

Aus der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik
Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie an der Universität
Tübingen

Die Biokompatibilität gestrickter Titannukleusprothesen der
Firma Buck und Co. GmbH

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhardt Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Grau, Philipp

2017

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. A. K. Nüssler

2. Berichterstatter: Professor Dr. H. P. Wendel

Tag der Disputation: 14.07.2016

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Abkürzungsverzeichnis | 7 |
| 1. Einleitung..... | 9 |
| 1.1 Der Discus intervertebralis..... | 10 |
| 1.2 Degenerative Veränderungen der Bandscheibe | 12 |
| 1.3 Ergebnisse bestehender Nukleusimplantate..... | 14 |
| 1.4 Die gestrickte Titannukleusprothese der Firma Buck und Co. GmbH 18 | |
| 1.5 Die Ziele der Arbeit | 20 |
| 2. Material und Methodik | 21 |
| 2.1 Materialien | 21 |
| 2.1.1 Chemikalien | 21 |
| 2.1.2 Geräte | 22 |
| 2.1.3 Verbrauchsmaterial | 23 |
| 2.1.4 Software | 23 |
| 2.2 Methoden..... | 24 |
| 2.2.1 Absorption | 24 |
| 2.2.2 Fluoreszenz..... | 24 |
| 2.2.3 SCP-1 Zellen..... | 25 |
| 2.2.4 Zellkultur..... | 25 |
| 2.2.5 Zellmedien..... | 26 |
| 2.3 Versuchsaufbau..... | 27 |
| 2.3.1 Zellauszählung mit Trypan-Blau | 28 |
| 2.4 Zeitlicher Versuchsablauf..... | 30 |
| 2.5 Messung des Resazurin Umsatzes | 31 |
| 2.5.1 Verwendete Lösungen und Geräte zur Messung des Resazurinumsatzes..... | 31 |
| 2.5.2 Durchführung | 31 |
| 2.6 Messung der AP-Aktivität..... | 32 |
| 2.6.1 Verwendete Lösungen und Geräte zur Bestimmung der AP- Aktivität..... | 33 |
| 2.6.2 Durchführung | 33 |
| 2.7 Alizarin-rot Bestimmung..... | 34 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 2.7.1 | Lösungen und Geräte zur Alizarin-rot Bestimmung..... | 35 |
| 2.7.2 | Durchführung | 35 |
| 2.8 | Epifluoreszenz | 36 |
| 2.8.1 | Lebend/Tod-Färbung..... | 37 |
| 2.8.2 | Calcein/Ethidiumbromid-Färbung..... | 38 |
| 2.8.3 | Alizarin-rot/Hoechst-Färbung | 40 |
| 2.9 | Schneiden der Drahtgestelle..... | 41 |
| 2.9.1 | Präparation der Implantate für den Schnitt..... | 41 |
| 2.9.2 | Schneideprozess der Drahtgestelle..... | 43 |
| 2.10 | Färbung der Drahtschnitte..... | 45 |
| 2.10.1 | Hämatoxylin/Eosin..... | 45 |
| 2.10.2 | Calcein/Ethidiumbromid | 46 |
| 2.10.3 | Autofluoreszenz von Kollagen | 48 |
| 2.11 | Mikroskopische Untersuchung struktureller Eigenschaften der Implantate | 49 |
| 2.11.1 | Software und Geräte | 49 |
| 2.11.2 | Bestimmung der Drahtzwischenräume..... | 50 |
| 2.11.3 | Bestimmung der Drahtfläche | 50 |
| 2.12 | Statistische Auswertung | 52 |
| 3. | Ergebnisse..... | 52 |
| 3.1 | Nachweis der Zellproliferation..... | 52 |
| 3.1.1 | Resazurin-Umsatz als indirekter Marker für Zellproliferation | 52 |
| 3.1.2 | Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der Zellproliferation | 58 |
| 3.2 | Differenzierungsfähigkeit der multipotenten SCP-1-Zellen | 59 |
| 3.2.1 | AP-Aktivität zur Bestimmung der Zelldifferenzierung | 59 |
| 3.2.2 | Alizarin-rot zur Bestimmung der Mineralisierung | 61 |
| 3.2.3 | Epifluoreszente Nachweis von Matrixbildung | 63 |
| 3.3 | Zellwachstumsmuster auf den Drahtgestellen | 66 |
| 3.3.1 | Mikroskopische Bestimmung des Zellwachstums mit Hilfe der Epifluoreszenz..... | 66 |
| 3.3.2 | Lichtmikroskopische Untersuchung der Zellausbreitung an gefärbten Schnitten | 68 |
| 3.4 | Mikroskopisch bestimmte technische Daten der Implantate | 73 |
| 3.4.1 | Drahtzwischenräume der Drähte..... | 73 |
| 3.4.2 | Fläche der Titandrähte im Querschnitt | 75 |

| | |
|---|-----------|
| 4. Diskussion | 76 |
| 4.1 Schlussfolgerung | 83 |
| 4.2 Ausblick | 84 |
| 5. Zusammenfassung | 85 |
| 6. Abbildungsverzeichnis | 87 |
| 7. Tabellenverzeichnis | 89 |
| 8. Literaturverzeichnis | 90 |
| 9. Erklärung zum Eigenanteil | 95 |
| 10. Veröffentlichungen | 96 |
| 11. Danksagung | 97 |

Abkürzungsverzeichnis

| Abkürzung | Beschreibung |
|--------------------|--|
| 2D | zweidimensional |
| Abb. | Abbildung |
| AM | Acetoxymethylester |
| AP | alkalische Phosphatase |
| BMP-2 | Bone-morphogenetic protein 2 |
| ca. | circa |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EZM | extrazelluläre Matrix |
| ddH ₂ O | destilliertes H ₂ O |
| d.h. | das heißt |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DPBS | Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline |
| dpi | dots per inch |
| FCS | fetal calf serum |
| hTERT | human telomerase reverse transcriptase |
| LDL | low density lipoprotein |
| MEM | Minimum Essential Medium Eagle |
| mRNA | Messenger Ribonukleinsäure |

| | |
|--------------|-------------------------------------|
| MW | Molecular weight (Molekulargewicht) |
| N | biologische Replikate |
| n | technische Replikate |
| NIH | national Institute of health |
| ODI | oswestry disability index |
| PEEK | Polyetheretherketon |
| PMMA | Polymethylmethacrylat |
| pNP | 4-Nitrophenol |
| RT | Raumtemperatur |
| SCP | single-cell-picked clones |
| Tab. | Tabelle |
| TGF- β | transforming growth factor beta |
| Tiff | tagged image file format |
| UV | ultraviolett |
| VAS | visuelle Analogskala |
| z.T. | zum Teil |

1. Einleitung

Einer der häufigsten Gründe für den Arztbesuch sind Rückenschmerzen. Sie sind neben Kopfschmerzen die häufigsten Schmerzsyndrome und führen durch eine ausgeprägte Chronifizierungstendenz bei den Betroffenen zu einer erheblichen Einschränkung der Lebensqualität (Abb.: 1). Nach den Daten der telefonischen Gesundheitsumfrage des Robert-Koch-Instituts (DSTel 03 und GEDA 2009) litten in den letzten 12 Monaten des jeweiligen Befragungszeitraumes 22% der Frauen und 16% der Männer unter Rückenschmerzen, die über drei Monate oder länger, fast täglich auftraten [1]. Die Prävalenz steigt mit zunehmendem Lebensalter [1], wobei sie im sechsten bis siebten Lebensjahrzehnt wieder abfällt und die einzelne Rückenschmerzepisode eine Lebenszeitprävalenz von ca. 74-84% aufweist [1, 2]. Diese epidemiologischen Daten erklären die außerordentliche Belastung der Gesundheitsversorgung sowie die volkswirtschaftlichen Kosten von ca. 17 Milliarden € jährlich [2], welche vergleichbar mit denen von Volkserkrankungen wie Diabetes, Herzerkrankungen und Depressionen sind. Der größte Teil der Gesamtkosten wird durch die Minderheit der chronischen Rückenschmerzpatienten und eine inadäquate Diagnostik verursacht [3]. Assoziiert mit Rückenschmerzen sind neben körperlichen Faktoren wie weibliches Geschlecht, Arthrose oder Arthritis, Rauchen, Bewegungsmangel und Übergewicht auch psychosoziale Komponenten wie ein niedriges Bildungsniveau, Schichtarbeit, Arbeitslosigkeit und Depression [1, 4]. Eine klinische Einteilung der Rückenschmerzen erfolgt nach Korff et al. in vier Grade je nach Schmerzausprägung und Funktionseinschränkung [5]. Diagnostisch werden von den häufigeren sog. unspezifischen Rückenschmerzen, ohne klare Ursache, die spezifischen Rückenschmerzen, mit pathologischem Korrelat unterschieden. Verantwortliche sind oft lumbale Radikulopathien, dessen häufigste Ursache der Bandscheibenprolaps ist [6].

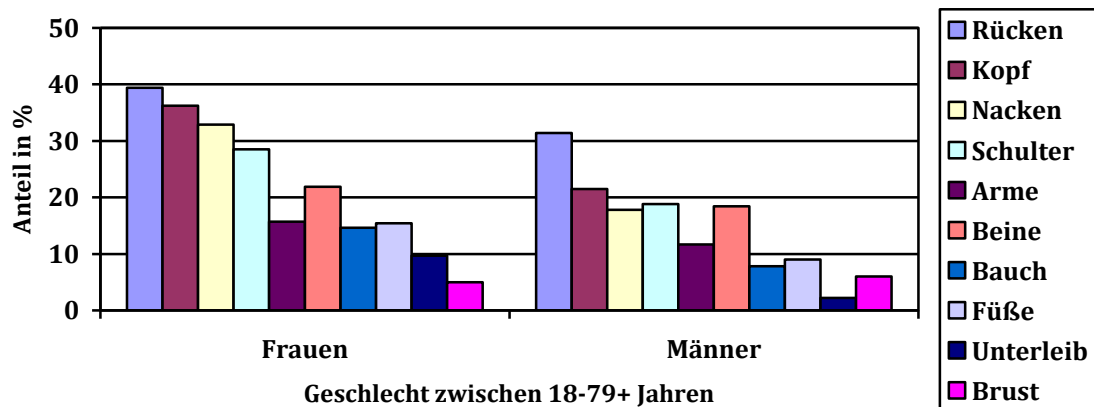


Abbildung 1: Geschlechtsspezifische Schmerzprävalenz nach Körperregionen aus Daten des Bundesgesundheitsurvey 1998 nach Bellach et al. [7]

1.1 Der Discus intervertebralis

Die Bandscheibe ist ein bindegewebiges Organ bestehend aus hyalinen Knorpelplatten und einem faserknorpeligen Anulus fibrosus, der den Nucleus pulposus, einen gallertartigen Kern, umgibt. Der Faserknorpel des Anulus fibrosus, ist aus ca. 20 konzentrischen, jeweils gegenläufigen Lamellen aufgebaut [8] und besteht vorwiegend aus Kollagen-Typ 1 [9, 10]. Er besitzt kein Perichondrium, so dass ein kontinuierlicher Übergang [11] in angrenzende Strukturen besteht und die Knorpelplatten der Wirbelkörper durch schraubenförmige Fasern miteinander verbunden werden, wobei die Fasern im dorsalen Discusabschnitt weniger stark ausgeprägt sind als ventral und lateral [12].

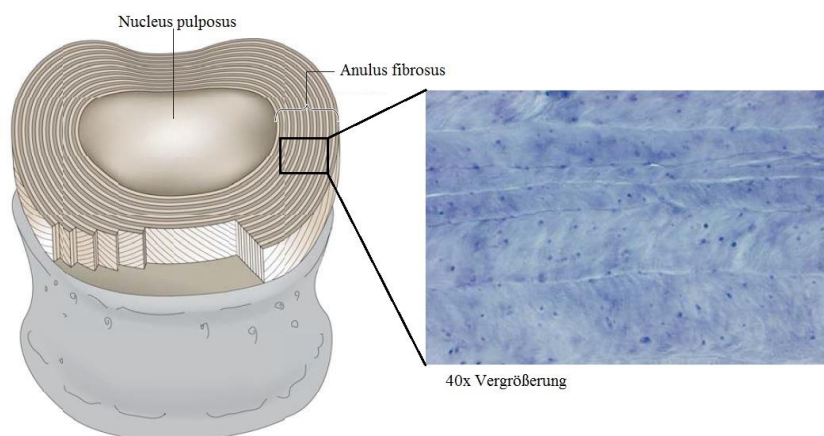


Abbildung 2: Aufbau der Bandscheibe modifiziert nach Käfer, W. et al. und Ulfig, N. [9, 13]

Der Hauptbestandteil des Nucleus pulposus ist Wasser (altersabhängig 90-74%), welches vorwiegend durch Mukopolysaccharide, Proteoglykane wie Aggrecan und Kollagen-Typ II so stark gebunden wird, dass es starken mechanischen Kompressionen weitgehend standhält [10, 12, 13]. Dies führt zu einem ausgeprägten hydrostatischen Druck im Inneren der Bandscheibe, so dass diese bei Entfernung aus der Wirbelsäule eine Kugelform anstreben würde. Im Laufe des Tages ist der Wasserverlust trotzdem so groß, dass sich die Körpergröße durchschnittlich um 1,13% reduziert, was sich bei nächtlicher Entlastung wieder regeneriert. Im Laufe des Lebens sinkt der Wassergehalt um 16% und es bilden sich Hohlräume sowie Calciumphosphatkristalle [12]. Während beim Neugeborenen die äußeren Anteile der Bandscheibe durch Gefäße versorgt werden, fehlen schon ab dem Kleinkindalter sowohl vaskuläre als auch neuronale Strukturen im Inneren der Bandscheibe, was mit zunehmendem Alter fortschreitet [14], weshalb die Nutrition vor allem durch Diffusion aus randständigen Gefäßen im Bereich der Deckplatten stattfindet [12, 13]. Beim Vorgang der Diffusion spielen vor allem die Wechselwirkungen des hydrostatischen Druckes sowie des onkotischen Druckes im Bandscheibenkern und umliegendem Gewebe eine Rolle. Durch hohen mechanischen Druck übersteigt der hydrostatische Druck die Wasserbindungskapazität der Bandscheibe. Dabei werden durch diese Kompression die hydrophilen Komponenten konzentriert, so dass der Wasserverlust begrenzt wird und bei Entlastung der Bandscheibe der erhöhte onkotische nukleäre Druck gegenüber dem Umgebungsdruck zum Einstrom von Wasser und damit auch niedermolekularen Nährstoffen führt [12]. Biomechanisch interagiert die Bandscheibe stets mit benachbarten Strukturen wie den Wirbelgelenken, welche bei Bandscheibendegenerationen mitbetroffen sein können [12].

Trotz seines vergleichsweise einfachen Aufbaus, erfüllt der Discus intervertebralis komplexe mechanische Aufgaben. Neben der gleichmäßigen Kraftweiterleitung im statischen Zustand und der Stoßdämpfung [12], wird durch die inkompressiblen Eigenschaften des Wassers der Nucleus pulposus entgegengesetzt der Belastung verschoben, so dass der Anulus fibrosus vorwiegend auf Zug beansprucht wird [8]. Das Verhalten ähnelt dabei, in

Abhängigkeit von der Belastung, sowohl flüssigen als auch festen Materialien, was bei der Auswahl eines geeigneten Nukleusersatzes relevant ist [15]. Der Quelldruck des Nukleus setzt den Anulus unter Spannung, so dass die Stabilität der einzelnen Wirbelsegmente untereinander gewährleistet wird, dabei begrenzt der Anulus fibrosus die Bewegung der Wirbelkörper gegeneinander [9]. Trotzdem ermöglichen erst die Disci intervertebrales die vielfältige und essentielle Beweglichkeit der Wirbelsäule im Rahmen alltäglicher Bewegungen [8, 11, 12]. Die Bandscheiben sind dabei so stabil, dass selbst bei hohen mechanischen Beanspruchungen tendenziell eher die angrenzenden Wirbelkörper beschädigt werden als diskale Strukturen [12]. Treten jedoch alters- und stoffwechselbedingte Läsionen im Anulus fibrosus auf, die dem Gallertkern Raum über das physiologische Maß hinaus geben, so dass die biomechanischen Eigenschaften kompromittiert werden oder kommt es zu strukturellen Veränderungen im Aufbau des Nucleus pulposus, stellt die Bandscheibe ein fragiles Gebilde dar, das den Belastungen auf Dauer nicht mehr stand hält [6, 12].

1.2 Degenerative Veränderungen der Bandscheibe

Die Degeneration der Zwischenwirbelstrukturen beginnt abhängig von genetischen, mechanischen und biologischen Faktoren oft ab der dritten Lebensdekade [13, 14, 16, 17]. Auf erste Defekte, einhergehend mit einer erhöhten Zelldichte, der hyalinen Knorpelplatten in der ersten Lebensdekade, folgen fibrosierende Veränderungen des Nucleus pulposus [14]. Der Proteoglykangehalt im Nukleus nimmt ab und es kommt zum Umbau von Kollagen Typ II zu Kollagen Typ I [13]. Die Zellen prolabierte Nuclei zeigen eine erhöhte Produktion von Metalloproteasen und eine gesteigerte Zellalterung [11]. Zusätzlich wandern Nerven in den Nukleus ein und können dadurch zu einem diskogenen Schmerz beitragen [18]. Der Anulus fibrosus zeigt erst später, v.a. zentral deutliche Risse und Spaltbildungen. Diese Risse werden durch hyalinisiertes Kollagen ersetzt und es kommt im weiteren Verlauf zu einer Zellproliferation bis hin zu Neovaskularisation entlang der Spaltbildungen [14].

Die beschriebene Abnahme der Vaskularisation der Bandscheibe im Kindesalter bei gleichzeitigem Wachstum der Bandscheiben führt zu einer Verlängerung der Diffusionsstrecke und fördert dadurch die Entstehung degenerativer Defekte, deren Maximum im Alter zwischen 51 und 70 Jahren erreicht wird [14, 16]. Diese strukturellen Veränderungen sind dafür verantwortlich, dass der Diskus den mechanischen Ansprüchen nicht mehr gerecht wird und es bei intaktem Anulus fibrosus zur Bandscheibenprotrusion und anschließendem Defekt, zum Bandscheibenprolaps in den Spinalkanal kommt. Dazu kommen weitere Beeinträchtigungen der umliegenden Strukturen durch statische Dysbalancen, wie die Facettengelenksarthrose [13].

Für die Symptomatik ist nicht ausschließlich die mechanische Kompression des Rückenmarks ursächlich [6], da auch radiologisch nachgewiesene Bandscheibenvorfälle (ca. 30%) klinisch unauffällig bleiben können [13]. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass durch den Kontakt von Rückenmark und Bandscheibe eine Entzündung initiiert wird, die durch Zellinfiltration und oxidativen Stress [17, 19] ebenfalls zur Pathogenese beiträgt [20, 21]. Ferner führt die sekundäre Affektion an freien Nervenendigungen der Wirbelgelenke zu Beschwerden [22] und im Sinne einer Arthrose zu mechanischen Rückenschmerzen [13].

Typische Symptome sind, abhängig von der Lokalisation des Bandscheibenvorfalles, ausstrahlende Schmerzen in das Bein, Paresen, sensible Störungen sowie ggf. Blasen- und Mastdarmstörungen, welche durch die Kompression und Inflammation des umliegenden neuronalen Gewebes begründet werden. Die konkreten Schmerzen im Rücken entstehen durch Druck auf das hintere Längsband der Wirbelsäule (Lig. longitudinale post.) bei einer Bandscheibenvorwölbung in der Medianlinie [6]. Für den von der Bandscheibe ausgehenden Schmerz wird der pathologisch innervierte, degenerative Nucleus pulposus, die Nerven an der Oberfläche des Anulus fibrosus und die schmerzweiterleitende plexiforme sinuvertebrale Nervenstruktur verantwortlich gemacht [18].

Neben einer genetischen Disposition und mechanischen Überbeanspruchungen werden Alter, erhöhtes LDL, Übergewicht [23] Arteriosklerose [24], Gewebsinfarkte [11] und Herpesinfektionen [25] als Risikofaktoren diskutiert.

Die Therapie des Bandscheibenvorfalles kann bei einer Vielzahl der Patienten konservativ erfolgen. Eine operative Therapie wird erst bei Versagen der konservativen Behandlungsmöglichkeiten sowie eines definierten morphologischen Korrelats für die Beschwerden angestrebt [13]. Infrage kommen je nach Ausprägung des Krankheitsbildes eine Diskektomie [13] oder, als Standard der stabilisierenden Verfahren, die interkorporelle Fusion [26, 27]. Neuere Therapieverfahren wollen eine Wiederherstellung der Bandscheibe mittels Bandscheiben- oder Nukleusersatz erzielen [13, 26].

1.3 Ergebnisse bestehender Nukleusimplantate

Der aktuelle Goldstandard in der operativen Therapie der Bandscheibendegeneration ist die korporale Fusion mit dem Ziel die segmentale Stabilität wiederherzustellen und schmerzauslösende mechanische Pathologien zu beseitigen. Die wenig erfolgreichen klinischen Langzeitergebnisse bezüglich der Schmerzproblematik und die sog. Anschlussdegeneration, eine durch unphysiologische Überlastung erzeugte Degeneration benachbarter Wirbelsegmente (20% der Patienten [13]), veranlassten die Suche nach neuen Behandlungsoptionen [28-32]. Dazu wandte man sich dynamischen Stabilisierungssystemen zu, um das physiologische Bewegungsausmaß der Wirbelsäule wiederherzustellen und gleichzeitig den diskogenen Schmerz zu therapieren. Neben dynamischen pedikelbasierten dorsalen Stabilisierungssystemen wie den interspinösen Platzhaltern wurden Prothesen für den Ersatz der gesamten Bandscheibe, des Facettengelenks sowie des Nucleus pulposus entwickelt [26, 27]. Im Folgenden soll hier die Entwicklung der Nukleusprothesen genauer betrachtet werden.

Die Intention zur Entwicklung eines Nukleusersatzes war vor allem die Möglichkeit, das Operationstrauma und die damit verbundene Morbidität zu

reduzieren. Bandscheibenprothesen sind auf einen anterioren oder lateralen Operationszugang angewiesen, was bei den kleinen Nukleusimplantaten nicht zwingend erforderlich ist [27]. Als eine essentielle Voraussetzung gilt ein intakter Anulus fibrosus [27] sowie weitgehend intakte Facettengelenke [33], so dass frühere und milde Stadien der Bandscheibendegeneration die therapeutische Zielgruppe bilden [31, 33]. Ohne intakte Begleitstrukturen scheint ein symptomatischer Behandlungserfolg nur wenig wahrscheinlich [33, 34]. Zur Indikationsstellung sollten keine Voroperation, Infektion, Tumoren, Sponylolisthesen, Stenosen oder Übergewicht vorliegen. Ferner wird ein Versagen der konservativen Therapie gefordert [33].

Phillips und Laurysen (2010) sehen die Anforderungen an ein Nukleusimplantat darin, dass neben der Wiederherstellung der biomechanischen Eigenschaften, wie gleichmäßige Kraftverteilung im Segment und Beweglichkeit, das Implantat so stabil und haltbar ist, dass keine Migration stattfindet, es nicht zum Einsinken kommt oder ausgedehnter Materialabrieb entsteht. Insbesondere der zentrale Anteil des Anulus fibrosus ist darauf angewiesen, durch den Pumpmechanismus des Nukleus per diffusion Nährstoffe zu erhalten, was durch das Implantat ebenfalls geleistet werden sollte. Des Weiteren spielt die einfache Implantierbarkeit eine wichtige Rolle für die klinische Handhabung [35]. Carl et. al. (2004) betont zusätzlich, dass ein Nukleusimplantat über entsprechende mechanische und biologische Eigenschaften verfügen sollte, um sowohl den Schmerz zu behandeln als auch die Anschlussdegeneration zu vermeiden [33]. Das Implantat soll nach Goins et al (2005) über 40 Jahre bis zu 100 Millionen Bewegungszyklen standhalten und dabei nur minimalen Abrieb zulassen [36]. Die Autoren sind sich darüber einig, dass die Biokompatibilität eine essentielle Voraussetzung für eine *in Vivo* Anwendung der Nukleusimplantate darstellt [33, 35-37].

Die Entwicklung begann in der Mitte des 20. Jahrhunderts mit unterschiedlichsten Herangehensweisen, die sich mit dem physiologischen und anatomischen Erkenntnisgewinn über die Bandscheibe verbesserten [27, 32, 33, 38]. Man unterscheidet hauptsächlich solide Implantate aus Metallen oder

Polymeren und viskoelastische, z.T. injizierbare, Präparate [27]. Auf dem Gebiet der soliden Nukleusprothesen leisteten Fernström et al. durch die Entwicklung einer Metallkugel als Nukleusersatz Pionierarbeit [27, 33, 35]. Die Kugel führte jedoch zu verstärkter segmentaler Hypermobilität und sank in die angrenzenden Strukturen ein, was den Erfolg dieses ersten Ansatzes schmälerte [27]. Zusätzlich konnte diese Prothese die mechanischen Eigenschaften der Bandscheibe nur unzureichend wiederherstellen und fand aus diesen Gründen keine breite klinische Anwendung [35]. Die Versuche an präformierten viskoelastischen Implantaten begannen ebenfalls wenig erfolgreich mit Silikonimplantaten, die an Materialermüdung scheiterten [39]. Nachteilig ist ebenfalls die erschwerte Größenanpassung und ein größeres Operationstrauma [36]. Gleichzeitig bestand einer der ersten viskoelastischen Ansätze darin, Elastomere wie Polymethylmethacrylat (PMMA) [36], Silikon (Nachemson 1962 [36]) oder Dacron [33] in das Lager des Nukleus zu injizieren [27, 33]. Neuere Varianten sind sog. Hydrogele aus Hyaluronsäure oder Polysacchariden [40], die entweder gekapselt oder frei appliziert werden und neben den biomechanischen Eigenschaften auch den osmotischen Nährstofftransport wiederherstellen sollen [41], da sie gebundenes Wasser unter Belastung abgeben und es anschließen wieder aufnehmen [36]. Freie Hydrogele härten *in situ* und werden via Katheder in den Hohlraum des Nukleus injiziert, wodurch diese lückenlos den Raum bei geringem Operationstrauma ausfüllen. Ein Austritt der meist toxischen Komponenten in die Umgebung birgt dabei jedoch einen Nachteil [36]. Beispiele dafür in der Entwicklung sind die BioDisc (Cryolife, Kennesaw, GA USA), welche bei Belastungstests nach 10 Millionen Bewegungszyklen einen reversiblen Höhenverlust von 10% zeigte [33]. Exemplarisch für ein umhülltes Hydrogel ist Dascor (Disc Dynamics, Eden Prairie, MN USA), bei welchem das gekühlte Hydrogel in einen vorgeformten Ballon eingebracht wird [33]. Weitere Ansätze bestanden im Einbringen von hydrophilen Coils, wie das Newcleus Spiral Implant (Centerpulse Orthopedics, Winterthur Schweiz), die sich nach dem Einsetzen in die Nukleushöhle zu einer spirale ausweiten (Abb.: 4). Diese zeigte bisher gute biokompatible sowie klinische Ergebnisse und ist weiterhin Gegenstand der Entwicklung [36]. Das

aktuell am häufigsten verwendete Implantat, der Prosthetic Disc Nucleus von Raymedica inc. (Bloomington, MN), wird bereits seit den späten achtziger Jahren des letzten Jahrhunderts entwickelt [27, 33, 36]. Die Prothese ist ein Kompromiss aus freiem Hydrogel und präformiertem Implantat [36]. Es besteht aus einem getrocknetem Hydrogel, das in einem Polyethylenetz eingeschlossen ist [33] (Abb.: 3). Die hydrophilen Komponenten dieses Implantats nehmen bis zu 80% ihres Gewichts an Wasser auf und Stellen somit anatomisch die Bandscheibe wieder her, während die straffe Hülle eine Ausbreitung in die horizontale Richtung verhindert. Dabei zeigte die Prothese gute biomechanische Ergebnisse und erwies sich als biokompatibel [36]. Problematisch war die starke Migrationstendenz und Revisionsraten von 10-50% [27, 42]. Die mechanische Nucleusprothese NUBAC™ gehört zu den ersten artikulierenden Prothesen und wird aktuell am zweithäufigsten implantiert [27]. Sie besteht aus zwei Deckplatten aus Polyetheretherketonen (PEEK), die über einen Ball in Gelenkpfannen in Verbindung stehen. Im 2-Jahres-Follow-up konnte die Prothese hinsichtlich des Schmerzes (VAS und ODI) sowie Komplikationsrate gute Ergebnisse liefern [43].

