

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

Pharmakawirkung auf *in vitro* kultivierte primäre humane Osteoblasten

Ivonne N. Kalinowski

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. Burgkart
2. Univ.-Prof. Dr. R. von Eisenhart-Rothe

Die Dissertation wurde am 14.10.2015 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 06.04.2016 angenommen.

In Liebe

für meine Eltern Hans und Isolde Kalinowski

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	7
1.1 Motivation	7
1.2 Fragestellung	10
2 Grundlagen der Knochenphysiologie	11
3 Material und Methoden	13
3.1 Versuchsaufbau	13
3.2 Verwendete Materialien	14
3.2.1 Verbrauchsmaterialien und Geräte	14
3.2.2 Puffer und Lösungen	16
3.3 Zellkultur	18
3.3.1 Gewinnung der primären humanen Osteoblasten	18
3.3.2 Kultivierung der primären humanen Osteoblasten	20
3.4 Verwendete Pharmaka und Verdünnungsreihen	24
3.4.1 Inkubation, Verdünnungsreihen und Plattenbelegung von Cefotiam (Spizef®) und Ceftriaxon (Rocephin®)	25
3.4.2 Inkubation, Verdünnungsreihen und Plattenbelegung von Linezolid (Zyvoxid®)	27
3.4.3 Inkubation, Verdünnungsreihen und Plattenbelegung von Parecoxib (Dynastat®)	28
3.4.4 Inkubation, Verdünnungsreihen und Plattenbelegung von Ibandronat (Bondronat®)	29
3.5 Bestimmung der Zellzahl und Vitalitätskontrolle	30
3.6 DNA-Quantifizierung	31
3.7 Bestimmung der Zellproliferation durch MTT-Test.....	34
3.8 Bestimmung des Gesamtproteins durch BCA-Assay.....	34
3.9 Bestimmung der Apoptoserate über Caspase 3,7 Aktivität.....	36
3.10 Bestimmung der Zellaktivität durch ALP-Aktivitäts-Assay.....	37
3.11 Quantitative Bestimmung des Calciumgehaltes	38
3.12 Mineralisationsnachweis - Alizarinrot-Färbung zur Calciumbestimmung	41
3.13 Immunzytochemischer Nachweis osteoblastencharakteristischer Marker zur Zelltypisierung.....	41
3.13.1 Immunzytochemischer Nachweis der Alkalischen Phosphatase	42
3.13.2 Immunzytochemischer Nachweis des Kollagen Typ I	43

3.13.3 Immunzytochemischer Nachweis des Osteocalcin.....	43
3.14 Statistik und Datenerfassung	44
4 Ergebnisse.....	45
4.1 Immunzytochemische Nachweise	45
4.1.1 Nachweis der Alkalischen Phosphatase	45
4.1.2 Nachweis von Kollagen Typ I.....	46
4.1.3 Nachweis von Osteocalcin.....	47
4.2 Ergebnisse Cefotiam (Spizef®).....	48
4.2.1 Bestimmung der Zellzahl und Vitalitätskontrolle.....	48
4.2.2 DNA-Quantifizierung.....	49
4.2.3 Bestimmung der Zellproliferation	50
4.2.4 Bestimmung des Gesamtproteins	51
4.2.5 Bestimmung der Apoptoserate.....	52
4.2.6 Bestimmung der Zellaktivität durch ALP-Messung.....	53
4.2.7 Mineralisationsnachweis durch Bestimmung des Calciumgehaltes.....	54
4.3 Ergebnisse Ceftriaxon (Rocephin®).....	56
4.3.1 Bestimmung der Zellzahl und Vitalitätskontrolle.....	56
4.3.2 DNA-Quantifizierung.....	57
4.3.3 Bestimmung der Zellproliferation	58
4.3.4 Bestimmung des Gesamtproteins	59
4.3.5 Bestimmung der Apoptoserate.....	60
4.3.6 Bestimmung der Zellaktivität.....	61
4.3.7 Mineralisationsnachweis durch Bestimmung des Calciumgehaltes.....	62
4.4 Ergebnisse Linezolid (Zyvoxid®).....	64
4.4.1 Bestimmung der Zellzahl und Vitalitätskontrolle.....	64
4.4.2 DNA-Quantifizierung.....	65
4.4.3 Bestimmung der Zellproliferation	66
4.4.4 Bestimmung des Gesamtproteins	67
4.4.5 Bestimmung der Apoptoserate.....	68
4.4.6 Bestimmung der Zellaktivität.....	69
4.4.7 Mineralisationsnachweis durch Bestimmung des Calciumgehaltes.....	69
4.5 Ergebnisse Parecoxib (Dynastat®)	72
4.5.1 Bestimmung der Zellzahl und Vitalitätskontrolle.....	72
4.5.2 DNA-Quantifizierung.....	73
4.5.3 Bestimmung der Zellproliferation	74

4.5.4	Bestimmung des Gesamtproteins	75
4.5.5	Bestimmung der Apoptoserate.....	76
4.5.6	Bestimmung der Zellaktivität.....	77
4.5.7	Mineralisationsnachweis durch Bestimmung des Calciumgehaltes.....	77
4.6	Ergebnisse Ibandronsäure (Bondronat®).....	80
4.6.1	Bestimmung der Zellzahl und Vitalitätskontrolle.....	80
4.6.2	DNA-Quantifizierung.....	81
4.6.3	Bestimmung der Zellproliferation	82
4.6.4	Bestimmung des Gesamtproteins	83
4.6.5	Bestimmung der Apoptoserate.....	84
4.6.6	Bestimmung der Zellaktivität.....	85
4.6.7	Mineralisationsnachweis durch Bestimmung des Calciumgehaltes.....	85
5	Diskussion	88
5.1	Cefotiam (Spizef®).....	88
5.2	Ceftriaxon (Rocephin®).....	91
5.3	Linezolid (Zyvoxid®).....	94
5.4	Parecoxib (Dynastat®).....	97
5.5	Ibandronat (Bondronat®)	100
6	Zusammenfassung.....	103
7	Ausblick	106
8	Literaturverzeichnis	107
9	Anhang.....	115
10	Tabellenverzeichnis	116
11	Abbildungsverzeichnis	117
12	Danksagung.....	121
13	Lebenslauf	122

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ALP	Alkalische Phosphatase
BCA	bicinchoninic acid (Bicinchoninsäure)
BSA	bovines Serumalbumin
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Ca ²⁺	Calcium-Ion
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
COX	Cyclooxygenase
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECM	Extrazellulärmatrix
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
et al.	et altera
FBS	Fetales bovines Serum
FCS	fetal calf serum (fetales Kälberserum)

g	Gramm
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
IGF	Insulin-like Growth Factor
IL	Interleukin
i.m.	intramuskulär
i.v.	intravenös
Kap.	Kapitel
max.	maximal
min	Minute(n)
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm ³	Kubikmillimeter
mM	Milli-Mol
µm	Mikrometer
MTT	3-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid
MRSA	Methicillinresistenter Staphylococcus Aureus
MRSE	Methicillinresistenter Staphylococcus Epidermidis
N	Normale

NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
NADH	Nicotinamidadenindinucleotidhydrogen
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
nm	Nanometer
NSAIDs	Nichtsteroidale Antiphlogistika
PBS	Phosphate-buffered saline
PFA	Paraformaldehyd
PVC	Polyvinylchlorid
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
Tab.	Tabelle
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
v.a.	vor allem
VRE	Vancomycinresistente Enterokokken
z.B.	zum Beispiel
%	Prozent

1 Einleitung

1.1 Motivation

Bei Knochenerkrankungen und operativen Eingriffen am Knochen hat die begleitende pharmakologische Therapie und die medikamentöse Behandlung von Begleit- und Grunderkrankungen eine wichtige Bedeutung. Mögliche Auswirkungen auf den Knochenstoffwechsel sollten bei der Entscheidung für ein bestimmtes Pharmakon berücksichtigt werden.

Derzeit finden begleitend zu orthopädischen Eingriffen insbesondere Medikamente zur Infektionsprophylaxe, zur Thromboseprophylaxe, zur peri- und postoperativen Analgesie sowie knochenaufbauende Substanzen bei verzögerter Knochenbruchheilung, Knochenmarködemen und Osteoporose routinemäßige Anwendung. Die Auswirkungen von Pharmaka auf bspw. Niere oder Leber sind meist ausführlich untersucht. Welchen Einfluss die in Orthopädie und Unfallchirurgie eingesetzten Medikamente auf die Aktivität von humanen Knochenzellen haben, wurde bisher jedoch nur vereinzelt beschrieben. Klinische Beobachtungen lassen mögliche Einflüsse auf den Stoffwechsel von Knochenzellen vermuten. Im Rahmen dieser Arbeit werden die Effekte dreier Antibiotika, einem Analgetikum sowie einem Bisphosphonat auf die Aktivität von *in vitro* kultivierten humanen Osteoblasten untersucht.

Antibiotika werden häufig sowohl in hoher lokaler, als auch in geringerer systemischer Dosis am orthopädischen und unfallchirurgischen Patienten eingesetzt. Bei ossären Eingriffen werden zur Senkung der postoperativen Infektionsrate prophylaktisch verschiedene Antibiotika verabreicht [Holtom 2006]. Dabei erfolgt standardmäßig eine perioperative single-shot i.v. Applikation mit einem Breitenspektrumantibiotikum, wie bspw. Ceftriaxon [Boxma, Broekhuizen et al. 1996; Southwell-Keely, Russo et al. 2004]. Die Therapie von Knocheninfekten oder infizierten Endoprothesen erfolgt hingegen in der Regel durch orale oder intravenöse antibiotische Langzeitbehandlung. Auf Grund häufig unzureichender Blutversorgung im Bereich der zu behandelnden anatomischen Regionen werden lokale Applikationsformen mittels Antibiotika-imprägnierten Ketten oder beschichteten Prothesen bzw. Antibiotika-versetzten Zement eingesetzt [Gerhart, Roux et al. 1988; Mohanty, Kumar et al. 2003].

Proliferationsinhibierende und sogar toxische Auswirkungen einiger Antibiotika auf *in vitro* kultivierte Osteoblasten oder Osteoblasten-ähnliche Zelllinien sind bereits bekannt [Holtom, Pavkovic et al. 2000; Salzmann, Naal et al. 2007; Naal, Salzmann et al. 2008]. Die Mehrzahl der wachstumshemmenden Wirkungen zeigten sich bei höheren Pharmakakonzentrationen, wie sie in erster Linie nach lokaler Applikation erreicht werden (mit dem Vorteil einer hohen lokalen Pharmakondosis bei zugleich geringer systemischer Belastung) [Buchholz, Engelbrecht 1970]. Bei wenigen Medikamenten scheint der negative Effekt auf den Knochenstoffwechsel schon bei systemischen Wirkkonzentrationen einzusetzen. Der Einfluss häufig eingesetzter Antibiotika wie Linezolid, Ceftriaxon oder Cefotiam auf den Knochenstoffwechsel wird im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

Cefotiam (Spizef®), ein Cephalosporin der 2. Generation aus der Gruppe der Lactamase-Inhibitoren, wird im Bereich der Orthopädie häufig zur perioperativen Prophylaxe und zur Behandlung von Weichteil-, Gelenk- oder Knocheninfektionen angewandt [Vogel, Bodmann et al. 2004]. Cephalosporine wirken als β -Laktam-Antibiotika sekundär bakterizid durch Hemmung der bakteriellen Zellwandsynthese [von Bruchhausen, Ebel et al. 1999]. Durch Öffnung des β -Laktam-Ringes und anschließender Bindung werden Enzyme zur Synthese des Mureins, einem Bestandteil der bakteriellen Zellwand, gehemmt [Kresken 2004].

Ein weiterer Vertreter aus der Gruppe der Cephalosporine ist Ceftriaxon (Rocephin®). Dieses Cephalosporin gehört der 3. Generation an. Als Breitspektrumantibiotikum dient Ceftriaxon der perioperativen Infektionsprophylaxe. Es ist zudem bei Harnwegs-, Atemwegs, Haut- und Weichteilinfektionen oder bei Sepsis durch Knochen- und Gelenkinfektionen indiziert [Wenzler, Daschner 2001].

Das Reserveantibiotikum Linezolid (Zyvoxid®) wird in der Orthopädie insbesondere bei Endoprotheseninfektionen oder zur Behandlung einer Osteomyelitis eingesetzt. Dieses Medikament aus der Gruppe der Oxazolidinone besitzt einen bakteriostatischen Wirkmechanismus durch spezifische Bindung an die 50S-Untereinheit der Ribosomen, was zu einer Hemmung der bakteriellen Proteinsynthese führt [Halle, Majcher-Peszynska et al. 2002].

Ebenfalls häufig werden in der Orthopädie und Unfallchirurgie Analgetika eingesetzt. Dabei erfolgt die schmerzlindernde Therapie nach operativen Eingriffen oder bei konservativer Therapie individuell verschieden über kurze und lange Zeiträume. Pharmaka verschiedenster Wirkstoffgruppen kommen hierbei zur Anwendung, vermehrt auch nichtsteroidale Antiphlogistika (NSAID). Die antiinflammatorischen, antipyretischen und analgetischen Wirkungen der NSAIDs wie bspw. Acetylsalicylsäure, Ibuprofen oder Diclofenac, beruhen

auf der Hemmung der Cyclooxygenase (COX). Dies ist ein Enzym, welches die Biosynthese von Prostaglandinen katalysiert, die daraufhin durch cAMP-gesteuerte Aktivierung von Osteoblasten und Osteoklasten den Knochenstoffwechsel beeinflussen [Baylink, Mohan et al. 1996; Riendeau, Percival et al. 1997]. Es konnten bereits inhibierende Einflüsse von NSAIDs auf den Knochenstoffwechsel mit einer signifikanten Verzögerung des Heilungsprozesses sowie Verschlechterung der mechanischen Eigenschaften des Frakturkallus und des neu gebildeten Knochens gezeigt werden [Beck, Salem et al. 2005]. Des Weiteren bestätigt der Einsatz der NSAIDs zur Prophylaxe heterotoper Ossifikationen die inhibierenden Auswirkungen auf den Knochenstoffwechsel [Vuolteenaho, Moilanen et al. 2008]. Gesichert wurde dieser Effekt in einer kontrollierten klinischen Studie durch fehlende Ossifikationen im Weichgewebe der Diclofenac-Behandlungsgruppe bei heterotoper Knochenneubildung von zwei Drittel der mit Placebo behandelten Patientengruppen [Wahlstrom, Risto et al. 1991]. Im Gegensatz dazu scheinen einige Analgetika anderer Wirkstoffklassen, wie bspw. Tramadol (Tramal®), in klinikrelevanten Dosen keine dieser inhibierenden Eigenschaften zu besitzen [Matziolis, Rau et al. 2002]. Da die NSAIDs aufgrund unselektiver COX-Hemmung kardiovaskuläre und gastrointestinale Nebenwirkungen aufweisen, werden in der Orthopädie vermehrt selektive COX-2-Hemmer, sogenannte Coxibe, ohne diese unerwünschten Nebeneffekte eingesetzt. Jedoch zeichnen sich auch bei dieser Medikamentengruppe Effekte auf den Knochenstoffwechsel ab [Igarashi, Woo et al. 2002 ; Vuolteenaho, Moilanen et al. 2008]. Neueste Studien ergaben, dass bspw. Parecoxib und Indomethacin bei weiblichen Ratten mit Tibiafrakturen drei Wochen nach Frakturheilung die Biegesteifigkeit und die endgültige Beugung negativ beeinflussten [Dimmen, Nordsletten et al. 2009]. *In vitro* Untersuchungen belegen für andere COX-2-Hemmer wie Celecoxib eine dosisabhängige Hemmung der osteoblastären Zellproliferation [Wang, Lin et al. 2004]. Da die Auswirkungen der Coxibe auf den osteoblastären Stoffwechsel bisher kaum untersucht wurden, wird in dieser Arbeit exemplarisch das Parecoxib getestet.

Eine weitere häufig in der Orthopädie eingesetzte Medikamentengruppe stellen die Bisphosphonate mit ihrer osteoklastenhemmenden Wirkung dar. Bisphosphonate werden vielfach in der Osteoporosetherapie eingesetzt. Durch Apoptoseinduktion in Osteoklasten wirken sie reduzierend auf die Knochenresorption, woraus eine positive Knochenbilanz resultiert [Im, Qureshi et al. 2004]. Diese Wirkstoffe werden zur Behandlung der Paget-Krankheit, von Hypercalcämie, Malignität, post-menopausaler Osteoporose, infektionsbedingtem Knochenverlust, fibröser Dysplasie oder auch der Osteogenesis imperfecta verwendet. Die Behandlung mit den häufig verwendeten Bisphosphonaten Alendronat und Risedronat führte in *in vitro* Studien zu einer Steigerung der Zellzahl, der ossären Differenzierungsmarker Osteocalcin, BMP-2, Kollagen Typ 1 sowie zu einer

vermehrten Aktivität der Alkalischen Phosphatase [Im, Qureshi et al. 2004]. Jedoch existieren hierzu uneinheitliche Ergebnisse in der Literatur, da auch proliferationshemmende Effekte von Alendronat auf Osteoblasten *in vitro* beschrieben wurden [García-Moreno, Serrano et al. 1998]. Zudem sind mit zunehmender Wirkstoffkonzentration zelltoxische Auswirkungen der Bisphosphonate auf Osteoblasten bekannt [Im, Qureshi et al. 2004]. Insbesondere im Bereich der Bisphosphonate bestehen derzeit noch einige Lücken in der Literatur bezüglich der Wirkung auf humane Knochenzellen. Aus diesem Grund wird in dieser Arbeit das häufig eingesetzte Ibandronat genauer untersucht.

Für das jeweils zu verwendende Pharmakon wurden unter Berücksichtigung der therapeutisch wirksamen Serumkonzentrationen Verdünnungsreihen aufgestellt. So können sowohl systemisch als auch lokal erreichbare Konzentrationen untersucht werden. Für die verschiedenen Pharmaka-Applikationen wurden Zeitspannen, angelehnt an die jeweilige klinische Applikationsdauer, gewählt.

1.2 Fragestellung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Fragestellung, welchen Einfluss bestimmte Pharmaka auf die Aktivität von *in vitro* kultivierten primären humanen Knochenzellen haben. So soll mittels standardisierter Untersuchungen die Wirkung auf den Stoffwechsel der Knochenzellen analysiert und interpretiert werden. Ziel ist es, basierend auf den Untersuchungen die Auswahl und Dosierung von Medikamenten, die in der Orthopädie und Unfallchirurgie häufig eingesetzt werden, zugunsten der Knochenheilung bzw. des Knochenstoffwechsels zu optimieren. Somit könnten Therapiekonzepte mit den eingesetzten Pharmaka hinsichtlich ihrer Dosierung und Anwendungsdauer optimiert werden. Ebenso könnte die Entscheidung für einen alternativen Wirkstoff für den entsprechenden Einsatzbereich erleichtert werden.

Im Folgenden werden die Wirkungen von fünf verschiedenen Medikamenten untersucht. Trotz der wichtigen Rolle im Fachgebiet der Orthopädie wurden diese in der Literatur bisher jedoch nur uneinheitlich, unvollständig oder noch gar nicht beschrieben. Untersucht werden drei Antibiotika (Cefotiam, Ceftriaxon und Linezolid), ein Analgetikum (Parecoxib) und ein Bisphosphonat (Ibandronat).

2 Grundlagen der Knochenphysiologie

Der Knochen erfüllt im menschlichen Körper mehrere wichtige Funktionen. Zum einen dient er als Stütz- und Halteapparat, zum anderen wirkt er an der Hämatopoese als Speicherort für Calcium- und Phosphationen und in Zusammenarbeit mit der Niere an der Homöostase der Elektrolyte mit.

Betrachtet man den Aufbau, so setzt sich der Knochen aus einer äußeren Substantia compacta und einer inneren Substantia spongiosa zusammen. Während die Kompakta aus Osteonen mit dichten Havers-Lamellen und einem zentralen Kanal besteht, bildet die Spongiosa ein Schwammwerk aus Bälkchen und Plattensystemen, in dessen Zwischenräumen Knochenmark liegt [Netter 1992; Green 1994].

Die Knochengrundsubstanz besteht zu 65% aus anorganischen Hydroxylapatitkristallen, welche sich vor allem aus Calcium und Phosphat zusammensetzen. Die restlichen 35% bildet eine organische Grundsubstanz, eine Matrix, welche insbesondere für die Zugfestigkeit verantwortlich ist. Diese setzt sich zu 90% aus Kollagen Typ I zusammen und zu 10% aus nichtkollagenen Proteinen, wie Proteoglykanen und Glykoproteinen [Gradinger, Gollwitzer 2006].

Der Knochen ist aufgrund ständig wechselnder biochemischer Anpassungen und seiner Aufgabe der Erneuerung des Skelettsystems, ein dynamisches System, welches durch ständigen Auf- und Abbau der Knochenmasse geprägt ist. Dieser Knochenumbau wird von hochspezialisierten Knochenzellen wie Osteoblasten und Osteoklasten übernommen. Erstere regulieren den Aufbau, letztere die Resorption des Knochens. Zu den Knochenzellen zählen desweiteren noch inaktive Zellen, sogenannte bone lining cells [Schneider, Refson 1989].

Bei den Osteoklasten handelt es sich um mehrkernige Riesenzellen, welche aus pluripotenten monocytären Vorläuferzellen entstehen [E.Kaiser 2002; Kaiser, Delling 2002]. Dieser Zelltyp findet sich an Orten der Knochenresorption in sogenannten Howship-Lakunen, welche die Osteoklasten durch die Sekretion von speziellen Enzymen in die Knochenmasse graben.

Osteoblasten sind hochspezialisierte Zellen, welche von mesenchymalen Stammzellen abstammen. Über Vorläuferzellen, so genannte Präosteoblasten, welche im Periosteum und im Knochenmark liegen, entwickeln sich schliesslich reife Osteoblasten. Zunächst entsteht eine aktive kubische Zelle, mit der Zeit wandelt sich der aktive Osteoblast jedoch in einen intermediären und schliesslich in einen flachen, ruhenden Osteoblast um.

Osteoblasten, welche nach Abschluss der Matrixsynthese auf der Knochenoberfläche als flache inaktive Zellen verbleiben, bezeichnet man als bone lining cells. Vermutlich dienen sie durch Bildung einer Blut-Knochen-Schranke der Aufrechterhaltung des Mineralhaushaltes [Gomez, Ardakani et al. 1995]. Sie können sich wieder in aktive Osteoblasten umwandeln, oder aber durch einen programmierten Zelltod, die sogenannte Apoptose, absterben. Osteoblasten produzieren wichtige Proteine, insbesondere Kollagen I, welches 90% der Knochenmatrix ausmacht. Weiterhin werden ALP, Osteocalcin, Osteonektin, Bone-Sialoprotein, Fibronektin und Glykosaminoglykane synthetisiert, welche als Marker für diesen Zelltyp genutzt werden können [Malaval, Modrowski et al. 1994; Remedios 1999]. Die Hauptaufgabe der Osteoblasten besteht in der Synthese der Knochengrundsubstanz (Kollagen Typ I, Proteoglykane, Glykoproteine) und der Regulation ihrer Mineralisation. Dabei produzieren die aktiven Knochenzellen Alkalische Phosphatase, welche im nächsten Schritt sezerniert wird und die Verkalkung des Osteoids initiiert [Gradinger, Gollwitzer 2006]. Hierzu nehmen die Zellen Calcium auf und geben dieses wieder an das Osteoid, also die vom Osteoblasten neu synthetisierte Knochengrundsubstanz ab. 70% des Osteoidsaums verkalkt innerhalb von drei Tagen, der Rest innerhalb von sechs Wochen [Kaiser, Delling 2002]. Dabei werden Osteoblasten vollständig in das Osteoid eingemauert und verändern ihren Phänotyp. Die resultierenden reifen, flachen Zellen werden als Osteozyten bezeichnet. Sie machen 90% der Knochenzellen aus und sind verantwortlich für den Stoffaustausch mit dem Blutkreislauf. Sie besitzen aber auch die Fähigkeit, die Matrixsynthese der Osteoblasten zu hemmen, wenn das Osteoid eine bestimmte Dicke erreicht hat [Gradinger, Gollwitzer 2006].

Zusammenfassend verläuft der Knochenumbau in mehreren Phasen. Zunächst differenzieren sich Osteoklasten aus Vorläuferzellen, um dann Howship-Lakunen in den Knochen zu graben. Dies erfolgt durch Auflösung der Knochenmasse. Anschliessend findet eine Apoptose der Osteoklasten statt. Der Defekt wird nun von Osteoblasten aufgefüllt. Das Osteoid wird mineralisiert und verknöchert [Gundle, Beresford 1995].

3 Material und Methoden

3.1 Versuchsaufbau

Sämtliche Versuche wurden mit primären humanen Osteoblasten durchgeführt. Eine Genehmigung der Ethikkommission lag vor. Im Folgenden werden die Schritte der Zellgewinnung, Zellproliferation bis hin zur Pharmaka-Applikation und anschließender Analysen beschrieben. Alle Schritte bis zum Zeitpunkt der Durchführung der einzelnen Tests erfolgten unter Verwendung einer Laminar Flow Werkbank unter sterilen Bedingungen. Zudem wurden vor ihrem Gebrauch sämtliche verwendete Glasgeräte autoklaviert, Lösungen durch Filtration mit einem 0,22 µm Filter sterilisiert und das verwendete Medium, PBS und Trypsin vor der Anwendung in einem Wasserbad auf 37 °C erwärmt.

Zunächst erfolgte die Erstellung eines Zellpools mit Zellen von sechs verschiedenen Patienten (männliche und weibliche Spender zu gleichen Anteilen), um repräsentative Aussagen treffen zu können. Hierfür wurden Osteoblasten nach intraoperativer Entnahme von Knochenspongiosa gewonnen. Die Spongiosa wurde dafür unter sterilen Bedingungen zerkleinert und in Kulturflaschen unter Zusatz von Zellkulturmedium verteilt. Der Mediumwechsel erfolgte alle drei Tage. Nach Erreichen der Subkonfluenz wurden die Zellen abtrypsiniert, das heißt von der Oberfläche des Behälters gelöst, gesplittet und zur weiteren Proliferation kultiviert. Sobald eine genügend hohe Zellzahl erreicht war, wurden die Zellen des jeweiligen Spenders in flüssigem Stickstoff eingefroren, bis ausreichend Zellen aller sechs Spender zur Verfügung standen, um einen Zellpool zu erstellen. Als osteoblastencharakteristische Marker zum Nachweis des Zelltyps in den Proben Osteocalcin, Kollagen und die Alkalische Phosphatase bestimmt. Im Anschluss an die Zellpoolerstellung (siehe Kapitel 3.3.2.4) und genügend Erholungszeit durch zwei weitere Passagierungen wurden die Zellen in 48er und 96er Well-Platten zur Vorbereitung auf die jeweiligen Untersuchungen zu je 20.000 bzw. 10.000 Zellen pro Well im sechsfachen Ansatz ausplattiert.

Sobald die Zellen am Boden der Platten adhärent waren, standen sie für die Zugabe des jeweiligen Pharmakons bereit. In fünf verschiedenen Konzentrationen und einem Kontrollansatz ohne Pharmakonzugabe wurden im sechsfachen Ansatz jeweils Cefotiam, Ceftriaxon, Linezolid, Parecoxib und Ibuprofen auf die zugehörigen Platten appliziert. Sowohl die Verdünnungsreihen, die Inkubationszeiten, als auch die Häufigkeit der Pharmakonzugabe waren abhängig von der jeweils bekannten therapeutischen

Wirkstoffkonzentration und der Dauer der Therapie *in vivo*. Somit konnten insbesondere im Bereich der Antibiotika sowohl systemische als auch lokal erreichbare Wirkstoffkonzentrationen untersucht werden.

Nach Behandlung mit den Pharmaka und unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Auswertzeitpunkte wurden Parameter zur Beurteilung der Zellproliferation, wie die Bestimmung der Zellzahl, des DNA-Gehalts, des Gesamtproteins durch den BCA-Test und der Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenase anhand des MTT-Tests bestimmt. Der programmierte Zelltod ließ sich durch Messung der Apoptoserate ermitteln. Zur Kontrolle der Zellaktivität wurde die ALP bestimmt, und zur Beurteilung der Calcifizierung ließ sich das Calcium photometrisch quantifizieren und zusätzlich anfärben.

3.2 Verwendete Materialien

In diesem Kapitel wird auf die im Einzelnen verwendeten Materialien und Methoden genauer eingegangen.

3.2.1 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Chamber Slide Objektträger (BD Falcon® CultureSlides, Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)

Eismaschine (Ziegra-Eismaschinen GmbH, Isernhagen, Deutschland)

Eppendorf-Gefäße (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland)

Eppendorf-Pipetten, unterschiedliche Volumina (PreCision, Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland)

Feinwaage (Scaltec, Heiligenstadt, Deutschland)

Laminar Flow Sterilwerkbank Herasafe Heraeus (Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, Deutschland)

Laminar Flow Sterilwerkbank Herasafe Typ HS 12 (Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland)

Luminometer Fluoscan (Thermo Electron Comparison, Ventaa, Finland)

Nalgene Cryogenic Vials (Nalge Company, Rochester, NY, USA)

Neubauer Zählkammer (Neubauer Feinoptik, Blankenburg, Deutschland)

Petrischalen (Sarstedt, Newton, USA)

Phasenkontrastmikroskop, Vergrößerungen 100-fach, 200-fach und 320-fach, Wilowert S (Firma Hund, Wetzlar, Deutschland)

Phasenkontrastmikroskop mit Kamera AxioCam MRc Axiovert 25, Vergrößerungen 40-fach, 100-fach und 200-fach (Zeiss, Jena, Deutschland) mit Programm Axiovision 3.1 (Zeiss, Deutschland)

pH-Messgerät (inolab, Weilheim, Deutschland)

Photometer (Thermo Electron Comparison, Dreireich, Deutschland)

Pipettierhilfe Pipetus-Akku (Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland) und Eppendorf easypet (Eppendorf GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland)

Puderfreie Latexhandschuhe (Kimberley Clark, Dallas, USA)

Sterile Einmal-Glaspipetten, unterschiedliche Volumina (Falcon, Becton Dickinson, Labware Franklin Lakes, NJ, USA)

Sterile Kanülen, MicrolanceTM3 (Becton Dickinson S.A., Spanien)

Sterile Pinzetten, Zangen, Sägen (Hartmann Peha AG, Heidenheim, Deutschland)

Sterile PVC-Röhrchen Falcon® Blue Max, unterschiedliche Volumina (Falcon, Becton Dickinson Labware Company Franklin Lakes, NJ, USA)

Sterile Tischabdeckung Foliodrape (Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland)

Sterilfilter Millex GP Filter Unit 0,22 µm (Millex, Carrigtwohill, Co. Cork, Irland)

Stickstofftank (Air liquide Medical GmbH Düsseldorf, Deutschland)

Tiefkühler (Heraeus Instruments GmbH, München, Deutschland)

Vortex Mixer (NeoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland)

Wasserbad (Grant Instruments, Cambridge, England)

Zellkulturflaschen, 75 cm² (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland und TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz)

Zellkulturinkubator HERAcell® (Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland)

Zellkulturobjektträger BD Falcon® CultureSlides 4-kammerig, 1,7 cm² pro Well (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)

Zentrifuge (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

3.2.2 Puffer und Lösungen

AEC Substrat (DAKO, Glostrup, Dänemark)

Alpha Medium Cat.No. F0925 (Biochrom, Berlin, Deutschland)

Aqua injectabile (Delta Select, Pfullingen, Deutschland)

Ascorbinsäure (Sigma, Steinreich, Deutschland)

Avidin-Biotin Complex (Vectastain Elite ABC Kit, Vector Laboratories Inc., USA)

BCA Protein Assay Kit (PIERCE, Rockford, USA)

Caspase-Glo 3/7 Assay (Promega, Madison, WI, USA)

Dexamethason (Sigma, Steinreich, Deutschland)

DNA-Stammlösung Hoechst 33258 (Sigma, Steinreich, Deutschland)

Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM) (Biochrom, Berlin, Deutschland)

Dulbecco's Vitamine (Folsäure 1 mg/l, Cholinchlorid 1 mg/l, Nicotinsäureamid 1 mg/l, D-Ca-

Panthotenat 1 mg/l, Pyridoxal-HCl 1 mg/l, Thiamin-HCl 1 mg/l, Riboflavin 0,1 mg/l, I-Inositol 2 mg/l), verwendet in einer Konzentration von 1% (Biochrom, Berlin, Deutschland)

EDTA (Sigma, Steinreich, Deutschland)

Einfriermedium (Biochrom, Berlin, Deutschland)

Ethanol 70% (Apotheke RdI, München, Deutschland)

Fetales Kälberserum (FCS), FBS Superior, Cat.No. S0615 (Biochrom, Berlin, Deutschland)

Hepes-Puffer (Biochrom, Berlin, Deutschland)

L-Glutamin (200 mM), Cat.No.K0283 (Biochrom, Berlin, Deutschland)

MEM –Vitamine (10 mM), Cat.No. K0373 (Biochrom, Berlin, Deutschland)

NaCl (Merck, Darmstadt, Deutschland)

PBS (0,01 M phosphate-buffered saline, pH 7,4, 138 mM NaCl, 2,7 mM KCl) (Sigma, St. Louis, MO, USA)

Primocym (invivogen, San Diego, USA)

Primärantikörper : Anti-Osteocalcin (Biotrend, Köln, Deutschland),

Anti-Kollagen I (Quartett, Berlin, Deutschland)

Proteinkinase (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland), Konzentration 1:1.000

Sekundärantikörper: anti-rabbit-IgG, 1:200 (Vector Laboratories Inc, Burlingame, USA)

Stock Solution BCA Assay

Tris (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Trypanblau (0,4%) (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

Trypsin/EDTA Solution, Cat.No.L2143 (Biochrom, Berlin, Deutschland)

Herstellung des TNE-Puffers: Nach Vermischen von 11,7 g NaCl und 0,121 g Tris in Pulverform mit 80 ml Aqua injectabile wurden 200 µl EDTA zugegeben. Der pH-Wert konnte mittels HCl bzw. NaOH-Gabe auf 7,4 eingestellt werden. Im Anschluss wurde das Gemisch auf 100 ml mit Aqua injectabile aufgefüllt.

3.3 Zellkultur

3.3.1 Gewinnung der primären humanen Osteoblasten

Die verwendete Knochenspongiosa stammt aus Hüftkopf, Beckenkamm und Knie von Patienten der Orthopädischen Klinik des Klinikums Rechts der Isar, München. Mit Einverständnis der Patienten sowie der Ethikkommission wurde Knochenmaterial weiterverwendet, welches im Rahmen operativer Eingriffe ansonsten verworfen worden wäre. Für die nachfolgenden Versuche konnten Knochenfragmente sechs verschiedener Spender, zu gleichen Anteilen männliche und weibliche Individuen, verwendet werden. Das Altersspektrum der Patienten reichte von 9 bis 71 Jahren. Aus den gewonnenen humanen Osteoblasten wurde ein Zellpool erstellt, um interindividuelle Unterschiede auszugleichen und repräsentative Aussagen treffen zu können. Die wichtigsten Probandendaten werden in Tabelle 1 dargestellt:

Tab. 1: Patientendatenübersicht

Geschlecht der Patienten	Alter der Patienten zum Tag der Knochenentnahme	Anatomische Region des entnommenen Knochenmaterials
Männlich	32	Beckenkamm
Männlich	9	Beckenkamm
Männlich	43	Hüftkopf
Weiblich	45	Hüftkopf
Weiblich	40	Beckenkamm
Weiblich	71	Distales Femur

Alle Arbeitsschritte, die zur Erstellung der Zellkulturen notwendig waren, wurden unter sterilen Bedingungen (Verwendung von Einmalhandschuhen und Benutzung einer Laminar Flow Werkbank) ausgeführt. Die Knochenproben wurden aus dem Operationssaal steril verpackt direkt in das Zellkulturlabor im gleichen Haus transportiert. Dort wurden die Proben umgehend nach äußerer Desinfektion der Verpackung in die zuvor mit 70% Ethanol desinfizierte und mit sterilen Abdecktüchern ausgelegte Laminar Flow Werkbank gestellt, in der sich alle folgenden Arbeitsschritte anschlossen. Unter der Laminar Flow Werkbank wurden die Knochenproben anschließend ausgepackt. Die nachfolgenden Arbeitsschritte zur Isolierung und Kultivierung der humanen Osteoblasten folgen der Gewebe-Explant-Methode [Gundle, Beresford 1995] und beziehen sich auf verschiedene Publikationen [Beresford, Gallagher et al. 1984; Auf'mkolk, Hauschka et al. 1985].



Abb. 1: Zerkleinerung der Spongiosa und Aussäen der entstandenen Knochenchips unter der Laminar Flow Werkbank

Auf sterilen Petrischalen erfolgte die Zerkleinerung der Spongiosa mithilfe steriler Zangen, Sägen und Pinzetten in ca. 5 mm große Stücke (siehe Abb.1). Die so entstandenen Knochenchips wurden in 50 ml Falcon PVC-Röhrchen gesammelt und mit je 20 ml alpha-Medium versetzt. Nach kräftigem Schütteln konnte das Medium abpipettiert und auf Kulturflaschen verteilt werden. Pro Flasche wurden 20 ml alpha-Medium (supplementiert mit 15% FCS, 1% L-Glutamine, 1% Dulbecco's Vitaminen, 1% Hepes-Buffer und 0,2% Primocym) zugesetzt. Die Spongiosastückchen ließen sich unter Verwendung von

Einmalpinzetten gleichmäßig auf mehrere Petrischalen verteilen. Jede dieser Schalen wurde anschließend mit 20 ml des alpha- Mediums mit oben genannten Zusätzen aufgefüllt und im Brutschrank (bei 37 °C und 5% CO₂ in wassergesättigter Luft) kultiviert. Ein Wechsel des Zellkulturmediums erfolgte in drei bis viertägigem Abstand. Nach drei bis sieben Tagen konnte unter mikroskopischer Kontrolle ein Wachsen der Zellen aus den Spongiosachips beobachtet werden (siehe Abb. 2).

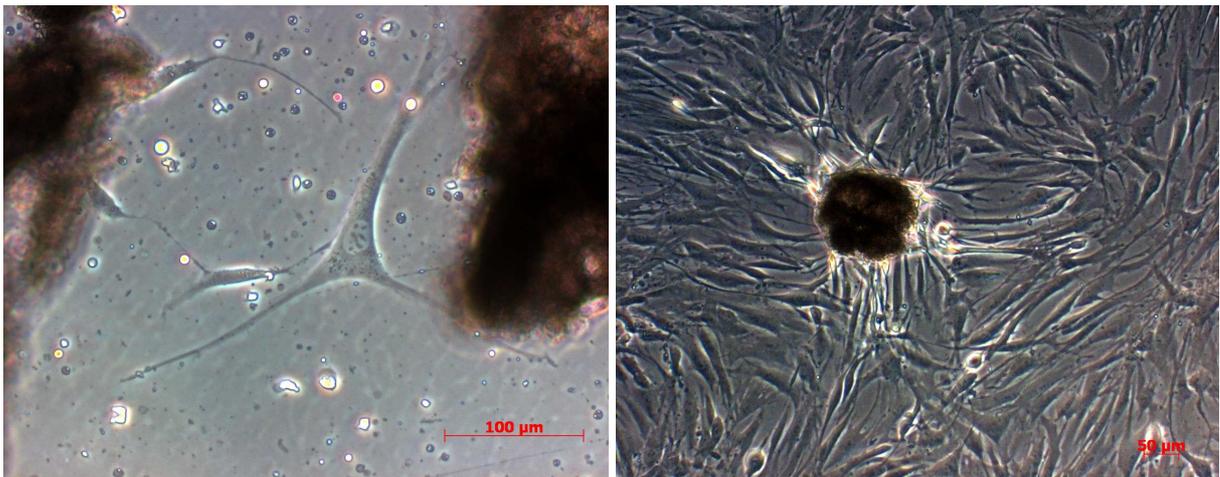


Abb. 2: Lichtmikroskopische Aufnahmen: Auswachsen von Osteoblasten aus den Knochenchips

Der dunkelbraune Bereich stellt ein Knochenspongiosa dar, aus welcher nach einigen Tagen zunächst einzelne Osteoblasten herauswachsen (linke Abbildung). Nach längerer Inkubationszeit wachsen immer mehr Knochenzellen sternförmig aus dem Spongiosastückchen heraus und man beobachtet eine Zellvermehrung (rechte Abbildung)

3.3.2 Kultivierung der primären humanen Osteoblasten

Die Kultivierung der primären humanen Osteoblasten erfolgte unter kontrollierten Bedingungen im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ in wassergesättigter Luft. Drei Tage nach Ausplattierung der Knochenchips fand der erste Mediumwechsel statt. Hierbei wurde die Hälfte des verbrauchten Mediums (10 ml) abpipettiert und mit frischem Medium aufgefüllt. Nach dem zweiten Mediumwechsel wurde das Medium jeweils komplett ausgetauscht und zusätzlich mit 0,2 µl/ml Dexamethason und 5 µl/ml Ascorbinsäure versetzt. Durch regelmäßige mikroskopische Kontrollen ließ sich das Wachstumsverhalten der Osteoblasten

gut beobachten (siehe Abb. 3). 14-23 Tage nach dem Aussäen der Knochenchips war der Boden der Kulturflaschen und Platten subkonfluent mit Zellen bewachsen (siehe Abb. 3). Zu diesem Zeitpunkt wurden die Zellen von den Kulturgefäßen gelöst, ihre Vitalität durch Anfärbung mit Trypanblau und anschließende Bestimmung der Zellzahl überprüft und in neue Kulturflaschen ausgesät. Ab diesem Arbeitsschritt spricht man von Primärzellen, also primären humanen Osteoblasten.

