

Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie
der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. R. von Eisenhart-Rothe)

Dynamisches Verhalten von primären humanen Osteoblasten in einer dreidimensionalen Kollagen-I-Matrix vor und nach medikamentöser Stimulation

Giulia Virginia Jarosch

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. R. von Eisenhart-Rothe

Die Dissertation wurde am 11.06.2014 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 21.01.2015
angenommen.

Für meinen Nonno Pipa

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	10
2	MATERIALIEN UND METHODEN	14
2.1	Geräte und Reagenzien	14
2.1.1	Technische Geräte	14
2.1.2	Material für die Zellkultur	16
2.1.3	Medienzusammensetzung	19
2.1.4	Material für die Wafer und PDMS-Kanal-Herstellung	20
2.1.5	Medikamente und Reagenzien	20
2.1.6	Immunhistochemie/Enzym-Substrat-Reaktion	20
2.1.7	Software	22
2.2	Patientenmaterial	22
2.3	Osteoblastenisolierung aus Knochengewebe	23
2.3.1	Gewinnung von primären humanen Osteoblasten aus spongiösem Knochengewebe	23
2.3.2	Kultivierung von primären humanen Osteoblasten	24
2.3.3	Passagierungsmethode und Bestimmung der Zellzahl	25
2.3.4	Kryokonservierung	26
2.3.5	Zellpool erstellen	27
2.3.6	Kultivierung und Fixierung von zellbewachsenen Zellkulturobjektträgern	28
2.3.7	Herstellung der Paraformaldehyd-Lösung (PFA)	28
2.3.8	Medikamentenbehandlung des Zellpools	28
2.4	Immunhistochemie und Substrat-Enzym-Reaktion	29
2.4.1	Immunhistochemischer Nachweis von Osteocalcin	30
2.4.2	Immunhistochemischer Nachweis von Kollagen I	31
2.4.3	Enzym-Substrat-Reaktion zum Nachweis von alkalischer Phosphatase	32

2.4.4	Auswertung der immunhistochemischen Färbungen sowie der Enzym-Substrat-Reaktion	32
2.5	Versuchsaufbau	33
2.5.1	Lithographische Herstellung eines Wafers mittels Fotolacks	34
2.5.2	PDMS-Kanal-Herstellung	37
2.6	Versuchsdurchführung	38
2.6.1	Herstellung des Kollagens	38
2.6.2	Vorbehandlung und Befüllung der PDMS-Kanäle	38
2.6.3	Computergestützte mikroskopische Aufzeichnung	39
2.6.4	Auswertung der Aufzeichnungen	40
2.7	Vorversuche	42
3	ERGEBNISSE	43
3.1	Patientengut	43
3.2	Vorversuche	44
3.2.1	Verdünnungsversuch Patient Nr. 1	45
3.2.2	Verdünnungsversuch Patient Nr. 2	46
3.2.3	Verdünnungsversuch Patient Nr. 3	47
3.2.4	Verdünnungsversuch Patient Nr. 4	48
3.3	Vergleich der einzelnen Patienten zwischen Passage 2-9	49
3.4	Vergleich der einzelnen Patienten in Passage 4	51
3.5	Ergebnisse der medikamentenbehandelten Zellpools	52
3.5.1	Vergleich der Zellinteraktion am 7. Inkubationstag	53
3.5.2	Vergleich der Zellinteraktion am 8. Inkubationstag	54
3.5.3	Vergleich der Zellinteraktion am 13. Inkubationstag	55
3.5.4	Vergleich der Zellinteraktion am 14. Inkubationstag	56
3.6	Immunhistochemie und Enzym-Substrat-Reaktion	57
3.6.1	Ergebnisse der Immunhistochemie sowie der Enzym-Substrat-Reaktion von Zellen der Patient Nr. 1-4	57
3.6.2	Ergebnisse der Immunhistochemie sowie der Enzym-Substrat-Reaktion der medikamentösbehandelten Zellpools	58

4	DISKUSSION	59
4.1	Knochen	59
4.1.1	Aufbau und Organisation	59
4.1.2	Zusammensetzung der Knochensubstanz	60
4.1.3	Turnover und Remodelling	63
4.2	Frakturen und Frakturheilung	65
4.2.1	Allgemeines Prinzip der Frakturheilung	65
4.2.2	Direkte Frakturheilung	65
4.2.3	Indirekte Frakturheilung	66
4.2.4	Einfluss von Geschlecht und Alter auf die Frakturheilung	67
4.3	Verwendete Medikamente und ihre Wirkung auf den Knochenstoffwechsel	70
4.3.1	Diclofenac	70
4.3.2	Ibandronsäure	72
4.3.3	Vancomycin	73
4.4	Auswahl der Patienten	74
4.5	Ergebnisdiskussion	74
4.6	Bewertung der Messmethodik und Ausblick	91
5	ZUSAMMENFASSUNG	93
6	ANHANG	94
6.1	Literaturverzeichnis	94
6.2	Tabellenverzeichnis	119
6.3	Abbildungsverzeichnis	120
6.4	Immunhistochemie/Enzym-Substrat-Reaktion	122
6.5	Danksagung	124
6.6	Lebenslauf	125

Abkürzungsverzeichnis

% = Prozent

AA = Ascorbinsäure

Ak = Antikörper

AP = alkalische Phosphatase

art. = arteriell

BMP = Bone Mineral Protein

BMU = Bone multicellular unit

BP = Bisphosphonate

BPH = Benigne Prostatahyperplasie

BSA = bovine serum albumin

bzw. = beziehungsweise

ca. = circa

chro. = chronisch

cm = Zentimeter

CO₂ = Kohlendioxid

COPD = chronisch obstruktive Lungenerkrankung

DEX = Dexamethason

dH₂O = destilliertes Wasser

DM Typ 2 = Diabetes mellitus Typ 2

DMSO = Dimethylsulfoxid

ECM = Extrazellulärmatrix

FCS = fetales Kälberserum

h = Stunde

H₂O = Wasser

HCl = Salzsäure

HEPES = 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

IGF = Insulin-like growth factor

IHC = immunhistochemische Färbung

IL-6 = Interleukin 6

IS = Intensity score

KHK = koronare Herzerkrankung

Kol I = Kollagen 1

M = Mol

max. = maximal

Med. = Medikamente

Mg = Magnesium

min = Minute

mind. = mindestens

mm² = Quadratmillimeter

MRSA = Methicillin resistenter Staphylococcus aureus

MSC = mesenchymale Stammzellen

n = Anzahl der Messungen

Na = Natrium

NE = Nebenerkrankungsprofil

NSAR = nichtsteroidale Antirheumatika

o.a. = oben aufgeführt

o.g. = oben genannte

OC = Osteocalcin

Pb = Blei

PBS = phosphatgepufferte Salzlösung

PCR = Polymerase-Kettenreaktion

PDMS = Polydimethylsiloxan

PFA = Paraformaldehyd

PP = positive Zellen in Prozent

PTH = Parathormon

RPM = rounds per minute

RT = Raumtemperatur

S = Schwefel

s = Sekunde

Silan = (tridecafluoro-1,1,2,2-tetrahydrooctyl) trichlorosilane

TGF- β = transformierender Wachstumsfaktor

TNF α = Tumornekrosefaktor α

u.a. = und andere

VE = Vorerkrankungen

VHF = Vorhofflimmern

μl = Mikroliter

1 Einleitung

Im klinischen Alltag sind Frakturen eines der häufigsten Krankheitsbilder, die einer medizinischen Therapie bedürfen [Mayer, Siems 2011]. Hierbei ist das primäre Ziel, die Kontinuität des Knochens wieder herzustellen und dadurch eine ausreichende mechanische Belastbarkeit und Schmerzfreiheit für den Patienten zu erreichen [Henne-Bruns 2003]. Dieses primäre Therapieziel wird in 10-20% der Fälle nicht erreicht und es kommt zur verzögerten oder inadäquaten Frakturheilung sowie in schweren Fällen zum vollkommenen Ausbleiben der Abheilung [Einhorn 1996, Court-Brown, McQueen 2008, Hernandez, Do et al. 2012]. Bis heute hat das Thema Frakturheilung in der klinischen und experimentellen Forschung einen hohen Stellenwert. Bisherige Arbeiten konnten zeigen, dass endokrinologische Gegebenheiten sowie höheres Lebensalter einen starken Einfluss auf die Frakturheilung und den Knochenstoffwechsel aufweisen [Gruber, Koch et al. 2006].

Der postmenopausale Abfall der Sexualhormone bedingt nicht nur eine vermehrte Osteoklastenaktivität und damit eine verstärkte Resorption von Knochensubstanz, sondern beeinflusst auch die Frakturheilung negativ [Meyer, Tсахakis et al. 2001, Sowers, Zheng et al. 2010, Khosla, Melton et al. 2011]. Nicht nur die weiblichen sondern auch die männlichen Sexualhormone wie z.B. Testosteron wirken auf den Knochenstoffwechsel [Callewaert, Boonen et al. 2010]. Die Erklärung hierfür findet sich begründet in ähnlichen Strukturformeln der beiden Hormongruppen [Vanderschueren, Vandenput et al. 2004].

Studien aus Japan belegen einen Knochenverlust unter Glukokortikoid-Therapie, da das Medikament die Apoptose von Osteoblasten und Osteozyten induziert und die Lebensdauer der Osteoklasten verlängert [Y. Tanaka 2013].

Dass Knochenmasse und Knochenheilung positiv mit dem Körpergewicht korrelieren, und somit übergewichtige Patienten eine bessere Knochenqualität aufzeigen, wird in der heutigen Literatur diskutiert [Waters, Ward et al. 2013, Ducky 2000, Cohen, Dempster et al. 2013].

Mit einem höherem Lebensalter reduziert sich nicht nur die Knochendichte, was zu vermehrten Frakturen führt, es laufen auch viele für die Regeneration des Knochens wichtige Mechanismen (Differenzierung und Teilungsraten der Osteoblasten, Angiogenese) verzögert oder gestört ab [Lu, Miclau et al. 2005, Stenderup, Justesen et al. 2001]. Diese Feststellungen werden dadurch bestärkt, dass mesenchymale Stammzellen im Alter eher zu Adipozyten als zu Osteoblasten differenzieren und auf diese Weise ein höherer Fettanteil auf Kosten der Knochendichte aufgebaut wird [Nishikawa, Nakashima et al. 2010, Rosen, Ackert-Bicknell et al. 2009, Abdallah, Haack-Sorensen et al. 2006, Stringer, Waddington et al. 2007].

Durch die geringere Anzahl an mesenchymalen Stammzellen wird die Reserve an Osteoblastenvorläuferzellen im Alter deutlich vermindert. Dies könnte eine mögliche Erläuterung für die Versuchsergebnisse von Meyer et al. sein, die heraus fanden, dass bei alten Versuchstieren eine deutlich verzögerte Frakturheilung im Vergleich zu jüngeren Tieren zu beobachten ist [Bergman, Gazit et al. 1996, D'Ippolito, Schiller et al. 1999, Egrise, Martin et al. 1992, Kassem, Marie 2011, Meyer, Tsahakis et al. 2001].

Diese Fakten sind nicht nur für den einzelnen Patienten relevant, sondern auch für das Gesundheitssystem. So korreliert die Liegezeit im Krankenhaus nach Frakturen positiv mit zunehmendem Alter [Gomberg, Gruen et al. 1999, Greatorex 1988]. Die Morbiditätsrate nach einem solchen Ereignis ist deutlich höher bei alten als bei jungen Menschen und die hierdurch entstehenden Kosten belasten die Gesundheitssysteme stark [Nilsson, Edwards 1969, Nieminen, Nurmi et al. 1981, Hee, Wong et al. 2001, Gomberg, Gruen et al. 1999].

Weitere Arbeiten untersuchen ihrerseits die Auswirkungen von Lebensgewohnheiten, Krankheiten, sowie Medikamenten auf die Frakturheilung, hier insbesondere den Einfluss von Diabetes mellitus Typ 1+2, NSAR, Rauchen, Alkoholkonsum, Mangelernährung und Koffeinkonsum [Court-Brown, McQueen 2008, Calori, Albisetti et al. 2007, Buckwalter J A, Einhorn T A et al. 2006, Hallstrom, Melhus et al. 2010, Syed, Ng 2010]. Dabei zeigt sich eine verzögerte Knochenheilung bei Diabetes-Typ 1+2-Patienten sowie bei dauerhafter Einnahme von NSAR [Hernandez, Do et al. 2012]. Der regelmäßige Alkoholkonsum sowie das Rauchen von Zigaretten verursachen bei alten wie bei jungen Patienten gleichermaßen einen vermehrten Knochenverlust und begünstigen somit Frakturen [Cawthon, Harrison et al. 2006, Hunter, Sambrook 2000, Taes, Lapauw et al. 2010, Rodrigues, Caetano-Lopes et al. 2012a]. Zigarettenrauch schädigt die Osteoblasten toxisch, während Ethanol die Differenzierung und Proliferation von Osteoblasten beeinträchtigt und MSC zur Proliferation zu Adipozyten anregt [Maddalozzo, Turner et al. 2009, Akhter, Iwaniec et al. 2003, Gong, Wezeman 2004]. Ferner gibt es Untersuchungen auf zellulärer Ebene, die die Auswirkungen von häufig verwendeten Medikamenten auf Osteoblasten untersuchen und ihre Auswirkung auf Syntheseleistung und Proliferationsrate dokumentieren [Di Az-Rodri Guez, Garci et al. 2011, Ho, Chang et al. 1999, Koch, Yekta et al. 2010, Edin, Miclau et al. 1996, Aslan, Andersen et al. 2012]. Die ubiquitär in der Medizin eingesetzten NSAR zeigen eine Hemmung sowohl der Proliferation als auch des Wachstums von Osteoblasten [Di Az-Rodri Guez, Garci et al. 2011, Ho, Chang et al. 1999]. Bei Bisphosphonaten hingegen zeigt sich allenfalls eine geringe Beeinflussung der Osteoblastenproliferation *in vitro* [Koch, Yekta et al. 2010].

Zusammenfassend können vier Faktoren für eine erfolgreiche Frakturheilung genannt werden. Erstens müssen genug MSC verfügbar sein, die auf ausreichend vorhandene Wachstumshormone und –stimuli adäquat reagieren können. Zweitens dürfen keine zytotoxischen Stoffe die

Osteoblasten behindern. Drittens muss die Lebenserwartung der Zellen ausreichend lang sein und zuletzt sollten genügend Grundsubstrate für den Knochenstoffwechsel vorhanden sein [Kassem, Marie 2011, Marie 1994, Parfitt, Villanueva et al. 1995, Syed, Hoey 2010].

Allerdings finden sich in der Literatur bisher keine Untersuchungen über den Effekt von Alter und Geschlecht auf das Verhalten von Knochenzellen bei der Frakturheilung. Besonders interessant erscheint hierbei die Frage, ob sich zwischen den verschiedenen Zellen Unterschiede in der Zell-Matrix-Interaktion oder in ihrem Differenzierungsverhalten zeigen.

Aus diesem Grund war es das primäre Ziel der vorliegenden Arbeit erstmals zu untersuchen, ob sich Knochenzellen von Patienten unterschiedlichen Alters oder Geschlechts in ihrem Verhalten unterscheiden. Dazu wurde sowohl die verschiedenen Zell-Matrix-Interaktionen bewertet, als auch das Expressionsmuster der Zellprodukte im Rahmen der Osteoblastendifferenzierung untersucht und ein Rückschluss auf deren Stellenwert in der Frakturheilung gezogen.

Als weiterer Aspekt wurde untersucht, inwieweit häufig in der Orthopädie eingesetzte Medikamente primäre humane Osteoblasten in ihren Verhaltensmustern beeinflussen.

Grundlage dieser Untersuchung war die erstmals 2009 von Fernandez et al. entwickelte Methode zur Beurteilung der mechanischen Zellkontraktion und deren mögliche Bedeutung für die Frakturheilung.

2 Materialien und Methoden

2.1 Geräte und Reagenzien

2.1.1 Technische Geräte

+70 °C Backofen	Wagner + Müller (München, Deutschland)
Axiovert 10 Mikroskop	Zeiss (München, Deutschland)
CO ₂ -Inkubator C 150	Binder (Tuttlingen, Deutschland)
Gefrierschrank Liebherr Premium	Liebherr (Biberach, Deutschland)
Hera freeze basic (-80°)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Hera Safe HS12 (Laminar Flow)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Inkubator Hera Cell	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Klimaschrank WTC	Binder (Tuttlingen, Deutschland)
Kühlschrank Liebherr Premium Frost free	Liebherr (Biberach, Deutschland)
Kupferkammer	Sonderanfertigung AG Bausch, Biophysik TUM (München, Deutschland)
Maske Wafer	bvm.maskshop GbR, (Obertshausen, Deutschland)
Mikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss GmbH (Jena, Deutschland)

Mikroskop Observer.Z1	Carl Zeiss GmbH (Jena, Deutschland)
MS2 Minishaker	Ika Works Inc. (Staufen, Deutschland)
Neubauer Zählkammer	Assistant (Sondheim, Deutschland)
Objektträger 76 x 26 mm	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Plasma Cleaner/Sterilizer PDC-32 G	Harrick (Ithaca, NY, USA)
Quecksilberdampfampe	Oriel Instruments (New Port USA)
Rotanata 460 R	Hettich Zentrifugen (Tuttlingen, Deutschland)
Temperaturautoregulation	Sonderanfertigung, AG Bausch, Biophysik TUM, (München, Deutschland)
Typ TKF (Laminar Flow)	BDK Luft- und Reinraumtechnik (Sonnenbühl, Deutschland)
Unisonic Cleaner	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Vakuumglocke	Sonderanfertigung AG Bausch, Biophysik TUM, (München, Deutschland)
Waage Kern PEJ 220-3M	Kern (Balingen, Deutschland)
Wärmeplatten	VWR (Darmstadt, Deutschland)
WS-400 B-6NPP/LITE Spin Coater	Laurell Technologies (North Wales, PA, USA)

XR 125 SM Waage	Precisa (Dietikon, Schweiz)
Z-Axis Piezo Stage and Controller Bundle	Thorlabs (Newton, NJ, USA)
Zentrifuge 5804 R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

2.1.2 Material für die Zellkultur

Alpha Medium	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
BSA lyophilized powder	Sigma (Steinheim, Deutschland)
Cryogefäße	Nalge Nunc International (Rochester, NY, USA)
Dexamethason	Sigma (Steinheim, Deutschland)
DMEM w/o Ca ²⁺ ,	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
DMEM (10x)	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma (Steinheim, Deutschland)
Einmalpinzette	Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland)
Einmalskalpell	Feather Safety Razor Co. (Osaka, Japan)
FCS	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
Hepes-Buffer (1M) in PBS w/o Ca ²⁺ w/oMg ²⁺	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
Nalgene Freezing Container	Sigma (Steinheim, Deutschland)

Kanülen R 0,90 mm x 40 mm, Sterican	Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland)
Klebestreifen	Tesa (Hamburg, Deutschland)
L-Ascorbic acid-2-phosphate	Sigma (Steinheim, Deutschland)
L-Glutamin 200mM low endotoxin	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
MEM-Vitamine	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
Omnifix F Spritzen 1 ml ohne Kanüle	Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland)
Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml 10.000 µg/ml)	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
Petrischalen 100 x 20 mm	Sarstedt (Newtown, NC. USA)
PFA-Pulver	Sigma (Steinheim, Deutschland)
Phosphate buffered saline, pH 7,4	Sigma (Steinheim, Deutschland)
Pipettenspitzen 2 ml/10 ml	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Pipettenspitzen 5 ml/25 ml	BD Labware (Franklin Lakes, NJ; USA)
Pipettierhilfe Easypet	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Sterile PCV-Röhrchen	BD Bioscience (Franklin Lakes, NJ, USA)
Sterile Tischabdeckung	Lohmann & Rauscher (Regensburg, Deutschland)

Trypsin/EDTA Solution
0,05%/0,02% (w/v)

Zellkulturflaschen

Zellkulturobjektträger

Biochrom AG
(Berlin, Deutschland)

BD Biosciences
(Two Oak Park, Bedford,
MA, USA)

Falcon, BD
(Heidelberg, Deutschland)

2.1.3 Medienzusammensetzung

	Grundmedium	Zusätze
Medium 1	Alpha-Medium (mod. MEM w 2.0 g/l NaHCO ₃ , w/o L- Glutamine, w/o Nucleosides)	20% FCS 1% DMEM Vitamine 1% L-Glutamin 0,2% Penicillin/Streptomycin 2% HEPES
Medium 2	DMEM w/o Ca ²⁺ (Dulbeccos modified eagle Medium, w 3,7 g/l NaHCO ₃ , w 1,0 g/l D-Glucose, w/o Glutamine)	10% FCS 1% DMEM Vitamine 1% L-Glutamin 0,2% Penicillin/Streptomycin
Medium 3	DMEM (10x) Flüssigmedium (w/o NaHCO ₃ , w 4,5 g/l D-Glukose, w/o L-Glutamin, w/o Na-Pyruvat)	Keine Zusätze

Tab. 1: Auflistung und Zusammensetzung der verwendeten Medien

2.1.4 Material für die Wafer und PDMS-Kanal-Herstellung

Helmanex II (1-2%)	Hellma Analytics (Mühlheim, Deutschland)
Isopropanol	Carl Roth (Tuttlingen, Deutschland)
Siliciumscheiben	Silicon Materials (Kaufering, Deutschland)
SU8 Entwickler	Microchem's (Newton, MA, USA)
SU8-100 Fotolack	Microchem's (Newton, MA, USA)
Sylgard®184 Silicone Elastomer Kit	Dow Corning (Midland, MI, USA)

2.1.5 Medikamente und Reagenzien

Ibandronsäure 2 mg/2 ml CH: H0361H01 Deutschland)	Roche (Mannheim,
Diclo-CT 75 mg/2 ml Ampulle CH: 259/10	CT Arzneimittel (Berlin, Deutschland)
Pure Col 100 ml 3,0 mg/ml	Inamed Biomaterials (Fremont, CA, USA)
Vancomycin CP 1,0 g CH: K04044	Hikma (Terrugem, Spanien)

2.1.6 Immunhistochemie/Enzym-Substrat-Reaktion

1M Tris-HCl Stocksolution	Sigma (Steinheim, Deutschland)
AEC + High sensitivity substrate chromogen ready to use	Dako (Hamburg, Deutschland)

Antibody Diluent with Background reducing components	Dako (Hamburg, Deutschland)
Aqua dest. Ecotainer	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
Avidin-Biotin-Complex (ABC)	Vector (Burlingame, Kanada)
Brij L23 Solution	Sigma (Steinheim, Deutschland)
Ethanol 70%	Apotheke, Klinikum Rechts der Isar (München, Deutschland)
Ethanol absolut 99,8%	Apotheke, Klinikum Rechts der Isar (München, Deutschland)
Kaisers Glyceringelatine	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Methanol 99,9%	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
NaCl-Tabletten	Sigma (Steinheim, Deutschland)
NBT/BCIP-Tablets	Roche (Mannheim, Deutschland)
Normal Rabbit IgG	PeproTech Inc. (Rocky Hill, USA)
Pepsin	Sigma (Steinheim, Deutschland)
Phosphate buffered saline, pH 7,4	Sigma (Steinheim, Deutschland)
Primärer Collagen Type I Polyclonal Antibody, Rabbit	Quartett (Berlin, Deutschland)
Primärer Osteocalcin-AK	Biotrend (Köln, Deutschland)

Protein Block, Serum free	Dako (Hamburg, Deutschland)
Proteinkinase K 1:1000 aq	Qiagen GmbH (Hilden, Deutschland)
Saures Hämalaun nach Mayer	Apotheke, Klinikum Rechts der Isar (München, Deutschland)
Sekundärer biotinylated Anti-Rabbit IgG (H+L)	Vectors Laboratories (Burlingame, CA, USA)

2.1.7 Software

MS Word

MS Excel

2.2 Patientenmaterial

Das für diese Arbeit verwendete humane Knochengewebe stammte aus dem Operationssaal der Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie (Direktor: Univ.-Prof. Dr. Eisenhart-Rothe) des Klinikum rechts der Isar, München.

Alle verwendeten Knochenfragmente waren überschüssige, nicht mehr verwendbare Spongiosaanteile des Beckenkamms, des Knies oder des Femurkopfes, die im Rahmen korrekativer oder kurativer Operationen gewonnen wurden. Die Entnahme, sowie anonyme Weiterverwendung des Knochengewebes erfolgte nach Einverständniserklärung der jeweiligen Patienten und wurde durch die lokale Ethikkommission Nr. (1307/05) genehmigt.

2.3 Osteoblastenisolierung aus Knochengewebe

Die Kultivierung der Zellen und die Herstellung der benötigten Lösungen fand unter sterilen Bedingungen und Verwendung einer Laminar-Air-Flow-Bank statt.

Alle Zellen wurden unter Standardbedingungen bei 5% CO₂, 95% Luftfeuchtigkeit und einer Temperatur von 37 °C in Begasungsbrutschränken kultiviert. Vor jeder Passagierung fand eine lichtmikroskopische Kontrolle auf Kontamination der Zellen statt.

Kurz vor jeder Verwendung von Kulturmedium 1 oder 2 wurden Ascorbinsäure (250 µl/50 ml) und Dexamethason (10 µl/50 ml) als osteogene Zusätze hinzugefügt, da diese aufgrund ihrer hohen Lichtempfindlichkeit bei -32 °C und Dunkelheit gelagert wurden.

2.3.1 Gewinnung von primären humanen Osteoblasten aus spongiösem Knochengewebe

Die für diese Arbeit verwendete Methode zur Gewinnung von primären Osteoblasten aus Knochenfragmenten wurde nach Gundle et al. modifiziert angewendet [Gundle, Beresford 1995].

Die Knochenproben wurden unter Operationsbedingungen in ein steriles PVC-Röhrchen (50 ml) mit 37 °C warmem Medium 1 gegeben und im Labor direkt weiterverarbeitet.

Ein steriles Operationstuch zur Abdeckung der Arbeitsfläche wurde ausgebreitet um grobe Verunreinigungen der Laminar-Air-Flow-Bank zu verhindern und das Kontaminationsrisiko der Proben zu reduzieren.

Das sich im PVC-Röhrchen befindende Medium-Blut-Gemisch wurde abpipettiert und in eine Kulturflasche (175 cm²) mit Medium 1 und osteogenen Zusätzen überführt, um möglicherweise bereits abgelöste Osteoblasten anzuzüchten.

Die Spongiosa wurde 4 mal mit 20 ml lauwarmen Medium 1 gereinigt und die Spülflüssigkeit in einem separaten PVC-Röhrchen gesammelt. Von Blut und Knochenmarkzellen befreit, wurde die Spongiosa mit einem

Einmalskalpell und einer Einmalpinzette in gleichgroße Chips (3x3x3 mm) zerteilt. Vom gewonnenen Material wurden etwa 10 Chips pro Petrischale ausgesät, mit 30 ml Medium 1 plus osteogene Zusätze bedeckt und in den Brutschrank (37 °C, 5% CO₂, 95% Luftfeuchtigkeit) gegeben.

Die gesammelte Spülflüssigkeit wurde auf ca. 2-3 Flaschen à 175 cm² aufgeteilt und ebenfalls mit den osteogenen Zusätzen ergänzt.

2.3.2 Kultivierung von primären humanen Osteoblasten

Nach zwei Tagen erfolgte eine erste lichtmikroskopische Kontrolle des Zellwachstums, bei der die Wachstumsdichte sowie die Reinheit der Zellkultur beurteilt wurden. Ebenso wurde die Hälfte des Mediums in den Flaschen als auch in den Schalen verworfen und mit derselben Menge Medium 2 ersetzt. Dieses Vorgehen wurde je nach Zelldichte und Wachstumsgeschwindigkeit beliebig häufig wiederholt, wobei lichtmikroskopische Kontrollen zur Vitalitätsprüfung und Kontaminationsfreiheit zweitägig erfolgten.

Nach 3-4 Wochen war meist der gewünschte subkonfluente Zellrasen erreicht und die Zellen konnten weiterverarbeitet werden.

Hierfür wurde das alte Kulturmedium verworfen und die Zellen mit PBS gereinigt, um eine Auswaschung des vorhandenen FCS zu erreichen. Zur Ablösung der Zellen aus den Kulturflaschen/-schalen wurde Trypsin verwendet.

Ca. 5 ml Trypsin wurden pro 175 cm² Flasche hinzugegeben (die Zellen sollten vollständig mit Trypsin bedeckt sein) und 7 min lang bei 37 °C inkubiert. Durch seitliche Schläge auf die Flasche ließen sich noch haftende Zellen vom Boden lösen. Die Zugabe der doppelten Menge FCS-haltigen Mediums 2 stoppte die Trypsinreaktion.

Die gesamte Flüssigkeit wurde in ein PVC-Röhrchen in geeigneter Größe überführt und bei 2500 RPM 10 min lang zentrifugiert. Der Überstand konnte verworfen werden und die Zellen entweder in flüssigem Stickstoff

bei -196 °C eingelagert oder in 25 ml Medium 2/175 cm² Flasche mit 125 µl AA und 5 µl Dex weiterkultiviert werden.

2.3.3 Passagierungsmethode und Bestimmung der Zellzahl

Das gewonnene Zellpellet wurde zuvor mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer ausgezählt und portionsweise in 25 ml Medium 2 auf weitere Kulturflaschen verteilt, um Subpopulationen zu erhalten.

Gefäßart	Zelldichte
175 cm ² Flaschen	80 x 10 ⁴ Zellen
75 cm ² Flaschen	35 x 10 ⁴ Zellen
25 cm ² Flaschen	12 x 10 ⁴ Zellen
chamber slides	1,5 x 10 ⁴ Zellen

Tab. 2: Kultivierungsgefäße mit ihren empfohlenen Zelldichten

Die Trypanblaufärbung ist eine sichere und schnelle Methode, um die Vitalität und Anzahl der Zellen in einer umschriebenen Probe zu ermitteln. Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, der geschädigte Zellmembranen durchdringt und sich intrazellulär an Proteine bindet, die dann im Lichtmikroskop blau erscheinen. Vitale unbeschädigte Zellen hingegen erscheinen als hell-weiße Kugel in blauer Umgebung, da ihre Membran nicht durchlässig ist. Mit Hilfe dieser Methode konnten avitale Zellen selektiv sichtbar gemacht werden und die vitalen schnell mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer quantifiziert werden [Gassen, Schimpf 1999, T. Lindl 2000b].

Dieses Verfahren wurde angewandt, um sicherzustellen, dass gleich viele Zellen pro Versuch benutzt wurden.

Trypsin-Medium-Zell-Mischung und Trypanblau wurden im Verhältnis 1:1 vermengt, ca. 1 min stehen gelassen und anschließend in die Neubauer-Zählkammer eingespritzt.

Die Neubauer-Zählkammer ist eine Glasfläche, in die ein Gitternetz eingefräst ist, und mit einem Deckglas einen definierten Raum von $0,9 \mu\text{l}$ ergibt. Der Raum mit 16×4 Feldern wurde mit Zellsuspension befüllt und die Zellen unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Somit ließ sich später die Anzahl an vitalen Zellen mit Hilfe der folgenden genannten Formel berechnen: Zellkonzentration pro ml = gezählte Zellen $\times 10^4/4 \times 2/2$.

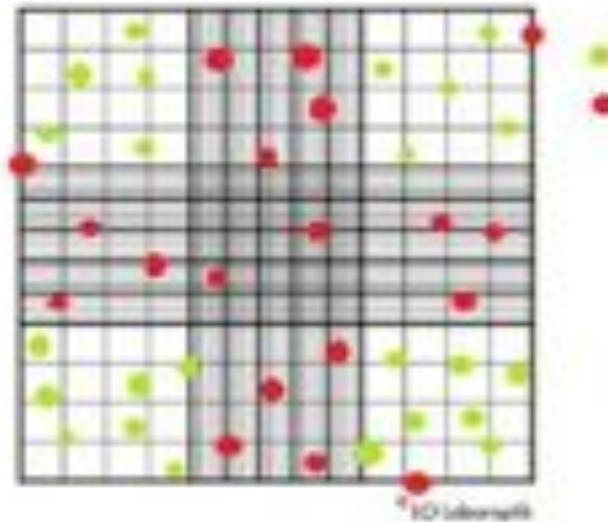


Abb. 1: Neubauerzählkammer: Nur die grün dargestellten Zellen werden in der Formel berücksichtigt; rote Zellen dürfen nicht gezählt werden.

