

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

Vaterit als Biomaterial für die natürliche Knochenregeneration

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

Vorgelegt von

Alica Christin Schäfer
aus Aschaffenburg

Mainz, 2021

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 07.12.2021

meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	VI
Formelverzeichnis.....	VII
1 Einleitung.....	1
1.1 Tissue Engineering.....	1
1.2 Bone Tissue Engineering.....	1
2 Ziel der Dissertation.....	3
3 Literaturdiskussion.....	5
3.1 Grundverständnis des Knochenmetabolismus.....	5
3.2 Knochenregeneration.....	6
3.2.1 Regeneration von Extraktionsalveolen.....	10
3.3 Knochenregeneration und Angiogenese.....	13
3.4 Knochenersatzmaterial.....	16
3.4.1 HA, TCP, HCA, Kollagen.....	17
3.4.2 Vaterit.....	20
3.5 Biokompatibilität von Knochenersatzmaterial.....	21
3.6 Zellen.....	26
3.6.1 Primärzellen.....	27
3.6.2 Zelllinien.....	27
3.6.3 Pluripotente und multipotente Stammzellen.....	28
4 Material.....	29
4.1 Instrumentarium.....	29
4.2 Chemikalien.....	30
4.3 Verbrauchsmaterialien.....	33
4.4 Zellkulturmedien.....	34
4.5 Primer.....	35

Inhaltsverzeichnis

4.6 Antikörper	36
4.7 Herkunft und Isolation der Primärzellen	37
4.8 Herkunft der Zelllinien	39
4.9 Getestetes Biomaterial	40
5 Methoden.....	43
5.1 Zellkultivierung	43
5.2 Sterilitätstest der Biomaterialien	44
5.3 Zellvitalitätstest mithilfe von Resazurin.....	45
5.4 Immuncytochemie	46
5.4.1 Endotoxin-Test mit HUVEC.....	49
5.4.2 Endotoxin-Test mit HUVEC und ISO-HAS.c1	51
5.4.3 Untersuchung des Zellwachstums auf Biomaterial.....	52
5.4.4 Untersuchung des Zellwachstums in Kokultur	53
5.5 Untersuchung der Genexpression mittels RT-PCR.....	54
6 Ergebnisse.....	58
6.1 Sterilitätstest der Biomaterialien	58
6.2 Toxizitätstest mittels Resazurin	59
6.3 Endotoxin-Test auf E-Selektin	66
6.3.1 Endotoxin-Test aller Biomaterialien mit HUVEC	66
6.3.2 Endotoxin-Test explizit mit Kol-Vat.....	69
6.4 Untersuchung des Zellwachstums auf Biomaterial.....	70
6.5 Untersuchung des Zellwachstums in Kokultur.....	79
6.6 Untersuchung der Genexpression.....	80
7 Diskussion	86
7.1 Immunologisches Potenzial.....	90
7.2 Beeinflussung des Zellwachstums	97
7.3 Untersuchung der Zellphysiologie	100
7.4 Limitationen der Zellwahl.....	109

Inhaltsverzeichnis

7.5 Ausblick	112
8 Zusammenfassung	118
9 Literaturverzeichnis	120
10 Danksagung	VIII
11 Lebenslauf	IX

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
ALP	Alkalische Phosphatase
Ang	Angiopoetin
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
AT	Annealing Temperature
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor (= FGF-2)
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BM	Biomaterial
BME	β -Mercaptoethanol
BMP	Bone Morphogenetic Proteins
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
BTE	Bone Tissue Engineering
BZÄK	Bundeszahnärztekammer
Calcein-AM	Calcein-acetoxy-methylester
CaP	Calciumphosphat
CD31	Cluster of Differentiation 31 (= PECAM-1)
cDNA	complementary DNA
DAPI	Diamidin-phenylindol
DGZMK	Deutsche Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
DIN	Deutsches Institut für Normung
DMA	Dimethacrylat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMEM/F-12	Dulbecco's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture F-12
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (= DNS)

Abkürzungsverzeichnis

DNasen	Desoxyribonukleasen
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
E. coli	Escherichia coli
ECGS	Endothelial Cell Growth Supplement
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELAM	endothelial-leukozytäres Adhäsionsmolekül
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EMA	European Medicines Agency
ES	embryonale Stammzellen
E-Selektin	Endothel-Selektin
EZM	Extrazellulärmatrix
FCS	fötales Kälberserum
FGF	Fibroblast Growth Factor
GBR	Guided Bone Regeneration
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GOZ	Gebührenordnung für Zahnärzte
HA	Hydroxylapatit
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HCA	Hydroxylcarbonatapatit
HDMEC	Human Dermal Microvascular Endothelial Cells
HEPES	Hydroxyethyl-piperaziny-ethansulfonsäure
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HSMC	Human Smooth Muscle Cells
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IGF	Insulin-like Growth Factor
IgG	Immunglobulin G

Abkürzungsverzeichnis

IL	Interleukin
iPS	induzierte pluripotente Stammzellen
kb	Kilobasenpaar
KEM	Knochenersatzmaterial
kGy	Kilogray
Kol	Kollagen
Kol-Vat	Kollagen-Vaterit
LAL	Limulus Amebocyte Lysate Assay
LbL	Layer-by-Layer
LPS	Lipopolysaccharid
M199	Medium 199
M-CSF	Macrophage Colony-Stimulating Factor
MMP	Matrixmetalloproteinasen
mRNA	messenger RNA
MSZ	mesenchymale Stammzellen
MTS	Dimethylthiazolyl-carboxymethoxyphenyl-sulfophenyl-tetrazolium
MTT	Dimethylthiazolyl-diphenyltetrazoliumbromid
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NF- κ B	Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
PBS	Phosphate Buffered Solution
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PECAM	Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule
PEG	Polyethylenglykol
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd

Abkürzungsverzeichnis

PLLA	Poly-L-Lactic Acid
PMDA	Pharmaceuticals and Medical Devices Agency
pOB	primäre Osteoblasten
PRF	Plateled Rich Fibrin
RANK	Receptor Activator of NFκB
RANKL	Receptor Activator of NF-κB Ligand
RNA	Ribonukleinsäure (= RNS)
RNasen	Ribonukleasen
rpm	revolutions per minute
RT	reverse Transkriptase
SBF	simulierte Körperflüssigkeit
SN	Seriennummer
SP	Socket Preservation
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCP	Tricalciumphosphat
TE	Tissue Engineering
TGF	Transforming Growth Factor
T-Kontrolle	Toxizitäts-Positivkontrolle
TNF	Tumornekrosefaktor
URL	Uniform Resource Locator
UV	ultraviolett
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
VE-Cadherin	Vascular Endothelial-Cadherin
VEGF	Vascular Endothelial Cell Growth Factor
vWF	von-Willebrand-Faktor
Z-Kontrolle	Zellkontrolle

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Veranschaulichung Versuchsaufbau der Kokultur	53
Abbildung 2: Toxizitätstest mit Resazurin und L929	60
Abbildung 3: Toxizitätstest mit Resazurin und HUVEC	61
Abbildung 4: Toxizitätstest mit Resazurin und pOB.....	62
Abbildung 5: Toxizitätstest mit Resazurin und MG-63	63
Abbildung 6: Toxizitätstest mit Resazurin und SaOs-2.....	64
Abbildung 7: Endotoxin-Test aller BM mit HUVEC	67
Abbildung 8: Phasenkontrastmikroskopie von HUVEC mit Extrakt.....	68
Abbildung 9: Endotoxin-Test von Kol-Vat mit HUVEC.....	69
Abbildung 10: Endotoxin-Test von Kol-Vat mit ISO-HAS.c1.....	70
Abbildung 11: Zellwachstum von HUVEC auf BM	71
Abbildung 12: Zellwachstum von pOB auf BM.....	73
Abbildung 13: Zellwachstum von MG-63 auf BM.....	75
Abbildung 14: Zellwachstum von SaOs-2 auf BM.....	77
Abbildung 15: Untersuchung des Zellwachstums in Kokultur	79
Abbildung 16: Genexpression von HUVEC auf BM	81
Abbildung 17: Genexpression von pOB auf BM	82
Abbildung 18: Genexpression von MG-63 auf BM.....	83
Abbildung 19: Genexpression von SaOs-2 auf BM	84

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendetes Instrumentarium	29
Tabelle 2: Verwendete Chemikalien	30
Tabelle 3: Verwendete Verbrauchsmaterialien	33
Tabelle 4: Verwendete Zellkulturmedien	34
Tabelle 5: Verwendete Primer	35
Tabelle 6: Genutzte Antikörper	36
Tabelle 7: Versuchsaufbau des Endotoxin-Tests aller BM	49
Tabelle 8: Versuchsaufbau des Endotoxin-Tests von Kol-Vat.....	51
Tabelle 9: Versuchsaufbau der Untersuchung des Zellwachstums in Kokultur	53
Tabelle 10: Resultate des Sterilitätstest der BM	58
Tabelle 11: Zellproliferation in Präsenz der BM	65
Tabelle 12: Auswertung der PCR von HUVEC	81
Tabelle 13: Auswertung der PCR von pOB	82
Tabelle 14: Auswertung der PCR von MG-63.....	83
Tabelle 15: Auswertung der PCR von SaOs-2	84

Formelverzeichnis

Formel 1: Berechnung der Zellkonzentration.....	44
Formel 2: Berechnung des benötigten Volumens.....	44

1 Einleitung

1.1 Tissue Engineering

Tissue Engineering (TE) bezeichnet ein interdisziplinäres Gebiet, das die Prinzipien des Ingenieurwesens und der Biowissenschaften zugunsten der Entwicklung von biologischen Ersatzstoffen vereint, die Gewebefunktion wiederherstellen, aufrechterhalten oder verbessern (Skalak und Fox 1988, zit. nach Langer und Vacanti 1993). Von trivialen Suggestionen über dessen Bedeutung absehend, beschreibt ‚Engineering‘ hier weniger einen an Maschinen und dafür Verantwortlichen gekoppelten Arbeitsprozess, sondern die Bündelung wissenschaftlicher Erkenntnisse auf Basis der Zellbiologie zur Erschaffung eines zweckerfüllenden Materials (Williams 2006). TE beschreibt das Ziel, verletztes, fehlendes oder beschädigtes Gewebe vorerst mit einem, diesem ähnlichen, Grundgerüst (Scaffold) zu stabilisieren, das durch Biomaterial (BM) repräsentiert werden kann (Williams 2009). Nach Transplantation *in vivo* soll diese formgebende Struktur im optimalen Fall auf natürlichem, also physiologischem Weg resorbiert und vollständig durch körpereigenes Material ersetzt werden. Das Scaffold kann ad hoc mit gewebsspezifischen Zellen (Unger et al. 2007) oder Wachstumsfaktoren (Kesireddy und Kasper 2016) benetzt werden, um die Integration im Implantationsgebiet zu optimieren. Es sollte die Adhäsion sowie die Einsprossung von Blutgefäßen ermöglichen, welche in der gewünschten Geweberegeneration eine so zentrale Rolle spielen (Kirkpatrick et al. 2007). Die ausgebildeten Gefäßstrukturen erleichtern patienteneigenen Zellen die Migration und nachfolgende Resorption des Gerüsts, um dieses allmählich durch neues, körpereigenes Gewebe ersetzen zu können (Chappard et al. 1993).

1.2 Bone Tissue Engineering

Knochen gilt weltweit auf dem Gebiet der Humanmedizin als zweithäufigstes Transplantationsgewebe, dem Spitzenreiter Blut folgend (van Heest und Swiontkowski 1999). Der Begriff des Bone Tissue Engineering (BTE) beschreibt das obig erwähnte TE speziell für Knochengewebe. Es ist nach heutigen Erkenntnissen und Fortschritten im Zusammenhang mit Knochenersatzmaterial (KEM), das als solches eine Spezifikation von BM darstellt, in humanmedizinischer Anwendung nicht mehr

wegzudenken. Aufgrund einer gestiegenen Lebenserwartung und einer stetig älter werdenden Weltbevölkerung ist auch ein Anstieg auf dem Gebiet muskuloskelettaler Beschwerden, wie beispielsweise Frakturen, Tumoren, Osteoporose und Knochenmetastasen zu verzeichnen (Agarwal und García 2015), welche das Interesse an rekonstruierendem Material, speziell für Knochen, begründen. KEM soll nach Transplantation in Knochen vorerst durch Osteoblasteninteraktion mit diesem verwachsen, um allmählich abgebaut und bestenfalls simultan durch körpereigenes Gewebe ersetzt werden zu können (Ohgushi et al. 1989). Hierzu benötigt das Scaffold daran anknüpfende, aussprossende Gefäßstrukturen, gewährleistet durch Endothelzellen, die das Implantationsgebiet mit knochenbildenden Zellen und Nährstoffen versorgen (Unger et al. 2007).

Die zunehmende Relevanz des BTE und seine gewichtige Bedeutung basiert in erster Linie auf der begrenzten Anzahl von autologem Spendermaterial bei kontinuierlich wachsendem Bedarf. Autologes Material, wie beispielsweise in der oralchirurgischen Anwendung häufig zum Einsatz kommender Knochen des Beckenkamms, gilt als durch Entnahmemorbidität begrenzt (Gitelis und Saiz 2002). Während allogenes Material, entsprechend eines anderen menschlichen Spenders, mit dem Problem von Abstoßungsreaktionen behaftet sein kann, zeigt es darüber hinaus nach Gefriertrocknungsbehandlung nur schwache Osteoinduktivität (Keating und McQueen 2001), demnach kaum Fähigkeit, mesenchymale Stammzellen (MSZ) zur Differenzierung zu knochenbildenden Zellen zu stimulieren (Chappard et al. 1993). Xenogene Materialien, die von einer anderen Spezies als der des Menschen entstammen, können als weniger begrenzte Ressource angesehen werden. Die Gefahr einer immunologischen Reaktion oder Infektion (Wu et al. 2019) wird heute durch geeignete Reinigungsverfahren möglichst gering gehalten (Chappard et al. 1993; Fages et al. 1994; Schnürer et al. 2003). Auch synthetisierte, resorbierbare KEM, dann als alloplastisch zu bezeichnen, die einerseits osteoinduktiv, als auch osteokonduktiv, also dem nachwachsenden Knochen ein Gerüst zum Nachwachsen bieten (Chappard et al. 1993), gelten als vielversprechende Alternative zur Behandlung ossärer Defekte.

2 Ziel der Dissertation

Diese Studie untersucht ein neuartiges Kollagen-Vaterit-Präparat für die natürliche Knochenregeneration. Primäres Ziel stellt die Evaluation der Biokompatibilität des in Kollagennetzen eingebetteten Vaterits dar. Bei gleichzeitig erhaltener Reaktionsfähigkeit zur Umwandlung in Hydroxylcarbonatapatit (HCA) soll jener Vaterit als Garant eines für die natürliche Knochenregeneration so wichtigen Ionen-Puffersystems dienen. Augenmerk dieses Kombinationspräparats liegt auf der Verbindung osteokonduktiver Eigenschaften von Vaterit mit stabilisierenden Fähigkeiten des Kollagennetzes. Vaterit könnte somit die Adhäsion von Osteoblasten induzieren, während das umgebende Kollagen einwandernden Endothelzellen als leitende Struktur diene. Diese Endothelzellen könnten anschließend in die von Osteoblasten gebildete Extrazellulärmatrix (EZM) migrieren und kapillarähnliche Strukturen ausbilden. Das neuartige Kollagen-Vaterit-Präparat soll die für Knochenregeneration fundamentalen Zellen wie Osteoblasten und Endothelzellen unterstützen und deren physiologischen Funktionen aufrechterhalten, um allmählich von einwachsendem Knochen ersetzt werden zu können. Kollagen selbst steht mit keinerlei inflammatorischen Reaktionen in Verbindung (Ferreira et al. 2012). Es findet darüber hinaus klinische Anwendung als knochenersetzendes Material im Sinne eines natürlichen Platzhalters. Biokompatibilität bildet die Grundvoraussetzung einer jeden Verwendung von BM in der Humanmedizin. Ermöglichen BM durch optimale Interaktion mit für physiologische Knochenregeneration essenziellen Zellen wie Osteoblasten und Endothelzellen einen erfolgreichen Knochenersatz, so werden sie als KEM bezeichnet. Biokompatibel, und damit absolut gewebeverträglich, werden grundsätzlich nicht toxische Produkte betitelt, die ohne inflammatorische Reaktionen mit den Wirtszellen interagieren (Schnürer et al. 2003). Hinsichtlich der Evaluation von Biokompatibilität *in vitro* muss ein KEM steril, frei von zytotoxischen Inhaltsstoffen und frei von Endotoxinen sein. Darüber hinaus sollte es Zellen die Adhäsion und Proliferation ermöglichen, wie dies auch bei Knochenregeneration *in vivo* beobachtet wird. Abschließend darf die Interaktion von KEM und Zellen die physiologische Genexpression nicht beeinträchtigen. Zugunsten einer solch graduellen Evaluierung der Tauglichkeit von Kollagen-Vaterit im Einsatz als KEM, nutzte diese Arbeit diverse Zellen, darunter primäre Osteoblasten, primäre Endothelzellen, osteoblastische Zelllinien, eine Endothelzelllinie sowie eine fibroblastische Mauszelllinie.

Zum Vergleich galten ähnliche Materialien, die bereits Verwendung auf dem Gebiet des BTE finden, als Referenz. Hierbei handelte es sich um vorwiegend kollagenbasierte Materialien, wie Collacone, Mucoderm, Porcines Perikard, Porcine Dermis und Rogg neben Collacone max, einem BM unter Zusatz von Hydroxylapatit und Tricalciumphosphat (HA/TCP). Um Rückschlüsse auf die Vaterit-Komponente des Kollagen-Vaterit-Präparats zuzulassen, diente ein Muster des separaten Kollagenzusatzes zum indirekten Vergleich.

Zugunsten der Prüfung vorig genannter Kriterien zur Erfüllung von Biokompatibilität testete diese Arbeit zunächst die Sterilität der Materialien. Anschließend folgte eine grundlegende Untersuchung der Proben auf Zytotoxizität, bevor nähere Tests hinsichtlich möglicherweise präsenster Endotoxine angestellt werden konnten. Daraufhin wurde das Zellwachstum mithilfe fluoreszenzbasierter Methoden auf den diversen KEM analysiert, um Rückschlüsse auf mögliche Interaktionen *in vivo* zu ziehen. Außerdem erfolgte eine Untersuchung der Genexpression einzelner Zellarten in Kontakt mit den Materialien unter Zuhilfenahme einer Polymerasekettenreaktion (PCR) mit anschließender Gelelektrophorese.

3 Literaturdiskussion

3.1 Grundverständnis des Knochenmetabolismus

Knochensubstanz lässt sich in eine organische und eine anorganische Phase gliedern, neben denen sie außerdem Lipide, Zellen und Wasser enthält. Der organische Teil besteht zu 95 % aus Typ-1-Kollagen, die restlichen 5 % machen Proteoglykane und nichtkollagene Proteine aus, darunter Osteokalzin, Osteopontin sowie Osteonektin.

Die anorganische Phase setzt sich hauptsächlich aus kristallinem Hydroxylapatit (HA) zusammen (Ginebra et al. 2018). Das in der Natur am häufigsten vorkommende Apatit ist Calciumphosphatapatit der generellen Formel $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$. In Knochen findet sich eine nicht-stöchiometrische, relativ calciumarme Form des HA, das bis zu 8 % Carbonat enthält (Okada und Furuzono 2012; Ginebra et al. 2018). Darüber hinaus lassen sich Spurenelemente wie Magnesium, Natrium, Kalium, Chlorid, Strontium, Fluor und Wasser nachweisen (Ginebra et al. 2018).

Als die drei wichtigsten Zellarten zum Erhalt der Knochenintegrität sind Osteoblasten, Osteoklasten sowie Osteozyten zu nennen. Eingebettet in eine kombiniert anorganisch/organische Matrix, kommt jeder dieser Zellarten eine gesonderte Funktion zu.

Als Matrixbestandteil wird schon während der Proliferationsphase der Osteoblasten Kollagen Typ 1 produziert, das einen Hauptteil der unmineralisierten Extrazellulärmatrix (EZM) ausmacht und in diesem Kontext auch als Osteoid bezeichnet wird (Boyce et al. 2009). Fibroblasten stabilisieren jene neu gebildete, kollagene EZM. Während der Matrixreifung erfolgt die Expression weiterer, nicht-kollagener Proteine wie der alkalischen Phosphatase (ALP) (George et al. 2006). In der späteren Phase der Mineralisation dann die Expression von Osteokalzin, Osteonektin und Osteopontin. ALP wird von Osteoblasten exprimiert, um Phosphat aus anorganischem Pyrophosphat zu spalten. In Kombination mit Calcium können Osteoblasten HA-Kristalle für den Knochenaufbau generieren, die in die EZM zwischen Kollagenfibrillen eingebaut werden (Vimalraj 2020) und damit das Osteoid mineralisieren. Während Osteokalzin neben regulativer Beeinflussung ebenso für die Reifung der Knochenmatrix eine herausragende Stellung einnimmt (Boskey et al. 1998), fällt Osteonektin für die Mineralisation neu synthetisierter Kollagenstränge und somit deren gefestigten Bindungen zu Knochen ins Gewicht (Termine et al. 1981). Singh et al. (2018) konkretisierten, dass Osteopontin Kristallwachstum von HA

reguliert und osteoklastenvermittelte Knochenresorption zu fördern vermag, wodurch das für Knochenintegrität so essenzielle Remodeling des Knochens, auch Knochenumbau genannt, ermöglicht wird. Insgesamt können die drei zuletzt genannten Proteine als Marker regelrecht ablaufender Knochenmineralisation gelten.

Osteoblasten produzieren folglich den organischen Anteil der Matrix, gleichermaßen vermögen sie anorganische Bestandteile zu generieren. Osteoklasten besitzen die Fähigkeit zur Knochenresorption. Nach indirekter Stimulation durch Parathormon exprimieren Osteoblasten den Receptor Activator of NF- κ B Ligand (RANKL), der sie zur indirekten Bindung an Osteoklasten befähigt. Osteoklasten bilden daraufhin osteoidabbauende Enzyme, sogenannte Matrixmetalloproteinasen (MMP), und senken den lokalen pH-Wert durch Sekretion von H^+ , Cl^- und Kathepsin K signifikant herab, um Knochen resorbieren zu können (Doi et al. 1998; Ono und Nakashima 2018). Osteoklasten ihrerseits können die knochenbildende Aktivität von Osteoblasten induzieren (Boyce et al. 2009). Parathormon fördert die Aktivität der Osteoklasten, während Osteoprotegerin, Calcitonin und Östrogene diese mindern. Osteozyten hingegen sind reife, ruhende Knochenzellen. Es handelt sich hierbei um ehemalige Osteoblasten, die gänzlich von Knochengewebe umsäumt wurden. Sie regulieren den Knochenumbau (Remodeling) (Boyce et al. 2009), der für die Stabilität und funktionelle Integrität des Knochens unerlässlich ist.

Verantwortlich für das Remodeling sind größtenteils Osteoblasten und Osteoklasten (Hadjidakis und Androulakis 2006). Faktoren wie Alterungsprozesse, Verletzungen, Infektionen und Tumoren können diesen konstanten Umbau beeinträchtigen. Bei ausgeprägten Traumata, Frakturen oder Knochenentnahmen, die Infektionen oder entarteten Zellen geschuldet sind, wird der Einsatz von KEM unabdingbar.

3.2 Knochenregeneration

Die reiche Vaskularisierung von Knochen impliziert grundsätzlich eine gute Wund- und Frakturheilung. Letztere stellt eine außergewöhnliche Variante der Regeneration dar, die sogenannte *restitutio ad integrum*, bei der neu gebildetes Gewebe später nicht mehr vom ursprünglich unversehrten Knochen abgrenzbar scheint. Anders als bei weichem Gewebe, verbleibt keinerlei fibröse Narbe am Verletzungsort (Majidinia et al. 2018). Derzeit werden zwei verschiedene Arten der Knochenregeneration unterschieden. Zum einen die direkte, primäre Variante mit minimaler Kallusbildung,

zum anderen die indirekte, sekundäre Variante inklusive kombiniert desmale (intramembranöser) und chondraler Ossifikation. Bei der direkten Frakturheilung besteht unmittelbarer Kontakt der Fragmente, sodass Unger et al. (2009) zufolge Osteoklasten und Gefäße aus eröffneten Havers-Kanälen, kleinen Zentralkanälen in der äußeren, sehr dichten Knochenschicht (Substantia compacta), in gegenüberliegende Bruchflächen wachsen und Knochen resorbieren. Anschließend besiedelnde Osteoblasten kleiden entstandene Nischen mit Osteoid aus, das allmählich verkalkt. Die Fraktur muss hierfür rigide stabilisiert sein. Bei der sekundären Frakturheilung besteht zwischen den Frakturrenden ein breiterer Spalt, der zunächst von einem Hämatom und einem sich daraus entwickelnden, bindegewebigen Kallus ausgefüllt wird. Die nekrotisierenden Frakturrenden werden sodann von Osteoklasten resorbiert (Unger et al. 2009).

In Hinsicht auf Knochen- und Frakturheilung ist besonders die indirekte Variante von Bedeutung, bei der sowohl desmale als auch chondrale Ossifikation kombiniert ablaufen (St-Arnaud und Naja 2011; Fazzalari 2011) und die dem physiologischen Heilungsprozess *in vivo* entspricht (Niethard et al. 2017). Während die desmale Knochenbildung direkte Knochenapposition unter dem Periost beschreibt, durchläuft die chondrale Ossifikation an angrenzenden Frakturbereichen mehrere Übergangszustände unter Bildung einer knorpelartigen Matrix, die allmählich kalzifiziert und durch Knochen ersetzt wird (Einhorn 1998; Einhorn 2005). Vorläufig entstandenes Knochengewebe, sogenannter Geflechtknochen, besteht aus ungeordnet verlaufenden Kollagenfasern. Geflechtknochen gilt als zellreich und weist nur einen geringen Mineralisationsgehalt auf. Auf die Bildung dieser stabilisierenden Übergangsform folgt sukzessive der Umbau zu belastungsstabilem Lamellenknochen. Dieser beschreibt umfangreicher organisiertes Gewebe, das sich durch trajektorieell, also in Belastungsrichtung ausgerichtete Kollagenfasern auszeichnet. Die EZM organisiert sich hierbei in eine zentral liegende, durch trabekuläre Knochenbälkchen gebildete Substantia spongiosa und eine peripher gebildete, an Havers-Kanälen reiche Substantia compacta (Welsch 2003; Schünke et al. 2014).

Der Prozess der indirekten Frakturheilung lässt sich in mehrere, ineinander übergehende Phasen gliedern, die als Inflammation, Regenerations- sowie Umbauphase deklariert werden (Haffner-Luntzer und Ignatius 2019):

Inflammatorische Phase

Die Frakturheilung beginnt mit einer inflammatorischen Phase. Hierbei schießt die Expression proinflammatorischer Mediatoren in die Höhe, darunter neben Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) auch die zwei in Bezug auf Knochenheilung wahrscheinlich einflussreichsten Interleukine (IL) IL-1 und IL-6 (Marsell und Einhorn 2011). Diese Signale rekrutieren inflammatorische Zellen wie Makrophagen und begünstigen die Angiogenese (Dimitriou et al. 2005), letztere unter anderem durch Produktion von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) stimuliert (Marsell und Einhorn 2011; Hu und Olsen 2016). Der von Osteoblasten exprimierte VEGF spielt eine Schlüsselrolle bei der Aktivierung aussprossender Angiogenese.

Durch Verletzung einer Gefäßwand aktivierte Thrombozyten sezernieren Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1) und Platelet Derived Growth Factor (PDGF). Osteoprogenitorzellen exprimieren Bone Morphogenetic Proteins (BMP) und es kommt zur Freisetzung von Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2) (Schindeler et al. 2008). Dieses Zusammenspiel führt zur Rekrutierung von MSZ und zum Übergang in die Phase der Kallusbildung, der sogenannten chondrogenen Phase (Cho et al. 2002; Dimitriou et al. 2005).

Regenerationsphase (Chondrogene Phase)

Im Bereich angrenzender Frakturrenden werden zugunsten der chondrozytenvermittelten Kallusbildung zunächst MSZ rekrutiert. Diese MSZ differenzieren im Sinne der chondralen Ossifikation zu Chondrozyten, die unter Ausbildung eines weichen Kallus weiter proliferieren. In Bereichen fehlender oder ungenügend ausgeprägter knorpelartiger Matrix erfolgt die Ablagerung fibrösen Gewebes durch Fibroblasten (Schindeler et al. 2008). Die chondrogene Phase scheint durch Höchstwerte an von Chondrozyten produziertem Kollagen Typ 2 und Kollagen Typ 10 charakterisiert (Cho et al. 2002). Nach Gewährleistung hinreichender Stabilität durch Ausbildung einer Kallusbrücke werden die Chondrozyten hypertroph. Sie nehmen eine hyperplastische Gestalt an und zeigen Apoptose. Während die EZM mineralisiert, wird der Knorpel unter Einsprossung von Gefäßen vaskularisiert, angeregt durch VEGF und Angiopoetin-1 (Ang-1) (Schindeler et al. 2008). Dies bedingt die Migration von Osteoprogenitorzellen und hämatopoetischen Stammzellen, die sodann in Osteoblasten und Osteoklasten differenzieren. Osteoklasten beseitigen atrophierte Zellen und mineralisiertes Knorpelgewebe, während Osteoblasten diese

Vorgängersubstanz durch ossäre Matrix, vorwiegend Kollagen Typ 1 enthaltend, ersetzen. Allseits der Kollagenfibrillen erfolgt schließlich die Ablagerung von HA-Kristallen durch Osteoblasten (Schwenzer und Bacher 2011). Eine beträchtliche Rolle spielt überdies die resultierende Hochregulation von ALP, welche anorganisches Pyrophosphat spaltet. Das entstehende Phosphat kann anschließend in Kombination mit Calcium durch Osteoblasten zu kristallinem HA generiert werden (Vimalraj 2020).

Im Bereich des Periosts nahe der Fraktur sowie unmittelbar an kortikalem Knochen erfolgt die desmale Ossifikation. Hierbei differenzieren MSZ direkt zu Osteoblasten (Schwenzer und Bacher 2011). Unter fortwährender Proliferation bilden jene Osteoblasten wenige Tage später vorläufigen Knochen aus, den sogenannten Geflechtknochen.

Gemäß Cho et al. (2002) kommen diversen BMP und weiteren Mitgliedern der TGF- β -Familie sowohl bei der desmalen als auch bei der chondralen Ossifikation wichtige regulative Funktionen zu. Über den gesamten Zeitraum der Frakturheilung detektierbare Level von exprimiertem Osteokalzin sowie Kollagen Typ 1 vermögen indessen ablaufende Osteogenese zu bestätigen (Cho et al. 2002).

Remodeling/Umbauphase

Die aus den Osteoprogenitorzellen differenzierten Osteoblasten exprimieren neben Interleukinen zudem weitere Schlüsselfaktoren der Osteozytogenese, wie Macrophage Colony-Stimulating Factor (M-CSF) und RANKL (Schindeler et al. 2008), die die Differenzierung der Osteoklasten fördern. In einer Literaturübersicht verwies Weitzmann (2017) auf die Vermutung, dass inflammatorische Zytokine, wie IL-1, IL-6, IL-7, IL-17a, TNF- α und VEGF die Osteoklastogenese indirekt über Stimulation der Produktion von RANKL regulieren. Unter Präsenz von M-CSF bindet RANKL an auf Osteoklastenvorläuferzellen befindlichen Receptor Activator of NF- κ B (RANK) und induziert somit die Differenzierung zu aktivierten und funktionsfähigen Osteoklasten. Von Osteoblasten gebildetes Osteoprotegerin hingegen verhindert die Bindung von RANKL an RANK und reguliert damit auch den durch Osteoklasten vermittelten Knochenabbau (Liu und Zhang 2015). Das Zusammenspiel der knochenabbauenden und knochenbildenden Eigenschaften der Osteoklasten und Osteoblasten verwandelt Geflechtknochen allmählich in funktionsstabilen Lamellenknochen (Mountziaris und Mikos 2008). Die Phase des Remodelings kann ein bis zwei Jahre in Anspruch nehmen (Niethard et al. 2017).

Bestimmte Bedingungen wie Frakturspalten einer Größe über 3 cm, Trümmerzonen unter statisch externer Fixation oder entstehende Pseudarthrosen, können die physiologisch regelrechte Wundheilung eines konservativ therapierten Defektes behindern (Unger et al. 2009). In solchen kritisch zu prognostizierenden Fällen kann BTE eine vielversprechende Alternative bieten, suffiziente Knochengeneration zu ermöglichen.

3.2.1 Regeneration von Extraktionsalveolen

Im zahnmedizinischen Bereich spielt das Knochenangebot insbesondere in Hinblick auf Zahnersatz eine beträchtliche Rolle. Nicht nur bei implantologischer Planung, sondern auch bei prothetischem Brückenersatz zeigt sich das gingivale Niveau für die schlussendliche Ästhetik als fundamental. Mit Zahnextraktionen gehen resorptive Umbauprozesse des Knochens unausweichlich einher, die Resorption der vestibulären Knochenlamelle gravierender ausgeprägt als die der lingualen sowie palatinalen Wand (Araújo und Lindhe 2005). In einem Review resümierten Tan et al. (2012), dass der horizontale Knochenverlust sechs Monate nach einer Zahnextraktion durchschnittlich bei 29 – 63 % und der vertikale Dimensionsverlust bei 11 – 22 % liegen kann, wobei die stärksten Resorptionsprozesse nach Extraktion innerhalb der ersten drei bis sechs Monaten zu verzeichnen sind. Wesentlich ist die resultierende Feststellung, dass der horizontale, den Alveolendurchmesser betreffende Knochenrückgang dreimal über dem vertikalen Knochenrückgang liegt (Götz und Schnutenhaus 2016). Dennoch hängt Knochenatrophie in der Sagittalen maßgeblich von der transversalen Knochendicke ab. Acht Wochen nach Extraktion von Frontzähnen kann der vertikale Knochenverlust bei dünnen Knochenlamellen in einer transversalen Stärke von 1 mm auch bis hin zu 7,5 mm betragen. Dies repräsentiert eine 3,5-fach höhere sagittale Resorption als in Studien dickwandigeren Knochens (Chappuis et al. 2013). Grundsätzlich atrophiert der Alveolarfortsatz im Unterkiefer stärker als der des Oberkiefers. Die erwähnten Maße sollen annäherungsweise eine gewisse Vorstellung der Dimension von extraktionsbedingter Knochenresorption vermitteln. Aufgrund verschiedener Bedingungen, wie der Anzahl und der Position zu extrahierender Zähne, parodontalen Komorbiditäten sowie der individuellen Belastbarkeit getesteter Patienten, kann keine allgemeingültige Aussage diesbezüglich getroffen werden. Der Heilungsprozess von Extraktionsalveolen ist,

ähnlich dem der Frakturheilung, in verschiedene, ineinanderfließende Phasen gegliedert:

Inflammatorische Phase

Nach der Extraktion eines Zahnes füllt sich die zurückbleibende Alveole mit Blut, das binnen kurzer Zeit in ein Blutkoagulum umgewandelt wird. Nach zwei bis drei Tagen beginnt die Einwanderung inflammatorischer Zellen, die die Alveole vor Bildung neuen Gewebes von unerwünschten Mikroorganismen befreien (Araújo et al. 2015). Die Kombination aus inflammatorischen Zellen, Endothelzellen und Fibroblasten führt zur Ausbildung kollagenreichen Granulationsgewebes (Krüger 1977), welches das Koagulum ersetzt und die proliferative Phase einleitet (Araújo et al. 2015; Götz und Schnutenhaus 2016).

Proliferative Phase

Das provisorisch gebildete Granulationsgewebe bietet ein Gerüst für einwandernde Endothelzellen und Osteoblasten. Über dem Blutkoagulum bildet sich epitheliales Gewebe, das die Extraktionswunde bereits nach sieben Tagen abzudecken vermag (Krüger 1977). Dieser Prozess wird auch als Reepithelialisierung bezeichnet. Innerhalb des Koagulums folgt die Ablagerung von Osteoid durch Osteoblasten, die zuvor aus Osteoprogenitorzellen differenzierten. Osteoid stellt erneut die unreife Grundsubstanz dar, die innerhalb von zwei bis vier Wochen mineralisiert (Götz und Schnutenhaus 2016). Anschließend kommt es gemäß Araújo et al. (2015) zu fingerförmigen Ablagerungen von Geflechtknochen entlang der neu gebildeten Gefäße. Nach vollständigem Einschluss von Gefäßen durch Geflechtknochen benennen sich diese funktionellen Einheiten als Osteone. Geflechtknochen ist nach etwa zwei Wochen im Knochendefekt detektierbar und verbleibt dort für einige Wochen. Es handelt sich hierbei um den obig beschriebenen unreifen Knochen, der allmählich zu belastungsstabilem Lamellenknochen umgebaut wird (Araújo et al. 2015).

Remodeling/Umbauphase

Die Umwandlung von Geflecht- zu Lamellenknochen wird als Bone Remodeling bezeichnet. Resorptive Vorgänge, wie den Alveolarkamm betreffende, werden als

Knochenumbauprozesse deklariert. Ab der vierten Woche wandelt sich das in der Alveole befindliche Gewebe langsam zu stabilem Lamellenknochen um, das Epithel fusioniert und wird mehrschichtig (Götz und Schnutenhaus 2016). Während die vollständige Reepithelialisierung in der Regel nach sechs Wochen als abgeschlossen gilt (Götz und Schnutenhaus 2016), bedarf es für den vollständigen Umbau des Knochens hin zu Lamellenknochen einige Monate (Lindhe et al. 2012; Araújo et al. 2015; Araújo et al. 2015).

Als anatomische Besonderheit lässt sich sogenannter Bündelknochen hervorheben, der die innere Alveolenwand auskleidet. Er betitelt eine dünne Knochenlamelle von 0,2 bis 0,4 mm ohne Osteone und dient parodontalen Fasern, wie Sharpey'schen Fasern, als Verankerung (Araújo et al. 2015). Der Name begründet sich in der Beschaffenheit bündelförmig, parallel einstrahlender Fasern des parodontalen Ligaments (Götz und Schnutenhaus 2016). Studien von Araújo und Lindhe (2005) zufolge gilt Bündelknochen als ausschließlich vom jeweiligen Zahn erhalten und wird bei Extraktion vollständig resorbiert, während restlicher Alveolarknochen *per diffusionem* versorgt wird. Bei sehr dünnwandigem, fast ausschließlich aus Bündelknochen bestehendem Knochen, kann dies in vollständiger Resorption der bukkalen Knochenlamelle resultieren (Fröhlich 2009; Rathe 2011). Der bukkale vertikale Knochenverlust steht also in direktem Zusammenhang mit der Dicke der noch bestehenden bukkalen Alveolenwand (Jung et al. 2018). Der Alveolendurchmesser stellt einen weiteren beeinflussenden Faktor bei der Regeneration von Extraktionsalveolen dar. Je größer die interalveoläre Distanz, desto geringer füllt sich die zurückbleibende Alveole mit Knochen (Rathe 2011). Dass eine Sofortimplantation Knochenresorption verhindere, widerlegten bereits Clementini et al. (2015) anhand einer Beurteilung diverser Studien. Stumbras et al. (2019) vereinten in einer Literaturübersicht verschiedener Methoden die Aussagen der Autoren zu dem Schluss, dass ‚Socket Preservation‘ (SP) diese Knochenresorption zwar nicht gänzlich verhindern könne, deren vertikale und horizontalen Ausmaße allerdings herabzusetzen vermöge. Einige Autoren behalten den Begriff SP ausschließlich vierwandigen Knochendefekten vor, sie bezeichnen den Erhalt von zwei- oder dreiwandigen Defekten nicht intakter Alveolen dann als ‚Ridge Preservation‘ (Endreß 2009; Happe 2010). Im Folgenden werden sowohl ‚Socket‘ als auch ‚Ridge Preservation‘ unter SP gemeinsam erläutert.

SP beschreibt das Prinzip des Auffüllens einer Extraktionsalveole, um die beschriebenen, resorptiven Umbauvorgänge nach Zahnextraktionen zu minimieren und zielt auf den Erhalt der Alveole ab (Rathe 2011). In erster Linie soll SP die mit einer Zahnextraktion einhergehende Kieferkammatrophy verringern (Hollay et al. 2014; Al-Nawas et al. 2020). Der Ausschuss Gebührenrecht der Bundeszahnärztekammer (BZÄK) beschreibt in einer tabellarischen Aufstellung knochenchirurgischer Leistungen (07/2013) autologen Knochen oder KEM als primäres Füllmaterial einer SP. Dem Einbringen von KEM soll sodann eine überdeckende Membran und/oder die Bildung eines weichgewebigen Lappens mit primärem Wundverschluss folgen. Trennende Membranen zwischen Parodont beziehungsweise Alveolarknochen und gingivalem Weichgewebe können im Sinne der Guided Bone Regeneration (GBR) zum Erhalt des Kieferkammknochens die Alveole von schneller proliferierendem Epithelgewebe freihalten, um später migrierenden Osteoblasten und Endothelzellen die Möglichkeit der Knochenneubildung zu gewähren (Mardas et al. 2010). Solche stabilisierenden Barrieremembranen gelten insbesondere bei größeren Knochendefekten als vorteilig (Al-Nawas et al. 2020). Sie können entweder alleinig (Lekovic et al. 1998) oder als KEM überdeckende Komponente (Barone et al. 2008) implantiert werden. Für kleinere Alveolarkammdefekte bis 3 mm konnte sich die separate Anwendung kollagenbasierter, resorbierbarer Membranen im Sinne der GBR bewähren (Al-Nawas et al. 2020). Für größere Defekte oder zugunsten eines ossären Alveolenerhalts mit nicht intakten Knochenwänden stellt die Verwendung von KEM in Kombination mit überdeckenden, resorbierbaren Membranen die Therapie der Wahl nach aktuellen Standards dar (Al-Nawas et al. 2020). Im Bereich der dentalen Implantologie bewährte sich insbesondere die Kombination von porcinen oder bovinen Kollagenmatrices in Anwendung mit KEM (Mardas et al. 2010). Bezüglich des Füllmaterials einer SP bieten sich zahlreiche Möglichkeiten, von denen Buch et al. (2005) eine ausführliche Übersicht anfertigten. Darunter findet sich ebenfalls HA, welches laut Buch et al. (2005) gute Langzeitergebnisse liefert und der hier untersuchten Vaterit-Komponente ähnlich ist (siehe auch Abschnitt 3.4.2).

3.3 Knochenregeneration und Angiogenese

Das Zusammenspiel von Knochenregeneration und Angiogenese, letztere oftmals auch als Vaskularisierung bezeichnet, ist von entscheidender Bedeutung. Neben der

Versorgung mit Sauerstoff und Wachstumsfaktoren sichert Angiogenese gleichzeitig den immunologischen Prozess in der initialen Phase der Implantation von KEM.

Derzeit werden drei Arten der Angiogenese unterschieden: Vaskulogenese, aussprossende und nicht aussprossende Angiogenese.

Vaskulogenese gilt als vorwiegend auf die embryonale Entwicklung beschränkt und bezeichnet die *de novo* Generierung von Gefäßen aus endothelialen Vorläuferzellen des Knochenmarks (Risau 1997). Sie kann allerdings gleichermaßen eine Rolle bei aussprossender Angiogenese im Falle von Wundheilung spielen (Carmeliet 2000).

Aussprossende Angiogenese bezeichnet die Ausbildung neuer Gefäße unter Migration und Proliferation von Endothelzellen, demgemäß durch Neuaussprossung bestehender Gefäße. Als Endothelzellen werden die innere Schicht der Gefäßwand auskleidenden Zellen bezeichnet, die unter anderem die Regulation des Gefäßtonus, der Hämostase und inflammatorischer Prozesse beeinflussen. Gegenüber weiteren Zellen der Gefäßwand wie Perizyten oder glatten Muskelzellen kommt Endothelzellen die gewichtigste Bedeutung im Rahmen der Angiogenese zu. Bei der nicht aussprossenden Angiogenese teilen sich vorhandene Gefäße durch Endothelzellausläufer (Carmeliet 2000). Hierbei findet vornehmlich ein Längenwachstum statt.

Im menschlichen Organismus und insbesondere bei der Integration von KEM sind alle drei eben genannten Formen der Gefäßbildung relevant. Da die aussprossende Angiogenese für die initiale Integration des KEM, auch im Rahmen der ausgelösten inflammatorischen Reaktion, die wohl gewichtigste Funktion einnimmt, wird diese im Folgenden näher erläutert (Carlier et al. 2012; Reinke und Sorg 2012).

Zu Beginn der aussprossenden Angiogenese erhöhen hypoxische Bedingungen, die sowohl in Tumor-, als auch in nekrotischem Gewebe vorzufinden sind, die Freisetzung von VEGF und Stickstoffmonoxid (NO), letzteres durch Makrophagen produziert. Diese Mediatoren führen zur Erhöhung der Gefäßpermeabilität (Conway et al. 2001). Ein niedriger Sauerstoffpartialdruck im Gewebe induziert zudem die Freisetzung von Hypoxie-induzierten Faktoren (HIF). Der Anstieg an HIF bedingt gleichzeitig einen Anstieg von freigesetztem VEGF, sowie eine Stabilisation von VEGF messenger RNA (mRNA), welches unweigerlich zur Stimulation von Endothelzellen in angrenzenden Blutgefäßen führt (Papetti und Herman 2002). VEGF, unter anderem von Osteoblasten exprimiert, induzieren sowohl Migration als auch Proliferation der Endothelzellen (Burke et al. 1995). Die Aktivierung von Endothelzellen führt zum ersten Schritt der Angiogenese, der Erhöhung der Gefäßpermeabilität durch Umverteilung endothelialer

Adhäsionsmoleküle wie Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (PECAM-1) und Vascular Endothelial Cadherin (VE-Cadherin) (Esser et al. 1998; Conway et al. 2001). Es folgt die durch VEGF induzierte Extravasation von Plasmaproteinen, die eine vorübergehend unterstützende Struktur bilden, um Endothelzellen die Migration zu erleichtern (Conway et al. 2001).

Angiopoetin-2 (Ang-2) lockert interzelluläre Kontakte von Endothelzellen, sodass die Zellen nun in die umgebende Matrix aussprossen können (Maisonpierre et al. 1997; Gale und Yancopoulos 1999), während Ang-1 die neu gebildeten Gefäße anschließend stabilisiert (Gavard et al. 2008). Die aussprossenden ‚Tip-Zellen‘ endothelialer Art bilden fingerförmige Zellfortsätze aus, sogenannte Filopodien, die nun den Weg der neu aussprossenden Gefäße entlang des VEGF-Gradienten leiten (Gerhardt et al. 2003). Die sich unmittelbar vor den ‚Tip-Zellen‘ erstreckende Matrix wird durch Proteinasen wie MMP aufgelöst (Rundhaug 2005). Dies gewährt aussprossenden Endothelzellen nicht nur ausreichend Platz für deren Angiogenese, sondern führt auch zur Freisetzung pro-angiogenetischer Faktoren, wie basic Fibroblast Growth Factor (bFGF, synonym zu FGF-2), VEGF und Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1), die zuvor in der EZM eingebettet lagen (Conway et al. 2001). Außerdem werden Adhäsionsstellen nun proteolytisch freigelegt, um die Migration der Endothelzellen zu ermöglichen (Conway et al. 2001). Zur Bildung funktioneller Gefäßstrukturen ist die Formation von Hohlräumen essenziell. Kamei et al. (2006) vermuteten, dass die Formation und Fusionierung intra- und interzellulärer Endothelzellvakuoli in der Bildung von vaskulären Lumina resultiert.

Nach Schaffung früher und fragiler Gefäßstrukturen müssen diese stabilisiert werden, den Begriff der Reifung prägend. Ang-1 stabilisiert hierfür die neu gebildeten Gefäße durch Phosphorylierung und damit Aktivierung von PECAM-1 und VE-Cadherin, welche sodann die interzellulären Kontakte der Endothelzellen festigen (Gamble et al. 2000).

Unter Einfluss von PDGF werden MSZ rekrutiert, die zu wandständigen Perizyten in mikrovaskulären Gefäßen sowie glatten Muskelzellen in größeren Gefäßen differenzieren. Durch die angeregte Proliferation zuletzt genannter können die unreifen Gefäßstränge ergänzend gefestigt werden (Papetti und Herman 2002). Darüber hinaus sorgt Ang-1 anhand des beschriebenen Mechanismus für Stärkung interzellulärer Zell-Zell-Kontakte und bewirkt weitere Stabilisation der Gefäßwand.

Perizyten bilden gemeinsam mit Endothelzellen anschließend EZM (Benjamin et al. 1998) und bewahren neu gebildete Gefäße vor Abbau.

VEGF wird im Zusammenhang mit Angiogenese die wohl kritischste Rolle zuteil. Dieser Wachstumsfaktor ist bei allen Entwicklungsstadien der Gefäßneubildung präsent und kann damit als bestimmende Komponente zur Detektion stattfindender Angiogenese dienen (Jin und Patterson 2008). Durch Osteoblasten gebildet repräsentiert VEGF auch im Rahmen der Knochenregeneration eine herausragende Stellung.

