

Aus dem Institut für Pathologie
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Auswirkungen von Proanthocyanidin-, Chondroitinsulfat- und
Hyaluronan-Oberflächenmodifikationen von Kollagenmembranen auf
Osteoblastenwachstum und Knochenbildung

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Zahnmedizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Isabel-Sofie Loleit
aus Bergisch Gladbach

Mainz, 2021

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion:

07. Dezember 2021

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Ziel der Dissertation	2
2 Literaturdiskussion	3
2.1 Knochen.....	3
2.2 Angiogenese und Knochenheilung	5
2.3 Tissue Engineering	6
2.4 Bone Tissue Engineering	7
2.5 Biomaterial	9
2.5.1 Kollagen.....	10
2.5.2 Glykosaminoglykane	11
2.5.3 Proanthocyanidine	12
2.6 In vitro Modelle.....	15
2.6.1 Zellmodell Osteoblasten.....	15
2.6.2 Zellmodell Endothelzellen	16
3 Material und Methoden	17
3.1 Material	17
3.1.1 Chemikalien	17
3.1.2 Verbrauchsmaterialien	18
3.1.3 Instrumentarium	19
3.1.4 Kits.....	19
3.1.5 Zelllinien.....	20
3.1.6 Zellkulturmedien.....	20
3.1.7 Antikörper.....	21

3.1.8	Biomaterialien	21
3.1.9	Primer	23
3.2	Methoden	24
3.2.1	Isolation und Kultivierung von humanen primären Osteoblasten	24
3.2.2	Isolation und Kultivierung von humanen primären Endothelzellen	24
3.2.3	Zellkultivierung	25
3.2.4	Sterilitätsprüfung	26
3.2.5	Untersuchung der Zytotoxizität (Resazurin-Reduktionstest)	26
3.2.6	E-Selektin Endotoxintest	29
3.2.7	Vitalfärbung mit Calcein-AM.....	29
3.2.8	Analyse der Genexpression von Zellen auf den Biomaterialien	30
4	Ergebnisse	32
4.1	Sterilitätsprüfung	32
4.2	Untersuchung der Zytotoxizität (Resazurin-Reduktionstest)	33
4.2.1	Einfluss der Materialextrakte auf die Zellvitalität	33
4.2.2	Einfluss aufsteigender PAC-Konzentrationen auf die Zellvitalität.....	36
4.3	E-Selektin Endotoxintest.....	39
4.4	Visualisierung der Zellen auf den Biomaterialien	40
4.5	Einfluss der Materialien auf die Genexpression der Zellen	45
5	Diskussion	49
5.1	Einfluss der Zellwahl	51
5.2	Sterilitätsprüfung	52
5.3	Untersuchung der Zytotoxizität	52
5.4	Endotoxintest	56
5.5	Zellen auf den Biomaterialien.....	57
5.6	Genexpression der Zellen	61
5.7	Kritik und Fazit	66

6	Zusammenfassung	68
7	Literaturverzeichnis	69
	Danksagung	88
	Lebenslauf.....	89

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
AK	Antikörper
Calcein-AM	Calcein-Acetoxymethylester
cDNA	komplementäre DNA
cm	Centimeter
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CS	Chondroitinsulfat
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
E. coli	Escherichia coli
ECGS	<i>endothelial cell growth supplement</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
GAG	Glykosaminoglykan
GTP	Gelatine Tricalciumphosphat
h	<i>hour</i> (Stunde)
HA	Hyaluronan
HBSS	<i>Hanks' Balanced Salt Solution</i>
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cells</i>
kb	Kilobasenpaare
KOL	Kollagen
L	Liter
LAL-Test	Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test
LPS	Lipopolysaccharid
min	Minute
mL	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
nm	Nanometer

PAC	Proanthocyanidine
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
pD	porzine Dermis
PECAM-1	Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül (<i>platelet endothelial cell adhesion molecule</i>)
PFA	Paraformaldehyde
pOB	primäre Osteoblasten
pP	porzines Perikard
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
s	Sekunde
TAE Puffer	Tris-Acetate-EDTA Puffer
Taq	<i>thermus aquaticus</i>
UV	Ultraviolett
VEGF	<i>vascular endothelial cell growth factor</i>
vWF	Von-Willebrand-Faktor
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Zelllinien.....	20
Tabelle 2: Verwendete Zellkulturmedien	20
Tabelle 3: Verwendete Antikörper	21
Tabelle 4: Bestandteile der verwendeten Biomaterialien	21
Tabelle 5: Zusammensetzung der verwendeten Biomaterialien	21
Tabelle 6: Liste der verwendeten Vergleichsmaterialien	22
Tabelle 7: Verwendete Primer	23
Tabelle 8: p-Werte	28
Tabelle 9: Ergebnisse der Sterilitätsprüfung der Materialien	32

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zellvitalität zu verschiedenen Zeitpunkten nach Zugabe der Extrakte .	34
Abbildung 2: Zellvitalität nach Zugabe von steigenden PAC-Konzentrationen	37
Abbildung 3: Fluoreszenzfärbung zum Nachweis von E-Selektin.....	39
Abbildung 4: Vitalfärbung Calcein-AM von HUVEC mit den Biomaterialien	41
Abbildung 5: Vitalfärbung Calcein-AM von MG-63 mit den Biomaterialien	42
Abbildung 6: Vitalfärbung Calcein-AM von SaOs-2 mit den Biomaterialien	43
Abbildung 7: Vitalfärbung Calcein-AM von pOB mit den Biomaterialien	44
Abbildung 8: PCR Ergebnisse von HUVEC mit den Biomaterialien.....	45
Abbildung 9: PCR Ergebnisse von MG-63 mit den Biomaterialien	46
Abbildung 10: PCR Ergebnisse von SaOs-2 mit den Biomaterialien	47
Abbildung 11: PCR Ergebnisse von pOB mit den Biomaterialien	48

1 Einleitung

Der natürliche Knochen ist ein mineralisiertes, gut vaskularisiertes Gerüst, das neben seiner Stütz- und Schutzfunktion Raum für weitere wichtige biologische Prozesse im Körper bedeutsam ist (Clarke 2008). Trotz seiner Fähigkeit zur Regeneration ohne Narbenbildung stellt die Versorgung von Knochendefekten die regenerative Medizin immer wieder vor Herausforderungen (Calori und Giannoudis 2011). Unter ungünstigen Bedingungen besteht die Möglichkeit, dass eine konservative Therapie nicht zu einer vollständigen Heilung führt (Rico-Llanos et al. 2021). Ab einer bestimmten Größe sollten Knochendefekte zudem aufgefüllt werden, um eine Verzögerung des Heilungsprozesses durch das Einwachsen von fibrösem Gewebe zu verhindern (Hettwer et al. 2019). Das autogene Knochenransplantat gilt wegen seines osteogenen, osteoinduktiven sowie osteokonduktiven Potentials nach wie vor als Goldstandard für die Versorgung von Knochendefekten (Rupp et al. 2021). Mit mehr als zwei Millionen Eingriffen jährlich, stellen Knochenransplantate, nach Bluttransfusionen, die zweithäufigste Gewebetransplantation weltweit dar (Campana et al. 2014). Aufgrund der limitierten Verfügbarkeit und der mit der Gewinnung von Autotransplantaten verbundenen Risiken, ist die Nachfrage nach therapeutischen Alternativen zum autogenen Transplantat hoch (Campana et al. 2014). Derzeit stehen neben Spendertransplantaten, Biomaterialien aus Metall, Keramik sowie aus natürlichen und synthetischen Polymeren für die Anwendung in der Knochenrekonstruktion zur Verfügung (Liu und Ma 2004). Auf der Suche nach einem resorbierbaren Material, das den Zellen als Gerüst dient, findet Kollagen, als organischer Hauptbestandteil des Knochengewebes, eine breite Anwendung im Bone Tissue Engineering (Lin et al. 2019).

In den Kollagen-basierten Testmaterialien, die in dieser Arbeit evaluiert werden sollen, wurden für die Erhöhung der Standfestigkeit, bei gleichzeitig guter Biokompatibilität, die Glykosaminoglykane Hyaluronan und Chondroitinsulfat sowie der Quervernetzer Proanthocyanidin verwendet. Da die meisten chemischen Quervernetzer toxische Effekte aufweisen, soll Proanthocyanidin als biologischer Vernetzer erprobt werden (Chen et al. 2008).

1.1 Ziel der Dissertation

Im Zuge dieser Arbeit werden Kollagen-basierte Gerüste, die entweder durch die Glykosaminoglykane Hyaluronan und Chondroitinsulfat modifiziert oder durch Proanthocyanidine vernetzt wurden, hinsichtlich ihrer Biokompatibilität sowie ihrer Fähigkeit zur Unterstützung des Zellwachstums und der physiologischen Zellfunktionalität evaluiert.

Hierfür werden die Materialien *in vitro* an humanen primären Endothelzellen, primären Osteoblasten sowie an verschiedenen Zelllinien getestet. Ziel ist die Analyse der Toxizität und Zellkompatibilität der Materialien sowie die Auswirkung auf Adhäsion, Proliferation und Migration der auf ihnen kultivierten Zellen. Mit den Ergebnissen der Untersuchungen sollen grundlegende Erkenntnisse über die Eignung der getesteten Biomaterialien für die Anwendung in der Knochenregeneration gewonnen werden.

2 Literaturdiskussion

2.1 Knochen

Der menschliche Knochen besteht aus verschiedenen Zelltypen, eingebettet in eine extrazelluläre Matrix (Clarke 2008). Er gewährleistet Schutz für die inneren Organe, dient als Stütze und Formgeber des Körpers und ermöglicht Bewegung, indem er Ansatzpunkte für die Skelettmuskulatur bietet (Clarke 2008). Zudem ist er der Ort der Hämatopoese innerhalb der Knochenmarkräume und dient der Aufrechterhaltung der Kalziumhomöostase (Watson und Adams 2018; Clarke 2008).

Der Knochen lässt sich in Geflecht- und Lamellenknochen unterteilen (Ulfig 2005). Das adoleszente Skelett besteht jedoch hauptsächlich aus Lamellenknochen (Ulfig 2005). Dieser kann makroskopisch in die Spongiosa und die Kortikalis unterteilt werden (Ulfig 2005). Die Kortikalis ist aus Osteonen aufgebaut und bildet die dichte Rindenschicht, die den Knochenmarkraum mit der netzförmigen Spongiosa umgibt (Ulfig 2005).

Der Knochen wird maßgeblich durch drei Zelltypen charakterisiert: Osteoblasten und Osteozyten, die aus mesenchymalen Vorläuferzellen entstehen, sowie Osteoklasten, die sich aus Makrophagen bzw. Monozyten entwickeln (Caplan 1991; Quinn et al. 1998). Sie sind eingebettet in die von den Osteoblasten sezernierte extrazelluläre Matrix, die hauptsächlich aus Kollagen Typ 1 sowie Proteoglykanen und nicht-kollagenen Proteinen wie Osteocalcin, Osteonectin und Osteopontin besteht (Mackie 2003). In diesen organischen Teil der extrazellulären Matrix lagert sich anorganisches Hydroxylapatit ein und gibt dem Knochen seine Druckfestigkeit (Mackie 2003).

Das Knochengewebe befindet sich ein Leben lang im kontinuierlichen Umbau. Dieser beinhaltet ein Wechselspiel von Auf- und Abbauprozessen des mineralisierten Knochens (Hadjidakis und Androulakis 2006). Zu Beginn des Remodellierungszyklus resorbieren Osteoklasten, stimuliert durch Osteoblasten, die alte Knochenmatrix (Hadjidakis und Androulakis 2006). Daraufhin folgt die Neubesiedlung der entstandenen Lakunen mit Osteoblasten und diese sezernieren die weiche Knochenmatrix, die anschließend mineralisiert und verfestigt wird (Hadjidakis und Androulakis 2006). Dieser Umbau dient der Aufrechterhaltung der Kalziumhomöostase sowie der Korrektur von kleinen Schäden, wodurch eine Ansammlung von

altem, instabilem Knochen verhindert und die Anpassung an unterschiedliche mechanische Belastungen ermöglicht wird (Hadjidakis und Androulakis 2006).

Osteoblasten

Wie auch Adipozyten und Chondrozyten entstehen Osteoblasten aus mesenchymalen Vorläuferzellen (Caplan 1991). Verschiedene Zytokine, Wachstumsfaktoren, Zell-Matrix-Interaktionen sowie direkte Zell-Zell-Interaktionen führen zur Expression von spezifischen Transkriptionsfaktoren, die wiederum die Differenzierung steuern (Capulli et al. 2014). Die osteogenen Differenzierungsstadien verlaufen von Osteoprogenitorzellen, über Präosteoblasten bis hin zum reifen Osteoblasten (Capulli et al. 2014). Die für diese Stadien charakteristischen Genexpressionsmuster können *in vitro* analysiert werden (Kassem et al. 2008). Reife Osteoblasten produzieren die organischen Bestandteile der extrazellulären Matrix und besitzen aufgrund der hohen Syntheseleistung einen großen Golgi-Komplex sowie ein stark ausgebildetes raues endoplasmatisches Retikulum (Mackie 2003). Die von Osteoblasten sezernierte weiche, kollagenhaltige Grundsubstanz, auch Osteoid genannt, wird später zu Knochen mineralisiert (Hadjidakis und Androulakis 2006). Die Lebenserwartung eines Osteoblasten liegt beim Menschen bei bis zu drei Monaten (Parfitt 1994). Einige Osteoblasten werden in der mineralisierten Matrix eingemauert und differenzieren sich zu Osteozyten (Sommerfeldt und Rubin 2001). Diese weisen eine veränderte Morphologie mit weniger Zellorganellen und einer reduzierten Produktion von Matrixproteinen auf (Sommerfeldt und Rubin 2001). Zusammen mit anderen Zellen bilden sie ein ausgedehntes Netzwerk und können, je nach Knochenumsatz, Jahrzehnte verbleiben (Jilka und O'Brien 2016).

2.2 Angiogenese und Knochenheilung

Die Angiogenese ist ein komplexer Prozess der aus Aktivierung, Migration und Proliferation von Endothelzellen besteht (Risau 1997). In diesem Prozess spielt unter anderem der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) eine erhebliche Rolle (Schipani et al. 2009). Über VEGF-Rezeptoren auf Endothelzellen und Osteoblasten wirkt VEGF stimulierend auf die Angiogenese und die Osteogenese (Schipani et al. 2009).

Es können drei verschiedene Mechanismen der Blutgefäßbildung unterschieden werden. Zum einen die „sprossende“ und „nicht-sprossende“ Angiogenese, zum anderen die Vaskulogenese (Risau 1997). Dabei kennzeichnet der Begriff „Angiogenese“ die Entstehung eines neuen Blutgefäßes aus einem bereits bestehenden (Risau 1997). Bei der sprossenden Angiogenese wird dies durch die auswärtige Migration und Proliferation von Endothelzellen aus dem bereits vorhandenen Gefäß erreicht (Risau 1997). Die nicht-sprossende Angiogenese, auch Intussuszeption genannt, führt durch die Teilung eines Gefäßes zu einer Gabelung und somit zur Entstehung von unabhängigen, getrennten Lumina (Mentzer und Konerding 2014). Die Vaskulogenese hingegen beschreibt die *de novo* Bildung eines primären kapillaren Plexus aus mesodermalen Vorläuferzellen, die sich zu Angioblasten differenzieren, und findet hauptsächlich während der Embryogenese statt (Risau und Flamme 1995). An den genannten Mechanismen sind unter anderem spezifische Zelladhäsionsmoleküle wie z. B. PECAM-1 (CD-31) beteiligt (Risau und Flamme 1995).

Der Knochen ist ein sehr stoffwechselaktives Gewebe, das eine reiche Gefäßversorgung besitzt und ca. 10-20 % des Herzzeitvolumens bezieht (Safadi et al. 2009). Neu entstandene Blutgefäße ermöglichen eine Versorgung mit Nährstoffen sowie den An- und Abtransport von Abfallstoffen und Zellen im verletzten Knochen und sind somit im Prozess der Knochenheilung unerlässlich (Rao und Stegemann 2013).

Nach einem Knochen trauma bildet sich durch die Verletzung der umliegenden Blutgefäße ein Hämatom (Kolar et al. 2011). Zellen des Blutes sowie Zellen des Knochenmarks strömen in den Frakturspalt und füllen diesen aus (Kolar et al. 2011). Durch die entstehende Störung der Sauerstoffversorgung entsteht eine lokale Hypoxie und Entzündungsreaktion (Kolar et al. 2011). Dies stimuliert die Angiogenese sowie

die Differenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen zu Osteoblasten oder Chondroblasten, je nach Ausprägung des Frakturspalts (Kolar et al. 2011; Einhorn und Gerstenfeld 2015). Im Falle der vorwiegend auftretenden indirekten Frakturheilung, bilden die Chondroblasten zunächst eine Brücke aus Knorpel (Einhorn und Gerstenfeld 2015). Eine hohe VEGF-Konzentration im Frakturspalt führt zur Ausdehnung der vorhandenen Blutgefäße, was die Einwanderung von Osteoblasten, die den entstandenen Faserknorpel verknöchern, unterstützt (Gerber et al. 1999). Der so entstandene Kallus wird anschließend in normales Knochengewebe umgebaut (Einhorn und Gerstenfeld 2015).

2.3 Tissue Engineering

Eine allgemeine Definition von Tissue Engineering formulierten Langer und Vacanti bereits 1993. Laut ihnen ist Tissue Engineering ein interdisziplinäres Feld, das die Grundsätze von Ingenieurwesen und Biowissenschaften für die Entwicklung von biologischem Ersatz vereint (Langer und Vacanti 1993). Das therapeutische Ziel von Tissue Engineering ist die Erhaltung, Wiederherstellung oder Verbesserung der Funktion von Geweben oder Organen (Langer und Vacanti 1993).

Bei der Therapie von ausgeprägten Gewebedefekten ist eine konservative Behandlung oft nicht ausreichend und macht eine chirurgische Intervention erforderlich. Üblicherweise beinhaltet diese eine Form von künstlichem Ersatz oder die Verwendung von autogenen (körpereigenen) oder Spender-Transplantaten (Unger et al. 2009). Diese Therapieansätze bergen jedoch einige Risiken und Probleme. Bei künstlichem Ersatz besteht die Gefahr fehlender Biokompatibilität und nicht ausreichender Beständigkeit des Materials (Hollister 2005). Aufgrund der beschränkten Verfügbarkeit von autogenen sowie Spender-Transplantaten, kann der therapeutische Bedarf oft nicht gedeckt werden und zudem verfügen die Immunsuppressiva, die zur Verhinderung einer Abstoßung des Spenderorgans eingesetzt werden, über erhebliche Nebenwirkungen (Orlando et al. 2011).

Mit Hilfe des Tissue Engineerings sollen Probleme der herkömmlichen therapeutischen Ansätze vermieden und die Methoden zur Geweberegeneration und Funktionswiederherstellung ergänzt oder potenziell sogar ersetzt werden (Langer und

Vacanti 1993). Ein Ansatz des Tissue Engineering besteht darin, eine Matrix zu implantieren, die das Wachstum der Zellen in das Material hinein durch die Freisetzung von Wachstumsfaktoren anregt und diesen zudem als Leitstruktur dient (Howard et al. 2008). Eine weitere Methode ist, Zellen auf einem biokompatiblen Gerüst zu kultivieren und dieses anschließend zu implantieren, um auf diese Weise biologisches Gewebe aus den körpereigenen Zellen des Patienten entstehen zu lassen (Howard et al. 2008). Dafür werden zuvor isolierte Zellen des Patienten auf einem Gerüst ausgesät und dieses anschließend implantiert (Howard et al. 2008). Dieses Gerüst kann je nach Zielgewebe unterschiedliche Eigenschaften besitzen.

Folgende Charakteristika sind unter anderem für den Erfolg des Gerüsts obligat:

- Die Architektur sollte so gestaltet sein, dass das Material porös genug ist, um Gefäß- und Nährstoffversorgung zu ermöglichen (O'Brien 2011).
- Es sollte die Anhaftung und Differenzierung der Zellen *in vitro* und nach Transplantation *in vivo* fördern sowie die Zellmigration unterstützen (O'Brien 2011).
- Des Weiteren sollte das Gerüst den Defekt mechanisch in seiner Form stabilisieren (O'Brien 2011).

Mit dem Ansatz, das Gewebe mit Hilfe von autogenen Zellen zu regenerieren, wird die Minimierung des Risikos einer Immunabstoßung angestrebt (Langer und Vacanti 1993).

2.4 Bone Tissue Engineering

Gesunder Knochen wird ständig durch ein Zusammenspiel von Osteoklasten und Osteoblasten umgebaut, um beschädigten Knochen zu reparieren und die Funktion des Knochens zu erhalten (Hadjidakis und Androulakis 2006). Obwohl das Knochengewebe eine hohe Fähigkeit der Eigenregeneration besitzt, besteht bei ungünstigen Bedingungen das Risiko einer unvollständigen Heilung, sodass eine chirurgische Intervention erforderlich wird (Calori und Giannoudis 2011; Rico-Llanos et al. 2021).

Gegenwärtige Rekonstruktionstechniken zielen darauf ab, die beispielsweise durch Trauma, Tumorresektionen oder Entzündungen entstandenen Knochendefekte zu kompensieren. Das ideale Knochenersatzmaterial ist osteogen, osteoinduktiv sowie osteokonduktiv (Rico-Llanos et al. 2021).

Osteogenität beschreibt die Anwesenheit von vitalen Zellen, die sich zu knocheninduzierenden Zellen differenzieren können, um neues Knochengewebe zu bilden (Fillingham und Jacobs 2016).

Osteoinduktion kennzeichnet das Vermögen, undifferenzierte Stammzellen so zu stimulieren, dass diese sich zu Osteoprogenitorzellen differenzieren, die ihrerseits in der Lage sind neuen Knochen zu bilden (Fillingham und Jacobs 2016).

Osteokonduktion beschreibt die Eigenschaft eines dreidimensionalen Leitgerüsts, optimale Bedingungen für das Einwachsen von Knochengewebe zu bieten (Fillingham und Jacobs 2016).

Das Knochenersatzmaterial sollte idealerweise die Migration von Osteoblasten in das Material hinein anregen, damit dieses mit der Zeit umgebaut und durch vitales Knochengewebe ersetzt werden kann (Chen et al. 2013).

In der regenerativen Medizin gibt es unterschiedliche therapeutische Optionen, um fehlende Knochensubstanz zu ersetzen. Das autogene Knochentransplantat, bei dem Spender und Empfänger eine Person sind, gilt nach wie vor für viele Indikationen als Goldstandard in der rekonstruktiven Chirurgie, da dieses osteogen, osteoinduktiv sowie osteokonduktiv ist und somit über alle Voraussetzungen verfügt, die für den Erfolg eines Transplantats erforderlich sind (Fillingham und Jacobs 2016). Ein Nachteil autogener Knochentransplantate ist die mit ihnen einhergehende Morbidität. Die für die Entnahme des autogenen Transplants erforderliche zusätzliche chirurgische Intervention, birgt erhöhte Risiken für den Patienten, die sich beispielsweise aus einer längeren Operationszeit ergeben können (Campana et al. 2014). Des Weiteren sind hier Blutverluste, Infektionen, Frakturen, neurologische Schädigungen sowie persistierende Beschwerden und Schmerzen an der Entnahmestelle als Nachteile des autogenen Knochenersatzes zu nennen (Campana et al. 2014).

Bei allogenen Knochentransplantaten handelt es sich um humane Fremdspenden (Fillingham und Jacobs 2016). Auch bei dieser Therapieform ergeben sich spezifische

Probleme und Risiken, wie eine Übertragung von Krankheiten durch den Spender, Immunreaktionen auf der Empfängerseite, die kostenaufwendige Aufbereitung des Transplantats sowie eine mangelhafte Stabilität aufgrund des aufwendigen Verarbeitungsprozesses (Campana et al. 2014).

Die Nachfrage von Knochentransplantaten ist enorm hoch. Nach Blut stellt Knochen das am zweithäufigsten transplantierte Gewebe dar (Campana et al. 2014). Aufgrund der zuvor beschriebenen Nachteile und Beschränkungen von Knochentransplantaten wurden alternative Materialien wie Metalle und Keramiken als Knochenersatz eingeführt, doch auch diese konnten im Vergleich zu autogenen Transplantaten nicht restlos überzeugen (Salgado et al. 2004).

Ein vielversprechender Ansatz für die Behandlung von Knochendefekten stellt deshalb das Tissue Engineering dar. Vorteil und Zielsetzung dieser Methode ist es, den Knochen mit Hilfe von autogenen Zellen des Patienten zu erneuern und damit dessen vollständige Wiedereingliederung in das Skelettsystem zu erlangen (McGovern et al. 2018). Um die Regeneration zu beschleunigen, besteht zudem die Möglichkeit das Biomaterial vor der Implantation mit Hormonen, Peptiden und Wachstumsfaktoren anzureichern (Vallet-Regí et al. 2011).

2.5 Biomaterial

Neben Transplantaten kommen derzeit hauptsächlich Metalle, Keramiken sowie natürliche und synthetische Polymere als Materialien in der Knochenregeneration zum Einsatz (Liu und Ma 2004).

Metalle und Keramiken haben den Nachteil, dass sie schwer zu verarbeiten und nicht resorbierbar sind (Maquet und Jerome 1997). Daher werden vermehrt natürliche Polymere eingesetzt. Diese sind dem Organismus vertraut und daher kann davon ausgegangen werden, dass sie, neben ihrer biologischen Abbaubarkeit, auch über die Fähigkeit verfügen, die Zellanhaftung und Zellfunktionen zu fördern (Liu und Ma 2004). Damit fügen sie sich in das Konzept des Tissue Engineerings ein, das als Grundvoraussetzung vorsieht, dass Materialien im Laufe der Zeit resorbiert und durch körpereigenes Gewebe ersetzt werden (O'Brien 2011).

Die in der Knochenregeneration zum Einsatz kommenden Materialien müssen darüber hinaus strukturelle Stabilität bieten sowie osteoinduktiv, osteokonduktiv und biokompatibel sein (Unger et al. 2009). Letzteres bedeutet laut Williams (2008), dass das Biomaterial einen bestimmten therapeutischen Nutzen erfüllt, ohne unerwünschte lokale oder systemische Effekte hervorzurufen. Folglich sollte die Analyse eines Biomaterials nachweisen, dass dieses keine pathogenen Verunreinigungen enthält und durch den Einsatz verschiedener Stoffe und Lösungsmittel während des Herstellungsprozesses keine zytotoxischen Substanzen im Biomaterial verblieben sind (Unger 2014). Des Weiteren sollte das Biomaterial die Proliferation und Differenzierung der Zellen unterstützen und weder immunogen noch kanzerogen oder mutagen wirken (Unger 2014; Williams 2008).