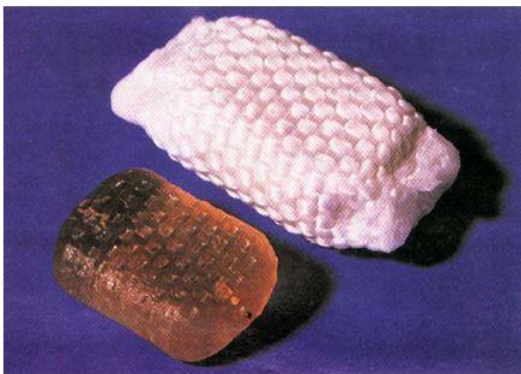


Abbildung 3: Prosthetic Disc Nucleus (aus Goins et al. [36])

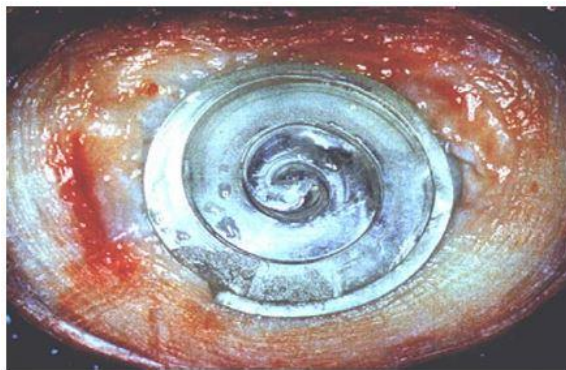


Abbildung 4: Newcleus spiral implant (aus Goins et al [36])

Zusammenfassend ist zu sagen, dass sich eine Vielzahl von Materialien, Applikationsformen und Modellen gegenwärtig in der Entwicklung befinden, wobei das größte Problem die Migration der Implantate bleibt [27, 44]. Ferner fehlen klinische Langzeitstudien, die einen konkreten Vorteil dieser Methode

nachweisen können. Das große Potenzial der Nukleusimplantate besteht weiterhin in einem geringen Operationstrauma bei guten biomechanischen Ergebnissen und der Wiederherstellung ursprünglicher Verhältnisse. Diese Methode wird jedoch nur einer kleinen Patientengruppe mit moderaten Bandscheibendegenerationen vorbehalten bleiben, weil man für einen Therapieerfolg nicht auf weitgehend gesunde umliegende Strukturen verzichten kann [27, 33, 37].

1.4 Die gestrickte Titannukleusprothese der Firma Buck und Co. GmbH

Eine Neuentwicklung in der Kategorie der mechanischen Nukleusimplantate ist die gestrickte Titannukleusprothese der Firma Buck und Co. GmbH (Abb.: 5). Das Implantat besteht aus verschlungenen Titanfäden mit einem Durchmesser von ca. 250 μm , welche die Form einer Bandscheibendeckplatte einnehmen. Der Gedanke, dass gestrickte Titanfäden die Funktion einer Bandscheibe wiederherstellen könnten, stammt aus der Automobilindustrie, in der gestrickte Titanfäden laut Hersteller schon seit einiger Zeit als Dämpfungselemente verbaut werden.



Abbildung 5: Die gestrickte Titannukleusprothese (aus Kettler, 2007 [45])

Durch seine makroskopisch raue Oberfläche hat dieses Implantat das Potenzial eines der Kernprobleme in der Nukleusprothetik, die Implantatmigration, zu lösen. Gleichzeitig wird erwartet, dass die Konfiguration der Prothese eine

optimale Dämpfung und damit Lastenverteilung im Segment ermöglicht. Kettler et al. (2007) untersuchten diese Annahmen sowie Fragen zur Materialermüdung in einer ersten Machbarkeitsstudie. Dazu wurde die Prothese in lumbale Bandscheiben vom Kalb implantiert und mechanische Parameter wie die axiale Steifigkeit, Flexibilität und Höhenverlust sowie Migrationstendenz unter zyklischer Dauerbelastung bestimmt. Nach Abschluss der mechanischen Tests wurde das Segment eröffnet und nach Ermüdungserscheinungen, Abrieb und Veränderungen im Implantatlager gesucht.

Die Studie zeigte, dass die Prothese in der Lage ist, die Höhe der Bandscheibe auch nach Dauerbelastung ideal wiederherzustellen, und somit vergleichbar mit dem erwähnten Prosthetic Disc Nucleus und dem Newleus spiral implant ist. Ebenfalls vielversprechende Ergebnisse wurden bei der axialen Steifigkeit beschrieben, die sich nicht signifikant von der einer intakten Probe unterschied. Schwächen tauchten bei den Flexibilitätstests in Extensions- und Flexionsbewegungen auf, welche nach Dauerbelastung deutlich, bis um das Doppelte, gesteigert waren. Dies führte man zum einen darauf zurück, dass bereits nach Implantation die Lordose gesteigert war, was möglicherweise durch eine bessere Größenanpassung des Implantats revidiert werden könnte. Eine weitere Ursache für das schlechtere Abschneiden könnte der Implantationsdefekt im Anulus fibrosus darstellen. In der Seitneigung zeigte die Nukleusprothese jedoch deutlich bessere wiederherstellende Eigenschaften. Die Frage nach der Migration des Drahtgestells sollte mit Röntgenbildern, vor und nach der Dauerbelastung, sowie der makroskopischen Betrachtungen der Implantatlager beantwortet werden. Die Untersucher fanden dabei keine Austreibung des Implantats, jedoch eine Migration nach anterior. Nach ihren Ergebnissen wird die Migrationstendenz jedoch als vergleichsweise gering eingeschätzt, wobei diese Abhängig von der chirurgisch konstruierten Implantathöhle und Lokalisation in der Bandscheibe sei sowie durch bessere Instrumentarien und chirurgischer Präparation behoben werden könne [#]. Bei der Makroskopischen Betrachtung wurden einzelne Bruchstücke der Titanfäden detektiert, die womöglich schwerwiegende Komplikationen erzeugen könnten.

In vorausgegangen Tests zur Materialermüdung und –abrieb, erwies sich das Material jedoch als stabil [45].

Neben den mechanischen Anforderungen ist man sich darüber einig, dass die Biokompatibilität eine wesentliche Voraussetzung für die Anwendung der Implantate *in Vivo* darstellt [33, 36].

1.5 Die Ziele der Arbeit

Die vorliegende Arbeit soll die Frage klären, wie die neuen Titanimplantate *in vitro* mit Zellen interagieren und eine Einschätzung der Biokompatibilität liefern [#].

Die Überprüfung Biokompatibilität des Titannukleusersatzes *in vitro*, soll die Grundlage schaffen für die weiterführende *in vivo* Anwendung. Titan hat sich in der Prothetik bereits als sehr verträgliches Material mit guter Möglichkeit zur bildgebenden Kontrolle etablieren können [46]. Trotz dieser Materialeigenschaften soll der Beweis erbracht werden, dass auch die gestrickten Titannukleusprothesen der Firma Buck und Co. GmbH mit ihrer drahtgestellartigen Konfiguration *in vitro* biokompatibel ist, bevor es zur weiteren Anwendung *in vivo* kommt. Des Weiteren sollen Erkenntnisse über das Wachstumsmuster der Zellen, d.h. Zellverteilung, Adhäsion am Drahtgestell und Matrixbildung, gewonnen werden, mit der Frage, inwiefern die biologische Umgebung mit den mechanischen Eigenschaften interferieren könnte.

Für die folgenden Untersuchungen zu der *in vitro* Biokompatibilität soll diese in Anlehnung an vergleichbare Studien [47-49] durch die Proliferation, die Differenzierung und ein adhäsives Wachstumsmuster definiert werden.

2. Material und Methodik

2.1 Materialien

Das folgende Kapitel stellt die verwendeten Materialien tabellarisch mit Name, Hersteller und Artikelnummer dar.

2.1.1 Chemikalien

Tab. 1: Chemikalienliste

| Chemikalie | Hersteller | Artikelnummer |
|--|----------------|---------------|
| Alizarin-rot S (C.I.58005) | Carl Roth | 0348.2 |
| Calcein | Sigma Aldrich | M1255 |
| Calcein acetoxymethyl ester (Calcein AM) | Sigma Aldrich | 17783-1MG |
| Calcium chloride | Carl Roth | CN93.1 |
| Cetylpyridiumchlorid monohydrate 98 % | Carl Roth | CN27.1 |
| Dexamethason | Sigma Aldrich | D2915-100MG |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Carl Roth | 4720.2 |
| ddH ₂ O | Carl Roth | 3175.1 |
| Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) | Sigma Aldrich | P8537 |
| Eosin nach Gill | Morphisto GmbH | 13733.00250 |
| Ethanol | Carl Roth | 5054.1 |
| Ethidium homodimer | Sigma Aldrich | 46043-1MG-F |
| Ethidiumbromid | Carl Roth | 2218.1 |
| Fetales Kalbserum (FCS) | Gibco | 10270-106 |
| Formaldehyd | Carl Roth | 4979.1 |
| β-Glycerophosphat | Sigma Aldrich | G9422-10G |
| Hämatoxylin nach Gill | Morphisto GmbH | 11773.00250 |
| Hepes | Carl Roth | HN78.2 |
| Hoechst 33342 | Sigma Aldrich | 14533-100MG |
| L-Ascorbinsäure-2-phosphat | Sigma Aldrich | A8960-5G |
| Magnesiumchlorid | Carl Roth | KK36.2 |
| MEM Alpha Modifikation mit Glutamine ohne Nukleoside | Gibco | 22561-054 |
| NaOH | Carl Roth | T135.1 |
| 4-Nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate (pNPP) | Carl Roth | 4165.1 |
| 4-Nitrophenol solution 10 mM (pNP) | Sigma Aldrich | N7660 |

| | | |
|-------------------------|----------------|-----------|
| Penicillin/Streptomycin | Sigma Aldrich | P0781 |
| Resazurin Natriumsalz | Sigma Aldrich | 199303-1G |
| Technovit 7200 | Heraeus Kulzer | 51000 |
| Technovit 7210 VLC | Heraeus Kulzer | 51100 |
| Technovit 7230 VLC | Heraeus Kulzer | 51300 |
| Tris-Base | Sigma Aldrich | T1503-1KG |
| Trypan Blue 0.5 % | Carl Roth | CN76.1 |
| Trypsin/EDTA | Sigma Aldrich | T3924 |
| Xylol | VWR Chemicals | 28973.294 |

2.1.2 Geräte

Tab. 2: Geräteliste

| Gerät | Hersteller |
|--|--|
| Inkubator: <ul style="list-style-type: none"> CO₂-Inkubator C150 | Binder GmbH, Tuttlingen Deutschland |
| Kühlager: <ul style="list-style-type: none"> Liebherr Comfort +4 °C/-20 °C Forma 900 Series -80 °C | Liebherr, Bulle Deutschland Thermo Scientific, Waltham |
| Mikroskope: <ul style="list-style-type: none"> EVOS fl (Fluoreszenzmikroskop) Primo Vert 12 V DC, 30 W | Advanced Microscopy Group, Mill Creek WA USA Zeiss, Oberkoch Deutschland |
| Schneidesystem <ul style="list-style-type: none"> Exakt Klebepresse Exakt 520 Lichtpolymerisationsgerät Exakt Diamantbandsäge 300/310 CP/R Profil Exakt Schleifsystem 400 CS Exakt AW 110 Mess- und Kontrollsystem Mikrometerschraube mit Digitalanzeige | EXAKT Apparatebau GmbH & Co. KG, Norderstedt Deutschland |
| Schleifpapier mit P800/1000, Durchmesser 270 mm SiC Nassschleifpapier P2500, Durchmesser 270 mm SiC Nassschleifpapier K4000, Durchmesser 270 mm SiC Einbettformen 2 Mulden, klein 16 mm Objekträger (25x75x1,5mm) | RESOLAB GmbH, Marburg Deutschland |
| Schwenktisch: Shaker DRS-12, Sky Line | EIMI Ltd., Riga Lettland |
| Sterilbank: <ul style="list-style-type: none"> Safe 2020, Class 2, EN 12469 | Thermo Fisher Scientific, Waltham MA USA |
| Spektralphotometer <ul style="list-style-type: none"> Omega plate-reader | FluoStar Omega, BMG Labtech Ortenberg Deutschland |
| Pipetten: <ul style="list-style-type: none"> 0,1 -2,5 µl Research Pipette Lambda plus 0,5-10 µl Research Pipette Lambda plus 10-100 µl Research Pipette Lambda plus | Corning, New York NY USA |

| | |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> • 50-200 µl Research Pipette Lambda plus • 100-1000 µl Research Pipette Lambda plus | |
| Waagen: <ul style="list-style-type: none"> • Laborwaage: Kern PCB 250-3 • Feinwaage: Kern ABJ 120 4M | Kern & Sohn GmbH, Balingen Deutschland |
| Wasserbad: <ul style="list-style-type: none"> • AQUAline AL 25 | Lauda, Lauda, Königshofen Deutschland |
| Zentrifugen <ul style="list-style-type: none"> • Haraeus Megafuge 40R | Thermo Fisher Scientific, Waltham MA USA |

2.1.3 Verbrauchsmaterial

Tab. 3: Verbrauchsmaterialiste

| Material | Hersteller |
|--|---|
| Mikrotiterplatten <ul style="list-style-type: none"> • 24 Well • 96 Well | Greiner Bio One, Frickenhausen Deutschland |
| Kulturflaschen <ul style="list-style-type: none"> • T25 • T75 • T175 | Greiner Bio One, Frickenhausen Deutschland |
| Spritzen (steril): <ul style="list-style-type: none"> • 2 ml Injekt • 10 ml Injekt | B Braun, Melsungen Deutschland |
| Sterilfilter für Spritzen <ul style="list-style-type: none"> • Millex GP 0,22 µm | Merck Millipore, Billerica, MA, USA |
| Pipettenspitzen | Starlab Tip One, Hamburg Deutschland |
| Röhrchen (Tubes) <ul style="list-style-type: none"> • 15 ml Cellstar Tubes, graduated, conical bottom • 50 ml Cellstar Tubes, graduated conical bottom | Corning, New York NY USA |

2.1.4 Software

Tab. 4: Softwareliste

| Software | Hersteller |
|-----------------------------|---|
| Image J 1.48v | Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda MD USA |
| Excel 14.0.7147.5001 | Microsoft Office Home and Student 2010, Redmond WA USA |
| JMP 11.1.1 | SAS Institute Inc., Cary NC USA |
| Omega Plate reader Software | BMG Labtech GmbH, Ortenberg Deutschland |

2.2 Methoden

In diesem Kapitel sollen zu Beginn die physikalischen Grundlagen der verwendeten Methoden erläutert und im Anschluss näher auf die speziellen Methoden eingegangen werden.

2.2.1 Absorption

Unter Absorption wird die Aufnahme von Teilchen oder elektromagnetischen Wellen in einen Festkörper verstanden. Dabei kann das Licht nur absorbiert werden, wenn die Energiedifferenz der Energieniveaus eines absorbierenden Mediums der Quantenenergie des auftreffenden Lichtes entspricht.

Die Abschwächung der Strahlenintensität durch Absorption kann dabei durch das Lambert-Beer'sche Gesetz beschrieben werden [50, 51]:

$$E = \lg(I_0/I) = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

E = Extinktion

I₀ = Intensität des einfallenden Lichtes in W/m²

I = Intensität des ausfallendes Lichtes in W/m²

c = Stoffmengenkoeffizient in mol/l

d = Schichtdicke in m

ε = Extinktionskoeffizient

2.2.2 Fluoreszenz

Die Fluoreszenz beschreibt die spontane Emission von Licht eines, durch elektromagnetische Strahlung, angeregten Elements. Trifft Licht mit einer bestimmten Wellenlänge auf ein Molekül, wird die Energie der Photonen teilweise absorbiert und die Elektronen in ein energetisch höheres Niveau versetzt. Diese Energiedifferenz wird beim Abfallen der Elektronen auf ihr ursprüngliches Energieniveau in Form von Wärme und elektromagnetischer Strahlung emittiert [51-53]. Weil die aufgenommene Energie nicht vollständig

wieder als elektromagnetische Strahlung abgegeben wird, ist das abgestrahlte Licht stets 20-50 nm langwelliger und energieärmer als das Anregungslicht, was als „Stokes Shift“ bezeichnet wird [51, 54]. Das Fluoreszenzspektrum ist für jede Substanz spezifisch und messempfindlich, dabei muss in biologischen Systemen der Ursprung der Emission nicht gleichzeitig dem Ort der Anregung entsprechen. An Moleküle in der Nachbarschaft kann dabei ebenfalls Energie übertragen werden [54]. Dabei kann es zum Beispiel zur sog. Resonanzenergieübertragung, dem Förster-Mechanismus, kommen. Hier liegt das Absorptionsspektrum eines 50-100 Å entfernten Moleküls im Emissionsspektrum des angeregten Moleküls, wobei die emittierte Energie strahlenlos absorbiert wird [50].

2.2.3 SCP-1 Zellen

Die verwendete Zellreihe, erworben von Prof. M. Schiecker (LMU München, Deutschland), entspricht humanen, mesenchymalen Stammzellen, die mit Hilfe von retroviralem Gentransfer (Lentiviren) der humanen Telomerase reversen Transkriptase (hTERT) durch Böcker et al. 2008 immortalisiert wurden [55]. Das Potenzial dieser SCP-1-Zellen (single-cell-picked-clone-1) sich zu Adipozyten, Chondroblasten oder Osteoblasten zu differenzieren [55, 56] wurde im Verlauf genutzt, um Aspekte der Biokompatibilität der Nukleusimplantate zu untersuchen. Günstig auf den Versuchsablauf wirkt sich außerdem die schnellere Proliferation der SCP-1-Zellen gegenüber primären humanen mesenchymalen Stammzellen aus [56].

2.2.4 Zellkultur

Zur Vorbereitung der verwendeten Zellen auf die Anwendung an den Drahtgestellen wurden die SCP-1 Zellen zunächst in einer Zellkultur herangezogen. Dies war nötig, um nach dem Auftauen der Zelllinie eine adäquate Zellzahl für die Aussaat zur Verfügung zu haben.

Sämtliche Schritte bei Vorbereitungen und Durchführungen während der Arbeit an der Zellkultur wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt

2.2.5 Zellmedien

Tab. 5: Kulturmedien

| Medium | Inhalt | Konzentration |
|--|--|---------------|
| Kulturmedium | 500 ml MEM Alpha modifiziert mit Glutamin ohne Nukleoside | |
| | 5 ml Penicillin/Streptomycin | 1% |
| | 50 ml FCS hitzeinaktiviert | 10% |
| Differenzierungsmedium | 500 ml MEM Alpha Modification mit Glutamin ohne Nukleoside | |
| | 5 ml Penicillin/Streptomycin | 1% |
| | 5 ml FCS hitzeinaktiviert | 1% |
| | L-Ascorbinsäure-2-Phosphat | 200 µM |
| | β-Glycerolphosphat | 10 mM |
| | Hepes | 25 mM |
| | Calcium Chloride | 1,5 mM |
| Dexamethason-Lösung (Dexamethason 5mM in DMSO) | 5 mM | |
| Alle Medien können bei 4 °C aufbewahrt werden | | |

2.2.5.1 Auftauen der SCP-1 Zellen

In Vorbereitung auf das Auftauen der SCP-1-Zellen, wurden zunächst das Kulturmedium auf 37 °C im Wasserbad erwärmt und ein Falcon mit 10 ml DPBS bei Raumtemperatur bereitgestellt. Nun wurden die Zellen durch wiederholte Hinzugabe des vorbereiteten DPBS in das zellenbeinhaltende Eppendorfgefäß aufgetaut und in ein 50 ml Falcon überführt. Nachdem die Zellsuspension aufgetaut war, wurde diese bei 600 G 10 min bei Raumtemperatur (20 °C) zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand aspiriert und das Zellpallet mit 5 ml des erwärmten Kulturmediums resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde nun in eine T25-Kulturflasche überführt und bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Nach 24 Stunden wurde überprüft, ob die Zellen am Plastik adhärirten. Durch mehrfache Passagierung der Zellkultur konnte diese nach 2 Wochen in eine T175-Kulturflasche übertragen werden.

2.2.5.2 Zellpassagierung

Aufgrund der starken Proliferation der Zelllinie, wurde die Zellkultur mehrfach geteilt, um eine, durch Platzmangel induzierte, Apoptose zu vermeiden. Dazu wurden die Zellen durch fünfminütige Inkubation mit 2 ml Trypsin/EDTA bei 37°C und 5% CO₂ sowie anschließendem manuellem Rütteln der Kulturflasche vom Boden dieser gelöst. Nach der Inaktivierung der Proteasen durch großzügige Hinzugabe von Kulturmedium wurde die Suspension bei 600 G und Raumtemperatur für 10 min zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand aspiriert und die zentrifugierten Zellen mit 10 ml Kulturmedium resuspendiert. In einer neuen T175-Kulturflasche wurde nun die hergestellte Zellsuspension 1:25 verdünnt und bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert-. Dieser Vorgang musste alle 5-6 Tage zum Erhalt der Zellkultur wiederholt werden.

2.3 Versuchsaufbau

Untersucht wurden verkleinerte Ausführungen der Nukleusimplantate in vier verschiedenen Dichten von 0,4 mg/cm³, 0,45 mg/cm³, 0,5 mg/cm³ und 0,75 mg/cm³ [#]. Die ursprüngliche Implantatgröße musste auf eine Größe von ca. 1,3x1x0,5 cm angepasst werden, damit die Versuchsobjekte in die vorhandene 24-Well-Mikrotiter-Platte appliziert werden konnten. Zur Bestimmung der Dichte wurden die Drahtgestelle mit der Feinwaage gewogen. Der Versuchsaufbau wird in Abbildung 1 visualisiert. Es wurden jeweils vier technische Replikate einer Dichte mit Zellen in sechs Versuchsdurchläufen (n=6, N=4) untersucht (Abb. 6: 1:A1-D4). Des Weiteren gab es in jeder Versuchsanordnung sogenannte 2D-Kontrollen, d.h. Wells ohne Drahtgestell, die ausschließlich mit Zellen versehen wurden (Abb.: 6: A5-D5). Zusätzlich wurden jeweils vier Hintergrundkontrollen mit zellfreiem Kulturmedium mitgeführt (Abb.: 6: A6-D6) [#]. Jedes Well enthielt 1 ml Kulturmedium bzw. Zellsuspension. Zu Beginn jeder Versuchsserie betrug die applizierte Zellzahl jeweils 50.000 Zellen/Well. Diese Menge wurde speziell im Hinblick auf die Resazurinmessung (siehe Abschnitt 2.5), nach vorausgegangen Versuchen gewählt, mit dem Ziel einen

messbaren Ausgangswert zu erreichen, der zusätzlich sensibel die Proliferation erkennen lässt.

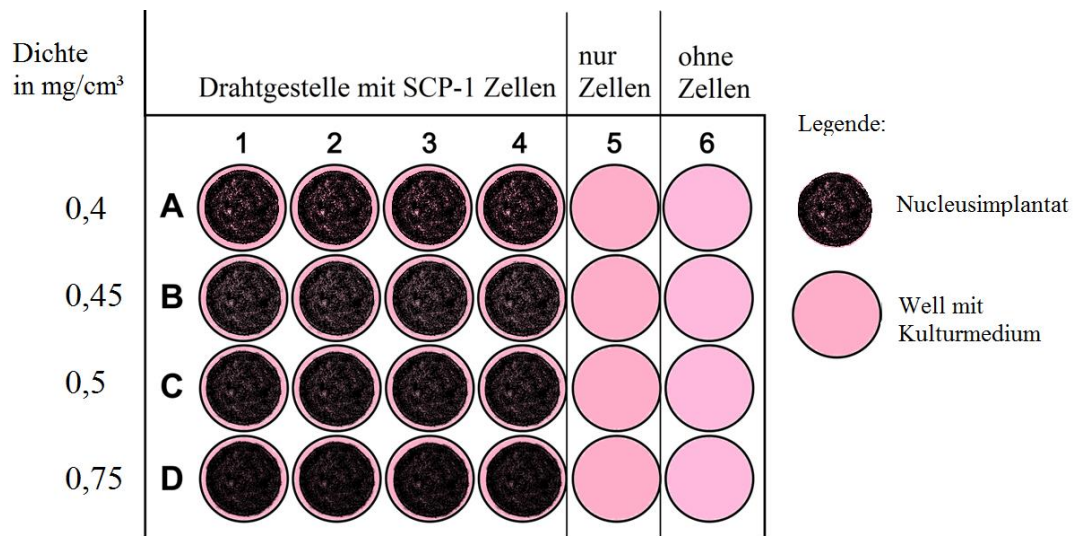


Abbildung 6: Versuchsaufbau (eigene Abbildung)

Vor dem Einsetzen wurden die verwendeten Drahtgestelle 3 Stunden in 1 % Octoxinol 9 (Triton-X-100[®]) Lösung mit destilliertem Wasser geschwenkt. Nach anschließendem zehnmaligem ausspülen mit Leitungswasser kamen die Untersuchungsobjekte für 2 x 8 min in ein Ultraschallbad mit destilliertem Wasser. Abschließend wurden die Drahtgestelle ca. 24h Luftgetrocknet und bei 126 °C 15 min. autoklaviert.

Das Einbringen der Zellen mit dem Kulturmedium sowie die Applikation der Drahtgestelle wurden unter sterilen Bedingungen an der Sterilbank vorgenommen, um Kontaminationen zu vermeiden.

2.3.1 Zellauszählung mit Trypan-Blau

Damit die untersuchten Objekte zu Beginn des Versuchs standardisierten Bedingungen unterliegen, wurde zunächst mit Hilfe der Trypan-Blau-Methode die Zellzahl pro Milliliter in der verwendeten Zellkulturpassage bestimmt. Ziel war es eine Zellsuspension herzustellen, die 50.000 Zellen/ml enthält, welche auf jedes Well verteilt wurde.

Trypanblau ist ein anionischer Diazofarbstoff, der von lebenden Zellen nicht aufgenommen wird, Zellwände toter Zellen jedoch penetriert. Demnach stellen sich tote Zellen als dunkelblau dar, während viable Zellen hell erscheinen [57].

2.3.1.1 Herstellung der Trypan-Lösung und der Zellsuspension

Tab. 6: Trypan-Färbelösung

| Lösung | Inhalt | Konzentration |
|------------------------|------------------------------------|---------------|
| Trypanblau Färbelösung | 0,75 ml Trypan Stammlösung 0,5% | 0,125 % |
| | 2,25 ml DPBS | |

Zunächst musste die aktuelle Zellkulturpassage so vorbereitet werden, dass die Zellen in Suspension vorliegen. Dazu wurde wie bei der Passagierung der Zellkultur vorgegangen (siehe Abschnitt: 2.2.3.2), bis die Zellen in eine erneute Kulturflasche überführt werden konnten.

