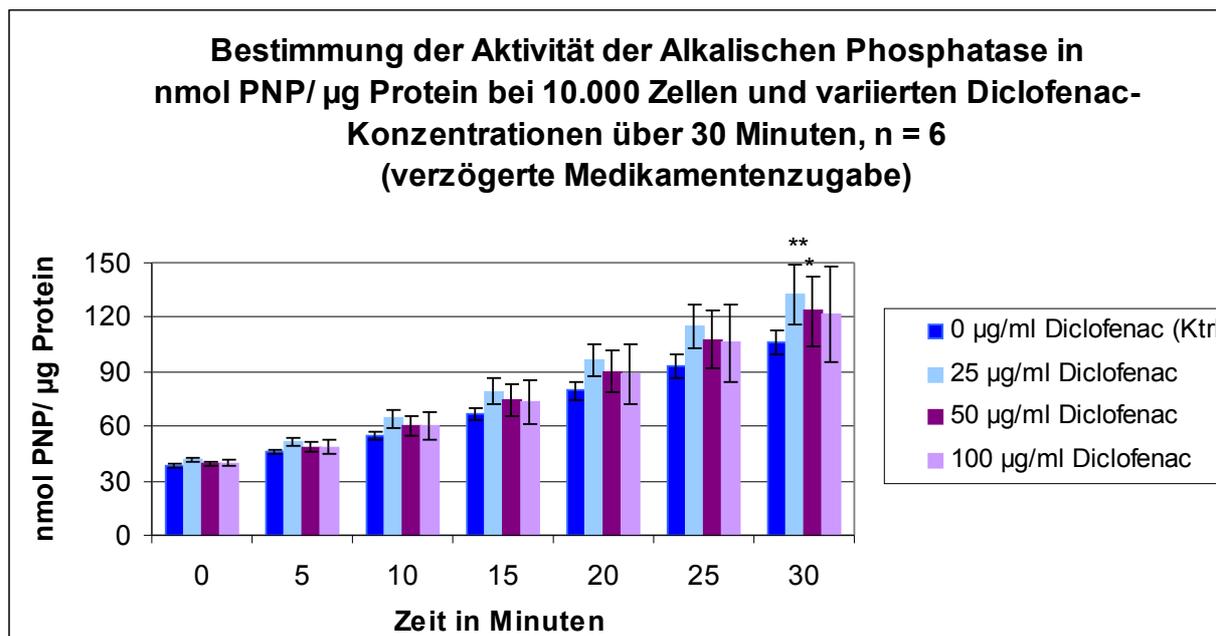


Abb. 10, ALP-Aktivitätsmessung - verzögerte Medikamentenzugabe

(10.000 Zellen, t = 0 bis 30 Minuten und variierte Diclofenac-Konzentrationen (Zellpassage 9, n = 6), Signifikanzniveau bezogen auf die Kontrolle (0 µg/ml) nach 30 Minuten (* = p ≤ 0,05; ** = p ≤ 0,01))

Über den gesamten Zeitverlauf kommt es in allen Gruppen zu einer kontinuierlichen Zunahme der verstoffwechselten Menge an p-Nitrophenol.

Zum Zeitpunkt $t = 30$ Minuten ist die Aktivität des Enzyms bei einer Diclofenackonzentration von $25 \mu\text{g/ml}$ am höchsten. Die Enzymaktivitäten bei $50 \mu\text{g/ml}$ und $100 \mu\text{g/ml}$ entsprechen sich weitestgehend, liegen aber unter der Enzymaktivität bei $25 \mu\text{g/ml}$. Die Aktivität der Alkalischen Phosphatase bei der Kontrollgruppe ($0 \mu\text{g/ml}$ Diclofenac) liegt nach 30 Minuten unter der Aktivität in den mit Diclofenac ausgesetzten Gruppen.

Diese Ergebnisse zum Zeitpunkt $t = 30$ Minuten erwiesen sich im Vergleich zur Kontrollgruppe als statistisch signifikant für die Konzentration von $25 \mu\text{g/ml}$ ($p = 0,002$) und $50 \mu\text{g/ml}$ ($p = 0,03$), nicht allerdings bei einer Diclofenac-Konzentration von $100 \mu\text{g/ml}$ ($p = 0,09$).

5.3 Direkte Medikamentenzugabe

5.3.1 Ergebnisse MTT-Test

Wie bereits unter 5.2.1 beschrieben, wurden für diesen Versuch die Zellen (Passage 9) wie in 4.1 ausgeführt angezüchtet. Im Gegensatz zum ersten Teil des Versuches, bei dem die Zellen auf verzögerte Weise (4.1.1) ausgesät wurden, erfolgte in diesem Teil des Versuchs die Aussaat der Zellen auf direkte Weise (4.1.2), ohne medikamentenfreie Adhäsionszeit zu Beginn. Der Test wurde mit Diclofenac-Konzentrationen von 0 µg/ml (Kontrollgruppe), 25 µg/ml, 50 µg/ml und 100 µg/ml durchgeführt. Es wurden pro Well 10.000 Zellen ausgesät, die Anzahl der Proben betrug jeweils n = 5 und die Messungen wurden dreifach wiederholt. Eine hohe prozentuale Zellvitalität entspricht einer hohen Proliferation lebender Zellen.

Abbildung 11 zeigt eine geringere Zellvitalität in den Diclofenac-Gruppen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Bei 100 µg/ml sinkt die Vitalität auf 80% (+/- 1,1%) (p = 0,02). Bei einer Konzentration von 25 µg/ml und 50 µg/ml nimmt die Proliferation im Vergleich zur Kontrollgruppe ungefähr gleich stark ab (25 µg/ml bzw. 50 µg/ml, 89% (+/- 4,3%) bzw. 92% (+/- 3,8%), p = 0,02 bzw. 0,04).

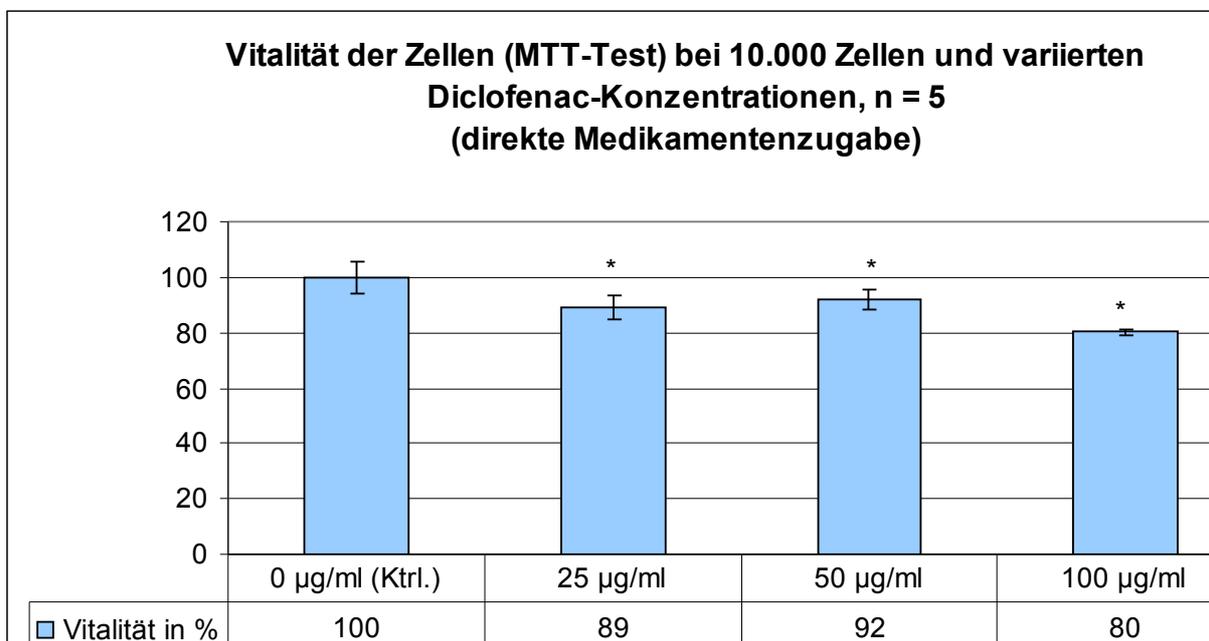


Abb. 11, MTT-Test - direkte Medikamentenzugabe

(10.000 Zellen und variierte Diclofenac-Konzentrationen (Zellpassage 9, n = 5), Signifikanzniveau bezogen auf die Kontrolle (0 µg/ml) (* = p ≤ 0,05))

5.3.2 Ergebnisse Calciumquantifizierung

Der Versuchsaufbau erfolgte analog zu 5.2.3 mit dem Unterschied, dass die Medikamentenzugabe auf direkte Weise (4.1.2) erfolgte. Der Versuch wurde einfach durchgeführt, die Anzahl der Proben betrug $n = 4$.

Je höher der prozentuale Wert der Calcifizierung im unten aufgeführten Schaubild ist, desto mehr Zellen verfügen über die Fähigkeit der Calciumquantifizierung, die ein Merkmal von Osteoblasten darstellt.

Die Calcifizierung auf Titan wurde als 100% gesetzt. Bei einer Konzentration von 25 $\mu\text{g/ml}$ zeigte sich eine Abnahme der Calcifizierung im Vergleich zur Kontrollgruppe von 6%, der sich als statistisch nicht signifikant erwies (94% (+/- 7,1%), $p = 0,07$). Dagegen war die 14%ige Abnahme bei 100 $\mu\text{g/ml}$ statistisch signifikant (86% (+/- 1,3%), $p = 0,02$). Bei 50 $\mu\text{g/ml}$ konnte keine Abnahme festgestellt werden (104% (+/-9,2%), $p = 0,03$).

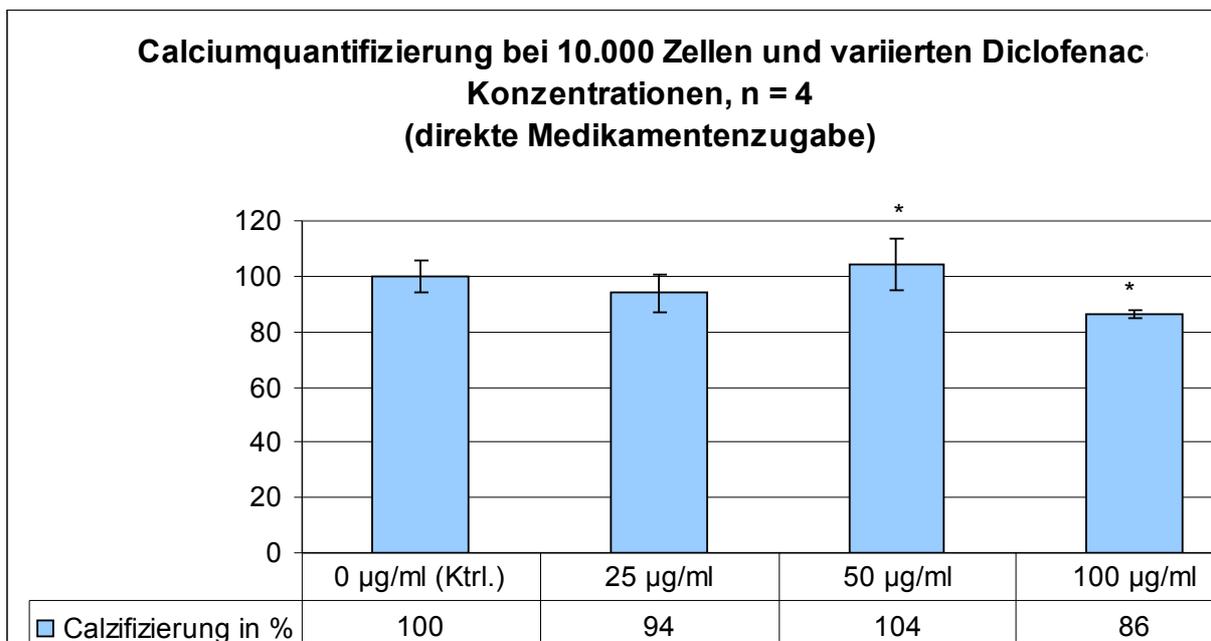


Abb. 12, Calciumquantifizierung - direkte Medikamentenzugabe

(10.000 Zellen und variierte Diclofenac-Konzentrationen (Zellpassage 9, $n = 4$), Signifikanzniveau bezogen auf die Kontrolle (0 $\mu\text{g/ml}$) (* = $p \leq 0,05$)

5.3.3 Ergebnisse BCA-Test

Für diesen Versuch wurden die Zellen analog zu der in 5.2.4 beschriebenen Vorgehensweise ausgesät allerdings mit dem Unterschied, dass Diclofenac bereits zur Aussaat direkt zu den Zellen gegeben wurde (4.1.2). Die Anzahl der Proben betrug $n = 5$, der Versuch wurde dreifach wiederholt.

Dabei entspricht in unten aufgeführtem Schaubild ein hoher Prozentwert einer hohen zellulären Proteinbiosynthese.

Die Proteinbestimmung bei direkter Medikamentenzugabe zeigt, dass die Proteinmenge pro Well zwar bei den unterschiedlichen Diclofenackonzentrationen im Vergleich zur Kontrollgruppe abnimmt, die Höhe der Medikamentenkonzentration bei den hohen Konzentrationen (50 $\mu\text{g/ml}$ und 100 $\mu\text{g/ml}$) jedoch nur einen geringfügigen Unterschied auf die Proteinmenge im Well ausmacht.

Der Messwert der Kontrollgruppe (0 $\mu\text{g/ml}$ Diclofenac) wurde auf 100% gesetzt. Es zeigt sich eine statistisch signifikante Abnahme um 4% bei 25 $\mu\text{g/ml}$ (96% (+/- 6,0%), $p = 0,03$), 11% bei 50 $\mu\text{g/ml}$ (89% (+/- 1,2%), $p = 0,02$) und 10% bei 100 $\mu\text{g/ml}$ (90% (+/- 2,9), $p = 0,02$).

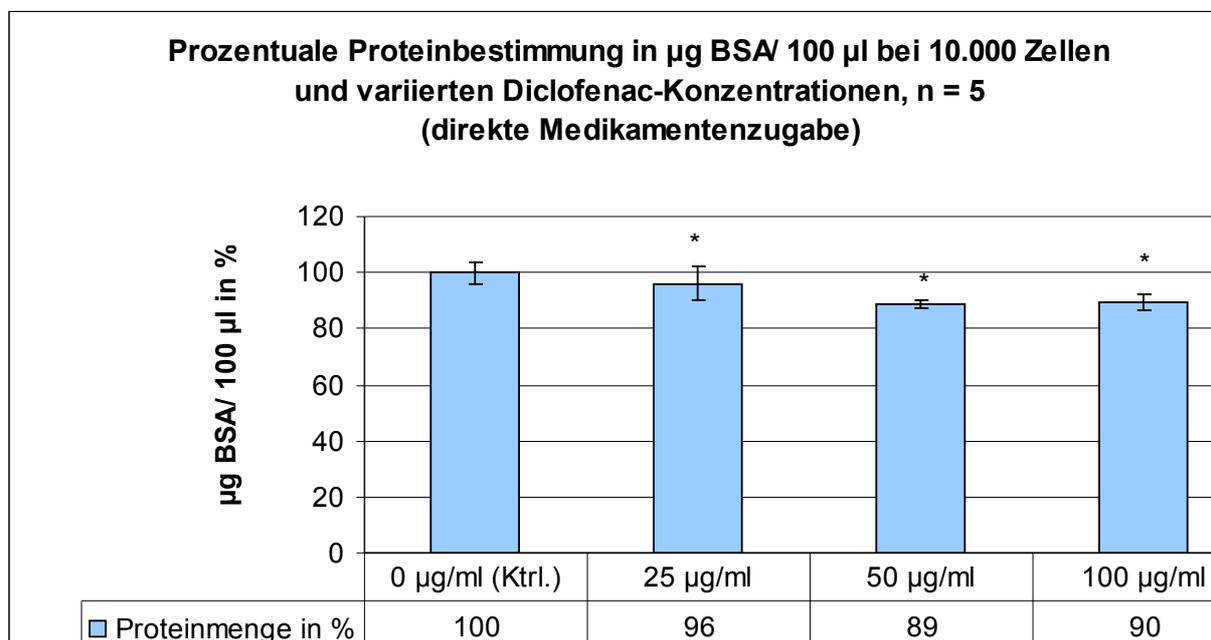


Abb. 13, Proteinbestimmung pro Well - direkte Medikamentenzugabe

(10.000 Zellen und variierte Diclofenac-Konzentrationen (Zellpassage 9, $n=5$), Signifikanzniveau bezogen auf die Kontrolle (0 $\mu\text{g/ml}$) (* = $p \leq 0,05$))

5.3.4 Ergebnisse ALP-Test

Die Anzucht der Zellen erfolgte wie unter 5.2.5 beschrieben, allerdings wurde in diesem Versuchsaufbau Diclofenac gemäß 4.1.2 direkt bei der Aussaat zu den Zellen gegeben. Die Anzahl der Proben betrug jeweils $n = 6$ und die verschiedenen Messungen wurden dreifach wiederholt.

Da die Messung der Alkalischen Phosphatase ein spezifischer Marker für die Stoffwechselaktivität von Knochenzellen ist, entspricht ein hoher Wert einem guten Stoffwechsel gesunder Osteoblasten.

Die Aktivität der Alkalischen Phosphatase ist in Abbildung 14 über den Zeitverlauf einer halben Stunde erkennbar. Die Werte entsprechen der Menge an p-Nitrophenol (in Nanomol) die pro Zeiteinheit von einem Mikrogramm des Enzyms Alkalische Phosphatase verstoffwechselt werden.