2.5.1 Kollagen

Kollagen ist einer der Hauptbestandteile von Haut und Knochen und macht ca. 30 % der Gesamtmasse aller Proteine des Körpers aus (Ricard-Blum 2011). Insgesamt besteht die Familie der Kollagene aus 28 Kollagen Typen (Ricard-Blum 2011). Kollagen Typ 1 ist durch die Ausbildung von Fibrillen sehr zugfest und ist somit im Wesentlichen für die Struktur und mechanische Festigkeit von Knochen, Sehnen und Haut verantwortlich (Gelse et al. 2003). Im Knochen wird Kollagen Typ 1 hauptsächlich von Osteoblasten sezerniert (Clarke 2008). Da es in großen Mengen gewonnen werden kann und durch eine sehr gute Biokompatibilität, biologische Abbaubarkeit sowie eine geringe Immunogenität charakterisiert ist, findet Kollagen bereits seit vielen Jahren breite Anwendung im Tissue Engineering (Lee et al. 2001). Für den Einsatz als Biomaterial wird Kollagen zumeist direkt aus tierischem Gewebe extrahiert und anschließend in unterschiedlichen Prozessen zu verschiedenen Gerüstformen verarbeitet (Rico-Llanos et al. 2021). Die positive Auswirkung von Kollagen-basierten Biomaterialien auf die Osteoblasten-Proliferation sowie -Differenzierung und damit die unterstützende Wirkung auf die Knochenregeneration, konnte bereits in mehreren *in vitro* sowie *in vivo* Studien festgestellt werden (Yang et al. 2016; Salamanca et al. 2020; Marinucci et al. 2001; Liu et al. 1999).

Im Tissue Engineering wird mit Kollagen der Ansatz verfolgt, eine künstliche extrazelluläre Matrix zu schaffen, in die sich Osteoblasten, Osteozyten und

Osteoklasten einlagern können. Dabei dient Kollagen den Zellen nicht nur als Stütze, sondern fördert auch die osteoblastische Zelldifferenzierung durch rezeptorvermittelte Interaktionen (Mizuno et al. 2000). Nachteilig ist jedoch, dass reine Kollagengerüste eine eher geringe Stabilität besitzen und schnell vom Körper resorbiert werden können, sodass Quervernetzer eingebracht werden, um die Stabilität und die Resorptionszeit zu erhöhen (Davidenko et al. 2015).

2.5.2 Glykosaminoglykane

Glykosaminoglykane bilden zusammen mit Kollagen die Grundsubstanz der extrazellulären Matrix (Salbach et al. 2012). Sie bestehen aus Polysaccharidketten, die zum Großteil mit Proteinskeletten zu Proteoglykanen verknüpft werden (Salbach et al. 2012). Proteoglykane besitzen die Fähigkeit gallertartige Strukturen zu bilden, und somit das Gewebe widerstandsfähiger gegenüber Druckkräften zu machen (Schuurmans et al. 2021). An den im Körper vorkommenden Glykosaminoglykanen haben Hyaluronan und Chondroitinsulfat, bezogen auf die Masse, den größten Anteil (Schuurmans et al. 2021). Da ihnen osteogene Eigenschaften zugeschrieben werden, sind sie besonders interessant für die Verwendung in Biomaterialien für die Knochenregeneration (Salbach-Hirsch et al. 2014).

Hyaluronan, auch Hyaluronsäure genannt, ist im Gegensatz zu den anderen Glykosaminoglykanen ein freies Polysaccharid, das weder an ein Proteinskelett gebunden noch sulfatiert ist (Alban 2007). Es besitzt eine geordnete Struktur aus sich wiederholenden β -D-Glucuronsäure- und N-Acetyl- β -D-Glucosamineinheiten (Alban 2007). Hyaluronan spielt nicht nur eine erhebliche Rolle in allen Phasen der Wundheilung, sondern kann zudem die Osteogenese und Angiogenese unterstützen (Frenkel 2014; Zhai et al. 2020). Studien zeigten, dass Hyaluronan-basierte Biomaterialien die Kollagen Typ 1 Synthese verstärken und sich positiv auf die Knochenregeneration auswirken (Liu et al. 1999; Marinucci et al. 2001). Humane Osteoblasten zeigen *in vitro* eine sehr gute Proliferationsrate sowie eine hohe Zellvitalität auf Hyaluronan-basierten Biomaterialien (Wiedmann-Al-Ahmad et al. 2005). Des Weiteren besteht die Möglichkeit Hyaluronan chemisch zu sulfatieren (Hintze et al. 2009). Dieses chemisch sulfatierte Hyaluronan wirkt sich *in vitro* ebenfalls positiv auf die Osteoblasten-Differenzierung sowie Matrixmineralisation aus (Salbach-

Hirsch et al. 2014). Darüber hinaus besitzt Hyaluronan die Fähigkeit, große Volumina an Flüssigkeit zu binden, was die Zelladhäsion und -proliferation sowie den Nährstoffaustausch positiv beeinflussen kann (Mathews et al. 2014).

Chondroitinsulfat ist in der extrazellulären Matrix von Knorpel und Knochen zu finden (Förster et al. 2012). Das sulfatierte Glykosaminoglykan besteht aus alternierenden Disaccharideinheiten, aufgebaut aus D-Glucuronsäure und N-Acetylgalactosamin (Förster et al. 2012). Chondroitinsulfat ist in der Lage ein für die Knochenbildung günstiges Umfeld zu schaffen, da es geladene Ionen wie Kalzium und Phosphat mit Hilfe seiner Sulfatgruppe binden kann (Kim et al. 2017). Zudem kann Chondroitinsulfat die Bindung von Osteoblasten, Osteoklasten und Wachstumsfaktoren an die extrazelluläre Matrix vermitteln und so unterstützend auf die Knochenbildung sowie den Knochenumbau wirken (Förster et al. 2012). *In vitro* Studien zeigten, dass Chondroitinsulfat in Kombination mit Kollagen Typ 1 die Proliferation, Adhäsion und osteogene Zelldifferenzierung von Osteoblasten, im Vergleich zu reinem Kollagen Typ 1, verbessern kann (Vandrovcová et al. 2011; Manfrini et al. 2015). Diese Ergebnisse wurden ebenfalls in *in vivo* Studien beobachtet, in denen Chondroitinsulfat die Zellbindung sowie Zelldifferenzierung von Osteoblasten beschleunigen konnte (Kim et al. 2017).

Hyaluronan und Chondroitinsulfat scheinen vielversprechende Ergänzungen für Kollagen-basierte Biomaterialien zu sein, da sie weitere Bestandteile einer künstlichen extrazellulären Matrix liefern und somit zur Verbesserung der Knochenheilung beitragen können.

2.5.3 Proanthocyanidine

Polyphenole sind bioaktive Verbindungen in Pflanzen, die diese vor Fraßfeinden, Erregern und Strahlung schützen (Fernando und Spratte 2005). Die in Traubenkernen enthaltenen Polyphenole können im Allgemeinen in Phenolsäuren und Flavonoide unterteilt werden (Shi et al. 2003). Flavonoide bilden die größte Untergruppe der in der Nahrung vorkommenden Polyphenole (Fernando und Spratte 2005). Sie beinhalten farblose Catechine, gelbe Flavone und Flavonole sowie rote und blaue Anthocyanidine (Fernando und Spratte 2005).

Die bedeutsamste Wirkung wird allerdings der Gruppe der oligomeren Proanthocyanidine (PAC) zugesprochen (Fernando und Spratte 2005). Diese entstehen durch die chemische Kondensation von Flavan-3-ol-Grundeinheiten (Dixon et al. 2005). PAC aus Traubenkernextrakt, eine der bekanntesten Quellen für diese bioaktiven Verbindungen, konnten in verschiedenen Studien eine Vielzahl an gesundheitsförderlichen Wirkungen zugeschrieben werden (Rauf et al. 2019).

Insbesondere die stark antioxidative Wirkung, die laut wissenschaftlicher Studien sogar stärker als die von Vitamin C, Vitamin E sowie β -Carotin ist, charakterisiert die pharmakologische Wirksamkeit von PAC (Bagchi et al. 2000). Des Weiteren unterstützten PAC die Rückführung des oxidierten Vitamin C in seine aktive Form und damit seine antioxidative Wirkung (Fernando und Spratte 2005).

Antioxidantien sind Substanzen die reaktive Sauerstoffspezies (ROS) eliminieren und somit den Organismus vor oxidativem Stress und den mit ihm einhergehenden Schädigungen schützen (Rani et al. 2016). ROS entstehen durch eine Vielzahl von biochemischen Prozessen in den Zellen und werden, bei vermehrtem Anfall, mit der Entwicklung von degenerativen Erkrankungen in Verbindung gebracht (Rani et al. 2016). Insbesondere bei der Wund- und Frakturheilung entsteht durch die lokale Ischämie oxidativer Stress, der die Heilung erschwert (Paskalev et al. 2011). In Studien konnte nachgewiesen werden, dass PAC die Genexpression des angiogenetischen Wachstumsfaktors VEGF anregen und so die Wundheilung potenziell unterstützen können (Khanna 2001). Außerdem wurde bei topischer Applikation eine verbesserte Architektur des neugebildeten Gewebes mit höherer Zelldichte sowie verbesserter Bindegewebsapposition festgestellt (Khanna et al. 2002).

Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass Biomaterialien mit PAC-Zusatz die Proliferation und Migration von mesenchymalen Stammzellen aus Knochenmark, Fibroblasten sowie primären Endothelzellen fördern und so die Wundheilung unterstützen können (Chen et al. 2013; Ma et al. 2019). Unter der Supplementierung von Traubenkernextrakt konnten antiosteoporotische Effekte, durch die Stimulation der Knochenbildung und Regulation der Knochenresorption, sowie eine vermehrte Kallusbildung mit erhöhter Knochenfestigkeit beobachtet werden (Gurger et al. 2019; Oršolić et al. 2018). Zusätzlich wird den PAC eine entzündungshemmende, vaskuloprotektive, antibakterielle, antikanzerogene und neuroprotektive Wirkung

zugesprochen (Lee et al. 2012; Caton et al. 2010; Mayer et al. 2008; Ye et al. 1999; Strathearn et al. 2014)

Darüber hinaus können PAC zur Vernetzung von Biomaterialien eingesetzt werden (Chen et al. 2008; Han et al. 2003; Choi et al. 2016). Vernetzer werden verwendet, um die Standfestigkeit zu erhöhen und die Resorptionszeit eines Biomaterials zu verlängern (Chen et al. 2008). Allerdings bergen synthetische Vernetzer oft das Risiko, zytotoxisch zu sein und somit die Biokompatibilität eines Biomaterials zu verringern (Chen et al. 2008). Studien von Han et al. (2003) und Choi et al. (2016) zeigen, dass PAC erfolgreich zur Stabilisierung von Kollagengerüsten eingesetzt werden können. Dabei hatten PAC eine ca. 120-mal geringere toxische Wirkung auf kultivierte Fibroblasten als der derzeit häufig verwendete Quervernetzer Glutaraldehyd (Han et al. 2003).

Aufgrund der genannten positiven Eigenschaften stellt die Zugabe dieser hoch bioaktiven Substanzen zu einem Biomaterial einen vielversprechenden Ansatz dar.

2.6 In vitro Modelle

Zur Beurteilung eines Biomaterials ist die Analyse anhand von *in vitro* Modellen unerlässlich. Sie ermöglichen die isolierte Untersuchung des Biomaterials auf dessen Toxizität und Stimulation der Zellproliferation sowie dessen Interaktion mit den auf ihm kultivierten Zellen unter kontrollierten und reproduzierbaren Bedingungen.

In vivo Tierversuche sind zeit- und kostenintensiv, werfen ethische Fragen auf und die physiologischen Unterschiede zwischen verschiedenen Spezies stellen eine mögliche Fehlerquelle dar (Rouwkema et al. 2011).

Um die Eignung eines Biomaterials für die Knochenregeneration *in vitro* zu testen, sind unterschiedliche Zelltypen verfügbar.

2.6.1 Zellmodell Osteoblasten

Für die Evaluation der Interaktion von Osteoblasten mit dem Biomaterial stehen Primärzellen sowie Zelllinien zur Verfügung.

Zur Beurteilung des physiologischen Wachstumsmuster osteoblastischer Zellen auf Biomaterialien sind isolierte und anschließend vermehrte humane primäre Osteoblasten besonders gut geeignet (Unger et al. 2009; Siggelkow et al. 1999). Es ist bekannt, dass primäre Osteoblasten oft auch *in vitro* ihre ursprünglichen phänotypischen Eigenschaften beibehalten (Czekanska et al. 2012). Allerdings finden sich nicht nur innerhalb eines Zelltyps, sondern auch in Abhängigkeit vom Ort der Gewebeentnahme, phänotypische Unterschiede (Kasperk et al. 1995). Des Weiteren können Alter und Geschlecht des Spenders die Genexpression beeinflussen (Zhang et al. 2004).

Die zeit- und kostenintensive Isolation von Primärzellen sowie die eingeschränkte Vergleichbarkeit der Studien, macht den Einsatz von Zelllinien unumgänglich (Czekanska et al. 2012). Diese haben den Vorteil einer unbegrenzten Verfügbarkeit (Czekanska et al. 2012).

In dieser Arbeit wurden die Osteosarkomzelllinien MG-63 und SaOs-2 in Ergänzung zu primären Osteoblasten verwendet. Die aus dem Osteosarkom eines 14-jährigen Jungen stammenden MG-63 Zellen haben eine ovale bis spindelförmige Morphologie und repräsentieren den Phänotyp eines unreifen Osteoblasten (Pautke et al. 2004;

Czekanska et al. 2012). Die Zelllinie SaOs-2 stammt ursprünglich aus dem Osteosarkom eines 11-jährigen Mädchens und besitzt den Phänotyp eines reifen Osteoblasten (Rodan et al. 1987; Czekanska et al. 2012). Trotz vorhandener Vorteile von Osteosarkomzelllinien, müssen die Unterschiede zwischen diesen und primären Osteoblasten, im Hinblick auf Zellgröße, Matrixproduktion sowie Proliferationszeit, bei der Verwendung in *in vitro* Untersuchungen bedacht werden (Pautke et al. 2004).

2.6.2 Zellmodell Endothelzellen

Endothelzellen haben eine essenzielle Bedeutung in der Knochenheilung, deshalb ist es geboten, diese ebenfalls in die Evaluation von Biomaterialien miteinzubeziehen (Velnar und Gradisnik 2018). Es konnte nachgewiesen werden, dass die Angiogenese eines der wichtigsten Kriterien für den Erfolg eines Biomaterials ist (Laschke et al. 2006). Aufgrund dessen, sollte die Interaktion von Biomaterialien mit Endothelzellen *in vitro* untersucht werden. Dafür werden zumeist Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen (HUVEC) verwendet (Unger et al. 2004). Diese bilden *in vitro*, ähnlich wie in Blutgefäßen, geordnete Netzwerke aus und reagieren auf toxische Stimuli relativ schnell mit einer verminderten Adhärenz sowie einer abgerundeten Form (Unger et al. 2009). Endothelzellen weisen zudem eine Reihe von einzigartigen, zellspezifischen Eigenschaften auf, die *in vitro* analysiert werden können (Unger et al. 2002). Primäre Endothelzellen zeigen eine hohe Expression des von-Willebrand-Faktors (vWF) sowie des Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmoleküls (PECAM-1) (Jaffe et al. 1974; Albelda et al. 1990). Ferner reagieren sie *in vitro* auf die Stimulation durch proinflammatorische Reize mit der Produktion des Zelladhäsionsmoleküls E-Selektin auf der Zelloberfläche (Bevilacqua et al. 1987). Diese Charakteristiken können durch die Analyse der Genexpression sowie mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen untersucht werden und ermöglichen somit eine Einschätzung der Kompatibilität von Biomaterial und Endothelzellen (Unger et al. 2009).

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

1 kb DNA Leiter, N3232L	New England BioLabs, Frankfurt
2-Propanol, I9516	Sigma-Aldrich, St. Louis
Amphotericin B 150 µg/mL	Gibco, Carlsbad
Aqua, dest., 7151-5	Fresenius Kabi, Bad Homburg
bFGF 1,25 µg/mL	Sigma-Aldrich, St. Louis
Bovines Serum Albumin (BSA), B9001S	New England BioLabs, Frankfurt
Calcein-Acetoxy-methylester (AM), C1430	Invitrogen, Carlsbad
Chloroform, C2432	Sigma-Aldrich, St. Louis
Ciprofloxacin, ≥98 %	Sigma-Aldrich, St. Louis
DAPI (4',6-Diamidin-2-Phenylindol), D1306	Sigma-Aldrich, St. Louis
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), D5671	Sigma-Aldrich, St. Louis
Endothelial Cell Growth Supplement (ECGS), 356006	Becton-Dickinson, Franklin Lakes
Escherichia coli, K12 (EC1)	Roth, Karlsruhe
Ethanol, 32205	Honeywell, Morristown
Fetales Kälberserum (FCS), F7524	Sigma-Aldrich, St. Louis
Fibronektin Aliquot 1 mg/mL, 11051407001	Roche Diagnostics, Rotkreuz
Gelatine, G1393	Sigma-Aldrich, St. Louis
Glutamax 100x, 35050-038	Gibco, Carlsbad
Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) 10x, 14060-040	Gibco, Carlsbad
Heparin Sodium, H3149	Sigma-Aldrich, St. Louis
Lipopolysaccharid (LPS), L2630	Sigma-Aldrich, St. Louis
Medium 199, M7528	Sigma-Aldrich, St. Louis
Phosphate Buffered Saline (PBS), D8537	Sigma-Aldrich, St. Louis
Penicillin-Streptomycin, P0781	Sigma-Aldrich, St. Louis
peqGREEN DNA/RNA Dye, 37-5010	vwr Peqlab, Darmstadt

Paraformaldehyd (PFA), P6148	Sigma-Aldrich, St. Louis
Resazurin Sodium Salt, R7017	Sigma-Aldrich, St. Louis
RiboLock RNase-Inhibitor, EO0382	Thermo Scientific, Waltham
RPMI Medium, 21875-034	Gibco, Carlsbad
β-Mercaptoethanol, 4227.3	Gibco, Carlsbad
TAE Puffer 50 x, 10399519	Thermo Scientific, Waltham
Terralin Liquid, 102001	Schülke, Norderstedt
Triton X-100, T8787	Sigma-Aldrich, St. Louis
Trizol Reagent Solution, AM9738	Invitrogen, Carlsbad
Trypan Blue Solution 0,4 %, T8154	Sigma-Aldrich, St. Louis
Trypsin-EDTA, 25200-056	Invitrogen, Carlsbad
UltraPure Agarose, 16500-500	Invitrogen, Carlsbad

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Mikroreaktionsgefäß 1,5/2/5 mL, 00301-20086/20094/19460	Eppendorf AG, Hamburg
Neubauer Zählkammer, PC73.1	Roth, Karlsruhe
Nitril Handschuhe, 290418-K	Abena, Zörbig
Parafilm, PM996	Bemis, Neenah
Petrischale 60 mm, Falcon, 3002	Becton-Dickinson, Franklin Lakes
Pipettenspitzen 10/200/1000 µL, 7410-15/65/45	Greiner Bio One, Kremsmünster
Reaktionsgefäß 15/50 mL, 188271/227261	Greiner Bio One, Kremsmünster
Serologische Pipetten 2/5/10/25 mL, 710/606/607/760-180	Greiner Bio One, Kremsmünster
Zellkulturflasche 50/250 mL, 690175/658175	Greiner Bio One, Kremsmünster
Zellkulturplatte mit 96-Wells, 655180	Greiner Bio One, Kremsmünster

3.1.3 Instrumentarium

8-Kanalpipetten 10-100/30-300 µL	Eppendorf AG, Hamburg
Agarose Gel-Elektrophorese, Sub-Cell GT	Bio Rad
Digitalkamera	Olympus, Shinjuku
Einkanalpipetten	Gilson, Middleton
eppendorf Zentrifuge, 5427 R	Eppendorf AG, Hamburg
Fluoreszenz Mikroskop, BZ-9000E	Keyence, Neu-Isenburg
Flüssigkeits-Absaugsystem, BVC-21	Vacuubrand, Wertheim
GeneAmp PCR System 9700	Applied Biosystems, Waltham
Heizblock ThermoMixer C, 5382000015	Eppendorf AG, Hamburg
Heizblock, Dri-Block DB-2D	Techne, Staffordshire
Inkubator, HERAcell 240	Thermo Scientific, Waltham
Kühl- und Gefrierschrank (4 °C/–20 °C)	Liebherr, Bulle
Lichtmikroskop, Leica DM IRB	Leica Mikrosysteme, Wetzlar
Mikrowelle	Bosch, Gerlingen
Pipettierhilfe, Pipetboy acu	Integra Biosciences, Zizers
Plattenreader Spark 10	Tecan, Männerdorf
Power Supply Elektrophorese Phero Stab 500	Biotec Fischer, Reiskirchen
Sicherheitswerkbank Hera Safe	Thermo Scientific, Waltham
Spektralphotometer Nanodrop 2000	Thermo Scientific, Waltham
UV-Lampe 254 nm	Bachofer, Reutlingen
Vibrationsmischer	Thermo Scientific, Waltham
Waage, LC42	Sartorius, Göttingen
Zentrifuge, Megafuge 1.0	Kendro, Langenselbold

3.1.4 Kits

High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (4368813)	Applied Biosystems, Waltham
REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix mit MgCl ₂ (R2523)	Sigma Aldrich, St. Louis

3.1.5 Zelllinien

Tabelle 1: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Zelltyp	Organismus
L-929 (ATCC CCL-1)	adhärent Fibroblast <u>Gewebe</u> : Subkutanes Bindegewebe	Mus musculus, Maus
MG-63 (ATCC CRL-1427)	adhärent <u>Gewebe</u> : Knochen <u>Krankheit</u> : Osteosarkom	Homo sapiens, Mensch
SaOs-2 (ATCC HTB-85)	adhärent <u>Gewebe</u> : Knochen <u>Krankheit</u> : Osteosarkom	Homo sapiens, Mensch

3.1.6 Zellkulturmedien

Tabelle 2: Verwendete Zellkulturmedien

Zelltyp	Zusammensetzung
HUVEC	Medium 199 + 20 % FCS + 1 mM Glutamax + 1 % (100 U/mL Penicillin + 100 µg/mL Streptomycin) + ECGS 50 µg/mL + Heparin 50 µg/mL
L929/MG-63/ pOB/SaOs-2	DMEM (high glucose) + 10 % FCS + 1 % Glutamax + 1 % (100 U/mL Penicillin + 100 µg/mL Streptomycin)

3.1.7 Antikörper

Tabelle 3: Verwendete Antikörper

Antikörper	Herkunft	Verdünnung	Anbieter
Alexa Fluor 488 anti-rabbit IgG (A-11008)	Ziege	1:1000	Invitrogen, Carlsbad
Anti-human E-Selektin (CD62E) IgG Clone ENA1 (MON 6010)	Maus	1:100	Monosan, Uden

3.1.8 Biomaterialien

Tabelle 4: Bestandteile der verwendeten Biomaterialien

Abkürzung	Bezeichnung	Lieferant
CS	Chondroitinsulfat (C9819-5G)	Sigma-Aldrich, St. Louis
GAG	Glykosaminoglykan	-
HA	Natrium-Hyaluronat	HTL Biotechnology, Javené
KOL	Kollagen	-
PAC	Proanthocyanidine (Traubenkernextrakt)	PureBulk, Roseburg

Tabelle 5: Zusammensetzung der verwendeten Biomaterialien

Biomaterial	GAG	Vernetzung	Massenverhältnis
1	-	-	reines KOL
2a	HA	-	KOL:HA=4:1
2b	CS	-	KOL:CS=4:1
3a-1	-	PAC	KOL:PAC=1:1
3a-2	-	PAC	KOL:PAC=2:1

Die Testmaterialien 1, 2a, 2b, 3a-1, 3a-2 bestehen aus 5 cm x 5 cm x 1 cm großen Kollagenvlies-Stücken, die entweder mit unterschiedlichen Glykosaminoglykanen versehen oder durch Proanthocyanidine vernetzt sind, siehe Tabelle 5.

Material 1 ist ein reines Kollagenvlies. Die Materialien wurden mittels Ethylenoxid (ETO) sterilisiert und steril verpackt geliefert.

Die Testmaterialien wurden mit dem kommerziell erhältlichen Kollagenvlies von ROGG, sowie mit den beiden Prototypen für transparente Deckmembranen, porcines Perikard (pP) und porcine Dermis (pD), verglichen.

Tabelle 6: Liste der verwendeten Vergleichsmaterialien

Biomaterial	Art	Beschreibung
pP	transparente Deckmembran	porzines Perikard Ref: 30810DH
pD	transparente Deckmembran	porzine Dermis Mustercharge D20180619
ROGG	Kollagenvlies	ROGG BioKollagen Wundaufgabe Lot: 170004

ROGG besteht laut Herstellerangaben aus reinem Kollagen und wird als sterile Wundaufgabe verwendet. Es soll die Blutstillung unterstützen, den Wundverschluss beschleunigen und anschließend vollständig vom Körper resorbiert werden. Die Materialien wurden vom Projektpartner für die Versuche zur Verfügung gestellt.

3.1.9 Primer

Tabelle 7: Verwendete Primer

Primer		Primer Sequenz	bp	AT
Aktin	F	5' - GACCTGACTGACTACCTCATGA - 3'	574 bp	63 °C
	R	5' - AGCATTGCGGTGGACGATGGAG - 3'		
E-Selektin	F	5' - TACTTGGCAAGTGTGACCC - 3'	258 bp	62 °C
	R	5' - TGTCACAGCATCACACTCAACC - 3'		
Kollagen Typ 1	F	5' - ATGAGAGCCCTCACACTCCTC - 3'	121 bp	60 °C
	R	5' - CTAGACCGGGCCGTAGAAGCG - 3'		
Osteocalcin	F	5' - ATGAGAGCCCTCACATCCTC - 3'	302 bp	60 °C
	R	5' - CTAGACCGGGCCGTAGAAGCG - 3'		
Osteonectin	F	5' - GTTGCCTGTCTCTAAACCCCT - 3'	343 bp	60 °C
	R	5' - CGTGTTTGCAGTGGTGGTTC - 3'		
Osteopontin	F	5' - GTTGCCTGTCTCTAAACCCCT - 3'	509 bp	60 °C
	R	5' - CGTGTTTGCAGTGGTGGTTC - 3'		
PECAM-1	F	5' - CAACAGACATGGCAACAAGG - 3'	240 bp	58 °C
	R	5' - TTCTGGATGGTGAAGTTGGC - 3'		
VEGF	F	5' - CTTGCCTTGCTGCTCTACCT - 3'	123 bp	57 °C
	R	5' - GCAGTAGCTGCGCTGATAGA - 3'		
vWF	F	5' - GATCCTAGTGGGGAATAAGG - 3'	308 bp	57 °C
	R	5' - TGGTGAGGTCATTGTTCTGG - 3'		

F: Forward Primer, R: Reverse Primer, AT: Annealing Temperature (primerabhängige Anlagerungstemperatur) in °C, bp: Größe des Amplifikationsprodukts in Basenpaaren

Die genutzten Primer stammen aus vorherigen Studien.

Die Primersequenzen wurden mittels des Primer-BLAST Tools des National Center for Biotechnology Information (NCBI) erstellt (National Center for Biotechnology Information (NCBI)). Die Sequenzen der Genabschnitte wurden zuvor in der Nukleotid Datenbank des NCBI ermittelt und mit Hilfe einer genspezifischen „Accession Number“ in das System eingelesen (National Center for Biotechnology Information (NCBI)).