Eine gesicherte Angiogenese gilt als essenziell hinsichtlich der Einheilung neu transplanteder Materialien, weshalb die schnelle Vaskularisierung neuer, als TE verwendeter BM Ziel aktueller Studien darstellt (Unger et al. 2007). Die soeben bekräftigte Relevanz von Angiogenese im Rahmen der Knochenregeneration betont die entscheidende Rolle der Endothelzellen. Während Osteoblasten für die Bildung neuer EZM zuständig sind, die im weiteren Verlauf verkalkt und allmählich zu Knochen umgebaut wird, ermöglicht diese Matrix und osteoblastär gebildete VEGF einwandernden Endothelzellen die Migration. Eine ausreichende Nährstoffversorgung kann derart lediglich durch anschließende Angiogenese gesichert werden. Folglich konkretisiert sich die Relation von Osteoblasten und Endothelzellen bei der regelrechten, natürlichen Knochenregeneration.

3.4 Knochenersatzmaterial

Die Grundvoraussetzung der Verwendung jeglichen BM in der Medizin stellt dessen Biokompatibilität dar. Darüber hinaus gelten Zellproliferation, Matrixreifung und Mineralisation als drei aufeinanderfolgende Stadien, die auf optimalem KEM erkennbar sein sollten. Als Matrixbestandteil wird schon während der Proliferationsphase der Osteoblasten Kollagen Typ 1 produziert. Während der Matrixreifung kommt es sodann zur Expression von ALP (Golub et al. 1992), später zur Bildung von Osteokalzin, Osteopontin und Osteonektin. Optimale KEM sollten Osteoblasten möglichst zur Expression dieser Stoffe anregen, um ein regelrechtes Durchlaufen der vorig genannten Stadien zu ermöglichen (Unger et al. 2009). Sie sollten bestenfalls sowohl osteokonduktiv als auch osteoinduktiv sein. Osteokonduktivität bezeichnet die Fähigkeit eines Materials, nachwachsendem Regenerationsgewebe als formgebende Leitstruktur zu dienen, während Osteoinduktivität die Anregung zur Bildung neuen Knochens beschreibt. Die

Resorption des Materials sollte mit neu gebildetem Knochen einhergehen, um durchweg ausreichende Stabilität zu gewährleisten. Eine ergänzend sichergestellte konstante, lokale Mineralstoffversorgung und ein damit einhergehendes Ionen-Puffersystem ermöglichen suffiziente Regeneration von Knochen (Schröder et al. 2015).

Die Nutzung von autologem Knochen gilt noch heute als Goldstandard (Wu et al. 2019), da das immunologische Risiko als gering eingestuft wird. Jedoch birgt sie dennoch die Gefahr einer Infektion der Entnahmestelle oder der grundsätzlichen Schwächung des Patienten durch einen zusätzlichen chirurgischen Eingriff. Autologer Knochen wird durch individuelle Verfügbarkeit an Knochensubstanz limitiert (Campana et al. 2014). Während allogene oder xenogene Materialien, sinngemäß einer anderen Spezies entstammend, bezüglich ihrer Form sowie Größe als weniger eingeschränkt gelten, überwog hier lange das Risiko einer immunologischen Abwehrreaktion sowie Infektion. Heute werden xenogene Materialien, beispielhaft tierischen Ursprungs, daher nur noch in behandelter Form eingesetzt (Schnürer et al. 2003) und mit entsprechenden chemischen Reinigungs- und Extraktionsprozessen aufbereitet (Chappard et al. 1993; Fages et al. 1994). Infolge der Denaturierung von gegenwärtigen Proteinen auf Xenografts träten immunologische Abwehrreaktionen heute nicht mehr auf (Schnürer et al. 2003). Auch alloplastische, also synthetisierte KEM, die osteokonduktive und osteoinduktive Eigenschaften zeigen, sollen in diesem Zusammenhang eine Lösung darstellen (Al-Nawas et al. 2020). In einigen Versuchen der letzten Jahre wurden Materialien entwickelt, die Anforderungen wie Porosität, mechanischer Stabilität und Resorbierbarkeit gerecht werden können. Zur Optimierung der Osteoinduktivität kann im Rahmen der Biofunktionalisierung darüber hinaus die Addition von Wachstumsfaktoren oder anderen regenerativ supportiven Substanzen erfolgen (Kämmerer und Pabst 2020). Diese eigenständig osteoinduktiven Substanzen sollen alloplastische Scaffolds in deren Bioaktivität verbessern (Kesireddy und Kasper 2016).

3.4.1 HA, TCP, HCA, Kollagen

Aufgrund ihrer chemischen Ähnlichkeit zur Knochenhartsubstanz konnten sich über die letzten Jahre besonders Calciumphosphate (CaP), wie Hydroxylapatit (HA) (Laasri et al. 2010) und Tricalciumphosphat (TCP) im Einsatz als Knochengerüste (Scaffolds) bewähren (Dorozhkin 2013). Während die meisten CaP gute Eigenschaften der Osteokonduktivität besitzen, unterscheiden sie sich bezüglich ihrer Osteoinduktivität.

Weiterhin gilt die Osteoinduktivität synthetisierter, azellulärer KEM als umstritten (Ohgushi et al. 1989). Nichtsdestotrotz belegten einige Studien, dass sowohl TCP als auch HA, Knochenbildung durch deren Mikroporosität zu induzieren vermögen (Yuan et al. 1999; Yuan et al. 2001; Chan et al. 2012). CaP können *in vivo* demnach gemäß Champion et al. (2011), Chan et al. (2012) und einigen weiteren Autoren (Yamasaki und Sakai 1992; Habibovic et al. 2005; Ripamonti 1996) aufgrund ihrer spezifischen Oberflächengeometrie sowie Porosität als osteoinduktiv gelten.

TCP lässt sich in Untergruppen wie β -TCP (Kotobuki et al. 2006) sowie α -TCP (Kamitakahara et al. 2008) splitten. Im Unterschied zu β -TCP ist α -TCP besser löslich (Chow 1991), doch laut Yuan et al. (2001) selbst bei identischer Morphologie nicht osteoinduktiv. Trotz der besseren Löslichkeit von α -TCP wird β -TCP aufgrund eines kombiniert hydrolytisch-zellulären Abbaus schneller resorbiert (Merten et al. 2000). Die langsame Degradationsrate von α -TCP begründet sich darin, dass es nahezu vollständig zu HA hydrolysiert (Smeets et al. 2018). HA stellt die amorphe Form von TCP dar (Campana et al. 2014). Als ein häufig als KEM verwendetes Produkt ist HA bei einem pH-Wert von 7,4 thermodynamisch stabiler als beide Formen des TCP (Dorozhkin 2013). HA wird langsamer resorbiert, was infolgedessen gleichermaßen in simultanem Einwachsen neuen Knochens resultiert (Okanoue et al. 2012). Die oft Jahre nach Implantation noch detektierbare Präsenz implantierter HA-Keramiken begründet sich möglicherweise in von Carmo et al. (2018) und Hesaraki et al. (2014) vermuteten hohen Temperaturen bei der Keramikherstellung und anschließender verdichtender Sinterung, die die Kristallinität erhöht und damit biologischen Abbau behindert. Insbesondere bei einem prolongierten Einfluss von Fremdmaterial auf den Körper wie bei KEM fällt dessen Biokompatibilität ins Gewicht. Auch HA vermag durch gesteigerte Mikroporosität osteoinduktiv wirken (Pei et al. 2017).

Zahlreiche Studien konnten belegen, dass β -TCP (Arahira und Todo 2014) und HA (Li et al. 2019) die Adhäsion, Differenzierung und Proliferation von knochenbildenden Zellen wie Osteoblasten oder mesenchymalen Stammzellen begünstigt und eine direkte Verbindung zu Knochen ermöglicht. Während unter Transmissionselektronenmikroskopie in Studien von Fujita et al. (2003) an der Grenze zwischen Knochen und β -TCP spärliche Kollagenfasern, Kalzifizierungen und Osteozytenfortsätze ausgemacht werden konnten und damit eine direkte Verbindung nahe legten, zeigte HA über Ausbildung fibrillärer Strukturen eine zunächst indirekte Bindung zu Knochen. Dies offenbarte unterschiedliche Mechanismen der Integration jener KEM.

Dass der Zusatz von Carbonat (CO_3^{2-}) zu Apatit sowohl die Adhäsion als auch die Proliferation osteoblastischer Zellen zu begünstigen vermag, betonten bereits Pieters et al. (2010). Speziell Hydroxylcarbonatapatit (HCA), ein mit Carbonat versetztes Hydroxylapatit, gewann die letzten Jahre zunehmend an Bedeutung. Der Zusatz von Carbonat bewirkt eine Optimierung von HA, ohne Einbußen in dessen Biokompatibilität zu verursachen (Kolanthai et al. 2017). HCA ist natürlicher Knochensubstanz sehr ähnlich (San Miguel et al. 2010), es überwindet Limitationen des nur schlecht abbaubaren HA und zeigt *in vivo* hohe Osteokonduktivität sowie, unter physiologischen Bedingungen, einen begünstigten Abbau (Carmo et al. 2018). Knochen sollte sich nicht auflösen, bis Osteoklasten den lokalen pH-Wert durch Protonentransfer auf einen Wert von 5,00 absenken. Besonders diesbezüglich zeigt HCA ein interessantes Gleichgewicht zwischen chemischer Dissoziation, Resorption durch Osteoklasten und osteoblastenvermittelter Bildung neuen Knochens (Germaini et al. 2017). HCA begünstigt gegenüber HA die Vitalität osteoblastischer Zellen, zudem eine verbesserte Proliferation von Präosteoblasten (Germaini et al. 2017) und fördert die Bildung neuen Knochens (San Miguel et al. 2010). In Kombination mit den obigen genannten Studien bezüglich CaP (Yuan et al. 1999; Yuan et al. 2001; Campion et al. 2011; Chan et al. 2012) liegt nahe, dass auch HCA durch dessen Mikroporosität osteoinduktiv wirken kann.

Wie in Abschnitt 3.1 näher ausgeführt, gilt Kollagen als natürlicher Bestandteil der extrazellulären Matrix und als essenzielle Komponente der Neubildung von Knochen *in vivo* (Schmidt et al. 2011). Es kann alternativ zu den eben beschriebenen CaP-Präparaten als natürliches Polymer, sinngemäß aus naturgegebenen Quellen, gewonnen und im Sinne des BTE genutzt werden (Ferreira et al. 2012; Ueda et al. 2002). Neben der Optimierung von Stabilität und Dreidimensionalität kann KEM darüber hinaus mit Kollagen ergänzt werden, um die Adhäsion und Proliferation gefäßbildender Endothelzellen zu fördern. Voraussetzend hierfür ist die Migration endothelialer Zellen. Ähnlich des Prinzips der SP oder GBR in der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie (Windisch und Mólnar 2017; Al-Nawas et al. 2020) findet Kollagen auch im Bereich der Orthopädie Anwendung. Im Sinne eines indirekten KEM soll hier eine überbrückende Kollagenmatrix als eine Art Platzhalter dienen. Skelettale Defekte werden demnach vor schneller proliferierendem, umliegenden Weichgewebe freigehalten, um besiedelnden Osteoblasten und Endothelzellen optimale Voraussetzungen zu allmählicher Knochenregeneration bieten zu können.

3.4.2 Vaterit

Jüngst gelang die nähere Erforschung und Synthese von Vateritnanopartikeln $\text{Ca}[\text{CO}_3]$ (Schüler und Tremel 2011; Mugnaioli et al. 2012). In Vaterit, benannt nach dem deutschen Mineralogen und Chemiker Heinrich Vater, wechseln sich hexagonal geordnete CO_3 -Gruppen mit achtfach koordinierten Calcium-Ionen ab, sodass jedes zentral liegende Calcium-Ion von acht Sauerstoff-Ionen der CO_3 -Gruppe umgeben ist (Mugnaioli et al. 2012). In diversen Gesteinsschichten oder von Fischen, Krustentieren oder Vögeln produziert kommt Vaterit in der Natur nur selten vor (Konopacka-Łyskawa 2019). Als letzte stabile, aber auch am besten lösliche Kristallstruktur von Calciumcarbonat (Tolba et al. 2016) bildet Vaterit in Lösung positiv geladene Nanopartikel, die bei Bedarf mit Carboxylat- oder Phosphatgruppen funktionalisiert werden können (Schüler und Tremel 2011). In wasserfreier Form bleibt Vaterit über einen langen Zeitraum stabil und kann in dieser Form trocken gelagert werden. Insgesamt existieren drei polymorphe Kristallstrukturen des $\text{Ca}[\text{CO}_3]$, darunter orthorhombischer Aragonit, rhomboedrischer Calcit und hexagonal angeordneter Vaterit (Boyjoo et al. 2014). Basierend auf deren mäßige Löslichkeit dissoziieren Vaterit-Partikel sukzessive in blutplasmaähnlicher Lösung wie simulierter Körperflüssigkeit (SBF) und bilden HCA (Schröder et al. 2015). Diesen Umwandlungsprozess erklären Schröder et al. (2015) mit der durch Dissoziation von Vaterit freigesetzten Ca^{2+} - und CO_3^{2-} -Ionen. Schlussfolgernd führe die lokale Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration mit einhergehender Anreicherung an aus SBF stammendem Phosphat zu einer Übersättigung der Lösung. Dies resultiere folglich in Keimbildung, ein Begriff der Kristallografie, von HCA oberflächlich des sich lösenden Vaterits (Schröder et al. 2015).

In poröses, dreidimensionales Polyethylenglykol-Acetal-Dimethacrylat-Hydrogel (PEG-Acetal-DMA-Hydrogel) eingebettet, kann Vaterit als mineralisches Reservoir dienen und als biomimetisches Material fungieren (Schröder et al. 2015). So gehalten zeigt Vaterit Potenzial zur Gewährleistung eines Ionen-Puffersystems für *in vivo*-Knochenregeneration bei dennoch bestehender Reaktionsfähigkeit zur Umwandlung zu HCA. Vaterit bildet plättchenförmige Agglomerate von HCA (Schröder et al. 2015), die dem im Knochen vorkommenden Apatit ähnlich sind (San Miguel et al. 2010) und trägt damit die genannten positiven Eigenschaften von HCA.

Demnach kann Vaterit als natürlicher Vorbote von HCA und damit der *in vivo* Knochenbildung gelten. Im Sinne eines KEM begünstigt Vaterit die Zelladhäsion,

Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten (Schröder et al. 2018). Diese Osteoblasten können folgend einerseits Osteoklasten zum Abbau des Vaterits induzieren, neuen Knochen bilden und zudem kollagenbasierte EZM produzieren, welche einwandernden Endothelzellen als Leitstruktur dient und damit verbundene Vaskularisierung ermöglicht.

Einige Methoden zur Synthetisierung von Vaterit nutzen zeitaufwändige Carbonisierungsverfahren von flüssigem Calciumhydroxid (Ca(OH)_2) mit gasförmigem Kohlenstoffdioxid (CO_2) (Maeda et al. 2005; Konopacka-Łyskawa 2019). Auch eine wässrige Synthese konnte bereits beschrieben werden, bei der Dopamin, Glycin oder L-Alanin zur Stabilisierung der Vateritphase benötigt werden (Schröder et al. 2018). Zuletzt jedoch etablierte sich eine schnellere, vereinfachte Methodik der Vateritsynthese, die auf ultraschallgestütztem Zerfall von Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3) in Ethylenglykol unter Gegenwart von Calciumchloridtetrahydrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) beruht (Schüler und Tremel 2011).

3.5 Biokompatibilität von Knochenersatzmaterial

Biokompatibilität bildet die Basis jeglicher Verwendung von BM in der Humanmedizin, so auch für die erfolgreiche Integration von Knochenersatz. Die Begrifflichkeit umfasst, in Zusammenhang mit in Knochenkontakt implantiertem BM, drei Untergruppen, die als Biotoleranz, Bioinertheit und Bioaktivität bezeichnet werden. Während biotolerante Materialien als körperfremd erkannt und aufgrund einer Abkapselung durch körpereigenes Weichgewebe toleriert werden können, vermögen sie über mehrere Jahre im Organismus zu persistieren. Bioinerte Materialien hingegen werden nicht als körperfremd identifiziert. Letztere interagieren nur in geringem Ausmaß anhand biochemischer Wechselwirkungen mit dem Organismus, gehen jedoch keine feste Verbindung mit ihm ein. Bioaktive Materialien demgegenüber besitzen die Fähigkeit mit körpereigenem Gewebe zu verwachsen und eine zugfeste Verbindung auszubilden (Dinkelacker 2014). Zur Begrifflichkeit der Bioaktivität zählen im weiteren Sinne zugleich Osteokonduktivität und Osteoinduktivität. Diese Definitionen gelten im Rahmen von biokompatiblen KEM als erstrebenswertes Ziel synthetisierter Materialien und repräsentieren die Auslegung des dieser Arbeit zugrunde liegenden Verständnisses von Biokompatibilität.

Nicht biokompatible BM oder KEM führen zu einer Aktivierung von Angio- sowie Osteogenese, die lediglich darauf abzielt, das Fremdmaterial von körpereigenem Gewebe zu isolieren (Ivanov et al. 2019). Biokompatibilität gilt demnach als voraussetzend für die Verwendung gewebeersetzenden Materials. Sie lässt sich gemäß Unger et al. (2014) durch Tests bestätigen, bei denen *in vitro*- als auch *in vivo*-Studien die biologischen Interaktionen zwischen Zellen und Material evaluieren, um eine sichere Beurteilung eines spezifischen BM zuzulassen. Diese Interaktionen können Zytotoxizität, inflammatorisches Potenzial, akute, subakute oder chronische Toxizität, Kanzerogenität, Zellwachstum und Abbau des BM inkludieren (Unger et al. 2014).

Zur Evaluation von Biokompatibilität werden Zellen unter sterilen Bedingungen in Laboratorien angezchtet. Anschließend folgt die Kombination des zu testenden Materials mit den angezchteten Zellen. Finales Ziel solcher Studien stellt die Ermittlung der Zellreaktion mit den BM dar, die im weiteren Verlauf Adhäsion, Wachstum, Morphologie, Vitalität und Genexpression der Zellen implizieren. Darüber hinaus möchten präklinische *in vitro*-Studien zellarttypische Phänotypen vorfinden, wie sie als solche bei *in vivo*-Studien zu erwarten sind. Soll das Material anhand von Nanopartikeln mit Zellen interagieren, so werden dieselben eben genannten Kriterien der Zellphysiologie in Präsenz der BM untersucht. Die so gewonnenen Resultate liefern erste Hinweise darauf, welches der neuartigen Materialien wünschenswerte Voraussetzungen erfüllt oder zellphysiologische *in vivo*-Abläufe bestmöglich widerspiegelt. Mithilfe der Protokolle der DIN EN ISO 10993 (2009) lassen sich solche erwünschten Voraussetzungen testen, um sie anschließend, im Rahmen von *in vivo*-Studien, auf ihre Wirksamkeit hin zu überprüfen.

Die Bewertung von Effektivität eines BM und damit auch von KEM beginnt im Allgemeinen mit der Prüfung der so essenziellen, diesen Abschnitt betitelnden, Biokompatibilität anhand von quantitativen Toxizitätstests (Unger 2014). Anschließend können Versuche hinsichtlich des Zellwachstums auf dem BM selbst neben Analysen der Genregulation mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) folgen.

Jedes neu entwickelte KEM erfordert eine Untersuchung im Hinblick auf erfüllte Biokompatibilität. Diesbezüglich wurde eine Reihe internationaler Standards durch die DIN EN ISO 10993 (2009) festgelegt, die der biologischen Beurteilung von Medizinprodukten dient. Präklinisch muss die Durchführung der für die spezifischen BM relevanten Untersuchungen erfolgen. Für Hersteller selbst stellt sich die

eigenverantwortliche Prüfung zum Nachkommen dieser Forderung bei sämtlichen neu entwickelten Materialien oftmals als zu zeitaufwändig und kostenintensiv dar. Solche Untersuchungen werden daher häufig externen Prüflaboratorien überlassen.

Zur Realisierung zellbiologischer Studien müssen KEM vom Hersteller bestimmte, initiale Kriterien erfüllen. Das Material muss nach Unger (2014) steril und frei von toxischen Inhaltsstoffen und Endotoxinen sein. Es soll physiologische Zellreaktionen ermöglichen und unterstützen. Offenkundig induziert die Präsenz von pathogenen Bakterien eine bakterielle Infektion *in vivo*, was demnach auch *in vitro* zu ersichtlichen, unerwünschten Reaktionen in der Zellkultur führt (Unger 2014).

Ein schwerwiegendes Problem bei der Verwendung von BM birgt die Gegenwart von Endotoxinen, auch bekannt als bakterielle Lipopolysaccharide (LPS). Sie sind Bestandteil der äußeren Membran gramnegativer Bakterien. Die Bezeichnung als Endotoxine rührt von der Beobachtung, dass diese LPS bei Bakterienzerfall frei werden und toxisch wirken. Während der Herstellung neuer BM kommt es durch antibiotische Behandlung, Erhitzung des Materials oder zugesetzte Ingredienzen zum Abtöten von Bakterien und damit unvermeidbar zur Freisetzung von LPS (Hurley 1995).

Endotoxine gelten als sehr robust. Enthalten BM und dementsprechend auch KEM bereits vor deren Sterilisierung LPS, so sind diese auch danach noch präsent. Endotoxine können fest an Materialien anhaften und lassen sich schlecht von diesen lösen (Magalhães et al. 2007). Schon geringe Mengen können über Stimulation inflammatorischer Prozesse leichte Symptome wie Fieber und Schüttelfrost, aber auch folgenschwere, systemische Entzündungsreaktionen hervorrufen (Magalhães et al. 2007). Nur endotoxinfreie, sterile KEM garantieren eine erfolgreiche Regeneration von Knochen (Unger 2014). Auch sterile, neuartige KEM können noch wesentliche Mengen an Endotoxin enthalten, wenn sich diese vor dem Sterilisationsprozess im Material befanden. Eine solche Kontamination nimmt enorme Auswirkungen auf zellbiologische Experimente, insbesondere auf Endothelzellen implizierende. Endotoxine in chemischen Lösungsmitteln, polymerisierenden Verbindungen und weiteren Ingredienzen, die zur Synthese des neuartigen Materials verwendet wurden, führen bereits in geringen Mengen zum Ablösen und Absterben der Zellen (Unger 2014). Bis dato gilt vornehmlich das Limulus Amebocyte Lysate Assay (LAL) als allgemein gebräuchlich, um BM für klinische Anwendung am Menschen von Endotoxin frei sprechen zu können (Franco et al. 2018).

Anstelle umfangreicher *in vitro*-Biokompatibilitäts- und Wirksamkeitsstudien in zellbiologischen Laboratorien, können Hersteller gemäß Unger (2014) einige simple und zeitsparende Untersuchungen anstellen, um Materialien hinsichtlich deren Sterilität, Abwesenheit zelltoxischer Inhaltsstoffe und Endotoxinfreiheit zu überprüfen. Diese Methoden ermöglichen simultan die Detektion möglicher Kontaminationsquellen während des Herstellungsprozesses. Die in dieser Arbeit gewählten Studien zur Untersuchung von Sterilität, Freiheit von toxischen Inhaltsstoffen und Abwesenheit von Endotoxin in KEM können problemlos, ohne Notwendigkeit exklusiver oder teurer Geräte, auch in kleineren, zellbiologischen Laboratorien durchgeführt werden (Unger 2014).

Die Kontrolle der Sterilität eines Materials kann anhand eines simplen Sterilitätstests erfolgen. Der Ausschluss von Toxizität gilt als Basis von Biokompatibilität. Zur Überprüfung genereller Toxizität eines BM kann ein Zell-Vitalitätstest mittels Resazurin dienen. Die dort ermittelte Menge an fluoreszenten Werten ist direkt proportional zur Anzahl lebender Zellen in der zu untersuchenden Probe, sodass mögliche Zytotoxizität eines Materials zugleich ermittelt werden kann.

Darüber hinaus zählen Endotoxine als eine nahezu ubiquitär vorkommende, sehr robuste Kontaminationsquelle in finalen BM. Die Prüfung auf Endotoxine in Medizinprodukten wurde in Deutschland weit weniger streng reglementiert als entsprechende Untersuchungen von Arzneimitteln oder Rohstoffen. Daher liegt es vornehmlich im Interesse des Herstellers, die Endotoxinfreiheit eines neu synthetisierten Produkts zu gewährleisten, um den allgemein gültigen europäischen Standards von Arzneimitteln, gemäß europäischem Arzneibuch nach Kapitel 2.6.14, zu entsprechen (Council of Europe, 2005/2006). Gegenwärtig werden mitunter standardmäßig LAL praktiziert, um Materialien auf Endotoxin zu prüfen (Schneier et al. 2020).

Bei der grundsätzlichen Testung auf Toxizität werden ebendiese Endotoxine häufig unterschätzt, weshalb diese Arbeit die Ermittlung von Endotoxin mittels immuncytochemischer Anfärbung von konsekutiv exprimiertem Endothel-Selektin (E-Selektin) gleich an den Toxizitätstest anschloss. Die aus der Zellwand gramnegativer Bakterien freigesetzten Endotoxine induzieren Zellen zur Expression inflammatorischer Proteine und Botenstoffe und gelten daher als proinflammatorisch. Sie ermöglichen hierdurch zusätzlich Einblicke in die Aufrechterhaltung physiologischer Zellfunktionen, weshalb LPS in dieser Arbeit zugunsten der Endotoxin-Positivkontrolle verabreicht wurden.

Die Untersuchung von Osseointegration, Osteokonduktivität sowie Osteoinduktivität kann bei *in vitro*-Studien mit menschlichen Zelllinien, Primärzellen oder Stammzellen erfolgen. Grundsätzlich zeigen diese Zellen in Zellkultur hierbei Charakteristika, die den Zellen *in vivo* ähneln. Während *in vitro* das Wachstum der Zellen auf zwei- oder dreidimensionalem KEM gegenüber dem Wachstum auf Plastik verglichen wird, können Rückschlüsse auf Zellwachstum und Zelleigenschaften getroffen werden. Solche Studien gelten hinsichtlich der Kontrolle von Biokompatibilität als ausschlaggebend und entscheidend. Zeigen die Zellen eine ähnliche Reaktion, wie *in vivo* erwartet, so können erste Rückschlüsse bezüglich einer denkbaren Tierstudie gezogen werden (Unger 2014). Laut Czekanska et al. (2012) stellen primäre, humane Osteoblasten die Zellart der Wahl bei *in vitro*-Versuchen zur Untersuchung von Knochenregeneration dar. In diesen soll Adhäsion, Wachstum und Verhalten der Zellen näher evaluiert werden, um ihnen zellarttypische Charakteristika der physiologischen *in vivo*-Reaktion zusprechen zu können (Czekanska et al. 2012). Für erfolgreiche, zellphysiologische Integration des implantierten KEM sollten Osteoblasten befähigt sein, auf dem Material zu adhären und zu wachsen. Als weitere, für Knochenregeneration essenzielle Zellen, gelten Endothelzellen, die für die Versorgung der Osteoblasten mit Sauerstoff und wichtigen Nährstoffen neben dem Abtransport von Abfallprodukten unverzichtbar sind (Unger et al. 2007). Die Implikation von Endothelzellen in Studien der Untersuchung von KEM vermag Aufschluss über das *in vitro*-Wachstum der Zellen zu geben. Darüber hinaus lassen sich Einblicke in deren essenzielle Genexpression im Zuge inflammatorischer Prozesse sowie in deren angiogenetisches Potenzial gewinnen (Santos et al. 2008). Endothelzellen selbst müssen für die zellphysiologische Integration des KEM am Implantationsort nicht zwingend initial auf dem Material adhären, vielmehr sollten sie erfolgreiche Zellproliferation in dessen Nähe bestätigen. Unter Berücksichtigung dieser Aspekte, untersuchte die vorliegende Arbeit das Zellwachstum von primären Endothelzellen, primären Osteoblasten und Zelllinien osteoblastischer sowie endothelialer Eigenschaften in Präsenz und auf den zu testenden BM. Die Einbeziehung der Fibroblastenzelllinie L929 beruft sich im Rahmen dieser Arbeit vornehmlich auf die durch ISO 10993-5 (2009) befürwortete Verwendung in Zytotoxizitätsversuchen.

Nichtsdestotrotz sind Gewebe und Organe nicht ausschließlich von einer Art Zellen abhängig, vielmehr von einem Zusammenspiel verschiedener. Um BM hinsichtlich dessen Biokompatibilität zukunftsweisend zu untersuchen, favorisierten Unger et al. (2011) die Variante, Osteoblasten sowie Endothelzellen in Kokultur auf dem

interessierenden Material zu kultivieren. Während den Osteoblasten die osteoinduktive Rolle der Knochenneubildung zugutekommt, sind Endothelzellen für die Versorgung jener mit Sauerstoff sowie anderer wichtiger Nährstoffe unabdingbar (Unger et al. 2007). Diese Kokulturen lassen möglichst organismusgetreue Vergleichsstudien unterschiedlicher BM zu. Überzeugt hierbei ein Produkt, so erlaubt dies die Integration in Tierstudien. Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wird das Prinzip einer systematischen Kokultivierung von primären Endothelzellen neben Osteoblasten veranschaulicht, den zwei so essenziellen Zellarten im Rahmen von Knochenregeneration.

Auch die Genexpression bedarf bei der Evaluierung von Biokompatibilität einer besonderen Inspektion. Überdies kann sie Aufschluss über mögliches osteoinduktives Potenzial von KEM geben. Daher schließt die Untersuchung auf exprimierte Genprodukte in Anbetracht einer Beurteilung des Zellmetabolismus mithilfe einer Reversen-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) die Versuchsreihe dieser Arbeit ab (siehe Abschnitt 5.5).

3.6 Zellen

Die für den Knochenmetabolismus relevanten Zellen können unspezifisch auf Osteoblasten, Osteozyten, Osteoklasten, Fibroblasten und Endothelzellen eingegrenzt werden. Zur optimalen Erforschung der Interaktion von KEM werden Osteoblasten (Czekanska et al. 2012) und Endothelzellen favorisiert (Unger et al. 2007). Es bieten sich Primärzellen, tumoröse sowie immortalisierte Zelllinien oder adulte beziehungsweise embryonale Stammzellen an.

Obwohl primäre, humane Osteoblasten laut Siggelkow et al. (1998) die optimalen Zellen für die Erforschung des Knochenmetabolismus und damit auch für die Evaluation von Biokompatibilität von KEM darstellen, scheitert dieses Wunschmodell an der begrenzten Verfügbarkeit verwendbarer Knochenexplantate (Czekanska et al. 2012) und spenderabhängigen, entnahmebedingten phänotypischen Differenzen (Martínez et al. 1999). Durch stattdessen verwendete Zelllinien humaner Osteosarkomzellen oder immortalisierte Primärzellen kann diese Problematik entschärft werden (Spelsberg et al. 1995). Verschiedene Studien zeigten, dass die meisten humanen Zelllinien, die Expressionsmuster osteoblastärer Phänotypen imitieren, anstelle von Primärzellen als Annäherungsmodell für die Erforschung

knochenbildender Zellen genutzt werden können (Bilbe et al. 1996). Dementsprechend etablierte sich eine Reihe von Osteosarkomzelllinien für *in vitro*-Untersuchungen, unter anderem die Zelllinien MG-63 (Bilbe et al. 1996) und SaOs-2 (Rodan et al. 1987; Pontén und Saksela 1967).

3.6.1 Primärzellen

Primärzellen bezeichnen direkt aus Gewebe isolierte Zellen, denen in Zellkulturversuchen vornehmlich alle phäno- als auch genotypischen Eigenschaften der zu untersuchenden Zellart zugeschrieben werden (Czekanska et al. 2012). Durch ihre Ähnlichkeit zur Ursprungszellart repräsentieren sie physiologische Ereignisse und Vorgänge bestmöglich. Nichtsdestominder birgt die Verwendung ebensolcher den Nachteil spenderbegrenzter Verfügbarkeit und Variabilität, kosten- und zeitintensiver Isolation, limitierter Verwendbarkeit und den möglichen Verlust diverser Eigenschaften durch zwangsläufige Passagen (May et al. 2012). Diese Aspekte bedenkend, eignen sich Primärzellen dennoch optimal zur Untersuchung gewebetypischer Vorgänge und stellen daher den Zelltyp der Wahl bei Untersuchungen zu Knochenmetabolismus in Zellkulturversuchen dar.

3.6.2 Zelllinien

Zelllinien werden hauptsächlich aus Krebsgewebe isoliert, da Krebszellen eine enorme Proliferationskapazität zu Grunde liegen. Sie gelten als unbegrenzt verfügbar, klonierbar, genetisch manipulierbar und leicht handzuhaben (May et al. 2012). Czekanska et al. (2012) bezeichneten sie darüber hinaus als verlässlich und ohne ethische Bedenken zeitsparend isolierbar.

Eine andere Lösung der vorig dargestellten Problematik besteht in der sogenannten Immortalisierung, bei der Zellarten durch gentechnische *in vitro*-Transformation, Transfektion beispielsweise, zu robusten, langlebigen und in ihrer Expression spezifischer Eigenschaften relativ beständigen Zelllinien überführt werden können (May et al. 2012). Voraussetzend für die Eignung und den Einsatz immortalisierter Zelllinien ist das Nachahmen wichtiger phäno- und genotypischer Charakteristika. Da Immortalität zugleich mit Kanzerogenität einhergeht, gilt die Verwendung immortalisierter Zelllinien auf *in vitro*-Versuche beschränkt.

3.6.3 Pluripotente und multipotente Stammzellen

Entgegen multipotenter Stammzellen sind embryonale, pluripotente Stammzellen in der Lage, sich in alle Zellen der drei embryonalen Keimblätter sowie der Keimbahn zu differenzieren. Ihre Entnahme aus dem Embryonalstadium, der Blastozyste, gilt allerdings als ethisch umstritten. Zu neuen Ansätzen gezwungen, gelang Takahashi et al. (2007) die Generierung von induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS) aus humanen Fibroblasten. Dies eröffnete neue Möglichkeiten, eine Vielzahl gewünschter Zelltypen und damit neue Gewebe erzeugen zu können (Mungenast et al. 2016). Nichtsdestotrotz sind embryonale, pluripotente Stammzellen (ES) und iPS nicht identisch und es stellt sich die Frage, inwieweit genetische Veränderungen auch unerwünschte Entartungen der Zellen hervorrufen können. Zur Klärung der Frage, inwieweit iPS die ES im Bereich der Grundlagenforschung möglicherweise ablösen können, sind weitere Studien anzustellen (Takahashi et al. 2007).

Multipotente, adulte Stammzellen entstammen ausgewachsenem Gewebe und dienen *in vivo* der Entwicklung und Regeneration des Ursprungsgewebes. Sie können sich weiter differenzieren, sind dabei jedoch auf die Gewebeart ihres Ursprungs spezialisiert. Zu adulten Stammzellen gehören beispielsweise hämatopoetische Stammzellen oder mesenchymale Stammzellen (MSZ). Hämatopoetische Stammzellen können aus Knochenmark isoliert werden, sie sind in deren Differenzierungsverhalten auf die Hämatopoese beschränkt (Pittenger et al. 1999). Hämatopoetische Stammzellen finden bereits bei Stammzelltransplantationen im Rahmen der Therapie leukämieerkrankter Patienten Anwendung (Potdar und Sutar 2010). MSZ entstammen dem Knochenmark, Fettgewebe oder der Nabelschnur. Sie können sich zu einer beschränkten Auswahl an weiteren Zellen differenzieren, darunter Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten (Pittenger et al. 1999).

Dennoch besteht das Problem einer spenderbegrenzten Isolation MSZ aus dem Knochenmark. Weniger invasive Methoden, wie Entnahmen aus Nabelschnur- oder Fettgewebe, gehen mit möglichen Einbußen phänotypischer Charakteristika sowie begrenzten Eigenschaften der Differenzierung einher (Shang et al. 2021). Für Zellkulturversuche bezüglich der Untersuchung von Knochenmetabolismus wird ihr Einsatz daher kontrovers diskutiert. Sie finden in der vorliegenden Arbeit keine Verwendung.

4 Material

4.1 Instrumentarium

Tabelle 1: Verwendetes Instrumentarium

Instrument, Modellbezeichnung	Hersteller
Analysenwaage, A120S	Sartorius, Göttingen
Autoklav	Heraeus Instruments, Hanau
Brutschrank, CO ₂ -Auto-Zero	Heraeus Instruments, Hanau
Eppendorf Zentrifuge, 5427R	Eppendorf AG, Hamburg
Fluoreszenzmikroskop, Bioevo HS9000E	Keyence, Neu-Isenburg
Flüssigstickstofftank, MVE Cryosystem 6000	German-Cryo, Jüchen
Fotoapparat	Olympus, Shinjuku
Gelelektrophorese, Wide Mini-Sub Cell GT Systems	Bio-Rad, München
Inkubator, HERAcell 140i	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Kühlschrank 4 °C/-20 °C	Bosch, München
Lichtmikroskop, Leica DM IRB	Leica Mikrosysteme, Wetzlar
Mikrowelle	Bosch, Gerlingen
Multikanalpipette, Transferpette multichannel pipette	Brandtech, Essex
Netzteil Elektrophorese, Phero Stab 500	Biotec-Fischer, Reiskirchen
Neubauer Zählkammer improved	Roth, Karlsruhe
Pipetman (Pipettensatz)	Gilson, Limburg-Offheim
Pipettierhilfe, Pipetboy acu	Integra Biosciences, Zizers

4 Material

Real Time PCR Cycler, Gene Amp PCR System 9700 (SN: A96S0112479)	Applied Biosystems, Foster City
Sicherheitswerkbank, Hera Safe	Kendro, Langenselbold
Spektralphotometer, Plattenreader multi, Spark 10M, 112664	TECAN Group, Männergdorf
Sterilbank, LaminAir HB 2448	Heraeus Instruments, Hanau
ThermoMixer, C 5382000015	Eppendorf AG, Hamburg
Trockenblockthermostat, Dri-Block DB-2D	Techne, Wiesbaden
UV-Lampe Sterileinheit	Bachofer, Reutlingen
Vakuum Pumpe, Vacusafe Comfort	Integra Biosciences, Fernwald
Vollspektrum-Spektralphotometer NanoDrop, ND-1000	NanoDrop, Wilmington
Vortexer	Fisher Scientific, Waltham
Waage, LC42	Sartorius, Göttingen
Wasserbad Julabo, SW-20C	Julabo, Seelbach
Zentrifuge, Megafuge 1.0	Kendro, Langenselbold

4.2 Chemikalien

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien

Material	Hersteller
1000 bp/1 kb DNA-Leiter (N3232L)	New England BioLabs, Ipswich
Amphotericin B 250 µg/ml (15290018)	Gibco, Carlsbad
Aqua dest. Ampuwa Plastipur (13MMP201)	Fresenius Kabi, Bad Homburg

4 Material

DMEM/F-12 (11320033)	Gibco, Carlsbad
BSA (B9001)	New England BioLabs, Ipswich
Calcein AM 1 mg/ml solution in dry DMSO (C1430)	Invitrogen, Carlsbad
Chloroform (C2432)	Sigma-Aldrich, St. Louis
Ciprofloxacin, ≥98 % (17850)	Sigma-Aldrich, St. Louis
DAPI (D1306)	Sigma-Aldrich, St. Louis
DMEM (1X) (D5671)	Sigma-Aldrich, St. Louis
DMSO (W38752)	Sigma-Aldrich, St. Louis
E. Coli (EC1)	Sigma-Aldrich, St. Louis
ECGS (354006)	Becton-Dickinson, Franklin Lakes
Ethanol, absolut (32205)	Honeywell, Charlotte
Ethanol 80 % (543543)	Merck, Darmstadt
FCS hitzeinaktiviert (12103C)	Sigma-Aldrich, St. Louis
Fibronektin 1 µg/ml (11051407001)	Roche Diagnostics, Rotkreuz
Gelatine (G1393)	Sigma-Aldrich, St. Louis
GlutaMax™-1 (100X) (35050-038)	Gibco, Carlsbad
HBSS (10X) (14060-040)	Gibco, Carlsbad
HEPES (15630056)	Gibco, Carlsbad
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (4368813)	Applied biosystems, Foster City
Isopropanol ≥ 99 % (I9516)	Sigma-Aldrich, St. Louis
LPS (L2630)	Sigma-Aldrich, St. Louis
Medium 199 (M199) steril filtered (M7528)	Sigma-Aldrich, St. Louis
Na-Heparin (H3149)	Sigma-Aldrich, St. Louis

4 Material

Paraformaldehyd (PFA) (15713)	Merck, Darmstadt
PBS (D8537)	Sigma-Aldrich, St. Louis
Penicillin-Streptomycin (10 000 U/mL) (15140122)	Gibco, Carlsbad
peqGREEN 20 000X DNA/RNA binding dye (37-5010)	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
ProLong Gold Antifade Mountant (P10144)	Molecular Probes, Eugene
REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix (R2648)	Sigma-Aldrich, St. Louis
Resazurin sodium salt (R7017-1G)	Sigma-Aldrich, St. Louis
RiboLock RNase Inhibitor (40 U/μl) EO0382	Thermo Scientific, Waltham
RPMI 1640 (1X) (21875-034)	Gibco, Carlsbad
TAE Puffer 50x (10399519)	Thermo Scientific, Waltham
TBE Puffer	Gibco, Carlsbad
Terralin Liquid (102001)	Schülke, Norderstedt
Triton X-100 (T8787)	Sigma-Aldrich, St. Louis
Trypan Blue Solution 0,4 % (T8154)	Sigma-Aldrich, St. Louis
Trypsin-EDTA 1x (25200-056)	Gibco, Carlsbad
UltraPure Agarose (16500-500)	Invitrogen, Carlsbad
β-Mercaptoethanol 99 % (4227.3)	Roth, Karlsruhe

4.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Deckgläser 24 x 60 mm (15747592)	Menzel, Braunschweig
Petrischale 60 mm (Falcon 3002)	Becton-Dickinson, Franklin Lakes
Pipette 2/5/10/25 ml (710180/606180/607180/760180)	Greiner Bio-One, Kremsmünster
Pipettenspitze 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Greiner Bio-One, Kremsmünster
Zellkulturflasche T 25, 25 cm ² (690160)	Greiner Bio-One, Kremsmünster
Zellkulturflasche T 75, 75 cm ² (658170)	Greiner Bio-One, Kremsmünster
Zellkultur-Objektträger Nunc Lab-Tek II, Chamber Slide mit 8 Kammern (154534)	Sigma-Aldrich, St. Louis
Zellkulturplatte mit 48 Kammern Cellstar, steril (677180)	Greiner Bio-One, Kremsmünster
Zellkulturplatte mit 96 Kammern, unsteril (655101)	Greiner Bio-One, Kremsmünster
Nitril Handschuhe (290418-K)	Abena, Aabenraa
Parafilm (PM996)	Pechiney Plastic Packaging, Paris
Zellkulturplatte mit 96 Kammern Cellstar, steril (655180)	Greiner Bio-One, Kremsmünster
Zentrifugenröhrchen 15 ml / 50 ml (188271/227261)	Greiner Bio-One, Kremsmünster
Flaschenhalsfilter 0,22 µm (Falcon 7105)	Becton-Dickinson, Franklin Lakes

Mikroreaktionsgefäß, 1,5 ml, 2 ml, 5 ml
(00301-20086/20094/19460)

Eppendorf, Hamburg

4.4 Zellkulturmedien

Tabelle 4: Verwendete Zellkulturmedien

Zelltyp	Zusammensetzung des Mediums
HUVEC	M199 + 20 % FCS + 1 % GlutaMax + 1 % (100 U/100 µg/ml) Pen/Strep + 0,1 % Na-Heparin/ECGS
ISO-HAS.c1	RPMI 1640 (1X) + 10 % FCS + 1 % GlutaMax + 1 % Pen/Strep
L929, pOB, SaOs-2, MG-63	DMEM (1X) + 10 % FCS + 1 % GlutaMax + 1 % Pen/Strep

4.5 Primer

Tabelle 5: Verwendete Primer

Gen		Primersequenz	Größe (bp)	AT (°C)
VEGF	f	5' - CTTGCCTTGCTGCTCTACCT - 3'	123	57
	r	5' - GCAGTAGCTGCGCTGATAGA - 3'		
Osteonektin	f	5' - GTTGCCTGTCTCTAAACCCCT - 3'	343	60
	r	5' - CGTGTTTGCAGTGGTGGTTC - 3'		
Osteopontin	f	5' - GTTGCCTGTCTCTAAACCCCT - 3'	509	60
	r	5' - CGTGTTTGCAGTGGTGGTTC - 3'		
Osteokalzin	f	5' - ATGAGAGCCCTCACATCCTC - 3'	302	60
	r	5' - CTAGACCGGGCCGTAGAAGCG - 3'		
Kollagen	f	5' - ATGAGAGCCCTCACACTCCTC - 3'	121	60
	r	5' - CTAGACCGGGCCGTAGAAGCG - 3'		
β-Aktin	f	5' - GACCTGACTGACTACCTCATGA - 3'	574	63
	r	5' - AGCATTTGCGGTGGACGATGGAG - 3'		
E-Selektin	f	5' - TACACTTGCAAGTGTGACCC - 3'	258	62
	r	5' - TGTCACAGCATCACACTCAACC - 3'		
PECAM-1	f	5' - CAACAGACATGGCAACAAGG - 3'	240	58
	r	5' - TTCTGGATGGTGAAGTTGGC - 3'		
vWF	f	5' - GATCCTAGTGGGGAATAAGG - 3'	308	57
	r	5' - TGGTGAGGTCATTGTTCTGG - 3'		

Anmerkung. Größe (bp): Größe des Amplifikationsprodukts (Basenpaare), AT (°C): Annealing Temperature (primerabhängige Anlagerungstemperatur), r: Umkehrsequenz, f: Vorwärtssequenz, Kollagen: Kollagen Typ 1.

Die genannten Primersequenzen entstammten vorangegangenen Studien (Dr. Ronald E. Unger).

Die Primersequenzen wurden mithilfe des öffentlich zugänglichen Primer-BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) des National Center for Biotechnology

Information (NCBI) generiert (National Center for Biotechnology Information (NCBI) 2020b). Die volle Sequenz der Genabschnitte konnte zuvor der Nukleotid-Datenbank des NCBI entnommen und mithilfe der Accession Number passenden Primern zugeordnet werden (National Center for Biotechnology Information (NCBI) 2020a).

4.6 Antikörper

Tabelle 6: Genutzte Antikörper

Antikörper	Anbieter
Chicken anti-rabbit IgG (H+L) Alexa Fluor 488, 2 mg/ml, A-21441	Invitrogen, Carlsbad
Goat anti-mouse IgG (H+L), Alexa Fluor 488, 2 mg/ml, A-11001	Invitrogen, Carlsbad
Goat anti-mouse IgG (H+L), Alexa Fluor 594, 2 mg/ml, A-11005	Invitrogen, Carlsbad
Mouse anti E-Selectin, 1 mg/ml, CD62-E MON6010	Monosan, Uden
Mouse anti-human PECAM/CD31, Endothelial Cell (Concentrate) Clone JC70A MO832	Agilent Dako, Santa Clara
Rabbit anti-GFP IgG, 200 µg/ml, sc8334	Santa Cruz, Dallas

4.7 Herkunft und Isolation der Primärzellen

HUVEC

Als primäre Endothelzellen dienten HUVEC, makrovaskuläre Endothelzellen. Dem Protokoll nach Jaffe et al. (1973) folgend wurden die Endothelzellen zeitnah aus dem Inneren einer kurz zuvor erhaltenen Nabelschnur mittels Kollagenase isoliert.

Kurz nach Entnahme wurde die Nabelschnur hierfür bis zur weiteren Verarbeitung in ein mit Puffer gefülltes Gefäß gelegt, bestehend aus 900 ml destilliertem Wasser, 100 ml 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) (10 X), 1 % Pen/Strep, 1 % Ciprofloxacin und 1 % Amphotericin B, nachfolgend Nabelschnurpuffer genannt, um das Gemisch bei 4 °C zu lagern. Nach Entfernen von Druckspuren der Klammer wurde ein Drainageröhrchen in beide Enden der Vena umbilicalis geführt, um sie mit Nabelschnurpuffer zu spülen. Anschließend folgte die Zugabe von 10 ml Kollagenase der Konzentration 0,2 %, verdünnt mit dem obig genannten Puffer, in die Vene, während das andere Röhrchen verschlossen wurde. Nach Inkubation mit Nabelschnurpuffer bei 37 °C für 15 – 20 min und anschließender Massage der Nabelschnur konnte die Endothelzellen enthaltende Kollagenaselösung mittels Nabelschnurpuffer herausgewaschen werden. Die gewonnene Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen übertragen, gefüllt mit 10 ml M 199 und 20 % fötalem Kälberserum (FCS). Nach 5-minütigem Zentrifugieren bei 1200 rpm konnte der Überschuss verworfen und die verbliebenen Zellen mit 5 ml M 199 inklusive 20 % FCS, 1 % GlutaMax, 1 % (100 U/ 100 µg/ml) Pen/Strep und 0,1 % Na-Heparin/Endothelial Cell Growth Supplement (ECGS) resuspendiert werden. (Jaffe et al. 1973)

Es folgte die Aussaat der Zellsuspension in eine gelatinebedeckte 25 cm²-Zellkulturflasche. Nun konnten die Zellen bei 37 °C und einem Luftgasgemisch von 5 % CO₂ und 95 % Sauerstoff inkubiert werden, nachfolgend als *inkubiert* beziehungsweise *Inkubation* beschrieben. Sobald ein konfluentes Wachstum ersichtlich geworden war, wurden die HUVEC 1 : 3 in eine neue, gelatinebedeckte Zellkulturflasche passagiert, sodann als Passage 1 bezeichnet. Passagieren bezeichnet die aufgesplittete Überführung von Zellen in neue Zellkulturgefäße. Erreichte auch diese Passage Konfluenz, so konnte sie erneut passagiert oder im Flüssigstickstofftank gelagert werden.