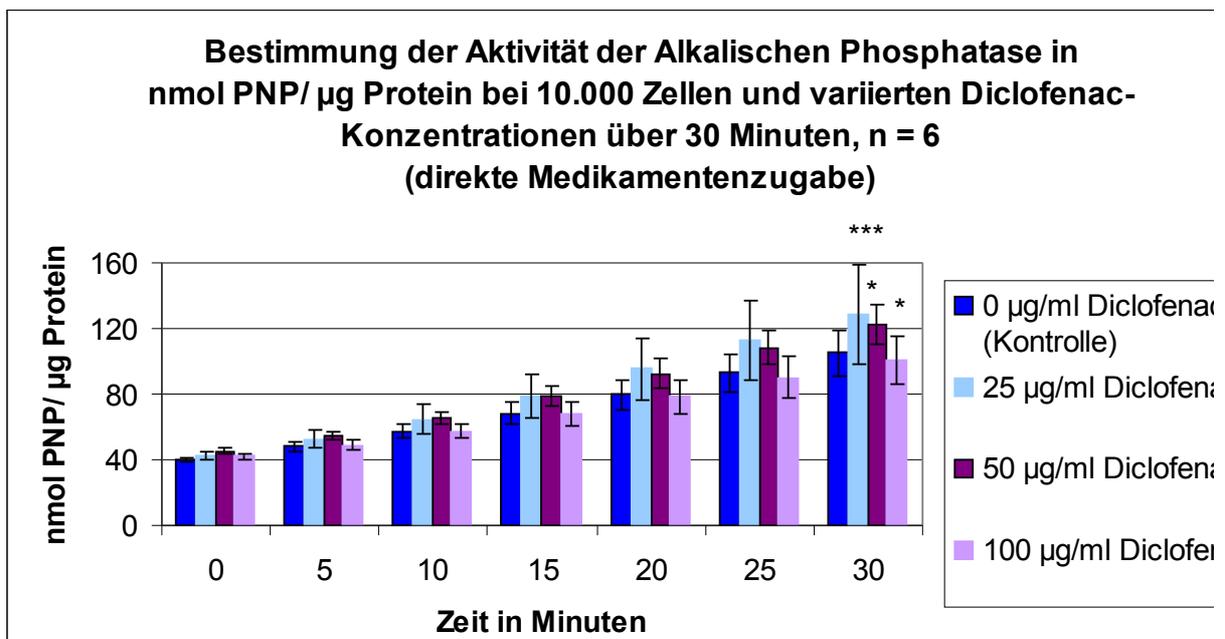


Abb. 14, ALP-Aktivitätsmessung - direkte Medikamentenzugabe

(10.000 Zellen, $t = 0$ bis 30 Minuten und variierte Diclofenac-Konzentrationen (Zellpassage 9, $n = 6$), Signifikanzniveau bezogen auf die Kontrolle (0 $\mu\text{g/ml}$) (* = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,001$))

Auch beim direkten Versuchsansatz kommt es über den Zeitverlauf von 30 Minuten zu einem kontinuierlichen Anstieg der verstoffwechselten Menge an p-Nitrophenol in allen Diclofenac-Gruppen sowie der Kontrolle.

Zum Zeitpunkt $t = 30$ Minuten (Abbildung 14) ist die Aktivität des Enzyms bei einer Diclofenac-Konzentration von $25 \mu\text{g/ml}$ am höchsten. Die Enzymaktivitäten liegen bei einer Diclofenac-Konzentration von $25 \mu\text{g/ml}$ und $50 \mu\text{g/ml}$ über der Aktivität des Enzyms bei $100 \mu\text{g/ml}$ beziehungsweise $0 \mu\text{g/ml}$. Die Enzymaktivität bei einer Diclofenackonzentration von $100 \mu\text{g/ml}$ liegt unter der Aktivität des Enzyms bei der Kontrollgruppe ($0 \mu\text{g/ml}$).

Diese Ergebnisse erwiesen sich beim Endpunkt $t = 30$ Minuten als statistisch signifikant ($25 \mu\text{g/ml}$ bzw. $50 \mu\text{g/ml}$ bzw. $100 \mu\text{g/ml}$, $p = 0,001$ bzw. $0,02$ bzw. $0,03$).

5.4 Vergleich zwischen verzögerter und direkter Medikamentenzugabe

5.4.1 Ergebnisse MTT-Test

Wenn man die Messwerte der verzögerten und direkten Medikamentenzugabe gegenüber stellt, zeigt sich, dass die Zellvitalität bei der direkten Medikamentenzugabe immer unter der Zellvitalität der verzögerten liegt (verzögert versus direkt, 25 µg/ml bzw. 50 µg/ml bzw. 100 µg/ml, 95% (+/- 3,1%) versus 89% (+/- 4,3%) bzw. 97% (+/- 2,6%) versus 92% (+/- 3,9%) bzw. 92% (+/- 2,0%) versus 80% (+/- 1,1%), p für jedes Messpaar = 0,008).

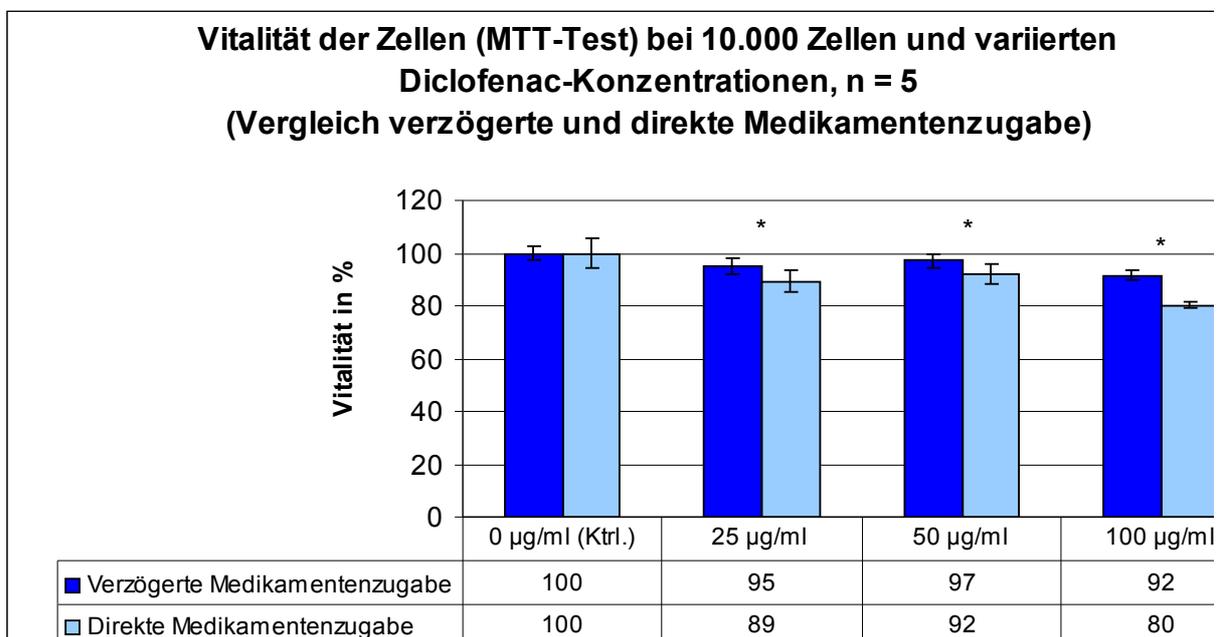


Abb. 15, MTT-Test - Vergleich verzögerter und direkter Ansatz

(10.000 Zellen und variierte Diclofenac-Konzentrationen (Zellpassage 9, n = 5),

Signifikanzniveau bezogen auf den Vergleich verzögerter und direkter Versuchsansatz

(* = $p \leq 0.05$)

5.4.2 Ergebnisse Calciumquantifizierung

Bei einer Diclofenac-Konzentration von 25 µg/ml und 100 µg/ml gleichen sich die Werte beim verzögerten und direkten Versuchsansatz bei der Calciumquantifizierung nahezu.

Hingegen kommt es bei einer Konzentration von 50 µg/ml Diclofenac bei verzögerter Medikamentenzugabe zu einer Abnahme, bei direkter Zugabe von Diclofenac zu einer Zunahme der Calcifizierung.

Ein statistisch signifikanter Unterschied konnte bei keiner der drei Konzentrationen festgestellt werden (verzögert versus direkt, 25 µg/ml bzw. 50 µg/ml bzw. 100 µg/ml, 93% (+/- 7,0%) versus 94% (+/- 7,1%) bzw. 89% (+/- 6,0%) versus 104% (+/- 9,2%) bzw. 85% (+/- 3,1%) versus 86% (+/- 1,3%), p = 0,77 bzw. 0,14 bzw. 0,36).

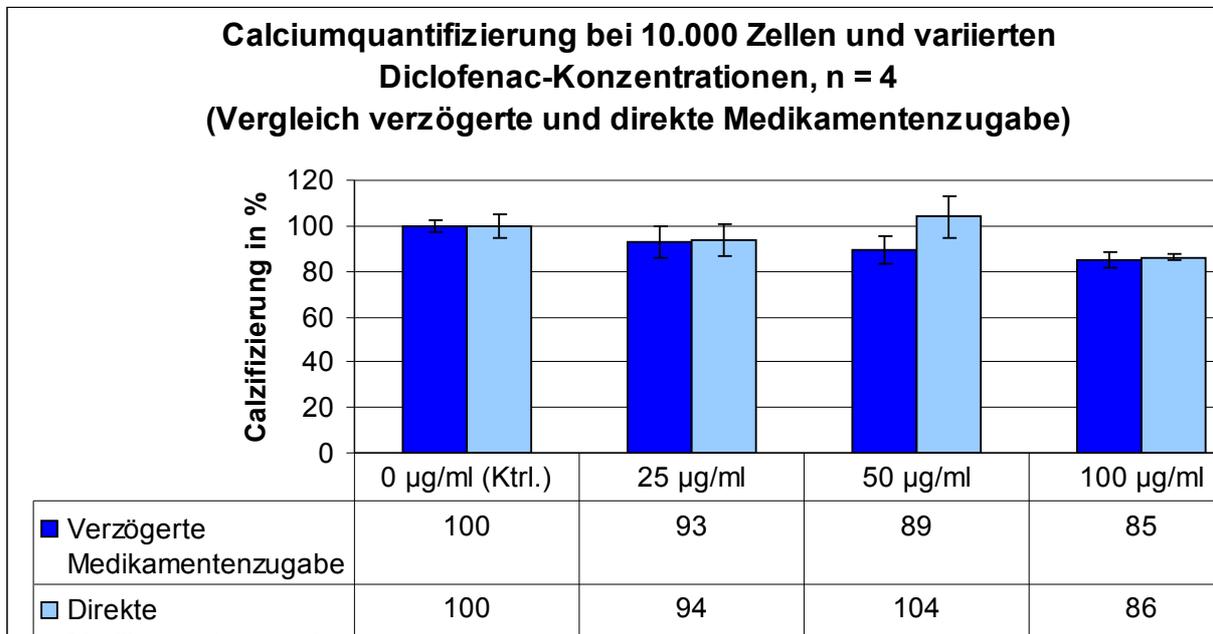


Abb. 16, Calciumquantifizierung - Vergleich verzögerter und direkter Ansatz (10.000 Zellen und variierte Diclofenac-Konzentrationen (Zellpassage 9, n = 4))

5.4.3 Ergebnisse BCA-Test

Beim Vergleich der Ergebnisse des BCA-Tests zwischen dem verzögerten und direkten Versuchsaufbau zeigt sich, dass sich die Werte bei einer Diclofenac-Konzentration von 25 µg/ml nahezu gleichen. Die statistische Auswertung ergab für diese Konzentration keinen signifikanten Unterschied zwischen verzögerter und direkter Medikamentenzugabe (94% (+/- 3,0%) versus 96% (+/- 6,0%), $p = 0,92$). Bei einer Konzentration von 50 µg/ml bzw. 100 µg/ml liegen die Werte bei direkter unter den Werten bei verzögerter Medikamentenzugabe, was sich als statistisch signifikant erwies (verzögert versus direkt, 50 µg/ml bzw. 100 µg/ml, 99% (+/- 3,2%) versus 89% (+/- 1,2%) bzw. 98% (+/- 2,0%) versus 90% (+/-2,9%), $p < 0,009$).

Das heißt, dass in denjenigen Wells, in denen die Zellen direkt bei der Aussaat mit höheren Konzentrationen an Diclofenac in Kontakt kamen (50 µg/ml und 100 µg/ml), weniger Protein enthalten ist. In den Wells, in denen die Zellen zuerst Zeit zum Adhärenieren hatten, bevor sie mit Diclofenac in Kontakt kamen, ist mehr Protein enthalten.

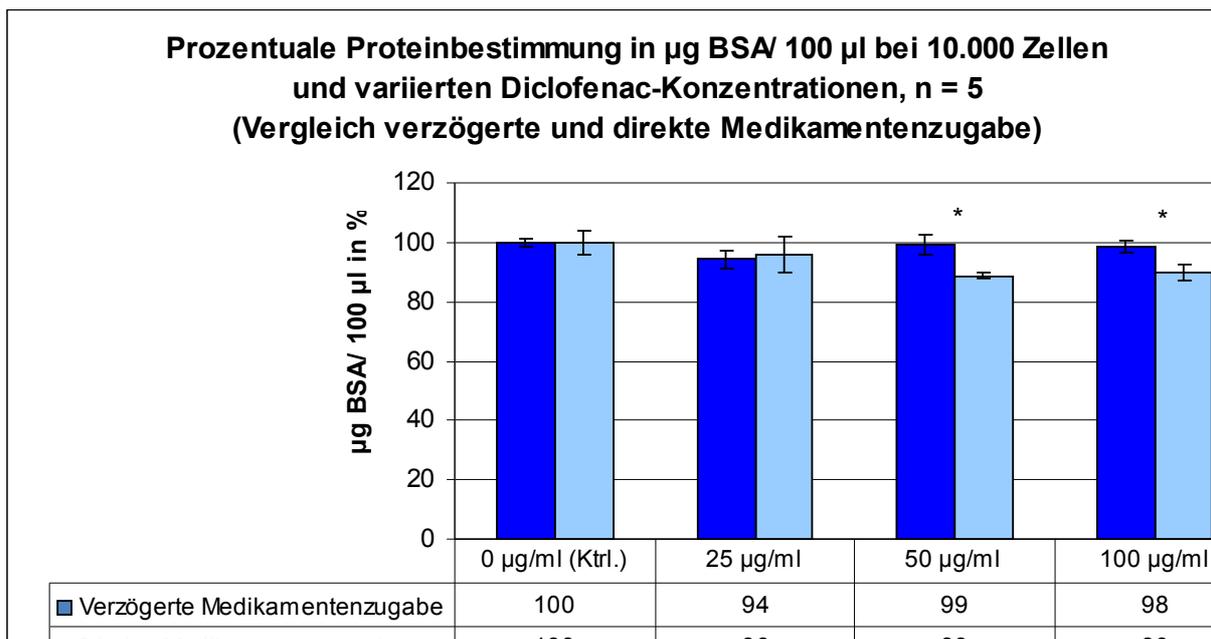


Abb. 17, Proteinbestimmung pro Well - Vergleich verzögerter und direkter Ansatz (10.000 Zellen und variierte Diclofenac-Konzentrationen (Zellpassage 9, n = 5) Signifikanzniveau bezogen auf den Vergleich verzögerter und direkter Versuchsansatz (* = $p \leq 0.05$))

5.4.4 Ergebnisse ALP-Test

Vergleicht man die ALP-Test-Ergebnisse des verzögerten und des direkten Versuchsansatzes fällt auf, dass es sowohl beim verzögerten als auch beim direkten Ansatz zu einer Aktivitätszunahme der Alkalischen Phosphatase bei den Konzentrationen 25 µg/ml und 50 µg/ml im Vergleich zur Kontrollgruppe (0 µg/ml) kommt. Die Größe der Veränderung ist bei beiden Versuchsansätzen vergleichbar hoch und zeigt zwischen beiden Ansätzen keinen signifikanten Unterschied (verzögert versus direkt, 25 µg/ml bzw. 50 µg/ml, 125% (+/- 15,2%) versus 122% (+/- 28,3%) bzw. 116% (+/- 18,6%) versus 116% (+/- 11,6%), p jeweils 0,6).

Bei 100 µg/ml Diclofenac scheint es auf den ersten Blick einen Unterschied zu geben: Hier liegt die Enzymaktivität bei direkter Aussaat geringfügig unter dem Wert der Kontrolle, während es bei verzögerter Aussaat zu einem Anstieg der Enzymaktivität über den Kontrollwert kommt. Der Unterschied zwischen verzögertem und direktem Versuchsansatz bei 100 µg/ml erwies sich allerdings ebenfalls nicht als statistisch signifikant (115% (+/- 24,6%) versus 96% (+/- 13,8%), p = 0,06).