2.3.4 Kryokonservierung

Die Kryokonservierung ist eine geeignete Methode, gewonnene Zellen aufzubewahren und für spätere Versuche in einheitlicher Passage zu konservieren. Bei diesem Verfahren können für die Zelle schädliche Substanzen, wie z.B. Eiskristalle entstehen, was durch die Zugabe von Dimethylsulfoxid (DMSO) verhindert wird [Pomerat, Moorhead 1956, Bouroncle 1965, Murthy 1998].

Das beim Zentrifugieren gewonnene Zellpellet wurde in dem PVC-Röhrchen ohne Überstand auf Eis gelegt; ebenso wurde mit dem leicht angetauten DMSO verfahren. Die Zellen wurden im kalten DMSO resuspendiert (3 Mio. Zellen/300 µl DMSO) und in ein speziell hierfür entwickeltes Kryoröhrchen überführt. Um eine gleichmäßige Abkühlung der Zellen zu erreichen, wurden die Kryoröhrchen in eine Isopropanolbox gestellt und diese bei -80 °C gekühlt. Durch dieses Verfahren wurde eine gleichmäßige und langsame Abkühlung bis auf -80 °C gewährleistet. Nach 2-3 Tagen wurden die Röhrchen in -196 °C kalten flüssigen Stickstoff überführt. In diesem Zustand können die Zellen theoretisch unbegrenzt konserviert werden [Lindl 2000a].

Beim Auftauen der Osteoblasten wurde auf eine rasche Erwärmung im Wasserbad geachtet, um keinen Zellverlust zu verursachen. Die Kryoröhrchen wurden im Wasserbad erwärmt bis nur noch ein kleiner Eiskristall zentral übrig blieb. Die halbgefrorene Lösung wurde sofort in ein mit 5 ml Medium 1 befülltes Röhrchen überführt und mit 2500 RPM 10 min zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes konnte das Zellpellet wie gewohnt weiter verwendet werden.

2.3.5 Zellpool erstellen

Für die weiterführenden Experimente wurden die zuvor einzeln untersuchten Patientenzellen zu einem Zellpool vereinigt, um die Auswirkung von unterschiedlichen Medikamenten zu testen. Hierfür wurden jeweils 500.000 Zellen in Passage 2-3 pro Patient „gepoolt“ und der Pool unter unterschiedlichen Gegebenheiten weiterkultiviert.

Zu diesem Zweck war es wichtig, dass sich alle Zellen in Passage 2 oder 3 befanden, unter gleichen Bedingungen herangezüchtet wurden (Medium, Zusätze, Zelldichte) und in keiner der Spenderzellflaschen eine Kontamination vorlag, die sich dann im gesamten Pool hätte ausbreiten können.

2.3.6 Kultivierung und Fixierung von zellbewachsenen Zellkulturobjektträgern

Für eine spätere immunhistologische Färbung mussten die Zellen auf Zellkulturobjektträgern, sogenannten chamber slides kultiviert werden. Hierbei handelt es sich um Glasobjektträger mit vier isolierten Kammern. In jede Kammer eines Objektträgers wurden 15.000 Zellen mit 1 ml Medium 2 ausgesät und im Brutschrank 2-3 Tage kultiviert. War ein subkonfluenter Zellrasen erreicht (mikroskopische Kontrolle), wurden die Objektträger vom Kammersystem abgelöst, in PBS für ca. 10 min gewaschen und anschließend luftgetrocknet.

Für die anschließende Fixierung der Zellen wurden zwei Lösungen benutzt: PFA für die Kollagen I Färbungen bzw. Alkohol (50% Methanol/50% Ethanol) für die alkalische Phosphatase- und die Osteocalcinfärbung. In diesen Lösungen wurden die Objektträger 10 min inkubiert, bevor sie über Nacht bei Raumluft trockneten. Anschließend konnten die chamber slides bei -32 °C eingefroren oder direkt weiter verwendet werden.

2.3.7 Herstellung der Paraformaldehyd-Lösung (PFA)

16 g des PFA Pulvers wurden in 300 ml 100 °C heißes PBS und 3,5 ml NaOH gegeben und mit Alufolie abgedeckt. Die Lösung wurde anschließend gerührt, bis sich das Pulver vollständig gelöst hatte und in einem Eisbad auf RT abgekühlt. Mit Hilfe von Titration mit HCl ließ sich der pH-Wert auf gewünschte 7,2-7,4 einstellen.

2.3.8 Medikamentenbehandlung des Zellpools

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden die Einflüsse von Diclofenac, Ibandronsäure und Vancomycin auf primäre humane Osteoblasten *in vitro* untersucht. Um *in vivo* Bedingungen zu entsprechen, wurde mit bekannten therapeutischen Plasmakonzentrationen gearbeitet. Die Zellen wurden 14 Tage in Medium 2 mit Medikamentenzusätzen kultiviert. Ein Mediumwechsel

erfolgte alle 4 Tage. Die Messungen wurden an den Tagen 7, 8, 13 sowie 14 durchgeführt.

Medikamente	Zugabe pro 25 ml Medium 2	Konzentration pro ml Medium 2	<i>In vivo</i> Plasmakonzentration
Diclofenac (75 mg/2 ml)	1,5 µl	2,2 µg/ml	2,2 µg/ml *
Ibandronsäure (2 mg/2 ml)	2,225 µl	90 ng/ml	90 ng/ml **
Vancomycin (1000 mg/50 ml)	37,5 µl	30 µg/ml	30 µg/ml ***

Tab. 3: Konzentrationen und Mischungsverhältnisse der verwendeten Medikamente für das Medium 2

* **Diclofenac:** <http://www.pharmazie.com/graphic/A/86/1-23786.pdf> (31.1.2011)

** **Ibandronsäure:** http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/human/000101/WC500053173.pdf (31.1.2011)

*** **Vancomycin:** https://www.gesundheit.gv.at/Portal.Node/ghp/public/content/labor/referenzwerte/Labor_Medikamente_Vancomycin_VANCO.html (31.1.2011)

2.4 Immunhistochemie und Substrat-Enzym-Reaktion

Um sicher zu stellen, dass es sich bei den angezüchteten Zellen um Osteoblasten handelte, wurden die Marker Osteocalcin und Kollagen I immunhistochemisch mittels Avidin-Biotin-Methode nachgewiesen [Hsu, Raine et al. 1981]. Die Enzym alkalische Phosphatase wurde mittels einer Substrat-Enzym-Reaktion nachgewiesen.

Osteocalcin (OC), Kollagen I (Kol I) und alkalische Phosphatase (AP) dienen als Substrate für die Färbung, da sie abhängig vom Reifestadium der Osteoblasten in unterschiedlichen Konzentrationen exprimiert werden [Aubin 1998].

Osteocalcin ist ein 47-50 Aminosäuren großes Protein [Hauschka 1986], das von reifen Osteoblasten [Aubin 1998] in der Phase der Matrixbildung und Mineralisierung stark exprimiert wird und als spezifischer

Osteoblastenmarker anerkannt ist [Aubin 1998, Hauschka 1986, Ducy 2000].

Kollagen I ist kein spezifischer Marker für Knochengewebe, da es in Haut, Sehnen, Bändern und anderen Organen vorkommt [Hees, Sinowatz 2000]. Es ist jedoch das einzige Kollagen, das im Knochen vorkommt [Auf'mkolk, Schwartz 1985, Marie, Lomri et al. 1989].

Durch eine gründliche Reinigung der Spongiosafragmente konnte eine Verunreinigung der Kulturen mit nicht-osteogenem Gewebe nahezu ausgeschlossen werden. Daher wurde Kollagen I in den vorliegenden Untersuchungen als knochenspezifischer Marker gewertet.

Alkalische Phosphatase ist ein Enzym, das bei der Kalzifikation der Knochenmatrix mitwirkt und auf der Zelloberfläche von Osteoblasten exprimiert wird [Swaminathan 2001]. Dieses ist ein anerkannter osteoblastischer Marker und kann sowohl in Vorläuferzellen als auch bei reifen Osteoblasten detektiert werden [Aubin 1998, Coelho, Cabral et al. 2000].

2.4.1 Immunhistochemischer Nachweis von Osteocalcin

Die bei -32 °C eingefrorenen, in Alkohol fixierten chamber slides wurden in der feuchten Kammer für 15 min bei RT erwärmt und anschließend 10 min lang in PBS rehydriert.

Zur Andauung der fixierten Zellen wurde für 20 min Proteinkinase K (1:1000 aq) auf die Objektträger aufgetragen und bei RT inkubiert. Die Andauung konnte durch eine zehnminütige Spülung in PBS gestoppt werden. Der Proteinblock, der 15 min bei RT inkubiert wurde, diente der Unterdrückung der unspezifischen Anfärbung der nicht gewünschten Antigene in einem späteren Schritt der IHC.

Die Anordnung der aufgetragenen Substrate zeigt Tabelle 4.

	Fenster 1	Fenster 2	Fenster 3	Fenster 4
Substrat	Spezifischer AK 1:25	Spezifischer AK 1:25	Unspezifischer AK 1:25	PBS- Probe

Tab. 4: Anordnung der immunhistochemischen Färbungen mit der jeweiligen AK-Verdünnung auf chamber slides

Die spezifischen AK gegen Osteocalcin wurden im Verhältnis 1:25 in Antibody-Diluent verdünnt und 70 µl pro Fenster aufgetragen ohne zwischenzeitliches Waschen. Als Negativ-Kontrolle wurden unspezifische rabbit-IgG in der gleichen Verdünnung verwendet. Die Inkubationszeit betrug zunächst 120 min bei RT, um anschließend bei 4 °C über Nacht abgeschlossen zu werden.

Zur Weiterverarbeitung wurden die Objektträger für eine Stunde auf RT erwärmt bevor die Antikörper mit PBS/Brij für 10 min abgewaschen wurden. Nun wurde der sekundäre Antikörper (Anti-Rabbit-IgG) 1:200 in PBS verdünnt aufgetragen und die Zellen für 30 min bei RT inkubiert.

Der Avidin-Biotin-Komplex (Fertigkit) musste 10 min vor Anwendung frisch angesetzt werden und 30 min auf den Zellen nach nochmaligem Waschen in PBS/Brji inkubieren.

Der AEC-Komplex, dessen Umsetzung des roten Chromogens lichtmikroskopisch kontrolliert wurde, inkubiert 2-10 min auf den Zellen, bis eine ausreichend starke Färbung erzielt wurde. Die Anfärbung wurde abermals mit PBS/Brij abgestoppt.

Zur besseren Differenzierung erfolgte die Anfärbung der Zellkerne mittels Hämalaun. Hierfür wurden die chamber slides 3 min in die Farblösung gegeben und anschließend 30 min unter fließendem Wasser gespült. Zum Schluss wurden die chamber slides mit flüssiger Glyceringelatine betropft und mit einem Deckglas endgültig fixiert.

2.4.2 Immunhistochemischer Nachweis von Kollagen I

Die bei -32 °C gelagerten, in 4% PFA fixierten chamber slides wurden in der feuchten Kammer für 15 min auf RT erwärmt und anschließend 10 min

in PBS rehydriert. Zur Andauung der fixierten Zellen wurde für 70 min Pepsin (5 mg Pepsin/50 ml 0,01M HCl) auf die chamber slides aufgetragen und bei RT inkubiert. Die Andauung wurde durch eine zehnminütige Spülung in PBS gestoppt. Mit dem Proteinblock wurde wie unter 2.4.1 beschrieben verfahren.

Die spezifischen Antikörper für Kollagen I wurden 1:25 in Antibody-Diluent verdünnt und 70 µl pro Fenster aufgetragen. Mit der Negativ-Kontrolle wurde wie unter 2.4.1 verfahren. Die Zellen wurden über Nacht in der feuchten Kammer bei RT ohne zwischenzeitliche Waschung inkubiert.

Das weitere Vorgehen glich dem unter Punkt 2.4.1 beschriebenen Prozedere.

2.4.3 Enzym-Substrat-Reaktion zum Nachweis von alkalischer Phosphatase

Die alkalische Phosphatase wurde direkt durch einen Farbstoff detektiert und angefärbt.

Die wie unter 2.4.1 beschrieben, aufgetauten alkoholfixierten chamber slides wurden für 10 min in Tris-Puffer rehydriert und anschließend mit der Substratlösung (NBT/BCIP Tablette in 10 ml dH₂O) für 30-60 min unter lichtmikroskopischer Kontrolle inkubiert. Bei ausreichender Anfärbung wurde die Reaktion mit Tris-Puffer gestoppt und die chamber slides mit flüssiger Glyceringelatine betropft und mit einem Deckglas endgültig fixiert.

2.4.4 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen sowie der Enzym-Substrat-Reaktion

Die Auswertung der Immunhistochemie erfolgte semiquantitativ nach dem modifizierten immunreaktiven score (IRS) nach Remmele und Stegner, der das Produkt aus der Intensität der Färbungen (Staining Intensity = SI) und die Prozentzahl der positiv angefärbten Zellkerne (positive Prozente = PP) pro Blickfeld berücksichtigt [Remmele, Stegner 1987]. In der

vorliegenden Arbeit wurde nicht die Prozentzahl der positiven Zellkerne, sondern der positiv angefärbten Zellen pro Blickfeld bestimmt.

Die Auswertung erfolgte unter dem Lichtmikroskop bei 10-facher Vergrößerung anhand vier repräsentativer Bildausschnitte.

Der Prozentsatz positiver Zellen wurde wie folgt klassifiziert:

0 = keine positiven Zellen

1 = <10% positive Zellen

2 = 10-50% positive Zellen

3 = 51-80% positive Zellen

4 = > 80% positive Zellen

Die Färbeintensität wurde wie folgt klassifiziert:

0 = keine Färbereaktion

1 = schwache Färbereaktion

2 = mäßige Färbereaktion

3 = starke Färbereaktion

Der IRS kann als Produkt von SI und PP Werte zwischen 0 und 12 erreichen und wurde wie folgt klassifiziert:

0 = keine Expression

1-3 = geringe Expression

4-8 = mäßige Expression

9-12 = starke Expression

2.5 Versuchsaufbau

Zur Untersuchung der Zellinteraktion mit der dreidimensionalen Kollagenmatrix wurden spezielle Mikrokanalsysteme aus PDMS angefertigt. Als Gußform dienten beschichtete Silizium-Wafer. Hierbei

handelt es sich um eine Siliciumscheibe auf der durch speziellen Fotolack ein vorgegebenes Muster kreiert wurde.

Die Kanalsysteme wurden mit einer Kollagen-Zell-Suspension befüllt und bei einer Temperatur von 37 °C 20 h unter einem speziellem Lichtmikroskop mittels einer digitalen Videokamera beobachtet und aufgezeichnet.

2.5.1 Lithographische Herstellung eines Wafers mittels Fotolacks

Die im Folgenden beschriebenen Vorgänge des Lithographieverfahrens wurden modifiziert nach den Protokollen von Sidorova et al. sowie McDonald et al. [Sidorova, Li et al. 2009, McDonald, Duffy et al. 2000].

Zur Herstellung der Gußform für die PDMS-Kanäle wurden Wafer (vorgeschnittene Siliciumscheiben) mit einem strahlungsempfindlichen Lack beschichtet.

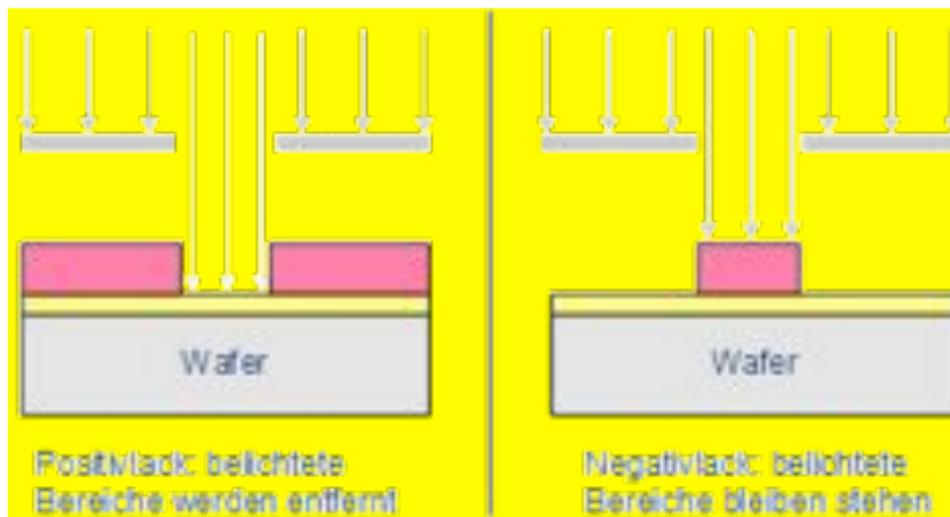


Abb. 2: Prinzip der Lithografie [www.halbleiter.org/litografie]

Der Fotolack besteht aus drei Komponenten: Lösungsmittel, das die Viskosität des Lacks beeinflusst, fotoempfindliche Partikel, die durch eine Quecksilberlampe umstrukturiert werden und Grundharz. In der Lackschicht kann mit Hilfe einer Strukturvorgabe (Maske) und einer Quecksilberlampe ein vorgegebenes Muster geschaffen werden. Durch diese Umstrukturierung können bestimmte Anteile des Lackes aushärten

(Negativlack) oder durch Entwickler vom Wafer gelöst werden (Positivlack). Die im Folgenden beschriebenen Versuche wurden alle mit einem Negativlack durchgeführt.

Die für die Experimente benötigten Wafer wurden aus einer Siliciumscheibe maskengerecht zugeschnitten. Hierbei musste darauf geachtet werden, dass der Glasschneider auf der matten Seite der Scheibe angesetzt wurde, um spätere Unebenheiten zu vermeiden.

Die zugeschnittenen Wafer wurden 30 min in Isopropanol in ein Ultraschallbad gegeben, um alle Fremdpartikel von der Oberfläche zu entfernen.

In dieser Zeit wurde der Arbeitsplatz entstaubt und der Rotationsbeschichter (Spin-Coater) vorbereitet. Es handelt sich hierbei um eine Zentrifuge, die durch Vakuum den Wafer fixiert, wodurch eine gleichmäßige Lackbeschichtung ermöglicht wurde.

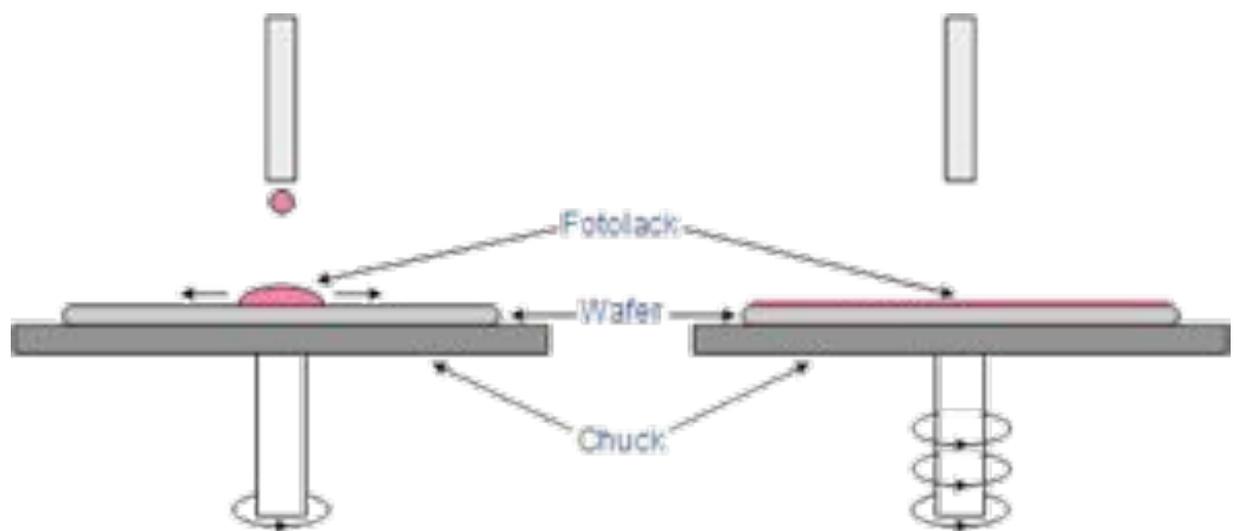


Abb. 3: Herstellung der homogenen Fotolackbeschichtung [www.halbleiter.org/litografie]

Die sauberen Wafer wurden einzeln in den Spin-Coater eingelegt und nochmals mit Isopropanol bei 3000 RPM für 2 x 30 s gewaschen.

Auf die Mitte des Wafers wurde ein dicker Tropfen SU8-100 Fotolack gegeben und ebenfalls mit 3000 RPM 2 x 30 s lang beschleunigt, wodurch eine 100 µm dicke Lackschicht auf dem Wafer entstand. Um

Verunreinigungen oder ungleichmäßig verteilten Lack zu detektieren, musste nach den ersten 30 s eine Sichtkontrolle vorgenommen werden. Bei eventuellen Fehlern wurde der Lack mittels Isopropanol abgewaschen und der Wafer neu beschichtet.

Wurde der Fotolack korrekt aufgetragen, folgte die Phase des „soft baking“, bei der der Wafer stufenweise erhitzt wurde, zuerst 10 min auf 65 °C, dann 30 min auf 95 °C und schließlich wieder 1 min auf 65 °C zum Abkühlen. Durch das Erhitzen verdunstete das Lösungsmittel und der Lack erlangte eine feste Konsistenz.

Die anschließende Belichtung erfolgte mittels einer Quecksilberlampe gemäß der „Kontaktbelichtungsmethode“. Hierbei wurde die Maske direkt mittels einer sauberen Glasscheibe auf den Lack gepresst. So wurden die Strukturen der Maske im Maßstab 1:1 auf den Wafer übertragen.

Zuvor wurde ein Tropfen Glycerin auf den Wafer gegeben, um einen verbesserten Brechungsindex zwischen Maske und Wafer zu erhalten [Chuang, Tseng et al. 2002]. Die Belichtungszeit betrug exakt 8 min und 40 s.

Durch die Belichtung unter der Quecksilber-Dampf-Lampe wurden die Fotoinitiatorsalze im Lack zu einer Säure umgewandelt, die später die Polymerisation induzierte. Einmal polymerisiert, war der Lack irreversibel am Silizium gebunden.

Die Belichtungszeit wurde von der Lackstärke und den Laborbedingungen bestimmt. Durch Unterbelichtung entstanden Risse im Film (ungenügende cross-links); Überbelichtung hingegen verursachte sogenannte T-topplings, was in Unebenheiten im Lack resultierte.

Beim anschließenden „post exposure baking“, bei dem der Wafer erneut für 30 min auf 65 °C erhitzt wurde, kam es zur Ausbildung der irreversiblen cross-links im Lack.

Im letzten Schritt, der sogenannten Entwicklung, wurde der überschüssige Lack mit zweifachem Inkubieren für 10 min in MicroChem's SU-8 Developer entfernt. Unentwickelte Stellen im Lack konnten durch

Isopropanol sichtbar gemacht werden (weißer Schleier) und mussten erneut entwickelt werden. Die Entwicklungszeiten wurden an die Lackstärke angepasst.

Die Qualität des Wafers wurde mithilfe eines Auflichtmikroskops geprüft, wobei jede einzelne Fotolackstruktur auf Genauigkeit der Kanten und Durchgängigkeit der Kanäle geprüft wurde. Bei Rissbildung oder Ablösungen des Lacks wurden „post exposure bake“-Länge und Belichtungszeiten dementsprechend angepasst.

Um später eine zu starke Haftung zwischen PDMS und Fotolack zu verhindern, wurden die Wafer 30 min im Vakuum mit Silan behandelt [Weibel, Kruithof et al. 2005].

2.5.2 PDMS-Kanal-Herstellung

PDMS (polydimethylsiloxane) ist ein geruchloses, farbloses, hydrophobes, ungiftiges und inertes Silikon. Die letztgenannte Eigenschaft war für den Einsatz in dieser Arbeit ausschlaggebend, da auf diese Weise keine Wechselwirkungen mit dem Kollagen, den Zellen oder der Wasserumgebung zu erwarten waren.

Aus dem Sylgard®184 Silicone Elastomer Kit wurden Sylgard und Silicon Elaston Base im Verhältnis 10:1 vermengt und anschließend zur Entgasung 20 min unter die Vakuumblocke gestellt.

Die luftblasenfreie Menge wurde über die parallel liegenden Wafer in eine große Petrischale gegeben bis die Wafer vollständig bedeckt waren. Die Dicke des Silikons sollte 0,5 bis 0,8 mm betragen. Die Petrischale wurde ebenfalls ca. 20 min entgast und anschließend über Nacht zum Aushärten in den 70 °C heißen Backofen gegeben.

Mit einem scharfen Skalpell und tangentialer Krafteinwirkung wurden vorsichtig die einzelnen Kanalblöcke aus der Masse herausgeschnitten und an den Enden der Mikrokanäle jeweils 1 mm große Löcher hineingestanz, ohne dabei die Kanalstrukturen im PDMS zu verletzen. Um ein geschlossenes Kanalsystem zu erhalten wurden Glasobjektträger

je nach PDMS-Kanalsystemgröße zugeschnitten und dienten später als Boden der Mikrokanäle.

Im nächsten Schritt wurden die zugeschnittenen Glasobjektträger sowie die Silikon-Kanäle mit Helmanex gereinigt und getrocknet.

Die PDMS-Kanäle wurden durch das Verfahren „Plasma cleaning“ irreversibel an die Glasobjektträger gebunden, so dass zwischen PDMS und dem Glas Mikrokanäle mit jeweils einem Stanzloch an jeder Seite entstanden [Brent, Steinbock 2003].

Die Lagerung der fertigen Mikrokanäle erfolgte im 70 °C Backofen.

2.6 Versuchsdurchführung

2.6.1 Herstellung des Kollagens

Bei der Herstellung des Kollagens wurde auf eine besonders präzise Vorgehensweise geachtet, da bereits geringe Abweichungen der pH-Werte oder Temperatur zu unterschiedlicher Fibrillenausbildung führen konnten. Aus diesem Grund mussten die Lösungen für jeden Versuchstag frisch angesetzt werden [Sung, Su et al. 2009]. Für einen Versuch mit einem PDMS-Kanal-System wurde ca. 1 ml Kollagenlösung benötigt.

Das Kollagen setzte sich zusammen aus 80% PureCol-Rinderkollagen, 1% Penicillin/Streptomycin und 5% FCS. Zur Neutralisation wurden 2% HEPES und 2% NaOH 1M zugegeben; 10% von Medium 3 lieferten genügend Nährstoffe während des Versuches. Das Kollagengemisch wurde für 60 min bei 4 °C gelagert, um eine optimale Fibrillenstruktur zu erhalten [Sung, Su et al. 2009]. Der Lösung wurden 6 µm durchmessende kollagenbeschichtete Latexkugeln zum „Tracking“ sowie Größenvergleich hinzugefügt [Fernandez, Bausch 2009].

2.6.2 Vorbehandlung und Befüllung der PDMS-Kanäle

Die fertigen PDMS-Mikrokanäle wurden 2 h vor Versuchsbeginn auf RT gebracht und erneut auf Verunreinigungen überprüft. Eine BSA-

Beschichtung der Kanäle verhinderte starke Anhaftungen von Kollagen am PDMS. Diesen Vorgang bezeichnet man als Passivierung.

Jeder einzelne Kanal wurde 20 min lang mit BSA bei 37 °C passiviert und anschließend mit PBS einzeln durchgespült. Um eine Verdampfung der BSA-Lösung zu verhindern, wurden die Öffnungen der Mikrokanäle mit einem Klebestreifen abgedichtet und der Objektträger in eine Petrischale mit 37 °C warmem destilliertem Wasser gelegt.

Die zu untersuchenden Zellen wurden wie gewohnt abtrypsiniert, das gewonnene Zellpellet in 500 µl PBS resuspendiert und abermals bei 6000 RPM zentrifugiert.

Zellen und Kollagen wurden in einer Konzentration von 300.000 Zellen/270 µl Kollagenmischung vorsichtig vermengt ohne dass Luftblasen im Kollagen entstanden, da diese sich bei Wärmezufuhr ausdehnen konnten und eine korrekte Aufzeichnung somit verhindert wurde.

Mit einer 1 ml Spritze wurde die Zell-Kollagen-Mischung aufgezogen und mit einer 0,9 mm durchmessende Kanüle langsam und stetig in die Kanäle eingespritzt. Bei zufriedenstellender lichtmikroskopischer Kontrolle (gute Zellverteilung, keine Fremdkörper, keine Luftblasen) wurden die Stanzlöcher an beiden Enden der Kanäle mit einem Klebestreifen luftdicht verschlossen.

2.6.3 Computergestützte mikroskopische Aufzeichnung

Vor Versuchsbeginn musste stets die Funktionalität des Versuchsaufbaus überprüft werden um technische Probleme im Vorfeld zu beseitigen. Sobald die Zell-Kollagen-Mischung einen Temperatur von 37 °C erreichte wurde die Aufzeichnung gestartet [Sung, Su et al. 2009]. Eine Unterbrechung der Gelpolymerisation war nicht möglich.

Der verwendete Verschiebetisch war mit einer Wärmekammer aus Kupfer versehen, die für eine konstante Temperatur von 37 °C während des gesamten Versuchs sorgte. Eine Fensterung im Boden und im Deckel der Kammer (0,8 x 2,5 cm) ermöglichte eine mikroskopische Aufzeichnung der

in der Kammer fixierten PDMS-Kanäle. Bei der Fixierung (durch Klebestreifen) war die parallele Ausrichtung zur horizontalen Kupferwand entscheidend, so dass die im Folgenden eingestellte Kameraeinstellung den gewünschten Kanalabschnitt zentral erfassen konnte.

Die Kammer wurde nun fest verschlossen und der Innenraum mit H₂O (5% CO₂, 37 °C) befüllt. Das Wasser versorgte die Zellen während der zwanzigstündigen Versuchsdauer mit ausreichend Sauerstoff und sorgte für die gewünschte Wärmeübertragung.

Im Anschluss wurde mit Hilfe des Computerprogramms die aktuelle Position des Tisches ermittelt. Davon abhängig wurden die Koordinaten für die gewünschten Messungen eingegeben, wobei beachtet werden musste, dass die Messstellen auf der y-Achse mind. 0,5 cm auseinander lagen, um Dehnungseffekte einer anderen Kollagenstelle auszuschließen. Bei den Messungen handelte es sich um mikroskopische Fotografien von verschiedenen Messpunkten in den PDMS-Kanälen zur Aufzeichnung der Zellinteraktion mit der sie umgebenden Kollagenmatrix.

Im letzten Schritt mussten die Zeit für den Gesamtversuch, sowie die Häufigkeit der Bilder der einzelnen Messpunkte festgelegt werden.

Alle Versuche wurden über 20 h durchgeführt und jede Position alle 15 Sekunden fotografiert. Pro Mikrokanal (Gesamtlänge 2 cm) wurden 3 Positionen beobachtet.

2.6.4 Auswertung der Aufzeichnungen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Kollagenbreiten zu den jeweiligen Zeitpunkten gemessen und hieraus eine Restkollagenbreite in % errechnet (Startwert 100%). Die jeweilige Breite wurde in Pixeln ausgemessen und durch den Ausgangswert dividiert um eine Vergleichbarkeit der Messungen zu erreichen.