2.3.1.2 Durchführung der Zellzählung

Die Zellzählung erfolgte in einer Neubauerzählkammer, welche zuvor mit 70% ethanolhaltiger Lösung zusammen mit dem Deckglas gereinigt wurde. Anschließend wurde das Deckglas auf die Kammer gelegt und durch mehrmaliges schieben bis zum Erscheinen der sog.: „Newtonschen Ringe“ fixiert. Anschließend wurden die 10 µl der vorbereiteten Zellsuspension 1:1 mit der hergestellten Trypanlösung gemischt und 10 µl der Mixtur in die beiden Zählkammern gegeben. Die Zählung der lebenden Zellen erfolgte „L“-förmig entlang der Zählquadrate in den vier Zählgittern. In beiden Zählkammern wurde nun der Durchschnitt n der jeweiligen vier Zählquadrate berechnet und die Zellzahl pro Milliliter mit folgender Formel ermittelt:

$$\text{Zahl der lebenden Zellen / ml} = n \cdot V_f \cdot 10^4$$

n : Durchschnitt viabler Zellen

V_f : Verdünnungsfaktor (in diesem Fall: 2)

2.4 Zeitlicher Versuchsablauf

Der zeitliche Rahmen eines Versuchsdurchlaufs erstreckt sich über 5 Wochen und wurde sechsmal wiederholt (Abb.: 7). An Tag eins wurde der oben genannte Versuchsaufbau erstellt und die Wells mit jeweils 50.000 Zellen in 1ml Kulturmedium bzw. ausschließlich Kulturmedium befüllt. Nach 24h Adhäsionszeit, wurden die Drahtgestelle, nach entsprechenden Dichten sortiert, in die Wells eingesetzt. Nun folgten wöchentliche Resazurinmessungen in den Wochen 1-3 mit anschließendem Kulturmediumwechsel. Nach der dritten Messung sollte mit dem Wechsel des Kulturmediums auf das Differenzierungsmedium die Differenzierung der Zellen stimuliert werden. Nach weiteren 14 Tagen erfolgte die abschließende Resazurinmessung.

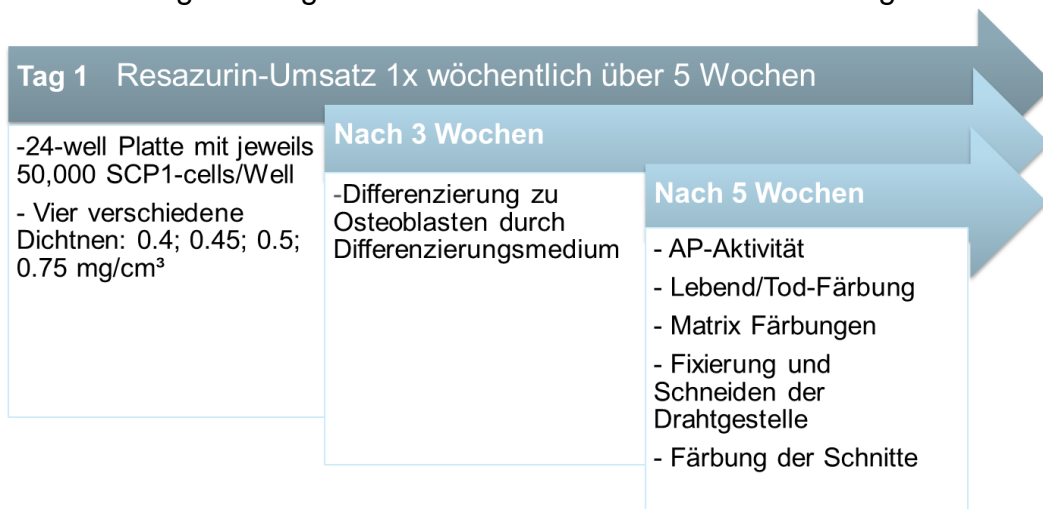


Abbildung 7: Versuchsablauf (eigene Abbildung)

Die AP-Messung, sowie die Alizarin-rot-Bestimmung, konnten aufgrund ihrer Zytotoxizität und der begrenzten Kapazität an Untersuchungsobjekten nicht bei jedem Versuchsdurchgang vorgenommen werden. Zusätzlich wurden am Ende die Färbungen sowie die Fixierungen für die weitere Aufarbeitung der Präparate vorgenommen [#].

2.5 Messung des Resazurin Umsatzes

Der Redoxfarbstoff Resazurin (auch Alarma Blau) dient zur indirekten Bestimmung der Proliferation, Zellviabilität sowie Toxizität bei Zellen [58]. Dabei macht man sich den Mechanismus zu Nutze, dass Resazurin vermutlich durch mitochondriale Enzyme [59] oder andere zellinterne Mechanismen [58] in viablen Zellen zu Resorufin, ebenfalls ein Farbstoff, metabolisiert wird. Anhand der Emission in der Fluoreszenzmessung bei einer Anregungs-Wellenlänge von 530-560 nm und einer Emission bei 590 nm [60] kann dabei auf die Zellzahl viabler Zellen und damit indirekt auf die Proliferation geschlossen werden. Die Vorteile dieser Methode liegen in der fehlenden Zytotoxizität des Farbstoffes, der einen Fortlauf des Experiments ermöglicht, sowie der Sensitivität und Reproduzierbarkeit [61]. Nachteilig wurden eine Akkumulation des Farbstoffes sowie ein verstärkter Abbau des Farbstoffes beobachtet, die zu Fehleinschätzungen der Zellzahl führen könnten [58]. Deshalb wurden die vorgenommenen Messungen stets in standardisierten Inkubationszeiten durchgeführt.

2.5.1 Verwendete Lösungen und Geräte zur Messung des Resazurinumsatzes

Tab. 7: Resazurin-Färbelösung

| Lösung | Inhalt | Konzentration |
|-----------------------|---|---------------|
| Resazurin-Färbelösung | 0,125 g Resazurin-Natriumsalz | 0,025 % |
| | 500 ml DPBS | |
| | Steril filtriert, in 2 ml Aliquots, bei -20 °C gelagert | |

Die Fluoreszenzmessung wurde im Omega[®]-Platereader vorgenommen und bei Omega Platereader (Software) in eine Excel[®]-Datei überführt.

2.5.2 Durchführung

Die Vorbereitung der Färbung bestand darin, die benötigte Menge an Färbelösung bei RT zu erwärmen bis diese flüssig wurde. Gleichzeitig wurde neues Kulturmedium zum späteren Austausch im Wasserbad auf 37 °C

erwärmt. Nun wurden unter sterilen Bedingungen 60 µl der Resazurin-Lösung in jedes Well mit darin befindlichen 1 ml Kulturmedium pipettiert und anschließend für 30 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Nach Abschluss der Inkubation wurde zur Fluoreszenzmessung ein 96-Well-Mikrotiter-Platte verwendet. Dabei wurden aus jedem Well der 24-Well-Mikrotiterplatte mit den Drahtgestellen jeweils 3 mal 100 µl in die 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Anschließend wurde die Fluoreszenz im Photospektrometer gemessen. Das Kulturmedium der Drahtgestelle wurde darauffolgend einmalig abgesaugt und gegen 1 ml frisches Nährmedium ausgetauscht, so dass der Farbstoff entfernt wurde und die Zellen geschont werden konnten. Mit Abschluss der Prozedur wurden die Implantate für weitere ein bzw. zwei Wochen bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert.

Zur Messwertberechnung, wurde der Durchschnitt der jeweiligen Triplikate gebildet und die Messwerte als Vielfaches zur Kontrolle aufgetragen.

2.6 Messung der AP-Aktivität

Die alkalische Phosphatase ist ein Enzym dass in zahlreichen Organen, wie Leber, Plazenta und Knochen exprimiert wird [62] und sollte damit als Parameter für die Differenzierung dienen. In der frühen Reifungsphase der Osteoblasten kommt es mit dem Sistieren der Proliferation *in vitro* zu einem starken Anstieg der AP-Expression, welcher mit dem Beginn der Mineralisierung wieder abfällt (siehe Abb.: 3) [63]. Aufgrund dieser Eigenschaft wurde die Bestimmung der AP-Aktivität gewählt, um die Differenzierungsfähigkeit der SCP-1-Zellen in Interaktion mit den Implantaten zu untersuchen. Die Messung wurde entsprechend dem Verlauf der AP-Expression reifender Osteoblasten zwei Wochen nach Initiation der Differenzierung vorgenommen. Aufgrund der Zytotoxizität der Lösung konnte dieser Versuch nur am Ende der jeweiligen Versuchsreihe durchgeführt werden. Dabei wurde als Substrat der alkalischen Phosphatase 4-Nitrophenyl-Phosphat verwendet, da es durch das Enzym zu 4-Nitrophenol und Phosphat hydrolysiert wird [64]. Die Absorption des

Reaktionsprodukts, 4-Nitrophenol, kann schließlich photospektrometisch bei einer Wellenlänge von 405 nm ermittelt werden [64].

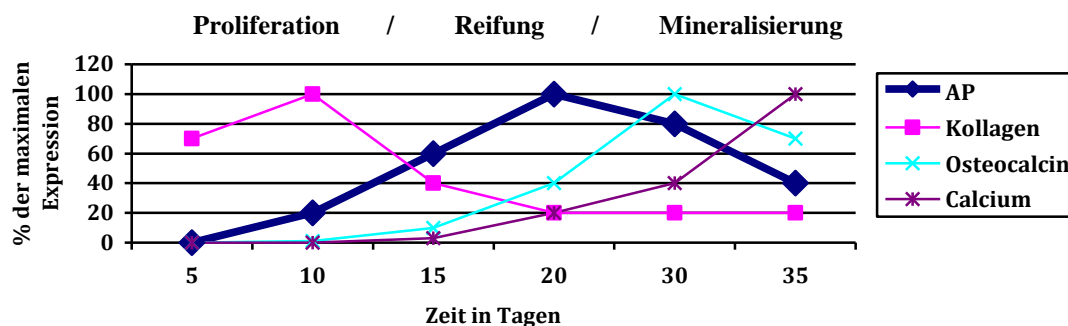


Abbildung 8: Substratexpression während der Osteoblastendifferenzierung modifiziert nach Lian und GS , JB Stein, 1995

2.6.1 Verwendete Lösungen und Geräte zur Bestimmung der AP-Aktivität

Tab. 8: AP-Lösung

| Lösung | Inhalt | Konzentration |
|-----------------------------|--|---------------|
| AP-Puffer | 3,75 g Glycin (MW: 75,07 g/mol) | 50 mM |
| | 12,11 g Tris-Base (MW: 121,1 g/mol) | 100 mM |
| | 203 mg MgCl ₂ (MW: 203,3 g/mol) | 1 mM |
| | 900 ml ddH ₂ O | |
| Titration mit NaOH bis pH 4 | | |
| Substratlösung | 1l ddH ₂ O | |
| | 1,3 mg 4-Nitrophenyldisodiumphosphat-hexahydrat (pNPP) | 3,5 mM |
| | 1 ml AP-Aktivität Assay Puffer | 0,1 M |

Die Absorptionsmessung erfolgte am Omega[®] Platereader

2.6.2 Durchführung

Vor jeder AP-Messung wurde zur Viabilitätsbestimmung eine Resazurinmessung durchgeführt (siehe Abschnitt 2.5). Nach dem Absaugen des restlichen Nährmediums wurden die Drahtgestelle einmalig mit 1 ml DPBS gewaschen. Im Anschluss wurden die untersuchten Drahtgestelle mit 1 ml Substratlösung bedeckt und 90 min bei 37 °C, 5% CO₂ und Lichtschutz

inkubiert. Die Absorption der inkubierten Lösung konnte nach Übertragung jedes Wells aus der 24-Well-Mikrotiterplatte in Triplikate aus 3 Wells in der 96-Well-Mikrotiterplatte mit je 100 µl im Photospektrometer bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen werden.

Zur Bestimmung der 4-Nitrophenolkonzentration aus den Messwerten der Absorption musste zusätzliche eine Standardreihe erstellt werden.

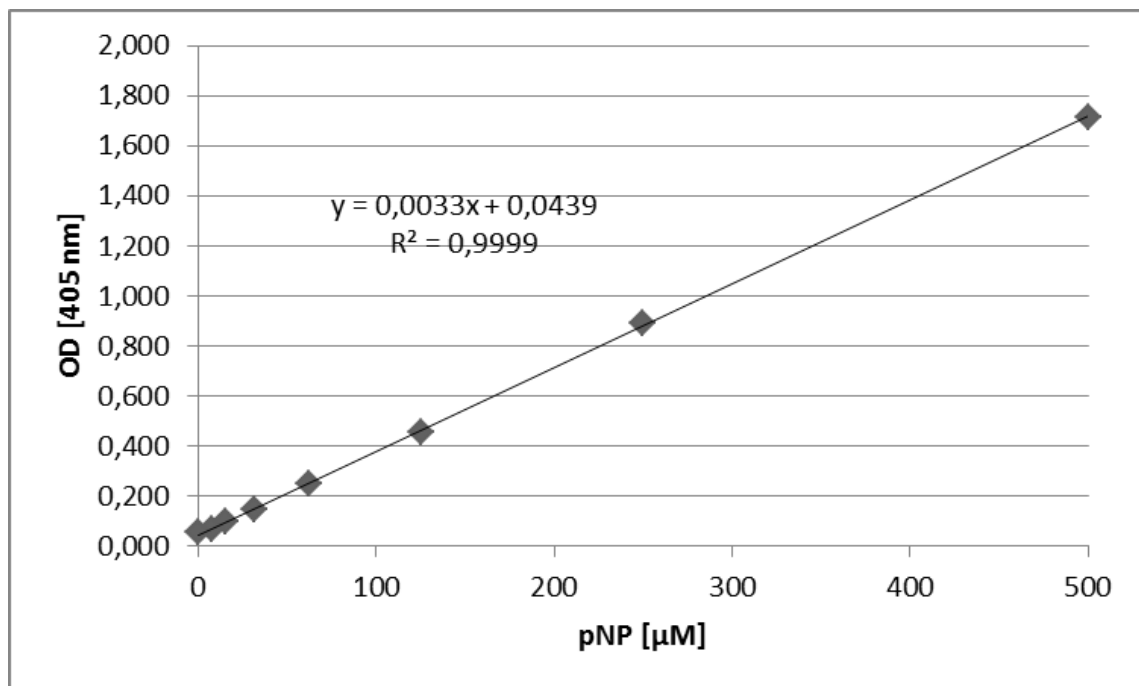


Abbildung 9: Standardkurve AP-Aktivität

Die Berechnung erfolgte anhand der Standardkurve sowohl in Form der gesamten AP-Aktivität des entsprechenden Wells, also auch der AP-Aktivität pro Zelle. Dazu wurde ein Quotient der Gesamtaktivität als Faktor zum entsprechenden Resazurin-Umsatz ermittelt.

2.7 Alizarin-rot Bestimmung

Eine weitere Methode, welche dem Nachweis der Differenzierung und der Biokompatibilität dienen sollte, bestand darin die ggf. produzierte Matrix mittels

Alizarin-rot anzufärben und durch das Extrahieren des matrixgebundenen Farbstoffes mittels Cetylpyridiniumchlorid eine Quantifizierung vorzunehmen [65, 66]. Alizarin besitzt die Eigenschaft Kalziumionen in einem Chelatkomplex zu binden, wobei die Probe fixiert werden muss und damit der Versuch an das Ende des Ablaufes gesetzt werden musste [67].

2.7.1 Lösungen und Geräte zur Alizarin-rot Bestimmung

Zur Durchführung wurden folgende zwei Lösungen benötigt [68]:

Tab. 9: Alizarin-rot-Lösungen

| Lösung | Inhalt | Konzentration |
|------------------------------|--|---------------|
| Alizarin rot-Färbelösung | 200 mg Alizarin-rot S | 0,5% |
| | 40 ml ddH ₂ O | |
| | Titration bis pH 4, lichtgeschützte Lagerung | |
| Cetylpyridiniumchloridlösung | 10 g Cetylpyridiniumchlorid monohydrat | 10% |
| | 100 ml Leitungswasser | |
| | Erhitzen im Wasserbad, Lagerung bei RT | |

Zusätzlich 99% Ethanol

Die Absorption wurde mit dem Omega[®]Platereader gemessen.

2.7.2 Durchführung

Nach der letzten Resazurinmessung wurde das übrige Kulturmedium aspiriert und die Zellen mit 99% Ethanol für 60 min bei -20 °C fixiert. Im nächsten Schritt wurden die Zellen dreimal mit Leitungswasser gewaschen und die Alizarin-rot Färbelösung hinzugegeben. Nach einer lichtgeschützten Inkubation von 30 min bei Raumtemperatur wurden die Zellen wiederholt dreimal mit Leitungswasser gewaschen und luftgetrocknet. Die Extraktion der Färbelösung erfolgte nun, durch die Hinzugabe der Cetylpyridiniumchlorid-Lösung und 30 minütiges Schwenken. Im letzten Schritt wurden die Lösungen als Triplikate in 96-Well-Mikrotiterplatten mit je 100 µl übertragen (s.o.) und die Absorption im Photospektrometer bei einer Wellenlänge von 560 nm bestimmt.

Mittels einer Standardkurve kann aus den ermittelten Absorptionswerten die Alizarin-rot-Konzentration ermittelt werden.

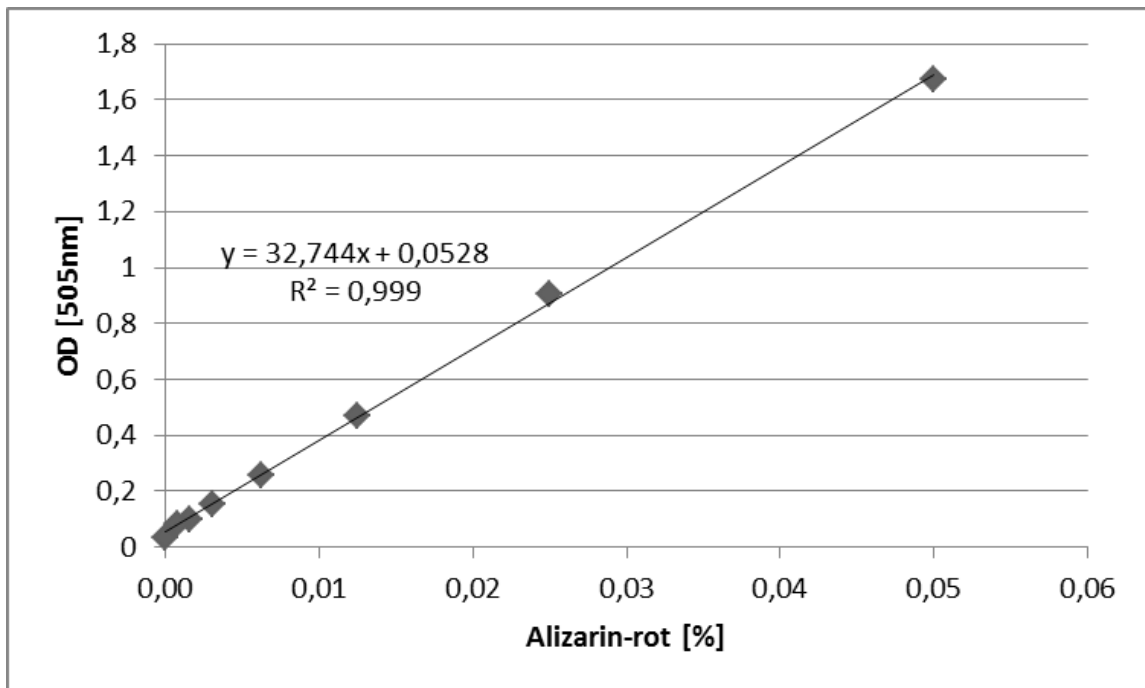


Abbildung 10: Standardkurve Alizarin-rot

2.8 Epifluoreszenz

Die Fluoreszenzmikroskopie bietet durch ein breites Spektrum an verfügbaren Färbelösungen vielfältige Möglichkeiten der Zell- sowie Matrixdarstellung. Deshalb sollte die Möglichkeit des Nachweises von viablen sowie toten Zellen [69, 70] und der Mineralisierung [71] genutzt werden. Das Verfahren diene dadurch der Beurteilung des Wachstumsmusters der Zellen am Drahtgestell. Ein weiterer Grund für die Wahl dieser Methode ist die Intransparenz der Drahtgestelle, die eine konventionelle Lichtmikroskopie verhindert. Die Betrachtung der Untersuchungsobjekte erfolgte dabei lediglich von einer Oberfläche, wobei je nach eingestellter Fokusebene ein tieferer Blick in die Drahtzwischenräume möglich war.

2.8.1 Lebend/Tod-Färbung

Bei der gleichzeitigen Färbung viabler und abgestorbener Zellen wurden die Farbstoffe Calcein Acetoxymethylester (AM) und Ethidium-homodimer-1 verwendet. Das farblose Calcein AM penetriert durch die Zellmembran und wird durch intrazelluläre Enzyme in den calciumbindenden Farbstoff Calcein gespalten [69]. Das intrazelluläre Calcein bindet an vorliegende Kalziumionen und fluoresziert grün bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm mit einer Exitationswellenlänge von 530 nm [72]. Aufgrund der vorausgesetzten enzymatischen Spaltung werden hier kurzzeitig vorwiegend lebende Zellen gefärbt, wobei Calcein selbst zytotoxische Eigenschaften besitzt [69]. Der Farbstoff Ethidium homodimer hingegen penetriert durch die Membranen abgestorbener Zellen und interkaliert mit RNA und DNA, so dass hier überwiegend tote Zellen gegengefärbt werden [73, 74]. Ethidium homodimer fluoresziert rot bei einer Exzitationswellenlänge von 530 nm mit einer Emissionswellenlänge von 645 nm [72].

2.8.1.1 Verwendete Lösungen und Geräte

Folgende Lösungen wurden für diese Färbung benötigt:

Tab. 10: Lebend/Tod-Färbelösung

| Lösung | Inhalt | Konzentration |
|--------------------------------|--------------------------------------|---------------|
| Calcein-Stammlösung | 1 g Calcein AM | 4 mM |
| | 251 µl DMSO | |
| | Lagerung bei 20 °C | |
| Ethidium-Homodimer-Stammlösung | 1 mg Ethidium homodimer | 2 mM |
| | 581 µl DMSO/ddH ₂ O (1:4) | |
| Arbeitslösung | 0,5 µl Calcein AM | 2 µM |
| | 2 µl Ethidium homodimer | 4 µM |
| | 1 ml DPBS | |

Die Fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden am Evos fl Fluoreszenzmikroskop vorgenommen.

2.8.1.2 Durchführung

Die in den Wells befindlichen Präparate wurden zweimal mit DPBS gewaschen und mit einer jeweils 1 ml Arbeitslösung bedeckt, bevor sie für 30 min bei 37 °C und 5% CO₂ unter Lichtschutz inkubiert wurden. Die inkubierten Präparate wurden anschließend noch einmal mit DPBS gewaschen und unter dem Mikroskop fotografiert. Die Fluoreszenz der einzelnen Farbstoffe wurde separat aufgenommen und anschließend grafisch überlagert, so dass beiden Färbungen gleichzeitig dargestellt sind. Die Bilder wurden im Tiff-Format mit 1360 x 1024 Pixel und einer horizontalen wie vertikalen Auflösung von 96 dpi gespeichert.

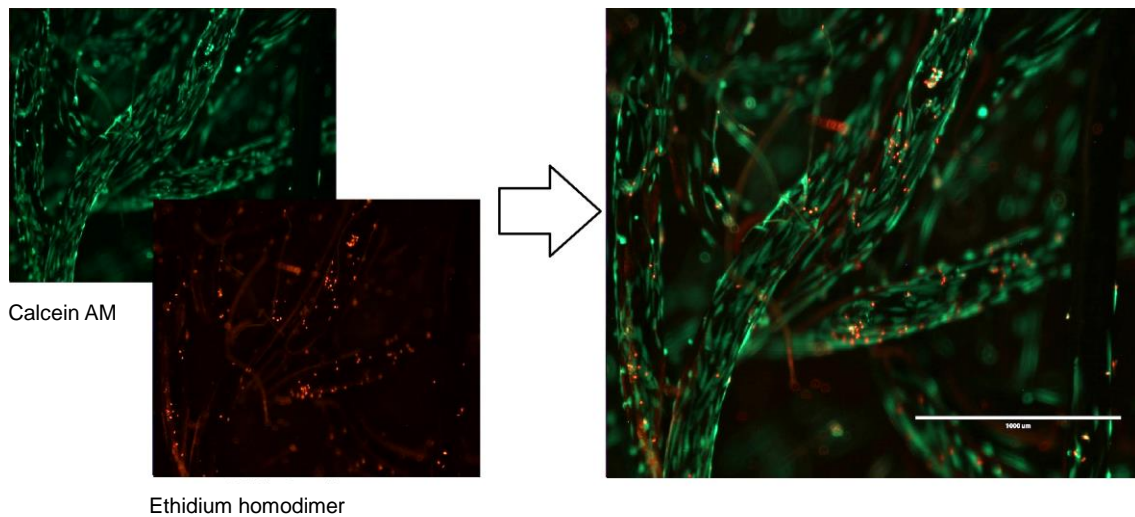


Abbildung 11: Lebend/Tod-Färbung, Calcein AM = grün, Ethidium homodimer = rot

2.8.2 Calcein/Ethidimbromid-Färbung

Bei dieser Färbung wird die calciumbindende Eigenschaft des Calceins (s.o.) zur Färbung der mineralisierten extrazellulären Matrix genutzt, da in diesem Fall kein Acetoxymethylester vorliegt, welcher die Penetration nach intrazellulär ermöglicht. Die Zellen werden mit rot fluoreszierendem Ethidimbromid dargestellt [75], welches durch geschädigte und nach einiger Zeit auch intakte Zellmembranen penetriert und mit der DNA interkaliert [76].

2.8.2.1 Verwendete Lösungen und Geräte

Tab. 11: Calcein/Ethidiumbromid-Färbelösung

| Lösung | Inhalt | Konzentration |
|------------------------------|--------------------------------------|---------------|
| Calcein-Arbeitslösung | Calcein 30 mM | 150 mM |
| | ddH ₂ O | |
| Ethidiumbromid-Arbeitslösung | 1mg Ethidiumbromid | 2 mM |
| | 581 µl DMSO/ddH ₂ O (1:4) | |
| Arbeitslösung | Calcein | 0,1% |
| | Ethidium homodimer | 0,1% |
| | Kulturmedium | |

Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung wurde am Evos fl Fluoreszenzmikroskop vorgenommen.

2.8.2.2 Durchführung

Nach Aspiration des Kulturmediums, wurden die Implantate jeweils mit 1 ml Färbelösung bedeckt und 30 min bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert, bevor die Fluoreszenz der einzelnen Färbungen mit 1360 x 1024 Pixel und einer horizontalen wie vertikalen Auflösung von 96 dpi fotografiert wurde und diese anschließend grafisch überlagert wurden.