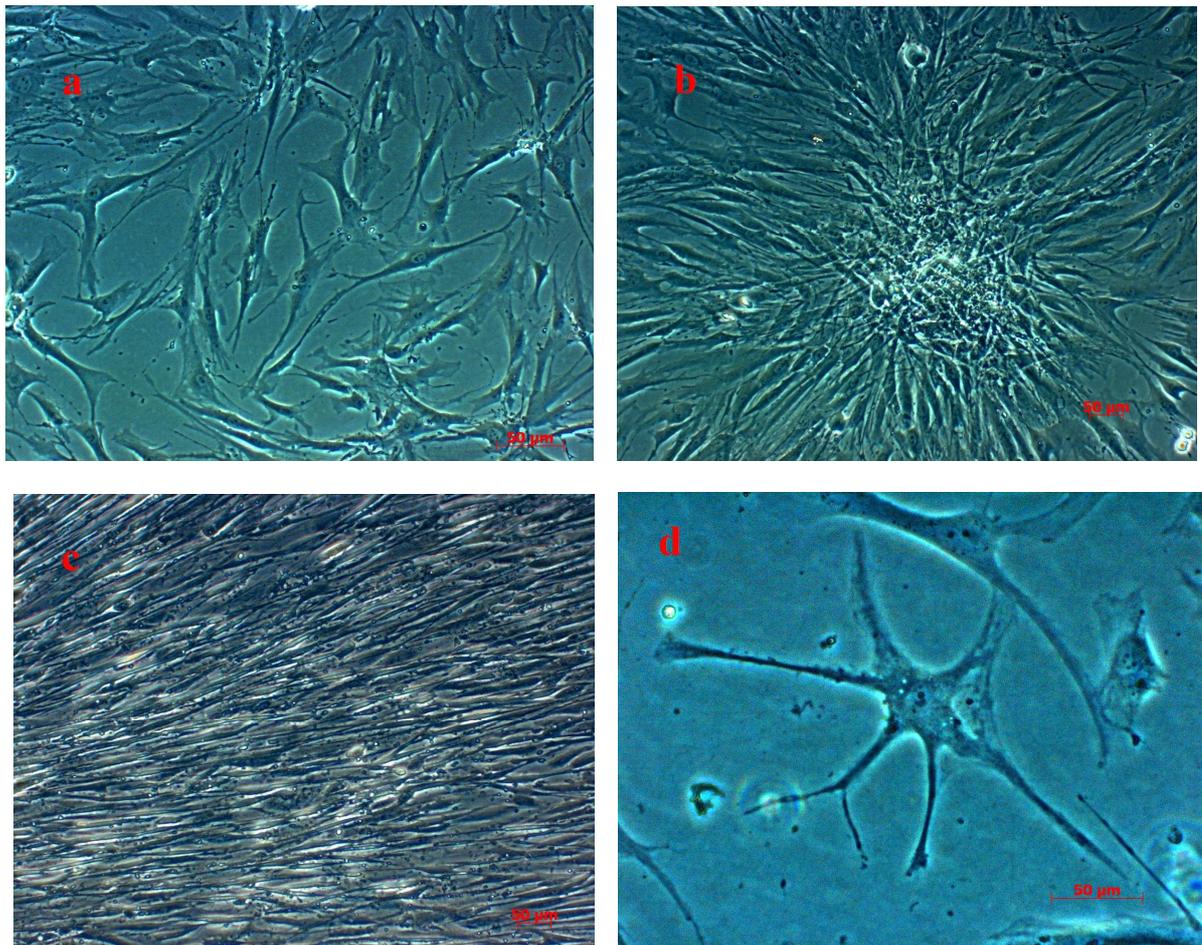


Abb. 3: Lichtmikroskopische Aufnahme von primären humanen Osteoblasten

Das erste Bild (a) zeigt ein subkonfluentes Wachstum der Osteoblasten. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Zellen von den Kulturgefäßen gelöst. In den Kulturgefäßen ließen sich immer wieder so genannte Nodules, das heißt Zellhaufen, wie in dem rechten oberen Bild (b) erkennen. Die linke untere Abbildung (c) zeigt dicht beieinander stehende Osteoblasten im konfluenten Wachstum. Zur Kontrolle der Vitalität werden einzelne Osteoblasten mit ihren Zellausläufern wie in Abbildung d lichtmikroskopisch betrachtet.

3.3.2.1 Ansatz der Zellkulturmedien und Mediumwechsel

Das verwendete Zellkulturmedium, DMEM, wurde mit 15% FCS (fetalem Kälberserum), 1% L-Glutamine, 1% Dulbecco's Vitaminen 1% HEPES-Buffer und 0,2% Primocym versetzt. Vor jedem Mediumwechsel wurde das angesetzte Zellkulturmedium zusätzlich mit 0,005% Ascorbinsäure und 0,0002% Dexamethason angereichert.

Tägliche mikroskopische Kontrollen der Zellen ermöglichten Aussagen über das Wachstumsverhalten und die Vitalität. Zudem ließ sich das Erreichen der Subkonfluenz (Abb. 3a) rechtzeitig erkennen. Bis zu diesem Zeitpunkt erfolgte ein Mediumwechsel sämtlicher Flaschen und Platten in dreitägigem Abstand. Sobald die Subkonfluenz erreicht war, wurden die Zellen vom Untergrund gelöst und passagiert, das heißt, erneut ausgesät.

3.3.2.2 Passagieren

Zur Passagierung der Osteoblasten wurde die Methode der Trypsinierung gewählt. Hierzu wurden zunächst alle benötigten Substanzen auf 37 °C im Wasserbad erwärmt. Das verbrauchte Kulturmedium in den Flaschen wurde verworfen und die Zellen im Anschluss mit 6 ml PBS pro Flasche gewaschen. Nach ca. 3 min Einwirkzeit wurde dieser Waschpuffer wieder abpipettiert und 6 ml Trypsin/EDTA pro Flasche zugegeben, durch Schwenken der Flaschen gleichmäßig verteilt und 7 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der Einwirkzeit erfolgte eine mikroskopische Kontrolle der Zellen. Durch leichtes Klopfen auf die Unterseite der Kulturflaschen lösten sich die Zellen von der Oberfläche. Um das Trypsin wieder zu neutralisieren, wurde direkt danach 6 ml Nährmedium zu dem Trypsin-Zell-Gemisch gegeben. Dieses Gemisch wurde mit einer Porengröße von 0,22 µm filtriert.

Eine kleine Menge dieser Suspension wurde zur Bestimmung der Zellzahl und zur Vitalitätskontrolle in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Um die Zellen von dem Trypsin-Medium-Gemisch zu trennen, wurden die 50 ml Falcon-Gefäße 10 Minuten lang bei 250 x g zentrifugiert. Danach konnte der Überstand verworfen werden und es blieb ein Zellpellet zurück. Dieses wurde mit frischem Nährmedium, das mit Ascorbinsäure und Dexamethason versetzt worden war, resuspendiert, und konnte neu ausgesät werden. In jede der neu angesetzten Zellkulturflaschen wurden 20 ml Nährmedium zugegeben und die Flaschen im Anschluss im Brutschrank inkubiert.

3.3.2.3 Kryokonservierung

Sobald eine für die geplanten Untersuchungen ausreichend hohe Zellzahl (im Durchschnitt 15 Mio. Zellen) pro Patient erreicht war, wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Dies war vier bis fünf Wochen nach dem ersten Aussäen der Knochenchips der Fall. Die Zellen wurden alle nach der ersten Passage, nachdem sie als primäre Osteoblasten bezeichnet werden konnten, eingefroren.

Zunächst wurde das Einfriermedium (Fries Medium), welches bei -20 °C gelagert wurde, aufgetaut und dann sofort auf Eis gestellt. Die Osteoblasten wurden nach dem eben beschriebenen Verfahren von den Kulturflaschen abtrypsiniert und gezählt. Ein Teil der Zellen wurde in sogenannte chamber slide Objektträger zur späteren Kontrolle ihres Gehalts an ALP ausgesät. Die übrigen Zellen konnten im Anschluss bei $250 \times 9,80665 \text{ m/s}^2$ abzentrifugiert werden. Nach Absaugen des Überstandes wurde das 50 ml Falcon Gefäß mit dem Zellpellet auf Eis gestellt. Die Osteoblasten ließen sich dann mit dem Einfriermedium in einer Konzentration von 5-10 Mio. Zellen pro ml resuspendieren und sofort in Kryoröhrchen aliquotieren (zu je 0,5 und 1 ml pro Röhrchen). Fünf Minuten nach Zugabe des Einfriermediums begann der Einfriervorgang (1 °C pro Minute). Die Einfrierröhrchen wurden hierfür in eine Einfrierbox die mit 1-Propanol gefüllt war, überführt und für 24 bis 48 h bei -80 °C gelagert. Danach konnten die Einfrierröhrchen in den Stickstofftank umgesiedelt werden.

3.3.2.4 Auftauen der Osteoblasten und Zellpoolerstellung

Nachdem ausreichend Zellen jedes einzelnen Patienten, die nach lichtmikroskopischen Qualitätskontrollen zur Zellpoolerstellung verwendet werden sollten, eingefroren waren, konnte die Erstellung des Zellpools erfolgen.

Ab diesem Zeitpunkt wurde für alle weiteren Schritte als Nährmedium alpha-Medium ohne Zusatz von Antibiotika, jedoch supplementiert mit 15% FCS, 2% L-Glutamin, 2% HEPES-Buffer, 2% Vitaminen, 5 µl/ml Ascorbinsäure und 0,2 µl/ml Dexamethason, verwendet.

Die Einfrierröhrchen wurden einzeln aus dem Stickstofftank herausgeholt und der Reihe nach abgearbeitet. Es wurden ca. 15 Mio. Zellen pro Patient aufgetaut.

Die Röhrchen ließen sich in einem 37 °C warmen Wasserbad unter leichtem Schwenken auftauen. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein 50 ml Falcon Gefäß, welches mit 37 °C warmen Medium gefüllt war, überführt.

Die Zellen eines jeden Patienten wurden nach diesem Schritt durch einen Filter der Größe 0,22 µm filtriert, mithilfe von Trypanblau gezählt und auf Vitalität überprüft. Es erfolgte eine Zentrifugation bei $250 \times g = 9,80665 \text{ m/s}^2$, der Überstand wurde abpipettiert und die Zellen mit neuem Medium resuspendiert. In ein 50 ml Falcon Gefäß wurden je 10 Mio. Zellen pro Patient pipettiert und vermischt. Der neu entstandene Zellpool wurde nun zu je 800.000 Zellen pro Zellkulturflasche und mit je 20 ml Nährmedium ausgesät und im Brutschrank kultiviert.

Es folgten tägliche mikroskopische Kontrollen und Mediumwechsel in dreitägigem Abstand. Nach sieben Tagen waren die Zellkulturflaschen subkonfluent mit Zellen bewachsen. Daraufhin erfolgte eine erneute Bestimmung der Zellzahl mit anschließender Passagierung und Ausplattierung von 650.000 Zellen pro Flasche. Vier Tage später wurden die Zellen erneut passagiert. Nach weiteren drei Tagen wurden die Zellen ein letztes Mal durch Abtrypsinierung von den Zellkulturflaschen gelöst, filtriert, gezählt und zu 20.000 Zellen pro Well in 48er Well Platten ausgesät. Von jeder der insgesamt 105 Platten wurden 36 Wells mit je 20.000 Zellen und 300 µl Nährmedium befüllt. Zusätzlich wurden ebenso fünfzehn 96er Well-Platten mit je 10.000 Zellen und 150 µl Medium pro Well gefüllt. Sämtliche Platten wurden im Anschluss 24 h zum Erreichen der Adhärenz am Boden der Zellkulturgefäße im Brutschrank kultiviert. Dann standen sie zur Pharmakonzugabe bereit.

3.4 Verwendete Pharmaka und Verdünnungsreihen

Es wurden Pharmaka aus der Gruppe der Antibiotika (Cefotiam, Ceftriaxon, Linezolid), der Coxibe (Parecoxib) und der Bisphosphonate (Ibandronat) getestet. Die Pharmakaapplizierung erfolgte über unterschiedliche Zeiträume und im sechsfachen Ansatz. Pro Medikament wurden fünf Verdünnungsreihen, die unter Berücksichtigung der *in vivo* erreichten therapeutischen Wirkstoffkonzentration berechnet wurden, angesetzt. Jeweils ein Well pro Verdünnungsstufe wurde pharmakonfrei angesetzt, so dass die hieraus gewonnenen Werte als Referenzwert für die Analysen verwendet werden konnten. Auch die Bestimmung der Inkubationszeiträume erfolgte unter Berücksichtigung der Anwendungszeiträume des jeweiligen Medikaments am Patienten.

Sämtliche Verdünnungen erfolgten mit isotoner, 0,9%iger NaCl-Lösung. Die Stammlösungen wurden vor ihrer Anwendung durch Sterilfilter der Porengröße 0,22 µm gereinigt. Im Folgenden werden die ausgesäten Verdünnungsreihen und Plattenbelegungen für 48er Well-

Platten beschrieben. Pro Pharmakon wurden zusätzlich drei 96er Well-Platten angesetzt. Für diese Platten wurde jeweils die Hälfte aller beschriebenen Medium-Lösungsansätze ausgesetzt. Die zugesetzten Wirkstoffkonzentrationen und Plattenbelegungen entsprachen den eben beschriebenen 48er Well Platten.

Folgende Substanzen und Pharmaka wurden zusätzlich zu denen, die in der normalen Zellkultur verwendet werden, angewandt:

Isotone Natriumchloridlösung 0,9% (Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)

Ceftriaxon (Wirkstoff Ceftriaxon-Dinatrium $3,5H_2O$) Pulver zur Herstellung einer Infusionslösung, DeltaSelect 2 g (DeltaSelectGmbH, Pfullingen, Deutschland)

Spizef® 2 g Trockensubstanz (Wirkstoff Cefotiamdihydrochlorid) (Grünenthal GmbH, Aachen, Deutschland)

Zyvoxid® 2 mg/ml Infusionslösung (Wirkstoff Linezolid) (Pharmacia GmbH, Pfizer Gruppe, Karlsruhe, Deutschland)

Bondronat® 2 mg (Wirkstoff Ibandronsäure) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland)

Dynastat® (Wirkstoff Parecoxib) 40 mg Pulver zur Herstellung einer Infusionslösung (Pfizer Limited, Sandwich, Kent, Vereinigtes Königreich)

3.4.1 Inkubation, Verdünnungsreihen und Plattenbelegung von Cefotiam (Spizef®) und Ceftriaxon (Rocephin®)

Mit beiden untersuchten Antibiotika aus der Gruppe der Cephalosporine erfolgte entsprechend der klinischen Anwendung als zumeist perioperative Prophylaxe und in Anlehnung an die derzeitige Literatur eine sogenannte Single Shot Behandlung mit Konzentrationen zwischen 0-100 µg/ml. Nach der ersten Applikation wurde bis zum dritten Auswertetag kein Mediumwechsel mehr vollzogen. Die Inkubationszeiten wurden auf je 24 h, 48 h, 72 h festgelegt. [Brisson, Bryskier et al. 1984; Rouan, Lecaillon et al. 1985; Peiper, Seelig et al. 1997; Esposito, Mittelkötter 2005].

Es wurde zunächst jeweils 2 g Cefotiam bzw. Ceftriaxon in Pulverform mit 20 ml NaCl-Lösung aufgelöst. Somit wurde eine Wirkstoffkonzentration von 100 mg/ml erreicht. Für die erste Verdünnung wurde 1 ml aus der Flasche mit dem Pharmakon entnommen und mit 9 ml NaCl verdünnt. Es entstand eine Lösung von 10.000 µg Pharmakon pro ml. Daraus wurden für die Verdünnung von 1.000 µg/ml je 33 µl mit 300 µl Medium in jedes Well der entsprechenden Reihe pipettiert. Aus derselben Lösung (10.000 µg/ml) wurden für die zweite Verdünnung 1 ml entnommen und mit 9 ml NaCl vermischt. Eine Lösung von 1.000 µg/ml war entstanden. Hieraus wurde für die Konzentrationsreihe von 250 µg/ml jeweils 85 µl pro Well mit 250 µl Medium pipettiert. Für die Verdünnungsreihe der Konzentration 100 µg/ml wurden aus der Lösung von 1.000 µg/ml jeweils 33 µl pro Well mit 300 µl Medium vermischt. 5 ml von der Lösung der Konzentration 1.000 µg/ml wurden mit 5 ml NaCl vermischt, um eine Konzentration von 500 µg/ml zu erreichen. Daraus entnahm man je 33 µl pro Well und gab 300 µl Medium pro Well dazu. Somit konnte eine Verdünnung von 50 µg/ml erreicht werden. Die Konzentration 25 µg/ml entstand durch Verdünnen von 16 µl aus der 500 µg/ml-Lösung mit 300 µl Medium pro Well. Die letzte Verdünnung bestand aus Medium ohne Antibiotikazusatz. Für die 96er Well-Platten wurde jeweils die Hälfte der beschriebenen Mengen verwendet.

Nach Erstellen der Verdünnungen in 50 ml Falcon Gefäßen wurden die jeweiligen Verdünnungsreihen nach dem Schema in Tabelle 2 auf die Well-Platten pipettiert (der Referenzwert entspricht reinem Medium ohne Zellen).

Tab. 2: Plattenbelegung Cefotiam und Ceftriaxon

1000 µg/ml	1000 µg/ml	1000 µg/ml	1000 µg/ml	1000 µg/ml	1000 µg/ml		
250 µg/ml	250 µg/ml	250 µg/ml	250 µg/ml	250 µg/ml	250 µg/ml		
100 µg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml		
50 µg/ml	50 µg/ml	50 µg/ml	50 µg/ml	50 µg/ml	50 µg/ml		
25 µg/ml	25 µg/ml	25 µg/ml	25 µg/ml	25 µg/ml	25 µg/ml		
0 µg/ml	0 µg/ml	0 µg/ml	0 µg/ml	0 µg/ml	0 µg/ml		Referenz- wert

3.4.2 Inkubation, Verdünnungsreihen und Plattenbelegung von Linezolid (Zyvoxid®)

Entsprechend des klinischen Einsatzes des Oxazolidinons Linezolid als Reserveantibiotikum *in vivo*, erfolgte der Mediumwechsel bei diesen Platten täglich mit erneuter Zugabe der entsprechenden Linezolidkonzentrationen bis zum jeweiligen Auswertzeitpunkt. Die Inkubationszeiten betragen 24 h, 72 h und 7 Tage.

Linezolid lag bereits als fertige Infusionslösung mit einer Konzentration von 2 mg/ml vor. Die einzelnen Endkonzentrationen wurden durch Zugabe von definierten Mengen der Infusionslösung zu 300 µl Medium pro Well erreicht. Die eingesetzten Wirkstoffkonzentrationen betragen 500, 100, 50, 25, 10 und 0 µg/ml [Ament, Jamshed et al. 2002; Duewelhenke, Krut et al. 2007].

Die Plattenbelegung richtete sich nach folgendem Schema (Tabelle 3):

Tab. 3: Plattenbelegung Linezolid

500 µg/ml	500 µg/ml	500 µg/ml	500 µg/ml	500 µg/ml	500 µg/ml		
100 µg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml		
50 µg/ml	50 µg/ml	50 µg/ml	50 µg/ml	50 µg/ml	50 µg/ml		
25 µg/ml	25 µg/ml	25 µg/ml	25 µg/ml	25 µg/ml	25 µg/ml		
10 µg/ml	10 µg/ml	10 µg/ml	10 µg/ml	10 µg/ml	10 µg/ml		
0 µg/ml	0 µg/ml	0 µg/ml	0 µg/ml	0 µg/ml	0 µg/ml		Referenz wert

3.4.3 Inkubation, Verdünnungsreihen und Plattenbelegung von Parecoxib (Dynastat®)

Die mit dem selektiven COX-2-Inhibitor Parecoxib behandelten Zellen wurden täglich mit frischem Medium und neu ausgesäten Verdünnungsreihen des Pharmakons versorgt. Die Inkubationszeiten betragen angepasst an die klinischen Anwendung von meist einigen Tagen, 24h, 72h, und 7 Tage, bei Wirkstoffkonzentrationen von 500, 100, 50, 5, 0,5 und 0 µg/ml [Ayar 2007; Kellinsalmi, Parikka et al. 2007].

Parecoxib lag in Flaschen zu je 40 mg Wirkstoff in Pulverform vor. Es wurden pro Flasche 40 ml NaCl in das Glasgefäß gegeben, um eine Konzentration von 1.000 µg/ml zu erreichen. Die Verdünnungsreihen wurden entsprechend der Beschreibung in Kapitel 3.4.1 hergestellt.

Die Plattenbelegung erfolgte folgendermaßen:

Tab. 4: Plattenbelegung Parecoxib

500 µg/ml	500 µg/ml	500 µg/ml	500 µg/ml	500 µg/ml	500 µg/ml		
100 µg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml		
50 µg/ml	50 µg/ml	50 µg/ml	50 µg/ml	50 µg/ml	50 µg/ml		
5 µg/ml	5 µg/ml	5 µg/ml	5 µg/ml	5 µg/ml	5 µg/ml		
0,5 µg/ml	0,5 µg/ml	0,5 µg/ml	0,5 µg/ml	0,5 µg/ml	0,5 µg/ml		
0 µg/ml	0 µg/ml	0 µg/ml	0 µg/ml	0 µg/ml	0 µg/ml		Referenz wert

3.4.4 Inkubation, Verdünnungsreihen und Plattenbelegung von Ibandronat (Bondronat®)

Die mit dem Bisphosphonat Ibandronat behandelten Zellen erhielten nur eine einmalige Pharmakonapplikation am ersten Tag. Die Auswertzeitpunkte betragen 24 h, 72 h und 7 Tage [Fromigue, Body 2002].

Bondronat® lag in Pulverform zu 2 mg pro Infusionsflasche vor. Der Inhalt einer Flasche ließ sich mit 2 ml NaCl auflösen, so dass eine Konzentration von 1.000 µg/ml erreicht wurde. Von dieser Verdünnung wurden entsprechende Mengen zu 300 µl Medium pro Well pipettiert, um die erwünschten Verdünnungen von 5, 2, 1, 0,5, 0,2 und 0 µg/ml zu erreichen.

Die Plattenbelegung mit den Verdünnungsreihen wurde wie folgt gewählt (siehe Tabelle 5):

Tab. 5: Plattenbelegung Ibandronat

5 µg/ml	5 µg/ml	5 µg/ml	5 µg/ml	5 µg/ml	5 µg/ml		
2 µg/ml	2 µg/ml	2 µg/ml	2 µg/ml	2 µg/ml	2 µg/ml		
1 µg/ml	1 µg/ml	1 µg/ml	1 µg/ml	1 µg/ml	1 µg/ml		
0,5 µg/ml	0,5 µg/ml	0,5 µg/ml	0,5 µg/ml	0,5 µg/ml	0,5 µg/ml		
0,2 µg/ml	0,2 µg/ml	0,2 µg/ml	0,2 µg/ml	0,2 µg/ml	0,2 µg/ml		
0 µg/ml	0 µg/ml	0 µg/ml	0 µg/ml	0 µg/ml	0 µg/ml		Referenz wert

3.5 Bestimmung der Zellzahl und Vitalitätskontrolle

Die Zellzahl wurde mithilfe der Trypanblau-Methode bestimmt [Gassen, Schrimpf 2002]. Trypanblau ist ein Farbstoff, der tote Zellen blau anfärbt, da er poröse Zellmembranen durchdringt. Lebende Zellen werden hingegen nicht angefärbt solange eine Einwirkzeit von fünf Minuten nicht überschritten wird. Sie erscheinen als helle Aussparung vor einer blauen Umgebung. Somit lassen sich zusätzlich zur Bestimmung der Zellzahl Aussagen über die Vitalität der Zellen treffen.

Nachdem die Zellen mithilfe von Trypsin/EDTA, wie unter Kap. 3.3.2.2 beschrieben, von den Kulturflaschen abtrypsiniert wurden und die Lösung im Anschluss mit Medium neutralisiert war, wurden gleiche Mengen (ca. 50 μ l) Zellsuspension und Trypanblaulösung in einem Eppendorf-Gefäß mithilfe eines Vortex-Mixers vermischt. Diese Suspension wurde anschließend auf eine Neubauer-Zählkammer aufpipettiert. In das Glas der Neubauer-Zählkammer ist in der Mitte als Zählfläche ein Liniennetz eingefräst (Abb. 4). Durch Auflegen eines Deckglases schafft man einen definierten Raum mit einer bestimmten Höhe zwischen beiden Gläsern. Die Zell-Trypanblau-Suspension wird seitlich aufpipettiert, so dass die Flüssigkeit durch Kapillarkräfte in diesen Zwischenraum diffundiert. Das Gitternetz der Zählkammer lässt sich in neun 1 mm² große Quadranten unterteilen. Unter dem Lichtmikroskop wurden die Zellen der vier äußersten Quadranten, welche wiederum aus je 16 Quadranten bestanden, gezählt. Daraus ließ sich im Anschluss die Anzahl Zellen pro Volumeneinheit folgendermaßen berechnen:

$$\text{Zellzahl pro ml} = \text{gezählte Zellen in 4 Quadranten} \times \frac{1}{4} \times 10^{-4} \times 2$$

Dabei entspricht „10⁻⁴“ dem Kammerfaktor und „2“ dem Verdünnungsfaktor. Um Aussagen über die absolute Zellzahl in den Wells treffen zu können, muss die so errechnete Zellzahl pro ml noch mit der Menge der zur Zellzählung verwendeten Suspension in ml multipliziert werden.

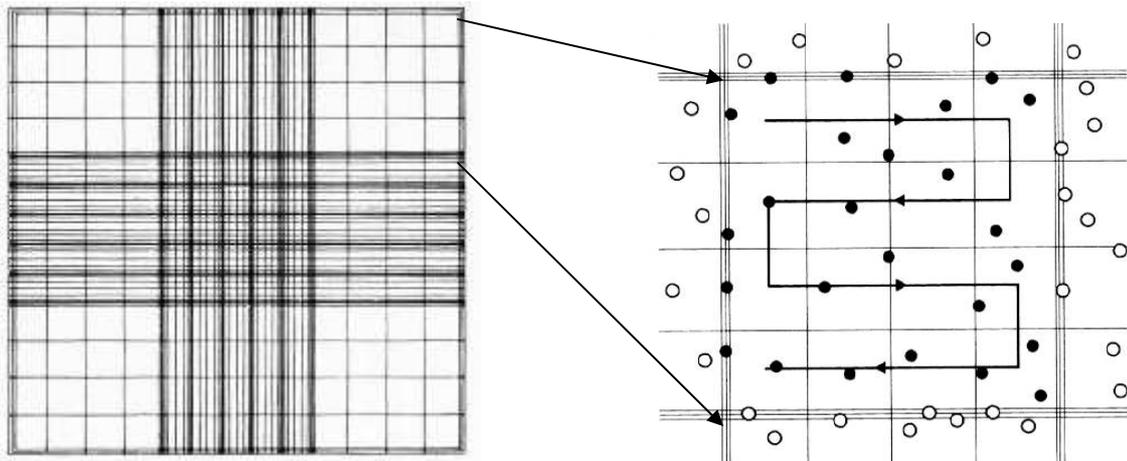


Abb. 4: Zählgitter der Neubauer-Zählkammer (linkes Bild). In der rechten Abbildung werden lebende, zu zählende Zellen als schwarze Punkte dargestellt, tote als weiße Aussparung

3.6 DNA-Quantifizierung

Zur Beurteilung der Proliferation der betreffenden Zellen wurde der DNA-Gehalt des Zellysats bestimmt. Die Bestimmung der DNA-Menge wurde unter Verwendung der bereits etablierten Fluoreszenz dye Hoechst Methode [Brunk, Jones et al. 1979; Cesarone, Bolognesi et al. 1979; Labarca, Paigen 1980] durchgeführt. Der zu den Proben gegebene Fluoreszenzfarbstoff Bisbenzimid, welcher Licht einer bestimmten Wellenlänge absorbiert, emittiert nach spezifischer Bindung an zelluläre DNA Licht einer anderen Wellenlänge. Es besteht eine lineare Abhängigkeit zwischen der gemessenen Fluoreszenz und dem DNA-Gehalt der Proben. Diese fluorometrische Konzentrationsbestimmung der DNA ist eine zuverlässige Methode, welche trotz Anwesenheit anderer zellulärer Bestandteile und unter Verwendung hoher Salzkonzentrationen den Nachweis von DNA Mengen bis zu 10 ng zulässt [Brunk, Jones et al. 1979; Labarca, Paigen 1980].

Zunächst wurde das Medium der zu untersuchenden Zellproben abgesaugt und die Proben zweimal mit je 300 μ l Aqua injectabile pro Well gewaschen. Die Platten wurden zum Entfernen der letzten Wassertropfen aus den Wells auf Papier ausgeklopft. Nach Einwickeln der Zellkulturplatten mit Parafilm wurden die Proben bei -80°C für sieben Tage eingefroren, bis die Proben der anderen Auswertzeitpunkte an demselben Punkt angelangt waren. Erst danach wurden die Platten wieder aufgetaut und mit 200 μ l Aqua injectabile pro Well versehen. Um eine Verdunstung zu vermeiden, erfolgte eine erneute Abdichtung der Platten mit Parafilm, bevor die Zellen eine Stunde bei Raumtemperatur inkubierten und im Anschluss

wieder bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 30 min lagerten. Durch die Einfrier-Auftau-Vorgänge lysierten die Zellen [Labarca, Paigen 1980], so dass die DNA freigesetzt wurde und zur späteren Messung zur Verfügung stand. Als Arbeitslösung wurden 10 ng DNA-Stammlösung in einem Eppendorf-Gefäß mit 1 ml Aqua injectabile gemischt, bis das Pulver vollständig in Lösung gegangen war. Anschließend wurden weitere 9 ml Aqua injectabile hinzugegeben und diese Farblösung im Verhältnis 1:50 mit TNE-Puffer verdünnt. Zur Erstellung einer Eichkurve (siehe Abb. 5) wurde eine Standardreihe mit definierten DNA-Mengen in Eppendorf-Gefäßen angefertigt. Die DNA-Stammlösung der Konzentration 1 mg/ml H_2O wurde mit TNE-Puffer verdünnt. Nach jedem Verdünnungsschritt wurde die jeweilige Lösung mithilfe des Vortex-Mixers vermischt. Somit entstanden DNA-Endkonzentrationen von 0, 0,5, 1, 2, 4, 5, 8 und 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bzw. DNA-Mengen von 0, 0,25, 0,5, 1, 2, 2,5, 4 und 5 μg DNA pro Well. Die Standardreihe wurde im sechsfachen Ansatz zu je 200 μl pro Well auf eine 48er Well-Zellkulturplatte aufgetragen. Nach Auftauen der Platten mit den Zellproben auf Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von je 200 μl Arbeitslösung in die Wells mit den Proben, der Standardreihe und dem Referenzwert gestartet. Die einzelnen Platten mit den verschiedenen Inkubationszeiten der Pharmaka und der Standardreihe wurden nacheinander abgearbeitet. Die fluoremetrische Messung am Fluorescan-Photometer erfolgte fünf Minuten später mit einer Integrationszeit von 20 ms. Die Anregung erfolgte bei einer Wellenlänge von 355 nm, wohingegen die emittierte Fluoreszenz über einen Emissionsfilter von 460 nm Wellenlänge gemessen wurde. Sämtliche ermittelten Werte wurden für nachfolgende Berechnungen in Excel überführt. Aus den Werten der Standardreihe wurde eine Eichkurve erstellt, so dass durch Auftragen der Daten der Zellproben auf die Kalibrierungsgerade die DNA-Menge der jeweiligen Proben ermittelt werden konnte.

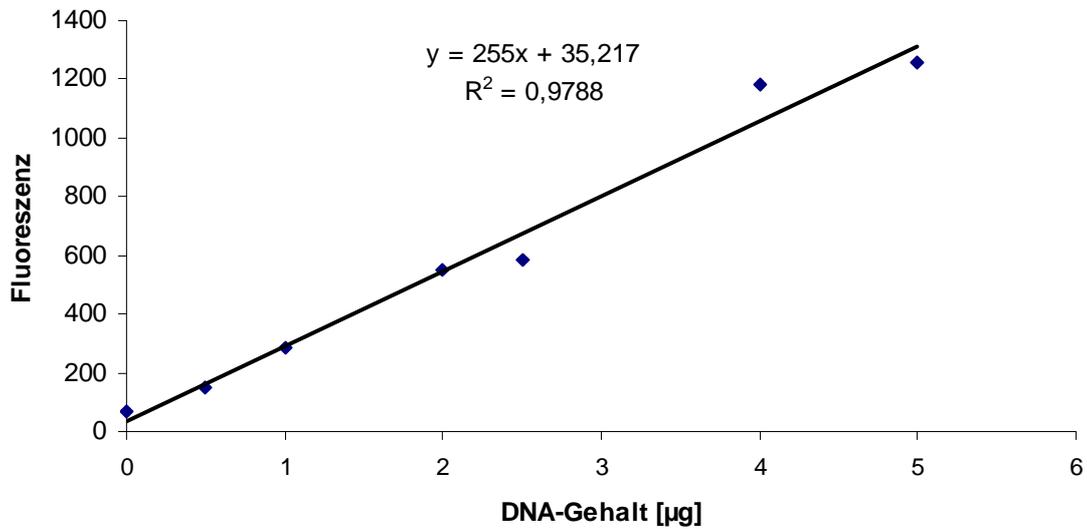


Abb. 5: Eichgerade zur Bestimmung des Gesamt-DNA-Gehaltes

Zur Bestimmung der DNA-Menge der mit Ibandronat behandelten Zellen wurde eine neue Standardreihe erstellt, da dieser Test zeitversetzt zu den anderen stattfand. Aus der Standardreihe konnte folgende Eichkurve berechnet werden (siehe Abb. 6).

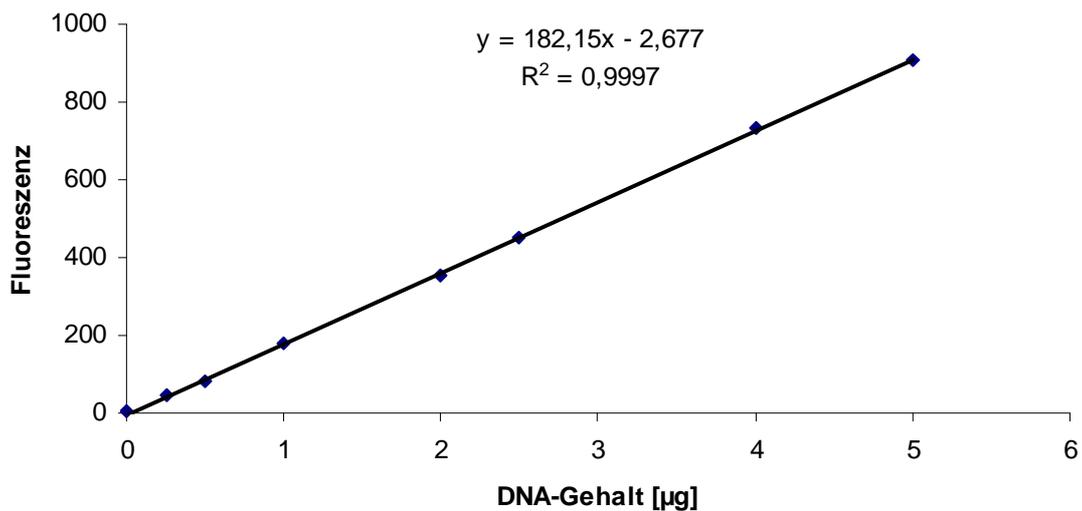


Abb. 6: Eichgerade zur Bestimmung des Gesamt-DNA-Gehaltes der mit Ibandronat behandelten Zellproben

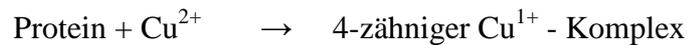
3.7 Bestimmung der Zellproliferation durch MTT-Test

Zur Bestimmung der Zellproliferation wurde die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenase unter Verwendung eines Zellproliferations Kit I (MTT, Roche, Deutschland) ermittelt [Mosmann 1983]. Dies ist ein etablierter Test zur Bestimmung der Vitalität und des Zellwachstums. Die kolorimetrische, nicht radioaktive Messung basiert auf der Umwandlung von gelben Tetrazoliumsalz 3-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT), welches zu den Proben gegeben wird, zu violetten Formazankristallen [Green, Reade et al. 1984; Berridge, Tan 1993]. Diese Reduktion benötigt zelluläre Dehydrogenasen (NADH, NADPH), welche nur in vitalen, stoffwechselaktiven Zellen mit intakten Mitochondrien vorhanden sind [Berridge, Tan 1993]. Der Anstieg der metabolischen Aktivität der Zellen korreliert somit direkt mit der Summe des neu entstandenen, wasserunlöslichen, violetten Formazans [Mosmann 1983], dessen Absorption im Photometer gemessen wurde.

Zu den Osteoblasten, die in 48er Well-Platten mit je 300 µl Medium pro Well inkubierten, wurde zu den Auswertzeitpunkten je 30 µl gelbes MTT Salz einer Endkonzentration von 0,5 mg/ml pro Kavität pipettiert. Es folgte eine vierstündige Inkubationszeit im Brutschrank bei 37 °C. Im Anschluss daran ließen sich mikroskopisch violette, wasserunlösliche Salzkristalle nachweisen. Damit diese in Lösung gebracht werden konnten, wurden 300 µl pro Well Solubilization Lösung auf die Zellen pipettiert und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C und 4,8% CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag waren die Formazankristalle gelöst, so dass je 100 µl pro Well dieser angesetzten Lösung zur nachfolgenden Messung in 96er Well Platten umpipettiert werden konnten. Die Messung der Absorption erfolgte im Photometer bei einer Messwellenlänge von 590 nm und einer Referenzwellenlänge von 690 nm.

3.8 Bestimmung des Gesamtproteins durch BCA-Assay

Die Bestimmung des Gesamtproteins des Zellysates erfolgte durch kolorimetrischen Nachweis und Quantifizierung unter Verwendung des Bicinchinonsäure (BCA)-Assays [Smith, Krohn et al. 1985]. Zugegebenes Cu²⁺ wird im alkalischen Milieu durch Proteine in den Proben zu Cu¹⁺ reduziert. Diese Reaktion wird als „biuret reaction“ bezeichnet. Das Reaktionsprodukt bildet durch Bindung des BCA-Reagenz mit Cu¹⁺-Ionen einen violettfarbenen Komplex mit einem Absorptionsmaximum bei 562 nm.



Dabei korreliert die photometrisch gemessene Farbstoffintensität direkt mit der Proteinkonzentration [Lottspeich F., Lottspeich H. et al. 1998]. Die zugehörige Eichgerade veranschaulicht den linearen Zusammenhang (siehe Abb. 6).

Zur Durchführung des Tests wurde das Medium aus den Proben abpipettiert und diese zweimal mit vorgewärmten PBS gewaschen. Im Anschluss daran wurden pro Kavität der 48er Well Platten 150 μl Triton (5%) zupipettiert. Nach zweimaligem Einfrieren (30 min, $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$) und Auftauen (30 min, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$) wurden die in Parafilm eingewickelten Platten über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Erstellen einer Eichkurve wurden acht verschiedene Stammlösungen aufsteigender Proteinkonzentration (25, 125, 250, 500, 750, 1.000, 1.500, 2.000 $\mu\text{g/ml}$) durch Verdünnen der Stock Solution des Testkits mit Triton (5%) hergestellt. Sämtliche Proben und Standardreihen wurden zu je 50 μl pro Well in eine 96er Well Platte umpipettiert. Pro Platte wurde ein Referenzwert aus 50 μl Triton (5%) erstellt. Nach Zugabe von je 175 μl Working Reagenz pro Well wurden die jeweiligen Platten mit Parafilm umwickelt und bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 30 min inkubiert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur erfolgte die Messung im Photometer bei einer Wellenlänge von 560 nm.

Nach Berechnung der Mittelwerte der Absorption der Standardreihe konnte folgende Eichgerade erstellt werden, aus welcher die Proteinkonzentrationen der jeweiligen Probe errechnet wurden.

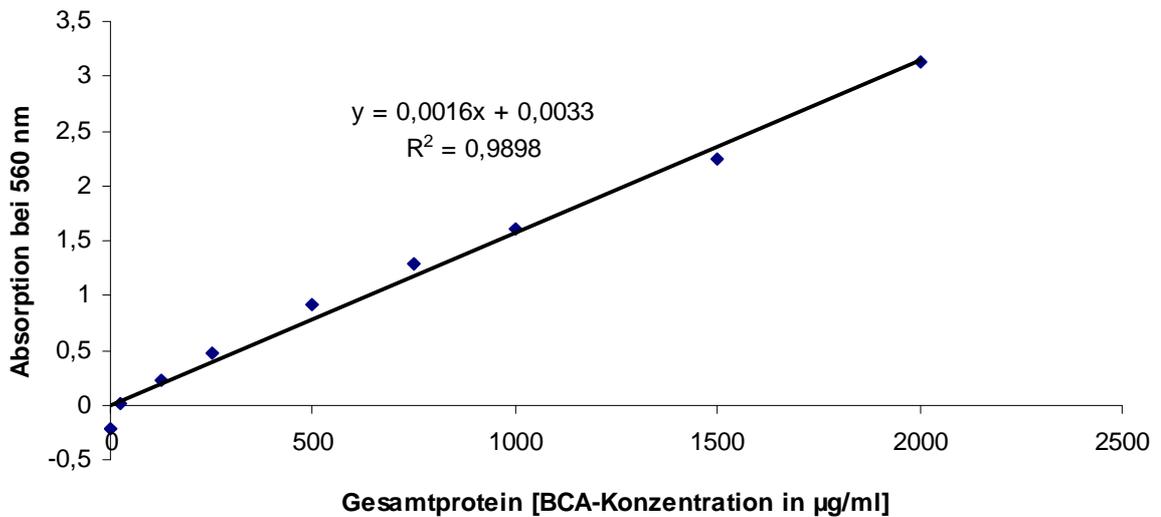


Abb. 7: Eichgerade zur Bestimmung des Gesamtproteins

3.9 Bestimmung der Apoptoserate über Caspase 3,7 Aktivität

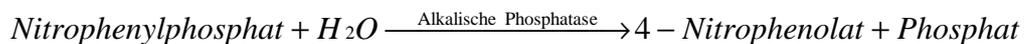
Als Apoptose wird der programmierte Zelltod, ein physiologischer Prozess, der zur Eliminierung von Zellen beiträgt, bezeichnet [Lockshin, Williams 1965; Kerr, Wyllie et al. 1972]. Dieser Prozess ist im multizellulären Organismus für die Aufrechterhaltung der Gewebemöostase ebenso wichtig wie die Differenzierung und Proliferation der Zellen. Die Apoptose kann von außen oder durch interne Einflüsse, wenn die Zelle krank oder funktionslos geworden ist, angeregt werden [Vaux, Strasser 1996]. Im Gegensatz zu anderen Formen des Zelltodes, wie bspw. der Nekrose, wird die Apoptose durch spezielle Enzyme, den Caspasen, kontrolliert.