3.2 Methoden

3.2.1 Isolation und Kultivierung von humanen primären Osteoblasten

Aus den von der Klinik für Orthopädie Mainz zur Verfügung gestellten Knochenfragmenten wurden humane primäre Osteoblasten (pOB) isoliert (Annaz et al. 2004; Dalby et al. 2002; Unger et al. 2011). Dazu wurden die Knochenfragmente zunächst zerkleinert und mit sterilem PBS gewaschen, um Blut und Geweberückstände zu entfernen. Danach wurden die Knochenfragmente in 0,2%iger Kollagenase für 30 min bei 37 °C resuspendiert und anschließend zentrifugiert. Nachdem dies einige Male mit frischer Kollagenase wiederholt wurde, wurde das Zellpellet mit PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet mit Medium (DMEM (1000 mg/L Glukose) + 10 % FCS + 1 % Glutamax + 100 U/100 µg/mL P/S + 75 mg/L Ascorbinsäure) resuspendiert und in einer sterilen Zellkulturflasche inkubiert. Nach ca. 2 Wochen waren die Zellen aus den Knochenfragmenten herausgewachsen und bildeten einen konfluenten Zellrasen. Die Zellen wurden durch Passagieren von den Knochenfragmenten gelöst und erneut in Medium (DMEM (1000 mg/L Glukose) + 10 % FCS + 1 % Glutamax + 100 U/100 µg/mL P/S) kultiviert. Anschließend wurden diese Zellen bis Passage 4 genutzt.

3.2.2 Isolation und Kultivierung von humanen primären Endothelzellen

Aus den von der Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Frauengesundheit in Mainz zur Verfügung gestellten Nabelschnüre wurden unter sterilen Bedingungen humane Nabelschnur Endothelzellen (HUVEC) isoliert (Jaffe et al. 1973). Nach erfolgter Isolierung der Zellen aus der Nabelschnur, wurden diese in einer mit Gelatine benetzten 25 cm² Zellkulturflasche zusammen mit Medium 199 + 20 % FCS + 0,64 % Glutamax + 100 U/100 µg/mL P/S + und 50 µL/mL Heparin + 50 µL/mL ECGS ausgesät. Anschließend wurden die Zellen in einem Begasungsbrutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 97 % inkubiert und passagiert (1:3) sobald sie konfluent waren. Die neue Passage wurde nach Erreichen eines konfluenten Zellrasens ebenfalls 1:3 passagiert oder in einem Tank mit Flüssigstickstoff gelagert. Für die Versuche wurden Zellen bis Passage 4 genutzt.

3.2.3 Zellkultivierung

Alle verwendeten Zellen wurden in 25 cm² oder 75 cm² großen Zellkulturflaschen ausgesät und bei 37 °C, 5 % CO₂ und einer relativen Luftfeuchte von 97 % inkubiert. Sobald die Zellen einen konfluenten Zellrasen ausgebildet hatten, wurden sie passagiert. Dazu wurde vorsichtig das Medium abgesaugt und die Zellen zunächst mit 5 mL bzw. 10 mL PBS für 30 s gewaschen. Das PBS wurde entfernt und 1 mL bzw. 1,5 mL 0,25%iges Trypsin wurde in die Zellkulturflasche eingefüllt (bei HUVEC bis auf einen dünnen Trypsinfilm sofort abgesaugt) und für 3–6 Minuten bei 37 °C ruhen gelassen. Nach einiger Zeit wurde unter einem Mikroskop kontrolliert, ob sich alle Zellen gelöst hatten. War dies der Fall, wurden 4 mL/ 8,5 mL neues Medium in die Zellkulturflasche eingefüllt und die Zellen mehrfach resuspendiert. Je nach Splitting-Verhältnis wurde ein Teil der Zellsuspension in eine neue Zellkulturflasche überführt und mit neuem Medium aufgefüllt. Für die HUVEC wurde die neue Zellkulturflasche zunächst mit 0,2%iger Gelatine benetzt und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Gelatine-Lösung abgesaugt und die Zellen hinzugefügt.

Um die Zellen zu zählen wurden 10 µL der abgelösten Zelllösung sowie 10 µL Trypan Blau in einem Eppendorf-Gefäß vermischt und in einer Zählkammer gezählt.

3.2.4 Sterilitätsprüfung

Die ca. 5 cm x 5 cm x 0,2 cm großen Testmaterialien wurden mittels Gammastrahlung sterilisiert und steril vom Hersteller geliefert. Als Vorbereitung für die Versuche wurden die Materialien unter sterilen Bedingungen aus der Verpackung entnommen, mit einem Skalpell oder einer Schere in ca. 0,5 cm x 0,5 cm große Stücke zerteilt und in sterilen Petrischalen aufbewahrt. Um zu verifizieren, dass die Materialien nach diesen Arbeitsschritten noch steril waren, wurde ein Sterilitätstest durchgeführt. Von jedem Testmaterial wurden drei zufällig ausgewählte Stücke in ein 15 mL Röhrchen zusammen mit 5 mL DMEM Medium (ohne Zusätze) gegeben und für 96 Stunden bei 37 °C in einem Bakterien-Brutschrank inkubiert. Zusätzlich wurde eine Sterilitätskontrolle nur mit Medium durchgeführt. Als Nachweis, dass Bakterien in dem Medium wachsen können, wurde eine Kontrolle mit E. coli beimpftem Medium durchgeführt. Alle Teströhrchen wurden unter den oben genannten Bedingungen inkubiert und jeden Tag auf Trübung untersucht.

3.2.5 Untersuchung der Zytotoxizität (Resazurin-Reduktionstest)

Die Zytotoxizität eines Materials kann durch die Messung der metabolischen Aktivität, der mit ihm in Berührung kommenden Zellen, bestimmt werden. Vitale Zellen reduzieren den blauen, nicht fluoreszierenden Farbstoff Resazurin in die pinke, gut messbare, fluoreszierende Form Resorufin (O'Brien et al. 2000).

Resazurin Herstellung

Für die Resazurin Lösung wurden 12 mg Resazurin in 100 mL HBSS (mit Ca²⁺ und Mg²⁺) aufgelöst und durch einen 0,22 µm Filter gefiltert und bei -20 °C gelagert. Basierend auf einer Methode nach Ivanov et al. (2017).

Untersuchung der Zytotoxizität der Biomaterialien

Herstellung der Materialextrakte

Für jedes Biomaterial wurden Extrakte vorbereitet, indem ein steriles 0,5 mm x 0,5 mm großes Stück des Biomaterials mit einer sterilen Pinzette in ein 1,5 mL Eppendorf-Röhrchen gegeben wurde. Zusätzlich wurden 1,5 mL Zellkulturmedium hinzugefügt und das Ganze bei 37 °C für 24 h inkubiert.

Durchführung

Die Zellen wurden mittels Trypsin im Zellkulturfläschchen gelöst und auf 20 000 Zellen pro Well in einer 96-Well-Platte ausgesät. Anschließend konnten die Zellen für 24 h bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit anwachsen.

Nach einer Inkubationsdauer von 24 h wurden 100 µL Medium aus den Wells abgesaugt und 100 µL der Extrakte hinzugefügt und erneut für 24 h, 48 h oder 72 h bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Außerdem wurden Zellen ohne Extrakt als Kontrolle vorbereitet. Es wurden jeweils mindestens 3 Wells pro Versuchsgruppe ausgewertet.

Zu den verschiedenen Zeitpunkten wurden 15 µL 10%iges Triton X-100 zu den Wells, die als Positivkontrolle dienten, hinzugefügt und für 1 h im Brutschrank inkubiert. Danach wurden 30 µL Resazurin Lösung zu allen Wells hinzugefügt und erneut für 3 h im Brutschrank inkubiert. Nach 3 h wurde die 96-Well-Platte bei 540 nm Anregungswellenlänge und 590 nm Emissionswellenlänge von einem Plattenlesegerät vermessen.

Untersuchung der Zytotoxizität verschiedener PAC-Konzentrationen

Herstellung der PAC Verdünnungsreihe

Zunächst wurde die Basislösung hergestellt. Dafür wurden 100 mg Traubenkernextrakt in 10 mL der entsprechenden Medien gelöst, sodass eine Konzentration von 10 000 µg/mL entstand und das Gemisch mittels Sterilfiltration aufbereitet. Anschließend wurden die verschiedenen Verdünnungsreihen angesetzt. Dazu wurde eine ausgerechnete Menge der Basislösung mit einer bestimmten Menge Medium gemischt. So entstanden Verdünnungen mit einer PAC-Konzentration von 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 500, 750 und 1000 µg/mL.

Durchführung

Die Zellen wurden mittels Trypsin im Zellkulturfläschchen gelöst und auf 20 000 Zellen pro Well in einer 96-Well-Platte ausgesät. Anschließend konnten die Zellen für 24 h bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit anwachsen.

Nach einer Inkubationsdauer von 24 h wurden 100 µL Medium aus den Wells abgesaugt und 100 µL der hergestellten Verdünnungen hinzugefügt und erneut für 24 h bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Außerdem wurden Zellen ohne PAC Zugabe als Kontrolle vorbereitet. Es wurden jeweils mindestens 5 Wells pro Versuchsgruppe ausgewertet.

Nach 24 h wurden 15 µL Triton X-100 zu den Wells, die als Positivkontrolle dienten, hinzugefügt und für 1 h im Brutschrank inkubiert. Danach wurde der Resazurin-Test durchgeführt und die Platte anschließend bei 540 nm Anregungswellenlänge und 590 nm Emissionswellenlänge von einem Plattenlesegerät vermessen.

Datenauswertung

Für die graphische Darstellung wurden von den gemessenen Rohwerten die Mittelwerte sowie der Standardfehler gebildet. Der bestimmte Mittelwert wurde anschließend auf die unbehandelten Kontrollzellen (100 %) bezogen, um die relative Vitalität der Zellen zu erhalten.

Die statistische Auswertung der Messergebnisse erfolgte mittels one-way ANOVA mit anschließendem Dunnett's Test mit der Software GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, San Diego). Als statistisch signifikanten Unterschied zwischen der Zellzahl der Testgruppe im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle wurden p-Werte kleiner 0,05 erachtet.

Tabelle 8: p-Werte

Symbol	p-Wert
*	< 0,05
**	< 0,01
***	< 0,001

3.2.6 E-Selektin Endotoxintest

Die Induktion von E-Selektin auf Endothelzellen nach der Zugabe von Extrakten der zu untersuchenden Substanzen, hat sich als Indikator für das Vorhandensein von Endotoxinen im Femtogramm Bereich erwiesen (Unger et al. 2014).

HUVEC wurden mittels Trypsin gelöst und auf einer mit 0,5%igem Fibronectin beschichteten 8-Well-Platte auf 25 000 Zellen pro 250 μ L pro Well ausgesät und für 24 h inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium aus allen Wells entfernt und frisches HUVEC Medium zusammen mit den zu testenden Extrakten (Herstellung siehe 3.2.5) den Wells hinzugefügt. Eine Positivkontrolle wurde durch die Zugabe von 1 μ g/mL LPS in 200 μ L Medium erzeugt. Außerdem diente ein Well mit Medium und 1. AK als Negativkontrolle, sowie ein Well mit Medium ohne 1. AK als Antikörperkontrolle. Nach 4 h wurde das Medium aus allen Wells entfernt und alle Wells 2-mal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 3,7%igem PFA für 15 Minuten fixiert und in 0,2 % Triton X-100 für 10 Minuten permeabilisiert. Nach erneuter Waschung mit PBS wurden die Zellen (abgesehen von Well 8) mit E-Selektin Monoklonalen AK (1:100 verdünnt in 1%igem BSA/PBS) für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und mit dem sekundären Antikörper Alexa 488 anti-mouse (1:1000 verdünnt in 1%igem BSA/PBS) für eine Stunde inkubiert. Nach erneuter Waschung mit PBS wurden die Zellkerne mit DAPI gefärbt, und die Platte mit den Zellen anschließend unter einem Fluoreszenz Mikroskop betrachtet.

3.2.7 Vitalfärbung mit Calcein-AM

Um das Wachstum und die Adhäsion von primären Endothelzellen, primären Osteoblasten sowie osteoblastischen Zelllinien auf den Biomaterialien zu analysieren, wurden ca. 0,5 x 0,5 mm² große Stücke der Biomaterialien in einer 48-Well-Platte verteilt und anschließend 50 000 Zellen pro Well in 2 mL Medium ausgesät. Danach wurden die Zellen für 4–5 Tage inkubiert und mit Calcein-AM gefärbt. Dazu wurden jeweils 10 μ L Calcein-AM Lösung in die Wells gegeben und für 10–20 Minuten inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen unter einem Fluoreszenz Mikroskop betrachtet und fotografiert. Um beide Seiten des Biomaterials betrachten zu können,

wurde dieses mit einer Pinzette umgedreht. Es wurden mindestens 5–8 Bilder pro Well gemacht und die Experimente mindestens 3-mal pro Material wiederholt.

3.2.8 Analyse der Genexpression von Zellen auf den Biomaterialien

RNA Isolation

Zunächst wurden ca. 0,5 x 0,5 mm² große Stücke der Biomaterialien in einer 48-Well-Platte verteilt und anschließend 50 000 Zellen pro Well ausgesät und diese für 4–5 Tage inkubiert. Zur Isolierung der RNA wurden anschließend die Zellen mittels Trizol Reagent und 1%igem β -Mercaptoethanol vom Biomaterial gelöst und in ein neues 1,5 mL Eppendorf-Gefäß überführt. Anschließend wurden 200 μ L Chloroform hinzugegeben, das Gemisch gevortext und nach 5 Minuten auf Eis bei 4 °C und 11200 U/m für 15 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde die oberste der drei Phasen in ein neues 1,5 mL Eppendorf-Gefäß überführt, mit der gleichen Menge an Isopropanol aufgefüllt und nach 10 Minuten erneut für 15 Minuten bei 4 °C und 11200 U/m zentrifugiert.

Anschließend wurde der Überstand bis auf das Zellpellet abgesaugt, dieses mit 500 μ L 80%igem Ethanol gewaschen und bei 8200 U/m für 5 Minuten zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde wiederholt und anschließend das Ethanol entfernt und das Zellpellet bei 55 °C getrocknet. Das Zellpellet wurde nun in 20 μ L RNase freiem Wasser aufgelöst und die RNA-Konzentration mittels NanoDrop gemessen.

Reverse-Transkriptase

Die Reverse-Transkriptase wurde mit dem Applied Biosystems™ High-Capacity cDNA Reverse-Transcription-Kit durchgeführt. Dazu wurden 10 μ L RNA/Wasser-Mix zusammen mit 10 μ L Master-Mix (2 μ L RT Puffer + 0,8 μ L dNTP Mix (100 mM) + 2 μ L Random Primers + 1 μ L MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50 U/ μ L) + 1 μ L RNase Inhibitor + 3,2 μ L RNase freies Wasser) vermischt und der Zyklus für die cDNA Synthese gestartet.

Zyklus Konditionen: 10 min bei 25 °C, 120 min bei 37 °C, 5 min bei 85 °C, Lagerung bei 4 °C

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Detektion einer spezifischen DNA-Sequenz wurden folgende Bestandteile in einem PCR-Gefäß vermischt: 12,5 µL RedTaq Ready Mix + 0,5 µL Forward Primer (0,5 µM) + 0,5 µL Reverse Primer (0,5 µM) + 2 µL cDNA Probe + 9,5 µL RNase freies Wasser

Anschließend wurden die PCR mit den in Tabelle 7 genannten Primern unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

- 94 °C, 2 min (DNA Denaturierung)
- 35 Zyklen
 - 94 °C, 30 s (DNA Denaturierung)
 - Primer spezifische Temperatur, 30 s (Annealing) (siehe Tabelle 7)
 - 72 °C, 30 s (DNA Synthese)
- 72 °C 10 min (finale Extension)
- 4 °C Lagerung

Gelelektrophorese

Durch das Aufkochen von Agarose-Pulver und 1 x TAE Puffer wurde 0,8%iges Agarose-Gel hergestellt. Nach der Abkühlung wurden 2 µL peqGREEN zu der Agarose-Lösung gegeben und das Gel zur Aushärtung in eine Elektrophorese-Kammer gegossen. Anschließend wurde das ausgehärtete Gel in die Gelelektrophorese-Apparatur gelegt und diese mit 1 x TAE Puffer aufgefüllt, bis das Gel vollständig bedeckt war. Nun wurden 10 µL je Probe, 10 µL Negativkontrolle, 10 µL Positivkontrolle und 6 µL Marker (500 bp–10 Kb DNA Leiter) in je eine Auftragstasche gegeben. Die Gelelektrophorese wurde bei 100 Volt ca. 45 min durchgeführt und die DNA-Banden anschließend mit Hilfe einer UV-Lampe visualisiert und der am Computer angeschlossenen Kamera fotografiert.

4 Ergebnisse

4.1 Sterilitätsprüfung

Um zu verifizieren, dass die Materialien nach der Entnahme aus der Verpackung sowie der Zerkleinerung noch steril waren, wurde eine Sterilitätsprüfung durchgeführt. Dafür wurden die Testmaterialien zusammen mit Medium, welches das Wachstum von Mikroorganismen unterstützt, in Röhren gegeben und die Trübung zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Zugabe der Materialien beurteilt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 zu sehen.

Tabelle 9: Ergebnisse der Sterilitätsprüfung der Materialien

Material	24 h	48 h	72 h	96 h
1	---	---	---	---
2a	---	---	---	---
2b	---	---	---	---
3a-1	---	---	---	---
3a-2	---	---	---	---
ROGG	---	---	---	---
pP	---	---	---	---
pD	---	---	---	---
Sterile Kontrolle	---	---	---	---
E. coli Kontrolle	+++	+++	+++	+++

Die Ergebnisse zeigen drei Röhren mit jeweils drei Stücken des Testmaterials an verschiedenen Zeitpunkten – : keine Trübung, + : Trübung

Die Ergebnisse der Sterilitätsprüfung zeigten, dass alle verwendeten Testmaterialien steril waren. Anhand der *Escherichia coli* (E. coli) beimpften Kontrolle konnte nachgewiesen werden, dass Bakterien in dem verwendeten Medium wachsen konnten.

4.2 Untersuchung der Zytotoxizität (Resazurin-Reduktionstest)

4.2.1 Einfluss der Materialextrakte auf die Zellvitalität

Um festzustellen, ob die Biomaterialien eine toxische Wirkung auf Zellen haben, wurde die metabolische Aktivität von ausgewählten Zellen 24 h, 48 h und 72 h nach Zugabe der Extrakte, die aus den Biomaterialien erzeugt wurden, mit einem Resazurin-Assay bestimmt. Die Ergebnisse aus diesen Experimenten sind in den Abbildung 1A–E zu sehen. Die Durchführung erfolgte wie unter 3.2.5 beschrieben. Jede Grafik zeigt die Mittelwerte der unabhängig voneinander durchgeführten Versuche in Prozent, bezogen auf die unbehandelte Kontrollgruppe, mit Standardfehler. Das Signifikanzniveau der Messungen wurde mittels one-way ANOVA mit anschließendem Dunnett's Test mit der Software GraphPad Prism 9 bestimmt. Die Sternchen kennzeichnen Messungen mit einem statistisch signifikanten Unterschied (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$) zwischen der Konzentration der einzelnen Testgrößen und den unbehandelten Kontrollzellen.

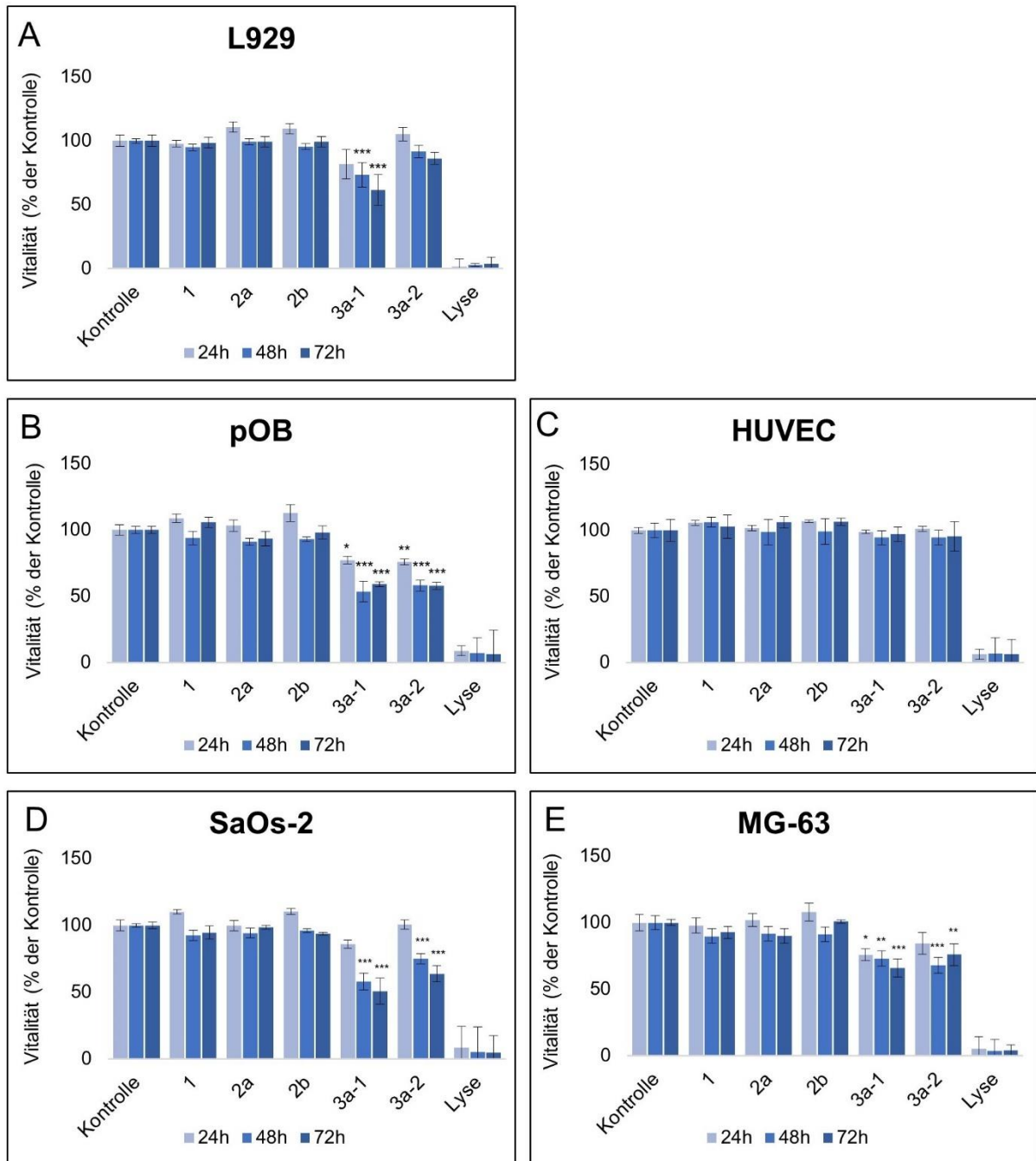


Abbildung 1: Zellvitalität zu verschiedenen Zeitpunkten nach Zugabe der Extrakte

Zur Analyse der Toxizität, der aus den verschiedenen Biomaterialien gewonnenen Extrakte, wurde die Zellvitalität von L929 (A), pOB (B), HUVEC (C), SaOs-2 (D) sowie MG-63 (E) 24 h/ 48 h/ 72 h nach Inkubation mit den Extrakten mit Hilfe eines Resazurin-Reduktionstests bestimmt und der Mittelwert aus unabhängigen Versuchen (A,C,D,E n=3, B n=2) mit Standardfehler, im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen (100 %), dargestellt. Für die Lysekontrolle wurden die Zellen mit 15 μ L Triton X-100 behandelt. Die statistische Auswertung der Messergebnisse erfolgte mittels one-way ANOVA mit anschließendem Dunnett's Test mit der Software GraphPad Prism 9. *p <0,05 **p <0,01 ***p <0,001

L929

In Abbildung 1A sind die Ergebnisse der Toxizitätstests mit L929-Zellen dargestellt. Nach der Inkubation mit Extrakten aus den Materialien 1, 2a und 2b wurden zu keinem Zeitpunkt offensichtlich toxische Effekte beobachtet. Jedoch zeigten die Extrakte aus 3a-1 und 3a-2 mit zunehmender Zeit eine Hemmung der metabolischen Aktivität der Zellen. Dabei konnte eine stärkere Hemmung mit dem Extrakt aus 3a-1 als mit dem Extrakt aus 3a-2, zu den verschiedenen Zeitpunkten, beobachtet werden. Nach 48- sowie 72-stündiger Inkubation mit Extrakt 3a-1 zeigte sich eine hoch signifikant reduzierte Zellzahl.

pOB

Die Ergebnisse der Resazurin-Tests der Extrakte mit den primären Osteoblasten sind in Abbildung 1B zu sehen. 48 h nach Inkubation mit den Extrakten aus den Materialien 1, 2a und 2b konnte ein leicht hemmender Effekt auf den Zellmetabolismus der pOB festgestellt werden, der jedoch nicht signifikant war. Mit den Extrakten der PAC-haltigen Materialien, 3a-1 und 3a-2, konnte eine wesentlich höhere Toxizität beobachtet werden. Die Resazurin-Werte zeigen, dass mit zunehmender Zeit weniger vitale Zellen vorhanden waren. Bereits nach 24 h konnte mit den Extrakten der PAC-haltigen Materialien eine signifikant reduzierte Zellvitalität beobachtet werden. Der Unterschied zur Kontrolle fiel nach 48 h noch deutlicher aus.

HUVEC

Wie in Abbildung 1C zu sehen ist, hatte keiner der Extrakte eine toxische Wirkung auf HUVEC. Unter allen Bedingungen konnte eine mit der Kontrolle vergleichbare Zellzahl beobachtet werden.

SaOs-2 & MG-63

Die Osteosarkomzelllinien zeigten ähnliche Ergebnisse wie die untersuchten primären Osteoblasten (Abbildung 1D und Abbildung 1E). Wenig bis keinen Einfluss auf die metabolische Aktivität wurde mit den Extrakten aus 1, 2a und 2b beobachtet. Mit diesen Extrakten konnte keine statistisch signifikante Änderung der metabolischen Aktivität nachgewiesen werden. Jedoch konnte bereits nach 24-stündiger Inkubation mit dem Extrakt aus 3a-1 eine signifikant reduzierte Zellzahl für MG-63 (Abbildung 1 E) beobachtet werden. Nach 48-stündiger Inkubation mit den PAC-haltigen Materialien 3a-1 und 3a-2 war eine hochsignifikant reduzierte Zellzahl beider Osteosarkomzelllinien ersichtlich. Der Unterschied zur Kontrolle fiel nach 72 h noch deutlicher aus.