Zur Auswertung wurden die Bilder nach 0, 2, 4, 10 und 20 h verwendet. Der Messpunkt 0 diente hierbei als Ausgangswert. Der Messpunkt nach 2

h wurde gewählt, da nach Sung et al. zu diesem Zeitpunkt das Kollagennetzwerk vollständig ausgebildet vorlag [Sung, Su et al. 2009].

Vorversuche zeigten, dass Stunde 4 und 10 die größten Veränderungen in der Kollagen-Zellinteraktion aufwiesen und somit eine hohe Aussagekraft besaßen.

Die Zell-Kollagenmatrix erreichte bei ca. 15-30% Restkollagenbreite ihren Endwert; eine weitere Kontraktion war aus räumlichen Gegebenheiten nicht mehr möglich. Da dieser Zustand nach 20 h sicher bei allen Versuchen erreicht wurde, diente dieser Messzeitpunkt als Versuchsendpunkt.

Die Diagramme zeigen die Mittelwerte und ihre Standardabweichung; die Anzahl der einzelnen Messungen wurde in den jeweiligen Diagrammen angegeben. Für die tabellarische und graphische Darstellung der Daten wurde das Programm MS Excel 2008 verwendet.

2.7 Vorversuche

Im Vorfeld dieser Arbeit wurden Experimente mit den Patientenzellen unternommen um die optimalen Rahmenbedingungen für die darauffolgenden Untersuchungen herauszufinden. Es galt, eine bestmögliche Zellverteilung in den Mikrokanälen sowie die ideale Kollagenkonzentration und -struktur zu erzielen, um möglichst aussagekräftige Resultate zu erhalten. Ebenso legten wir in diesen ersten Vorversuchen die Messzeitpunkte fest.

Der Versuchsaufbau erfolgte wie o.a. mit Abweichungen in der verwendeten Zellzahl sowie der Kollagenkonzentration in der Versuchslösung.

Um die optimale Zellzahl zu ermitteln fügten wir 100.000, 200.000, 300.000, 400.000 sowie 500.000 Zellen pro 270 µl Kollagenlösung hinzu und untersuchten die Zellverteilung in den Kanälen mikroskopisch.

Zur Feststellung der geeigneten Kollagenkonzentration in der Lösung verwendeten wir 80%ige sowie 40%ige (40% Kollagen, 10% DMEM, 4Hepes, 2NaOH, 1% Pen/Strep, 43% Serum) Kollagenlösungen und verglichen ihre Kontraktionsraten über 20 h.

3 Ergebnisse

3.1 Patientengut

Patient Nr. 1	Geschlecht: weiblich Alter: 18 Jahre NE: keine Med.: orales Antikontrazeptivum Entnahmeort: Beckenkamm
Patient Nr. 2	Geschlecht: weiblich Alter: 66 Jahre NE: DM Typ2, Hyperlipidämie, Adipositas, chro. VHF, KHK, art. Hypertonie, Hypothyreose Med.: Torasemid, Ramipril, Digitoxin, Bisoprolol, Phenprocoumon, L-Thyroxin, Insulin, Spironolacton, Metformin Entnahmeort: Femurkondyle
Patient Nr. 3	Geschlecht: männlich Alter: 28 Jahre NE: keine Med.: keine Entnahmeort: Beckenkamm
Patient Nr. 4	Geschlecht: männlich Alter: 64 Jahre NE: art. Hypertonie, Dyslipoproteinämie, Adipositas, BPH, Nephrolithiasis, COPD, Niereninsuffizienz Med.: Triamteren, Hydrocholothiazid, Tenofibrat Entnahmeort: Hüftkopf

Tab. 5: Patientendaten mit Angaben zu Geschlecht, Alter, Nebenerkrankungsprofil (NE), Medikamenten sowie Entnahmestelle

3.2 Vorversuche

Die Vorversuche zur Bestimmung des Kollagengehalts in der verwendeten Lösung zeigten, dass bei einer 80%igen Kollagenmischung die messbaren Unterschiede graduierter als in einer 40%igen Matrix waren, da bei der verdünnten Versuchsreihe bereits nach 2 h das Kollagen um 20-40% kontrahiert und somit die weitere Aussagekraft eingeschränkt war (vgl. Abb. 3.2). Die von Fernandez et al. eingesetzten Latexkugeln dienten in ihrer Arbeit von 2009 dem „Tracking“ der Zellen und der Darstellung der Kollagenbewegung [Fernandez, Bausch 2009, Sawhney, Howard 2002]. In unseren Voruntersuchungen zeigte sich, dass die Latexkugeln von den primären humanen Osteoblasten phagozytiert wurden und somit kein „Tracking“ mehr erfolgen konnte. Um einen einheitlichen Versuchsaufbau zu erhalten und eine veränderte Kollagenpolymerisation zu vermeiden wurden die Kugeln trotzdem allen weiteren Untersuchungen beigelegt.

Zur Beurteilung der verwendeten Zellzahl wurden die Kriterien Zellverteilung, Zellclusterbildung sowie Zell-Zell-Interaktion verwendet. Bei zu wenigen Zellen im untersuchten Bildausschnitt durchwanderten die Zellen das Kollagen um Kontakt zu weiteren Zellen zu suchen und verließen dadurch teilweise den Bildausschnitt. Somit konnte keine oder kaum eine Interaktion beobachtet werden. Zu viele Zellen pro Bildausschnitt verursachten eine Clusterbildung, weshalb eine sinnvolle Auswertung der Kollageninteraktion nicht erfolgen konnte. Ebenso zeigte sich, dass in Medium 2 zentrifugierte Zellen eine sehr hohe Clusterbildungstendenz aufwiesen, die durch wiederholtes Zentrifugieren in PBS zugunsten einer besseren Zellverteilung in den PDMS-Kanälen deutlich minimiert werden konnte. Dies vermag am geringeren Elektrolytgehalt in PBS liegen.

Für 300.000 Zellen/270 µl Kollagenlösung erreichten wir eine homogene Zellverteilung ohne starke Clusterbildung, so dass alle weiteren Versuche mit dieser Zellzahl erfolgten.

3.2.1 Verdünnungsversuch Patient Nr. 1

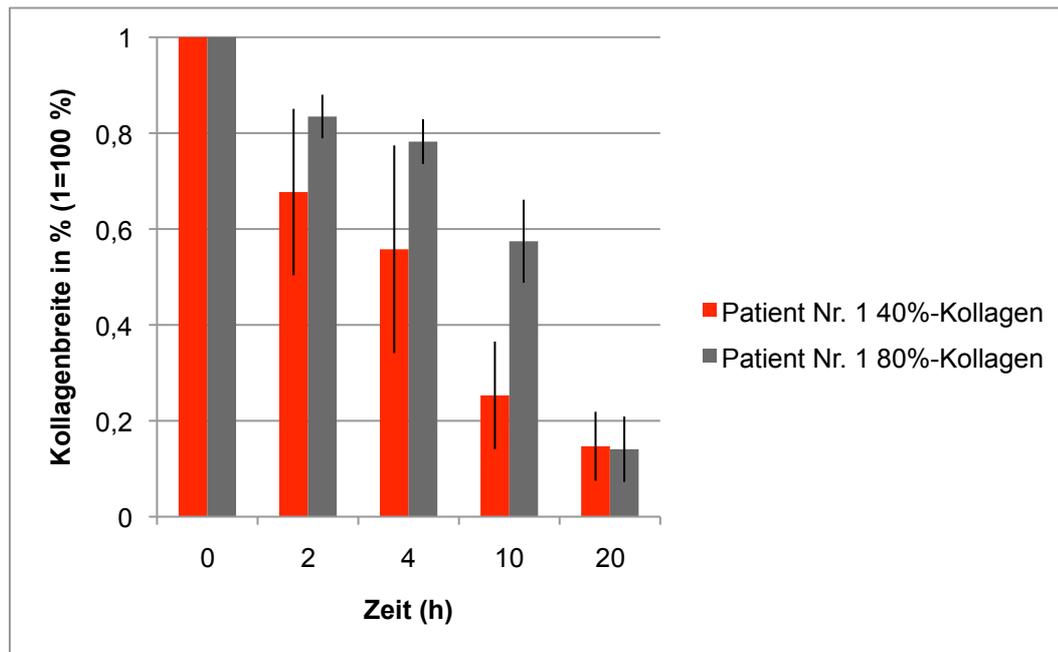


Abb. 4: Vergleich von Patient Nr. 1 in Matrizen mit 40%- und 80%igem Kollagen über einen Zeitraum von 20 h (n=6 pro Messung)

Alle im Folgenden beschriebenen Versuche wiesen zur h 0 eine Kollagenbreite von 100% auf. Dies zeigte, dass die verwendeten Kanäle zu Beginn der Messung gleichmäßig mit der Zell-Kollagen-Mischung ausgefüllt waren.

Der Versuch mit Zellen des Patienten Nr. 1 im verdünntem Kollagen ergab in den Messpunkten nach 2, 4 und 10 h eine Kollagenbreite, die im Durchschnitt um 23% niedriger war als im Vergleichsversuch mit 80%igem Kollagen. Nach 2 h wurde ein Unterschied von 13% gemessen, nach 10 h betrug der Unterschied 32%. Beim letzten Messpunkt erreichten beide Gruppen einen gemeinsamen Endwert (14% Restkollagenbreite).

3.2.2 Verdünnungsversuch Patient Nr. 2

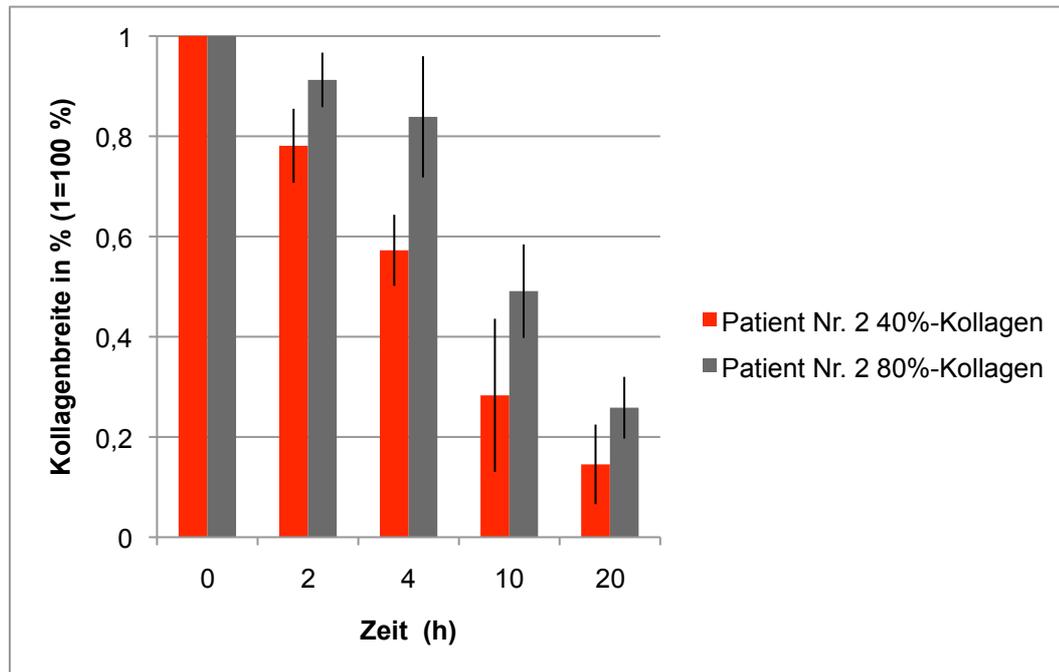


Abb. 5: Vergleich von Patient Nr. 2 in Matrizen mit 40%- und 80%igem Kollagen über einen Zeitraum von 20 h (n=6 pro Messung)

Bei Patient Nr. 2 zeigte sich im Mittel für die Messpunkte nach 2, 4 und 10 h ein Unterschied von durchschnittlich 20% in der Kollagenbreite, wobei auch hier nach 2 h die geringsten Kontraktionsunterschiede mit 13% gemessen wurden. Die Messungen nach 4 und 10 h mit 26% und 21% wiesen die größten Unterschiede auf. Dieser Versuch erreichte keinen gemeinsamen Endpunkt, so dass nach 20 h ein Kontraktionsunterschied von 11% gemessen wurde.

3.2.3 Verdünnungsversuch Patient Nr. 3

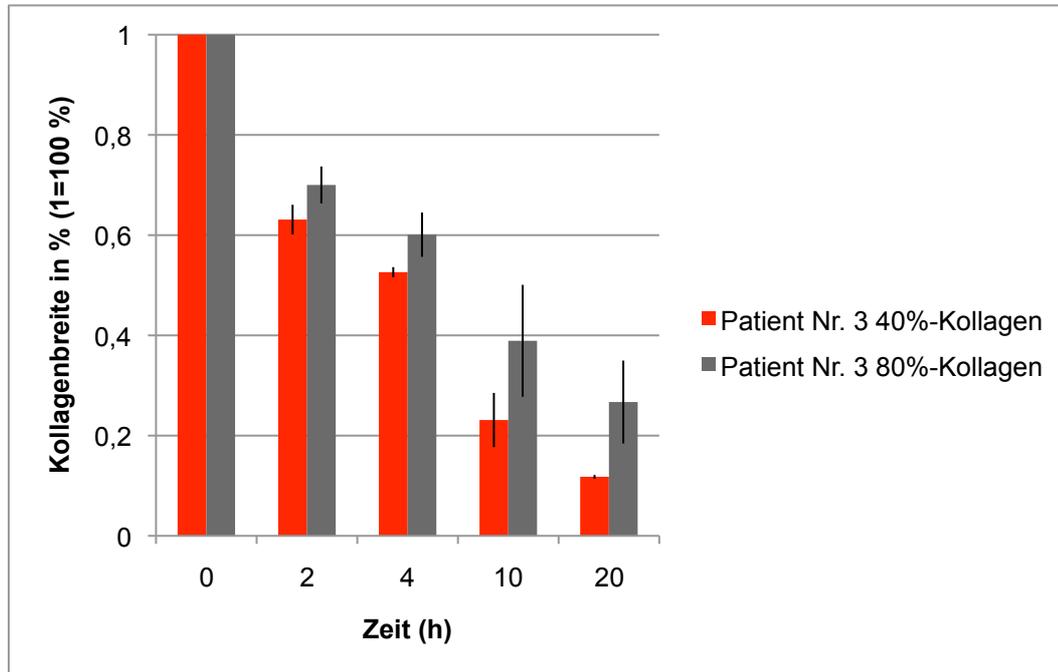


Abb. 6: Vergleich von Patient Nr. 3 in Matrizen mit 40%- und 80%igem Kollagen über einen Zeitraum von 20 h (n=3 für 40%; n=6 für 80%)

Bei Patient Nr. 3 zeigte sich im Mittel für die Messpunkte nach 2 und 4 h ein Unterschied von durchschnittlich 7,5% in der Kollagenbreite, die Zeitpunkte nach 10 und 20 h wiesen die doppelte Differenz auf. In dieser Graphik war der unterschiedliche Endpunkt deutlich messbar und betrug 15%.

3.2.4 Verdünnungsversuch Patient Nr. 4

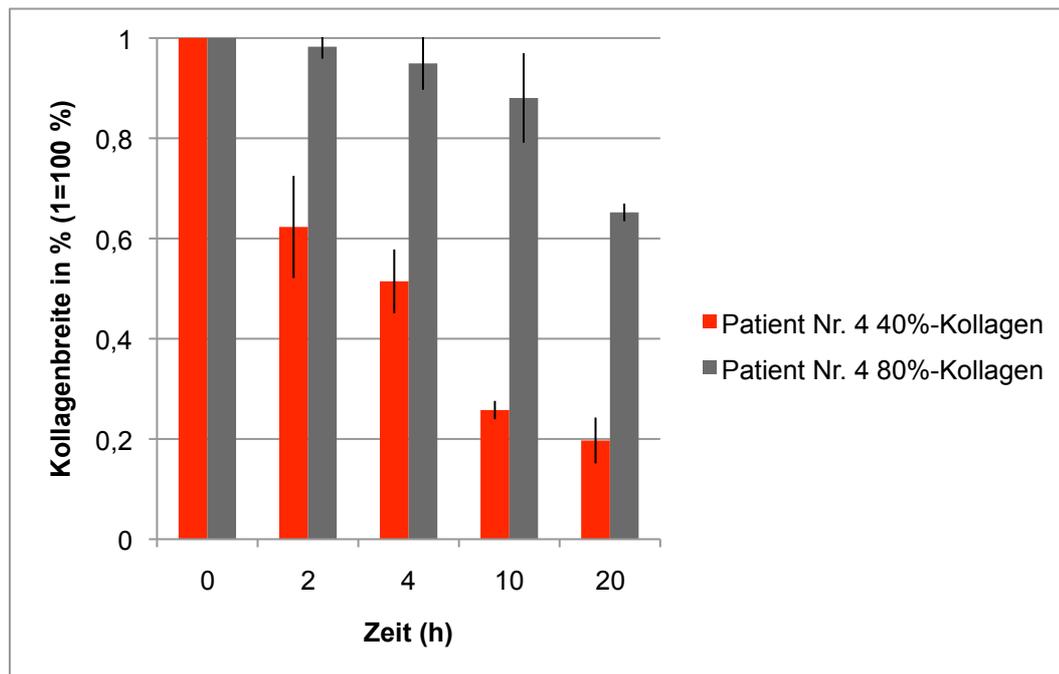


Abb. 7: Vergleich von Patient Nr. 4 in Matrizen mit 40%- und 80%igem Kollagen über einen Zeitraum von 20 h (n=3 pro Messung)

Bei Patient Nr. 4 zeigte sich eine deutliche Differenz zwischen der 40%igen und der 80%igen Kollagenlösung. Diese lag für die Messpunkte nach 2,4,10 und 20 h im Mittel bei 47%. Die größte Differenz war nach 10 h zu messen mit 63%. Am Endpunkt nach 20 h lag die Breite noch bei 65% des Ursprungswerts und damit 46% über dem des 40%igen Kollagennetzwerks.

3.3 Vergleich der einzelnen Patienten zwischen Passage 2-9

Abb. 9 zeigt die Mittelwerte der in 3.2 verwendeten Patientenzellen mit den dazugehörigen Standardabweichungen, die über mehrere Passagen hinweg beobachtet wurden. Patient Nr. 1 wurde in den Passagen 3 bis 9 verwendet und es konnten 48 Einzelmessungen für die Auswertung berücksichtigt werden. Die Mittelwerte für Patient Nr. 2 errechneten sich aus 45 Einzelmessungen zwischen Passage 3 und 5. Patient Nr. 3 und Patient Nr. 4 wurden jeweils in den Passagen 2 bis 4 untersucht; hierbei konnten 25 bzw. 27 Einzelmessungen einbezogen werden

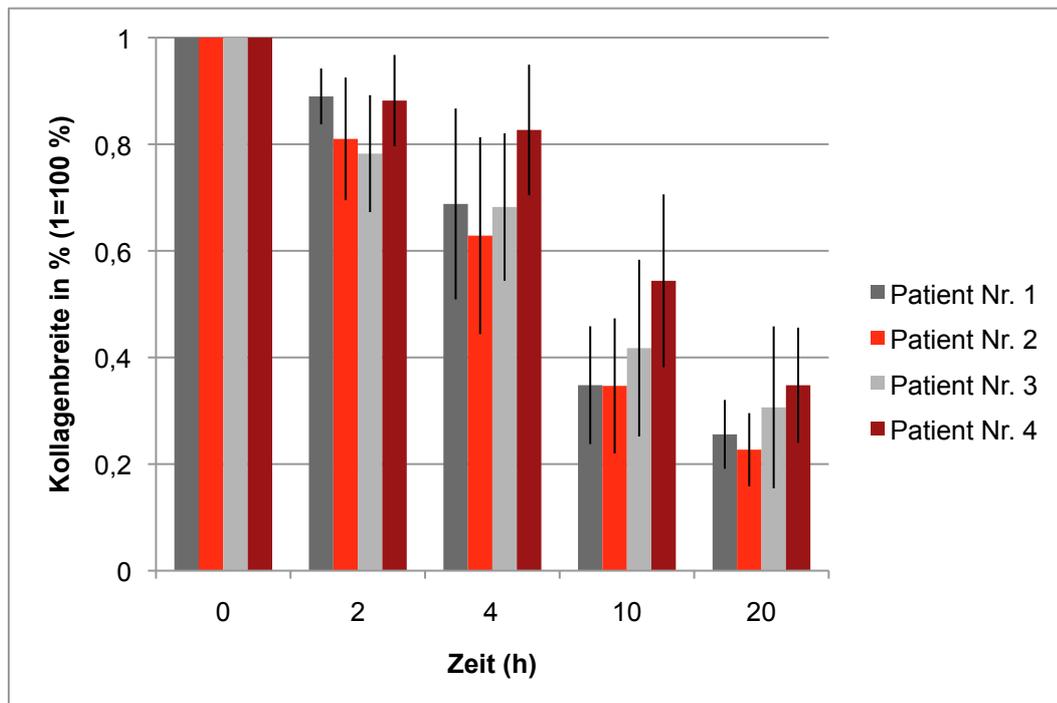


Abb. 8: Vergleich der Kollagenbreiten von unterschiedlichen Patienten in einer 80%igen Kollagenmatrix gemittelt aus mehreren Passagen (2-9), dargestellt in Prozent

Patient Nr. 1 zeigte nach 2 h eine Verringerung der Kollagenbreite um 12% und nach 4 h um weitere 20% auf 68%. Dieser Wert konnte zum nächsten Messpunkt hin um die Hälfte weiter reduziert werden und erreichte eine Endbreite von 25%.

Patient Nr. 2 zeigte in den ersten beiden Messpunkten eine starke Interaktion mit der Matrix (2 h = 80%, 4 h = 62%). Diese wurde zum nächsten Messpunkt um die Hälfte reduziert und erreichte eine Endbreite von 22%.

Die stärkste Anfangskontraktion erzielte Patient Nr. 3 mit 78% der ursprünglichen Kollagenbreite, wobei nach 4 h nur weitere 10% kontrahiert werden konnten. In den beiden letzten Messpunkten verzeichnete Patient Nr. 3 zwischen 5-8% geringere Kontraktionen im Vergleich zu Patient Nr.1 und 2.

Von allen gemessenen Werten waren im Verlauf die geringsten Kontraktionsbreiten bei Patient Nr. 4 zu beobachten. Nach 2 h glichen sich die Patienten Nr. 1 und Nr. 4 in ihrer Kollagenbreite, nach 4 h wurde jedoch bereits eine Differenz von 14% messbar, die bis zum vierten Messpunkt auf 20% anwuchs. Im Endpunkt lag die Restkollagenbreite bei 34% und somit nur 4% hinter der Messung von Patient Nr. 3.

3.4 Vergleich der einzelnen Patienten in Passage 4

In Abb. 9 wurden die Werte der einzelnen Patienten in der vierten Passage exemplarisch aufgeführt, um eine direkte Vergleichbarkeit zwischen dem Zellalter zu erreichen. Passage 4 wurde gewählt, da für alle verwendeten Patienten in dieser Passage Ergebnisse vorlagen. Hierbei konnten die Ergebnisse aus 3.3 bestätigt werden und auch die Streuung der Werte entsprach derjenigen aus Abb. 8.

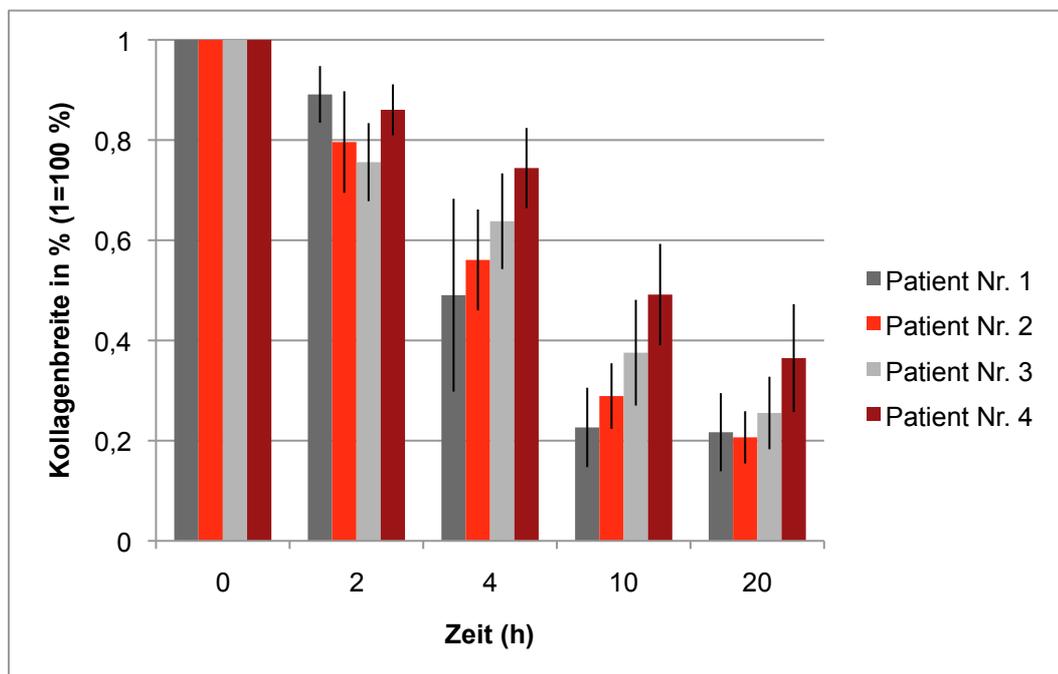


Abb. 9: Vergleich der vier Patienten in der vierten Passage in einer 80%igen Kollagenmatrix (n=15, n=18, n=12, n=9), dargestellt in Prozent

Wie bereits die Kollektivgraphik (Abb. 8) zeigte, wies Patient Nr. 1 die geringste Anfangskontraktion auf, die aber im Verlauf deutlich stärker wurde und im Endpunkt eine Breite von 20% erreichte. Für Patient Nr. 2 und Patient Nr. 3 zeigte die Graphik Kontraktionsraten die mit denjenigen aus Abb. 8 vergleichbar waren. Wie bereits in Punkt 3.3 besprochen verzeichnetet Patient Nr. 4 die geringste Zell-Matrix-Interaktion über den gemessenen Zeitraum.

3.5 Ergebnisse der medikamentenbehandelten Zellpools

Im Folgendem Abschnitt dieser Arbeit wurden die Auswirkungen von drei in der Orthopädie häufig verwendeten Medikamente und unterschiedliche Inkubationszeiten der Medikamente auf die Zell-Matrix-Interaktion gemessen. Hierfür wurden zu 1 ml Medium 2 entweder 2,2 µg Diclofenac, 90 ng Ibandronsäure oder 30 µg Vancomycin hinzugefügt und der Zellpool für insgesamt 14 Tage inkubiert. Gemessen wurde die Interaktion am 7., 8., 13. sowie 14. Tag nach Zugabe der Medikamente. Zur Kontrolle dienten Zellen die nicht medikamentös behandelt wurden.

Um eine Untersuchung der zeitlichen Komponente zu ermöglichen, waren die Messpunkte der Untersuchung ursprünglich für den 7. und 14. Tag nach Beginn der Medikamentenbehandlung angesetzt. Nachdem am Tag 7 anfangs bis zur Stunde 10 kaum eine Kontraktion messbar war entschieden wir uns für eine erneute Messung am 8. Tag. Ebenso war es uns wichtig auch für Tag 14 eine zusätzliche Kontrolle durchzuführen und entschieden uns für den 13. Tag.

3.5.1 Vergleich der Zellinteraktion am 7. Inkubationstag

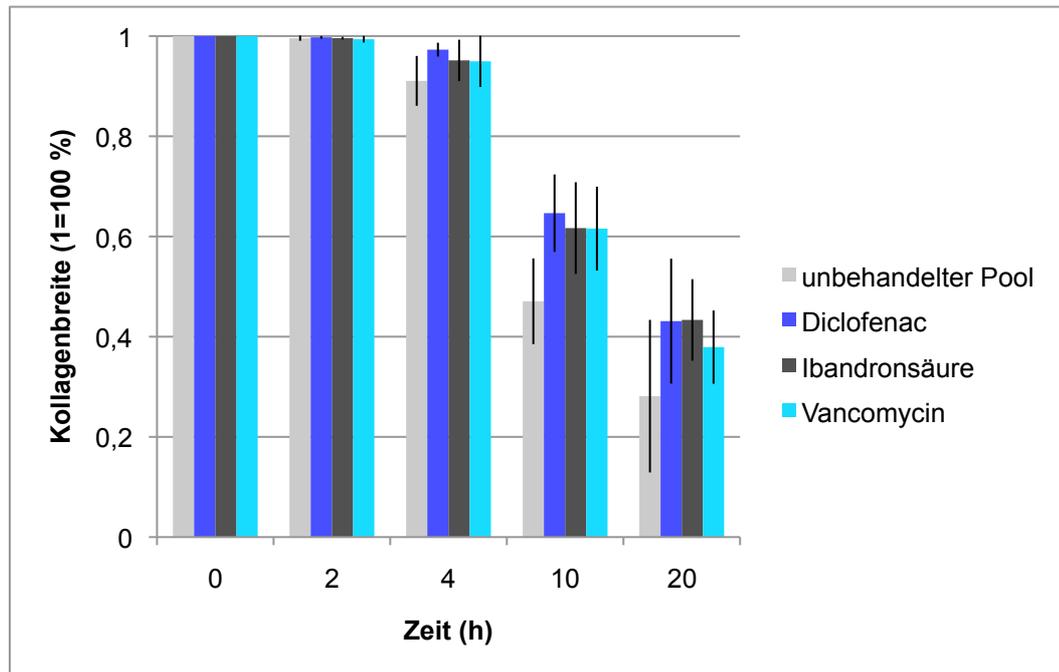


Abb. 10: Zellpool unter dem Einfluss verschiedener Medikamente im Vergleich zu unbehandelten Zellen am Tag 7 der Inkubationszeit (n=6, n=12, n=6, n=6), dargestellt in Prozent

In den ersten drei Messpunkten konnten keine wesentlichen Unterschiede zwischen den vier Gruppen gemessen werden. Nach 4 h verzeichnete die unbehandelte Gruppe eine Differenz in der Kollagenbreite von 3-6% im Vergleich zu den anderen Gruppen. Diese Differenz konnte nach 10 und 20 h verzweifacht werden, so dass die Kontrollgruppe eine Endbreite von 28% erreichte wohingegen die Medikamentenzellen lediglich ca. 40% erreichten.