Zur Bestimmung der Apoptoserate wurde die Aktivität der Caspase 3 und Caspase 7 mittels dem Caspase Glo^R 3/7 Assay gemessen. Das Caspase 3/7-Substrat wurde zu den Proben gegeben. Apoptotische Zellen in den Proben enthielten Caspasen, welche einen Teil des zugegebenen Trägermaterials abspalteten, so dass ein Substrat für die Luciferase freigesetzt wurde. Nach Reaktion mit dem Enzym Luciferase konnte ein Lumineszenzsignal gemessen werden, welches nach Angaben des Technical Bulletin Caspase Glo^R 3/7 Assay, Promega 2005, proportional zur Menge aktivierter Caspasen und damit zur Apoptoserate war. Zur Durchführung des Tests wurden die Proben, die in 96er Well-Platten angesetzt waren, verwendet. Nach Erwärmung der Platten mit den Zellen, Substrat und Puffer auf Raumtemperatur, wurden pro Well je 150 µl Caspase-Reagenz zu den Proben mit 150 µl

Medium und dem Referenzwert (bestehend aus 150 µl Kulturmedium) pipettiert. Nach kräftigem Vermischen bei 400 rpm für 30 s wurden jeweils 150 µl Flüssigkeit pro Well jeder Platte in weiße, für den Test geeignete, Mikrotiterplatten umpipettiert. Nach weiteren 30 min Inkubation bei Raumtemperatur ließ sich die Lumineszenz jeder Probe im Luminometer messen. Diese wies eine direkte Proportionalität zur Apoptoserate auf.

3.10 Bestimmung der Zellaktivität durch ALP-Aktivitäts-Assay

Die Zellaktivität der untersuchten Osteoblasten wurde über die kinetische Messung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase, einem wichtigen Marker für die osteogene Differenzierung, bestimmt [Robey, Termine 1985]. Als wichtiger Bestandteil der Zellmembran wird die knochenspezifische Alkalische Phosphatase von Osteoblasten produziert [Gothlin, Ericsson 1971; Coleman 1992]. Bei dem Versuch wurde der Alkalische Phosphatase Test Kit der Firma Ecoline (Holzheim, Deutschland) verwendet. Dabei wurde farbloses Nitrophenylphosphat durch die in den Zellen befindliche Alkalische Phosphatase in gelbes Nitrophenolat umgewandelt:



Die Geschwindigkeit der Reaktion kann photometrisch ermittelt werden und korreliert direkt mit der Aktivität der Alkalischen Phosphatase in den Proben.

Nach Abpipettieren des Kulturüberstands und zweimaligen Waschvorgang mit je 300 µl PBS pro Well wurden 150 µl Triton (1% in PBS) pro Kavität auf die Platten verteilt. Die mit Parafilm abgedichteten Platten wurden nun für 60 min im Inkubator bei 37 °C inkubiert. Es folgten weitere zwei Durchläufe von je 20 min bei -70 °C und 20 min bei 37 °C.

Eine Standardreihe mit definierten Mengen an p-Nitrophenolat wurde nach in Tab. 6 (siehe Anhang) gezeigtem Schema in Eppendorf-Gefäßen angefertigt und wie die Zellproben weiter behandelt.

Sämtliche Proben wurden zu je 50 µl pro Well auf 96er Well-Platten umpipettiert und mit je 50 µl Working Reagenz versehen. Als Referenzwert wurden 50 µl Triton (1%) in ein Well pro Platte pipettiert. Von der Standardreihe wurden dreifach Bestimmungen angefertigt, wobei je 100 µl pro Kavität ohne Zugabe von Working Reagenz in die Platten ausgesät wurden

Die Absorption in den Proben wurde direkt im Anschluss daran im Spektralphotometer bei einer Messwellenlänge von 405 nm gegen den Referenzwert gemessen. Weitere Messungen erfolgten 30 Minuten lang in fünfminütigem Abstand. Die Geschwindigkeit der Reaktion war analog zur Enzymaktivität. Durch Erstellen einer Eichgeraden aus der Standardreihe (siehe Abb. 8) konnte anhand dieser die Absorption in den Proben in Enzymaktivität umgerechnet werden. Durch Einsetzen der Werte in die Eichgerade und nach Bezug auf die Dauer der Reaktion wurde die Enzymaktivität pro Minute ermittelt. Im Anschluss konnte die Aktivität der Alkalischen Phosphatase auf das Gesamtprotein bezogen werden, so dass die spezifische Aktivität ermittelt werden konnte.

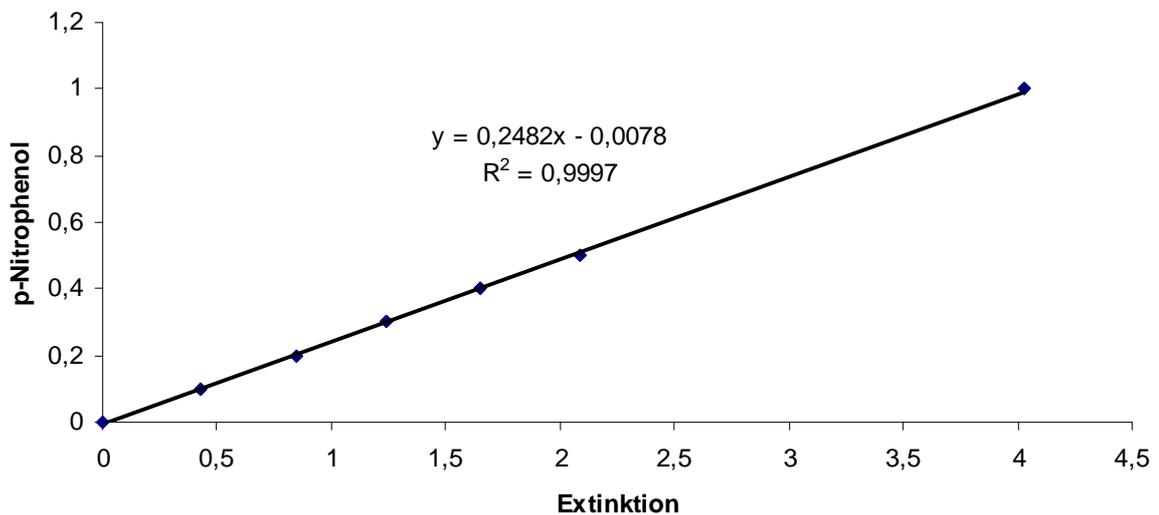


Abb. 8: Eichgerade zur Bestimmung der ALP-Aktivität

3.11 Quantitative Bestimmung des Calciumgehaltes

Der Calciumgehalt in den Zellkulturen wurde unter Verwendung des Quantichrom Calcium Assay Kit (BioAssay Systems, USA) gemessen. Ein Phenolsulphonephtalein-Farbstoff bildet spezifisch einen stabilen blauen Komplex mit dem freien Calcium in den Zellproben. Die Farbintensität, bei 612 nm Wellenlänge gemessen im Photometer, ist zu der Calciumkonzentration in den Proben direkt proportional.

Zu den Proben zur Calciumbestimmung wurde nach den ersten sieben Tagen nach dem Aussäen bei jedem Mediumwechsel zusätzlich 1% α -Glycerophosphat appliziert. Nach

jeweils drei und vier Wochen Inkubationszeit unter wöchentlichem Mediumwechsel und mikroskopischen Kontrollen wurden die Proben für die Calciumbestimmung vorbereitet. Zur Calcium-Extraktion wurde zunächst das Medium aus jeder Exkavation der Platten abpipettiert und nach zweimaligem Waschen mit 1 ml 37 °C vorgewärmten PBS pro Well wurden selbige mit 1 ml 0,5 N HCl behandelt. Nach einer Inkubationszeit von fünf Minuten bei Raumtemperatur ließ sich das Zellysat vom Boden der Platten mit einer Pipettenspitze gut abkratzen und abspülen. Das Lysat jeder Verdünnungsreihe wurde jeweils in einem Eppendorf-Gefäß gesammelt und im vorgeheizten Thermomixer bei 10 °C und 1.000 rpm drei Stunden lang geschüttelt. Nach anschließendem fünfminütigen Zentrifugieren der Proben bei 1.000 rpm konnte der Überstand vorsichtig abpipettiert werden, ohne dass das Zellpellet zerstört wurde. Der Überstand wurde bei -80 °C gelagert. Die Bestimmung des Calciumgehalts wurde bei allen Proben gleichzeitig durchgeführt. Nach Auftauen der Proben auf Raumtemperatur wurde jede Verdünnungsstufe zu jeweils 5 µl pro Well im sechsfachen Ansatz auf 96er Well Zellkulturplatten auspipettiert. Eine Standardreihe mit Calcium-Konzentrationen von 20, 16, 12, 8, 6, 4, 2 und 0 mg/dl wurde durch Mischen der Standardlösung des Testkits mit Aqua injectabile erstellt. Anschließend wurden auch hiervon jeweils 5 µl pro Well im fünffachen Ansatz in eine 96er Well Zellkulturplatte ausplattiert. Nach Anrühren der Arbeitslösung aus Reagenz A und B des Testkits im Verhältnis 1:1 wurden jeweils 200 µl dieser Lösung zu den Proben und der Standardreihe pipettiert und durch leichtes Schwenken der Platten vermischt. Ein Referenzwert pro Platte mit jeweils 205 µl Arbeitslösung wurde mitgemessen. Nach einer dreiminütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur ließ sich die Absorption der Proben und Standardreihe gegen den Referenzwert bei einer Wellenlänge von 620 nm messen. Im Anschluss daran erfolgte die Erstellung einer Eichgeraden (Abb. 8) aus den Mittelwerten der Standardreihe, aus welcher nach Anleitung des Quantichrom Calcium Assay Kit die Calciumkonzentrationen der vorliegenden Proben ermittelt werden konnten [Bradley, Schumann 1984; Woo, Cannon 1984; Mori, Tanji et al 2000].

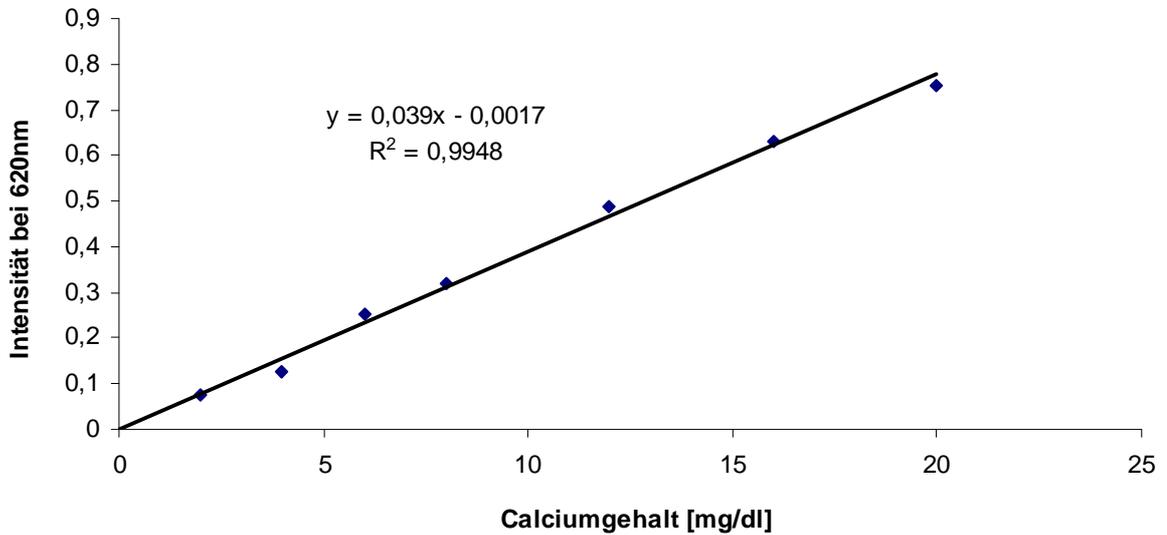


Abb. 9: Eichgerade zur Bestimmung der Calciumkonzentration der Proben

Da die Bestimmung des Calciumgehaltes der Zellproben zeitlich versetzt zu den anderen Pharmaka erfolgte, war eine erneute Erstellung der Standardreihe notwendig. Es ergab sich eine neue Eichgerade:

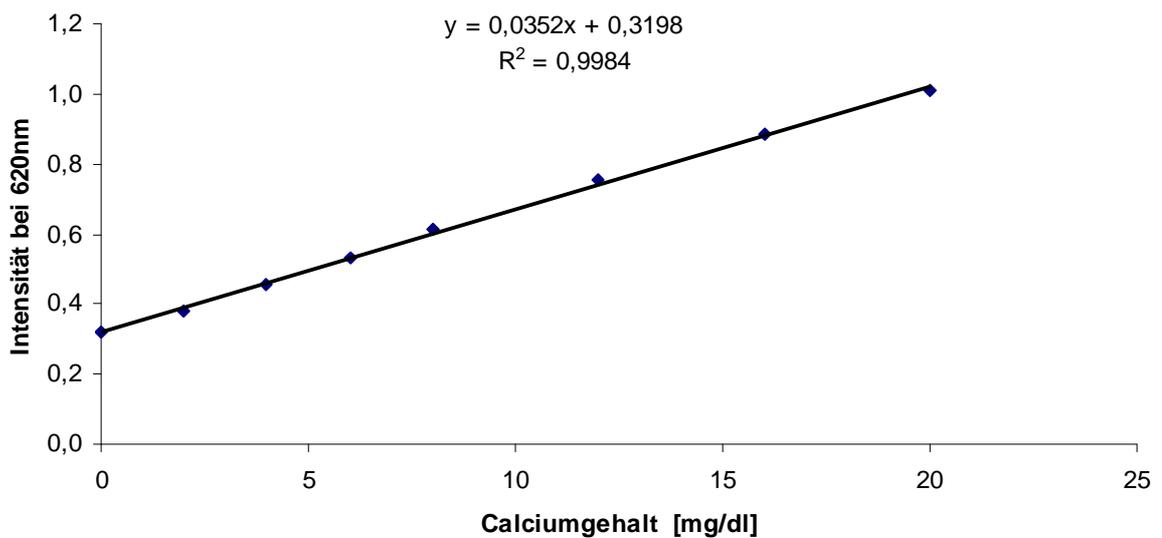


Abb. 10: Eichgerade zur Bestimmung des Calciumgehaltes der mit Ibandronat behandelten Zellen

3.12 Mineralisationsnachweis - Alizarinrot-Färbung zur Calciumbestimmung

Zum histomorphologischen Nachweis der Mineralisation bzw. des Calciums in den Zellproben wurden die Mineralisationskerne rot gefärbt und im Lichtmikroskop fotografiert. Der Nachweis der osteoblastären Marker erfolgte in sämtlichen Proben nach einer Kulturzeit von vier Wochen. Die Platten mit den adhärenenten Osteoblasten wurden nach Abpipettieren des Mediums und zweimaligem Waschen mit 37 °C warmen PBS zum Fixieren der Zellen mit 200 µl PFA (4%) pro Well behandelt. Nach einer Einwirkzeit von 20 Minuten wurde das PFA entfernt und die Proben bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Im Anschluss an die Fixierung erfolgte eine Überschichtung der Zellen mit 200 µl pro Well Alizarinrot-Färbelösung (1%, pH 4,5, Sigma, Deutschland) für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Es folgten mehrmalige Waschvorgänge mit PBS, bis die Waschlösung farblos war. Nach Inkubation der Proben in PBS über Nacht bei Raumtemperatur konnte das rotgefärbte Calcium in den Proben lichtmikroskopisch dargestellt, fotografiert und semiquantitativ bewertet werden [Anh, Dimai et al. 1998].

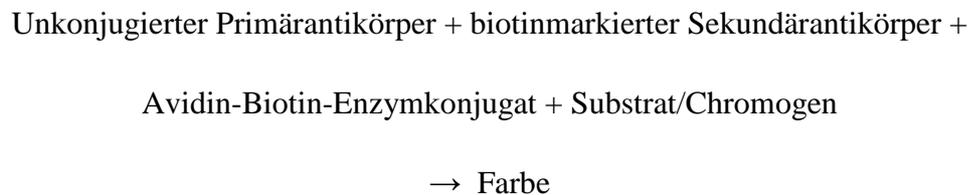
3.13 Immunzytochemischer Nachweis osteoblastencharakteristischer Marker zur Zelltypisierung

Die Osteoblasten-Differenzierung durchläuft mehrere Entwicklungsstadien von der mesenchymalen Stammzelle über Osteoblastenvorläufer, Präosteoblasten, transitorische, sekretorische, osteozytische Osteoblasten bis zum Osteozyt. Zum Nachweis dieser Differenzierung wurden unter Verwendung von Antikörpern gegen Enzyme und Stoffwechselprodukte von Osteoblasten immunzytochemische Präparate angefertigt. Diese konnten lichtmikroskopisch ausgewertet werden.

Die Zellen aus den Kontrollkulturen eines jeden einzelnen Patienten wurden nach dem Abtrypsinieren gezählt und auf chamber slide Objektträgern zu je 10.000 Zellen und 1 ml Zellkulturmedium pro Objektkammer ausgesät. Die Zellen wurden 7-15 Tage bis zum Erreichen der Subkonfluenz weiter kultiviert. Sobald diese erreicht war, folgte ein zweimaliges Waschen der Objektträger mit PBS zu je fünf Minuten. Zum Fixieren der Osteoblasten auf dem Glasboden der Objektträger wurden diese für 15 Minuten in eine mit

PFA gefüllte Küvette getaucht. Nach einem weiteren Waschgang mit PBS wurden die Objektträger luftgetrocknet und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

Das im Folgenden verwendete Färbeverfahren folgt der Avidin-Biotin-Methode, welche darauf beruht, dass das Glycoprotein Avidin mit hoher Affinität an das Vitamin Biotin bindet [Burmester, Pezzutto et al. 2007]. Den Zellen mit dem zu untersuchenden Antigen wird zunächst ein spezifischer Antikörper zugesetzt, welcher an das Antigen bindet. An diesen Primärantikörper lässt man einen mit Biotin gekoppelten Sekundärantikörper binden. Der biotinmarkierte Sekundärantikörper kann anschließend durch Zugabe von peroxidasekonjugiertem Avidin, welches einen Komplex mit dem Biotin bildet, nachgewiesen werden, da die Peroxidase die Umwandlung von zugegebenem AEC-Substrat/Chromogen katalysiert und ein roter Farbstoff sichtbar wird.



3.13.1 Immunzytochemischer Nachweis der Alkalischen Phosphatase

Die Alkalische Phosphatase (ALP) ist ein Isoenzym zur Hydrolyse von Phosphorsäuremonoestern, welches sowohl zellmembrangebunden also auch mikrosomal ungebunden in den Zellen vorliegt [Anh, Dimai et al. 1998]. Die Aktivität der Osteoblastendifferenzierung vom Präosteoblasten zum sekretorischen Osteoblasten kann durch die ALP nachgewiesen werden [Ingram, Park et al. 1994].

Nach Auftauen der chamber slide Objektträger wurden diese für 20 Minuten mit Tris-Puffer behandelt. Im Anschluss daran wurden die Zellen mit dem chromogenen Alkalische-Phosphatase-Substrat bedeckt. Die dadurch ausgelöste Enzymreaktion, bei der die Umgebung der ALP-positiven Zellen blau-violett angefärbt wird, erfolgte unter mikroskopischer Kontrolle nach 45 Minuten. Nach Erreichen einer genügend hohen Farbtintensität wurden die Objektträger erneut mit Tris-Puffer gewaschen, um die Reaktion zu stoppen. Als letzter Schritt wurden die Zellen mit flüssiger Gelatine und einem Deckblatt auf dem Objektträger fixiert und im Anschluss lichtmikroskopisch fotografiert.

3.13.2 Immunzytochemischer Nachweis des Kollagen Typ I

Osteoblasten (insbesondere die Differenzierungsstadien vom transitorischen, über den sekretorischen zum osteolytischen Osteoblasten) lassen sich durch eine spezifisch hohe Aktivität an Kollagen Typ I mithilfe der im Folgenden beschriebenen Avidin-Biotin-Methode nachweisen:

Nach Auftauen der chamber slides und einem Waschvorgang mit PBS ließen sich die Zellen mit 0,4% Pepsin in 0,01 N HCl für 90 Minuten bei 37 °C in einer feuchten Kammer andauern. Es folgten zwei Waschvorgänge mit PBS. Anschließend wurde eine Proteinkinase für 10 min bei Raumtemperatur aufgetragen. Eine Verdünnung des Kollagen-I-Antikörpers mit PBS im Verhältnis 1:25 und eine Negativkontrolle (nur PBS) wurde aufgetragen und die Proben über Nacht bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde der zweite Antikörper (anti-rabbit-IgG, 1:200, Vector Laboratories Inc, USA) und nach einem Waschvorgang mit PBS der Avidin-Biotin-Komplex für jeweils 30 min Inkubationszeit hinzupipettiert. Nach einer Wiederholung des eben beschriebenen Vorgangs wurden die Proben mit dem AEC-Substrat unter mikroskopischer Kontrolle solange inkubiert, bis die Zellen eine genügend intensive Färbung aufwiesen.

3.13.3 Immunzytochemischer Nachweis des Osteocalcin

Osteocalcin ist ein von Osteoblasten produziertes Protein der extrazellulären Knochenmatrix, welches am Knochenumbau beteiligt ist. Es bindet an den sekretorischen Osteoblasten und den Osteozyten, so dass es als Osteoblastennachweis dient [Ingram, Park et al. 1994].

Für den Nachweis des Osteocalcins wurden die aufgetauten chamber slide Objektträger zunächst für fünf Minuten in PBS gestellt und im Anschluss der Primärantikörper in einer Verdünnung von 1:1.000 für 15 Minuten bei Raumtemperatur aufgetragen. Nach einer zweimaligen Spülung mit PBS wurde die Reaktion durch Hinzugabe eines Dako Proteinblocks für weitere 10 min gestoppt. Der Osteocalcin-Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:50 mit Antikörper-Detektionslösung über Nacht bei Raumtemperatur (in einer feuchten Kammer) inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde anti-rabbit-IgG in einer Verdünnung von 1:200 in PBS aufgetragen. Unter lichtmikroskopischer Kontrolle wurden die

Zellen inkubiert, bis sie analog zu Kapitel 3.13.1 auf den Objektträgern fixiert werden konnten.

3.14 Statistik und Datenerfassung

Die statistische Auswertung wurde unter Verwendung der Computerprogramme Microsoft Excel 2003 und SPSS (Version 11.5 für Windows) durchgeführt. Alle statistischen Analysen und Vergleiche wurden explorativ zum 5% Signifikanzniveau vorgenommen. Somit wurden Unterschiede bei den Auswertungen als signifikant bezeichnet wenn $p \leq 0,05$ betrug. Folgende statistische Tests wurden durchgeführt: Dunnet-T-Test zur Auswertung der DNA-Quantifizierung, des MTT-Tests, des BCA-Assays, der Caspase 3,7-Aktivität, der ALP-Aktivität (hierbei wurde zusätzlich der Dunnett-C-Test angewandt) sowie der Quantitativen Bestimmung des Calciums. Desweiteren wurde die Standardabweichung für alle Tests in Excel berechnet.

4 Ergebnisse

Zunächst wurde zur Optimierung der Arbeitsschritte ein Vorversuch mit einem bereits mehrfach etablierten Antibiotikum durchgeführt (siehe Kapitel 4.1). Es folgten immunzytochemische Färbungen der in den Versuchen verwendeten Poolzellen, um die Zellen zu typisieren (Kapitel 4.2). Sämtliche Ergebnisse werden im Folgenden nach Medikamenten geordnet aufgeführt (Kapitel 4.3-4.7). Beginnend mit Resultaten aus Messungen bezüglich der Zellproliferation (Zellzahl, DNA-Quantifizierung, Zellproliferation und -aktivität und Bestimmung des Gesamtproteins und Zelltod) folgten Messungen zur Zelldifferenzierung und die Bestimmung der Matrix-Mineralisation bzw. des Calciumgehaltes der Knochenzellkulturen.

4.1 Immunzytochemische Nachweise

4.1.1 Nachweis der Alkalischen Phosphatase

Die untersuchten Zellen wiesen insgesamt eine hohe ALP-Aktivität auf. Somit waren sie als Osteoblasten einzuordnen. Abbildung 11 zeigt eine Aufnahme der Zellen, welche einen hohen Gehalt an ALP aufweisen und somit blau angefärbt erscheinen. Die helleren, nicht angefärbten Bereiche entsprechen zellfreien Bereichen. Auch stärker colorierte, dunkler erscheinende Bereiche um die Zellmembran, Kernmembran und den Nukleolus innerhalb der Zelle, sprechen für die osteogene Potenz der Proben.

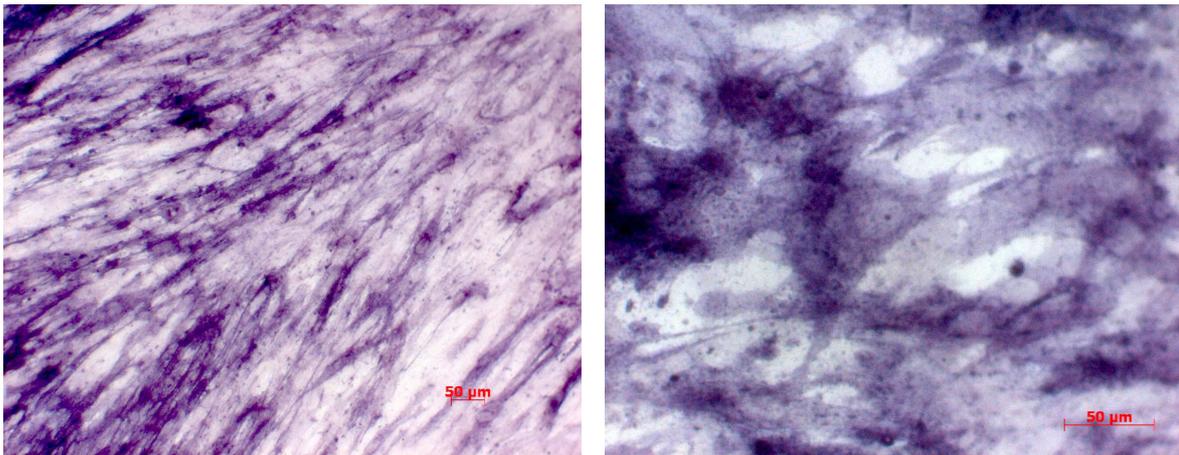


Abb.11: Lichtmikroskopische Aufnahme der Zellproben nach dem ALP-Nachweis (blau angefärbte Bereiche)

4.1.2 Nachweis von Kollagen Typ I

Die immunzytochemische Färbung konnte Kollagen Typ I in allen getesteten Zellkulturen positiv nachweisen. Das Kollagen stellt sich in den Färbungen der chamber slides als rote Einlagerungen dar (Abb. 12).

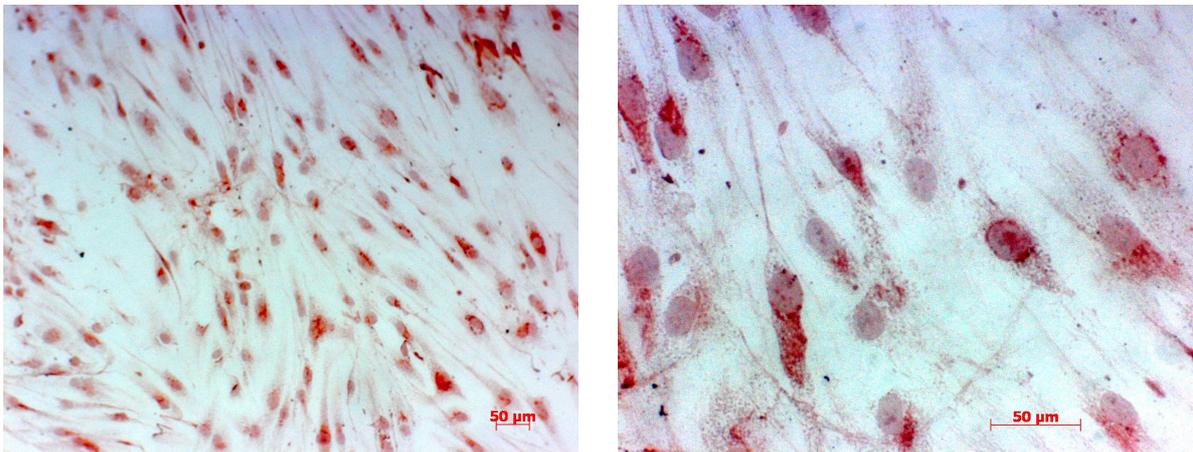


Abb. 12: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Osteoblasten nach Kollagen-I-Färbung (rote Bereiche)

4.1.3 Nachweis von Osteocalcin

Die immunzytochemische Darstellung des von den Osteoblasten exprimierten Osteocalcins fiel für sämtliche untersuchten Zellkulturen positiv aus. Die Osteocalcinablagerungen bilden sich als rötliche intra- und extrazelluläre Anfärbungen ab (siehe Abb. 13).

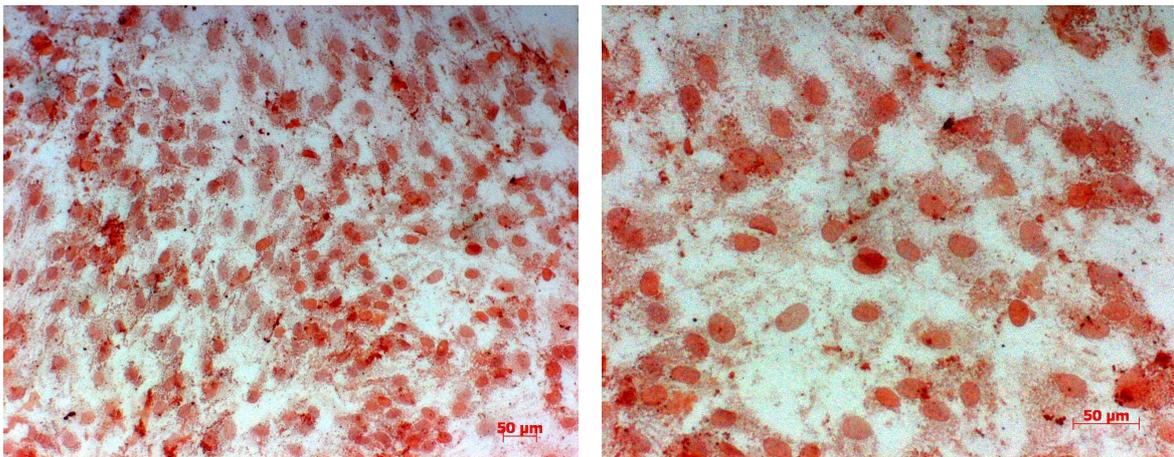


Abb. 13: Lichtmikroskopische Aufnahmen zum Nachweis der rötlich angefärbten Osteocalcinablagerungen

4.2 Ergebnisse Cefotiam (Spizef®)

4.2.1 Bestimmung der Zellzahl und Vitalitätskontrolle

Durch die Bestimmung der Zellzahl und Kontrolle der Zellvitalität sollte wie in Kapitel 3.5 beschrieben, der Einfluss von Cefotiam auf die Zellproliferation der Osteoblasten zu den Inkubationszeitpunkten von 24, 48 und 72 h bestimmt werden. Es wurden nur lebende, vitale Zellen gezählt. Zu Beginn des Versuchs wurden 20.000 Zellen pro Well, also 120.000 Zellen pro Verdünnungsstufe, ausgesät.

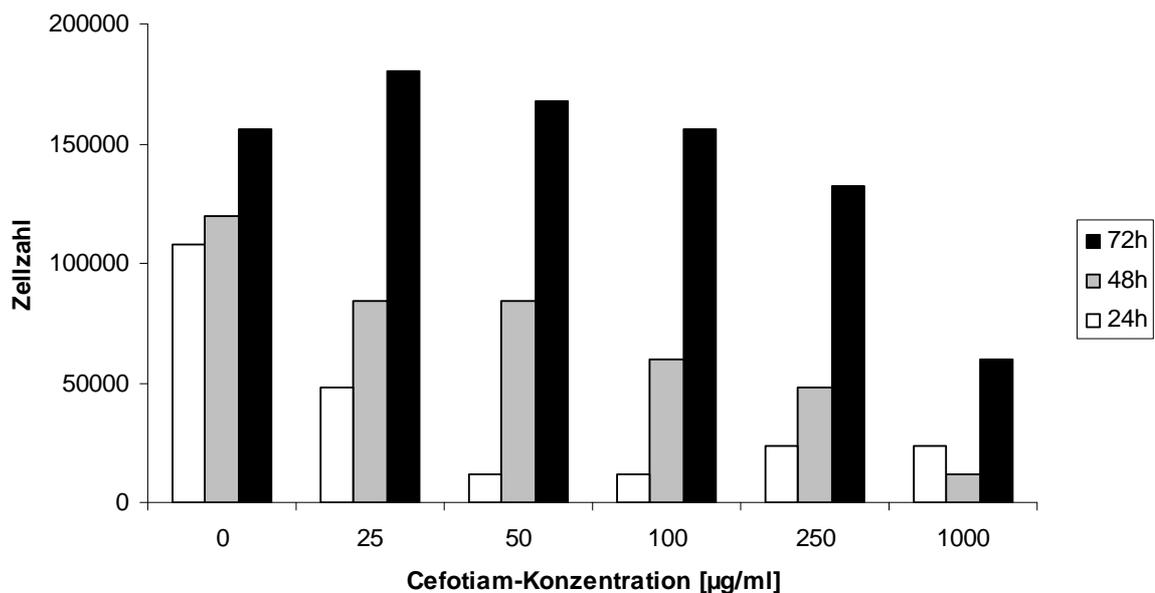


Abb. 14: Zellzahl nach Applikation von Cefotiam nach 24, 48, 72 h. Die Säulen zeigen die absolute Zellzahl zu den angegebenen Untersuchungszeiträumen und Cefotiam-Konzentrationen

Die Y-Achse (Abb. 14) entspricht der absoluten Zellzahl. Die Konzentration 0 µg/ml Cefotiam entspricht dem Kontrollansatz, das heißt, dem Zellansatz ohne Zugabe von Pharmaka. Mit steigender Pharmakon-Konzentration ließ sich tendentiell ein leichter Rückgang der Zellkonzentration erkennen. Dies war bei Konzentration von 1.000 µg/ml Cefotiam am stärksten ausgeprägt. Mit zunehmender Inkubationszeit stieg auch die Zellzahl.

4.2.2 DNA-Quantifizierung

Die Bestimmung des DNA-Gehaltes in den Zellproben wird durch Abbildung 15 veranschaulicht. Nach 24 h erwies sich der DNA-Gehalt in den untersuchten Zellproben als gering, und nahm mit steigender Antibiotikakonzentration zu. Nach 48-stündiger Inkubationszeit hingegen war die DNA-Konzentration in den Zellproben durch alle Verdünnungsstufen hindurch sehr gering. Erst nach 72 h war im Vergleich zu den kürzeren Inkubationszeiten ein deutlicher Anstieg des DNA-Gehaltes der Zellproben erkennbar. Während Konzentrationen im Bereich von 25-250 $\mu\text{g/ml}$ kaum Einfluss auf die DNA-Konzentration hatten, sank die DNA-Konzentration bei 1.000 $\mu\text{g/ml}$ Cefotiam und Inkubationszeiten von 48 und 72 h signifikant (bei $p < 0,05$). Einzige Ausnahme war der signifikante Anstieg der DNA-Menge bei 1.000 $\mu\text{g/ml}$ Cefotiam nach 24 h Einwirkzeit.

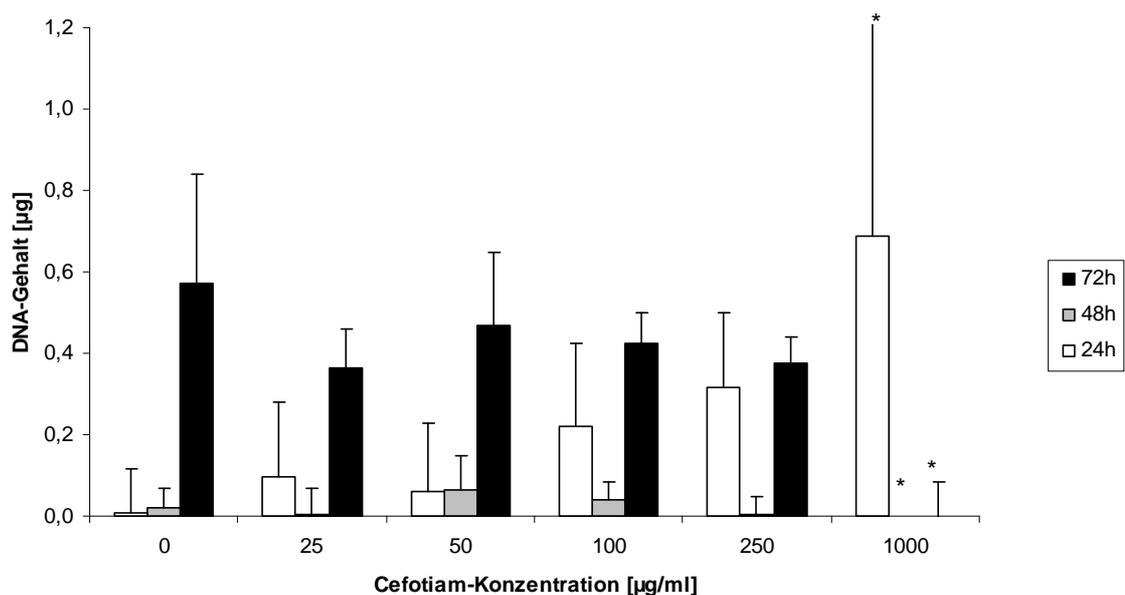


Abb. 15: DNA-Gehalt der Zellproben in Abhängigkeit von der Cefotiam-Konzentration

4.2.3 Bestimmung der Zellproliferation

Die Ergebnisse der Cefotiam-induzierten Effekte auf die Zellproliferation werden in Abbildung 16 dargestellt. Konzentrationen von 0, 25, 50 $\mu\text{g/ml}$ Cefotiam hatten einen nur geringen Einfluss auf die Zellproliferation. Verdünnungen von 100 ($p=0,000$), 250 ($p=0,000$), 1.000 ($p=0,004$) $\mu\text{g/ml}$ Cefotiam ließen die Proliferationsrate nach 24 h kontinuierlich hochsignifikant ansteigen. Längere Einwirkzeiten von 48 und 72 h zeigten einen statistisch hochsignifikanten Anstieg ($p= 0,003$ bzw. $p=0,000$) ab Werten von 1.000 $\mu\text{g/ml}$ Cefotiam.

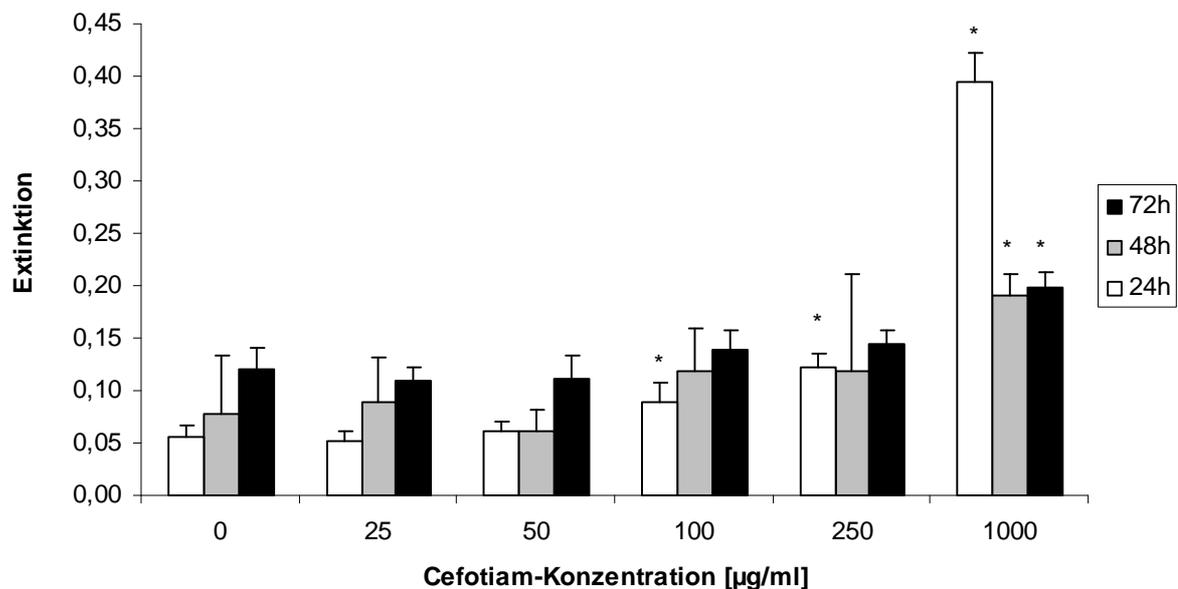


Abb.16: Cefotiamabhängige Veränderungen der Zellproliferation gemessen anhand der Extinktion

4.2.4 Bestimmung des Gesamtproteins

Der Einfluss von Cefotiam auf den Proteingehalt wurde anhand des BCA-Tests ermittelt. Abbildung 17 veranschaulicht den konzentrationsabhängigen Einfluss des Medikaments auf das Gesamtprotein. Insgesamt zeigte sich die Auswirkung des Pharmakons auf die Proteinkonzentration in den Proben als nur gering. Die Cefotiam-Konzentration hatte kaum Einfluss auf die Proteinkonzentration. Bis hin zu Werten von 50 µg/ml Cefotiam ließ sich ein geringfügiges Absinken des Gesamtproteins und bei höheren Werten ein leichter Anstieg erkennen. Im Vergleich zu 24-stündiger Inkubationszeit sank nach 48 h das Gesamtprotein geringfügig. Die höchsten Werte der Proteinkonzentration wurden nach 72 h beobachtet. Einzig hochsignifikanten Einfluss ($p \leq 0,000$) auf das Gesamtprotein war bei höchster Pharmaka-Konzentration von 1.000 µg/ml nach 72h Inkubationszeit zu beobachten. In diesen Proben sank der Proteingehalt im Vergleich zur Kontrolle deutlich ab.