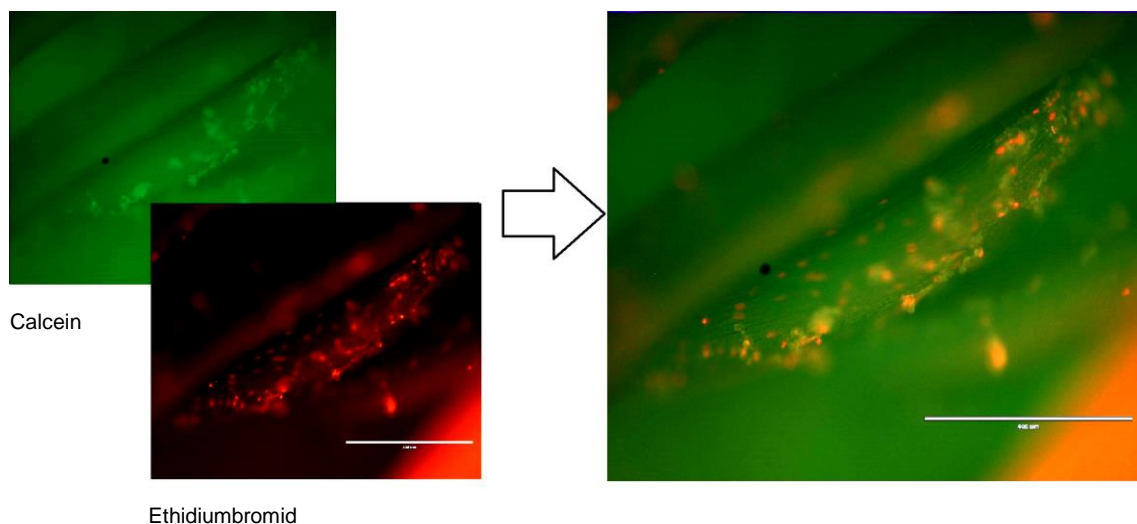


Abbildung 12: Calcein/Ethidiumbromid-Färbung, Calcein = grün, Ethidiumbromid = rot

2.8.3 Alizarin-rot/Hoechst-Färbung

Neben der Möglichkeit der Quantifizierung der mineralisierten Matrix [77] kann die Matrix mit Hilfe von Alizarin-rot und dem Fluoreszenzmikroskop rot dargestellt werden [78, 79]. Die Zellkerne werden dabei mit Hoechst 33342 blau gefärbt, aufgrund der zellpermeablen Eigenschaft dieses Farbstoffes und der Interaktion mit der DNA [80, 81].

2.8.3.1 Verwendete Lösungen und Geräte

0,5 % Alizarin-rot Färbelösung:

Tab. 12: Alizarin-rot Färbelösung

| Lösung | Inhalt | Konzentration |
|--------------------------|---|---------------|
| Alizarin-rot Färbelösung | 200 mg Alizarin-rot S | 0,5 % |
| | 40 ml ddH ₂ O | |
| | Titration bis pH4, lichtgeschützte Lagerung | |
| Hoechst-Färbelösung | 20 mg Hoechst 33342 | 2 µg/ml |
| | 2ml DMSO | |
| Arbeitslösung | Alizarin-rot | 0,1% |
| | Hoechst | 0,1% |
| | Kulturmedium | |

Ethanol 99 %

Bildaufnahmen erfolgten mit dem Evos fl Fluoreszenzmikroskop.

2.8.3.2 Durchführung

Auf das Aspirieren des Nährmediums folgte die Fixierung der Zellen durch Hinzugabe von 99% Ethanol über 60 min bei -20 °C. Anschließend wurden die Wells dreimal mit Leitungswasser gewaschen und mit der Arbeitslösung 30 min bei Raumtemperatur unter Lichtschutz inkubiert. Die Färbung wurde mit dem Fluoreszenzmikroskop im Tiff-Format mit 1360 x 1024 Pixel und einer horizontalen wie vertikalen Auflösung von 96 dpi dokumentiert.

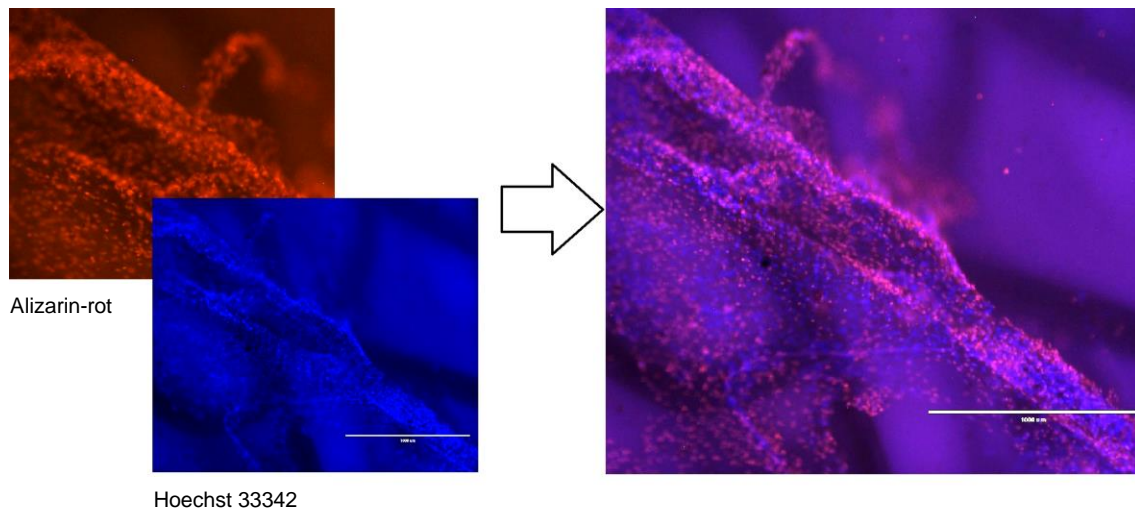


Abbildung 13: Alizarin-rot/Hoechst 33342-Färbung, Alizarin-rot = rot, Hoechst 33342 = blau

2.9 Schneiden der Drahtgestelle

Die begrenzte, oberflächliche Betrachtungsmöglichkeit der Epifluoreszenz gab Anlass zur Suche nach weiteren Methoden zur Darstellung des Prothesenkerns. Dazu sollten die Implantate mit Hilfe der „Trenn-Dünnschliff-Technik zur Herstellung histologischer Präparate von nicht schneidbaren Geweben und Materialien“ nach K. Donath, 1987 [82] zu lichtmikroskopischen Schnitten prozessiert werden und damit eine Betrachtung des Zellwachstumsmusters im Inneren der Drahtgestelle ermöglicht werden. Die Darstellung der Zellen und der extrazellulären Matrix wurde mit konventionellen lichtmikroskopischen Färbungen sowie Fluoreszenzfärbungen unternommen.

Die Durchführung der damit verbundenen Versuche erfolgte in enger Zusammenarbeit mit dem klinischen Forschungslabor der Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie der Universitätsklinik Tübingen unter der Leitung von Prof. Dr. rer.-nat. H.P. Wendel.

2.9.1 Präparation der Implantate für den Schnitt

Voraussetzung für den Schnitt war zum einen die Fixierung der Zellen sowie die Einbettung der Drahtgestelle in ein geeignetes Medium, das sowohl den Schnitt

als auch die Färbung ermöglicht. Die Fixierung konnte dabei mit jeglicher auch für die konventionelle Lichtmikroskopie üblichen Form durchgeführt werden. In diesem Fall wurden die Präparate 24 h in 10% Formaldehyd fixiert und anschließend in Technovit 7200, ein lichthärtender Kunststoff auf Methacrylatbasis, eingebettet [83].

2.9.1.1 Materialien und Geräte

10 % Formaldehyd in ddH₂O

Ethanol in aufsteigenden Konzentrationen

Technovit 7200 (Einbettungsmedium)

Präzisionskleber (lichthärtend) Technovit 7210 VLC

Fixationskleber Technovit 7230 VLC

Kunststoffobjektträger

Exakt Klebepresse

Exakt 520 Lichtpolymerisationsgerät

Einbettformen

Tab. 13: Präinfiltrationslösung

| Lösung | Inhalt | Konzentration |
|------------------------|----------------|---------------|
| Präinfiltrationslösung | Technovit 7200 | |
| | Ethanol | 100% |

2.9.1.2 Durchführung

Nach der Formaldehydfixierung der Drahtgestelle, wurden diese 15 min bei fließendem Wasser gewaschen und anschließend in aufsteigenden Konzentrationen von Ethanol von 50, 70, 80, 90, 96 und 100% jeweils 30-45 min entwässert. Daraufhin folgte die Präinfiltration bei der die Objekte 24 Stunden in der Präinfiltrationslösung bei 4 °C inkubiert wurden. Es folgten weitere 24 Stunden bei 4 °C in reinem Technovit 7200 bis zur Infiltration, bei welcher die Objekte nochmals in einer neuen Lösung Technovit 7200 unter Lichtschutz bei 4 °C für 24 Stunden inkubiert wurden. Zur Einbettung wird das

infiltrierte Objekt in eine entsprechende Einbettform mit einem Tropfen Technovit 7230 geklebt und blasenfrei mit Technovit 7200 übergossen. Die Polymerisation erfolgte im Exakt 520 über 10 Stunden bei Weißlicht und weitere 10 Stunden bei UV-Licht. Nun konnte der Block mit dem Präzisionskleber Technovit 7210 auf einem Kunststoffobjektträger fixiert werden und 5-10 Minuten unter UV-Licht aushärten. Vor dem eigentlichen Schneiden wurde das Präparat in der Mitte durchtrennt und ein zweiter Objektträger angebracht, damit die Schnitte nicht am Rand sondern im Inneren des Drahtgestells vorgenommen werden konnten.

2.9.2 Schneidprozess der Drahtgestelle

Die eingebetteten Präparate wurden nun mit einem Trennschleifsystem durch eine Diamantbandsäge unter ständigem spülen in lichtmikroskopische Schnitte geschnitten. Dabei wird die Vorschubkraft, welche sich aus der Summe des Druckes der Probe auf das Sägebund zusammensetzt bzw. eine Funktion der Vorschubgeschwindigkeit darstellt, mit der die Probe auf das Band trifft möglichst konstant gehalten. Da jedes Material seine individuelle minimale Vorschubkraft, die zum Schneiden der Probe nötig ist, besitzt, kann eine konstante Vorschubgeschwindigkeit bei Proben mit unterschiedlichen Materialhärten zu ausgeprägten Trennkräften führen, die das Sägebund schädigen [84]. Dieses Problem wurde vom Hersteller gelöst, indem die erwähnte Vorschubgeschwindigkeit durch variables Gewicht der Materialhärte angepasst wird und damit die Vorschubkraft konstant bleibt. Gleichzeitig wird das eingebettete Implantat ähnlich dem Prinzip einer Rotationssäge während des Vorgangs rotiert, um eine punktuelle Kraftwirkung auf das Präparat zu erzielen und damit störende Reibungsartefakte zu reduzieren [84]. Zudem sollte der Vorschub möglichst gleichmäßig erfolgen und keine Schnittunterbrechung zugelassen werden, da sonst eine Stufenbildung an der Oberfläche die Folge sein kann. Das Trennband ist einschichtig mit Diamanten besetzt und wird durch fortlaufende Spülung von störendem Abrieb gereinigt, so dass eine möglichst glatte Oberfläche entsteht [82].

Nach dem Schnitt musste das Präparat mit einem Mikroschleifsystem, das aus einem Gehäuse mit rotierendem Schleifteller mit einem Schleifpapier bestand, auf die gewünschte Dicke geschliffen werden. Dazu wurde für jedes Präparat der individuelle Nullpunkt festgelegt, d.h. der Punkt, an dem das Präparat die Schleifpapieroberfläche gerade berührt. Anschließend kann die gewünschte Differenz abgeschliffen werden, bis das Gerät automatisch stoppt. Der Druck des Präparates auf die Schleifoberfläche wird durch individuell gewählte Gewichte bestimmt [82].

2.9.2.1 Materialien und Geräte

Exakt Diamantbandsäge 300/310 CP/R Profil

Exakt Schleifsystem 400 CS

Schleifblätter mit 800/1000/2500 Körnung

Exakt AW 110 Mess- und Kontrollsystem

Mikrometerschraube mit Digitalanzeige

Polierpapier mit 4000 Körnung

2.9.2.2 Durchführung

Auf dem vorbereiteten Präparat wurde zunächst die Schichtdicke von etwa 100 µm mit einem Stift markiert und auf dem Schnitttisch angebracht.

Durch ein Vakuum von 400-600 mbar an der Halterung fixiert, wird das Präparat mit den zwei Objektträgern an das Trennband im Bereich der markierten Schnitthöhe herangeführt. Nun erfolgte der automatische Schnitt bei dem die Probe alternierend, mit aufsteigendem Radius (Stufe 1-3), rotierte und durch ein Gewicht an das Trennband gedrückt wurde. Das Sägeband wurde dabei fortlaufend mit Leitungswasser gespült, um die Diamantzwischenräume der Bandsäge vom Abrieb zu reinigen und durch Abkühlung das Diamantband vor schädlicher Überhitzung zu schützen.

Nach der erfolgreichen Trennung, wird das Präparat durch das Dünnschleifsystem auf die gewünschte Dicke gebracht. Das Schleifgerät musste 5 min warm laufen, bis anschließend die Schleifpapiere in aufsteigender Körnung aufgelegt wurden. Das Präparat wurde mit dem Objektträger an der Vakuumhalterung (600-800 mbar) fixiert und durch Gewichte auf die rotierende Schleifoberfläche gepresst. Dabei war die Schleifdauer von der individuellen Schnittdicke des Präparates abhängig. Der Vorgang wiederholte sich mit zwischenzeitlichen Kontrollen am digitalen Mikrometer, bis die gewünschte Dicke von ca. 100 µm erreicht wurde. Durch Ungenauigkeiten beim Schneiden, die das Präparat zu dünn abtrennten, war auch durch nachträglichen schleifen die Zielobjektdicke von 100 µm nicht regelmäßig erreichbar. Zum Schluss wurden die Präparate mit dem Silikonpolierpapier ca. 5 min poliert.

2.10 Färbung der Drahtschnitte

Zur besseren Beurteilung des Wachstumsmusters der Zellen und der Extrazellulären Matrix wurde zunächst auf konventionelle Färbemethoden der Histologie wie der Hämatoxylin/Eosin-Färbung zurückgegriffen. Aufgrund der unzureichenden Resultate und geringem Informationsgewinn wurden zusätzlich die Kollagenautofluoreszenz sowie eine Calcein/Ethidiumbromid-Fluoreszenzfärbung untersucht.

2.10.1 Hämatoxylin/Eosin

Die Anwendung der in der Histologie weit verbreiteten Hämatoxylin/Eosin-Färbung wurde bereits von Donath, K. 1987 in der Methode der „Trenn-Dünnschliff-Technik“ [82] beschrieben. Hämatoxylin färbt azide Strukturen die Zellkerne blau, während Eosin durch die Affinität zu basischen Ladungen das Zytoplasma und Kollagen rot färbt [85].

2.10.1.1 Verwendete Lösungen und Geräte

Tab. 14: Hämatoxylin/Eosin-Färbung

| Lösung | Inhalt | Konzentration |
|------------------------------|---------------------------|---------------|
| Hämatoxylin nach Gill | 6 g Hämatoxylin | 0,42 % |
| | 0,6 g Natriumjodat | 0,042% |
| | 52,8 g Aluminiumsulfat | 3,6 % |
| | 690 ml ddH ₂ O | |
| | 690 ml Ethylenglykol | |
| | 60 ml Eisessig | |
| Eosin | 0,5 g Eosin Y | 0,5 % |
| | 100 ml Ethanol 96% | |
| | 2 Tropfen Eisessig | |

Die Aufnahmen erfolgten mit der Funktion des Durchlichtmikroskops am Evos fl Fluoreszenzmikroskop

2.10.1.2 Durchführung

Die Präparate wurden 15 min in Hämatoxylin nach Gill und anschließend 10 min in Leitungswasser eingelegt. Danach wurden die Objekte mit destilliertem Wasser gespült und für 5 min in Eosin Y gefärbt. Am Schluss wurden die Präparate mit Ethanol 96% sowie Ethanol 100% entwässert und Xylen geklärt.

2.10.2 Calcein/Ethidiumbromid

In dieser Methode wurde eine Färbung der Epifluoreszenz wieder aufgegriffen, bei welcher Calcein zur Färbung der mineralisierten, kalziumhaltigen extrazellulären Matrix verwendet wurde [71] und die Zellkerne mittels Ethidiumbromid [76] gegengefärbt wurden. Diese Methode wurde gewählt, weil sie bei den Versuchen zur Epifluoreszenz bereits sehr gute Ergebnisse zeigte.

2.10.2.1 Verwendete Lösungen und Geräte

Tab. 15: Calcein/Ethidiumbromid-Färbelösung

| Lösung | Inhalt | Konzentration |
|------------------------------|--------------------------------------|---------------|
| Calcein-Arbeitslösung | 1 g Calcein | 4 mM |
| | 251 µl DMSO | |
| Ethidiumbromid-Arbeitslösung | 1mg Ethidiumbromid | 2 mM |
| | 581 µl DMSO/ddH ₂ O (1:4) | |
| Arbeitslösung | Calcein AM | 0,1% |
| | Ethidium homodimer | 0,1% |
| | Kulturmedium | |

Die Aufnahme erfolgte am Evos fl Fluoreszenzmikroskop.

2.10.2.2 Durchführung

Die Schnitte wurden jeweils mit 2 ml Färbelösung so bedeckt, dass die gesamte Fläche des Präparates eingeschlossen war. Unter lichtgeschützter Abdeckung wurden die Objekte 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss konnten die die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop mit 1360 x 1024 Pixel und einer horizontalen wie vertikalen Auflösung von 96 dpi aufgenommen werden.

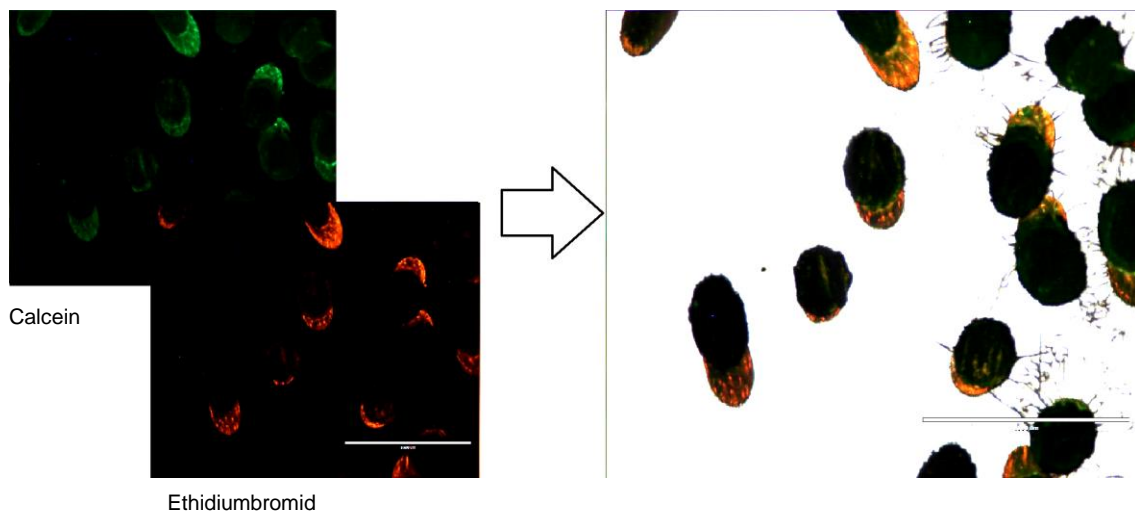


Abbildung 14: Calcein/Ethidiumbromid-Schnittfärbung, Calcein = grün, Ethidiumbromid = rot

2.10.3 Autofluoreszenz von Kollagen

In der Diagnostik von Gewebsveränderungen ist die Anwendung der Autofluoreszenz durch endogene Fluorophore verschiedener Geweben, wie Kollagen, Elastin oder Tryptophan Gegenstand vielfältiger Forschungen [50, 86-88]. Für die Untersuchung der Osteoblastendifferenzierung und der Ausbreitung von extrazellulärer Matrix spielt speziell das Kollagen, mit Anregungsmaxima von 280, 330, 450 nm und Emissionsmaxima von 310, 390, 530 nm [87], eine vordergründige Rolle. Diese Untersuchung ermöglichte dadurch die zusätzliche Darstellung von nicht-mineralisierter organischer Matrix.

2.10.3.1 Verwendete Geräte

Evos fl Fluoreszenzmikroskop

2.10.3.2 Durchführung

Die Schnitte der jeweiligen Dichten wurden zunächst unter dem Durchlichtmikroskop systematisch aufgenommen und anschließend mit Licht bei einer Wellenlänge von 485 nm. Das emittierte Licht wurde anschließend fotografisch im Tiff-Format mit einer Größe von 1360 x 1024 Pixel und einer horizontalen wie vertikalen Auflösung von 96 dpi dokumentiert und mit den Durchlichtmikroskopischen Bildern am Mikroskop überlagert.

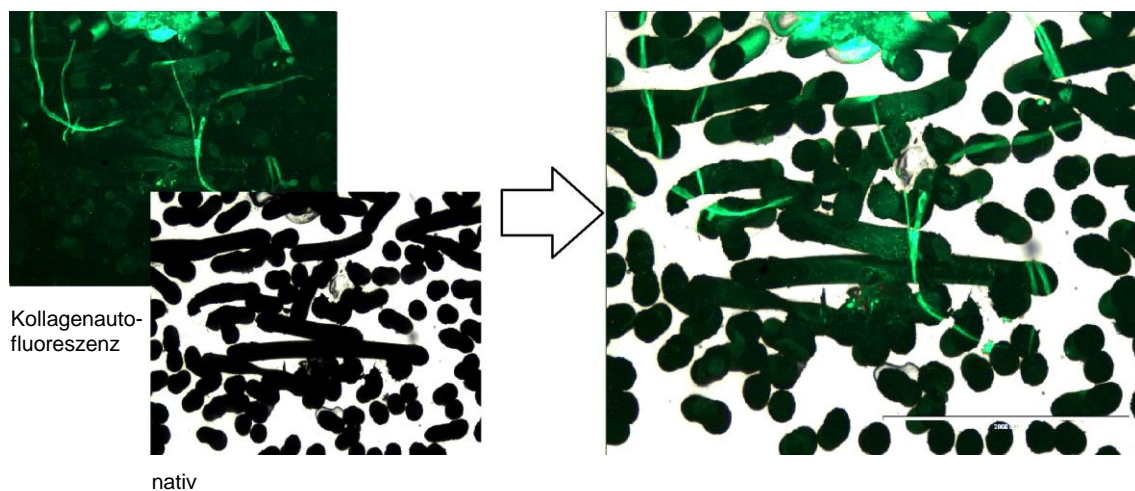


Abbildung 15: Kollagenautofluoreszenz, Kollagen (grün), Titanfäden (schwarz)

2.11 Mikroskopische Untersuchung struktureller Eigenschaften der Implantate

Weiterhin boten die lichtmikroskopischen Schnitte im ungefärbten Zustand die Möglichkeit, zusätzliche technische Daten über die Drahtgestelle zu sammeln, die zur Interpretation der Biokompatibilität beitragen sollten. Hierbei wurden die technischen Unterschiede der Implantate auf mikroskopischer Ebene evaluiert und dadurch Informationen über den tatsächlichen Freiraum bzw. die Porengröße des Gewebes innerhalb des Drahtgestells erlangt. Die Drahtgestelle wurden systematisch als durchlichtmikroskopischen Aufnahmen mit einer Größe von 1360x 1024 Pixeln und einer Auflösung von 96 dpi rasterförmig bei einer 5x Vergrößerung dokumentiert (siehe Abbildung 16). Die Open Source Software „ImageJ“ des NIH ist eine etablierte Methode zur quantitativen Analyse mikroskopischer Bilder [89-91] und besitzt eine hohe Reliabilität in der Bestimmung von Größenmaßen wie Länge und Fläche [92, 93]. Deshalb wurde diese zur Analyse der Aufnahmen hinsichtlich der Fläche der Drähte im 2D-Querschnitt sowie der Distanz zwischen den Drähten verwendet. Die Bilder wurden in ihrer Helligkeit und dem Kontrast individuell bearbeitet, damit eine automatische Analyse mittels Makro durch ImageJ erfolgen konnte.

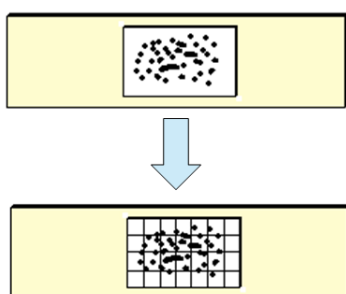


Abbildung 16: systematische Aufnahme des Schnittes (eigene Abbildung)

2.11.1 Software und Geräte

ImageJ 1.48

Evos fl Fluoreszenzmikroskop

2.11.2 Bestimmung der Drahtzwischenräume

Eine Einschätzung der Drahtzwischenräume sollte mit Hilfe des Abstandes zwischen den Drähten in der 2D-Aufnahme erfolgen. Dazu wurden in Image J von jeder Dichte jeweils mindestens 35% der Aufnahmen (n=10) in 5x Vergrößerung zufällig ausgewählt und 25 Abstände zwischen den Drähten mit der Funktion „Measure“ vermessen [94]. Die Messungen wurden einheitlich am Rand von, im Querschnitt getroffenen, Drahtabschnitten durchgeführt und jeweils im Winkel von 90° vorgenommen. Die Skalierung erfolgte zuvor am Maßstab, der durch das Mikroskop in der Aufnahme vorgegeben wurde mit der Funktion „set scale“ [91, 94].

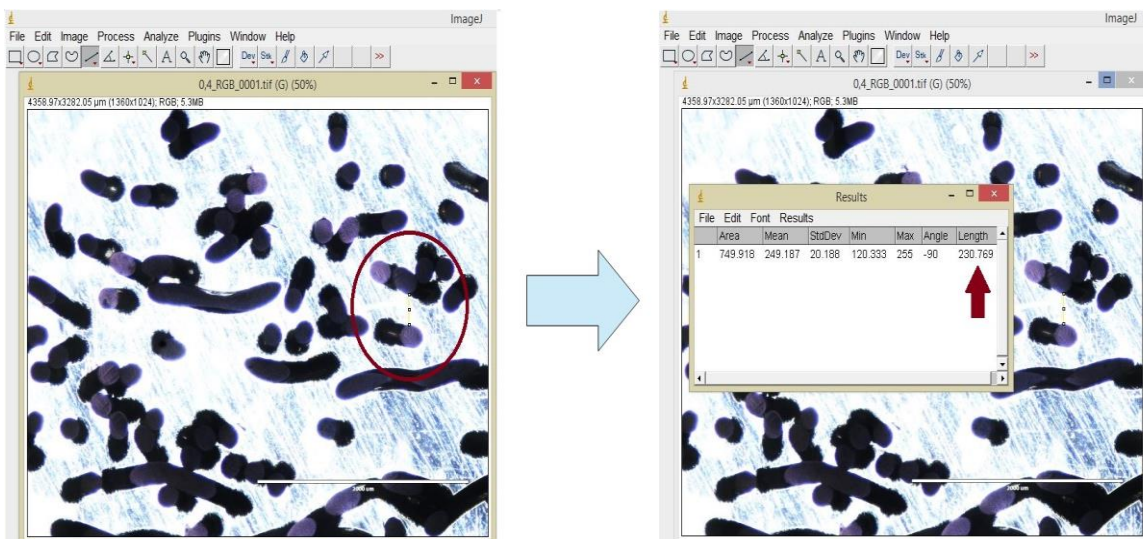


Abbildung 17: Abstandsmessung

Zur Auswertung wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen der jeweiligen Dichten ermittelt.

2.11.3 Bestimmung der Drahtfläche

Zur mikroskopischen Untersuchung der Herstellerangaben bezüglich der verschiedenen Dichten auf mikroskopischer Ebene wurden mindestens 35% der Aufnahmen, in 5x Vergrößerung, jeder Dichte (n=10) automatisch analysiert. Dazu wurde zunächst das Maß mit Hilfe des vom Mikroskop

angegebenen Maßstabs skaliert [94]. Anschließend wurden die Bilder in eine 8-bit Datei und im nächsten Schritt in ein binäres Bild transformiert. Nun konnten die abgebildeten Flächen mit der Funktion „Analyze Particle“ ermittelt werden [95]. Dieser Vorgang wurde durch Anwendung eines Makros automatisiert, wobei der Untersucher stets die Ergebnisse im Hinblick auf das Bild hinsichtlich der Plausibilität validieren musste. Zur Auswertung wurden der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet.