3.5.2 Vergleich der Zellinteraktion am 8. Inkubationstag

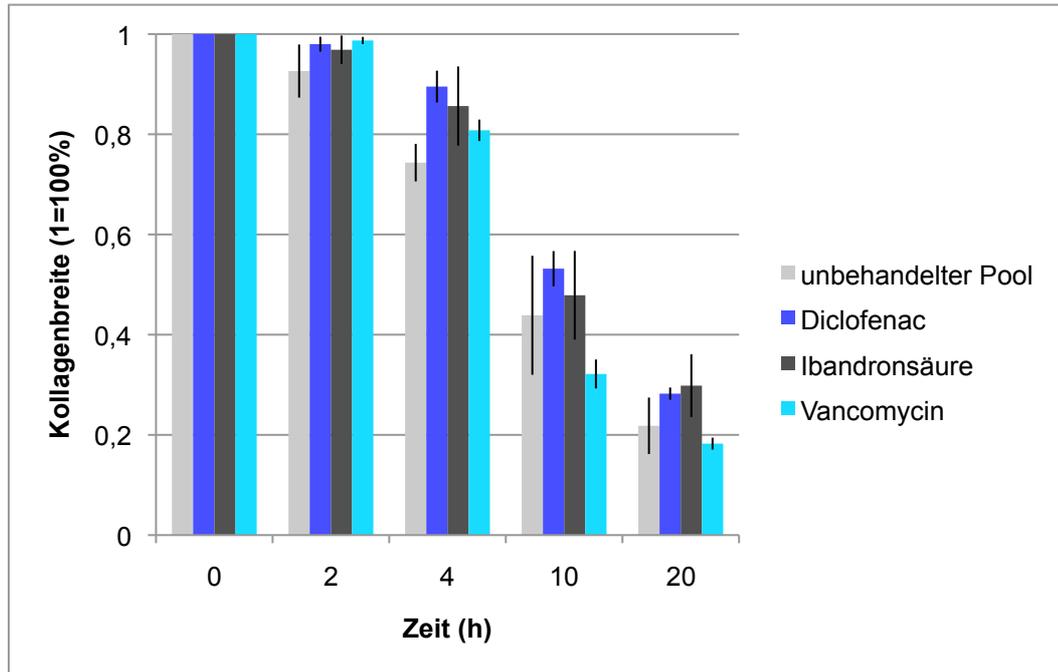


Abb. 11: Zellpool unter Einfluss von verschiedenen Medikamenten im Vergleich zu unbehandelten Zellen am Tag 8 der Inkubationszeit (n=6, n=3, n=12, n=6), dargestellt in Prozent

Am achten Tag nach der Medikamentenbehandlung zeigte am ersten Messpunkt die Kontrollgruppe im Schnitt eine um 7% stärkere Kontraktion als die behandelten Gruppen. Die Vancomycin-behandelten Zellen steigerten ihre Kontraktion nach 4 und 10 h um knapp 50% und erreichten dadurch eine nach 10 h um 10% stärkere Kontraktion als die unbehandelten Zellen. Im Endpunkt betrug die Differenz zwischen den beiden Gruppen 3% zu Gunsten der Vancomycin-behandelten Zellen. Im Vergleich zur Kontrollgruppe ließ sich bei der Diclofenac-Gruppe zu allen Messzeitpunkten eine geringere Kontraktion erkennen (ca. 8%), wobei die max. Differenz nach 4h (16%) erreicht wurde. Ein ähnliches Verhalten bei der Interaktion verzeichneten die Ibandronsäurebeeinflussten Zellen. Diese konnten im Durchschnitt eine Differenz von 7% nach 4, 10 und 20 h zu Gunsten der unbehandelten Gruppe zeigen.

3.5.3 Vergleich der Zellinteraktion am 13. Inkubationstag

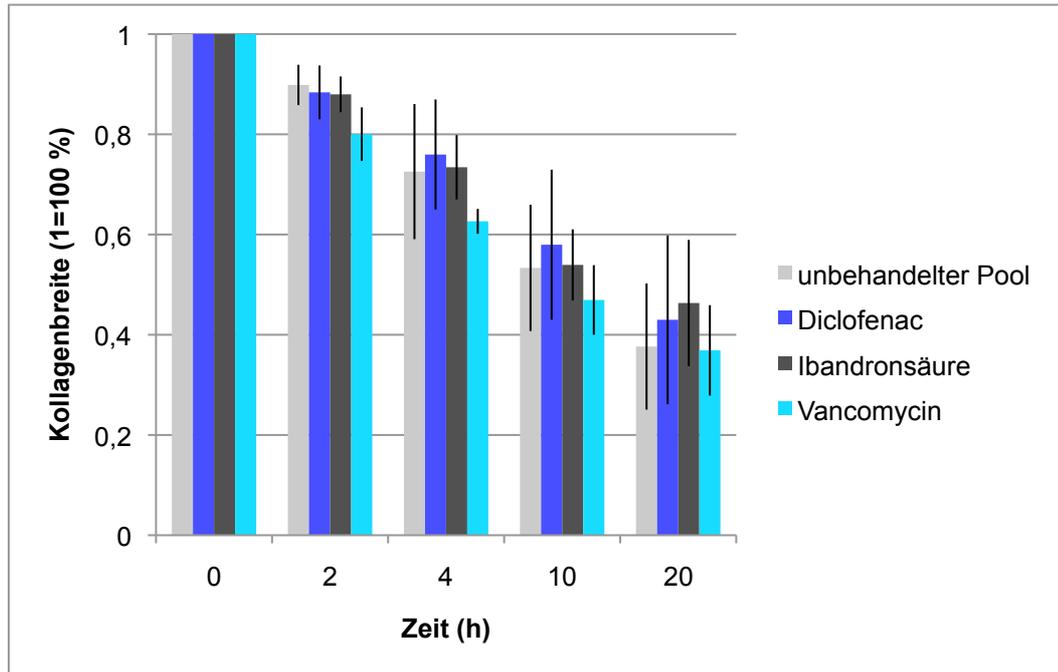


Abb. 12: Zellpool unter Einfluss von verschiedenen Medikamenten im Vergleich zu unbehandelten Zellen an Tag 13 der Inkubationszeit (n=6, n=12, n=6, n=6), dargestellt in Prozent

Am dreizehnten Inkubationstag wies die Vancomycin-Gruppe die geringste Kollagenbreite an allen Messpunkten auf. Nach 2 und 4 h war bereits ein Unterschied von ca. 10% gegenüber der Vergleichsgruppe messbar. Gegen Ende des Versuchs gleichen sich beide Gruppen mit ihren Werten an. Die Ibandronsäure- und Diclofenac-Gruppen verhielten sich ähnlich wie zuvor und verzeichneten insgesamt geringere Kontraktionen als die Kontrollgruppe. Nennenswert war ein Unterschied von 10% nach 20 h zwischen der Ibandronsäure- und der unbehandelten Gruppe.

3.5.4 Vergleich der Zellinteraktion am 14. Inkubationstag

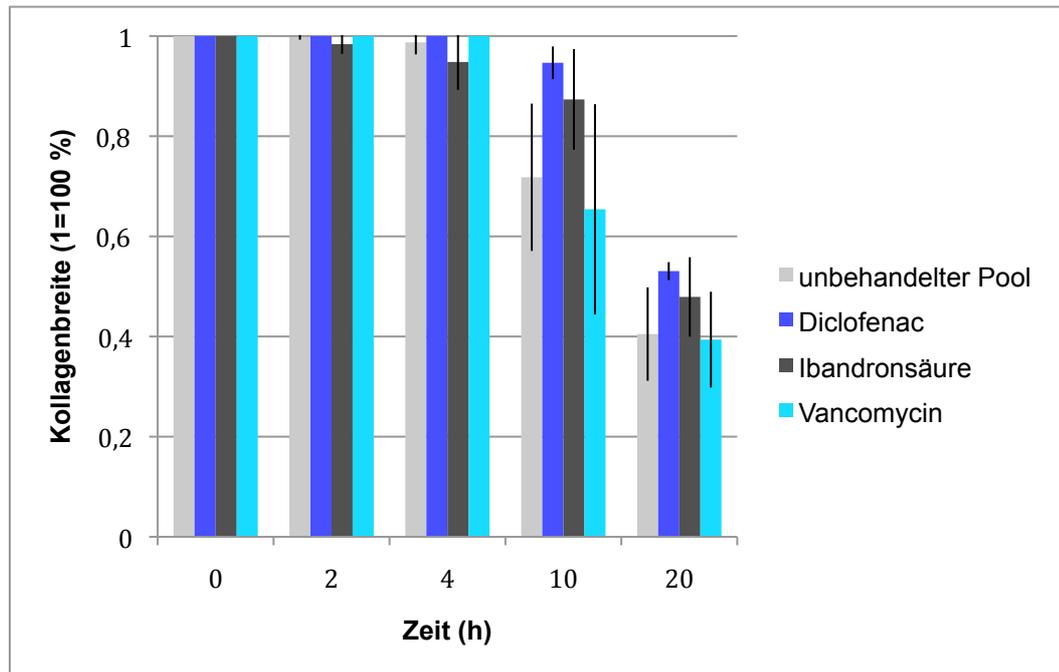


Abb. 13: Zellpool unter Einfluss verschiedener Medikamenten im Vergleich zu unbehandelten Zellen an Tag 14 der Inkubationszeit (n=6, n=6, n=5, n=12), dargestellt in Prozent

Am vierzehnten Inkubationstag zeigte sich für alle Gruppen ein Anfangsplateau, in dem die Zellen nur geringfügige Interaktionen mit ihrer Matrix erkennen ließen. Nach 10 h erreichten die Kontroll-Gruppe und die Vancomycin-Gruppe Werte zwischen 65% und 71% der Ursprungsbreite und erzielten Endwerte um 40%. Demgegenüber erreichten die anderen beiden Gruppen nach 10 h 87-94% der Anfangsbreite und konnten im Endpunkt eine maximale Kontraktion von ca. 50% erzielen.

3.6 Immunhistochemie und Enzym-Substrat-Reaktion

3.6.1 Ergebnisse der Immunhistochemie sowie der Enzym-Substrat-Reaktion von Zellen der Patient Nr. 1-4

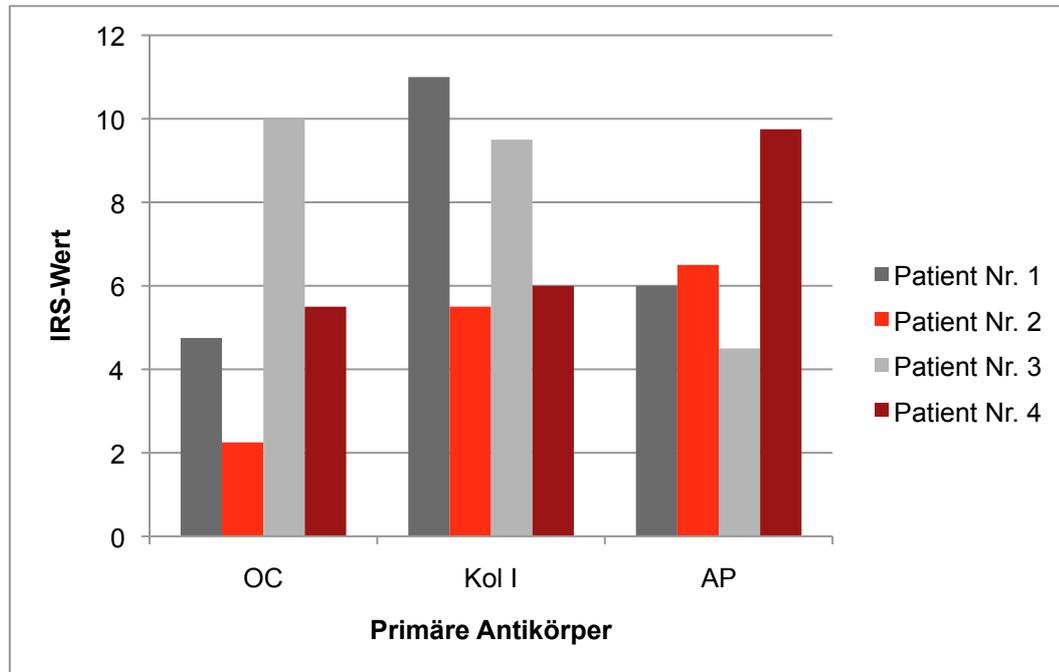


Abb. 14: Expression von Osteocalcin (OC), Kollagen I (Kol I) und alkalischer Phosphatase (AP) der Patientenzellen Nr. 1-4, dargestellt nach dem IR-Score

Patient Nr. 3 erzielte beim Osteocalcinnachweis eine starke Expression. Bei der Kollagenfärbung konnten jeweils Patientin Nr.1 sowie Patient Nr. 3 ein starkes Expressionslevel erreichen, während Patient Nr. 2 und Patient Nr. 4 nur mäßige Werte erlangen konnten. Beim Nachweis der alkalischen Phosphatase erreichte Patient Nr. 4 als einziger ein starkes Expressionsniveau. Alle weiteren Probandenzellen erzielten lediglich ein mäßiges Niveau.

3.6.2 Ergebnisse der Immunhistochemie sowie der Enzym-Substrat-Reaktion der medikamentösbehandelten Zellpools

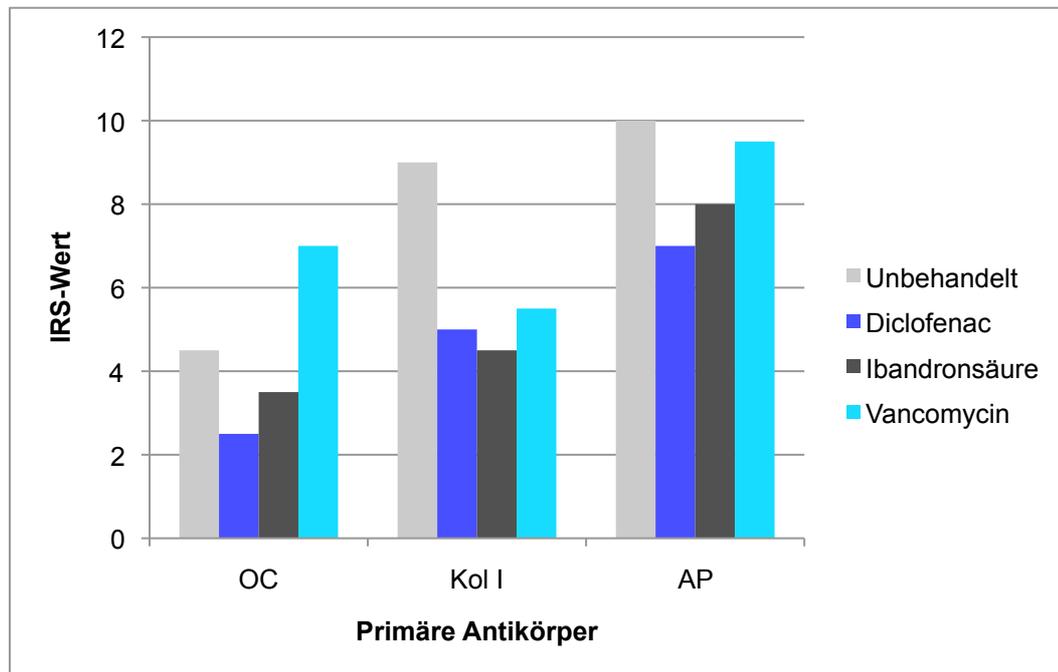


Abb. 15: Expression von Osteocalcin (OC), Kollagen I (Kol I) und alkalischer Phosphatase (AP) beim unbehandeltem und medikamentenbehandeltem Zellpool, dargestellt nach dem IR-Score

Bei allen Markern erreichten die unbehandelten Zellen sowie die Vancomycin-Gruppe die höchsten Expressionslevel, wobei auch zwischen den beiden Gruppen Unterschiede deutlich wurden. So zeigten die Vancomycinzellen beim Osteocalcin einen um 2,5 Punkte höheren Score als die Vergleichsgruppe, lagen jedoch bei der Kollagen-I-Expression 3,5 Punkte hinter dieser. Im Gegensatz dazu wurde das Expressionsmuster der unbehandelten Zellen für Kollagen I als stark eingestuft und die der Vancomycin Gruppe nur als mäßig. Die geringsten Unterschiede beobachtet man in der Expression der alkalischen Phosphatase. Hier erreichten alle Gruppen eine mäßige bis starke Expression.

4 Diskussion

4.1 Knochen

4.1.1 Aufbau und Organisation

Die Knochen bilden nicht nur das Grundgerüst des Bewegungsapparates und bieten Schutz für die inneren Organe, sondern dienen auch als Kalzium- und Phosphatspeicher des Körpers und beherbergen das Knochenmark [Harada, Rodan 2003].

Lange Röhrenknochen bestehen aus einer Diaphyse (Schaft) und zwei Epiphysen, die jeweils die Enden des Knochens bilden. Als Metaphyse wird das Verbindungsstück der beiden eingangs erwähnten Knochenanteile bezeichnet. Diese dient in der Kindheit und Adoleszenzphase dem Längenwachstum des Knochens [Rauber, Kopsch 2003]. Periost, Gefäße, Gelenkknorpel und Knochenmark stellen die Weichteile des Knochens dar. Das Periost überzieht die Außenfläche der Knochen an allen Stellen ohne Knorpel bzw. Muskelansätze und ist mit sensiblen Nervenfasern ausgestattet, die im Frakturfall starken Schmerzen verursachen [Liebich 1999].

Die Blutversorgung des Knochens in der Kompakta wird durch die Blutgefäße in den zentral gelegenen Haverschen Kanälen gesichert, die mit den umgebenden Knochenlamellen (3-7 μm breit) ein Osteon bilden. Spongiosatrabekel (max. 200 μm dick) hingegen weisen keine eigenständige Blutversorgung auf. Ihre Versorgung ist durch das angrenzende Knochenmark gesichert [Lüllmann-Rauch 2009].

Hinsichtlich der Grundsubstanz lassen sich Skelettknochen makroskopisch in die o. g. zwei Einheiten gliedern, die biochemisch identisch sind, sich jedoch in ihrem architektonischen Aufbau deutlich unterscheiden [C.P.Adler 2000].

Der größte Anteil der Knochenmasse – in etwa 80% – besteht aus Kompakta, deren Hauptaufgabe darin besteht, mechanische Stabilität zu gewährleisten und den inneren Organen Schutz zu bieten. Die restlichen 20% der Knochensubstanz bildet die Spongiosa, ein dichtes Trabekelwerk aus Knochenbälkchen, die im Inneren des Knochens für Stabilität sorgen. Aufgrund ihrer großen Oberfläche (80% der gesamten Knochenfläche), sehr hohen Umbauraten und einer guten Durchblutung ist die Spongiosa hauptsächlich für die metabolischen Regulationsaufgaben des Knochens verantwortlich. Sie befindet sich in der Epiphyse langer Röhrenknochen sowie als Stützwerk in kleineren Knochen (Wirbelkörper, Beckenkamm, etc.) [Hadjidakis, Androulakis 2006].

Das Zusammenspiel zwischen Spongiosa und Kompakta verleiht dem Skelett eine hohe mechanische Stabilität und Flexibilität und reduziert gleichzeitig das Gewicht der Knochen zugunsten einer leichten, dynamischen Bewegungsweise [Seeman 2008].

Eingebettet im Spongiosanetzwerk befindet sich das Knochenmark, ein zentrales blutbildendes Organ, das durch seine intraossäre Lage besonders geschützt ist.

4.1.2 Zusammensetzung der Knochensubstanz

Die Knochenmatrix besteht zu 65% aus anorganischen Stoffen und zu 35% aus organischen Bestandteilen.

Als organische Bestandteile werden alle von den Zellen synthetisierten Stoffe bezeichnet sowie die Zellen selbst. Diese werden unterteilt in Osteozyten, Osteoblasten und Osteoklasten, deren Aktivitätsgrad und Differenzierung para- und endokrin reguliert sind [Hadjidakis, Androulakis 2006].

Osteoblasten stammen von mesenchymalen Stammzellen (MSC) ab, die ebenso die Ursprungszellen für Knorpel-, Muskel- oder Fettzellen darstellen [Manolagas 2000, Bianco, Riminucci et al. 2001, T. Beck 2003]. Generell unterscheidet man zwischen aktiven und inaktiven Osteoblasten,

wobei nur die aktiven Osteoid synthetisieren. Inaktive Osteoblasten werden als „bone lining cells“ bezeichnet, von denen einige sich zu aktiven Osteoblasten umwandeln können und andere durch Apoptose untergehen [Noble, Reeve 2000, Lüllmann-Rauch 2009]. Zusätzlich bilden inaktive Osteoblasten das Endost, die innerste Schicht des Knochens [Lüllmann-Rauch 2009].

Insgesamt bilden Osteoblasten den größten Anteil der Zellpopulation im Knochen und sind für Wachstum, Umbauvorgänge und Wundheilung maßgeblich verantwortlich.

Die Knochenentstehung gliedert sich in drei Phasen: Produktion des Osteoids, Reifung und abschließende Mineralisierung [Hadjidakis, Androulakis 2006]. In der ersten Phase wird hauptsächlich Kollagen I vom Osteoblast synthetisiert, das ca. 90% der organischen Substanz bildet [Hadjidakis, Androulakis 2006]. Ab der zweiten Phase werden zu gleichen Anteilen Kollagen I und Osteocalcin gebildet. Osteocalcin ist ein wichtiges Protein in der Kalziumbindung und der Inhibierung frühreifer oder fehlerhafter Mineralisierung [Luo, Ducky et al. 1997, Ducky, Desbois et al. 1996].

Circa 10% der Osteoblasten mauern sich selbst in Osteoid ein oder werden eingemauert und differenzieren zu Osteozyten [Remedios 1999, Budras, Mulling et al. 1996]. Letztere liegen als abgeflachte Zellen isoliert in sogenannten Lakunen und bilden mit ihren multiplen Zellfortsätzen ein Netzwerk zwischen Osteoblasten, blutbildenden Knochenmarkszellen und Endothelzellen der Blutgefäße [Kaiser 2002]. Auch der Transport von Ionen, Nährstoffen und Abfallprodukten wird über diese sternförmigen Ausläufer koordiniert [Liebich 1999, Nijweide, Mulder 1986]. Die genaue Funktion der Osteozyten ist noch nicht hinreichend geklärt, jedoch wird vermutet, dass sie eine zentrale Rolle beim Remodelling des Knochens einnehmen [Lanyon 1993].

Der Abbau von Knochensubstanz stellt die Hauptaufgabe der Osteoklasten dar. Diese sind multinuklearen Riesenzellen (100 µm), die

von mononuklearen Vorläuferzellen des Knochenmarks abstammen und mit ca. 1% die kleinste Population der Knochenzellen bilden [Miyamoto, Suda 2003, Vaananen, Horton 1995]. Aktive Osteoklasten können ihre dem Knochen zugewandte Seite durch Faltenbildung erheblich vergrößern und bilden damit die sogenannte „Howship-Lakune“ [Remedios 1999]. Hauptaufgabe dieser Zellen ist die Demineralisierung der Kollagenfasern durch Auflösung der Hydroxylapatit-Kristall-Kollagen-Bindungen und die enzymatische Spaltung der übrigen Fibrillen [Hadjidakis, Androulakis 2006]. Nach Beendigung ihrer Aufgabe lösen sich die Zellen vom Knochen wieder ab und haften an anderer Stelle um weiteren Knochen zu resorbieren [Liebich 1999].

Auch wenn Osteoblasten und –klasten häufig als Gegenspieler bezeichnet werden, könnten Osteoklasten ohne Hilfe der Osteoblasten nicht zu reifen Zellen differenzieren. Dies hängt mit dem RANKL/RANK/Osteoprotegerin-System zusammen, das Ausreifung und Aktivierung der Osteoklasten reguliert [Kornak U. 2003, Krischak, Augat et al. 2007a, T. Beck 2003].

Organisches Material (35%)	Kollagene Fasern Typ I Wasser Osteoid Glykane Glykoproteine
Anorganisches Material (65%)	Hydroxylapatit Karbonate Fluoride Mg, Na, Pb, S

Tab. 6: Zusammensetzung der Extrazellulärmatrix des Knochens
[www.unifr.ch/anatomy/elearningfree/allemand/stuetzgewebe/knochen/ezm/d-ezm.php]

Der anorganische Anteil besteht zu 85% aus Calciumphosphat, das in einer späteren Phase zu Hydroxylapatit-Kristallen $[3Ca_3(PO_4)_2x(OH)_2]$ umgewandelt wird. Diese Kristalle lagern sich durch ihre hohe Affinität

longitudinal an der Oberfläche oder im Inneren der Kollagenfibrillen ein. Das dadurch entstehende Konstrukt aus zugfesten Kollagenfibrillen und druckfesten Kristallen bildet die Grundvoraussetzung für die Biegefestigkeit des Knochens [Lüllmann-Rauch 2009].

Magnesiumphosphat, Alkalisalze, Calciumcarbonat, Calciumchlorid und Calciumfluorid bilden die restlichen 15% [Rauber, Kopsch 2003].

4.1.3 Turnover und Remodelling

Der menschliche Knochen untersteht einem ständigen Umwandlungsprozess, der erlaubt, dass kleine alltägliche Mikrotraumata repariert werden, der Knochen sich an neue mechanische Gegebenheiten anpasst und vom Körper benötigtes Calcium schnell zur Verfügung gestellt werden kann [Dunlop, Hartmann et al. 2009, Hill 1998]. Im Laufe eines Jahres werden circa 28% der Spongiosa und 4% der Kompakta kontinuierlich resorbiert und durch neue Substanz ersetzt. Diese komplexe Bauaufgabe wird von sogenannten „bone multicellular units“ (BMU) übernommen, eine Einheit von Osteoblasten und -klasten, die für die Entstehung neuer Osteone in der Kompakta und Umgestaltung der Trabekel in der Spongiosa zuständig sind [Nakahama 2010].

Für den Remodellingprozess sind bisher drei Aktivierungsmechanismen bekannt. Erstens reagieren eingemauerte Osteozyten auf veränderte mechanische Belastungen und können diese auf zellulärer Ebene in eine Signalkaskade umwandeln und das Remodelling induzieren [Bonewald 2007]. Ferner führen Knochenfrakturen oder Immobilisation von Extremitäten dazu, dass Osteozyten apoptotisch werden und das von ihnen synthetisierte TGF- β vermindert vorliegt [Verborgt, Tatton et al. 2002, Aguirre, Plotkin et al. 2006]. Heino et al. zeigten in ihrer Arbeit, dass TGF- β der Osteoklastenhemmung dient und eine reduzierte Konzentration dieses Stoffes als Induktion von Umbauprozessen gilt [Heino, Hentunen et al. 2002]. Eine weitere Funktion konnte 1995 durch Riiikonen et al. gezeigt werden, die untersuchten, dass TGF- β über die α 2 β 1-Integrine zu einer

vermehrten Interaktion zwischen Kollagen I und den Zellen beiträgt [Riikonen, Koivisto et al. 1995]. Verringert sich der TGF- β -Gehalt, so sinkt die Festigkeit des Knochens und der Weg für die Umbauprozesse wird geebnet. Ebenso wurde festgestellt, dass verringerte Östrogenlevel und erhöhte Glukokortikoidkonzentrationen die Apoptose der Osteozyten bedingen können [O'Brien, Jia et al. 2004, Jilka, Noble et al. 2012]. Der letzte Aktivierungsweg ist hormonell gesteuert, wobei Parathormon (PTH) aus der Nebenschilddrüse den Hauptmetaboliten darstellt. Osteoblasten besitzen an ihrer Oberfläche PTH-Rezeptoren und können so durch Knochenaufbau oder -abbau den Calciumgehalt im Blut beeinflussen. Ist der Calciumwert zu niedrig, induziert PTH den Abbauprozess am Knochen [Juppner, Abou-Samra et al. 1991, Swarthout, D'Alonzo et al. 2002]. Im Gegensatz dazu stehen Untersuchungen, die dem PTH eine knochenaufbauende Funktion zusprechen [Fermor, Skerry 1995]. Somit scheint dieses Hormon mehrere Aufgaben im menschlichen Körper zu beseitigen, die aktuell noch nicht in allen Einzelheiten geklärt sind.

Als ersten Schritt des Remodelings schaffen aktivierte Osteoklasten durch den Abbau von Knochensubstanz einen neuen Kanal im vorhandenen Knochen, ohne der bisherigen Osteonenarchitektur zu folgen und bilden somit das Grundgerüst für ein neues Osteon [Lüllmann-Rauch 2009]. Phagozyten und Osteoblastenvorläuferzellen beseitigen die unmineralisierten Kollagenreste und ebnen für die Osteoblasten den Weg zur Synthese neuen Materials [Baron, Neff et al. 1986, Everts, Delaisse et al. 2002]. Hierbei ist nicht genau bekannt, welcher Mechanismus für die Aktivierung der Osteoblasten verantwortlich ist. Einige Studien suggerieren, dass Insulin Growth Factor 1 und 2 (IGF 1/2) sowie TGF- β aus dem resorbierten Knochen freigesetzt werden und Osteoblasten aktivieren [Tang, Wu et al. 2009]. Andere Studien hingegen verfolgen die Hypothese, dass die Osteoklasten selbst neue Osteoblasten rekrutieren und aktivieren [Martin, Sims 2005]. Nicht nur der beschriebene Knochenabbau kann den Aufbau bedingen. Auch PTH und mechanischer

Stress sind in der Lage, über Osteozyten eine Wnt-Signalkaskade zu aktivieren und Knochenmatrixentstehung zu induzieren [X. Li, Zhang et al. 2005, Fermor, Skerry 1995, Robling, Niziolek et al. 2008].

4.2 Frakturen und Frakturheilung

Eine Fraktur entsteht dann, wenn die mechanischen Eigenschaften eines Knochens - Elastizität und Festigkeit - überschritten werden und es im Zuge dessen zu einer Diskontinuität des Knochens selbst kommt, die wiederum zu Funktionsverlust und Schmerzen führt [Perren 1992, Simmons 1985, Siewert 2012].

Zur Wiederherstellung der Struktur und Funktion des Knochens werden im Organismus eine Abfolge von lokalen und generalisierten Mechanismen induziert, bei denen sowohl Zellen als auch biochemische Mediatoren eine wichtige Rolle spielen [Probst, Spiegel 1997, Dimitriou, Tsiridis et al. 2005].

4.2.1 Allgemeines Prinzip der Frakturheilung

Das Grundprinzip der Frakturheilung besteht darin, die geometrischen Gegebenheiten sowie die biomechanischen Eigenschaften des Knochens wieder herzustellen [Gerstenfeld, Einhorn 2003]. Viele der molekularen Mechanismen, die das Wachstum und die zelluläre Differenzierung der Frakturheilung steuern, sind identisch mit denjenigen, die die Embryogenese von Knochensubstanz kontrollieren. So stellt die Frakturheilung eine besondere Art der embryonalen Knochenentwicklung im fertig gereiften Körper dar [Gerstenfeld, Cullinane et al. 2003].

Am Ende des erfolgreichen Prozesses wurde der Defekt des Knochens durch ein entsprechendes Geweberegenerat ersetzt und nicht nur durch Narbengewebe überbrückt [McKibbin 1978].

4.2.2 Direkte Frakturheilung

Die direkte Frakturheilung zeichnet sich dadurch aus, dass sie ohne Kallusbildung abläuft. Hierfür ist ein enger Kontakt der Frakturrenden

zueinander sowie eine ausreichende und stabile Blutversorgung der Frakturzone nötig [Braun, Ruter 1996].

Aus den abgerissenen Haverschen-Kanälen sprießen Gefäßkapillaren und Osteoklasten in das gegenüberliegende Frakturende ein und bilden sogenannte Resorptionskanäle. Diese Kanäle werden anschließend von Osteoblasten und Extrazellulärmatrix (ECM) ausgefüllt, die eine direkte Brücke zwischen den Frakturenden entstehen lassen. Überflüssiges Knochenmaterial und abgestorbene Zellen werden von Makrophagen verstoffwechselt [Welsch 2010].

4.2.3 Indirekte Frakturheilung

Eine indirekte Frakturheilung findet immer dann statt, wenn die Knochenfragmente zu weit auseinander stehen und der entstandene Schaden nicht durch direktes Einsprießen von Kapillaren beseitigt werden kann [Welsch 2010].

Dieser Prozess wird in vier Schritte untergliedert [Carano, Filvaroff 2003]: Die Entzündungsphase dominiert den Anfang und ist die Folge eines Frakturhämatoms durch verletzte Gefäße. Hierdurch werden Entzündungszellen wie Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen angelockt und protolytische Enzymkaskaden aktiviert, die für den weiteren Heilungsvorgang essentiell sind [Welsch 2010, Harder, An 2003]. In der nächsten Phase bildet sich der sogenannte weiche Kallus, ein dichtes Geflecht aus Kollagen- und Fibrinsträngen, Fibroblasten und Granulationsgewebe. Um eine ausreichende Stabilität im Kallus zu erreichen, 3. Phase, werden Kalksalze nach und nach eingelagert, so dass sich Geflechtknochen entlang der neuen Kapillaren bildet [Braun, Ruter 1996, Radasch 1999]. Im Verlauf des Remodellings ,4. Phase, wird der mechanisch instabilere Geflechtknochen durch Lamellenknochen ersetzt, um eine solide Brücke zwischen den Frakturenden entstehen zu lassen. Der Prozess kann bis zu mehreren Monaten dauern und ist mit

dem ursprünglichen Knochenaufbau und der Revaskularisierung der Frakturenden abgeschlossen [Chao, Aro et al. 1989].