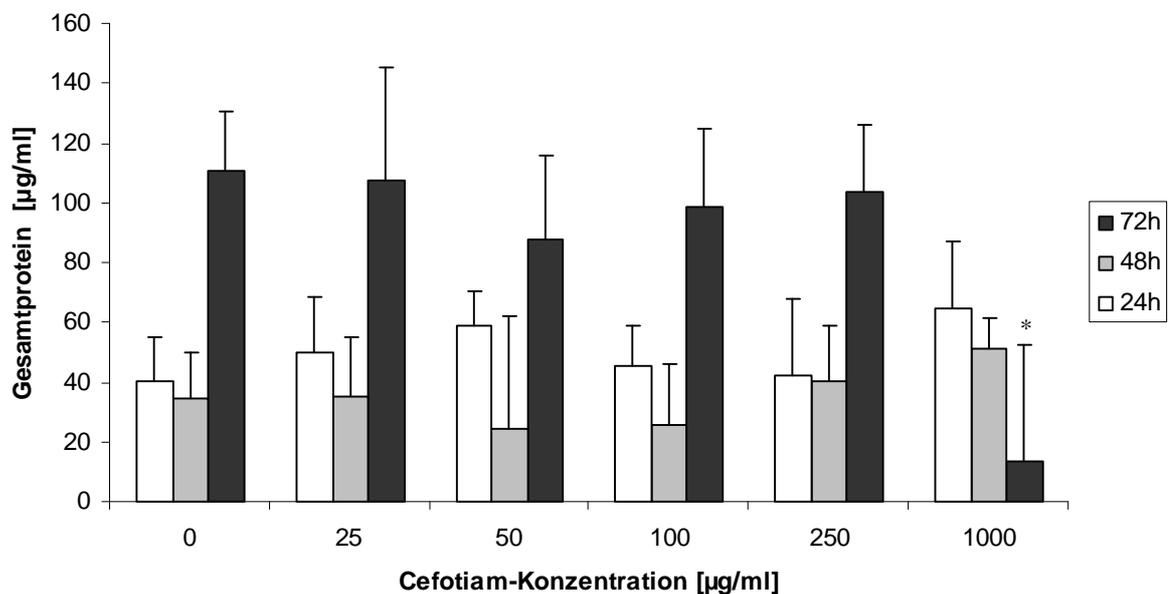


Abb.17: Proteingehalt der Zellproben in Abhängigkeit von der Cefotiam-Konzentration

4.2.5 Bestimmung der Apoptoserate

Das nachfolgende Diagramm (Abb. 18) stellt die proportional zur Caspasen-Aktivität gemessene Lumineszenz der Zellproben in Abhängigkeit von der Pharmakon-Konzentration und den verschiedenen Inkubationszeiten dar. Sowohl nach 24 h als auch nach 48 h Inkubationszeit zeigte sich ab einer Konzentration von 25 µg/ml Cefotiam mit zunehmender Pharmakon-Konzentration eine statistisch signifikante Verminderung der Intensität der apoptotischen Prozesse in den jeweiligen Zellproben im Vergleich zur Kontrolle. Nach 72 h Einwirkzeit zeigte sich eine allmählich abfallende Apoptoserate mit zunehmender Medikamentenkonzentration, die erst ab 100 µg/ml Cefotiam statistisch hochsignifikant abfiel. Insgesamt konnte mit steigender Inkubationszeit eine Verminderung der Apoptosevorgänge in den jeweiligen Zellproben gemessen werden.

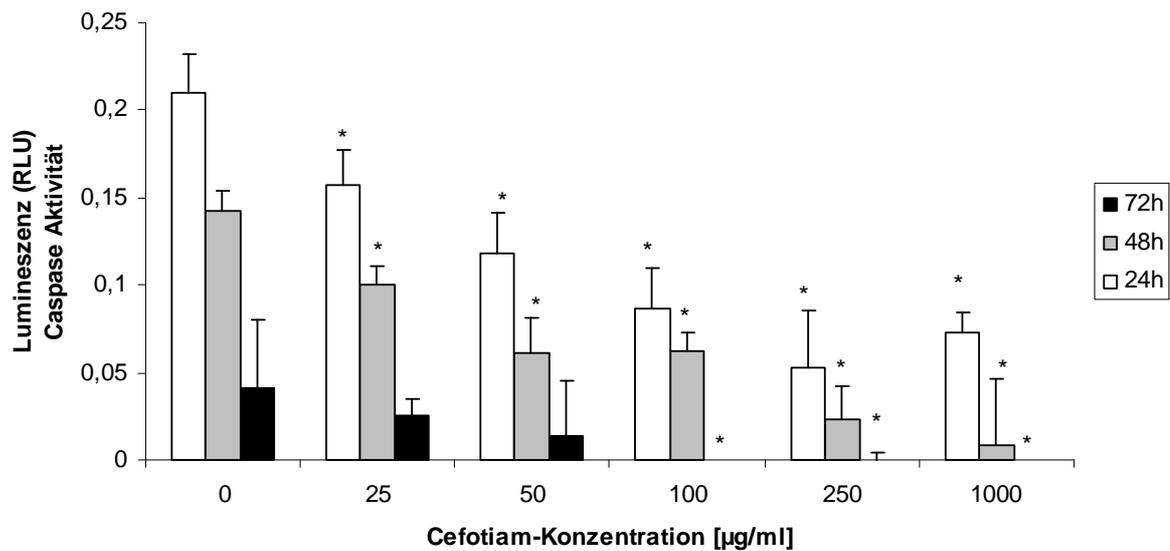


Abb.18: Caspaseaktivität der untersuchten Osteoblasten in Abhängigkeit von der Cefotiam-Konzentration

4.2.6 Bestimmung der Zellaktivität durch ALP-Messung

Die Produktion der Alkalischen Phosphatase wurde auf die entsprechende Gesamtproteinkonzentration der jeweiligen Pharmakakonzentrationsstufe bezogen, um Aussagen über die spezifische Aktivität der Zellen zu erhalten. Die Zellaktivität der mit Cefotiam behandelten Osteoblasten zeigte keine relevanten Veränderungen hinsichtlich steigender Pharmakonkonzentration (siehe Abb. 19). Eine statistisch signifikante Abnahme der Aktivität konnte lediglich nach 72 h Inkubationszeit bei höchster Konzentration von 1.000 $\mu\text{g/ml}$ Cefotiam nachgewiesen werden. Ansonsten zeigte sich im Vergleich zu 24-stündiger Einwirkzeit eine Aktivitätszunahme von bis zu 250 $\mu\text{g/ml}$ Cefotiam nach 48 h, welche nach 72 h Inkubation wieder geringfügig abnahm. Ebenso stieg die Zellaktivität bei Konzentrationen von 50 und 100 $\mu\text{g/ml}$ Pharmakon.

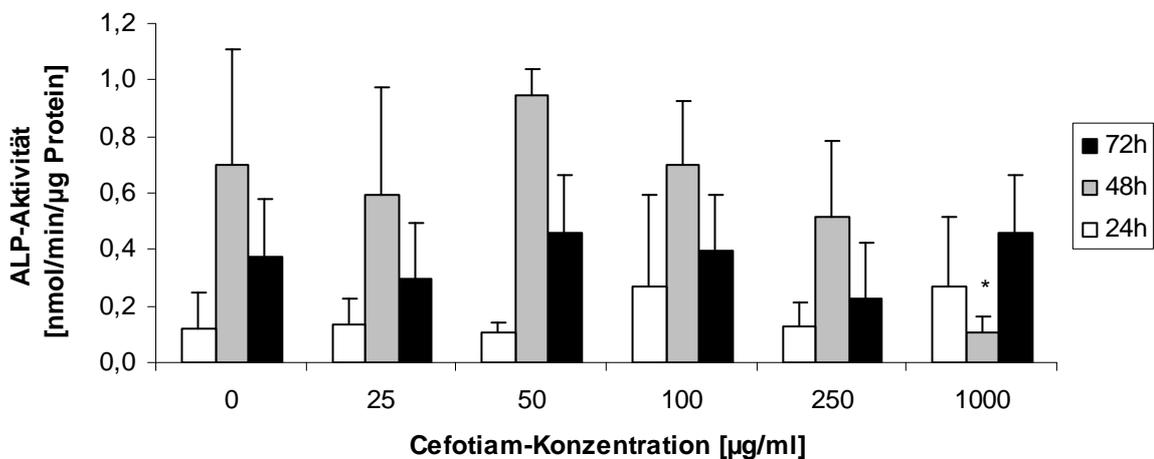


Abb. 19: Zellaktivität bezogen auf die Proteinkonzentration der jeweiligen Pharmakonkonzentration nach Cefotiam-Behandlung

4.2.7 Mineralisationsnachweis durch Bestimmung des Calciumgehaltes

4.2.7.1 Quantitativer Nachweis

Der Calciumgehalt in den Zellkulturen, welche jeweils drei und vier Wochen verschiedenen Cefotiam-Verdünnungsstufen ausgesetzt waren, wird in Abbildung 20 graphisch dargestellt. Nach drei Wochen Inkubationszeit mit Cefotiam zeigte sich kein oder nur ein geringfügiger Einfluss auf die Calcifizierung allen getesteten Verdünnungsstufen von 25, 50, 100, 250 und 1.000 $\mu\text{g/ml}$. Auch nach vier Wochen Inkubation hatte das Medikament (bei Verdünnungen von 0-100 $\mu\text{g/ml}$) kaum einen Einfluss auf den Calciumgehalt in den Proben. Die Calcifizierung nahm erst nach vierwöchiger Einwirkzeit unter Behandlung mit 250 und 1.000 $\mu\text{g/ml}$ Cefotiam statistisch signifikant ab.

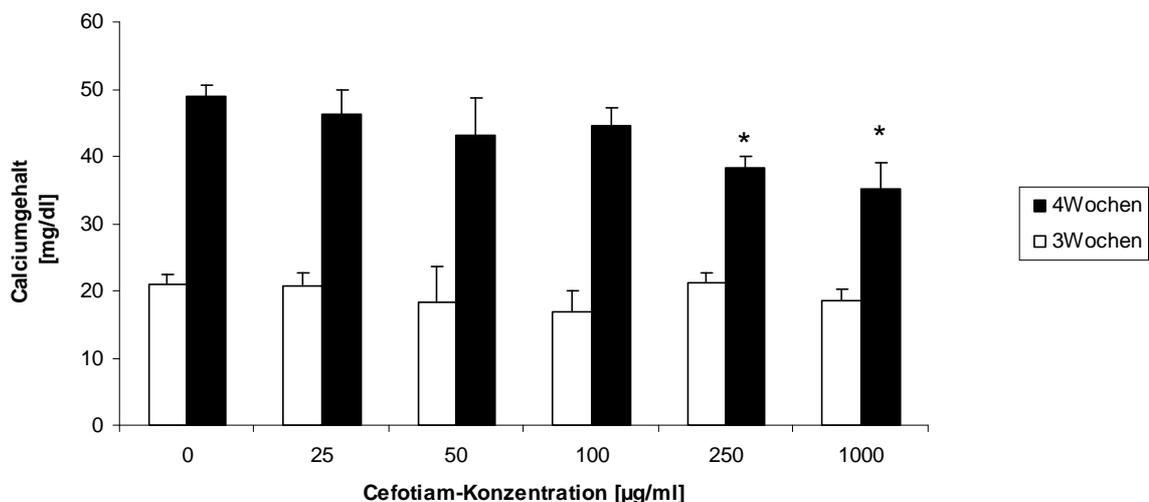


Abb. 20: Calciumgehalt der Osteoblastenkulturen in Abhängigkeit von der Cefotiam-Konzentration

4.2.7.2 Alizarinrot-Färbung

Lichtmikroskopisch konnte eine verminderte Mineralisation der Osteoblasten mit steigender Pharmakonkonzentration beobachtet werden. Die Zellen bildeten einen konfluenten Zellrasen, in welchem die rotgefärbten Mineralisationskerne („nodules“) zwischen den Zellen homogen verteilt waren.

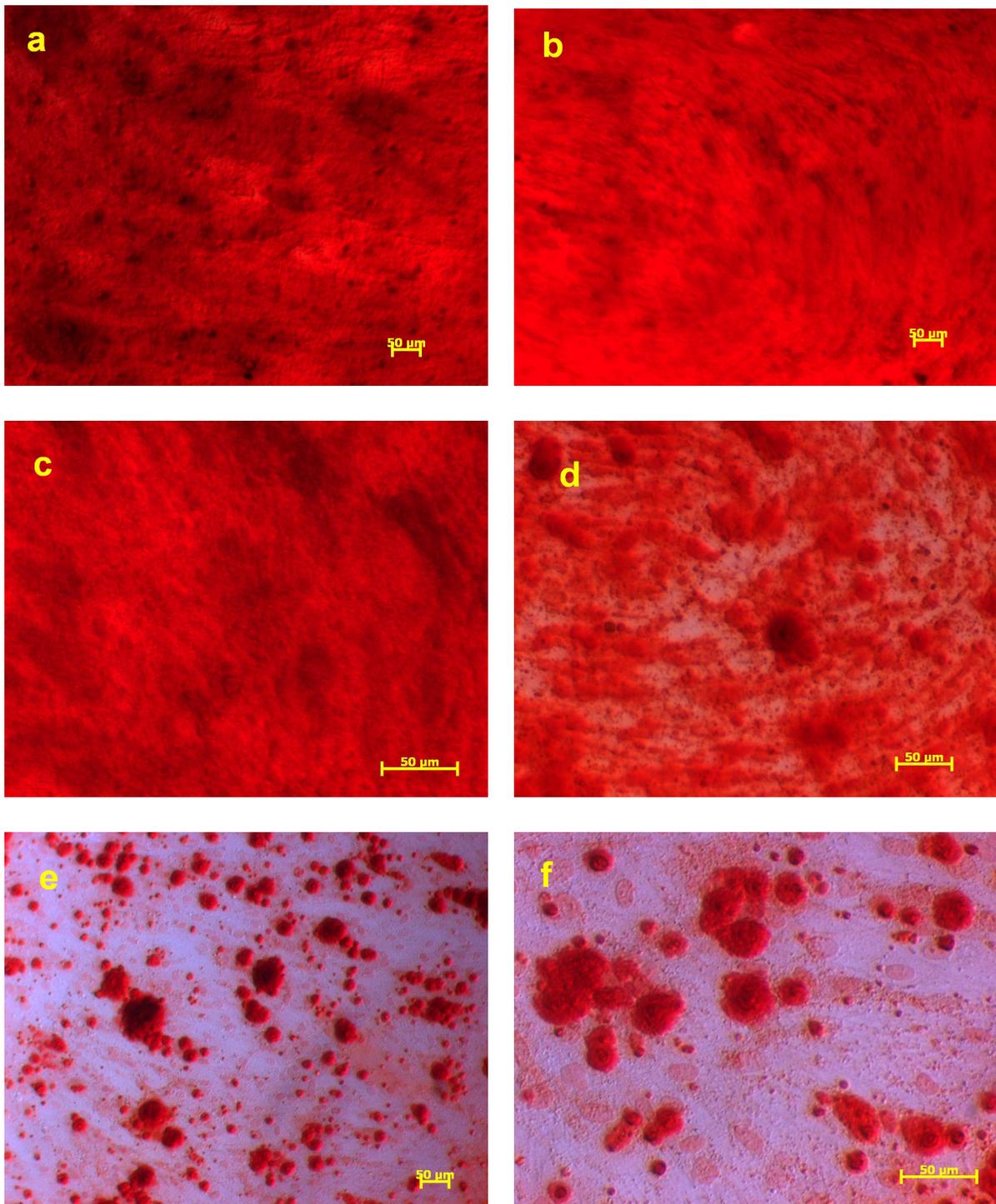


Abb. 21: Alizarinrotfärbung der mit Cefotiam behandelten Osteoblasten. Die gleichmäßig verteilten Mineralisationskerne (sogenannte „nodules“) erscheinen rot

a: Kontrollansatz ohne Pharmakonzusatz

b: 25 µg/ml Cefotiam

c: 50 µg/ml Cefotiam

d: 100 µg/ml Cefotiam

e: 500 µg/ml Cefotiam

f: 1.000 µg/m Cefotiam

4.3 Ergebnisse Ceftriaxon (Rocephin®)

4.3.1 Bestimmung der Zellzahl und Vitalitätskontrolle

Mit steigender Inkubationszeit der mit Ceftriaxon behandelten Osteoblasten, stieg auch die Zellzahl, was sich insbesondere bei dem Kontrollansatz ohne Antibiotikagabe zeigte. Ansonsten sank die Zellzahl mit ansteigender Ceftriaxon-Konzentration geringfügig (siehe Abb. 22). Insgesamt hatte die Menge des zugegebenen Ceftriaxons jedoch erst nach 48 und 72 h Inkubationszeit einen deutlich hemmenden Einfluss auf das Zellwachstum.

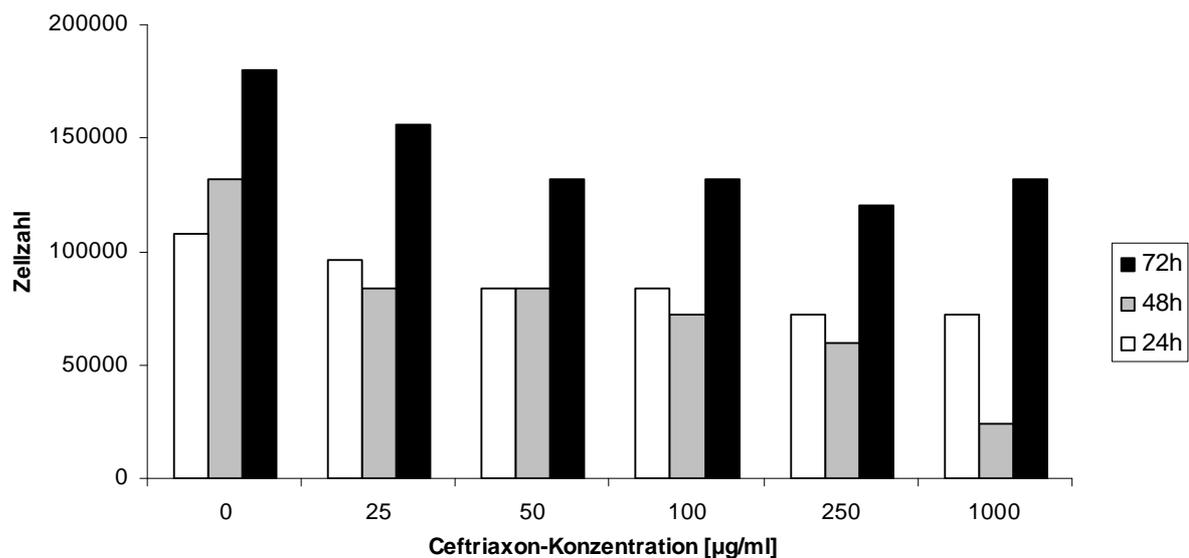


Abb. 22: Zellzahl in Abhängigkeit von der Ceftriaxon-Konzentration nach 24, 48 und 72 h. Die Säulen zeigen die absolute Zellzahl zu den angegebenen Untersuchungszeiträumen und Ceftriaxon-Konzentrationen

4.3.2 DNA-Quantifizierung

Abbildung 23 illustriert den DNA-Gehalt der Osteoblastenkulturen in Abhängigkeit von der Ceftriaxon-Konzentration und den Inkubationszeiten, denen sie ausgesetzt waren. Es zeigten sich diesbezüglich keine statistisch signifikanten Unterschiede in den Zellkulturen. Selbst die Höchstdosis von 1.000 $\mu\text{g/ml}$ Ceftriaxon verursachte keine wesentlichen Veränderungen des DNA-Gehaltes in den Zellproben. Mit steigender Inkubationszeit nahm bei sämtlichen getesteten Antibiotikakonzentrationen auch der DNA-Gehalt zu.

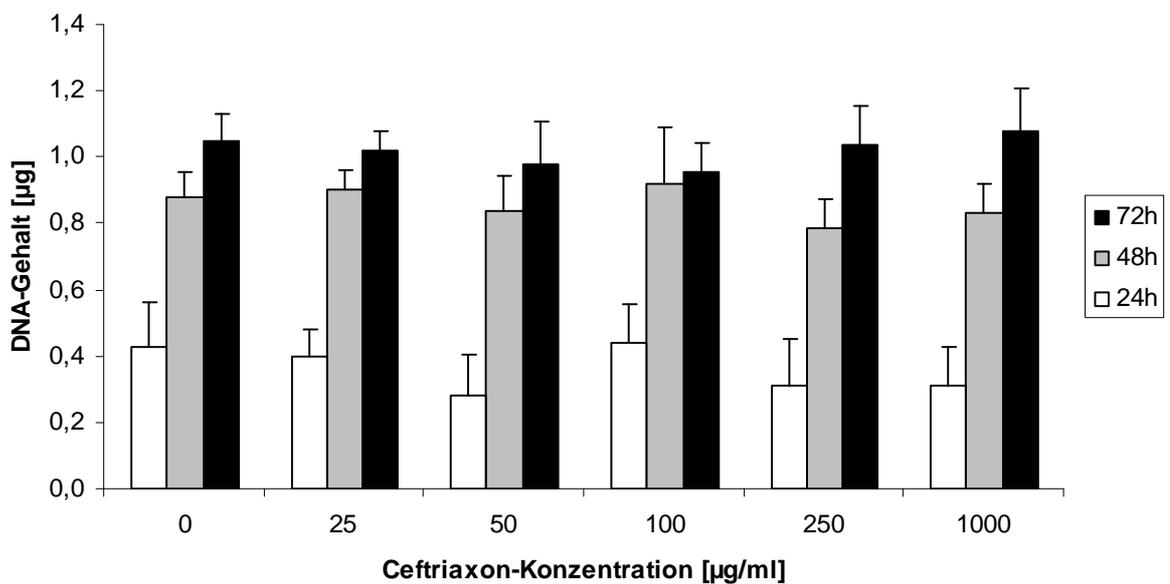


Abb. 23: DNA-Gehalt der Zellproben in Abhängigkeit von der Ceftriaxon-Konzentration

4.3.3 Bestimmung der Zellproliferation

Nachfolgende Abbildung veranschaulicht die Auswirkungen von Ceftriaxon-behandelten Osteoblasten auf deren Proliferationsrate, wobei die gemessene Absorption der Zellproben proportional zur Zellproliferation ist. Ceftriaxon in den Verdünnungen von 1.000 $\mu\text{g/ml}$ zeigte zu allen Inkubationszeiten einen signifikanten proliferationssteigernden Einfluss (24 h: $p=0,00$, 48 h: $p=0,001$; 72 h: $p=0,000$). Eine 48-stündige Inkubationszeit bewirkte bei einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ des Antibiotikums ebenso einen Anstieg der Zellproliferation ($p=0,041$). Ein statistisch signifikanter Rückgang der Zellproliferationsrate wurde erst bei einer Konzentration von 250 $\mu\text{g/ml}$ nach 24-stündiger Inkubation ermittelt ($p=0,001$). Ansonsten zeigte sich kein oder nur ein geringer Einfluss des Pharmakons auf die Aktivität der vitalen Zellen.

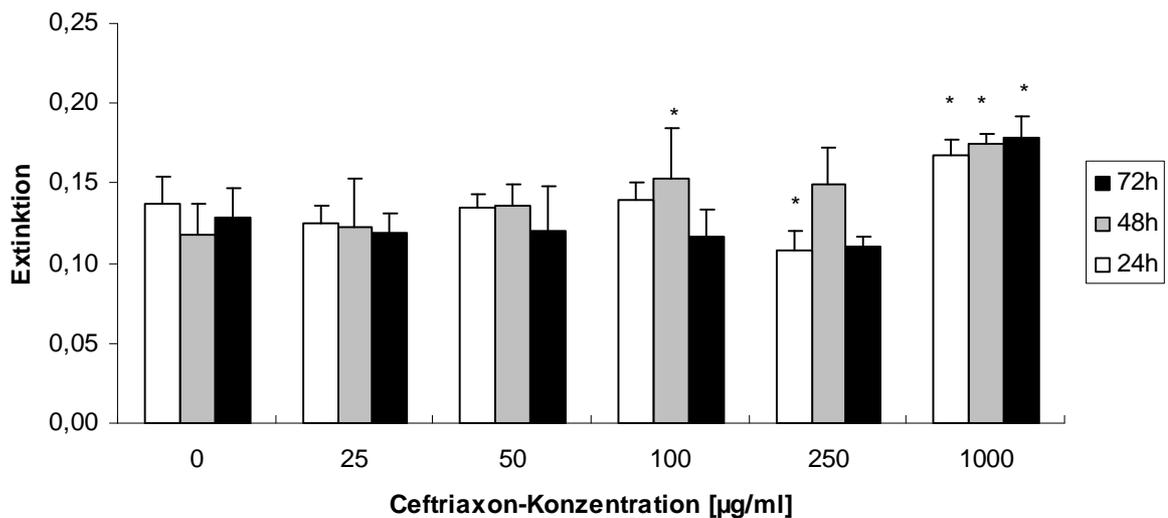


Abb. 24: Ceftriaxon-abhängige Veränderungen der Zellproliferation gemessen durch Extinktionswerte

4.3.4 Bestimmung des Gesamtproteins

Die Ergebnisse der Messung des gesamten Proteingehalts der Proben werden in Abbildung 25 illustriert. Steigende Ceftriaxonkonzentrationen bis hin zu 1.000 $\mu\text{g/ml}$ hatten zu Inkubationszeiten von 24 und 72h keinen oder nur geringen Einfluss auf den Proteingehalt der Zellen. Lediglich bei einer Inkubationszeit von 48 h zeicheten sich leichte Tendenzen zu einer steigenden Proteinkonzentration mit steigender Pharmakakonzentration ab.

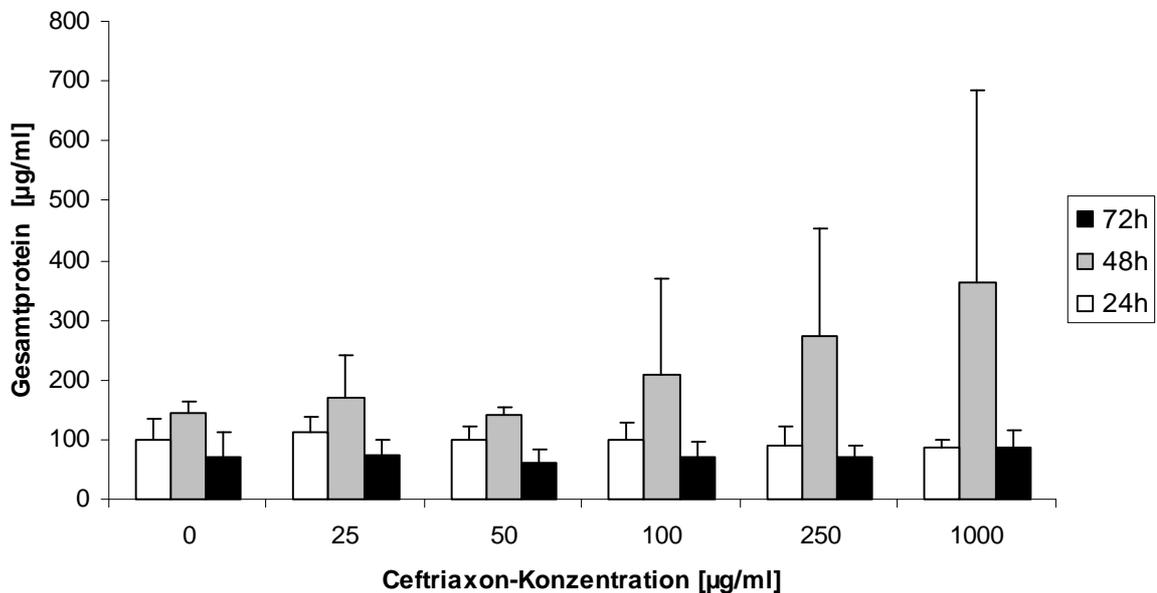


Abb. 25: Gesamtproteingehalt der Zellproben in Abhängigkeit von der Ceftriaxon-Konzentration

4.3.5 Bestimmung der Apoptoserate

Nachfolgende Abbildung (Abb. 26) veranschaulicht die Apoptoserate, gemessen durch die Caspase-Aktivität im Photometer, in Abhängigkeit von der Pharmakonkonzentration über die Zeit, der die Zellen ausgesetzt waren. Es zeigte sich ein Rückgang der Apoptosevorgänge mit zunehmender Pharmakakonzentration zu allen Inkubationszeiten. Statistisch signifikant wird dieser Rückgang nach 24 und 72 h Inkubation ab Werten von 50, 100, 250 bis zu 1.000 $\mu\text{g/ml}$ Ceftriaxon. Vergleicht man die Häufigkeit des programmierten Zelltodes in den Zellen zu den verschiedenen Inkubationszeiten miteinander, so war die höchste Dichte nach 24 h zu messen. Nach längerer Inkubation von 48 h war die Apoptoserate in den Zellen deutlich geringer im Vergleich zu kürzerer Einwirkzeit. Nach 72 h zeigte sich dann wieder eine vermehrte Caspaseaktivität in den Osteoblasten, welche jedoch noch unter dem 24 h-Wert lag.

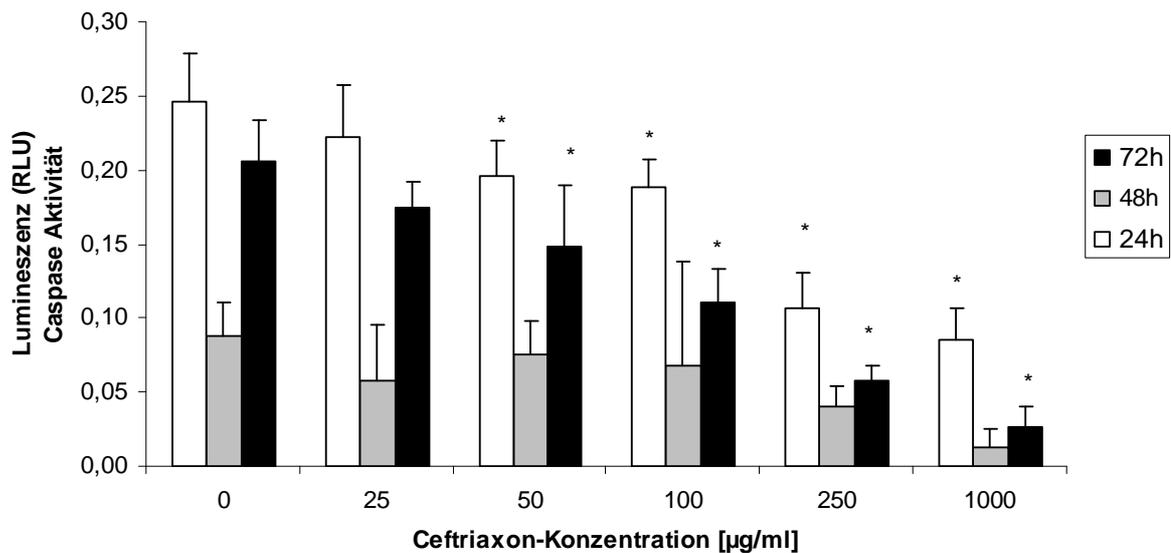


Abb. 26: Caspaseaktivität gemessen anhand der Lumineszenz der Zellproben bei verschiedenen Pharmakakonzentrationsstufen

4.3.6 Bestimmung der Zellaktivität

Die Aktivität der Alkalischen Phosphatase ließ sich durch Zugabe unterschiedlicher Ceftriaxonverdünnungen kaum beeinflussen. Einzig statistisch signifikante Aktivitätsabnahme zeigte sich nach 72 h unter Behandlung mit 1.000 $\mu\text{g/ml}$ Ceftriaxon. Eine Beobachtung der Zellaktivität über die Zeit, zeigte eine geringfügige Abnahme derselben nach 48 h im Vergleich zu 24 h Inkubationszeit, um nach 72 h wieder deutlich anzusteigen (siehe Abb. 27).

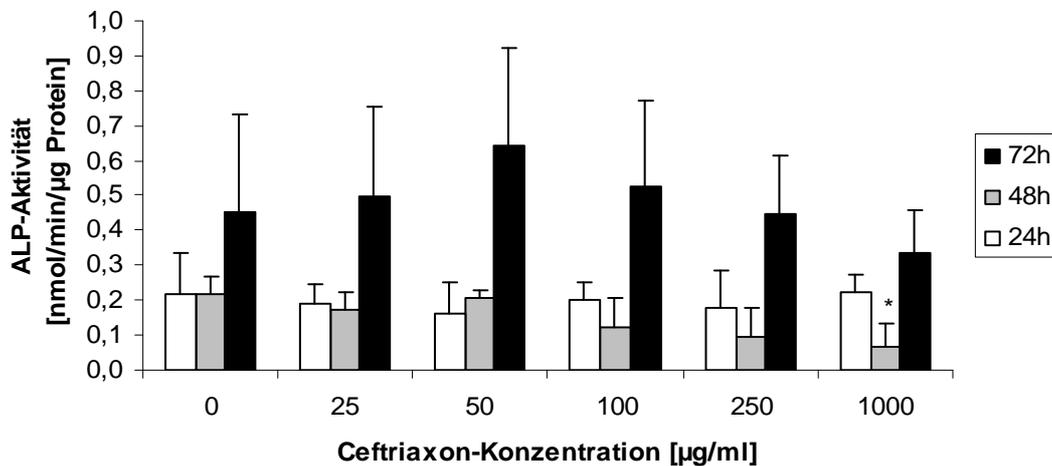


Abb. 27: ALP-Aktivität bezogen auf das Gesamtprotein in den Zellproben in Abhängigkeit von der Ceftriaxon-Konzentration

4.3.7 Mineralisationsnachweis durch Bestimmung des Calciumgehaltes

4.3.7.1 Quantitativer Nachweis

Die quantitative Beurteilung der Matrix-Mineralisation erfolgte durch Bestimmung der Calcium-Konzentrationen der getesteten Zellkulturen (Abb. 28). Nach drei Wochen Zellkultur konnte nur ein geringer Einfluss von Ceftriaxon aller getesteten Verdünnungsstufen auf den Calciumgehalt beobachtet werden. Nach einer weiteren Woche Inkubationszeit zeigte sich ein ähnliches Bild, wobei unter Behandlung mit 100 und 250 $\mu\text{g/ml}$ Ceftriaxon die Calcifizierung statistisch signifikant stimuliert wurde. Im Vergleich zu einer dreiwöchigen Inkubationszeit lag der Calciumgehalt der Proben nach vier Wochen insgesamt höher.

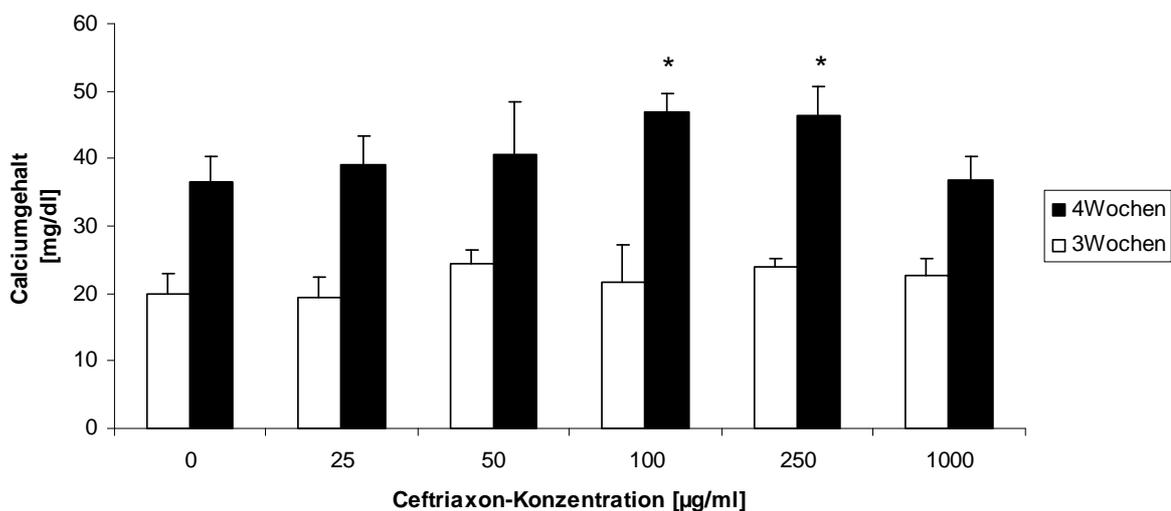


Abb.28: Calciumgehalt der Osteoblastenkulturen in Abhängigkeit von der Ceftriaxon-Konzentration nach drei bzw. vier Wochen Inkubationszeit

4.3.7.2 Alizarinrot-Färbung

Es zeigte sich mit steigender Ceftriaxon-Konzentration eine geringere Mineralisationsdichte in den Wells. Abbildung 29 veranschaulicht dies in lichtmikroskopischer Darstellung. Mit zunehmender Ceftriaxon-Konzentration nahm der konfluente Zellrasen ab und es zeigten sich weniger rotgefärbte nodules (Mineralisationskerne) in den getesteten Proben.

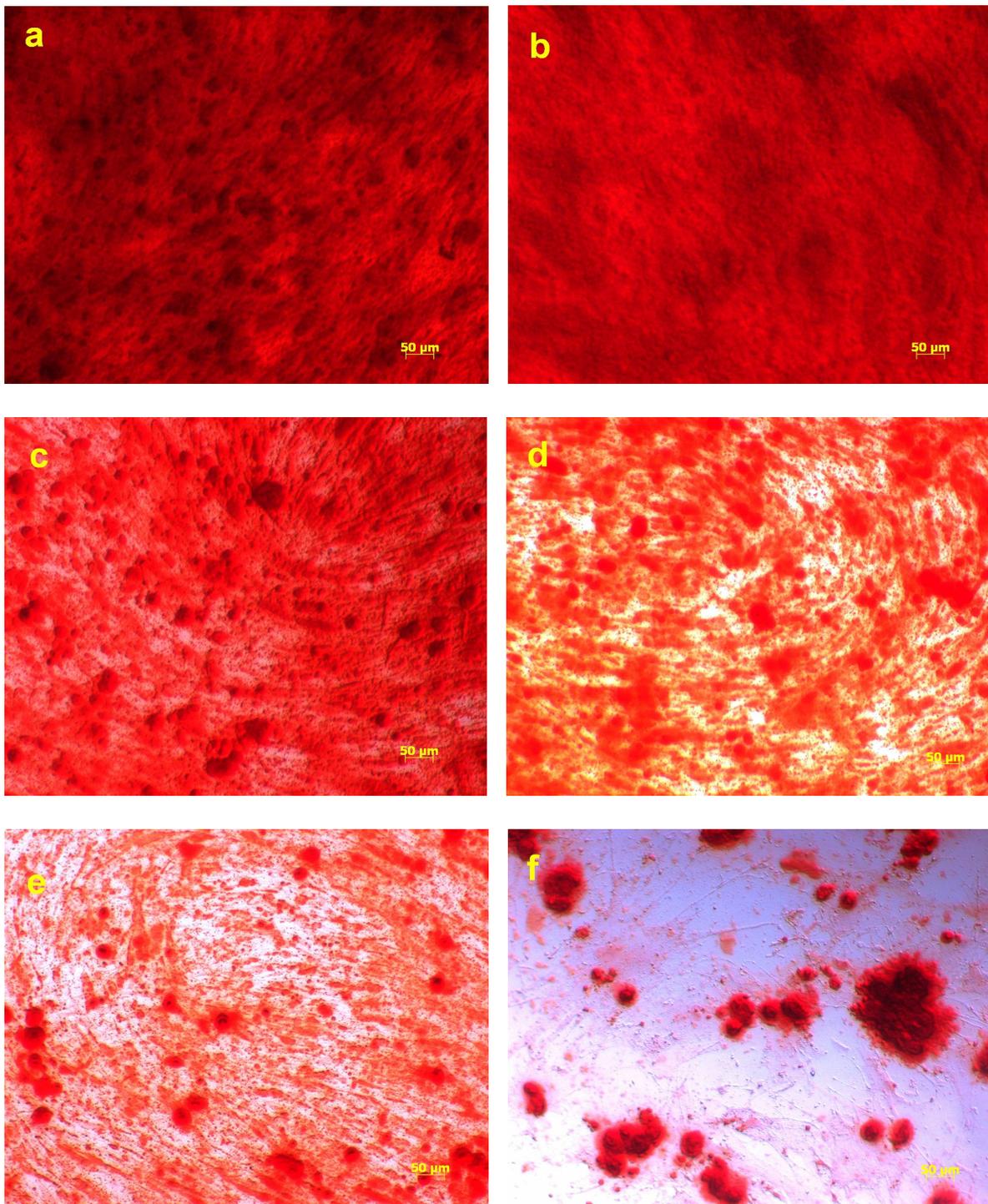


Abb.29: Alizarinrotfärbung der mit Ceftriaxon behandelten Osteoblasten. Die gleichmäßig verteilten Mineralisationskerne (sogenannte „nodules“) erscheinen rot
a: Kontrollansatz ohne Pharmakonzusatz
b: 25 µg/ml Ceftriaxon
c: 50 µg/ml Ceftriaxon
d: 100 µg/ml Ceftriaxon
e: 500 µg/ml Ceftriaxon
f: 1.000 µg/m Ceftriaxon

4.4 Ergebnisse Linezolid (Zyvoxid®)

4.4.1 Bestimmung der Zellzahl und Vitalitätskontrolle

Die mit Linezolid behandelten Kulturen zeigten erst bei einer Inkubationszeit von sieben Tagen einen deutlichen Rückgang der Zellzahl bereits in therapeutischer Wirkdosis. Mit zunehmender Inkubationszeit stieg die Zellzahl vor allem in den Kontrollgruppen ohne Pharmakon. Mit steigender Pharmakonkonzentration sank hingegen das Wachstum, was besonders bei Konzentrationen ab dem Bereich von 50 µg/ml Linezolid zum Ausdruck kam (Abb. 30). Bei geringeren Konzentrationen zeigte sich kaum ein Einfluss auf die Zellzahl bis 50 µg/ml. Einzig eine einwöchige Inkubationszeit von sieben Tagen wirkte sich schon bei geringen Dosen von bereits 10 µg/ml negativ aus.