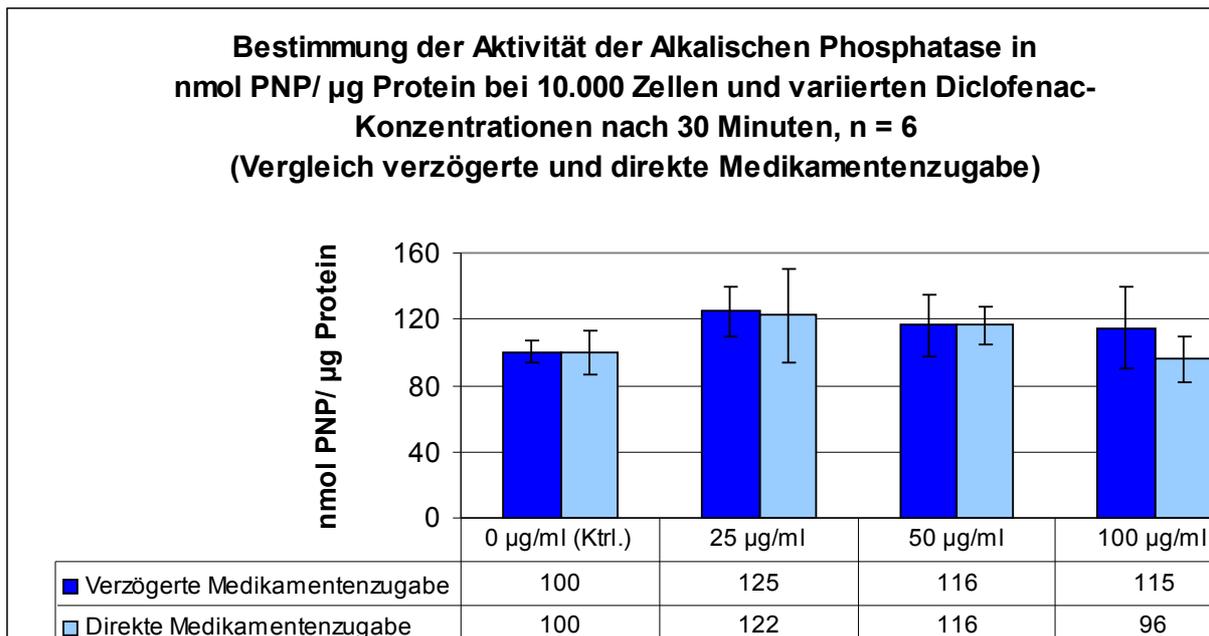


Abb. 18, ALP-Aktivitätsmessung - Vergleich verzögerter und direkter Ansatz
(10.000 Zellen, t = 30 Minuten und variierte Diclofenac-Konzentrationen
(Zellpassage 9, n = 6))

5.5 Untersuchungen zur Adhärenz

5.5.1 Ergebnisse REM-Untersuchung

5.5.1.1 Kontrollgruppe (0 µg/ml Diclofenac)

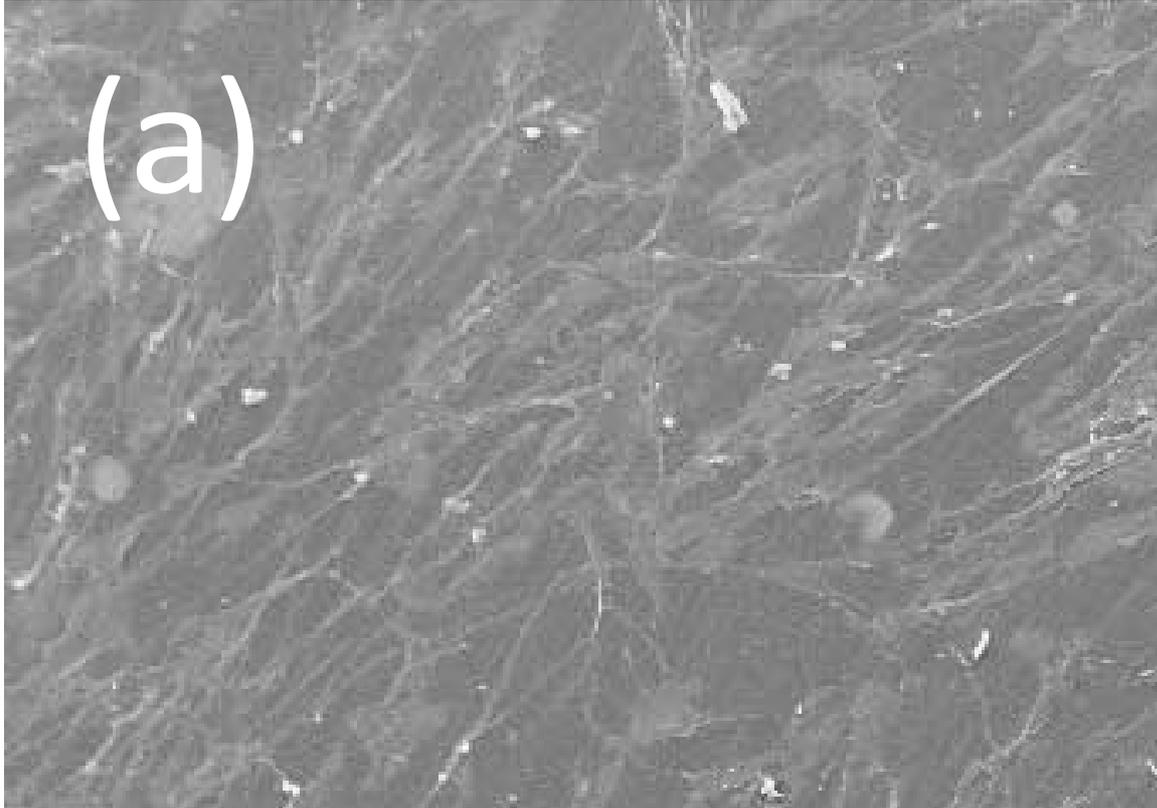


Abb. 19, Kontrollgruppe (0 µg/ml Diclofenac) – a: Übersicht, b-d: aufsteigende Vergrößerungen entsprechend der Skalierungsbalken

In der Übersichtsaufnahme (Abb. 19 a) sieht man, dass sich die Osteoblasten gleichmäßig und flächendeckend über die gesamte Oberfläche ausbreiten. Der Zellrasen ist dicht und man kann polygonale, zum Teil mehrschichtige Zellen erkennen.

In den Vergrößerungen (Abb. 19 b-d) erkennt man zwischen den Zellen Zellausläufer, mit deren Hilfe die Zellen untereinander kommunizieren. Zur Titanoberfläche hin sieht man Zytoplasmafortsätze, die der Zelladhäsion dienen.

5.5.1.1.1 25 µg/ml Diclofenac

Im Folgenden sind die beiden Versuchsansätze bei einer Diclofenac-Konzentration von 25 µg/ml gegenüber gestellt:

Auf der linken Seite (Abb. 20 a) befindet sich das Bild des verzögerten Versuchsansatzes, das heißt das Bild der Zellen, die vor Inkubation mit Diclofenac eine medikamentenfreie Adhäsionsphase hatten.

Auf der rechten Seite (Abb. 20 b) ist der direkte Versuchsansatz abgebildet. Es handelt sich um das Bild der Zellen, die direkt bei Aussaat mit Diclofenac in Kontakt kamen.

Verzögerte Medikamentenzugabe

Direkte Medikamentenzugabe

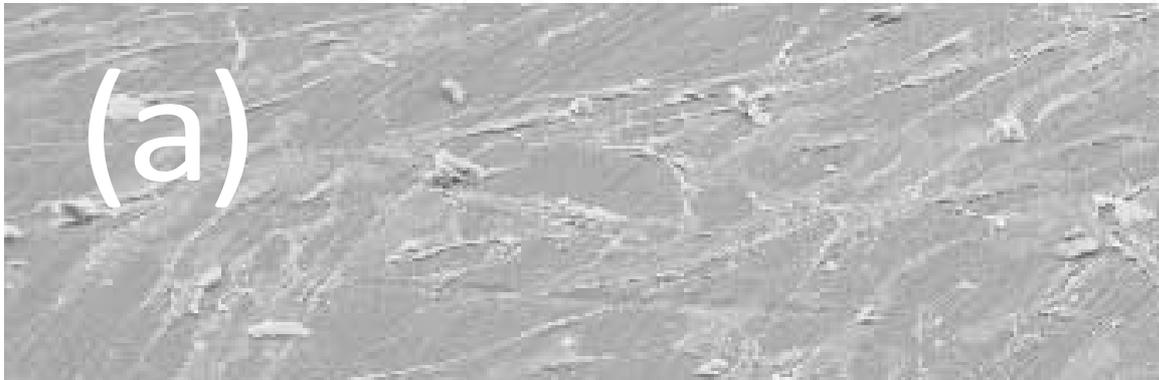


Abb. 20, 25 µg/ml Diclofenac – a: Übersicht verzögerte Medikamentenzugabe, b: Übersicht direkte Medikamentenzugabe

Sowohl bei verzögerter als auch bei direkter Medikamentenzugabe erscheint der Zellrasen in der rasterelektronenmikroskopischen Übersichtsaufnahme dicht. Im Vergleich zu der Übersichtsaufnahme der Kontrollgruppe (siehe oben) kann man bei einer Diclofenac-Konzentration von 25 µg/ml keinen morphologischen Unterschied zum Übersichtsbild der Kontrollgruppe (0 µg/ml Diclofenac) erkennen.

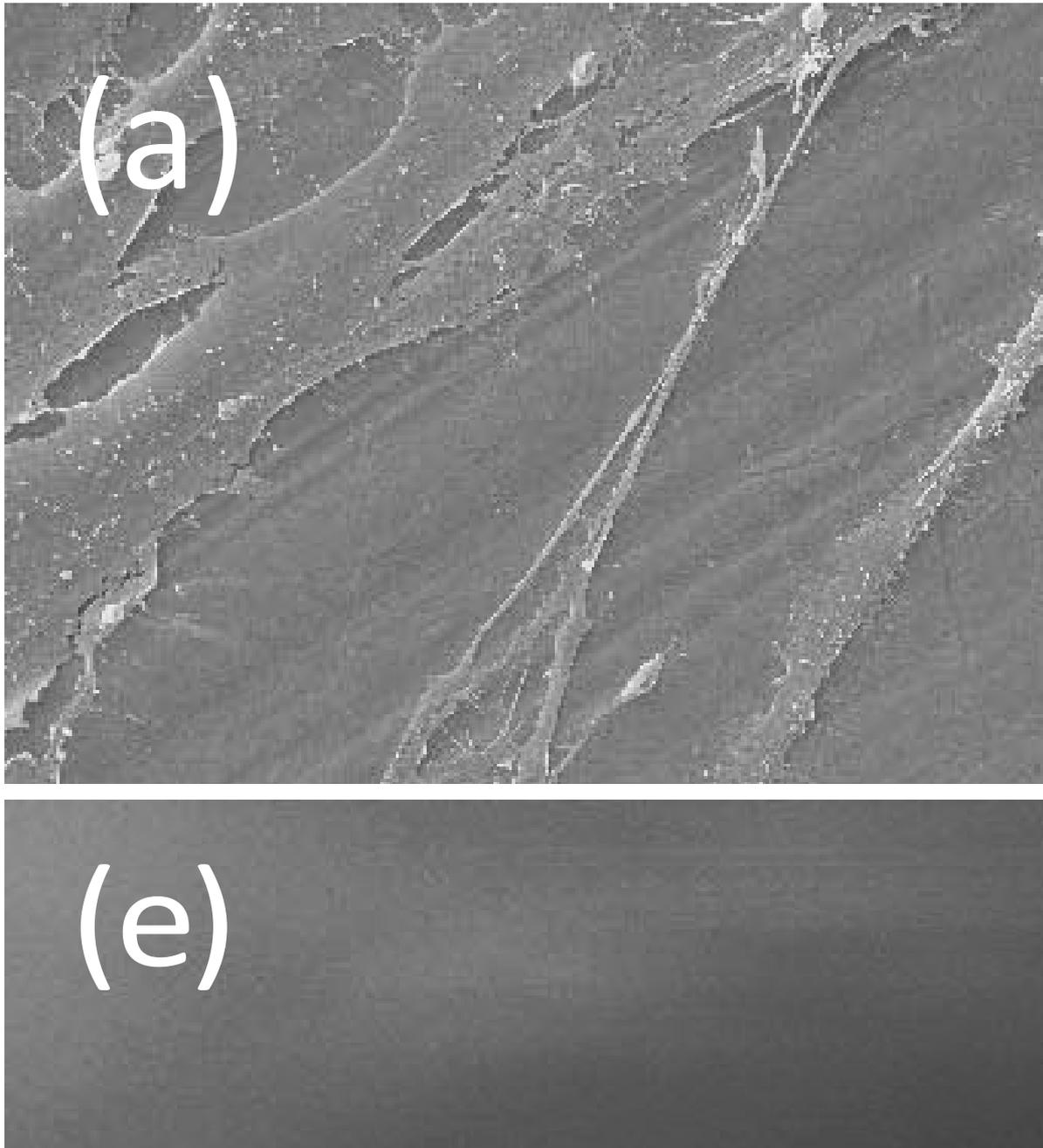


Abb. 21, 25 $\mu\text{g/ml}$ Diclofenac – Vergrößerungen a-f entsprechend der Skalierungsbalken;
a,c,e: verzögerte Medikamentenzugabe; b,d,f: direkte Medikamentenzugabe

Bei genauerer Betrachtung kann man erkennen, dass die Zellen in beiden Gruppen (verzögerte und direkte Medikamentenzugabe) bei einer Diclofenac-Konzentration von 25 $\mu\text{g/ml}$ mehrheitlich flach ausgebreitet sind und untereinander über Zellausläufer in Kontakt stehen. In der seitlichen Aufsicht (Abb. 21 e) kann man erkennen, wie sich die Zellausläufer vertikal ausbreiten. Vor allem bei verzögertem Versuchsansatz, das heißt bei den Bildern der linken Spalte (Abb. 22 a, c, e), bei denen der Adhäsionsprozess zuerst medikamentenfrei erfolgte, liegen die Zellen zum Teil mehrschichtig übereinander.

5.5.1.1.2 50 µg/ml Diclofenac

Auch bei einer Diclofenac-Konzentration von 50 µg/ml sieht man unten aufgeführt die Gegenüberstellung des verzögerten (Abb. 22 a) und des direkten (Abb. 22 b) Versuchsansatzes in rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Verzögerte Medikamentenzugabe

Direkte Medikamentenzugabe



Abb. 22, 50 µg/ml Diclofenac - a: Übersicht verzögerte Medikamentenzugabe, b: Übersicht direkte Medikamentenzugabe

Bei einer Konzentration von 50 µg/ml ist der Zellrasen bei verzögerter Medikamentenzugabe (Abb. 22 a) immer noch dicht. Im Vergleich zu den Übersichtsbildern der Kontrollgruppe und der den Aufnahmen der Diclofenac-Konzentration von 25 µg/ml erscheint das gesamte Bild jedoch etwas unruhiger und ungeordneter. Die Zellen breiten sich nicht mehr so gleichmäßig auf der Oberfläche ab.

Auf der rechten Seite (Abb. 22 b) sieht man das Bild des direkten Versuchsansatzes bei einer Diclofenac-Konzentration von 50 µg/ml. Hier erscheint der Zellrasen weniger dicht im Vergleich zum verzögerten Versuchsansatz bei gleicher Medikamentenkonzentration.

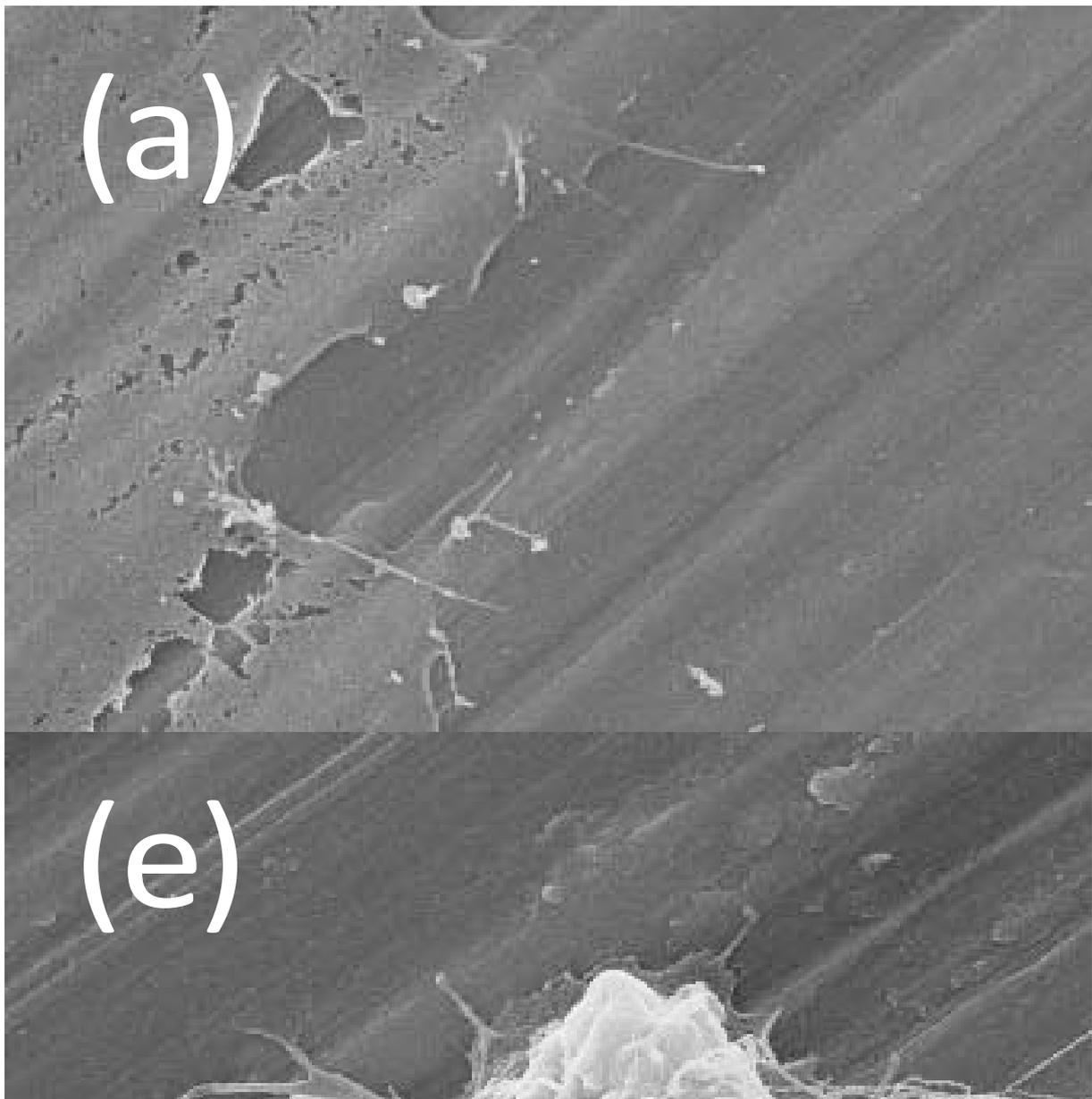


Abb. 23, 50 $\mu\text{g/ml}$ Diclofenac - Vergrößerungen a-f entsprechend der Skalierungsbalken; a,c,e: verzögerte Medikamentenzugabe; b,d,f: direkte Medikamentenzugabe

Sowohl bei verzögerter (Abb. 24 a, c, e) als auch bei direkter (Abb. 24 b, d, f) Medikamentenzugabe sieht man deutlich, dass sich bei einer Diclofenac-Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ mehr und mehr Zellen abkugeln und von der Oberfläche ablösen. Die Zellkontakte untereinander sind reduziert und die Adhäsion auf der Titanoberfläche ist verringert. Die Zellen erscheinen in ihrer Morphologie durch eine Diclofenac-Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ gestört. In der Vergrößerungsaufnahme sind bei dieser Konzentration zwischen dem verzögerten und dem direkten Versuchsansatz morphologisch keine großen Unterschiede zu erkennen.

5.5.1.1.3 100 µg/ml Diclofenac

Bei einer Diclofenac-Konzentration von 100 µg/ml sieht man unten aufgeführt auf der linken Seite das Bild des verzögerten Versuchansatzes (Abb. 24 a, c) und dem gegenüber auf der rechten Seite das Bild des direkten Versuchansatzes (Abb. 24 b, c) in rasterelektronischen Aufnahmen.