4.2.4 Einfluss von Geschlecht und Alter auf die Frakturheilung

Die geringere Knochendichte und verminderte Qualität des Knochens im Alter gelten in der Literatur als gesichert und stellen das Hauptproblem der Frakturentstehung und -heilung dar [Hunter, Sambrook 2000]. In diesem Zusammenhang konnten Cooper et al. zeigen, dass bereits die Knochenentwicklung in der Kindheit sowie der Wachstumsschub in der Pubertät das Risiko für eine spätere Osteoporose und Frakturentstehung erkennen lassen [Cooper, Eriksson et al. 2001, Khosla 2012]. So bedingt eine verminderte Wachstumsrate in der Adoleszenzphase ein höheres Risiko für spätere Knochenfrakturen.

Die Annahme, dass Frauen eine deutlich höhere Abbaurate des Knochens aufzeigen als Männer ließ sich nur für die ersten 10 Jahre postmenopausal bestätigen [Riggs, Melton 1986, Marie, Kassem 2011]. Davor und danach zeigten weibliche wie männliche Probanden eine ähnliche Abbautendenz, die allerdings um eine Dekade zugunsten der Männer verschoben war [Riggs, Melton et al. 2008, Khosla, Riggs et al. 2006]. Im Abbau der Kortikalis konnten keine Unterschiede zwischen den Geschlechtern im Alter festgestellt werden [Chen, Zhou et al. 2010]. Die Spongiosatrabekel wiederum werden bei männlichen Patienten im Alter dünner, während weibliche ältere Patienten Defektzonen in ihrem Spongiosanetzwerk aufweisen [Ebeling 2008]. In der Postmenopause kommt es bei weiblichen Patienten zu einem Abfall des Sexualhormons Östrogen, welches einen direkten Einfluss auf die Regulation von Osteoklasten und -blasten hat und somit das Gleichgewicht zwischen Knochenauf und -abbau maßgeblich mitsteuert [Jilka, Hangoc et al. 1992, Kameda, Mano et al. 1997]. Dies ist eine mögliche Erklärung für das frühere und häufigere Auftreten von Frakturen bei älteren weiblichen Patienten [Khosla 2012]. Jedoch lässt sich die veränderte Abbauart sowie-

rate nicht nur durch das Absinken von weiblichen Hormonen sondern auch von Testosteron in männlichen Patienten erklären, wobei Testosteron einen geringeren Einfluss auf die Knochendichte zeigt [Kassem, Marie 2011]. Sinkt der Spiegel des freien Östrogens unter die mittlere Serumkonzentration (Altersgruppenbezogen), unabhängig von der Testosteronkonzentration, so kann ein vermehrter Knochenabbau gemessen werden [Khosla, Melton et al. 2001]. Leder et al. sowie Falahati-Nini et al. zeigten, dass der Knochenabbau zu 70% durch Östrogen und 30% durch das männliche Sexualhormon Testosteron beeinflusst wird [Leder, LeBlanc et al. 2003, Falahati-Nini, Riggs et al. 2000].

Eine andere Studie zeigte, dass 40% der Frakturen bei alten Männern aber nur 20% bei alten Frauen sekundären Erkrankungen, wie z.B. genetischen oder endokrinologischen Störungen, zuzuschreiben sind [Riggs, Melton 1986, Brand, Lowe et al. 2008].

Doch nicht nur endokrinologische Veränderungen sondern auch die Lebensweise, insbesondere Bewegung, wirken sich auf die Knochensubstanz aus. So zeigten Marie et al., dass eine verminderte mechanische Belastung des Körpers zu einer vermehrten Fettproduktion und geringeren Osteoblastenentwicklung führt [Marie, Zerath 2000]. Diese Annahme fand Bestätigung in Studien, die untersuchten, dass mechanische Reize, wie z.B. Spaziergehen oder leichte sportliche Betätigungen, die MSC zur Proliferation anregen und die Differenzierung zu Osteoblasten unterstützen [Luu, Capilla et al. 2009, David, Martin et al. 2007].

Das Verhalten der Osteoblasten im Alter in ihrer Funktion als Hauptzellen des Knochens befindet sich seit Jahren unter intensiver Beobachtung. So zeigten Untersuchungen, dass vermindert vorhandene MSC im Alter zusätzlich eine höhere Apoptoserate aufweisen, wodurch die Zahl der Osteoblasten und Osteozyten abermals sinkt [Pietschmann, Rauner et al. 2009, Zhou, Greenberger et al. 2008]. Darüber hinaus altern die

vorhandenen Osteoblasten auch schneller und büßen Funktionalität ein [Suzuki, Amizuka et al. 2005]. Bereits in den 80er Jahren bewiesen einige Arbeitsgruppen, dass das Alterspigment Lipofuscin sich in Osteoblasten beider Geschlechter ablagert und zu einer verminderten Funktionalität der Zellen führt [Tonna 1975, Bikle, Sakata et al. 2002, J. Cao, Venton et al. 2003].

Klinische Studien deuten daraufhin, dass es bei alten Menschen generell zu einer verspäteten Kallusbildung kommt und dieser zusätzlich eine vergleichsweise deutlich schlechtere Mikrostruktur und schwächere Mineralisierung aufweist [Meyer, Tсахakis et al. 2001, Mehta, Strube et al. 2010].

Die schlechte Qualität des Regeneratknochens scheint allerdings nicht das einzige Problem zu sein. Schell et al. haben gezeigt, dass in alten frakturierten Knochen mehr Osteoklasten als im jungen Knochen vorhanden sind, die einen vermehrten Abbau induzieren [Schell, Lienau et al. 2006].

4.3 Verwendete Medikamente und ihre Wirkung auf den Knochenstoffwechsel

Die Wirkstoffe Diclofenac, Ibandronsäure und Vancomycin sind hinsichtlich ihrer Wirkung auf den Knochen und ihren Einsatz im klinischen Alltag hinreichend untersucht. In der Literatur lassen sich jedoch für die von uns verwendeten Medikamente keine Daten zur Wirkung auf die Knochenzellinteraktion sowie zur Knochenzell-Matrix-Interaktion finden. Somit war es das Ziel dieser Arbeit mögliche Einflüsse auf die Osteoblasten und ihre Interaktionen zu untersuchen.

4.3.1 Diclofenac

Diclofenac zählt zu den nicht steroidalen Antirheumatika (NSAR) und wird ubiquitär in der Behandlung von akuten und chronischen Schmerzen sowie zur Entzündungshemmung in der Medizin eingesetzt [Konstantinidis, Papageorgiou et al. 2012]. Das Wirkprinzip beruht auf der Hemmung der Cyclooxygenasen 1 und 2 (COX 1&2), die für die Umwandlung von Arachidonsäure in Prostaglandine verantwortlich sind [Vane, Botting 1998, Needleman, Turk et al. 1986]. Letztere beeinflussen zahlreiche Abläufe im menschlichen Körper wie die Steuerung von Entzündungsreaktionen, Durchblutung und Schmerzentstehung [Boushel, Langberg et al. 2004, Vrotsos, Miller et al. 2003]. Prostaglandine haben außerdem Einfluss auf Differenzierungs- und Reifungsprozesse von Osteoblasten und sind mitverantwortlich für die Hemmung von Osteoklasten [Shamir, Keila et al. 2004, Krischak, Augat et al. 2007a, Okamoto, Kajiya et al. 2004].

In vielen unterschiedlichen Studien wurde nachgewiesen, dass Diclofenac einen negativen Einfluss auf die Knochenentstehung und -heilung hat und seine Verwendung bei Patienten mit Frakturen hinterfragt werden muss [Di Az-Rodri Guez, Garci et al. 2011, Chang, Li et al. 2009, Fu, Bashutski

et al. 2012, Hernandez, Do et al. 2012, Pountos, Georgouli et al. 2012]. In *in vitro* Studien wurden diese Erkenntnisse überwiegend bestätigt und hierbei zusätzlich festgestellt, dass Diclofenac keinen signifikanten Einfluss auf die Syntheseleistung von osteoblastenspezifischen Markern aufweist [Almaawi, Wang et al. 2013, Krischak, Augat et al. 2007b, Krischak, Augat et al. 2007a].

Die Eigenschaft der NSAR die Knochenentstehung zu hemmen, wird in der Orthopädie als Prophylaxe gegen unerwünschte heterotrope Ossifikationen z.B. nach Hüftendoprothesenimplantationen genutzt [Macfarlane, Ng et al. 2008]. Hierbei kommt es durch lokale Entzündungsreaktionen zu ektooper Knochenentstehung, die wiederum die Funktionalität z.B. des Gelenkes einschränkt und dem Patienten Schmerzen verursacht. Die Prophylaxe muss für mind. 7 Tage, in der Regel für 3-4 Wochen, verabreicht werden ab dem ersten postoperativem Tag, da so die Stimuli zur Knochenbildung (Proliferation von MSC, Rekrutierung von Vorläuferzellen etc.) unterbunden werden [Kneller, Barthel et al. 1997].

4.3.2 Ibandronsäure

Ibandronsäure gehört zu der Gruppe der stickstoffhaltigen Bisphosphonate und dient der Therapie von Krankheiten mit erhöhtem Knochenumbau wie z.B. Knochenmetastasen oder Osteoporose [Sittig 2012, Russell, Rogers 1999]. Es wurde bisher angenommen, dass die Hauptwirkung des Medikaments auf der Hemmung der Osteoklasten beruht und dadurch weniger Knochen resorbiert wird [Glatt, Pataki et al. 2004, Pataki, Muller et al. 1997]. Neuere Studien hingegen zeigten, dass Bisphosphonate auch die Differenzierung und Proliferation von Osteoblasten und Vorläuferzellen aus Stammzellen fördern und auf diese Weise an einem vermehrten Knochenaufbau beteiligt sind [von Knoch, Jaquier et al. 2005, Fromigue, Body 2002]. Koch et al. zeigten in einer ihrer Arbeiten, dass die Differenzierung der Osteoblasten vom proliferativem zum nicht-proliferativem Stadium, in dem die Knochenmatrixproduktion verstärkt wird, durch stickstoffhaltige Bisphosphonate induziert wird. Zusätzlich wiesen sie eine verstärkte Kollagen-I-Synthese in den ersten 10 Tagen nach Medikamentenzugabe nach, die jedoch am 14. Tag auf unter 30% herunter reguliert wird [Koch, Yekta et al. 2010]. Trotz dieser positiven Effekte von Bisphosphonaten auf die Knochensubstanz zeigten Delmas et al., dass die Medikamenteneinnahme das Frakturrisiko für Patienten nicht mindert [Delmas, Rizzoli et al. 2005].

Im klinischen Alltag muss bei der Verwendung besonders auf die Kieferknochennekrose als Nebenwirkung geachtet werden, die durch die veränderte Proliferation der Osteoblasten entstehen kann [Walter, Al-Nawas et al. 2009, Bamias, Kastritis et al. 2005, Koch, Yekta et al. 2010]. Darüber hinaus führen Bisphosphonate zur Obliteration von Blutgefäßen, wodurch eine avaskuläre Knochennekrose entstehen kann [Marx, Sawatari et al. 2005, Abu-Id, Acil et al. 2006].

4.3.3 Vancomycin

Vancomycin ist ein sehr potentes Antibiotikum gegen gram positive Bakterien, das zur Gruppe der Glykopeptide gehört und besonders bei der Therapie von MRSA-Infektionen zum Einsatz kommt und als Reserveantibiotikum im klinischen Alltag gilt [Lee, Lee et al. 2004, Ruß, Endres 2011].

Vancomycin-behandelte meist allogene Knochenimplantate werden in der modernen Chirurgie verwendet, da hier Infektionen mit *Staphylococcus aureus*-Stämmen besonders häufig vorkommen, und ihre Eigenschaft Biofilme zu synthetisieren (56%), die Therapie vor gewaltige Schwierigkeiten stellt [Stewart, Barr et al. 2012, Edmondson, Day et al. 2014]. Durch das lokale Applizieren des Medikaments am möglichen Infektionsort können sowohl die Bildung eines Biofilms als auch systemische Nebenwirkungen vermindert werden [Buttaro, Gimenez et al. 2005, Ketonis, Barr et al. 2011a]. Stewart et al. zeigten in ihrer Studie, dass durch Vancomycin-beschichtete Titanimplantate sowohl die Besiedlung durch *Staphylococcus aureus* auf ein Minimum reduziert als auch ein gutes Remodelling und Heilungsergebnis erzielt werden können [Stewart, Barr et al. 2012]. Buttaro et al. erzielten ähnliche Ergebnisse bezüglich der Fixation und Heilungsrate wie Stewart et al. und stellten darüber hinaus fest, dass die Re-Infektionsrate durch beschichtete Implantate deutlich verringert werden kann [Buttaro, Pusso et al. 2005].

Auf zellulärer Ebene konnten keine signifikanten Unterschiede für die Differenzierung, Proliferation und Membrandurchgängigkeit der Osteoblasten unter Vancomycinbehandlung festgestellt werden [Edin, Miclau et al. 1996, Winkler 2009, Ketonis, Barr et al. 2011a].

4.4 Auswahl der Patienten

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine explorative Studie zur Etablierung einer neuen Methode. Somit wurde ein kleines ausgewähltes Patientenkollektiv verwendet. Die Auswahl der Patienten erfolgte zum einen nach dem Alter. Nach der Definition der Weltgesundheitsorganisation gilt als alt, wer das 65. Lebensjahr vollendet hat. Zum anderen wurden Patienten beider Geschlechter untersucht. Bei der Auswahl der Patienten wurde auf eine Vergleichbarkeit zwischen den jungen und alten Patienten geachtet in Bezug auf ihre Vorerkrankungen bzw. Medikamente. Dabei ist jedoch kritisch zu berücksichtigen, dass bestimmte Vorerkrankungen wie z.B. Diabetes mellitus Typ 2 (Patient Nr. 2) oder Niereninsuffizienz (Patient Nr. 4) das Verhalten von Osteoblasten beeinflussen können [Hernandez, Do et al. 2012].

4.5 Ergebnisdiskussion

Die Grundlage für diese Arbeit lieferten Bellows et al. bereits 1981, in dem sie beweisen konnten, dass Osteoblasten eine Kontraktion in einer Kollagen-I-Matrix *in vitro* verursachen können [Bellows, Melcher et al. 1981, Bouvier, Couble et al. 1990]. Diese Interaktion wird durch β 1-Integrine der Osteoblasten reguliert [M. F. Baslé, M. Lesourd et al. 1998]. Wie Abb. 8 dieser Arbeit zeigt, lassen sich zwischen den Patienten Nr. 1, Nr. 2 und Nr. 3 minimale Differenzen in der Interaktion der Zellen mit der Matrix feststellen. Hierbei treten zwar Schwankungen in der Kollagenbreite an verschiedenen Messpunkten auf, allerdings erreichen alle drei Gruppen ähnliche Endwerte. Lediglich die Zellen von Patient Nr. 4 weisen eine mäßig langsamere Kontraktionsrate im zeitlichen Verlauf auf; ihre Endbreite liegt trotzdem nur 4% über derjenigen der anderen Patienten. Ließen sich unsere Ergebnisse in einem größerem statistisch relevantem Patientenkollektiv bestätigen, und keine alters- oder geschlechtsabhängigen Unterschiede in der Matrix-Zell-Interaktion feststellen, müssten die unterschiedlichen Frakturheilungstendenzen auf

andere Faktoren zurückgeführt werden. Einige Arbeiten nehmen an, dass sich das Spongiosamaterial in der Anzahl und Proliferationsverhalten der Zellen je nach Entnahmeort unterscheidet [Kasperk, Wergedal et al. 1995, Aerssens, Boonen et al. 1997]. Bei unserem ausgewählten Patientenkollektiv lässt sich darüber keine Aussage treffen.

Um eine detaillierte Aussage über die Qualitätsunterschiede von primären Osteoblasten alter, junger, weiblicher und männlicher Testpersonen treffen zu können, sollten in Zukunft z.B. je fünf Patienten pro Gruppe die sich bzgl. der Parameter wie z.B. Gewicht, Vorerkrankungen, Medikamenten etc. möglichst wenig unterscheiden untersucht werden. Desweiteren wird vermutet, dass die Rassenzugehörigkeit Unterschiede in der Knochenmasse sowie -struktur zeigt und somit Differenzen in der Interaktion entstehen können [Nelson, Simpson et al. 1997].

Ebenso sollten weitere Gruppen im Lebensalter zwischen 30-40 Jahren untersucht werden, da sich herausgestellt hat, dass in diesem Lebensabschnitt die größte Knochendichte bei beiden Geschlechtern vorliegt [Zanatta, Valenti et al. 2012].

Die beobachteten großen Schwankungen zwischen den einzelnen Messungen am selben Versuchstag könnten durch Qualitätsunterschiede im Versuchsaufbau herrühren oder aber durch bisher nicht bekannte Störgrößen induziert worden sein. Eine ähnlich starke Streuung bei immer gleich bleibenden Zell-Kollagen-Mischungen stellten bereits Bellows et al. 1981 in ihren Experimenten fest, ohne eine plausible Ursache hierfür zu finden [Bellows, Melcher et al. 1981].

Die umgebende Matrix kann den Phentypen der Zellen durch das Zusammenspiel von Oberflächenrezeptoren und Kollagen-I beeinflussen sowie zu unterschiedlichen Proliferationsraten und Differenzierungen führen, was sich später in der Interaktion mit der Umgebung widerspiegeln kann [Smalley, Lioni et al. 2006, Lynch, Stein et al. 1995].

Ein weiterer Grund für die geringen Differenzen der Kollagenbreiten zwischen den verschiedenen Gruppen könnte auch die für diese Arbeit

angewandte Kultivierungsmethode sein. Bei der Auswaxsmethode handelt es sich um eine 2D-Kultur, die für *in vitro* Versuche etabliert ist, sich jedoch nicht für *in vivo* Modelle eignet. Für eine genauere Übertragbarkeit auf *in vivo* Modelle sollte eher eine 3D-Kulturmethode angewendet werden, da bereits der Kultivierungsansatz Auswirkungen auf die Zellentwicklung haben kann [Buxton, Bitar et al. 2008, Gruber, Koch et al. 2006, Masi, Franchi et al. 1992].

Ein weiterer zu berücksichtigender Aspekt im Umgang mit Osteoblasten und Kollagen-I-Gel ist, dass mechanische Einflüsse auf das Gel sowohl das Verhalten als auch das Expressionsmuster der Zellen stark beeinflussen können [Tan, Desai 2003, M. Yang, Huang et al. 2012]. So induzieren mechanische Reize eine stärkere Proliferation der Zellen mit darauf folgender stärkerer Kontraktion, die wiederum als Signal zur weiteren Proliferation rezipiert wird [Akhouayri, Lafage-Proust et al. 1999]. Anhand dieses Beispiels ist erkennbar, wie sensibel die Zell-Kollagen-Mischung auf äußere Einflüsse reagiert, und wie schnell dadurch Ergebnisse verfälscht werden können. Die Tatsache, dass alle für diese Dissertation benötigten Arbeitsschritte von Hand durchgeführt wurden, lässt die Vermutung zu, dass sich dabei an unterschiedlichen Messtagen unbeabsichtigte Abweichungen in der Durchführung der Versuche zu Lasten der Reproduzierbarkeit ereigneten. Zum jetzigen Zeitpunkt sind allerdings noch keine geeigneten automatisierten und technisch unterstützten Abläufe für diese Versuche möglich.

In Abb. 8 wurden die Mittelwerte mehrerer Versuchstage dargestellt und miteinander verglichen. Hierbei muss hinterfragt werden, ob die gemessenen Interaktionen wirklich nahezu identisch oder Differenzen durch die Mittelung der verschiedenen Passagen nicht erkennbar waren. Aus diesem Grund wurden die Ergebnisse aller Patienten in der vierten Passage abermals miteinander verglichen (Abb. 9). Folglich scheint die Passagenanzahl keinen Einfluss auf die Ergebnisse zu haben.

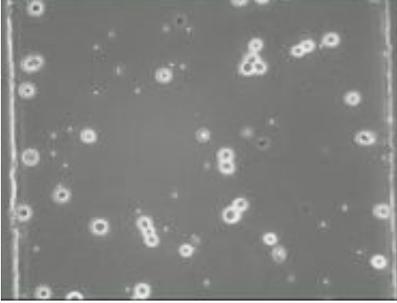
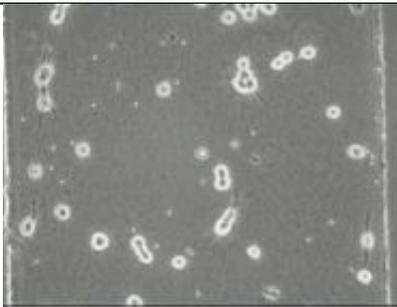
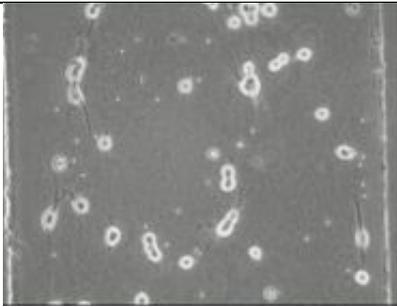
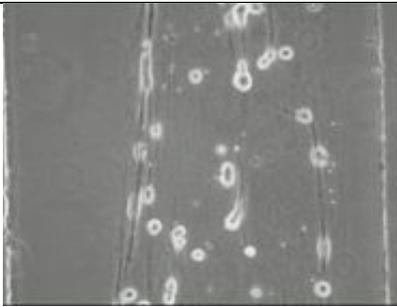
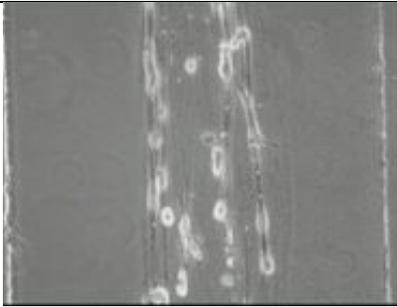
Kontraktion nach 0 h	
Kontraktion nach 2 h	
Kontraktion nach 4 h	
Kontraktion nach 10 h	
Kontraktion nach 20 h	

Abb. 16: Zell-Matrix-Interaktion des unbehandelten Zellpools über 20 h (siehe Kapitel 3.5.2, Abb.11)

Die verwendeten Knochenzellen der vier Patienten zeigten lichtmikroskopisch sowohl in Bezug auf ihre Wachstumsgeschwindigkeit als auch auf ihre Differenzierung zu keinem Zeitpunkt der Kultivierung Unterschiede. In der Vergangenheit untersuchten verschiedene Forschungsgruppen die Alterungsprozesse von Spenderzellen in Hinblick auf ihre Verdopplungszeiten, Lebenserwartung und Seneszenz-Marker *in vitro*. Hierbei zeigte sich, dass die Verdopplungszeit sowie die Lebensspanne von alten Zellen geringer als bei jungen ist und erstere früher die Seneszenz-Marker *in vitro* exprimieren [Kveiborg, Kassem et al. 1999, Kassem, Ankersen et al. 1997, Stenderup, Justesen et al. 2003]. Dies liegt zum einen an einer höheren Apoptoserate, zum anderen an verkürzten Telomeren in den Zellen, die für die Alterung derselben verantwortlich gemacht werden [Baxter, Wynn et al. 2004, Simonsen, Rosada et al. 2002, Almeida, Han et al. 2007].

Manolagas et al. konnten 2000 in Versuchen verdeutlichen, dass die Lebensspanne der Osteoblasten für die Frakturheilung deutlich wichtiger als ihre Teilungsraten sei [Manolagas 2000]. Gleichmaßen konnte nachgewiesen werden, dass Osteoblasten eine sog. Wachstumsweise nach Hayflick zeigen, die in drei Phasen aufgeteilt wird. Die erste ist durch eine hohe Proliferationsrate gekennzeichnet, gefolgt von geringen Verdopplungsraten bis hin zum vollkommenen Stillstand der Proliferation. Durch die relativ niedrigen Passagenzahlen in der vorliegenden Dissertation, sollte gewährleistet werden, dass alle für die Versuche verwendeten Zellen sich in der ersten Phase nach Hayflick befanden [Kassem, Ankersen et al. 1997]. Diese Überlegung wurde im Vorfeld der Versuche berücksichtigt, weshalb die Passagen auf max. neun begrenzt und die Zellen in ihrem Wachstum und Proliferationsverhalten beobachtet wurden.

An einzelnen Versuchstagen (Abb. 10 bzw. 13) ließen sich teilweise Kurvenverläufe feststellen, die initial einen Stillstand der Interaktion

(Plateau) aufzeigten. Diesem Plateau folgte eine starke Kontraktion des Kollagens nach 4 und 10 h und eine Endbreite von ca. 20% wurde erreicht. Als Ursache für die großen Differenzen in der anfänglichen Kollagenbreite nehmen wir an, dass die Kollagenfibrillen in der Matrix an den einzelnen Versuchstagen unterschiedliche Ausrichtungen zeigten und dadurch eine veränderte initiale Kontraktionsfähigkeit auftrat. Unsere Beobachtung, bei der wir retrospektiv die Ausrichtung des Kollagens als gerichtet (iso) oder ungerichtet (aniso) einstufen, widerlegte diese Annahme, da die Kurvenverläufe unabhängig von der Kollagenausrichtungen waren. Die Ausrichtung des Kollagens wurde im Bereich von Stunde 2 gemessen bei der das Kollagen vollständig polymerisiert vorlag. Eine Bestimmung zu einem späteren Zeitpunkt erschien nicht zielführend, da die Zellen durch ihre Interaktion die Organisation des Kollagens erheblich beeinflussen. So richten sich die Zellen in langgestreckter Form *in vivo* longitudinal zu den Fibrillen aus und modulieren über ihre Integrinrezeptoren die Interaktion zwischen dem Kollagen und Fibronectin, einem Brückenmolekül der ECM, um ein optimales Netzwerk zu erschaffen [Akhoyari, Lafage-Proust et al. 1999]. Gleichzeitig richten sich die Aktinbündel intrazellulär parallel zu den Kollagenbündeln aus, um eine mechanische Verstärkung zu erzeugen. All diese Mechanismen wurden auch bei kultivierten Zellen festgestellt [Horwitz, Duggan et al. 1986].

Die oben beschriebene Zellausrichtung entlang der Bündel und das Ausbreiten der Zellen konnten in unserer Arbeit ebenfalls beobachtet werden. Befand sich eine Zelle isoliert in der Kollagenmatrix, so versuchte sie durch longitudinale Streckung Kontakt zu weiteren Zellen aufzubauen und gemeinsam eine Kontraktion des Kollagens zu bewirken. Interessant ist hierbei, dass die Zellen trotz ihrer longitudinalen Ausrichtung noch seitliche, zu Interaktionen führende Kontakte mit Kollagen eingehen können.

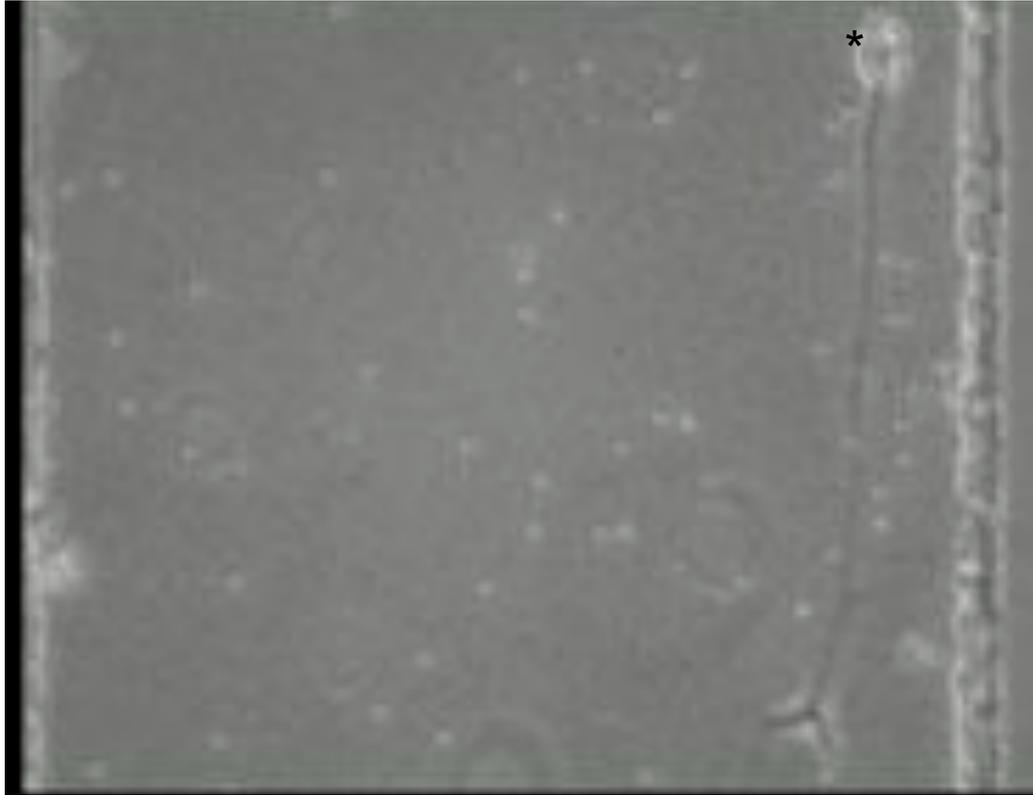


Abb. 17: Elongierte Zelle (*) in einer Kollagen-I-Matrix

Den selben Kurvenverlauf wie in Teilen unserer Untersuchungen zeigten bereits frühere Forschungsgruppen, welche die Kontraktion auf Well-Platten beurteilten. Hierbei wurde der Durchmesser des Kollagengels in den Well-Platten gemessen. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit wurde diese Interaktion nicht im Stundenbereich sondern nach Tagen gemessen. Dadurch wurde die anfängliche Kontraktion nicht beurteilt. Desweiteren muss ein Einfluss der unterschiedlichen Versuchsaufbauten (Mikrokanalsystem vs. Well-Platten) angenommen werden [Akhouayri, Lafage-Proust et al. 1999]. Bellows et al. zeigten, dass Osteoblasten in einer dreidimensionalen Kollagenmatrix zuerst eine Art Netzwerk untereinander bilden, bevor die Adhäsion ans Kollagen beginnt. So konnte gezeigt werden, dass die Plateauphase durch abweichende Zeiten für die Organisation der Osteoblasten untereinander entsteht, die für eine geregelte Kontraktion nötig ist. [Bellows, Melcher et al. 1981]. Dies scheint

einzigartig bei Osteoblasten zu sein und dient *in vivo* der Anpassung an veränderte Belastungssituationen, bei denen die Zellen auf mechanische Einflüsse reagieren und hierdurch eine optimale Verformung des Knochens bewirken [Akhouayri, Lafage-Proust et al. 1999]. Dass für eine Kontraktion des Gels zuerst eine Zell-Zell-Interaktion bestehen muss, wie von Bellows et al. beschrieben, scheint nicht allein bedeutsam zu sein. Klebe et al. kamen zu dem Schluss, dass auch die Kollagenfibrillen selbst die mechanische Kraft zwischen den Zellen übertragen können und somit zur Erzeugung einer Veränderung im Kollagen kein direkter Kontakt zwischen den Zellen zwingend notwendig ist [Klebe, Caldwell et al. 1989]. Wir beobachteten in unseren Untersuchungen, dass eine Kontraktion des Gels erst nach Interaktion zwischen den Osteoblasten entstehen kann, sei es über direkten Kontakt oder mittels Kollagenfibrillen. Wenn diese Verbindung zwischen den Zellen nicht direkt erfolgt, elongiert sich die Zelle, bildet viele Zellausläufer und bewegt sich im Kollagen, um Anschluss an andere Zellen zu finden. Merkt eine Zelle, dass auf die Bindung ans Kollagen und eine leichte Kontraktion eine andere Zelle reagiert, so verstärkt sie ihre Interaktion und zieht weiter an der Kollagenverbindung mit der anderen Zelle. Ist kein Erfolg zu verzeichnen, löst die Zelle ihre Bindung mit dem Kollagen und durchwandert es auf der Suche nach weiteren Zellen, um gemeinsam eine Kontraktion auslösen zu können. Dieses Verhalten kann in ähnlicher Art und Weise bei der direkten Frakturheilung beobachtet werden, die nur dann zustande kommt, wenn die Zellen direkten Kontakt zueinander finden.