Primäre Osteoblasten (pOB)

Die Gewinnung von primären Osteoblasten (pOB) erfolgte aus spongiösem Knochen humaner, gesunder Spender. Die Fragmente wurden in freundlicher Unterstützung von der Unfallchirurgie der Universitätsklinik Mainz zur Verfügung gestellt.

Zugunsten der Zellgewinnung wurden die Knochenfragmente zunächst in eine mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) und 1 % Pen/Strep gefüllte Petrischale gelegt. Anschließend konnte der Knochen mithilfe einer Hohlmeißelzange nach Luer zerkleinert und die Fragmente in ein neues, mit steriler PBS gefülltes Petrischalengefäß gelegt werden. In 50 ml-Zentrifugenröhrchen mit enthaltener, steriler PBS konnten die Knochenfragmente nun durch kraftvolles Schütteln von Gewebs- und Blutresten befreit werden. Es folgte das Verwerfen des Überstands und die Wiederholung dieses Vorgangs mit jeweils frisch dazugegebener PBS, bis im Überstand weder Trübung noch Gewebs- oder Blutreste mehr ersichtlich waren. Im Anschluss wurden die Knochenproben in sterile Kammergefäße übertragen, je drei Muster pro Kammer. Jede Kammer wurde nun mit 2 ml Dulbecco's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12) inklusive 1 % Pen/Strep und 20 % FCS befüllt. Es folgte die Inkubation bei 37 °C mit täglichem Wechsel des Mediums. Zwei Mal wöchentlich wurde die Zellproliferation überprüft, um bei Konfluenz zu passagieren. Hierfür wurde der Zellteppich zunächst mit PBS gespült, bevor 1 ml 0,25 % Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) auf die Zellen gegeben wurde und damit im Brutschrank inkubiert werden konnte. Nach einer Minute wurde die Enzymaktivität mithilfe der Verdünnung durch DMEM/F-12-Medium mit 20 % enthaltenem FCS gestoppt. Die gelösten Zellen wurden nun in neuen 50 ml-Zentrifugenröhrchen gesammelt und mithilfe eines 40 µm-Siebs von Knochenresten getrennt, bevor die Aussaat auf eine 75 cm²-Zellkulturflasche folgte. Nach Überführung in die Zellkulturflasche befanden sich die pOB in Passagenummer 1. Der Wechsel des Mediums erfolgte zwei Mal wöchentlich mit Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 1 % Pen/Strep, 10 % FCS und 2 % GlutaMax enthaltend. Nach Erreichen eines konfluenten Wachstums konnten die Zellen für experimentelle Zwecke direkt genutzt oder für späteren Gebrauch im flüssigen Stickstofftank gelagert werden. Hierfür wurden die trypsinisierten und gesammelten Zellen 5 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Anschließend konnte das Zellpellet in FCS, 10 % DMSO enthaltend, resuspendiert und in 2 ml-Eppendorfgefäße gefüllt werden. So wurden die Zellen nun bei -80 °C eingefroren, um sie 24 h später im flüssigen Stickstofftank lagern zu können.

4.8 Herkunft der Zelllinien

SaOs-2

SaOs-2 bezeichnet eine humane Osteosarkomzelllinie der Kennziffer ATCC HTB-85, entnommen aus Knochengewebe einer 11 Jahre alten, weiblichen, kaukasischen Spenderin. Die Zelllinie gilt als adhärent und wurde von ATCC-LGC Standards, Wesel, bereitgestellt.

MG-63

MG-63-Zellen bezeichnet eine humane Osteosarkomzelllinie der Kennziffer ATCC CRL-1427. Die genutzten Zellen der Zelllinie MG-63 stammten aus Osteosarkomgewebe eines 14 Jahre alten, männlichen, kaukasischen Spenders. Die Zelllinie gilt als adhärent und wurde von ATCC-LGC Standards, Wesel, bereitgestellt. Bei MG-63-GFP handelt es sich um die gleiche, humane Osteosarkomzelllinie mit dem Zusatz einer Markierung mittels grün fluoreszierendem Protein (GFP).

ISO-HAS.c1

ISO-HAS.c1 stellt eine Modifikation der von und gemäß Masuzawa et al. (1999) extrahierten und bereitgestellten Endothelzelllinie ISO-HAS dar, die aus Gewebe eines Hämangiosarkoms der Kopfhaut eines 84 Jahre alten, männlichen Japaners gewonnen wurde. Da diese Zelllinie CD31 nur heterogen exprimiert, klonierten Unger et al. (2002) explizit CD31-positive Zellen mithilfe eines Dynabeads CD31 Endothelial Cell Kits und begrenzender Verdünnung auf 96-Kammergefäßen und erhielten somit ISO-HAS.c1-Zellen. Bei der Klonierung galt eine einzige ISO-HAS-1-Zelle als Ursprung.

L929

L929 dient als Fibroblastenzelllinie der Referenz ATCC CCL-1, entnommen aus subcutanem Gewebe von einem Fibrosarkom einer 100 Tage alten, männlichen Hausmaus. Die Zelllinie gilt als adhärent und wurde von ATCC-LGC Standards, Wesel, bereitgestellt.

Bei allen verwendeten Zelllinien handelte es sich um adhärente Zellen, die bei Konfluenz einer Kontaktinhibition unterlagen und demnach rechtzeitig passagiert wurden.

4.9 Getestetes Biomaterial

Alle hier erwähnten Produkte wurden in freundlicher Unterstützung seitens Botiss, Zossen, zur Verfügung gestellt. Bis auf Kol-Vat finden alle genannten Materialien als bewährte BM Anwendung in der Humanmedizin (Smeets et al. 2014; Windisch und Mólnar 2017; botiss dental, botiss biomaterials GmbH 2020a; botiss dental, botiss biomaterials GmbH 2020c; ROGG Verbandstoffe GmbH 2020; mbp, medical biomaterial products GmbH 2020). Neben ihrer Verwendung als Weichgewebersatz besitzen Kollagenpräparate durch die Imitation natürlicher und bei Knochenregeneration gebildeter EZM die Potenz, als KEM zu gelten. Zudem werden sie im Sinne indirekter KEM als Art Platzhalter genutzt, um ossäre Defekte von schneller proliferierendem, umliegendem Weichgewebe freizuhalten und Osteoblasten und Endothelzellen die nötige Zeit zu allmählicher Knochenregeneration zu gewähren (siehe auch Abschnitt 3.4.1).

Kol

Bei Kol handelt es sich um eine separate Probe des Kollagen-Phosphatanteils in Kol-Vat. Zur Herstellung diente die von Botiss, Zossen, prozessierte porcine Kollagensuspension, die zu 99 % Kollagenfasern und zu 1 % Phosphatsalze enthielt. Für die Fertigung wurde ein Teil der für das Kombinationsprodukt Kol-Vat hergestellten Kollagensuspension, deren pH-Wert bei 7,0 – 7,4 lag, separat weiterverarbeitet. Nach Gefriertrocknungsvorgang der Kollagenmasse bei -60 °C bis +25 °C folgte eine Gammastrahlensterilisation in einem Bereich von 25 kGy bis 45 kGy. Kol ermöglichte das Ziehen indirekter Rückschlüsse auf die Vaterit-Komponente des Kol-Vat.

Probeexemplar, Größe: ~ 50 x 50 x 2 mm

Kol-Vat

Kol-Vat ist eine auf Bitte der Universitätsmedizin Mainz speziell von Botiss, Zossen, zusammengestellte Kombination ihres eigens hergestellten Kollagenpräparats (Kol) und in diesem Gerüst eingebetteten Vaterit-Nanopartikeln, deren Herstellung der Forschungsgruppe von Professor Tremel, Institut für anorganische und analytische Chemie der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, entstammten. Die Vaterit-Komponente wurde vor Einarbeitung in das Kombinationsprodukt durch die Forschungsgruppe Professor Roths, Arbeitsgemeinschaft Dr. R. E. Unger, Institut für

allgemeine Pathologie der Universitätsmedizin Mainz, auf Endotoxinfreiheit untersucht. Die Inkorporation des Vaterits in Kollagen geschah bei Raumtemperatur über mechanische Homogenisierung des Vaterits in die oben genannte Kollagensuspension, deren pH-Wert bei 7,0 bis 7,4 lag. Der Vateritanteil des schlussendlichen Präparats betrug 94 %. Die restlichen 6 % enthielten zu 5 % Kollagenfasern und zu 1 % Phosphatsalze. Der Homogenisierung schloss ein Gefriertrocknungsvorgang bei -60 °C bis +25 °C und eine anschließende Sterilisation mit Gammastrahlung einer Dosis von 25 kGy bis 45 kGy an. Für die Synthese der Vaterit-Komponente wurde das Versuchsprotokoll von Schröder et al. (2018) befolgt, denen die Herstellungsvarianten von Schüler und Tremel (2011) als Vorlage dienten. Die entstandenen ovalen und als ellipsoid zu benennenden Vaterit-Partikel wurden aufgrund ihrer hohen Löslichkeit durch Kollagennetze (Kol) stabilisiert.

Probeexemplar, Größe: ~ 50 x 50 x 2 mm

Collacone

Collacone bezeichnet einen formbaren Konus aus Kollagen Typ 1 und Kollagen Typ 3, gewonnen aus porciner Dermis. Es dient der Applikation in Extraktionsalveolen, um die natürliche Knochenregeneration zu fördern (botiss dental, botiss biomaterials GmbH 2020b).

Artikelnummer: 511112 Höhe: ~ 16 mm, Ø Grundfläche: ~ 11 mm, Ø Spitze: ~ 7 mm

Collacone max

Collacone max bezeichnet ein Kompositmaterial, bestehend aus porcinen Kollagenfasern vom Typ 1 und Typ 3 sowie synthetisierten, biphasischen CaP-Granula. Die CaP-Komponente setzt sich zu 60 % aus HA sowie zu 40 % aus β -TCP zusammen. Laut Hersteller eignet sich das Produkt zur Förderung natürlicher Knochenregeneration (botiss dental, botiss biomaterials GmbH 2020a).

Artikelnummer: 250001 Größe: 16 x 11 x 7 mm

Mucoderm

Mucoderm ist eine aus porciner Dermis gewonnene, dreidimensionale Matrix mit interkonnektierender Porosität. Zusammengesetzt aus Kollagen Typ 1 und Kollagen

Typ 3 dient es als Weichgewebstransplantat und fungiert folglich als indirektes KEM (botiss dental, botiss biomaterials GmbH 2020c).

Artikelnummer: 701520 Größe: 15 x 20 mm

Porcine Dermis

Das Präparat Porcine Dermis stellt eine transparente Deckmembran kollagener Matrix xenogenen Typs dar. Gemäß Herstellerangaben findet das prozessierte Kollagenpräparat zugunsten von Geweberegeneration und dementsprechend im Einsatz als indirektes KEM Anwendung.

Mustercharge D20180619, Größe: 20 x 30 mm

Porcines Perikard

Bei dem Präparat Porcines Perikard handelt es sich um eine transparente Deckmembran, gewonnen aus Kollagengewebe des porcinen Perikards. Laut Hersteller dient das Produkt zur Geweberegeneration.

Mustercharge 30810DH, LOT: 17P07-06, 2020-07 Größe: 80 x 100 mm

Rogg

Rogg, nach vollständiger Artikelbezeichnung ‚Rogg BioKollagen Wundauflage‘, repräsentiert einen Kollagenvlies aus porcinem Kollagen. Laut Herstellerangaben seitens ROGG Verbandstoffe, Fahrenzhausen, eignet es sich als Füllmaterial von Gewebedefekten und fördert Geweberegeneration (ROGG Verbandstoffe GmbH 2020).

Artikelnummer: 2001000, LOT: 170004, Größe: 45 x 110 mm

5 Methoden

5.1 Zellkultivierung

Zugunsten der Zellproliferation wurden alle Zellen in Zellkulturflaschen der Größe 25 cm² oder 75 cm² kultiviert. In adäquatem Medium (siehe Abschnitt 4.4) konnten die Zellen inkubiert werden. Je nach Wachstumsverhalten und Konfluenz wurden die Zellen zwei Mal wöchentlich passagiert. Nach Absaugen des alten Mediums und wiederholtem Waschvorgang mit PBS wurden hierfür 1 ml bei 25 cm²- und 1,5 ml bei 75 cm²-Zellkulturflaschen von 0,25 % Trypsin-EDTA zu den Zellen pipettiert. Mit Ausnahme der HUVEC wurde die genannte Lösung 60 – 90 s auf dem Zellrasen belassen und inkubiert. Aufgrund der hohen Empfindlichkeit der HUVEC wurde das Trypsin-EDTA-Gemisch bereits nach 10 s von diesen Zellen gesaugt, um sie ohne Lösung für 60 – 90 s zu inkubieren. Nach Inspektion von abgelösten Zellen unter dem Lichtmikroskop, Leica DM IRB von Leica Mikrosysteme, konnte das Trypsingemisch durch Zugabe adäquaten Mediums inaktiviert werden, bevor sorgfältig resuspendiert wurde. HUVEC wurden im Verhältnis 1 : 3, andere Zellarten 1 : 5 gesplittet. Die Zellkulturflasche der neu passagierten Zellen für HUVEC sollte bereits 1 h vorab mit 0,2 % Gelatinelösung in PBS benetzt werden. Alternativ konnte Fibronectin, 1 : 200 in PBS verdünnt, als gleichwertige Beschichtung dienen. Nach 1 h Inkubation bei 37 °C konnte das Gemisch abgesaugt und die HUVEC ausgesät werden. Für andere Zellarten wurde auf diese vorbereitende Beschichtung verzichtet. Ein Mediumswechsel der Zellen erfolgte alle zwei Tage.

Zur Vorbereitung der in den Versuchen benötigten Anzahl an Zellen erfolgte die Verwendung der Neubauer Zählkammer (Hämozytometer), in die 20 µl der mit Trypan colorierten Zellen pipettiert wurde. Das Verhältnis betrug 10 µl Zellsuspension kombiniert mit 10 µl Trypanblau-Lösung, woraus ein Gesamtgemisch von 20 µl resultierte und sich ein Verdünnungsfaktor von zwei ergab. Vier Quadrate der Größe von 1 mm² wurden unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Der Mittelwert der gezählten Zellen pro Kammer wurde durch Division mit vier ermittelt und anschließend mit dem Verdünnungsfaktor zwei sowie dem Faktor 10 000 multipliziert. Aus dieser Formel resultiert die ermittelte, vorhandene Zellzahl pro ml, gekürzt dargestellt gemäß

$$\frac{\text{gezählte Zellmenge}}{2} \times \frac{10000}{\text{ml}} = \text{vorhandene Zellzahl pro ml.}$$

Formel 1: Berechnung der Zellkonzentration

Die gewünschte Zellzahl in der zu generierenden Zellsuspension resultiert schließlich aus dem hierfür benötigten Volumen an zuvor ermittelter Zellkonzentration, nach

$$\frac{\text{gewünschte Zellzahl}}{\text{vorhandene Zellzahl/ml}} = \text{benötigtes Volumen (ml).}$$

Formel 2: Berechnung des benötigten Volumens

5.2 Sterilitätstest der Biomaterialien

Um die mit Biokompatibilität unausweichlich einhergehende Sterilität der BM zu garantieren, wurde den näheren Untersuchungen der Materialien eine Sterilitätstestung vorangestellt.

Nachdem alle verwendeten Materialien mit Gammastrahlen- oder Ethylenoxidsterilisation behandelt worden waren, wurden sie in sterilen Verpackungen vom Hersteller geliefert. Die Materialien besaßen eine ungefähre Größe von 50 x 50 x 2 mm. Sie wurden unter sterilen Bedingungen aus der Verpackung entnommen und anschließend mit einem Skalpell oder einer Schere in kleine, gleiche Stücke der ungefähren Größe von 5 x 5 mm geschnitten. Die zerkleinerten Muster wurden anschließend in sterilen Petrischalen aufbewahrt. Um sicherzustellen, dass sie auch nach dieser Handhabung inklusive Schneidprozess noch Sterilität gewährten, wurde ein erneuter Sterilitätstest praktiziert.

Zum Testen der Sterilität wurden drei zufällig ausgewählte Proben jedes BM entnommen und mit 5 ml DMEM ohne Zusatzstoffe in ein 15 ml-Röhrchen gegeben. Das Röhrchen mit dem Material wurde bei 37 °C in einem Bakterieninkubator für 96 h inkubiert. Eine Sterilitätskontrolle, hier die Negativkontrolle, wurde mit alleinigem Medium angesetzt. Der Nachweis, dass Bakterien die Fähigkeit besaßen, im Medium zu wachsen, hier als Positivkontrolle bezeichnet, wurde durch Beimpfen des Mediums mit *Escherichia coli* (*E. coli*) generiert. Das Röhrchen der Positivkontrolle wurde in Reihe neben den anderen Röhrchen inkubiert. Jeden Tag erfolgte eine Inspektion der Proben auf Trübung.

5.3 Zellvitalitätstest mithilfe von Resazurin

Erfolgreiche Knochenregeneration und die uneingeschränkte Proliferation aller genannten Zellen setzen den Ausschluss von Toxizität voraus. Die vorliegende Arbeit nutzte den Toxizitätstest mithilfe von Resazurin anhand von für Knochenmetabolismus essenziellen Zellen. Darunter verwendete sie überdies die Zelllinie L929, eine fibroblastische Mauszelllinie, welche sich über die letzten Jahre vorrangig für die Verwendung in Toxizitätstest etablierte. Sie wird von der ISO 10993-5 (2009) als mustergültige Zelllinie zur Durchführung von Zytotoxizitätstestungen von BM angeführt. Materialien, die zu einer Verringerung der Zellzahl um über 30 % führen, gelten nach jener Norm als zytotoxisch.

Zur Untersuchung der KEM auf für Biokompatibilität fundamentale Abwesenheit von Toxizität oder auf womöglich zellstimulierende Effekte, wurde der Zell-Vitalitätstest mit Resazurin genutzt. Hierbei handelt es sich um einen Fluoreszenztest, mit dessen Hilfe zelluläre metabolische Aktivität detektiert und somit die Anzahl vitaler, metabolisch aktiver Zellen verifiziert werden kann. Resazurin ist ein Redoxindikator, der vor Reduktion als nicht-fluoreszenter, blauer Farbstoff vorliegt. Nach Reduktion reagiert er zu pinkfarbenem, hoch fluoreszentschem Resorufin, das bei einer Anregungswellenlänge von 530 bis 560 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm im Spektralphotometer ausgelesen werden kann. Resazurin reagiert mit intrazellulären, mitochondrialen Koenzymen wie Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Dehydrogenase (NADH-Dehydrogenase) vitaler Zellen und wird somit durch Elektronenübertragung zum hoch fluoreszenten Resorufin reduziert (Borra et al. 2009; Chen et al. 2018). Die ermittelte Menge an fluoreszenten Werten ist proportional zur Anzahl lebender Zellen in der zu untersuchenden Probe. Resazurin selbst gilt als nicht toxisch. Nachdem die ausgesäten, verschiedenen Zellarten jeweils mit dem Extrakt des zu testenden BM versehen wurden, konnte das Wachstum der Zellen nach 24, 48 und 72 h gemäß der erwähnten Anfärbung verglichen und die Materialien somit auf Toxizität oder auftretende Stimulation geprüft werden.

Das Extrakt wurde mit 2 ml des jeweils zellspezifischen Mediums hergestellt, zu dem je ein Stück BM jeder zu untersuchenden Probe gegeben wurde und das Gemisch 24 h inkubiert werden konnte. Zur Vorbereitung der Resazurininlösung wurden 12 mg Resazurinsalz in 100 ml Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS), mit Zusatz von Ca^{2+} und Mg^{2+} , gelöst. Nach Filtrierung durch einen 0,22 μm -Filter konnte das Gemisch verwendet oder, aliquotiert bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, gelagert werden. Zu Versuchsbeginn wurden

15 000 Zellen in 200 µl Medium pro Kammer eines 96-Kammergefäßes ausgesät und für 24 h inkubiert. Am folgenden Tag wurden 100 µl Medium jeder Kammer verworfen und durch 100 µl des jeweiligen Extrakts ersetzt, wonach eine erneute Inkubation für 24, 48 und 72 h folgte. Hinsichtlich einer Kontrolle des Zellwachstums von lediglich mit Medium versetzten Zellen ohne BM wurden ausgewählte Kammern mit frischem Medium statt Extrakt versorgt (Zellkontrolle: Z-Kontrolle). Für die Toxizitäts-Positivkontrolle (T-Kontrolle) wurden spezielle Kammern am Tag der Auslesung mit 15 µl 10 % Triton X-100 versetzt. Zugunsten der Visualisierung konnten die auszuwertenden Kammern nach 24, 48 und 72 h mit 30 µl der Resazurinlösung ergänzt werden. Auf die Zugabe des Fluoreszenzfarbstoffs folgend wurden die Zellen für 3 h inkubiert, bevor sie mithilfe des Spektralphotometers bei einem Anregungsspektrum von 530 nm bis 560 nm und einem Emissionsspektrum von 580 nm bis 600 nm auf derselben Platte ausgewertet wurden. Lebende und damit hoch fluoreszente Zellen wurden erfasst und so als Summe jeder Kammer gelistet. Ausschließlich mit Resazurin versetztes Medium auf Plastik diente als Referenz der resultierenden Absorption durch das Medium allein. Anschließend folgte die graphische Veranschaulichung der Daten, um die metabolische Zellaktivität und damit das Wachstum der Zellen nach 24, 48 und 72 h zu vergleichen. Alle verwendeten Zellarten wurden in einer Zellzahl der Höhe von 15 000 Zellen pro Kammer ausgesät. Der Toxizitätstest mithilfe von Resazurin wurde mit der Fibroblastenzelllinie L929, den Osteosarkomzelllinien SaOs-2 und MG-63, primären Osteoblasten (pOB) und primären Endothelzellen (HUVEC) durchgeführt.

5.4 Immuncytochemie

Immuncytochemie bezeichnet ein diagnostisches Untersuchungsverfahren aus dem Bereich der Immunhistochemie zum Nachweis von Genprodukten auf Einzelzellebene. Diese Arbeit verwendete die indirekte Methodik der Immunfluoreszenz. Während ein Primärantikörper hierbei direkt an das zu detektierende Antigen bindet, kann ein mit fluoreszente Farbstoff markierter Sekundärantikörper an den Primärantikörper docken. Die Immunfluoreszenz wird anschließend mit einem Fluoreszenzmikroskop visualisiert. Zugunsten vereinfachter Orientierung wurde zudem eine Kernfärbung mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) vorgenommen. Dabei handelt es sich um einen Fluoreszenzfarbstoff, der bevorzugt an Adenin-Thymin-Basenpaarungen der DNA

bindet. Die Kombination beider Färbungen gestattet einen Einblick in die spezifische Genexpression der untersuchten Zellen. In Kokultur ergibt sich der Vorteil, Endothelzellen mittels spezifisch exprimierter Proteine, wie PECAM-1 oder von-Willebrand-Faktor (vWF), von PECAM/vWF-negativen Zellen, beispielsweise Osteoblasten oder Fibroblasten, differenzieren zu können. Zudem lässt sich das inflammatorische Potenzial verschiedener Zellarten auf BM nachvollziehen.

Je nach Wahl der zu detektierenden Genprodukte wurden adäquate primäre sowie sekundäre Antikörper (AK) gewählt.

Stimulation durch LPS

Ein schwerwiegendes Problem bei der Verwendung von BM birgt die Präsenz von Endotoxinen, auch bekannt als Lipopolysaccharide (LPS). Endotoxine induzieren Zellen zur Freisetzung inflammatorischer Proteine. Sie ermöglichen demnach einen Einblick in die Aufrechterhaltung physiologischer Zellfunktionen bei Erfordernis einer immunologischen Reaktion und dienen durch separate Zugabe folgend als Endotoxin-Positivkontrolle.

Die Evaluation von Biokompatibilität impliziert neben der generellen Testung auf Toxizität die zusätzliche Untersuchung auf Endotoxine. Die vorliegende Arbeit setzte den genannten Test gleich in Anschluss an die Toxizitätsprüfung zu Anfang der Versuchsreihe.

E-Selektin

E-Selektin (Endothel-Selektin; synonym zu ELAM-1: endothelial-leukozytäres Adhäsionsmolekül) ist ein oberflächliches Glykoprotein und vermittelt Zellkontakte zwischen neutrophilen Granulozyten und Endothelzellen. Es wird bei Kontakt mit Endotoxinen von Endothelzellen exprimiert und gilt als Indiz einer inflammatorischen Reaktion (Tsoref et al. 2018), beispielsweise nach Stimulation mit LPS.

Mittels Fluoreszenzfärbung nach obig erwähntem Schema und dem primären AK mouse anti E-Selektin (Monosan) sowie dem sekundären AK goat anti-mouse IgG, Alexa Fluor 488 (Invitrogen) kann dieses Oberflächenselektin anhand grün befleckter Zellen sichtbar gemacht werden (Unger et al. 2014) und damit Aufschluss über die Präsenz von Endotoxinen geben. Da die Induktion von exprimiertem E-Selektin nach 4 h ihr Maximum erreicht, wurden die Zellen in den folgend beschriebenen Versuchen

4 h nach der Zugabe von LPS fixiert. Anschließend erfolgte die immunhistochemische Anfärbung und sodann die Untersuchung am Fluoreszenzmikroskop mit fotografischer Sicherung der Ergebnisse.

Detektion der Zellen in Kokultur mittels PECAM-1

PECAM-1 (synonym CD31) bezeichnet ein transmembranöses Protein, das konstitutiv exprimiert wird und als endothelspezifisch gilt. Es zeigt transmembranöse Zell-Zell-Kontakte. Im Falle der hier angeführten Versuche wurde PECAM-1 zur Differenzierung endothelialer Zellen in Kokultur gegenüber PECAM-1 negativen Zellen wie Osteoblasten genutzt.

Primär dient PECAM-1 der Steuerung von Leukozytentransmigration im Falle einer Immunreaktion (National Center for Biotechnology Information (NCBI) 2021). Darüber hinaus beeinflusst PECAM-1 die Angiogenese und Wahrnehmung von Scherstress (Woodfin et al. 2007). Vorwiegend an interzellulären Kontakten endothelialer Zellen lokalisiert, gibt PECAM-1 Aufschluss über eine regelrechte Interaktion endothelialer Zellen und veranschaulicht ihre Beziehung zueinander. Bei den hier durchgeführten Versuchen wurde für PECAM-1 der primäre monoklonale AK mouse anti-human PECAM (Agilent Dako) sowie der sekundäre AK goat anti-mouse IgG, Alexa Fluor 594 (Invitrogen) verwendet und nach obig erläuterten Schema verfahren.

Detektion der Zellen in Kokultur mittels GFP

MG-63-GFP bezeichnet eine mit GFP markierte MG-63-Zelllinie. Ungeachtet der Fluoreszenzmarkierung verhält sich die Zelllinie identisch einer unmarkierten, osteoblastären MG-63-Zelllinie. Durch einen anti-GFP-AK können diese Zellen in Kokultur nach Fixierung neben anderen, GFP-negativen Zellen visualisiert werden. In dieser Arbeit wurde für GFP der primäre AK rabbit anti-GFP (Santa Cruz) und der sekundäre AK chicken anti-rabbit IgG (Invitrogen) herangezogen und nach obig erläuterten Schema verfahren.

Fluoreszenzmikroskopie

Zur Visualisierung von Fluoreszenz wurde ein Fluoreszenzmikroskop genutzt. Die Fluoreszenzmikroskopie stellt eine auf Fluoreszenz spezialisierte Art der Lichtmikroskopie dar. Fluoreszierende Strukturen strahlen bei Anregung durch Licht

spezifischer Wellenlänge Licht einer anderen Wellenlänge ab. Dieses sogenannte emittierte Licht wird vom Fluoreszenzmikroskop durch absorptionsbedingten Energieabfall erfasst, um daraus ein projiziertes Bild der fluoreszierenden Strukturen zu erzeugen (Mehlhorn 2009). Die vorliegende Arbeit analysierte auftretende Fluoreszenz mithilfe des Fluoreszenzmikroskops Biorevo HS9000E von Keyence, mit dem gleichzeitig über eine interne Mikroskopkamera die Aufnahme von Bildern erfolgte.

Phasenkontrastmikroskopie

Bei der Phasenkontrastmikroskopie handelt es sich um eine spezielle Abbildungsmethodik der Lichtmikroskopie, in der vorliegenden Arbeit durch gezielte Einstellung am Fluoreszenzmikroskop, Biorevo HS9000E von Keyence, verwirklicht. Sie ermöglicht die Visualisierung von Proben mit einer geringen Intensitätsminderung und Amplitudenveränderung des durchdringenden Lichts. Transparente, dünne Materialien absorbieren Licht in zu geringem Umfang, um derart ein Bild im Sinne von Hell-Dunkel-Unterschieden erzeugen zu können. Stattdessen kommt es durch Differenzen der Dichte zur unterschiedlich starken Abbremsung durchdringender Lichtwellen und demnach zu geringen Phasenverschiebungen. Diese Phasenverschiebungen können am Mikroskop in Interferenz verschiedenphasiger Lichtwellen, den sogenannten Phasenkontrast, umgewandelt und erneut mithilfe der internen Mikroskopkamera in Bildaufnahmen festgehalten werden (Neumann et al. 2014).

5.4.1 Endotoxin-Test mit HUVEC

Tabelle 7: Versuchsaufbau des Endotoxin-Tests aller BM

Zellen	Primärer AK	Sekundärer AK
HUVEC	mouse anti E-Selektin (Monosan)	goat anti-mouse IgG, Alexa Fluor 488 (Invitrogen)

Anmerkung. AK: Antikörper.

Ein Lab-Tek-Objektträger mit 8 Kammern wurde 1 h bei 37 °C mit 0,005 % Fibronectin benetzt, bevor 15000 Zellen HUVEC inklusive Growth Factor (10 µl/ml ECGS/Na-

Heparin (1 : 1 000)) in den Kammern 1 – 8 verteilt wurden. Pro Kammer ergab sich ein Verhältnis von 15 000 Zellen pro 250 µl Medium. Es folgte eine 24-stündige Inkubation des Lab-Tek-Objektträgers bei 37 °C.

Derweil wurde jeweils ein kleines Stück der BM Kol, Kol-Vat, Collacone, Collacone max und Mucoderm in 1,2 ml HUVEC-Medium in separaten Eppendorfgefäßen vorbereitet und ebenfalls 24 h bei 37 °C inkubiert.

Am folgenden Tag wurde das Medium aus den Kammern entfernt, bevor 200 µl frisches HUVEC Medium ergänzt werden konnte, das in Kammern 3 – 7 auch 20 µl der unten genannten Extrakte enthielt: Kammer 1: Antigen-Negativkontrolle, nur Medium; Kammer 2: Antigen-Positivkontrolle, Medium + 1 µl/ml LPS; Kammer 3: 20 µl Kol-Extrakt; Kammer 4: 20 µl Kol-Vat-Extrakt; Kammer 5: 20 µl Collacone-Extrakt; Kammer 6: 20 µl Collacone-max-Extrakt; Kammer 7: 20 µl Mucoderm-Extrakt; Kammer 8: AK-Negativkontrolle, nur Medium ohne primären AK.

Der Versuchsablauf jener hier durchgeführten immunhistochemischen Färbungen startete mit dem Fixieren der Zellen auf dem Glasträger mithilfe von Paraformaldehyd (PFA). Nach 4 h wurde das Medium aus allen Kammern entfernt, bevor jede einzelne Kammer doppelt mit PBS gewaschen und 200 µl 3,7 % PFA zugesetzt werden konnte. Auf 15-minütige Inkubation folgte das Entfernen des PFA und wiederholtes, viermaliges Waschen mit PBS. Dem Absaugen der PBS schloss die Zugabe von 250 µl 0,2 % Triton X-100 in jede Kammer und 10-minütiges Warten an. Der Zusatz von Triton X-100 in Lösung sollte die Zellen permeabilisieren, um sowohl den AK als auch DAPI das Durchdringen der Zellmembran zu ermöglichen. Daraufhin wurde erneut drei Mal mit PBS gewaschen.

Zugunsten der Immunfluoreszenzanalyse wurde der 1 : 100 in 1 % bovinem Serumalbumin (BSA) und PBS verdünnte AK mouse anti E-Selektin (Monosan) in Kammern 1 – 3 und 4 – 7 gefüllt. Nach 1 h Inkubation bei 37 °C wurden die Kammern vier Mal mit PBS gewaschen. Es folgte die Zugabe des zweiten AK, goat anti-mouse IgG, Alexa Fluor 488 (Invitrogen), 1 : 1 000 in PBS und 1 % BSA verdünnt. Die Zugabe erfolgte in einer Menge von 200 µl pro Kammer. Das zur Verdünnung beigefügte BSA sollte eine unspezifische Bindung von Immunglobulin G (IgG) verhindern.

Nach einstündiger Lagerung bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss wurden die Kammern je zwei Mal mit PBS gewaschen. Es folgte die Zugabe von DAPI, 1 : 10 000 in destilliertem Wasser verdünnt, welches nach 5 min durch doppelte Säuberung mit PBS wieder entfernt wurde. DAPI diente, obig erwähnt, zum ergänzenden Anfärben

des Zellkerns. Nach Hinzugabe von ProLong Gold Antifade Mountant zur Fixierung konnten die Kammern zur Trocknung gelagert werden. Die Auswertung erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskop am folgenden Tag.

5.4.2 Endotoxin-Test mit HUVEC und ISO-HAS.c1

Tabelle 8: Versuchsaufbau des Endotoxin-Tests von Kol-Vat

Zellen	Primärer AK	Sekundärer AK
HUVEC, ISO-HAS.c1	mouse anti-E-Selektin (Monosan)	goat anti-mouse IgG, Alexa Fluor 488, (Invitrogen)

Anmerkung. AK: Antikörper.

Ein Lab-Tek-Objektträger mit 8 Kammern wurde 1 h bei 37 °C mit 0,005 % Fibronectin benetzt, bevor 25 000 Zellen HUVEC inklusive Growth Factor (10 µl/ml ECGS/Na-Heparin (1 : 1000)) in den Kammern 1 – 4, sowie die gleiche Anzahl an Zellen ISO-HAS.c1 in den Kammern 5 – 8 verteilt wurden. Pro Kammer ergab sich ein Verhältnis von 25 000 Zellen pro 250 µl Medium.

Überdies wurde jeweils ein kleines Stück Kol-Vat in 1,2 ml HUVEC- sowie ISO-HAS-Medium in kleinen Eppendorfgefäßen vorbereitet und mitsamt dem Objektträger 24 h bei 37 °C inkubiert.

Am folgenden Tag wurde das Medium gegen 200 µl HUVEC-Medium unter Zugabe folgender Ansätze ausgetauscht: Kammer 1: Antigen-Negativkontrolle, nur Medium; Kammer 2: Antigen-Positivkontrolle, Medium + 1 µl/ml LPS; Kammer 3: 200 µl Kol-Vat-Extrakt; Kammer 4: AK-Negativkontrolle, nur Medium ohne primären AK; Kammer 5: Antigen-Negativkontrolle, nur Medium; Kammer 6: Antigen-Positivkontrolle, Medium + 1 µl/ml LPS; Kammer 7: 200 µl Kol-Vat-Extrakt; Kammer 8: AK-Negativkontrolle, nur Medium ohne primären AK. Nach 4 h wurde das Medium aus allen Kammern entfernt, bevor jede einzelne Kammer doppelt mit PBS gewaschen und mit 200 µl 3,7 % PFA versetzt wurde. Nach 15 min Inkubation folgte die Entfernung des PFA und erneutes, viermaliges Waschen mit PBS. Nach Entnahme des PBS wurde in jede Kammer 250 µl 0,2 % Triton X-100 gefüllt und folgend 10 min gewartet. Anschließend wurde erneut drei Mal mit PBS gewaschen.

Zugunsten der Immunfluoreszenzanalyse wurde der 1 : 100 in 1 % BSA und PBS verdünnte AK mouse anti E-Selektin (Monosan) in Kammern 1 – 3 und 4 – 7 gegeben. Nach 1 h Inkubation bei 37 °C wurden die Kammern erneut viermalig mit PBS gewaschen. Anschließend folgte die Zugabe des zweiten AK, goat anti-mouse IgG, Alexa Fluor 488 (Invitrogen), 1 : 1 000 verdünnt in PBS und 1 % BSA in allen Kammern zu je 200 µl.

Nach 1 h Lagerung bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss wurden die Kammern je zwei Mal mit PBS gewaschen. Es folgte die Zugabe von DAPI, 1 : 10 000 in destilliertem Wasser verdünnt, welches nach 5 min durch doppelte Säuberung mit PBS wieder entfernt wurde. Nach Hinzugabe von ProLong Gold Antifade Mountant konnten die Kammern zur Trocknung gelagert werden. Die Auswertung erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie am folgenden Tag.

5.4.3 Untersuchung des Zellwachstums auf Biomaterial

Um Zellwachstum auf BM untersuchen zu können, wurden die einzelnen BM der Größe von etwa 5 x 5 mm in einem 48-Kammergefäß verteilt. Zellen der Konzentration von 50 000 Zellen/500 µl konnten pro Kammer in adäquatem Medium ausgesät werden, um den Kammerträger anschließend für vier bis fünf Tage zu inkubieren. Sodann wurden die Zellen mithilfe von 10 µl der angesetzten Calcein-acetoxymethylester- (Calcein-AM-) Lösung pro Kammer gefärbt, bevor der Träger weitere 10 – 20 min unter Lichtausschluss inkubiert wurde. Die Auslesung erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop. Pro Kammer wurden vier bis acht Bilder gesammelt. Um Zellwachstum auf den BM ganzheitlich zu analysieren, erfolgte die Invertierung der Proben mithilfe einer Pinzette.

Als zu testende Zellen wurden primäre Endothelzellen (HUVEC), primäre Osteoblasten (pOB) und zwei osteoblastäre Zelllinien (MG-63 und SaOs-2) verwendet.

5.4.4 Untersuchung des Zellwachstums in Kokultur

Tabelle 9: Versuchsaufbau der Untersuchung des Zellwachstums in Kokultur

Zellen	Primärer AK	Sekundärer AK
MG-63-GFP + HUVEC	rabbit anti-GFP (a-GFP) (Santa Cruz)	chicken anti-rabbit, Alexa Fluor 488 (Invitrogen)
	mouse anti-PECAM/CD31 (a-PE) (Agilent Dako)	goat anti-mouse, Alexa Fluor 594 (Invitrogen)

Anmerkung. AK: Antikörper.

Ein Lab-Tek-Objektträger mit 8 Kammern wurde mit 0,005 % Fibronectin benetzt und 1 h bei 37 °C inkubiert bevor, nach Absaugen des Überstands, 25 000 Zellen MG-63-GFP in Kammern 1 und 5 und 25 000 Zellen HUVEC inklusive Growth Factor (10 µl/ml ECGS/Na-Heparin (1 : 1 000)) in Kammern 2 und 6 ausgesät wurden. Die Kammern der Kokulturen 3, 4, 7 und 8 erhielten jeweils 12 000 Zellen pro Zelltyp, in Abbildung 1 veranschaulicht. Pro Kammer ergab sich ein Verhältnis von 25 000 Zellen pro 250 µl Medium. Alle Zellen wurden in HUVEC-Medium wiederholt resuspendiert. Es schloss eine 24- bis 48-stündige Inkubation des Lab-Tek-Objektträgers bei 37 °C bis zur vollständigen Konfluenz an.

Primärer AK (Zellen)	1. a-PE (MG-GFP)	2. a-PE (HUVEC)	3. a-PE (MG-GFP + HUVEC) (50/50)	4. a-PE+a-GFP (MG-GFP + HUVEC) (50/50)
	5. a-GFP (MG-GFP)	6. a-GFP (HUVEC)	7. a-GFP (MG-GFP + HUVEC) (50/50)	8. kein AK (MG-GFP + HUVEC) (50/50)

Abbildung 1: Veranschaulichung Versuchsaufbau der Kokultur in Lab-Tek-Träger

Durchnummerierung einzelner Kammern des Lab-Tek-Trägers mit jeweiligen Zugaben. AK: Antikörper, a-PE: Anti-PECAM-1-AK, a-GFP: Anti-GFP-AK.

Nach Absaugen des Mediums am folgenden Tag konnten 200 µl frisches HUVEC-Medium zu den Kammern gegeben werden. Nach 4 h wurde das Medium aus allen Kammern entfernt, bevor jede einzelne doppelt mit PBS gewaschen und mit 200 µl 3,7 % PFA versetzt wurde. Auf 15-minütige Inkubation folgte das Entfernen des PFA

und viermaliges Waschen mit PBS. Dem Absaugen der PBS schloss die Zugabe von 250 µl 0,2 % Triton X-100 in jede Kammer und 10-minütiges Warten an. Sodann folgte wiederholt eine dreimalige Waschung mit PBS.

Zugunsten der Immunfluoreszenzanalyse wurde der 1 : 50 in 1 % BSA und PBS verdünnte AK mouse anti-human PECAM (Agilent Dako) in Kammern 1 – 3 pipettiert. Des Weiteren wurde der 1 : 100 in 1 % BSA verdünnte AK rabbit anti-GFP (Santa Cruz) in Kammern 5 – 7 ergänzt. Der 1 : 100 verdünnte rabbit anti-GFP-AK konnte mit 1 : 50 verdünntem mouse anti-PECAM-AK vermischt und 200 µl des Gemischs in Kammer 4 gegeben werden.

Nach 1 h Lagerung unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur wurden die Kammern je vier Mal mit PBS gewaschen. Anschließend konnten die jeweils 1 : 1 000 in 1 % BSA und PBS verdünnten AK chicken anti-rabbit Alexa 488 und goat anti-mouse Alexa 594 (Invitrogen) vermischt und je 200 µl dieses Gemischs in die oben aufgeführten Kammern gefüllt werden. Nach einstündiger Inkubation folgte ein doppelter Waschvorgang mit PBS. Es schloss die Zugabe von DAPI an, 1 : 10 000 in destilliertem Wasser verdünnt, welches nach 5 min mit doppelter Säuberung durch PBS wieder entfernt wurde. Nach Hinzugabe von ProLong Gold Antifade Mountant konnten die Kammern zur Trocknung gelagert werden. Die Auswertung erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskop am folgenden Tag. Darüber hinaus wurden die Zellen mittels Phasenkontrastmikroskopie untersucht.

5.5 Untersuchung der Genexpression mittels RT-PCR

Die Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) ermöglicht eine Detektion spezifischer Genprodukte auf Gesamtzellebene. Mithilfe reverser Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, kann mRNA in complementary DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Anschließend folgt eine Vervielfältigung der gewonnenen cDNA durch PCR, wofür genspezifische DNA-Primer verwendet werden, um eine Gelelektrophorese durchlaufen zu können. In Agarosegel können Moleküle sodann bei einer angelegten elektrischen Spannung anhand ihrer Größe und einer spezifischen Porengröße des Gels aufgetrennt werden. Die entstehenden Banden lassen sich mithilfe eines inerten Farbstoffs visualisieren.

Isolation der RNA

50 000 Zellen wurden jeweils in separate Kammern eines 48-Kammergefäßes zu den unterschiedlichen BM gegeben und für vier bis fünf Tage inkubiert. Zur Kontrolle wurde darüber hinaus jede Zellart unbehandelt in gleicher Konzentration mit Medium auf Plastik inkubiert, um eine Positivkontrolle zu erhalten. Bei HUVEC erfolgte zudem vor Isolation der RNA eine vierstündige Inkubation mit LPS (1 µg/ml, 4 h), um die Expression von E-Selektin zu induzieren. Um RNA zu isolieren, wurden zuerst die per Lichtmikroskop identifizierten Zellen von den zu testenden BM abgelöst und lysiert. Dies erfolgte mithilfe von 1 ml Trizol, das 1 %-iges β-Mercaptoethanol (BME) enthielt. Die lysierten Zellen wurden in ein Eppendorfgefäß überführt und zusammen mit jeweils 200 µl Chloroform, welches die Phasenseparation unterstützt, 15 s auf dem Vibrationsmischer geschüttelt, danach 5 min auf Eis gelagert und anschließend bei 4 °C 15 min mit 11 200 rpm zentrifugiert. Nach Überführung der wässrigen, RNA enthaltenden Phase der Eppendorfgefäße in neue konnte die gleiche Menge an Isopropanol hinzugefügt und erneut für 10 min auf Eis gelagert werden. Nach folgender Zentrifugation bei 4 °C 15 min mit 11 200 rpm wurde das nun erkennbare RNA-Pellet mit 500 µl 80 % Ethanol gewaschen und anschließend bei 4 °C 5 min mit 8 200 rpm zentrifugiert. Die zwei zuletzt genannten Schritte fanden wiederholt statt, um verbliebenes Ethanol sodann abzusaugen und das Pellet trocknen zu lassen. Zuletzt erfolgte das Resuspendieren des getrockneten Pellets in 20 µl ribonukleasefreiem Wasser, entsprechend destilliertem Wasser ohne Ribonukleasen (RNasen) oder Desoxyribonukleasen (DNasen), und die Konzentrationsmessung mithilfe des Spektralphotometers, NanoDrop ND-1000. 1 000 ng der isolierten RNA wurden dann zu einem Gesamtgemisch von 10 µl verdünnt und für den Vorgang der reversen Transkription verwendet.

Reverse Transkription

Das obig erwähnte Gesamtgemisch wurde nun mithilfe des High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits nach Herstellervorgaben im Real Time PCR Cycler, Applied Biosystems, transkribiert. Um RNA in cDNA umzuschreiben, wurde zunächst 10 µl Mastermix, bestehend aus 2 µl RT-Puffer, 0,8 µl Desoxyribonukleosidtriphosphate-(dNTP-) Mix (0,1 mol/l), 2 µl RT-Random-Primer, 1 µl MultiScribe-Reverse-Transcriptase (50 U/µl), 1 µl RNase-Inhibitor und 3,2 µl nukleasefreies Wasser mit 10 µl des RNA/Wasser-Gemischs einer Konzentration von 50 ng/µl in PCR-Röhrchen

vermengt. Daraufhin konnten die Röhren im Real Time PCR Cycler 10 min bei zunächst 25 °C, 120 min bei 37 °C und 5 min bei 85 °C behandelt werden, um anschließend bei 4 °C abzukühlen. Um cDNA zu erhalten, deren Prozessierung aus 10 ng RNA resultierte, wurden sodann 20 µl der cDNA mit 180 µl ribonukleasefreiem Wasser vermischt und bei 4 °C gelagert.

PCR

Die gefrorene cDNA wurde aufgetaut und anschließend unmittelbar genutzt. Bezüglich der PCR verwendete diese Arbeit den REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix von Sigma-Aldrich gemäß Herstellervorgaben. Hierfür wurde für den Mastermix 12,5 µl REDTaq ReadyMix mit 0,5 µl (0,001 mmol/l) der Vorwärts- sowie 0,5 µl (0,001 mmol/l) der Rückwärtssequenz des adäquaten Primers eines jeweiligen Genabschnitts vermengt. Darüber hinaus folgte die Zugabe von 2 µl der zu untersuchenden cDNA-Probe und 9,5 µl Wasser. Die genutzten Primer sind unter Abschnitt 4.5 aufgeführt. Bei 94 °C erfolgte die initiale Denaturierung. Dieser schlossen sich 35 Zyklen bei 94 °C für 2 min, bei 94 °C für 30 s, bei der jeweils primerabhängigen Anlagerungstemperatur für 30 s und bei 72 °C für 30 s an. Die Extensionsphase beendete die PCR bei 72 °C für 10 min, um entstandene cDNA anschließend bei 4 °C lagern zu können.

Gelelektrophorese

Nukleinsäuren können mithilfe der Agarosegelelektrophorese unkompliziert aufgetrennt werden. Agarose, ein pflanzliches Polysaccharid, bildet im Gel netzartige Strukturen, durch welche die DNA-Fragmente bei angelegter Spannung je nach Größe unterschiedlich weit wandern (Schrödel 2008).