4.2.2 Einfluss aufsteigender PAC-Konzentrationen auf die Zellvitalität

Anhand einer Probe, der in der Synthese der Materialien verwendeten PAC, wurde eine Verdünnungsreihe mit den Zellkulturmedien hergestellt. Anschließend wurden die Auswirkungen der verschiedenen Konzentrationen auf die Zellvitalität vier verschiedener Zelltypen nach 24-stündiger Inkubation ausgewertet. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abbildung 2 ersichtlich. Dargestellt ist der Mittelwert in Prozent, bezogen auf die unbehandelte Kontrollgruppe, mit Standardfehler.

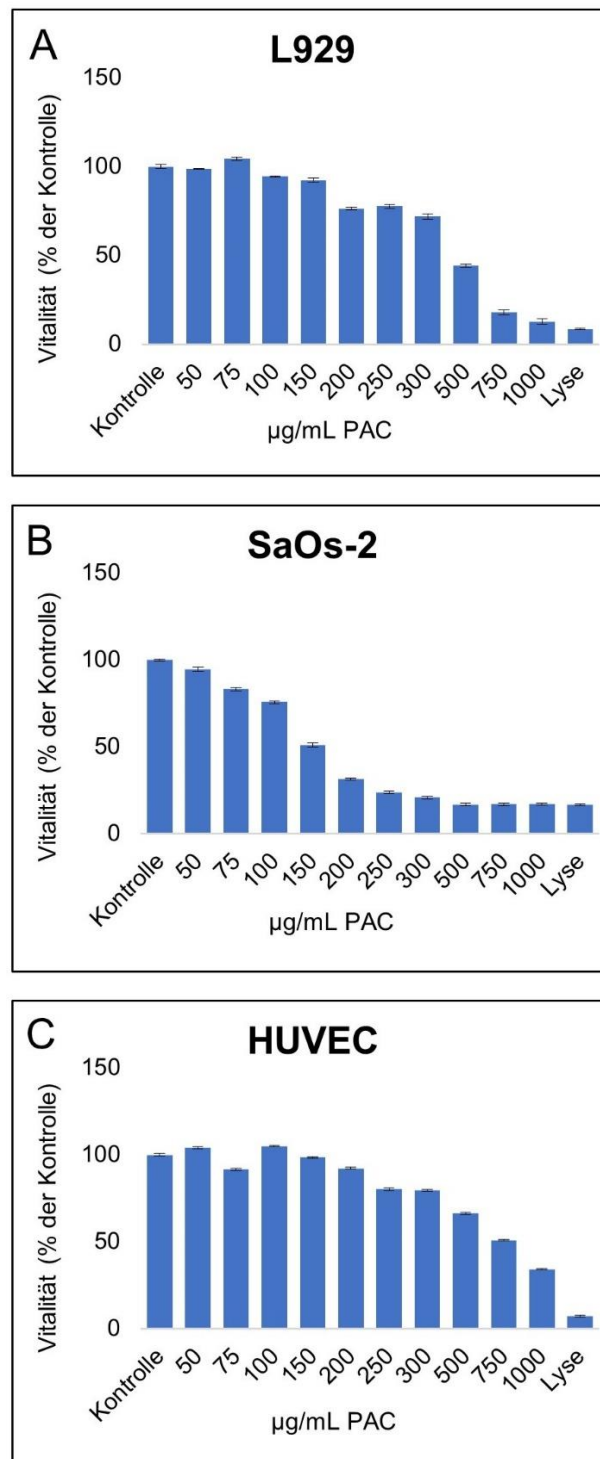


Abbildung 2: Zellvitalität nach Zugabe von steigenden PAC-Konzentrationen

PAC wurden in den angezeigten Konzentrationen zu den Zellen gegeben und die metabolische Aktivität der Zellen nach 24-stündiger Inkubation bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte einer 5er Bestimmung mit Standardfehler im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen (100 %). Eine Lysekontrolle wurde durch die Zugabe von Triton X-100 erzeugt.

Wie in Abbildung 2 dargestellt ist, konnte eine sukzessive Reduktion der vitalen Zellen mit steigenden PAC-Konzentrationen festgestellt werden.

Ab PAC-Konzentrationen über 200 µg/mL konnte eine deutlich verringerte Zellvitalität (unter 80 % der Kontrolle) von L929 beobachtet werden (Abbildung 2A).

SaOs-2 wiesen ab einer PAC-Konzentration von 100 µg/mL eine eindeutig reduzierte Zellaktivität (unter 80 % der Kontrolle) auf (Abbildung 2B).

Ab einer PAC-Konzentration von 300 µg/mL war ein toxischer Effekt (Zellzahl unter 80 % der Kontrolle) auf HUVEC ersichtlich (Abbildung 2C).

Insgesamt ist anhand der Ergebnisse sichtbar, dass PAC in bestimmten Konzentrationen einen bedeutend toxischen Effekt auf alle Zellen in Kultur hatten. Leider war eine Messung der aus den Materialien gespülten PAC-Konzentration, aufgrund von Interferenzen mit den Substanzen des Mediums, nicht möglich.

4.3 E-Selektin Endotoxintest

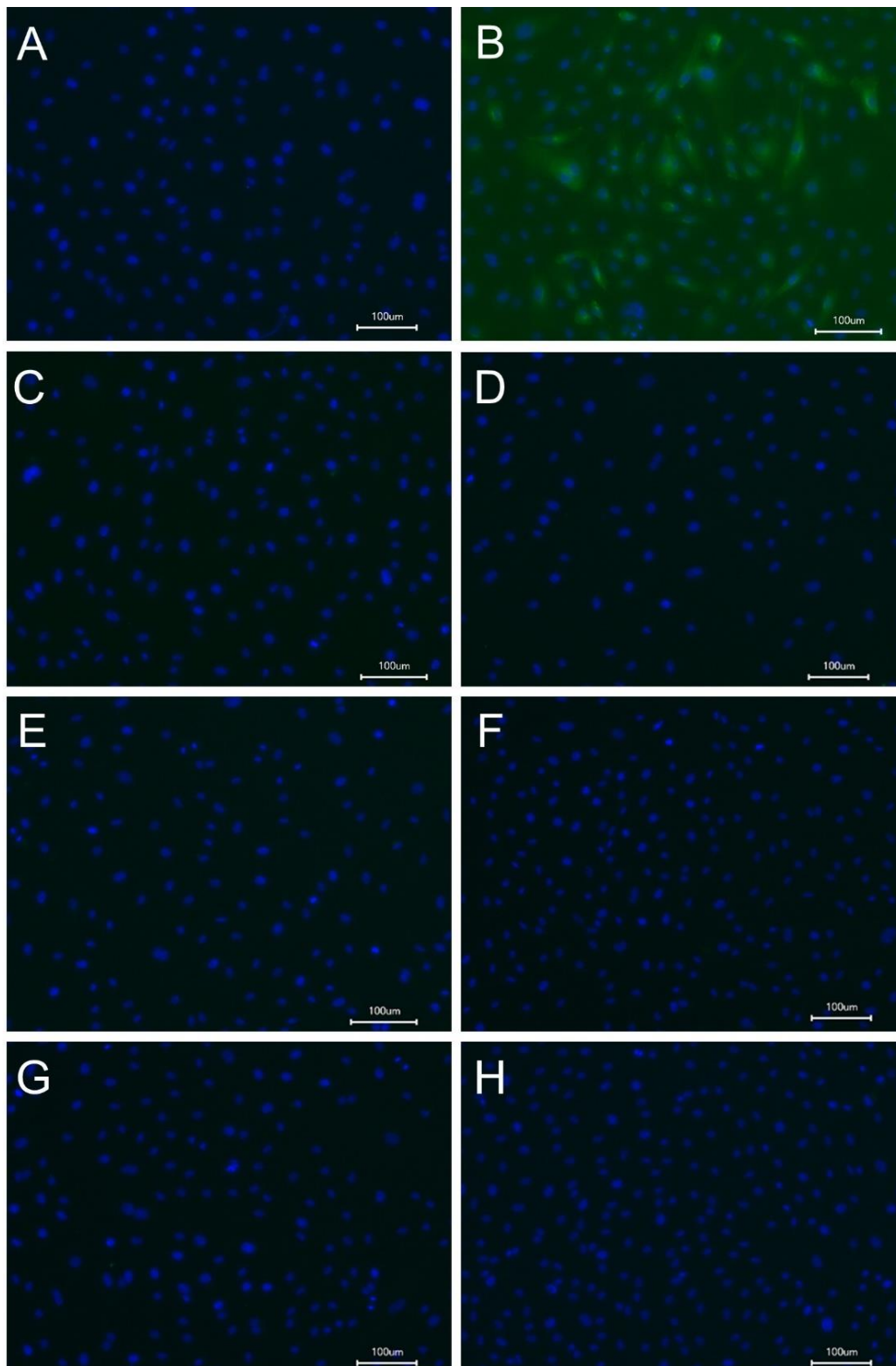


Abbildung 3: Fluoreszenzfärbung zum Nachweis von E-Selektin

Die Färbung erfolgte nach 4-stündiger Inkubation von HUVEC mit den Extrakten der Testmaterialien und nach zusätzlicher Stimulation mit LPS.

A: Negativkontrolle (– LPS) **B:** Positivkontrolle (+ LPS) **C:** 1 **D:** 2a **E:** 2b **F:** 3a-1 **G:** 3a-2
H: Antikörperkontrolle (Kein 1. Antikörper) Der Maßstab entspricht 100 µm.

Um festzustellen, ob die Materialien Endotoxine enthielten oder eine entzündliche Wirkung auf die Zellen hatten, wurden HUVEC mit den Extrakten aus den Testmaterialien behandelt und anschließend eine Fluoreszenzfärbung zum Nachweis des Adhäsionsmoleküls E-Selektin durchgeführt.

Wie in Abbildung 3 zu sehen ist, zeigten Zellen die LPS ausgesetzt waren, eine starke Färbung für E-Selektin (grüne Färbung, Abbildung 3B), wohingegen bei den Kontrollzellen keine Färbung sichtbar war (Abbildung 3A). Die Zellen, die mit Extrakten der Testmaterialien behandelt wurden, zeigten keine Färbung für E-Selektin (Abbildung 3 C-H), sodass davon ausgegangen werden konnte, dass die Materialien frei von Endotoxinen waren.

4.4 Visualisierung der Zellen auf den Biomaterialien

Die Abbildungen 4–7 zeigen das Wachstum der Zellen auf den verschiedenen Biomaterialien, nach 5-tägiger Inkubation und anschließender Vitalfärbung mit Calcein-AM. Die dargestellten Bilder sind repräsentativ für jeweils sechs Bilder pro Well für drei verschiedene Proben jedes Testmaterials. Als Vergleich dienten die Kontrollzellen auf Zellkulturplastik sowie Zellen auf den kommerziell erhältlichen Biomaterialien ROGG, porcines Perikard (pP) und porcine Dermis (pD). Der gezeigte Maßstab entspricht 100 µm.

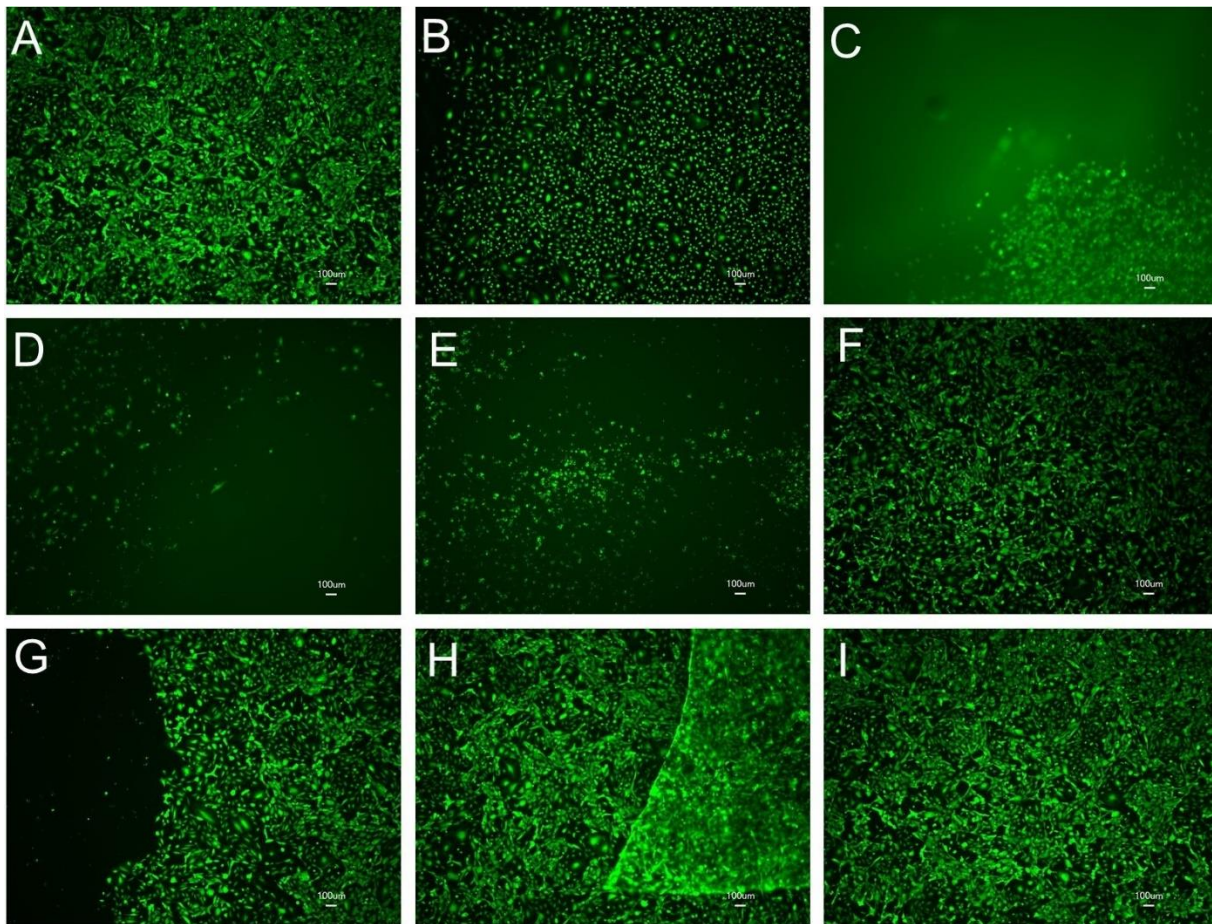


Abbildung 4: Vitalfärbung Calcein-AM von HUVEC mit den Biomaterialien

Die Zellen wurden auf den Biomaterialien ausgesät und nach 5 Tagen mit Calcein-AM gefärbt. Der Maßstab entspricht 100 µm. **A:** 1 **B:** 2a **C:** 2b **D:** 3a-1 **E:** 3a-2 **F:** ROGG **G:** pP **H:** pD **I:** Kontrolle

Abbildung 4 zeigt das Wachstum von HUVEC auf den verschiedenen Testmaterialien. Die Zellen zeigten ein gutes Wachstum mit Material 1 sowie den Vergleichsmaterialien ROGG, pP und pD, das in Zellzahl und Morphologie mit dem der Kontrollzellen auf Zellkulturplastik vergleichbar war. Die auf 2a kultivierten Zellen zeigten eine ähnliche Zellzahl wie die zuvor genannten Materialien, jedoch stellten sich die Zellen etwas abgerundeter dar. Im Unterschied dazu, waren auf 2b weniger Zellen feststellbar. Auf den Materialien 3a-1 und 3a-2 waren ebenfalls nur wenige Zellen sichtbar, wobei auf 3a-2, verglichen mit 3a-1, etwas mehr Zellen beobachtet werden konnten.

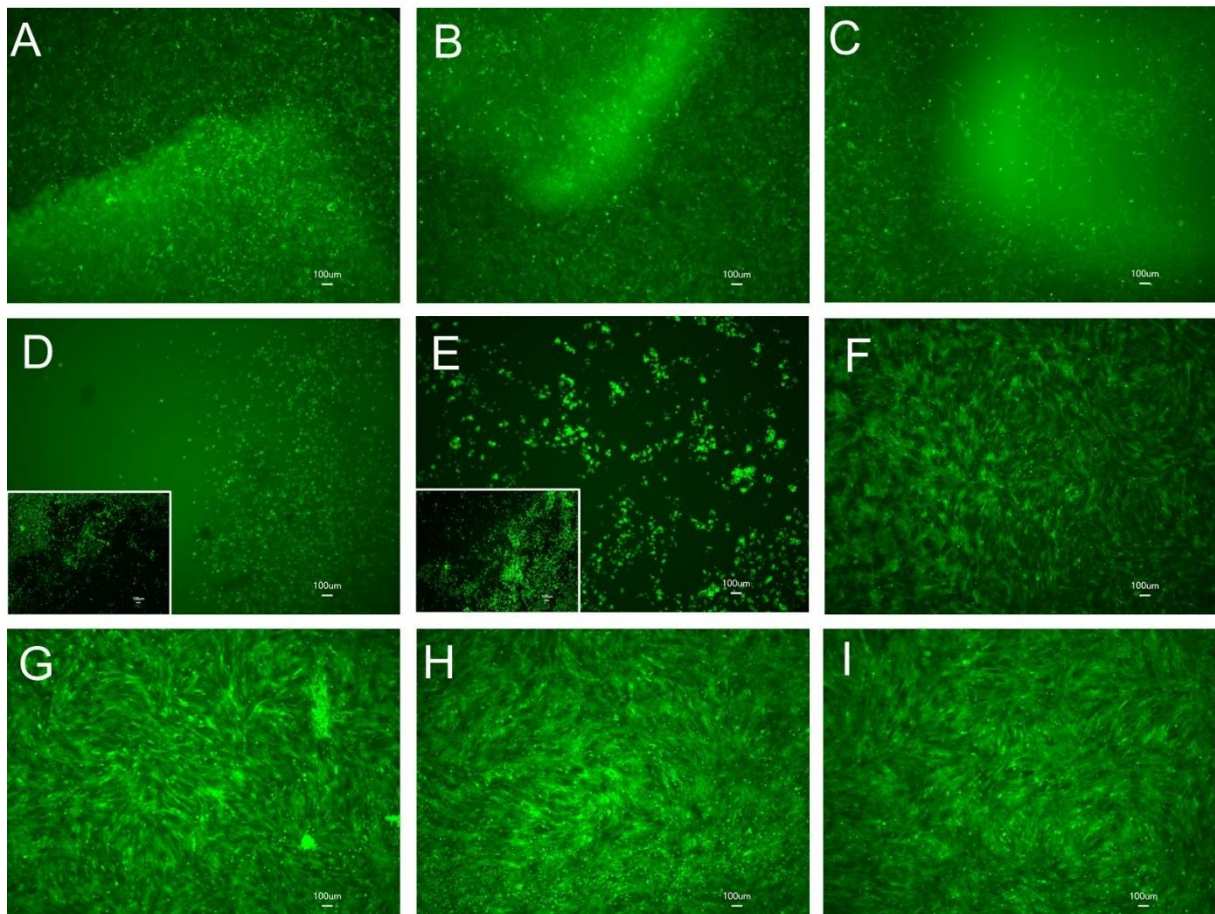


Abbildung 5: Vitalfärbung Calcein-AM von MG-63 mit den Biomaterialien

Die Zellen wurden auf den Biomaterialien ausgesät und nach 5 Tagen mit Calcein-AM gefärbt. Der Maßstab entspricht 100 µm. **A:** 1 **B:** 2a **C:** 2b **D:** 3a-1 **E:** 3a-2 **F:** ROGG **G:** pP **H:** pD **I:** Kontrolle

Das Wachstum der osteoblastischen Zelllinie MG-63 auf den Testmaterialien ist in Abbildung 5 zu sehen. Die höchste Anzahl an Zellen konnte auf den Vergleichsmaterialien ROGG, pP und pD beobachtet werden. Diese war vergleichbar mit der Menge an Kontrollzellen auf dem Zellkulturplastik. Für die Materialien 1, 2a und 2b konnte eine gute Zellanheftung beobachtet werden, jedoch wurde eine insgesamt geringere Zellzahl – vor allem mit Material 2b – festgestellt. Die MG-63 zeigten eine physiologisch gespreizte Zellmorphologie sowohl auf den zuvor genannten Materialien als auch daneben auf dem Zellkulturplastik. Auf den Materialien 3a-1 und 3a-2 waren deutlich weniger Zellen zu sehen. Zudem stellten sich diese morphologisch kugelig dar und wuchsen inhomogener. Die eingefügten Bilder zeigen vitale Zellen an den Rändern der Wells (Abbildung 5D bzw. E).

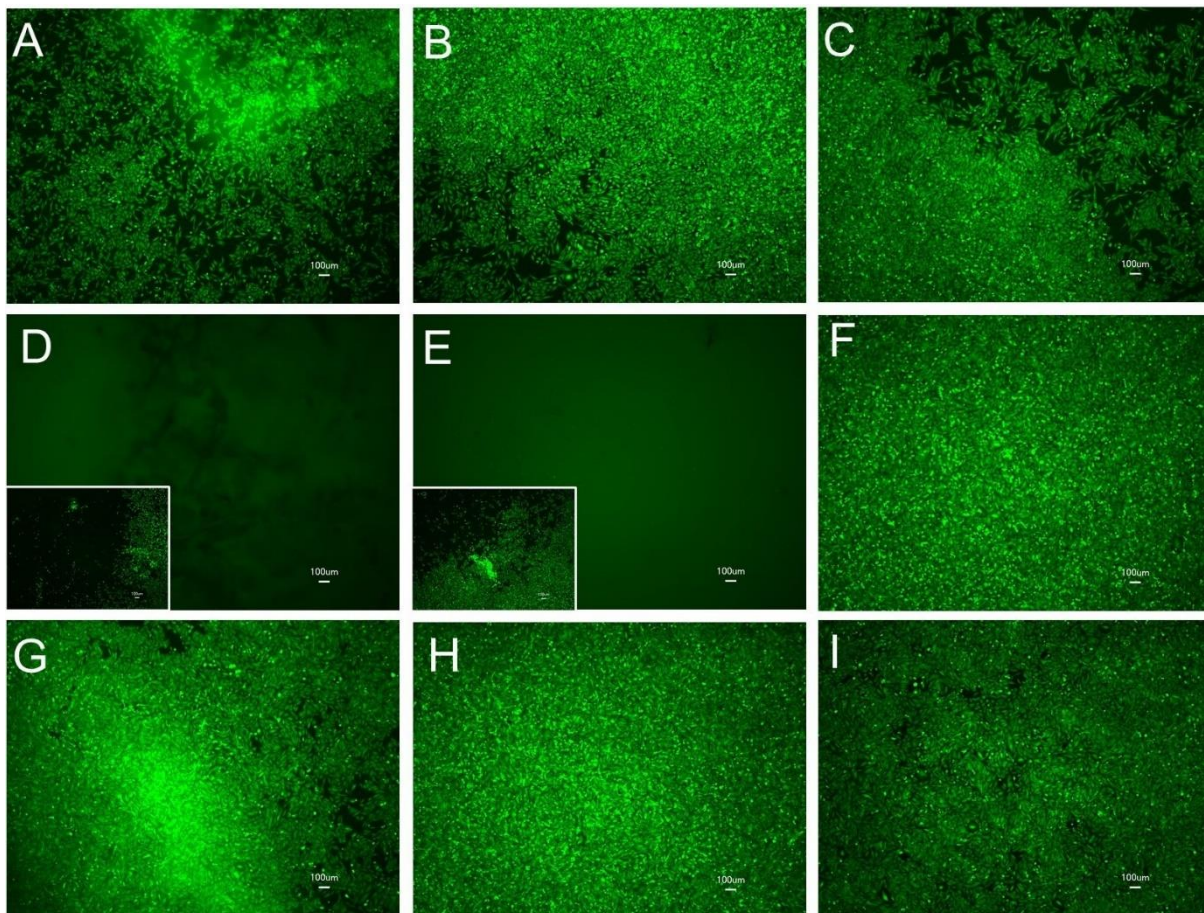


Abbildung 6: Vitalfärbung Calcein-AM von SaOs-2 mit den Biomaterialien

Die Zellen wurden auf den Biomaterialien ausgesät und nach 5 Tagen mit Calcein-AM gefärbt. Der Maßstab entspricht 100 µm. **A:** 1 **B:** 2a **C:** 2b **D:** 3a-1 **E:** 3a-2 **F:** ROGG **G:** pP **H:** pD **I:** Kontrolle

In Abbildung 6 ist das Wachstum von SaOs-2 auf den Materialien ersichtlich. Auf den Testmaterialien 1, 2a und 2b wiesen die Zellen sowohl auf als auch neben den Materialien ein sehr gutes Wachstum auf. Mit den Vergleichsmaterialien ROGG, pP und pD konnte jedoch ein umfangreiches Zellwachstum sowohl auf als auch um die Materialien erzielt werden. Die Zellen zeigten eine phänotypisch gestreckte Morphologie und waren in einer mit der Kontrolle vergleichbaren Zellzahl vorhanden. Auf den Materialien 3a-1 und 3a-2 waren keine lebensfähigen Zellen zu sehen. Allerdings konnten seitlich an den Rändern der Wells vitale Zellen beobachtet werden. Es ließen sich dabei mehr vitale Zellen in Wells mit 3a-2 als mit 3a-1 feststellen (Abbildung 6E bzw. D eingefügte Bilder).