Verzögerte Medikamentenzugabe

Direkte Medikamentenzugabe

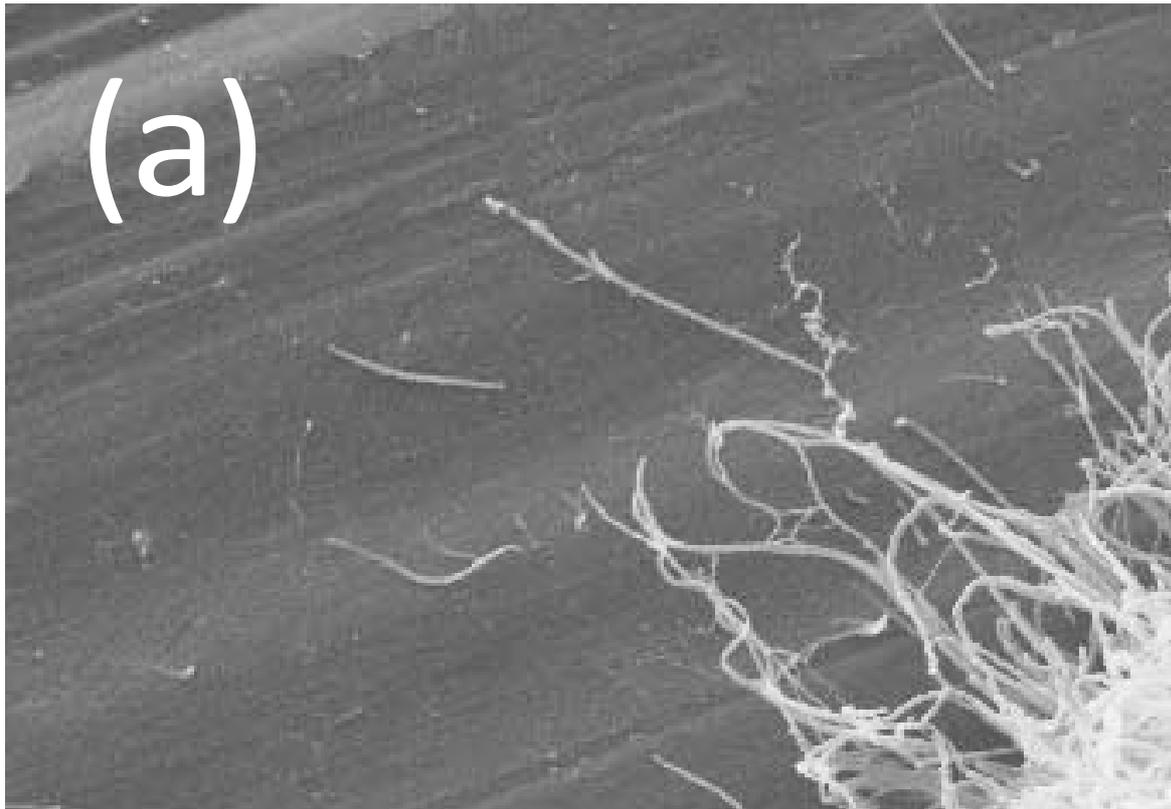


Abb. 24, 100 µg/ml Diclofenac - Vergrößerungen a-d entsprechend der Skalierungsbalken; a,c: verzögerte Medikamentenzugabe; b,d: direkte Medikamentenzugabe

Beim verzögerten Versuchsansätzen (Abb. 24 a, c) sind nur noch vereinzelt Zellen auf der Titanoberfläche zu erkennen. Die Zellen sind in ihrer Morphologie gestört im Vergleich zur Kontrollgruppe, dennoch kann man auf der linken Seite bei verzögerter Medikamentenzugabe noch deutlich Zellen mit zelltypischen Bestandteilen (zum Beispiel Zellausläufer) erkennen. Die Zellausläufer, die der Zellkommunikation zwischen den Zellen dienen, sind in ihrer Anzahl reduziert und die Adhärenz auf der Titanoberfläche scheint durch weniger sichtbare Kontakte zur Oberfläche schwächer ausgeprägt zu sein als in der Kontrollgruppe. Ein anderes Bild hingegen zeigt sich bei direkter Medikamentenzugabe bei einer Diclofenac-Konzentration von 100 µg/ml (Abb. 24 b, d): Hier kann man nur noch vereinzelt Zellbestandteile auf der Titanoberfläche erkennen. Diese sind in ihrer Form völlig amorph ohne typische Charakteristika einer osteoblastären Zelle, wie zum Beispiel

Zellausläufer oder Zytoplasmafortsätze.

5.5.2 Ergebnisse xCELLigence System

5.5.2.1 Verzögerte Diclofenac-Zugabe

In den folgenden Versuchen wurden 5.000 Zellen ausgesät. Nach ungefähr 20 Stunden (Inkubation über Nacht) erfolgte ein Mediumwechsel. Ab diesem Zeitpunkt waren die Osteoblasten unter Medikamenteneinfluss.

Die Anzahl der Medikamenten-Proben betrug jeweils $n = 3$, die der Kontroll-Probe (0 $\mu\text{g/ml}$ Diclofenac) $n = 2$. Der Versuch wurde einfach wiederholt.

Um den Adhäsionsvorgang in Echtzeit näher zu beleuchten, wurde die Impedanzänderung, als Meßwert für den Anteil adhärenter Zellen, in Abhängigkeit verschiedener Diclofenac-Konzentrationen im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Medikamentenzugabe untersucht. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden die Standardabweichungen nicht in das Liniendiagramm der Abbildung 26 eingetragen. Sie finden sich aber im Säulendiagramm (Abb. 27) und in den Beschreibungen im Text.

Bei Aussaat von 5.000 Zellen kommt es erst zu einem steil verlaufenden Anstieg der Impedanzänderung. Nach Zugabe des Medikamentes kommt es auf Grund des Mediumwechsels und der damit verbundenen Störeinflüsse zunächst zu einem Peak in der Messkurve, der aber messtechnisch bedingt ist und keine Aussage über den Adhäsionsprozess zulässt. 20 Stunden nach Aussaat der Zellen ist noch keine Plateauphase im Kurvenverlauf erreicht, der Adhäsionsvorgang setzt sich folglich auch nach Zugabe des Medikamentes fort. Dabei ist die Impedanzänderung, die Zeichen des Adhäsionsprozesses ist, um so größer, je geringer die Diclofenac-Konzentration ist. Die Steigung der Kurven und damit die Impedanzänderung als Zeichen des Zellwachstums ist bei der Kontrollgruppe am steilsten. Bei einer Diclofenac-Konzentration von 25 $\mu\text{g/ml}$ und 50 $\mu\text{g/ml}$ entsprechen sich die Steigungen weitestgehend, liegen aber unter der der Kontrollgruppe. Bei einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ Diclofenac ist die Steigung der Kurve flacher und im Kurvenverlauf kann man kurz nach Medikamentenzugabe (etwa zwischen 25h und 30h) ein vorübergehendes Sistieren auf gleichem Niveau des gemessenen Zellindex feststellen.

Abbildung 25 veranschaulicht den Adhäsionsprozess der unterschiedlichen Diclofenac-Konzentrationen sowie der Kontrollgruppe über einen Zeitraum von 45 Stunden.

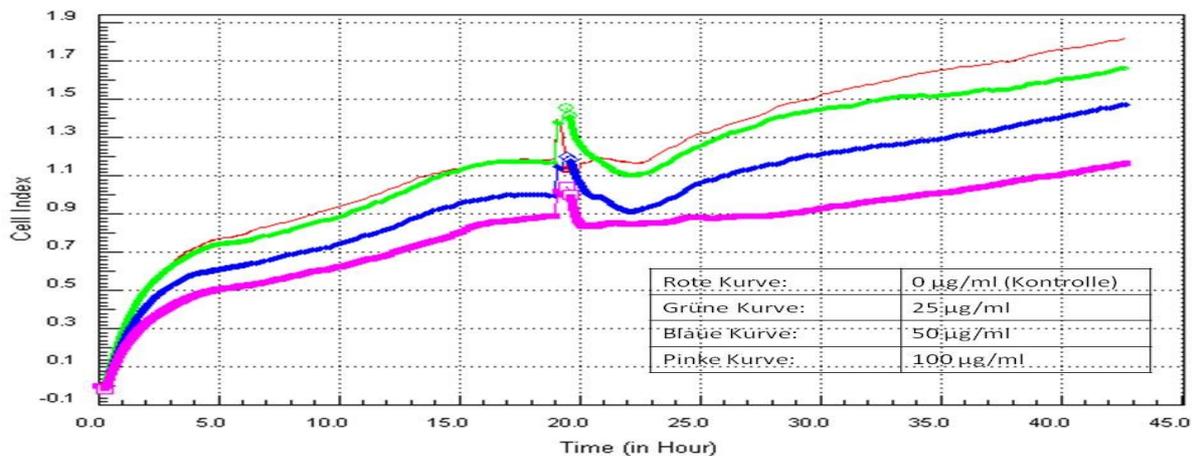


Abb. 25, xCELLigence, Liniendiagramm - verzögerte Medikamentenzugabe (5.000 Zellen und variierte Diclofenac-Konzentrationen, Real-Time-Verlauf über 45 Stunden, (Zellpassage 7, n = 3))

Das unten aufgeführte Schaubild (Abb. 26) zeigt den Zellindex der unterschiedlichen Diclofenac-Konzentrationen in prozentualen Vergleich zur Kontrollgruppe (100%) nach 48 h 1 min 46 sec. Es findet sich eine konzentrationsabhängige Abnahme des Zellindex, der sich für eine Konzentration von 25 µg/ml sowie 50 µg/ml als statistisch signifikant erwies (25 µg/ml bzw. 50 µg/ml bzw. 100 µg/ml, 91% (+/- 1,4%) bzw. 81% (+/- 1,9%) bzw. 64% (+/- 1,6%), p = 0,02 bzw. 0,03 bzw. 0,06).

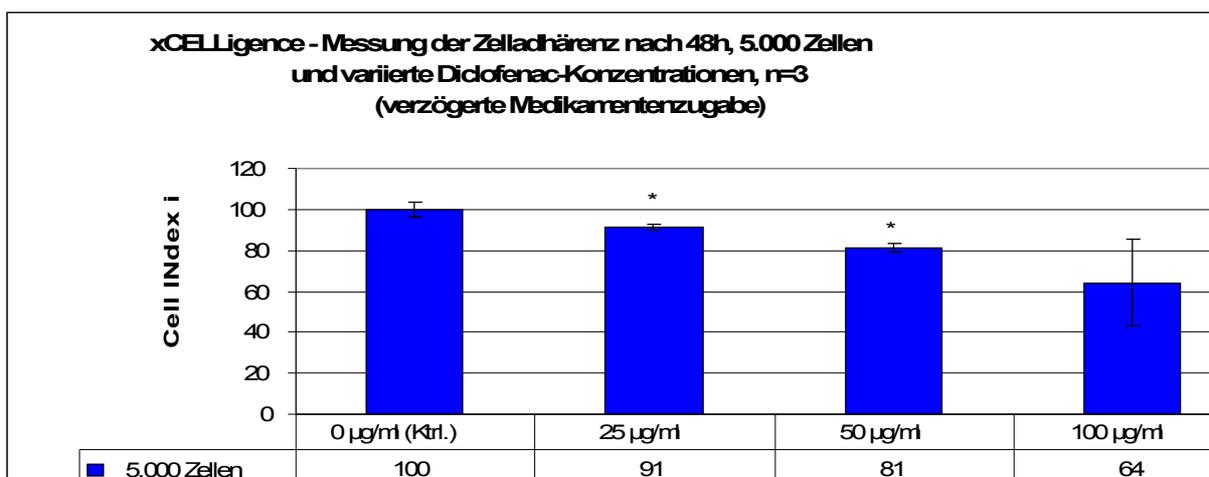


Abb. 26, xCELLigence, Säulendiagramm - verzögerte Medikamentenzugabe (5.000 Zellen und variierte Diclofenac-Konzentrationen, prozentualer Vergleich des Cell Index nach 48h (Zellpassage 7, n = 3), Signifikanzniveau bezogen auf die Kontrolle (0 µg/ml) (* = p ≤ 0,05))

5.5.2.2 Direkte Diclofenac-Zugabe

Wie bereits in den vorherigen Versuchen geschildert, wurde beim direkten Versuchsansatz das Diclofenac sofort bei Aussaat der Zellen zugegeben. Die Aussaat erfolgte mit 5.000 Zellen, die Anzahl der Medikamenten-Proben betrug jeweils n = 3, die der Kontroll-Probe (0 µg/ml Diclofenac) n = 2, der Versuch wurde einfach wiederholt.

Wie bereits beim verzögerten Versuchsansatz (siehe 5.5.2.1) wurden die Standardabweichungen aus Gründen der Übersichtlichkeit nur im Säulendiagramm (siehe Abb. 27) eingetragen.

Um zu überprüfen, ob die Zellen nach initialer Adhäsion besser auf den Diclofenac-Einfluss reagierten, wurde dieser Versuch auch mit einer Diclofenac-Zugabe nach einer, zwei und vier Stunden nach Aussaat durchgeführt. Die prozentuale Angabe des Zellindex als Indiz für die Anzahl adhärierter Zellen bezieht sich wieder auf das Ende der Messzeit (48 h 1 min 46 sec).

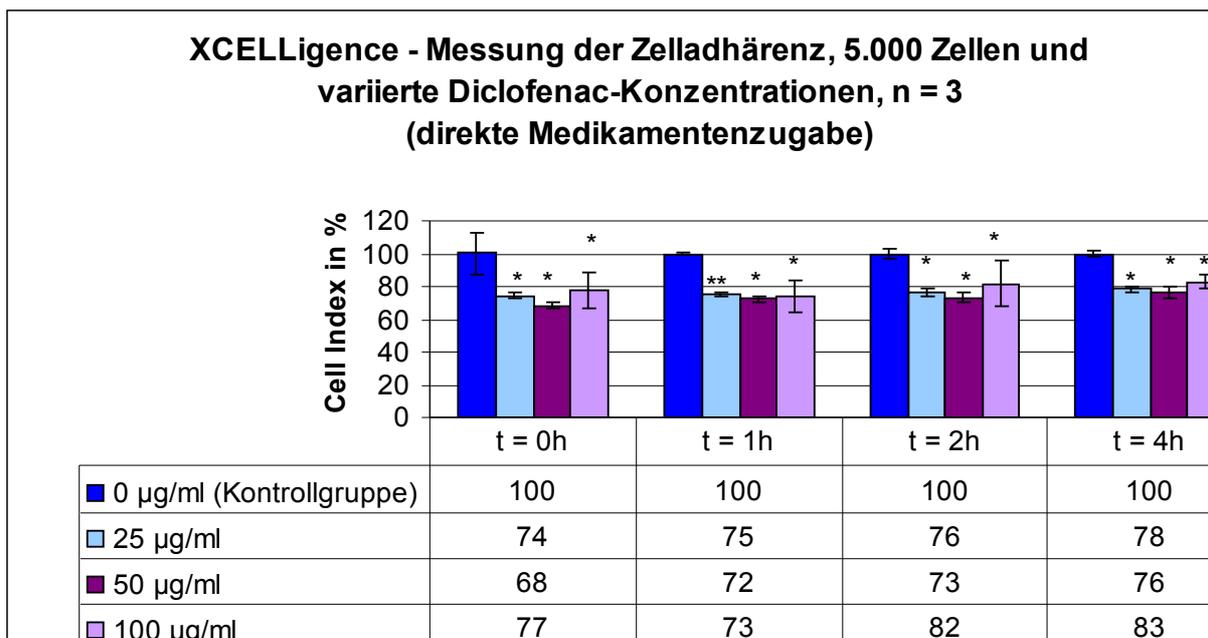


Abb. 27, xCELLigence, Säulendiagramm - direkte Medikamenten-Zugabe

(5.000 Zellen und variierte Diclofenac-Konzentrationen, prozentualer Vergleich nach t = 0, 1h, 2h und 4h (Zellpassage 7, n = 3), Signifikanzniveau bezogen auf die Kontrolle (0 µg/ml) (* = p ≤ 0,05; ** = p ≤ 0,01))

In allen vier Versuchen zeigt sich, dass die adhärierte Zellmenge bei den verschiedenen Diclofenac-Konzentrationen zwar deutlich geringer ist als in der Kontrollgruppe, aber es innerhalb der einzelnen Konzentrationsgruppen (25 µg/ml bzw. 50 µg/ml bzw. 100µg/ml Diclofenac) zu keinem wesentlichen, konzentrationsabhängigen Unterschied kommt

(t = 0: 74% (+/- 1,8%) bzw. 68% (+/- 1,8%) bzw. 77% (+/- 10,6%), p = 0,02 bzw. 0,02 bzw. 0,04;

t = 1: 75% (+/- 1,3%) bzw. 72% (+/- 1,7%) bzw. 73% (+/- 9,7%), p = 0,01 bzw. 0,02 bzw. 0,03;

t = 2: 76% (+/- 2,4%) bzw. 73% (+/- 3,0%) bzw. 82% (+/- 14,1%), p = 0,04 bzw. 0,03 bzw. 0,05;

t = 4: 78% (+/- 1,6%) bzw. 76% (+/- 3,7%) bzw. 83% (+/- 4,1%), p = 0,03 bzw. 0,04 bzw. 0,04).

Die folgenden Diagramme (Abb. 29 – 32) geben nun den Verlauf der Adhäsion nach etwa 48 Stunden und darüber hinaus bis 72 Stunden wieder.