In Abb. 14 sind die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung sowie der Enzym-Substrat-Reaktion der vier Patienten in der 3.- 4. Passage dargestellt. Diese Versuche lieferten in erster Linie den Nachweis, dass es sich bei den angezüchteten Zellen um Osteoblasten handelt, die anhand ihrer spezifischen Marker identifiziert wurden (s. Anhang).

Bei der Osteocalcinfärbung unterscheiden sich die Zellen von Patient Nr. 3 mit einer starken Anfärbung deutlich von den anderen drei Patienten. Bei

der Kollagen-I-Färbung erreichen die Zellen der jungen Patienten Nr. 1 und 3 starke Expressionsniveaus, während die der alten Patienten Nr. 2 und 4 nur mittlere Levels erzielen. Einige Arbeiten zeigen eine Korrelation zwischen niedriger Osteocalcinexpression und schlechterer Knochenqualität und leiten daraus ein erhöhtes Frakturrisiko daraus ab. [S. Tanaka, Narusawa et al. 2011, Szulc, Chapuy et al. 1993]. 2012 wurde diese Aussage dahingehend verstärkt, dass Rodrigues et al. nicht nur geringe Osteocalcinlevel als negativen Knochenqualitätsmarker bestätigten, sondern darüber hinaus feststellten, dass eine geringe Expression von Kollagen I eine verminderte Knochenqualität bedeutet [Rodrigues, Caetano-Lopes et al. 2012b]. Meyers et al. konnten zeigen, dass die Kollagen-I-Matrix ansich ein starker Stimulus für die Differenzierung von Osteoblasten *in vivo* darstellt [Meyers, Zayzafoon et al. 2004]. Dies wurde bereits 1997 von Takeuchi vermutet, der feststellte, dass weniger alkalische Phosphatase synthetisiert wird, wenn der Integrin-Rezeptor $\alpha 2\beta 1$ der Osteoblasten blockiert wird [Takeuchi, Suzawa et al. 1997]. Die Reaktion zum Nachweis der alkalischen Phosphatase hingegen präsentiert ein entgegengesetztes Bild. Die Zellen von Patient Nr. 4 verzeichnen die höchsten Expressionen wohingegen die Zellen von Patient Nr. 3 sehr geringe Levels an alkalischer Phosphatase aufweisen. Bei den Patienten Nr. 1 und 3 kann kein Unterschied untereinander festgestellt werden.

Physiologisch sind erhöhte Werte der alkalischen Phosphatase z.B. in der Adoleszenz, bei malignen Knochenprozessen sowie nach Frakturheilungen messbar [Almasan, Baciut et al. 2011]. Diese Tatsache unterstützt auch die These, dass mechanische Belastungen eine erhöhte Expression an alkalischer Phosphatase bedingen und somit eine schnellere Heilung fördern [M. Yang, Huang et al. 2012]. Über die alkalische Phosphatase als Frühmarker für das Frakturrisiko findet man in der Literatur kontroverse Untersuchungen. Es gibt sich hierzu Arbeiten, die erhöhte AP-Werte im Alter mit einem höheren Frakturrisiko verbinden,

andere wiederum zeigen bei verminderten AP-Werten eine geminderte Osteoblastenqualität [Garnero, Hausherr et al. 1996, Bruyere, Collette et al. 2003, Gerdhem, Ivaska et al. 2004]. Den Einfluss der umgebenden Kollagen-I-Matrix *in vitro* auf das Verhalten der Expression der alkalischen Phosphatase in Osteoblasten untersuchten 1995 Lynch et al. und zeigten, dass Kollagen-I einen positiven Effekt auf die Synthese der alkalischen Phosphatase hat [Lynch, Stein et al. 1995]. Durch diese Erkenntnisse erscheint eine erneute Messung der Marker im Anschluss an die Kollagen-Zell-Interaktion für diese Arbeit sinnvoll, um weitere Unterschiede zwischen den Patienten zeigen zu können. Ebenso sollte ein quantitatives Verfahren (z.B. PCR) gewählt werden, um eine bessere Vergleichbarkeit zu erhalten.

Bei den ersten drei Messpunkten in Abb. 10 sind kaum Unterschiede zwischen den Medikamentengruppen und der Kontrolle sichtbar. Deutlicher sind die Unterschiede nach 10 und 20 h, wenn die unbehandelte Gruppe im Vergleich zum Rest der Proben schmalere Kollagenbreiten erreicht und in ihrer Endbreite fast auf die Werte der Einzelzellversuche herankommt. Der Kurvenverlauf am Tag 8 (Abb. 11) unterscheidet sich von Tag 7 (Abb. 10) durch eine deutlich frühere und stärkere Kontraktion sowie geringere Endbreite bei allen Versuchsgruppen. Hierbei ist zu erkennen, dass die unbehandelten sowie die mit dem Antibiotikum Vancomycin behandelten Zellen die geringsten Kollagenbreiten aufweisen, während die Ibandronsäure- und Diclofenac-behandelten Zellpools eine deutlich trägere Kontraktionsbereitschaft zeigen. Dieses Verhalten wird auch in den darauf folgenden Untersuchungen sichtbar, obgleich die Kurvenverläufe der beiden letzten Messungen sich stark unterscheiden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Vancomycin-Zellen und die Kontrollgruppe die stärksten Kontraktionen induzieren, wohingegen die beiden anderen Medikamentengruppen in allen Messpunkten eine schwächere Kontraktion zeigen.

Nach den Messungen am Tag 7 vermuteten wird, dass die geringere Anfangskontraktion im Vergleich zu den ungepoolten Zellen durch die Erstellung eines Zellpools zustande gekommen sind. Als Ursache hierfür wäre eine gegenseitige Beeinflussung der unterschiedlichen Zellen im Zellpool plausibel. Allerdings konnte diese Art von Zell-Matrix-Interaktion an den Tagen 8 und 13 nicht gezeigt werden. Die unterschiedlichen Kurvenverläufe werden wahrscheinlich durch Abweichungen in der Herstellung der Lösungen sowie im Versuchsaufbau begründet sein.

Unsere Versuche zeigen eine Hemmung der Zell-Matrix-Interaktion unter dem Einfluss des Medikaments Diclofenac. In einer retrospektiven Untersuchung konnten Ritter et al. keine signifikanten Einflüsse von NSAR auf die Protheseneinheilung bzw. Frakturheilung verzeichnen [Ritter, Sieber 1985]. Diese Daten wurden durch viele nachfolgende Untersuchungen widerlegt, die ihrerseits zeigten, dass es unter einer NSAR-Dauertherapie, und hier insbesondere von Diclofenac, zu einer verzögerten oder ausbleibenden Frakturheilung kommt, wobei Dosierung und Dauer der Applikation eine entscheidende Rolle spielen [A. Beck, Krischak et al. 2003, Vuolteenaho, Moilanen et al. 2008, Gerstenfeld, Al-Ghawas et al. 2007]. In diesem Zusammenhang scheint Diclofenac nicht die Organisation der Frakturheilung, sondern lediglich ihren zeitlichen Ablauf zu beeinflussen [Gregory, Forwood 2007]. Setzt man das Medikament frühzeitig wieder ab, so sind Qualitätsunterschiede in der Frakturheilung nicht mehr messbar [Gerstenfeld, Al-Ghawas et al. 2007]. Fu et al. zeigten 2012, dass unter der Therapie mit NSAR geringere Knochenmasse sowie -dichte gemessen werden können, die zur Verzögerung der Protheseneinheilung führen [Fu, Bashutski et al. 2012]. Wiederum andere Studien zeigten, dass unter Diclofenac-Therapie die Kallus-Reifung gestört abläuft und die mechanischen Eigenschaften des Knochens deutlich kompromittiert sind, was zu erhöhten Raten von ausbleibender Frakturheilung führt [Gerstenfeld, Einhorn 2003, Simon, O'Connor 2007].

Seit langem wird Diclofenac in der Orthopädie zur Prophylaxe von heterotrophen Ossifikation erfolgreich eingesetzt. Entzündungsmediatoren stimulieren über Prostaglandine die Differenzierung von MSC zu Osteoblasten und fördern somit die Knochenheilung [Ritter, Sieber 1985, Gebuhr, Wilbek et al. 1995, S. Sell, M. Teschner et al. 1999].

Diese klinischen Beobachtungen lassen sich durch experimentelle Arbeiten auf zellulärer Ebene bestätigen, in denen gezeigt werden konnte, dass Diclofenac je nach Applikationsdauer und Konzentration erhebliche Auswirkungen auf Osteoblasten aufweist [Ho, Chang et al. 1999]. Dies bezüglich untersuchten verschiedene Arbeitsgruppen, dass Proliferation, Migration, Differenzierung, Stoffwechsellleistungen und DNA-Synthese unter Diclofenac stark reduziert werden und die Zellzahl mit steigender Medikamentenkonzentration abnimmt [Di Az-Rodri Guez, Garci et al. 2011, Matziolis G, Rau HM et al. 2002, Kaspar, Hedrich et al. 2005, Krischak, Augat et al. 2007a]. Bei der in unserer Arbeit verwendeten Konzentration konnten die genannten Arbeitsgruppen keine Unterschiede in der Zellzahl oder Stoffwechsellleistung verzeichnen. Sell et al. hingegen zeigten, dass bereits Konzentrationen von 1 µg/ml die Zellzahl verringern und die DNA-Synthese bei dieser Konzentration um 44% im Gegensatz zu unbehandelten Zellen abnimmt [Sell, Teschner et al. 1999]. Diese kontroversen Ergebnisse könnten durch pH-Wert-Schwankungen in der Zellkultur erklärt werden, da Diclofenac im sauren Milieu, wie z.B. im entzündlichen Gewebe, akkumuliert und eine bessere Wirkung entfaltet [Kaspar, Hedrich et al. 2005]. In Bezug auf die Frakturheilung scheinen Prostaglandine nicht nur BMP 7 zu beeinflussen, sondern auch Osteoklasten zu hemmen [Spiro, Beil et al. 2010, Okamoto, Kajiya et al. 2004]. Für die genannten Prozesse sind Prostaglandine verantwortlich, die neben der Steuerung der Reifung von Osteoblasten und Chondrozyten auch als Bindeglied zwischen TNF- α , IL-6, BMP, etc. und den Knochenzellen fungieren [T. F. Li, Zuscik et al. 2004, Shamir, Keila et al.

2004, Vassiliou, Jing et al. 2003, Harizi, Norbert 2004, Dinarello 2002, Arikawa, Omura et al. 2004].

Auch die Zellen unter Einwirkung von Ibandronsäure zeigten eine schwächere Kontraktion des Kollagens als die Kontrollgruppe. Somit lässt sich sagen, dass die Kontraktionsfähigkeit der Zellen in unserem Versuchszeitraum von zwei Wochen durch die Gabe von Ibandronsäure inhibiert wurde.

Die nicht einheitliche Studienlage erschwerte im Vorfeld dieser Arbeit die Ermittlung der genauen Konzentration an Bisphosphonaten, hier insbesondere von Ibandronsäure, die *in vivo* auf die Knochen wirkt.

Das liegt nicht nur an den verschiedenen Bisphosphonatarten, die in den Studien verwendet wurden, sondern auch an ihren unterschiedlichen, von Autor zu Autor wechselnden Dosierungen. Diese Sachlage erschwert die Vergleichbarkeit der Studien untereinander sowie die Übertragung von *in vitro* Ergebnissen auf *in vivo* Modelle. Trotz dieser Differenzen stimmen nahezu alle Autoren überein, dass Bisphosphonate die Rate an Frakturen bei osteoporotischen oder malignen Prozessen dank der mit dieser Therapie zusammenhängenden vermehrten Bildung an Knochenmasse verringern können, wobei dieser Vorteil mit einer geringeren mechanischen Stabilität einhergeht [Pozzi, Vallet et al. 2009, Koch, Wunsch et al. 2011]. Dem verringerten Frakturrisiko steht eine verlangsamte Knochenheilung gegenüber, die mutmaßlich durch geringere Osteocalcinlevels unter Bisphosphonattherapie verursacht wird. Um eine verbesserte Heilungsrate zu erreichen, müssen hohe Dosen des Medikamentes am Wirkort präsent sein mit einhergehender Erhöhung des Osteocalcingehalts [Almasan, Baciut et al. 2011]. Cao et al. äußerten die Vermutung, Bisphosphonate würden die Zeit des Remodelling negativ beeinflussen, der entstandene Kallus sei jedoch größer und stärker mineralisiert als ohne Medikament [Y. Cao, Mori et al. 2002].

Die genauen Wirkmechanismen von Bisphosphonaten konnten bisher nur teilweise ergründet werden, wenngleich feststeht, dass diese über das

RANKL/RANK/OPG-System sowohl Osteoklasten in ihrem Handeln hemmen als auch Osteoblasten aktivieren und darüber hinaus höhere Apoptoseraten von Osteoklasten induzieren [Viereck, Emons et al. 2002, Koch, Merkel et al. 2010b]. Zudem kommt es durch die geringeren Apoptoseraten von Osteoblasten und -zyten verstärkt zu einer erhöhten Knochenmasse und -dichte [Jeong, Jin et al. 2013, Plotkin, Weinstein et al. 1999].

Zusätzlich fördern Bisphosphonate dosisabhängig die Differenzierung von MSC zu Osteoblasten und erhöhen die Anzahl der zur Verfügung stehenden knochenproduzierenden Zellen [von Knoch, Jaquiere et al. 2005, Koch, Merkel et al. 2010a, Giuliani, Pedrazzoni et al. 1998, Klein, Ben-Bassat et al. 1998, Im, Qureshi et al. 2004, Kim, Kim et al. 2009]. Diese Wirkung scheint allerdings nur von kurzer Dauer zu sein, da in den ersten 3 Tagen nach Einnahmebeginn die Proliferation zwar um 30% gesteigert werden kann, dies jedoch nach 7 Tagen um -40% vom Ausgangswert abfällt [Fromigue, Body 2002]. Diese konzentrationsabhängigen Proliferationsraten bestätigte Reinholz et al. in seiner Arbeit und stellte fest, dass die Syntheseleistungen der verbliebenden Knochenzellen durch das Medikament deutlich erhöht wurden [Reinholz, Getz et al. 2000].

Den erwähnten positiven Effekten stehen Ergebnisse gegenüber, die eine Hemmung der Knochenheilung durch Bisphosphonate zeigen. Diese Wirkung erklären die Autoren durch zwei Prozesse. Zum einen soll eine geringere Mineralisierung des Knochens stattfinden, zum anderen wirken Bisphosphonate zytotoxisch auf das Wachstum und die Funktion der Osteoblasten [Orriss, Key et al. 2009]. Unsere Experimente zeigten über einen Zeitraum von 14 Tagen keine erhöhten Apoptoseraten der Osteoblasten unter Ibandronsäure und somit gehen wir davon aus, dass keine Zytotoxizität bestand.

Bei dem Vancomycin-behandeltem Zellpool konnten ähnliche Kontraktionsbreiten wie bei dem Kontrollpool verzeichnet werden. Die

schwächere Kontraktion am siebten Inkubationstag wurde unsererseits als Fehlmessung betrachtet. Somit schlussfolgern wir, dass das Antibiotikum Vancomycin die Heilungsabläufe auf zellulärer Ebene nicht beeinträchtigt. In diesem Punkt deckt sich das Ergebnis unserer Arbeit mit denjenigen, die feststellten, dass die Frakturheilung durch Vancomycin nicht verlangsamt wird, sondern besser und schneller als ohne verlaufen kann [C. C. Yang, Lin et al. 2013, Haleem, Rouse et al. 2004]. Auch bezüglich der Stabilität weisen Antibiotika-behandelte Knochen keinen Nachteil gegenüber unbehandelten auf [Kallala, Graham et al. 2012]. Die Einflüsse von Vancomycin auf der zellulären Ebene werden kontrovers diskutiert. Es zeigt sich erneut, dass die unterschiedlichen Konzentrationen des Medikaments sowie die Messmethode das Ergebnis beeinflussen. Die Erkenntnis, eine Konzentration von unter 1000 µg/ml Vancomycin habe keinen Effekt auf die Zellzahl, allerdings eine Konzentration von 10.000 µg/ml sei für die Zellen toxisch, diente als Grundlage für weitere Versuche [Edin, Miclau et al. 1996]. Hierbei wurden die Menge an DNA intrazellulär sowie die Proliferation und Zellzahl unter Einwirkung des Medikaments gemessen. Viele Arbeiten zeigten keinen negativen Effekt auf DNA-Menge und Proliferation der Osteoblasten. Einige Ergebnisse unterstützten sogar die These, die Proliferation könne medikamentenabhängig gesteigert werden [Rathbone, Cross et al. 2011, Oyama M., Emerton ME. et al. 1998, Ketonis, Barr et al. 2011a, Antoci, Adams et al. 2007, Zhang, Yang de et al. 2008, Lepretre, Chai et al. 2009]. Eine verbesserte Differenzierung, Proliferation und Mineralisierung von Knochen unter Vancomycin wiesen 2013 Yang et al. nach und zeigten damit die positiven Einflüsse des Medikaments auf die Knochenheilung [C. C. Yang, Lin et al. 2013].

Auch bei den medikamentenbeeinflussten Zellen bestätigten wir durch eine Immunhistochemie und Enzym-Substrat-Reaktion, dass es sich um Osteoblasten handelt, die unter den Medikamentenbehandlung nicht dedifferenziert waren (s. Anhang).

Das stärkste Expressionsniveau des Markers Osteocalcin erreicht die Vancomycin-behandelte Gruppe, gefolgt von der Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse verzeichneten wir auch bei der Messung der alkalischen Phosphatase, wobei hier der Unterschied zu den anderen zwei Gruppen geringer war als bei Osteocalcin. Die unbehandelten Zellen erreichten bei den Kollagen-I-Anfärbungen den höchsten Score unterschieden sich jedoch deutlich von den anderen Gruppen, die untereinander vergleichbare Expressionsniveaus zeigten.

Wie bereits erwähnt, werden die Auswirkungen von NSAR auf Osteoblasten und ihre Syntheseleistung so wie auch die Expression der osteoblastentypischen Marker in der Literatur kontrovers diskutiert. 1999 zeigten Ho et al., dass nach 6-24 h Inkubation mit Indomethacin, die alkalische Phosphatase- und Kollagen-I-Expression deutlich ansteigt [Ho, Chang et al. 1999]. Im selben Jahr wurde hingegen auch gezeigt, dass Diclofenac bereits bei einer Konzentration von 1 µg/ml die Kollagen I Synthese um 82% mindert, während Osteocalcin und alkalische Phosphatase verstärkt exprimiert werden [Sell, Teschner et al. 1999].

Dass Konzentrationen von 2 µg/ml Diclofenac keinen positiven Einfluss auf die Expression von Kollagen I und alkalischer Phosphatase nach 24 h Inkubation haben, zeigten Kaspar et al. [Kaspar, Hedrich et al. 2005]. Die Ergebnisse von Kasper et al. bestärken unsere Annahme und unterstützen die These, dass Diclofenac mit 2µg/ml die Syntheseleistung der Zellen vermindert und negative Auswirkungen auf die Knochenqualität haben könnte.

Unsere Ergebnisse in Bezug auf die Immunhistochemie der Ibandronsäure-behandelten Zellen bestätigen diverse Resultate aus der Literatur, die besagen, Bisphosphonate beeinflussen je nach verwendeter Konzentration die Syntheseleistung von Osteocalcin, Kollagen-I und alkalischer Phosphatase negativ [Pataki, Muller et al. 1997]. Die Mehrheit der Studien unterstützt jedoch die These, dass unter der Therapie mit Bisphosphonaten alle Marker vermehrt exprimiert werden und somit zu

einer vermeintlich besseren Knochenqualität beitragen [Im, Qureshi et al. 2004, Xiong, Yang et al. 2009, Giuliani, Pedrazzoni et al. 1998]. Diese Annahme deckt sich auch mit den bereits oben beschriebenen Daten zur Syntheseleistung der Zellen, allerdings untersuchte bis jetzt keine andere Arbeit einen so langen Applikationszeitraum wie wir, so dass kein aussagekräftiger Vergleich gezogen werden kann.

In der Immunhistochemie zeigen die Vancomycin-Zellen bei jedem gemessenem Marker eine mäßige bis starke Expression, erreichen allerdings nur für Osteocalcin höhere Werte als die Kontrollgruppe. Leider lassen sich für Vancomycinbehandelte Zellen und die Expression von Osteocalcin keine Daten in der Literatur finden. Es wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch häufig darauf hingewiesen, dass hohe Osteocalcinwerte eine gute Knochenheilung bedingen und somit Vancomycin keinen negativen Einfluss auf die Frakturheilung zu haben scheint.

In den übrigen Medikamentengruppen liegen die Werte leicht unter denjenigen der unbehandelten Zellen. Dieses Verhalten zeigte sich auch bei früheren Versuchen [Ketonis, Barr et al. 2011b].

4.6 Bewertung der Messmethodik und Ausblick

Fernandez et al. etablierten in ihrer Arbeit die o.g. Messmethodik, um den Einfluss der Matrix auf die mechanische Antwort von Zellen zu erörtern und die intrazellulären Veränderungen zu messen [Fernandez, Bausch 2009].

Für unsere Zwecke modifizierten wir ihren Versuchsaufbau, um die Interaktion zwischen den Zellen und ihrer Umgebung beobachten und quantitativ messen zu können. Hierbei traten Schwierigkeiten im Versuchsaufbau sowie -ablauf auf, die wir als Begründung für unsere schwankenden Ergebnisse heranziehen.

Die von uns verwendeten Mikrokanalsysteme interferieren über ihre Form und ihre Architektur mit den Zellen und beeinflussen das Verhalten der Kollagenmatrix deutlich stärker als Well-Platten-Systemen. Dieses Problem beginnt bereits bei der Herstellung der PDMS-Kanäle, bei der jeder einzelne Kanalkomplex ein von Hand hergestelltes Unikat ist. Es genügen minimale Abweichungen im PDMS-Mischungsverhältnis oder mikroskopische Verunreinigungen am Wafer, um die Form und Struktur der Kanäle zu beeinflussen. Wir beobachteten, dass leicht unebene Ränder der PDMS-Kanäle deutlich geringere Kontraktionen aufwiesen als vollkommen glatte Ränder. Ein weiteres Problem stellt die Herstellung und Verarbeitung des Kollagens dar. Arbeiten haben gezeigt, dass Rinderkollagen durch seine Isolierung beschädigt wird und somit nicht identisch mit dem *in vivo* Kollagen ist. Desweiteren verändern Temperaturschwankungen, mechanische Erschütterung und pH-Wert-Schwankungen die Struktur des Kollagens [Silver, Freeman et al. 2003, Wood 1960, McPherson, Wallace et al. 1985, Shoulders, Raines 2009]. Konnte der Versuch aus technischen Gründen nicht unmittelbar nach Befüllen der Kanäle gestartet werden, so entstanden Temperaturschwankungen, die möglicherweise eine veränderte

Fibrillenstruktur induzieren können. Ebenso besteht die Möglichkeit, dass die Klebestreifen, die als Abdichtung der Kanäle dienten, das Kollagen mechanisch beeinflussen. Doch nicht nur die Matrix beeinflusst das Verhalten der Zellen, sondern auch das Mikrokanalsystem an sich. Es hat sich beispielsweise herausgestellt, dass Fibroblasten in Mikrokanälen eine deutlich veränderte Vitalität im Vergleich zu anderen Kulturgefäßen aufweisen, was sich auch auf Osteoblasten übertragen lässt [Sung, Su et al. 2009, Ducky 2000]. Das Oberflächen-Durchmesser-Verhältnis beeinflusst primär die Kollagenmatrix und spiegelt auch nicht die Bedingungen *in vivo* wider. Ebenso lassen sich die Ergebnisse nicht mit Well-Platten-Systemen vergleichen [Sung, Su et al. 2009]. Auch die Temperaturverteilung, welches für die Polymerisation des Kollagens wichtig ist, wird durch die PDMS-Kollagen-Interaktion gestört [Satish, Kandlikar 2006].

Für weitere Versuche sollte nicht nur die Zell-Kollagen-Interaktion, sondern auch die Zell-Zell-Interaktion z.B. elektronenmikroskopisch gemessen werden und weitere mögliche Differenzen feststellen zu können. Hierbei wäre es denkbar, dass es auf zellulärer Ebene deutliche Unterschiede zwischen den Spenderzellen vorliegen, die bisher nicht untersucht wurden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei weiterer Anwendung der in dieser Arbeit dargestellten Methode, diese nach den oben beschriebenen Kriterien modifiziert und angepasst werden muss, um die Qualität und Aussagekraft der Ergebnisse zu verbessern.

5 Zusammenfassung

Die verzögerte oder inadäquate Frakturheilung, insbesondere bei älteren Patienten, stellt für die orthopädische Chirurgie noch immer eine große Herausforderung dar.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, primäre Osteoblasten von jungen und alten Menschen bezüglich ihrer Interaktion mit einer Kollagen-I-Matrix zu untersuchen und anhand der Unterschiede einen möglichen Rückschluss auf die Frakturheilung zu ziehen. Für diese Arbeit wurden primäre humane Osteoblasten von vier verschiedenen Patienten angezüchtet und ihre Interaktion mit einer selbst hergestellten dreidimensionalen Kollagen-I-Matrix über einen Zeitraum von 20 h untersucht. Unsere Experimente ergaben keine relevanten Unterschiede am Endpunkt, jedoch zeigten Osteoblasten der älteren Patienten eine verzögerte Interaktion.

Ein weiteres Ziel war es, den Einfluss von ausgewählten, in der Orthopädie häufig verwendeten Medikamenten (Diclofenac, Ibandronsäure und Vancomycin) auf die Zell-Matrix-Interaktion zu messen. Diese Versuche ergaben für Diclofenac und Ibandronsäure eine hemmende Wirkung auf die Zell-Matrix-Interaktion, während Vancomycin eine tendenziell verstärkte Kontraktionsfähigkeit der Zellen bewirkte.

Begleitend wurden die Zellen immunhistochemisch, sowie mittels einer Enzym-Substrat-Reaktion als Osteoblasten identifiziert und die Expression von Osteocalcin, Kollagen I und alkalischer Phosphatase quantifiziert. Hierbei korrelierten hohe Osteocalcin- und Kollagen-I-Werte mit einer stärkeren Zell-Matrix-Interaktion.

Zusammen mit den genannten Ergebnissen konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine geeignete Methodik zur semiquantitativen Analyse der Zell-Matrix-Interaktion entwickelt werden, die als Grundlage für weiterführende experimentelle Untersuchungen der Knochenphysiologie dienen kann.

6 Anhang

6.1 Literaturverzeichnis

Abdallah, B. M., Haack-Sorensen, M., Fink, T., Kassem, M. (2006): Inhibition of osteoblast differentiation but not adipocyte differentiation of mesenchymal stem cells by sera obtained from aged females. *Bone*, 39, 181-8.

Abu-Id, M. H., Acil, Y., Gottschalk, J., Kreuzsch, T. (2006): [Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw]. *Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie : MKG*, 10, 73-81.

Aerssens, J., Boonen, S., Joly, J., Dequeker, J. (1997): Variations in trabecular bone composition with anatomical site and age: potential implications for bone quality assessment. *The Journal of endocrinology*, 155, 411-21.

Aguirre, J. I., Plotkin, L. I., Stewart, S. A., Weinstein, R. S., Parfitt, A. M., Manolagas, S. C., Bellido, T. (2006): Osteocyte apoptosis is induced by weightlessness in mice and precedes osteoclast recruitment and bone loss. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 21, 605-15.

Akhouayri, O., Lafage-Proust, M. H., Rattner, A., Laroche, N., Caillot-Augusseau, A., Alexandre, C., Vico, L. (1999): Effects of static or dynamic mechanical stresses on osteoblast phenotype expression in three-dimensional contractile collagen gels. *Journal of cellular biochemistry*, 76, 217-30.

Akhter, M. P., Iwaniec, U. T., Haynatzki, G. R., Fung, Y. K., Cullen, D. M., Recker, R. R. (2003): Effects of nicotine on bone mass and strength in aged female rats. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, 21, 14-9.

Almaawi, A., Wang, H. T., Ciobanu, O., Rowas, S. A., Rampersad, S., Antoniou, J., Mwale, F. (2013): Effect of Acetaminophen and Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs on Gene Expression of Mesenchymal Stem Cells. *Tissue engineering. Part A*.

Almasan, H., Baciut, G., Baciut, M., Almasan, O., Bran, S., Oana, L. (2011): Serum changes induced by intramedullar experimental administration of bisphosphonates. *Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie*, 52, 435-42.

Almeida, M., Han, L., Martin-Millan, M., Plotkin, L. I., Stewart, S. A., Roberson, P. K., Kousteni, S., O'Brien, C. A., Bellido, T., Parfitt, A. M., Weinstein, R. S., Jilka, R. L., Manolagas, S. C. (2007): Skeletal involution by age-associated oxidative stress and its acceleration by loss of sex steroids. *The Journal of biological chemistry*, 282, 27285-97.

Antoci, V., Jr., Adams, C. S., Parvizi, J., Ducheyne, P., Shapiro, I. M., Hickok, N. J. (2007): Covalently attached vancomycin provides a nanoscale antibacterial surface. *Clinical orthopaedics and related research*, 461, 81-7.

Arikawa, T., Omura, K., Morita, I. (2004): Regulation of bone morphogenetic protein-2 expression by endogenous prostaglandin E2 in human mesenchymal stem cells. *Journal of cellular physiology*, 200, 400-6.

Aslan, D., Andersen, M. D., Gede, L. B., de Franca, T. K., Jorgensen, S. R., Schwarz, P., Jorgensen, N. R. (2012): Mechanisms for the bone anabolic effect of parathyroid hormone treatment in humans. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*, 72, 14-22.

Aubin, J. E. (1998): Bone stem cells. *Journal of cellular biochemistry. Supplement*, 30-31, 73-82.

Auf'mkolk, B., Schwartz, E. R. (1985): Biochemical characterizations of human osteoblasts in culture. *Progress in clinical and biological research*, 187, 201-14.

Bamias, A., Kastiris, E., Bamia, C., Moulopoulos, L. A., Melakopoulos, I., Bozas, G., Koutsoukou, V., Gika, D., Anagnostopoulos, A., Papadimitriou, C., Terpos, E., Dimopoulos, M. A. (2005): Osteonecrosis of the jaw in cancer after treatment with bisphosphonates: incidence and risk factors. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 23, 8580-7.

Baron, R., Neff, L., Tran Van, P., Nefussi, J. R., Vignery, A. (1986): Kinetic and cytochemical identification of osteoclast precursors and their differentiation into multinucleated osteoclasts. *The American journal of pathology*, 122, 363-78.

Baxter, M. A., Wynn, R. F., Jowitt, S. N., Wraith, J. E., Fairbairn, L. J., Bellantuono, I. (2004): Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion. *Stem cells*, 22, 675-82.

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. *Archives of orthopaedic and trauma surgery*, 123, 327-32.

Beck, T. (2003): Der Knochen-lebendig und stoffwechselaktiv. Pharma.Ztg, 148. Jahrgang.

Bellows, C. G., Melcher, A. H., Aubin, J. E. (1981): Contraction and organization of collagen gels by cells cultured from periodontal ligament, gingiva and bone suggest functional differences between cell types. Journal of cell science, 50, 299-314.