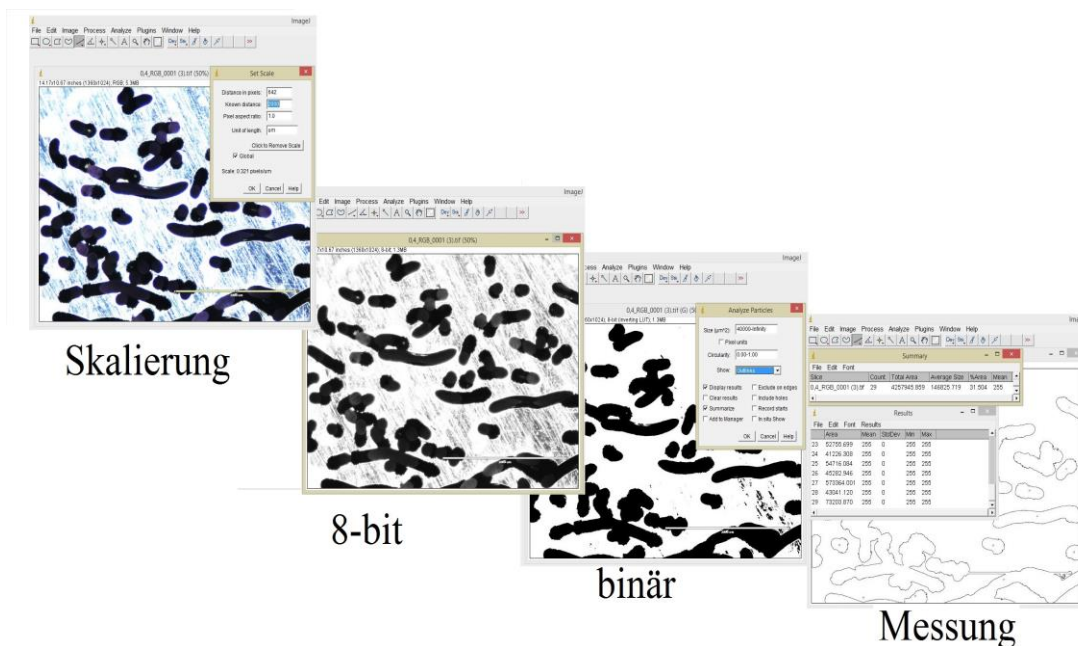


Abbildung 18: Flächenberechnung

Auszug aus dem verwendeten Makro:

```

„open("C:\\...\\Area\\0,4\\0,4_RGB_0001.tif");
//setTool("line");
makeLine(680, 890, 1304, 890);
run("Set Scale...", "distance=624 known=2000 pixel=1 unit=um global");
run("8-bit");
setOption("BlackBackground", false);
run("Make Binary");
run("Analyze Particles...", "size=25000 display summarize");
selectWindow("Results");
saveAs("Results", "C:\\...\\Area\\0,4\\Results0,4_1.txt");
run("Open Next");
[...]"

```

2.12 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte in SAS-JMP®. Zunächst wurden die Messwerte auf ihre Verteilung geprüft. Bei normalverteilten Werten wurden der Mittelwert und die einfache Standardabweichung bzw. der einfache Standardfehler ermittelt. Die Signifikanztests erfolgten mit dem Students t-Test. Die festgelegten Signifikanzniveaus waren $p=0,05$ (*) und $0,01$ (**) [#].

3. Ergebnisse

Die Biokompatibilität sollte entsprechend der einleitenden Definition hinsichtlich der Zellproliferation, der Differenzierung und dem Wachstumsmuster untersucht werden. Der folgende Abschnitt stellt die Ergebnisse bezüglich der einzelnen Punkte vor.

3.1 Nachweis der Zellproliferation

Das Zellwachstum wurde zum einen durch die quantifizierende Methode der Resazurinmessung und zum anderen qualitativ mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie genauer untersucht.

3.1.1 Resazurin-Umsatz als indirekter Marker für Zellproliferation

Die indirekte Bestimmung der Proliferation mittels Resazurinumsatz erfolgte in regelmäßigen Abständen über fünf Wochen. In der folgenden Übersicht (Abb.: 19) wurden die ermittelten Messwerte als Faktor zur Kontrolle, dem jeweiligen ersten Wert an Tag 1 des Versuchsdurchgangs, für die unterschiedlichen Dichten aufgetragen.

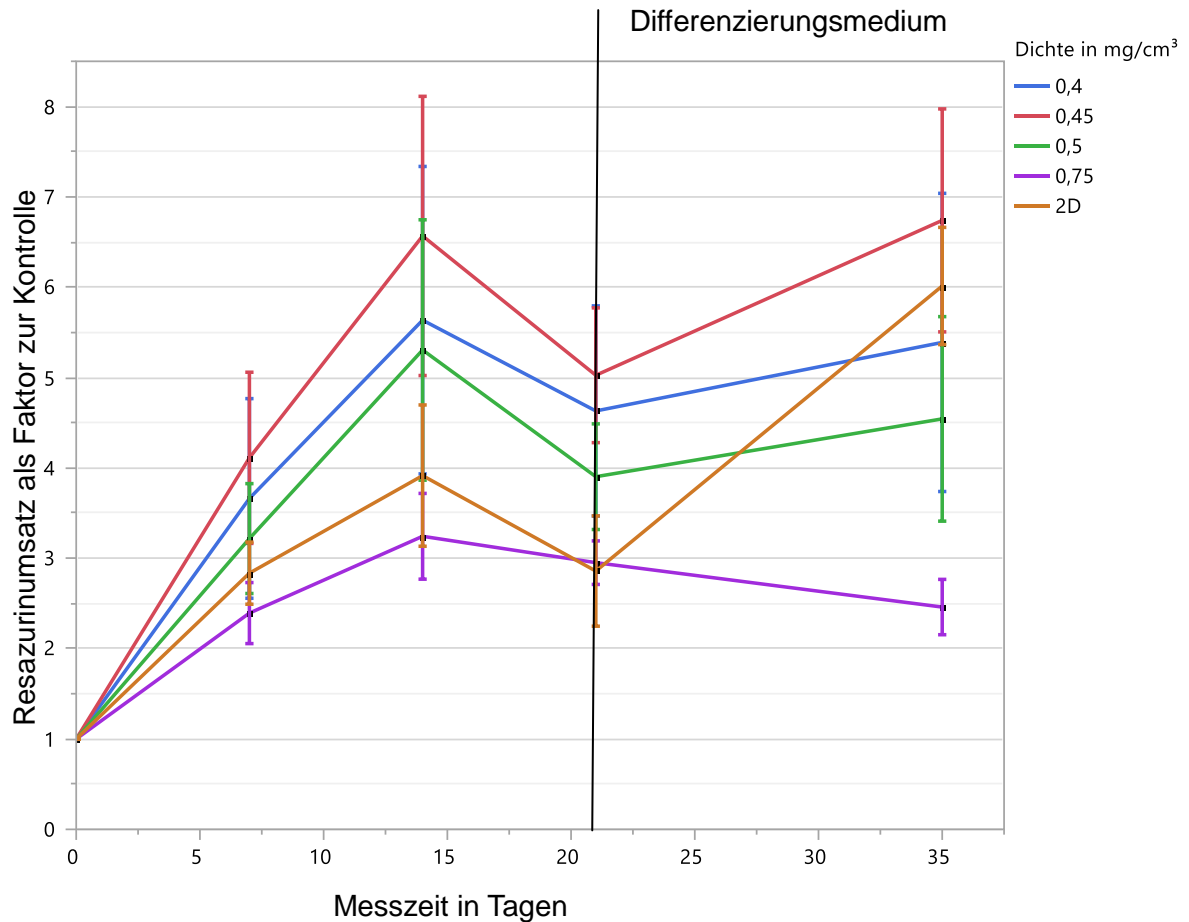


Abbildung 19: Übersicht Resazurinumsatz aller Dichten über 5 Wochen, Mittelwerte und erster Standardfehler, N=7, n=4

Es wird deutlich, dass alle Dichten über den gesamten Versuchszeitraum ein Zellwachstum im Bereich der 2D-Matrix aufweisen und ein erster Gipfel der Zellzahl nach zwei Wochen erreicht ist. Das Wachstum in der Anfangsphase weist nur geringe Unterschiede auf und trennt sich erst im weiteren Verlauf. Bis zur Hinzugabe des Differenzierungsmediums, weisen jedoch alle Graphen ähnliche Tendenzen auf. In den folgenden Darstellungen werden die jeweiligen Messzeitpunkte genauer betrachtet.

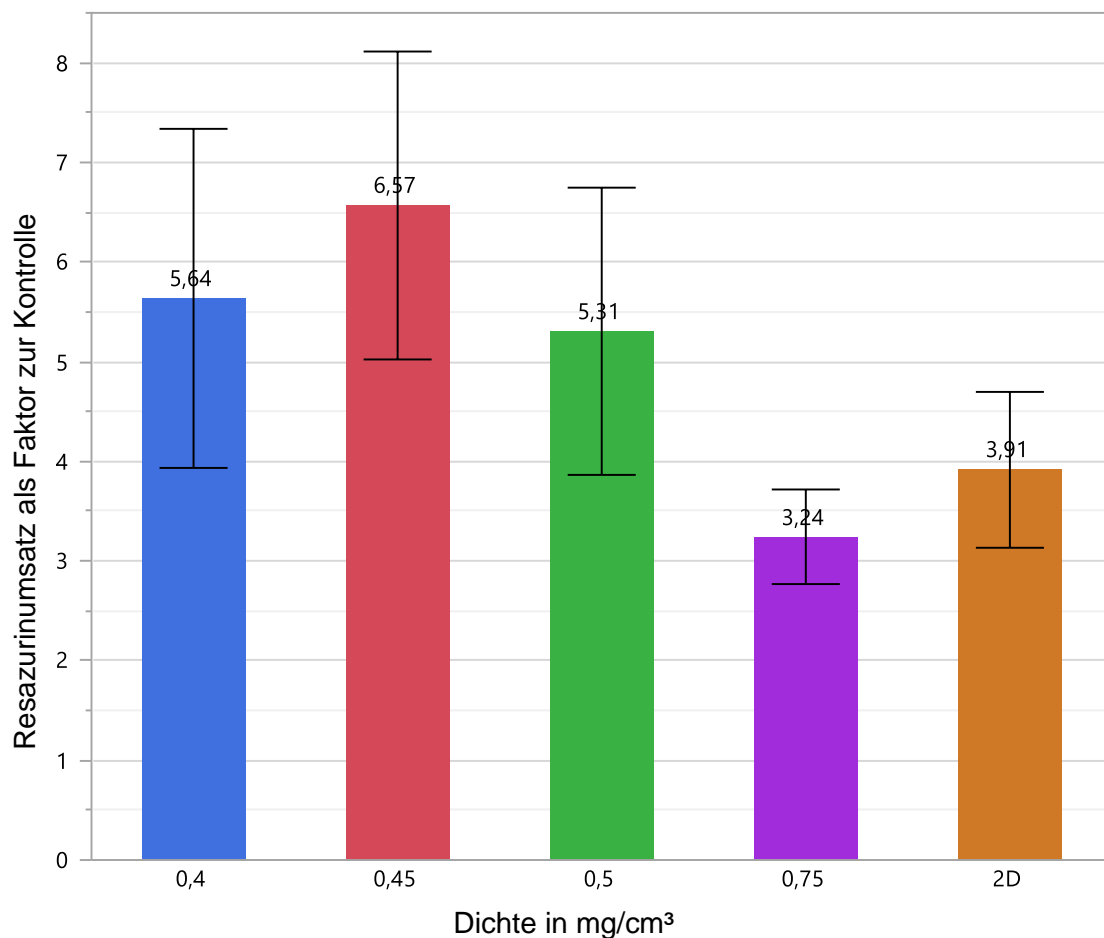


Abbildung 20: Resazurinumsatz an Tag 14 alle Dichten, Mittelwerte und erster Standardfehler, N=7, n=4

Abbildung 20 verdeutlicht, dass nach zwei Wochen das Drahtgestell der Dichte 0,45 mg/cm³ mit dem Faktor 6,57(+/-1,54) die tendenziell höchste Proliferationsrate erreicht, während die Dichte 0,75 mg/cm³ mit 3,25(+/-0,47) einen Resazurinumsatz zeigt, der noch unter der zweidimensionalen Umgebung mit 3,91(+/-0,78) liegt. Insgesamt lässt sich jedoch erkennen, dass die Drahtgestelle mit den niedrigeren Dichten eine gesteigerte Proliferation gegenüber der 2D-Kontrolle aufweisen, sich jedoch untereinander nicht signifikant unterscheiden [#].

Nachdem die höchste Zellzahl, vor der Differenzierung, überschritten wurde, fällt die Proliferationsrate synchron bei allen Dichten bis zum Wechsel des Nährmediums an Tag 21 ab.

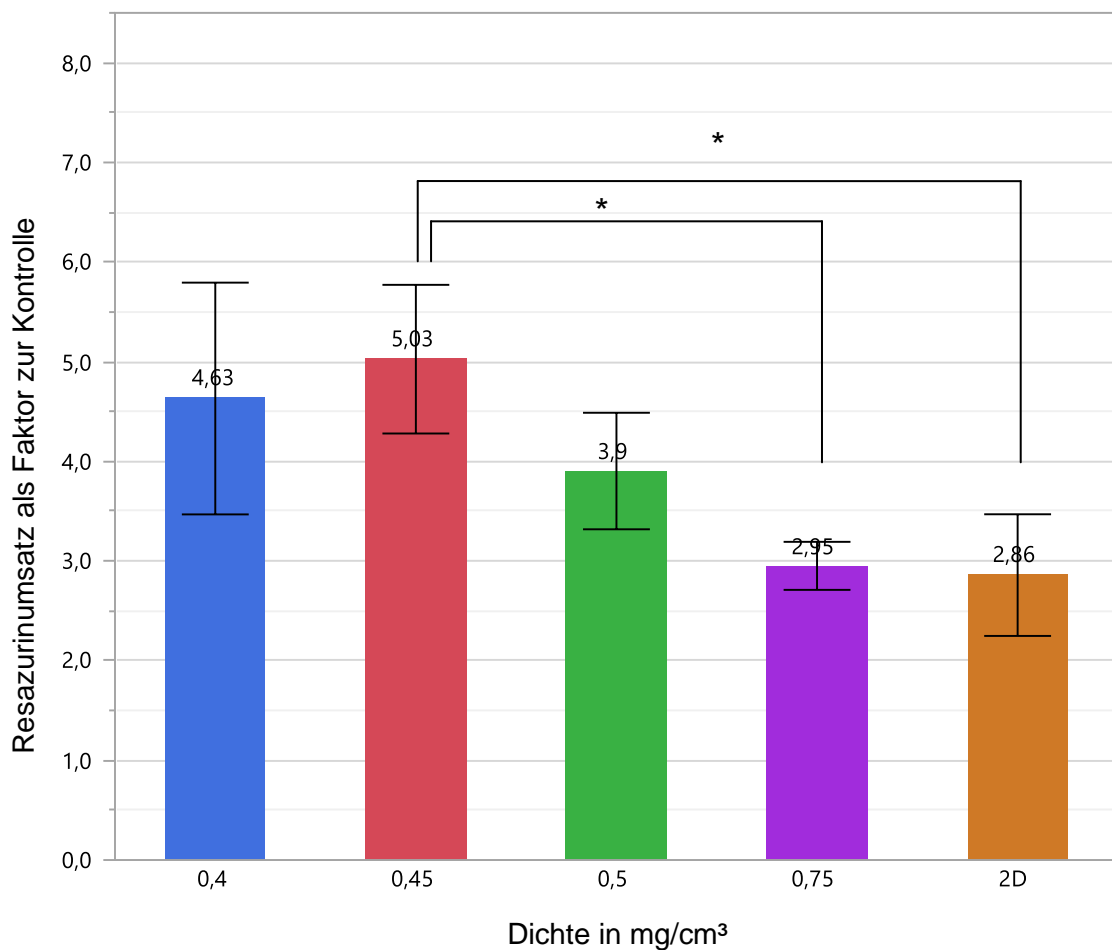


Abbildung 21: Resazurinumsatz an Tag 21 alle Dichten, Mittelwert und erster Standardfehler, N=7, n=4 (*: $p < 0,05$)

Der Resazurinumsatz bei $0,45 \text{ mg/cm}^3$ zeigt sich zu diesem Messzeitpunkt signifikant gesteigert gegenüber der Dichte $0,75 \text{ mg/cm}^3$ und der 2D-Matrix ($p < 0,05$). Die Zellviabilität liegt nun tendenziell bei allen Drahtgestellen über der der 2D-Umgebung.

Das Ergebnis der Messung am Tag 21 (Abb.: 22) zeigt den Rückgang der Proliferation sowohl in allen Dichten als auch in der 2D-Kontrolle im Vergleich zum 14. Tag, welcher am deutlichsten im Drahtgestell mit $0,45 \text{ mg/cm}^3$ Dichte mit einer Differenz von 1,54 ist. Der geringste Wachstumsrückgang zeigt sich bei der Dichte $0,75 \text{ mg/cm}^3$ mit einer Differenz im Mittelwert von 0,29 [#].

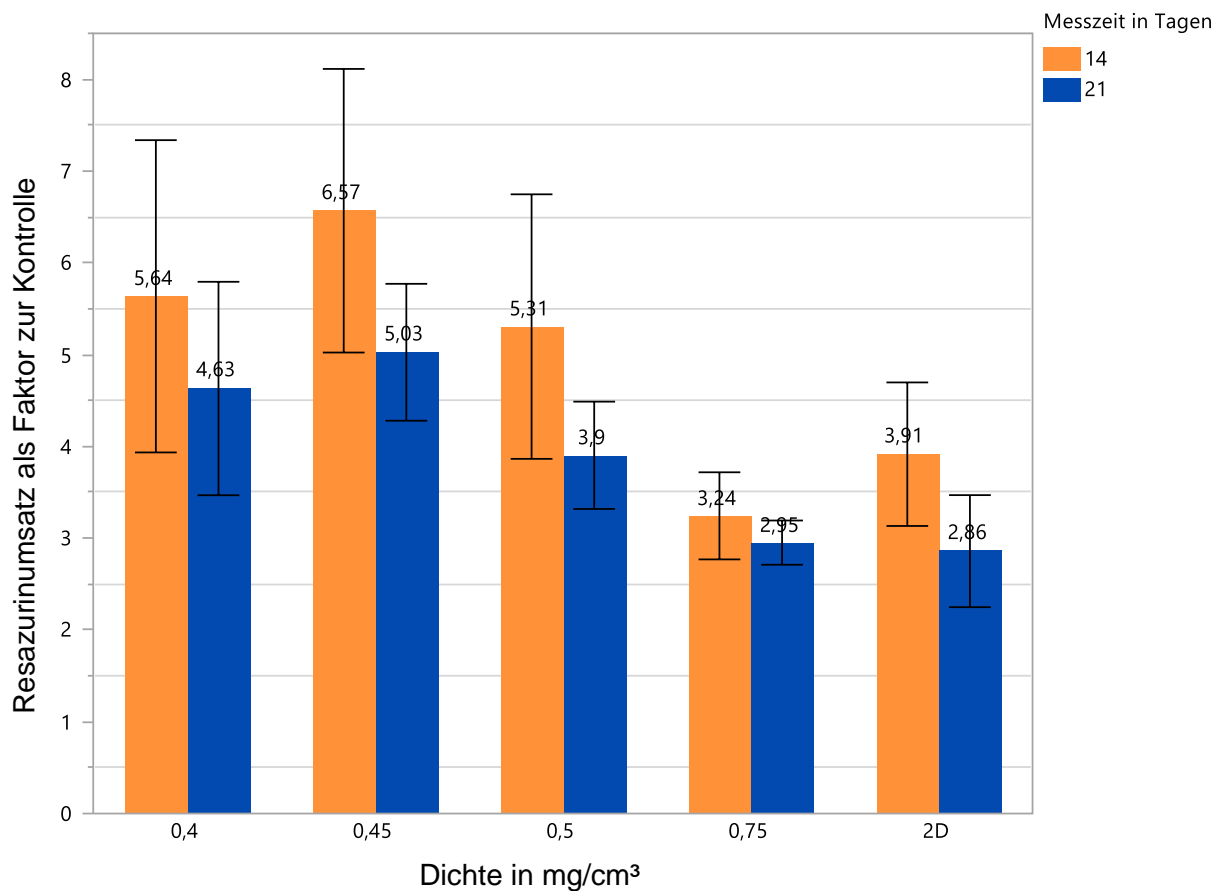


Abbildung 22: Differenz des Resazurinumsatzes von Tag 14 auf Tag 21, Mittelwerte und erster Standardfehler N=7, n=4

Im Anschluss an diese Messung wurde das Kulturmedium gegen das Differenzierungsmedium ausgetauscht, um die Entwicklung der SCP-1-Zellen zu Osteoblasten zu initiieren. Nach weiteren 14 Tagen erfolgte die letzte Messung des Resazurinumsatzes. Abbildung 23 zeigt, dass gegenüber 0,75 mg/cm³ bei den anderen Dichten und der 2D-Kontrolle der Resazurinumsatz nach fünf Wochen wieder ansteigt (Abb.: 19). Ein signifikanter Unterschied der Proliferation besteht zwischen der Dichte 0,75 mg/cm³ und 0,45 mg/cm³ ($p < 0,05$) sowie der 2D-Matrix ($p < 0,05$).

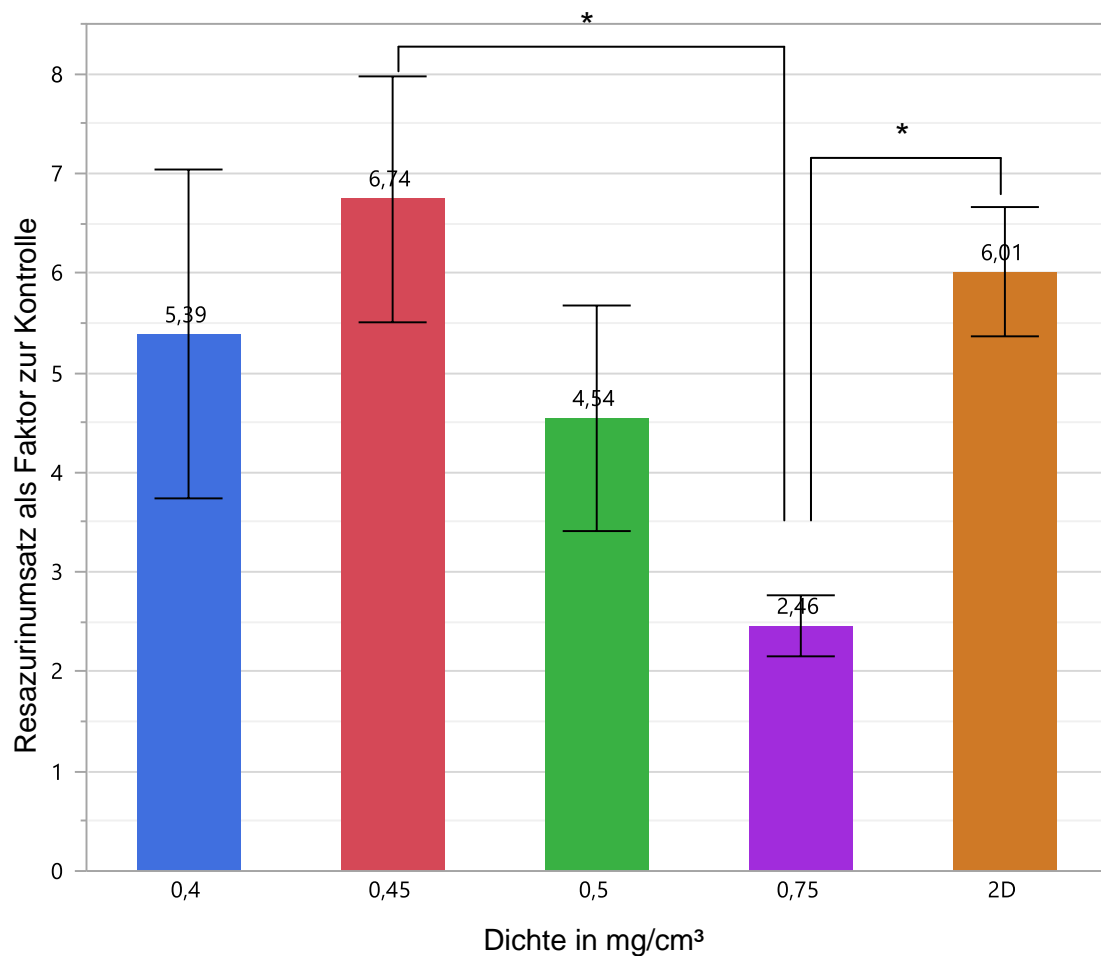


Abbildung 23: Resazurinumsatz an Tag 35 aller Dichten, Mittelwerte und erster Standardfehler, N=7, n=4 (*: $p < 0,05$)

In dieser Zeit kommt es, wie in Abbildung 24 ersichtlich, zu einem signifikanten Anstieg des Wachstums in der 2D-Matrix ($p < 0,01$). Die Drahtgestelle haben, bis auf die Dichte $0,75 \text{ mg/cm}^3$, ebenfalls eine tendenziell positive Wachstumsdifferenz. Das Implantat mit der Dichte $0,45 \text{ mg/cm}^3$ zeigt die größte Wachstumsdifferenz der Drahtgestelle im Mittelwert mit $1,71 \text{ [#]}$.

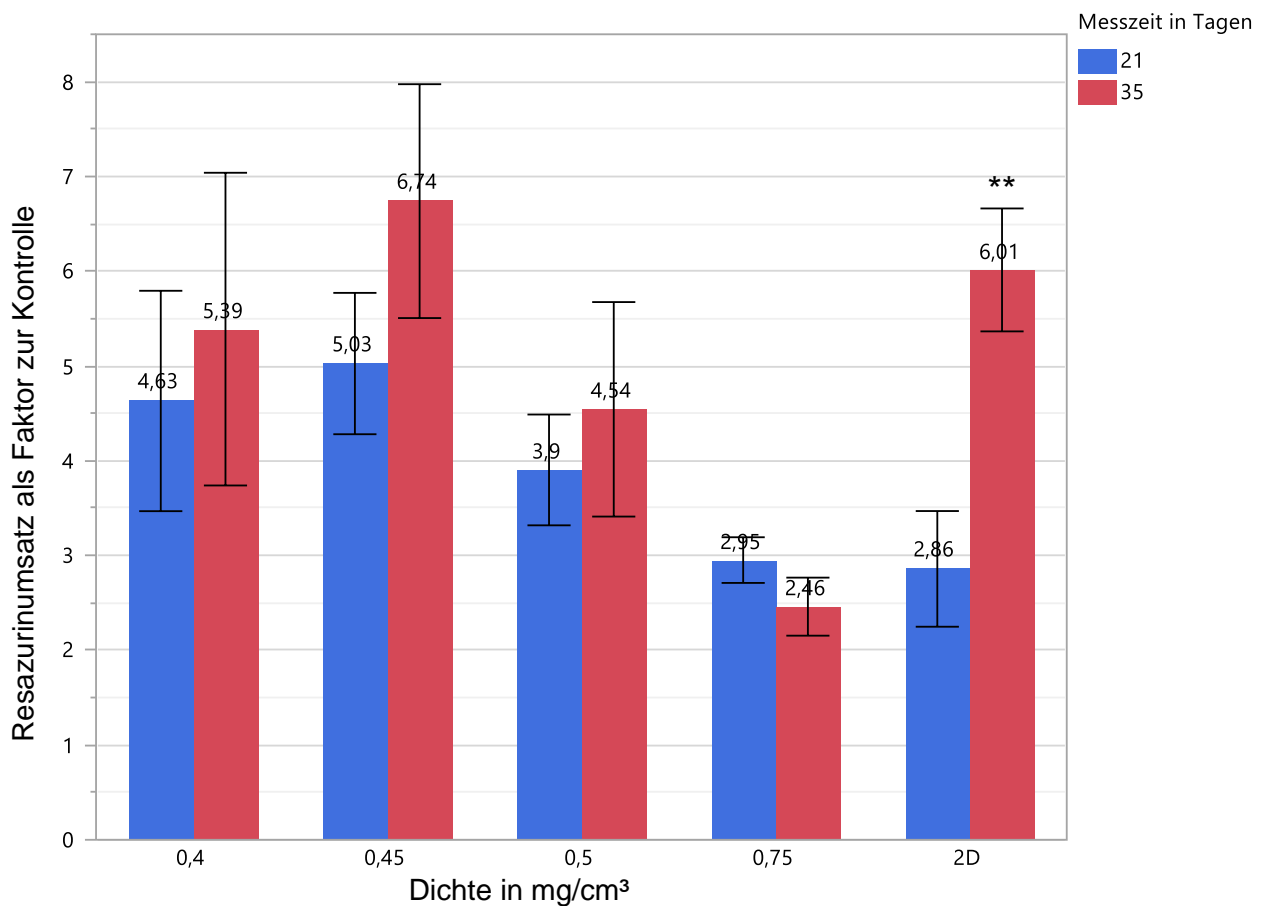


Abbildung 24: Differenz des Resazurinumsatzes von Tag 21 auf Tag 35, Mittelwerte und erster Standardfehler, N=7, n=4 (**: $p < 0,01$)

3.1.2 Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der Zellproliferation

Die morphologische Analyse des Zellwachstums erfolgte mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie. Die Lebend/Tot-Färbung nach fünf Wochen in Abbildung 25 liefert dabei sowohl einen Eindruck über das Zellwachstum als auch über das Verhältnis von viablen Zellen zu abgestorbenen Zellen.