(1) Diclofenac-Zugabe sofort (t=0h)

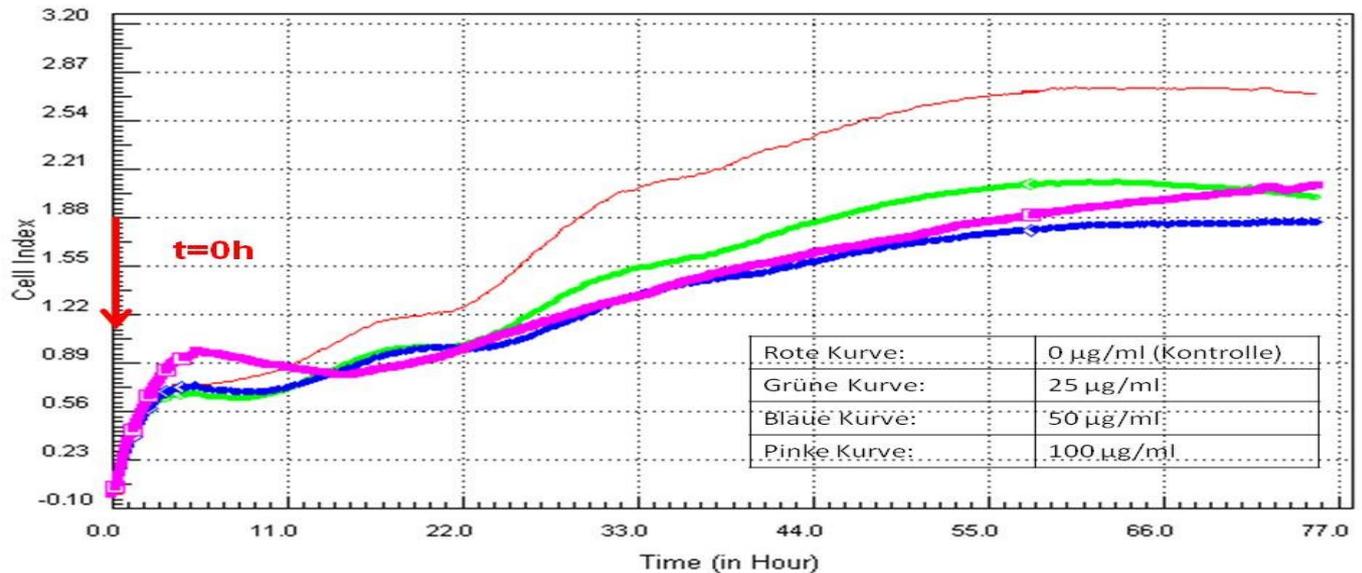


Abb. 28, xCELLigence - direkte Medikamentenzugabe - Diclofenac-Zugabe t = 0
(5.000 Zellen und verschiedene Diclofenac-Konzentrationen, Real-Time-Verlauf über 77 Stunden (Zellpassage 7, n = 3))

(2) Diclofenac-Zugabe nach t=1h

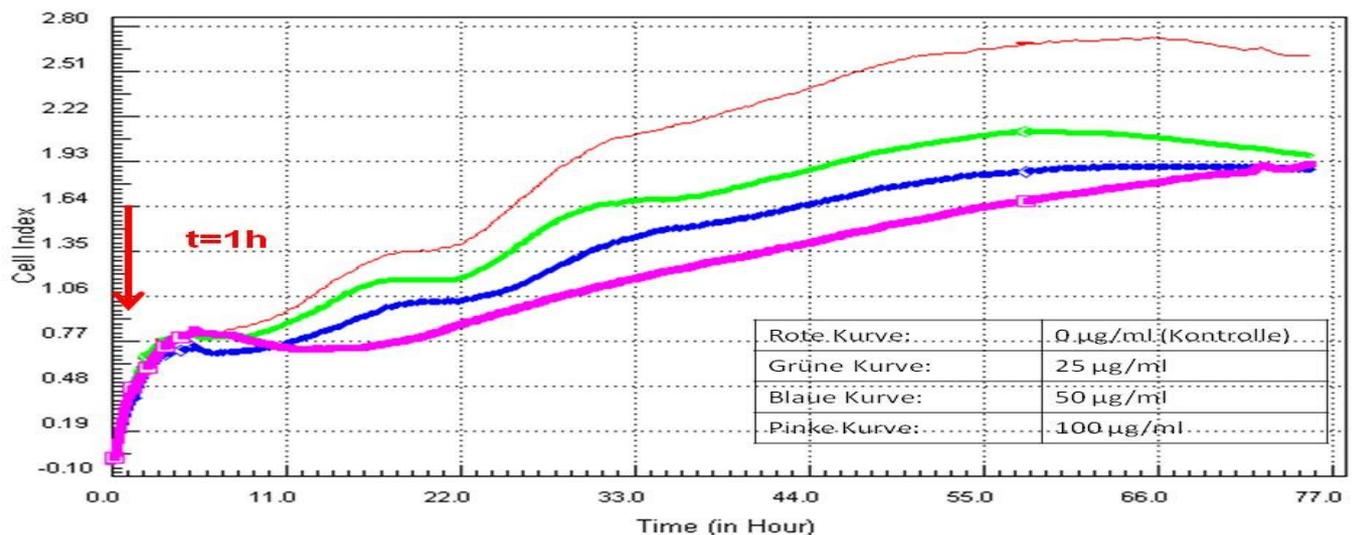


Abb. 29, xCELLigence - direkte Medikamentenzugabe - Diclofenac-Zugabe t = 1h
(5.000 Zellen und verschiedene Diclofenac-Konzentrationen, Real-Time-Verlauf über 77 Stunden (Zellpassage 7, n = 3))

(3) Diclofenac-Zugabe nach t=2h

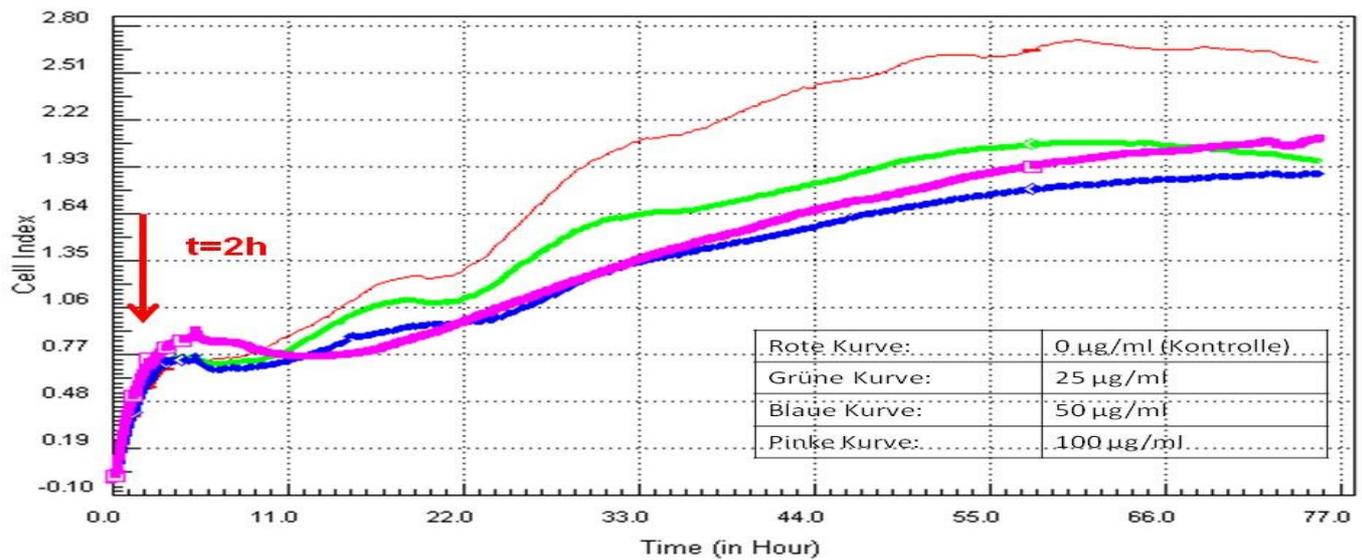


Abb. 30, xCELLigence - direkte Medikamentenzugabe - Diclofenac-Zugabe t = 2h
(5.000 Zellen und verschiedene Diclofenac-Konzentrationen, Real-Time-Verlauf über 77 Stunden (Zellpassage 7, n = 3))

(4) Diclofenac-Zugabe nach t=4h

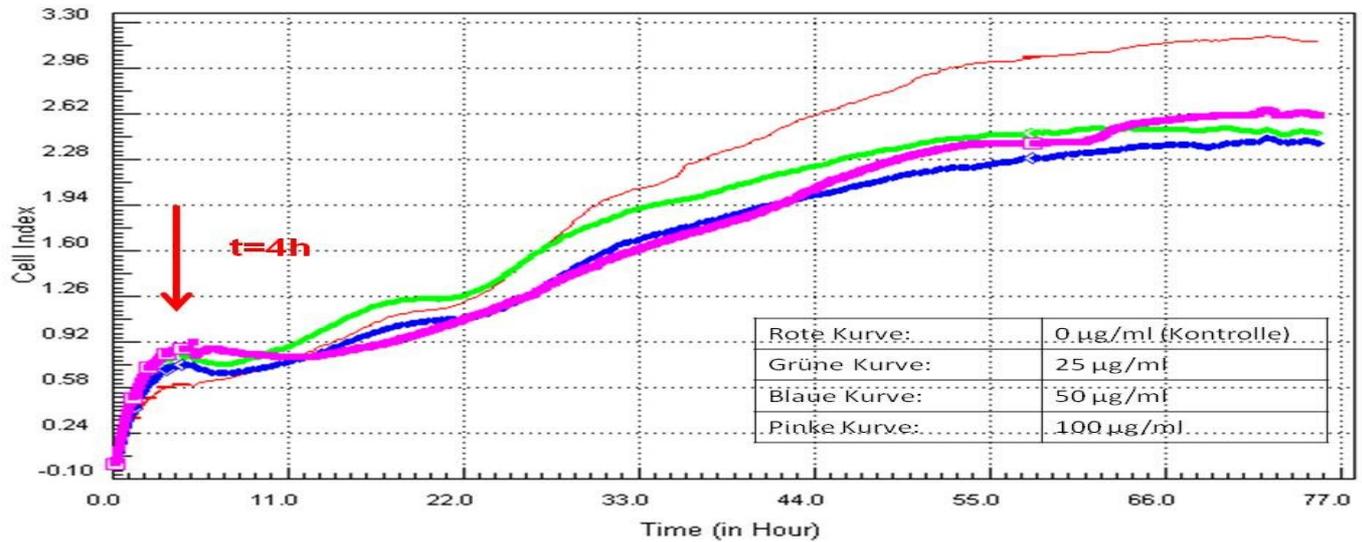


Abb. 31, xCELLigence - direkte Medikamentenzugabe - Diclofenac-Zugabe t = 4h
(5.000 Zellen und verschiedene Diclofenac-Konzentrationen, Real-Time-Verlauf über 77 Stunden (Zellpassage 7, n = 3))

In allen vier Diagrammen zeigt sich, dass die rote Kurve, die der Kontrollgruppe entspricht, die schnellste Steigung - und somit Adhäsion - zeigt. Unter Medikamenteneinfluss kommt es zu einer geringeren Adhäsion, die auch langsamer, das heißt mit einer flacheren Steigung, verläuft. Nach 72 Stunden bildet sich für alle Diclofenac-Konzentrationen ein Plateau aus. Die Adhäsion ist dabei vollständig abgelaufen, weitere Zellen kommen nicht hinzu. Dieses Plateau liegt für alle Medikamentenkonzentrationen auf etwa dem gleichen Niveau. Obgleich die Kontrollgruppe in allen vier Versuchen ähnliche Werte bezüglich der Adhäsionsgeschwindigkeit zeigt und der endgültig erreichbare Wert nach 72 Stunden (und nach 44 Stunden) ähnlich ist, zeigen sich Unterschiede in den Medikamentengruppen, je nachdem zu welchem Zeitpunkt die Zellen mit Diclofenac in Kontakt kamen. Je später das Medikament zugegeben wurde, so lassen sich die Ergebnisse zusammenfassen, desto höher ist die Menge an adhären Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Vgl. der Abb. 29 – 32).

5.5.2.3 Vergleich verzögerte und direkte Diclofenac-Zugabe

Vergleicht man die Zelladhärenz nach 48 Stunden bei verzögerter und direkter Medikamentenzugabe fällt auf, dass die Werte bei einer Konzentration von 25 und 50 µg/ml Diclofenac bei direkter Medikamentenzugabe immer unter denen der Vergleichsgruppe bei verzögerter Medikamentenzugabe liegen. Der prozentuale Abfall zwischen direkter und verzögerter Medikamentenzugabe ist bei den Konzentrationen 25 µg/ml bzw. 50 µg/ml nahezu identisch bei 15% bzw. 16% (verzögert versus direkt, 25 µg/ml bzw. 50 µg/ml, 91% (+/- 1,4%) versus 74% (+/- 1,8%) bzw. 81% (+/- 2,3%) versus 68% (+/- 1,8%), $p = 0,2$ bzw. 0,3).

Bei einer Diclofenac-Konzentration von 100 µg/ml liegt der Wert bei direkter Medikamentenzugabe im Schaubild zwar über dem Wert der verzögerten Diclofenac-Zugabe, es ergab sich hierfür jedoch keine statistische Signifikanz (verzögert versus direkt, 64% (+/- 20,9%) versus 77% (+/- 10,6%).

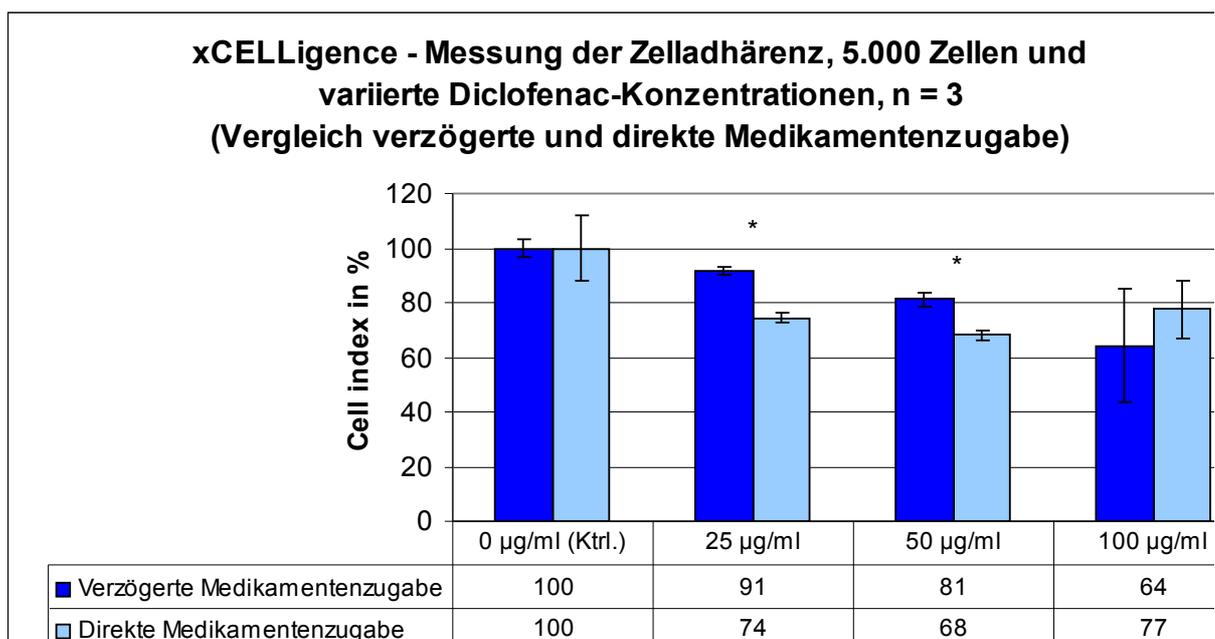


Abb. 32 xCELLigence - Vergleich verzögerter und direkter Ansatz

(5.000 Zellen und verschiedene Diclofenac-Konzentrationen, prozentualer Vergleich (Zellpassage 7, n = 3), Signifikanzniveau bezogen auf den Vergleich verzögerter und direkter Versuchsansatz (* = $p \leq 0.05$))

6 Diskussion

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob das Medikament Diclofenac, welches als Analgetikum und zur Vermeidung Heterotoper Ossifikation verwendet wird, das Adhäsionsverhalten humaner Osteoblasten auf Prothesenoberflächen ändert.

Da Diclofenac tief in den Stoffwechsel der Osteoblasten eingreift, kann es möglich sein, dass dieses Medikament einen nachteiligen Effekt auf den Adhäsionsvorgang der Osteoblasten hat. Die Adhäsion der Knochenzellen auf der Prothesenoberfläche ist von eminenter Bedeutung für die Festigkeit der Prothese im Knochen. Daher könnte eine unreflektierte Gabe von Diclofenac, obgleich in vielen Kliniken nach Implantation einer Hüft-TEP Routine, negative Auswirkungen auf die Festigkeit und Stabilität des Knochen-Prothesen-Interfaces haben.

Die Beantwortung der Frage ist komplex und benötigte mehrere Arbeitsschritte:

Zunächst musste herausgefunden werden, wie Diclofenac im hier verwendeten und in Abschnitt 3 genau beschriebenen Versuchs-Setup auf den Stoffwechsel der Zellen wirkt. Aus der Literatur sind hierzu verschiedene Ergebnisse publiziert worden:

Stand der Forschung

Die Arbeitsgruppe um Matziolis konnte in einer Studie von 2002 eine konzentrationsabhängige Abnahme des Proliferationsverhaltens humaner Osteoblasten ab einer Diclofenac-Konzentration von 6 µg/ml mit Hilfe des auch in dieser Arbeit verwendeten MTT-Tests feststellen. Matziolis et al. verwendeten pro Versuch 10.000 Zellen, die Aussaat erfolgte in 48er-Multiwellplatten bei einem Well-Volumen von 0,5 ml. Die Medikamentenzugabe erfolgte 24 Stunden nach Aussaat der Zellen. Dadurch entspricht sein Versuchsansatz dem in dieser Arbeit verwendeten *verzögerten* Versuchsansatz (Vgl. 4.1.1). Die Arbeitsgruppe führte alle zwei Tage einen Mediumwechsel mit den entsprechenden Diclofenac-Konzentrationen durch und maß die Proliferation nach insgesamt neun Tagen³⁴.

Ähnliche Ergebnisse erzielte die Arbeitsgruppe um Sell. Sie konnten bereits ab einer Konzentration von 1 µg/ml eine Hemmung der Proliferation und Kollagen-I-Synthese bei primären Osteoblasten feststellen. Die Einwirkzeit betrug in deren Versuchsansatz 48 Stunden, was in dieser Arbeit dem *direkten* Versuchsaufbau entspricht (Vgl. 4.1.2). Sell et al. maßen die Proliferation mit dem MTT-Test nach vier bis sieben Tagen⁴⁵.