Bergman, R. J., Gazit, D., Kahn, A. J., Gruber, H., McDougall, S., Hahn, T. J. (1996): Age-related changes in osteogenic stem cells in mice. Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research, 11, 568-77.

Bianco, P., Riminucci, M., Gronthos, S., Robey, P. G. (2001): Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. Stem cells, 19, 180-92.

Bikle, D. D., Sakata, T., Leary, C., Elalieh, H., Ginzinger, D., Rosen, C. J., Beamer, W., Majumdar, S., Halloran, B. P. (2002): Insulin-like growth factor I is required for the anabolic actions of parathyroid hormone on mouse bone. Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research, 17, 1570-8.

Bonewald, L. F. (2007): Osteocytes as dynamic multifunctional cells. Annals of the New York Academy of Sciences, 1116, 281-90.

Bouroncle, B. A. (1965): Preservation of living cells at -79 degrees C with dimethyl sulfoxide. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine, 119, 958-61.

Boushel, R., Langberg, H., Risum, N., Kjaer, M. (2004): Regulation of blood flow by prostaglandins. Current vascular pharmacology, 2, 191-7.

Bouvier, M., Couble, M. L., Hartmann, D. J., Gauthier, J. P., Magloire, H. (1990): Ultrastructural and immunocytochemical study of bone-derived cells cultured in three-dimensional matrices: influence of chondroitin-4 sulfate on mineralization. Differentiation; research in biological diversity, 45, 128-37.

Brand, C., Lowe, A., Hall, S. (2008): The utility of clinical decision tools for diagnosing osteoporosis in postmenopausal women with rheumatoid arthritis. BMC musculoskeletal disorders, 9, 13.

Braun, W., Ruter, A. (1996): [Fracture healing. Morphologic and physiologic aspects]. Der Unfallchirurg, 99, 59-67.

Brent, Steinbock, O. (2003): Polymer Surface Modification Using Microwave-Oven-Generated Plasma. 19, 8117-8118.

Bruyere, O., Collette, J., Delmas, P., Rouillon, A., Roux, C., Seidel, L., Richy, F., Reginster, J. Y. (2003): Interest of biochemical markers of bone turnover for long-term prediction of new vertebral fracture in postmenopausal osteoporotic women. *Maturitas*, 44, 259-65.

Buckwalter J A, Einhorn T A, L., Marsh J (2006): Bone and joint healing. In: Rockwood

and Green's fractures in adults, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkin.

Budras, K. D., Mulling, C., Horowitz, A. (1996): Rate of keratinization of the wall segment of the hoof and its relation to width and structure of the zona alba (white line) with respect to claw disease in cattle. *American journal of veterinary research*, 57, 444-55.

Buttaro, M. A., Gimenez, M. I., Greco, G., Barcan, L., Piccaluga, F. (2005): High active local levels of vancomycin without nephrotoxicity released from impacted bone allografts in 20 revision hip arthroplasties. *Acta orthopaedica*, 76, 336-40.

Buttaro, M. A., Pusso, R., Piccaluga, F. (2005): Vancomycin-supplemented impacted bone allografts in infected hip arthroplasty. Two-stage revision results. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*, 87, 314-9.

Buxton, P. G., Bitar, M., Gellynck, K., Parkar, M., Brown, R. A., Young, A. M., Knowles, J. C., Nazhat, S. N. (2008): Dense collagen matrix accelerates osteogenic differentiation and rescues the apoptotic response to MMP inhibition. *Bone*, 43, 377-85.

C.P.Adler (2000): Bones and bone tissue; normal anatomy and histology, in *Bone diseases*, New York, Springer.

Callewaert, F., Boonen, S., Vanderschueren, D. (2010): Sex steroids and the male skeleton: a tale of two hormones. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 21, 89-95.

Calori, G. M., Albisetti, W., Agus, A., Iori, S., Tagliabue, L. (2007): Risk factors contributing to fracture non-unions. *Injury*, 38 Suppl 2, S11-8.

Cao, J., Venton, L., Sakata, T., Halloran, B. P. (2003): Expression of RANKL and OPG correlates with age-related bone loss in male C57BL/6 mice. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 18, 270-7.

Cao, Y., Mori, S., Mashiba, T., Westmore, M. S., Ma, L., Sato, M., Akiyama, T., Shi, L., Komatsubara, S., Miyamoto, K., Norimatsu, H. (2002): Raloxifene, estrogen, and alendronate affect the processes of fracture repair differently in ovariectomized rats. *Journal of bone and*

mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research, 17, 2237-46.

Carano, R. A., Filvaroff, E. H. (2003): Angiogenesis and bone repair. Drug discovery today, 8, 980-9.

Cawthon, P. M., Harrison, S. L., Barrett-Connor, E., Fink, H. A., Cauley, J. A., Lewis, C. E., Orwoll, E. S., Cummings, S. R. (2006): Alcohol intake and its relationship with bone mineral density, falls, and fracture risk in older men. Journal of the American Geriatrics Society, 54, 1649-57.

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, 148-56.

Chao, E. Y., Aro, H. T., Lewallen, D. G., Kelly, P. J. (1989): The effect of rigidity on fracture healing in external fixation. Clinical orthopaedics and related research, 24-35.

Chen, H., Zhou, X., Shoumura, S., Emura, S., Bunai, Y. (2010): Age- and gender-dependent changes in three-dimensional microstructure of cortical and trabecular bone at the human femoral neck. Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA, 21, 627-36.

Chuang, Y.-J., Tseng, F.-G., Lin, W.-K. (2002): Reduction of diffraction effect of UV exposure on SU-8 negative thick photoresist by air gap elimination. Microsystem Technologies, 8, 308-313.

Coelho, M. J., Cabral, A. T., Fernande, M. H. (2000): Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part I: osteoblastic differentiation of serially passaged human bone marrow cells cultured in alpha-MEM and in DMEM. Biomaterials, 21, 1087-94.

Cohen, A., Dempster, D. W., Recker, R. R., Lappe, J. M., Zhou, H., Zwahlen, A., Muller, R., Zhao, B., Guo, X., Lang, T., Saeed, I., Liu, X. S., Guo, X. E., Cremers, S., Rosen, C. J., Stein, E. M., Nickolas, T. L., McMahon, D. J., Young, P., Shane, E. (2013): Abdominal fat is associated with lower bone formation and inferior bone quality in healthy premenopausal women: a transiliac bone biopsy study. The Journal of clinical endocrinology and metabolism.

Cooper, C., Eriksson, J. G., Forsen, T., Osmond, C., Tuomilehto, J., Barker, D. J. (2001): Maternal height, childhood growth and risk of hip fracture in later life: a longitudinal study. Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European

Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA, 12, 623-9.

Court-Brown, C. M., McQueen, M. M. (2008): Nonunions of the proximal humerus: their prevalence and functional outcome. *The Journal of trauma*, 64, 1517-21.

D'Ippolito, G., Schiller, P. C., Ricordi, C., Roos, B. A., Howard, G. A. (1999): Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 14, 1115-22.

David, V., Martin, A., Lafage-Proust, M. H., Malaval, L., Peyroche, S., Jones, D. B., Vico, L., Guignandon, A. (2007): Mechanical loading down-regulates peroxisome proliferator-activated receptor gamma in bone marrow stromal cells and favors osteoblastogenesis at the expense of adipogenesis. *Endocrinology*, 148, 2553-62.

Delmas, P. D., Rizzoli, R., Cooper, C., Reginster, J. Y. (2005): Treatment of patients with postmenopausal osteoporosis is worthwhile. The position of the International Osteoporosis Foundation. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, 16, 1-5.

Di Az-Rodri Guez, L., Garci, A. Marti Nez O., Arroyo-Morales, M., Rodri Guez-Perez, L., Rubio-Ruiz, B., Ruiz, C. (2011): Effects of Indomethacin, Nimesulide, and Diclofenac on Human MG-63 Osteosarcoma Cell Line. *Biological research for nursing*.

Dimitriou, R., Tsiridis, E., Giannoudis, P. V. (2005): Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury*, 36, 1392-404.

Dinarello, C. A. (2002): The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clinical and experimental rheumatology*, 20, S1-13.

Ducy, P. (2000): The Osteoblast: A Sophisticated Fibroblast under Central Surveillance. *Science*, 289, 1501-1504.

Ducy, P., Desbois, C., Boyce, B., Pinero, G., Story, B., Dunstan, C., Smith, E., Bonadio, J., Goldstein, S., Gundberg, C., Bradley, A., Karsenty, G. (1996): Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature*, 382, 448-52.

Dunlop, J. W., Hartmann, M. A., Brechet, Y. J., Fratzl, P., Weinkamer, R. (2009): New suggestions for the mechanical control of bone remodeling. *Calcified tissue international*, 85, 45-54.

Ebeling, P. R. (2008): Clinical practice. Osteoporosis in men. *The New England journal of medicine*, 358, 1474-82.

Edin, M. L., Miclau, T., Lester, G. E., Lindsey, R. W., Dahners, L. E. (1996): Effect of cefazolin and vancomycin on osteoblasts in vitro. *Clinical orthopaedics and related research*, 245-51.

Edmondson, M. C., Day, R., Wood, D. (2014): Vancomycin iontophoresis of allograft bone. *Bone & joint research*, 3, 101-7.

Egrise, D., Martin, D., Vienne, A., Neve, P., Schoutens, A. (1992): The number of fibroblastic colonies formed from bone marrow is decreased and the in vitro proliferation rate of trabecular bone cells increased in aged rats. *Bone*, 13, 355-61.

Einhorn, T. A. (1996): Enhancement of fracture healing. *Instructional course lectures*, 45, 401-16.

Everts, V., Delaisse, J. M., Korper, W., Jansen, D. C., Tigchelaar-Gutter, W., Saftig, P., Beertsen, W. (2002): The bone lining cell: its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 17, 77-90.

Falahati-Nini, A., Riggs, B. L., Atkinson, E. J., O'Fallon, W. M., Eastell, R., Khosla, S. (2000): Relative contributions of testosterone and estrogen in regulating bone resorption and formation in normal elderly men. *The Journal of clinical investigation*, 106, 1553-60.

Fermor, B., Skerry, T. M. (1995): PTH/PTHrP receptor expression on osteoblasts and osteocytes but not resorbing bone surfaces in growing rats. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 10, 1935-43.

Fernandez, P., Bausch, A. R. (2009): The compaction of gels by cells: a case of collective mechanical activity. *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro*, 1, 252-9.

Fromigue, O., Body, J. J. (2002): Bisphosphonates influence the proliferation and the maturation of normal human osteoblasts. *Journal of endocrinological investigation*, 25, 539-46.

Fu, J. H., Bashutski, J. D., Al-Hezaimi, K., Wang, H. L. (2012): Statins, glucocorticoids, and nonsteroidal anti-inflammatory drugs: their influence on implant healing. *Implant dentistry*, 21, 362-7.

Garnero, P., Hausherr, E., Chapuy, M. C., Marcelli, C., Grandjean, H., Muller, C., Cormier, C., Breart, G., Meunier, P. J., Delmas, P. D. (1996): Markers of bone resorption predict hip fracture in elderly women: the

EPIDOS Prospective Study. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 11, 1531-8.

Gassen, H.-G., Schrimpf, G. (1999): *Gentechnische Methoden*.

Gebuhr, P., Wilbek, H., Soelberg, M. (1995): Naproxen for 8 days can prevent heterotopic ossification after hip arthroplasty. *Clinical orthopaedics and related research*, 166-9.

Gerdhem, P., Ivaska, K. K., Alatalo, S. L., Halleen, J. M., Hellman, J., Isaksson, A., Pettersson, K., Vaananen, H. K., Akesson, K., Obrant, K. J. (2004): Biochemical markers of bone metabolism and prediction of fracture in elderly women. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 19, 386-93.

Gerstenfeld, L. C., Al-Ghawas, M., Alkhiary, Y. M., Cullinane, D. M., Krall, E. A., Fitch, J. L., Webb, E. G., Thiede, M. A., Einhorn, T. A. (2007): Selective and nonselective cyclooxygenase-2 inhibitors and experimental fracture-healing. Reversibility of effects after short-term treatment. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, 89, 114-25.

Gerstenfeld, L. C., Cullinane, D. M., Barnes, G. L., Graves, D. T., Einhorn, T. A. (2003): Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *Journal of cellular biochemistry*, 88, 873-84.

Gerstenfeld, L. C., Einhorn, T. A. (2003): Developmental aspects of fracture healing and the use of pharmacological agents to alter healing. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions*, 3, 297-303; discussion 320-1.

Giuliani, N., Pedrazzoni, M., Negri, G., Passeri, G., Impicciatore, M., Girasole, G. (1998): Bisphosphonates stimulate formation of osteoblast precursors and mineralized nodules in murine and human bone marrow cultures in vitro and promote early osteoblastogenesis in young and aged mice in vivo. *Bone*, 22, 455-61.

Glatt, M., Pataki, A., Evans, G. P., Hornby, S. B., Green, J. R. (2004): Loss of vertebral bone and mechanical strength in estrogen-deficient rats is prevented by long-term administration of zoledronic acid. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, 15, 707-15.

Gomberg, B. F., Gruen, G. S., Smith, W. R., Spott, M. (1999): Outcomes in acute orthopaedic trauma: a review of 130,506 patients by age. *Injury*, 30, 431-7.

- Gong, Z., Wezeman, F. H. (2004): Inhibitory effect of alcohol on osteogenic differentiation in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Alcoholism, clinical and experimental research*, 28, 468-79.
- Greatorex, I. F. (1988): Proximal femoral fractures: an assessment of the outcome of health care in elderly people. *Community medicine*, 10, 203-10.
- Gregory, L. S., Forwood, M. R. (2007): Cyclooxygenase-2 inhibition delays the attainment of peak woven bone formation following four-point bending in the rat. *Calcified tissue international*, 80, 176-83.
- Gruber, R., Koch, H., Doll, B. A., Tegtmeier, F., Einhorn, T. A., Hollinger, J. O. (2006): Fracture healing in the elderly patient. *Experimental gerontology*, 41, 1080-93.
- Gundle, R., Beresford, J. N. (1995): The isolation and culture of cells from explants of human trabecular bone. *Calcified tissue international*, 56 Suppl 1, S8-10.
- Hadjidakis, D. J., Androulakis, II (2006): Bone remodeling. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1092, 385-96.
- Haleem, A. A., Rouse, M. S., Lewallen, D. G., Hanssen, A. D., Steckelberg, J. M., Patel, R. (2004): Gentamicin and vancomycin do not impair experimental fracture healing. *Clinical orthopaedics and related research*, 22-4.
- Hallstrom, H., Melhus, H., Glynn, A., Lind, L., Syvanen, A. C., Michaelsson, K. (2010): Coffee consumption and CYP1A2 genotype in relation to bone mineral density of the proximal femur in elderly men and women: a cohort study. *Nutrition & metabolism*, 7, 12.
- Harada, S., Rodan, G. A. (2003): Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature*, 423, 349-55.
- Harder, A. T., An, Y. H. (2003): The mechanisms of the inhibitory effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on bone healing: a concise review. *Journal of clinical pharmacology*, 43, 807-15.
- Harizi, H., Norbert, G. (2004): Inhibition of IL-6, TNF-alpha, and cyclooxygenase-2 protein expression by prostaglandin E2-induced IL-10 in bone marrow-derived dendritic cells. *Cellular immunology*, 228, 99-109.
- Hauschka, P. V. (1986): Osteocalcin: the vitamin K-dependent Ca²⁺-binding protein of bone matrix. *Haemostasis*, 16, 258-72.

- Hee, H. T., Wong, H. P., Low, Y. P., Myers, L. (2001): Predictors of outcome of floating knee injuries in adults: 89 patients followed for 2-12 years. *Acta orthopaedica Scandinavica*, 72, 385-94.
- Hees, H., Sinowatz, F. (2000): *Histologie, Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischer Anatomie*, Deutscher-Ärzte Verlag Köln.
- Heino, T. J., Hentunen, T. A., Vaananen, H. K. (2002): Osteocytes inhibit osteoclastic bone resorption through transforming growth factor-beta: enhancement by estrogen. *Journal of cellular biochemistry*, 85, 185-97.
- Henne-Bruns, D. (2003): *Duale Reihe Chirurgie*. In: 2. Auflage (Hrsg.), Stuttgart: Thieme.
- Hernandez, R. K., Do, T. P., Critchlow, C. W., Dent, R. E., Jick, S. S. (2012): Patient-related risk factors for fracture-healing complications in the United Kingdom General Practice Research Database. *Acta orthopaedica*, 83, 653-60.
- Hill, P. A. (1998): Bone remodelling. *British journal of orthodontics*, 25, 101-7.
- Ho, M. L., Chang, J. K., Chuang, L. Y., Hsu, H. K., Wang, G. J. (1999): Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and prostaglandins on osteoblastic functions. *Biochemical pharmacology*, 58, 983-90.
- Horwitz, A., Duggan, K., Buck, C., Beckerle, M. C., Burrridge, K. (1986): Interaction of plasma membrane fibronectin receptor with talin--a transmembrane linkage. *Nature*, 320, 531-3.
- Hsu, S. M., Raine, L., Fanger, H. (1981): A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and an avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. *American journal of clinical pathology*, 75, 734-8.
- Hunter, D. J., Sambrook, P. N. (2000): Bone loss. *Epidemiology of bone loss*. *Arthritis research*, 2, 441-5.
- Im, G. I., Qureshi, S. A., Kenney, J., Rubash, H. E., Shanbhag, A. S. (2004): Osteoblast proliferation and maturation by bisphosphonates. *Biomaterials*, 25, 4105-15.
- Jeong, H. M., Jin, Y. H., Choi, Y. H., Chung, J. O., Cho, D. H., Chung, M. Y., Civitelli, R., Chung, D. J., Lee, K. Y. (2013): Risedronate increases osteoblastic differentiation and function through connexin43. *Biochemical and biophysical research communications*, 432, 152-6.
- Jilka, R. L., Hangoc, G., Girasole, G., Passeri, G., Williams, D. C., Abrams, J. S., Boyce, B., Broxmeyer, H., Manolagas, S. C. (1992): Increased

osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6. *Science*, 257, 88-91.

Jilka, R. L., Noble, B., Weinstein, R. S. (2012): Osteocyte apoptosis. *Bone*.

Juppner, H., Abou-Samra, A. B., Freeman, M., Kong, X. F., Schipani, E., Richards, J., Kolakowski, L. F., Jr., Hock, J., Potts, J. T., Jr., Kronenberg, H. M., et al. (1991): A G protein-linked receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide. *Science*, 254, 1024-6.

Kaiser, E.; Dellling, G. (2002): Osteozyten – ein Organ im Aufwind morphologischer und

zellbiologischer Forschung. *Osteologie*, 11/4, 219-236.

Kallala, R., Graham, S. M., Nikkhah, D., Kyrkos, M., Heliotis, M., Mantalaris, A., Tsiridis, E. (2012): In vitro and in vivo effects of antibiotics on bone cell metabolism and fracture healing. *Expert opinion on drug safety*, 11, 15-32.

Kameda, T., Mano, H., Yuasa, T., Mori, Y., Miyazawa, K., Shiokawa, M., Nakamaru, Y., Hiroi, E., Hiura, K., Kameda, A., Yang, N. N., Hakeda, Y., Kumegawa, M. (1997): Estrogen inhibits bone resorption by directly inducing apoptosis of the bone-resorbing osteoclasts. *The Journal of experimental medicine*, 186, 489-95.

Kaspar, D., Hedrich, C. M., Schmidt, C., Liedert, A., Claes, L. E., Ignatius, A. A. (2005): [Diclofenac inhibits proliferation and matrix formation of osteoblast cells]. *Der Unfallchirurg*, 108, 18, 20-4.

Kasperk, C., Wergedal, J., Strong, D., Farley, J., Wangerin, K., Gropp, H., Ziegler, R., Baylink, D. J. (1995): Human bone cell phenotypes differ depending on their skeletal site of origin. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 80, 2511-7.

Kassem, M., Ankersen, L., Eriksen, E. F., Clark, B. F., Rattan, S. I. (1997): Demonstration of cellular aging and senescence in serially passaged long-term cultures of human trabecular osteoblasts. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, 7, 514-24.

Kassem, M., Marie, P. J. (2011): Senescence-associated intrinsic mechanisms of osteoblast dysfunctions. *Aging cell*, 10, 191-7.

Ketonis, C., Barr, S., Adams, C. S., Shapiro, I. M., Parvizi, J., Hickok, N. J. (2011a): Vancomycin bonded to bone grafts prevents bacterial colonization. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55, 487-94.

Ketonis, C., Barr, S., Shapiro, I. M., Parvizi, J., Adams, C. S., Hickok, N. J. (2011b): Antibacterial activity of bone allografts: comparison of a new vancomycin-tethered allograft with allograft loaded with adsorbed vancomycin. *Bone*, 48, 631-8.

Khosla, S. (2012): Pathogenesis of Age-Related Bone Loss in Humans. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*.

Khosla, S., Melton, L. J., 3rd, Atkinson, E. J., O'Fallon, W. M. (2001): Relationship of serum sex steroid levels to longitudinal changes in bone density in young versus elderly men. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 86, 3555-61.

Khosla, S., Melton, L. J., 3rd, Riggs, B. L. (2011): The unitary model for estrogen deficiency and the pathogenesis of osteoporosis: is a revision needed? *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 26, 441-51.

Khosla, S., Riggs, B. L., Atkinson, E. J., Oberg, A. L., McDaniel, L. J., Holets, M., Peterson, J. M., Melton, L. J., 3rd (2006): Effects of sex and age on bone microstructure at the ultradistal radius: a population-based noninvasive in vivo assessment. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 21, 124-31.

Kim, H. K., Kim, J. H., Abbas, A. A., Yoon, T. R. (2009): Alendronate enhances osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells: a preliminary study. *Clinical orthopaedics and related research*, 467, 3121-8.

Klebe, R. J., Caldwell, H., Milam, S. (1989): Cells transmit spatial information by orienting collagen fibers. *Matrix*, 9, 451-8.

Klein, B. Y., Ben-Bassat, H., Breuer, E., Solomon, V., Golomb, G. (1998): Structurally different bisphosphonates exert opposing effects on alkaline phosphatase and mineralization in marrow osteoprogenitors. *Journal of cellular biochemistry*, 68, 186-94.

Knelles, D., Barthel, T., Karrer, A., Kraus, U., Eulert, J., Kolbl, O. (1997): Prevention of heterotopic ossification after total hip replacement. A prospective, randomised study using acetylsalicylic acid, indomethacin and fractional or single-dose irradiation. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*, 79, 596-602.

Koch, F. P., Merkel, C., Al-Nawas, B., Smeets, R., Ziebart, T., Walter, C., Wagner, W. (2010a): Zoledronate, ibandronate and clodronate enhance osteoblast differentiation in a dose dependent manner - A quantitative in vitro gene expression analysis of Dlx5, Runx2, OCN, MSX1 and MSX2.

Journal of cranio-maxillo-facial surgery : official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery.

Koch, F. P., Merkel, C., Ziebart, T., Smeets, R., Walter, C., Al-Nawas, B. (2010b): Influence of bisphosphonates on the osteoblast RANKL and OPG gene expression in vitro. Clinical oral investigations.

Koch, F. P., Wunsch, A., Merkel, C., Ziebart, T., Pabst, A., Yekta, S. S., Blessmann, M., Smeets, R. (2011): The influence of bisphosphonates on human osteoblast migration and integrin α V β 3/tenascin C gene expression in vitro. Head & face medicine, 7, 4.

Koch, F. P., Yekta, S. S., Merkel, C., Ziebart, T., Smeets, R. (2010): The impact of bisphosphonates on the osteoblast proliferation and Collagen gene expression in vitro. Head & face medicine, 6, 12.

Konstantinidis, I., Papageorgiou, S. N., Kyrgidis, A., Tzellos, T. G., Kouvelas, D. (2012): Effect of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs on Bone Turnover: An Evidence-Based Review. Reviews on recent clinical trials.

Kornak U., Dellling G. und Mundlos S. (2003): Molekulare Mechanismen der Regulation

der Knochendichte durch Osteoklasten. Deutsches Ärzteblatt 100, 19, A-1258.

Krischak, G. D., Augat, P., Blakytyn, R., Claes, L., Kinzl, L., Beck, A. (2007a): The non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac reduces appearance of osteoblasts in bone defect healing in rats. Archives of orthopaedic and trauma surgery, 127, 453-8.

Krischak, G. D., Augat, P., Sorg, T., Blakytyn, R., Kinzl, L., Claes, L., Beck, A. (2007b): Effects of diclofenac on periosteal callus maturation in osteotomy healing in an animal model. Archives of orthopaedic and trauma surgery, 127, 3-9.

Kveiborg, M., Kassem, M., Langdahl, B., Eriksen, E. F., Clark, B. F., Rattan, S. I. (1999): Telomere shortening during aging of human osteoblasts in vitro and leukocytes in vivo: lack of excessive telomere loss in osteoporotic patients. Mechanisms of ageing and development, 106, 261-71.

Lanyon, L. E. (1993): Osteocytes, strain detection, bone modeling and remodeling. Calcified tissue international, 53 Suppl 1, S102-6.

Leder, B. Z., LeBlanc, K. M., Schoenfeld, D. A., Eastell, R., Finkelstein, J. S. (2003): Differential effects of androgens and estrogens on bone

turnover in normal men. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 88, 204-10.

Lee, S. H., Lee, J. E., Baek, W. Y., Lim, J. O. (2004): Regional delivery of vancomycin using pluronic F-127 to inhibit methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) growth in chronic otitis media in vitro and in vivo. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 96, 1-7.

Lepretre, S., Chai, F., Hornez, J. C., Vermet, G., Neut, C., Descamps, M., Hildebrand, H. F., Martel, B. (2009): Prolonged local antibiotics delivery from hydroxyapatite functionalised with cyclodextrin polymers. *Biomaterials*, 30, 6086-93.

Li, T. F., Zuscik, M. J., Ionescu, A. M., Zhang, X., Rosier, R. N., Schwarz, E. M., Drissi, H., O'Keefe, R. J. (2004): PGE2 inhibits chondrocyte differentiation through PKA and PKC signaling. *Experimental cell research*, 300, 159-69.

Li, X., Zhang, Y., Kang, H., Liu, W., Liu, P., Zhang, J., Harris, S. E., Wu, D. (2005): Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling. *The Journal of biological chemistry*, 280, 19883-7.

Liebich, H.-G. (1999): *Funktionelle Histologie: Histologie der Haussäugetiere*, Stuttgart, Schattauer.

Lindl (Hrsg.): (2000a): *Zell- und Gewebekultur: Spektrum Akademischer Verlag GmbH*.

Lindl, T. (2000b): *Zell- und Gewebekultur*.

Lu, C., Miclau, T., Hu, D., Hansen, E., Tsui, K., Puttlitz, C., Marcucio, R. S. (2005): Cellular basis for age-related changes in fracture repair. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, 23, 1300-7.

Lüllmann-Rauch (2009): *Taschenlehrbuch Histologie*, Stuttgart, Thieme.

Luo, G., Ducy, P., McKee, M. D., Pinero, G. J., Loyer, E., Behringer, R. R., Karsenty, G. (1997): Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature*, 386, 78-81.

Luu, Y. K., Capilla, E., Rosen, C. J., Gilsanz, V., Pessin, J. E., Judex, S., Rubin, C. T. (2009): Mechanical stimulation of mesenchymal stem cell proliferation and differentiation promotes osteogenesis while preventing dietary-induced obesity. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 24, 50-61.

Lynch, M. P., Stein, J. L., Stein, G. S., Lian, J. B. (1995): The influence of type I collagen on the development and maintenance of the osteoblast phenotype in primary and passaged rat calvarial osteoblasts: modification of expression of genes supporting cell growth, adhesion, and extracellular matrix mineralization. *Experimental cell research*, 216, 35-45.

M. F. Baslé, M. Lesourd, F. Grizon, C. Pascaretti, Chappard, D. (1998): Typ-I-Kollagen im xenogenen Knochenmaterial reguliert Anbindung und Verbreitung von Osteoblasten über die β 1-Integrin-Untereinheit. *Der Orthopäde*, 1998/02, 136-142.

Macfarlane, R. J., Ng, B. H., Gamie, Z., El Masry, M. A., Velonis, S., Schizas, C., Tsiridis, E. (2008): Pharmacological treatment of heterotopic ossification following hip and acetabular surgery. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 9, 767-86.

Maddalozzo, G. F., Turner, R. T., Edwards, C. H., Howe, K. S., Widrick, J. J., Rosen, C. J., Iwaniec, U. T. (2009): Alcohol alters whole body composition, inhibits bone formation, and increases bone marrow adiposity in rats. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, 20, 1529-38.

Manolagas, S. C. (2000): Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocrine reviews*, 21, 115-37.

Marie, P. J. (1994): Human osteoblastic cells: a potential tool to assess the etiology of pathologic bone formation. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 9, 1847-50.

Marie, P. J., Kassem, M. (2011): Extrinsic mechanisms involved in age-related defective bone formation. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 96, 600-9.

Marie, P. J., Lomri, A., Sabbagh, A., Basle, M. (1989): Culture and behavior of osteoblastic cells isolated from normal trabecular bone surfaces. *In vitro cellular & developmental biology : journal of the Tissue Culture Association*, 25, 373-80.

Marie, P. J., Zerath, E. (2000): Role of growth factors in osteoblast alterations induced by skeletal unloading in rats. *Growth factors*, 18, 1-10.

Martin, T. J., Sims, N. A. (2005): Osteoclast-derived activity in the coupling of bone formation to resorption. *Trends in molecular medicine*, 11, 76-81.

Marx, R. E., Sawatari, Y., Fortin, M., Broumand, V. (2005): Bisphosphonate-induced exposed bone (osteonecrosis/osteopetrosis) of

the jaws: risk factors, recognition, prevention, and treatment. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, 63, 1567-75.

Masi, L., Franchi, A., Santucci, M., Danielli, D., Arganini, L., Giannone, V., Formigli, L., Benvenuti, S., Tanini, A., Beghe, F., et al. (1992): Adhesion, growth, and matrix production by osteoblasts on collagen substrata. *Calcified tissue international*, 51, 202-12.

Matziolis G, Rau HM, Klever P, Erli HJ, O, Paar (2002): Modification of human osteoblasts by various analgesics. *Unfallchirurg* 105, 527-531.

Mayer, Siems (2011): 100 Krankheitsbilder in der Physiotherapie, Springer Verlag.

McDonald, J. C., Duffy, D. C., Anderson, J. R., Chiu, D. T., Wu, H., Schueller, O. J., Whitesides, G. M. (2000): Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). *Electrophoresis*, 21, 27-40.

McKibbin, B. (1978): The biology of fracture healing in long bones. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*, 60-B, 150-62.

McPherson, J. M., Wallace, D. G., Sawamura, S. J., Conti, A., Condell, R. A., Wade, S., Piez, K. A. (1985): Collagen fibrillogenesis in vitro: a characterization of fibril quality as a function of assembly conditions. *Collagen and related research*, 5, 119-35.

Mehta, M., Strube, P., Peters, A., Perka, C., Hutmacher, D., Fratzl, P., Duda, G. N. (2010): Influences of age and mechanical stability on volume, microstructure, and mineralization of the fracture callus during bone healing: is osteoclast activity the key to age-related impaired healing? *Bone*, 47, 219-28.

Meyer, R. A., Jr., Tsahakis, P. J., Martin, D. F., Banks, D. M., Harrow, M. E., Kiebzak, G. M. (2001): Age and ovariectomy impair both the normalization of mechanical properties and the accretion of mineral by the fracture callus in rats. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, 19, 428-35.

Meyers, V. E., Zayzafoon, M., Gonda, S. R., Gathings, W. E., McDonald, J. M. (2004): Modeled microgravity disrupts collagen I/integrin signaling during osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Journal of cellular biochemistry*, 93, 697-707.