Für die zu untersuchenden DNA-Fragmente wurde eine Agarosegelkonzentration von 0,8 % gewählt. Die Herstellung des Gels erfolgte mit 0,5 % Tris-Borat-EDTA- (TBE-) Puffer und anschließendem Aufkochen des Gemischs in der Mikrowelle. Nach kurzer Abkühlzeit wurde 2 µl peqGREEN 20000X DNA/RNA binding dye-Stammlösung hinzugegeben, um die Banden unter späterem ultravioletten (UV-) Licht fluoreszieren zu lassen, bevor das Gel zur Aushärtung in eine jeweilige Elektrophoresekammer gegossen werden konnte. Ein 10-Zinken-Kamm befand sich in der Kammer, um spätere Taschen zum Einfüllen der Proben zu formen. Nach 15 min konnte das Gel nun in die Apparatur gesetzt und mit elektrisch leitendem TBE-Puffer überdeckt werden. Anschließend konnten 10 µl jeder Probe sowie 10 µl einer Negativ- sowie

einer Positivkontrolle neben 6 µl Marker (DNA-Bandenskala, 1 kb-Leiter) als Referenz in die einzelnen Taschen gefüllt werden. Die Gelelektrophorese lief nun bei einer angelegten Spannung von 100 V für 30 – 40 min, bis einzelne Primerbanden vollständig bis zum Ende der Skala durchgelaufen waren. Mithilfe von UV-Licht konnten anschließend die einzelnen DNA-Banden visualisiert werden, die durch den bereits ins Gel gegebene peqGREEN 20000X DNA/RNA binding dye-Farbstoff nun fluoreszierten. Zugunsten nachfolgender Auswertung wurden geräteintern fotografische Aufnahmen angefertigt.

6 Ergebnisse

6.1 Sterilitätstest der Biomaterialien

Um sicherzustellen, dass die Materialien sowohl nach Entnahme aus der Verpackung als auch nach der Zerkleinerung in Stücke noch steril waren, wurden präparierte Materialstücke in ein Medium gegeben, das das Wachstum von Mikroorganismen unterstützte. Tabelle 10 repräsentiert die Ergebnisse zu verschiedenen Zeitpunkten nach Zugabe der Materialien zu den Medium enthaltenden Röhren.

Tabelle 10: Resultate des Sterilitätstest der BM zu verschiedenen Zeitpunkten

Material	24 h	48 h	72 h	96 h
Kol	- / - / -	- / - / -	- / - / -	- / - / -
Kol-Vat	- / - / -	- / - / -	- / - / -	- / - / -
Collacone	- / - / -	- / - / -	- / - / -	- / - / -
Collacone max	- / - / -	- / - / -	- / - / -	- / - / -
Rogg	- / - / -	- / - / -	- / - / -	- / - / -
Porcines Perikard	- / - / -	- / - / -	- / - / -	- / - / -
Porcine Dermis	- / - / -	- / - / -	- / - / -	- / - / -
Sterilkontrolle	- / - / -	- / - / -	- / - / -	- / - / -
E. coli	+ / + / +	+ / + / +	+ / + / +	+ / + / +

Anmerkung. Die Ergebnisse sind für 3 Röhren respektive 3 verschiedenen Materialproben gezeigt; - : keine Trübung, + : Trübung, E.coli: Escherichia coli.

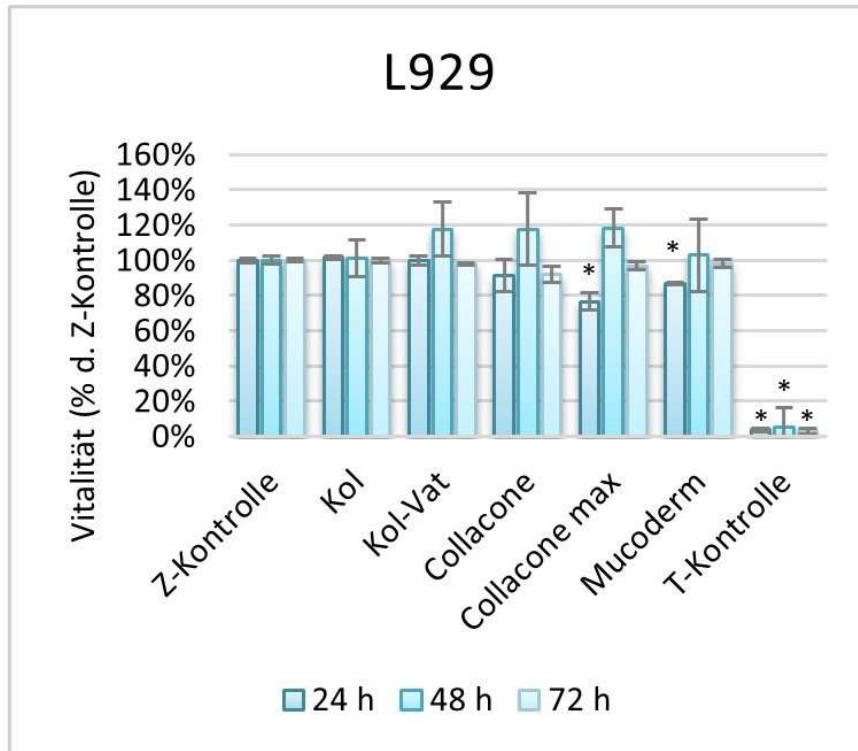
Der in Tabelle 10 dargestellte Sterilitätstest bestätigte die Sterilität aller getesteten Materialien zu jedem der untersuchten Zeitpunkte. Wie ersichtlich, zeigte keines der vom Hersteller erhaltenen Materialien auch nach Zerkleinerung in kleine Proben eine Trübung. Sie repräsentierten ähnliche Ergebnisse wie die der Probe unbehandelten Mediums (Sterilkontrolle) und galten daher als steril. Das Kontrollröhrchen demonstrierte ermöglichtes Wachstum bakterieller Kontamination wie Escherichia coli (E. coli) in dem Medium und verdeutlichte das Resultat bei nicht vorliegender Sterilität.

6.2 Toxizitätstest mittels Resazurin

Die Grafiken in Abbildung 2 bis 6 zeigen die Ergebnisse quantitativer Toxizitätstests der verschiedenen BM mit Resazurin und anschließender Auslesung durch ein Spektralphotometer.

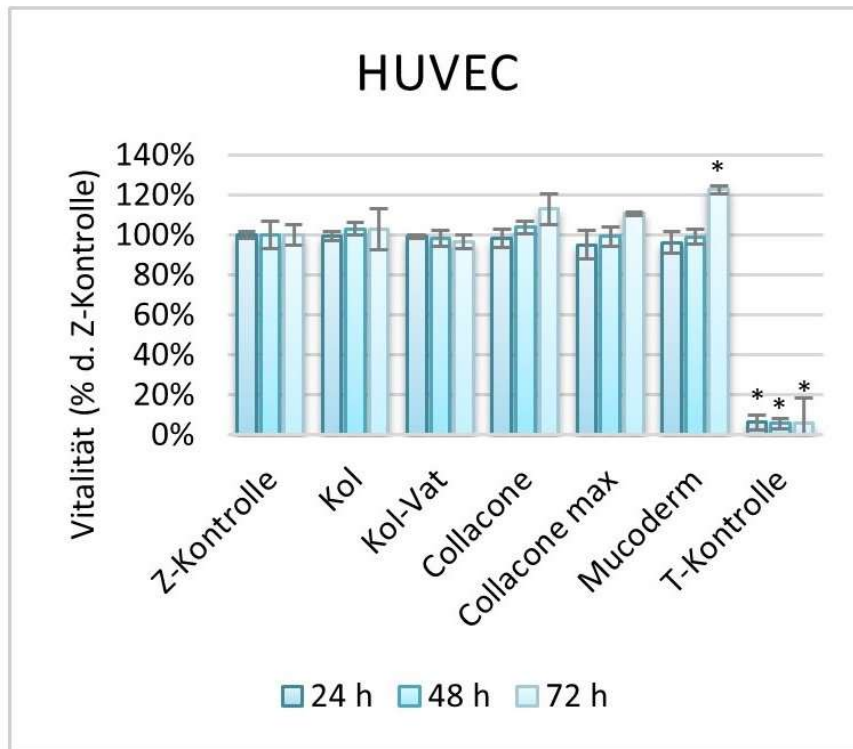
Die Ergebnisse repräsentieren die metabolische Aktivität der Zellen nach 24, 48 und 72 Stunden nach Zugabe der Extrakte. Jedes Säulendiagramm veranschaulicht eine der im Schnitt drei Mal durchgeführten, voneinander unabhängigen Messungen pro Zellart, die bei den Primärzellen differierenden Spendern entstammten. Die Abbildungen zeigen den mittleren Durchschnitt der erfassten Absorption von je drei unabhängigen Zellkammern zu den jeweiligen Zeitpunkten abzüglich der durchschnittlich erfassten Absorption des Mediums allein. Die mit Vitalität gleichzusetzenden Werte wurden in prozentualer Abhängigkeit der pro Zeitintervall gemessenen Vitalität der unbehandelten Zellen ohne BM (Zellkontrolle) gesetzt. Als Fehlerindikatoren diente die ermittelte Standardabweichung pro Experimentalgruppe. Das Signifikanzniveau der Messungen wurde anhand des unabhängigen Zweistichproben-T-Tests mit unterschiedlicher Varianz ermittelt und bei $p < 0,05$ als statistisch signifikant erachtet. Es diente zum Vergleich von unbehandelten Zellen gegenüber den Zellen unter Behandlung mit Extrakt. Die Auswertung erfolgte mit Excel (Microsoft Office, Microsoft).

Die getesteten Extrakte von Kol, Kol-Vat, Collacone, Collacone max und Mucoderm wurden jeweils 24, 48 und 72 Stunden zu den verschiedenen Zellen gegeben, unter den in Abschnitt 5.3 genannten Bedingungen inkubiert und anschließend im Spektralphotometer ausgewertet. Die zu Anfang ausgesäte Anzahl vitaler Zellen betrug 15 000 Zellen pro Kammer. Mit 30 μ l 10 % Triton X-100 versetzte Zellen dienten als Toxizitäts-Positivkontrolle (T-Kontrolle) und repräsentierten resultierenden Zelluntergang bei vorliegender Toxizität. Die Balken zeigen die Relation zur Zellpopulation der unbehandelten Zellen (Z-Kontrolle), die zu jedem Messzeitpunkt 100 % entsprach. Die aufgeführten Ergebnisse spiegeln repräsentativ einen der für jede Zellart drei Mal durchgeführten Versuche wider.

Vitalität der L929-Zellen**Abbildung 2: Toxizitätstest mit Resazurin und L929**

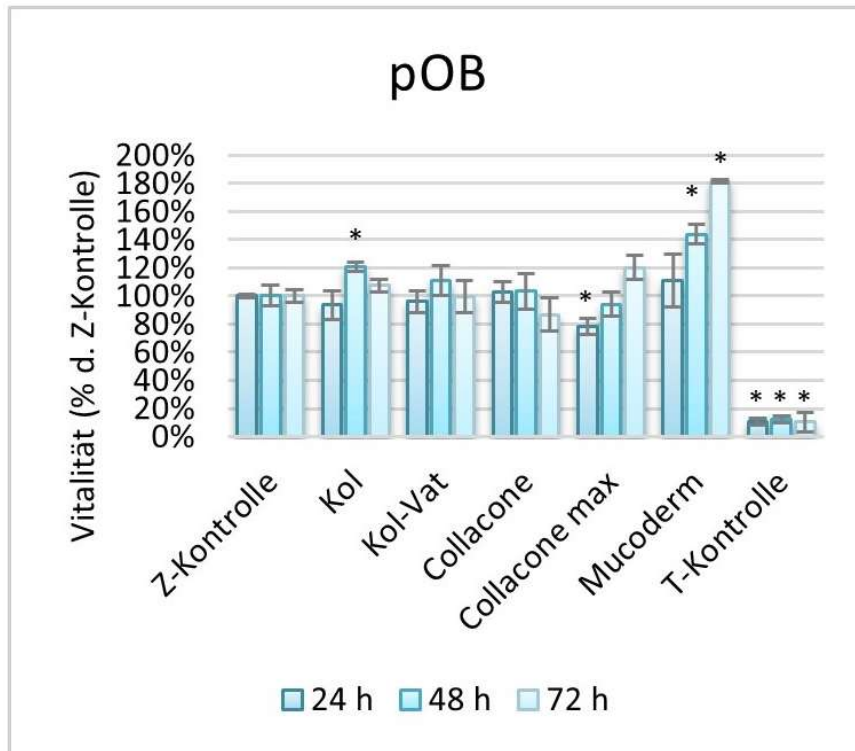
Inkubation der Zellen mit den BM, Ermittlung der Zellvitalität zu den angeführten Zeitpunkten mittels Resazurin. Abhängigkeit der Vitalität der Zellen (y-Achse) von der unterschiedlichen Zusammensetzung verschiedener BM (x-Achse) zu 24, 48, 72 h. Vitalität: prozentualer Anteil der Zellvitalität unter den jeweiligen Bedingungen verglichen zur Z-Kontrolle (= 100 %). Z-Kontrolle: Zellkontrolle auf Plastik, T-Kontrolle: Toxizitäts-Positivkontrolle, schwarze Strecken: Standardabweichung, *: $p < 0,05$.

Zu Anfang fiel eine der Zellkontrolle (Z-Kontrolle) sehr ähnliche Zellzahl der Kollagen-Vaterit-Probe (Kol-Vat) nach 24 h auf. Reines Kollagen (Kol) zeigte vergleichbar hohe Zellzahlen, während die Collacone-Probe zu diesem Zeitpunkt eher geringere, die Collacone-max- und Mucoderm-Probe sogar signifikant geringere Zellpopulationen aufwiesen. Die Ergebnisse verdeutlichten einen merklichen Anstieg der Zellpopulation der Kollagen-Vaterit-Probe von 24 h auf 48 h verglichen zu den unbehandelten Zellen (Z-Kontrolle). Die restlichen BM, ausgenommen der Kol-Probe, demonstrierten ähnlich starke Zunahmen, die der Mucoderm-Probe weniger deutlich ausgeprägt. Nach 72 h lag die Zellpopulation der Kol-Vat-Probe kaum merklich unter Kol und der Zellkontrolle. Das Wachstum schien somit leicht zu stagnieren, möglicherweise aufgrund von Kontaktinhibition. Die Anzahl vitaler Zellen bei Collacone max und Mucoderm lag zu diesem Zeitpunkt in vergleichbarer Höhe zu Kol-Vat, während Collacone leicht geringere Zellzahlen zeigte. Insgesamt konnte keine bedeutende Toxizität festgestellt werden.

Vitalität der HUVEC**Abbildung 3: Toxizitätstest mit Resazurin und HUVEC**

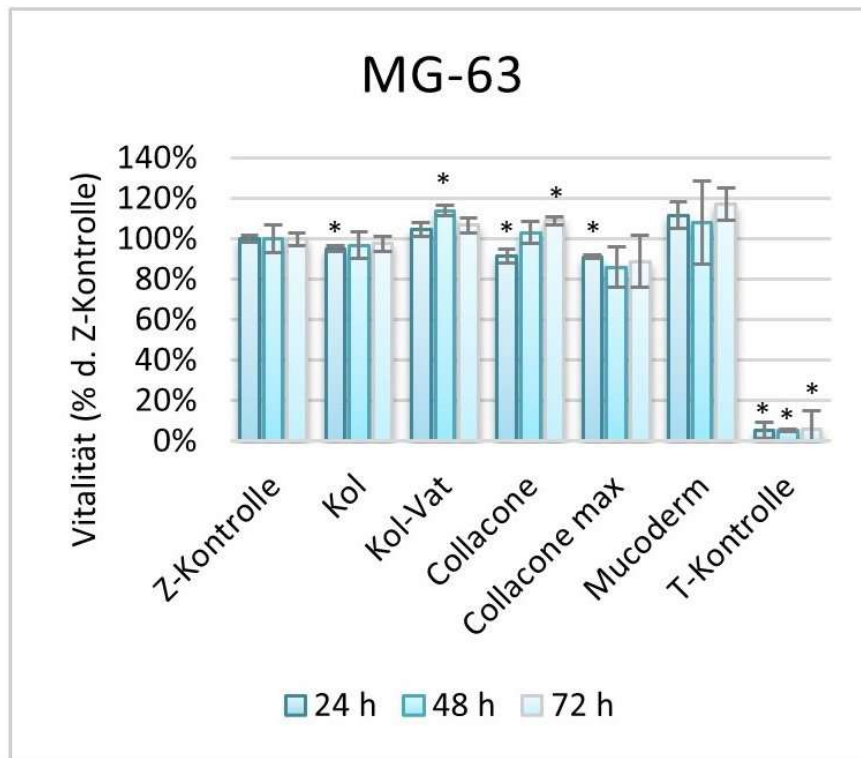
Inkubation der Zellen mit den BM, Ermittlung der Zellvitalität zu den angeführten Zeitpunkten mittels Resazurin. Abhängigkeit der Vitalität der Zellen (y-Achse) von der unterschiedlichen Zusammensetzung verschiedener BM (x-Achse) zu 24, 48, 72 h. Vitalität: prozentualer Anteil der Zellvitalität unter den jeweiligen Bedingungen verglichen zur Z-Kontrolle (= 100 %). Z-Kontrolle: Zellkontrolle auf Plastik, T-Kontrolle: Toxizitäts-Positivkontrolle, schwarze Strecken: Standardabweichung, *: $p < 0,05$.

Nach 24 und 48 h lagen die Zellzahlen der Kol-Vat-Probe in ähnlicher Höhe der Kontrollzellzahl, die Zellzahlen der anderen Proben lagen vergleichbar. Collacone max und Mucoderm zeigten zu diesen Zeitpunkten leicht niedrigere Werte vitaler Zellen als die unbehandelte Zellkontrolle. Nach 72 h repräsentierte der Wert der Kol-Vat-Probe eine, verglichen zur Zellkontrolle, leicht geringere Zellpopulation, jedoch nicht signifikant geringer. Kol, Collacone, Collacone max und Mucoderm zeigten nach 72 h leicht bis deutlich höhere Werte vitaler Zellen verglichen zu Kol-Vat. Gegenüber den unbehandelten Zellen (Z-Kontrolle) wies Mucoderm nach 72 h eine signifikant höhere Zellzahl auf. HUVEC offenbarten eine vergleichbare Vitalität in Gegenwart aller getesteten BM ohne zu beobachtende Hinweise auf mögliche Toxizität.

Vitalität der pOB**Abbildung 4: Toxizitätstest mit Resazurin und pOB**

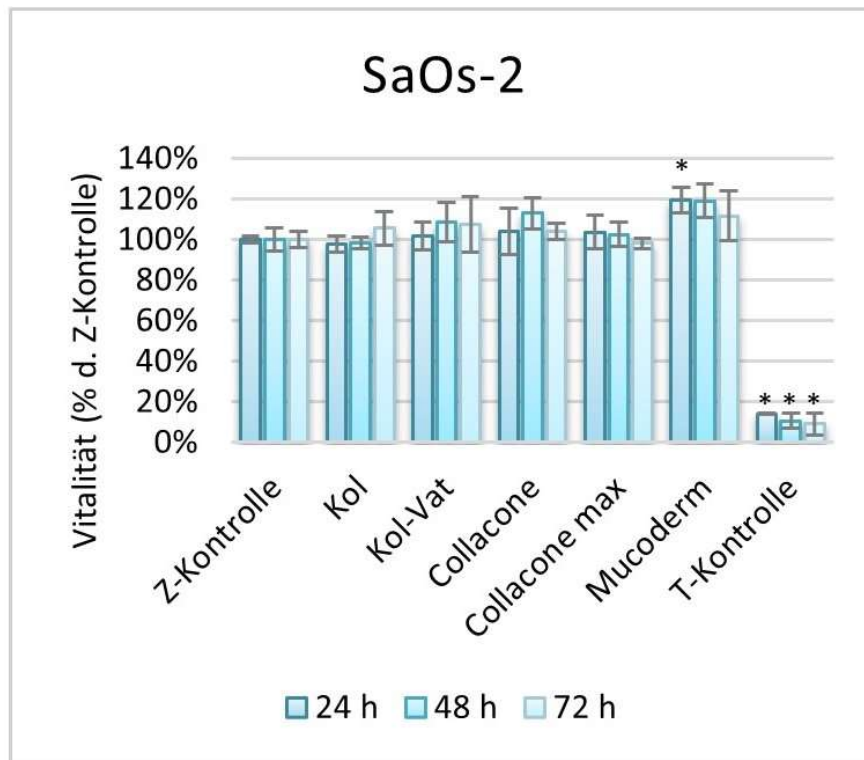
Inkubation der Zellen mit den BM, Ermittlung der Zellvitalität zu den angeführten Zeitpunkten mittels Resazurin. Abhängigkeit der Vitalität der Zellen (y-Achse) von der unterschiedlichen Zusammensetzung verschiedener BM (x-Achse) zu 24, 48, 72 h. Vitalität: prozentualer Anteil der Zellvitalität unter den jeweiligen Bedingungen verglichen zur Z-Kontrolle (= 100 %). Z-Kontrolle: Zellkontrolle auf Plastik, T-Kontrolle: Toxizitäts-Positivkontrolle, schwarze Strecken: Standardabweichung, *: $p < 0,05$.

Nach 24 h lag die Zellzahl der Kol-Vat- sowie der Kol-Probe minimal unter der Kontrollzellzahl, Collacone max offenbarte signifikant niedrigere Zellzahlen. Während die Zahl vitaler Zellen bei Collacone in ähnlicher Höhe wie die der Zellkontrolle lag, repräsentierte die Mucoderm-Probe höhere Zellzahlen als die unbehandelten Zellen (Z-Kontrolle). 48 h nach Zugabe des Extrakts zeigte Kol-Vat merklich erhöhte Werte der Zellpopulation, die Zellkontrolle, Collacone und Collacone max übertreffend. Kol und Mucoderm erreichten hier signifikant höhere Zellzahlen als die Zellkontrolle. Nach 72 h Inkubation wies die Kol-Vat-Probe eine der Zellkontrolle und Kol-Probe ähnlich hohe Zellpopulation auf, die Collacone-Probe offenbarte geringere Zellzahlen. Collacone max zeigte demgegenüber eine merklich erhöhte Zellzahl. Mucoderm präsentierte zu diesem Zeitpunkt signifikant höhere Zellzahlen als die unbehandelten Zellen (Z-Kontrolle).

Vitalität der MG-63-Zellen**Abbildung 5: Toxizitätstest mit Resazurin und MG-63**

Inkubation der Zellen mit den BM, Ermittlung der Zellvitalität zu den angeführten Zeitpunkten mittels Resazurin. Abhängigkeit der Vitalität der Zellen (y-Achse) von der unterschiedlichen Zusammensetzung verschiedener BM (x-Achse) zu 24, 48, 72 h. Vitalität: prozentualer Anteil der Zellvitalität unter den jeweiligen Bedingungen verglichen zur Z-Kontrolle (= 100 %). Z-Kontrolle: Zellkontrolle auf Plastik, T-Kontrolle: Toxizitäts-Positivkontrolle, schwarze Strecken: Standardabweichung, *: $p < 0,05$.

24 h nach Zugabe des Extrakts zeigte die Kol-Vat-Probe eine leicht höhere Anzahl vitaler Zellen als die Zellkontrolle und die vergleichenden Proben, ausgenommen Mucoderm. Kol, Collacone und Collacone max ließen signifikant geringere Zellzahlen als die unbehandelten Zellen (Z-Kontrolle) vernehmen. Nach 48 h veranschaulichte Kol-Vat eine signifikant höhere Zellzahl gegenüber der Zellkontrolle, die Vergleichsproben übertreffend. Nach 72 h lag die Zellpopulation der Kol-Vat-Probe immer noch über den unbehandelten Zellen (Z-Kontrolle), ebenfalls die Mucoderm- sowie Signifikanzniveau erreichende Collacone-Probe. Die restlichen BM zeigten geringere Zellzahlen. Während die Werte von Kol zu 24 h und 48 h, denen der Zellkontrolle sehr ähnelten, zeigte Collacone max zu diesen Zeitpunkten deutlich geringere Werte. Die Zunahme der Zellen mit Kol-Vat-Extrakt von 24 h auf 48 h erschien höher als die Veränderung der Zellzahl von 48 h auf 72 h, was auf ein Stagnieren des Zellwachstums aufgrund von Kontaktinhibition rückführbar wäre. Es konnte keinerlei Toxizität der getesteten Materialien beobachtet werden.

Vitalität von SaOs-2-Zellen**Abbildung 6: Toxizitätstest mit Resazurin und SaOs-2**

Inkubation der Zellen mit den BM, Ermittlung der Zellvitalität zu den angeführten Zeitpunkten mittels Resazurin. Abhängigkeit der Vitalität der Zellen (y-Achse) von der unterschiedlichen Zusammensetzung verschiedener BM (x-Achse) zu 24, 48, 72 h. Vitalität: prozentualer Anteil der Zellvitalität unter den jeweiligen Bedingungen verglichen zur Z-Kontrolle (= 100 %). Z-Kontrolle: Zellkontrolle auf Plastik, T-Kontrolle: Toxizitäts-Positivkontrolle, schwarze Strecken: Standardabweichung, *: $p < 0,05$.

24 h nach Zugabe des Extrakts zeigte die Kol-Vat-Probe leicht höhere Zellzahlen als die Zellkontrolle. Die Werte vitaler Zellen bei Kol, Collacone und Collacone max lagen in ähnlichen Bereichen. Mucoderm offenbarte gegenüber den unbehandelten Zellen (Z-Kontrolle) signifikant erhöhte Werte nach 24 h. Nach 48 h konnte eine merkliche Zunahme der Zellzahl bei der Kol-Vat- und Collacone-Probe beobachtet werden, verglichen zur Zellkontrolle sowie Kol und Collacone max lagen die Werte höher. Nach 72 h ließ Kol-Vat weiterhin höhere Zellzahlen als die Zellkontrolle auf Plastik sowie Collacone max vernehmen, ähnlich der Kol-Probe zeigten sich leicht höhere Werte als bei zugegebenen Extrakten der Collacone-Probe. Mucoderm repräsentierte bei 48 h und 72 h im Vergleich zur Zellkontrolle und den anderen BM höhere Werte, während die Werte von Collacone max in ähnlichen Bereichen der Zellkontrolle lagen. Insgesamt ermöglichte Kol-Vat ein kontinuierliches Zellwachstum. Wie bereits bei der MG-63-Zelllinie konnte auch bei den SaOs-2-Zellen in Anwesenheit der Materialien keine bedeutsame Toxizität festgestellt werden.

Alle Zellarten zeigten nach Inkubation mit Extrakt der Kol-Vat Probe innerhalb der ersten 24 h bis 48 h eine leichte bis deutliche Zunahme des Zellwachstums, die im weiteren Verlauf durch Kontaktinhibition zu stagnieren schien. Gegenüber der mit Kol-Extrakt inkubierten Zellen verzeichneten die primären Osteoblasten sowie Endothelzellen in Präsenz von Kol-Vat vergleichbare, die übrigen hier getesteten Zellarten höhere Werte. Das Proliferationsverhalten wird in Tabelle 11 vereinfacht dargestellt. Die Vaterit-Zugabe schien das Zellproliferationsverhalten positiv zu beeinflussen. Collacone, Collacone max und Mucoderm dienten als bereits bewährte und Zellwachstum anregende Vergleichsmaterialien, während Kol die separate Kollagenkomponente des Kol-Vat präsentierte. Keines der untersuchten BM offenbarte für jegliche hier zur Anwendung kommenden Zellen bedeutsame Toxizität.

Tabelle 11: Zellproliferation in Präsenz der BM

Zellen	Kol	Kol-Vat	Collacone	Collacone max	Mucoderm
L929	+	++	++	++	+
HUVEC	+	+	++	++	+++
pOB	++	+	+	+	+++
MG-63	+	++	+	(+)	++
SaOs-2	+	++	++	+	+++

Anmerkung. (+) : geringes Wachstum, + : regelrechtes Wachstum, ++ : gutes Wachstum, +++ : sehr gutes Wachstum.

Darüber hinaus erfolgte die Betrachtung der Zellen zu den obig aufgeführten Zeitpunkten unter dem Lichtmikroskop, um mögliche Aussagen über qualitative Zytotoxizität nach ISO 10993-5 (2009) treffen zu können. Alle Zellen offenbarten in Gegenwart jeglicher getesteten Materialien ein physiologisches Erscheinungsbild. Während die Zellen endothelialen Typs eine langgestreckte Morphologie repräsentierten, die bei Konfluenz einem pflastersteinartigen Muster gleichkam, zeigten osteoblastische Zellen ein für ihre Zellart charakteristisches, rundliches Aussehen (siehe auch Abschnitt 6.4). Die für Toxizitätstests etablierte L929-Zelllinie veranschaulichte ein für fibroblastische Zellarten kennzeichnendes, spindelförmiges Erscheinungsbild.

6.3 Endotoxin-Test auf E-Selektin

6.3.1 Endotoxin-Test aller Biomaterialien mit HUVEC

Die hier angeführten Ergebnisse zeigen die Testung auf Endotoxine durch Anfärbung von E-Selektin nach Inkubation von HUVEC mit Extrakten der zu testenden BM Kol, Kol-Vat, Collacone, Collacone max und Mucoderm. Die Ergebnisse des Anfärbens der HUVEC hinsichtlich deren Induktion von E-Selektin nach vierstündiger Inkubation mit Extrakten der BM ist in Abbildung 7 dargestellt. Die Färbung erfolgte mittels Immuncytochemie, die Auswertung der Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop. Die Zellen mit dem zugesetzten LPS, repräsentativ für die sogenannte Antigen-Positivkontrolle, offenbarten eine hohe Induktion von E-Selektin in diesen 4 h. Dies wurde anhand der hohen Anzahl grün befleckter Zellen, die eine grüne Unterlegung des Zellkerns aufzeigten, ersichtlich. Keines der getesteten Materialien Kol, Kol-Vat, Collacone, Collacone max oder Mucoderm induzierte eine Expression von E-Selektin in den Zellen (Abwesenheit der grün befleckten Zellen).

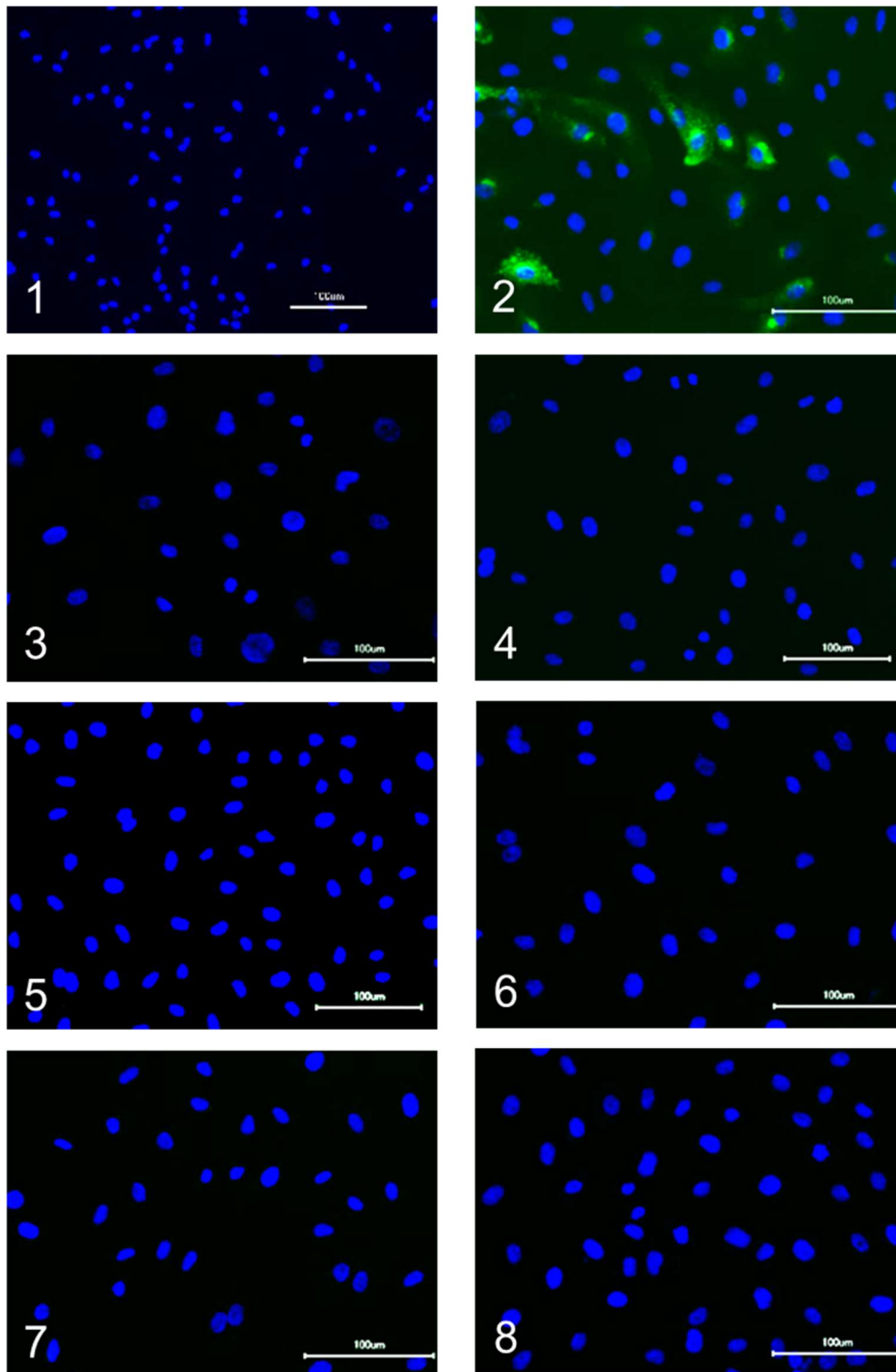


Abbildung 7: Endotoxin-Test aller BM mit HUVEC

Anfarbung möglicher E-Selektin-Expression durch HUVEC auf BM. Fluoreszenzmikroskopiefotos: 1) – LPS: Antigen-Negativkontrolle, 2) + LPS: Antigen-Positivkontrolle, 3) Kol-Extrakt; 4) Kol-Vat-Extrakt, 5) Collacone-Extrakt, 6) Collacone-max-Extrakt, 7) Mucoderm-Extrakt, 8) kein primärer AK: AK-Negativkontrolle. AK: Antikörper, blau: Zellkerne, grün: gebundene AK gegen E-Selektin; Messbalken: 100 µm.

Die Ergebnisse 1 bis 8 in Abbildung 7 veranschaulichen eine erfolgreiche Visualisierung der primären Endothelzellen HUVEC durch Kernfärbung. Die Antigen-Positivkontrolle (2) hob erhaltene Syntheseleistung von E-Selektin durch HUVEC nach Stimulation mit Endotoxinen hervor. Die Antigen-Negativkontrolle (1) sowie die AK-Negativkontrolle (8) verdeutlichten das wünschenswerte Ergebnis endotoxinfreier BM ohne anfärbares E-Selektin. Keines der hier getesteten Materialien (3 – 7) stimulierte primäre Endothelzellen zur Expression von E-Selektin.

Phasenkontrastmikroskopie

Überdies wurden die HUVEC mithilfe der Phasenkontrastmikroskopie am Fluoreszenzmikroskop vier Stunden nach Zugabe des jeweiligen Extrakts untersucht. Wie Abbildung 8 zum Ausdruck bringt, zeigten alle Zellen in Präsenz der unterschiedlichen Extrakte von Kol, Kol-Vat, Collacone, Collacone max und Mucoderm neben vorliegender Adhärenz eine ähnliche Morphologie.

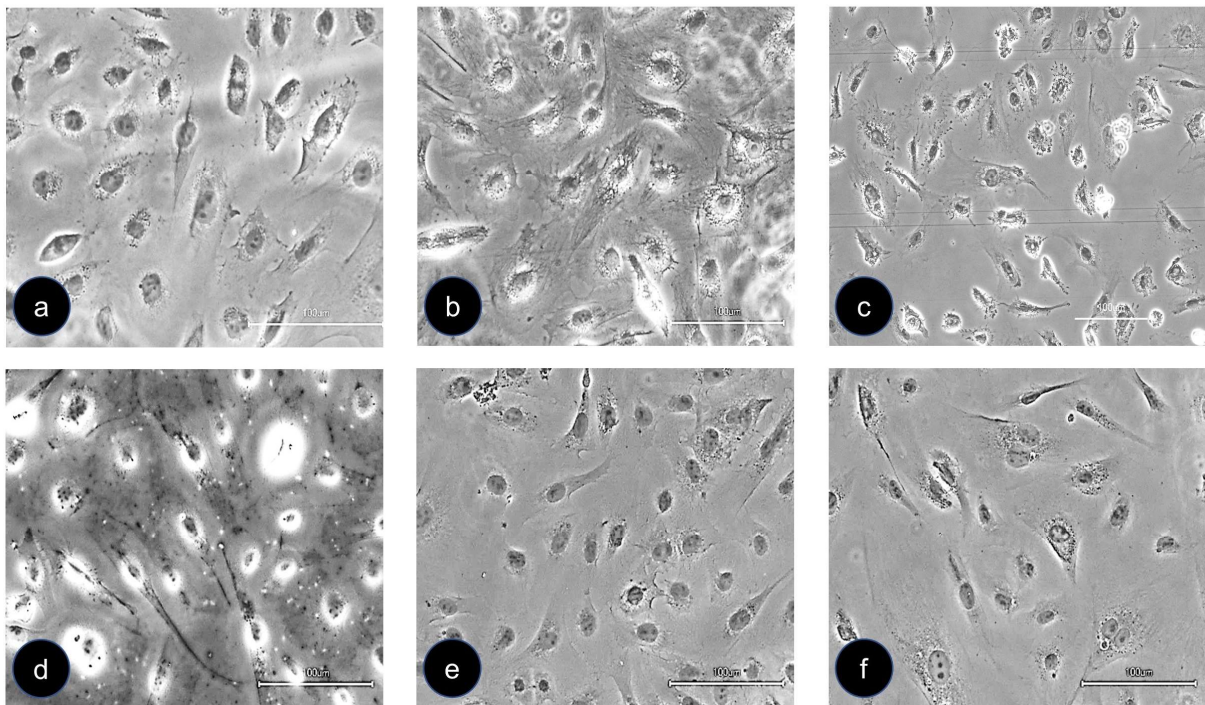


Abbildung 8: Phasenkontrastmikroskopie von HUVEC mit Extrakt

Untersuchung der HUVEC mittels Phasenkontrastmikroskopie nach Inkubation der Zellen mit den verschiedenen Extrakten für 4 h. HUVEC nach Exposition mit Extrakt von a) Kol, b) Kol-Vat, c) Kol-Vat, d) Collacone, e) Collacone max, f) Mucoderm. Messbalken: 100 µm.

6.3.2 Endotoxin-Test explizit mit Kol-Vat

Um die Resultate der vorangegangenen Testung explizit für Kol-Vat zu bestätigen, nutzte diese Arbeit neben einem wiederholten Durchgang mit HUVEC auch ISO-HAS.c1-Zellen gemäß Abschnitt 5.4.2. Vaterit entstammte der Herstellung durch die Forschungsgruppe Professor Tremels, Institut für anorganische und analytische Chemie der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz. Zugunsten der anschließenden Inkorporation in Kollagenetze wurde der synthetisierte Vaterit zu Botiss, Zossen, gesendet. Um sicherzustellen, dass die neu entwickelte Kombination auch nach Fertigung keinerlei Endotoxine enthielt, wurde eine Testung der Extrakte durchgeführt. Die Resultate verdeutlichen Abbildungen 9 und 10. Die folgenden Erkenntnisse basieren auf der bereits genannten Versuchsdurchführung des Anfärbens von E-Selektin. Die Auswertung erfolgte nach Inkubation von HUVEC sowie ISO-HAS.c1-Zellen mit Kol-Vat Extrakt für 24 h.

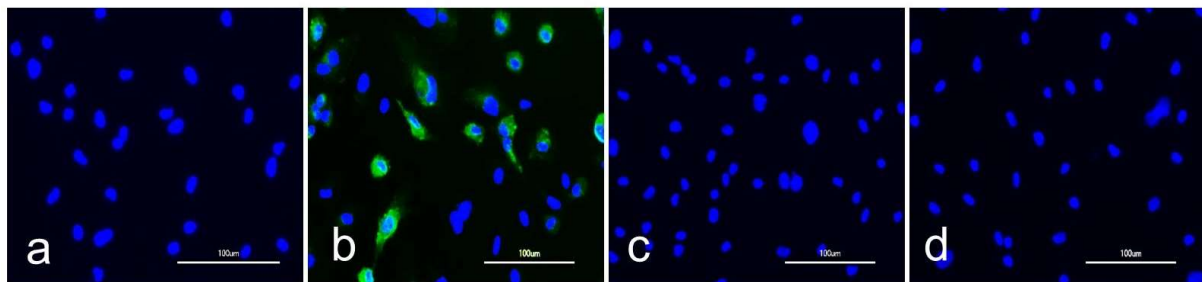


Abbildung 9: Endotoxin-Test von Kol-Vat mit HUVEC

Anfärbung von E-Selektin, Fluoreszenzmikroskopiefotos von HUVEC nach Inkubation mit Kol-Vat-Extrakt: a) Antigen-Negativkontrolle: nur Medium, b) Antigen-Positivkontrolle: + LPS, c) AK-Negativkontrolle: kein primärer AK, d) HUVEC nach Zugabe des Kol-Vat-Extrakts: keine Expression von E-Selektin. AK: Antikörper, blau: Zellkerne, grün: gebundene AK gegen E-Selektin, Messbalken: 100 µm.

Die Bilder zeigten eine regelrechte Kernfärbung der HUVEC, die Antigen-Positivkontrolle (b) bestätigte eine erfolgreiche Fluoreszenzfärbung von E-Selektin, welches im Zuge der inflammatorischen Reaktion der HUVEC auf Zugabe von LPS exprimiert worden ist. Die Färbung demonstrierte eine erhaltene Syntheseleistung dieser primären Zellen. Die HUVEC mit hinzugegebenem Kol-Vat-Extrakt (d) zeigten hingegen keinerlei exprimiertes E-Selektin, was eine inflammatorische Reaktion auf mögliche Endotoxine ausschloss. Die Antigen-Negativkontrolle (a) sowie die AK-Negativkontrolle, ohne primären AK gegen E-Selektin (c), seien als Kontrollen zur Veranschaulichung des gewünschten Ergebnisses aufgeführt.

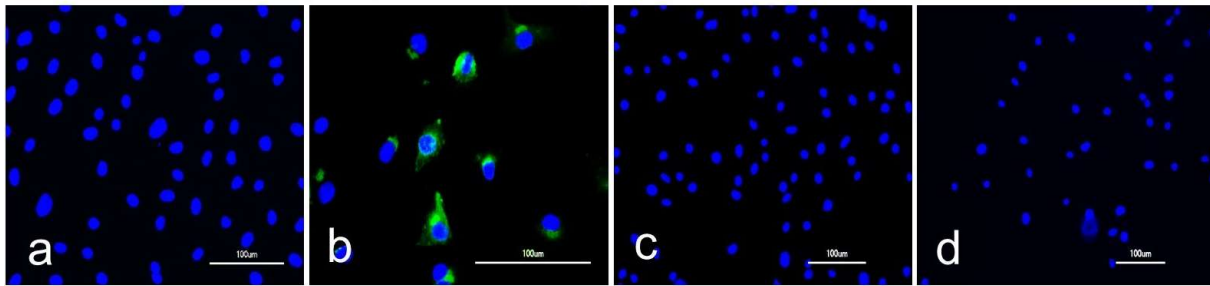


Abbildung 10: Endotoxin-Test von Kol-Vat mit ISO-HAS.c1

Anfärbung von E-Selektin, Fluoreszenzmikroskopiefotos von ISO-HAS.c1-Zellen nach Inkubation mit Kol-Vat-Extrakt: a) Antigen-Negativkontrolle: nur Medium, b) Antigen-Positivkontrolle: + LPS, c) AK-Negativkontrolle: kein primärer AK, d) ISO-HAS.c1-Zellen nach Zugabe des Kol-Vat-Extrakts: keine Expression von E-Selektin. AK: Antikörper, blau: Zellkerne, grün: gebundene AK gegen E-Selektin, Messbalken: 100 µm.

Die Ergebnisse repräsentierten eine regelrechte Kernfärbung der ISO-HAS.c1-Zellen auf den Bildern a) bis d). Die Antigen-Positivkontrolle (b) ließ die Fluoreszenzmarkierung des E-Selektins erkennen, welches durch ISO-HAS.c1-Zellen auf Stimulation mit LPS exprimiert worden war. Die mit Kol-Vat-Extrakt versehenen Zellen (d) zeigten keinerlei Expression von E-Selektin, hier verdeutlicht neben der Antigen-Negativkontrolle (a) sowie der AK-Negativkontrolle (c) dargestellt. Die Ergebnisse lassen schließen, dass Kol-Vat keine durch Endotoxine stimulierte inflammatorische Reaktion verursachte.

6.4 Untersuchung des Zellwachstums auf Biomaterial

Die angeführten Ergebnisse in Abbildungen 11 bis 14 veranschaulichen die Zellinteraktion zwischen Endothelzellen und Osteoblasten nach vier bis fünf Tagen Inkubation auf dem zu testenden BM nach Anfärbung durch Calcein-AM und Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop. Die angeführten Abbildungen stehen repräsentativ für mindestens sechs aufgenommene Bilder pro Kammer von jeweils drei unabhängigen Materialproben. Während c) bis g), entsprechend Collacone, Collacone max, Rogg, Porcines Perikard und Porcine Dermis, als Kontrolle des Zellwachstums auf bereits in der Medizin verwendeten Produkten dienen, zeigt h) unbehandeltes Zellwachstum auf Plastik. Die Probe a) repräsentiert in den folgenden Abbildungen die separate Kollagenkomponente (Kol) des Kol-Vat (b) und dient dem indirekten Vergleich. Bei den hier gezeigten Ergebnissen gilt zu beachten, dass sich die Proben Kol (a), Kol-Vat (b) und Collacone (c) nach 24 h zu großen Anteilen und nach vier Tagen bereits zu Teilen aufgelöst hatten.

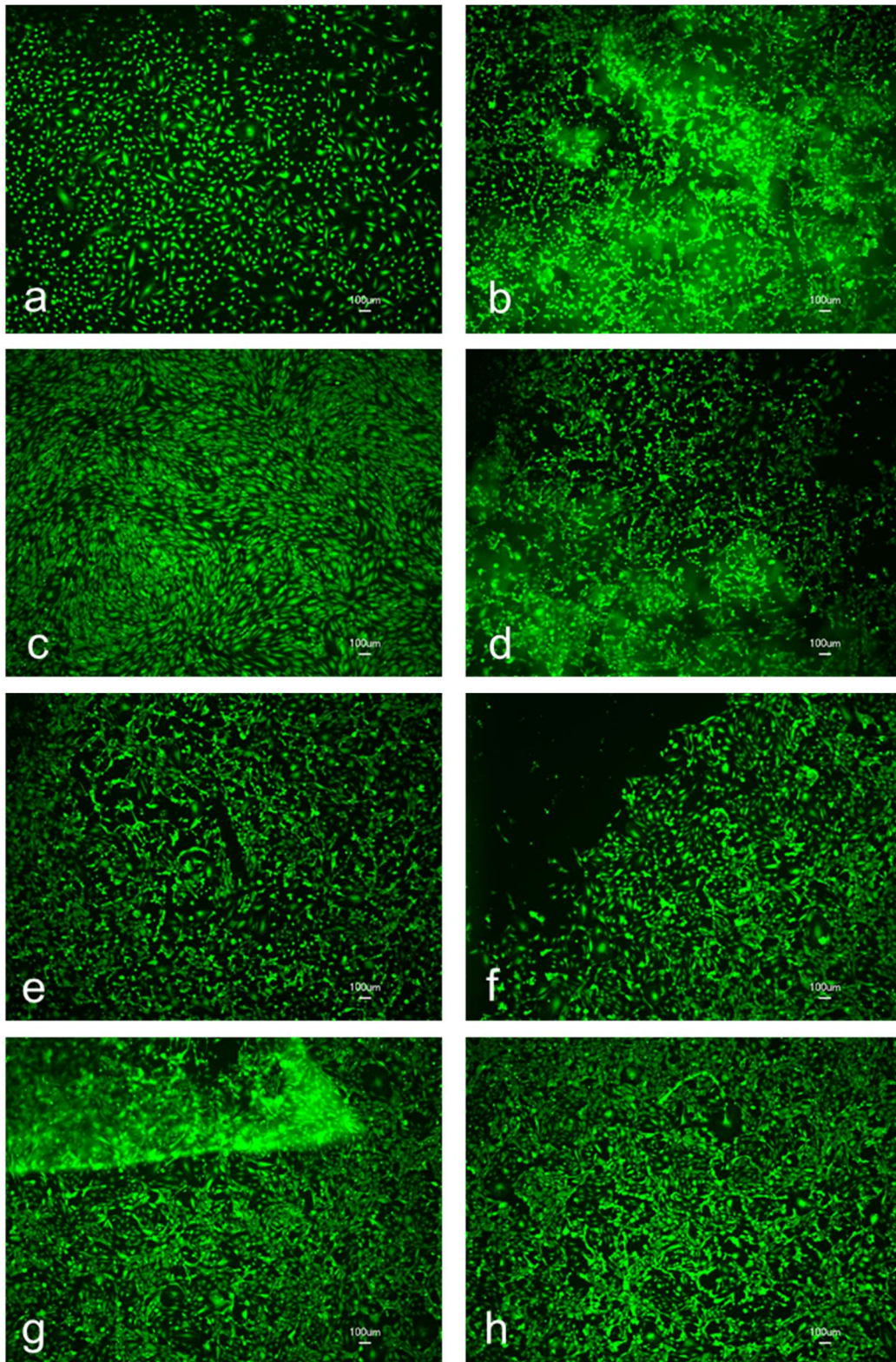


Abbildung 11: Zellwachstum von HUVEC auf BM

Zellwachstum auf a) Kol, b) Kol-Vat, c) Collacone, d) Collacone max, e) Rogg, f) Porcines Perikard, g) Porcine Dermis, h) Plastik (Kontrolle). Grün: fluoreszierende, vitale Zellen, Messbalken: 100 µm.