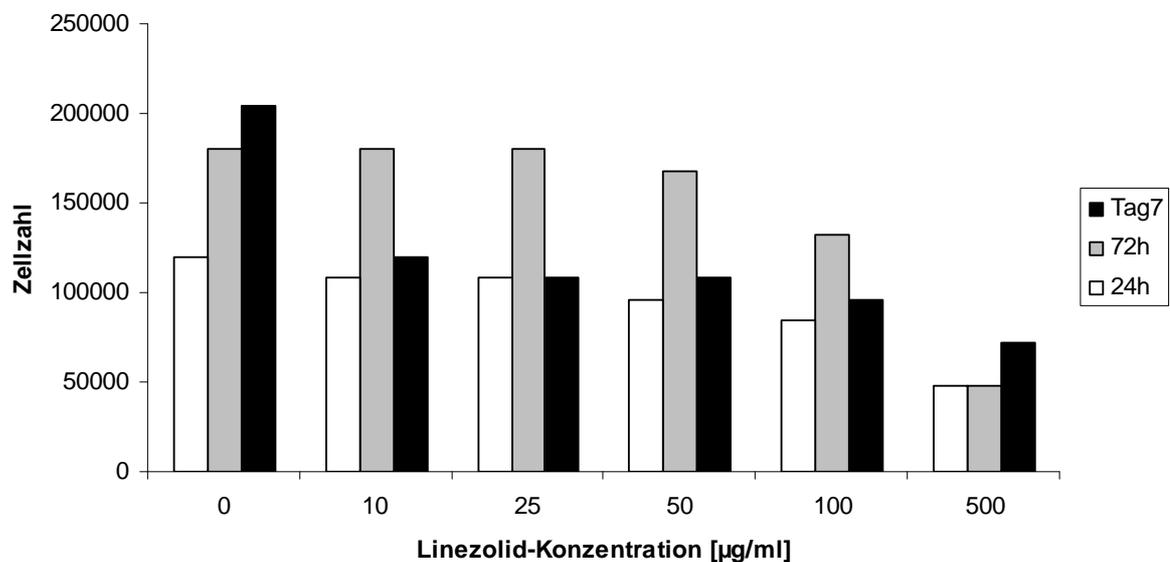


Abb. 30: Zellzahl in Abhängigkeit von der Linezolidkonzentration

4.4.2 DNA-Quantifizierung

Mit steigender Inkubationszeit ließ sich auch hinsichtlich des DNA-Gehalts des Zellysats eine Zunahme bei allen getesteten Verdünnungsreihen erkennen. Eine statistisch signifikante Abnahme des DNA-Gehalts im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte sich jedoch erst bei Konzentrationen von 500 $\mu\text{g/ml}$ Linezolid nach 72 h und nach sieben Tagen Einwirkzeit. Eine Ausnahme bietet der Wert nach 24 h Inkubation mit 100 $\mu\text{g/ml}$ Antibiotikum, welcher leicht signifikant ansteigt. Konzentrationen bis 100 $\mu\text{g/ml}$ Linezolid beeinflussten die Osteoblastenproliferation bzw. den DNA-Gehalt der Zellen kaum (Abb. 31).

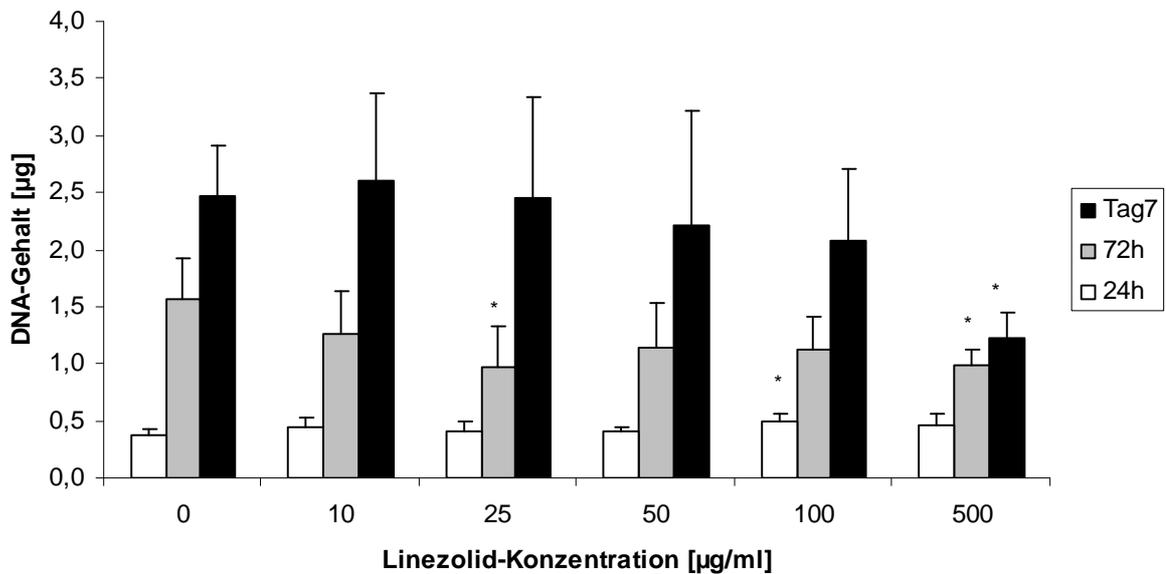


Abb. 31: DNA-Gehalt der Zellproben in Abhängigkeit von der Linezolid-Konzentration

4.4.3 Bestimmung der Zellproliferation

In Abbildung 32 ist die Proliferationsfähigkeit der mit Linezolid behandelten Osteoblasten dargestellt. Sämtliche getesteten Verdünnungsstufen des Medikamentes bewirkten nach 24 h Einwirkzeit eine Abnahme der Zellproliferation auf einem Signifikanzlevel von $p=0,000$ für Konzentrationen von 10, 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ Linezolid, bzw von $p=0,003$ bei 500 $\mu\text{g/ml}$ Linezolid. Nach 72 h und nach sieben Tagen Inkubation konnte eine statistisch signifikante Abnahme der Zellproliferation nur bei 50 und 500 $\mu\text{g/ml}$ Linezolid festgestellt werden ($p=0,00$ für je 500 $\mu\text{g/ml}$ und $p=0,005$ bzw. 0,002 für 50 $\mu\text{g/ml}$ nach 72 h bzw. an Tag 7).

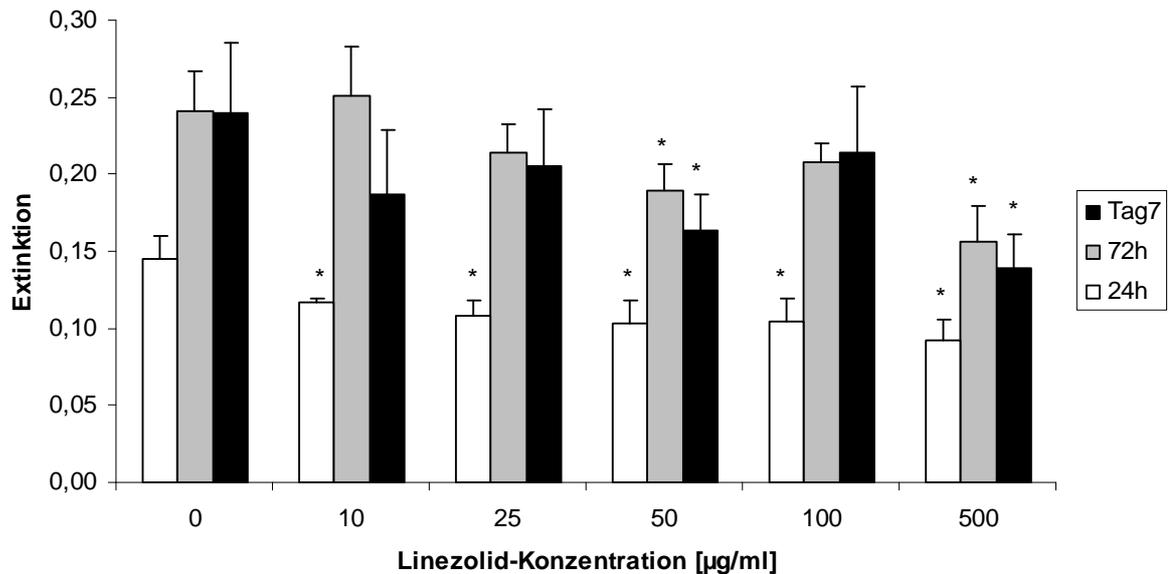


Abb. 32: Linezolidabhängige Veränderungen der Zellproliferation gemessen anhand der Extinktion

4.4.4 Bestimmung des Gesamtproteins

Die Quantifizierung des Gesamtproteins der mit Linezolid behandelten Proben wird in Abbildung 33 dargestellt. Eine 24- und 48-stündige Einwirkzeit zeigte keine oder nur geringe Auswirkungen auf den Gehalt an Gesamtprotein in den Proben. Einzig signifikanter Abfall im Vergleich zur Referenzgruppe konnte hierbei nach 72-stündiger Inkubationszeit bei einer Konzentration von 500 $\mu\text{g/ml}$ Linezolid gemessen werden. Nach 7 Tagen sanken die Proteinkonzentrationen sämtlicher Proben und Verdünnungsstufen im Vergleich zur Kontrollgruppe von 10 bis 500 $\mu\text{g/ml}$ Linezolid auf dem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ ab.

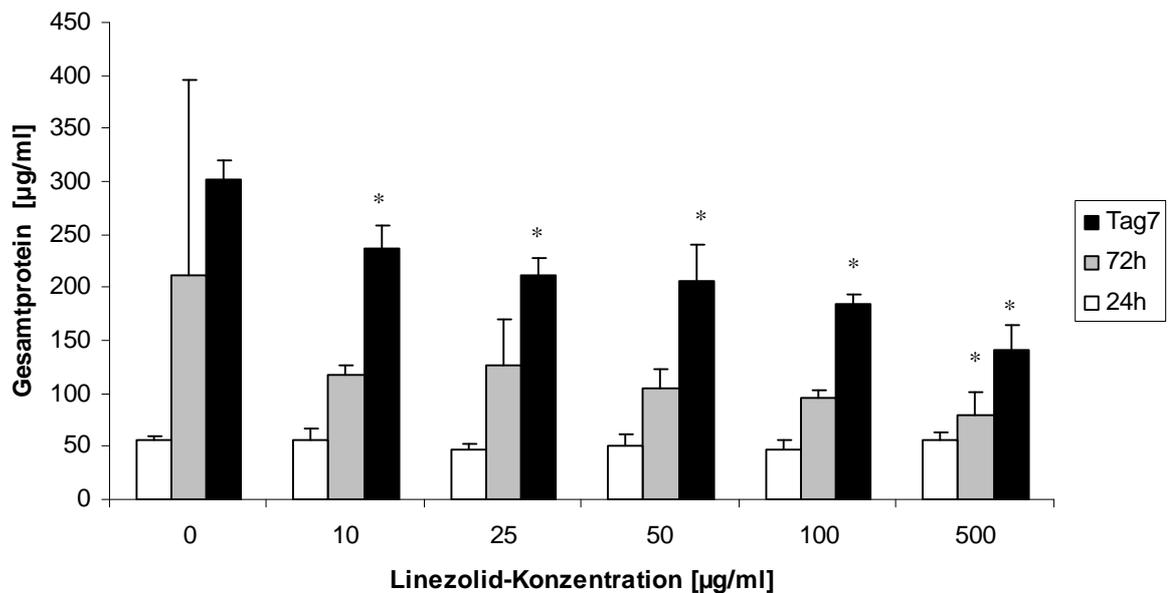


Abb.33: Gesamtproteingehalt der Osteoblasten in Abhängigkeit von der Linezolid-Konzentration

4.4.5 Bestimmung der Apoptoserate

Abbildung 34 veranschaulicht die Caspaseaktivität in Abhängigkeit von der jeweiligen Linezolid-Konzentration in den Zellproben. Tendenziell ließ sich ein Absinken der Apoptoserate mit zunehmender Konzentration an Linezolid erkennen. Nach 24 h war dieses Absinken bei einer Konzentration von 25 µg/ml zum ersten Mal statistisch signifikant ($p \leq 0,00$). Höhere Konzentrationen von 50, 100 und 500 µg/ml zeigten ebenfalls eine statistisch signifikante Abnahme der Apoptoserate in den Kulturen, welche jedoch geringer als bei 25 µg/ml ausgeprägt war. Nach 72 h Inkubationszeit war kaum ein Einfluss zu erkennen, die Apoptoserate sank erst bei 500 µg/ml Linezolid signifikant ab. Nach einer Woche Einwirkzeit ließ sich ebenfalls eine geringe Tendenz zur Abnahme des Zelltodes in den Kulturen erkennen, welche bei den Proben mit 50 und 500 µg/ml Linezolid statistisch signifikant war. Die Apoptoserate war nach kurzer Einwirkzeit (24, 72 h) am höchsten, wohingegen sich nach einer Woche Inkubation eine deutlich geringere Apoptoserate zeigte.

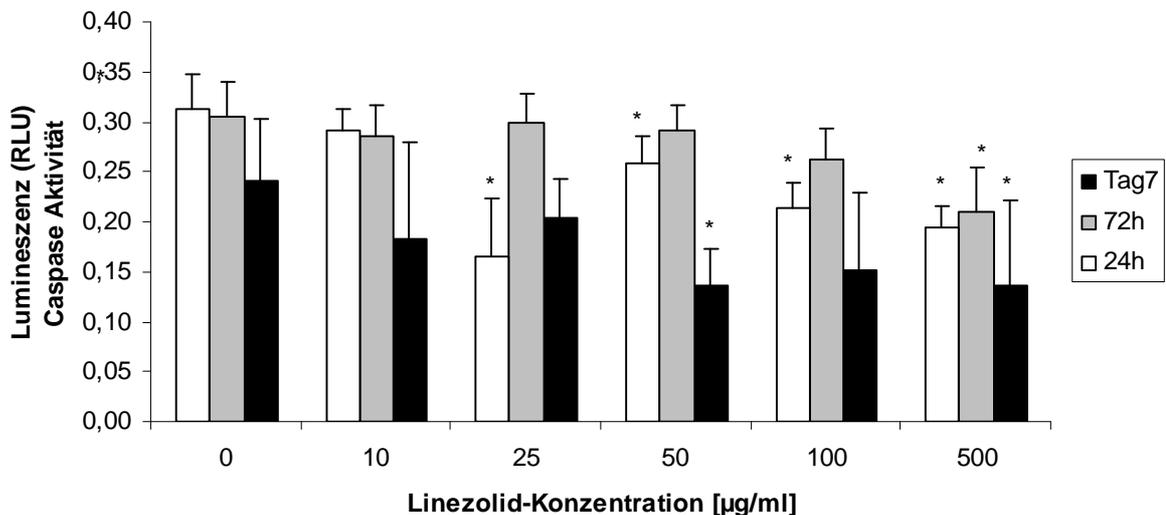


Abb.34: Caspaseaktivität der Zellproben in Abhängigkeit von der Linezolid-Konzentration

4.4.6 Bestimmung der Zellaktivität

Abbildung 35 veranschaulicht den Einfluss von Linezolid auf die Zellaktivität pro Gesamtprotein der getesteten Osteoblasten. Während 24 h Inkubationszeit kaum einen Einfluss zu hatte, ließ sich nach 72 h bei Konzentrationen von 100 µg/ml Linezolid eine statistisch signifikante Zunahme der Zellaktivität im Vergleich zur Kontrolle erkennen. Eine einwöchige Inkubationszeit führte insgesamt zu deutlich geringeren Aktivitätswerten mit Ausnahme von Konzentrationen von 500 µg/ml Linezolid, welche zu einem statistisch signifikanten Anstieg im Vergleich zur Kontrollgruppe führte.

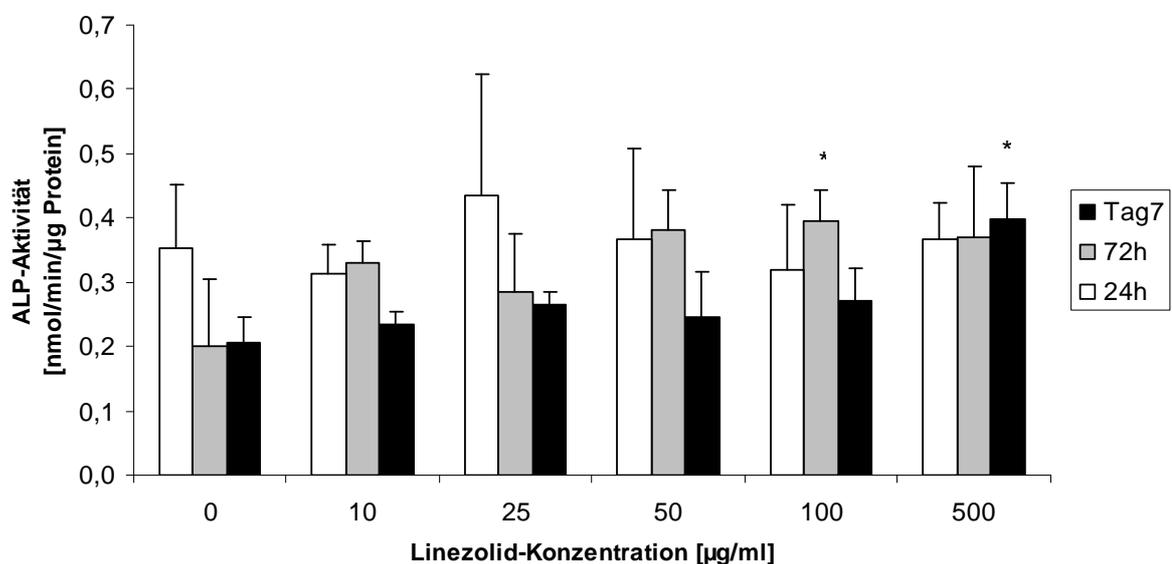


Abb.35: Einfluss von Linezolid auf die Zellaktivität pro Gesamtprotein der getesteten Osteoblasten

4.4.7 Mineralisationsnachweis durch Bestimmung des Calciumgehaltes

4.4.7.1 Quantitativer Nachweis

Abbildung 36 illustriert den Zusammenhang der Calcifizierung der getesteten Zellproben mit der Linezolid-Konzentration nach drei und vier Wochen Inkubationszeit. Die gewonnenen Daten zeigten einen statistisch signifikanten Rückgang der Calcifizierung bereits nach drei

Wochen Inkubation. Konzentrationen von 10 µg/ml Linezolid zeigten im Vergleich zur Kontrolle ohne Medikamentenzusatz eine Tendenz zum Absinken der Calcifizierungsrate. Diese waren ab Konzentrationen von 25, 50, 100 und 500 µg/ml Linezolid statistisch signifikant mit $p \leq 0,05$. Eine Korrelation zwischen der Pharmakonkonzentration und dem Calciumgehalt ließ sich auch nach vier Wochen Inkubation erkennen. Hier zeigte die Behandlung beginnend mit 10 µg/ml Linezolid ein signifikantes Absinken des Calciumgehaltes. Steigende Linezolidkonzentrationen wie bspw. 25, 50, 100, 500 µg/ml zogen einen immer geringeren Calciumgehalt in den Zellproben nach sich.

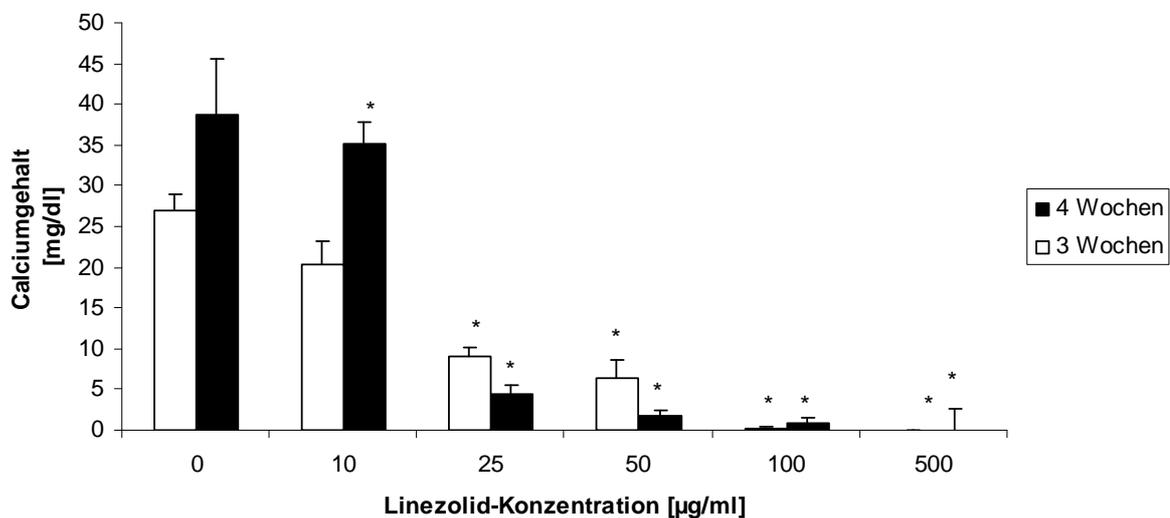


Abb.36: Calciumgehalt der mit unterschiedlichen Linezolid-Konzentrationen behandelten Zellproben

4.4.7.2 Alizarinrot-Färbung

Zum qualitativen Nachweis der osteoblastären Mineralisierung erfolgte die Alizarinrotfärbung. Mit steigender Linezolid-Konzentration in den Zellproben ließ sich ein Rückgang der rotgefärbten nodules und somit der Mineralisation erkennen (siehe Abb. 37).

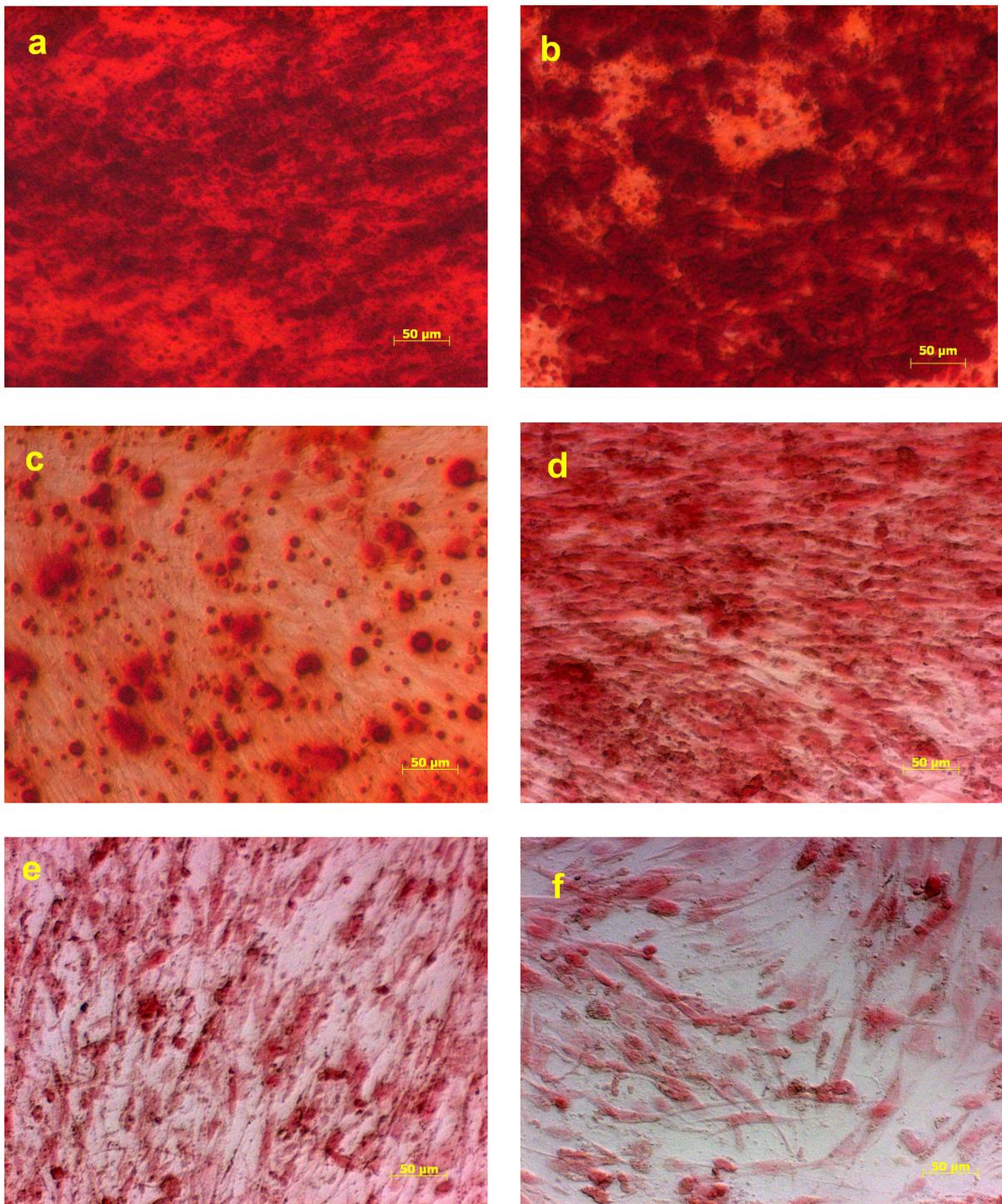


Abb.37: Zytochemischer Nachweis der Mineralisation durch Alizarinrotfärbung der Zellproben. Die Mineralisationskerne erscheinen als rotgefärbte nodules.

a: Kontrollansatz ohne Pharmakonzusatz

b: 10 µg/ml Linezolid

c: 25 µg/ml Linezolid

d: 50 µg/ml Linezolid

e: 100 µg/ml Linezolid

f: 500 µg/ml Linezolid

4.5 Ergebnisse Parecoxib (Dynastat®)

4.5.1 Bestimmung der Zellzahl und Vitalitätskontrolle

Mit steigender Inkubationszeit stieg auch die Anzahl der Osteoblasten in den Kulturen. Abbildung 38 zeigt mit zunehmender Parecoxib-Konzentration ein geringfügiges Absinken der Zellzahl nach 72 h und 7 Tagen Inkubation. Dieses Absinken beginnt bei den geringsten getesteten Dosen von 0,5 µg/ml Parecoxib.

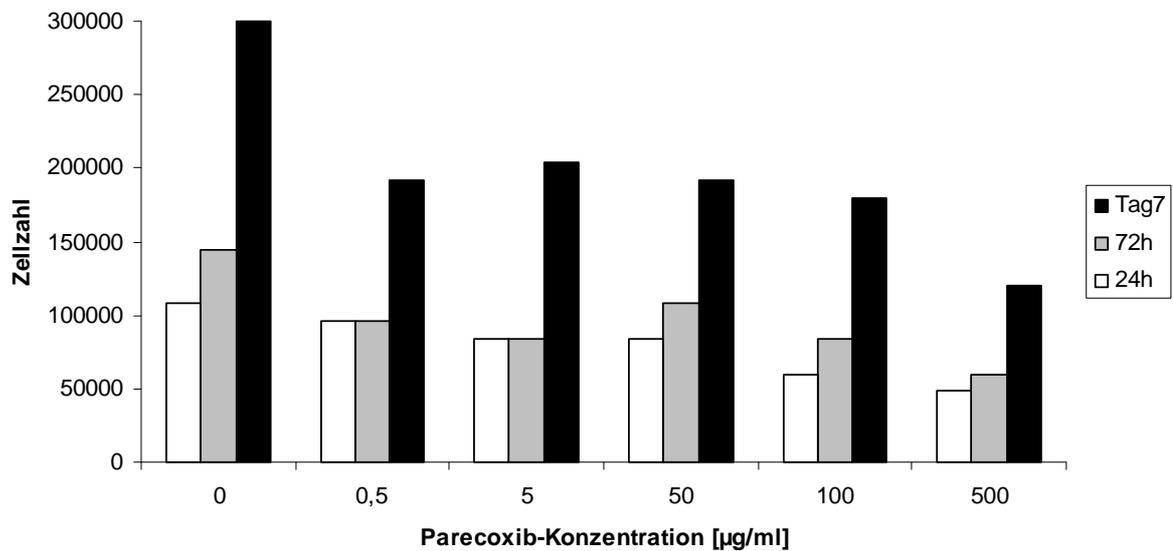


Abb. 38: Zellzahl in Abhängigkeit von der Parecoxib-Konzentration

4.5.2 DNA-Quantifizierung

Eine 24-stündige Inkubationszeit der Osteoblasten mit Parecoxib hatte auf den DNA-Gehalt der Zellproben nur geringe Auswirkungen (siehe Abb. 39). Im Vergleich zu 24 h Inkubation zeigte sich nach 72 h und sieben Tagen ein Anstieg der DNA-Menge in den jeweiligen Zellproben. Erst mit Höchstdosen von 500 $\mu\text{g/ml}$ Parecoxib sich nach 72 h bzw. sieben Tagen eine deutliche Abnahme der DNA-Konzentration der behandelten Zellen gegenüber der Kontrollgruppe. Nach sieben Tagen Inkubation ließ sich bereits bei Konzentrationen ab 100 $\mu\text{g/ml}$ Parecoxib eine signifikante Verminderung der DNA-Menge erkennen.

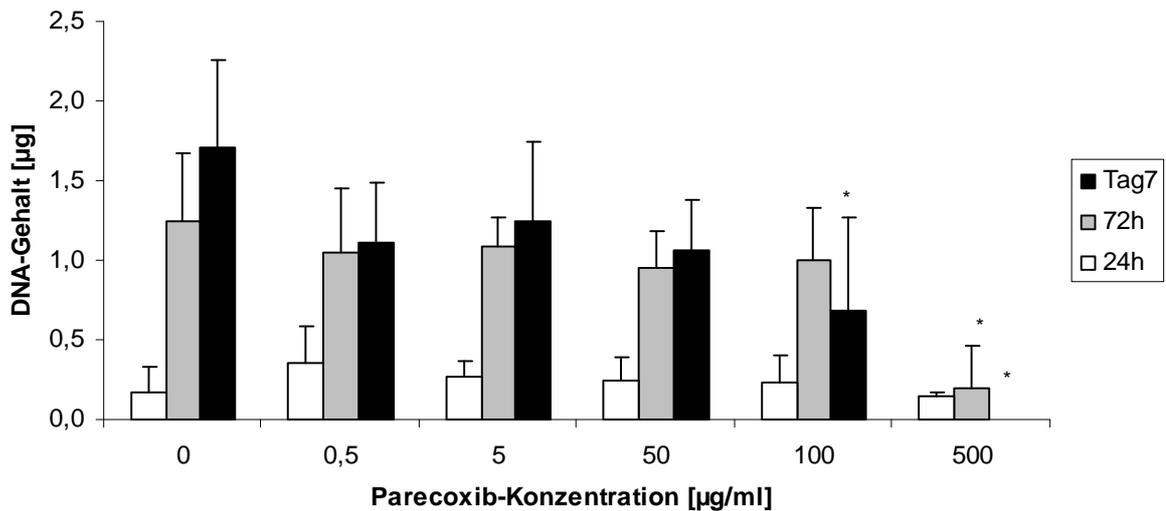


Abb.39: Veränderungen des DNA-Gehaltes der Zellproben in Abhängigkeit von der Parecoxib-Konzentration

4.5.3 Bestimmung der Zellproliferation

Die anhand des MTT-Tests gemessene Zellproliferation der Osteoblasten unter Parecoxib-Einfluss wird in Abb. 40 dargestellt. Diesbezüglich wirkte Parecoxib hemmend auf die Zellen. Während eine 24-stündige Inkubationszeit bis hin zu Konzentrationen von 100 $\mu\text{g/ml}$ Parecoxib kaum Einfluss auf die Zellproliferation der untersuchten Osteoblasten hatte, nahm diese nach 72 h Inkubation bereits bei Konzentrationen von 50 ($p=0,008$), 100 ($p=0,001$), 500 ($p=0,000$) $\mu\text{g/ml}$ signifikant ab. Nach sieben Tagen Inkubationszeit konnte eine Abnahme der zellulären Proliferation schon bei Konzentrationen ab 5 $\mu\text{g/ml}$ Parecoxib nachgewiesen werden (5 $\mu\text{g/ml}$: $p=0,001$; 50 $\mu\text{g/ml}$: $p=0,033$; 100 $\mu\text{g/ml}$: $p=0,034$; 500 $\mu\text{g/ml}$: $p=0,000$).

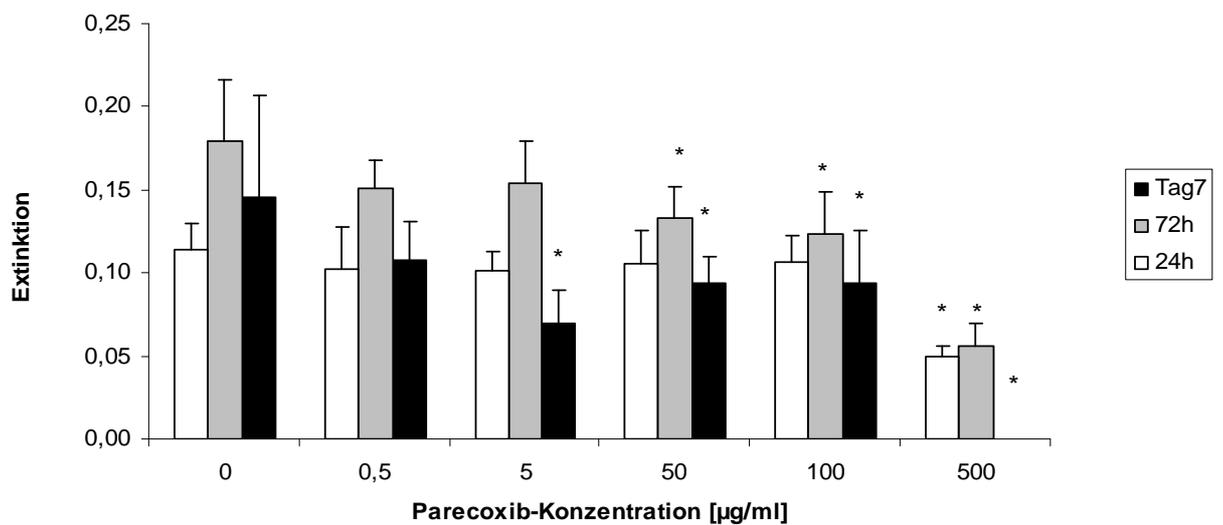


Abb.40: Parecoxibabhängige Veränderungen der Zellproliferation gemessen anhand der Extinktion

4.5.4 Bestimmung des Gesamtproteins

Abbildung 41 veranschaulicht den Zusammenhang zwischen dem Gesamtproteingehalt der Osteoblastenproben und steigender Parecoxib-Konzentration. Während nach 24- und 48-stündiger Inkubationszeit der Proteingehalt der Proben relativ unbeeinflusst von einer steigenden Pharmakonzentration blieb, konnte nach sieben Tagen Einwirkzeit ein signifikanter Abfall des Gesamtproteins gemessen werden. Dieser begann bei einer Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ Parecoxib ($p=0,000$) und nahm bis zu 500 $\mu\text{g/ml}$ ($p=0,000$) weiter ab. Insgesamt stieg mit der Inkubationszeit auch der Gesamteiweißgehalt der Proben.

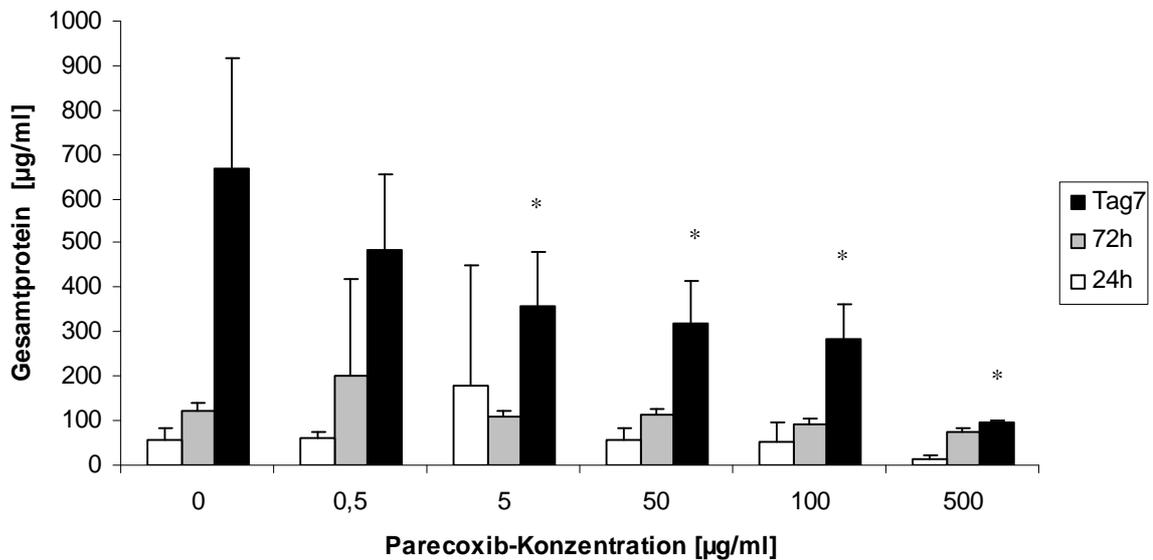


Abb.41: Gesamtproteingehalt der Osteoblasten in Abhängigkeit von der Parecoxib-Konzentration

4.5.5 Bestimmung der Apoptoserate

Abb. 42 zeigt die Apoptoserate, welche proportional zur Caspasen-Aktivität zu betrachten ist, in Abhängigkeit von der Pharmakonkonzentration. Nach 72 h ließ sich im Vergleich zu 24-stündiger Einwirkzeit eine deutliche Abnahme der Apoptoserate erkennen. Diese war nach sieben Tagen Inkubation jedoch wieder erhöht und überschritt die 24 h-Werte. Statistisch signifikante Abnahmen der Apoptoseraten ließen sich nach 24 h ab Konzentrationen von 50, 100 und 500 $\mu\text{g/ml}$ Parecoxib messen, nach drei Tagen bei Verdünnungen von 100 und 500 $\mu\text{g/ml}$ Parecoxib. Eine eindeutige Abnahme der Lumineszenz und somit der Apoptose in den Kulturen konnte nach sieben Tagen bereits ab 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Pharmakon gemessen werden. Die Apoptoserate sank bei 5, 50, 100 bis zu 500 $\mu\text{g/ml}$ auf einem Signifikanzlevel von $p \leq 0,005$ immer weiter ab.