Chang et al. untersuchten in einer Arbeit aus dem Jahre 2009 die Auswirkungen verschiedener antiinflammatorischer Medikamente (Dexamethason, NSAR (Indomethacin,

Diclofenac, Ketorolac), Celecoxib) auf das Verhalten humaner Osteoblasten. Auch diese Arbeitsgruppe konnte eine dosisabhängige Hemmung der Proliferation unter Diclofenacgabe feststellen. Diese fand bereits ab einer Konzentration in der Größenordnung von 1 µmol/l bis 10 µmol/l statt, was umgerechnet einer Konzentration von 0,296 µg/ml bis 2,961 µg/ml entspricht (1 Mol Diclofenac = 296,05 g). Es muss allerdings beachtet werden, dass in der Studie von Chang et al. nicht der MTT-Test zur Beurteilung des Proliferationsverhaltens unter Medikamenteneinfluss herangezogen wurde, sondern dieses anhand der Thymidin-Inkorporation beurteilt wurde¹². Dieses Verfahren beruht auf dem Einbau von radioaktiv markierten Thymidin (3H-Thymidin) in neu synthetisierter DNA bei Zellteilung.

Auch die Arbeitsgruppe um Kaspar konnte einen negativen Effekt auf die Proliferation der Knochenzellen durch Diclofenac feststellen. In ihrem Ansatz wurden 3.000 Zellen in 96-Multiwellplatten bei einem Wellvolumen von 100 µl ausgesät. Zuerst wurde den Zellen zwei bis drei Stunden Zeit zur Adhärenz gelassen. Anschließend wurden verschiedene Diclofenac-Konzentrationen hinzugegeben und die Zellen erneut für 24 Stunden inkubiert. Allerdings konnte die Hemmung der Proliferation der Zellen durch Diclofenac nur bei hohen Konzentrationen von 50 µg/ml beobachtet werden. Konzentrationen von < 25 µg/ml hatten einen geringen oder keinen Einfluss auf die Zellen, niedrige Konzentrationen von 1,56 µg/ml und 0,19 µg/ml ergaben in ihrem Untersuchungszeitraum keinen hemmenden Effekt auf die Knochenzellen²⁷.

Diese Ergebnisse mögen vielleicht durch die Art der Zellen beeinflusst worden sein. Während die vorhin genannten Arbeitsgruppen mit humanen, primären Osteoblasten experimentierten, wählten Kaspar et al. Osteosarkomzellen. Unklar bleibt, ob diese Zellen generell anders auf den medikamenteninduzierten Stress reagieren.

Ein weiterer Punkt, der bei der Beurteilung der verschiedenen Testergebnisse in Bezug auf die Höhe der Diclofenac-Konzentration, ab der eine Hemmung auf die Osteoblasten erkennbar ist, nicht außer Acht gelassen werden darf, ist die Tatsache, dass sich in den verschiedenen Studien die Nährmedien nicht vollkommen gleichen und die kultivierten Zellen somit andere Versuchsbedingungen hatten.

In der vorliegenden Untersuchung wurde zur Kultivierung der Zellen zunächst DMEM-Medium mit 16% FCS verwendet. Die Anzucht für die Versuche erfolgte jedoch in Alpha-Medium, um optimale Bedingungen für die Zellen zu schaffen und mögliche Nebeneffekte durch schlechte Zuchtbedingungen weitestgehend zu eliminieren.

Die Forschergruppen um Matziolis, Kaspar und Chang verwendeten in ihren Versuchen alle das Medium DMEM und FCS als Zusatz. Jedoch variiert der Anteil an FCS bei den unterschiedlichen Versuchsansätzen. Kaspar et al. verwendeten 20% FCS, wohingegen Chang et al. zu Beginn der Anzucht FCS in einem Anteil von 10% im Medium verwendeten,

24 Stunden vor der Medikamentenzugabe den Anteil an FCS aber auf 2% reduzierten. In der Arbeit von Matziolis et al. ist kein Hinweis auf den prozentualen Anteil von FCS im Medium gegeben und in der Veröffentlichung um Sell et al. wird lediglich über ein nicht näher beschriebenes Vollmedium berichtet, welches zur Anzucht verwendet wurde^{12, 27, 34}.

Möglicherweise ergibt sich zwischen den Arbeitsgruppen ein Unterschied der Konzentration von Diclofenac, ab der eine Hemmung auf Osteoblasten zu erkennen ist, da Diclofenac an Plasmaproteine, die auch in FCS vorkommen, gebunden ist und daher bei variierendem FCS-Gehalt nur in unterschiedlicher Konzentration zu den Zellen transportiert werden kann. Im menschlichen Körper zum Beispiel ist Diclofenac zu 99,4% an Albumin gebunden⁴³. Die Höhe des Albumins im Plasma oder in der Gelenksflüssigkeit ist deshalb ausschlaggebend für die Konzentration von Diclofenac in diesen Gebieten. Im gesunden Gelenk ist die Albuminkonzentration in der Gelenksflüssigkeit niedriger als im Plasma. Im Rahmen eines Entzündungsprozesses steigt jedoch der Albumingehalt im entzündeten Gewebe und der Synovialflüssigkeit und somit auch der klinisch wirksame Anteil von Diclofenac in diesen Gebieten⁹.

Ferner kann die Wahl der Zellen und deren Herkunft einen nicht unerheblichen Einfluss auf die Versuchsergebnisse haben: Evans et al. postulierten 2003, dass sich die in der Literatur nur schwer vergleichbaren, veröffentlichten Ergebnisse dadurch erklären, dass viele Untersuchungen gar nicht mit humanen Osteoblasten erfolgten, sondern mit Sarkomzelllinien oder Tiergewebszellen¹⁷.

Ein weiterer Erklärungsversuch für die zum Teil unterschiedlich publizierten Ergebnisse ist, dass Zellen in verschiedenen Entwicklungsstadien nicht gleich sensibel auf die Stresssituation durch Verabreichung des Medikament reagieren²⁷.

Wie bereits angedeutet, spielt die Konzentration des Medikamentes im Versuch eine bedeutende Rolle. Allerdings gibt es in Bezug auf die tatsächliche Wirkstoffkonzentration des Medikaments Diclofenac im menschlichen Körper nach Einnahme eines Dragees keinen wissenschaftlichen Konsens.

Gemäß Kaspar et al. beträgt die Serumkonzentration nach einmaliger Einnahme von 50 mg Diclofenac 0,19 µg/ml, nach dreimaliger Gabe 1,56 µg/ml²⁷. Wie genau und in welchem Kompartiment Kaspar et al. diese Diclofenac-Konzentrationen gemessen haben, ist leider aus ihrer Veröffentlichung nicht ersichtlich.

Nach Angaben von Sell et al. bewirkt die Einnahme bereits eines Dragees mit 50 mg Diclofenac nach zwei Stunden eine maximale Plasmakonzentration von 1,6 µg/ml⁴⁵. Dies entspricht auch den Werten, die der Produktinformation von Diclofenac des Herstellers Ciba Geigy zu entnehmen sind¹⁹.

Dies wirft die Frage auf, wie hoch die tatsächliche Medikamentenkonzentration im Plasma eines Patienten ist, der über einen längeren Zeitraum, möglicherweise schon monate- oder jahrelang, Diclofenac in hohen Konzentrationen einnimmt. Da sich das Medikament Diclofenac im sauren Entzündungsmilieu anreichert, ist die Konzentration dort höher als im übrigen Körper²⁷.

Eine weitere, oftmals nicht berücksichtigte Variable ist die Darreichungsform des Medikamentes. Dieses ist als Reinform, sowie als Retard-Präparat in Kombination mit Colestyramin erhältlich. Beide Formen haben den gleichen Wirkstoff, der Wirkungseintritt des Retard-Präparat ist allerdings verzögert und die Wirkdauer verlängert. Zwar gibt es keine Studien über einen Einfluss von Colestyramin auf den Knochenstoffwechsel, jedoch kann dies auch nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden. In vorliegender Untersuchung wurde die Reinform des Medikamentes Diclofenac verwendet. Welche Form in den anderen erwähnten Studien verwendet worden ist, ist nicht nachvollziehbar.

Evans et al. erwähnen in ihrer Studie eine weiter interessante Tatsache, die für die Interpretation der Ergebnisse wichtig ist: In ihren Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass humane Osteoblasten, die mit Indomethacin oder Dimethylphenylfuranone (DPF) ausgesät wurden, zuerst in ihrer Zellzahl abnahmen (Indomethacin: 77%, DPF: 81%). Diesen Zellrückgang erklärt Evans et al. durch einen Verlust der Adhäsion, welcher allerdings reversibel ist.

In ihrem Versuch wurden nach 24 Stunden die Medikamente entfernt. Daraufhin stiegen die Zellzahlen erneut auf 92% (Indomethacin) und 95% (DPF). Evans et al. postulierten daraufhin, dass Osteoblasten, die nur kurz mit NSAR behandelt wurden, sich von dem „Stress“ durch die Medikamenteneinnahme erholen können. Außerdem weisen sie darauf hin, dass der Zeitpunkt der Medikamentenzugabe dafür entscheidend sein kann^{17 20}.

Um genau diesen Punkt näher zu betrachten, wurde in der vorliegenden Untersuchung die Zelladhärenz im Verlauf in Echtzeit untersucht.

Versuchsaufbau:

Es liegen bislang keine Informationen darüber vor, wie hoch die Diclofenac-Konzentration nach unterschiedlich langer Einnahme im Knochengewebe tatsächlich ist. Im Vorfeld dieser Arbeit durchgeführte Versuche mit niederen Diclofenac-Konzentrationen (0,1 µg/ml, 0,25 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1,0 µg/ml, 2,5 µg/ml) zeigten in vorliegenden Versuchsansätzen keinen Effekt auf die Proliferation der Zellen. Dies mag seine Ursache unter Umständen darin haben, dass das in den Versuchen dieser Arbeit verwendete Medium 16% FCS enthielt und sich das Diclofenac an die im FCS enthaltenen Proteine binden kann. Auch Kaspar et al. verwendeten hohe FCS-Konzentrationen und sahen bei 0,19-1,56 µg/ml keine Änderung im Proliferationsverhalten der Osteoblasten²⁷.

Es mag einen deutlichen Unterschied hinsichtlich des Adhäsionsvorganges und des Zellstoffwechsels machen, je nachdem, ob die Zellen bei Einwirkung des Medikamentes bereits adhärirt sind oder noch nicht.

Die Adhäsion der Osteoblasten wird über Integrine vermittelt. Dabei handelt es sich um transmembranöse Oberflächenproteine, die Zellen untereinander, sowie Zellen mit extrazellulärer Matrix verbinden. Außerdem spielen sie eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion von Zellen mit deren Umgebung und sind an anderen wichtigen Zellprozessen wie der Proliferation, Migration, Differenzierung und Apoptose beteiligt.

Die Gruppe der Liganden und die der Integrine, die extrazelluläre Matrix binden, beinhaltet Fibronectin, Kollagen, Vitronectin und Osteopontin. Die Integrinrezeptorbindung und -anhäufung führt zur Bildung von fokalen Adhäsionsfoci, aus denen die Integrine das Zytoskelett mit der extrazellulären Matrix verbinden^{13 6 23}.

Um diesen möglichen Unterschied im Adhäsionsvorgang aufzudecken wurden für jeden Versuch zwei unterschiedliche Vorgehensweisen getestet: Im direkten Versuchsansatz (Vgl. 4.1.2) wurden die Zellen zusammen mit dem Medikament ausgesät. Der Adhäsionsvorgang und die damit verbundenen Stoffwechselvorgänge mussten von den Zellen also unter Einfluss des Medikamentes durchgeführt werden. Dieses Modell sollte einen Patienten abbilden, der zum Zeitpunkt der Operation bereits mit Diclofenac aufgesättigt ist.

Im verzögerten Ansatz (4.1.1) wurde den Zellen 24 Stunden Zeit zur Adhärenz gegeben, bevor das Medikament zugegeben wurde. Dies sollte einen Patienten abbilden, der erst nach der Operation, am Folgetag beginnend, Diclofenac verabreicht bekommt.

Ergebnisse und deren Interpretation:

In allen Versuchen wurden primäre, gepoolte Osteoblasten verwendet. Um nachzuweisen, dass es sich tatsächlich um Osteoblasten mit all ihren Eigenschaften handelt, wurden immunzytochemische Färbungen des Kollagen I, der Alkalischen Phosphatase, des Fibronectin und des Osteocalzins durchgeführt.

Die immunzytochemischen Färbungen fielen alle positiv aus und weisen somit das Vorliegen von Osteoblasten nach. Eine Verfälschung der Ergebnisse dadurch, dass die verwendeten Zellen ihre Differenzierung oder ihre osteoblastentypischen Charakteristika verloren hätten, konnte damit für die im Folgenden dargestellten Versuche weitestgehend ausgeschlossen werden.

Proliferation und Stoffwechsel

Verzögerte Medikamentenzugabe

In den Versuchen zeigte sich, dass die Zellen relativ unempfindlich auf das Diclofenac reagieren. Selbst hohe Dosen von 50 µg/ml führten zu keiner wesentlichen Abnahme der Proliferation im Vergleich zur Kontrollgruppe. Erst sehr hohe Dosen von 100 µg/ml des Medikamentes konnten in dieser Arbeit eine verminderte Proliferation zeigen. Diese Hemmung der Proliferation war umso stärker je geringer die Anzahl ausgesäter Zellen war. Bei 100 µg/ml war die Proliferation bei 2.500 Zellen gegenüber der Kontrollgruppe um etwa 20% gesunken, zeigte aber bei der zehnfachen Zellmenge (25.000 Zellen) keine Änderung mehr.

Im Zytotoxizitäts-Test (LDH-Test) konnte keine wesentliche Freisetzung von LDH durch Diclofenac gefunden werden. LDH tritt bei der Lyse nach dem Absterben der Zellen ins Versuchsmedium und dient dabei als Hinweis für eine Zellzerstörung, beispielsweise als Folge der Zugabe zytotoxischer Substanzen. Einen zytotoxischen Einfluss von Diclofenac auf Osteoblasten konnte somit, selbst in unnatürlich hohen Konzentrationen (250 µg/ml) weitestgehend ausgeschlossen werden.

Nun sollte überprüft werden, ob die Stoffwechseleigenschaften der Zellen, speziell durch das Medikament beeinflusst wurden. Hierzu sollte die Aktivität des Enzyms Alkalische Phosphatase (ALP) gemessen werden. Die ALP ist ein anerkannter Marker für den osteoblastären Stoffwechsel und ein Differenzierungsmerkmal der Osteoblasten^{3 36}.

Ferner wurden die Mengen an gebildetem Protein festgestellt und die Calcifizierung der extrazellulären Matrix bestimmt.

Interessanterweise spiegelt sich der an sich schädliche Einfluss des Diclofenac nicht in der Aktivität der Alkalischen Phosphatase wieder: Es konnten 24 Stunden nach Inkubation mit Diclofenac leicht erhöhte ALP-Aktivitäten bei 25, 50 und 100 µg/ml Diclofenac festgestellt werden, wobei die Aktivität für 25 µg/ml am höchsten war.

Demgegenüber zeigt jedoch der MTT-Test bei einer Konzentration von 25 µg/ml einen Abfall der Zellproliferation, wenn auch nur einen sehr geringen. Ein ähnliches Muster ist bereits von der Wirkung des Antibiotikums Clindamycin auf Osteoblasten beschrieben worden. In einer Studie von Naal et al. wurde gezeigt, dass es zu einer signifikanten Abnahme der Proliferation humaner Osteoblasten bei gleichzeitiger signifikanter Zunahme der Aktivität der Alkalischen Phosphatase kam. Naal et al. stellten in ihrer Untersuchung fest, dass Clindamycin in niedrigen Konzentrationen zu einer Stimulation des Zellmetabolismus humaner Osteoblasten führten³⁷.

Auch hier führten bestimmte Konzentrationen des Medikamentes und der Zellzahl zu einer Abnahme der Zellproliferation im MTT-Test, aber dennoch zu einem Anstieg des

Zellstoffwechsels, wie dies am Beispiel der Alkalischen Phosphatase (ALP) gesehen werden konnte.

Etwas differenzierter stellt sich die Calcifizierung dar:

Das Potenzial zur Calcifizierung von gebildeter Matrix kennzeichnet Osteoblasten und ist eine ihrer Hauptcharaktereigenschaften. Nur dadurch kann zum Beispiel gebildeter Kallus verknöchern und stabil werden.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe auf Titan, kam es bei den einzelnen Diclofenac-Konzentrationen zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der Calcifizierung, die umso größer war, je höher die Diclofenac-Konzentration gewählt wurde.

Zuletzt galt die Aufmerksamkeit der Proteinbildung als Maß für die Stoffwechselaktivität. Hier zeigte sich in den Konzentrationen 25 µg/ml, 50 µg und 100 µg/ml kein ausgeprägter Unterschied in der gebildeten Proteinmenge. Zumindest bei der verzögerten Medikamentenzugabe hat Diclofenac zwar einerseits einen hemmenden Einfluss auf die Proliferation, scheint den sonstigen Stoffwechsel der Osteoblasten aber nicht weiter zu stören oder negativ zu beeinflussen. Im Gegenteil, bei geringen Konzentrationen scheint Diclofenac sogar eine leicht stimulierende Wirkung auf den Knochenstoffwechsel zu zeigen, zumindest innerhalb der hier untersuchten 24 Stunden.

Direkte Medikamentenzugabe

Nun stellt sich die Frage, wie sich dies bei direkter Medikamentenzugabe verhält, das heißt bei Inkubation der Zellen mit Diclofenac und gleichzeitiger Adhäsion.

Bei direkter Medikamentenzugabe konnte eine konzentrationsabhängige Abnahme der Proliferation im MTT-Test festgestellt werden.

Bei direkter Aussaat von 10.000 Zellen mit verschiedenen Diclofenac-Konzentrationen (25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml) hatte das Medikament im MTT-Test stärker hemmende Einflüsse auf das Proliferationsverhalten der Osteoblasten im Vergleich zur verzögerten Medikamentenapplikation. Der Proliferationsabfall zwischen direkter und verzögerter Medikamentenzugabe war umso größer, je höher die Diclofenac-Konzentration gewählt wurde (-11% bei 25 und 50 µg/ml, -14% bei 100 µg/ml).