Das Zellwachstum von HUVEC auf den verschiedenen BM wird in Abbildung 11 ersichtlich. Die Zellen wuchsen auf allen Materialproben und offenbarten eine ähnliche Morphologie denen, der Kontrollzellen auf Plastik (h). Zwischen dem Kollagen-Vaterit-Gemisch (b) oder der HA/ β -TCP-Probe, Collacone max (d), und den Kollagen-Präparaten a), c) und e) bis g) (entsprechend Kol, Collacone, Rogg, Porcines Perikard and Porcine Dermis) konnten keine Unterschiede festgestellt werden. Auf den Proben b) bis h) zeigten die Endothelzellen ein für ihre Art typisches Wachstumsverhalten adhärenter, vitaler Zellen, das sogenannte ‚spreading‘. Sie präsentierten eine langgezogene, ausgestreckte Morphologie. Durch Erhöhung der Zellzahl und vermehrte interzelluläre Kontakte veränderte sich diese Morphologie zu eher kuboiden, pflastersteinartig angeordneten Zellen, insbesondere auf c), g) und h) erkennbar.

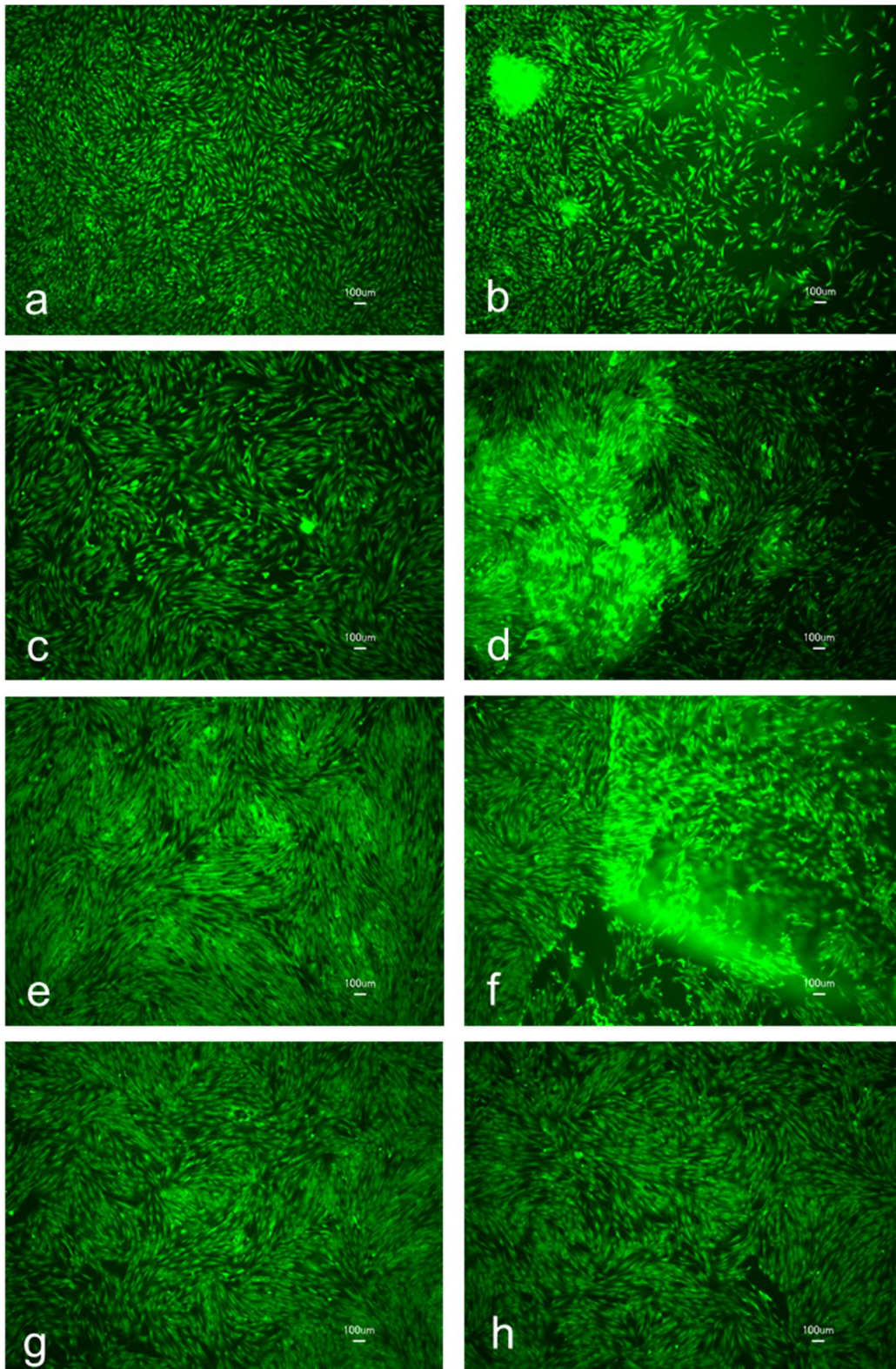


Abbildung 12: Zellwachstum von pOB auf BM

Zellwachstum auf a) Kol, b) Kol-Vat, c) Collacone, d) Collacone max, e) Rogg, f) Porcines Perikard, g) Porcine Dermis, h) Plastik (Kontrolle). Grün: fluoreszierende, vitale Zellen, Messbalken: 100 µm.

Um das Wachstum von Osteoblasten auf den BM bestmöglich zu analysieren, wurden drei verschiedene osteoblastische Zelltypen verwendet. Abbildung 12 zeigt das Zellwachstum primärer Osteoblasten (pOB) auf den verschiedenen Materialien. Die pOB offenbarten eine gleichkommende Morphologie auf allen untersuchten Produkten. Auf den kollagenbasierten BM (a, c, e, f, g) konnten nahezu konfluente Monolayer beobachtet werden. Porcines Perikard (f) präsentierte eine intensive Fluoreszenzfärbung bildmittig, die auf mit Zellen besetztes Material zurückzuführen ist, das dazu tendierte, sich in Vertiefungen der Zellkulturkammern zusammenzurollen. Das Vaterit enthaltende Präparat Kol-Vat (b) und die HA/ β -TCP-Probe Collacone max (d) ermöglichten ein ebenfalls sehr gutes Zellwachstum, wobei viele Zellen an den größeren Partikeln des sich auflösenden Kol-Vat (b) beziehungsweise an den nanogroßen Partikeln des Collacone max (d) hafteten. Dies wird an den intensiv gefärbten Fluoreszenzpunkten der Bilder erkennbar, die auf überaus große Zellmengen auf kleinem Raum, entsprechenden Zellakkumulationen, auf den einzelnen Partikeln hindeuteten.

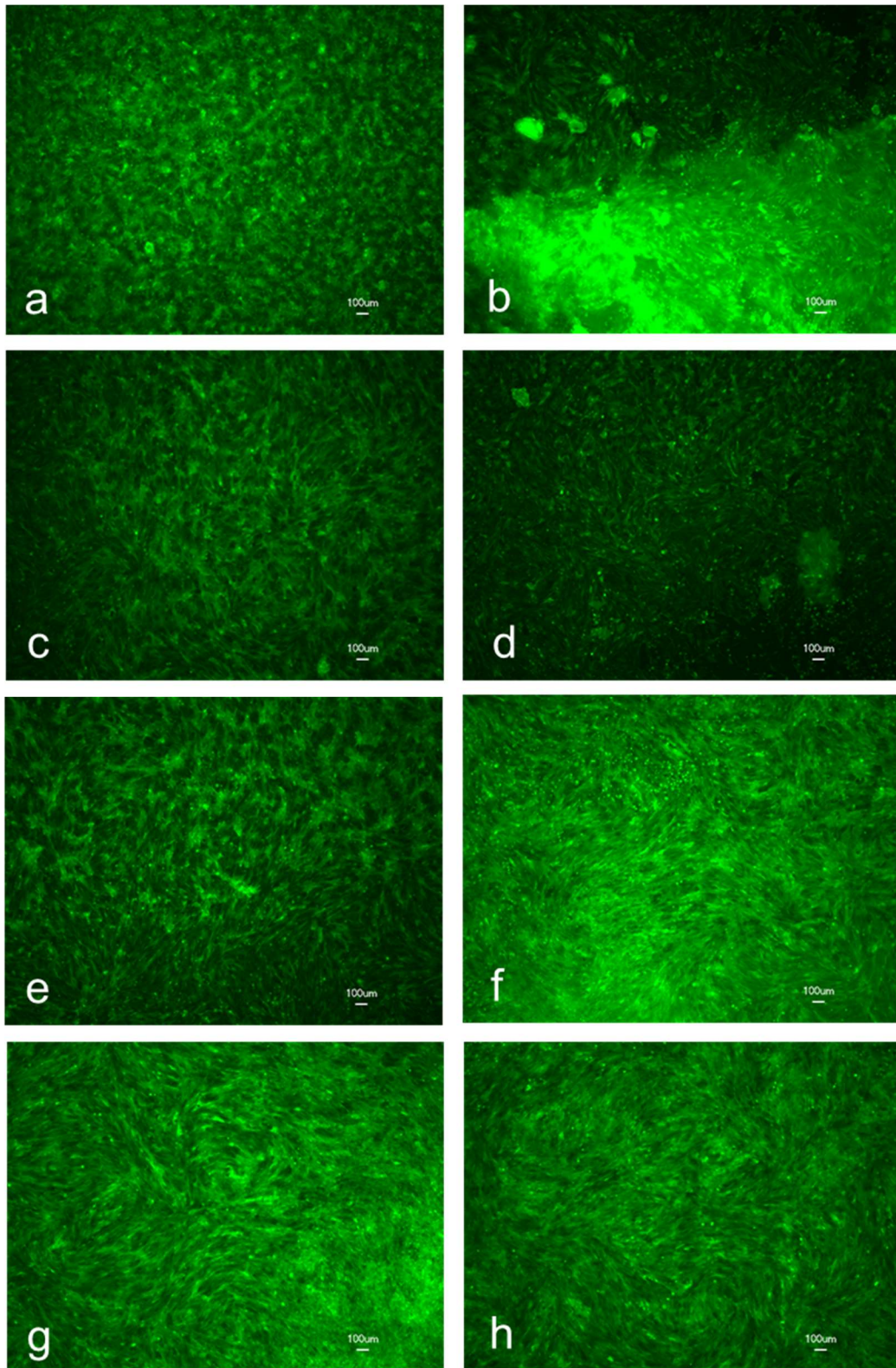


Abbildung 13: Zellwachstum von MG-63 auf BM

Zellwachstum auf a) Kol, b) Kol-Vat, c) Collacone, d) Collacone max, e) Rogg, f) Porcines Perikard, g) Porcine Dermis, h) Plastik (Kontrolle). Grün: fluoreszierende, vitale Zellen, Messbalken: 100 µm.

Abbildung 13 veranschaulicht die Vitalitätskontrolle mittels Calcein-AM der Zelllinie MG-63 auf den Materialien. Die Zellen wuchsen ausnahmslos auf allen Materialien. Auf den kollagenbasierten Präparaten Kol (a), Collacone (c), Rogg (e), Porcines Perikard (f) und Porcine Dermis (g) zeigte sich ein ähnliches Zellwachstum inklusive ähnlicher Morphologie. Die Vaterit- und HA/ β -TCP-basierten Materialien (b, d) zeigten erneut verstärkt fluoreszierende Zellakkumulationen, bedingt durch Anhaftung der Zellen an Materialpartikeln in Mikro- und Nanogröße. Die Zellen zeigten eine für ihre Art spezifische, rundliche Zellmorphologie, die jedoch auf Kol-Vat (b), verschuldet durch deren akkumulierendes Verhalten, nur undeutlich erkennbar schien.

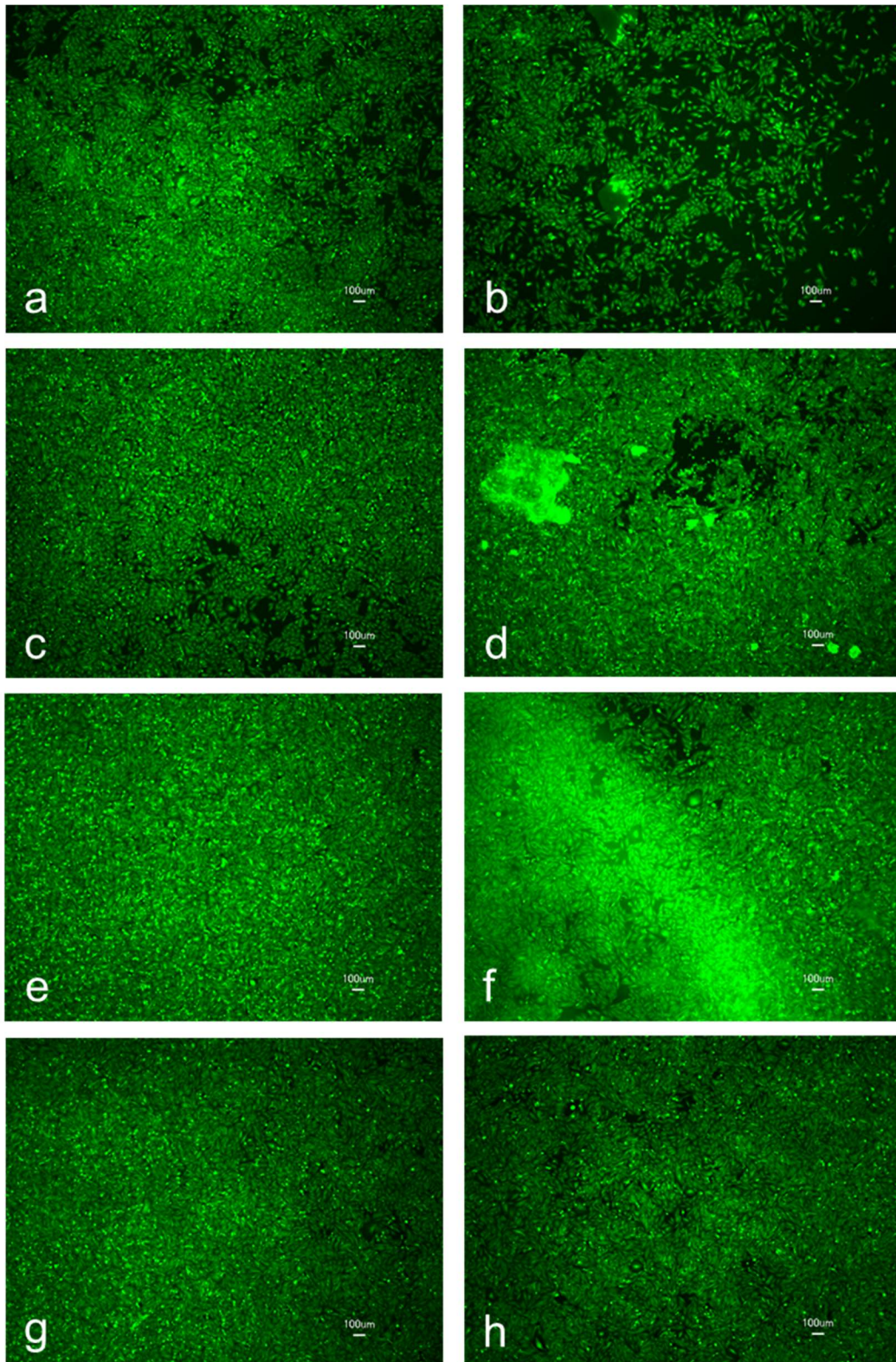


Abbildung 14: Zellwachstum von SaOs-2 auf BM

Zellwachstum auf a) Kol, b) Kol-Vat, c) Collacone, d) Collacone max, e) Rogg, f) Porcines Perikard, g) Porcine Dermis, h) Plastik (Kontrolle). Grün: fluoreszierende, vitale Zellen, Messbalken: 100 µm.

Das mit Calcein-AM veranschaulichte Zellwachstum der zweiten, ebenfalls osteoblastischen Zelllinie SaOs-2 nach Inkubation auf den verschiedenen BM zeigt Abbildung 14. Die Ergebnisse sind denen, bei MG-63-Zellen beobachteten, sehr ähnlich (Abbildung 13). Auf den vorwiegend Kollagen enthaltenden Präparaten (a, c, e, f, g) ließ sich eine homogene Zellverteilung über die gesamte Fläche beobachten. Im Porcines Perikard repräsentierenden Bild (f) ist die intensive Fluoreszenzfärbung bildmittig ebenfalls auf mit Zellen besetzte Materialränder zurückzuführen, die dazu neigten, sich in den Vertiefungen der Zellkulturkammern zusammenzurollen. Die dementsprechend hohe Anzahl übereinanderliegender Zellen resultierte in einer erhöhten Fluoreszenz an diesen Stellen. Die Kol-Vat- und HA/β-TCP-Probe (b, d) bewirkten erneut eine Zellakkumulation an einzelnen Vaterit- und HA/β-TCP-Partikeln, die wiederholt in einer stärkeren Fluoreszenzfärbung gipfelten. Da weder die Kollagenproben (a, c, e, f, g) noch die Positivkontrolle der Zellen auf Plastik (h) diese partielle Zellanhäufung imitierten, lässt sich diese Eigenschaft direkt auf den Vaterit-beziehungsweise den HA/β-TCP-Anteil der BM übertragen. Die osteoblastischen Zellen zeigten abermals die für sie typische, rundliche Zellmorphologie. Die Zellzahlen auf allen Materialien erschienen unter Beachtung übereinander gehäuft liegender Zellen vergleichbar.

Zusammenfassend lässt sich schließen, dass das Zellwachstum auf der Kollagenprobe Kol sowie dem Vaterit-enthaltenden Material den getesteten, kommerziell erhältlichen, kollagenbasierten Produkten sowie dem gleichartigen HA/β-TCP-KEM ähnlich war. Nachdem die Zellen auf der Oberfläche der verschiedenen BM anhafteten, folgte deren Teilung sowie Proliferation. Alle verwendeten Zellarten zeigten auf Kol-Vat (b) und der HA/β-TCP-Probe Collacone max (d) ein gesondertes, in Zellakkumulationen organisiertes, lokalisiertes Wachstumsverhalten. Es ließen sich vergleichbar hohe Zellzahlen zu Zellen auf bereits etablierten Produkten (c – g) sowie der Positivkontrolle (h) ausmachen. Resümierend schien die Zusammensetzung des BM und damit die verbundene Löslichkeit, Einfluss auf das Wachstum der hier getesteten Zellen zu nehmen.

6.5 Untersuchung des Zellwachstums in Kokultur

Die folgend dargestellten Ergebnisse zeigen Endothelzellen und Osteoblasten in Kokultur nach Anfärbung von GFP und PECAM-1 durch Immuncytochemie gemäß Abschnitt 5.4.4 und anschließender Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop.

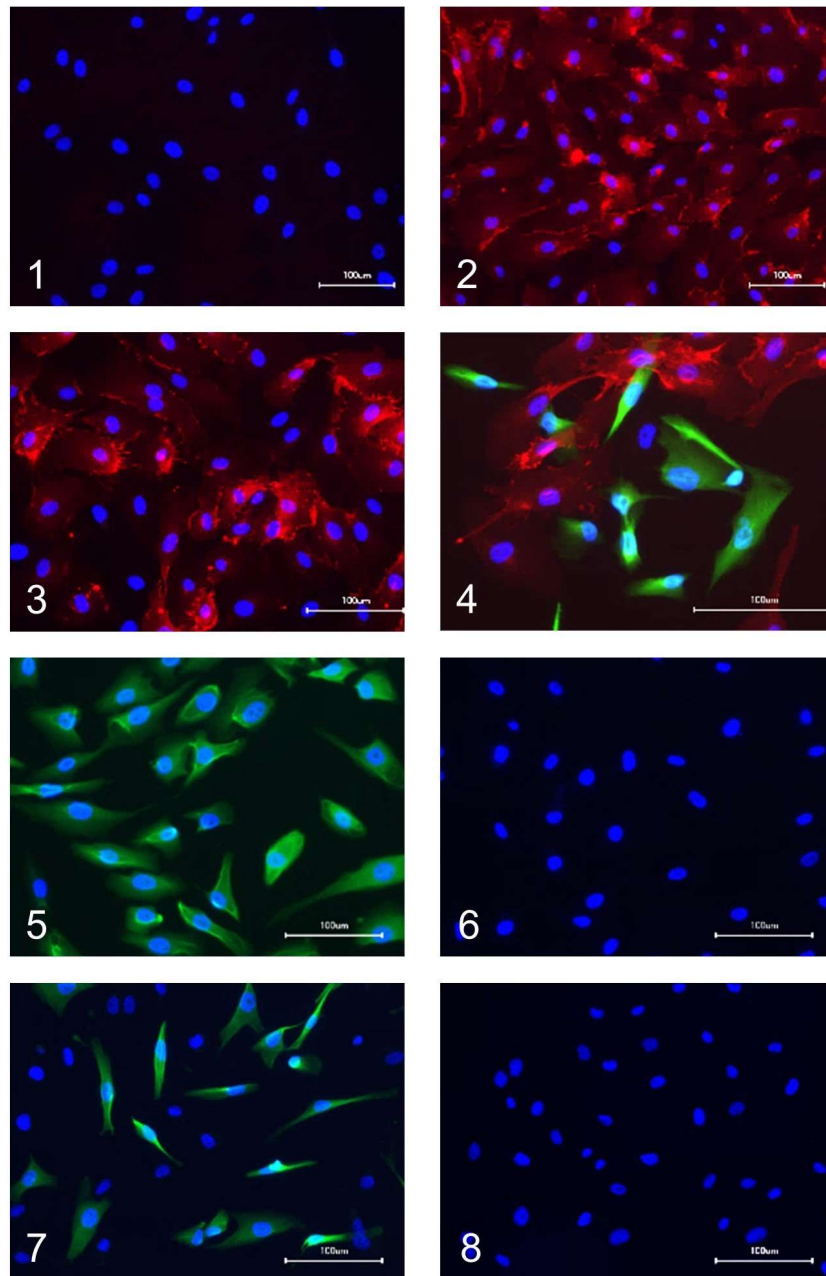


Abbildung 15: Untersuchung des Zellwachstums in Kokultur

Fluoreszenzmikroskopiefotos von 1) MG-63-GFP + a-PE, 2) HUVEC + a-PE, 3) Kokultur MG-63-GFP/HUVEC + a-PE, 4) Kokultur MG-63-GFP/HUVEC + a-PE und a-GFP, 5) MG-63-GFP + a-GFP, 6) HUVEC + a-GFP, 7) Kokultur MG-63-GFP/HUVEC + a-GFP, 8) AK-Negativkontrolle: Kokultur MG-63-GFP/HUVEC ohne AK. a-PE: Anti-PECAM-1-AK, anti-GFP: Anti-GFP-AK, blau: Zellkerne, grün: GFP auf MG-63-Zellen, rot: PECAM-1 auf HUVEC, Messbalken: 100 µm.

Die hier dargestellt angefärbte Kokultivierung primärer Endothelzellen und einer Osteosarkomzelllinie osteoblastärer Eigenschaften konnte nach fluoreszierender Anfärbung von PECAM-1 und GFP differenziert werden. Die blaue Anfärbung des Zellkerns durch DAPI diente bei allen Proben der Zelldarstellung. Zellen ohne primären AK stellten die AK-Negativkontrolle dar (8). HUVEC ließen sich aufgrund deren Ausbildung interzellulärer Kontakte, wie hier in den Kontrollen durch anti-PECAM-AK (2 + 3) rot, nicht aber durch anti-GFP-AK (6 + 7) grün anfärben. Die mit GFP versetzten MG-63-Zellen wiederum ließen sich durch AK gegen GFP (5 + 7), nicht aber gegen das endothelzellspezifische Oberflächenprotein PECAM-1 (1 + 3) anfärben. Die simultane Färbung durch AK sowohl gegen PECAM-1 als auch gegen GFP erlaubten in Kokultur die Differenzierung von Endothelzellen gegenüber osteoblastären Zellen (4) und können somit als beispielhafte Basis weiterführender Studien zur Untersuchung der Interaktion zwischen BM und kokultivierten Zellarten dienen.

6.6 Untersuchung der Genexpression

Die folgenden Ergebnisse in Abbildungen 16 bis 19 und Tabellen 12 bis 15 repräsentieren die anhand einer PCR und anschließender Gelelektrophorese analysierte Genexpression von für Knochenregeneration essenziellen Zellen. Nach Inkubation mit den zu untersuchenden BM Kol, Kol-Vat, Collacone, Collacone max, Rogg und Porcine Dermis für vier bis fünf Tage erfolgte die Isolation der RNA und die Synthese der cDNA inklusive anschließender Visualisierung entstandener Amplifikationsprodukte (PCR-Produkte) gemäß Abschnitt 5.5.

6 Ergebnisse

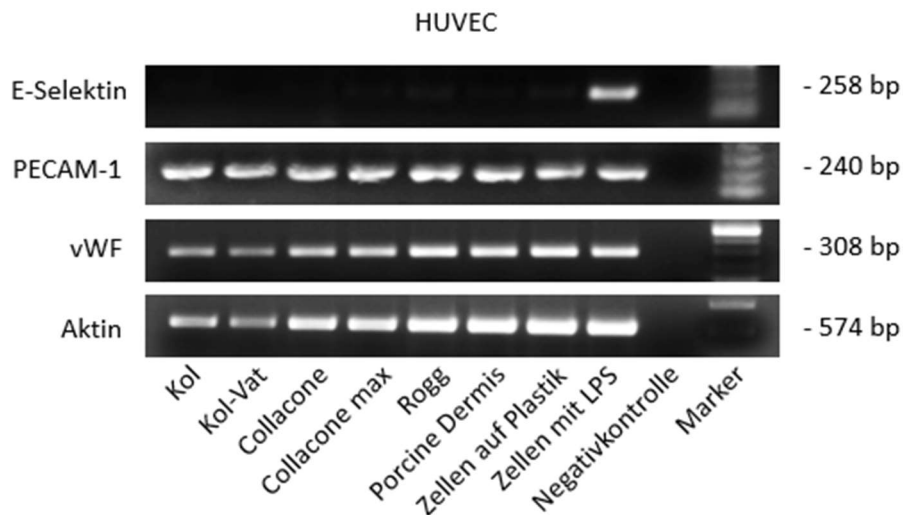


Abbildung 16: Genexpression von HUVEC auf BM

PCR-Ergebnisse der analysierten Genexpression von HUVEC, die auf verschiedenen BM wuchsen. Links die untersuchten Gene, rechts die erwartete Größe des PCR-Produkts und unten das jeweilige BM. Aktin: β -Aktin, Zellen auf Plastik: RNA von Zellen, die auf Zellkulturplatte wuchsen, Zellen mit LPS: RNA von mit LPS stimulierten Zellen, Negativkontrolle: Wasser, Marker: Referenz des PCR-Produkts.

Tabelle 12: Auswertung der PCR von HUVEC

Gen	Kol	Kol-Vat	Collacone	Collacone max	Rogg	Porcine Dermis	Zellen auf Plastik	LPS
E-Selektin	–	–	–	–	–	–	–	+
PECAM-1	+	+	+	+	+	+	+	+
vWF	+	+	+	+	+	+	+	+
β-Aktin	+	+	+	+	+	+	+	+

Anmerkung. Tabellarische Darstellung der visualisierten Genexpression. + : sichtbares Amplifikationsprodukt, – : nicht sichtbares Amplifikationsprodukt.

Die Resultate der analysierten Genexpression der HUVEC visualisiert Abbildung 16, tabellarisch verdeutlicht in Tabelle 12. Vier Gene wurden untersucht, darunter β -Aktin, vWF, PECAM-1 und E-Selektin. Wie ersichtlich wird, veranschaulichten HUVEC eine homogene Expression von β -Aktin, vWF und PECAM-1 auf allen BM. Auf keiner der Materialproben exprimierten HUVEC E-Selektin. Zuletzt genanntes wurde nur nach vorangegangener Stimulation der HUVEC mit LPS exprimiert.

Die folgenden drei Abbildungen 17, 18, 19 und die Tabellen 13, 14, und 15 zeigen die Ergebnisse der visualisierten Genexpression primärer Osteoblasten und zwei humaner osteoblastischer Zelllinien auf den verschiedenen BM.

6 Ergebnisse

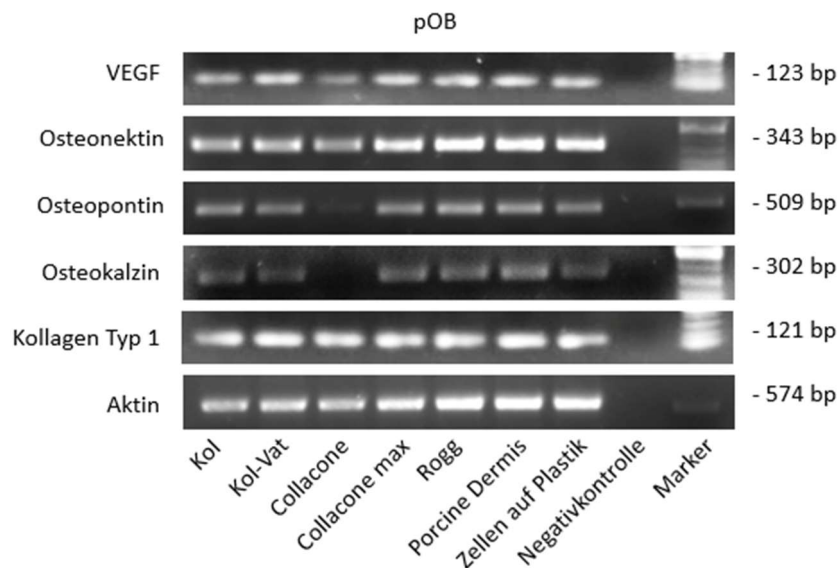


Abbildung 17: Genexpression von pOB auf BM

PCR-Ergebnisse der analysierten Genexpression von pOB, die auf verschiedenen BM wuchsen. Links die untersuchten Gene, rechts die erwartete Größe des PCR-Produkts und unten das jeweilige BM. Aktin: β -Aktin, Zellen auf Plastik: RNA von Zellen, die auf Zellkulturplatte wuchsen, Negativkontrolle: Wasser, Marker: Referenz des PCR-Produkts.

Tabelle 13: Auswertung der PCR von pOB

Gen	Kol	Kol-Vat	Collacone	Collacone max	Rogg	Porcine Dermis	Zellen auf Plastik
VEGF	+	+	+	+	+	+	+
Osteonektin	+	+	+	+	+	+	+
Osteopontin	+	+	–	+	+	+	+
Osteokalzin	+	+	–	+	+	+	+
Kollagen Typ 1	+	+	+	+	+	+	+
β-Aktin	+	+	+	+	+	+	+

Anmerkung. Tabellarische Darstellung der visualisierten Genexpression. + : sichtbares Amplifikationsprodukt, – : nicht sichtbares Amplifikationsprodukt.

Die Genexpression von diversen exprimierten, osteoblastischen Proteinen veranschaulicht Abbildung 17 für primäre Osteoblasten (pOB), tabellarisch herausgestellt in Tabelle 13. Wie deutlich wird, ist eine starke Expression von β -Aktin, Kollagen Typ 1, Osteonektin und dem Angiogenese induzierenden VEGF auf allen Materialproben zu vernehmen. Eine verschiedengradige Expression von Osteokalzin und Osteopontin war ebenso ersichtlich. Collacone max schien lediglich eine kaum bis nicht ausmachbare Expression von Osteopontin sowie Osteokalzin zu induzieren.

6 Ergebnisse

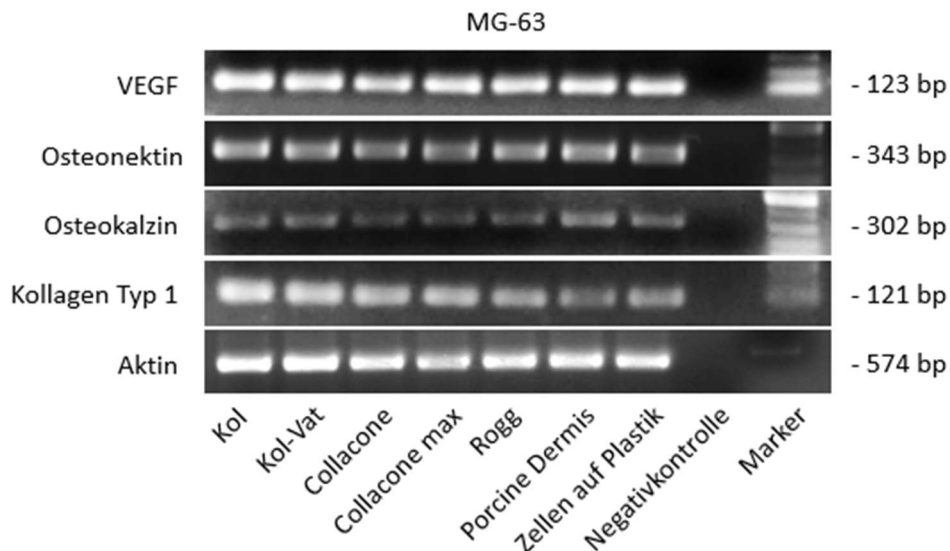


Abbildung 18: Genexpression von MG-63 auf BM

PCR-Ergebnisse der analysierten Genexpression von MG-63-Zellen, die auf verschiedenen BM wuchsen. Links die untersuchten Gene, rechts die erwartete Größe des PCR-Produkts und unten das jeweilige BM. Aktin: β -Aktin, Zellen auf Plastik: RNA von Zellen, die auf Zellkulturplatte wuchsen, Negativkontrolle: Wasser, Marker: Referenz des PCR-Produkts.

Tabelle 14: Auswertung der PCR von MG-63

Gen	Kol	Kol-Vat	Collacone	Collacone max	Rogg	Porcine Dermis	Zellen auf Plastik
VEGF	+	+	+	+	+	+	+
Osteonektin	+	+	+	+	+	+	+
Osteokalzin	+	+	+	+	+	+	+
Kollagen Typ 1	+	+	+	+	+	+	+
β-Aktin	+	+	+	+	+	+	+

Anmerkung. Tabellarische Darstellung der visualisierten Genexpression. + : sichtbares Amplifikationsprodukt, – : nicht sichtbares Amplifikationsprodukt.

Die Genexpression der osteoblastischen Zelllinie MG-63 zeigt Abbildung 18, tabellarisch vereinfacht in Tabelle 14. Ähnlich den pOB war eine homogene Expression von β -Aktin, Kollagen Typ 1 und VEGF ausmachbar. Eine vergleichbar starke Expression von Osteokalzin und Osteonektin zeigte sich ebenfalls, welche von der bei pOB ersichtlichen abwich. Auf keinem der getesteten Materialien konnte ein Amplifikationsprodukt für Osteopontin vernommen werden (Daten nicht gezeigt).

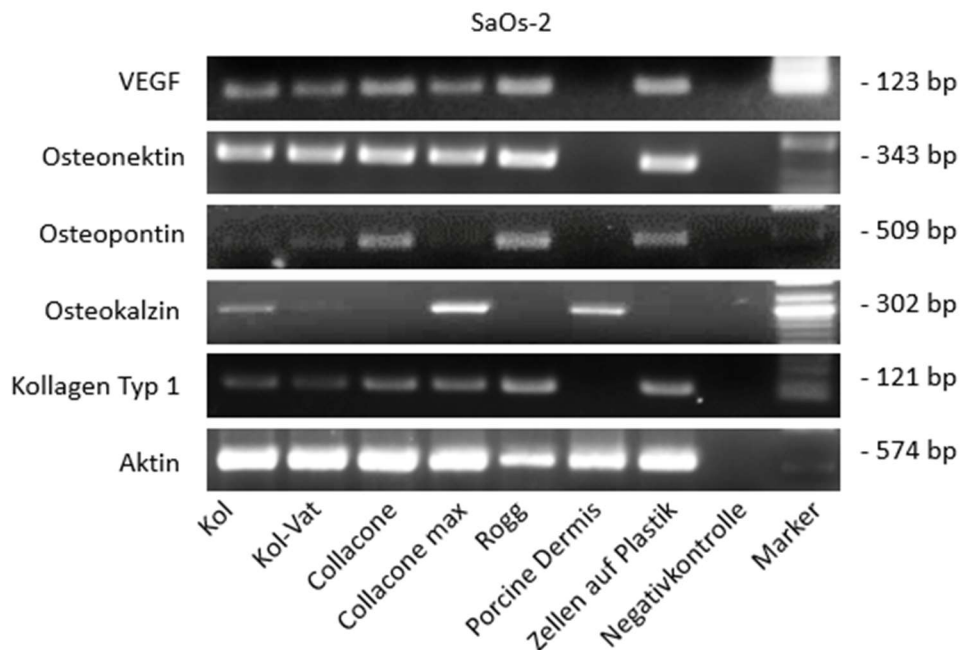


Abbildung 19: Genexpression von SaOs-2 auf BM

PCR-Ergebnisse der analysierten Genexpression von SaOs-2-Zellen, die auf verschiedenen BM wuchsen. Links die untersuchten Gene, rechts die erwartete Größe des PCR-Produkts und unten das jeweilige BM. Aktin: β -Aktin, Zellen auf Plastik: RNA von Zellen, die auf Zellkulturplatte wuchsen, Negativkontrolle: Wasser, Marker: Referenz des PCR-Produkts.

Tabelle 15: Auswertung der PCR von SaOs-2

Gen	Kol	Kol-Vat	Collacone	Collacone max	Rogg	Porcine Dermis	Zellen auf Plastik
VEGF	+	+	+	+	+	–	+
Osteonektin	+	+	+	+	+	–	+
Osteopontin	(+)	(+)	+	–	+	–	+
Osteokalzin	+	(+)	–	+	–	+	–
Kollagen Typ 1	+	+	+	+	+	–	+
β-Aktin	+	+	+	+	+	+	+

Anmerkung. Tabellarische Darstellung der visualisierten Genexpression. + : sichtbares Amplifikationsprodukt, (+) : kaum sichtbares Amplifikationsprodukt, – : nicht sichtbares Amplifikationsprodukt.

Die Ergebnisse der Genexpression von SaOs-2-Zellen auf den diversen Materialien repräsentiert Abbildung 19, tabellarisch verdeutlicht in Tabelle 15. Sowohl für Kollagen Typ 1 als auch VEGF zeigten sich ähnliche Expressionsmuster wie bei pOB und MG-63-Zellen. Dennoch konnte kein Hinweis dieser Amplifikationsprodukte bei Porciner Dermis verifiziert werden. Erstaunlicherweise ließ Porcine Dermis auch kein

Amplifikationsprodukt für Osteonektin ausmachen. Weder Osteopontin noch Osteokalzin konnten durch SaOs-2-Zellen konsistent auf den differierenden Materialien exprimiert werden. Gegenüber einer hohen Expression an Osteokalzin auf Kol, Collacone max und Porciner Dermis zeigten die anderen Materialien diese lediglich in geringem bis keinem Ausmaß, die Zellkontrolle auf Plastik mit eingenommen.

Andererseits und konträr zur Expression von Osteokalzin, war die Osteopontinexpression auf Collacone und Rogg hoch. Nur geringe bis kaum vernehmbare Expression von Osteopontin war auf Kol, Kol-Vat, Collacone max und Porciner Dermis nachweisbar.

7 Diskussion

Das Interesse an knochenersetzendem Material resultiert aus der geschilderten Problematik eines stetig wachsenden Bedarfs, hervorgerufen durch eine höhere Lebenserwartung bei gleichzeitiger Zunahme ossärer Defekte (Agarwal und García 2015). Der Ansatz des BTE mithilfe synthetisierter Materialien bietet Möglichkeiten, Limitationen immunologischen Ursprungs rein xenogener sowie allogener Materialien zu überwinden (Keating und McQueen 2001), spenderbegrenzte Verfügbarkeit und Entnahmemorbidität werden umgangen (Gitelis und Saiz 2002). Synthetisierte Produkte implizieren den Vorteil, entsprechende Anforderungen definierter chemischer oder mechanischer Eigenschaften reproduzierbar zu erfüllen. Sie bringen das Gebiet des BTE erheblich voran (BaoLin und Ma 2014). Wie unter Abschnitt 1.2 erläutert, stellt das erstrebenswerte Ziel des BTE der Ersatz von beschädigtem oder fehlendem Knochengewebe dar, das vorerst durch ein Scaffold stabilisiert werden kann.

Die anschließende Migration und Funktionalität knochenbildender Zellen setzt die für deren Nährstoffversorgung essenzielle Einsprossung von Blutgefäßen durch Endothelzellen voraus, um Regeneration von Knochen bei gleichzeitiger, bestenfalls parallel ablaufender Resorption des Scaffolds zu begünstigen (Unger et al. 2007). Endothelzellen kommt als innere Auskleidung von Gefäßstrukturen eine fundamentale Bedeutung bei der unter Abschnitt 3.3 geschilderten, aussprossenden Angiogenese und inflammatorischen Prozessen zu, die im Rahmen einer Implantation von KEM unweigerlich ausgelöst werden.

Vaterit als alloplastisches BM bietet mit seiner Fähigkeit zur Umwandlung in HCA eine Alternative zu gegenwärtig häufig zur Anwendung kommendem HA und TCP (Schröder et al. 2015). Im Bestreben, HA in dessen Charakteristika zu optimieren, kann der Carbonatzusatz des entstehenden HCA neben einer Förderung von Adhäsion und Proliferation osteoblastischer Zellen zudem eine raschere biologische Abbaubarkeit, auch Biodegradation genannt, garantieren (Pieters et al. 2010; Germaini et al. 2017). Als natürlicher Vorbote von ausfallendem HCA besitzt Vaterit die in Abschnitt 3.4.2 erwähnte Potenz eines vielversprechenden KEM.

Neben ersten Ansätzen der Verwendung von Vaterit selbst als Scaffold zugunsten von Knochenregeneration (Schröder et al. 2015; Schröder et al. 2018; Huang et al. 2020) konnte er bereits in vielerlei Studien als Zusatzkomponente hinsichtlich der Optimierung bereits bewährter KEM überzeugen (Yamada et al. 2015; Shu et al. 2017;

Ivanov et al. 2019). Auch gänzlich heterogenen Ansätzen folgend, konnten Vaterit-Mikropartikel als Zusatz bei Impaktionsknochen transplantation *in vivo* unter Einbeziehung allogenen Knochens Regeneration fördern (Green et al. 2009).

Während die Stabilisation der synthetisierten Vaterit-Partikel als Hauptkomponente des Scaffolds in den Arbeiten von Schröder et al. 2015 und 2018 durch PEG-Acetal-DMA-Hydrogel gewährleistet wurde, konnte diese bei xenogenem Vaterit auch mithilfe von Poly-L-Lactic Acid (PLLA) (Huang et al. 2020) sichergestellt werden. Die Untersuchungen des PEG-verstärkten, synthetisierten Vaterits bestätigten zunächst eine ausbleibende inflammatorische Stimulation primärer Endothelzellen und damit die Endotoxinfreiheit des Materials (Schröder et al. 2015). Überdies erlaubte jene Kombination eine erfolgreiche Zellkultivierung humaner, primärer Osteoblasten (pOB), einer osteoblastischen Zelllinie (MG-63) und primärer Endothelzellen (HUVEC) in Gegenwart der Materialproben bei erhaltener, zellarttypischer Genexpression von E-Selektin und ALP (Schröder et al. 2018). Dementsprechend war das Interesse eines ebenso biokompatiblen, andersartig stabilisierten Vaterit-Präparats geweckt. Ergänzend zu Studien von Schröder et al. (2018) bezog die vorliegende Arbeit neben primären Endothelzellen und Osteoblasten mehrere osteoblastische Zelllinien für die Evaluation genereller Toxizität des Kollagen-Vaterit-Materials mit ein. Hinsichtlich der Endotoxin-Testung nutzten die im Rahmen dieser Studie durchgeführten Versuche über primäre Endothelzellen hinaus eine endotheliale Zelllinie. Das osteogenetische Potenzial konnte neben den bei Schröder et al. (2018) analysierten Markern E-Selektin und ALP anhand weiterer Proteine näher beleuchtet werden.

Huang et al. (2020) ergründeten die Osteogenese einer osteoblastischen Osteosarkomzelllinie (SaOs-2) *in vitro* und Knochenregeneration *in vivo* bei Untersuchungen von PLLA-verstärktem und aus Muschelperlen gewonnenem Vaterit. Der xenogene Vaterit bestätigte auch dort osteokonduktive neben osteoinduktiven Eigenschaften. Da sich die Untersuchungen von Huang et al. (2020) auf Vaterit xenogenen Ursprungs beschränkten, können dort erworbene Kenntnisse nur unspezifisch auf synthetisierten Vaterit übertragen werden.

Oral et al. (2020) untersuchten alleinigen, mithilfe einer Ausfällungsreaktion von Calciumacetat und Natriumbikarbonat synthetisierten Vaterit *in vitro*. Sie kultivierten humane, primäre Osteoblasten mit Extrakten des Vaterits unterschiedlicher Konzentration. Die Proliferation der mit den Extrakten kultivierten primären Osteoblasten konnte durch Vaterit angeregt werden. Sie zeigte sich

konzentrationsabhängig, wobei eine Vaterit-Konzentration ab 1 mg/ml zur Abnahme der Zellzahl bei allen dort untersuchten Polymorphen des Calciumcarbonats führte. Entgegen den hier gewonnenen Erkenntnissen zeigten sich die Werte an vitalen Zellen in Präsenz von Vaterit bei Oral et al. (2020) denen, der auf Plastik kultivierten Zellen, unterlegen. Gleichwohl interessiert im Rahmen der zuletzt genannten Studie die Interaktion des Materials mit weiteren osteoblastischen und endothelialen Zellarten, die in Kooperation die Neubildung von Knochen erst ermöglichen. Neben einem Nachweis proliferationsfördernder Wirkung von Vaterit lag besonderes Augenmerk der vorliegenden Arbeit auf der Evaluation von Biokompatibilität des neuartigen Produkts, für das Oral et al. (2020) erste Ansätze mit humanen Osteoblasten lieferte. Auch Zellphysiologie, Morphologie und Genexpression sollten anhand der hier durchgeführten Versuchsreihe näher inspiziert werden.

Synthetisierter Vaterit als Hauptkomponente von KEM im Rahmen des BTE wurde seither nur spärlich untersucht, ebenso dessen Inkorporation in Kollagenetze. Nach vorherigen Studien bezüglich der durch Schröder et al. (2018) bestätigten *in vitro*-Biokompatibilität von in PEG-Acetal-DMA-Hydrogel eingebettetem Vaterit interessiert zugleich das Potenzial von kollagenverstärktem Vaterit als biokompatibles KEM.

Kollagen repräsentiert den elementaren Bestandteil extrazellulär gebildeter Matrix, explizit auch angesichts neu zu generierenden Knochens (Schmidt et al. 2011). Aus natürlichen Quellen gewonnen, gilt es als attraktives KEM *in vitro* und *in vivo* (Salamanca et al. 2018; Salamanca et al. 2020). Rico-Llanos et al. (2021) postulierten, dass Kollagen als BM biokompatibel und in dessen Degradation modifizierbar ist, darüber hinaus mit Wirtszellen interagiert, die Vaskularisierung anregt und keine unerwünschten inflammatorischen Reaktionen stimuliert. Da alleiniges Kollagen hinsichtlich dessen osteoinduktiver Eigenschaften nicht gänzlich überzeugen konnte, bieten sich durch Addition diverser Wachstumsfaktoren oder weiterer Substanzen attraktive Möglichkeiten, diese Limitation zu überwinden (Maia et al. 2013). Über ein induziertes Cross-Linking von Kollagenpräparaten gelingt zudem die Verbesserung von deren mechanischen Stabilität. Offenkundig gilt Kollagen als extrem vielseitig und kann anhand zahlreicher weiterer Methoden modifiziert werden, um es auf eine Vielzahl von Anwendungsbereichen im Sinne des BTE adäquat anzupassen (Rico-Llanos et al. 2021). Insbesondere im Bereich der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie konnte sich Kollagen als erfolgsversprechendes KEM etablieren. Gegenwärtig findet es in der Zahnmedizin beispielsweise bei der SP oder GBR Anwendung (Al-Nawas et

al. 2020) (siehe auch Abschnitt 3.4.1). Als sogenanntes ‚indirektes‘ KEM fungieren Kollagenmatrices, separat verwendet, als eine Art Platzhalter. Rascher proliferierendes, umliegendes Weichgewebe wird so vom ossären Defekt ferngehalten, um besiedelnden Osteoblasten und Endothelzellen genügend Zeit für allmähliche Neubildung von Knochen zu gewähren.