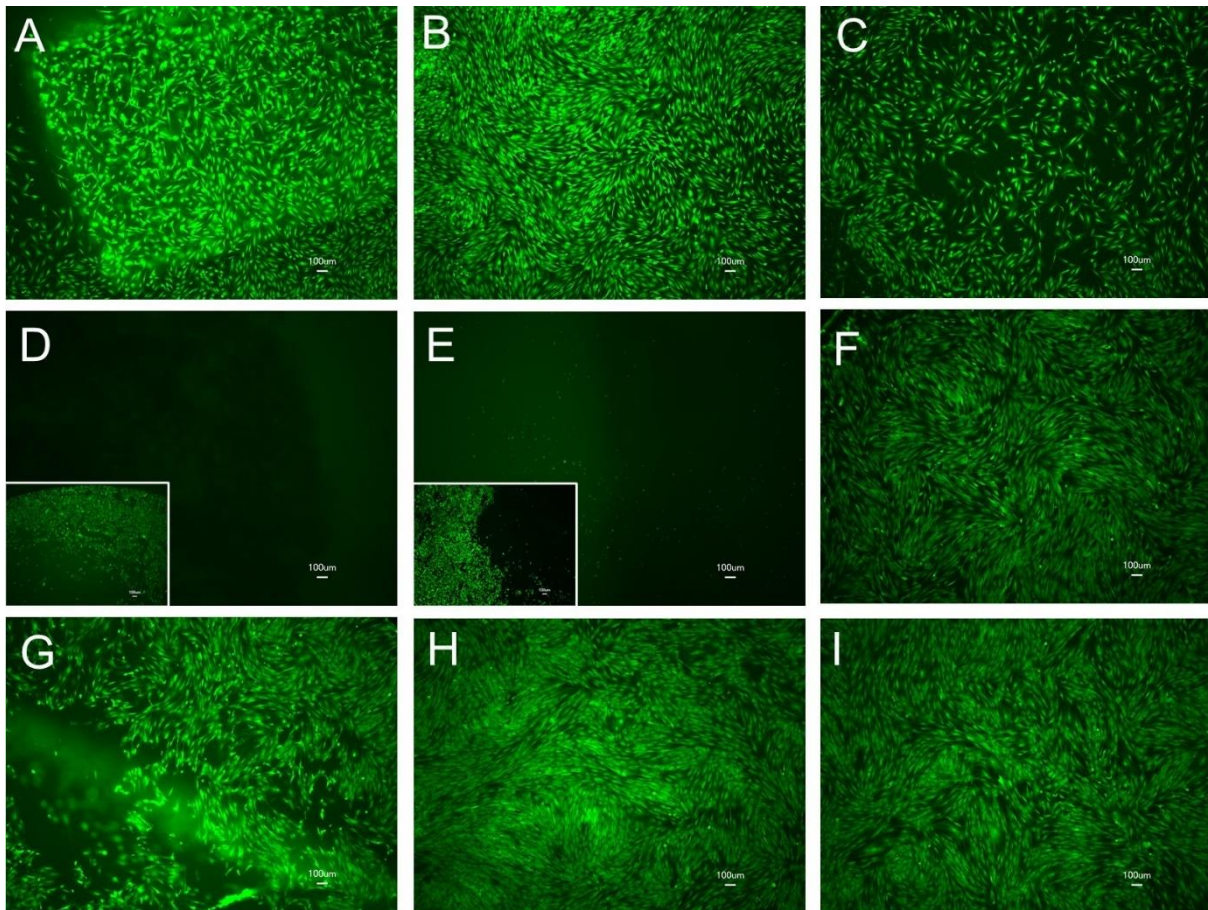


Abbildung 7: Vitalfärbung Calcein-AM von pOB mit den Biomaterialien

Die Zellen wurden auf den Biomaterialien ausgesät und nach 5 Tagen mit Calcein-AM gefärbt. Der Maßstab entspricht 100 µm. **A:** 1 **B:** 2a **C:** 2b **D:** 3a-1 **E:** 3a-2 **F:** ROGG **G:** pP **H:** pD **I:** Kontrolle

Abbildung 7 zeigt das Wachstum von primären Osteoblasten auf den Biomaterialien. Die pOB wuchsen homogen – sowohl auf als auch neben 1, 2a und 2b. Mit den Vergleichsmaterialien ROGG, pP und pD konnte ebenfalls ein homogenes Zellwachstum sowohl auf als auch neben den Materialien beobachtet werden. Das Zellwachstum auf und um die Materialien ähnelt dem Wachstum der Kontrollzellen auf dem Zellkulturplastik.

Für die Materialien 3a-1 und 3a-2 zeigten die pOB ein ähnliches Wachstumsmuster wie SaOs-2 (Abbildung 6). Auf den Materialien 3a-1 und 3a-2 konnten keine lebenden Zellen ausgemacht werden. Jedoch befanden sich vitale Zellen neben den Materialien, an den Rändern der Wells. Auch hier konnten in Wells mit Material 3a-2 mehr vitale Zellen beobachtet werden als in Wells mit 3a-1 (Abbildung 7E bzw. D eingefügte Bilder).

4.5 Einfluss der Materialien auf die Genexpression der Zellen

Die Genexpressionsmuster der Zellen auf den verschiedenen Materialien wurden mittels PCR untersucht und sind in Abbildung 8–11 zu sehen. In Fällen, in denen die Aktin-Amplifikation keine Bande gezeigt hat oder in denen die Aktin-Banden nur schwach waren, wurde die RNA-Isolierung aus den Zellen wiederholt und die beste von 4–5 unabhängigen RNA/cDNA-Isolierungen verwendet (Daten nicht gezeigt). Es konnte in allen Fällen RNA aus den Zellen, die 5 Tage in Kultur mit den Materialien waren, isoliert (basierend auf Nanodrop-Messungen) und für die cDNA-Synthese verwendet werden.

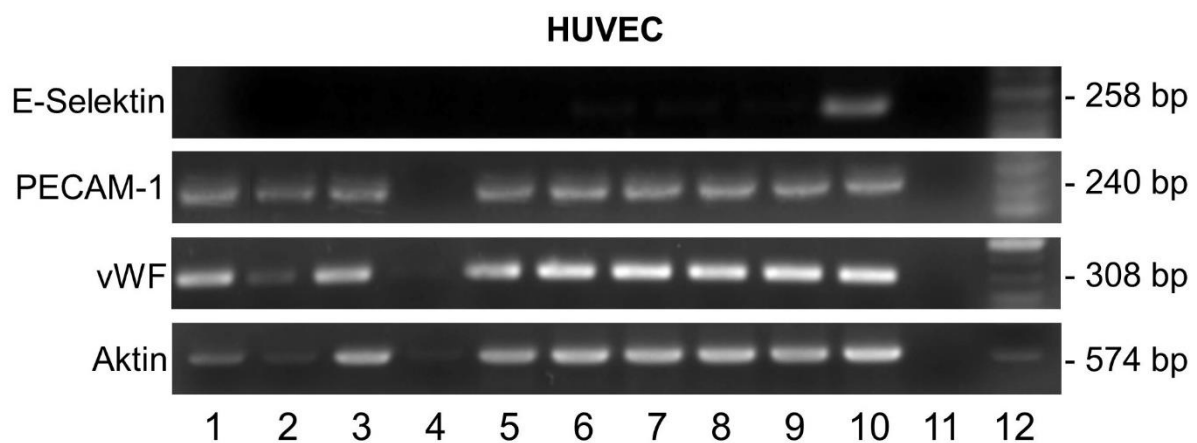


Abbildung 8: PCR Ergebnisse von HUVEC mit den Biomaterialien

Die Untersuchung der Genexpression erfolgte nach 5-tägiger Inkubation mit den Biomaterialien.

Die untersuchten Gene sind links dargestellt. Die Materialien sind unten aufgelistet und sind:

1: 1, 2: 2a, 3: 2b, 4: 3a-1, 5: 3a-2, 6: ROGG, 7: pP, 8: pD 9: Nur Zellen 10: Zellen + LPS

11: Wasser 12: Leiter. Die Größe des amplifizierten Produkts ist rechts zu sehen.

Wie in Abbildung 8 ersichtlich ist, konnte mit den meisten Biomaterialien ein Aktin-Amplifikationsprodukt nachgewiesen werden. Mit RNA der auf 3a-1 kultivierten HUVEC konnte keine Aktin-Bande beobachtet werden. Die Amplifikation der cDNA von auf 1 und 2a kultivierten HUVEC ergab nur eine schwache Aktin-Bande. Die vWF und PECAM-1 Genexpression von HUVEC war auf allen Materialien ähnlich. Eine E-Selektin Genexpression wurde nur nach zusätzlicher Stimulation mit LPS beobachtet. Die auf den Biomaterialien kultivierten Zellen zeigten keine E-Selektin Genexpression.

Für die Untersuchung der Genexpression von Osteoblasten auf den Materialien wurden zwei Osteoblasten-Zelllinien, MG-63 und SaOs-2, sowie primäre Osteoblasten (pOB) verwendet (Abbildung 9–11).

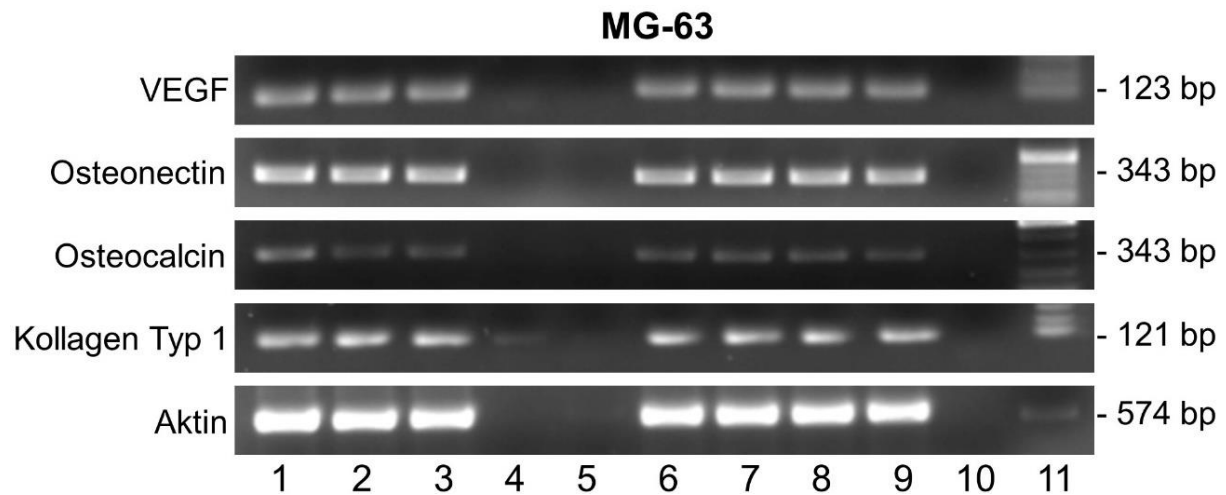


Abbildung 9: PCR Ergebnisse von MG-63 mit den Biomaterialien

Die Untersuchung der Genexpression erfolgte nach 5-tägiger Inkubation mit den Biomaterialien.

Die untersuchten Gene sind links dargestellt. Die Materialien sind unten aufgelistet und sind:

1: 1, 2: 2a, 3: 2b, 4: 3a-1, 5: 3a-2, 6: ROGG, 7: pP, 8: pD 9: Nur Zellen 10: Wasser 11: Leiter

Die Größe des amplifizierten Produkts ist rechts zu sehen.

Wie in Abbildung 9 für MG-63 zu sehen ist, konnte mit allen Materialien, mit Ausnahme der PAC-haltigen Materialien, 3a-1 und 3a-2, eine starke Aktin-Bande beobachtet werden. In den Proben, in denen eine Aktin-Bande zu sehen war, konnte ebenfalls eine Expression von Kollagen Typ 1, Osteocalcin, Osteonectin und VEGF beobachtet werden. Für Osteopontin konnte in keiner der Proben ein Amplifikationsprodukt nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die Osteocalcin-Bande wies, im Vergleich zu den anderen Genen, eine insgesamt geringere Intensität auf. Eine sehr schwache Kollagen Typ 1-Bande wurde mit auf 3a-1 kultivierten Zellen erzielt.

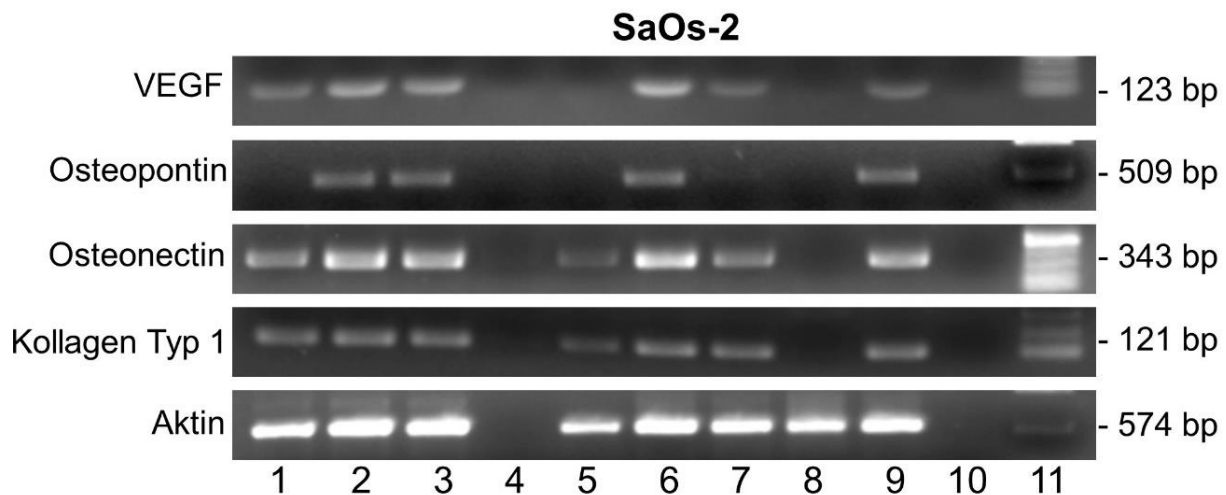


Abbildung 10: PCR Ergebnisse von SaOs-2 mit den Biomaterialien

Die Untersuchung der Genexpression erfolgte nach 5-tägiger Inkubation mit den Biomaterialien.

Die untersuchten Gene sind links dargestellt. Die Materialien sind unten aufgelistet und sind:

1: 1, 2: 2a, 3: 2b, 4: 3a-1, 5: 3a-2, 6: ROGG, 7: pP, 8: pD 9: Nur Zellen 10: Wasser 11: Leiter

Die Größe des amplifizierten Produkts ist rechts zu sehen.

Die Expression von Osteoblasten-Genen durch SaOs-2 auf den verschiedenen Materialien ist in Abbildung 10 dargestellt. Die Genexpression wies insgesamt eine große Variabilität auf. Mit Ausnahme, der auf 3a-1 kultivierten Zellen, konnte mit allen anderen Materialien ein Aktin-Amplifikationsprodukt nachgewiesen werden. Die Expression von Kollagen Typ 1 war auf den verschiedenen Materialien relativ homogen, die Expression von Osteonectin, Osteopontin und VEGF variierte jedoch stark. Die Kollagen Typ 1 Expression konnte nicht mit auf 3a-1 und pD kultivierten Zellen nachgewiesen werden. Die mit 3a-2 inkubierten SaOs-2 zeigten nur eine geringe Expression an Kollagen Typ 1.

Die Expression von Osteonectin und VEGF war mit den meisten Materialien ähnlich, mit Ausnahme der PAC-haltigen Materialien 3a-1 und 3a-2 sowie pD, mit denen keine oder nur eine schwache Expression dieser Gene nachgewiesen werden konnte.

Die Expression von Osteopontin wies eine sehr starke Variabilität auf und konnte nur mit auf 2a, 2b und ROGG kultivierten Zellen beobachtet werden.

Ein Osteocalcin-Amplifikationsprodukt konnte nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

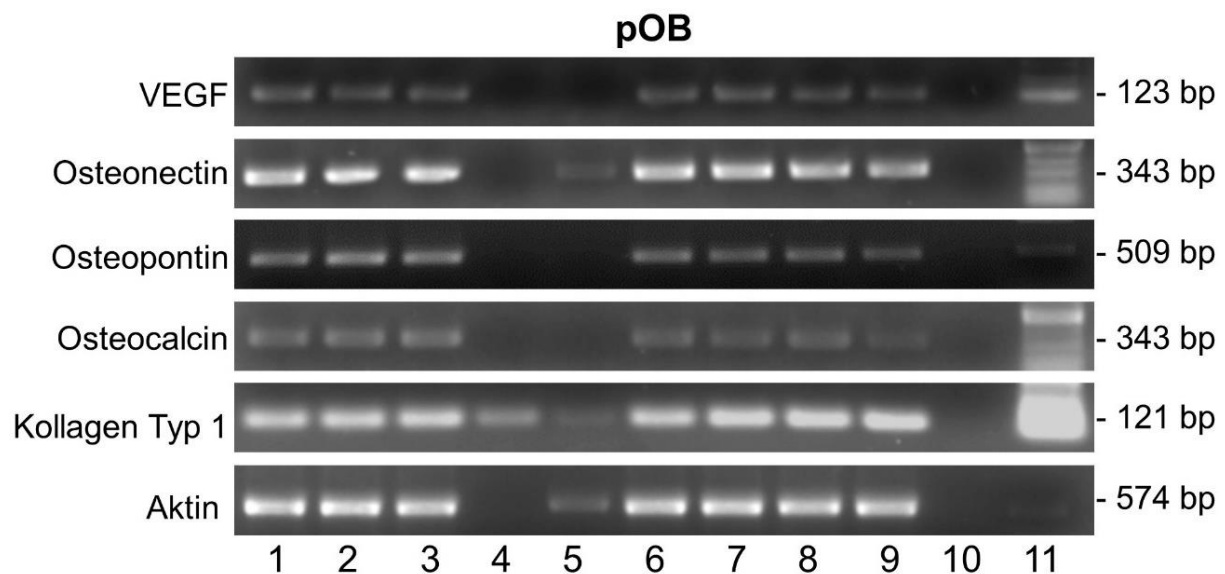


Abbildung 11: PCR Ergebnisse von pOB mit den Biomaterialien

Die Untersuchung der Genexpression erfolgte nach 5-tägiger Inkubation mit den Biomaterialien.

Die untersuchten Gene sind links dargestellt. Die Materialien sind unten aufgelistet und sind:

1: 1, **2:** 2a, **3:** 2b, **4:** 3a-1, **5:** 3a-2, **6:** ROGG, **7:** pP, **8:** pD **9:** Nur Zellen **10:** Wasser **11:** Leiter

Die Größe des amplifizierten Produkts ist rechts zu sehen.

Die Genexpression von den, mit den unterschiedlichen Biomaterialien kultivierten pOB, ist in Abbildung 11 dargestellt. Ähnlich wie bei den anderen Zellen, konnte mit 3a-1 ebenfalls kein Aktin-Amplifikationsprodukt und nur eine leichte Aktin-Bande mit 3a-2 beobachtet werden. Die Intensitäten der unterschiedlichen Amplifikationsprodukte waren für die weiteren Materialien untereinander vergleichbar. Es konnte eine starke Expression von Kollagen Typ 1 und Osteonectin beobachtet werden, sowie eine geringere Intensität der Banden für Osteocalcin, Osteopontin und VEGF. Somit wiesen die pOB auf allen Materialien, mit Ausnahme der PAC-haltigen Materialien, eine zelltypische Genexpression auf. Überraschenderweise konnte eine leichte Kollagen Typ 1-Bande mit auf 3a-1 kultivierten pOB beobachtet werden. Eine noch schwächere Kollagen Typ 1-Bande konnte mit auf 3a-2 kultivierten Zellen beobachtet werden.

5 Diskussion

Die Versorgung von Knochendefekten stellt eine anspruchsvolle Aufgabe dar, der sich die regenerative Medizin mit großer Häufigkeit stellen muss. Im Jahr 2018 wurden in Deutschland allein im stationären Rahmen fast 100 000 operative Prozeduren durchgeführt, in denen Knochenersatzmaterialien oder Knochentransplantate zum Einsatz kamen (Rupp et al. 2021). Dabei wurden in 24 % der Fälle Biomaterialien für die Rekonstruktion des Knochendefekts verwendet (Rupp et al. 2021). Der globale Markt für Knochentransplantate und Knochenersatzmaterialien hatte 2020 bereits einen Wert von ca. 2,91 Mrd. US-Dollar und dieser wird schätzungsweise im Jahr 2028 auf 4,3 Mrd. US-Dollar ansteigen (Grand View Research 2021). Daher dürfte auch weiterhin bei der Entwicklung und Nachfrage von Biomaterialien ein stetiger Anstieg zu erwarten sein.

Ein für die Knochenregeneration geeignetes Biomaterial sollte dem Konzept des Tissue Engineerings folgen und den Zellen ein Gerüst bieten, in das diese immigrieren können (O'Brien 2011). Auf diese Weise soll im Idealfall, biologisches Gewebe aus den körpereigenen Zellen des Patienten entstehen (O'Brien 2011). Das Biomaterial sollte die Proliferation und Differenzierung der auf ihm befindlichen Zellen fördern sowie osteoinduktiv und osteokonduktiv sein (Rico-Llanos et al. 2021). Bevor ein Biomaterial beim Menschen zum Einsatz kommen kann, bedarf es einer genauen Sicherheitsbewertung, in der die Biokompatibilität *in vitro* sowie *in vivo* geprüft wird (Unger 2014).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Evaluation der Biokompatibilität der zur Verfügung gestellten Testmaterialien anhand ausgewählter *in vitro* Studien vorgenommen. Basis der getesteten Biomaterialien war ein Kollagengerüst, das entweder mit Glykosaminoglykanen versehen oder mit Proanthocyanidinen vernetzt wurde. Kollagen findet breite Anwendung im Tissue Engineering, da es in großen Mengen gewonnen werden kann und durch eine sehr gute Biokompatibilität, biologische Abbaubarkeit sowie eine geringe Immunogenität charakterisiert ist (Lee et al. 2001). Studien zeigen, dass sich Kollagengerüste positiv auf die Osteoblasten-Differenzierung auswirken und somit die Knochenbildung unterstützen können (Marinucci et al. 2001; Yang et al. 2016; Salamanca et al. 2020; Liu et al. 1999). Kollagen dient den Zellen nicht nur als Stütze, sondern kann über rezeptorvermittelte

Bindungen direkt mit ihnen interagieren und so die osteoblastische Zelldifferenzierung fördern (Mizuno et al. 2000). Von besonderer Bedeutung ist der Zusatz der bioaktiven Glykosaminoglykane, Hyaluronan und Chondroitinsulfat, sowie dem natürlichen Quervernetzer Proanthocyanidin in den Testmaterialien. Als bedeutender Bestandteil der extrazellulären Matrix spielt Hyaluronan eine zentrale Rolle in der Wundheilung und kann zudem die Osteogenese und Angiogenese unterstützen (Frenkel 2014; Zhai et al. 2020). Ihm konnte in mehreren Studien eine positive Wirkung auf die Osteoblasten-Proliferation und Knochenregeneration, insbesondere in Kombination mit Kollagen, nachgewiesen werden (Liu et al. 1999; Marinucci et al. 2001). Chondroitinsulfat ist ebenfalls ein wichtiger Bestandteil der extrazellulären Matrix und ist in der Lage, geladene Ionen sowie Osteoblasten zu binden und somit die Knochenbildung zu unterstützen (Förster et al. 2012). In Studien konnte Chondroitinsulfat die Proliferation, Adhäsion sowie osteogene Zelldifferenzierung von Osteoblasten *in vitro* sowie *in vivo* verbessern (Vandrovcová et al. 2011; Kim et al. 2017). Hyaluronan und Chondroitinsulfat scheinen demnach vielversprechende Ergänzungen für Kollagen-basierte Biomaterialien zu sein, da sie weitere Bestandteile einer künstlichen Matrix liefern und somit zur Verbesserung der Knochenheilung beitragen können.

Proanthocyanidine (PAC) sind eine Gruppe von biologisch aktiven Polyphenolen, die von vielen Pflanzen synthetisiert werden. Durch ihre antioxidative sowie die Angiogenese fördernde Wirkung können sie die Wundheilung unterstützen (Bagchi et al. 2000; Khanna 2001; Khanna et al. 2002). Unter der Supplementierung von Traubenkern-extrakt konnte eine vermehrte Kallusbildung mit erhöhter Knochenfestigkeit sowie eine antiosteoporotische Wirkung, durch die Stimulation der Knochenbildung und Regulation der Knochenresorption, beobachtet werden (Gurger et al. 2019; Oršolić et al. 2018). Des Weiteren konnten PAC bereits erfolgreich als Quervernetzer in Kollagen-basierten Biomaterialien eingesetzt werden (Han et al. 2003; Choi et al. 2016). Dabei hatten PAC eine ca. 120-mal geringere toxische Wirkung auf Fibroblasten in Kultur als der häufig verwendete Quervernetzer Glutaraldehyd (Han et al. 2003). Zudem konnte beobachtet werden, dass PAC die physikalischen Eigenschaften eines Kollagengerüsts verbessern und die Proliferation von humanen Zellen des parodontalen Ligaments unterstützen (Choi et al. 2016). Chen et al. (2008) stellten fest, dass aus einem Gelatine-Tricalciumphosphat

(GTP) -PAC-Gerüst freigesetzte Proanthocyanidine die Proliferation von MG-63 fördert. *In vivo* Studien zeigten ebenfalls, dass ein PAC vernetztes GTP-Gerüst erfolgreich als Ersatz für Knochendefekte genutzt werden kann (Chen et al. 2009).

5.1 Einfluss der Zellwahl

Der Prozess der Knochenneubildung, des Umbaus und der Regeneration benötigt die gute Koordination verschiedener Zellen. Um diesen Prozess in einem Modell nachahmen zu können, müssen die natürlichen Vorgänge *in vitro* möglichst gut imitiert werden. Für dieses Vorhaben stehen Primärzellen und Zelllinien zur Auswahl. Für die *in vitro* Analyse von Biomaterialien, die in der Knochenrekonstruktion eingesetzt werden sollen, sind expandierte Primärkulturen von humanen Osteoblasten besonders geeignet, da sie direkt aus Spendermaterial isoliert werden und somit die *in vivo* Bedingungen am besten widerspiegeln (Unger et al. 2009; Siggelkow et al. 1999). Allerdings erschweren die spenderspezifischen Unterschiede in den Zellphänotypen sowie die instabile Differenzierung von Zellen in Kultur die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse (Czekanska et al. 2012). Insbesondere das Spenderalter und -geschlecht kann Auswirkungen auf die Genexpression haben (Zhang et al. 2004). In den genannten Experimenten wurden humane primäre Endothelzellen sowie Osteoblasten verwendet. Da Endothelzellen in der Knochenregeneration eine essenzielle Bedeutung haben, ist es sinnvoll, diese ebenfalls in die Evaluation des Biomaterials miteinzubeziehen (Velnar und Gradisnik 2018). Ein Nachteil primärer Zellen ist, dass diese nicht unbegrenzt lange kultiviert werden können, ohne dass einige ihrer Eigenschaften möglicherweise verloren gehen (Kengla et al. 2017). Aufgrund dieser Problematik wurden die in der Forschung etablierten humanen Osteosarkomzelllinien SaOs-2 und MG-63 in den Versuchsaufbau integriert (Czekanska et al. 2012). Diese bieten einige Vorteile – unter anderem die fehlende spenderspezifische Variabilität sowie eine bessere Reproduzierbarkeit. Allerdings sollte bei der Bewertung der Ergebnisse der maligne Ursprung dieser Zelllinien berücksichtigt werden (Pautke et al. 2004).

5.2 Sterilitätsprüfung

Bevor ein Biomaterial in Zellstudien untersucht werden kann, muss dessen Sterilität nachgewiesen werden. Eine Kontamination kann auf unterschiedliche Weise verursacht werden. Zum einen werden die Materialien aus biologischen Proben gewonnen, die eine große Anzahl an Mikroorganismen beinhalten. Zum anderen, kann auch die Verarbeitung der Biomaterialien eine Verunreinigung mit Mikroorganismen hervorrufen. Durch das Einlegen des Biomaterials in steriles Zellmedium, kann eine Kontamination mit Mikroorganismen leicht festgestellt werden (Unger 2014). Diese können sich in dem Medium vermehren und verursachen so eine sichtbare Trübung des Zellmediums (Unger 2014). Um sicher zu gehen, dass das erhaltene Material steril war und auch durch das Zerkleinern keine Kontamination entstanden ist, wurde der zuvor beschriebene Sterilitätstest durchgeführt. Dabei wurde eine längere Inkubationszeit von 96 Stunden gewählt, um sicherzustellen, dass selbst eine sehr geringe Menge an Mikroorganismen nachweisbar sein würde. Der Test wurde mit drei zufällig ausgewählten Stücken eines jeden Materials durchgeführt, um die Ergebnisse wiederholen und vergleichen zu können. Alle Tests ergaben, dass die Materialien steril waren und für die weiteren Experimente verwendet werden konnten.