In allen Dichten ist ein ausgeprägtes Zellwachstum an der Vielzahl grüner, viabler, und weniger roter, abgestorbener, Zellen erkennbar, welches sich adhärent entlang der Titandrähte auszubreiten scheint. Stellenweise sind zwischen den Drähten netzartige Strukturen erkennbar, die auf eine Matrixbildung hinweisen und ebenfalls mit Zellen bewachsen sind. Der dichte Zellrasen spiegelt die ausgeprägte Proliferation wider. Durch die Färbung wird

ein deutliches Überwiegen der viablen Zellen gegenüber abgestorbenen Zellen erkennbar [#].

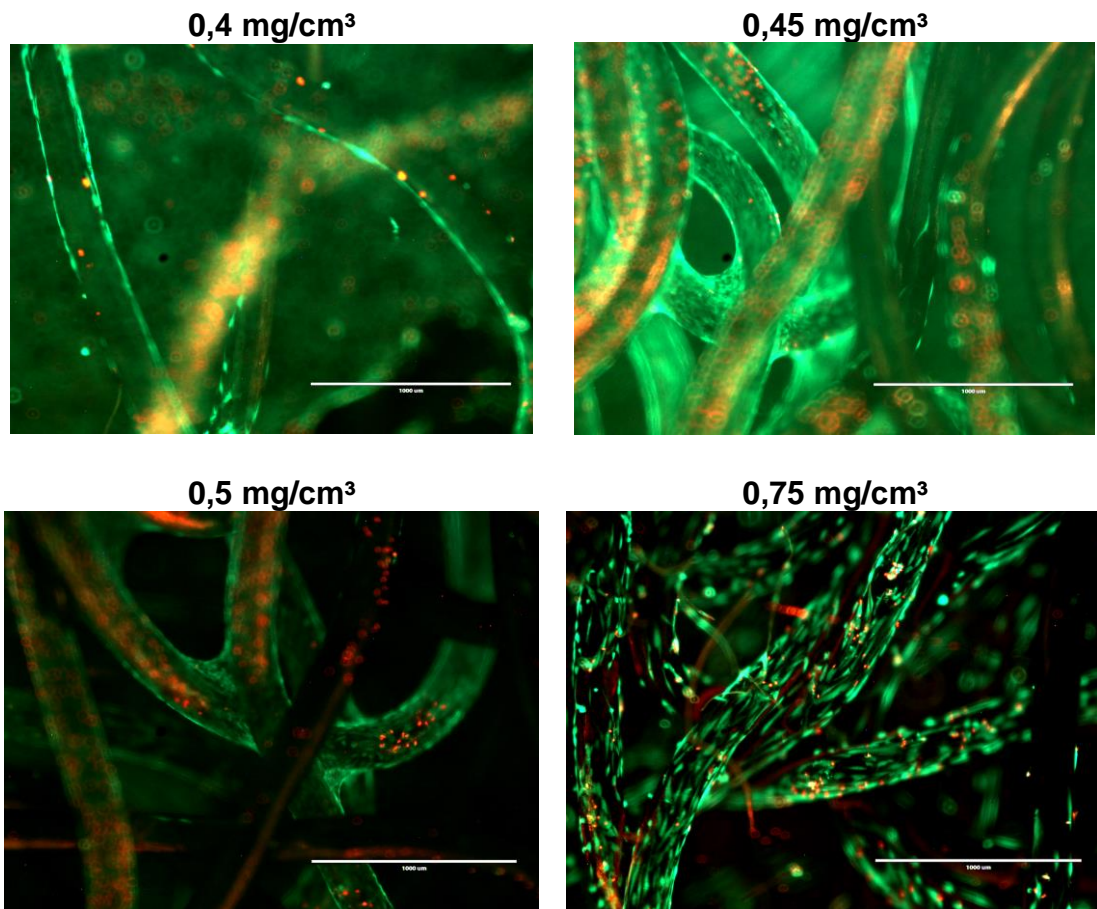


Abbildung 25: Lebend/Tot-Färbung (Calcein AM/Ethidium homodimer), lebende Zellen (Calcein AM) = grün, tote Zellen (Ethidium homodimer) = rot, Maßstabsbalken entspricht 1000 µm

3.2 Differenzierungsfähigkeit der multipotenten SCP-1-Zellen

Die Differenzierungsfähigkeit wurde ebenfalls durch eine quantifizierende Messung, wie die AP-Aktivität und Alizarin-rot Färbung, sowie eine mikroskopische Visualisierungen untersucht.

3.2.1 AP-Aktivität zur Bestimmung der Zelldifferenzierung

Die Bestimmung der Aktivität der alkalischen Phosphatase soll, als ein früher Marker, die Differenzierungsfähigkeit der Stammzellen nachweisen und wurde

dazu nach 5 wöchiger Zellkultur und 14 Tage nach Initiation der Differenzierung gemessen.

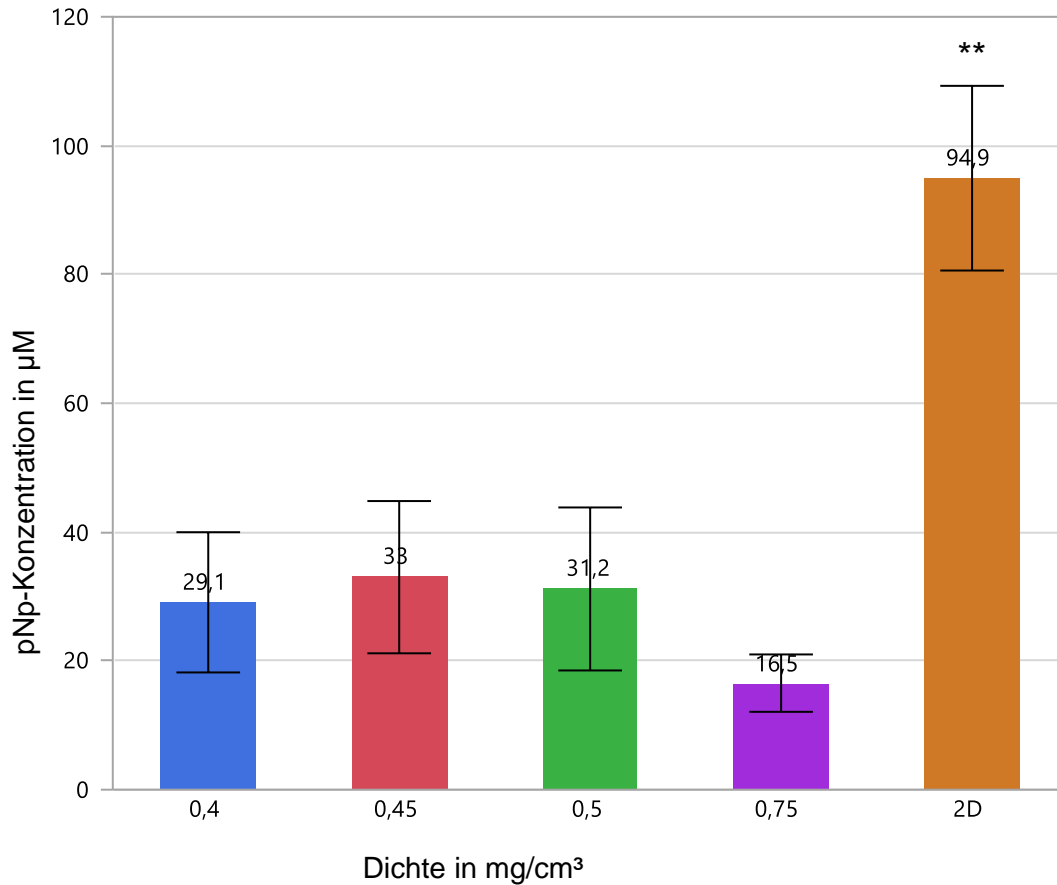


Abbildung 26: Gesamt AP-Aktivität nach 2 Wochen Differenzierung, Mittelwerte und erster Standardfehler, N=4 n=3 (**: p<0,01)

Die Gesamtaktivität der alkalischen Phosphatase der 2D Matrix zeigt einen signifikanten Unterschied zu den Drahtgestellen sämtlicher Dichten. Tendenziell weist das Drahtgestell mit der Dichte 0,45 mg/cm³ die höchste AP-Aktivität mit 33 (+/-11,82) µM pNP auf, wobei alle Drahtgestelle eine Differenzierungstendenz zeigen. Die Gesamtaktivität der AP ist sehr abhängig von der Zellzahl. Umso höher die Zellzahl, desto mehr AP-Enzyme sind vorhanden. Zur Normalisierung dieser Messung wurde deshalb die AP-Aktivität pro Zelle ermittelt. Dazu ist in Abbildung 27 die AP-Aktivität als Faktor zum zeitlich kohärenten Resazurinumsatz aufgetragen.

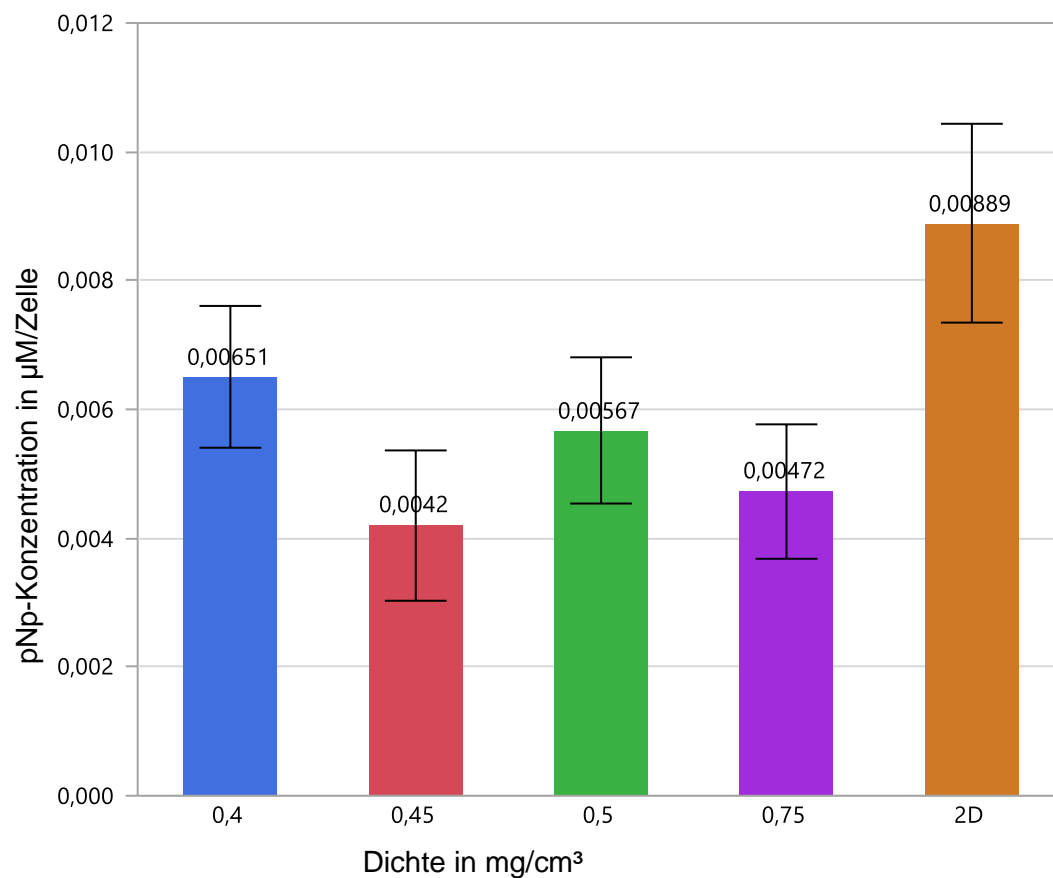


Abbildung 27: AP-Aktivität pro Zelle, Mittelwerte und erster Standardfehler, N=4 n=3

Die AP-Aktivität pro Zelle zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen den Drahtgestellen und der 2D-Kontrolle. Tendenziell weist die 2D-Matrix weiterhin die stärkste Differenzierungsaktivität auf. Im Gegensatz zur Gesamtaktivität zeigt hier die Dichte 0,4 mg/cm³ mit 0,0065 (+/- 0,0011) µM pNp/Zelle die stärkste Enzymaktivität. Außerdem sind zwischen den einzelnen Dichten tendenziell deutlichere Unterschiede erkennbar als in der Gesamt-AP-Aktivität. Die geringste Enzymaktivität scheint bei dem Drahtgestell mit 0,45 mg/cm³ und 0,0042 (+/- 0,0012) µM pNP/Zelle vorzuliegen [#].

3.2.2 Alizarin-rot zur Bestimmung der Mineralisierung

Ein weiteres Mittel zum Nachweis einer Zelldifferenzierung ist die Bestimmung von mineralisierter Matrix, welche durch Osteoblasten gebildet wurde. Des Weiteren kann der Reifungsfortschritt der Zellen während des

Differenzierungsvorgangs durch diesen zweiten Parameter besser eingegrenzt werden. Die Messung erfolgte zum selben Zeitpunkt wie die AP-Aktivitäts-Bestimmung nach fünf Wochen in Kultur mit zweiwöchiger Differenzierung.

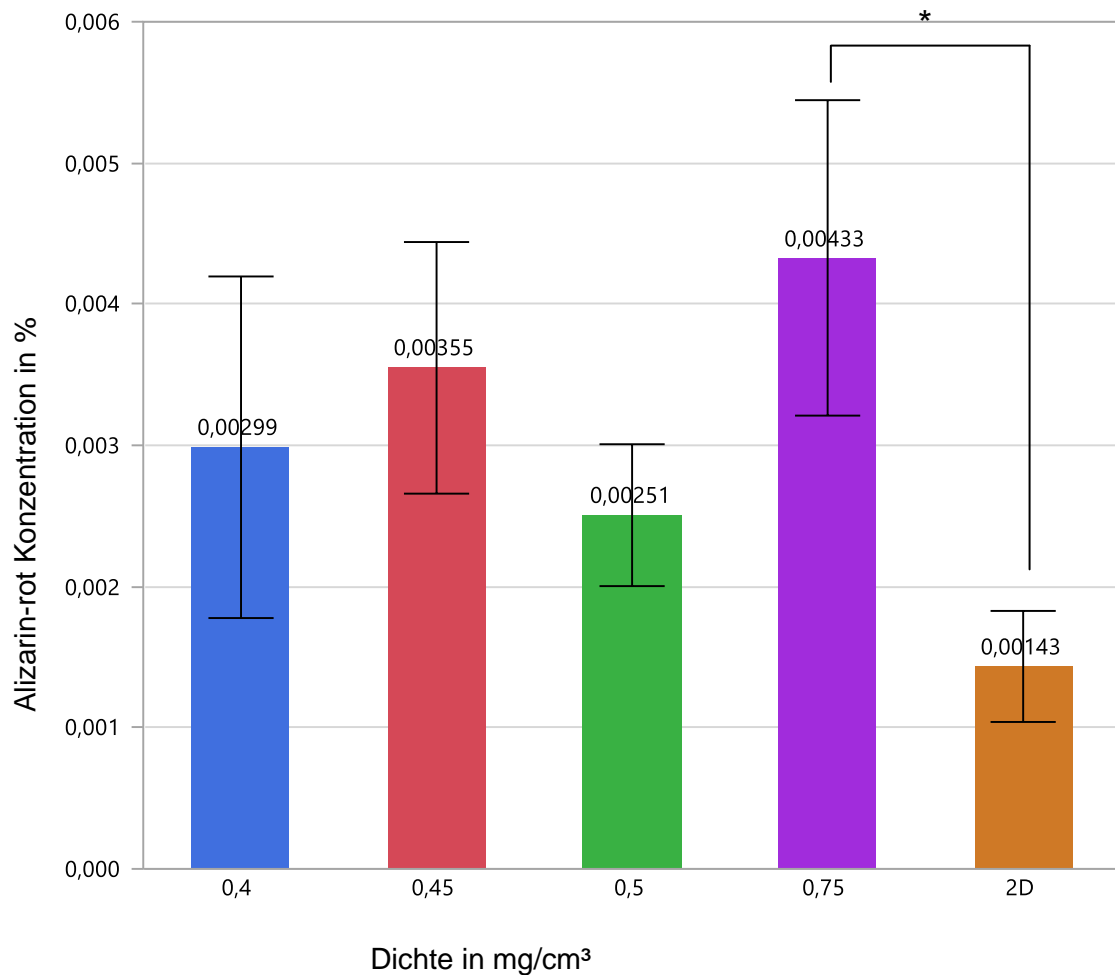


Abbildung 28: Alizarin-rot-Bestimmung, Mittelwerte und erster Standardfehler, n=4 N=2 (*: p<0,05)

Die Auftragung der Messwerte jeder Dichte in Abbildung 28 zeigt eine tendenziell gesteigerte Mineralisierung der Drahtgestelle gegenüber der 2D-Umgebung, wobei der Unterschied ausschließlich bei der Dichte 0,75 mg/cm³ signifikant ist. Ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Drahtgestellen ließ sich nicht nachweisen [#].

3.2.3 Epifluoreszente Nachweis von Matrixbildung

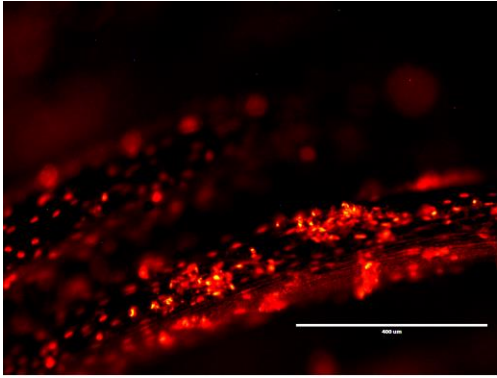
Zusätzlich zu den quantitativen Methoden wurde die Matrixbildung mikroskopisch untersucht.

Der fluoreszenzmikroskopische Nachweis der Matrixbildung gelang mittels Alizarin-rot/Hoechst-Färbung sowie der Calcein/Ethidiumbromid-Färbung. Das Ziel beider Fluoreszenzfärbungen war die abgegrenzte Darstellung von mineralisierter Matrix gegenüber den Zellkernen.

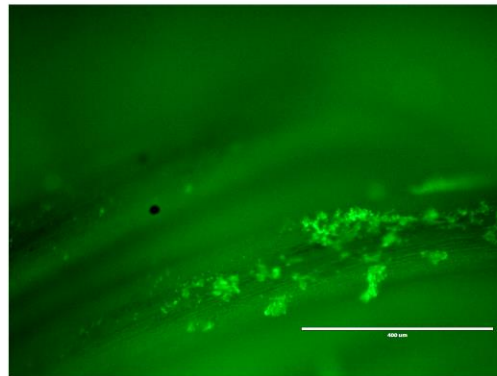
3.2.3.1 Der Nachweis mineralisierter Matrix mit Calcein

Der Farbstoff Calcein wurde als Acetoxymethylester bereits bei der Lebend/Tod-Färbung verwendet. Je nach Farbstoff werden die Bilder einzeln aufgenommen und überlagert dargestellt.

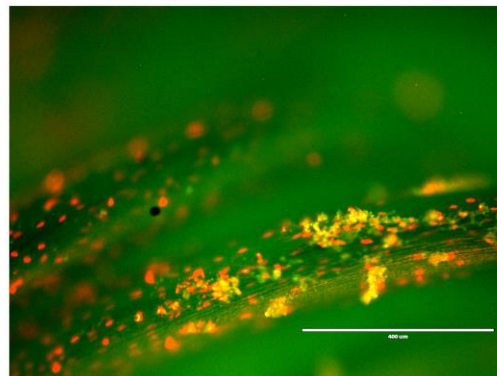
Die Abbildung 29 zeigt an dem Drahtgestell der Dichte $0,4 \text{ mg/cm}^3$ beispielhaft den morphologischen Nachweis der Matrixbildung. Die toten Zellen werden mit Hilfe von Ethidiumbromid rot dargestellt und wachsen entlang der Titanfäden. Dazwischen finden sich einzelne (grüne) Matrixansammlungen, in der Nähe der Zellen. Die Matrix bildet inhomogene Knötchen zwischen den gleichmäßig verteilten Zellkernen [#].



Die Zellkerne in orange
(Ethidiumbromid)



Die mineralisierte
Matrix in grün (Calcein)



Calcein und
Ethidiumbromid

Abbildung 29: Calcein/Ethidiumbromid-Färbung bei $0,4 \text{ mg/cm}^3$ Drahtgestell, mineralisierte (Calcein) = grün, Zellkerne (Ethidiumbromid) = rot, 10x Vergrößerung, Maßstabsbalken entspricht $400 \mu\text{m}$

3.2.3.2 Der Nachweis mineralisierter Matrix mit Alizarin-rot

Die rot-fluoreszierende Eigenschaft des kalziumbindenden Alizarin-rot stellt in der folgenden Abbildung 30 die mineralisierte Matrix rot dar, während Hoechst 33342 die Zellkerne blau anfärbt. Die Bilder des jeweiligen

Fluoreszenzfarbstoffes wurden einzeln aufgenommen und anschließend überlagert.

Man erkennt in allen Dichten eine ausgeprägte (rote) Matrixbildung entlang der Titandrähte. In der Nähe dieser Mineralisationsknoten finden sich zahlreiche gleichmäßig verteilte blaue Zellkerne. Es lässt sich demnach neben einer ausgeprägten Proliferation auch die Bildung mineralisierter Matrix morphologisch nachweisen.

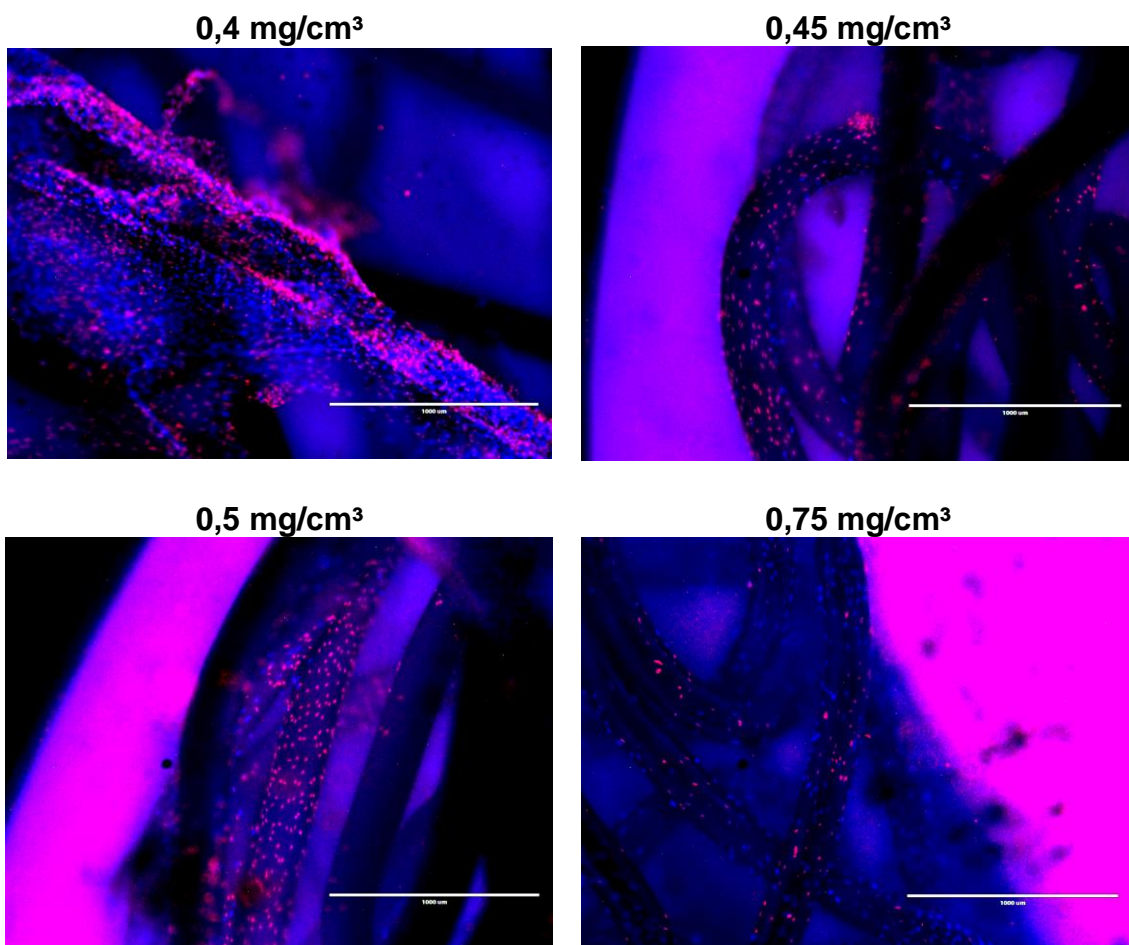


Abbildung 30: Alizarin-rot/Hoechst-Färbung, Zellen (Hoechst 33342) = blau, mineralisierte Matrix (Alizarin-rot) = rot, 5x Vergrößerung, Maßstabsbalken entspricht 1000 µm

Die Aufnahmen zeigen zufällig gewählte, exemplarische Ausschnitte aus den untersuchten Drahtgestellen und korrelieren deshalb nicht zwangsläufig mit den erhobenen Messwerten.

3.3 Zellwachstumsmuster auf den Drahtgestellen

Die Untersuchung des Wachstumsmusters gibt weitere Hinweise auf die Interaktion der Zellen mit den Drahtgestellen bezüglich der Biokompatibilität sowie des möglichen Einflusses auf die biomechanischen Eigenschaften des Implantats.

Die epifluoreszenten Aufnahmen haben nur eine begrenzte Aussagekraft über das Zellwachstum im Inneren der Drahtgestelle. Zur besseren Darstellung der Ausbreitung der Zellen im Implantatkern, wurden die Drahtgestelle geschnitten und mit konventionell lichtmikroskopischen sowie fluoreszenzmikroskopischen Methoden untersucht.

3.3.1 Mikroskopische Bestimmung des Zellwachstums mit Hilfe der Epifluoreszenz

Die Betrachtung der Implantatoberfläche in 2x Vergrößerung (Abb.: 31) zeigt ein dichtes Netz aus viablen Zellen die über eine matrixartige Struktur mit grüner Fluoreszenz miteinander verbunden werden, was auf eine Kollagenbildung hinweist. Die Zellen wachsen somit nicht nur entlang der Drahtfäden, sondern auch auf der eigenen extrazellulären Matrix.