Ebenso vermag Kollagen, in der Intention andersartiges KEM zu ergänzen, die Steigerung von Dreidimensionalität bestehender KEM zu ermöglichen und demnach die Migration endothelialer Zellen zu fördern. Yang et al. (2016) konnten zeigen, dass der Zusatz von Kollagen zu HA/ β -TCP-Präparaten die Adhäsion und Differenzierung von Osteoblasten gegenüber alleinigem HA/ β -TCP anzuregen vermag. Nguyen et al. (2017) bestätigten eine Förderung der Vaskularisierung durch Kollagenmatrices. Weitere Studien, wie von Ho et al. (2016), bekräftigten bereits *in vivo* das Potenzial einer solchen HA/ β -TCP-Kollagenmischung, ähnlich des hier verwendeten Collacone max, für den Einsatz zugunsten einer erfolgreichen SP. Kollagen fördert die Adhäsion, Proliferation und Differenzierung verschiedenartiger Zellen und überzeugt auf dem Gebiet des BTE (Filippi et al. 2020). Zusammenfassend stellt es eine nahezu universell einsetzbare, bewährte Basis zur Herstellung von Scaffolds mithilfe von inkorporierten, synthetisierten Materialien dar. Nach diesem Grundsatz interessiert die Effektivität einer abgewandelten Version des vorig erwähnten Kollagen-HA/ β -TCP-Präparats wie Kollagen-Vaterit.

Aus gegebenem Anlass beschäftigte sich die vorliegende Arbeit mit durch Kollagenmatrices stabilisiertem, synthetisiertem Vaterit. Hierfür wurden Untersuchungen angestellt, die die Interaktion von für Knochenregeneration wichtigen Zellen wie Osteoblasten und Endothelzellen mit dem Kollagen-Vaterit-Präparat eingehend inspizieren.

Als grundlegende Voraussetzung für die Fähigkeiten eines KEM, allmählich resorbiert und durch körpereigene Substanz ersetzt werden zu können, gilt die physiologisch wünschenswerte Interaktion des Materials mit patienteneigenen Zellen eben genannter Zellarten (Unger et al. 2011). Dies impliziert die Erfüllung essenzieller Bedingungen wie die Garantie einer bestätigten Biokompatibilität des Materials und das damit verbundene Ausbleiben von inflammatorischen Reaktionen körpereigener Zellen. Hinsichtlich dieser erstrebenswerten *in vivo*-Reaktion können *in vitro*-Tests mit den für Knochenregeneration unabdingbaren Zellen wie Osteoblasten und Endothelzellen als Basis dienen (Unger et al. 2007; Czekanska et al. 2012).

Für die sukzessive *in vitro*-Evaluation von Biokompatibilität des neuartigen Kollagen-Vaterit-Präparats bedurfte es einer primär angestellten Gewährleistung von Sterilität. Weiter sollten neuartige KEM keinerlei zelltoxische Inhaltsstoffe absondern, die spätere patienteneigene Zellen negativ beeinflussen könnten. Gegenteilig ließen sich im Rahmen solcher Zytotoxizitätsstudien auch Inhaltsstoffe ermitteln, die Zellproliferation möglicherweise steigerten. An den Ausschluss genereller Toxizität erfolgte die Negativierung vorhandener Endotoxine, die hitzestabile, robuste und vom Sterilisationsprozess unbeeindruckte Pyrogene darstellen. Im weiteren Verlauf der Evaluation von Biokompatibilität *in vitro* wurde das Wachstum der Zellen in Präsenz und unmittelbar auf dem BM untersucht. Zeigten sich erneut positive Resultate, so stand zur Komplettierung der Verifizierung von Biokompatibilität *in vitro* lediglich der Nachweis einer zellphysiologischen Genexpression aus. Diesem Evaluationsprozess sukzessive folgend, analysierte die vorliegende Arbeit umfassend die Tauglichkeit von Kollagen-Vaterit als biokompatibles KEM.

Um vergleichende Aussagen in Bezug auf gegenwärtig in der Medizin verwendetes KEM treffen zu können, wurde die zu testende Kollagen-Vaterit-Mischung neben einem Kollagenkegel (Collacone), einer HA/β-TCP-Probe (Collacone max), Kollagenmembranen (Mucoderm, Porcines Perikard, Porcine Dermis) und Kollagenvlies (Rogg) untersucht. Mithilfe der Kollagenprobe Kol als separate Kollagen-Komponente der Kol-Vat-Probe konnten Änderungen des Zellverhaltens direkt auf Vaterit übertragen werden. Die restlichen, in der Medizin bereits Anwendung findenden Produkte, ermöglichten die Evaluation der Biokompatibilität und osteogenen Potenz von in Kollagennetzen eingebettetem Vaterit nach aktuellen Standards.

7.1 Immunologisches Potenzial

Der Ausschluss von Zytotoxizität neuartiger BM gilt hinsichtlich der Erlangung von Biokompatibilität als unerlässlich. Voraussetzend hierfür ist die, in Abschnitt 6.1 bestätigte, Gewährleistung absoluter Sterilität aller zu untersuchenden Materialien.

Zur Herstellung von BM, demnach auch KEM, werden biologische Proben verwendet, die eine große Menge an Mikroorganismen enthalten. Die Handhabung dieser Ingredienzen kann zu Kontamination, entsprechend Verunreinigungen, führen. Um die Sterilität der vom Hersteller erhaltenen Materialien gewährleisten zu können und sicherzustellen, dass auch der Zerkleinerungsprozess keinerlei Kontamination

eingeführt hatte, wurde ein Sterilitätstest durchgeführt. Eine längere Inkubationszeit von bis zu 96 Stunden wurde angesetzt, um auch kleinste Mengen an Mikroorganismen nachweisen zu können. Für sich wiederholende Untersuchungen wurden jeweils drei Materialproben des gleichen BM zufällig ausgewählt. Resümierend lassen die Ergebnisse des in dieser Arbeit durchgeführten Sterilitätstests vernehmen, dass alle untersuchten BM steril vorlagen und demnach für weitere Zellkulturstudien verwendet werden konnten.

Trotz bestätigter Sterilität kann dennoch eine Kontamination von BM mit zelltoxischen Inhaltsstoffen bestehen. Diese können laut Unger (2014) zu jedem Zeitpunkt der einzelnen Fertigungsschritte eingeführt werden. Beispielsweise, wenn zum Resuspendieren einer ausgefällten oder getrockneten Verbindung mit Wasser oder Puffer, Bakterien oder Endotoxin enthaltende Lösungen verwendet werden, die auch durch spätere Sterilisation nicht eliminiert werden können. Neu synthetisierte Materialien werden anschließend anhand zahlreicher verschiedener Methoden analysiert, um Informationen über Struktur, Größe, Form, Porosität und Oberflächenladung zu gewinnen. Darüber hinaus werden sie durch Zugabe von Peptiden, Proteinen, Chemotherapeutika, biologischen Wirkstoffen und anderen Substanzen weiter modifiziert, was die Gefahr der Präsenz zelltoxischer Komponenten erhöht. Der Tatsache geschuldet, dass vielen Herstellern ein Zugang zu zellbiologischen Laboratorien für die umfangreiche Evaluation eines jeden einzelnen Fertigungsschrittes fehlt, können kontaminierende Substanzen, wie zurückbleibende zelltoxische Inhaltsstoffe oder Endotoxine, jederzeit unbemerkt eingeführt werden. Anschließend werden ebendiese Quellen bei jedem folgenden Schritt der Prozessierung weitergereicht. Sie verbleiben so im System und sind schlussendlich auch im synthetisierten Endprodukt präsent (Unger 2014).

Der Ausschluss von Toxizität und damit die ermöglichte Zellproliferation aller genannten Zellen bildet die Voraussetzung erfolgreicher Knochenregeneration. Treten Stoffe aus dem zu testenden Material oder lassen sich jene bei Verwendung auswaschen, die toxisch oder stimulierend auf Zellen wirken, so lässt sich dies durch einen simplen und zeitsparenden Toxizitätstest mittels Resazurin detektieren. Die metabolische Aktivität der untersuchten Zellarten unterliegt einer Beeinflussung durch zugegebene Extrakte der einzelnen Materialien. Anhand dieser lassen sich Rückschlüsse auf Zellverhalten in Präsenz neu zu erprobender KEM ziehen. Extrakte können, gemäß ISO 10993-5 (2009), durch Inkubation der Materialien mit jeweilig

adäquatem Zellkulturmedium hergestellt werden, die eine optimale Trägersubstanz ausgewaschener, gelöster Inhaltsstoffe bieten. Anlässlich des Ausbleibens zelltoxischer Wirkungen von Resazurin ermöglicht diese Methodik eine mühelose, längerfristige Beobachtung metabolischer Veränderung der Zellaktivität (Borra et al. 2009). Bei Ausbleiben von auf toxische Inhaltsstoffe rückführbare Reaktionen nach 48 bis 72 Stunden kann die Gegenwart toxischer Komponenten verneint und entstandene Abbauprodukte auf ein nicht zellbedenkliches Niveau herabgestuft werden. Dessen ungeachtet spiegelt der Zellmetabolismus stimulierende Effekte, verursacht durch dem Material entweichende Inhaltsstoffe, im Sinne einer gesteigerten Zellproliferation wider.

Um Zytotoxizität neuartiger KEM auszuschließen, testete diese Arbeit zunächst Zellwachstum primärer Osteoblasten und Endothelzellen humanen Ursprungs neben Zelllinien einerseits osteoblastärer und andererseits fibroblastischer Eigenschaften in Gegenwart der verschiedenen Materialien. Die Einbeziehung primärer Endothelzellen fundiert auf der bedeutsamen Beobachtung, dass neben Osteoblasten, wie in den Studien von Oral et al. (2020) verwendet, auch Endothelzellen als Garant regelrechter Knochenregeneration dienen (siehe auch Abschnitt 3.3). Die in dieser Arbeit genutzte Mauszelllinie fibroblastischer Eigenschaften (L929) etablierte sich vorrangig für die Verwendung im Rahmen von Toxizitätsstudien. Sie wird von der ISO 10993-5 (2009) als mustergültige Zelllinie zur Durchführung von Zytotoxizitätstestungen angeführt.

Die Norm zur medizinischen Beurteilung von Medizinprodukten verweist gleichermaßen auf Möglichkeiten einer qualitativen sowie quantitativen Evaluation von Zytotoxizität, wobei quantitative Analysen zu bevorzugen sind (ISO 10993-5, 2009). Die mikroskopische Beurteilung der Zellen nach Exposition zu den Extrakten anhand veränderter Zellmorphologie, Adhäsion und Membranintegrität liefert Hinweise auf die Qualität von Zytotoxizität. Beeinflussungen der Zellzahl durch Zelltod und Zellproliferation erlauben Rückschlüsse auf quantitative Beurteilung präsenter Zytotoxizität. Materialien, die zu einer Verringerung der Zellzahl um über 30 % führen, gelten nach dieser Norm als zytotoxisch.

Diesbezüglich wurde mithilfe des Resazurin-Vitalitätstests (siehe auch Abschnitt 6.2), einer simplen und schnellen Methodik zu diesem Zweck, mögliche generelle Zytotoxizität der Materialien überprüft. Neben verschiedenartigen Zellen wurde das Kollagen-Vaterit-Präparat mit anderen Varianten von bereits kommerziell eingesetztem KEM sowie der separaten Kollagenkomponente Kol aus Kol-Vat

verglichen. Die Positivkontrolle (Toxizitätskontrolle) veranschaulichte resultierenden Zelluntergang aller getesteten Zellen nach Zugabe von Triton X-100 und gab ein Beispiel für Zellverhalten in Präsenz zelltoxischer Inhaltsstoffe.

In Gegenwart der einzelnen Materialien offenbarten alle verwendeten Zellen bei Betrachtung unter dem Lichtmikroskop eine für ihre Zellart typische Morphologie. Neben dem langgestreckt wirkenden Zellbild der endothelialen Zelllinien und Primärzellen, die bei zunehmender Konfluenz zu einem pflastersteinartigen Muster formierten, behielten die osteoblastischen Zellarten einen rundlich-ovalen Phänotyp bei. Die fibroblastischen Zellen repräsentierten spindelförmig erscheinende Zellkonturen. Während die Präsenz der Kollagen-Vaterit-Probe neben der von separatem Kollagen (Kol) bei allen getesteten Zelllinien höhere Proliferationswerte zur Folge hatte, verhielt sich das Wachstum der Primärzellen von Osteoblasten und Endothelzellen bei diesen zwei Proben vergleichbar. Entgegen den bei Oral et al. (2020) getroffenen Aussagen, zeigten insgesamt alle mit Kollagen-Vaterit-Extrakt versetzten Zellarten höhere Zahlen als die Zellkontrolle auf Plastik. Verglichen zu den anderen, bereits in der medizinischen Anwendung befindlichen Materialien, konnte der Zusatz von Vaterit mit entsprechend gleichwertigen Zellzahlen überzeugen. Die quantitative Zytotoxizität bestätigende, von ISO 10993-5 (2009) definierte 30 %-Marke an absterbenden Zellen wurde von keinem der getesteten Materialien bei keiner der verschiedenen Zellarten innerhalb des Messzeitraums überschritten. Damit konnte die Präsenz bedeutsamer Toxizität bei sämtlichen getesteten Materialien in den für diese Arbeit durchgeführten Versuchen qualitativ sowie quantitativ ausgeschlossen werden.

Biomaterialien können gemäß ihrer Inhaltsstoffe sowohl positive als auch negative Effekte auf die Zellproliferation bewirken. Stellt sich bei einer solchen Toxizitätstestung ein BM als toxisch heraus, so müssen mögliche Ursachen bei der Herstellung aufgedeckt werden. Eine Alternative zu Zytotoxizitätstests mit Resazurin stellt die MTT-Untersuchung anhand des wasserlöslichen Farbstoffs 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) dar. Allerdings ist die Auswertung lediglich kolorimetrisch möglich, während Resazurin-Tests sowohl mithilfe von kolorimetrischer als auch fluoreszenzbasierter Detektion analysiert werden können. Zudem müssen die Zellen vor Auslesung eines MTT-Tests lysiert werden, um das Formazansalz lösen und detektieren zu können. Die Umsetzung zu nadelförmigen Formazankristallen bedingt einen abrupten Zelltod (Präbst et al. 2017). Der Zusatz des Resazurins erfordert keine vorangegangene Zelllyse, was die Möglichkeit von näheren

Auswertungen zur Zellmorphologie der getesteten Proben ausdehnt. Eine weitere Methode auf Basis metabolischer Umsetzung von Tetrazoliumderivaten ist der MTS-Test mit 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS). Eine aufwändige Lyse der Zellen vor visueller Detektion bleibt auch hier erspart. Dennoch gilt die Messung der Zellvitalität anhand metabolischer Aktivität durch Resazurin gegenüber der Tetrazolium-basierten Methodik mit MTT oder MTS als spezifischer (Riss et al. 2016), da Formazansalze auch durch andere Komponenten des Zellkulturmediums umgesetzt werden können (Präbst et al. 2017).

Die Evaluation von Biokompatibilität impliziert neben der generellen Testung auf Toxizität die zusätzliche Untersuchung auf Endotoxine. An den Ausschluss genereller Toxizität folgte in dieser Arbeit daher die spezifische Untersuchung auf Endotoxine, eine nahezu ubiquitäre Kontaminationsquelle synthetisierter BM (Gorbet und Sefton 2005). Endotoxine, in der Literatur auch als ‚ungebetene Gäste‘ bei der Entwicklung neuartiger BM bezeichnet (Gorbet und Sefton 2005), gelten als hitzestabil und sehr robust. Sie sind Bestandteil der äußeren Membran gramnegativer Bakterien und Cyanobakterien. Bei Bakterienzerfall werden diese LPS frei und wirken toxisch, daher deren Bezeichnung als Endotoxine. Während der Herstellung neuer BM kommt es durch antibiotische Behandlung, Erhitzung des Materials oder zugesetzte Ingredienzen zum Abtöten von Bakterien und damit unweigerlich zur Freisetzung von LPS (Hurley 1995). Enthält BM bereits vor dessen Sterilisierung LPS, so sind diese auch danach noch präsent. Bereits minimale Mengen können im Empfängerorganismus leichte Symptome wie Fieber und Schüttelfrost, aber auch schwerwiegendere, systemische Entzündungsreaktionen wie eine bakterielle Sepsis hervorrufen. Nur endotoxinfreie, sterile BM stellen eine erfolgreiche Regeneration von Knochen sicher (Unger et al. 2014).

Freigesetzte Endotoxine induzieren Zellen zur Expression inflammatorischer Proteine und gelten somit als proinflammatorisch. Gleichermaßen ermöglichen Endotoxine einen Einblick in die Aufrechterhaltung physiologischer Zellfunktionen bei Erfordernis einer inflammatorischen Reaktion und dienen durch separate Zugabe in den hier durchgeführten Versuchen als Antigen-Positivkontrolle. E-Selektin stellt ein endotheliales Oberflächenglykoprotein dar, das exklusiv als Antwort auf Zytokinstimulation, zum Beispiel durch TNF, IL-1 oder LPS induziert, gebildet wird (Bevilacqua et al. 1989; Bevilacqua 1993). Es gilt als spezifischer Marker, da die endotheliale Expression durch inflammatorische Reize stimuliert wird und sowohl

quantitativ als auch qualitativ variieren kann. In Zellkulturversuchen lässt sich mithilfe dieser Erkenntnis diese Funktionalität von Endothelzellen nutzen, indem die für Zytotoxizitätstests etablierten Material-Extrakte (ISO 10993-5 (2009)) (siehe auch Abschnitt 5.3) mit Endothelzellen inkubiert werden. Weiter kann bei Ausschluss immunologischen Potenzials aller anderen Faktoren ein BM selbst als Auslöser einer inflammatorischen Reaktion identifiziert werden, wenn sich die Zellen zuvor in unstimuliertem Zustand befanden. Fluoreszierendes E-Selektin repräsentiert sich als grüne Unterlegung des endothelialen Zellkerns, in dieser Arbeit als grün befleckt bezeichnet. Zeigen Extrakte der BM grün befleckte Endothelzellen nach gemeinsamer Inkubation und anschließender immuncytochemischer Färbung unter dem Fluoreszenzmikroskop, so sind Endotoxine zu vermuten. Der im Rahmen der vorliegenden Studie untersuchte Vaterit ließe sich demzufolge bei Präsenz grün befleckter, E-Selektin exprimierender Zellen nach Exposition zu Extrakten des Kol-Vat als Endotoxin enthaltend einstufen, wenn das beigemischte Kollagenpräparat Kol selbst keinerlei Expression induzieren würde. Nach Auswertung der Ergebnisse konnte diese Möglichkeit bei dem in dieser Studie getesteten Kol sowie Kol-Vat *in vitro* ausgeschlossen werden. Die Testung auf E-Selektin bestätigte durch Abwesenheit an grün befleckten Zellen in Gegenwart aller Materialproben, dass keines der BM Endotoxin enthielt und präsentierte wünschenswerte, keine inflammatorischen Reaktionen offenbarende Resultate. Die endotheliale Zelllinie verifizierte diese Ergebnisse speziell für das Kollagen-Vaterit-Präparat. Gleichzeitig gab die Expression von E-Selektin Aufschluss über eine regelrechte Syntheseleistung der verwendeten Zellen. Gemeinsam mit den Ergebnissen der generellen Toxizitätstestung lässt sich folglich annehmen, dass weder die separate Kollagenkomponente Kol noch die Mischung Kol-Vat oder eines der anderen BM zytotoxische Effekte *in vivo* hervorrufen dürfte.

Damit erfüllt Kollagen-Vaterit in den Testungen der vorliegenden Arbeit einige der laut Unger (2014) wichtigsten Voraussetzungen von in der Humanmedizin zur Anwendung kommenden, neuartigen KEM, darunter Endotoxinfreiheit, Sterilität und das Fehlen von zelltoxischen Inhaltsstoffen.

Endothelzellen gehören zu den wesentlichen Zellen der Gewebe- und Knochenregeneration im Zuge inflammatorischer Prozesse. Sie gelten als sensibler Sensor für Endotoxine und lassen gleichermaßen Rückschlüsse über vorliegende Toxizität gegenüber weiteren patienteneigenen Zellen zu. Der genutzte Endotoxin-Test anhand

Visualisierung von exprimiertem E-Selektin stellt eine Alternative zu dem überaus kostenintensiveren Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (Schneier et al. 2020) oder einem Limulus Amebocyte Lysate Assay (LAL) dar. Das LAL, ebenfalls ein *in vitro*-Test, wurde 1970 unter Verwendung von Lysat etabliert, welches zuvor aus Amöbozyten von Pfeilschwanzkrebsen (*Limulus polyphemus*) gewonnen worden war und in Gegenwart geringer Mengen an Endotoxin koaguliert (Hurley 1995). Dieser Test wird noch heute weltweit als Standardmethode durch Nennung in länderspezifischen Arzneibüchern zur Evaluation von Medizinprodukten gemäß ISO 29701 (2010) praktiziert und von den wichtigsten Arzneimittelbehörden wie European Medicines Agency (EMA) oder Pharmaceuticals and Medical Devices Agency (PMDA) akzeptiert (Franco et al. 2018). Die Endotoxin-Testung mithilfe von E-Selektin birgt gegenüber eines LAL einige Vorteile. Zunächst stellen Endothelzellen eine unumgängliche Instanz bei der Interaktion des Empfängerorganismus mit implantiertem BM dar. Durch physiologische Gegebenheiten setzt erfolgreiche Knochenregeneration die regelrechte Kooperation mit Endothelzellen voraus (siehe auch Abschnitt 3.3), die früher oder später mit implantiertem BM in Kontakt treten (Unger et al. 2014). Die Endotoxin-Testung anhand von exprimiertem E-Selektin untersucht demzufolge explizit jene Zellen, die auch *in vivo* von Endotoxin beeinflusst würden. Ergänzend erweist sich die Endotoxin-Detektion mit Endothelzellen gegenüber eines LAL als zeitsparend und weniger kostspielig, da keine zahlreichen Pfeilschwanzkrebse gefangen werden müssen, um deren Blut zu extrahieren. Abgesehen davon führt die Gewinnung von Blut lebender Pfeilschwanzkrebse zum Tod zahlreicher Individuen jährlich, was nicht nur in der Bedrohung dieser Art, sondern auch einiger Vogelarten resultiert und keine ökologisch nachhaltige Praxis der Gegenwart darstellen kann (Maloney et al. 2018).

Wie bisherige Resultate vernehmen lassen, zeigt sich die Sensitivität der Testung auf E-Selektin mithilfe von Endothelzellen gegenüber eines ELISA sowie LAL als mindestens gleichwertig, wenn nicht gar überlegen (Unger et al. 2014). Nichtsdestotrotz kann die hier durchgeführte Testung der Endotoxine nicht als allumfassend gelten, da sich diese Arbeit auf spezifisch exprimierte Marker wie E-Selektin *in vitro* konzentrierte. Darüber hinaus wurde zwar dessen gesteigerte Expression in Monokultur, allerdings nicht dessen Funktionalität hinsichtlich der Bindung an leukozytäre Adhäsionsmoleküle geprüft. Da es sich bei HUVEC allerdings um Primärzellen handelt, ist von deren regelrechten Funktionalität und demnach einer

bestmöglichen Imitation zellphysiologischer Abläufe auszugehen. Eine schlussendliche Verifizierung liefern spätere *in vivo*-Studien.

Zusätzlich impliziert die Verwendung von Extrakten gemäß ISO 10993-5 (2009) differierende Einflussfaktoren während des Extraktionsprozesses. Diese benennend, können unterschiedlich große Grenzflächen zwischen Material und Zellkulturmedium, der pH-Wert, chemische Löslichkeit, die Diffusionsrate, Osmolarität, Bewegung, Temperatur, Inkubationszeit und weitere Faktoren die Konzentration des BM im schlussendlich entstehenden Extrakt beeinflussen. Je nach Materialkonzentration sind schwankende Ergebnisse sowohl bei den Toxizitätstests als auch den Endotoxin-Tests zu erwarten. Die ISO 10993-5 (2009) gibt daher adäquate Inkubationszeiten und -temperaturen vor, um diese Schwankungen gering zu halten. Unter Einhaltung jener Rahmenbedingungen verweist sie auf eine aussagekräftige Beurteilung von Zytotoxizität mithilfe von Materialextrakten. Die von ihr genannten Bedingungen zur Herstellung der Extrakte wurden auch in der vorliegenden Arbeit eingehalten.

7.2 Beeinflussung des Zellwachstums

Das darüber hinaus essenzielle Kriterium einer physiologischen Interaktion von für Knochenregeneration fundamentalen Zellen und KEM gilt als weiterer beeinflussender Faktor zur Erlangung von Biokompatibilität. Neu geschaffene Scaffolds sollten die Adhäsion sowie Proliferation von Zellen wie Endothelzellen und osteoblastischen Zellen begünstigen. Diesbezüglich analysierte die vorliegende Arbeit anhand des Resazurin-Tests zunächst das Zellwachstum in Gegenwart der Materialien, sowie anschließend Morphologie und Zellwachstum primärer Osteoblasten, primärer Endothelzellen und zwei osteoblastischer Zelllinien unmittelbar auf den verschiedenen BM. Während Osteoblasten befähigt sein sollten, auf KEM direkt adhären und proliferieren zu können, genügt zugunsten regelrechter Knochenregeneration das Wachstum von Endothelzellen bereits nahe dem zu untersuchenden Material. Dies fundiert auf der physiologischen Verflechtung von Osteoblasten und Endothelzellen während Knochenregeneration *in vivo*. Neben dem von Osteoblasten gebildeten, pro-angiogenetisch wirkenden Schlüsselfaktor VEGF, dient die EZM einwandernden Endothelzellen als Leitstruktur (Melincovici et al. 2018), um nahe dem Scaffold zu migrieren. Die angesiedelten Endothelzellen gelten als wesentlich für die anschließende Neubildung von Gefäßen allseits des neu implantierten Materials.

Lediglich durch folgende Angiogenese kann suffiziente Nährstoffversorgung und ein Abtransport von Abfallprodukten adäquate Voraussetzungen für Osteoblasten bei der Neubildung von Knochen schaffen (Unger et al. 2007; Weinandy et al. 2014).

Da neben dem Ausschluss immunologischen Potenzials auch stimulierende Effekte mithilfe von Resazurin-Tests ausgemacht werden können, wurde Zellwachstum in Präsenz der verschiedenen BM in Form von Extrakten analysiert. Alle Zellen offenbarten nach Fluoreszenzfärbung mithilfe von Resazurin eine positiv zu wertende Zellproliferation. In Gegenwart der Kollagen-Vaterit-Probe zeigten alle getesteten Zelllinien in den angeführten Resultaten höhere Zellzahlen als unter Einfluss von Kollagen allein. Die osteoblastischen Zelllinien MG-63 und SaOs-2 proliferierten in dem dargestellten Beispiel nach Zusatz des Kol-Vat stärker als unter Einfluss des kommerziell zur Anwendung kommenden KEM Collacone max, MG-63-Zellen übertrafen überdies die Proliferationswerte in Präsenz von Collacone. Die primären Endothelzellen und Osteoblasten offenbarten vergleichbare Werte in Gegenwart des Kollagen-Vaterit-Produkts und der anderen Materialien. Grundsätzlich repräsentierte sich eine stärkere Zellproliferation gegenüber dem Wachstum unbehandelter Zellen auf Plastik, womit sich dem kollagenstabilisierten Vaterit ebenso zellstimulierende Effekte zuschreiben lassen. Auch die untersuchten Kollagenpräparate dieser Arbeit offenbarten ein regelrechtes Wachstum osteoblastischer und endothelialer Zellen. Im Einklang mit den von Schmidt et al. (2011) getroffenen Aussagen zeigten die SaOs-2-Zellen auf kollagenbasierten BM ein ähnliches Wachstum wie das Zellwachstum auf Plastik. Die Ablichtungen fluoreszierender MG-63-Zellen auf mit Kollagen versetzten, porcinen KEM nach sieben Tagen in Arbeiten von Salamanca et al. (2020) ähneln den hier erzielten Fluoreszenzmikroskopieabbildungen der gleichen Zellart auf Kol. Die restlichen, in dieser Studie untersuchten Kollagenpräparate Collacone, Rogg, Porcines Perikard und Porcine Dermis präsentierten sogar konfluentere Monolayer als in der dortigen Arbeit. Diese Resultate gehen mit Erkenntnissen von Grabska-Zielińska et al. (2020) einher, die ebenfalls eine gesteigerte Proliferation osteoblastischer MG-63-Zellen auf den Kollagenmischungen postulierten. Im Einklang mit Untersuchungen von Gutiérrez-Prieto et al. (2019) bestätigten auch die pOB regelrechtes Zellwachstum auf kollagenbasierten Materialien, wobei deren Konfluenz auf hier untersuchten Kollagenpräparaten Kol, Collacone, Rogg, Porcines Perikard und Porcine Dermis die der dort abgebildeten pOB übertraf. Ebenso offenbarten die HUVEC eine mit anderen Studien vergleichbare Proliferation auf kollagenbasierten Materialien (Kanzawa et al. 1993).

Um Zellen hinsichtlich deren Wachstumsverhalten auf KEM untersuchen zu können, bietet sich die Vitalfärbung mit Calcein-AM. Hierbei handelt es sich um einen fluoreszierenden, intrazellulären Ionenindikator, der nach Zugabe zum Nährmedium die Zellmembran der Zellen durchdringt und nach Reaktion mit einer zellständigen Esterase unter Präsenz von Calciumionen grün fluoresziert (Neri et al. 2001). Voraussetzend hierfür ist die Vitalität der Zellen mit damit einhergehender Enzymaktivität der Esterase inklusive Integrität der Zellmembran. Calcein-AM ist schwach toxisch, bietet jedoch eine ausreichende Zeitspanne von bis zu vier Stunden, um die Zellen mittels Fluoreszenzmikroskop visualisieren zu können (Lövgren und Blomberg 1994).

Das anhand jener Methode visualisierte Wachstumsverhalten aller getesteten Zellen auf den BM zeigte insgesamt positive Resultate der Adhäsion und Proliferation auf Kollagen-Vaterit sowie auf dessen separaten Kollagen-Komponente. Alle Zellen offenbarten eine für ihre Zellart typische Morphologie auf allen untersuchten Materialien. Die Zellzahl vitaler Zellen schien zwischen den unterschiedlichen Materialien nicht zu differieren. Verglichen zu den übrigen KEM, schien der Vaterit- ebenso wie der HA/ β -TCP-Zusatz lokalisiert kumuliertes Zellwachstum auf Resten des sich auflösenden Materials zu begünstigen. Die restlichen, auf Kollagen basierten Materialien wie Rogg, Porcines Perikard und Porcine Dermis kultivierten Zellen repräsentierten ein angeregtes Wachstum, das über die BM hinaus die ganze Kammer auszufüllen schien. Die zum indirekten Vergleich dienende, separate Kollagen-Probe repräsentierte zum Zeitpunkt der Aufnahme ein anderes Zellverhalten als die des Kol-Vat, weshalb sich die Zellakkumulation fördernden Materialreste als Vaterit definieren ließen. Neben den Proben des separaten Kollagens lagen die Zellzahlen vergleichbar hoch. Unterschiede zeigten sich vor allem hinsichtlich der Löslichkeit, durch die Vaterit einer langsameren Degradierung als Kollagen allein unterlag. Dennoch lösten sich die Reste des Vaterits schneller als überbliebene Partikel der HA/ β -TCP-Probe. Unter Berücksichtigung der in Abschnitt 3.4.1 angeführten Charakteristika von HA und β -TCP enthielten die ersichtlichen Reste der HA/ β -TCP-Probe vermutlich kein Kollagen mehr, hingegen größtenteils HA. In Fluoreszenzmikroskopiebildern von Salamanca et al. (2020) wies reines HA/ β -TCP kaum Dissoziation und einen ersichtlichen, konfluenten Monolayer von MG-63-Zellen auf, der sich gleichermaßen in den hier gezeigten Bildern des Kombinationspräparates mit Kollagen (Collacone max) ausmachen ließ. Ho et al. (2016) bekräftigten eine ähnliche Steigerung der Zellproliferation von MG-63-Zellen in Gegenwart von HA/ β -TCP-Kollagen-Extrakten,

wie sie in dieser Studie bei Kol-Vat und auf Collacone max ersichtlich war. Da die dort analysierte HA/ β -TCP-Kollagen-Probe *in vivo* bessere Resultate hinsichtlich suffizienter SP sogar gegenüber bovinem Knochen erzielte, liegt dies auch für die hier untersuchten und *in vitro* ähnlich agierenden Produkte des Kollagen-Vaterits und des Collacone max nahe.

Neben den bereits in der Medizin verwendeten, kommerziellen KEM zeigte Kollagen-Vaterit eine vergleichbare Interaktion mit den Zellen. Alle Zellarten offenbarten eine regelrechte Adhäsion und Proliferation auf sämtlichen untersuchten BM. Alle verwendeten Zellen zeigten in Präsenz des Kol-Vat-Musters eine ähnliche Proliferation wie in Gegenwart von dessen separater Kollagen-Komponente, die Zelllinien offenbarten sogar höhere Proliferationsraten, was explizit Vaterit als potenzielles KEM eine proliferationsfördernde Wirkung zusprach. Eine Veränderung der Zellmorphologie ließ sich nur in Folge auftretender Konfluenz der Zellen feststellen, nicht aber als Reaktion auf verschiedene Materialbeschaffenheiten, beispielsweise Oberflächen-gestaltung und Porosität.

Die Zusammensetzung des KEM, insbesondere auch die damit verbundene Löslichkeit (Yuan et al. 2001), schien die Zelladhäsion mitsamt Proliferation zu beeinflussen. Da Vaterit in SBF zu HCA transformiert (Schröder et al. 2015), ließ sich mit dem in dieser Arbeit verwendeten Zellkulturmedium aufgrund der hohen Ähnlichkeit zu SBF eine vergleichbare Transformation vermuten. Wie bereits in Abschnitt 3.4.2 angeführt, wird HCA ein interessantes Gleichgewicht zwischen chemischer Dissoziation, osteoklastenvermittelter Resorption und Bildung neuen Knochens durch Osteoblasten zugesprochen. Gegenüber in der Medizin bereits etabliertem KEM wie HA zeigt HCA eine höhere Vitalität sowie höhere metabolische Aktivität der Osteoblasten (Germaini et al. 2017) und verspricht demnach eine positive Einflussnahme auf Knochenregeneration *in vivo*.

7.3 Untersuchung der Zellphysiologie

Um spezifische Wechselwirkungen zwischen Zellen und Material zu beleuchten, konnten exprimierte Proteine untersucht und mithilfe einer RT-PCR und anschließender Verwendung einer Gelelektrophorese nachgewiesen werden. Die physiologische Synthesefähigkeit der Zellen sollte sich somit bestätigen.

Anhand der RT-PCR und nachfolgenden Durchlaufens einer Gelelektrophorese lässt sich Genexpression einzelner Zellen auf Gesamtzellebene analysieren (Sila-Asna et al. 2007). Eine andere Methodik zur Evaluation exprimierter Gene bietet die Immunocytochemie (siehe auch Abschnitt 5.4). Für eine Vielzahl interessierender Gene stellte sich dies allerdings als kosten- und zeitintensiver als die simple Durchführung einer RT-PCR mit anschließender Visualisierung der Gene anhand einer Gelelektrophorese dar. Die RT-PCR ermöglicht die Evaluation der Synthesefähigkeit verschiedenartiger Zellen anhand diverser Genprodukte.

Einen essenziellen Bestandteil extrazellulärer Matrix bildet β -Aktin, auch als sogenanntes Haushaltsgen bezeichnet. Die Benennung als solches stützt auf der Faktizität, dass β -Aktin, unbeeindruckt äußerer Einflüsse, Zellart und Zellstadium, nicht regulativ und damit konstitutiv exprimiert wird. Haushaltsgene gelten als grundsätzlich notwendig für den Erhalt der Zellintegrität. β -Aktin lässt sich demnach sowohl bei Osteoblasten als auch bei Endothelzellen mithilfe einer RT-PCR detektieren. Neben E-Selektin spielen auch Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) und Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) eine wichtige Rolle bei Entzündungsreaktionen, da sie die endotheliale Bindung an Leukozyten initiieren, die anschließende Extravasation ermöglichen (Charreau et al. 2000). Im Gegensatz zu E-Selektin werden ICAM-1 und VCAM-1 konstitutiv und auch von anderen Zellen exprimiert. Als konstitutiv exprimierte, endothelzellspezifische Marker gelten darüber hinaus PECAM-1 und vWF. Während interzelluläres PECAM-1 als Marker endothelialer Differenzierung betrachtet wird (Canosa et al. 2017), handelt es sich bei dem vWF um ein von Endothelzellen und Megakaryozyten exprimiertes Glykoprotein (Tannenbaum et al. 1994). Einerseits kann es die Thrombozytenadhäsion initiieren, während es andererseits als Trägerprotein des Blutgerinnungsfaktors 8 fungiert, womit sich seine gewichtige Bedeutung bei der primären und sekundären Hämostase begründet. VEGF gilt als osteoblastischer Marker, der die Bildung neuer Blutgefäße durch Endothelzellen stimuliert (Melincovici et al. 2018). Als Nachweis osteoblastischer Synthesefähigkeit kann indessen Kollagen Typ 1 angefärbt werden, welches, in Abschnitt 3.2 näher erläutert, die Hauptkomponente der EZM bei der Knochenbildung darstellt und während der frühen Phase der Kallusbildung für Stabilisation sorgt. Ergänzend stellen Osteopontin, Osteonektin und Osteokalzin interessante, detektierbare Moleküle dar, die als Marker der Knochenmineralisation gelten (siehe auch Abschnitt 3.1). Osteokalzin weist darüber hinaus Osteoblastendifferenzierung nach (Yamaguchi et al. 2000).

Das sogenannte Haushaltsgen β -Aktin ließ sich bei Inkubation auf den BM bei allen untersuchten Zellarten nachweisen. Nach vorangegangener Stimulation mit LPS bestätigten die primären Endothelzellen die physiologisch durch Endotoxin induzierte Expression von E-Selektin auf allen untersuchten Materialien. Ohne Stimulation zeigten die Endothelzellen keinerlei Amplifikationsprodukt für E-Selektin, womit den BM keine inflammatorischen Reaktionen verursachenden Substanzen zugesprochen werden konnten. Der für regelrechte Hämostase fundamentale vWF konnte, neben dem interzellulären Marker PECAM-1, auf sämtlichen BM exprimiert werden. Die Endothelzellen zeigten damit das Potenzial zur Ausbildung regelrechter Zellkontakte ohne Anzeichen einer inflammatorischen Stimulation und erfüllten demnach die Voraussetzungen zur Bildung neuen, vitalen Gewebes. Hierfür manifestierten die Endothelzellen auf den Vaterit- sowie den Vergleichsmaterialien ein ähnliches Genexpressionsmuster wie auf Zellkulturplastik wachsende Zellen. Die endotheliale Genexpression wird durch die Gegenwart von Vaterit nicht beeinträchtigt.

Eine Expression von pro-angiogenetisch wirkendem VEGF bestätigte jede untersuchte osteoblastische Zellart auf nahezu allen Materialien. Eine entsprechende Förderung der Angiogenese durch körpereigene Osteoblasten *in vivo* gilt folglich zu erwarten. Die Expression von Mineralisation und damit Osteogenese ermöglichenden Proteinen wie Osteonektin und Osteokalzin konnte bei überwiegend allen osteoblastischen Zellarten auf sämtlichen untersuchten Materialien nachgewiesen werden. Während die primären Osteoblasten auf allen BM die getesteten Gene wie VEGF, Osteonektin, Kollagen Typ 1 und β -Aktin exprimierten, konnten Amplifikationsprodukte für Osteopontin und Osteokalzin auf allen BM, ausgenommen Collacone, nachgewiesen werden. Auf Collacone zeigten sich diesbezüglich nur annähernd bis kaum ausmachbare Expressionsmuster. Weshalb Collacone die primären Osteoblasten an der Expression von Genprodukten des Osteopontins sowie Osteokalzins in einer Weise zu hindern schien, die keine der beiden übrigen osteoblastischen Zelllinien imitierte, kann nicht eindeutig geklärt werden. Möglich wäre eine Behinderung der entstandenen cDNA durch Kollagenreste, die bei Isolation der RNA nicht gänzlich eliminiert wurden und in folgenden Schritten weitergereicht wurden (Wang und Stegemann 2010). Kollagen vermag über eine Verschiebung der Schmelzkurve an RNA und cDNA zu binden, womit das Signal des interkalierenden Farbstoffs vom Kollagen behindert werden kann. Insbesondere das Signal kleinerer Amplifikationsprodukte lässt sich von Kollagenkomponenten auslöschen (Opel et al. 2010).

Die bisher für Mineralisationsnachweise eher als ungeeignet beschriebene, zusätzlich verwendete osteoblastische Zelllinie MG-63 (Czekanska et al. 2012) veranschaulichte wider Erwarten eine konsistente Expression von Mineralisation bestätigenden Proteinen wie Osteokalzin und Osteonektin. Ein Nachweis von Osteopontin war auch in der hier durchgeführten Untersuchung ähnlich der Aussagen von Kumarasuriyar et al. (2009) nicht zu vernehmen.

SaOs-2-Zellen zeigten bereits in Studien von Rodan et al. (1987) problematische Genexpressionen von Mineralisation markierenden Proteinen wie Osteokalzin. Auch Mahonen et al. (1990) beschrieben eine Synthesefähigkeit von Osteokalzin durch MG-63-, nicht aber durch SaOs-2-Zellen. Die vorliegende Studie bestätigte im Einklang mit zuvor genannten Erkenntnissen eine inkonsistente Expression von Knochenreifung nachweisenden Proteinen durch SaOs-2-Zellen, insbesondere von Osteopontin und Osteokalzin. Während Osteopontin von Kol, Kol-Vat, Collacone max und Porciner Dermis auch nach zahlreichen Wiederholungen kaum bis nicht nachweisbar exprimiert wurde, konnten ebendiese mit Ausnahme des Kol-Vat (Kol, Collacone max und Porcine Dermis) eine umso stärker deutliche Expression von Osteokalzin induzieren. Konträr zeigten die Osteopontin exprimierenden SaOs-2-Zellen auf Collacone, Rogg und den unbehandelten Zellen auf Plastik kaum bis keine Expression von Osteokalzin. Auf Porciner Dermis konnte lediglich die Expression von Osteokalzin und β -Aktin visualisiert werden.

Die Zelllinie SaOs-2 vermag Zellen in einem spezifischen osteoblastischen Reifungsstadium widerzuspiegeln, wodurch deren Differenzierungsverhalten von primären, humanen Osteoblasten abweicht (Jääskeläinen et al. 1994). Neben den bereits zuvor genannten Vorbehalten gegenüber der SaOs-2-Zelllinie, lassen sich die Abweichungen anhand der nachfolgend erläuterten Limitationen von Zelllinien in Abschnitt 7.4 erklären. Darüber hinaus könnte die inadäquate Expression des Markers osteoblastischer Differenzierung Osteokalzin auf die bereits genannte phänotypische Beschränkung von SaOs-2-Zellen zurückgeführt werden, die auch Czekanska et al. (2012) und Mahonen et al. (1990) bestätigten. Die Resultate der nachgewiesenen, regelrechten Genexpressionsmuster durch den aussagekräftigen osteoblastischen Zelltyp der pOB ließen die Abweichung der Zelllinie SaOs-2 in den Hintergrund rücken. Resümierend deuteten die visualisierten Amplifikationsprodukte, insbesondere die der primären Endothelzellen und Osteoblasten, auf regelrechte Expressionsmuster auf sämtlichen untersuchten BM hin. Da die vorliegende Studie mit einer nicht

quantitativen PCR-Methodik arbeitete, ließen sich stärker und schwächer ausgeprägte Amplifikationsbanden nur unspezifisch werten und nicht auf quantitative Aussagen übertragen. Vielmehr interessierte die Entscheidung, ob die getesteten Zellarten ihre Fähigkeit zur Expression der für Knochenregeneration essenziellen Genprodukte beibehielten und nicht in welchem Ausmaß. Mit Ausklammerung der SaOs-2-Zelllinie zeigen alle untersuchten Zellen regelrechte Muster der jeweils für sie spezifischen Genexpression auf sämtlichen Materialien, eingeschlossen der neu synthetisierten Präparate von gesondertem Interesse Kol und Kol-Vat.

Wiederholt kann im Rahmen dieser Untersuchung keine definitive Aussage bezüglich der Funktionalität exprimierter Proteine getroffen werden. Hierzu benötigte es die Einbeziehung in anzusetzende *in vivo*-Studien.

Die hier erfolgte Durchführung der RT-PCR stieß auf Probleme, weshalb der Verwendung von β -Mercaptoethanol (BME) in 1-prozentiger Konzentration gesonderte Aufmerksamkeit gebührt. Ohne den Zusatz zuletzt genannter Komponente erwies sich das Befolgen des in Abschnitt 5.5 beschriebenen Arbeitsablaufs, fundierend auf bisher etablierten Versuchsprotokollen von Youssef Farhat (2012), als nicht zielführend. Um RNA zu isolieren, folgte auf die Inkubation der BM mit den verschiedenen Zellen zunächst deren Lyse. Hierfür wurde anfangs lediglich die in Abschnitt 5.5 angeführte Menge an Trizol verwendet. Trotz weiteren, genauen Befolgens der beschriebenen Methodik konnte zu Beginn keine cDNA zur anschließend hinreichenden Visualisierung exprimierter Gene gewonnen werden. Auch die Erhöhung der Zellzahl bei zahlreicher Wiederholung des Versuchs erwies sich für viele der zu untersuchenden BM als ineffektiv. Andere Ansätze des Wiederholens implizierten das Zentrifugieren des Gemischs nach Zusatz von Trizol zu den Zellen, um mögliche Inhaltsstoffe zu entfernen, die die Interaktion mit Trizol behindern könnten. Auch diese Strategie blieb erfolglos. Bemerkenswerterweise schien jene Problematik jedoch keinen Einzelfall darzustellen, vielmehr manifestierte sie sich wiederholt bei RNA-Isolationsprozessen bestimmter Materialien (Wang und Stegemann 2010; Reimann et al. 2019). Erst nach Hinzufügen von 1-prozentigem BME zu dem Trizolreagenz konnte RNA gewonnen werden, die einen suffizienten Ertrag an visualisierbarer cDNA versprach. Nichtsdestotrotz führte auch dies nicht unentwegt zum gewünschten Erfolg. Eine weitere Erhöhung der BME-Konzentration zeigte sich kontraproduktiv. Nach zahlreichen missglückten Versuchen vermochte lediglich der Zusatz des BME in einer Konzentration von 1 % größtenteils Erfolg zu versprechen.

Diese Beobachtung lässt die Freisetzung von Substanzen vermuten, die die Integrität der extrahierten RNA gefährdeten. Da der Zusatz von BME diese Gefahr zu entkräften schien, liegt der Verdacht zuvor präsent gewesener Ribonukleasen (RNasen) nahe. Diese stellen intrazellulär robuste und hochaktive Enzyme dar, die für den physiologischen Abbau von RNA *in vivo* verantwortlich sind. Während des Schritts der Lyse von zu untersuchenden Zellen kann es infolgedessen auch zur Freisetzung von RNasen kommen. Da RNasen frei gewordene RNA anschließend hydrolytisch spalten und abbauen zu vermögen, müssen sie für die Extraktion von RNA eliminiert werden. Mithilfe von BME als Reduktionsmittel gelingt die Denaturierung und Inaktivierung von RNasen durch Spaltung von deren Disulfidbrücken (Mommaerts et al. 2015). Auch Autoren wie van der Poel-van de Luytgaarde et al. (2013) oder Reimann et al. (2019) verhalfen sich mit BME zu einer Optimierung des RNA-Isolierungsprozesses, indem nicht nur der Ertrag an RNA gesteigert, sondern auch deren Aufreinigung und resultierende Qualität verbessert werden konnte.