Beim direkten Versuchsansatz der Calciumquantifizierung konnte bei einer Konzentration von 25 µg/ml sowie bei 100 µg/ml eine konzentrationsabhängige Abnahme der Calcifizierung festgestellt werden. Lediglich bei einer Konzentration von 50 µg/ml ergab sich keine statistisch signifikante Änderung der Calcifizierung im Vergleich zur Kontrollgruppe auf Titan. Eine Erklärung könnte möglicherweise die hohe Standardabweichung sein, denn vergleicht man den Calcifizierungsprozess des verzögerten mit dem direkten Versuchsansatz, so ergeben

sich für keine der drei Diclofenac-Konzentrationen statistisch signifikante Unterschiede. Bei beiden Versuchsansätzen war die Calcifizierung der extrazellulären Matrix unter Medikamenteneinfluss auf Titan geringer als in der unbehandelten Kontrollgruppe auf Titan und zwar war diese umso schlechter je höher die Diclofenac-Konzentration gewählt wurde. Dies deckt sich mit bisherigen Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen, die eine längere Konsolidierungsdauer von Osteotomien und Frakturen annehmen, wenn während der Phase, in der Kallus verknöchert, Diclofenac verabreicht wurde^{8 32 46}.

Bezüglich der Kalzifizierung wurde also herausgefunden, dass es keine Rolle spielt, ob die Zellen vor Medikamentenkontakt Zeit zur Adhärenz hatten (verzögerter Versuchsansatz) oder gleich mit dem Medikament ausgesät wurden (direkter Versuchsansatz).

Die gebildete Menge an Proteinen ist unter direktem Einfluss des Diclofenac geringer als in der Kontrollgruppe. Vergleicht man die Proteinmengen nach direkter und verzögerter Medikamentenwirkung ergab sich keine statistische Signifikanz bei einer Konzentration von 25 µg/ml Diclofenac. Ab einer Konzentration von 50 µg/ml lag die Proteinmenge beim direkten Versuchsansatz unter derjenigen des verzögerten Ansatzes.

Die bereits bei der verzögerten Gabe des Diclofenac beobachtete stimulatorische Wirkung auf die Aktivität der Alkalischen Phosphatase (ALP) konnte auch bei direkter Zugabe beobachtet werden. Zwischen beiden Versuchsansätzen ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede. In unserem Ansatz ist die stimulative Wirkung des Diclofenacs auf die Aktivität der ALP unabhängig davon, zu welcher Zeit das Medikament zugegeben wurde.

Vergleich verzögerter und direkter Medikamentenzugabe

Sowohl die Proliferation (MTT-Test) als auch der Proteinstoffwechsel (BCA-Test) wurden durch direkte Medikamentenzugabe stärker gehemmt als durch verzögerte Zugabe von Diclofenac.

Kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen verzögerter und direkter Medikamentenzugabe konnte beim ALP-Test sowie der Calcifizierung gemessen werden.

Beim Ersten kam es in beiden Ansätzen zu einer Steigerung der Aktivität der ALP durch Diclofenac, während sowohl eine verzögerte wie auch direkte Zugabe von Diclofenac zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung der Calcifizierung führte.

Auch wenn bei direkter Zugabe des Medikamentes stellenweise eine Stimulation der Stoffwechselfparameter beobachtet wurde, so erwies sich dies im Vergleich zur verzögerten Zugabe nicht als statistisch signifikant. Warum sich dies nun so verhielt muss Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Offensichtlich sind Osteoblasten aber in der Phase der Adhäsion weitaus empfindlicher in ihrem Stoffwechsel. Wird der Stoffwechsel hier gestört, sinkt das Proliferationspotential, möglicherweise dadurch, dass weniger Zellen überhaupt in die sessile Form eintreten und sich vermehren können. Möglicherweise stört das Diclofenac direkt den Adhäsionsvorgang.

Wenn Diclofenac einen Einfluss auf das Stoffwechselverhalten hat, stellt sich nun die Frage, ob sich dadurch auch das Adhäsionsverhalten der Zellen ändert. Aus der Zellkultur ist hinreichend bekannt, dass die Adhäsion ein den Anforderungen der Zelle entsprechendes Milieu voraussetzt. Hierzu zählen z.B. pH-Wert, Nährstoffangebot und die Beimengung bestimmter Nährstoffe in das Wachstumsmedium. Werden diese Anforderungen nicht erfüllt, kommt es zu keiner oder einer deutliche langsameren Adhäsion. Daraus lässt sich ableiten, dass die Störung des zellulären Stoffwechsels zu einer Störung der Adhäsion führen kann. Daher wurden in den folgenden Untersuchungen die Adhäsionsvorgänge genauer analysiert.

Zelladhärenz

Die hier gemachten Versuche zur Messung der Zelladhärenz beruhen auf dem Prinzip der Impedanzänderung. Hierbei handelt es sich um die Messung von Änderungen der Wechselstromwiderstände. Haftet sich eine Zelle an einen Untergrund, so kann durch Anlage eines Wechselstroms ein Widerstand (Impedanz) gemessen werden. Je mehr Zellen anhaften, umso größer ist die Impedanzänderung. Da die Adhäsion von Zellen ein dynamischer Prozess ist, kann die Impedanzänderung als Funktion der Zeit ermittelt werden. Daraus kann ein Graph erstellt werden, der die Impedanzänderung als Zeichen des Adhäsionsprozesses widerspiegelt.

Bei bekannter Zellzahl und dem Wissen, wie schnell eine bestimmte Zellprobe unter definierten Umständen an eine definierte Oberfläche haftet (Kontrollprobe), können Rückschlüsse auf den Zustand der Zelle geschlossen werden. Durch gezielte Änderung der abhängigen und unabhängigen Variablen können dadurch Hinweise auf Stoffwechsellage, Zustand und Potential der Zellen gewonnen werden.

Letztlich liefert das xCELLigence-System aber nur indirekte Hinweise auf die Adhäsion. Der direkte Adhäsionsvorgang, das heißt die Ausbildung von Adhäsionsfoci und die Interaktion von Integrinen mit Liganden, kann nicht ermittelt werden.

Außerdem kommt es allein durch die Vermehrung der Zellen schon zu einem Ansteigen des Mess-Signals, da durch mehr Zellen auch der Widerstand und damit die Impedanz geändert werden. Das System ist also in der Lage, über eine Änderung der Zellzahl auf einer Oberfläche Rückschlüsse auf die Menge der adhärenierten Zellen zu schließen. Wollte man die Adhäsion alleine, isoliert betrachten, müsste die Zellproliferation gestoppt werden.

Die Messungen der Impedanzänderung - als Meßwerte der Zellzahl auf einer Oberfläche - zeigen nun folgende Ergebnisse:

Verzögerte Medikamentenzugabe

Bei einer Zellzahl von 5.000 Zellen veränderte sich die Impedanz wie folgt: In der Kontrollgruppe wurde am Ende der Messzeit (nach 48h) die größte Impedanzänderung gemessen. Bei den verschiedenen Diclofenac-Gruppen (25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml) kam es zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der gemessenen Impedanzänderung, was auf eine Abnahme der Adhäsionsprozesse durch das Medikament Diclofenac schließen lässt.

Die Geschwindigkeit der Impedanzänderung als Zeichen des zeitlichen Ablaufs des Adhäsionsprozesses, kann im Schaubild anhand der Steigung erkannt werden. Diese verläuft in der Kontrollgruppe am steilsten. Bei einer Konzentration von 25 µg/ml und 50 µg/ml verlaufen die Kurven parallel mit gleicher Steigung, also mit gleicher starker Änderung der Impedanz und somit mit einer gleich großen Zunahme der Adhäsionsprozesse. Der Kurvenverlauf bei einer Diclofenac-Konzentration von 100 µg/ml gestaltet sich etwas anders: die Kurve ist flacher und zeigt ein vorübergehendes Sistieren der Impedanzveränderung nach Medikamentenzugabe (ungefähr von 25 Stunden bis 30 Stunden).

Dies kann als Indiz dafür gewertet werden, dass es auch bei bereits adhären Zellen durch Diclofenac zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme des Zellstoffwechsels und der Zellproliferation kommt. Diese Abnahme ist umso größer, je höher die Diclofenac-Konzentration gewählt wurde.

Dies wird durch die Stoffwechseltests bestätigt. Die Zellzahl im MTT-Test sowie der Prozess der Calciumquantifizierung zeigen eine konzentrationsabhängige Abnahme durch Diclofenac.

Direkte Medikamentenzugabe

Bei direkter Medikamentenzugabe zeigte sich am Ende der Messzeit bei der Kontrollgruppe der größte Zellindex, als Messwert der Impedanz. Auch unter Diclofenac-Einfluss konnten der Adhäsionsprozess und die damit verbundene Proliferation der Zellen weiterlaufen. Dies lässt sich aus der auch nach Medikamentenzugabe positiv verlaufenden Steigung der Kurven im Schaubild ablesen. Allerdings erreichten die mit Diclofenac versetzten Zellen das Endplateau, und damit den statischen Zellzustand zwar zeitgleich zur Kontrollgruppe, aber mit geringeren Zellmengen auf der Oberfläche als diese.

Dieses Plateau lag umso tiefer, je eher die Zellen mit Diclofenac in Kontakt kamen und war für die drei Konzentrationen jeweils nahezu identisch. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass beim direkten Versuchsansatz nicht die Diclofenac-Konzentration entscheidend für den Adhäsionsprozess war, sondern vielmehr der Zeitpunkt der Medikamentenzugabe. Der Versuchsansatz mit sofortiger Medikamentenzugabe führte zu einer niedrigeren Impedanzänderung am Ende der Messzeit im Gegensatz zu dem Ansatz, bei dem die Zellen zuvor eine Zeit medikamentenfreier Adhärenz hatten.

Vergleich verzögerter und direkter Medikamentenzugabe

Vergleicht man die Impedanzänderung nach 48 Stunden und Aussaat von 5.000 Zellen bei verzögerter Medikamentenzugabe mit direktem Diclofenac-Kontakt der Zellen, dann wird ersichtlich, dass bei beiden Gruppen der Zellindex am Ende der Messzeit (als Zeichen der Anzahl adhärenter Zellen) unter der der Kontrollgruppe lag.

Dieser Unterschied ist konzentrationsabhängig und fällt bei direkter Medikamentenzugabe stärker ins Gewicht als bei verzögerter.

Zur Stützung der Ergebnisse sowie zur bildlichen Anschauung der Ergebnisse wurden REM-Aufnahmen angefertigt.

REM-Aufnahmen

Verzögerte Medikamentenzugabe

Bei verzögerter Medikamentenzugabe sind die Bilder der Kontrollgruppe (0 mg/ml), der 25 µg/ml Diclofenac-Gruppe und der 50 µg/ml Diclofenac-Gruppe sehr ähnlich.

Das Bild bei 100 µg/ml Diclofenac ist zwar im Vergleich zur Kontrollgruppe verändert, da die Zellkontakte zwischen den Zellen weniger sind, aber dennoch sind die Zellen, im Gegensatz zu den Zellen, die direkt mit einer Konzentration von 100 µg/ml Diclofenac in Kontakt kamen, bei verzögerter Medikamentenzugabe als Osteoblasten zu erkennen.

Direkte Medikamentenzugabe

Bei direkter Medikamentenzugabe ähnelt das Bild der Kontrollgruppe dem der Zellen, die mit 25 µg/ml Diclofenac behandelt wurde. Bei 50 µg/ml Diclofenac kann man eine Abnahme des Zellrasens beobachten. Bei einer Konzentration von 100 µg/ml kann man nur noch vereinzelt Bruchstücke der ehemals vitalen Osteoblasten sehen.

Vergleich verzögerter und direkter Medikamentenzugabe

Schlussfolgernd kann festgehalten werden, dass die Zellen in ihrer Morphologie bis zu einer Konzentration von 50 µg/ml bei verzögerter Medikamentenzugabe und 25 µg/ml bei direkter Medikamentenzugabe morphologisch weitestgehend unbeeinträchtigt sind.

Bei direkter Medikamentenzugabe sind bei einer Konzentration von 100 µg/ml keine Osteoblasten mehr auf der Titanoberfläche erkenntlich.

Bei verzögerter Medikamentenzugabe kommt es bei dieser Konzentration lediglich zu einer Abnahme der Zellkontakte untereinander und zur Titanoberfläche.

Diese Erkenntnisse decken sich weitestgehend mit den Ergebnissen der Stoffwechseluntersuchungen und der Adhärenzmessungen.

Schwächen der Arbeit

Die hier gewählten Versuchsmodelle sind artifiziell und lassen daher die Ergebnisse nicht ohne weiteres auf in-vivo Situationen übertragen.

Insgesamt hat die Arbeit einen explorativen Charakter, da die n-Zahlen in den vorliegenden Versuchen unterschiedlich und nicht hoch genug gewählt wurden. Weitere Untersuchungen mit nur einer Diclofenac-Konzentration und einer n-Zahl >7 könnten genauere Ergebnisse liefern.

Ein weiterer Schwachpunkt der Arbeit ist die Ungewissheit über den realen Anteil an aktivem Diclofenac im Nährmedium. Diclofenac wird im Körper an Plasma gebunden transportiert und liegt nur in sehr geringem Maße als pharmakologisch aktive Form vor. Auch in den hier durchgeführten Versuchen wurde Serum verwendet (FCS als Zuschlag zum Zellkulturmedium). Trotz der Tatsache, dass FCS ein Standardzusatz in der Zellkultur ist, sind die genauen Inhaltsstoffe und die Zusammensetzung des Serums bis heute nicht restlos geklärt und unterliegen Schwankungen. Daher reservieren sich Zellkulturelabore eine Charge an FCS beim Hersteller, um stets die gleiche Zusammensetzung zur Verfügung zu haben. In einem Versuchsansatz mit gleicher Diclofenac-Konzentration aber unterschiedlichen Anteilen der Zusätze könnte geklärt werden, ob und in welchem Ausmaß die Zusätze zum Zellkulturmedium die Ergebnisse der Meßwerte beeinflussen.

Ferner konnte mit dem xCELLigence-System nur eine indirekte Aussage über die Adhäsion gemacht werden, da die Adhäsionsmessung bei der Durchführung in diesem Messsystem, lediglich die Menge der Zellen auf der Oberfläche misst. Natürlich hängt diese Zellzahl einerseits von der verwendeten Zellmenge und andererseits von der Proliferation ab. Eine direkte, quantitative Bestimmung der Adhärenzprozesse ist daher nur möglich, wenn die Zellen in ihrer Vermehrung gestoppt, aber im Zellstoffwechsel noch aktiv sind.

In dieser Arbeit war nicht Ziel zu klären, ob Diclofenac einen direkten Einfluss auf den molekularen Adhäsionsprozess und die Ausbildung des Zytoskelettes hat oder ob dies nur eine Folge des gestörten Stoffwechsels an anderer Stelle ist. Allerdings wird durch die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen eindrucksvoll gezeigt, dass das Medikament einen Einfluss auf die Zellmorphologie hat.

Daher dient diese Arbeit als Vorversuch zu weiteren Analysen, in denen speziell die Ausbildung der Adhäsionsfoci und die Ausbildung des Zytoskelettes unter Diclofenac-Einfluss untersucht werden sollen.

7 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Diclofenac auf Osteoblasten und deren Adhäsionsverhalten auf Oberflächen untersucht.

Hintergrund ist die Tatsache, dass Diclofenac ein weit verbreitetes Medikament zur Vermeidung Heterotoper Ossifikationen bei elektivem Hüftgelenkersatz darstellt.

Da Diclofenac den Stoffwechsel von Zellen beeinflusst, ist es denkbar, dass darunter die Adhäsion der Zellen auf Titanoberflächen leidet, was Ursache einer vorzeitigen Lockerung des Implantats mit der Folge eines Prothesenwechsels sein kann.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob Diclofenac einen konzentrationsabhängigen Einfluss auf den Stoffwechsel und den Adhäsionsprozess von Osteoblasten hat. Außerdem sollte beleuchtet werden, ob die Wirkung von Diclofenac auf die Zellen unterschiedlich ist, je nachdem ob die Zellen bereits adhärirt sind oder nicht. Es sollte also gezeigt werden, ob der Zeitpunkt der Medikamentenzugabe ausschlaggebend ist. Ferner wurde anhand von rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen die Morphologie der Osteoblasten unter Diclofenac-Einfluss veranschaulicht und das Adhäsionsverhalten der Zellen in Echtzeit beobachtet.

Bei der Untersuchung der Zellproliferation zeigte sich, dass Diclofenac einen hemmenden Einfluss auf die Zellen hat. Je größer die Diclofenac-Konzentration gewählt wurde, desto geringer war das Proliferationsvermögen der Zellen. Allerdings nahm das Proliferationsvermögen bei verzögerter Medikamentenzugabe, also mit vorheriger Adhärenzperiode der Osteoblasten ohne Diclofenac-Kontakt, nur um wenige Prozentwerte ab. Hingegen war die Abnahme bei direkter Zugabe von Diclofenac ohne vorherige medikamentenfreie Adhärenzphase deutlicher.

Ferner konnte gezeigt werden, dass die Stoffwechselfunktionen der Zellen, zumindest was die Calcifizierung der Matrix und die Proteinbildung betrifft, ebenfalls durch Diclofenac gehemmt wurden. Bei der Untersuchung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase konnte allerdings eine leichte Stimulation durch Diclofenac festgestellt werden.

Auch bei diesen Versuchen war die negative Wirkung bei direkter Medikamentenzugabe, das bedeutet bei Zugabe von Diclofenac schon bereits zum Zeitpunkt 0, stärker ausgeprägt als bei Gabe des Medikamentes nach 24 Stunden. Offenbar können die Zellen in adhärirter Form besser mit dem Einfluss des Medikamentes umgehen.

Vergleicht man den Adhäsionsprozess humaner Osteoblasten unter Diclofenac-Einfluss, fällt auf, dass bei allen Diclofenac-Konzentrationen die gemessene Impedanzänderung als Meßwert für die Anzahl adhärenter Zellen unter der der unbehandelten Kontrollgruppe lag.

Dieser Unterschied war konzentrationsabhängig und fiel bei direkter Medikamentenzugabe stärker ins Gewicht als bei verzögerter.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Gabe von Diclofenac auch die Geschwindigkeit des Adhäsionsprozesses von Osteoblasten auf Oberflächen beeinflusst. Umso höher die Diclofenac-Konzentration gewählt wurde und umso eher die Zellen mit dem Medikament in Kontakt kamen, desto langsamer verlief der Adhäsionsprozess.

Diese Ergebnisse stützen auch die REM-Untersuchungen, bei denen die morphologischen Veränderungen der Zellen veranschaulichen, dass sowohl eine höhere Konzentration an Diclofenac sowie eine direkte Medikamentenzugabe eine stärkere Beeinträchtigung der Zellen zur Folge haben.