Miyamoto, T., Suda, T. (2003): Differentiation and function of osteoclasts. *The Keio journal of medicine*, 52, 1-7.

- Murthy, S. S. (1998): Some insight into the physical basis of the cryoprotective action of dimethyl sulfoxide and ethylene glycol. *Cryobiology*, 36, 84-96.
- Nakahama, K. (2010): Cellular communications in bone homeostasis and repair. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 67, 4001-9.
- Needleman, P., Turk, J., Jakschik, B. A., Morrison, A. R., Lefkowitz, J. B. (1986): Arachidonic acid metabolism. *Annual review of biochemistry*, 55, 69-102.
- Nelson, D. A., Simpson, P. M., Johnson, C. C., Barondess, D. A., Kleerekoper, M. (1997): The accumulation of whole body skeletal mass in third- and fourth-grade children: effects of age, gender, ethnicity, and body composition. *Bone*, 20, 73-8.
- Nieminen, S., Nurmi, M., Satokari, K. (1981): Healing of femoral neck fractures; influence of fracture reduction and age. *Annales chirurgiae et gynaecologiae*, 70, 26-31.
- Nijweide, P. J., Mulder, R. J. (1986): Identification of osteocytes in osteoblast-like cell cultures using a monoclonal antibody specifically directed against osteocytes. *Histochemistry*, 84, 342-7.
- Nilsson, B. E., Edwards, P. (1969): Age and fracture healing: a statistical analysis of 418 cases of tibial shaft fractures. *Geriatrics*, 24, 112-7.
- Nishikawa, K., Nakashima, T., Takeda, S., Isogai, M., Hamada, M., Kimura, A., Kodama, T., Yamaguchi, A., Owen, M. J., Takahashi, S., Takayanagi, H. (2010): Maf promotes osteoblast differentiation in mice by mediating the age-related switch in mesenchymal cell differentiation. *The Journal of clinical investigation*, 120, 3455-65.
- Noble, B. S., Reeve, J. (2000): Osteocyte function, osteocyte death and bone fracture resistance. *Molecular and cellular endocrinology*, 159, 7-13.
- O'Brien, C. A., Jia, D., Plotkin, L. I., Bellido, T., Powers, C. C., Stewart, S. A., Manolagas, S. C., Weinstein, R. S. (2004): Glucocorticoids act directly on osteoblasts and osteocytes to induce their apoptosis and reduce bone formation and strength. *Endocrinology*, 145, 1835-41.
- Okamoto, F., Kajiya, H., Fukushima, H., Jimi, E., Okabe, K. (2004): Prostaglandin E2 activates outwardly rectifying Cl(-) channels via a cAMP-dependent pathway and reduces cell motility in rat osteoclasts. *American journal of physiology. Cell physiology*, 287, C114-24.
- Orriss, I. R., Key, M. L., Colston, K. W., Arnett, T. R. (2009): Inhibition of osteoblast function in vitro by aminobisphosphonates. *Journal of cellular biochemistry*, 106, 109-18.

- Oyama M., Emerton ME., JJO., Francis, al., et (1998): The effect of cefuroxime, ciprofloxacin, flucloxacillin and vancomycin on human osteoblast-like cells in vitro. *JBone*, 80 B.
- Parfitt, A. M., Villanueva, A. R., Foldes, J., Rao, D. S. (1995): Relations between histologic indices of bone formation: implications for the pathogenesis of spinal osteoporosis. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 10, 466-73.
- Pataki, A., Muller, K., Green, J. R., Ma, Y. F., Li, Q. N., Jee, W. S. (1997): Effects of short-term treatment with the bisphosphonates zoledronate and pamidronate on rat bone: a comparative histomorphometric study on the cancellous bone formed before, during, and after treatment. *The Anatomical record*, 249, 458-68.
- Perren, S. M. (1992): [Biomechanical basis of fracture treatment]. *Der Orthopade*, 21, 3-10.
- Pietschmann, P., Rauner, M., Sipos, W., Kersch-Schindl, K. (2009): Osteoporosis: an age-related and gender-specific disease--a mini-review. *Gerontology*, 55, 3-12.
- Plotkin, L. I., Weinstein, R. S., Parfitt, A. M., Roberson, P. K., Manolagas, S. C., Bellido, T. (1999): Prevention of osteocyte and osteoblast apoptosis by bisphosphonates and calcitonin. *The Journal of clinical investigation*, 104, 1363-74.
- Pomerat, C. M., Moorhead, P. S. (1956): Thermal stress and tissue culture. VII. The effect of glycerol on cells with special reference to protection against freezing. *Texas reports on biology and medicine*, 14, 237-53.
- Pountos, I., Georgouli, T., Calori, G. M., Giannoudis, P. V. (2012): Do nonsteroidal anti-inflammatory drugs affect bone healing? A critical analysis. *TheScientificWorldJournal*, 2012, 606404.
- Pozzi, S., Vallet, S., Mukherjee, S., Cirstea, D., Vaghela, N., Santo, L., Rosen, E., Ikeda, H., Okawa, Y., Kiziltepe, T., Schoonmaker, J., Xie, W., Hideshima, T., Weller, E., Bouxsein, M. L., Munshi, N. C., Anderson, K. C., Raje, N. (2009): High-dose zoledronic acid impacts bone remodeling with effects on osteoblastic lineage and bone mechanical properties. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 15, 5829-39.
- Probst, A., Spiegel, H. U. (1997): Cellular mechanisms of bone repair. *Journal of investigative surgery : the official journal of the Academy of Surgical Research*, 10, 77-86.

Radasch, R. M. (1999): Biomechanics of bone and fractures. The Veterinary clinics of North America. Small animal practice, 29, 1045-82, v-vi.

Rathbone, C. R., Cross, J. D., Brown, K. V., Murray, C. K., Wenke, J. C. (2011): Effect of various concentrations of antibiotics on osteogenic cell viability and activity. Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society, 29, 1070-4.

Rauber, Kopsch (2003): Anatomie des Menschen.

Reinholz, G. G., Getz, B., Pederson, L., Sanders, E. S., Subramaniam, M., Ingle, J. N., Spelsberg, T. C. (2000): Bisphosphonates directly regulate cell proliferation, differentiation, and gene expression in human osteoblasts. Cancer research, 60, 6001-7.

Remedios, A. (1999): Bone and bone healing. The Veterinary clinics of North America. Small animal practice, 29, 1029-44, v.

Remmele, W., Stegner, H. E. (1987): [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. Der Pathologe, 8, 138-40.

Riggs, B. L., Melton, L. J., 3rd (1986): Involutional osteoporosis. The New England journal of medicine, 314, 1676-86.

Riggs, B. L., Melton, L. J., Robb, R. A., Camp, J. J., Atkinson, E. J., McDaniel, L., Amin, S., Rouleau, P. A., Khosla, S. (2008): A population-based assessment of rates of bone loss at multiple skeletal sites: evidence for substantial trabecular bone loss in young adult women and men. Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research, 23, 205-14.

Riikonen, T., Koivisto, L., Vihinen, P., Heino, J. (1995): Transforming growth factor-beta regulates collagen gel contraction by increasing alpha 2 beta 1 integrin expression in osteogenic cells. The Journal of biological chemistry, 270, 376-82.

Ritter, M. A., Sieber, J. M. (1985): Prophylactic indomethacin for the prevention of heterotopic bone formation following total hip arthroplasty. Clinical orthopaedics and related research, 217-25.

Robling, A. G., Niziolek, P. J., Baldridge, L. A., Condon, K. W., Allen, M. R., Alam, I., Mantila, S. M., Gluhak-Heinrich, J., Bellido, T. M., Harris, S. E., Turner, C. H. (2008): Mechanical stimulation of bone in vivo reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin. The Journal of biological chemistry, 283, 5866-75.

Rodrigues, A. M., Caetano-Lopes, J., Vale, A. C., Aleixo, I., Pena, A. S., Faustino, A., Sepriano, A., Polido-Pereira, J., Vieira-Sousa, E., Lucas, R., Romeu, J. C., Monteiro, J., Vaz, M. F., Fonseca, J. E., Canhao, H. (2012a): Smoking is a predictor of worse trabecular mechanical performance in hip fragility fracture patients. *Journal of bone and mineral metabolism*, 30, 692-9.

Rodrigues, A. M., Caetano-Lopes, J., Vale, A. C., Vidal, B., Lopes, A., Aleixo, I., Polido-Pereira, J., Sepriano, A., Perpetuo, I. P., Monteiro, J., Vaz, M. F., Fonseca, J. E., Canhao, H. (2012b): Low osteocalcin/collagen type I bone gene expression ratio is associated with hip fragility fractures. *Bone*, 51, 981-9.

Rosen, C. J., Ackert-Bicknell, C., Rodriguez, J. P., Pino, A. M. (2009): Marrow fat and the bone microenvironment: developmental, functional, and pathological implications. *Critical reviews in eukaryotic gene expression*, 19, 109-24.

Ruß, A., Endres, S. (2011): *Arzenimittelpocket plus*, Grünwald, Börm Bruckmeier Verlag.

Russell, R. G., Rogers, M. J. (1999): Bisphosphonates: from the laboratory to the clinic and back again. *Bone*, 25, 97-106.

S. Sell, M. Teschner, C. Gaissmaier, F. Martini, S. A. Weidner, 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.

Satish, G., Kandlikar, SG. (2006): *Heat Transfer and Fluid Flow in Minichannels and Microchannels*, Elsevier.

Sawhney, R. K., Howard, J. (2002): Slow local movements of collagen fibers by fibroblasts drive the rapid global self-organization of collagen gels. *The Journal of cell biology*, 157, 1083-91.

Schell, H., Lienau, J., Epari, D. R., Seebeck, P., Exner, C., Muchow, S., Bragulla, H., Haas, N. P., Duda, G. N. (2006): Osteoclastic activity begins early and increases over the course of bone healing. *Bone*, 38, 547-54.

Seeman, E. (2008): Structural basis of growth-related gain and age-related loss of bone strength. *Rheumatology*, 47 Suppl 4, iv2-8.

Sell, S., Teschner, M., Gaissmaier, C., Martini, F., Weidner, S. A., Kusswetter, W. (1999): [Effect of diclofenac on human osteoblasts and their stromal precursors in vitro in relation to arthroplasty]. *Zeitschrift für Rheumatologie*, 58, 13-20.

Shamir, D., Keila, S., Weinreb, M. (2004): A selective EP4 receptor antagonist abrogates the stimulation of osteoblast recruitment from bone marrow stromal cells by prostaglandin E2 in vivo and in vitro. *Bone*, 34, 157-62.

Shoulders, M. D., Raines, R. T. (2009): Collagen structure and stability. *Annual review of biochemistry*, 78, 929-58.

Sidorova, J. M., Li, N., Schwartz, D. C., Folch, A., Monnat, R. J., Jr. (2009): Microfluidic-assisted analysis of replicating DNA molecules. *Nature protocols*, 4, 849-61.

Siewert, J-R (2012): *Chirurgie*. Berlin: Springer Verlag.

Silver, F. H., Freeman, J. W., Seehra, G. P. (2003): Collagen self-assembly and the development of tendon mechanical properties. *Journal of biomechanics*, 36, 1529-53.

Simmons, D. J. (1985): Fracture healing perspectives. *Clinical orthopaedics and related research*, 100-13.

Simon, A. M., O'Connor, J. P. (2007): Dose and time-dependent effects of cyclooxygenase-2 inhibition on fracture-healing. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, 89, 500-11.

Simonsen, J. L., Rosada, C., Serakinci, N., Justesen, J., Stenderup, K., Rattan, S. I., Jensen, T. G., Kassem, M. (2002): Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells. *Nature biotechnology*, 20, 592-6.

Sittig, H. B. (2012): Pathogenesis and bisphosphonate treatment of skeletal events and bone pain in metastatic cancer: focus on ibandronate. *Onkologie*, 35, 380-7.

Smalley, K. S., Lioni, M., Herlyn, M. (2006): Life isn't flat: taking cancer biology to the next dimension. *In vitro cellular & developmental biology. Animal*, 42, 242-7.

Sowers, M. R., Zheng, H., Jannausch, M. L., McConnell, D., Nan, B., Harlow, S., Randolph, J. F., Jr. (2010): Amount of bone loss in relation to time around the final menstrual period and follicle-stimulating hormone staging of the transmenopause. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 95, 2155-62.

Spiro, A. S., Beil, F. T., Baranowsky, A., Barvencik, F., Schilling, A. F., Nguyen, K., Khadem, S., Seitz, S., Rueger, J. M., Schinke, T., Amling, M. (2010): BMP-7-induced ectopic bone formation and fracture healing is impaired by systemic NSAID application in C57BL/6-mice. *Journal of*

orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society, 28, 785-91.

Stenderup, K., Justesen, J., Clausen, C., Kassem, M. (2003): Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone*, 33, 919-26.

Stenderup, K., Justesen, J., Eriksen, E. F., Rattan, S. I., Kassem, M. (2001): Number and proliferative capacity of osteogenic stem cells are maintained during aging and in patients with osteoporosis. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 16, 1120-9.

Stewart, S., Barr, S., Engiles, J., Hickok, N. J., Shapiro, I. M., Richardson, D. W., Parvizi, J., Schaer, T. P. (2012): Vancomycin-modified implant surface inhibits biofilm formation and supports bone-healing in an infected osteotomy model in sheep: a proof-of-concept study. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, 94, 1406-15.

Stringer, B., Waddington, R., Houghton, A., Stone, M., Russell, G., Foster, G. (2007): Serum from postmenopausal women directs differentiation of human clonal osteoprogenitor cells from an osteoblastic toward an adipocytic phenotype. *Calcified tissue international*, 80, 233-43.

Sung, K. E., Su, G., Pehlke, C., Trier, S. M., Eliceiri, K. W., Keely, P. J., Friedl, A., Beebe, D. J. (2009): Control of 3-dimensional collagen matrix polymerization for reproducible human mammary fibroblast cell culture in microfluidic devices. *Biomaterials*, 30, 4833-41.

Suzuki, H., Amizuka, N., Oda, K., Li, M., Yoshie, H., Ohshima, H., Noda, M., Maeda, T. (2005): Histological evidence of the altered distribution of osteocytes and bone matrix synthesis in klotho-deficient mice. *Archives of histology and cytology*, 68, 371-81.

Swaminathan, R. (2001): Biochemical markers of bone turnover. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 313, 95-105.

Swarthout, J. T., D'Alonzo, R. C., Selvamurugan, N., Partridge, N. C. (2002): Parathyroid hormone-dependent signaling pathways regulating genes in bone cells. *Gene*, 282, 1-17.

Syed, F. A., Hoey, K. A. (2010): Integrative physiology of the aging bone: insights from animal and cellular models. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1211, 95-106.

Syed, F. A., Ng, A. C. (2010): The pathophysiology of the aging skeleton. *Current osteoporosis reports*, 8, 235-40.

Szulc, P., Chapuy, M. C., Meunier, P. J., Delmas, P. D. (1993): Serum undercarboxylated osteocalcin is a marker of the risk of hip fracture in elderly women. *The Journal of clinical investigation*, 91, 1769-74.

Taes, Y., Lapauw, B., Vanbillemont, G., Bogaert, V., De Bacquer, D., Goemaere, S., Zmierzak, H., Kaufman, J. M. (2010): Early smoking is associated with peak bone mass and prevalent fractures in young, healthy men. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 25, 379-87.

Takeuchi, Y., Suzawa, M., Kikuchi, T., Nishida, E., Fujita, T., Matsumoto, T. (1997): Differentiation and transforming growth factor-beta receptor down-regulation by collagen-alpha2beta1 integrin interaction is mediated by focal adhesion kinase and its downstream signals in murine osteoblastic cells. *The Journal of biological chemistry*, 272, 29309-16.

Tan, W., Desai, T. A. (2003): Microfluidic patterning of cells in extracellular matrix biopolymers: effects of channel size, cell type, and matrix composition on pattern integrity. *Tissue engineering*, 9, 255-67.

Tanaka, S., Narusawa, K., Onishi, H., Miura, M., Hijioka, A., Kanazawa, Y., Nishida, S., Ikeda, S., Nakamura, T. (2011): Lower osteocalcin and osteopontin contents of the femoral head in hip fracture patients than osteoarthritis patients. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, 22, 587-97.

Tanaka, Y. (2013): [Functional Network between Bone and Organs. Glucocorticoid and bone metabolism and disease]. *Clinical calcium*, 23, 229-35.

Tang, Y., Wu, X., Lei, W., Pang, L., Wan, C., Shi, Z., Zhao, L., Nagy, T. R., Peng, X., Hu, J., Feng, X., Van Hul, W., Wan, M., Cao, X. (2009): TGF-beta1-induced migration of bone mesenchymal stem cells couples bone resorption with formation. *Nature medicine*, 15, 757-65.

Tonna, E. A. (1975): Accumulation of lipofuscin (age pigment) in aging skeletal connective tissues as revealed by electron microscopy. *Journal of gerontology*, 30, 3-8.

Vaananen, H. K., Horton, M. (1995): The osteoclast clear zone is a specialized cell-extracellular matrix adhesion structure. *Journal of cell science*, 108 (Pt 8), 2729-32.

Vanderschueren, D., Vandenput, L., Boonen, S., Lindberg, M. K., Bouillon, R., Ohlsson, C. (2004): Androgens and bone. *Endocrine reviews*, 25, 389-425.

Vane, J. R., Botting, R. M. (1998): Mechanism of action of antiinflammatory drugs. *International journal of tissue reactions*, 20, 3-15.

Vassiliou, E., Jing, H., Ganea, D. (2003): Prostaglandin E2 inhibits TNF production in murine bone marrow-derived dendritic cells. *Cellular immunology*, 223, 120-32.

Verborgt, O., Tatton, N. A., Majeska, R. J., Schaffler, M. B. (2002): Spatial distribution of Bax and Bcl-2 in osteocytes after bone fatigue: complementary roles in bone remodeling regulation? *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 17, 907-14.

Viereck, V., Emons, G., Lauck, V., Frosch, K. H., Blaschke, S., Grundker, C., Hofbauer, L. C. (2002): Bisphosphonates pamidronate and zoledronic acid stimulate osteoprotegerin production by primary human osteoblasts. *Biochemical and biophysical research communications*, 291, 680-6.

von Knoch, F., Jaquiere, C., Kowalsky, M., Schaeren, S., Alabre, C., Martin, I., Rubash, H. E., Shanbhag, A. S. (2005): Effects of bisphosphonates on proliferation and osteoblast differentiation of human bone marrow stromal cells. *Biomaterials*, 26, 6941-9.

Vrotsos, Y., Miller, S. C., Marks, S. C., Jr. (2003): Prostaglandin E--a powerful anabolic agent for generalized or site-specific bone formation. *Critical reviews in eukaryotic gene expression*, 13, 255-63.

Vuolteenaho, K., Moilanen, T., Moilanen, E. (2008): Non-steroidal anti-inflammatory drugs, cyclooxygenase-2 and the bone healing process. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 102, 10-4.

Walter, C., Al-Nawas, B., du Bois, A., Buch, L., Harter, P., Grotz, K. A. (2009): Incidence of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws in breast cancer patients. *Cancer*, 115, 1631-7.

Waters, D. L., Ward, A. L., Villareal, D. T. (2013): Weight loss in obese adults 65years and older: A review of the controversy. *Experimental gerontology*.

Weibel, D.B., Kruithof, Potenta (2005): Torque-Actuated Valves for Microfluidics. *Anal. Chem*, 77, 4726-4733.

Welsch (2010): *Sobotta Lehrbuch Histologie*. München: Elsevier.

Winkler, H. (2009): Rationale for one stage exchange of infected hip replacement using uncemented implants and antibiotic impregnated bone graft. *International journal of medical sciences*, 6, 247-52.

Wood, G. C. (1960): The formation of fibrils from collagen solutions. 2. A mechanism of collagen-fibril formation. *The Biochemical journal*, 75, 598-605.

Xiong, Y., Yang, H. J., Feng, J., Shi, Z. L., Wu, L. D. (2009): Effects of alendronate on the proliferation and osteogenic differentiation of MG-63 cells. *The Journal of international medical research*, 37, 407-16.

Yang, C. C., Lin, C. C., Liao, J. W., Yen, S. K. (2013): Vancomycin-chitosan composite deposited on post porous hydroxyapatite coated Ti6Al4V implant for drug controlled release. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 33, 2203-12.

Yang, M., Huang, L., Xiao, L., Liao, E. (2012): [Effects of mechanical stimulation on proliferation and differentiation in MG-63 osteoblast-like cells]. *Sheng wu yi xue gong cheng xue za zhi = Journal of biomedical engineering = Shengwu yixue gongchengxue zazhi*, 29, 894-7.

Zanatta, M., Valenti, M. T., Donatelli, L., Zucal, C., Dalle Carbonare, L. (2012): Runx-2 gene expression is associated with age-related changes of bone mineral density in the healthy young-adult population. *Journal of bone and mineral metabolism*, 30, 706-14.

Zhang, L. F., Yang de, J., Chen, H. C., Sun, R., Xu, L., Xiong, Z. C., Govender, T., Xiong, C. D. (2008): An ionically crosslinked hydrogel containing vancomycin coating on a porous scaffold for drug delivery and cell culture. *International journal of pharmaceutics*, 353, 74-87.

Zhou, S., Greenberger, J. S., Epperly, M. W., Goff, J. P., Adler, C., Leboff, M. S., Glowacki, J. (2008): Age-related intrinsic changes in human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells and their differentiation to osteoblasts. *Aging cell*, 7, 335-43.

6.2 Tabellenverzeichnis

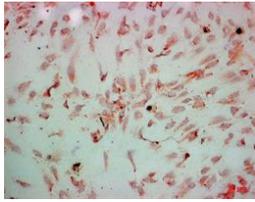
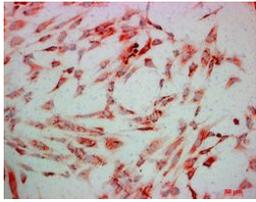
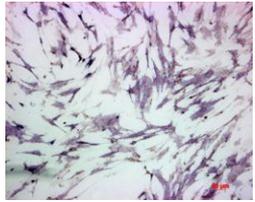
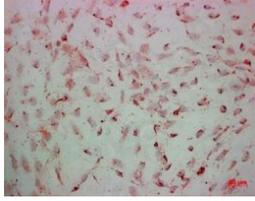
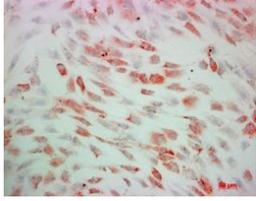
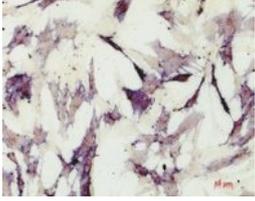
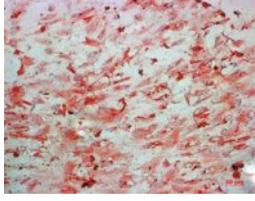
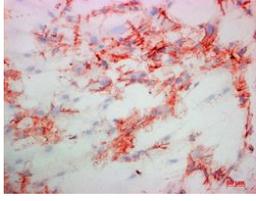
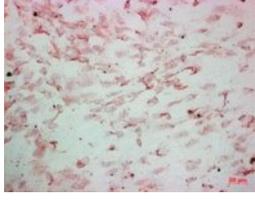
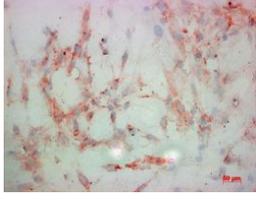
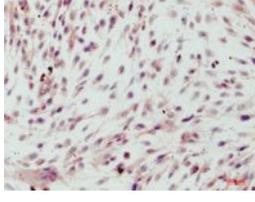
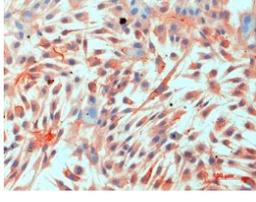
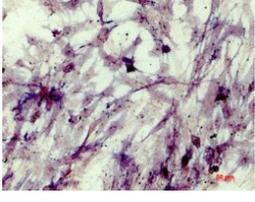
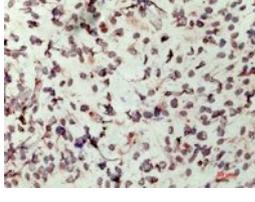
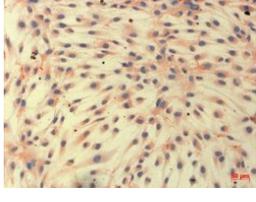
Tab. 1: Auflistung und Zusammensetzung der verwendeten Medien	19
Tab. 2: Kultivierungsgefäße mit ihren empfohlenen Zelldichten	25
Tab. 3: Konzentrationen und Mischungsverhältnisse der verwendeten Medikamente für das Medium 2.....	29
Tab. 4: Anordnung der immunhistochemischen Färbungen mit der jeweiligen AK-Verdünnung auf chamber slides	31
Tab. 5: Patientendaten mit Angaben zu Geschlecht, Alter, Nebenerkrankungsprofil (NE), Medikamenten sowie Entnahmestelle	43
Tab. 6: Zusammensetzung der Extrazellulärmatrix des Knochens	62

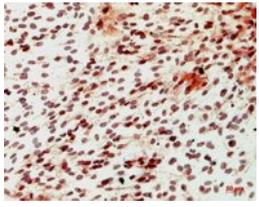
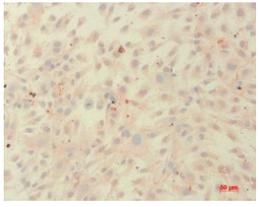
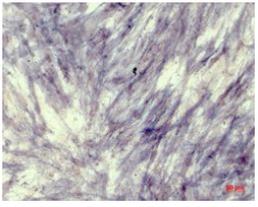
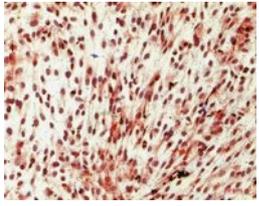
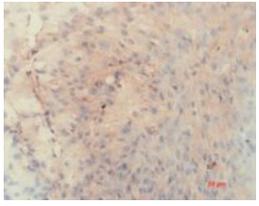
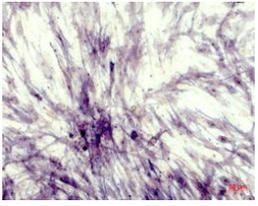
6.3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Neubauerzählkammer: Nur die grün dargestellten Zellen werden in der Formel berücksichtigt; rote Zellen dürfen nicht gezählt werden.	26
Abb. 2: Prinzip der Lithografie	34
Abb. 3: Herstellung der homogenen Fotolackbeschichtung	35
Abb. 4: Vergleich von Patient Nr. 1 in Matrizen mit 40%- und 80%igem Kollagen über einen Zeitraum von 20 h (n=6 pro Messung).....	45
Abb. 5: Vergleich von Patient Nr. 2 in Matrizen mit 40%- und 80%igem Kollagen über einen Zeitraum von 20 h (n=6 pro Messung).....	46
Abb. 6: Vergleich von Patient Nr. 3 in Matrizen mit 40%- und 80%igem Kollagen über einen Zeitraum von 20 h (n=3 für 40%; n=6 für 80%).....	47
Abb. 7: Vergleich von Patient Nr. 4 in Matrizen mit 40%- und 80%igem Kollagen über einen Zeitraum von 20 h (n=3 pro Messung).....	48
Abb. 8: Vergleich der Kollagenbreiten von unterschiedlichen Patienten in einer 80%igen Kollagenmatrix gemittelt aus mehreren Passagen (2-9), dargestellt in Prozent.....	49
Abb. 9: Vergleich der vier Patienten in der vierten Passage in einer 80%igen Kollagenmatrix (n=15, n=18, n=12, n=9), dargestellt in Prozent.....	51
Abb. 10: Zellpool unter dem Einfluss verschiedener Medikamente im Vergleich zu unbehandelten Zellen am Tag 7 der Inkubationszeit (n=6, n=12, n=6, n=6), dargestellt in Prozent	53

Abb. 11: Zellpool unter Einfluss von verschiedenen Medikamenten im Vergleich zu unbehandelten Zellen am Tag 8 der Inkubationszeit (n=6, n=3, n=12, n=6), dargestellt in Prozent	54
Abb. 12: Zellpool unter Einfluss von verschiedenen Medikamenten im Vergleich zu unbehandelten Zellen an Tag 13 der Inkubationszeit (n=6, n=12, n=6, n=6), dargestellt in Prozent	55
Abb. 13: Zellpool unter Einfluss verschiedener Medikamenten im Vergleich zu unbehandelten Zellen an Tag 14 der Inkubationszeit (n=6, n=6, n=5, n=12), dargestellt in Prozent	56
Abb. 14: Expression von Osteocalcin (OC), Kollagen I (Kol I) und alkalischer Phosphatase (AP) der Patientenzellen Nr. 1-4, dargestellt nach dem IR-Score	57
Abb. 15: Expression von Osteocalcin (OC), Kollagen I (Kol I) und alkalischer Phosphatase (AP) beim unbehandeltem und medikamentenbehandeltem Zellpool, dargestellt nach dem IR-Score.....	58
Abb. 16: Zell-Matrix-Interaktion des unbehandelten Zellpools über 20 h (siehe Kapitel 3.5.2, Abb.11).....	77
Abb. 17: Elongierte Zelle (*) in einer Kollagen-I-Matrix.....	80

6.4 Immunhistochemie/Enzym-Substrat-Reaktion

	Osteocalcin	Kollagen I	Alkalische Phosphatase
Patient Nr. 1			
Patient Nr. 2			
Patient Nr. 3			
Patient Nr. 4			
Zellpool unbehandelt			
Zellpool Diclofenac			

<p>Zellpool Ibandron- säure</p>			
<p>Zellpool Vancomycin</p>			

6.5 Danksagung

Für die Entstehung dieser Arbeit danke ich

Herrn PD Dr.med. Rainer Burgkart für die Überlassung dieses Themas, die vielen hilfreichen Besprechungen und den Ansporn,

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Rüdiger von Eisenhart-Rothe, Direktor der Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie im Klinikum rechts der Isar, für die exzellenten Arbeitsbedingungen im orthopädischen Zellkulturlabor,

Herrn Prof. Dr. Andreas Bausch, Lehrstuhlinhaber für Biozellphysik TU München Garching, und **seiner Arbeitsgruppe** für die hervorragenden Arbeitsbedingungen im Labor der Zellbiophysik TU München Garching sowie der ideenreichen Unterstützung und Hilfestellung.

Mein besonderer Dank geht an

Herrn Dr. med. Johannes Schauwecker und **Dr. Pablo Fernandez** für die intensive und herzliche Betreuung,

Belma Saldamli und **Jutta Tübel** für die fachliche Unterstützung,

Frauke Wilken und **Florian Hilz** für die tolle Arbeitsatmosphäre im Labor und die vielen Hilfestellungen,

und zuletzt **meiner Familie** für den großartigen moralischen Beistand.

6.6 Lebenslauf

Giulia Virginia Jarosch geb. Baumhauer

Geboren am 10.08.1987 in Ratingen

Schulabschluss:

05/2006 Abitur, Annette-von-Droste-Hülshoff-
Gymnasium, Düsseldorf; Note: 1,6

Studium:

10/2006 –10/2012 Studium der Humanmedizin LMU München
Gesamtnote ärztliche Prüfung: gut (1,83)

Praktisches Jahr:

Innere Medizin: Klinikum Schwabing,
München

Gynäkologie: Klinikum Dritter Orden,
München

Chiurgie 1: Katutura Hospital, Windhoek,
Namibia

Chirurgie 2: Erasmus MC, Rotterdam,
Niederlande

Promotion:

Seit 03/2010 Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie,
Klinikum Rechts der Isar, München,
Univ.-Prof. Dr. R. v. Eisenhart-Rothe

Assistenzärztin

Seit 07/2013 Pneumologie, Klinikum Bogenhausen,
München, Prof. Dr. med F. Joachim Meyer