Einen weiteren Ansatz zur Klärung der geschilderten Problematik könnte die bereits erwähnte Behinderung der RNA- oder DNA-Stränge durch Kollagen liefern. Letzteres kann während des Isolationsschrittes temperaturbedingt an DNA oder RNA binden und die Vervielfältigung über Behinderung der Polymerase oder das Farbsignal der Amplifikationsbande durch Interaktion mit dem Farbstoff beeinträchtigen (Kim et al. 2000; Opel et al. 2010). Da alle getesteten BM Kollagen enthielten, liegt auch diese Vermutung nahe.

Ebenso könnten Polysaccharide behindernde Substanzen des Isolationsprozesses darstellen. Das grundlegende Prozedere der RNA-Isolation unter Verwendung von Trizol basiert auf anfänglichem Gewebeverdau in einem Lysepuffer. Es folgt die Separation einer RNA enthaltenden, wässrigen Phase von einer organischen Phase und sodann der Ausfall von RNA. Große Polysaccharidfragmente, die durch vorangegangene Digestion nicht eliminiert wurden, können Nukleinsäuren einschließen und diese beim nachfolgenden Zentrifugieren mit in die zu verwerfende Phase überführen. Dies resultiert in einer geringen RNA-Ausbeute und überdies in nicht gänzlich aufgereinigten Strängen der übrigen RNA, was über den Zusatz von Cetyl-Trimethylammonium-Bromid jedoch verhindert werden kann (Wang und Stegemann 2010). Reste solcher Polysaccharide und Proteine könnten, ähnlich der Analysen von Wang und Stegemann (2010), auch in den hier durchgeführten Untersuchungen zur Verunreinigung isolierter RNA-Stränge geführt haben.

Ob die schlussendliche Lösung der geschilderten Problematik mithilfe von BME aus der Inaktivierung zuvor präsenter RNAsen oder der Aufreinigung von mit Polysaccharid oder Kollagen verklebten RNA/DNA-Strängen resultierte, kann nicht eindeutig bestimmt werden. Die Tatsache, dass sich lediglich die Visualisierung der Amplifikationsprodukte verbesserte, nicht aber die Menge an über das Spektralphotometer gemessener isolierter RNA und die uns verfügbaren Proben alle größtenteils Kollagen enthielten, deutete eher auf die Entfernung behinderender Kollagenreste an RNA-Strängen hin.

Zur Untersuchung der Zellphysiologie zurückkehrend, liegen Ansätze vor, dass auch die Morphologie des BM, in Bezug auf dessen Porosität, Auswirkungen auf Zellphysiologie nimmt. Gauthier et al. (1998) bekräftigten, dass die Größe an Porositäten in HA/β-TCP-Keramiken entscheidenden Einfluss auf die Osteokonduktivität knochenbildender Zellen und damit das Wachstumsverhalten *in vivo* nehme, nicht aber deren Anzahl. Inwieweit die Porosität und Konnektivität der einzelnen Materialien Einfluss auf die Zelladhäsion, und wie bei Campion et al. (2011) vermutet, auf dessen Osteoinduktivität nimmt, könnte in weiterführenden Studien der einzelnen Materialien evaluiert werden, bei denen sich Muster gleicher Zusammensetzung ausschließlich anhand von deren Porengrößen unterscheiden.

Überdies konnte in den Studien von Oral et al. (2020) ein Korrelat zwischen Partikelform verschiedener Polymorphe des Calciumcarbonats und dem Zellmetabolismus, im Sinne der Aufnahme durch die Zellen und der damit verbundenen Proliferationsrate primärer Osteoblasten, festgestellt werden. Dies fundiert auf der von Parakhonskiy et al. (2015) postulierten Annahme, dass längliche, ellipsoide Partikel eine raschere Aufnahme durch Zellen versprechen, als sphäroidische. Yashchenok et al. (2013) gelang die Synthese verschiedener morphologischen Strukturen von Vaterit, von der eine als ellipsoid, die andere als sphäroidisch beschrieben werden konnte. Während ellipsoide Partikel folglich eine schnelle Internalisierung, also Aufnahme durch die Zellen versprechen, sind sie hinsichtlich einer schnellen Biodegradierbarkeit durch Zellen wünschenswert. Die gemäß Schröder et al. (2018) synthetisierten Vaterit-Partikel, entsprechend den in der vorliegenden Arbeit untersuchten, kamen einer ellipsoiden Morphologie gleich (Schröder et al. 2018) und eignen sich daher optimal für eine schnelle Metabolisierung durch die Zellen. Dennoch ist für suffiziente Knochenregeneration zunächst eine Stabilisation des Implantationsgebiets durch KEM erwünscht, um mitunter durch

besiedelnde Zellen allmählich abgebaut und durch Knochen ersetzt werden zu können (siehe auch Abschnitt 1.2). Hierfür ist die von Schröder et al. (2015) beobachtete Formation des ellipsoiden Vaterits in SBF von Vorteil, bei der 500 – 1000 nm große Agglomerate gebildet wurden. Dies könnte einerseits ideale Voraussetzungen für eine nicht zu rasche Internalisierung durch die Zellen und andererseits eine Vergrößerung der Oberfläche schaffen, welche wiederum die Adhäsion von Osteoblasten zu fördern vermag (Schröder et al. 2018). Die Morphologie des in dieser Studie untersuchten Vaterits bot demnach die von Schröder et al. (2018) erkannten, vorteiligen Ansätze eines biokompatiblen und osteoinduktiven KEM, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit umfangreich untermauert wurden.

Die durchgeführten Versuche prüften den Einfluss unterschiedlicher Zusammensetzungen der BM, Aussagen über eine Korrelation zur Porenbeschaffenheit konnten nicht getroffen werden. Somit lassen die Resultate schließen, dass das Kollagen-Vaterit Präparat die Adhäsion und Proliferation primärer Endothelzellen, primärer Osteoblasten und Zelllinien osteoblastärer Eigenschaften begünstigt, dessen Löslichkeit diese Eigenschaften allerdings limitiert. Neben der separaten Kollagen-Probe wirkte das Zellwachstum bezüglich der Lokalisation beeinflusst, die Zellproliferation erschien positiv stimuliert, womit sich die gewonnenen Annahmen auf die Vaterit-Komponente selbst übertragen ließen. Die HA/ β -TCP-Mischung, Collacone max, zeigte ähnliche Bilder der Zellproliferation. Schlussfolgernd könnte die Kollagen-Vaterit-Probe nach ebenda genannten Beobachtungen als osteokonduktiv gelten, da sie in der vorliegenden Arbeit die Adhäsion und Proliferation der für Knochenregeneration notwendigen Zellen *in vitro* begünstigte und ihnen als Art Leitstruktur diente. Die erzielten Erkenntnisse über eine regelrechte, zellvermittelte Synthesefähigkeit der für Knochenregeneration bedeutenden Proteine liefern Rückschlüsse auf eine möglicherweise bestehende Osteoinduktivität von Vaterit.

Die gewonnenen Annahmen zur Tauglichkeit von Kollagen-Vaterit als KEM im Rahmen des TE lassen grundlegende Überlegungen zu möglichen, physiologisch ablaufenden Reaktionen *in vivo* zu. Hinsichtlich der speziell für Knochenregeneration wichtigen Zellen zeigt die Kollagen-Vaterit-Mischung eine optimale Zellinteraktion *in vitro*, die ihr die Potenz eines biokompatiblen (siehe Abschnitte 6.1 – 6.3), osteokonduktiven (siehe Abschnitt 6.4) und osteoinduktiven (siehe Abschnitt 6.6) KEM zuspricht. Bezüglich der Anwendung der hier getesteten Kollagen-Vaterit-Probe im humanmedizinischen Bereich sind weitere *in vivo*-Untersuchungen erforderlich, die

nähere Aussagen über die physiologischen Interaktionen zwischen den Zellen untereinander und dem KEM erlauben.

Die Einbeziehung in Tierstudien bietet Möglichkeiten, korrelierende Aussagen zur humanen Reaktion *in vivo* treffen zu können und stellt bis heute einen grundlegenden Teil präklinischer Evaluation materialtypischer Charakteristika dar (Unger et al. 2009). Vor klinischer Anwendung müssen der Evaluation in Zellkulturversuchen aussagekräftige *in vivo*-Studien folgen, die auf ein ‚Proof-of-Principle‘ abzielen (Kirkpatrick et al. 2007), um die Auffassung eines Prinzips fundiert beweisen zu können. Tierstudien sind jedoch oft kostspielig und mit ethischen Vorbehalten behaftet (Morelli et al. 2007). Da *in vivo*-Studien zudem nie gänzlich von *in vitro*-Studien abgelöst werden können, machen sich Bemühungen hinsichtlich der Weiterentwicklung aussagekräftiger *in vitro*-Studien bezahlt. Anhand präklinischer Evaluation kann so eine Vorauswahl vielversprechender BM getroffen werden, um die Anzahl nötiger *in vivo*-Tierstudien gering zu halten (Unger et al. 2009). Dies betont die enorme Relevanz möglichst genauer Imitationen zellphysiologischer Abläufe *in vitro*.

Zweidimensionale Modelle der Zellkultivierung in Monokultur repräsentierten lange den Standard präklinischer Auswertung verschiedener KEM *in vitro* (Czekanska et al. 2012). Da dies speziell für Knochenregeneration und damit verbundene Mineralisationsprozesse fernab physiologischer Bedingungen *in vivo* liegt, gilt fortschrittliches Interesse an bereits zu Anfang erwähnten Kokulturen (Unger et al. 2011), wie in dieser Studie beispielhaft mit primären Endothelzellen und einer osteoblastischen Zelllinie veranschaulicht. Hier vermag der visualisierte Endothelzellmarker PECAM-1 einerseits zellarttypische Charakteristika herauszustellen und andererseits eine Differenzierung zu Osteoblasten zu ermöglichen. Durch die bestätigte Vitalität der kokultivierten Osteoblasten anhand von fluoreszierendem GFP möchte diese Studie einen Ausblick auf mögliche, weiterführende *in vitro*-Studien geben. Das Gelingen jener Kokultivierung mit für Knochenregeneration so gewichtigen Zellarten liefert einen ergänzenden Ansatz für die Testung neuartiger Biomaterialien (Kirkpatrick et al. 2007). Im Rahmen solcher könnte die angiogenetische Qualität neu ausgebildeter Gefäßstrukturen durch die osteoblastisch induzierte Differenzierung von Endothelzellen näher beurteilt werden. Darüber hinaus können Kokulturen gleichermaßen erfolgversprechende Ansätze der, im folgenden Abschnitt 7.5 behandelten, Prävaskularisierung liefern. Überdies soll die Steigerung von

Dreidimensionalität mehr Nähe zu physiologischen Prozessen *in vivo* schaffen (Rouwkema et al. 2006; Ganesan et al. 2017).

Ziel dieser Studie stellte die *in vitro*-Testung von Biokompatibilität des neu synthetisierten Kollagen-Vaterit-Materials und dessen Tauglichkeit als potenzielles KEM dar. Nach Bestätigung der Sterilität des Materials folgte der Ausschluss möglicher, inflammatorische Reaktionen verursachender Inhaltsstoffe. Darüber hinaus wurde die regelrechte Vitalität, Proliferation und Morphologie von für Knochenregeneration essenziellen Zellen wie Osteoblasten und Endothelzellen in Präsenz und insbesondere auf dem neuartigen Kollagen-Vaterit-Präparat verifiziert. Die auf Kollagen-Vaterit auftretende Genexpression erwies sich als regelrecht und Knochenregeneration fördernd. Diese Kriterien *in vitro* erfüllend, überzeugte das untersuchte Kollagen-Vaterit-Präparat mit mindestens gleichwertigen Resultaten derer, bereits zur Anwendung kommender, kommerzieller KEM. Da die Probe allen anfangs gestellten Anforderungen für die Evaluation von Biokompatibilität und Eignung als KEM *in vitro* im Umfang dieser Arbeit gerecht wird, lässt sich Kollagen-Vaterit als vielversprechende Alternative bei der Therapie ossärer Defekte auffassen und rechtfertigt die Einbeziehung in weiterführende Studien *in vivo*.

7.4 Limitationen der Zellwahl

Die Beurteilung zeitintensiver Neubildung komplexen Gewebes im Rahmen des TE bedingt eine längerfristige Kultivierung *in vitro*. Primäre Zellarten spiegeln sicherlich die organismusgetreuesten Bedingungen *in vitro* wider (Unger et al. 2011).

Primärzellen repräsentieren die Attraktivität eines umfassenden Zellverhaltens in Zellkulturversuchen, das physiologische Gegebenheiten optimal reflektiert und sich daher vornehmlich für präklinische Evaluationen eignet. Dennoch dominieren diesbezüglich Grenzen, die die Durchführung solcher Untersuchungen erschweren. Einerseits gilt die Isolation primärer Zellen als kostenintensiv und kompliziert, da nur aus geeignetem, gesundem Spendergewebe auch funktionstüchtige, verwendbare Primärzellen gewonnen werden können (May et al. 2012). Andererseits existieren interindividuell auch innerhalb einer Art, wie bei verschiedenen humanen Spendern, Differenzen (Siddappa et al. 2007), die sich nicht vereinheitlichen und daher nur unpräzise extrapolieren lassen (Czekanska et al. 2012). Am Beispiel humaner, primärer Osteoblasten veranschaulicht, existieren phänotypische Unterschiede in

Zellkultur bezüglich des ossären Ursprungs und damit der skelettalen Entnahmestelle der Zellen (Montanez et al. 2002). Weiterführend können auch variierende Isolationsmethoden sowie das Alter des Spenderorganismus spätere phänotypische Eigenschaften primärer Zellen beeinflussen (Czekanska et al. 2012). So ermittelten Fedarko et al. (1992), dass Zellproliferation bei fötalen, primären Knochenzellen die höchsten Werte erzielte, während sie mit zunehmenden Alter abnahm. Dies ging mit der Bilanz der Proteinexpression einzelner Primärzellen einher. Die dort untersuchte Kollagenexpression sank nach Erreichen deren Maximums im pubertären Alter mit zunehmendem Alter signifikant herab. Hohe Osteonektin-Spiegel hingegen waren sowohl bei fötalen als auch pubertären Zellen messbar (Fedarko et al. 1992). Hinzu kommt die Korrelation interindividueller Differenzen gleichartiger Spender durch differierendes Geschlecht. Humane Primärzellen, entnommen aus Gewebe weiblicher, jüngerer Spenderinnen, exprimierten in Studien von Zhang et al. (2004) signifikant höhere Osteokalzin-Level als von postmenopausalen Patientinnen gewonnen. Männliche Spender hingegen repräsentierten kaum altersbezogenen Unterschiede der Osteokalzinexpression (Katzburg et al. 1999).

Darüber hinaus stellten Unger et al. (2011) fest, dass primäre Zellen aufgrund deren begrenzten Lebensspanne nach der fünften Passage ihre zellarttypischen Charakteristika verändern können, weshalb Primärzellen bestenfalls in der dritten oder vierten Passage Verwendung finden sollten. Gleichwohl kann, trotz Nachgehen dieser Empfehlung, keine Garantie bezüglich der Kontinuität zellarttypischer Charakteristika ausgesprochen werden. Die in dieser Arbeit verwendeten, humanen Primärzellen gelten unter Beachtung der genannten Aspekte dennoch als aussagekräftigste Zellart zur Evaluation von Biokompatibilität *in vitro* (Unger et al. 2011).

Nach Beurteilung experimenteller Studien von Schrödel (2008) bestünden bei inflammatorischen Reizen und Angiogenesefunktionen keinerlei Unterschiede bezüglich der Reaktivität von mikro- und makrovaskulären, primären Endothelzellen. Diese Arbeit verwendete ausschließlich HUVEC, repräsentativ für makrovaskuläre, primäre Endothelzellen. Weiterführend könnte zusätzlich die Interaktion mit mikrovaskulären, primären Endothelzellen untersucht werden.

Auch die Verwendung von Zelllinien gilt als eingeschränkt beurteilbar. Sie lassen Risiken bezüglich einer möglichen Entartung der Zellen, ebenda speziell aufgrund deren tumorösen Charakters, erneut nicht ausschließen. Zudem vermögen Zelllinien, immortalisiert oder wie in dieser Arbeit verwendet, tumorösen Ursprungs, nicht die

gesamte Bandbreite phänotypischer, zellartspezifischer Charakteristika widerzuspiegeln, liegen sie in einem bestimmten Zellstadium arretiert vor. Die hier genutzten Zellen tumorösen Ursprungs (siehe Abschnitt 4.8) bieten jedoch auch einige Vorteile. Zum einen sind sie in unbegrenzter Anzahl verfügbar, stellen keine ethischen Hürden dar, lassen sich zeitsparend gewinnen und gelten zum anderen als zuverlässig reproduzierbar. Anhand von osteoblastischen Zelllinien osteosarkomatösen Ursprungs bestätigten Czekanska et al. (2012) die Widerstandsfähigkeit und hohe Proliferationsrate jener verwendeten Zellen.

Die genutzten Zelllinien ISO-HAS.c1, MG-63 und SaOs-2 konnten dementsprechend in bisherigen Studien mit zellarttypischen Charakteristika überzeugen, die denen der primären Endothelzellen HUVEC und primären Osteoblasten pOB sehr ähnelten, darunter zeigten sie eine nahezu identische Morphologie und Synthesefähigkeit. Beispielhaft zeigten Saldaña et al. (2011), dass SaOs-2-Zellen eine, den primären Osteoblasten anfangs sehr ähnliche, zu späteren Zeitpunkten der Zellkultur jedoch vielfach höhere und physiologischen Gegebenheiten abweichende Menge an ALP exprimierten. Darüber hinaus offenbarten SaOs-2-Zellen einen eingeschränkten Phänotyp, der je nach Imitation eines speziellen Reifungsstadiums auch unterschiedliche Differenzierungsmerkmale repräsentierte (Jääskeläinen et al. 1994; Czekanska et al. 2012), was im Hinblick auf die untersuchte Genexpression dieser Studie bestätigt werden kann. Dennoch weisen SaOs-2-Zellen eine den Primärzellen ähnliche Expression von Wachstumsfaktoren und Zytokinen auf (Bilbe et al. 1996). Unter Vorbehalt diverser Aspekte, gelten sie demnach als überzeugende Alternative zu primären Osteoblasten bei fundamentalen Untersuchungen von BM *in vitro* (Czekanska et al. 2012).

MG-63-Zellen, die in einem präosteoblastischen Stadium des Zellzyklus arretiert vorliegen, zeigen eine Inkonsequenz bei der Expression von Matrixproteinen und gelten daher als beschränkt einsetzbar für die Evaluation von Matrixmineralisierung *in vitro*. Darüber hinaus stellen sie einen unreifen osteoblastischen Zelltyp dar, der weiterer Entwicklung bei längerfristigen Zellkulturversuchen ausgesetzt ist (Czekanska et al. 2012). Dessen ungeachtet, zeigen MG-63-Zellen, ursprünglich von Billiau et al. (1977) zur *in vitro*-Produktion von Interferonen (Zytokinen) genutzt, herausragende Qualitäten veränderter phänotypischer Eigenschaften und gelten besonders für die Verwendung im Rahmen hormoneller Zellkulturstudien als attraktive Wahl (Czekanska

et al. 2012). Auch in allen hier durchgeführten Versuchen konnten MG-63-Zellen mit positiven Eigenschaften überzeugen, die primären Osteoblasten sehr ähnelten.

Finden ausgewählte Zelllinien Einsatz in Studien, die physiologischen Knochenmetabolismus untersuchen sollen, so würden Krankheiten des Spenders, wie Osteoporose, solche Studien möglicherweise signifikant verfälschen. Am Beispiel der analysierten osteoblastischen Zelllinien wird deutlich, dass bei der Verwendung von Zelllinien sowie Primärzellen grundsätzlich besondere Aufmerksamkeit auf Alter, Geschlecht und Gesundheitszustand des Spenderorganismus gelegt werden muss.

Bei Zelllinien tierischen Ursprungs werden die bisher genannten Aspekte zusätzlich von interartlich bestehenden Differenzen ergänzt, die nur kritisch auf die humane Spezies extrapoliert werden dürfen (Czekanska et al. 2012). In Anbetracht dessen beruft sich die vorliegende Arbeit bei Einbeziehung der fibroblastischen Mauszelllinie L929 auf deren durch ISO 10993-5 (2009) befürwortete Eignung für Toxizitätstests.

Die Anzahl der kultivierten Zellen, ebenso wie das hierfür verwendete Zellkulturmedium, lassen *in vitro*-Studien an ihre Grenzen stoßen. Physiologische Gegebenheiten erscheinen weitaus komplexer als ein zuvor prozessiertes Zellkulturmedium bestimmter Ingredienzen einer konstanter Konzentration. Die angeführten Resultate bieten die Grundlage für zu erwartende *in vivo*-Interaktionen der neuartig zusammengestellten Kollagen-Vaterit-Probe mit körpereigenen Zellen. Gemäß des ‚Proof-of-Principle‘ steht die Einbindung in folgende *in vivo*-Studien aus.

7.5 Ausblick

Das Verständnis von BTE und der dafür notwendigen zellphysiologischen Regenerationsabläufe *in vivo* eröffnet neue Möglichkeiten zur Optimierung synthetisierter KEM. Einen Ansatz hierfür liefert der Begriff der Biofunktionalisierung. Er beschreibt die Ergänzung eines Scaffolds, beispielsweise des Kollagen-Vaterit-Präparats, durch osteoinduktiv wirkende Substanzen, die Regeneration von zu ersetzendem Gewebe anregen sollen. Demnach können bereits diverse Beschichtungen, darunter Fibronectin oder Gelatine, die Adhäsion und Proliferation von primären Endothelzellen ermöglichen beziehungsweise signifikant steigern (Unger et al. 2005). Auch den Scaffolds zugesetzte Wachstumsfaktoren oder Zellen können zur Biofunktionalisierung beitragen (Yang et al. 2017). Bei den in der Zahnmedizin zur Anwendung kommenden KEM gilt unter anderem die Gruppe der BMP als bewährter

Ansatz, BM durch Zusatz von Wachstumsfaktoren osteoinduktive Fähigkeiten zu verleihen. Ebendiese sollen nach Transplantation die Differenzierung knochenbildender Zellen im Empfängerorganismus induzieren und damit die Knochenheilung fördern (He et al. 2019).

Aufgrund der hohen Löslichkeit und Instabilität von Vaterit in Lösung bieten sich attraktive Möglichkeiten, Vaterit als Trägermaterial osteoinduktiv wirkender Substanzen zu nutzen. Yamada et al. (2015) bekräftigten das osteoinduktive Potenzial freiwerdender Magnesium-, Calcium-, und Silikationen. In deren Studie testeten sie daher Vaterit als Trägersubstanz dieser osteogenetisch wirkenden Ionen anhand einer osteoblastischen Mauszelllinie, was zur Steigerung von deren Proliferation sowie Differenzierung führte.

Neben osteoinduktiv wirkenden Ionen und Proteinen wie Wachstumsfaktoren können auch in der Tumorthherapie Anwendung findende Medikamente wie Doxorubicin (Peng et al. 2010) oder Photosensibilisatoren (Svenskaya et al. 2013) in Vaterit inkorporiert werden. Auch pro-angiogenetische Faktoren erlauben die Einbettung in Scaffolds, um die so wichtige Vaskularisierung des implantierten Gerüsts möglichst rasch gewährleisten zu können. Insbesondere VEGF und bFGF gewannen diesbezüglich an Ansehen, wobei VEGF die Formation neuer Blutgefäße initiiert, während bFGF nach längerer Exposition die Reifung der neuen Gefäßstrukturen in Gang setzt (Briganti et al. 2010). Wilcke et al. (2007) betonten darüber hinaus die gesteigerte Effektivität im Sinne des angiogenetischen Potenzials bei Verwendung einer Kombination aus VEGF und bFGF.

Um den Abschnitt der Biofunktionalisierung durch präklinische Benetzung der Scaffolds mit Zellen zu komplettieren, wird dieser in besonderer Hinsicht auf in der Oralchirurgie praktizierte Methoden näher erläutert. In der dentalen Implantologie vermochte sich in den letzten Jahren für die Verwendung spendereigener Zellen im Rahmen knochenersetzender Prozesse vornehmlich Platelet Rich Fibrin (PRF) zu etablieren. Hierbei handelt es sich um eine serum-, leukozyten- und thrombozytenbeladene Fibrinmatrix autologen Ursprungs, die natürlicherweise integrierte Wachstumsfaktoren enthält. Nach Dohan Ehrenfest et al. (2009) vermag PRF bewährte und im Sinne der Knochenregeneration vorteilhafte Wachstumsfaktoren wie VEGF, PDGF und TGF über einen längeren Zeitraum von bis zu zehn Tagen (Blatt et al. 2020) freizusetzen. Dies eröffnet Möglichkeiten zur Förderung der anschließenden Regeneration von Hart- und Weichgewebe in klinischer Anwendung, und vermag das

angiogenetische Potenzial alloplastischer KEM signifikant zu steigern (Blatt et al. 2021). Die Herstellung erfolgt unkompliziert *chairside*, also in der gleichen Sitzung des vorzunehmenden Eingriffs, mithilfe zentrifugierten Vollblutes. Zur Prozessierung benötigt es weder Antikoagulantien noch sonstige Zusätze, die alleinige Zentrifugation peripheren, venösen Patientenblutes reicht aus. Die nachfolgend in den zentrifugierten Röhrchen separierten Phasen repräsentieren eine untere, rot gefärbte, erythrozytenreiche Komponente und eine obere, daran angrenzende, hellere Phase der Leukozyten und Thrombozyten enthaltenden PRF-Matrix. Mit abnehmender Zentrifugalkraft können höhere Konzentrationen im oberen, PRF darstellenden Anteil der zentrifugierten Röhrchen prozessiert werden. Die Viskosität lässt sich mithilfe unterschiedlicher Materialbeschaffenheiten der Röhrchen beeinflussen. Während Glasröhrchen eine rasche Koagulation der separaten Phasen und damit solide Matrices bedingen, kann mit kunststoffbasierten Röhrchen eine verlangsamte Koagulation erzielt und damit flüssigere PRF-Matrices gewonnen werden (Al-Maawi und Ghanaati 2019). Für den Einsatz von PRF in Kombination mit KEM eignet sich vornehmlich die zuletzt genannte Variante (Al-Maawi et al. 2019). Nach vorsichtiger Entnahme der oberen, PRF enthaltenden, flüssigen Phase mit einer Kanüle kann die gewonnene PRF-Matrix über KEM geträufelt werden, um die Materialien mit patienteneigenen Blutzellen zu benetzen (Al-Maawi et al. 2019). Die Implantation des knochenersetzenden Materials erfolgt sodann im Anschluss. Auch bei dem synthetisierten Kollagen-Vaterit-Produkt bietet sich eine solche Benetzung mithilfe von patienteneigenen Zellen durch PRF als simple Optimierungsmethodik an, dessen Biokompatibilität aufgrund des autologen Ursprungs keiner weiteren Evaluation bedarf.

Während Zhang et al. (2012) hinsichtlich neu generierten Knochens im Rahmen einer Sinusbodenaugmentation zwischen alleinig transplantiertem, xenogenem Material und der Kombination mit PRF keinen signifikanten Unterschied *in vivo* postulierten, verzeichneten weitere Autoren wie Yoon et al. (2014) im Einklang damit dennoch eine Steigerung der Vaskularisierung. Auch Blatt et al. (2020) bestätigten ein signifikant erhöhtes angiogenetisches Potenzial *in vitro* und *in vivo* bei Zusatz von PRF zu xenogenem KEM gegenüber alleinig transplantiertem Material. Letztere Studie zeigte dies insbesondere in den ersten Stunden nach Implantation, in denen eine gesicherte Vaskularisierung über die regelrechte Integration von KEM entscheiden kann (Liu et al. 2018). Wenn auch die osteogene Qualität der Verwendung von PRF zur

Behandlung ossärer Defekte weiterhin umstritten bleibt, so überzeugt die Potenz einer gesteigerten Vaskularisierung.

Neben bisher genannten Varianten zur Optimierung knochenersetzender BM existiert der Ansatz einer Kombination pro-angiogenetischer Matrices mit biokompatiblen Scaffolds. Die allgemein gewichtige Rolle der Endothelzellen hinsichtlich Nährstoff- und Sauerstoffversorgung bei Knochenregeneration wird durch die Annahme ergänzt, dass insbesondere in den ersten Tagen nach Implantation eine rasche Vaskularisierung über die vollständige Versorgung großflächigerer Scaffolds entscheidet (Unger et al. 2010). Ohne jene Versorgung bleibt das Gerüst allein von Diffusion abhängig (Liu et al. 2018), die langfristig keinen hinreichenden Austausch von Nährstoffen und Abfallprodukten für den Erhalt und die Integrität des Scaffolds bieten kann. Die präklinische Generierung von Gefäßstrukturen ermöglicht bei späterer Implantation eine rapide und suffiziente Inoskulation. Letzteres umschreibt die Ausbildung einer Verbindung zwischen den neuen, zuvor generierten Gefäßstrukturen und dem angiogenetischen Netzwerk des Empfängerorganismus (Laschke et al. 2008).

Unger et al. (2007) gelang die wohl erste Langzeitstudie einer Prävaskularisierung alloplastischer Materialien wie HA mithilfe der ebenso in dieser Arbeit praktizierten Methodik der Kokultivierung *in vitro*. Durch die Kombination primärer, mikrovaskulärer Endothelzellen (HDMEC) mit Zellen einer osteoblastischen Zelllinie (MG-63) oder pOB, konnte die selbstorganisierte Formation mikropillärer, gewebeähnlicher Strukturen auf den BM beobachtet werden, ohne, dass weitere Modifikationen durch pro-angiogenetische Faktoren vonnöten waren. Diese beiden Zellarten schienen in Interaktion optimale Bedingungen zur Prävaskularisierung von KEM *in vitro* liefern zu können (Unger et al. 2007). Wenige Jahre später ließ sich die Effektivität dieser Methodik der Kokultivierung in Tierversuchen *in vivo* demonstrieren. Neben der Integration und Funktionalisierung des implantierten, angiogenetischen Netzwerks konnte das Scaffold überdies durch die stimulierte Vaskularisierung des Empfängerorganismus in das BM hinein überzeugen (Unger et al. 2010). Jene Studie repräsentierte die wohl erste, in der ein derart zuvor generiertes, prävaskularisiertes KEM ohne den Zusatz weiterer pro-angiogenetischer Substanzen *in vivo* Erfolg zeigte und damit dessen Prinzip verifizierte.

Diese Ansätze waren später etablierten Modellen der Prävaskularisierung *in vitro* womöglich ein Meilenstein. Auch Liu et al. (2018) berichteten über eine erfolgreiche

Prävaskularisierung sowohl xenogener als auch synthetisierter Scaffolds. Nach dreiwöchiger Kultivierung glatter, humaner Muskelzellen (HSMC) auf den getesteten, dreidimensionalen Scaffolds *in vitro*, folgte die Aussaat von HUVEC. Nach weiteren sechs Tagen der Kokultivierung wurde Fibrin zur Stabilisierung der gebildeten Gefäßstrukturen zu den Materialien gegeben, um gefestigte, prävaskularisierte und implantierbare BM zu erschaffen. Die HSMC, alternativ zu in anderen Studien verwendeten MSZ oder osteoblastären Zellen erwiesen sich dort als essenziell für die Stimulation der Endothelzellen und dementsprechender Ausbildung von Gefäßstrukturen *in vitro*. Dies geht mit der bereits hervorgehobenen Bedeutung von kokultivierten Zellarten bei Zellkulturversuchen einher (Unger et al. 2011). Eine weitere Methodik der Prävaskularisierung lieferten Mishra et al. (2016), bei der synthetisierte Scaffolds aus Polypropylenfumarat und Fibrinkomposit nach Kokultivierung humaner MSZ und HUVEC in Form von Sphäroiden in immundefiziente Mäuse implantiert wurden. Anschließend ließ sich dort die ermöglichte Inoskulation und damit die erfolgreiche Vaskularisierung *in vivo* beobachten. Als sphäroidal versteht sich die Gruppierung einzelner Zellen in Form von Zellhaufen, die durch den Zusammenschluss eine für ihre Zellart typische Mikroumgebung schaffen und damit einen adäquaten Sauerstoff- und Nährstoffmetabolismus aufrechterhalten. Auch Steffens et al. (2009) zeigten die erfolgreiche Vaskularisierung von implantierten, zuvor mit sphäroidal kokultivierten HUVEC und pOB benetzten Kollagengerüsten in Empfänger-gewebe von immundefizienten Mäusen. Die Kokultivierung in sphäroidaler Struktur, wie auch in den beiden zuletzt genannten Studien realisiert, präsentierte sich in angiogenetischer Hinsicht laut Fennema et al. (2013) den als Monolayer ausgestreuten Zellen überlegen, womöglich durch veränderte interzelluläre sowie Zell-EZM-Interaktionen.

Die MG-63-Zellen und die pOB in den Studien von Unger et al. (2007; 2010) sowie die HSMC und MSZ in den weiteren, eben angeführten Arbeiten, sezernierten bei den dortigen Varianten der Prävaskularisierung *in vitro* pro-angiogenetische Mediatoren für die Endothelzellen und boten ihnen gleichzeitig ein Gerüst für deren Aussprossung.

Die gewonnenen Erfahrungen zur Prävaskularisierung synthetisierter Scaffolds stellen die Notwendigkeit zugesetzter Wachstumsfaktoren in Frage. Stattdessen verweisen sie auf das Potenzial zu gewebeähnlicher Selbstorganisation von Gefäßstrukturen durch Zellen, wie in etablierten Modellen der Kokultivierung von primären Endothelzellen neben osteoblastischen Zellen bestätigt (Unger et al. 2007; Unger et

al. 2010) und im Rahmen der vorliegenden Arbeit in Abschnitt 6.5 beispielhaft veranschaulicht.

Mithilfe diverser Methoden lässt sich die Löslichkeit von Vaterit und damit die kontrollierte Abgabe von darin eingebetteten Stoffen weiter modifizieren. Beschichtungen, wie zum Beispiel eine sogenannte Layer-by-Layer- (LbL), also mehrschichtige und schichtweise aufgetragene Beschichtung aus Polyallylamin-Hydrochlorid und Polynatriumstyrolsulfonat, können die Transformation im Sinne einer Dissoziation von Vaterit verlangsamen. Sergeeva et al. (2015) wiesen nach, dass die Löslichkeit von Vaterit-Kristallen bei physiologischem pH-Wert mit Zunahme der Dicke einer solchen Beschichtung abnahm und damit Möglichkeiten der prolongierten Freisetzung von in Vaterit inkorporierten Stoffen eröffnet. Vaterit könnte so eine längerfristige Freisetzung zugesetzter Wachstumsfaktoren wie VEGF oder bFGF garantieren oder eine mögliche Prävasikularisierung erlauben, bei der zugesetzte, pro-angiogenetische Mediatoren überflüssig würden. In Vaterit integrierte Fe_3O_4 -Nanopartikel demgegenüber reduzieren unter Abnahme des pH-Wertes die Ordnung des Kristallgitters und vermögen nach Sergeeva et al. (2015) die Auflösung des Vaterits zu beschleunigen. Inwieweit die getestete Vaterit-Probe weiterer Optimierungsmaßnahmen bedarf, bleibt nach anschließenden *in vivo*-Versuchen herauszustellen.

Ergänzend ist die in dieser Arbeit bestätigte Attraktivität von Kollagen als Basis prozessierter Scaffolds im Sinne des BTE hervorzuheben. Die verschiedenen Kollagenpräparate porcinen Ursprungs präsentierten in den hier durchgeführten Untersuchungen ein biokompatibles, Zelladhäsion und -proliferation begünstigendes Gerüst. Sie ermutigen zur Inkorporation weiterer synthetisierter, Knochenregeneration fördernder Stoffe, um das Gebiet des BTE zu erweitern.

8 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit stellte die Evaluation von Biokompatibilität und Tauglichkeit des neu synthetisierten Kollagen-Vaterit-Präparats *in vitro* dar, um dessen Potenz als für die medizinische Anwendung geeignetes Knochenersatzmaterial im Hinblick auf aktuelle Standards zu ergründen. Die Wahl der genutzten Zellarten beruft sich auf zu beobachtende, natürliche Vorgänge während der Knochenregeneration *in vivo*, für die maßgeblich Osteoblasten und Endothelzellen als herausragend relevant gelten. Humane Zellarten stellten demnach einerseits primäre Endothelzellen (HUVEC) und eine endotheliale Zelllinie (ISO-HAS.c1) sowie andererseits primäre Osteoblasten (pOB) und zwei osteoblastische Zelllinien (SaOs-2, MG-63) dar. Eine fibroblastische Mauszelllinie (L929) diente der isolierten Verwendung im Rahmen der Toxizitätstests. Um aktuellen Standards gerecht zu werden, untersuchte diese Arbeit die zu testende Kollagen-Vaterit-Mischung neben Material der separaten Kollagenkomponente (Kol), einem Kollagenkegel (Collacone), einer HA/ β -TCP-Probe (Collacone max), Kollagenmembranen (Mucoderm, Porcines Perikard, Porcine Dermis) und Kollagenvlies (Rogg).

Einem systematischen Konzept zur Evaluation von Biokompatibilität *in vitro* sukzessive folgend, wurde allen anfangs die Sterilität der vom Hersteller erhaltenen und anschließend zugunsten der Studien eigens prozessierten Materialproben verifiziert. Sodann erfolgte der Ausschluss genereller Toxizität des Präparats anhand eines Resazurin-Vitalitätstests. Darüber hinaus ließ sich im Rahmen dieser Testung sogleich gesteigertes Proliferationsverhalten sämtlicher untersuchten Zellen in Präsenz der Kollagen-Vaterit-Mischung vernehmen. Die explizite Verneinung möglicher gegenwärtiger Endotoxine oder anderer, vom Kollagen-Vaterit-Produkt freigesetzter Stoffe, die endotheliale Zellen zur Veranlassung einer inflammatorischen Reaktion stimulieren könnten, erfolgte im Anschluss mithilfe eines Endotoxin-Tests. Daraufhin wurde das mit Calcein-AM visualisierte Zellwachstum der Zellen auf den zu vergleichenden Materialproben analysiert. Alle Zellen zeigten eine regelrechte Zelladhäsion und Vitalität auf dem Kollagen-Vaterit-Produkt, mit dem Zellverhalten auf den anderen Biomaterialien vergleichbar. Unter Zuhilfenahme eines Lichtmikroskops wurde zudem die Morphologie aller verwendeten Zellen bei Kultivierung in Gegenwart sowie auf den Materialien selbst verfolgt. Diese manifestierte sich schlussendlich bei allen Zellen auf dem Kollagen-Vaterit-Produkt als regelrecht und nur unter Konfluenz verändert. Die abschließende Evaluation der zellarttypischen Genexpression mithilfe

einer RT-PCR demonstrierte die uneingeschränkte Syntheseleistung der Zellen auf sämtlichen erprobten Materialien.

Resümierend erfüllt die Kollagen-Vaterit-Mischung in den hier durchgeführten Untersuchungen alle Voraussetzungen, um dessen Potenzial als biokompatibles, osteokonduktives und osteoinduktives KEM *in vitro* zu bestätigen. Neben aktuell in der klinischen Anwendung genutzten Materialien kann das neu synthetisierte Produkt mit gleichwertigen Resultaten überzeugen. Die gewonnenen Erkenntnisse *in vitro* sprechen dem Kollagen-Vaterit-Präparat wünschenswerte Charakteristika eines biokompatiblen, attraktiven KEM im Rahmen des Bone Tissue Engineering zu. In welchem Maß diese Annahmen bei späteren *in vivo*-Studien bestätigt werden, bleibt abzuwarten. Dennoch konkretisiert die vorliegende Arbeit die Relevanz präklinischer Evaluation synthetisierter KEM *in vitro* und zeigt hierfür ein beispielhaftes Konzept, das auch weiteren Studien als Anregung dienen könnte.

9 Literaturverzeichnis

- Agarwal R, García AJ (2015) Biomaterial strategies for engineering implants for enhanced osseointegration and bone repair. *Advanced drug delivery reviews* 94:53–62. doi:10.1016/j.addr.2015.03.013.
- Al-Maawi S, Ghanaati S (2019) Autologes Blutkonzentrat zur Unterstützung der Regeneration; Plateled Rich Fibrin (PRF). *Implantologie Journal*:14–17.
- Al-Maawi S, Conrad T, Dohle E, Ghanaati S (2019) PRF: Dos and Don'ts in der Herstellung und Prozessierung. *Implantologie Journal*:10–14.
- Al-Nawas B, Tröltzsch M, Kämmerer PW, Pabst A, Tröltzsch M, Kauffmann P, Schiegnitz E, Brockmeyer P (2020) Leitlinie Deutsche Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde (DGZMK): Implantologische Indikationen für die Anwendung von Knochenersatzmaterialien; (S2k) [Internet]. 06/2020 [zit. am 09.02.2021]. URL: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/083-009I_S2K_Implantologische-Indikationen-Anwendung-Knochenersatzmaterialien_2020-11.pdf.
- Arahira T, Todo M (2014) Effects of proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells on compressive mechanical behavior of collagen/ β -TCP composite scaffold. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 39:218–230. doi:10.1016/j.jmbbm.2014.07.013.
- Araújo MG, Lindhe J (2005) Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. *Journal of clinical periodontology* 32:212–218. doi:10.1111/j.1600-051X.2005.00642.x.
- Araújo MG, Silva CO, Misawa M, Sukekava F (2015) Alveolar socket healing: what can we learn? *Periodontology 2000* 68:122–134. doi:10.1111/prd.12082.
- Ausschuss Gebührenrecht der Bundeszahnärztekammer (07/2013)
„Knochenmanagement“ eine tabellarische Aufstellung knochenchirurgischer Leistungen/ Leistungskombinationen, Gebührenordnung für Zahnärzte (GOZ) Kommentar. Berlin: BZÄK.
- BaoLin G, Ma PX (2014) Synthetic biodegradable functional polymers for tissue engineering: a brief review. *Science China. Chemistry* 57:490–500. doi:10.1007/s11426-014-5086-y.
- Barone A, Aldini NN, Fini M, Giardino R, Calvo Guirado JL, Covani U (2008) Xenograft versus extraction alone for ridge preservation after tooth removal: a clinical and histomorphometric study. *Journal of periodontology* 79:1370–1377. doi:10.1902/jop.2008.070628.
- Benjamin LE, Hemo I, Keshet E (1998) A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Development (Cambridge, England)* 125:1591–1598.
- Bevilacqua MP (1993) Endothelial-leukocyte adhesion molecules. *Annual review of immunology* 11:767–804. doi:10.1146/annurev.iy.11.040193.004003.
- Bevilacqua MP, Stengelin S, Gimbrone MA, Seed B (1989) Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science* 243:1160–1165. doi:10.1126/science.2466335.

- Bilbe G, Roberts E, Birch M, Evans DB (1996) PCR phenotyping of cytokines, growth factors and their receptors and bone matrix proteins in human osteoblast-like cell lines. *Bone* 19:437–445. doi:10.1016/s8756-3282(96)00254-2.
- Billiau A, Edy VG, Heremans H, van Damme J, Desmyter J, Georgiades JA, Somer P de (1977) Human Interferon: Mass Production in a Newly Established Cell Line, MG-63. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 12:11–15.
- Blatt S, Burkhardt V, Kämmerer PW, Pabst AM, Sagheb K, Heller M, Al-Nawas B, Schiegnitz E (2020) Biofunctionalization of porcine-derived collagen matrices with platelet rich fibrin: influence on angiogenesis in vitro and in vivo. *Clin Oral Invest* 24:3425–3436. doi:10.1007/s00784-020-03213-8.
- Blatt S, Thiem DGE, Pabst A, Al-Nawas B, Kämmerer PW (2021) Does Platelet-Rich Fibrin Enhance the Early Angiogenetic Potential of Different Bone Substitute Materials? An In Vitro and In Vivo Analysis. *Biomedicines* 9. doi:10.3390/biomedicines9010061.
- 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* 23:255–262. doi:10.1590/s1806-83242009000300006.
- Boskey A, Gadaleta S, Gundberg C, Doty S, Ducey P, Karsenty G (1998) Fourier transform infrared microspectroscopic analysis of bones of osteocalcin-deficient mice provides insight into the function of osteocalcin. *Bone* 23:187–196. doi:10.1016/s8756-3282(98)00092-1.
- botiss dental, botiss biomaterials GmbH (2020a) collacone max® Produktinformation [Internet]. 11.05.2020 [zit. am 15.12.2020]. URL: <https://botiss-dental.com/products/collacone-max/>.
- botiss dental, botiss biomaterials GmbH (2020b) collacone® Produktinformation [Internet]. 11.05.2020 [zit. am 15.12.2020]. URL: <https://botiss-dental.com/de/products/collacone-de/>.
- botiss dental, botiss biomaterials GmbH (2020c) mucoderm® Produktinformation [Internet]. 11.05.2020 [zit. am 15.12.2020]. URL: <https://botiss-dental.com/de/products/mucoderm-de/>.
- Boyce BF, Yao Z, Xing L (2009) Osteoclasts have multiple roles in bone in addition to bone resorption. *Critical reviews in eukaryotic gene expression* 19:171–180. doi:10.1615/critreueukargeneexpr.v19.i3.10.
- Boyjoo Y, Pareek VK, Liu J (2014) Synthesis of micro and nano-sized calcium carbonate particles and their applications. *J. Mater. Chem. A* 2:14270–14288. doi:10.1039/C4TA02070G.
- Briganti E, Spiller D, Mirtelli C, Kull S, Counoupas C, Losi P, Senesi S, Di Stefano R, Soldani G (2010) A composite fibrin-based scaffold for controlled delivery of bioactive pro-angiogenetic growth factors. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 142:14–21. doi:10.1016/j.jconrel.2009.09.029.
- Buch R, Wagner W, Reichert TE (2005) Alveolar-ridge-preservation. *ZZI- Z. Zahnärztliche Implantologie*:30–37.
- Burke PA, Lehmann-Bruinsma K, Powell JS (1995) Vascular endothelial growth factor causes endothelial proliferation after vascular injury. *Biochemical and biophysical research communications* 207:348–354. doi:10.1006/bbrc.1995.1194.