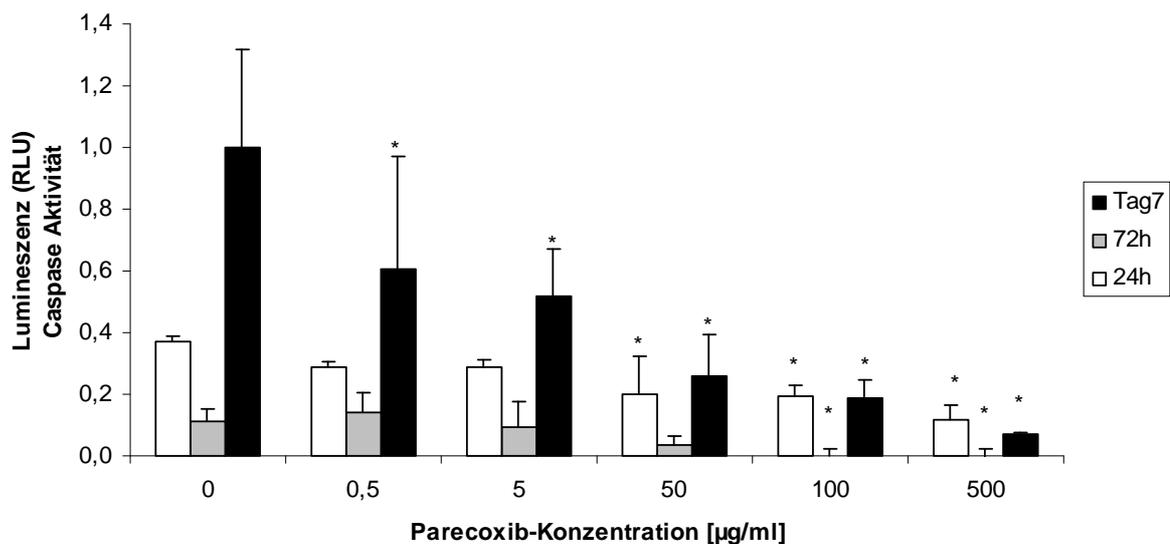


Abb.42: Caspaseaktivität der untersuchten Osteoblasten in Abhängigkeit von der Parecoxib-Konzentration

4.5.6 Bestimmung der Zellaktivität

In Abbildung 43 wird der Einfluss von Parecoxib auf die Zellaktivität der untersuchten Osteoblasten dargestellt. Insgesamt war der Einfluss auf die ALP bei sämtlichen getesteten Verdünnungsstufen relativ gering, mit Ausnahme von 500 $\mu\text{g/ml}$ Parecoxib. Hier zeigte sich nach 24 h ein statistisch signifikanter positiver Einfluss auf die Zellaktivität, jedoch bei hoher Standardabweichung. Nach längeren Einwirkzeiten von 72 h bzw. sieben Tagen ließ sich ein statistisch signifikanter Rückgang der Zellaktivität im Vergleich zur Kontrollgruppe erkennen. Insgesamt nahm die Zellaktivität nach sieben Tagen über alle Verdünnungsstufen hinweg ab.

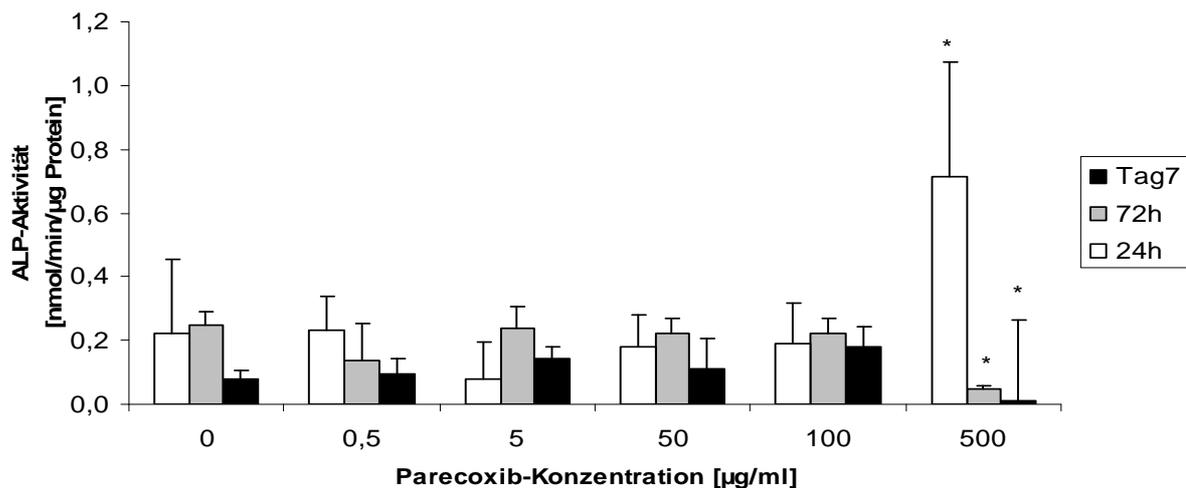


Abb. 43: Zellaktivität bezogen auf das Gesamtprotein nach Parecoxib-Behandlung

4.5.7 Mineralisationsnachweis durch Bestimmung des Calciumgehaltes

4.5.7.1 Quantitativer Nachweis

Bei der Messung des Calciumgehalts in den mit Parecoxib behandelten Kulturen fand sich nach dreiwöchiger Inkubationszeit ein statistisch signifikantes Absinken der Menge an

Calcium in den Zellproben, was besonders deutlich ab Konzentrationen von 100 und 500 $\mu\text{g/ml}$ Parecoxib zu erkennen war. Eine Einwirkzeit von vier Wochen zeigte im Vergleich zur Kontrollgruppe unter Behandlung mit 0,5 und 5 $\mu\text{g/ml}$ Medikament eine deutliche Zunahme der Calcifizierung auf einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$. Höhere Dosen von Parecoxib wie 50, 100 oder 500 $\mu\text{g/ml}$ hingegen ließen den Calciumgehalt der Zellproben im Vergleich zur Referenzgruppe signifikant absinken. Der Calciumgehalt lag nach vier Wochen nur bei 0,5, 5 und 100 $\mu\text{g/ml}$ Pharmakon deutlich über dem entsprechenden Wert bei drei Wochen Inkubation. 50 $\mu\text{g/ml}$ Parecoxib zeigten nach längerer Inkubation (vier Wochen) deutlich geringere Calciumwerte als nach drei Wochen (siehe Abb. 44).

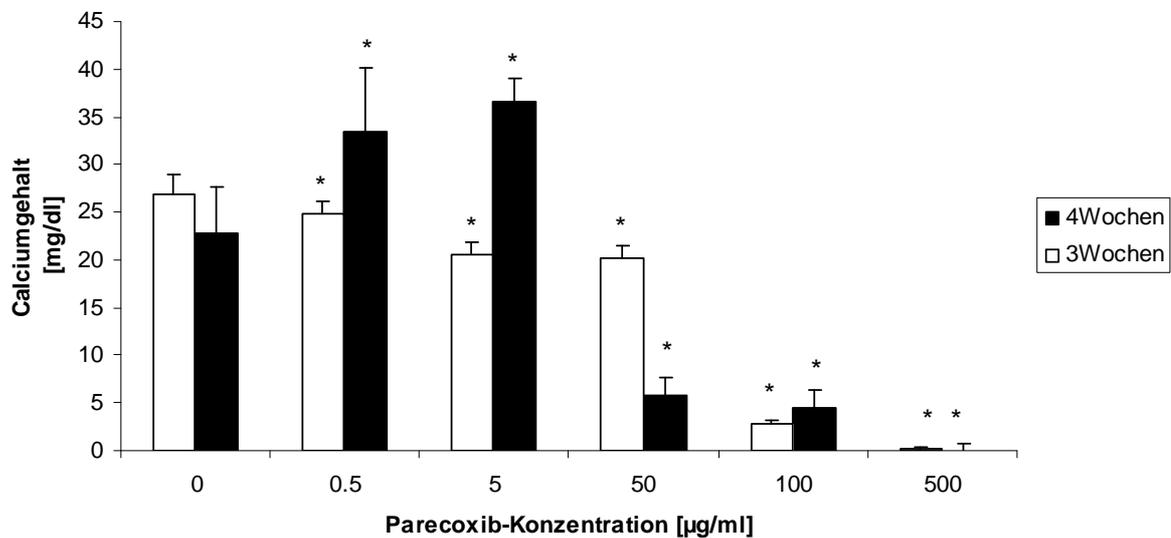


Abb. 44: Calciumgehalt der Zellproben nach drei bzw. vier Wochen in Abhängigkeit von der Parecoxib-Konzentration

4.5.7.2 Alizarinrot-Färbung

Die Mineralisation der untersuchten Osteoblasten zeigte einige Unterschiede zwischen den unbehandelten Kulturen und denen mit Zusatz verschiedener Parecoxib-Verdünnungen (Abb. 45). Während die Referenzgruppe eine starke Mineralisation aufwies, nahm diese mit steigender Pharmakonkonzentration wieder ab.

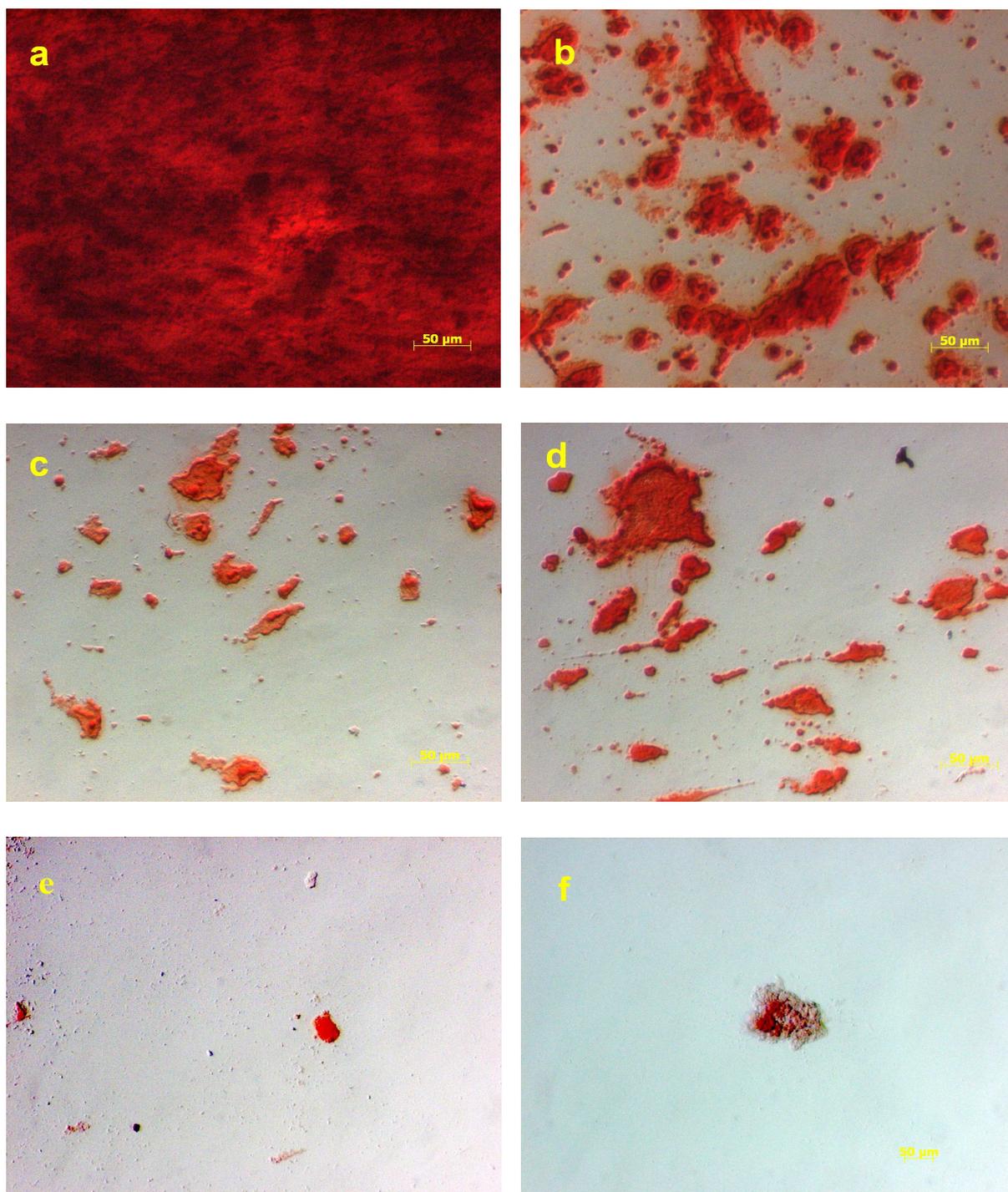


Abb. 45: Mineralisation der Osteoblasten, nachgewiesen durch Alizarinrotfärbung der Mineralisationskerne bei verschiedenen Parecoxib-Verdünnungsstufen

- a: Kontrollansatz ohne Pharmakonzusatz
- b: 0,5 µg/ml Parecoxib
- c: 5 µg/ml Parecoxib
- d: 50 µg/ml Parecoxib
- e: 100 µg/ml Parecoxib
- f: 500 µg/ml Parecoxib

4.6 Ergebnisse Ibandronsäure (Bondronat®)

4.6.1 Bestimmung der Zellzahl und Vitalitätskontrolle

Die Referenzgruppe, welche nicht mit Pharmaka behandelt wurde, zeigte einen Anstieg der Zellrate mit zunehmender Zeit. Betrachtet man die absolute Zellzahl der mit Ibandronat behandelten Osteoblasten, so nahm diese mit steigenden Ibandronat-Konzentrationsstufen im Vergleich zur Referenzgruppe (0 µg/ml Ibandronat) nur geringfügig ab. In Abbildung 46 wird dieser Zusammenhang veranschaulicht. Kürzere Inkubationszeiten (24 h) der mit Ibandronat behandelten Zellen hatten bei Erhöhung der Dosis fast keinen Einfluss auf die Zellzahl, wohingegen eine längere Einwirkdauer von sieben Tagen im Vergleich dazu einen Rückgang der Zellzahl zur Folge hatte.

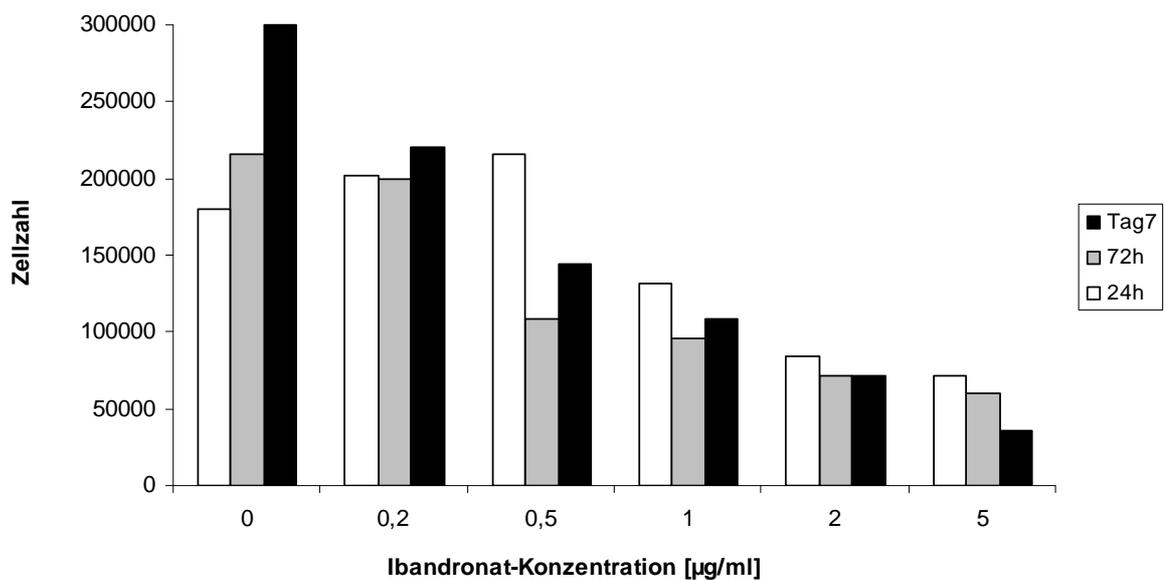


Abb.46: Absolute Zellzahl in Abhängigkeit von verschiedenen Ibandronat-Konzentrationen

4.6.2 DNA-Quantifizierung

Der DNA -Gehalt in den Zellproben erwies sich nach 24 h und 72 h Inkubationszeit über alle Verdünnungsstufen hindurch als gleichbleibend gering (siehe Abb. 47). Einzig signifikante Verminderung der DNA-Menge im Vergleich zum Referenzwert war nach 72-stündiger Inkubationszeit bei Konzentrationen von 1 und 5 $\mu\text{g/ml}$ Ibandronat zu messen. Nach einer Einwirkzeit des Pharmakons von sieben Tagen konnte über alle Verdünnungsstufen hinweg eine deutlich höhere DNA-Menge im Vergleich zu einer Inkubation von 24 h bzw. 72 h gemessen werden. Lediglich bei einer Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ Ibandronat zeigte sich eine signifikante Verringerung des DNA-Gehaltes der Zellproben im Vergleich zum Kontrollwert nach sieben Tagen.

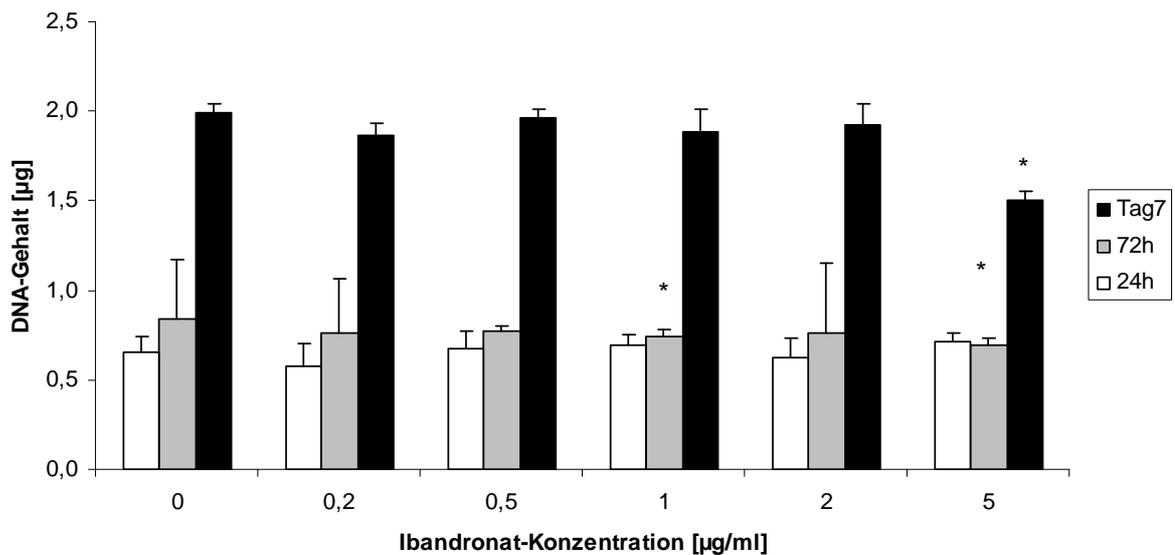


Abb. 47: Gesamt-DNA-Gehalt der Zellproben in Abhängigkeit von der Ibandronat-Konzentration

4.6.3 Bestimmung der Zellproliferation

Es konnte gezeigt werden, dass nach 24 und 72 h Inkubation Konzentrationen von 0, 0,5, 2, und 5 $\mu\text{g/ml}$ Ibandronat nur einen geringen Einfluss auf die Zellproliferation der Osteoblasten hatten (siehe Abb. 48). Im Vergleich zu einer 24-stündigen Einwirkzeit war die Proliferation nach 72 h insgesamt verringert, wobei eine Inkubation von sieben Tagen insgesamt eine höhere Zellproliferation in den Wells aufwies. Eine statistisch positive Auswirkung auf die Proliferation zeigte sich bei 0,2 $\mu\text{g/ml}$ Parecoxib nach 24 h ($p=0,047$). Jedoch konnte nach sieben Tagen Inkubation bereits bei Werten von 0,2 $\mu\text{g/ml}$ Coxib über alle Verdünnungsstufen hinweg eine statistisch signifikante Verminderung ($p=0,000$) der Zellproliferation im Vergleich zur Kontrolle ermittelt werden. Konzentrationen von 5 $\mu\text{g/ml}$ Ibandronat senkten die Proliferationsrate der Zellen nach sieben Tagen am stärksten.

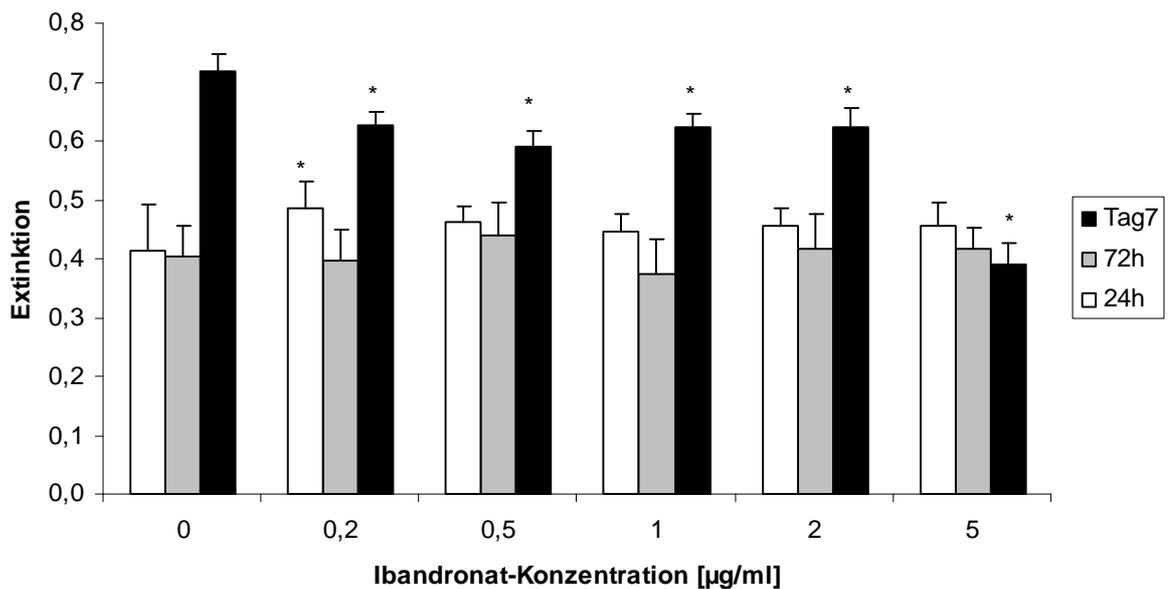


Abb. 48: Ibandronatabhängige Effekte auf die Zellproliferation, gemessen anhand der Extinktion

4.6.4 Bestimmung des Gesamtproteins

Die Bestimmung des Gesamtproteingehaltes der mit Ibandronat behandelten Osteoblastenkulturen wird in Abbildung 49 veranschaulicht. Der Proteingehalt stieg in der Kontrollgruppe ohne Medikamentenzugabe mit der Zeit an. Insgesamt zeigte sich kaum ein Einfluss des Pharmakons zu den getesteten Konzentrationen auf die Eiweissekretion. Lediglich eine Inkubation von sieben Tagen mit 2 bzw. 5 $\mu\text{g/ml}$ Ibandronat ließ das Gesamtprotein der Zellproben im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant sinken.

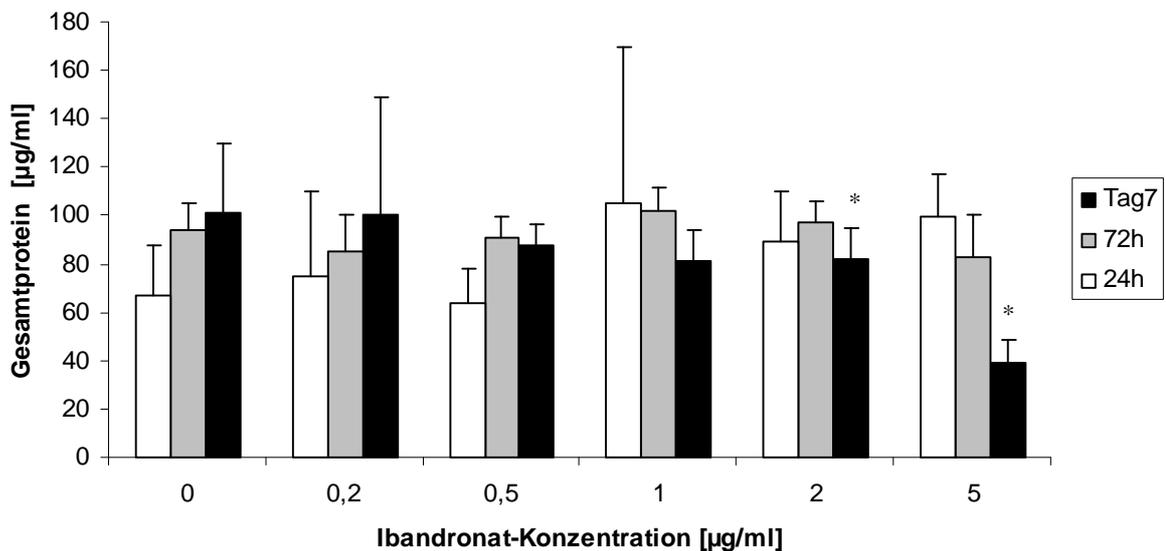


Abb. 49: Gesamtproteingehalt der Osteoblastenproben in Abhängigkeit von der Ibandronat-Konzentration

4.6.5 Bestimmung der Apoptoserate

Ein Ibandronat-abhängiger Einfluss auf die Apoptoserate der Zellproben konnte weder nach 24 noch 72 h Inkubationszeit gemessen werden (Abb. 50). Eine höhere Apoptoserate zeigte sich erst nach 7 Tagen Inkubation mit dem Pharmakon. Im Vergleich zur Referenzgruppe war diese jedoch erst bei einer Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ Ibandronat statistisch signifikant.

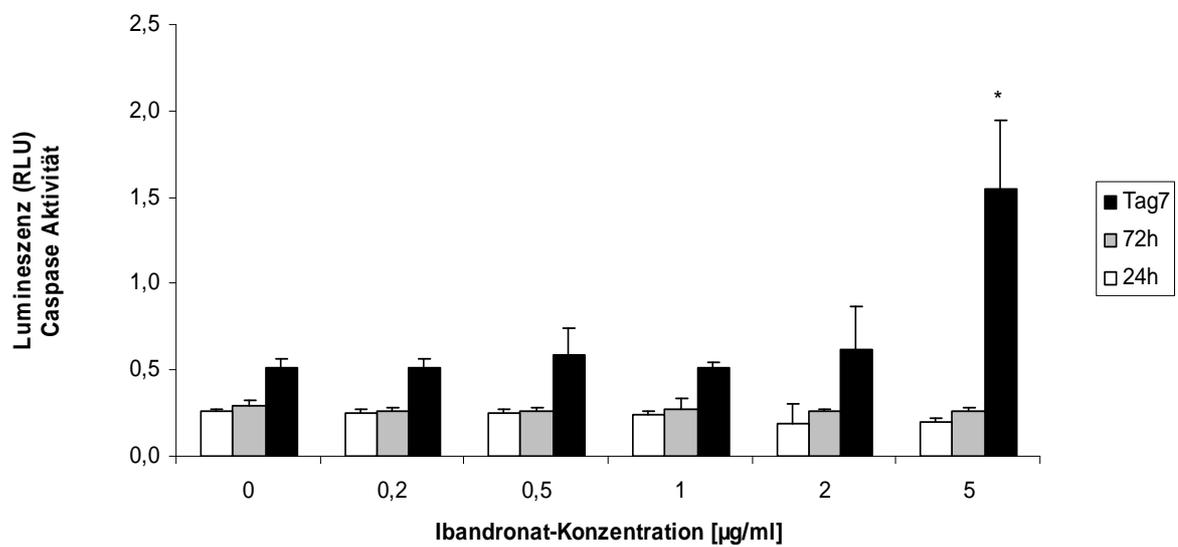


Abb. 50: Caspaseaktivität der Zellproben in Abhängigkeit von der Ibandronat-Konzentration

4.6.6 Bestimmung der Zellaktivität

Nachfolgende Abbildung (Abb. 51) zeigte den Einfluss von Ibandronat auf die Aktivität der ALP der getesteten Osteoblasten. Das Pharmakon schien zu keiner Verdünnungsstufe einen signifikanten Einfluss auf die Zellaktivität zu haben. Einzige Ausnahme zeigte sich bei Konzentrationen von 5 $\mu\text{g/ml}$ Pharmakon nach 24 h bei welcher sich ein statistisch signifikantes Absinken der Zellaktivität abzeichnete. Nach 48h Inkubation war die Zellaktivität zu allen Verdünnungsstufen im Vergleich zu 24-stündiger Einwirkzeit vermindert. Nach sieben Tagen zeigte sich die Aktivität der ALP jedoch insgesamt wieder erhöht.

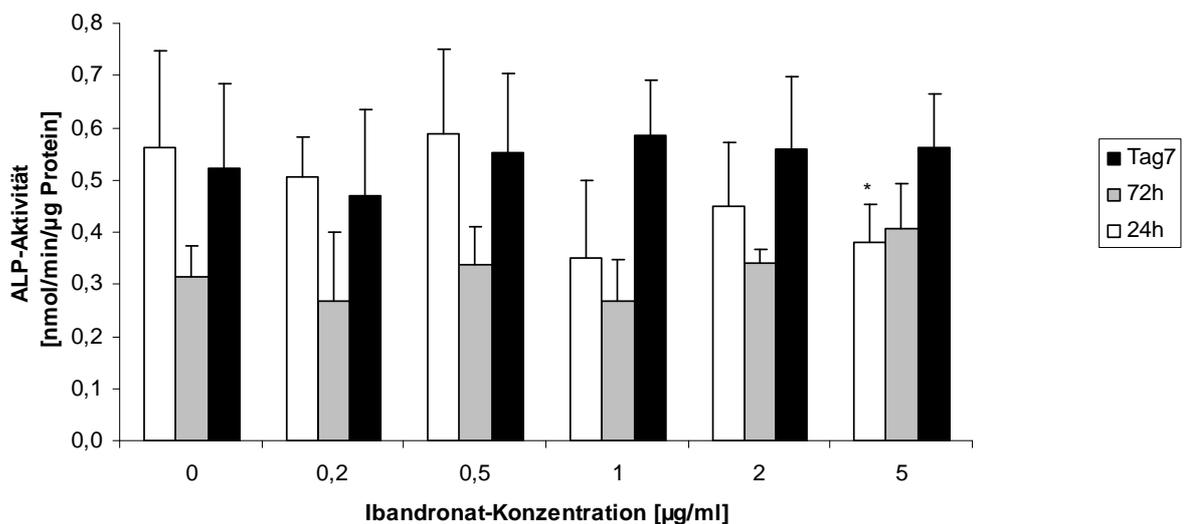


Abb. 51: Zellaktivität der Osteoblasten bezogen auf das Gesamtprotein nach Ibandronatbehandlung

4.6.7 Mineralisationsnachweis durch Bestimmung des Calciumgehaltes

4.6.7.1 Quantitativer Nachweis

Es konnte eine im Vergleich zur Kontrollgruppe statistisch signifikante Abnahme des Calciumgehaltes bei allen getesteten Pharmakonkonzentrationen nachgewiesen werden. Dies

war sowohl nach drei als auch nach vier Wochen Inkubation zu erkennen (Abb.52). Am stärksten fiel das Absinken nach dreiwöchiger Inkubation bei Konzentrationen von 0,2 auf 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Ibandronat aus. Eine vierwöchige Inkubation zeigte einen plötzlichen Abfall des Calciumgehaltes bei Konzentrationsprüngen von 0 auf 0,2 bzw. 0,2 auf 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Ibandronat. Insgesamt war die Calcifizierung nach vier Wochen im Vergleich zu kürzeren Zeiten deutlich vermindert.

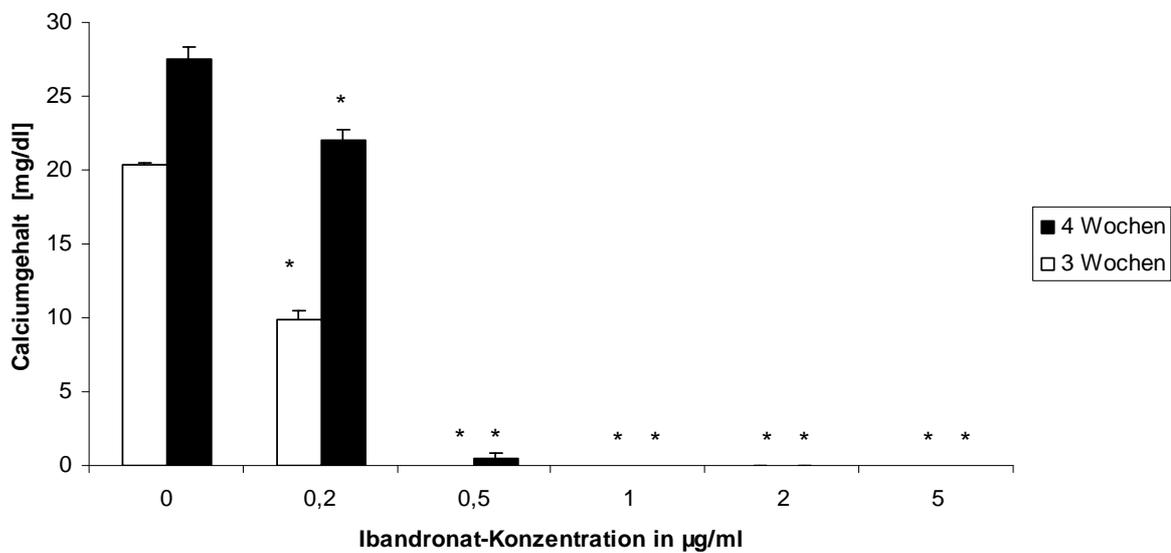


Abb. 52: Calciumgehalt der Zellen nach drei und vier Wochen Inkubationszeit in Abhängigkeit von der Ibandronat-Konzentration

4.6.7.2 Alizarinrot-Färbung

Mit steigender Ibandronatkonzentration konnte auch mikroskopisch eine deutliche Abnahme der Mineralisation nachgewiesen werden. Bis zu 0,2 $\mu\text{g/ml}$ Ibandronat kann eine starke Anfärbung abgebildet werden, bei höheren Konzentrationen war ein vergleichsweise deutlicher Rückgang zu beobachten.

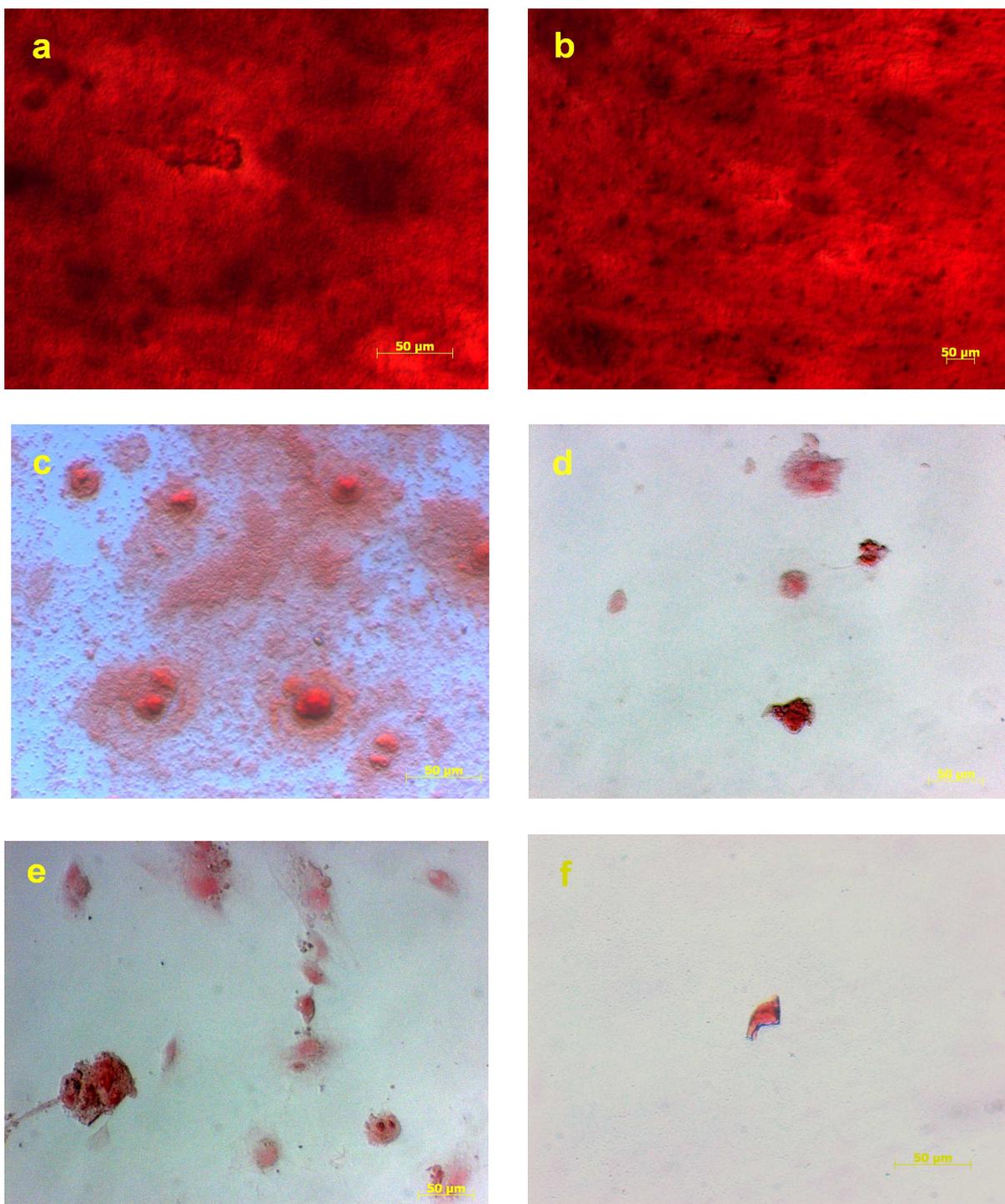


Abb. 53: Mineralisation der Osteoblasten, nachgewiesen durch Alizarinrotfärbung der Mineralisationskerne bei verschiedenen Ibandronat-Verdünnungsstufen

- a: Kontrollansatz ohne Pharmakonzusatz
- b: 0,2 μg/ml Ibandronat
- c: 0,5 μg/ml Ibandronat
- d: 1 μg/ml Ibandronat
- e: 2 μg/ml Ibandronat
- f: 5 μg/ml Ibandronat

5 Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Wirkung ausgesuchter Pharmaka auf *in vitro* kultivierte primäre humane Osteoblasten.

Zunächst erfolgt eine Übersicht über die verwendeten Wirkstoffe und verwendeten Wirkkonzentrationen mit Bezug auf pharmakologische Auswirkungen des jeweiligen Medikaments. Im Anschluss daran werden die Ergebnisse der durchgeführten Tests in Bezug auf die Fragestellung erläutert, interpretiert, mit anderen Studien verglichen und diskutiert.

5.1 Cefotiam (Spizef®)

Cefotiam, auch bekannt unter dem Handelsnamen Spizef®, ist ein Breitbandantibiotikum aus der Gruppe der β -Lactamase-Inhibitoren bzw. deren Untergruppe der Cephalosporine. Dieses parenteral und intramuskulär anwendbare Antibiotikum hemmt die Zellwandsynthese sich teilender Bakterien und wirkt somit bakterizid gegen ein weites Spektrum sowohl grampositiver als auch gramnegativer Bakterien. Cefotiam zeigt als Cephalosporin der 2. Generation eine bessere β -Lactamaseresistenz im Vergleich zu den klassischen Cephalosporinen mit Wirkung gegen grampositive und gramnegative Bakterien wie bspw. Staphylokokken, Streptokokken, E.coli, Neisserien, Hämophilus, Klebsiellen, Salmonellen und Shigellen. Angewandt wird Cefotiam bei Atemwegs-, Weichteil-, Hals-Nasen-Ohren-, Harnwegs-, Haut-, Knochen- und abdominellen Infektionen sowie Sepsis mit einer Dosis von 1-2 g, jeweils zwei bis dreimal täglich bei einer maximalen Tagesdosis von 6 g [Ruß, Endres 2009]. Cefotiam wird nicht nur bei bereits bestehenden Infektionen angewendet. Mehrere Studien belegen, dass eine präoperative intravenöse Verabreichung von Cefotiam als sogenannter „single shot“ die postoperative Rate an tiefen Wundinfektionen senkt [Wildfeuer, Mallwitz et al. 1997; Dahlhoff 1998; Schnöring, Brock 2003]. Diese prophylaktische perioperative Anwendung verstärkt insbesondere im Fachgebiet der Orthopädie und Unfallchirurgie die Frage nach deren Auswirkung auf den Knochen. Bei einer kurzen Halbwertszeit von einer Stunde wird das Medikament vorwiegend renal eliminiert [Rouan, Lecaillon et al. 1985; Dahlhoff 1998].

Die Plasmakonzentration von Cefotiam nach intravenöser Anwendung einer gängigen Dosis von je 0,5, 1 oder 2 g Cefotiam, beträgt nach einer Zeit von 1,98 min zwischen 51,5 $\mu\text{g/ml}$

(bei 0,5 g i.v. Bolus Injektion) und 280 µg/ml (bei 2 g i.v. Bolus Injektion). Bei längerer Einwirkzeit ist die Plasmakonzentration entsprechend niedriger [Rouan, Lecaillon et al. 1985]. Nach intramuskulärer Injektion von 1 g Cefotiam konnte nach 0,75-1 h eine mittlere Plasmakonzentration von 16,6 +/- 5,1 µg/ml gemessen werden [Rouan, Lecaillon et al. 1985].

Die Untersuchungsreihen dieser Arbeit wurden mit Konzentrationen von 0, 25, 50, 100, 250 und 1.000 µg/ml Cefotiam getestet, wobei insbesondere die mittleren Verdünnungsstufen von 25, 50, 100 und 250 µg/ml als klinisch relevant angesehen werden können. Das breite Spektrum ist bewusst gewählt, um mögliche Auswirkungen auch bei Höchstkonzentrationen besser beurteilen zu können, wenngleich auch eine andere Forschergruppe mit insgesamt niedrigeren Konzentrationen von 0,15 bis 250 µg/ml Cefotiam arbeitete [Brisson, Bryskier et al. 1985].

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Cefotiam im Bereich der therapeutisch angewandten Wirkkonzentrationen nur einen geringen Einfluss auf den Osteblastenstoffwechsel *in vitro* besitzt.

Die immunzytochemischen Nachweise von ALP, Kollagen I und Osteocalcin dienen im Allgemeinen der Typisierung von primären humanen Knochenzellen als differenzierte Osteoblasten. Die Zellkulturen eines jeden Patienten wurden diesbezüglich einzeln getestet.