5.3 Untersuchung der Zytotoxizität

Biomaterialien können aus verschiedenen natürlichen oder synthetischen Materialien hergestellt werden. Im Herstellungsprozess kommen unterschiedliche Chemikalien, Lösungen und Lösungsmittel zur Anwendung, die eine toxische Wirkung auf Zellen haben können. Um festzustellen, ob ein Biomaterial frei von potenziell zelltoxischen Verbindungen ist, besteht die Möglichkeit, ein Materialextrakt nach der ISO 10993-5 (2009-06) Methodik *in vitro* zu testen. Dafür wird das Biomaterial in steriles Medium gegeben, für 24 h inkubiert und nach erfolgter Zentrifugierung kann der Extrakt zu den Zellen gegeben und die Auswirkung auf die Zellvitalität evaluiert werden. Hierfür bietet der Resazurin-Reduktionstest die Möglichkeit, den Einfluss des Extrakts auf die metabolische Aktivität der Zellen zu bestimmen (Gong et al. 2020). Vitale Zellen reduzieren den blauen, nicht fluoreszierenden Farbstoff Resazurin in die pinke, fluoreszierende Form Resorufin, die leicht gemessen werden kann (O'Brien et al.

2000). Eine Verminderung von Resorufin zeigt eine Reduktion der metabolischen Aktivität der Zellen, beziehungsweise eine Reduktion der vitalen Zellen und lässt somit Rückschlüsse auf die Toxizität eines Materials zu (Borra et al. 2009). Durch die 72-stündige Inkubation der Zellen mit den Extrakten der Biomaterialien, lassen sich auch die längerfristigen Effekte auf die Zellen darstellen. Für diesen Zweck wurde die Mausfibroblastenzelllinie L929 verwendet. Sie ist eine etablierte Zelllinie in Untersuchungen zur Zytotoxizität von Biomaterialien und wird von ISO 10993-5 (2009-06) empfohlen. Des Weiteren wurde die metabolische Aktivität der Osteosarkom-zelllinien MG-63 sowie SaOs-2 nach der Inkubation mit Extrakten der Biomaterialien analysiert. Als Beispiel für gesunde Zellen, die im Rahmen der Knochenheilung eine elementare Rolle spielen, wurde außerdem die Auswirkungen der Biomaterialien auf die metabolische Aktivität von primären Endothelzellen (HUVEC) und primären Osteoblasten (pOB) untersucht.

Die Inkubation von L929, HUVEC, MG-63, SaOs-2 und pOB mit den Extrakten aus 1, 2a und 2b ließ nach 72 Stunden eine zur unbehandelten Kontrolle vergleichbare Zellvitalität, ohne signifikante Unterschiede, beobachten. Dies lässt darauf schließen, dass die Materialien 1, 2a und 2b keine zytotoxischen Eigenschaften aufwiesen.

Auf die Zelllinie L929 hatte die Inkubation mit den Extrakten der PAC-haltigen Materialien einen toxischen Effekt. Dieser fiel am stärksten mit dem höher dosierten PAC-Material 3a-1 (1:1 Kollagen/PAC) aus. Bereits nach 48-stündiger Inkubation war eine hoch signifikant reduzierte Zellzahl mit diesem Extrakt zu beobachten. Für den Extrakt aus 3a-2 (2:1 Kollagen/PAC) konnte eine graduelle Reduktion der metabolischen Aktivität festgestellt werden, die jedoch nicht statistisch signifikant war.

Die Osteosarkomzelllinien MG-63 und SaOs-2 sowie die pOB wiesen bereits nach 24-stündiger Inkubation mit den Extrakten der PAC-haltigen Materialien eine verringerte metabolische Aktivität auf. Der toxische Effekt fiel dabei ebenfalls mit dem höher dosierten PAC-haltigen Material 3a-1 deutlicher aus. Spätestens nach 48-stündiger Inkubation mit den Extrakten der PAC-haltigen Materialien konnte mit allen osteoblastischen Zellen eine hoch signifikant reduzierte Zellzahl beobachtet werden.

Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Zellen, hatten die PAC-haltigen Materialien keinen toxischen Effekt auf HUVEC. Nach 72-stündiger Inkubation mit den Extrakten aus 3a-1 und 3a-2 wurde eine zur Kontrolle vergleichbare Zellzahl beobachtet.

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse darauf schließen, dass zelltoxische Substanzen aus den PAC-haltigen Materialien 3a-1 und 3a-2 ausgespült wurden.

Um die Auswirkungen der in den Biomaterialien verwendeten PAC auf Zellen in Kultur zu evaluieren, wurden Resazurin-Studien mit aufsteigenden PAC-Konzentrationen durchgeführt. In diesen konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass höhere PAC-Konzentrationen einen toxischen Effekt auf Zellen in Kultur haben. Ein direkter Vergleich zu den Resazurin Versuchen mit den Extrakten der Biomaterialien, lässt sich allerdings nicht ziehen, da eine Messung der in das Zellkulturmedium ausgespülten PAC, aufgrund von Interferenzen mit Substanzen des Mediums, nicht möglich war.

Die Ergebnisse des Toxizitätstest mit den PAC-haltigen Biomaterialien decken sich nur teilweise mit den in der Literatur vorhandenen Ergebnissen. Ye et al. (1999) beobachteten eine selektive Toxizität von PAC gegenüber einigen menschlichen Krebszellen, während das Wachstum und die Vitalität der normalen humanen Zellen erhöht wurde. Im Gegensatz dazu, zeigten die Ergebnisse dieser Arbeit eine zeit- und konzentrationsabhängige Toxizität von PAC auf alle untersuchten Zellen. Auch die Extrakte der PAC-haltigen Biomaterialien hatten auf alle osteoblastischen Zellen einen toxischen Effekt. Chen et al. (2008) beobachteten einen positiven Effekt auf die Proliferation von MG-63 nach Inkubation mit den Extrakten eines PAC-haltigen GTP-Materials. Ähnliche Erkenntnisse konnten auch Chen et al. (2013) mit mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark einer Ratte und dem Extrakt eines GTP-PAC-Gerüsts gewinnen. In Kontrast dazu, wurde in dieser Arbeit eine Abnahme der Zellproliferation aller osteoblastischen Zellen nach Inkubation mit den Extrakten von 3a-1 und 3a-2 beobachtet. Allerdings unterscheiden sich die Studien in der Art der verwendeten Materialien, im Massenverhältnis von PAC in den Biomaterialien sowie in Bezug auf Zellzahl, Zellart und Kultivierungsbedingungen. Übereinstimmend mit den vorliegenden Ergebnissen konnten bereits vorherige Studien einen toxischen Effekt auf humane Krebszelllinien sowie Zellen des parodontalen Ligaments mit ansteigender PAC-Konzentration *in vitro* feststellen (Albogami 2020; Ye et al. 1999; Choi et al. 2016; Wu et al. 2020; Katiyar und Athar 2013; Shejawal et al. 2020).

Eine mögliche Erklärung für das Auftreten von Toxizität bei den Extrakten der Materialien 3a-1 und 3a-2 ist der dort enthaltene hohe Massenanteil von PAC. Dieser beträgt, bezogen auf Kollagen, in 3a-1 50 wt% und in 3a-2 33 wt%. Eine mögliche Erklärung wäre, dass PAC aufgrund der hohen Konzentration ungebunden im Kollagen vorlagen und somit in den Extrakt übergehen konnten und dort zytotoxische Effekte auf die Zellen hatten, wie sie ebenfalls im Resazurin-Reduktionstest mit ansteigenden PAC-Konzentrationen beobachtet werden konnten.

Interessanterweise hatten die PAC-haltigen Extrakte aus 3a-1 und 3a-2 keinen toxischen Effekt auf HUVEC. In der Literatur lassen sich verschiedene positive Auswirkungen von PAC auf Endothelzellen finden. Zum einen konnte beobachtet werden, dass PAC *in vivo* sowie *in vitro* oxidative Endothelzellschäden, die durch hohe Glucosespiegel entstehen können, mindern und bereits aufgetretene Schäden rückgängig machen können und so potenziell zur Verhinderung von endothelialen Dysfunktionen beitragen könnten (Liu et al. 2016; Pinna et al. 2017; Jiang et al. 2015). Des Weiteren wurde bereits die positive Auswirkung von PAC auf die Endothelzellproliferation beschrieben (Liu et al. 2016; Ma et al. 2019). In der Studie von Ma et al. (2019) wurde der stimulierende Effekt des PAC-Zusatzes zu einem Calciumsilikat-Natriumalginat-Gerüsts auf die Proliferation und Migration von auf ihm kultivierten HUVEC beobachtet. Außerdem zeigten PAC zytoprotektives Potential, indem sie die Apoptose kultivierter Endothelzellen verhinderten (Alqahtani et al. 2019). Ferner konnte beobachtet werden, dass PAC verschiedene Veränderungen mit vaskuloprotektiver Wirkung, wie z. B. die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts, in kultivierten Endothelzellen auslösten (Caton et al. 2010).

Ein möglicher Anhaltspunkt dafür, warum die PAC-haltigen Materialien in dieser Arbeit keinen toxischen Effekt auf die verwendeten Endothelzellen, wohl aber auf die getesteten Osteoblasten hatten, könnte der physiologische Aufnahmeweg von PAC bieten. Unter natürlichen Bedingungen werden PAC über die Nahrung aufgenommen und gelangen über die Enterozyten in die Pfortader und anschließend über die Leber und Blutbahn zu anderen Organen (Ou und Gu 2014). Dass Endothelzellen weniger sensibel auf höhere PAC-Konzentrationen reagieren, könnte folglich darauf beruhen, dass sie auf natürlichem Wege früher als nachgeschaltete Gewebe mit ihnen in Berührung kommen. Ferner ist die Analyse des PAC-Gehalts im Gewebe nach Nahrungsaufnahme schwierig und es stellt sich die Frage, in welchem Ausmaß und in

Form welcher Metaboliten, PAC unter physiologischen Bedingungen überhaupt aus der Blutbahn in die Gewebe übertreten (Xu et al. 2012; Serrano et al. 2009).

5.4 Endotoxintest

Endotoxine, auch bekannt als bakterielle Lipopolysaccharide (LPS), befinden sich in der äußeren Zellmembran von gramnegativen Bakterien und können bei der Zerstörung der Bakterien, beispielsweise durch Erhitzen, freigesetzt werden (Wang und Quinn 2010). Sie können sich selbst in sterilen Materialien befinden, da sie sehr hitzestabil und unempfindlich gegenüber schwankenden pH-Werten sind (Almeida et al. 2016). Endotoxine können bereits in kleinsten Mengen das Immunsystem sowie die Gerinnungskaskade aktivieren und somit zu Entzündung, Gewebeerstörung bis hin zum septischen Schock führen (Opal 2010). Neben einer guten Funktionalität sowie Biokompatibilität ist somit auch die Abwesenheit von Endotoxinen ein Grundkriterium für den Einsatz eines Biomaterials (ISO 10993-1 (2018-08)). Gegenwärtig ist der Limulus-Amöbozyten-Lysat (LAL)-Gerinnungstest das am weitesten verbreitete Testsystem zum Nachweis von Endotoxinen (Schneier et al. 2020). Für diesen Test wird ein Lysat aus den Blutzellen (Amöbozyten) des Pfeilschwanzkrebsses (*Limulus polyphemus*) gewonnen, das durch die Stimulation geringer Endotoxinkonzentrationen koaguliert (Unger et al. 2014). Jedoch bestehen neben den hohen Kosten beim Einsatz dieses Testsystems auch ethische Bedenken, was die Einführung einer Alternative wünschenswert macht (Unger et al. 2014).

Humane primäre Endothelzellen reagieren *in vitro* auf die Stimulation durch proinflammatorische Reize wie LPS durch die Produktion des Zelladhäsionsmoleküls E-Selektin auf der Zelloberfläche (Bevilacqua et al. 1987). Diese Expression von E-Selektin kann mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen sichtbar gemacht werden (Unger et al. 2014). Zudem konnte nachgewiesen werden, dass diese Methode ebenso sensitiv wie der LAL-Test ist (Unger et al. 2014). Des Weiteren sind Endothelzellen im Organismus unmittelbar an den von Endotoxinen ausgelösten, pathologischen Reaktionen beteiligt und somit ist es von Vorteil diese bereits in die Endotoxin-Testung miteinzubeziehen (Unger et al. 2014).

Bei der Immunfluoreszenzfärbung von HUVEC nach der Inkubation mit den Extrakten der Testmaterialien konnte keine Expression von E-Selektin festgestellt werden und somit konnte davon ausgegangen werden, dass die Materialien Endotoxin frei waren. Dies deutet darauf hin, dass das Wachstum von Bakterien, die für das Vorhandensein von Endotoxinen verantwortlich sind, während der Herstellung der Biomaterialien verhindert wurde oder die Endotoxine nach dem Herstellungsprozess erfolgreich entfernt wurden.

5.5 Zellen auf den Biomaterialien

Für den Erfolg eines Biomaterials *in vivo* ist die Adhäsion sowie Migration von Zellen auf und in das Material obligat. Dies kann *in vitro* anhand von Zellen oder Zelllinien, die das Zielgewebe repräsentieren, studiert werden. Hierfür werden diese Zellen auf den Biomaterialien ausgesät, für eine bestimmte Zeit inkubiert und anschließend angefärbt und mit Hilfe eines Mikroskops begutachtet.

Die in dieser Arbeit verwendete Färbung Calcein-AM dient der kurzzeitigen Markierung von vitalen Zellen (Weston und Parish 1990). Der Farbstoff gelangt durch die Zellmembran in die Zellen und wird in vitalen Zellen enzymatisch zu grün fluoreszierendem Calcein gespalten. Die markierten Zellen können dann unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden.

Im Rahmen dieser *in vitro* Studie wurde ein insgesamt gutes Wachstum der Zellen auf den Biomaterialien 1, 2a sowie 2b beobachtet. Die untersuchten Zellen zeigten eine gute Adhärenz und eine phänotypische Morphologie. Eine Ausnahme bildeten HUVEC, die auf 2b nur ein mäßiges Wachstum zeigten. Jedoch konnte mit den Vergleichsmaterialien ROGG, pP und pD ein umfangreicheres Zellwachstum erzielt werden.

Das Wachstum der Zellen auf dem reinen Kollagenmaterial 1 war insgesamt gut und für die Primärzellen HUVEC und pOB war dies vergleichbar mit dem der Kontrollzellen auf Zellkulturplastik. Basl et al. (1998) beschreiben, dass auf Kollagen-haltigen Materialien kultivierte SaOs-2 eine gestreckte Form, mit Ausrichtung entlang der Kollagen-Bündel aufweisen. Diese Morphologie konnte ebenfalls auf den Testmaterialien 1, 2a und 2b beobachtet werden.

Die getesteten Osteosarkomzelllinien konnten gut an 1 adhären, zeigten jedoch ein insgesamt umfangreicheres Wachstum auf dem Zellkulturplastik. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen der Studie von Rothamel et al. (2004) überein. Dort konnte ebenfalls ein besseres Wachstum von SaOs-2 auf Zellkulturplastik, verglichen mit dem Wachstum auf einem Kollagen-basierten Biomaterial, erzielt werden (Rothamel et al. 2004). Im Gegensatz dazu, wurde in der Studie von Schmidt et al. (2011) ein vergleichbar gutes Wachstum von SaOs-2 Zellen auf einer Kollagenmembran sowie auf konventionellen Kulturplatten festgestellt. Des Weiteren konnten Salamanca et al. (2020) eine gesteigerte Proliferation und Konfluenz osteoblastischer Zellen durch den Kollagenzusatz eines Biomaterials, im Vergleich zur reinen Mediumkontrolle, feststellen. Dies konnte mit den Testmaterialien jedoch nicht erreicht werden.

Die Ergebnisse der Studie von pOB auf dem Hyaluronan(HA)-basierten Biomaterial 2a decken sich mit dem Ergebnis der Studie von Wiedmann-Al-Ahmad et al. (2005), die ebenfalls gutes Wachstum von primären Osteoblasten auf HA-basierten Biomaterialien beschreiben. Auch in der Studie von Mathews et al. (2014) mit humanen mesenchymalen Stammzellen aus Knochenmark, kultiviert auf HA-haltigen Biomaterialien, zeigte sich ein umfangreiches Zellwachstum auf den Materialien. Allerdings beschreiben Mathews et al. (2014), dass 24 h nach Zugabe der Zellen zum Biomaterial nur vereinzelt Zellansammlungen zu beobachten waren, diese sich allerdings nach 14 Tagen zu einem konfluenten Zellrasen sowohl auf als auch in dem Material ausgebreitet hatten. Somit ist davon auszugehen, dass nach einer längeren Kultivierungszeit noch mehr Zellen auf und in das Biomaterial migrieren. Obwohl das Zellwachstum auf dem Biomaterial 2a insgesamt gut war, konnte mit den Vergleichsmaterialien ROGG, pP und pD eine bessere Zellanhaftung erreicht werden.

Mathews et al. (2014) stellten fest, dass die Verringerung der HA-Konzentration in einem Chitosan-Kollagen-HA-Gerüst, zu einer gleichmäßigeren Mikrostruktur und einer besseren Osteogenese führt. Durch eine Reduzierung des relativ hohen Massenanteils an Hyaluronan (2a 20 wt%) ließen sich demzufolge die Eigenschaften des Biomaterials ggf. weiter verbessern.

Die Untersuchung von Zellen auf dem Chondroitinsulfat (CS)-haltigen Biomaterial 2b, zeigte eine insgesamt gute Zelladhäsion von Osteoblasten auf dem Material. Dies deckt sich mit den Ergebnissen aus der Studie von Vandrovcová et al. (2011), in denen

ein Polymer mit einem Kollagen-CS-Überzug behandelt wurde, und MG-63 Zellen auf diesem erfolgreich adhärten. Im Unterschied zu der Studie von Vandrovcová et al. (2011) konnte in dieser Arbeit mit Material 2b keine Steigerung der Proliferation, im Vergleich zu den reinen Kollagen Materialien, beobachtet werden. Der Effekt von CS auf Endothelzellen wurde in der Studie von Jia et al. (2021) beschrieben. Dort konnte ein positiver Effekt auf die Zellproliferation von porcinen Endothelzellen auf einem CS-Kollagen-Gerüst festgestellt werden (Jia et al. 2021). In der vorliegenden Arbeit wurden jedoch weniger HUVEC auf 2b, verglichen mit den in der Medizin bereits etablierten Materialien ROGG, pP und pD sowie den Testmaterialien 1 und 2a festgestellt.

Bei der Evaluierung der PAC-haltigen 3a-1 und 3a-2 Materialien war ein insgesamt schlechtes Zellwachstum zu verzeichnen. In den Versuchen mit HUVEC und MG-63 zeigten sich einige vitale, jedoch rundliche Zellen auf den PAC-haltigen Materialien. Bei den Versuchen mit SaOs-2 und pOB ließen sich nur vereinzelt vitale Zellen neben den Materialien beobachten.

Im Vergleich zu den vorliegenden Ergebnissen, wurden in der Literatur bereits positive Effekte von PAC-haltigen Biomaterialien auf die auf ihnen kultivierten Zellen beschrieben. In der Studie von Ma et al. (2019) unterstützte ein PAC-Zusatz zu einem Calciumsilikat-Natriumalginat-Gerüst, die Proliferation und Migration der auf ihm kultivierten HUVEC. Choi et al. (2016) stellten ebenfalls fest, dass Zellen des parodontalen Ligaments auf einem PAC-vernetzten Kollagengerüst eine bessere Morphologie sowie eine höhere Zellzahl als auf einem reinen Kollagengerüst aufwiesen.

Eine mögliche Erklärung für die schlechte Adhärenz der Zellen auf den PAC-vernetzten Biomaterialien, ist der relativ hohe Massenanteil an PAC. Dieser beträgt bei 3a-1 50 wt% und bei 3a-2 33 wt%, bezogen auf das Kollagen.

Für eine erfolgreiche Besiedelung der Biomaterialien spielen die Liganden-Rezeptorbindungen von Integrinen eine besondere Rolle. Integrine sind Zelloberflächenrezeptoren, die an Liganden auf anderen Zellen oder extrazellulären Matrixproteinen binden können (Alberts et al. 2017). Sie scheinen nicht nur die Zelladhäsion zu regulieren, sondern auch deren Ausbreitung, Migration und Morphologie und stellen so einen erheblichen Faktor in der Gewebeheilung dar, indem

sie eine Verbindung zwischen Gerüst und Zellen ermöglichen (Alberts et al. 2017; Basl et al. 1998). Das β 1-Integrin, von dem bekannt ist, dass es für die Bindung an Zellen und Kollagen verantwortlich ist, ist das Hauptintegrin der Osteoblasten (Basl et al. 1998). In der Studie von Basl et al. (1998) wurde festgestellt, dass SaOs-2, abhängig von der chemischen Oberfläche des Biomaterials, morphologisch eine gestreckte Form oder eine rundliche Form mit keinem erkennbaren Bezug zum Biomaterial aufwies. So konnte nachgewiesen werden, dass die chemische Beschaffenheit der Oberfläche des Biomaterials, die Form und Organisation der auf ihm kultivierten Osteoblasten direkt beeinflusst (Basl et al. 1998). In Studien mit anderen Quervernetzern konnte festgestellt werden, dass die Integrin-vermittelten Wechselwirkungen von Zellen und Kollagen mit zunehmender Vernetzung abnehmen, was darauf hindeutet, dass die Verfügbarkeit von Liganden vermindert wird (Davidenko et al. 2016; Grover et al. 2012). Somit besteht potenziell das Risiko, dass die Vernetzung die Interaktion von Zellen und Kollagenmembran stören und somit die Wirksamkeit einschränken könnte (Grover et al. 2012).

Aufgrund der hohen PAC-Konzentrationen in den Testmaterialien, besteht die Möglichkeit, dass dieses auch unvernetzt innerhalb der Materialien vorgelegen haben könnte. Daraus könnten sich unmittelbare Auswirkungen auf die Oberflächenbeschaffenheit des Materials ergeben haben und diese in Folge zu einer Störung der Zelladhärenz geführt haben. Die unvernetzten PAC könnten darüber hinaus auch direkt mit den Zellen reagiert haben, woraus möglicherweise eine veränderte Morphologie resultierte. Ye et al. (1999) konnten in ihrer Studie beobachten, dass sich humane Krebszellarten in Kultur nach PAC-Zugabe kugelig und nicht mehr adhärent auf dem Zellkulturplastik darstellten. Des Weiteren könnte der bereits zuvor in Kapitel 5.3 erörterte zytotoxische Einfluss von PAC auf Zellen in Kultur eine mögliche Ursache für die fehlende Adhärenz der Zellen auf den Materialien 3a-1 und 3a-2 darstellen.

Damit Biomaterialien für Bone Tissue Engineering genutzt werden können, benötigen diese eine bestimmte Porengröße, um die Adhäsion der Zellen zu ermöglichen. Studien zeigten, dass eine große Porengröße mit einer höheren Zahl adhärenter Zellen einhergeht (Murphy et al. 2010). Eine Größe von 325 μ m wird als optimal für Biomaterialien in der Knochenheilung angesehen (Murphy et al. 2010). Sowohl die Kollagen- als auch die Glykosaminoglykan-Konzentration beeinflussen die Porengröße des Materials und damit die Lebensfähigkeit, Proliferation und räumliche

Verteilung der Osteoblasten innerhalb des Materials (Tierney et al. 2009; Aminatun et al. 2018). Der Anteil an Glykosaminoglykanen in den verwendeten Biomaterialien 2a und 2b, ist mit 20 wt% relativ hoch. Allerdings gehen höhere Glykosaminoglykan- und PAC-Konzentrationen auch mit einer dichteren Materialstruktur einher (Aminatun et al. 2018; Chen et al. 2008). Optimalerweise besitzt ein Biomaterial eine so poröse Struktur, dass Zellen immigrieren sowie Nährstoffe hineintransportiert werden können (Chen et al. 2013). Möglicherweise besitzen die Vergleichsmaterialien ROGG, pP und pD eine porösere Struktur als die getesteten Materialien und die Zellen konnten aus diesem Grund, dort besser adhären.

Zusammenfassend konnte beobachtet werden, dass die PAC-haltigen Materialien die Proliferation sowie Adhäsion von Endothelzellen und Osteoblasten hemmten oder diese sogar verhinderten. Die Materialien 1, 2a und 2b erlaubten zwar die Adhäsion sowie Proliferation der Zellen, jedoch konnten sie diese, gegenüber den Vergleichsmaterialien, weniger gut unterstützen.

5.6 Genexpression der Zellen

Der Grad der Expression von zellspezifischen Markern, der auf den Biomaterialien kultivierten Zellen, ist ein Indikator für die Biokompatibilität und ein Maß für die Stimulation und Unterstützung der phänotypischen Differenzierung und Funktionalität der Zellen. Diesbezüglich bietet die Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion die Möglichkeit, die Genexpression spezifischer Gene nachzuweisen. Dazu wird mittels des Enzyms Reverse-Transkriptase eine komplementäre DNA anhand einer zuvor isolierten mRNA synthetisiert. Die so entstandene cDNA wird anschließend in der Polymerase-Kettenreaktion mit Hilfe von genspezifischen Primern exponentiell vervielfältigt. Die Produkte der Amplifikation können dann in der Agarose-Gelelektrophorese in einem elektrischen Feld ihrer Größe nach getrennt und mit Hilfe eines Farbstoffes sichtbar gemacht werden. Für die Untersuchung der Biomaterialien wurde die Genexpression von primären Endothelzellen (HUVEC), primären Osteoblasten (pOB) sowie den osteoblastischen Zelllinien SaOs-2 und MG-63, nach 5-tägiger Kultivierung auf den Biomaterialien, analysiert.

Endothelzellen spielen eine entscheidende Rolle in der Wundheilung sowie bei Entzündungsreaktionen, indem sie die Vaskularisierung ermöglichen (Velnar und Gradisnik 2018). Sie exprimieren eine Reihe von zellspezifischen Markern, die *in vitro* untersucht werden können (Müller et al. 2002). Primäre Endothelzellen zeigen eine hohe Expression des Von-Willebrand-Faktors (vWF) sowie des Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmoleküls (PECAM-1) (Jaffe et al. 1974; Albelda et al. 1990). Obwohl entzündliche Prozesse Teil der natürlichen Heilung sind, sollte ein Biomaterial selbst keinen entzündlichen Reiz darstellen. Endothelzellen reagieren *in vitro* auf die Stimulation durch proinflammatorische Reize wie LPS durch die Produktion des Zelladhäsionsmoleküls E-Selektin auf der Zelloberfläche (Bevilacqua et al. 1987). Endotoxine weisen starke Protein-Interaktionen auf und können persistent an Biomaterialien haften (Magalhães et al. 2007). Es besteht die Möglichkeit, dass sie in einem Materialextrakt nicht in Lösung gehen und somit in dem in Kapitel 5.4 beschriebenen Endotoxintest die Expression von E-Selektin nicht auslösten. Aufgrund dieser Problematik wurden die HUVEC Zellen, nach der direkten Kultivierung auf den Biomaterialien, auf den Entzündungsmarker E-Selektin hin untersucht. Als Kontrollgruppe dienten Zellen nach zusätzlicher Stimulation mit LPS. Außerdem erfolgte die Untersuchung der Genexpression der endothelzellspezifischen Marker PECAM-1 und vWF, sowie dem housekeeping Gen Aktin (Müller et al. 2002).