- 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* 25:2445–2461. doi:10.1007/s10856-014-5240-2.
- Campion CR, Chander C, Buckland T, Hing K (2011) Increasing strut porosity in silicate-substituted calcium-phosphate bone graft substitutes enhances osteogenesis. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* 97:245–254. doi:10.1002/jbm.b.31807.
- Canosa S, Moggio A, Brossa A, Pittatore G, Marchino GL, Leoncini S, Benedetto C, Revelli A, Bussolati B (2017) Angiogenic properties of endometrial mesenchymal stromal cells in endothelial co-culture: an in vitro model of endometriosis. *Molecular human reproduction* 23:187–198. doi:10.1093/molehr/gax006.
- Carlier A, Geris L, Bentley K, Carmeliet G, Carmeliet P, van Oosterwyck H (2012) MOSAIC: a multiscale model of osteogenesis and sprouting angiogenesis with lateral inhibition of endothelial cells. *PLoS Computational Biology* 8:e1002724. doi:10.1371/journal.pcbi.1002724.
- Carmeliet P (2000) Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature medicine* 6:389–395. doi:10.1038/74651.
- Carmo ABXd, Sartoretto SC, Alves ATNN, Granjeiro JM, Miguel FB, Calasans-Maia J, Calasans-Maia MD (2018) Alveolar bone repair with strontium- containing nanostructured carbonated hydroxyapatite. *Journal of applied oral science : revista FOB* 26:e20170084. doi:10.1590/1678-7757-2017-0084.
- Chan O, Coathup MJ, Nesbitt A, Ho C-Y, Hing KA, Buckland T, Campion C, Blunn GW (2012) The effects of microporosity on osteoinduction of calcium phosphate bone graft substitute biomaterials. *Acta biomaterialia* 8:2788–2794. doi:10.1016/j.actbio.2012.03.038.
- Chappard D, Fressonnet C, Genty C, Baslé M-F, Rebel A (1993) Fat in bone xenografts: Importance of the purification procedures on cleanliness, wettability and biocompatibility. *Biomaterials* 14:507–512. doi:10.1016/0142-9612(93)90238-W.
- Chappuis V, Engel O, Reyes M, Shahim K, Nolte L-P, Buser D (2013) Ridge alterations post-extraction in the esthetic zone: a 3D analysis with CBCT. *Journal of dental research* 92:195–201. doi:10.1177/0022034513506713.
- Charreau B, Coupel S, Goret F, Pourcel C, Soullou JP (2000) Association of glucocorticoids and cyclosporin A or rapamycin prevents E-selectin and IL-8 expression during LPS- and TNF α -mediated endothelial cell activation. *Transplantation* 69:945–953. doi:10.1097/00007890-200003150-00047.
- Chen X, Wang Z, Duan N, Zhu G, Schwarz EM, Xie C (2018) Osteoblast-osteoclast interactions. *Connective tissue research* 59:99–107. doi:10.1080/03008207.2017.1290085.
- Cho T-J, Gerstenfeld LC, Einhorn TA (2002) Differential Temporal Expression of Members of the Transforming Growth Factor β Superfamily During Murine Fracture Healing. *Journal of Bone and Mineral Research* 17:513–520. doi:10.1359/jbmr.2002.17.3.513.
- Chow LC (1991) Development of Self-Setting Calcium Phosphate Cements. *Nippon Seramikkusu Kyokai gakujutsu ronbunshi* 99:954–964. doi:10.2109/jcersj.99.954.
- Clementini M, Tiravia L, Risi V de, Vittorini Orgeas G, Mannocci A, Sanctis M de (2015) Dimensional changes after immediate implant placement with or without

- simultaneous regenerative procedures: a systematic review and meta-analysis. *Journal of clinical periodontology* 42:666–677. doi:10.1111/jcpe.12423.
- Conway EM, Collen D, Carmeliet P (2001) Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovascular Research* 49:507–521. doi:10.1016/S0008-6363(00)00281-9.
- Council of Europe, Strasbourg (2005/2006) 2.6.14; Ph. Eur. European Pharmacopoeia 5.0.161–168.
- Czekanska EM, Stoddart MJ, Richards RG, Hayes JS (2012) In search of an osteoblast cell model for in vitro research. *European cells & materials* 24:1–17.
- Deutsches Institut für Normung e.V. (DIN), 2009. DIN EN ISO 10993 Biologische Beurteilung von Medizinprodukten. Berlin: DIN.
- Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis PV (2005) Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury* 36:1392–1404. doi:10.1016/j.injury.2005.07.019.
- Dinkelacker W (Hrsg) (2014) Implantatprothetik: Biomechanische und prothetische Konzepte in der Implantologie [E-Book]. Stuttgart: Thieme. doi: 10.1055/b-002-96298.
- Dohan Ehrenfest DM, Peppo GM de, Doglioli P, Sammartino G (2009) Slow release of growth factors and thrombospondin-1 in Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF): a gold standard to achieve for all surgical platelet concentrates technologies. *Growth factors (Chur, Switzerland)* 27:63–69. doi:10.1080/08977190802636713.
- Doi Y, Shibutani T, Moriwaki Y, Kajimoto T, Iwayama Y (1998) Sintered carbonate apatites as bioresorbable bone substitutes. *J. Biomed. Mater. Res.* 39:603–610. doi:10.1002/(SICI)1097-4636(19980315)39:4<603::AID-JBM15>3.0.CO;2-7.
- Dorozhkin SV (2013) Calcium Orthophosphate-Based Bioceramics. *Materials* 6:3840–3942. doi:10.3390/ma6093840.
- Einhorn TA (1998) The cell and molecular biology of fracture healing. *Clinical orthopaedics and related research*:7-21. doi:10.1097/00003086-199810001-00003.
- Einhorn TA (2005) The Science of Fracture Healing. *J Orthop Trauma*:4-6.
- Endreß E (2009) Behandlung von Extraktionsalveolen mit einem anorganischen bovinen Knochenaufbaumaterial – Ein wissenschaftliches Update. *ZWR* 118:112–114. doi:10.1055/s-0029-1216337.
- Esser S, Lampugnani MG, Corada M, Dejana E, Risau W (1998) Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *Journal of Cell Science* 111 (Pt 13):1853–1865.
- Fages J, Marty A, Delga C, Condoret J-S, Combes D, Frayssinet P (1994) Use of supercritical CO₂ for bone delipidation. *Biomaterials* 15:650–656. doi:10.1016/0142-9612(94)90162-7.
- Fazzalari NL (2011) Bone fracture and bone fracture repair. *Osteoporosis International* 22:2003–2006. doi:10.1007/s00198-011-1611-4.
- Fedarko NS, Vetter UK, Weinstein S, Robey PG (1992) Age-related changes in hyaluronan, proteoglycan, collagen, and osteonectin synthesis by human bone cells. *Journal of cellular physiology* 151:215–227. doi:10.1002/jcp.1041510202.
- Fennema E, Rivron N, Rouwkema J, van Blitterswijk C, Boer J de (2013) Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues. *Trends in Biotechnology* 31:108–115. doi:10.1016/j.tibtech.2012.12.003.

- Ferreira AM, Gentile P, Chiono V, Ciardelli G (2012) Collagen for bone tissue regeneration. *Acta biomaterialia* 8:3191–3200. doi:10.1016/j.actbio.2012.06.014.
- Filippi M, Born G, Chaaban M, Scherberich A (2020) Natural Polymeric Scaffolds in Bone Regeneration. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8:474. doi:10.3389/fbioe.2020.00474.
- Franco E, Garcia-Recio V, Jiménez P, Garrosa M, Girbés T, Cordoba-Diaz M, Cordoba-Diaz D (2018) Endotoxins from a Pharmacopoeial Point of View. *Toxins* 10. doi:10.3390/toxins10080331.
- Fröhlich M (2009) Die Extraktionsalveole als potenzielles Implantatbett. *Zahnmedizin up2date* 3:555–576. doi:10.1055/s-0029-1186205.
- Fujita R, Yokoyama A, Nodasaka Y, Kohgo T, Kawasaki T (2003) Ultrastructure of ceramic-bone interface using hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate ceramics and replacement mechanism of β -tricalcium phosphate in bone. *Tissue and Cell* 35:427–440. doi:10.1016/S0040-8166(03)00067-3.
- Gale NW, Yancopoulos GD (1999) Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, Angiopoietins, and ephrins in vascular development. *Genes Dev.* 13:1055–1066.
- Gamble JR, Drew J, Trezise L, Underwood A, Parsons M, Kasminkas L, Rudge J, Yancopoulos G, Vadas MA (2000) Angiopoietin-1 is an antipermeability and anti-inflammatory agent in vitro and targets cell junctions. *Circulation research* 87:603–607. doi:10.1161/01.res.87.7.603.
- Ganesan MK, Finsterwalder R, Leb H, Resch U, Neumüller K, Martin R de, Petzelbauer P (2017) Three-Dimensional Coculture Model to Analyze the Cross Talk Between Endothelial and Smooth Muscle Cells. *Tissue engineering. Part C, Methods* 23:38–49. doi:10.1089/ten.TEC.2016.0299.
- Gauthier O, Bouler J-M, Aguado E, Pilet P, Daculsi G (1998) Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: influence of macropore diameter and macroporosity percentage on bone ingrowth. *Biomaterials* 19:133–139. doi:10.1016/s0142-9612(97)00180-4.
- Gavard J, Patel V, Gutkind JS (2008) Angiopoietin-1 prevents VEGF-induced endothelial permeability by sequestering Src through mDia. *Developmental cell* 14:25–36. doi:10.1016/j.devcel.2007.10.019.
- George J, Kuboki Y, Miyata T (2006) Differentiation of mesenchymal stem cells into osteoblasts on honeycomb collagen scaffolds. *Biotechnology and bioengineering* 95:404–411. doi:10.1002/bit.20939.
- Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, Abramsson A, Jeltsch M, Mitchell C, Alitalo K, Shima D, Betsholtz C (2003) VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *The Journal of cell biology* 161:1163–1177. doi:10.1083/jcb.200302047.
- Germaini M-M, Detsch R, Grünwald A, Magnaudeix A, Lalloue F, Boccaccini AR, Champion E (2017) Osteoblast and osteoclast responses to A/B type carbonate-substituted hydroxyapatite ceramics for bone regeneration. *Biomedical materials* 12:35008. doi:10.1088/1748-605X/aa69c3.
- Ginebra M-P, Espanol M, Maazouz Y, Bergez V, Pastorino D (2018) Bioceramics and bone healing. *EFORT open reviews* 3:173–183. doi:10.1302/2058-5241.3.170056.

- Gitelis S, Saiz P (2002) What's new in orthopaedic surgery. *Journal of the American College of Surgeons* 194:788–791. doi:10.1016/S1072-7515(02)01198-5.
- Golub EE, Harrison G, Taylor AG, Camper S, Shapiro IM (1992) The role of alkaline phosphatase in cartilage mineralization. *Bone and Mineral* 17:273–278. doi:10.1016/0169-6009(92)90750-8.
- Gorbet MB, Sefton MV (2005) Endotoxin: the uninvited guest. *Biomaterials* 26:6811–6817. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.04.063.
- Götz W, Schnutenhaus S (2016) „Socket Healing“ und „Socket Preservation“: Eine kurze Übersicht. *ZWR* 125:524–530. doi:10.1055/s-0042-117764.
- Grabska-Zielińska S, Sionkowska A, Coelho CC, Monteiro FJ (2020) Silk Fibroin/Collagen/Chitosan Scaffolds Cross-Linked by a Glyoxal Solution as Biomaterials toward Bone Tissue Regeneration. *Materials* 13:3433. doi:10.3390/ma13153433.
- Green DW, Bolland BJRF, Kanczler JM, Lanham SA, Walsh D, Mann S, Oreffo ROC (2009) Augmentation of skeletal tissue formation in impaction bone grafting using vaterite microsphere biocomposites. *Biomaterials* 30:1918–1927. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.12.052.
- Gutiérrez-Prieto SJ, Perdomo-Lara SJ, Diaz-Peraza JM, Sequeda-Castañeda LG (2019) Analysis of In Vitro Osteoblast Culture on Scaffolds for Future Bone Regeneration Purposes in Dentistry. *Advances in pharmacological sciences* 2019:5420752. doi:10.1155/2019/5420752.
- Habibovic P, Yuan H, van der Valk CM, Meijer G, van Blitterswijk CA, Groot K de (2005) 3D microenvironment as essential element for osteoinduction by biomaterials. *Biomaterials* 26:3565–3575. doi:10.1016/j.biomaterials.2004.09.056.
- Hadjidakis DJ, Androulakis II (2006) Bone remodeling. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1092:385–396. doi:10.1196/annals.1365.035.
- Haffner-Luntzer M, Ignatius A (2019) Biologische Einflussfaktoren auf die Knochenbruchheilung. *OP-JOURNAL* 35:5–10. doi:10.1055/a-0677-3615.
- Happe A, Spitta Verlag (2010) *Implantologie Allgemein: Strukturerehalt durch Socket Preservation oder Ridge Preservation* [Internet]. 03.09.2010 [zit. am 17.12.2020]. URL: https://www.dimagazin-aktuell.de/implantologie/implantologie-allgemein/story/strukturerehalt-durch-socket-preservation-oder-ridge-preservation-__2818.html.
- He J, Han X, Wang S, Zhang Y, Dai X, Liu B, Liu L, Zhao X (2019) Cell sheets of co-cultured BMP-2-modified bone marrow stromal cells and endothelial progenitor cells accelerate bone regeneration in vitro. *Experimental and therapeutic medicine* 18:3333–3340. doi:10.3892/etm.2019.7982.
- Hesaraki S, Nazarian H, Pourbaghi-Masouleh M, Borhan S (2014) Comparative study of mesenchymal stem cells osteogenic differentiation on low-temperature biomineralized nanocrystalline carbonated hydroxyapatite and sintered hydroxyapatite. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* 102:108–118. doi:10.1002/jbm.b.32987.
- Ho K-N, Salamanca E, Chang K-C, Shih T-C, Chang Y-C, Huang H-M, Teng N-C, Lin C-T, Feng S-W, Chang W-J (2016) A Novel HA/β-TCP-Collagen Composite Enhanced New Bone Formation for Dental Extraction Socket Preservation in Beagle Dogs. *Materials* 9. doi:10.3390/ma9030191.

- Hollay H-CC, Schug J, Kirste M, Huber A, Troedhan A, Köhli M, Spitta Verlag (2014) Wege zu einer sicheren Socket Preservation; zmk-aktuell Implantologie [Internet]. 20.08.2014 [zit. am 23.11.2020]. URL: https://www.zmk-aktuell.de/fachgebiete/implantologie/story/wege-zu-einer-sicheren-socket-preservation__1091.html.
- Hu K, Olsen BR (2016) Osteoblast-derived VEGF regulates osteoblast differentiation and bone formation during bone repair. *The Journal of clinical investigation* 126:509–526. doi:10.1172/JCI82585.
- Huang Q, Liu Y, Ouyang Z, Feng Q (2020) Comparing the regeneration potential between PLLA/Aragonite and PLLA/Vaterite pearl composite scaffolds in rabbit radius segmental bone defects. *Bioactive materials* 5:980–989. doi:10.1016/j.bioactmat.2020.06.018.
- Hurley JC (1995) Endotoxemia: methods of detection and clinical correlates. *Clinical Microbiology Reviews* 8:268–292.
- International Organization for Standardization (ISO), 2009. ISO 10993-5 Biological evaluation of medical devices. Geneva: ISO.
- International Organization for Standardization (ISO), 2010. ISO 29701 Nanotechnologies - Endotoxin test on nanomaterial samples for in vitro systems: Limulus amoebocyte lysate (LAL) test. Geneva: ISO.
- Ivanov AN, Saveleva MS, Kurtukova MO, Kustodov SV, Gladkova EV, Blinnikova VV, Babushkina IV, Parakhonskiy BV, Ulyanov VY, Norkin IA (2019) Particularities of Bone Regeneration in Rats after Implantation of Polycaprolactone Scaffold Mineralized with Vaterite with Adsorbed Tannic Acid. *Bull Exp Biol Med* 167:275–278. doi:10.1007/s10517-019-04508-x.
- Jääskeläinen T, Pirskanen A, Ryhänen S, Palvimo JJ, Deluca HF, Mäenpää PH (1994) Functional interference between AP-1 and the vitamin D receptor on osteocalcin gene expression in human osteosarcoma cells. *European journal of biochemistry* 224:11–20. doi:10.1111/j.1432-1033.1994.tb19989.x.
- 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* 52:2745–2756. doi:10.1172/JCI107470.
- Jin S-W, Patterson C (2008) The Opening Act: Vasculogenesis and the Origins of Circulation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 29:623–629. doi:10.1161/ATVBAHA.107.161539.
- Jung RE, Sapata VM, Hämmerle CHF, Wu H, Hu X-L, Lin Y (2018) Combined use of xenogeneic bone substitute material covered with a native bilayer collagen membrane for alveolar ridge preservation: A randomized controlled clinical trial. *Clinical Oral Implants Research* 29:522–529. doi:10.1111/clr.13149.
- Kamei M, Saunders WB, Bayless KJ, Dye L, Davis GE, Weinstein BM (2006) Endothelial tubes assemble from intracellular vacuoles in vivo. *Nature* 442:453–456. doi:10.1038/nature04923.
- Kamitakahara M, Ohtsuki C, Miyazaki T (2008) Review paper: behavior of ceramic biomaterials derived from tricalcium phosphate in physiological condition. *Journal of biomaterials applications* 23:197–212. doi:10.1177/0885328208096798.
- Kämmerer, P. W., Pabst, A. (2020) Wachstumsfaktoren und Knochenersatzmaterialien – bisher und in Zukunft. *wissen kompakt* 2:47.

- Kanzawa S, Endo H, Shioya N (1993) Improved in vitro angiogenesis model by collagen density reduction and the use of type III collagen. *Annals of plastic surgery* 30:244–251. doi:10.1097/00000637-199303000-00008.
- Katzburg S, Lieberherr M, Ornoy A, Klein BY, Hendel D, Somjen D (1999) Isolation and hormonal responsiveness of primary cultures of human bone-derived cells: gender and age differences. *Bone* 25:667–673. doi:10.1016/s8756-3282(99)00225-2.
- Keating JF, McQueen MM (2001) Substitutes for autologous bone graft in orthopaedic trauma. *The Journal of Bone and Joint Surgery. British volume* 83-B:3–8. doi:10.1302/0301-620X.83B1.0830003.
- Kesireddy V, Kasper FK (2016) Approaches for building bioactive elements into synthetic scaffolds for bone tissue engineering. *J. Mater. Chem. B* 4:6773–6786. doi:10.1039/C6TB00783J.
- Kim S, Labbe RG, Ryu S (2000) Inhibitory effects of collagen on the PCR for detection of *Clostridium perfringens*. *Applied and Environmental Microbiology* 66:1213–1215. doi:10.1128/aem.66.3.1213-1215.2000.
- Kirkpatrick CJ, Fuchs S, Iris Hermanns M, Peters K, Unger RE (2007) Cell culture models of higher complexity in tissue engineering and regenerative medicine. *Biomaterials* 28:5193–5198. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.08.012.
- Kolanthai E, Abinaya Sindu P, Thanigai Arul K, Sarath Chandra V, Manikandan E, Narayana Kalkura S (2017) Agarose encapsulated mesoporous carbonated hydroxyapatite nanocomposites powder for drug delivery. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology* 166:220–231. doi:10.1016/j.jphotobiol.2016.12.005.
- Konopacka-Łyskawa D (2019) Synthesis Methods and Favorable Conditions for Spherical Vaterite Precipitation: A Review. *Crystals* 9:223. doi:10.3390/cryst9040223.
- Kotobuki N, Kawagoe D, Nomura D, Katou Y, Muraki K, Fujimori H, Goto S, Ioku K, Ohgushi H (2006) Observation and quantitative analysis of rat bone marrow stromal cells cultured in vitro on newly formed transparent beta-tricalcium phosphate. *Journal of materials science. Materials in medicine* 17:33–41. doi:10.1007/s10856-006-6327-1.
- Krüger E (1977) *Operationslehre für Zahnärzte*, Berlin: Die Quintessenz, 109-111.
- 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* 218:501–511. doi:10.1002/jcp.21620.
- Laasri S, Taha M, Laghzizil A, Hlil EK, Chevalier J (2010) The affect of densification and dehydroxylation on the mechanical properties of stoichiometric hydroxyapatite bioceramics. *Materials Research Bulletin* 45:1433–1437. doi:10.1016/j.materresbull.2010.06.040.
- Langer R, Vacanti JP (1993) Tissue engineering. *Science* 260:920–926. doi:10.1126/science.8493529.
- Laschke MW, Rücker M, Jensen G, Carvalho C, Mülhaupt R, Gellrich N-C, Menger MD (2008) Improvement of vascularization of PLGA scaffolds by inosculation of in situ-preformed functional blood vessels with the host microvasculature. *Annals of surgery* 248:939–948. doi:10.1097/SLA.0b013e31818fa52f.
- Lekovic V, Camargo PM, Klokkevold PR, Weinlaender M, Kenney EB, Dimitrijevic B, Nedic M (1998) Preservation of alveolar bone in extraction sockets using

- bioabsorbable membranes. *Journal of periodontology* 69:1044–1049. doi:10.1902/jop.1998.69.9.1044.
- Li Y, Li B, Song Y, Ma A, Li C, Zhang X, Li H, Zhang Q, Zhang K (2019) Improved osteoblast adhesion and osseointegration on TiO₂ nanotubes surface with hydroxyapatite coating. *Dent. Mater. J.* 38:278–286. doi:10.4012/dmj.2018-118.
- Lindhe J, Cecchinato D, Bressan EA, Toia M, Araújo MG, Liljenberg B (2012) The alveolar process of the edentulous maxilla in periodontitis and non-periodontitis subjects. *Clinical Oral Implants Research* 23:5–11. doi:10.1111/j.1600-0501.2011.02205.x.
- Liu W, Zhang X (2015) Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)/RANK/osteoprotegerin system in bone and other tissues (review). *Molecular Medicine Reports* 11:3212–3218. doi:10.3892/mmr.2015.3152.
- Liu X, Jakus AE, Kural M, Qian H, Engler A, Ghaedi M, Shah R, Steinbacher DM, Niklason LE (2018) Vascularization of Natural and Synthetic Bone Scaffolds. *Cell transplantation* 27:1269–1280. doi:10.1177/0963689718782452.
- Lövgren J, Blomberg K (1994) Simultaneous measurement of NK cell cytotoxicity against two target cell lines labelled with fluorescent lanthanide chelates. *Journal of Immunological Methods* 173:119–125. doi:10.1016/0022-1759(94)90289-5.
- Maeda H, Kasuga T, Nogami M, Ueda M (2005) Preparation of bonelike apatite composite for tissue engineering scaffold. *Science and technology of advanced materials* 6:48–53. doi:10.1016/j.stam.2004.07.003.
- 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 : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe canadienne des sciences pharmaceutiques* 10:388–404.
- Mahonen A, Pirskanen A, Keinänen R, Mäenpää PH (1990) Effect of 1,25(OH)₂D₃ on its receptor mRNA levels and osteocalcin synthesis in human osteosarcoma cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1048:30–37. doi:10.1016/0167-4781(90)90018-w.
- Maia FR, Bidarra SJ, Granja PL, Barrias CC (2013) Functionalization of biomaterials with small osteoinductive moieties. *Acta biomaterialia* 9:8773–8789. doi:10.1016/j.actbio.2013.08.004.
- Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD (1997) Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 277:55–60. doi:10.1126/science.277.5322.55.
- Majidinia M, Sadeghpour A, Yousefi B (2018) The roles of signaling pathways in bone repair and regeneration. *Journal of cellular physiology* 233:2937–2948. doi:10.1002/jcp.26042.
- Maloney T, Phelan R, Simmons N (2018) Saving the horseshoe crab: A synthetic alternative to horseshoe crab blood for endotoxin detection. *PLoS biology* 16(10):e2006607. doi:10.1371/journal.pbio.2006607.
- Mardas N, Chadha V, Donos N (2010) Alveolar ridge preservation with guided bone regeneration and a synthetic bone substitute or a bovine-derived xenograft: a randomized, controlled clinical trial. *Clinical Oral Implants Research* 21:688–698. doi:10.1111/j.1600-0501.2010.01918.x.

- Marsell R, Einhorn TA (2011) The biology of fracture healing. *Injury* 42:551–555. doi:10.1016/j.injury.2011.03.031.
- Martínez ME, Del Campo MT, Medina S, Sánchez M, Sánchez-Cabezudo MJ, Esbrit P, Martínez P, Moreno I, Rodrigo A, Garcés MV, Munuera L (1999) Influence of skeletal site of origin and donor age on osteoblastic cell growth and differentiation. *Calcified tissue international* 64:280–286. doi:10.1007/s002239900619.
- Masuzawa M, Fujimura T, Hamada Y, Fujita Y, Hara H, Nishiyama S, Katsuoka K, Tamauchi H, Sakurai Y (1999) Establishment of a human hemangiosarcoma cell line (ISO-HAS). *Int. J. Cancer* 81:305–308. doi:10.1002/(sici)1097-0215(19990412)81:2<305::aid-ijc22>3.0.co;2-z.
- May T, Hauser H, Wirth D (2012) Funktionale Zelllinien durch neue Immortalisierungsprotokolle. *Biospektrum* 18:390–393. doi:10.1007/s12268-012-0199-3.
- mbp, medical biomaterial products GmbH (2020) Duraheal Produktinformation [Internet]. 11.05.2020 [zit. am 15.12.2020]. URL: <http://www.mbp-gmbh.de/duraheal/>.
- Mehlhorn H (2009) Mikrobiologische Untersuchungsmethoden: Fluoreszenzmikroskopie. In: Neumeister B, Geiss H, Braun R, Kimmig P (Hrsg) *Mikrobiologische Diagnostik [E-Book]*. Stuttgart: Thieme. doi:10.1055/b-002-19462.
- 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 = Revue roumaine de morphologie et embryologie* 59:455–467.
- Merten HA, Wiltfang J, Hönig JF, Funke M, Luhr HG (2000) Intraindividuelle Vergleich von alpha- und beta-TCP-Keramik im Tierexperiment. *Mund Kiefer GesichtsChir* 4 Suppl 2:509-15. doi:10.1007/PL00012702.
- Mishra R, Roux BM, Posukonis M, Bodamer E, Brey EM, Fisher JP, Dean D (2016) Effect of prevascularization on in vivo vascularization of poly(propylene fumarate)/fibrin scaffolds. *Biomaterials* 77:255–266. doi:10.1016/j.biomaterials.2015.10.026.
- Mommaerts K, Sanchez I, Betsou F, Mathieson W (2015) Replacing β -mercaptoethanol in RNA extractions. *Analytical biochemistry* 479:51–53. doi:10.1016/j.ab.2015.03.027.
- Montanez E, Casaroli-Marano RP, Vilaro S, Pagan R (2002) Comparative study of tube assembly in three-dimensional collagen matrix and on Matrigel coats. *Angiogenesis* 5:167–172.
- Morelli C, Barbanti-Brodano G, Ciannilli A, Campioni K, Boriani S, Tognon M (2007) Cell morphology, markers, spreading, and proliferation on orthopaedic biomaterials. An innovative cellular model for the "in vitro" study. *Journal of biomedical materials research. Part A* 83:178–183. doi:10.1002/jbm.a.31262.
- Mountziaris PM, Mikos AG (2008) Modulation of the Inflammatory Response for Enhanced Bone Tissue Regeneration. *Tissue Engineering. Part B, Reviews* 14:179–186. doi:10.1089/ten.teb.2008.0038.
- Mugnaioli E, Andrusenko I, Schüler T, Loges N, Dinnebier RE, Panthöfer M, Tremel W, Kolb U (2012) Ab Initio structure determination of vaterite by automated electron diffraction. *Angewandte Chemie (International Ed.)* 51:7041–7045. doi:10.1002/anie.201200845.

- Mungenast AE, Siegert S, Tsai L-H (2016) Modeling Alzheimer's disease with human induced pluripotent stem (iPS) cells. *Molecular and Cellular Neuroscience* 73:13–31. doi:10.1016/j.mcn.2015.11.010.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Hrsg) (2021) PECAM1 platelet and endothelial cell adhesion molecule 1 [Homo sapiens (human)] [Internet]. 2021 [zit. am 06.03.2021]. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=5175>.
- National Institutes of Health (2020a) Nucleotide database: A collection of nucleotide sequences from several sources [Internet]. 2021 [zit. am 14.02.2021]. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>.
- National Institutes of Health (2020b) Primer-BLAST: Primer-basic local alignment search tool [Internet]. 2021 [zit. am 14.02.2021]. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>.
- Neri S, Mariani E, Meneghetti A, Cattini L, Facchini A (2001) Calcein-acetyoxymethyl cytotoxicity assay: standardization of a method allowing additional analyses on recovered effector cells and supernatants. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 8:1131–1135. doi:10.1128/CDLI.8.6.1131-1135.2001.
- Neumann G, Schäfer A, Mendling W (2014) Grundlagen der Phasenkontrastmikroskopie. In: Neumann G, Schäfer A, Mendling W (Hrsg) *Phasenkontrast-Mikroskopie in der Frauenarztpraxis*, Berlin: Springer, 9-17.
- Nguyen B-NB, Moriarty RA, Kamalidinov T, Etheridge JM, Fisher JP (2017) Collagen hydrogel scaffold promotes mesenchymal stem cell and endothelial cell coculture for bone tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 105:1123–1131. doi:10.1002/jbm.a.36008.
- Niethard FU, Pfeil J, Biberthaler P (2017) *Orthopädie und Unfallchirurgie* [E-Book]. Stuttgart: Thieme. doi:10.1055/b-005-143648.
- Ohgushi H, Goldberg VM, Caplan AI (1989) Heterotopic osteogenesis in porous ceramics induced by marrow cells. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 7:568–578. doi:10.1002/jor.1100070415.
- Okada M, Furuzono T (2012) Hydroxylapatite nanoparticles: fabrication methods and medical applications. *Science and technology of advanced materials* 13:64103. doi:10.1088/1468-6996/13/6/064103.
- Okanoue Y, Ikeuchi M, Takemasa R, Tani T, Matsumoto T, Sakamoto M, Nakasu M (2012) Comparison of in vivo bioactivity and compressive strength of a novel superporous hydroxyapatite with beta-tricalcium phosphates. *Archives of orthopaedic and trauma surgery* 132:1603–1610. doi:10.1007/s00402-012-1578-4.
- Ono T, Nakashima T (2018) Recent advances in osteoclast biology. *Histochemistry and cell biology* 149:325–341. doi:10.1007/s00418-018-1636-2.
- Opel KL, Chung D, McCord BR (2010) A study of PCR inhibition mechanisms using real time PCR. *Journal of forensic sciences* 55:25–33. doi:10.1111/j.1556-4029.2009.01245.x.
- Oral ÇM, Ercan B, Kapusuz D (2020) Calcium carbonate polymorph dictates in vitro osteoblast proliferation. *J Aust Ceram Soc* 56:1421–1426. doi:10.1007/s41779-020-00492-y.

- Papetti M, Herman IM (2002) Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *American journal of physiology. Cell physiology* 282:C947-70. doi:10.1152/ajpcell.00389.2001.
- Parakhonskiy B, Zyuzin MV, Yashchenok A, Carregal-Romero S, Rejman J, Möhwald H, Parak WJ, Skirtach AG (2015) The influence of the size and aspect ratio of anisotropic, porous CaCO₃ particles on their uptake by cells. *J Nanobiotechnol* 13:53. doi:10.1186/s12951-015-0111-7.
- Pei X, Ma L, Zhang B, Sun J, Sun Y, Fan Y, Gou Z, Zhou C, Zhang X (2017) Creating hierarchical porosity hydroxyapatite scaffolds with osteoinduction by three-dimensional printing and microwave sintering. *Biofabrication* 9:45008. doi:10.1088/1758-5090/aa90ed.
- Peng C, Zhao Q, Gao C (2010) Sustained delivery of doxorubicin by porous CaCO₃ and chitosan/alginate multilayers-coated CaCO₃ microparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 353:132–139. doi:10.1016/j.colsurfa.2009.11.004.
- Pieters IY, van den Vreken NMF, Declercq HA, Cornelissen MJ, Verbeeck RMH (2010) Carbonated apatites obtained by the hydrolysis of monetite: influence of carbonate content on adhesion and proliferation of MC3T3-E1 osteoblastic cells. *Acta biomaterialia* 6:1561–1568. doi:10.1016/j.actbio.2009.11.002.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143–147. doi:10.1126/science.284.5411.143.
- Pontén J, Saksela E (1967) Two established in vitro cell lines from human mesenchymal tumours. *International journal of cancer* 2:434–447. doi:10.1002/ijc.2910020505.
- Potdar P, Sutar J (2010) Establishment and molecular characterization of mesenchymal stem cell lines derived from human visceral & subcutaneous adipose tissues. *Journal of Stem Cells & Regenerative Medicine* 6:26–35.
- Präbst K, Engelhardt H, Ringgeler S, Hübner H (2017) Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1601:1–17. doi:10.1007/978-1-4939-6960-9_1.
- Rathe F (2011) Weichgewebs- und Alveolenmanagement: zmk-aktuell Parodontologie [Internet]. 09/2011 [zit. am 08.10.19]. URL: https://www.zmk-aktuell.de/fachgebiete/parodontologie/story/weichgewebs--und-alveolenmanagement__525.html.
- Reimann E, Abram K, Köks S, Kingo K, Fazeli A (2019) Identification of an optimal method for extracting RNA from human skin biopsy, using domestic pig as a model system. *Sci Rep* 9:20111. doi:10.1038/s41598-019-56579-5.
- Reinke JM, Sorg H (2012) Wound repair and regeneration. *European surgical research. Europäische chirurgische Forschung. Recherches chirurgicales europeennes* 49:35–43. doi:10.1159/000339613.
- 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* 13:599. doi:10.3390/polym13040599.

- Ripamonti U (1996) Osteoinduction in porous hydroxyapatite implanted in heterotopic sites of different animal models. *Biomaterials* 17:31–35. doi:10.1016/0142-9612(96)80752-6.
- Risau W (1997) Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386:671–674. doi:10.1038/386671a0.
- Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, Minor L (Hrsg) (2016) *Assay Guidance Manual: Cell Viability Assays* [Internet]. 06/2016 [zit. am 12.01.2021]. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>.
- 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* 47:4961–4966.
- ROGG Verbandstoffe GmbH (2020) *ROGG Biokollagen Wundaufgabe* Produktinformation [Internet]. 26.11.2020 [zit. am 05.01.2021]. URL: <https://rogg-verbandstoffe.de/produkt/rogg-bio-kollagen>.
- Rouwkema J, Boer J de, van Blitterswijk CA (2006) Endothelial cells assemble into a 3-dimensional prevascular network in a bone tissue engineering construct. *Tissue engineering* 12:2685–2693. doi:10.1089/ten.2006.12.2685.
- Rundhaug JE (2005) Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 9:267–285. doi:10.1111/j.1582-4934.2005.tb00355.x.
- Salamanca E, Hsu C-C, Huang H-M, Teng N-C, Lin C-T, Pan Y-H, Chang W-J (2018) Bone regeneration using a porcine bone substitute collagen composite in vitro and in vivo. *Scientific reports* 8:984. doi:10.1038/s41598-018-19629-y.
- 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. doi:10.3390/polym12010093.
- Saldaña L, Bensiamar F, Boré A, Vilaboa N (2011) In search of representative models of human bone-forming cells for cytocompatibility studies. *Acta biomaterialia* 7:4210–4221. doi:10.1016/j.actbio.2011.07.019.
- San Miguel B, Kriauciunas R, Tosatti S, Ehrbar M, Ghayor C, Textor M, Weber FE (2010) Enhanced osteoblastic activity and bone regeneration using surface-modified porous bioactive glass scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 94:1023–1033. doi:10.1002/jbm.a.32773.
- Santos MI, Tuzlakoglu K, Fuchs S, Gomes ME, Peters K, Unger RE, Piskin E, Reis RL, Kirkpatrick CJ (2008) Endothelial cell colonization and angiogenic potential of combined nano- and micro-fibrous scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*:4306–4313. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.07.033.
- Schindeler A, McDonald MM, Bokko P, Little DG (2008) Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Seminars in cell & developmental biology* 19:459–466. doi:10.1016/j.semcd.2008.07.004.
- 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* 17:1161–1170. 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* 117:2588–2609. doi:10.1002/bit.27362.

- Schnürer SM, Gopp U, Kühn K-D, Breusch SJ (2003) Knochenersatzwerkstoffe. *Der Orthopäde* 32:2–10. doi:10.1007/s00132-002-0407-9.
- Schrödel S (2008) Analyse und Vergleich von Wachstum und Zellfunktionen bei primären humanen mikrovasculären Endothelzellen und bei einer humanen mikrovasculären Endothelzelllinie auf unterschiedlichen Knochenersatzmaterialien [Inauguraldissertation]. Mainz: Fachbereich Pathologie der Johannes-Gutenberg-Universität.
- Schröder R, Pohlit H, Schüler T, Panthöfer M, Unger RE, Frey H, Tremel W (2015) Transformation of vaterite nanoparticles to hydroxycarbonate apatite in a hydrogel scaffold: relevance to bone formation. *J. Mater. Chem. B* 3:7079–7089. doi:10.1039/c5tb01032b.
- Schröder R, Besch L, Pohlit H, Panthöfer M, Roth W, Frey H, Tremel W, Unger RE (2018) Particles of vaterite, a metastable CaCO₃ polymorph, exhibit high biocompatibility for human osteoblasts and endothelial cells and may serve as a biomaterial for rapid bone regeneration. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* 12:1754–1768. doi:10.1002/term.2703.
- Schüler T, Tremel W (2011) Versatile wet-chemical synthesis of non-agglomerated CaCO₃ vaterite nanoparticles. *Chem. Commun.* 47:5208–5210. doi:10.1039/C0CC05717G.
- Schünke M, Schulte Erik, Schumacher U, Voll M, Wesker K (Hrsg) (2014) *Prometheus Lernatlas - Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem*. 4. Aufl. Stuttgart: Thieme, 16-17.
- Schwenzer N, Bacher M (Hrsg) (2011) *Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie*, Stuttgart: Thieme, 212-213.
- Sergeeva A, Sergeev R, Lengert E, Zakharevich A, Parakhonskiy B, Gorin D, Sergeev S, Volodkin D (2015) Composite Magnetite and Protein Containing CaCO₃ Crystals. External Manipulation and Vaterite → Calcite Recrystallization-Mediated Release Performance. *ACS Applied Materials & Interfaces* 7:21315–21325. doi:10.1021/acsami.5b05848.
- Shang F, Yu Y, Liu S, Ming L, Zhang Y, Zhou Z, Zhao J, Jin Y (2021) Advancing application of mesenchymal stem cell-based bone tissue regeneration. *Bioactive materials* 6:666–683. doi:10.1016/j.bioactmat.2020.08.014.
- Shu Y, Qiu F, Zhang Y, Cao W, Wu Z, Nian S, Zhou N (2017) Novel vaterite-containing tricalcium silicate bone cement by surface functionalization using 3-aminopropyltriethoxysilane: setting behavior, in vitro bioactivity and cytocompatibility. *Biomedical materials* 12:65007. doi:10.1088/1748-605X/aa84b8.
- Siddappa R, Licht R, van Blitterswijk C, Boer J de (2007) Donor variation and loss of multipotency during in vitro expansion of human mesenchymal stem cells for bone tissue engineering. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 25:1029–1041. doi:10.1002/jor.20402.
- Siggelkow H, Niedhart C, Kurre W, Ihbe A, Schulz A, Atkinson MJ, Hüfner M (1998) In vitro differentiation potential of a new human osteosarcoma cell line (HOS 58). *Differentiation; research in biological diversity* 63:81–91. doi:10.1046/j.1432-0436.1998.6320081.x.
- 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* 53:25–35.
- Singh A, Gill G, Kaur H, Amhmed M, Jakhu H (2018) Role of osteopontin in bone remodeling and orthodontic tooth movement: a review. *Progress in Orthodontics* 19:18. doi:10.1186/s40510-018-0216-2.
- Skalak R, Fox CF (Hrsg) (1988) *Tissue engineering; Proceedings of a workshop held at Granlibakken, Lake Tahoe, California, February 26 - 29, 1988*, New York: Liss.
- Smeets R, Jung O, Hanken H, Hartjen P, Al Dam A, Gröbe A, Heiland M, Gosau M, Rothamel D, Schlee M, Iglhaut G, Kolk A (2014) Was können regenerative Materialien in der Zahnmedizin leisten – und wo sind die Grenzen? *Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift*:708–721.
- Smeets R, Arnhold S, Henningsen A, Jung O, Barbeck M, Schnettler R, Wenisch S (2018) Knochenersatzmaterialien. *wissen kompakt* 12:55–64. doi:10.1007/s11838-018-0062-6.
- Spelsberg TC, Harris SA, Riggs BL (1995) Immortalized Osteoblast Cell Systems (New Human Fetal Osteoblast Systems). *Calcified tissue international* 56 (1):18-21. doi:10.1007/BF03354644.
- St-Arnaud R, Naja RP (2011) Vitamin D metabolism, cartilage and bone fracture repair. *Molecular and Cellular Endocrinology* 347:48–54. doi:10.1016/j.mce.2011.05.018.
- Steffens L, Wenger A, Stark GB, Finkenzeller G (2009) In vivo engineering of a human vasculature for bone tissue engineering applications. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 13:3380–3386. doi:10.1111/j.1582-4934.2008.00418.x.
- Stumbras A, Kuliesius P, Januzis G, Juodzbaly G (2019) Alveolar Ridge Preservation after Tooth Extraction Using Different Bone Graft Materials and Autologous Platelet Concentrates: a Systematic Review. *Journal of oral & maxillofacial research* 10:e2. doi:10.5037/jomr.2019.10102.
- Svenskaya Y, Parakhonskiy B, Haase A, Atkin V, Lukyanets E, Gorin D, Antolini R (2013) Anticancer drug delivery system based on calcium carbonate particles loaded with a photosensitizer. *Biophysical chemistry* 182:11–15. doi:10.1016/j.bpc.2013.07.006.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131:861–872. doi:10.1016/j.cell.2007.11.019.
- Tan WL, Wong TLT, Wong MCM, Lang NP (2012) A systematic review of post-extraction alveolar hard and soft tissue dimensional changes in humans. *Clin. Oral. Impl. Res.* 23:1–21. doi:10.1111/j.1600-0501.2011.02375.x.
- Tannenbaum SH, Chao ES, Galnick HR (1994) Heparin Enhances Endothelial Cell von Willebrand Factor Content by Growth Factor Dependent Mechanisms. *Thromb Haemost* 72:770–776. doi:10.1055/s-0038-1648956.
- Termine JD, Kleinman HK, Whitson S, Conn KM, McGarvey ML, Martin GR (1981) Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell* 26:99–105. doi:10.1016/0092-8674(81)90037-4.
- Tolba E, Müller WEG, Abd El-Hady BM, Neufurth M, Wurm F, Wang S, Schröder HC, Wang X (2016) High biocompatibility and improved osteogenic potential of

amorphous calcium carbonate/vaterite. *J. Mater. Chem. B* 4:376–386.
doi:10.1039/C5TB02228B.

Tsoref O, Tyomkin D, Amit U, Landa N, Cohen-Rosenboim O, Kain D, Golan M, Naftali-Shani N, David A, Leor J (2018) E-selectin-targeted copolymer reduces atherosclerotic lesions, adverse cardiac remodeling, and dysfunction. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 288:136–147.
doi:10.1016/j.jconrel.2018.08.029.

Ueda H, Hong L, Yamamoto M, Shigeno K, Inoue M, Toba T, Yoshitani M, Nakamura T, Tabata Y, Shimizu Y (2002) Use of collagen sponge incorporating transforming growth factor- β 1 to promote bone repair in skull defects in rabbits. *Biomaterials* 23:1003–1010. doi:10.1016/S0142-9612(01)00211-3.

Unger R, 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* 28:3965–3976.
doi:10.1016/j.biomaterials.2007.05.032.

Unger RE, Krump-Konvalinkova V, Peters K, Kirkpatrick C (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* 64:384–397. doi:10.1006/mvre.2002.2434.

Unger RE, Huang Q, Peters K, Protzer D, Paul D, Kirkpatrick CJ (2005) Growth of human cells on polyethersulfone (PES) hollow fiber membranes. *Biomaterials* 26:1877–1884. doi:10.1016/j.biomaterials.2004.05.032.

Unger RE, Halstenberg S, Günther H, Sartoris A, Brochhausen C, Kirkpatrick CJ (2009) Bewertung von neuartigen Biomaterialien zum Zweck der Knochenrekonstruktion und -regeneration : In-vitro-Versuche mit Mono- und Kokulturen von Osteoblasten und Endothelzellen. *Der Orthopäde* 38:1020–1028.
doi:10.1007/s00132-009-1491-x.

Unger RE, Ghanaati S, Orth C, Sartoris A, Barbeck M, Halstenberg S, Motta A, Migliaresi C, Kirkpatrick CJ (2010) The rapid anastomosis between prevascularized networks on silk fibroin scaffolds generated in vitro with cocultures of human microvascular endothelial and osteoblast cells and the host vasculature. *Biomaterials* 31:6959–6967. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.05.057.

Unger RE, Halstenberg S, Sartoris A, Kirkpatrick CJ (2011) Human endothelial and osteoblast co-cultures on 3D biomaterials. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 695:229–241. doi:10.1007/978-1-60761-984-0_15.

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* 1:38–45.

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* 35:3180–3187. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.12.059.

van der Poel-van de Luytgaarde SCPAM, Geertsma-Kleinekoort WMC, Goudswaard CS, Hogenbirk-Hupkes PE, van Hoven-Beijen MA, van de Werf M, Chu IWT, van Kapel J, Valk PJM (2013) Addition of β -mercaptoethanol is a prerequisite for high-quality RNA isolation using QIASymphony technology as demonstrated by detection of molecular aberrations in hematologic malignancies. *Genetic testing and molecular biomarkers* 17:475–480. doi:10.1089/gtmb.2012.0448.

- van Heest A, Swiontkowski M (1999) Bone-graft substitutes. *The Lancet* 353:28-29. doi:10.1016/S0140-6736(99)90228-3.
- Vimalraj S (2020) Alkaline phosphatase: Structure, expression and its function in bone mineralization. *Gene* 754:144855. doi:10.1016/j.gene.2020.144855.
- Wang L, Stegemann JP (2010) Extraction of high quality RNA from polysaccharide matrices using cetyltrimethylammonium bromide. *Biomaterials* 31:1612–1618. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.11.024.
- Weinandy S, Laffar S, Unger RE, Flanagan TC, Loesel R, Kirkpatrick CJ, van Zandvoort M, Hermanns-Sachweh B, Dreier A, Klee D, Jockenhoevel S (2014) Biofunctionalized microfiber-assisted formation of intrinsic three-dimensional capillary-like structures. *Tissue Engineering. Part A* 20:1858–1869. doi:10.1089/ten.tea.2013.0330.
- Weitzmann MN (2017) Bone and the Immune System. *Toxicologic pathology* 45:911–924. doi:10.1177/0192623317735316.
- Welsch U (Hrsg) (2003) *Sobotta Lehrbuch Histologie; Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie*. 1. Aufl. München: Elsevier Urban & Fischer, 119-136.
- Wilcke I, Lohmeyer JA, Liu S, Condurache A, Krüger S, Mailänder P, Machens HG (2007) VEGF(165) and bFGF protein-based therapy in a slow release system to improve angiogenesis in a bioartificial dermal substitute in vitro and in vivo. *Langenbecks Arch Surg* 392:305–314. doi:10.1007/s00423-007-0194-1.
- Williams DF (2006) To engineer is to create: the link between engineering and regeneration. *Trends in Biotechnology* 24:4–8. doi:10.1016/j.tibtech.2005.10.006.
- Williams DF (2009) On the nature of biomaterials. *Biomaterials* 30:5897–5909. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.07.027.
- Windisch P, Mólnar B (2017) Resorbierbare Barrieremembranen in der GBR und GTR. *Implantologie Journal*:6-12.
- Woodfin A, Voisin M-B, Nourshargh S (2007) PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 27:2514–2523. doi:10.1161/ATVBAHA.107.151456.
- Wu D, Zhou L, Lin J, Chen J, Huang W, Chen Y (2019) Immediate implant placement in anterior teeth with grafting material of autogenous tooth bone vs xenogenic bone. *BMC Oral Health* 19:266. doi:10.1186/s12903-019-0970-7.
- Yamada S, Obata A, Maeda H, Ota Y, Kasuga T (2015) Development of Magnesium and Siloxane-Containing Vaterite and Its Composite Materials for Bone Regeneration. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 3:195. doi:10.3389/fbioe.2015.00195.
- Yamaguchi A, Komori T, Suda T (2000) Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1. *Endocr Rev* 21:393–411. doi:10.1210/edrv.21.4.0403.
- Yamasaki H, Sakai H (1992) Osteogenic response to porous hydroxyapatite ceramics under the skin of dogs. *Biomaterials* 13:308–312. doi:10.1016/0142-9612(92)90054-R.
- 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.

- Yang J, Zhang YS, Yue K, Khademhosseini A (2017) Cell-laden hydrogels for osteochondral and cartilage tissue engineering. *Acta biomaterialia* 57:1–25. doi:10.1016/j.actbio.2017.01.036.
- Yashchenok A, Parakhonskiy B, Donatan S, Kohler D, Skirtach A, Möhwald H (2013) Polyelectrolyte multilayer microcapsules templated on spherical, elliptical and square calcium carbonate particles. *J. Mater. Chem. B* 1:1223–1228. doi:10.1039/C2TB00416J.
- Yoon J-S, Lee S-H, Yoon H-J (2014) The influence of platelet-rich fibrin on angiogenesis in guided bone regeneration using xenogenic bone substitutes: a study of rabbit cranial defects. *Journal of cranio-maxillo-facial surgery : official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery* 42:1071–1077. doi:10.1016/j.jcms.2014.01.034.
- Youssef Farhat (2012) RNA Extraction from Collagen Gels Using Qiagen's RNeasy Kit [Internet]. 05.02.2013 [zit. am 24.02.2021]. URL: <https://protocol-place.com/basic-lab-techniques/rna-purification/rna-extraction-from-collagen-gels-using-qiagens-rneasy-kit/>.
- Yuan H, Kurashina K, Bruijn JD de, Li Y, Groot K de, Zhang X (1999) A preliminary study on osteoinduction of two kinds of calcium phosphate ceramics. *Biomaterials* 20:1799–1806. doi:10.1016/S0142-9612(99)00075-7.
- Yuan H, Bruijn JD de, Li Y, Feng J, Yang Z, Groot K de, Zhang X (2001) Bone formation induced by calcium phosphate ceramics in soft tissue of dogs: a comparative study between porous alpha-TCP and beta-TCP. *Journal of materials science. Materials in medicine* 12:7–13. doi:10.1023/a:1026792615665.
- 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: official publication of the Orthopaedic Research Society* 22:30–38. doi:10.1016/S0736-0266(03)00155-4.
- Zhang Y, Tangl S, Huber CD, Lin Y, Qiu L, Rausch-Fan X (2012) Effects of Choukroun's platelet-rich fibrin on bone regeneration in combination with deproteinized bovine bone mineral in maxillary sinus augmentation: a histological and histomorphometric study. *Journal of cranio-maxillo-facial surgery : official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery* 40:321–328. doi:10.1016/j.jcms.2011.04.020.

10 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich zunächst bei meinem betreuenden Professor bedanken, unter dessen Verantwortung mir die Durchführung dieser experimentellen Arbeit mit allen zur Verfügung stehenden Mitteln des beteiligten Instituts ermöglicht wurde. Ein herzliches Dankeschön gilt darüber hinaus meinem zuständigen Betreuer, der stets mit Rat und Tat zur Hilfe stand und unter jeglichen Umständen die bestmögliche Unterstützung garantierte. Daneben möchte ich mich vielmals bei der gesamten Laborarbeitsgemeinschaft für ihre aufgeschlossene Integration bedanken.

11 Lebenslauf