Betrachtet man Zellzahl, DNA-Gehalt, Gesamtproteingehalt und Apoptoserate, so zeigte sich auch bei steigender Konzentration ein nur geringer Einfluss der getesteten Cefotiam-Verdünnungen auf die Knochenzellen. Interessanterweise waren sogar proliferationssteigernde Auswirkungen zu beobachten, obwohl von Antibiotika, die in ähnlicher Weise getestet wurden, bisher in der Literatur überwiegend hemmende Effekte beschrieben wurden. So konnten bspw. hemmende Einflüsse von Vancomycin und Cefazolin auf die Proliferation und das Wachstum einer MG-63-Zellkultur gemessen werden [Edin, Miclau et al. 1996].

Eine Erhöhung der Proliferationsraten, insbesondere auch der Zellzahl, mit der Inkubationszeit (nach 24, 48, 72 h) liess sich bei allen getesteten Konzentrationen erkennen. Dies liegt vermutlich darin begründet, dass die Zellen mehr Zeit zum Wachstum hatten. Vergleicht man jedoch die Auswirkungen der unterschiedlichen Verdünnungsstufen des Medikamentes untereinander, so zeigten Cefotiamkonzentrationen von bis zu 250 µg/ml nur einen geringen Einfluss auf die Zellzahl. Erst Konzentrationen von 1.000 µg/ml Cefotiam ließen die Zellzahl signifikant absinken. Da diese Konzentration *in vivo* jedoch kaum erreicht wird, kann gefolgert werden, dass in therapeutischer Dosierung eine Cefotiamtherapie keinen negativen Einfluss auf die Osteblastenzahl hat. Diese Ergebnisse entsprechen den von Edin

et al. gewonnenen Daten, wonach zwei andere Antibiotika ebenfalls erst bei getesteten Höchstdosen von 1.000 µg/ml (Cefazolin) bzw. 10.000 µg/ml (Vancomycin) ein abfallendes Zellwachstum zur Folge hatten [Edin, Miclau et al. 1996]. Insgesamt ist die Ermittlung der Zellzahl jedoch eher als grobe Abschätzung anzusehen, da eine einzelne gezählte Zelle aufgrund der Umrechnung auf die Gesamtzellzahl im jeweiligen Well großen Einfluss hat. Zur konkreteren Beurteilung des Zellwachstums bzw. der Proliferation eignet sich deswegen die Quantifizierung des DNA-Gehalts und der Proteinkonzentrationen der Zellproben. Beide Parameter zeigten sich in physiologischen Wirkkonzentrationen kaum beeinflusst von einer steigenden Cefotiamkonzentration. Wieder hatte erst die Höchstdosis von 1.000 µg/ml ein signifikantes Absinken sowohl der Proteinmenge (jedoch erst ab 72 h), als auch der DNA-Menge zur Folge. Da diese Ergebnisse mit der ermittelten Zellzahl in den entsprechenden Proben weitgehend übereinstimmen, bestätigt dies die Validität der Zellzahl als Parameter. Der signifikante Anstieg des DNA-Gehaltes nach 24 h Inkubation könnte einen Hinweis auf einen kurzfristigen positiven Effekt des Pharmakons bei kurzer Einwirkzeit geben. Interessanterweise zeigte sich eine Steigerung der Zellproliferation mit steigenden Cefotiamkonzentrationen, wenn man die mitochondriale Aktivität betrachtet. Nach 24 h konnte eine Steigerung der ALP-Aktivität bezogen auf das Gesamtprotein bereits ab therapeutischen Konzentrationen von 100 µg/ml beobachtet werden, nach 48 und 72 h erst bei den Höchstdosen von 1.000 µg/ml Cefotiam. Ähnliche proliferationssteigernde Effekte in höheren Wirkdosen wurden in der Literatur bei der Behandlung mit dem Cephalosporin Cefuroxim beschrieben [Salzmann, Naal et al. 2007]. Entsprechend der Proliferationsparameter sank auch die Apoptoserate und zeigt diesbezüglich eine positive Wirkung des getesteten Cephalosporins. Die Zelltodrate sank bei steigenden Cefotiamkonzentrationen bereits im therapeutisch wirksamen Bereich von 25 µg/ml statistisch signifikant über alle getesteten Wirkkonzentrationen. Lediglich eine 72-stündige Inkubation zeigte ein verzögertes Absinken bei Werten ab 100 µg/ml Cefotiam. Ein solcher Effekt ist bisher in der verfügbaren Literatur noch nicht beschrieben worden. Ähnlich den Ergebnissen von Salzmann et al., die über steigenden Metabolismus bei niedrigen Cefuroximkonzentrationen berichten, zeigte sich auch bei einer Behandlung mit Cefotiam die Zellaktivität zeitweise positiv beeinflusst. Einzige Ausnahme ist das signifikante Absinken bei der höchsten Konzentration von 1.000 µg/ml nach 24 h, welche nach 72 h jedoch wieder ansteigt. Ein ähnliches Absinken der ALP-Aktivität bei hohen Konzentrationen wurde auch von anderen Autoren für Cefuroxim, Gentamicin oder Rifampicin beschrieben [Isefuku, Joyner et al. 2001; Isefuku, Joyner et al. 2003; Salzmann, Naal et al. 2007]. Ein geringer Anstieg der Aktivität ließ sich bei den niedrigen Konzentrationen von 25 und 50 µg/ml Cefotiam erkennen. Diese stimulierende Wirkung auf humane Osteoblasten im therapeutischen Bereich wurde bereits für Clindamycin beschrieben, jedoch wies dies auch

toxische Effekte bei höheren Dosierungen auf [Naal, Salzmann et al. 2008]. Im Gegensatz dazu sind hemmende Einflüsse von anderen Antibiotika wie Trovafloxacin oder Rifampicin bei bereits niedrigen Dosierungen beschrieben [Holtom, Pavkovic et al. 2000; Isefuku, Joyner et al. 2001]. Bestärkt wird die relative Unabhängigkeit des Osteoblastenmetabolismus von dem Antibiotikum durch den nur geringen Effekt auf die Calcifizierung der Zellen, welche nach drei Wochen nicht merklich beeinflusst wurde. Auch nach vier Wochen Inkubation zeigte sich nur bei hohen Konzentrationen von 250 und 1.000 µg/ml ein verminderter Calciumgehalt in den Zellproben.

Insgesamt hat somit eine Behandlung mit Cefotiam nur einen differenziert anzusehenden Einfluss auf den Zellstoffwechsel der humanen Osteoblasten *in vitro*. In niedrigen Dosierungen ließ sich teilweise sogar ein proliferationssteigernder Effekt messen, wenn man bspw. den MTT-Test oder das Absinken der Apoptoserate betrachtet. Proliferationshemmende Effekte konnten nur bei hohen Wirkdosen nachgewiesen werden, so dass dies für die gebräuchliche Dosierung keine Rolle spielt. Da in der Literatur über einen stimulierenden Effekt des Cefotiams bislang nichts bekannt ist, sollten weitere Untersuchungen über diese Zusammenhänge folgen.

5.2 Ceftriaxon (Rocephin®)

Ceftriaxon, ebenfalls ein Breitenspektrumantibiotikum aus der Gruppe der Cephalosporine, gehört der 3. Generation an. Im Vergleich zu dem im vorangegangenen Kapitel beschriebenen Cefotiam zeigt Ceftriaxon ein erweitertes Wirkspektrum gegen gramnegative Bakterien und ist gegen grampositive Bakterien, insbesondere *Pseudomonas aeruginosa* und multiresistente Enterobacteriaceae wirksam [Wenzler, Daschner 2001]. Am orthopädischen Patienten ist Ceftriaxon bei Harnwegs-, Atemwegs, Haut- und Weichteilinfektionen oder Sepsis, bei Knochen- und Gelenkinfektionen sowie vereinzelt zur perioperativen Prophylaxe indiziert [Wenzler, Daschner 2001]. Bei einer Halbwertszeit von ca. 8 h wird es als Kurzzeittherapie von ein bis drei Tagen vermehrt im ambulanten Bereich eingesetzt. Die Ausscheidung erfolgt über Nieren und Galle. Die intravenöse bzw. intramuskuläre Anwendung erfolgt in der Regel einmal täglich in Dosen von 1-2 g/d. Hieraus ergeben sich Plasmakonzentrationen im Bereich von 81 µg/ml nach i.m. Injektion bzw. 168,1 +/- 28,2 µg/ml bzw. 256,9 +/- 16,8 µg/ml nach einer 30 min vorangegangenen i.v. Injektion von 1 bzw. 2 g Ceftriaxon [Edin, Mclau et al. 1996; Roche Documed AG 2007].

In der vorliegenden Arbeit wurden Konzentrationen im Bereich von 0-1.000 µg/ml Ceftriaxon getestet, so dass die *in vivo* erreichten Plasmakonzentrationen unter therapeutischer Anwendung mit Abweichungen nach oben und unten berücksichtigt wurden. Insbesondere die Verdünnungen von 50, 100, 250 µg/ml können somit als klinisch relevant bewertet werden.

Zusammengefasst zeigten vorliegende Untersuchungen, dass der Einfluss von Ceftriaxon auf Knochenvorläuferzellen differenziert zu bewerten ist. Auf die Anzahl der Osteoblasten hatte eine steigende Ceftriaxonkonzentration kaum einen Einfluss, es war tendentiell ein nur geringfügiges Absinken der Zellvermehrung zu erkennen. In der Literatur wurde dies bereits für Vancomycin und Cefazolin, einem Cephalosporin der 1. Generation, beschrieben. Demnach hatten erst höchste Konzentrationen von 10.000 bzw. 1.000 µg/ml Pharmakon eine Hemmung des Zellwachstums zur Folge, während die Osteoblasten bei geringeren Dosen nicht wesentlich beeinflusst wurden [Edin, Miclau et al. 1996]. Passend dazu konnten bis hin zu der höchsten getesteten Dosis von 1.000 µg/ml Ceftriaxon auch hinsichtlich des DNA-Gehaltes der Kulturen keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Antibiotikum gemessen werden. Dabei wäre ein steigender DNA-Gehalt der Proben von 24 auf 48 und 72 h aufgrund einer steigenden Zellzahl mit der Zeit zu erwarten gewesen. Da die DNA-Menge der Proben nach längerer Inkubation von 48h im Vergleich zu 24-stündiger Anwendung absank, könnte dies ein Hinweis auf proliferationshemmende Effekte des Pharmakons mit längerer Einwirkdauer sein. Nach 72 h stieg die DNA-Menge in den Proben wieder an, vermutlich da in der Zwischenzeit ein Erholungseffekt eingetreten sein könnte. Der trotzdem insgesamt nur geringe Einfluss verschiedener Cephalosporinverdünnungen auf das Osteoblastenwachstum ließ sich auch für das im vorangegangenen Kapitel beschriebene Cefotiam erkennen. Ebenso veränderte sich das Gesamtprotein der Zellproben trotz steigender Ceftriaxonkonzentrationen nicht wesentlich. So zeigten sich zwar bereits nach 48-stündiger Inkubation geringe Tendenzen zu steigenden Proteinkonzentrationen ab 100 µg/ml Ceftriaxon, diese erreichten jedoch mit einer relativ hohen Standardabweichung statistisch keine Signifikanz. Der insgesamt höhere Proteingehalt der Zellen lässt sich am ehesten durch höhere Proliferationsraten in dem im Folgenden beschriebenen MTT-Test erklären. So bestärkte der im Anschluss zur Beurteilung der Zellproliferation durchgeführte MTT-Test die durch Zellzahl, Gesamtprotein- und DNA-Gehalt gewonnenen Annahmen eines weitgehend unabhängigen Osteoblastenwachstums von steigenden Ceftriaxonkonzentrationen. Es zeigte sich das Bild einer natürlichen Schwankung. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Zellproliferation erst bei hohen Cephalosporinkonzentrationen von 1.000 µg/ml signifikant beeinflusst wurde und anstieg, obwohl kein wesentlicher Effekt auf den DNA-Gehalt der Zellen beobachtet werden konnte. Ein Anstieg der Proliferation im MTT-Test war ähnlich zu dem Gesamtprotein bereits bei einer 48-stündigen Inkubation mit 100 µg/ml Ceftriaxon zu

erkennen. Als einzige Ausnahme konnte ein signifikantes Absinken der Proliferationsrate nach eintägiger Inkubation mit 250 µg/ml Ceftriaxon nachgewiesen werden. In der Literatur wurden ähnliche Effekte eines weiteren Cephalosporins, des Cefuroxims, bereits beschrieben. Während geringere Konzentrationen an Cefuroxim kaum einen Effekt zeigten, ließen hohe Konzentrationen die Proliferation von Osteoblasten ansteigen [Salzmann, Naal et al. 2007]. Andere Quellen wiederum belegen bei der Untersuchung von anderen Cephalosporinen einen gegenteiligen Effekt. Demnach soll Cefazolin bspw. eine zeit- und dosisabhängige hemmende Wirkung auf das Zellwachstum und die Zellproliferation bei Verdünnungen ab 200 µg/ml besitzen [Edin, Miclau et al. 1996].

Die hohen Proliferationswerte bei hohen Ceftriaxon-Konzentrationen wurden von einem Rückgang des Zelltods begleitet. Dementsprechend sank die Apoptose nach 24 und 72 h Inkubation bereits im therapeutisch wirksamen Bereich von 50 µg/ml bis hin zur höchsten getesteten Wirkkonzentration von 1.000 µg/ml. Eine mögliche Erklärung für die im Vergleich relativ niedrigen Zelltod-Werte nach 48 h Einwirkzeit mag sein, dass viele Zellen nach 24 h den Zelltod induzieren. So stünden nach 48 h weniger Zellen zur Verfügung. Die relativ niedrige Apoptoserate nach 72 h passt ebenfalls zu der relativ gestiegenen Zellzahl nach 72 h. Andere Autoren berichten über zytotoxische Effekte bei den höchsten getesteten Wirkkonzentrationen eines Cephalosporins, wie z.B. bei 1.000 µg/ml Cefuroxim, wobei niedrigere Dosierungen von 50 und 100 µg/ml teilweise auch einen Abfall der LDH-Konzentration, welche mit Zellschäden korreliert, zeigten [Salzmann, Naal et al. 2007]. Auch die Zellaktivität, die anhand der Aktivität der ALP pro µg Gesamtprotein ermittelt wurde, blieb relativ unverändert bei steigenden Ceftriaxon-Konzentrationen. Aktivitätsunterschiede ließen sich zwar im Hinblick auf unterschiedliche Inkubationszeiten erkennen, so zeigte sich eine deutlich höhere Zellaktivität nach drei Tagen Inkubation, jedoch waren diese Werte statistisch nicht signifikant. Zu übertragbaren Ergebnissen kamen Charak et al., die zeigten, dass Ceftriaxon die koloniebildende Aktivität humaner Knochenmarkvorläuferzellen nicht unterdrückte [Salzmann, Naal et al. 2007, Charak, Malloy et al. 1991].

Ein weiteres Indiz für einen teilweise stimulierenden Einfluss des Ceftriaxons auf den osteoblastären Zellmetabolismus stellt die Calcifizierung dar. Diese war zu allen Konzentrationen des Cephalosporins nach dreiwöchiger Inkubationszeit gleichbleibend stabil. Eine vierwöchige Einwirkzeit bewirkte bereits im therapeutischen Bereichen von 100 und 250 µg/ml Ceftriaxon einen Anstieg des Calciumgehaltes der Osteoblasten. Eine darüber hinaus höhere Konzentration des Wirkstoffes ließ den Calciumgehalt jedoch annähernd unverändert. Salzmann et al. konnten für cefuroximbehandelte Osteoblasten ebenfalls einen Anstieg der extrazellulären Calcifizierung im Bereich therapeutischer Wirkkonzentrationen nachweisen. Bei einer Höchstdosis von 1.000 µg/ml Medikament konnte auch für Cefuroxim kein

vermehrter Calciumgehalt mehr gemessen werden [Salzmann, Naal et al. 2007]. Der histomorphologische Nachweis der Mineralisation der Zellproben, welcher nach vier Wochen erfolgte, zeigte einen deutlichen Rückgang der Mineralisationskerne mit steigenden Konzentrationen. Da jedoch nur kleine Ausschnitte lichtmikroskopisch erfasst werden konnten, kann dieser Nachweis lediglich als Abschätzung eingestuft werden. Eine weitere mögliche Ursache für diesen Verlauf könnte eine geringere Zelldichte mit steigenden Konzentrationen nach vierwöchiger Inkubation sein. Insgesamt mag es jedoch den Anschein haben, dass höhere Konzentrationen von Ceftriaxon sogar leicht stimulierend auf die Osteoblasten wirken, insbesondere mit Anstieg der Proliferationsrate im MTT-Test und Absinken der Apoptoserate.

5.3 Linezolid (Zyvoxid®)

Linezolid aus der Gruppe der Oxazolidinone entspricht im Gegensatz zu den beiden bereits zuvor beschriebenen Antibiotika Ceftriaxon und Cefotiam einem Reserveantibiotikum. Sein Wirkspektrum umfasst grampositive Erreger, insbesondere multiresistente Bakterien wie z.B. MRSA, MRSE oder VRE. Somit wird es unter anderem bei Sepsis, Endokarditis, Katheterinfektionen, Pneumonien und beim orthopädischen Patienten zur Therapie der Osteomyelitis sowie von Endoprotheseninfektionen eingesetzt [Ament, Jamshed et al. 2002]. Linezolid hemmt die bakterielle Proteinsynthese durch spezifische Bindung an die Ribosomen und zeigt somit eine bakteriostatische Wirkung [Ruß, Endres 2009]. Die Halbwertszeit beträgt ca. fünf Stunden bei einer renalen und intestinalen Ausscheidung. Die Verabreichung kann oral und intravenös erfolgen, wobei eine Dosierung von 600 mg zweimal täglich über 10-14 Tage empfohlen wird [Ruß, Endres 2009]. Angelehnt an die Plasmaverteilung bei klinischer Anwendung von ca 10-20 µg/ml wurden in der vorliegenden Arbeit Konzentrationen von 500, 100, 50, 25, 10 und 0 µg/ml Linezolid getestet [Ament, Jamshed et al. 2002; Dewelhenke, Krut et al. 2007].

Insgesamt konnte bei systemisch erreichbaren Wirkkonzentrationen zumeist kein negativer Effekt durch die Linezolidbehandlung nachgewiesen werden. Lediglich vereinzelt zeigten sich proliferationshemmende Auswirkungen im therapeutischen Bereich. Höhere Konzentrationen über den klinischen Anwendungsbereich hinaus, hemmten jedoch den Stoffwechsel der Osteoblasten.

Während die Zellzahl der Proben ohne Pharmakonbehandlung entsprechend der Inkubationszeit zunahm, da den Osteoblasten mehr Zeit zum Wachstum bleibt, wirken sich zu allen Inkubationszeiten Verdünnungen ab 50-100 µg/ml Linezolid geringfügig negativ auf die Zellzahl aus. Auch andere getestete Antibiotika zeigten eine negative Auswirkung auf die Zellzahl. So sank die Zellzahl bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Cephalosporinen, Ceftriaxon und Cefotiam, ebenfalls ab Werten von 25-200 µg/ml Antibiotikum. Am deutlichsten erschien dies bei den höchsten getesteten Konzentrationen von 1.000 µg/ml.

Ein stärker spezifischer Parameter zur Beurteilung der Proliferation der getesteten Osteoblasten ist der DNA-Gehalt der Zellen. Passend zur Zellzahl nahm der DNA-Gehalt der Proben mit höheren Pharmakakonzentrationen zunächst nur geringfügig ab. 500 µg/ml Linezolid zeigte jedoch nach drei und sieben Tagen ein deutliches Absinken des DNA- sowie des Proteingehaltes. Somit wirkte diese Verdünnungsstufe am stärksten toxisch auf die Zellen. Mit kurzer Inkubationszeit von 24 h schien den Effekt auf den DNA-Gehalt am geringsten zu sein, Verdünnungen mit 100 µg/ml Linezolid zeigten sogar einen signifikanten Anstieg und somit positiven Einfluss auf die Proliferation der Osteoblasten. Abweichend hiervon sank nach drei Tagen Inkubation der DNA-Gehalt der Zellproben im Vergleich zur Kontrolle. Statistisch signifikant war dies bei Verdünnungen von 25 µg/ml Linezolid. Der Rückgang des DNA-Gehaltes in den Proben im Vergleich zur Kontrolle war nur gering ausgeprägt, dennoch sollte dies nicht unbeachtet bleiben, insbesondere da die *in vivo* erreichte Plasmakonzentration der Patienten nur geringfügig darunter liegt. Der Gesamtproteingehalt der Zellproben verhielt sich nach ein und drei Tagen ähnlich unspezifisch. Es wurde jedoch deutlich, dass eine längere Inkubationszeit von bspw. sieben Tagen einen limitierenden Einfluss auf den Zellstoffwechsel bzw. die Proteinsynthese hatte. Da das Absinken bereits bei niedrigen Konzentrationen Linezolid begann, wie sie auch *in vivo* erreicht werden können, sollte hier Anlass zur weiteren Diskussion in Bezug auf die Dauer einer möglichen Therapie mit Linezolid gegeben sein.

Auch der MTT-Test bestätigte eine proliferationshemmende Wirkung von Linezolid. Diese trat insbesondere bei hohen Konzentrationen auf. So wirkten 500 µg/ml Linezolid bei allen Inkubationszeiten signifikant proliferationshemmend. Ein Rückgang der Zellproliferation zeigte sich nach 24-stündiger Inkubation zwar schon bei Konzentrationen ab 10 µg/ml, welche im therapeutischen Bereich liegen, bei längerer Inkubationszeit war dies jedoch nicht mehr signifikant nachweisbar. Eine mögliche Erklärung mag eine Erholung der Zellen über die Zeit zu sein. Duewelhenke et al. kamen 2006 zu dem Schluss, dass Linezolid in höheren Konzentrationen von 240 µg/ml Linezolid die mitochondriale Aktivität beeinträchtigt und somit hemmend auf Zellproliferation und metabolische Aktivität wirkt. Allerdings wurden

deren Versuche erst nach zwei Tagen Inkubationszeit durchgeführt [Düwelhenke, Krut et al. 2007]. Im Vergleich zu anderen Antibiotika sank die Proliferationsrate der Osteoblasten nach Behandlung mit Linezolid erst bei hohen Konzentrationen. So wurden bspw. 20% proliferationsgehemmte primäre humane Osteoblasten bei der Behandlung mit schon 20-40 µg/ml Makroliden, Clindamycin und Rifampicin, gefunden. Bei dem Einsatz von Tetracyclinen und Fluorchinolonen sank die Proliferationsrate erst bei Konzentrationen von 60-80 µg/ml und bei Linezolid erst bei hohen Konzentrationen von 240 µg/ml [Düwelhenke, Krut et al. 2007]. Dazu passend konnte in den genannten Studien eine vermehrte Zytotoxizität der hohen Linezolidkonzentrationen aufgrund des Anstiegs des LDH-Gehaltes nachgewiesen werden. Die Aktivität der ALP bezogen auf den Proteingehalt zeigte ein relativ unspezifisches Verhalten bei sämtlichen Konzentrationsstufen, wobei auch hier eine längere Inkubationszeit von sieben Tagen im Vergleich zu kürzeren Inkubationszeiten zumeist einen Rückgang der Aktivität aufzeigte. Einzig hohe Konzentrationen von 500 µg/ml ließen nach sieben Tagen Inkubation einen Aktivitätszuwachs zu vermerken. Eine dreitägige Inkubation zeigte schon bei 100 µg/ml Linezolid eine Zunahme der Zellaktivität. Ähnlich positiv wirkte sich die Linezolid-Behandlung im Hinblick auf die Apoptoserate aus. Der programmierte Zelltod zeigte bei kurzer Inkubationszeit von einem Tag einen statistisch signifikanten Rückgang bei Konzentrationen ab 25 µg/ml. Eine längere Einwirkzeit von drei Tagen hatte wiederum keinen Einfluss auf die Apoptoserate. Diese war erst wieder nach sieben Tagen Inkubation bei 50-500 µg/ml Linezolid rückläufig. Dosisabhängig war sich eine signifikante Verminderung der Kalzifizierung im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Pharmakabehandlung zu erkennen. Die Hemmung der Mineralisation der Osteoblasten trat schon bei geringen Konzentrationen von 10 bzw. 25 µg/ml Linezolid nach drei bzw. vier Wochen Inkubation auf. In Zusammenschau der Ergebnisse zeigte sich bei Linezolid-Konzentrationen im Bereich der therapeutischen Wirkkonzentrationen im Bereich von 10-25 µg/ml jedoch kaum ein Einfluss auf die untersuchten Osteoblasten. Teilweise wirkte sich das Medikament stimulierend auf den Stoffwechsel der Knochenzellen aus. Lediglich höchste Konzentrationen, wie sie bei lokaler Applikation vorkommen können, zeigten einen hemmenden Einfluss auf den Zellstoffwechsel. Somit lässt sich sagen, dass die systemische Therapie mit Linezolid hinsichtlich ihrer Auswirkung auf den Osteoblastenstoffwechsel durchaus geeignet ist. Bei systemisch erreichbaren Wirkkonzentrationen konnte kein negativer Effekt der Linezolidbehandlung festgestellt werden. Die negativen Auswirkungen bei hohen Konzentrationen sollten jedoch bei der lokalen Applikation, bspw. im Rahmen von Osteomyelitisoperationen, berücksichtigt werden.

5.4 Parecoxib (Dynastat®)

Parecoxib ist ein Analgetikum aus der Gruppe der Nichtsteroidalen Antiphlogistika (NSAID) mit Wirkung durch Hemmung der Cyclooxygenase 2. Dies ist ein Enzym, welches die Biosynthese von Prostaglandinen katalysiert. Prostaglandin E₂ stimuliert durch Aktivierung von sowohl Osteoblasten als auch Osteoklasten den Knochenstoffwechsel [Baylink, Mohan et al. 1996; Riendeau, Percival et al. 1997]. Das Anwerben und die Osteoblastendifferenzierung von Knochenmarksvorläuferzellen wird unterstützt, so dass die Knochenmasse, -stärke und -dichte und die Rate an Bildung von neuem Knochen ansteigt [Yang, Liu et al. 1993; Keila, Kelner et al. 2001; Vuolteenaho, Moilanen et al. 2008].

NSAIDs werden außer zur Schmerztherapie gegenwärtig auch zur Prophylaxe heterotoper Ossifikationen, bspw. nach Traumata oder Hüftgelenkersatz, eingesetzt [Miehle 2003; Vuolteenaho, Moilanen et al. 2008; Akritopoulos, Papaioannidou et al. 2009]

Die Halbwertszeit ist mit 0,1 h (i.v.) - 0,3 h (i.m.) relativ kurz, wobei Parecoxib als Prodrug in der Leber zu Valdecoxib, dessen Halbwertszeit 8 h beträgt, metabolisiert wird. Die Elimination erfolgt hepatisch, nur ca. 5% werden als Valdecoxib unverändert über den Urin eliminiert. Parecoxib wird intramuskulär oder intravenös als Kurzzeittherapie zumeist mit einer Dosierung von 40 mg verabreicht, wobei eine Tageshöchstdosis von 80 mg nicht überschritten werden sollte [Kandagal 2007]. Die Plasmakonzentration des Medikamentes *in vivo* beträgt demnach 0,9–18,4 µg/ml [Dimmen, Nordsletten et al. 2009]. In der vorliegenden Arbeit wurden Konzentrationen im Bereich von 0-500 µg/ml Parecoxib untersucht, so dass insbesondere der Bereich von 0,5, 5 und 50 µg/ml als klinisch relevant angesehen werden kann.

In der vorliegenden Untersuchung zeigte sich, dass eine Behandlung der Osteoblasten mit Parecoxib die Zellzahl bereits ab Konzentrationen von 0,5 µg/ml verminderte. Zu allen getesteten Inkubationszeiten war die Zellzahl der mit dem Coxib behandelten Osteoblasten geringer als die der Kontrolle. Diese Ergebnisse korrelieren mit den Ergebnissen der veröffentlichten Literatur, wonach Parecoxib einen hemmenden Effekt auf die Knochenheilung und in diesem Zusammenhang somit auch auf den Osteoblastenstoffwechsel besitzt [Evans, Butcher 2004; A. Meunier 2006]. Allerdings wurde in diesen Studien diese Aussage nach deutlich weniger Untersuchungen wie in der vorliegenden Arbeit getroffen.

Der DNA-Gehalt der Proben lässt weitere Aussagen über das Osteoblastenwachstum zu. Nach einer eintägigen Behandlung war die Proliferation der Knochenzellen kaum beeinflusst.

Sowohl in Bezug auf DNA- und Proteingehalt, als auch auf die mit dem MTT-Test gemessene Zellproliferation, hatte eine eintägige Behandlung mit Parecoxib keinen signifikanten Einfluss auf die Osteoblasten. Einzige Ausnahme war das Absinken der Zellproliferation mit einem Rückgang des DNA-Gehaltes bei einer Dosierung von 500 µg/ml Parecoxib, welche jedoch deutlich über der *in vivo* erreichten Plasmakonzentration liegt. Selbst eine Behandlungsdauer von drei Tagen beeinflusste die Osteoblastenproliferation kaum. Bereits 2004 fanden Evans et al. keinen nennenswerten Einfluss von Celecoxib, einem weiteren selektiven COX-2-Hemmer, auf den DNA-Gehalt von Osteoblasten *in vitro* [Evans, Butcher 2004]. Celecoxib ließ selbigen im Rahmen anderer Studien sogar ansteigen [Arpornmaeklong, Akarawatcharangura et al. 2008]. Der relativ geringe Einfluss auf die Proliferation schien sich bei Parecoxib zu bestätigen. Nach drei Tagen sank lediglich die mit dem MTT-Test gemessene Zellproliferation bei Konzentrationen ab 50 µg/ml. Eine längere Inkubationszeit von sieben Tagen schien sich jedoch negativ hinsichtlich der Zellproliferation auszuwirken. So wies der DNA-Gehalt nach sieben Tagen zwar erst bei 100 µg/ml signifikante Einschränkungen auf, doch sanken sowohl die Zellproliferation als auch die Proteinmenge der Osteoblasten nach einwöchiger Behandlung deutlich. Die Beobachtungen korrelieren weitgehend mit Ergebnissen anderer Studien, in denen bspw. für Celecoxib ebenfalls eine Proliferationshemmung von Osteoblasten festgestellt werden konnte [Kaspar, Hedrich et al. 2005]. Diese trat zum einen bereits bei therapeutischen Dosen, zum anderen erst ab einer Behandlungsdauer von drei Tagen auf. Der negative Effekt war insbesondere bei hohen Celecoxib-Konzentrationen und mit Dauer der Expositionszeit ausgeprägt [Wang, Lin et al. 2004]. Aber auch andere NSAID wie bspw. Diclofenac, Indometacin und Ibuprophen wirken *in vitro* proliferationshemmend auf Knochenzellen [Ho, Chang et al. 1999; Matziolis, Rau et al. 2002].

Obwohl steigende Anwendungsdauer und Konzentration des Medikamentes mit einem Rückgang der Zellproliferation einhergingen, sank die Apoptoserate der Zellen mit steigender Konzentration. Bereits nach einem Tag Behandlung mit Konzentrationen von 50 µg/ml und mehr Parecoxib gingen weniger Zellen den programmierten Zelltod ein, als bei geringeren Dosen. Eine einwöchige Behandlung verminderte die Apoptoserate bereits bei Konzentrationen, wie sie in therapeutischer Dosierung vorliegen (0,2 mg/ml). In der Referenzgruppe ohne Pharmakonzugabe war die Apoptoserate nach einwöchiger Behandlung erhöht. Dies mag am ehesten an einer Kontaktinhibierung aufgrund vermehrten Zellwachstums mit der Zeit liegen. Somit könnten auch die erniedrigten Apoptosewerte nach drei Tagen erklärt werden, da die Zellen in der pharmakonfreien Umgebung mit der Zeit proliferiert sein könnten.

Die Zellaktivität bezogen auf die ALP-Aktivität, zeigte sich relativ unverändert bei steigenden Pharmakonzentrationen. Erst Dosierungen von 500 µg/ml Parecoxib hatten ein statistisch signifikantes Absinken der Zellaktivität nach drei Tagen zur Folge. Da Konzentrationen von 500 µg/ml deutlich über der *in vivo* erreichten Plasmakonzentrationen liegen, schien die Verabreichung von Parecoxib im Hinblick auf die Zellaktivität keine große Rolle zu spielen. Der Calciumgehalt der Osteoblasten sank nach dreiwöchiger Inkubationszeit bereits ab klinisch relevanten Dosen von 0,5 µg/ml Parecoxib ab. Ab einer Dosierung von 100 µg/ml Parecoxib zeigte sich im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe ein weiterer deutlicher Rückgang des Calcium-Gehalts. Somit wird die Dosisabhängigkeit hinsichtlich der Wirkung des Pharmakons auf den Zellstoffwechsel verdeutlicht. Einen negativen Einfluss von Parecoxib auf die Genexpression in Bezug auf Calcificationsmarker und Matrixsynthese beschreiben Pretzsch et al. Allerdings wurden die Tests in deren Versuchsaufbau mit Osteoblasten (welche in deren Studie als Coculturen angelegt wurden) bei kurzen Inkubationszeiten von 0, 24, 48, 72 h und mit Parecoxibkonzentrationen bis zu 100 µM durchgeführt [Schwarming, Pretzsch et al. 2015]. Wie bereits für andere NSAIDs beschrieben, kann man nach einer noch längeren Inkubationszeit - in vorliegendem Fall vier Wochen - eine Reversibilität dieses Mineralisierungsdefizits erkennen. In den Versuchen zeigte sich bei physiologischen Konzentrationen von 0,5-5 µg/ml sogar eine Stimulierung der Mineralisation. Dies könnte Anreiz für weitere Untersuchungen geben. Eine höhere Dosierung sollte jedoch indikationsabhängig aufgrund des hiermit verbundenen Rückgangs der Calcifizierung vermieden werden. Unterstützt wird diese Annahme durch die Alizarinrotfärbung der Knochenzellen, in der sich die deutliche Verminderung der Calcifizierung nach drei Wochen zeigt. Dimmen et al. konnten negative Auswirkungen von Parecoxib und Indomethacin bei weiblichen Ratten mit Tibiafrakturen drei Wochen nach Beginn einer Frakturheilung nachweisen. In deren Fall wurden Biegesteifigkeit und die endgültige Beugung limitiert. Somit empfahlen sie diesbezüglich eine postoperative Vermeidung der entsprechenden Medikamente bzw. Dosierungen [Dimmen, Nordsletten et al. 2009]. Andere Studien belegten für Parecoxib ebenfalls vorübergehende inhibitorische Effekte auf die Knochenheilung, welche als Langzeiteffekte jedoch nicht mehr signifikant erschienen. In diesem Fall wurde die Frakturheilung röntgenologisch nach 28 und 42 Tagen beurteilt, so dass dies in zeitlich unterschiedlichem Rahmen zu den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit steht [Akritopoulos, Papaioannidou et al. 2009]. In der Literatur werden des öfteren hemmende Effekte einer Langzeitbehandlung mit Parecoxib auf den Knochenstoffwechsel beschrieben, was sich auch durch die in dieser Arbeit durchgeführten Tests nicht widerlegen ließ. Trotz scheinbarer Reversibilität der Effekte ist eine längerfristige Anwendung kritisch zu beurteilen und individuell abzuwägen.

5.5 Ibandronat (Bondronat®)

Ibandronat ist ein Bisphosphonat, welches hauptsächlich zur Osteoporoseprophylaxe eingesetzt wird. Bisphosphonate wirken über eine Hemmung der Osteoklastentätigkeit am Knochen [Kurth, Hovy et al. 2001]. Somit wird ein vermehrter Abbau des Knochens durch Hemmung der Resorption vermieden und das Serumcalcium normalisiert. Dieses Pharmakon ist sowohl für eine orale, wie auch intravenöse Anwendung geeignet. Weitere wichtige Indikationen sind die tumorbedingte Hypercalcämie sowie die Prophylaxe skelettbezogener Ereignisse bei Knochenmetastasen [Ruß, Endres 2009]. Die therapeutische Dosierung beträgt indikationsabhängig zwischen 2-6 mg i.v.. In der Osteoporosetherapie werden 3 mg i.v. alle drei Monate oder 150 mg pro Monat oral verordnet, bei der Hypercalcämie 2-4 mg als verdünnte Einmaldosis. Bei Knochenmetastasen wird eine Höchstdosis von 6 mg alle drei bis vier Wochen gegeben (oder nüchtern wöchentlich 50 mg oral). Die Elimination erfolgt unverändert renal bei einer relativ hohen Eliminationshalbwertszeit von 10-16 h. Das nicht renal ausgeschiedene Ibandronat bleibt vermutlich über lange Zeit an den Knochen gebunden, so dass hier insbesondere die Langzeiteffekte betrachtet werden sollten. Für Ibandronat beträgt die Plasmakonzentration nach einmaliger intravenöser Injektion von 3 mg Ibandronat 0,582 +/- 108 µg/ml [European-Medicines-Agency 2007]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Konzentrationen von 0, 0,2, 0,5, 1, 2 und 5 µg/ml Ibandronat verwendet. Den Plasmakonzentrationen bei normaler therapeutischer Anwendung *in vivo* sind somit insbesondere die Werte bei 0,2 und 0,5 µg/ml Ibandronat zuzuordnen.

Überwiegend erscheint Ibandronat im Konzentrationsbereich der klinischen Anwendung weitgehend unbedenklich hinsichtlich der Auswirkung auf Osteoblasten. Der erwiesene Rückgang der Mineralisierung sollte jedoch genauer betrachtet werden.

Der Osteoblastenstoffwechsel erwies sich im Hinblick auf DNA-Gehalt und ALP-Aktivität als relativ unabhängig von dem Bisphosphonat. So sank der DNA-Gehalt der Proben erst bei Konzentrationen von 1 und 5 µg/ml Ibandronat nach 72 h bzw. sieben Tagen signifikant. Diese hohen Konzentrationen werden klinisch jedoch nicht eingesetzt. Kürzere Inkubationszeiten konnten sogar bei Höchstkonzentrationen keine limitierenden Auswirkungen auf den DNA-Gehalt bewirken. Nach einwöchiger Inkubation war die DNA-Menge ebenso wie die Zellproliferation gemessen im MTT-Test höher im Vergleich zu kürzeren Inkubationszeiten. Dies kann zum einen im sogar stoffwechsellanregendem Einfluss des Medikaments begründet sein, wofür die im Vergleich zu Kontrolle ohne Pharmakon erhöhte ALP-Aktivität pro Gesamtprotein sprechen würde, als auch damit, dass die Zellen mehr Zeit zum Wachsen hatten und somit der DNA-Gehalt insgesamt höher liegt. Auch auf

das Gesamtprotein war der Einfluss von Ibandronat mit steigender Konzentration unspezifisch zu bewerten. Nach kurzer Inkubationszeit (24 h) konnte ein stimulierender Effekt bei allen getesteten Verdünnungsstufen aufgezeigt werden. Etwas längere Inkubation (72 h) schien dagegen kaum einen Einfluss zu haben. Nach einer Woche Inkubation zeigte sich ein Absinken des Gesamtproteins, wenngleich erst bei hohen Dosierungen von 2 und 5 µg/ml, wie sie *in vivo* nicht vorkommen. Ähnliche Effekte konnten für Alendronat (ein weiteres Bisphosphonat) nachgewiesen werden, welches bei hohen Konzentrationen zelltoxisch wirkte, während geringere Dosen keinen Effekt auf die Proliferation zeigten [García-Moreno, Serrano et al. 1998]. Dies wurde belegt für die Zellzahl und den DNA-Gehalt gemessen anhand von Tritiumwassereinbau in die DNA der Knochenzellen [García-Moreno, Serrano et al. 1998]. Im Hinblick auf die Zellproliferationsrate (gemessen durch den MTT-Test) zeigte sich nach ein und drei Tagen zunächst ebenfalls keine signifikante Veränderung nach Pharmakonapplikationen. Einzige Ausnahme war die auch therapeutisch relevante Wirkdosis von 0,2 µg/ml Ibandronat. Diese ließ die Osteoblasten signifikant proliferieren und hatte somit eine stimulierende Wirkung auf die untersuchten Knochenzellen. Längere Pharmakongabe von einer Woche ließ die Proliferationsrate der getesteten Osteoblasten im Vergleich zur Kontrolle bei allen getesteten Pharmakonkonzentrationen abfallen, wobei der Effekt bei der klinisch kaum relevanten hohen Dosis von 5 mg/dl am deutlichsten erschien. Insgesamt war die Proliferation jedoch mit der Dauer nach einer Woche Einwirkzeit im Vergleich zu kürzeren Zeiten deutlich gestiegen.

Die Aktivität der ALP schien weitgehend unabhängig von der Konzentration zu sein. So konnte keine statistisch signifikante Veränderung festgestellt werden. Es fanden sich lediglich geringe Schwankungen der Aktivität bei unterschiedlichen Konzentrationen. Nach 72 h Inkubation schienen die Zellen hinsichtlich der Aktivität der ALP stimuliert zu werden. Dieser anregende Effekt von Ibandronat auf Zellaktivität konnte auch von Fromigue et al. belegt werden, die im Vergleich zu anderen Bisphosphonaten denselben jedoch nur als gering einstufen. Ausserdem fanden sie einen stimulierenden Einfluss von Ibandronat in Bezug auf die Zellproliferation nach 72 h. Im Vergleich zu anderen Bisphosphonaten war der Effekt jedoch nur gering, da bspw. Knochenzellen durch Clondronat schon nach 24 h stimuliert wurden und Pamidronat keine Auswirkung zeigte. Somit ist der Effekt von Bisphosphonaten differenziert zu betrachten. Längere Inkubationszeiten von einer Woche hatten bei eben genannten Pharmaka einen Rückgang des Zellwachstums zur Folge [Fromigue, Body 2002]. Naidu et al. fanden im Fall von Alendronat und Zolendronat, zwei weiteren Medikamente dieser Gruppe, mit steigender Konzentration eine signifikant sinkende Zellzahl, während gleichzeitig TGF-β1 (transforming growth factor beta 1) anstieg [Naidu, Dechow et al. 2008].