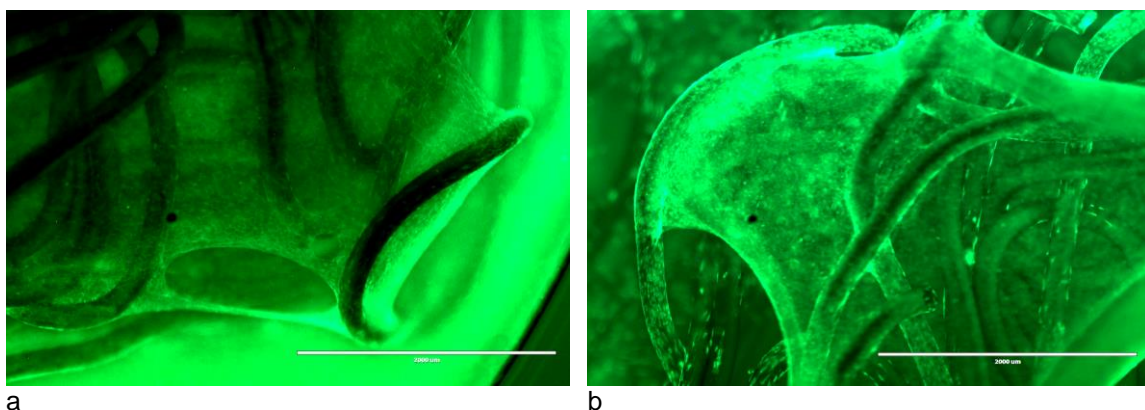


Abbildung 31: Calcein AM-Färbung, 2x Vergrößerung, Maßstabsbalken entspricht 2000 µm viable Zellen (grün), Kollagen (grün)

Im Hintergrund der Übersicht, d.h. im Inneren des Implantats, zeigt sich eine Rarifizierung des Zellwachstums, welches sich bei näherer Betrachtung (Abb.: 32) verdeutlicht. Die Zellen liegen den Titanfäden homogen an, zeigen aber zwischen den verschiedenen Drähten unterschiedlich starke Wachstumsausprägungen.

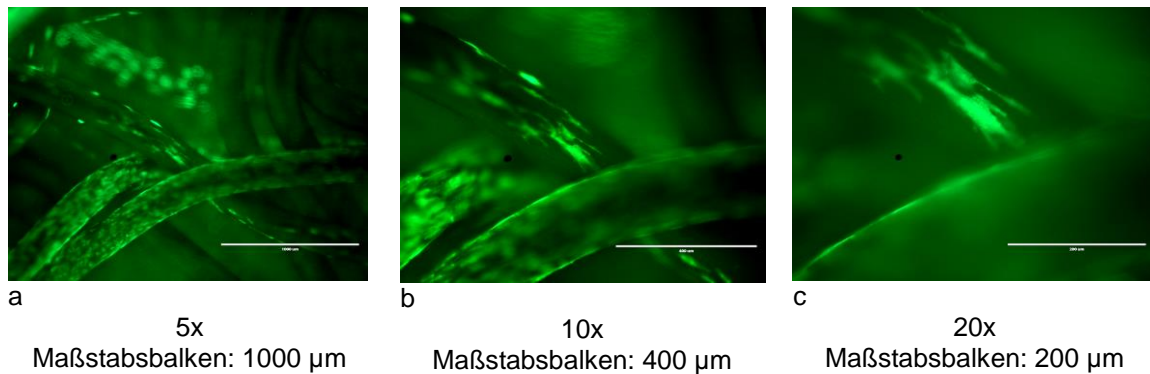


Abbildung 32: Calcein AM-Färbung, viable Zellen (grün) in aufsteigenden Vergrößerungen, die linke Seite weist zur Oberfläche

Die Matrixbildung zeigt sich in der übersichtlichen Betrachtung (Abb.: 33) ungleichmäßig verteilt, mit umgebenden Zellen und ebenfalls einer Abnahme im Inneren des Implantates. Dabei ist die mineralisierte Matrix zu kleinen Knoten verdichtet und über eine netzartige Struktur verteilt.

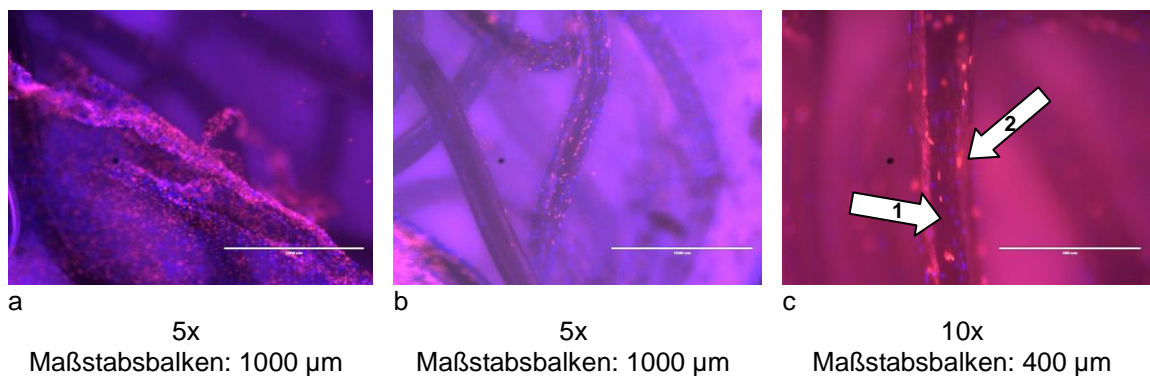


Abbildung 33: Alizarin-rot/Hoechst-Färbung: Zellkerne (blau, Pfeil 1), mineralisierte Matrix (rot, Pfeil 2) in aufsteigenden Vergrößerungen

Am Rand der Implantate findet sich, wie in Abbildung 34 dargestellt, eine regelmäßiger Mineralisierung der Matrix in Form kleiner Mineralisationsknoten statt.

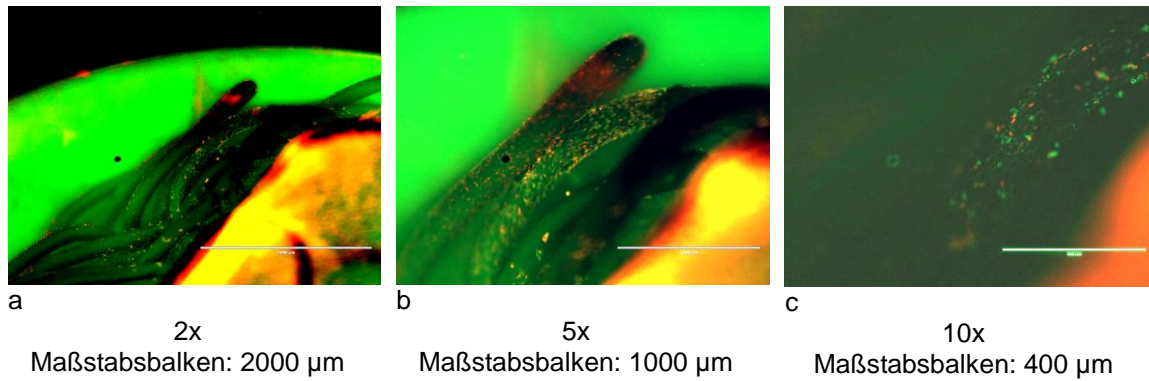


Abbildung 34: Calcein/Ethidiumbromid-Färbung, Zellkerne (rot), mineralisierte Matrix (grün), in aufsteigenden Vergrößerungen

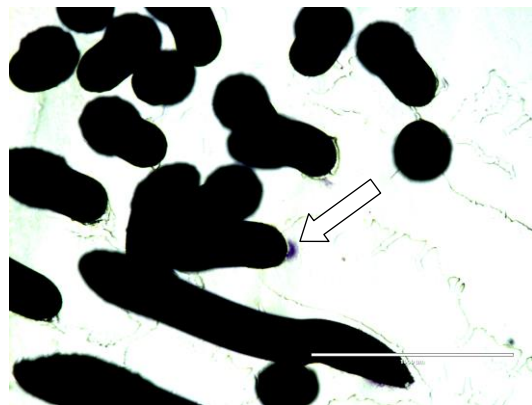
3.3.2 Lichtmikroskopische Untersuchung der Zellausbreitung an gefärbten Schnitten

Die Untersuchung des Implantats im Querschnitt ermöglichte den Nachweis des Zellwachstums, extrazellulärer Matrix sowie eine Übersicht über das Wachstumsmuster bis in die zentralen Anteile des Implantats hinein.

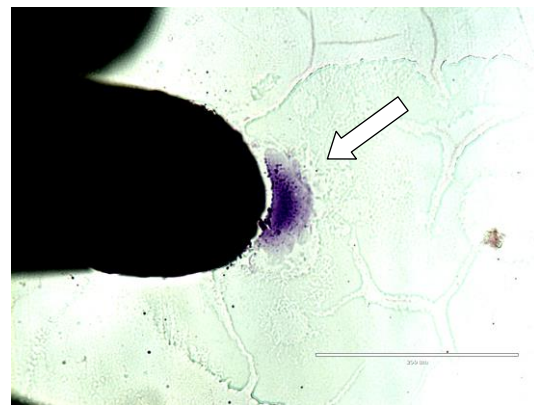
Die Darstellung der Zellen wurde mit der Hämatoxylin/Eosin-Färbung und Calcein/Ethidiumbromid vorgenommen. Die Verteilung der Matrix sollte mittels der Kollagenautofluoreszenz sowie der Calcein-Färbung eruiert werden, um sowohl mineralisierte als auch nicht-mineralisierte Anteile identifizieren zu können.

3.3.2.1 Hämatoxylin/Eosin-Färbung der lichtmikroskopischen Implantatschnitte

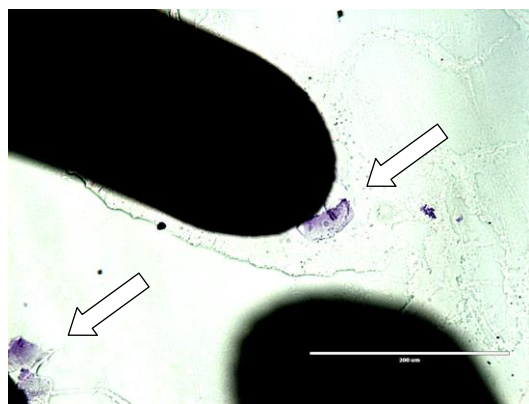
Abbildung 35 zeigt, dass nur vereinzelt Zellkerne und wenig Matrix zur Darstellung kamen. Es zeigten sich lediglich in den Dichten $0,4 \text{ mg/cm}^3$ und $0,5 \text{ mg/cm}^3$ gefärbte Strukturen.



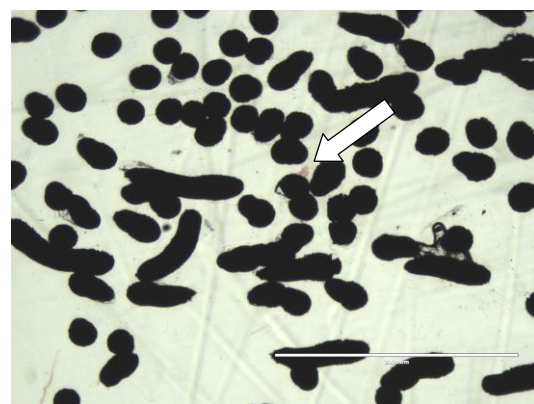
a (0,4 mg/cm³)
5x
Maßstabsbalken: 1000 µm



b (0,4 mg/cm³)
20x
Maßstabsbalken: 200 µm



c (0,4 mg/cm³)
20x
Maßstabsbalken: 200 µm



d (0,5 mg/cm³)
2x
Maßstabsbalken: 2000 µm

Abbildung 35: Hämatoxylin/Eosin-Färbung, Verschiedene Vergrößerungen, Zellkerne (blau), Matrix (rot), Titandrähte (schwarz)

Trotz der wenigen erkennbaren Strukturen geben diese Aufnahmen (Abb.: 35) erste Hinweise darauf, dass auch in den Schnitten Zellen und Matrix vorhanden sind. Die detektierten Zellkerne und Matrixbestandteile lagen alle den Titandrähten an. Es lässt sich jedoch keine Aussage über die Verteilung oder das Wachstumsmuster der Zellen treffen.

3.3.2.2 Calcein/Ethidiumbromid-Färbung der lichtmikroskopischen Implantatschnitte

Bereits in der Epifluoreszenz konnten sowohl Matrix als auch Zellen erfolgreich mit Calcein und Ethidiumbromid angefärbt werden. Diese Möglichkeit sollte

auch bei den lichtmikroskopischen Schnitten angewendet werden. Die Aufnahmen der einzelnen Farbstoffe sowie das Durchlichtbild werden in den Abbildungen 36-38 überlagert dargestellt.

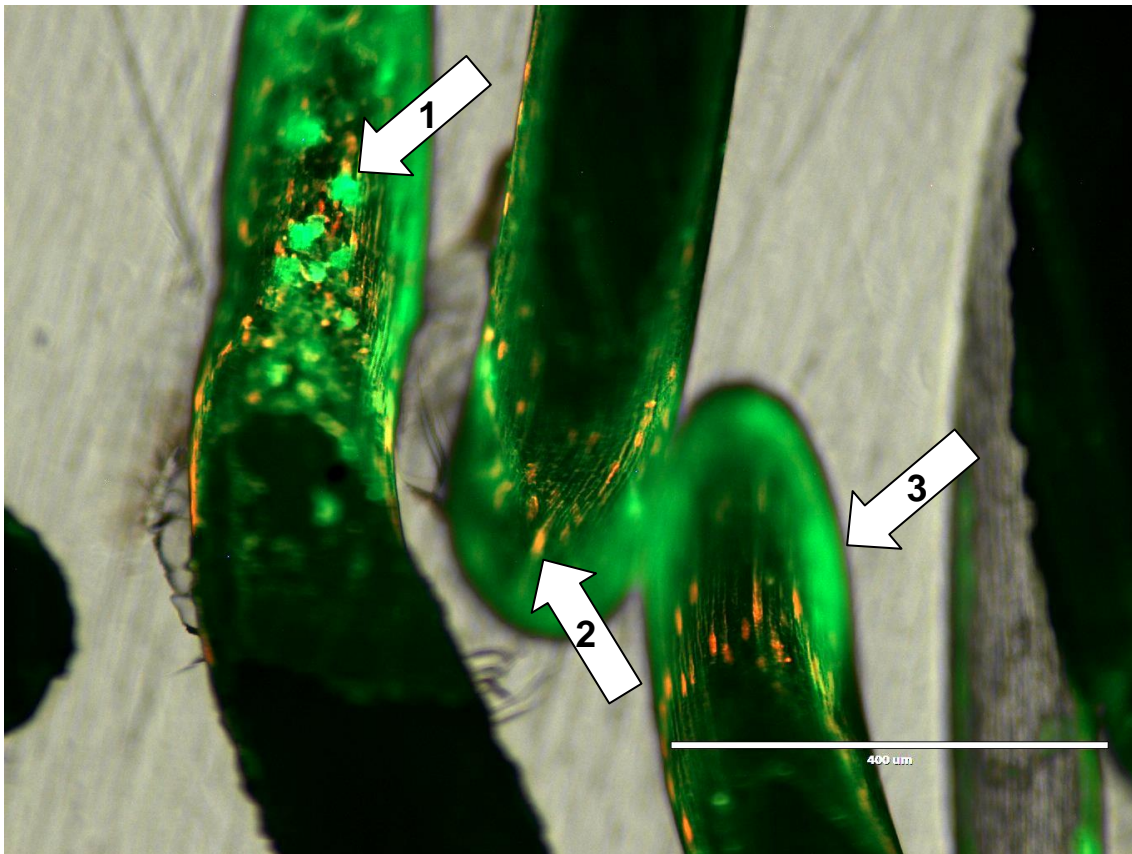


Abbildung 36: Calcein/Ethidiumbromid Färbung: mineralisierte Matrix (grün, Pfeil 1), Zellkerne (rot, Pfeil 2), Kollagen (grün, Pfeil 3), 10x Vergrößerung, Maßstabsbalken: 400 µm

Abbildung 36 hebt beispielhaft an der Dichte $0,45 \text{ mg/cm}^3$ die angefärbten Strukturen hervor. Die Zellkerne liegen als kleine rote Punkte (Pfeil 2) an den Titandrähten, neben der mineralisierten Matrix, die, wie bereits beschrieben, an den grünen unregelmäßig geformten Knoten erkennbar ist (Pfeil 1). Zusätzlich existiert eine flächige grüne Färbung, welche durch die Autofluoreszenz des Kollagens zustande kommt (Pfeil 3).

Diese beschriebenen Strukturen konnten in allen Dichten aufgefunden werden. Die Beispiele für jede Dichte sind in Abbildung 37 gegenübergestellt.

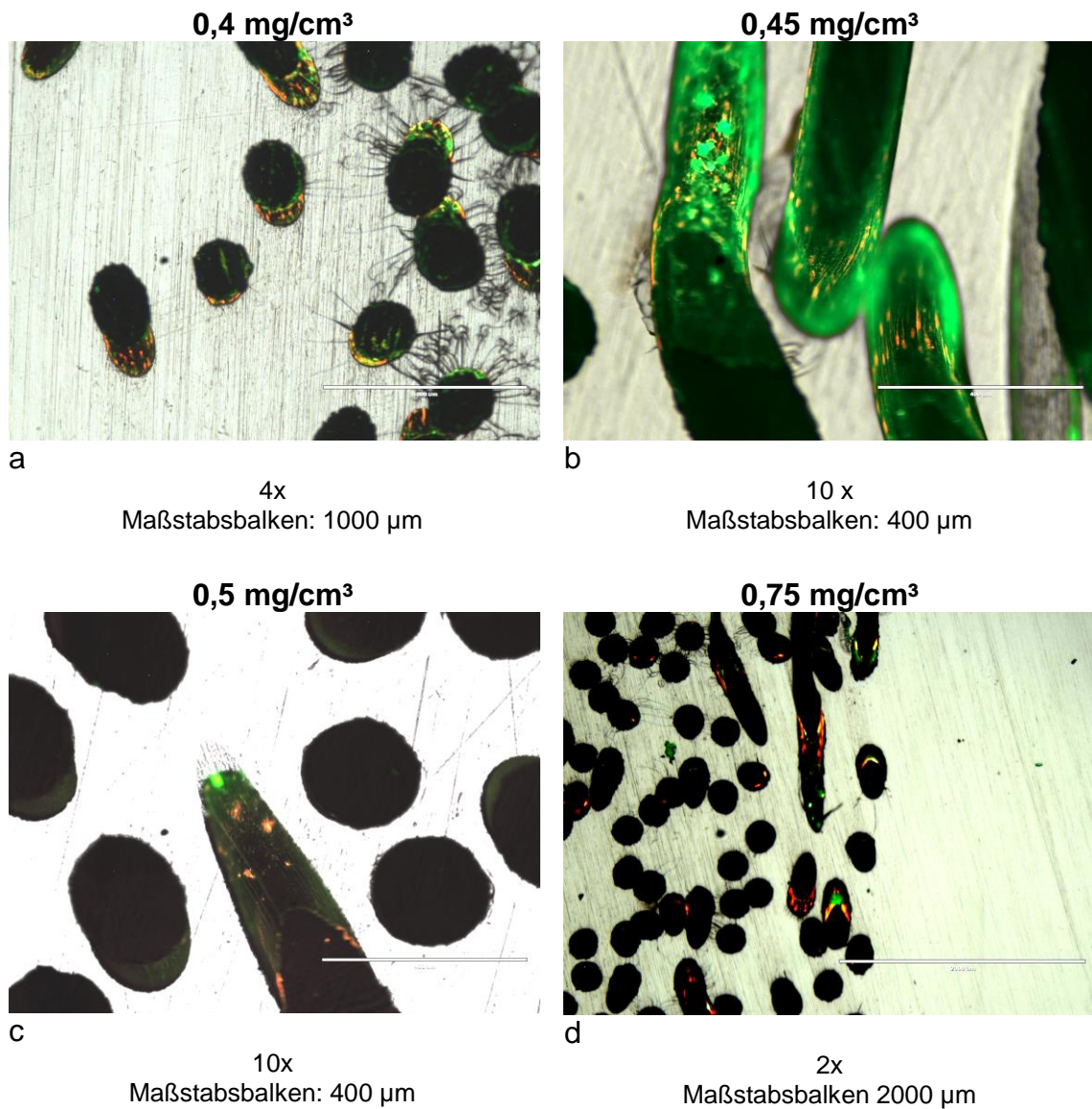


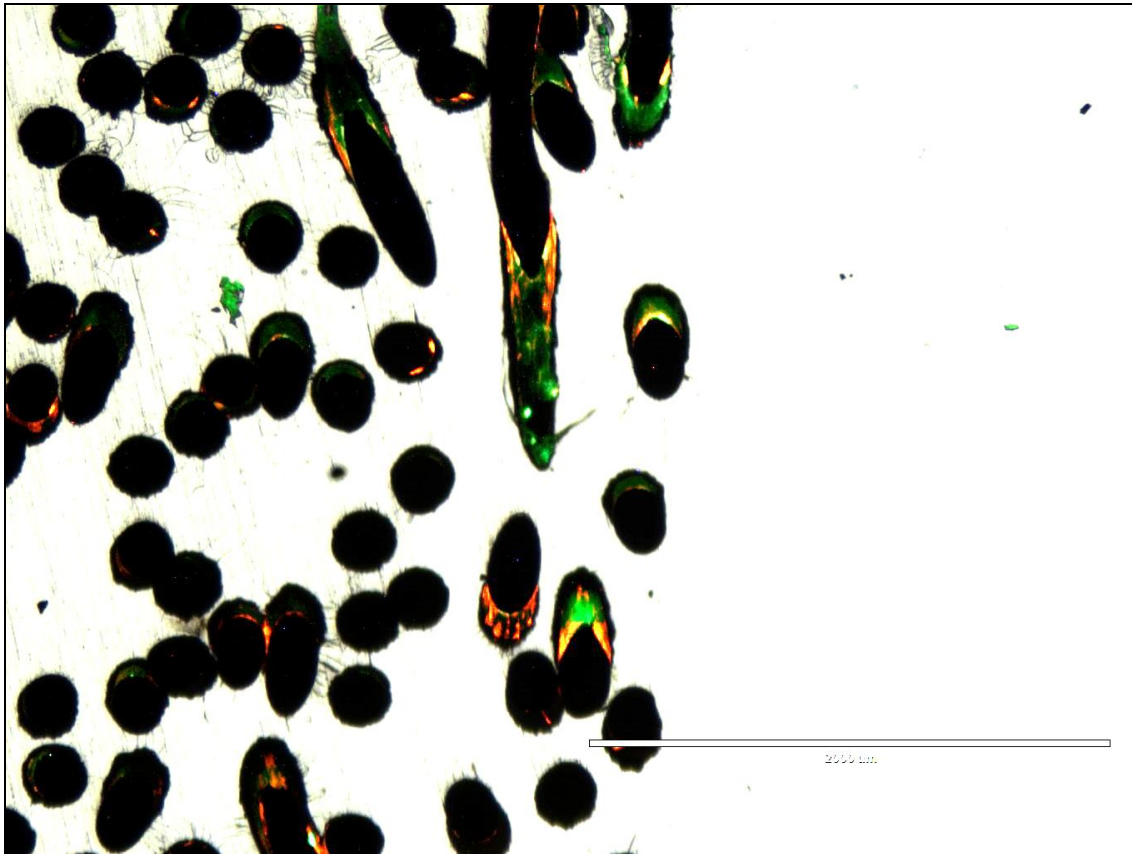
Abbildung 37: Calcein/Ethidiumbromid-Färbung, Übersicht aller Dichten, Zellkerne (rot), extrazelluläre Matrix (grün)

3.3.2.2.1 Wachstumsmuster im Calcein/Ethidiumbromid gefärbten Querschnittpräparat

Das Wachstumsmuster wird in der 2x Vergrößerung des Querschnitts des 0,75 mg/cm³ Drahtgestells in Abbildung 38 deutlich.

innen

außen



Zellen und EZM

Abbildung 38: Dichte $0,75 \text{ mg/cm}^3$, 2x Vergrößerung, Maßstabsbalken: $2000\mu\text{m}$, Zellkerne (rot), extrazelluläre Matrix (grün)

Die Verteilung der Zellen sowie extrazellulären Matrix (EZM) zeigt eine deutlich höhere Dichte am Rand des Präparates [#]. Die Menge gefärbter Zellen sowie mineralisierter Matrix nimmt sukzessive zur Mitte des Präparates ab. Es wird demnach der Eindruck aus der Epifluoreszenz bestätigt. Die mineralisierte Matrix konnte nur geringfügig in zentralen Implantatarealen detektiert werden, während die rein organische Matrix, erkennbar an der Kollagenautofluoreszenz, vorhanden war.

3.4 Mikroskopisch bestimmte technische Daten der Implantate

Die unterschiedlichen mikroskopischen Eigenschaften der Implantate bestimmen unmittelbar die Umgebungsbedingungen für das Wachstum und die Differenzierung der Zellen. Es sollte die Frage beantwortet werden, wie sehr sich die Implantate in ihren Umgebungseigenschaften für die Zellen durch die unterschiedlichen Dichten voneinander unterscheiden. Zur Beschreibung der unterschiedlichen Wachstumsvorraussetzung wurden die Abstände zwischen zufällig ausgewählten Drähten jeder Dichte sowie die Fläche, welche die Titandrähte im Querschnitt auf dem Objektträger einnehmen, in ImageJ bestimmt.

3.4.1 Drahtzwischenräume der Drähte

Für jede Dichte wurden zufällig 10 Schnitte ausgewählt und jeweils 25 Abstände im Winkel von 90° in der Schnittebene gemessen. Die Ergebnisse sind in Form eines Box plot in Abbildung 39 aufgetragen.