In der vorliegenden Studie zeigte sich, dass keines der getesteten Materialien die E-Selektin-Expression in HUVEC auslöste. Gleichzeitig konnte die physiologische Expression von Aktin, PECAM-1 und vWF auf allen Materialien nachgewiesen werden. Eine Ausnahme bildete das PAC-haltige Material 3a-1, mit dem sich keines der untersuchten Gene nachweisen ließ. Diese Beobachtungen belegen, dass die Materialien keine Endotoxine enthielten und bestätigen die Ergebnisse aus 5.4. Nach Stimulation mit zugesetztem LPS konnte die Expression von E-Selektin beobachtet und somit der Erhalt der Syntheseleistung der HUVEC nachgewiesen werden.

Die primären Osteoblasten sowie die beiden Osteosarkomzelllinien MG-63 und SaOs-2 wurden nach Kultivierung mit den Biomaterialien auf die Genexpression von physiologischen osteoblastischen Markern hin untersucht. Bereits in anderen Studien wurde die Möglichkeit, mittels PCR die Genexpression von Osteoblasten auf

Biomaterialien zu untersuchen, erwähnt (Sila-Asna et al. 2007). Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) spielt für die Knochenheilung und die Knochenbildung eine erhebliche Rolle (Hu und Olsen 2016; Melincovici et al. 2018). Das von Osteoblasten sezernierte VEGF stimuliert die osteoblastische Differenzierung sowie die Rekrutierung von Endothelzellen und Osteoklasten und unterstützt somit die Remodellierungsphase des Reparaturprozesses (Hu und Olsen 2016).

Osteoblasten durchlaufen auf einem Biomaterial idealerweise drei Entwicklungsstadien; die Proliferation, die Matrixreifung sowie die Matrixmineralisation (Unger et al. 2009). Um diese zu untersuchen, können die Gene für die Bildung von Osteopontin, Osteonectin, Osteocalcin und Kollagen Typ 1 analysiert werden. Dabei handelt es sich um Bestandteile der extrazellulären Matrix des Knochens, die von Osteoblasten sezerniert werden (Clarke 2008). In der frühen Proliferationsphase beginnen die Osteoblasten mit der Sezernierung von Kollagen Typ 1 (Stein et al. 1990). Osteonectin bindet Kollagen Typ 1 sowie Hydroxylapatit und reguliert als calciumbindendes Protein die Matrixmineralisation (Zhu et al. 2020; Robey 2002). Osteopontin wird vermehrt während der Matrixmineralisation exprimiert und soll zudem die osteoblastische Zelldifferenzierung modulieren können (Stein et al. 1990; Yabe et al. 1997). Osteocalcin ist eines der wichtigsten nicht-kollagenen Proteine der extrazellulären Matrix des Knochens (Sila-Asna et al. 2007). Da es ausschließlich von reifen Osteoblasten sezerniert wird, gilt es als Indikator für die osteoblastische Zelldifferenzierung (Sila-Asna et al. 2007).

Die auf den Biomaterialien kultivierten Osteosarkomzellen MG-63 zeigten bei der Analyse eine normale phänotypische Genexpression mit allen nicht-PAC-haltigen Materialien. Mit den PAC-haltigen Materialien konnte keine Expression der untersuchten Gene beobachtet werden. Des Weiteren konnte in keiner Versuchsgruppe eine Osteopontin-Expression durch MG-63 nachgewiesen werden. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen der Studie von Kumarasuriyar et al. (2009). Dort wird ebenfalls die phänotypische Expression von Kollagen Typ 1, Osteonectin und Osteocalcin, jedoch die Abwesenheit der Expression von Osteopontin durch MG-63, nach 7-, 15- und 29-tägiger Inkubation unter osteogenen Bedingungen, beschrieben (Kumarasuriyar et al. 2009).

Die Expression von osteoblastischen Genen durch SaOs-2 auf den Biomaterialien wies eine große Variabilität auf. Das housekeeping Gen Aktin konnte in den SaOs-2 Zellen auf allen Test- und Vergleichsmaterialien nachgewiesen werden – mit Ausnahme der auf dem PAC-haltigen Material 3a-1 befindlichen Zellen. Kollagen Typ 1 sowie Osteonectin konnten nicht oder nur uneinheitlich mit den auf PAC-haltigen Materialien oder pD kultivierten Zellen nachgewiesen werden.

Die Genexpressionen von VEGF und Osteopontin wiesen eine noch stärkere Variabilität auf. Beide Marker konnten nicht mit der RNA aus SaOs-2 Zellen auf den PAC-haltigen Materialien sowie auf pD nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte keine Osteopontin-Expression mit den auf Testmaterial 1 und Vergleichsmaterial pP kultivierten Zellen nachgewiesen werden.

Die Expression von Osteocalcin konnte in keiner Versuchsgruppe beobachtet werden. In den in der Literatur zu findenden Studien wird für SaOs-2 ebenfalls keine oder nur eine schwache Expression von Osteocalcin sowie Osteopontin beschrieben (Rodan et al. 1987; Nadiminty et al. 2006). Deshalb beurteilten bereits Rodan et al. (1987) den Stellenwert von Osteocalcin als osteoblastischen Zellmarker kritisch und es stellt sich zudem die Frage, ob SaOs-2 die geeignete Zelllinie für die Analyse der unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Osteoblasten ist.

Die mit den Materialien kultivierten pOB zeigten für die nicht PAC-haltigen Materialien eine homogene, phänotypische Genexpression von Aktin, VEGF, Osteonectin, Osteopontin, Osteocalcin, sowie Kollagen Typ 1. Die auf den PAC-haltigen Biomaterialien kultivierten pOB, zeigten keine eindeutige Genexpression der untersuchten Marker.

Im Gegensatz dazu beobachteten Huang et al. (2020), dass PAC in geringer Dosierung (0,1–10 µg/mL) die Expression von osteogenen Markern, wie Osteopontin, in humanen Fibroblasten des parodontalen Ligaments hochregulieren können. Des Weiteren stellten Khanna et al. (2001) eine vermehrte VEGF-Expression in humanen Keratinozyten nach 24-stündiger Inkubation mit 10 µg/mL PAC-Lösung fest.

Das Fehlen der genspezifischen Banden im Rahmen der Analyse der Materialien ist vermutlich auf verbleibende PCR-inhibitorische Substanzen zurückzuführen. PAC sind hochreaktive Verbindungen, die Proteine und RNA binden und mit ihnen schwerlösliche Komplexe bilden können (Todd und Vodkin 1993; Hagerman und Butler 1981).

In der Literatur wurde die Problematik, RNA in Anwesenheit von PAC zu isolieren, bereits erläutert (Wang und Vodkin 1994). Des Weiteren stellten Opel et al. (2010) fest, dass Kollagen ebenfalls ein PCR-Inhibitor darstellen kann, indem es an die DNA-Matrix bindet und die Taq-Polymerase inhibiert. Aufgrund der bereits erwähnten, hohen Konzentration an PAC in den Testmaterialien, besteht die Möglichkeit, dass diese, trotz angepasstem Extraktionsprotokoll, nicht vollständig entfernt werden konnten und als Inhibitoren verblieben sind.

Zusammenfassend zeigten die Zellen auf den Materialien 1, 2a und 2b eine ähnliche Genexpression wie die Kontrollzellen auf Kulturplastik. Eine vereinzelt inhomogene Genexpression wurde mit SaOs-2 beobachtet, was auf zellspezifische Ursachen sowie den Verbleib von PCR-inhibitorischen Substanzen zurückzuführen sein könnte. Für Zellen, die auf 3a-1 und 3a-2 kultiviert wurden, war keine eindeutige Genexpression auszumachen. Dies könnte ebenfalls auf den Verbleib von PCR-inhibitorischen Substanzen sowie auf die bekannten, zytotoxischen Eigenschaften, insbesondere von hohen PAC-Konzentrationen, zurückzuführen sein.

5.7 Kritik und Fazit

In dieser Arbeit wurden fünf Kollagen-basierte Biomaterialien anhand von essenziellen Kriterien auf ihre Eignung für einen Einsatz in der Knochenregeneration untersucht.

Es konnte beobachtet werden, dass alle Testmaterialien steril und endotoxinfrei waren. Im Falle des reinen Kollagenmaterials 1 sowie den mit Glykosaminoglykanen versetzten Biomaterialien 2a und 2b, konnte keine Toxizität mit den untersuchten Zellen festgestellt werden und die auf ihnen kultivierten Zellen zeigten eine zelltypische Genexpression. Die genannten Materialien erlaubten die Adhäsion und Proliferation der auf ihnen kultivierten Zellen, konnten diese jedoch im Vergleich zu der Kontrolle auf Zellkulturplastik sowie den Vergleichsmaterialien weniger gut unterstützen. Die PAC haltigen Biomaterialien 3a-1 und 3a-2 zeigten einen zeit- und dosisabhängigen toxischen Effekt auf die untersuchten Osteoblasten und hemmten oder verhinderten die Adhäsion und Proliferation aller auf ihnen kultivierten Zelltypen. Nach 5-tägiger Inkubation auf den Materialien 3a-1 und 3a-2 konnte keine phänotypische Genexpression der Zellen ausgemacht werden. Unklar ist, ob dies aufgrund der zytotoxischen Eigenschaften der Materialien oder verbliebener inhibitorischer Substanzen auftrat.

Aufgrund fehlender Informationen über mögliche weitere Inhaltsstoffe der getesteten Biomaterialien und über die Art des Herstellungsprozesses, konnten diese nur in der hier vorgelegten Form in ihrer Gesamtheit untersucht werden. Es bleiben daher gewisse Unsicherheiten, wie die Biomaterialien im Detail mit den Zellen interagiert und welche Inhaltsstoffe tatsächlich auf die Zellen eingewirkt haben.

Die Übertragbarkeit von *in vitro* gewonnenen Ergebnissen auf *in vivo* Bedingungen ist noch nicht ausreichend erforscht. Daher bleibt die Aussagekraft von *in vitro* Versuchen begrenzt. Eine Problematik von *in vitro* Versuchen stellt eine mögliche Ablagerung von toxischen Produkten dar (Fini und Giardino 2003). *In vivo* treten aufgrund von lokalen und systemischen Faktoren komplexe Wechselwirkungen zwischen Biomaterial und Organismus auf, die *in vitro* nicht vollständig nachgeahmt werden können (Fini und Giardino 2003). *In vivo* Versuche geben somit vermutlich noch immer eine präzisere Einschätzung der zu erwartenden Eigenschaften eines Biomaterials in der Anwendung beim Menschen (Unger et al. 2009).

Aus den vorliegenden Ergebnissen lässt sich daher keine eindeutige Aussage über die *in vivo* zu erwartende Biokompatibilität der getesteten Materialien treffen - und somit kann keine abschließende Bewertung über die Eignung der Testmaterialien erfolgen.

Da Knochengewebe nicht nur aus einer Zellart besteht, sollten für die Evaluierung eines Biomaterials im Idealfall auch unterschiedliche Zelltypen gleichzeitig zum Einsatz kommen. Studien haben gezeigt, dass die *in vitro* Kokultur von Endothelzellen und Osteoblasten die osteoblastische Differenzierung verbessern und die Ausbildung von mikrovaskulären Strukturen stimulieren kann (Inomata und Honda 2019; Unger et al. 2007). Daher würde es sich anbieten, die hier untersuchten Biomaterialien in weiterführenden Studien anhand von Kokulturen zu testen.

Wegen der bereits näher erläuterten, vielversprechenden Eigenschaften von Kollagen Typ 1, Glykosaminoglykanen und PAC für die Knochenregeneration, sollten Anpassungsentwicklungen, in Bezug auf die Reduzierung des prozentualen Glykosaminoglykan- und vor allem des PAC-Gehalts, in Betracht gezogen werden und anschließend eine erneute Untersuchung der Biomaterialien erfolgen.

6 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde die Interaktion von Proanthocyanidin- und Glykosaminoglykan-modifizierten Kollagenmembranen mit ausgewählten Zellen analysiert sowie deren Eignung für den Einsatz in der Knochenregeneration mit Hilfe von *in vitro* Modellen evaluiert.

Die Untersuchungen zeigten, dass die zur Verfügung gestellten Biomaterialien auch nach der Verarbeitung steril und endotoxinfrei waren. Die Toxizitätstests wurden nach der ISO 10993-5 (2009-06) Methodik mit der dort empfohlenen Zelllinie L929, den beiden Osteosarkomzelllinien, SaOs-2 und MG-63, sowie mit primären Osteoblasten (pOB) und primären Endothelzellen (HUVEC) durchgeführt. Das reine Kollagen-Material sowie die Hyaluronan- und Chondroitinsulfat-modifizierten Materialien hatten keinen toxischen Effekt auf die untersuchten Zellen. Jedoch konnte eine zeit- und dosisabhängige Toxizität der PAC-haltigen Materialien beobachtet werden. Mit den in der Materialherstellung verwendeten PAC wurde eine Verdünnungsreihe erstellt und diese auf ihre toxische Wirkung auf kultivierte Zellen untersucht. Dabei war ebenfalls eine konzentrationsabhängige Toxizität der PAC ersichtlich.

Die Analyse der auf den Biomaterialien ausgesäten Zellen zeigte, dass die reine Kollagenmembran sowie die Glykosaminoglykan-modifizierten Materialien die Zelladhäsion und -proliferation erlaubten, diese jedoch, gegenüber den Vergleichsmaterialien, weniger gut unterstützten. Die PAC-vernetzten Materialien hemmten oder verhinderten die Adhäsion und Proliferation der auf ihnen kultivierten Zellen. Darüber hinaus wurde eine mögliche Interaktion der Biomaterialien mit der Genregulation der auf ihnen kultivierten Endothelzellen und Osteoblasten ausgewertet. Hierfür wurde die Expression zellspezifischer Gene mittels Reverse-Transkriptase-PCR untersucht. Dabei zeigten die auf dem reinen Kollagenmaterial sowie die auf den Glykosaminoglykan-modifizierten Kollagenvliesen kultivierten Zellen, eine insgesamt homogene Expression zelltypischer Gene. Bei den auf PAC-haltigen Materialien kultivierten Zellen, konnte keine eindeutige Expression der untersuchten Gene nachgewiesen werden. Dies ist möglicherweise auf zytotoxische Eigenschaften der PAC oder auf den Verbleib von PCR-inhibitorischen Substanzen zurückzuführen.

7 Literaturverzeichnis

- Alban S (2007) Kohlenhydrate III: Aminoglykane und Glykosaminoglykane. In: Hänsel R, Sticher O, Hrsg. Pharmakognosie - Phytopharmazie. 8. Aufl. Heidelberg: Springer, 655–704. doi:10.1007/978-3-540-34281-6_20.
- Albelda SM, Oliver PD, Romer LH, Buck CA (1990) EndoCAM: A novel endothelial cell-cell adhesion molecule. *Journal of Cell Biology*. 110(4):1227–1237. doi:10.1083/jcb.110.4.1227.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P, Wilson J, Hunt T (2017) *Molecular Biology of the Cell*. 6. Aufl. New York. Garland Science. 1074–1081.
- Albogami S (2020) Proanthocyanidins reduce cellular function in the most globally diagnosed cancers in vitro. *PeerJ*. 8:e9910. doi:10.7717/peerj.9910.
- Almeida KM de, Almeida MM, Fingola FF, Ferraz HC (2016) Membrane adsorber for endotoxin removal. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 52(1):171–178. doi:10.1590/S1984-82502016000100019.
- Alqahtani AS, Abdel-Mageed WM, Shahat AA, Parvez MK, Al-Dosari MS, Malik A, Abdel-Kader MS, Alsaid MS (2019) Proanthocyanidins from the stem bark of *Rhus tripartita* ameliorate methylglyoxal-induced endothelial cell apoptosis. *Journal of Food and Drug Analysis*. 27(3):758–765. doi:10.1016/j.jfda.2019.02.002.
- Aminatun, Wijayanti TR, Vartan D, Widiyanti P (2018) Characteristics of composite scaffold chitosan-chondroitin sulphate / hydroxyapatite as the candidate of bone graft. In: *Proceedings of the 2nd International Conference Postgraduate School*. 1. Aufl.: SciTePress, 236–243. doi:10.5220/0007540602360243.
- Annaz B, Hing KA, Kayser M, Buckland T, Di Silvio L (2004) Porosity variation in hydroxyapatite and osteoblast morphology: A scanning electron microscopy study. *Journal of Microscopy*. 215(1):100–110. doi:10.1111/j.0022-2720.2004.01354.x.

- Bagchi D, Bagchi M, Stohs SJ, Das DK, Ray SD, Kuszynski CA, Joshi SS, Pruess HG (2000) Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: Importance in human health and disease prevention. *Toxicology*. 148(2–3):187–197. doi:10.1016/s0300-483x(00)00210-9.
- Basl MF, Grizon F, Pascaretti C, Lesourd M, Chappard D (1998) Shape and orientation of osteoblast-like cells (Saos-2) are influenced by collagen fibers in xenogenic bone biomaterial. *Journal of Biomedical Materials Research*. 40(3):350–357. doi:10.1002/(sici)1097-4636(19980605)40:3<350::aid-jbm2>3.0.co;2-e.
- Bevilacqua MP, Pober JS, Mendrick DL, Cotran RS, Gimbrone MA (1987) Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 84(24):9238–9242. doi:10.1073/pnas.84.24.9238.
- Borra RC, Lotufo MA, Gagiotti SM, Barros FdM, Andrade PM (2009) A simple method to measure cell viability in proliferation and cytotoxicity assays. *Brazilian Oral Research*. 23(3):255–262. doi:10.1590/s1806-83242009000300006.
- Calori GM, Giannoudis PV (2011) Enhancement of fracture healing with the diamond concept: The role of the biological chamber. *Injury*. 42(11):1191–1193. doi:10.1016/j.injury.2011.04.016.
- Campana V, Milano G, Pagano E, Barba M, Cicione C, Salonna G, Lattanzi W, Logroscino G (2014) Bone substitutes in orthopaedic surgery: From basic science to clinical practice. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 25(10):2445–2461. doi:10.1007/s10856-014-5240-2.
- Caplan AI (1991) Mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research*. 9(5):641–650. doi:10.1002/jor.1100090504.
- Capulli M, Paone R, Rucci N (2014) Osteoblast and osteocyte: Games without frontiers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 561:3–12. doi:10.1016/j.abb.2014.05.003.

- Caton PW, Potheary MR, Lees DM, Khan NQ, Wood EG, Shoji T, Kanda T, Rull G, Corder R (2010) Regulation of vascular endothelial function by procyanidin-rich foods and beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58(7):4008–4013. doi:10.1021/jf9031876.
- Chen K-Y, Shyu P-C, Chen Y-S, Yao C-H (2008) Novel bone substitute composed of oligomeric proanthocyanidins-crosslinked gelatin and tricalcium phosphate. *Macromolecular Bioscience*. 8(10):942–950. doi:10.1002/mabi.200800007.
- Chen K-Y, Shyu P-C, Dong G-C, Chen Y-S, Kuo W-W, Yao C-H (2009) Reconstruction of calvarial defect using a tricalcium phosphate-oligomeric proanthocyanidins cross-linked gelatin composite. *Biomaterials*. 30(9):1682–1688. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.12.024.
- Chen K-Y, Chung C-M, Chen Y-S, Bau D-T, Yao C-H (2013) Rat bone marrow stromal cells-seeded porous gelatin/tricalcium phosphate/oligomeric proanthocyanidins composite scaffold for bone repair. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 7(9):708–719. doi:10.1002/term.1461.
- Choi Y, Kim H-J, Min K-S (2016) Effects of proanthocyanidin, a crosslinking agent, on physical and biological properties of collagen hydrogel scaffold. *Restorative Dentistry & Endodontics*. 41(4):296–303. doi:10.5395/rde.2016.41.4.296.
- Clarke B (2008) Normal bone anatomy and physiology. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 3(3):131-139. doi:10.2215/CJN.04151206.
- Czekanska EM, Stoddart MJ, Richards RG, Hayes JS (2012) In search of an osteoblast cell model for in vitro research. *European Cells and Materials*. 24:1–17. doi:10.22203/ecm.v024a01.
- Dalby MJ, Di Silvio L, Harper EJ, Bonfield W (2002) Increasing hydroxyapatite incorporation into poly(methylmethacrylate) cement increases osteoblast adhesion and response. *Biomaterials*. 23(2):569–576. doi:10.1016/s0142-9612(01)00139-9.

- Davidenko N, Schuster CF, Bax DV, Raynal N, Farndale RW, Best SM, Cameron RE (2015) Control of crosslinking for tailoring collagen-based scaffolds stability and mechanics. *Acta Biomaterialia*. 25:131–142. doi:10.1016/j.actbio.2015.07.034.
- Davidenko N, Schuster CF, Bax DV, Farndale RW, Hamaia S, Best SM, Cameron RE (2016) Evaluation of cell binding to collagen and gelatin: A study of the effect of 2D and 3D architecture and surface chemistry. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 27(10):148. doi:10.1007/s10856-016-5763-9.
- Dixon RA, Xie D-Y, Sharma SB (2005) Proanthocyanidins – A final frontier in flavonoid research? *The New Phytologist*. 165(1):9–28. doi:10.1111/j.1469-8137.2004.01217.x.
- Einhorn TA, Gerstenfeld LC (2015) Fracture healing: Mechanisms and interventions. *Nature Reviews Rheumatology*. 11:45–54. doi:10.1038/nrrheum.2014.164.
- Fernando RC, Spratte G (2005) Natürlich vorkommende Vitalstoffe aus Traubenkernen. *Erfahrungsheilkunde*. 54(10):631–636. doi:10.1055/s-2005-917998.
- Fillingham Y, Jacobs J (2016) Bone grafts and their substitutes. *The Bone & Joint Journal*. 98-B(1A):6–9. doi:10.1302/0301-620X.98B.36350.
- Fini M, Giardino R (2003) In vitro and in vivo tests for the biological evaluation of candidate orthopedic materials: Benefits and limits. *Journal of Applied Biomaterials & Biomechanics*. 1(3):155–163
- Förster Y, Rentsch C, Schneiders W, Bernhardt R, Simon JC, Worch H, Rammelt S (2012) Surface modification of implants in long bone. *Biomater*. 2(3):149–157. doi:10.4161/biom.21563.
- Frenkel JS (2014) The role of hyaluronan in wound healing. *International Wound Journal*. 11(2):159–163. doi:10.1111/j.1742-481X.2012.01057.x.
- Gelse K, Pöschl E, Aigner T (2003) Collagens – Structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 55(12):1531–1546. doi:10.1016/j.addr.2003.08.002.

- Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N (1999) VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nature Medicine*. 5(6):623–628. doi:10.1038/9467.
- Gong X, Liang Z, Yang Y, Liu H, Ji J, Fan Y (2020) A resazurin-based, nondestructive assay for monitoring cell proliferation during a scaffold-based 3D culture process. *Regenerative Biomaterials*. 7(3):271–281. doi:10.1093/rb/rbaa002.
- Grand View Research (2021) Global bone graft and substitutes market report, 2021-2028. [zitiert am 03. Mai 2021]. URL: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/bone-grafts-substitutes-market>
- Grover CN, Gwynne JH, Pugh N, Hamaia S, Farndale RW, Best SM, Cameron RE (2012) Crosslinking and composition influence the surface properties, mechanical stiffness and cell reactivity of collagen-based films. *Acta Biomaterialia*. 8(8):3080–3090. doi:10.1016/j.actbio.2012.05.006.
- Gurger M, Yilmaz E, Yilmaz S, Once G, Konuk M, Kaya E, Say Y, Artas G, Artas H (2019) Grape seed extract supplement increases bone callus formation and mechanical strength: An animal study. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*. 14(1):206. doi:10.1186/s13018-019-1251-5.
- Hadjidakis DJ, Androulakis II (2006) Bone remodeling. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1092:385–396. doi:10.1196/annals.1365.035.
- Hagerman AE, Butler LG (1981) The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *The Journal of Biological Chemistry*. 256(9):4494–4497
- Han B, Jaurequi J, Tang BW, Nimni ME (2003) Proanthocyanidin: A natural crosslinking reagent for stabilizing collagen matrices. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 65(1):118–124. doi:10.1002/jbm.a.10460.

- Hettwer W, Horstmann PF, Bischoff S, Güllmar D, Reichenbach JR, Poh PSP, van Griensven M, Gras F, Diefenbeck M (2019) Establishment and effects of allograft and synthetic bone graft substitute treatment of a critical size metaphyseal bone defect model in the sheep femur. *APMIS: Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*. 127(2):53–63. doi:10.1111/apm.12918.
- Hintze V, Moeller S, Schnabelrauch M, Bierbaum S, Viola M, Worch H, Scharnweber D (2009) Modifications of hyaluronan influence the interaction with human bone morphogenetic protein-4 (hBMP-4). *Biomacromolecules*. 10(12):3290–3297. doi:10.1021/bm9008827.
- Hollister SJ (2005) Porous scaffold design for tissue engineering. *Nature Materials*. 4(7):518–524. doi:10.1038/nmat1421.
- Howard D, BATTERY LD, Shakesheff KM, Roberts SJ (2008) Tissue engineering: Strategies, stem cells and scaffolds. *Journal of Anatomy*. 213(1):66–72. doi:10.1111/j.1469-7580.2008.00878.x.
- Hu K, Olsen BR (2016) Osteoblast-derived VEGF regulates osteoblast differentiation and bone formation during bone repair. *The Journal of Clinical Investigation*. 126(2):509–526. doi:10.1172/JCI82585.
- Huang J, Liu L, Jin S, Zhang Y, Zhang L, Li S, Song A, Yang P (2020) Proanthocyanidins promote osteogenic differentiation of human periodontal ligament fibroblasts in inflammatory environment via suppressing NF-κB signal pathway. *Inflammation*. 43(3):892–902. doi:10.1007/s10753-019-01175-y.
- Inomata K, Honda M (2019) Co-culture of osteoblasts and endothelial cells on a microfiber scaffold to construct bone-like tissue with vascular networks. *Materials (Basel)*. 12(18):2869. doi:10.3390/ma12182869.
- ISO 10993-1 (2018-08) Biological evaluation of medical devices — Part 1: Evaluation and testing within a risk management process (ISO 10993-1:2018)
- ISO 10993-5 (2009-06) Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity (ISO 10993-5:2009)

- Ivanov DP, Grabowska AM, Garnett MC (2017) High-throughput spheroid screens using volume, resazurin reduction, and acid phosphatase activity. In: Gilbert D, Friedrich O, Hrsg. *Cell Viability Assays: Methods and Protocols*. 1601. New York: Humana Press, 43–59. doi:10.1007/978-1-4939-6960-9_4.
- Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR (1973) Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *The Journal of Clinical Investigation*. 52(11):2745–2756. doi:10.1172/JCI107470.
- Jaffe EA, Hoyer LW, Nachman RL (1974) Synthesis of von Willebrand factor by cultured human endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 71(5):1906–1909. doi:10.1073/pnas.71.5.1906.
- Jia W, Li M, Liu L, Zhou H, Liu X, Gu G, Xiao M, Chen Z (2021) Fabrication and assessment of chondroitin sulfate-modified collagen nanofibers for small-diameter vascular tissue engineering applications. *Carbohydrate Polymers*. 257:117573. doi:10.1016/j.carbpol.2020.117573.
- Jiang Y, Li Y, Ding Y, Dai X, Ma X, Bao L, Zhang Z, Li Y (2015) Grape seed proanthocyanidin extracts prevent high glucose-induced endothelial dysfunction via PKC and NF- κ B inhibition. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 79(9):1493–1503. doi:10.1080/09168451.2014.991679.
- Jilka RL, O'Brien CA (2016) The role of osteocytes in age-related bone loss. *Current Osteoporosis Reports*. 14(1):16–25. doi:10.1007/s11914-016-0297-0.
- Kasperk C, Wergedal J, Strong D, Farley J, Wangerin K, Gropp H, Ziegler R, Baylink DJ (1995) Human bone cell phenotypes differ depending on their skeletal site of origin. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 80(8):2511–2517. doi:10.1210/jcem.80.8.7629252.
- Kassem M, Abdallah BM, Saeed H (2008) Osteoblastic cells: Differentiation and trans-differentiation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 473(2):183–187. doi:10.1016/j.abb.2008.03.028.
- Katiyar SK, Athar M (2013) Grape seeds: Ripe for cancer chemoprevention. *Cancer Prevention Research*. 6(7):617–621. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-13-0193.