Zusammenfassend lässt sich vermuten dass Ibandronat in therapeutisch wirksamen Konzentrationen kaum stoffwechsellinhibierende Effekte besitzt. Zu ähnlichen Ergebnissen hinsichtlich der Wirkung von Bisphosphonaten auf Knochenzellen kamen wie bereits erwähnt Garcia-Moreno et al., welche für Alendronat ebenfalls keine wesentliche Beeinflussung von Zellproliferation, Lebensfähigkeit oder Mineralablagerung humaner Osteoblasten bei Konzentrationen von 2×10^{-9} mol/l nachweisen konnten [García-Moreno, Serrano et al. 1998].

Die Behandlung mit den häufig verwendeten Bisphosphonaten Alendronat und Risedronat führte in *in vitro* Studien zu einer Steigerung der Zellzahl und der Aktivität der ALP sowie den ossären Differenzierungsmarkern Osteocalcin, BMP-2 und Kollagen Typ1 [Im, Qureshi et al. 2004]. Jedoch sind mit zunehmender Wirkstoffkonzentration zelltoxische Wirkungen der Bisphosphonate auf Osteoblasten bekannt [Im, Qureshi et al. 2004; Naidu, Dechow et al. 2008]. Passend zu der relativ unspezifischen Wirkung auf die Proliferation zeigt sich auch der Einfluss auf die Apoptoserate. Es konnte keine signifikante Beeinflussung festgestellt werden. Lediglich bei der Höchstkonzentration von 5 µg/ml nach einer Inkubation von sieben Tagen war die Apoptoserate signifikant hoch. Ansonsten war durch das Medikament jedoch kein relevanter stoffwechsellinhibierender Einfluss nachzuweisen.

Interessanterweise zeigte sich bereits bei therapeutisch wirksamen Dosen von 0,2 sowie 0,5 µg/ml Ibandronat ein statistisch signifikanter Rückgang des Calciumgehaltes in den Zellproben. Am deutlichsten war dies bei dem Sprung von 0,2 zu 0,5 µg/ml Ibandronat. Während die Zellen bei 0,2 µg/ml Ibandronat noch einen relativ hohen Calciumgehalt besaßen, so fiel dieser nach Behandlung mit einer Dosis von 0,5 µg/ml, wie sie auch therapeutisch zum Einsatz kommen kann, deutlich ab. Höhere Konzentrationen wirkten ebenfalls limitierend auf den Calciumgehalt der Zellen. Somit ist die Beeinflussung des Knochenstoffwechsels schon bei therapeutischen Dosierungen zu verzeichnen, so dass eine Anpassung der Dosierung längerfristig überdacht werden sollte und gegebenenfalls weitere Untersuchungen mit eben diesen grenzwertigen Pharmakonkonzentrationen erfolgen sollten.

6 Zusammenfassung

Im Bereich der Orthopädie und Unfallchirurgie werden regelmässig Pharmaka zur Analgesie, Infektionsprophylaxe oder aufgrund internistischer Begleiterkrankungen eingesetzt. Es erscheint daher unerlässlich, die Auswirkungen solcher Pharmaka auf den Knochenstoffwechsel zu erforschen. Bisher finden sich diesbezüglich nur wenige wissenschaftliche Publikationen. Daher war es Ziel dieser Arbeit, den Einfluss einiger in der Orthopädie häufig eingesetzter Medikamente, drei Antibiotika (Cefotiam, Ceftriaxon, Linezolid), einem Analgetikum (Parecoxib) sowie einem Bisphosphonat (Ibandronat), auf den Knochenstoffwechsel *in vitro* zu untersuchen. So wurden Osteoblastenkulturen hinsichtlich der Veränderung der Zellproliferation, der Zellzahl, des DNA-Gehaltes, des Proteingehaltes sowie der Aktivität der ALP und der Zelltodrate nach Pharmakapplikation untersucht. Auch die Calcifizierung unter Pharmakaeinfluss wurde untersucht. Die Medikamente wurden zu je fünf verschiedenen Konzentrationen und einem Kontrollansatz ohne Pharmakazugabe untersucht. Zusätzlich erfolgten die Messungen zu jeweils verschiedenen Inkubationszeiten. Die verwendeten Osteoblasten wurden zuvor intraoperativ gewonnen, isoliert und ein repräsentativer Zellpool erstellt.

Sämtliche getesteten Pharmaka zeigten eine vom Wirkstoff, der Dosierung und der Anwendungsdauer abhängige Wirkung auf die Knochenzellen.

Cefotiam besitzt im Bereich der klinisch angewandten Wirkkonzentrationen kaum Einfluss auf den Osteoblastenstoffwechsel. In niedrigen Dosierungen ließ sich teilweise ein proliferationssteigernder Effekt messen, wenn man bspw. den MTT-Test oder das Absinken der Apoptoserate betrachtet. Proliferationshemmende Effekte konnten nur bei hohen Wirkdosen nachgewiesen werden, so dass dies für die gebräuchliche Dosierung keine Rolle spielt. Da in der Literatur über einen stimulierenden Effekt des Cefotiams bislang nichts bekannt ist, sollten weitere Untersuchungen über diese Zusammenhänge folgen.

Ceftriaxon ist hingegen differenzierter zu betrachten. Insgesamt mag es den Anschein haben, dass höhere Konzentrationen von Ceftriaxon leicht stimulierend auf die Osteoblasten wirken, insbesondere da die Proliferationsrate im MTT-Test anstieg und die Apoptose sank. Aber auch die Einwirkzeit scheint eine große Rolle zu spielen. Während die Zellzahl, der DNA-Gehalt und das Gesamtprotein zu jeder Zeit relativ unbeeinflusst von einer steigenden Dosierung Ceftriaxon blieben und auch die Aktivität der ALP nicht wesentlich beeinflusst wurde, zeigten hohe Dosen im klinisch nicht mehr relevanten Bereich nach 48h eine proliferationsstimulierende Wirkung im MTT-Test. Eine kürzere Anwendungsdauer von nur

24h jedoch ließ bereits in systemisch relevanter Dosierung (250 µg/ml Ceftriaxon) proliferationshemmende Einflüsse erkennen. Der zeitabhängige Effekt zeigte sich auch in einem Rückgang des Zelltodes bei kurzer Anwendungszeit, während nach 72 h die Rate höher lag.

Linezolid zeigte bei einer Dosierung, wie sie nach intravenöser oder oraler Gabe erreicht wird, keinen relevanten stoffwechsellinhibierenden Effekt auf die untersuchten Knochenzellen. Der Einfluss des Medikamentes bei Dosierungen, die einer systemischen Gabe entsprachen, war insgesamt gering ausgeprägt, teilweise konnten stoffwechselstimulierende Auswirkungen dokumentiert werden. Höhere Pharmakakonzentrationen, wie sie bei lokaler Applikation vorkommen, hatten jedoch einen hemmenden Einfluss auf den Knochenstoffwechsel der Osteoblasten. Das Gesamtprotein sank mit höherer Pharmakondosis ebenfalls wie die Zellzahl. Limitierende Effekte der Zellaktivität (gemessen im ALP-Test) waren erst nach längerer Inkubationszeit nachzuweisen. Insgesamt kann Linezolid somit hinsichtlich der Wirkung auf den Knochen bei systemischer Gabe als gut verträgliches Antibiotikum bewertet werden.

Als häufig im Bereich der Knochenerkrankungen angewandtes Analgetikum wurde Parecoxib getestet. In der Literatur werden des öfteren hemmende Effekte einer Langzeitbehandlung mit Parecoxib auf den Knochenstoffwechsel beschrieben, was sich auch durch die in dieser Arbeit durchgeführten Tests nicht widerlegen ließ. So war ein Absinken der Zellzahl sowie eine verminderte Calcifizierung bereits bei klinisch relevanter Dosierung zu vermerken. Hemmende Effekte hinsichtlich der Proliferation konnten bei Kurzzeitbehandlung allerdings nur in hoher Dosierung, wie sie bei klinischer Anwendung nicht vorkommt, aufgezeigt werden. Bei längerer Einwirkzeit reichte eine geringe Dosierung. Im Kontrast dazu steht eine rückläufige Zelltodrate bereits bei therapeutisch angewandten Wirkdosen. Aufgrund wieder ansteigender Calciumkonzentrationen nach längerer Anwendung schien der Effekt reversibel zu sein. In Zusammenschau der Ergebnisse sollte eine längerfristige Anwendung sowie die Anpassung der Dosierung kritisch beurteilt und individuell abgewägt werden. Hinsichtlich der Wirkung auf den Knochenstoffwechsel könnte bei Einsatz von Parecoxib zudem eine regelmässige Kontrolle (z.B. röntgenologisch) der Calcifizierung des Knochens in Betracht gezogen werden.

Ibandronat aus der Gruppe der Bisphosphonate erschien zunächst weitgehend unbedenklich im Bereich der klinischen Anwendung hinsichtlich seiner Wirkung auf Osteoblasten. In klinisch relevanter Dosierung war die Proliferation nahezu unabhängig von einer Pharmakonapplikation. Bei einwöchiger Behandlung konnten hinsichtlich DNA-Menge oder ALP-Aktivität sogar stimulierende Auswirkungen auf die getesteten Zellen festgestellt

werden. Eine Reduktion der Proteinmenge zeigte sich erst nach einer Woche Inkubation sowie nur bei hoher Dosierung, wie sie systemisch nicht erreicht wird. Der Calciumgehalt der Zellen sank jedoch nach einer Einwirkzeit von drei Wochen bereits bei therapeutisch wirksamer Dosierung. Längerfristig könnte im klinischen Einsatz eine Anpassung der Dosis überdacht werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass die therapeutische Anwendung der untersuchten Pharmaka bei Knochenerkrankungen auf einem vielschichtigen Wirkprinzip basiert, dessen einzelne Aspekte weiter untersucht werden sollten. Insbesondere beim Einsatz hoher Konzentrationen sollten die Auswirkungen des jeweils verabreichten Wirkstoffes auf den Knochenstoffwechsel im Hinblick auf Dosisanpassung, Anwendungsdauer sowie Entscheidung für ein bestimmtes Pharmakon berücksichtigt werden.

7 Ausblick

Bislang vorliegende Untersuchungen und die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Auswirkungen von Medikamenten auf den Knochenstoffwechsel nicht unterschätzt werden sollten und entsprechende Kenntnisse bedeutsam sind.

Weiterführende Projekte könnten Untersuchungen mit anderen Parametern des Knochenstoffwechsels wie Osteocalcin, Kollagen I, Osteopontin oder Bone Sialo-Protein beinhalten. Desweiteren könnte die RNA der Zellen isoliert werden, um durch Untersuchung der Genexpression weitere Erkenntnisse über den Stoffwechsel der Osteoblasten zu erlangen.

Nachdem die Zellkulturen im Rahmen dieser Arbeit ausschliesslich Osteoblastenkulturen enthielten, wären im präklinischen Bereich weiterführende Tests mit gemischten Osteoblasten- und Osteoklastenkulturen denkbar, um so der physiologischen Knochenkonstellation näher zu kommen.

8 Literaturverzeichnis

Akritopoulos, P., Papaioannidou, P., Hatzokos, I., Haritanti, A., Iosifidou, E., Kotoula, M., Mirtsou-Fidani, V. (2009). "Parecoxib has non-significant long-term effects on bone healing in rats when administered for a short period after fracture." *Arch Orthop Trauma Surg* 129(10): 1427-32.

Ament, P. W., Jamshed N., Horne, J. P. (2002). "Linezolid: its role in the treatment of gram-positive, drug-resistant bacterial infections." *Am Fam Physician* 65(4) (2002): 663-70.

Anh, D. J., Dimai H. P., Hall, S. L., Farley, J. R. (1998). "Skeletal alkaline phosphatase activity is primarily released from human osteoblasts in an insoluble form, and the net release is inhibited by calcium and skeletal growth factors." *Calcif Tissue Int* 62(4): 332-40.

Arpornmaeklong, P., Akarawatcharangura, B., Pripatnanont, P. (2008). "Factors influencing effects of specific COX-2 inhibitor NSAIDs on growth and differentiation of mouse osteoblasts on titanium surfaces." *Int J Oral Maxillofac Implants* 23(6): 1071-81.

Auf'mkolk, B., P. V. Hauschka, et al. (1985). "Characterization of human bone cells in culture." *Calcif Tissue Int* 37(3): 228-35.

Ayar, A. (2007). "Tocolytic effect of parecoxib, a new parenteral cyclo-oxygenase-2-specific inhibitor, on the spontaneous and prostaglandin-induced contractions of rat isolated myometrium." *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34(8): 737-41.

Baylink, T. M., Mohan, S., Fitzsimmons, R. J., Baylink, D. J. (1996). "Evaluation of signal transduction mechanisms for the mitogenic effects of prostaglandin E2 in normal human bone cells in vitro." *J Bone Miner Res* 11(10): 1413-8.

Beck, A., Salem, K., Krischak, G., Kinzl, L., Bischoff, M., Schmelz, A., (2005). "Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in the perioperative phase in traumatology and orthopedics effects on bone healing." *Oper Orthop Traumatol* 17(6): 569-78.

Beresford, J. N., J. A. Gallagher, Poser, J. W., Russell, R. G., (1984). "Production of osteocalcin by human bone cells in vitro. Effects of 1,25(OH)2D3, 24,25(OH)2D3, parathyroid hormone, and glucocorticoids." *Metab Bone Dis Relat Res* 5(5): 229-34.

Berridge, M. V. and A. S. Tan (1993). "Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction." *Arch Biochem Biophys* 303(2): 474-82.

- Boxma, H., Broekhuizen, T., Patka, P., Oosting, H. (1996). "Randomised controlled trial of single-dose antibiotic prophylaxis in surgical treatment of closed fractures: the Dutch Trauma Trial." *Lancet* 347(9009): 1133-7.
- Brisson, A. M., A. Bryskier, Millerioux, L., Fourtillan, J. B. (1984). "Pharmacokinetics of cefotiam administered intravenously and intramuscularly to healthy adults." *Antimicrob Agents Chemother* 26(4): 513-8.
- Bradley, M., Schumann G.B. (1984). "Examination of urine." *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods* 17: 380.
- Brunk, C. F., K. C. Jones, James, T. W. (1979). "Assay for nanogram quantities of DNA in cellular homogenates." *Anal Biochem* 92(2): 497-500.
- Buchholz, H. W., Engelbrecht, H. (1970). "Depot effects of various antibiotics mixed with Palacos resins" *Chirurg* 41(11): 511-5.
- Burmester, G.-R., A. Pezzutto, et al. (2007). *Taschenatlas der Immunologie*. Stuttgart, Georg Thieme Verlag, 98-99.
- Cesarone, C. F., Bolognesi C., Santi, L. (1979). "Improved microfluorometric DNA determination in biological material using 33258 Hoechst." *Anal Biochem* 100(1): 188-97.
- Charak B.S., L. R., Malloy B., Twomey P., Mazumder A. (1991). "The effect of amphotericin B, aztreonam, imipenem and cephalosporins on the bone marrow progenitor cell activity." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 27(1): 95-104.
- Coleman, J. E. (1992). "Structure and mechanism of alkaline phosphatase." *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 21: 441-83.
- Dahlhoff, A., Ed. (1998). *Pharmacokinetics of Selected Antibacterial Agents*, Basel, Karger, 1.Auflage: 111
- Dimmen, S., L. Nordsletten, L., Madsen, J. E. (2009). "Parecoxib and indomethacin delay early fracture healing: a study in rats." *Clin Orthop Relat Res* 467(8): 1992-9.
- Duewelhenke, N., Krut, O., Eysel, P. (2007). "Influence on mitochondria and cytotoxicity of different antibiotics administered in high concentrations on primary human osteoblasts and cell lines." *Antimicrob Agents Chemother* 51(1): 54-63.
- Edin, M. L., Miclau, T., Lester, G. E., Lindsey, R. W., Dahners, L. E. (1996). "Effect of cefazolin and vancomycin on osteoblasts in vitro." *Clin Orthop Relat Res*(333): 245-51.

- Esposito, S., Mittelkotter, U. (2005). "Ceftriaxone prophylaxis in abdominal, cardiovascular, thoracic, orthopaedic, neurosurgical and general surgery: a review of practice 1996 - 2003." *J Chemother* 17 Suppl 2: 17-32.
- European-Medicines-Agency. (2007). "Bonviva Ibandronic acid." Stand 18.8.2010, <http://www.emea.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/Bonviva/Bonviva-H-501-X-03-SD.pdf>, 18.8.2010
- Evans, C. E. and C. Butcher (2004). "The influence on human osteoblasts in vitro of non-steroidal anti-inflammatory drugs which act on different cyclooxygenase enzymes." *J Bone Joint Surg Br* 86(3): 444-9.
- Fromiguet, O., Body, J. J. (2002). "Bisphosphonates influence the proliferation and the maturation of normal human osteoblasts." *J Endocrinol Invest* 25(6): 539-46.
- García-Moreno C, Serrano S., Nacher M., Farré M., Díez A., Mariñoso M.L., Carbonell J., Mellibovsky L., Nogués X., Ballester J., Aubía J. (1998). "Effect of alendronate on cultured normal human osteoblasts." *Bone* 22(3): 233-9.
- Gassen, H.-G. and G. H. Schrimpf (2002). ""Gentechnische Methoden"." Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 3.Auflage: 46-50.
- Gerhart, T. N., Roux, R. D., Horowitz, G., Miller, R. L., Hanff, P., Hayes, W. C. (1988). "Antibiotic release from an experimental biodegradable bone cement." *J Orthop Res* 6(4): 585-92.
- Gothlin, G., Ericsson, J. L. (1971). "Fine structural localization of alkaline phosphomonoesterase in the fracture callus of the rat." *Isr J Med Sci* 7(3): 488-90.
- Gomez, B. Jr., Ardacani, S., Ju J., Jenkins D., Cerelli M.J., Daniloff G.Y., Kung V.T.(1995). "Monoclonal antibody assay for measuring bone-specific alkaline phosphatase activity in serum." *Clinical Chemistry* 41(11): 1551-3, 1560-6.
- Gradinger, R. and Gollwitzer (2006). "Ossäre Integration." Springer Verlag, Heidelberg. 1.Auflage: 24-28.
- Green, J. (1994). "The physicochemical structure of bone: cellular and noncellular elements." *Miner Electrolyte Metab* 20(1-2): 7-15.
- Green, L. M., Reade, J. L., Ware, C. F. (1984). "Rapid colorimetric assay for cell viability: application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines." *J Immunol Methods* 70(2): 257-68.

- Gundle, R., Beresford, J.N. (1995). "The isolation and culture of cells from explants of human trabecular bone." *Calcif Tissue Int* 56 Suppl 1: 8-10.
- Halle, E., Majcher-Peszynska, J., Drewelow, B., "Linezolid: das erste Antibiotikum aus der Klasse der Oxazolidinone." *Chemotherapie Journal* (2002)11: 1-11.
- 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." *Biochem Pharmacol* 58(6): 983-90.
- Holtom, P. D. (2006). "Antibiotic prophylaxis: current recommendations." *J Am Acad Orthop Surg* 14(10 Suppl): 98-100.
- Holtom, P. D., Pavkovic, S. A., Bravos, P. D., Patzakis, M. J., Shepherd, L. E.Frenkel, B. (2000) "Inhibitory effects of the quinolone antibiotics trovafloxacin, ciprofloxacin, and levofloxacin on osteoblastic cells in vitro." *J Orthop Res* 18(5): 721-7.
- Igarashi K, W. J., Woo, J.T., Stern P.H. (2002). "Effects of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib, on bone resorption and osteoclastogenesis in vitro." *Biochem Pharmacol.* 63(3) :523-32.
- Im, G. I., Qureshi, S. A., Kenney, J., Rubash, H. E., Shanbhag, A. S. (2004). "Osteoblast proliferation and maturation by bisphosphonates." *Biomaterials* 25(18): 4105-15.
- Ingram, R. T., Park, Y. K., Clarke, B. L., Fitzpatrick, L. A. (1994). "Age- and gender-related changes in the distribution of osteocalcin in the extracellular matrix of normal male and female bone. Possible involvement of osteocalcin in bone remodeling." *J Clin Invest* 93(3): 989-97.
- Isefuku, S., Joyner, C. J., Simpson, A. H. (2001). "Toxic effect of rifampicin on human osteoblast-like cells." *J Orthop Res* 19(5): 950-4.
- Isefuku, S., Joyner, C. J., Simpson, A. H. (2003). "Gentamicin may have an adverse effect on osteogenesis." *J Orthop Trauma* 17(3): 212-6.
- Kaiser, E. and G. Delling (2002). "Osteozyten-ein Organ im Aufwind morphologischer und zellbiologischer Forschung." *Osteologie* 11/4: 219-236.
- Kandagal, P. B., Shaikha, S. M. T., Manjunatha, D. H., Seetharamappa,J. "High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Parecoxib in Human Plasma and Pharmaceutical Formulations." *Analytical Letters* 40 (15) (2007): 2925-2934

- 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." *Unfallchirurg*. 108(1): 18, 20-4.
- Keila, S., A. Kelner, Weinreb, M. (2001). "Systemic prostaglandin E2 increases cancellous bone formation and mass in aging rats and stimulates their bone marrow osteogenic capacity in vivo and in vitro." *J Endocrinol* 168(1): 131-9.
- Kellinsalmi, M., Parikka, V., Risteli, J., Hentunen, T., Leskela, H. V., Lehtonen, S., Selander, K., Vaananen, K., Lehenkari, P. (2007). "Inhibition of cyclooxygenase-2 down-regulates osteoclast and osteoblast differentiation and favours adipocyte formation in vitro." *Eur J Pharmacol* 572(2-3): 102-10.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., Currie, A. R. (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." *Br J Cancer* 26(4): 239-57.
- Kresken, M. (2004). "Parenterale Cephalosporine: Neue Entwicklungen mit Wirksamkeit gegen MRSA und Enterokokken." Stand 21.4.2005. http://www.p-e-g.org/archiv_tmp/jahrestagung_19/symp_beta_laktam/abs_kresken.htm.
- Kurth, A., L. Hovy, Hennigs, T. (2001). "Bisphosphonattherapie von Knochenerkrankungen." Darmstadt, Steinkopff Verlag. 1. Auflage: 8-9.
- Labarca, C., Paigen, K. (1980). "A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure." *Anal Biochem* 102(2): 344-52.
- Lockshin, R. A., Williams, C.M. (1965). "Programmed cell death-cytology of degeneration in the intersegmental muscles of the pernyi silkworm." *J Insect Physiol* 11: 123-33.
- Lottspeich F., Lottspeich H., Zorbas, H. (1998). "Bioanalytik. 1." Spektrum Akademischer Verlag GmbH , Heidelberg - Berlin. 1. Auflage: 40-41.
- Malaval, L., Modrowski, D., Gupta, A.K., Aubin, J.E. (1994). "Cellular expression of bone-related proteins during in vitro osteogenesis in rat bone marrow stromal cell cultures." *Journal of Cell Physiology* 158(3): 555-72.
- Matziolis, G., Rau, H. M., Klever, P., Erli, H. J., Paar, O. (2002). "Modification of human osteoblasts by various analgesics". *Unfallchirurg* 105(6): 527-31.
- Meunier, P. A. (2006). "Parecoxib impairs early metaphyseal bone healing in rats." *Arch Orthop Trauma Surg* 126(7): 433-6.

- Miehle, W. (2003). "Medikamentöse Therapie rheumatischer Erkrankungen." Thieme Verlag, Stuttgart, 3.Auflage: 44-46.
- Mohanty, S. P., Kumar, M. N., Murthy, N. S. (2003). "Use of antibiotic-loaded polymethyl methacrylate beads in the management of musculoskeletal sepsis-a retrospective study." *J Orthop Surg* 11(1): 73-9.
- Mori, F., Tanji, K., Wakabayashi, K. (2000). "Widespread calcium deposits, as detected using the alizarin red S technique, in the nervous system of rats treated with dimethyl mercury." *Neuropathology* 20(3): 210-5.
- Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." *J Immunol Methods* 65(1-2): 55-63.
- Naal, F. D., Salzmann, G. M., von Knoch, F., Tuebel, J., Diehl, P., Gradinger, R., Schauwecker, J. (2008). "The effects of clindamycin on human osteoblasts in vitro." *Arch Orthop Trauma Surg* 128(3): 317-23.
- Naidu, A., Dechow, P. C., Spears, R., Wright, J. M., Kessler, H. P., Opperman, L. A. (2008). "The effects of bisphosphonates on osteoblasts in vitro." *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 106(1): 829-37.
- Netter, F. (1992). "Farbatlanten der Medizin Bewegungsapparat Band 7" Georg Thieme Verlag New York, Stuttgart, 1.Auflage: 169-172.
- Peiper, C., Seelig, M., Treutner, K. H., Schumpelick, V. (1997). "Low-dose, single-shot perioperative antibiotic prophylaxis in colorectal surgery." *Chemotherapy* 43(1): 54-9.
- Promega. "Caspase-Glo 3/7 Assay." Promega Technical Bulletin, USA (2005): 1-17.
- Remedios, A. (1999). "Bone and bone healing." *Veterinary Clinics of North America : Small Animal Practice* 29(5): 1029-1044.
- Riendeau, D., Percival, M. D., Boyce, S., Brideau, C., Charleson, S., Cromlish, W., Ethier, D., Evans, J., Falgoutyret, J. P., Ford-Hutchinson, A. W., Gordon, R., Greig, G., Gresser, M., Guay, J., Kargman, S., Leger, S., Mancini, J. A., O'Neill, G., Ouellet, M., Rodger, I. W., Therien, M., Wang, Z., Webb, J. K., Wong, E., Chan, C. C. (1997). "Biochemical and pharmacological profile of a tetrasubstituted furanone as a highly selective COX-2 inhibitor." *Br J Pharmacol* 121(1): 105-17.
- Robey, P. G., Termine, J. D. (1985). "Human bone cells in vitro." *Calcif Tissue Int* 37: 453-60.

Roche Documed AG. (2007). "Rocephin®, Fachinformation des Arzneimittel-Kompendium der Schweiz®." Stand 3.11.2007, <http://www.kompendium.ch/Monographie.aspx?Id=6d1245bf-e1e5-4a1a-a6ec-a441b1f1b469&lang=de&MonType=fi>.

Rouan, M. C., Lecaillon, J. B., Guibert, J., Modai, J., Schoeller, J. P., (1985). "Pharmacokinetics of cefotiam in humans." *Antimicrob Agents Chemother* 27(2): 177-80.

Ruß,A., Endres, S. (2009). "Arzneimittel pocket plus". Björn Bruckmeier Verlag, Grünwald, 5.Auflage, 159

Salzmann, G. M., Naal, F., von Knoch, F., Tuebel, J., Gradinger, R., Imhoff, A., Schauwecker, J. "Effects of cefuroxime on human osteoblasts in vitro." *J Biomed Mater Res A* 82(2) (2007): 462-8.

Schneider, G. B., Refson, M. (1989). "Pluripotent hemopoetic stem cells give rise to osteoclasts in vitro: effects of rGM-CSF." *Bone Miner* 5: 129-38.

Schnöring, M., Brock, M. (2003). "Prophylactic antibiotics in lumbar disc surgery: analysis of 1,030 procedures." *Zentralbl Neurochir* 64(1):24-9.

Schwarting, T., Pretzsch, S., Debus, F., Ruchholtz, S., Lechler, P. (2015). "The effect of cyclooxygenase inhibition on tendon-bone healing in an in vitro coculture model." *Mediators of inflammation*. 2015: 1-10

Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., Klenk, D. C. (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid." *Anal Biochem* 150(1): 76-85.

Southwell-Keely, J. P., Russo, R. R., March, L., Cumming, R., Cameron, I., Brnabic, A. J. (2004). "Antibiotic prophylaxis in hip fracture surgery: a metaanalysis." *Clin Orthop Relat Res*(419): 179-84.

Vaux, D. L., Strasser, A. (1996). "The molecular biology of apoptosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(6): 2239-44.

Vogel, F., Bodmann, K. F., Expertenkommission der Paul-Ehrlich-Gesellschaft (2004). "Empfehlungen zur kalkulierten parenteralen Initialtherapie bakterieller Erkrankungen bei Erwachsenen." *Chemotherapie Journal* 13: 46-105.

von Bruchhausen, F., Ebel,S., Frahm, A. W., Hackenthal, E. (1999). "Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis: Stoffe A-D." Springer Verlag. Berlin, Heidelberg, New York, 5.Auflage: 795.

- Vuolteenaho, K., Moilanen, T., Moilanen, E. (2008). "Non-steroidal anti-inflammatory drugs, cyclooxygenase-2 and the bone healing process." *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 102(1): 10-4.
- Wahlstrom, O., Risto, O., Djerf, K., Hammerby, S. (1991). "Heterotopic bone formation prevented by diclofenac. Prospective study of 100 hip arthroplasties." *Acta Orthop Scand* 62(5): 419-21.
- Wang, J.L., Lin, K.L., Chen, J.S., Lu, Y.C., Jiann, B.P., Chang, H.T., Hsu, S.S., Chen, W.C., Huang, J.K., Ho, C.M., Jan, C.R. (2004). "Effect of celecoxib on Ca²⁺ movement and cell proliferation in human osteoblasts." *Biochem Pharmacol* 67(6): 1123-30.
- Wenzler, S., Daschner, F. (2001). "Was gibt es Neues zur 1-g-Therapie und zur perioperativen Antibiotika-Prophylaxe mit Ceftriaxon." *ChemotherapieJournal* 10(5): 169-173
- Wildfeuer, A., Mallwitz, J., Gotthardt, H., Hille, E., Gruber, H., Dahmen, G., Pfaff, G., Göbel, C. (1997). "Pharmacokinetics of ampicillin, sulbactam and cefotiam in patients undergoing orthopedic surgery." *Infection* 25(4): 258-62.
- Woo, J., Cannon, D. (1984). "Intermediates and Inorganic Ions." *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods* 17: 133.
- Yang, R. S., Liu, T. K., Lin-Shiau, S. Y. (1993). "Increased bone growth by local prostaglandin E2 in rats." *Calcif Tissue Int* 52(1) (1993): 57-61.

9 Anhang

Tab. 6: Standardreihe der p-Nitrophenolat-Konzentrationen

	P-Nitrophenol	Reagenz-Puffer (Reagenz 1)	Endkonzentration
Mix 1	100 μ l Standard-Solution (p-Nitrophenol-Standard-Solution; 10 μ M)	900 μ l	1 μ M
Mix 2	200 μ l	200 μ l	0,5 μ M
Mix 3	160 μ l	240 μ l	0,4 μ M
Mix 4	120 μ l	280 μ l	0,3 μ M
Mix 5	80 μ l	320 μ l	0,2 μ M
Mix 6	40 μ l	360 μ l	0,1 μ M
Mix 7	0 μ l	350 μ l	0,0 μ M

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 :	Patientendatenübersicht.....	18
Tabelle 2 :	Plattenbelegung Cefotiam und Ceftriaxon.....	26
Tabelle 3 :	Plattenbelegung Linezolid.....	27
Tabelle 4 :	Plattenbelegung Parecoxib.....	28
Tabelle 5 :	Plattenbelegung Ibandronat.....	29
Tabelle 6 :	Standardreihe der p-Nitrophenolat-Konzentrationen.....	115

11 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 :	Zerkleinerung der Spongiosa und Aussäen der entstandenen Knochenchips unter der Laminar Flow Werkbank.....	19
Abbildung 2 :	Lichtmikroskopische Aufnahmen: Auswachsen von Osteoblasten aus den Knochenchips.....	20
Abbildung 3 :	Lichtmikroskopische Aufnahme von primären humanen Osteoblasten.....	21
Abbildung 4 :	Zählgitter der Neubauer-Zählkammer (linkes Bild). In der rechten Abbildung werden lebende, zu zählende Zellen als schwarze Punkte dargestellt, tote als weiße Aussparung.....	31
Abbildung 5 :	Eichgerade zur Bestimmung des Gesamt-DNA-Gehaltes.....	33
Abbildung 6 :	Eichgerade zur Bestimmung des Gesamt-DNA-Gehaltes der mit Ibandronat behandelten Zellproben.....	33
Abbildung 7 :	Eichgerade zur Bestimmung des Gesamtproteins.....	36
Abbildung 8 :	Eichgerade zur Bestimmung der ALP-Aktivität	38
Abbildung 9 :	Eichgerade zur Bestimmung der Calciumkonzentration der Proben....	40
Abbildung 10 :	Eichgerade zur Bestimmung des Calciumgehaltes der mit Ibandronat behandelten Zellen.....	40
Abbildung 11 :	Lichtmikroskopische Aufnahme der Zellproben nach dem ALP-Nachweis (blau angefärbte Bereiche).....	46
Abbildung 12:	Lichtmikroskopische Aufnahmen von Osteoblasten nach Kollagen-I-Färbung (rote Bereiche).....	46
Abbildung 13 :	Lichtmikroskopische Aufnahmen zum Nachweis der rötlich angefärbten Osteocalcinablagerungen.....	47
Abbildung 14 :	Zellzahl nach Applikation von Cefotiam nach 24, 48, 72 h. Die Säulenzeigen die absolute Zellzahl zu den angegebenen Untersuchungszeiträumen und Cefotiam-Konzentrationen.....	48
Abbildung 15 :	DNA-Gehalt der Zellproben in Abhängigkeit von der Cefotiam-Konzentration.....	49

Abbildung 16 :	Cefotiamabhängige Veränderungen der Zellproliferation gemessen anhand der Extinktion.....	50
Abbildung 17 :	Proteingehalt der Zellproben in Abhängigkeit von der Cefotiam-Konzentration.....	51
Abbildung 18 :	Caspaseaktivität der untersuchten Osteoblasten in Abhängigkeit von der Cefotiam-Konzentration.....	52
Abbildung 19 :	Zellaktivität bezogen auf die Proteinkonzentration der jeweiligen Pharmakonkonzentration nach Cefotiam-Behandlung.....	53
Abbildung 20 :	Calciumgehalt der Osteoblastenkulturen in Abhängigkeit von der Cefotiam-Konzentration.....	54
Abbildung 21 :	Alizarinrotfärbung der mit Cefotiam behandelten Osteoblasten.....	55
Abbildung 22 :	Zellzahl in Abhängigkeit von der Ceftriaxon-Konzentration nach 24, 48 und 72 h.....	56
Abbildung 23 :	DNA-Gehalt der Zellproben in Abhängigkeit von der Ceftriaxon-Konzentration.....	57
Abbildung 24 :	Ceftriaxon-abhängige Veränderungen der Zellproliferation gemessen durch Extinktionswerte.....	58
Abbildung 25 :	Gesamtproteingehalt der Zellproben in Abhängigkeit von der Ceftriaxon-Konzentration.....	59
Abbildung 26 :	Caspaseaktivität gemessen anhand der Lumineszenz der Zellproben bei verschiedenen Pharmakakonzentrationsstufen.....	60
Abbildung 27 :	ALP-Aktivität bezogen auf das Gesamtprotein in den Zellproben in Abhängigkeit von der Ceftriaxon-Konzentration.....	61
Abbildung 28 :	Calciumgehalt der Osteoblastenkulturen in Abhängigkeit von der Ceftriaxon-Konzentration nach drei bzw. vier Wochen Inkubationszeit.....	62
Abbildung 29 :	Alizarinrotfärbung der mit Ceftriaxon behandelten Osteoblasten.....	63
Abbildung 30 :	Zellzahl in Abhängigkeit von der Linezolidkonzentration.....	64
Abbildung 31 :	DNA-Gehalt der Zellproben in Abhängigkeit von der Linezolid-Konzentration.....	65

Abbildung 32 :	Linezolidabhängige Veränderungen der Zellproliferation gemessen anhand der Extinktion.....	66
Abbildung 33 :	Gesamtproteingehalt der Osteoblasten in Abhängigkeit von der Linezolid-Konzentration.....	67
Abbildung 34 :	Caspaseaktivität der Zellproben in Abhängigkeit von der Linezolid-Konzentration	68
Abbildung 35 :	Einfluss von Linezolid auf die Zellaktivität pro Gesamtprotein der getesteten Osteoblasten	69
Abbildung 36 :	Calciumgehalt der mit unterschiedlichen Linezolid-Konzentrationen behandelten Zellproben.....	70
Abbildung 37 :	Zytochemischer Nachweis der Mineralisation durch Alizarinrotfärbung der Zellproben (Linezolid).....	71
Abbildung 38 :	Zellzahl in Abhängigkeit von der Parecoxib-Konzentration	72
Abbildung 39 :	DNA-Gehalt der Zellproben in Abhängigkeit von der Parecoxib-Konzentration.....	73
Abbildung 40 :	Parecoxibabhängige Veränderungen der Zellproliferation gemessen anhand der Extinktion.....	74
Abbildung 41 :	Gesamtproteingehalt der Osteoblasten in Abhängigkeit von der Parecoxib-Konzentration.....	75
Abbildung 42 :	Caspaseaktivität der untersuchten Osteoblasten in Abhängigkeit von der Parecoxib-Konzentration.....	76
Abbildung 43 :	Zellaktivität bezogen auf das Gesamtprotein nach Parecoxib-Behandlung.....	77
Abbildung 44 :	Calciumgehalt der Zellproben nach drei bzw. vier Wochen in Abhängigkeit von der Parecoxib-Konzentration.....	78
Abbildung 45 :	Mineralisation der Osteoblasten, nachgewiesen durch Alizarinrotfärbung der Mineralisationskerne bei verschiedenen Parecoxib-Verdünnungsstufen.....	79
Abbildung 46 :	Absolute Zellzahl in Abhängigkeit von verschiedenen Ibandronat-Konzentrationen.....	80
Abbildung 47 :	Gesamt-DNA-Gehalt der Zellproben in Abhängigkeit von der Ibandronat-Konzentration.....	81

Abbildung 48 :	Ibandronatabhängige Effekte auf die Zellproliferation, gemessen anhand der Extinktion.....	82
Abbildung 49 :	Gesamtproteingehalt der Osteoblastenproben in Abhängigkeit von der Ibandronat-Konzentration.....	83
Abbildung 50 :	Caspaseaktivität der Zellproben in Abhängigkeit von der Ibandronat-Konzentration.....	84
Abbildung 51 :	Zellaktivität der Osteoblasten bezogen auf das Gesamtprotein nach Ibandronatbehandlung.....	85
Abbildung 52 :	Calciumgehalt der Zellen nach drei und vier Wochen Inkubationszeit in Abhängigkeit von der Ibandronat-Konzentration.....	86
Abbildung 53 :	Mineralisation der Osteoblasten, nachgewiesen durch Alizarinrotfärbung der Mineralisationskerne bei verschiedenen Ibandronat-Verdünnungsstufen.....	87

12 Danksagung

Für die Mitwirkung an der Entstehung dieser Arbeit danke ich

Herrn **Professor Dr. Reiner Gradinger** und seinem Nachfolger, **Herrn Professor Dr. Rüdiger von Eisenharth-Rothe**, Direktoren der Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie der TU München, die es mir ermöglichten, die Arbeit in ihrer Klinik unter hervorragenden Arbeitsbedingungen in den orthopädischen Zellkulturlaboren zu erstellen.

Mein besonderer Dank gilt

Herrn Privatdozent Dr. Rainer Burgkart für die großartige Unterstützung, Motivation, ein immer offenes Ohr, nicht zuletzt für die sehr gute Betreuung und die wunderbare Atmosphäre bei der Arbeit,

Dr. Johannes Schauwecker für die äußerst kompetente Beratung in fachlichen Angelegenheiten, die sehr gute Zusammenarbeit und Betreuung bei der Planung und Niederschrift der Arbeit,

Frau Jutta Tübel für die sehr gute Einarbeitung in die Zellkulturtechniken, die ausgezeichnete Zusammenarbeit und Unterstützung bei der Durchführung der praktischen Untersuchungen sowie ihr aussergewöhnliches Engagement,

Dr. Gian Salzmann für die Beratung in fachlichen Angelegenheiten,

sowie **Herrn Tibor Schuster** für die Beratung in statistischen Fragestellungen.

Desweiteren möchte ich dem Operationsteam des Klinikums Rechts der Isar, München, sowie den beteiligten Patienten für die Überlassung der Knochenmaterialien danken.

Meinen Eltern, Hans und Isolde Kalinowski, danke ich für ihre großartige Unterstützung in jeglicher Hinsicht.

13 Lebenslauf

Ivonne Kalinowski

Geboren am 30.03.1982 in Freising

Schulabschluss

Juni 2001 Allgemeine Hochschulreife, Carl-Orff-Gymnasium, Unterschleißheim

Studium

10/2001-10/2002 Technische Universität München, Weihenstephan
Studium der Biologie

10/2002-4/2003 Technische Universität München
Studium Technologie- und Managementorientierte
Betriebswirtschaftslehre

4/2003-6/2009 Ludwigs-Maximilians-Universität München
Studium der Humanmedizin

Praktisches Jahr Chirurgie: Nepean Hospital, Sydney, Australien und Klinikum Dachau
Innere Medizin: Ilmtalklinik, Pfaffenhofen
Orthopädie: Universitätsklinikum Großhadern, München

06/2009 Ärztliche Prüfung

Promotion

Seit 2006 Promotion am Klinikum Rechts der Isar in der experimentellen
Forschung der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie der TU
München, PD Dr. Rainer Burgkart

Berufserfahrung

11/2009-04/2010 Assistenzärztin Innere Medizin / Kardiologie, Klinikum Dachau

06/2010-04/2012 Assistenzärztin in der Orthopädischen Klinik Tegernsee

04/2012-04/2014 Assistenzärztin Innere Medizin, Klinikum Martha Maria München

Seit 05/2014 Assistenzärztin Arbeitsmedizin, MediCare Flughafen München