Zusammenfassend konnte in vorliegender Arbeit gezeigt werden, dass das Medikament Diclofenac in den Stoffwechsel von Osteoblasten eingreift und zwar in Abhängigkeit der Konzentration des Medikaments sowie dem Zeitpunkt der Medikamentenzugabe: Je höher die Diclofenac-Konzentration gewählt wurde und je eher die Zellen mit Diclofenac in Kontakt kamen, desto größer war der negative Einfluss von Diclofenac auf den Metabolismus, die Adhärenz und die Morphologie humaner Osteoblasten.

8 Literaturverzeichnis

1. Akman S, Gögüs A, Sener N, Bilgiç B, Aksoy B, Seckin F (2002) Effect of diclofenac sodium on union of tibial fractures in rats. *Advances in therapy* 19: 119-125
2. Atienza J, Zhu J, Wang X, Xu X, Abassi Y (2005) Dynamic monitoring of cell adhesion and spreading on microelectronic sensor arrays. *J Biomol Screen* 10: 795-805
3. Aubin J (1998) Advances in the osteoblast lineage. *Biochem Cell Biol* 76: 899-910
4. Auf'mkolk B, Hauschka P, Schwartz E (1985) Characterization of human bone cells in culture. *Calcified Tissue International* 37: 228-235
5. Barthel T, Baumann B, Noth U, Eulert J (2002) Prophylaxis of heterotopic ossification after total hip arthroplasty: A prospective randomized study comparing indomethacin and meloxicam. *Acta Orthop Scand* 73: 611-614
6. Bates R, Lincz L, Burns G (1995) Involvement of integrins in cell survival. *Cancer Metast Rev* 14
7. Bätge B, Seitzer, PK M (1993) Die organische Knochenmatrix, Kollagene und nichtkollagene Proteine. *Osteologie* 2: 193-201
8. Beck A, Krischak G, Sorg T, Augat P, Farker K, Merkel U, Kinzl L, Claes L (2003) Influence of diclofenac (group of nonsteroidal anti-inflammatory drugs) on fracture healing. *Arch Orthop Trauma Surg* 123
9. Benson M, Aldo-Benson M, Brandt K (1985) Synovial fluid concentrations of diclofenac in patients with rheumatoid arthritis or osteoarthritis. *Semin Arthritis Rheum* 15: 65-67
10. Berridge M, Tan A (1993) Characterization of the cellular reduction of MTT. Subcellular localisation, substrate dependence and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Archiv Biochem Biophys* 303: 474-482
11. Berridge M, Tan A, McCoy K, Wang R (1996) The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochemica* 4: 14-19
12. Chang J-K, Li C-J, Liao H-J, Wang C-K, Wang G-J, Ho M-L (2009) Anti-inflammatory drugs suppress proliferation and induce apoptosis through altering expressions of cell cycle regulators and pro-apoptotic factors in cultured human osteoblasts. *Toxicology* 258: 148-156
13. Cowles E, Brailey L, Gloria A, Gronowicz G (2000) Integrin-mediated signaling regulates AP-1 transcription factors and proliferation in osteoblasts. *J Biomed Mater Res* 52: 725-737
14. Decker T, Lohmann-Matthes M-L (1988) A quick and simple method for the quantification of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular

- cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *Journal of Immunological Methods* 115: 61-69
15. Dekel S, Lenthall G, Francis M (1981) Release of prostaglandins from bone and muscle after tibial fracture. An experimental study in rabbits. *J Bone Joint Surg Br* 63: 185-189
 16. Eulert J, Knelles D, Barthel T (1997) Heterotope Ossifikationen. *Orthopäde* 26: 399-406
 17. Evans C, Butcher C (2004) The influence on human osteoblasts in vitro of non-steroidal anti-inflammatory drugs which act on different cyclooxygenase enzymes. *J Bone Joint Surg Br* 86: 444-449
 18. Gebuhr P, Wilbek H, Soelberg M (1995) Naproxen for 8 days can prevent heterotopic ossification after hip arthroplasty. *Clinical orthopaedics and related research* 314: 166-169
 19. Geigy C (1994) Produktinfo Diclofenac.
 20. Guez D, Lesclous P, Baroukh B, Staffar J (2001) Impact of timing of opmethacin treatment in a model of synchronized bone remodelling in rats. *Exp Physiol* 86: 373-379
 21. Herschman H, Xie W, Reddy S (1995) Inflammation, reproduction, cancer and all that... The regulation and role of the inducible prostaglandin synthase. *Bioessays* 17: 1031-1037
 22. Hogevoid H, Grogard B, Reikeraas O (1992) Effects of short-term treatment with corticosteroids and indomethacin on bone healing. *Acta Orthop Scand* 63: 607-611
 23. Hynes R (1992) Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell Tissue Res* 69: 11-25
 24. Ingram RT, Park YK, Clarke BL, Fitzpatrick LA (1994) Age- and gender-related changes in the distribution of osteocalcin in the extracellular matrix of normal male and female bone. Possible involvement of osteocalcin in bone remodeling. *The Journal of Clinical Investigation* 93: 989-997
 25. Jacobsson S, Djerf K, Ivarsson I, Wahlström O (1994) Effect of diclofenac on fixation of hydroxyapatite coated implants. An experimental study. *J Bone Joint Surg Br* 76-B: 831-833
 26. Jones S, Boyde A (1977) The migration of osteoblasts. *Cell Tissue Res* 184: 179-193
 27. Kaspar* D, Hedrich* CM, Schmidt C, Liedert A, Claes LE, Ignatius AA (2005) Diclofenac hemmt die Proliferation und Matrixbildung osteoblastärer Zellen. *Der Unfallchirurg* 108: 18-24
 28. Kirstein S, Atienza J, Xi B, Zhu J, Yu N, Wang X, Xu X, Abassi Y (2006) Live cell quality control and utility of real-time cell electronic sensing for assay development. *Assay Drug Dev Technol* 4: 545-553

29. Knelles D, Barthel T, Karrer A, Kraus U, Eulert J, Koelbl O (1997) Prevention of heterotopic ossification after total hip replacement. A prospective, randomised study using acetylsalicylic acids, Indomethacin and fractional or single dose irradiation. *The J Bone Joint Surg Br* 79: 596-602
30. Koelbl O, Knaus P, Pohl F, Flentje M, Sebald W (2001) Radiation induced reduction of BMP-induced proteoglycan synthesis in an embryonal mesenchymal tissue equivalent using the chicken „Limb bud“ test. *Strahlentherapie und Onkologie* 8: 432-436
31. Koorevaar C, Hu H, Lemmens A, Kampen vA (1999) No effective prophylaxis of heterotopic ossification with short term ibuprofen. *Arch Orthop Trauma Surg* 119: 183-185
32. Krischak G, Augat P, Blakytyn R, Claes L, Kinzi L, Beck A (2007) The non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac reduces appearance of osteoblasts in bone defect healing in rats. *Arch Orthop Trauma Surg* 127: 453-458
33. Maloney W, Jasty M, Willet C, Mulroy RJ, WH H (1992) Prophylaxis for heterotropic bone formation after total hip arthroplasty using low-dose radiation in high risk patients *Clin Orthop* 280: 230-234
34. Matziolis G, Rau H, Klever P, Erli H, Paar O (2002) Beeinflussung humaner Osteoblasten durch verschiedene Analgetika. *Unfallchirurg* (2005) 108:18024 105: 527-531
35. Mazur P (1966) Physical and chemical basis of injury in single-celled microorganisms subjected to freezing and thawing. In: Meryman H (ed) *Cryobiology*. Academic Press, London, pp 213-315
36. Miao D, Scutt A (2002) Histochemical localization of alkaline phosphatase activity in decalcified bone and cartilage. *J Histochem Cytochem* 50: 333-340
37. Naal F, Salzmann G, v. Knoch F, Tuebel J, Diehl P, Gradinger R, Schauwecker J (2008) The effects of clindamycin on human osteoblasts in vitro. *Arch Orthop Trauma Surg* 128: 317-323
38. Norrdin R, Jee W, High W (1990) The role of prostaglandins in bone in vivo. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)* 41: 139-149
39. Pilbeam C, Harrison J, Raisz L (2002) Prostaglandins and bone metabolism. In: Bilezikian J, Raisz L, Rodan G (eds) *Principles of Bone Biology*. Academic Press, New York, pp 979-994
40. Pohl F, Hassel S, Nohe A, Flentje M, Knaus P, Sebald W, Koelbl O (2003) Radiation-induced suppression of the BMP 2 signal transduction pathway in the pluripotent mesenchymal cell line C2C12: an in vitro model for prevention of heterotopic ossification by radiotherapy. *Radiation research* 159: 124-127

41. Raisz L, Martin T (1983) Prostaglandins in bone and mineral metabolism. In Peck W (ed) Bone and mineral research, annual 2 Amsterdam: excerpta medica Elsevier Science: 286-310
42. Reikeraas O, Engebretsen L (1998) Effects of ketoralac tromethamine and indomethacin on primary and secondary bone healing. An experimental study in rats. Arch Orthop Trauma Surg 118: 50-52
43. Riess W, Stierlin H, Degen P (1978) Pharmacokinetics and metabolism of the anti-inflammatory agent Voltaren. Scand J Rheumatol 22: 17-29
44. Sell S, Willms R, Jany R, Esenwein S, Gaissmaier C, Martini F, Bruhm G, Burkardsmaier F, Bamberg M, Küsswetter W (1998) The suppression of heterotopic ossifications. Radiation versus nonsteroidal anti-inflammatory drug therapy - a prospective study. The Journal of Arthroplasty 13: 854-859
45. Sell S, Teschner M, Gaissmaier C, Martini F, Weidner SA, Küsswetter W (1999) Wirkung von Diclofenac auf humane Osteoblasten und stromale Knochenmarkzellen in vitro in bezug auf die Endoprothetik. Zeitschrift für Rheumatologie 58: 13-20
46. Sen C, Erdem M, Gunes T, Koseoglu D, Filiz N (2007) Effects of diclofenac and tenoxicam on distraction osteogenesis. Arch Orthop Trauma Surg 127: 153-159
47. Smith W, Song I (2002) The enzymology of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. Prostaglandins Other Lipid Mediat 68-69: 115-128
48. Wittenberg J, Wittenberg R (1991) Release of prostaglandins from bone and muscle after femoral osteotomy in rats. Acta Orthop Scand 62: 577-581

9 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1, Strukturformel des Medikamentes Diclofenac.....	11
Abb. 2, ICC, Kollagen I Abb. 3, ICC, Alkalische Phosphatase.....	33
Abb. 2, ICC, Kollagen I Abb. 3, ICC, Alkalische Phosphatase.....	33
Abb. 4, ICC, Fibronectin Abb. 5, ICC, Osteocalzin.....	33
Abb. 4, ICC, Fibronectin Abb. 5, ICC, Osteocalzin.....	33
Abb. 6, MTT-Test - verzögerte Medikamentenzugabe.....	35
Abb. 7, LDH-Test - verzögerte Medikamentenzugabe.....	36
Abb. 8, Calciumquantifizierung - verzögerte Medikamentenzugabe.....	37
Abb. 9, Proteinbestimmung pro Well - verzögerte Medikamentenzugabe.....	38
Abb. 10, ALP-Aktivitätsmessung - verzögerte Medikamentenzugabe.....	39
Abb. 11, MTT-Test - direkte Medikamentenzugabe	41
Abb. 12, Calciumquantifizierung - direkte Medikamentenzugabe.....	42
Abb. 13, Proteinbestimmung pro Well - direkte Medikamentenzugabe.....	43
Abb. 14, ALP-Aktivitätsmessung - direkte Medikamentenzugabe.....	44
Abb. 15, MTT-Test - Vergleich verzögerter und direkter Ansatz.....	46
Abb. 16, Calciumquantifizierung - Vergleich verzögerter und direkter Ansatz.....	47
Abb. 17, Proteinbestimmung pro Well - Vergleich verzögerter und direkter Ansatz.....	48
Abb. 18, ALP-Aktivitätsmessung - Vergleich verzögerter und direkter Ansatz.....	49
Abb. 19, Kontrollgruppe (0 µg/ml Diclofenac) – a: Übersicht, b-d: aufsteigende Vergrößerungen entsprechend der Skalierungsbalken.....	50
Abb. 20, 25 µg/ml Diclofenac – a: Übersicht verzögerte Medikamentenzugabe, b: Übersicht direkte Medikamentenzugabe.....	51
Abb. 21, 25 µg/ml Diclofenac – Vergrößerungen a-f entsprechend der Skalierungsbalken; a,c,e: verzögerte Medikamentenzugabe; b,d,f: direkte Medikamentenzugabe.....	52
Abb. 22, 50 µg/ml Diclofenac - a: Übersicht verzögerte Medikamentenzugabe, b: Übersicht direkte Medikamentenzugabe.....	53
Abb. 23, 50 µg/ml Diclofenac - Vergrößerungen a-f entsprechend der Skalierungsbalken; a,c,e: verzögerte Medikamentenzugabe; b,d,f: direkte Medikamentenzugabe.....	54
Abb. 24, 100 µg/ml Diclofenac - Vergrößerungen a-d entsprechend der Skalierungsbalken; a,c: verzögerte Medikamentenzugabe; b,d: direkte Medikamentenzugabe.....	55
Abb. 25, xCELLigence, Liniendiagramm - verzögerte Medikamentenzugabe.....	57
Abb. 26, xCELLigence, Säulendiagramm - verzögerte Medikamentenzugabe.....	57
Abb. 27, xCELLigence, Säulendiagramm - direkte Medikamenten-Zugabe	58
Abb. 28, xCELLigence - direkte Medikamentenzugabe - Diclofenac-Zugabe t = 0.....	60
Abb. 29, xCELLigence - direkte Medikamentenzugabe - Diclofenac-Zugabe t = 1h.....	60
Abb. 30, xCELLigence - direkte Medikamentenzugabe - Diclofenac-Zugabe t = 2h.....	61
Abb. 31, xCELLigence - direkte Medikamentenzugabe - Diclofenac-Zugabe t = 4h	61
Abb. 32 xCELLigence - Vergleich verzögerter und direkter Ansatz.....	63

10 Lebenslauf

Sarah Brugger, geboren am 22. Oktober 1984 in Tett nang

Berufserfahrung

Seit Sept. 2011 **Assistenzärztin der Gynäkologie und Geburtshilfe**
am Rotkreuzklinikum in München

Studium und Schulausbildung

Apr. 2007 – Mai 2011 **Studium der Humanmedizin** (Klinischer Teil)
an der Technischen Universität München
Abschluss: *Zweites Staatsexamen*

Apr. 2005 – März 2007 **Studium der Humanmedizin** (Vorklinik)
an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
Abschluss: *Erstes Staatsexamen*

Sept. 2001 – Juli 2004 **Graf-Zeppelin-Gymnasium**
in Friedrichshafen
Abschluss: *Allgemeine Hochschulreife*

Aug. 2000 – Aug. 2001 **Castle High School**
in Evansville, Indiana, Amerika

Sept. 1995 – Juli 2000 **Graf-Zeppelin-Gymnasium**
in Friedrichshafen

Stipendien

Mai 2007 – Mai 2011 Stipendiatin der **Konrad-Adenauer-Stiftung**

Juni 2004 – Juni 2006 Stipendiatin von **e-fellows.net**

Praktika

Praktisches Jahr

- Okt. 2010 – Dez. 2010 **Chirurgie am Eerste Rivier Hospital**
in Kapstadt, Südafrika
- Aug. 2010 – Okt. 2010 **Gynäkologie und Geburtshilfe am Central New Foundland
Regional Health Center**
in Grand-Fall-Windsor, Kanada
- Apr. 2010 – Aug. 2010 **Innere Medizin am Spital Linth**
in Uznach, Schweiz
- Febr. 2010 – Apr. 2010 **Gynäkologie und Geburtshilfe am Spital Linth**
in Uznach, Schweiz

Famulaturen

- Sept. 2009 – Okt. 2009 **Notaufnahme am Klinikum Rechts der Isar**
in München
- Febr. 2009 – Apr. 2009 **Orthopädie und Unfallchirurgie am Klinikum Rechts der
Isar**
in München
- März – 2009 Apr. 2009 **Orthopädie in der Orthopädie am Stiglmaierplatz**
in München
- Juli 2007 – Aug. 2007
in München **Kardiologische Intensivstation am Deutschen Herzzentrum**

Krankenpflegepraktikum

- März 2006 – Apr. 2006 **Psychatrie an der Clinique Belle-Rive**
in Avignon, Frankreich
- Juli 2005 – Aug. 2005 **Innere Medizin am Klinikum Friedrichshafen GmbH**
in Friedrichshafen

11 Danksagung

Danken möchte ich Herrn Professor Dr. Reiner Gradinger und seinem Nachfolger Herrn Professor Dr. Rüdiger von Eisenhart-Rothe, Direktoren der Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie der TU München, die mir ermöglichten die vorliegende Dissertation an ihrer Klinik zu erstellen.

Ebenso gebührt mein besonderer Dank Herrn Privatdozent Dr. Rainer Burgkart, der mich bei der Durchführung der Arbeit unterstützte und mir immer zur Seite stand. Ohne ihn wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Mein Dank gilt außerdem meinem Betreuer, Dr. Carsten Horn, der mich von Beginn an anleitete und stets ein offenes Ohr für meine Fragen und Ideen hatte.

Besonders hervorheben möchte ich außerdem die Hilfe, die ich von Frau Jutta Tübel aus dem Labor für Zellkultur erhalten habe: Ein herzliches Dankeschön für die geduldige und freundliche Anleitung der Versuche sowie die fachlich kompetente Unterstützung und die selbstverständliche Nutzung aller Materialien und Messgeräte.

Dem Deutschen Museum möchte ich für die kostenlose Bereitstellung ihres Rasterelektronenmikroskops danken. Dabei möchte ich mich besonders bei Herrn Klaus Macknapp für die zeitaufwendige Anfertigung der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen bedanken.

Die Firma Roche verdient meinen Dank für die Bereitstellung des xCELLigence-Messsystems und die unkomplizierte Unterstützung bei der Durchführung meiner Versuche.

Beim gesamten Operationsteam der Orthopädischen Klinik des Rechts der Isar möchte ich mich für die Bereitstellung der Knochenmaterialien bedanken. Außerdem gebührt mein Dank den Patienten, die sich dazu bereit erklärt haben, an meiner Studie teilzunehmen.

Schließlich möchte ich herzlichst meiner Freundin Petra Kleiner und meiner Schwester Eva Brugger danken, die mich sowohl fachlich als auch sprachlich immer unterstützt und ermutigt haben.