- Kengla C, Kidiyoor A, Murphy SV (2017) Bioprinting complex 3D tissue and organs. In: Williams DF, Orlando G, Remuzzi G, Hrsg. Kidney transplantation, bioengineering, and regeneration: Kidney transplantation in the regenerative medicine era. London: Academic Press, 957–971. doi:10.1016/B978-0-12-801734-0.00068-0.
- Khanna S (2001) Upregulation of oxidant-induced VEGF expression in cultured keratinocytes by a grape seed proanthocyanidin extract. *Free Radical Biology and Medicine*. 31(1):38–42. doi:10.1016/S0891-5849(01)00544-5.
- Khanna S, Venojarvi M, Roy S, Sharma N, Trikha P, Bagchi D, Bagchi M, Sen CK (2002) Dermal wound healing properties of redox-active grape seed proanthocyanidins. *Free Radical Biology and Medicine*. 33(8):1089–1096. doi:10.1016/s0891-5849(02)00999-1.
- Kim HD, Lee EA, An Y-H, Kim SL, Lee SS, Yu SJ, Jang HL, Nam KT, Im SG, Hwang NS (2017) Chondroitin sulfate-based biomineralizing surface hydrogels for bone tissue engineering. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 9(26):21639–21650. doi:10.1021/acsami.7b04114.
- Kolar P, Gaber T, Perka C, Duda GN, Buttgerit F (2011) Human early fracture hematoma is characterized by inflammation and hypoxia. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 469(11):3118–3126. doi:10.1007/s11999-011-1865-3.
- Kumarasuriyar A, Murali S, Nurcombe V, Cool SM (2009) Glycosaminoglycan composition changes with MG-63 osteosarcoma osteogenesis in vitro and induces human mesenchymal stem cell aggregation. *Journal of Cellular Physiology*. 218(3):501–511. doi:10.1002/jcp.21620.
- Langer R, Vacanti JP (1993) Tissue engineering. *Science*. 260(5110):920–926. doi:10.1126/science.8493529.
- Laschke MW, Harder Y, Amon M, Martin I, Farhadi J, Ring A, Torio-Padron N, Schramm R, Rücker M, Junker D, Häufel JM, Carvalho C, Heberer M, Germann G, Vollmar B, Menger MD (2006) Angiogenesis in tissue engineering: Breathing life into constructed tissue substitutes. *Tissue Engineering*. 12(8):2093–2104. doi:10.1089/ten.2006.12.2093.

- Lee T, Kwon H-S, Bang B-R, Lee YS, Park M-Y, Moon K-A, Kim T-B, Lee K-Y, Moon H-B, Cho YS (2012) Grape seed proanthocyanidin extract attenuates allergic inflammation in murine models of asthma. *Journal of Clinical Immunology*. 32(6):1292–1304. doi:10.1007/s10875-012-9742-8.
- Lee CH, Singla A, Lee Y (2001) Biomedical applications of collagen. *International Journal of Pharmaceutics*. 221(1-2):1–22. doi:10.1016/s0378-5173(01)00691-3.
- Lin K, Zhang D, Macedo MH, Cui W, Sarmiento B, Shen G (2019) Advanced collagen-based biomaterials for regenerative biomedicine. *Advanced Functional Materials*. 29(3):1804943. doi:10.1002/adfm.201804943.
- Liu L-S, Thompson AY, Heidarman MA, Poser JW, Spiro RC (1999) An osteoconductive collagen/hyaluronate matrix for bone regeneration. *Biomaterials*. 20(12):1097–1108. doi:10.1016/S0142-9612(99)00006-X.
- Liu X, Ma PX (2004) Polymeric scaffolds for bone tissue engineering. *Annals of Biomedical Engineering*. 32(3):477–486. doi:10.1023/b:abme.0000017544.36001.8e.
- Liu Y, Liao W-J, Zhu Z, Zeng H, He H-Q, Sun X-L, Xu X-F, Huang L, Wang W-M, Zhou X-Y, He Y-Z (2016) Effect of procyanidine on VEGFR-2 expression and transduction pathway in rat endothelial progenitor cells under high glucose conditions. *Genetics and Molecular Research*. 15(1):1501692. doi:10.4238/gmr.15016925.
- Ma H, Zhou Q, Chang J, Wu C (2019) Grape seed-inspired smart hydrogel scaffolds for melanoma therapy and wound healing. *ACS Nano*. 13(4):4302–4311. doi:10.1021/acsnano.8b09496.
- Mackie EJ (2003) Osteoblasts: Novel roles in orchestration of skeletal architecture. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 35(9):1301–1305. doi:10.1016/S1357-2725(03)00107-9.
- Magalhães PO, Lopes AM, Mazzola PG, Rangel-Yagui C, Penna TCV, Pessoa A (2007) Methods of endotoxin removal from biological preparations: A review. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*. 10(3):388–404

- Manfrini M, Mazzoni E, Barbanti-Brodano G, Nocini P, D'agostino A, Trombelli L, Tognon M (2015) Osteoconductivity of complex biomaterials assayed by fluorescent-engineered osteoblast-like cells. *Cell Biochemistry and Biophysics*. 71(3):1509–1515. doi:10.1007/s12013-014-0374-x.
- Maquet V, Jerome R (1997) Design of macroporous biodegradable polymer scaffolds for cell transplantation. *Materials Science Forum*. 250:15–42. doi:10.4028/www.scientific.net/MSF.250.15.
- Marinucci L, Lilli C, Baroni T, Becchetti E, Belcastro S, Balducci C, Locci P (2001) In vitro comparison of bioabsorbable and non-resorbable membranes in bone regeneration. *Journal of Periodontology*. 72(6):753–759. doi:10.1902/jop.2001.72.6.753.
- Mathews S, Bhonde R, Gupta PK, Totey S (2014) Novel biomimetic tripolymer scaffolds consisting of chitosan, collagen type 1, and hyaluronic acid for bone marrow-derived human mesenchymal stem cells-based bone tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 102(8):1825–1834. doi:10.1002/jbm.b.33152.
- Mayer R, Stecher G, Wuerzner R, Silva RC, Sultana T, Trojer L, Feuerstein I, Krieg C, Abel G, Popp M, Bobleter O, Bonn GK (2008) Proanthocyanidins: Target compounds as antibacterial agents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56(16):6959–6966. doi:10.1021/jf800832r.
- McGovern JA, Griffin M, Hutmacher DW (2018) Animal models for bone tissue engineering and modelling disease. *Disease Models & Mechanisms*. 11(4):dmm033084. doi:10.1242/dmm.033084.
- Melincovici CS, Boşca AB, Şuşman S, Mărginean M, Mişu C, Istrate M, Moldovan IM, Roman AL, Mişu CM (2018) Vascular endothelial growth factor (VEGF) - Key factor in normal and pathological angiogenesis. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*. 59(2):455–467
- Mentzer SJ, Konerding MA (2014) Intussusceptive angiogenesis: Expansion and remodeling of microvascular networks. *Angiogenesis*. 17(3):499–509. doi:10.1007/s10456-014-9428-3.

- Mizuno M, Fujisawa R, Kuboki Y (2000) Type I collagen-induced osteoblastic differentiation of bone-marrow cells mediated by collagen- $\alpha 2\beta 1$ integrin interaction. *Journal of Cellular Physiology*. 184(2):207–213. doi:10.1002/1097-4652(200008)184:2<207::AID-JCP8>3.0.CO;2-U.
- Müller AM, Hermanns MI, Skrzynski C, Nesslinger M, Müller K-M, Kirkpatrick CJ (2002) Expression of the endothelial markers PECAM-1, vWf, and CD34 in vivo and in vitro. *Experimental and Molecular Pathology*. 72(3):221–229. doi:10.1006/exmp.2002.2424.
- Murphy CM, Haugh MG, O'Brien FJ (2010) The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 31(3):461–466. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.09.063.
- Nadiminty N, Lou W, Lee SO, Mehraein-Ghomi F, Kirk JS, Conroy JM, Zhang H, Gao AC (2006) Prostate-specific antigen modulates genes involved in bone remodeling and induces osteoblast differentiation of human osteosarcoma cell line SaOS-2. *Clinical Cancer Research*. 12(5):1420–1430. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-1849.
- National Center for Biotechnology Information (15.02.2021a) Nukleotide. [zitiert am 15. Februar 2021]. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>
- National Center for Biotechnology Information (15.02.2021b) Primer-BLAST. [zitiert am 15. Februar 2021]. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>
- O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F (2000) Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*. 267(17):5421–5426. doi:10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x.
- O'Brien FJ (2011) Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*. 14(3):88–95. doi:10.1016/S1369-7021(11)70058-X.
- Opal SM (2010) Endotoxins and other sepsis triggers. In: Ronco C, Piccinni P, Rosner MH, Hrsg. *Endotoxemia and endotoxin shock: Disease, diagnosis and therapy*. 167. Aufl. Basel: Karger, 14–24. doi:10.1159/000315915.

- Opel KL, Chung D, McCord BR (2010) A study of PCR inhibition mechanisms using real time PCR. *Journal of Forensic Sciences*. 55(1):25–33. doi:10.1111/j.1556-4029.2009.01245.x.
- Orlando G, Baptista P, Birchall M, Coppi P de, Farney A, Guimaraes-Souza NK, Opara E, Rogers J, Seliktar D, Shapira-Schweitzer K, Stratta RJ, Atala A, Wood KJ, Soker S (2011) Regenerative medicine as applied to solid organ transplantation: Current status and future challenges. *Transplant International*. 24(3):223–232. doi:10.1111/j.1432-2277.2010.01182.x.
- Oršolić N, Nemrava J, Jeleč Ž, Kukulj M, Odeh D, Terzić S, Fureš R, Bagatin T, Bagatin D (2018) The beneficial effect of proanthocyanidins and icariin on biochemical markers of bone turnover in rats. *International Journal of Molecular Sciences*. 19(9):2746. doi:10.3390/ijms19092746.
- Ou K, Gu L (2014) Absorption and metabolism of proanthocyanidins. *Journal of Functional Foods*. 7:43–53. doi:10.1016/j.jff.2013.08.004.
- Parfitt AM (1994) Osteonal and hemi-osteonal remodeling: The spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *Journal of Cellular Biochemistry*. 55(3):273–286. doi:10.1002/jcb.240550303.
- Paskalev MD, Goranov NV, Krastev SJ, Roydev RT (2011) Antioxidant and bone healing effect of vitamin E in an experimental osteotomy model in dogs. *Comparative Clinical Pathology*. 20(4):403–408. doi:10.1007/s00580-010-1011-8.
- Pautke C, Schieker M, Tischer T, Kolk A, Neth P, Mutschler W, Milz S (2004) Characterization of osteosarcoma cell lines MG-63, Saos-2 and U-2 OS in comparison to human osteoblasts. *Anticancer Research*. 24(6):3743–3748
- Pinna C, Morazzoni P, Sala A (2017) Proanthocyanidins from *Vitis vinifera* inhibit oxidative stress-induced vascular impairment in pulmonary arteries from diabetic rats. *Phytomedicine*. 25:39–44. doi:10.1016/j.phymed.2016.12.015.
- Quinn JM, Neale S, Fujikawa Y, McGee JO, Athanasou NA (1998) Human osteoclast formation from blood monocytes, peritoneal macrophages, and bone marrow cells. *Calcified Tissue International*. 62(6):527–531. doi:10.1007/s002239900473.

- Rani V, Deep G, Singh RK, Palle K, Yadav UCS (2016) Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. *Life Sciences*. 148:183–193. doi:10.1016/j.lfs.2016.02.002.
- Rao RR, Stegemann JP (2013) Cell-based approaches to the engineering of vascularized bone tissue. *Cytotherapy*. 15(11):1309–1322. doi:10.1016/j.jcyt.2013.06.005.
- Rauf A, Imran M, Abu-Izneid T, Iahisham-UI-Haq, Patel S, Pan X, Naz S, Sanches Silva A, Saeed F, Rasul Suleria HA (2019) Proanthocyanidins: A comprehensive review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 116:108999. doi:10.1016/j.biopha.2019.108999.
- Ricard-Blum S (2011) The collagen family. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 3(1):a004978. doi:10.1101/cshperspect.a004978.
- Rico-Llanos GA, Borrego-González S, Moncayo-Donoso M, Becerra J, Visser R (2021) Collagen type I biomaterials as scaffolds for bone tissue engineering. *Polymers*. 13(4):599. doi:10.3390/polym13040599.
- Risau W (1997) Mechanisms of angiogenesis. *Nature*. 386(6626):671–674. doi:10.1038/386671a0.
- Risau W, Flamme I (1995) Vasculogenesis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 11:73–91. doi:10.1146/annurev.cb.11.110195.000445.
- Robey PG (2002) Bone matrix proteoglycans and glycoproteins. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, Hrsg. *Principles of bone biology*. San Diego: Academic Press, 225–237. doi:10.1016/B978-012098652-1.50116-5.
- Rodan SB, Imai Y, Thiede MA, Wesolowski G, Thompson D, Bar-Shavit Z, Shull S, Mann K, Rodan GA (1987) Characterization of a human osteosarcoma cell line (Saos-2) with osteoblastic properties. *Cancer Research*. 47(18):4961–4966
- Rothamel D, Schwarz F, Sculean A, Herten M, Scherbaum W, Becker J (2004) Biocompatibility of various collagen membranes in cultures of human PDL fibroblasts and human osteoblast-like cells. *Clinical Oral Implants Research*. 15(4):443–449. doi:10.1111/j.1600-0501.2004.01039.x.

- Rouwkema J, Gibbs S, Lutolf MP, Martin I, Vunjak-Novakovic G, Malda J (2011) In vitro platforms for tissue engineering: Implications for basic research and clinical translation. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 5(8):e164-e167. doi:10.1002/term.414.
- Rupp M, Kerschbaum M, Klute L, Frank L, Alt V (2021) Knochentransplantation oder Biomaterial? *Der Unfallchirurg*. 124(2):146–152. doi:10.1007/s00113-020-00861-z.
- Safadi FF, Barbe MF, Abdelmagid SM, Rico MC, Aswad RA, Litvin J, Popoff SN (2009) Bone structure, development and bone biology. In: Khurana JS, Hrsg. *Bone pathology*. Totowa: Humana Press, 1–50. doi:10.1007/978-1-59745-347-9_1.
- Salamanca E, Hsu CC, Yao WL, Choy CS, Pan YH, Teng N-C, Chang W-J (2020) Porcine collagen-bone composite induced osteoblast differentiation and bone regeneration in vitro and in vivo. *Polymers*. 12(1):93. doi:10.3390/polym12010093.
- Salbach J, Rachner TD, Rauner M, Hempel U, Anderegg U, Franz S, Simon J-C, Hofbauer LC (2012) Regenerative potential of glycosaminoglycans for skin and bone. *Journal of Molecular Medicine*. 90(6):625–635. doi:10.1007/s00109-011-0843-2.
- Salbach-Hirsch J, Ziegler N, Thiele S, Moeller S, Schnabelrauch M, Hintze V, Scharnweber D, Rauner M, Hofbauer LC (2014) Sulfated glycosaminoglycans support osteoblast functions and concurrently suppress osteoclasts. *Journal of Cellular Biochemistry*. 115(6):1101–1111. doi:10.1002/jcb.24750.
- Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL (2004) Bone tissue engineering: State of the art and future trends. *Macromolecular Bioscience*. 4(8):743–765. doi:10.1002/mabi.200400026.
- Schipani E, Maes C, Carmeliet G, Semenza GL (2009) Regulation of osteogenesis-angiogenesis coupling by HIFs and VEGF. *Journal of Bone and Mineral Research*. 24(8):1347–1353. doi:10.1359/jbmr.090602.

- Schmidt T, Stachon S, Mack A, Rohde M, Just L (2011) Evaluation of a thin and mechanically stable collagen cell carrier. *Tissue Engineering Part C: Methods*. 17(12):1161–1170. doi:10.1089/ten.tec.2011.0201.
- Schneier M, Razdan S, Miller AM, Briceno ME, Barua S (2020) Current technologies to endotoxin detection and removal for biopharmaceutical purification. *Biotechnology and Bioengineering*. 117(8):2588–2609. doi:10.1002/bit.27362.
- Schuurmans CCL, Mihajlovic M, Hiemstra C, Ito K, Hennink WE, Vermonden T (2021) Hyaluronic acid and chondroitin sulfate (meth)acrylate-based hydrogels for tissue engineering: Synthesis, characteristics and pre-clinical evaluation. *Biomaterials*. 268:120602. doi:10.1016/j.biomaterials.2020.120602.
- Serrano J, Puupponen-Pimiä R, Dauer A, Aura A-M, Saura-Calixto F (2009) Tannins: Current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. *Molecular Nutrition & Food Research*. 53(2):310-329. doi:10.1002/mnfr.200900039.
- Shejawal KP, Randive DS, Bhinge SD, Bhutkar MA, Wadkar GH, Jadhav NR (2020) Green synthesis of silver and iron nanoparticles of isolated proanthocyanidin: Its characterization, antioxidant, antimicrobial, and cytotoxic activities against COLO320DM and HT29. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 18(1):43. doi:10.1186/s43141-020-00058-2.
- Shi J, Yu J, Pohorly JE, Kakuda Y (2003) Polyphenolics in grape seeds— Biochemistry and functionality. *Journal of Medicinal Food*. 6(4):291–299. doi:10.1089/109662003772519831.
- Siggelkow H, Rebenstorff K, Kurre W, Niedhart C, Engel I, Schulz H, Atkinson MJ, Hüfner M (1999) Development of the osteoblast phenotype in primary human osteoblasts in culture: Comparison with rat calvarial cells in osteoblast differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry*. 75(1):22–35. doi:10.1002/(sici)1097-4644(19991001)75:1<22::aid-jcb3>3.0.co;2-6.
- Sila-Asna M, Bunyaratvej A, Maeda S, Kitaguchi H, Bunyaratavej N (2007) Osteoblast differentiation and bone formation gene expression in strontium-inducing bone marrow mesenchymal stem cell. *The Kobe Journal of Medical Sciences*. 53(1-2):25–35

- Sommerfeldt DW, Rubin CT (2001) Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. *European Spine Journal*. 10(2):86-95. doi:10.1007/s005860100283.
- Stein GS, Lian JB, Owen TA (1990) Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation. *FASEB Journal*. 4(13):3111–3123. doi:10.1096/fasebj.4.13.2210157.
- Strathearn KE, Yousef GG, Grace MH, Roy SL, Tambe MA, Ferruzzi MG, Wu Q-L, Simon JE, Lila MA, Rochet J-C (2014) Neuroprotective effects of anthocyanin- and proanthocyanidin-rich extracts in cellular models of Parkinson's disease. *Brain Research*. 1555:60–77. doi:10.1016/j.brainres.2014.01.047.
- Tierney CM, Jaasma MJ, O'Brien FJ (2009) Osteoblast activity on collagen-GAG scaffolds is affected by collagen and GAG concentrations. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 91(1):92–101. doi:10.1002/jbm.a.32207.
- Todd JJ, Vodkin LO (1993) Pigmented soybean (glycine max) seed coats accumulate proanthocyanidins during development. *Plant Physiology*. 102(2):663–670. doi:10.1104/pp.102.2.663.
- Ulfing N (2005) *Kurzlehrbuch Histologie*. 2. Aufl. Stuttgart. Thieme. 264.
- Unger RE, Peters K, Wolf M, Motta A, Migliaresi C, Kirkpatrick CJ (2004) Endothelialization of a non-woven silk fibroin net for use in tissue engineering: Growth and gene regulation of human endothelial cells. *Biomaterials*. 25(21):5137–5146. doi:10.1016/j.biomaterials.2003.12.040.
- Unger RE, Halstenberg S, Günther H, Sartoris A, Brochhausen C, Kirkpatrick CJ (2009) Bewertung von neuartigen Biomaterialien zum Zweck der Knochenrekonstruktion und -regeneration. *Der Orthopäde*. 38(11):1020–1028. doi:10.1007/s00132-009-1491-x.
- Unger RE (2014) Essential criteria that must be met by novel biomaterials prior to further in vitro and in vivo biological evaluation. *Advanced Biomaterials and Devices in Medicine*. 1(1):38–45

- Unger RE, Krump-Konvalinkova V, Peters K, Kirkpatrick CJ (2002) In vitro expression of the endothelial phenotype: Comparative study of primary isolated cells and cell lines, including the novel cell line HPMEC-ST1.6R. *Microvascular Research*. 64(3):384–397. doi:10.1006/mvre.2002.2434.
- Unger RE, Sartoris A, Peters K, Motta A, Migliaresi C, Kunkel M, Bulnheim U, Rychly J, Kirkpatrick CJ (2007) Tissue-like self-assembly in cocultures of endothelial cells and osteoblasts and the formation of microcapillary-like structures on three-dimensional porous biomaterials. *Biomaterials*. 28(27):3965–3976. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.05.032.
- Unger RE, Halstenberg S, Sartoris A, Kirkpatrick CJ (2011) Human endothelial and osteoblast co-cultures on 3D biomaterials. In: Haycock JW, Hrsg. 3D cell culture: Methods and protocols. 695. New York: Humana Press, 229–241. doi:10.1007/978-1-60761-984-0_15.
- Unger RE, Peters K, Sartoris A, Freese C, Kirkpatrick CJ (2014) Human endothelial cell-based assay for endotoxin as sensitive as the conventional Limulus Amebocyte Lysate assay. *Biomaterials*. 35(10):3180–3187. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.12.059.
- Vallet-Regí M, Colilla M, González B (2011) Medical applications of organic-inorganic hybrid materials within the field of silica-based bioceramics. *Chemical Society Reviews*. 40(2):596–607. doi:10.1039/c0cs00025f.
- Vandrovcová M, Douglas T, Hauk D, Grössner-Schreiber B, Wiltfang J, Bačáková L, Warnke PH (2011) Influence of collagen and chondroitin sulfate (CS) coatings on poly-(lactide-co-glycolide) (PLGA) on MG 63 osteoblast-like cells. *Physiological Research*. 60(5):797–813. doi:10.33549/physiolres.931994.
- Velnar T, Gradisnik L (2018) Tissue augmentation in wound healing: The role of endothelial and epithelial cells. *Medical Archives*. 72(6):444–448. doi:10.5455/medarh.2018.72.444-448.
- Wang C-S, Vodkin LO (1994) Extraction of RNA from tissues containing high levels of procyanidins that bind RNA. *Plant Molecular Biology Reporter*. 12(2):132–145. doi:10.1007/BF02668374.

- Wang X, Quinn PJ (2010) Lipopolysaccharide: Biosynthetic pathway and structure modification. *Progress in Lipid Research*. 49(2):97–107. doi:10.1016/j.plipres.2009.06.002.
- Watson EC, Adams RH (2018) Biology of bone: The vasculature of the skeletal system. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 8(7):a031559. doi:10.1101/cshperspect.a031559.
- Weston SA, Parish CR (1990) New fluorescent dyes for lymphocyte migration studies. *Journal of Immunological Methods*. 133(1):87–97. doi:10.1016/0022-1759(90)90322-m.
- Wiedmann-Al-Ahmad M, Gutwald R, Gellrich N-C, Hübner U, Schmelzeisen R (2005) Search for ideal biomaterials to cultivate human osteoblast-like cells for reconstructive surgery. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 16(1):57–66. doi:10.1007/s10856-005-6447-z.
- Williams DF (2008) On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*. 29(20):2941–2953. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.04.023.
- Wu X, Yu H, Zhou H, Li Z, Huang H, Xiao F, Xu S, Yang Y (2020) Proanthocyanidin B2 inhibits proliferation and induces apoptosis of osteosarcoma cells by suppressing the PI3K/AKT pathway. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 24(20):11960–11971. doi:10.1111/jcmm.15818.
- Xu Z, Du P, Meiser P, Jacob C (2012) Proanthocyanidins: Oligomeric structures with unique biochemical properties and great therapeutic promise. *Natural Product Communications*. 7(3):381–388. doi:10.1177/1934578X1200700321.
- Yabe T, Nemoto A, Uemura T (1997) Recognition of osteopontin by rat bone marrow derived osteoblastic primary cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 61(4):754–756. doi:10.1271/bbb.61.754.
- Yang D-J, Jeon J-H, Lee S-Y, An H-W, Park KO, Park K-B, Kim S (2016) Effects of collagen grafting on cell behaviors in BCP scaffold with interconnected pore structure. *Biomaterials Research*. 20:3. doi:10.1186/s40824-016-0049-3.

- Ye X, Krohn RL, Liu W, Joshi SS, Kuszynski CA, McGinn TR, Bagchi M, Preuss HG, Stohs SJ, Bagchi D (1999) The cytotoxic effects of a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract on cultured human cancer cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 196(1-2):99–108. doi:10.1023/A:1006926414683.
- Zhai P, Peng X, Li B, Liu Y, Sun H, Li X (2020) The application of hyaluronic acid in bone regeneration. *International Journal of Biological Macromolecules*. 151:1224–1239. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.10.169.
- Zhang H, Lewis CG, Aronow MS, Gronowicz GA (2004) The effects of patient age on human osteoblasts' response to Ti–6Al–4V implants in vitro. *Journal of Orthopaedic Research*. 22(1):30–38. doi:10.1016/S0736-0266(03)00155-4.
- Zhu Y-S, Gu Y, Jiang C, Chen L (2020) Osteonectin regulates the extracellular matrix mineralization of osteoblasts through P38 signaling pathway. *Journal of Cellular Physiology*. 235(3):2220–2231. doi:10.1002/jcp.29131.

Danksagung

Lebenslauf