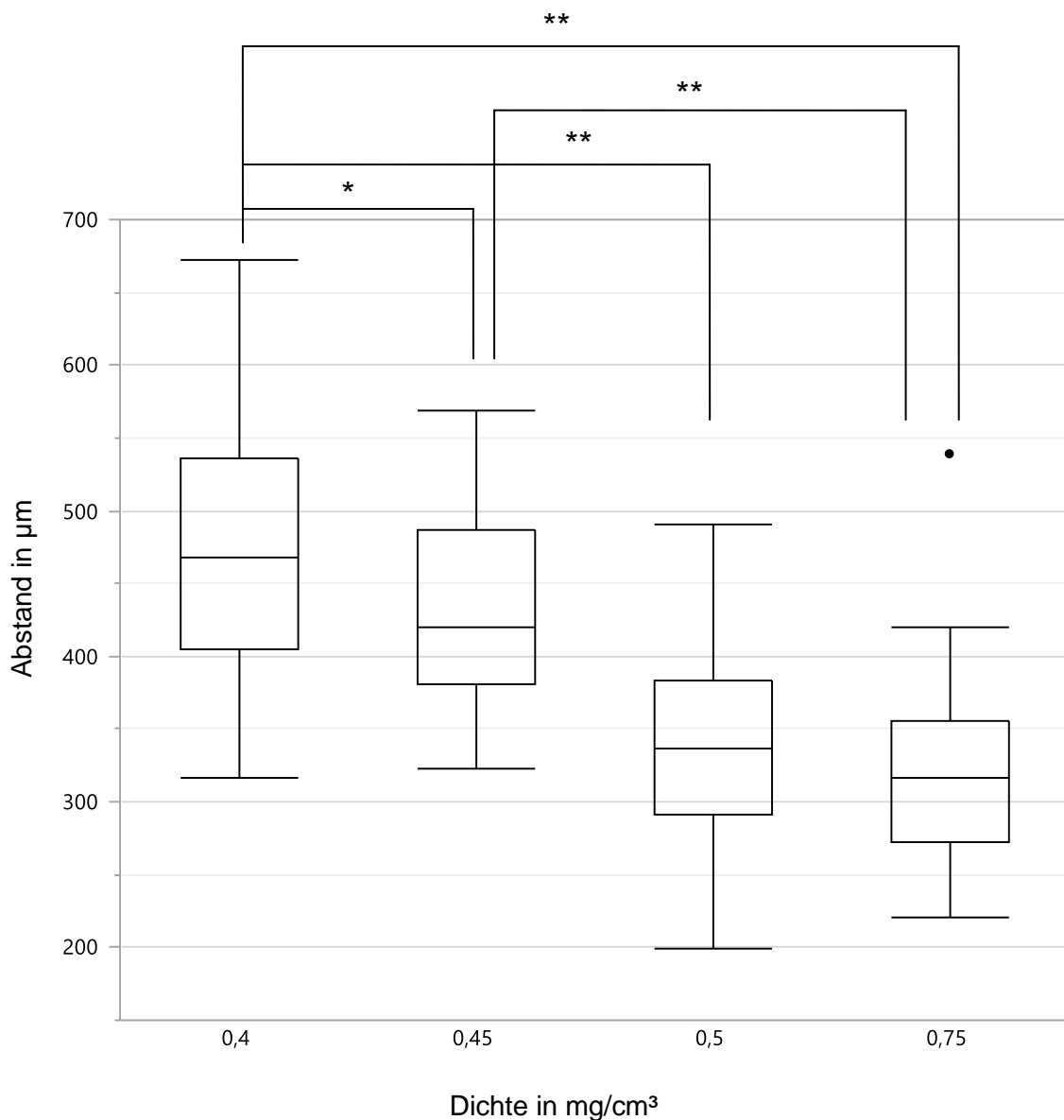


Abbildung 39: Abstände zwischen den Drähten jeder Dichten, N=10, n=3 (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$)

Alle Dichten zeigen untereinander einen tendenziellen Unterschied zwischen den durchschnittlichen Drahtabständen im Querschnitt, der mit zunehmender Dichte abnimmt. Bis auf die Dichten $0,75 \text{ mg/cm}^3$ und $0,5 \text{ mg/cm}^3$ unterscheiden sich alle Dichten in diesem Parameter signifikant voneinander. Die Dichte $0,4 \text{ mg/cm}^3$ erreicht dabei durchschnittlich den maximalen Drahtabstand von $474,71 (+/- 92,63) \mu\text{m}$, während dieser bei $0,75 \text{ mg/cm}^3$ mit $321,72 (+/- 70,35) \mu\text{m}$ am geringsten ist.

3.4.2 Fläche der Titandrähte im Querschnitt

In 10 zufällig ausgewählten Schnitten wurde automatisiert die Fläche bestimmt und ist in Abbildung 40 für jede Dichte aufgetragen.

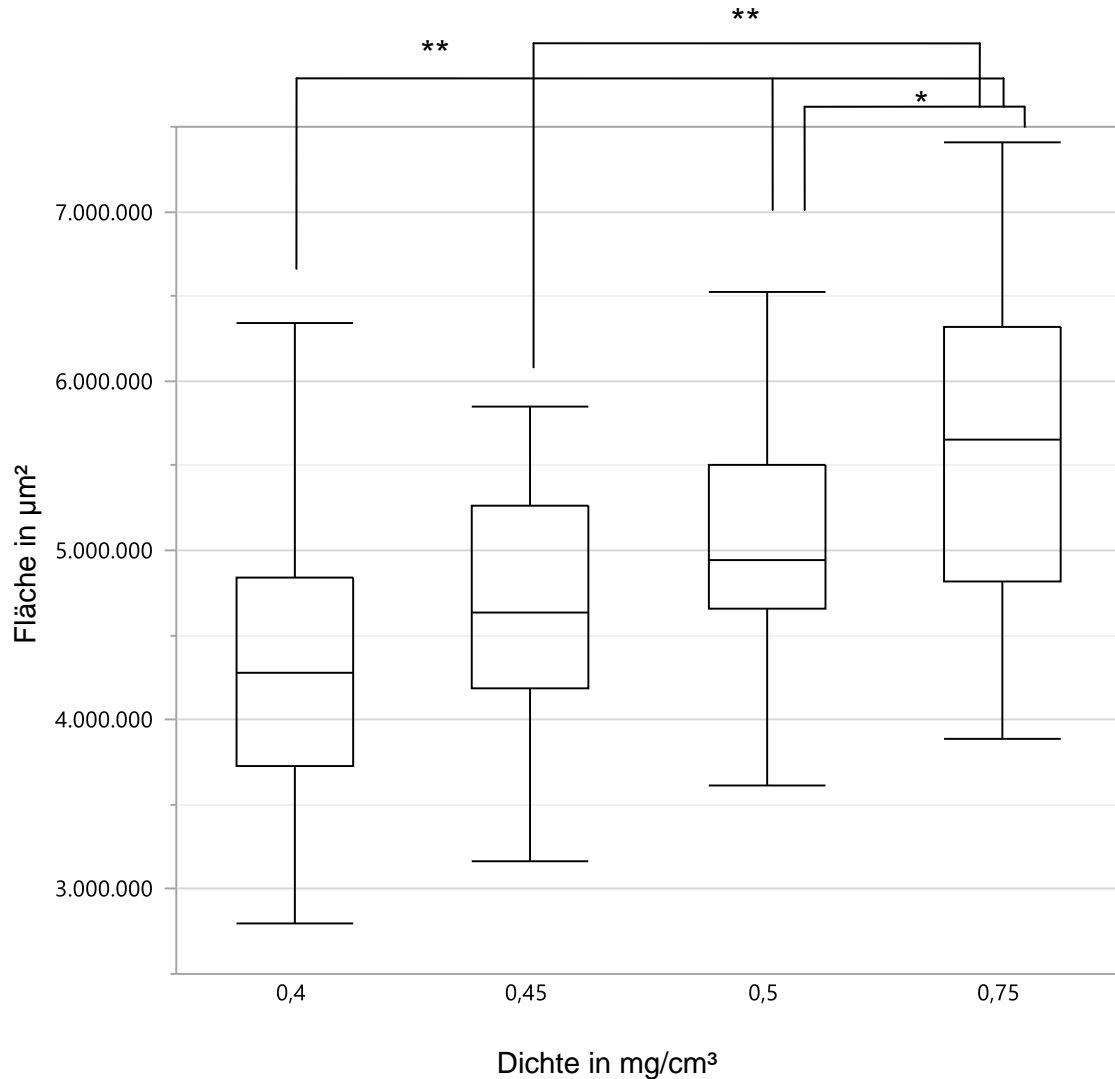


Abbildung 40: Fläche jeder Dichte, N=10, n=3 (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$)

Die Fläche, welche die Präparate auf dem Objektträger einnehmen, steigt mit zunehmender Dichte tendenziell an. Der Unterschied ist innerhalb der niedrigen Dichten zwischen 0,45 mg/cm³ und 0,5 mg/cm³ sowie 0,4 mg/cm³ nicht signifikant. Die maximale Fläche wird im Mittel bei einer Dichte von 0,75 mg/cm³ bei 5,641 (+/- 1,02) mm² erreicht. Das Minimum liegt durchschnittlich bei der Dichte 0,4 mg/cm³ mit 4,257 (+/- 0,86) mm².

4. Diskussion

Die hohe klinische und volkswirtschaftliche Relevanz von Rückenschmerzen sowie den damit verbundenen strukturellen Schäden an der Wirbelsäule treiben die Bestrebungen zur Entwicklung neuer Therapien im Bereich der Wirbelsäulen Chirurgie stets voran. Die Schwächen der aktuellen Standardtherapie, der interkorporellen Fusion, in der chirurgischen Behandlung des Bandscheibenprolapses, wie zum Beispiel die Anschlussdegeneration, erfordern für das verhältnismäßig junge Patienten Klientel neue therapeutische Ansätze. Mit steigender Lebenserwartung und anderen Risikofaktoren in der Bevölkerung, wie Adipositas, wird die Nachfrage nach längerfristig zuverlässigen Verfahren weiter zunehmen. Die gestrickte Nukleusprothese der Firma Buck und Co GmbH konnte bereits in den biomechanischen Tests überzeugende Ergebnisse liefern und wies vor allem eine geringe Implantatmigration auf, welche bisher eines der Kardinalprobleme in der Nukleusprothetik darstellt [27], [#]. Im nächsten Schritt sollte in dieser Arbeit die *in vitro* Biokompatibilität dieser neuartigen Nukleusprothese untersucht werden. In Anlehnung an Arbeiten von Jung, Zhang und Yang [47-49] wurde die Biokompatibilität anhand der Proliferation, Differenzierung und des Wachstumsmusters bestimmt.

Die Proliferation wurde indirekt durch die Messung des Resazurinumsatzes bestimmt und zusätzlich fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Das Wachstum an den Implantaten wurde dabei mit einer zweidimensionalen Kontrolle, ohne Drahtgestell, über fünf Wochen mit vier verschiedenen Implantatdichten verglichen, wobei in den letzten zwei Wochen zusätzlich die Differenzierung der Zellen eingeleitet wurde. Nach sieben Tagen zeigte sich eine ähnliche Wachstumstendenz bei allen Dichten sowie der 2D-Kontrolle mit jeweils unterschiedlichen Anstiegen, welche bis zum 14. Tag anhielt. Das Wachstum lag dabei erwartungsgemäß bei den meisten Dichten, bis auf 0,75 mg/cm³, oberhalb der 2D-Kontrolle, da jene eine größere Wachstumsfläche für die Zellausbreitung bieten als die zweidimensionale Umgebung. Das Implantat mit 0,75 mg/cm³ Dichte zeigte eine reduzierte Wachstumstendenz gegenüber der

2D-Kontrolle. Methodisch könnte eine erschwerte Verteilung des Resazurins in diesem Drahtgestell in Frage kommen, so dass die Zellen weniger mit dem Redoxfarbstoff in Kontakt kommen konnten, um diesen umzusetzen. In der Literatur zum Zellwachstum an gerüstähnlichen Wachstumsbedingungen, werden diese Ergebnisse bestätigt. Größere Hohlräume, wie sie in den niedrigeren Dichten vorliegen, fördern das Zellwachstum während es in kleinen Poren stagniert [96, 97]. Nach zwei Wochen erreichte die Dichte 0,45 mg/cm³ die höchste Wachstumsdifferenz mit 6,57(+/-1,54)-fachen Resazurinumsatz zum Tag 1. Es zeigte sich zu diesem Zeitpunkt jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Drahtgestellen und der 2D-Kontrolle, was darauf hinweist, dass das Zellwachstum durch die Drahtgestelle nicht deutlich behindert wurde und die Zellen die Titanoberfläche als Wachstumsmatrix angenommen haben. In der dritten Versuchswoche kam es zum tendenziell unterschiedlichen Wachstumsabfall sowohl bei Implantaten als auch der Kontrolle. Dabei war die Wachstumsreduktion in der Dichte 0,45 mg/cm³ mit einer Differenz von 1,54 im Mittelwert am höchsten, während es in der Dichte 0,75 mg/cm³ mit einer Reduktion im Mittelwert um 0,29 nur zu geringfügigen Änderungen kam. Einerseits könnte es zur selbstinduzierten Apoptose gekommen zu sein, die zum einen durch ein massives Zellwachstum wie beispielsweise bei der Dichte 0,45 mg/cm³ oder eine kleinere Oberfläche wie bei der 2D-Kontrolle verursacht wurde andererseits wäre auch Kontaktinhibition als weitere Ursache möglich [98]. Die Dichte 0,45 mg/cm³ zeigte trotz des Abfalls nach drei Wochen ein signifikant gesteigertes Wachstum gegenüber der 2D-Kontrolle und 0,75 mg/cm³ ($p < 0,05$). Demnach scheint 0,45 mg/cm³ die besten Eigenschaften für das Zellwachstum zu besitzen. Insgesamt zeigten vor der Differenzierung alle Drahtgestelle einen tendenziell höheren Resazurinumsatz als die 2D-Matrix. Es lässt sich nach den ersten drei Wochen mit multipotenten SCP-1 Zellen zusammenfassend feststellen, dass die Drahtgestelle quantitativ vergleichbare und die Dichte 0,45 mg/cm³ signifikant höhere Proliferationsraten zeigen als die zweidimensionale Kontrolle. Dies gibt bereits positive Hinweise auf eine mögliche *in vitro* Biokompatibilität der Implantate. In zahlreichen Arbeiten wurde ebenfalls der wachstumsfördernde

Einfluss knochenähnlicher Gerüste beschrieben [97, 99, 100]. Der Wachstumsabfall entspricht einer normalen Wachstumskurve *in vitro* kultivierter Zellen, wobei die Anlauf- und stationäre Phase aufgrund der langen Messintervalle nicht deutlich zur Darstellung kamen [98]. Nach der dritten Woche wurde anschließend die Differenzierung der Zellen eingeleitet und nach weiteren zwei Wochen die Proliferation wiederholt indirekt mittels Resazurinumsatz bestimmt sowie morphologisch in der Fluoreszenzmikroskopie untersucht. In der fünften Woche zeigte sich ein moderater Anstieg der Proliferation in den Dichten 0,4; 0,45 und 0,5 während die Dichte 0,75 mg/cm³ weiter im Wachstum abfiel. Die 2D-Kontrolle erfuhr im Gegensatz zu den Drahtgestellen einen hochsignifikanten Wachstumsanstieg um den Faktor 3,15 im Mittelwert ($p < 0,01$). Dies weist darauf hin, dass die Differenzierung in den Implantaten, im Gegensatz zur Kontrolle, zum Messzeitpunkt bereits stattfindet bzw. schon weiter fortgeschritten ist, wodurch die Proliferation im Vergleich sistiert. Dieser Zusammenhang lässt sich anhand des Zellzyklus erklären, bestehend aus einer mitotischen Phase, in welcher die Zellteilung stattfindet und einer Interphase in der vermehrt Transkription stattfindet und die Zelle in ein ausdifferenziertes Stadium (G_0) übertreten kann. In der Interphase kommt es zur hohen metabolischen Aktivität und dem Wachstum der Zelle, es findet jedoch keine Zellteilung und dementsprechend keine Proliferation statt, so dass es zu keiner Zunahme der Zellzahl kommt [101]. Dass es nach dem Abfall in Woche 3 überhaupt wieder zum Anstieg des Resazurinumsatzes kommt ist möglicherweise dem Versuchsablauf geschuldet, bei dem das Nährmedium mit dem entstandenen Zelldendritus abgesaugt wurde und somit eventuell neuer Freiraum für eine Proliferation geschaffen wurde. Die Differenzierung als Parameter für die Biokompatibilität wird später in diesem Kapitel genauer besprochen. In der Fluoreszenzmikroskopie konnte mit der Lebend/Tod-Färbung das Wachstum der Zellen morphologisch bestätigt werden. Zusätzlich wurde in allen Dichten deutlich, dass sich die Zellen einschichtig an den Titandrähten der Implantate entlang ausbreiten und nicht beschränkt auf dem Grund der Mikrotiterplatte wuchsen. Dieses Wachstumsverhalten konnte in ähnlichen Arbeiten zum Wachstum von

osteogenen Stammzellen beobachtet werden [102]. Des Weiteren überwog die Anzahl der viablen Zellen, welche den Farbstoff Calcein AM umsetzten, gegenüber den abgestorbenen Zellen. Diese Beobachtung unterstreicht zusätzlich die Biokompatibilität der Drähte hinsichtlich der Proliferation.

Die ersten indirekten Hinweise auf eine Differenzierung durch den Resazurinumsatz wurden durch spezifischere Messverfahren näher untersucht. Dazu wurde mit Hilfe der Messung der AP-Aktivität und des quantitativen Nachweises von mineralisierter Matrix mittels Alizarin-rot der Differenzierungsfortschritt anhand des Schemas von Lian und GS, JB Stein, (1995) [63] (siehe Kap.: 2.6) in den jeweiligen Dichten nach zweiwöchiger Differenzierung bestimmt. Laut Lian und Stein kommt es in der Reifungsphase der Osteoblasten zur höchsten Aktivität der alkalischen Phosphatase, während Kalzium erst während der Mineralisierung messbar wird. Es lässt sich demnach mit den verwendeten Parameter eine relativ zuverlässige Einschätzung darüber abgeben, in welchem Stadium der Differenzierung sich die Zellen zum Messzeitpunkt befinden. Die gesamte AP-Aktivität zeigt eine signifikant höhere Aktivität der 2D-Kontrolle ($p < 0,01$) gegenüber den Drahtgestellen. Zu beachten ist dabei, dass die Zellanzahl dabei rechnerisch wesentlichen Einfluss auf die Menge der AP-Enzyme hat. Deshalb wurde zur idealen Betrachtung die AP-Aktivität pro Zelle errechnet. In dieser Betrachtung zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Drahtgestellen und der 2D-Kontrolle, wobei die Drahtgestelle weiterhin eine tendenziell verringerte AP-Aktivität zeigten. Die Dichte $0,4 \text{ mg/cm}^3$ hatte innerhalb der Implantate die höchste AP-Aktivität pro Zelle mit $0,00651 (+/- 0,0011) \mu\text{M/Zelle}$ während die Dichte $0,45$ mit $0,0042 (+/- 0,0012) \mu\text{M/Zelle}$ die niedrigste Aktivität erreichte. Diese Ergebnisse verdeutlichen zwar, dass eine Differenzierung in allen Drahtgestellen und der Kontrolle stattfindet, jedoch kann eine niedrige AP-Aktivität entsprechend Lian und Stein (1995) [63] sowohl ein verminderten Reifungsfortschritt als auch eine bereits wieder abgefallene Enzymaktivität bei eingesetzter Mineralisierung anzeigen. Zur genaueren Einschätzung diente deshalb die Alizarin-rot-Messung zur Bestimmung der Mineralisierung. Die Ergebnisse zeigen eine signifikant gesteigerte Mineralisierung in den Implantaten mit der Dichte $0,75 \text{ mg/cm}^3$

gegenüber der 2D-Kontrolle mit einer Konzentration von 0,0043 (+/- 0,0011)% ($p < 0,05$). Im direkten Vergleich der AP-Aktivität und Alizarin-rot-Färbung innerhalb der Drahtgestelle zeigt sich, dass jene Dichten, die eine hohe AP-Aktivität pro Zelle zeigten ($0,4 \text{ mg/cm}^3$ und $0,5 \text{ mg/cm}^3$) vergleichsweise niedrige Alizarin-rot Werte aufweisen. Umgekehrt zeigen die Dichten $0,45 \text{ mg/cm}^3$ und $0,75 \text{ mg/cm}^3$ eine niedrigere AP-Aktivität bei erhöhten Alizarin-rot Werten. Dieser Zusammenhang spricht dafür, dass die Dichten $0,4 \text{ mg/cm}^3$ und $0,5 \text{ mg/cm}^3$ sich noch in einer frühen Phase der Mineralisierung befinden, während die Zellen der Drahtgestelle mit $0,45 \text{ mg/cm}^3$ und $0,75 \text{ mg/cm}^3$ Dichte die Differenzierung weitgehend abschlossen haben. Die Zellen der zweidimensionalen Kontrolle scheinen sich, mit einer deutlich gesteigerten AP-Aktivität bei einer stark reduzierten mineralisierten Matrix, im frühen Stadium des Reifungsprozesses zu befinden. Dazu passt die signifikante Proliferationssteigerung im Vergleich zu den Drahtgestellen (Abb.: 24). Der morphologische Nachweis einer mineralisierten Matrix erfolgte durch die Färbungen Calcein/Ethidiumbromid sowie Hoechst/Alizarin-rot. Beide Färbungen zeigten in allen Dichten eine ausgeprägte, zum Teil inhomogene, Verteilung von Matrixkristallen auf den Titandrähten und organischen Matrixstrukturen an den Drahtgestellen. Sie bestätigen damit die vorausgegangenen Messergebnisse insofern, dass eine Mineralisierung und damit auch eine Differenzierung der Zellen stattgefunden haben. Mit Alizarin-rot gefärbte Matrix erscheint wie in vorausgegangenen Arbeiten als rote Punkte [67], während Calcein die unregelmäßig geformten Mineralisationskristalle sowohl in der Epifluoreszenz als auch in den Schnitten grün anfärbt, wie es bereits in der Arbeit von Hale und Santerre (2000) [71] dargestellt wurde. Es lässt sich bezüglich der Differenzierung festhalten, dass die Drahtgestelle offenbar die Reifung der Osteoblasten nicht nur ermöglichen sondern gegenüber der 2D-Kontrolle sogar fördern können. Zu diesem Schluss kamen auch andere Arbeiten von Hirota et al. (2015) [103]. Der Zusammenhang zwischen dem Hohlraumgehalt des Implantates und dem Differenzierungsverhalten diskutierten bereits andere Arbeiten von Karageorgiou et al. (2005) [97], Hutmacher et al. (2007) [104] sowie Kasten et al. [105]. Die Ergebnisse von

Mygind et al. (2007) [96] stimmen mit den Ergebnissen dieser Arbeit überein, dass niedrige Zwischenräume die Differenzierung fördern, während größere Hohlräume das Wachstum der Zellen steigern. Dabei scheinen im Fall der Drahtgestelle vor allem die Dichten $0,45 \text{ mg/cm}^3$ sowie $0,75 \text{ mg/cm}^3$ tendenziell am stärksten eine Differenzierung voranzutreiben. Ursächlich könnte im Beispiel der Dichte $0,45 \text{ mg/cm}^3$ die gesteigerte Zelldichte aufgrund der hohen Zellzahl nach 21 Tagen sein, welche auch von anderen Autoren als stimulierender Faktor für die Differenzierung beschrieben wird [106]. Eine Ursache für die fortgeschrittene Differenzierung der Drähte mit $0,75 \text{ mg/cm}^3$ ist möglicherweise die niedrige Porigkeit durch eine höhere Drahtdichte, wie sie in der mikroskopischen Untersuchung der Drahtzwischenräume bestätigt wurde, (Kap.: 3.4.1), was von Mygind et al (2007) sowie Nasim et al. (2014) [96, 107] ebenfalls beschrieben wurde. Die Differenzierung fördert zwar die Verankerung des Implantats, könnte sich jedoch im Hinblick auf die biomechanischen Eigenschaften der Prothesen, durch eine erhöhte Festigkeit, störend auf die Dämpfungseigenschaften auswirken. Es ist durch die histologischen Eigenschaften der Bandscheibe jedoch anzunehmen, dass bis auf den Bereich der Deckplatten vermehrt Chondroblasten das zelluläre Milieu der Prothese bestimmen und damit eine komplette Mineralisierung des Implantates unwahrscheinlich ist [12].

Weitere Erkenntnisse zur Interaktion der Zellen und Zellmatrix mit den Prothesen lieferten die Betrachtungen des Wachstumsmusters. Dabei wurden die Drahtgestelle epifluoreszenzmikroskopisch in der Übersicht betrachtet. Zusätzlich fand eine Untersuchung der Prothese in lichtmikroskopischen Schnitten statt, um den Querschnitt und damit auch das Innere der Drahtgestelle beurteilen zu können. Bei übersichtlicher Betrachtung zeichnet sich eine umhüllende Wachstumsform der Zellen mit entsprechender Matrix ab. Die Zellen scheinen eine netzartige organische Matrix zu synthetisieren, welche gleichzeitig zur Oberflächenvergrößerung führt und damit zum Wachstum beizutragen scheint. Aufgrund der Autofluoreszenz dieser extrazellulären Substanz und den Syntheseigenschaften von Osteoblasten handelt es sich dabei um Kollagen [50]. Da die mineralisierte Matrix auf dem Boden einer

organischen Vorläuferstruktur entsteht haben diese Strukturen stets das Potenzial zum weiteren Knochenwachstum [106]. Die Betrachtung der Präparate in einer stärkeren Vergrößerung zeigte eine Abnahme des Wachstums hin zum Inneren des Implantats. Dieser Beobachtung wurde bei der Mikroskopie der Schnitte weiter nachgegangen und es bestätigte sich eine Abnahme des Zellwachstums und der mineralisierten Matrix im Inneren der Prothese. Dies zeigt, dass die Zellen während der gesamten Dauer des Versuches das Implantat nicht durchwachsen haben und es nur randständig mineralisiert wurde. Mygind et al. (2007) beschreiben ebenfalls dieses Wachstumsmuster in der Tiefe des Implantats unter statischen Bedingungen, das eine Tiefe von ca. 250 μm nicht überschreitet [96]. Möglicherweise schränkt *in vivo* wie auch *in vitro* die Nutrition der Zellen durch Diffusion das intraprothetische Tiefenwachstum ein und verhindert einen störenden Einfluss der organischen Strukturen beim Einwachsen des Implantates [108]. Dieses Ergebnis könnte sich in Bezug auf die Interaktion mit den biomechanischen Eigenschaften der Prothese als Vorteil erweisen. Es bleibt jedoch fraglich, in wie weit eine tatsächliche räumliche Grenze für die Proliferation und Mineralisation besteht oder ob lediglich die zeitliche Begrenzung das Wachstum eingeschränkt hat.

Die Untersuchung der technischen Eigenschaften der Drahtgestelle auf lichtmikroskopischer Ebene diente dazu, die unterschiedlichen Eigenschaften durch die verschiedenen Dichten zu validieren und die entsprechend unterschiedlichen physikalischen Umgebungseigenschaften der Zellen einschätzen zu können. Es konnten signifikante Unterschiede in der Größe der Drahtzwischenräume festgestellt werden, wobei diese mit zunehmender Dichte kleiner werden. Erwartungsgemäß nimmt die Fläche der Drähte mit ansteigenden Dichten zu. Es lassen sich demnach auch auf mikroskopischer Ebene die Unterschiede der einzelnen Dichten nachweisen, so dass die Dichte als reliables Unterscheidungsmerkmal angesehen werden kann. Der durchschnittlich kleinste gemessene Drahtzwischenraum lag bei der Dichte 0,75 mg/cm^3 bei 321,72 (+/- 70,35) μm was räumlich das Zellwachstum bei einer möglichen Zellgröße von ca. 100 μm [55] nicht einschränken sollte. Dieser Wert

liegt über der Mindestgröße der Hohlräume, die in vorausgegangenen Arbeiten bei ca. 100 μm (50-150 μm) ermittelt wurde [97]. Hinsichtlich der Bedeutung der Porengröße beschreiben einige Autoren eine Diskrepanz im Einfluss der Porengröße auf die Osteogenese *in vitro* und *in vivo*. Während *in vitro* kleinere Porengrößen (<100 μm) eine Osteogenese durch Zellaggregation und verminderte Zellproliferation fördern, verstärken *in vivo* größere Poren die Osteogenese durch bessere Vaskularisation, so dass Porengrößen von >300 μm empfohlen werden [97, 104]. Niedrigere Porengrößen führen über den Umweg der Chondrogenese zur Osteogenese [109]. Die optimale Zwischenraumgröße für die Differenzierung wird mit 250-350 μm angegeben [99]. Alle untersuchten Implantate besitzen im Mittel Porengrößen im optimalen Bereich für eine *in vivo* Anwendung oder größer. Die osteointegrativen Eigenschaften der Dichten 0,75 mg/cm^3 und 0,5 mg/cm^3 könnten *in vivo* denen der niedrigeren Dichten, aufgrund ihrer Porengröße, überlegen sein. Jedoch kann die Ausprägung der organischen Matrix wie Kollagen als zusätzlicher Faktor für die Oberfläche, welche zur Proliferation zur Verfügung steht, eine wichtige Rolle spielen [110]. Die Produktion von Wachstumsfaktoren wie TGF- β [97] oder BMP-2 [111] wurden bereits in anderen Studien genutzt, um das Wachstum zusätzlich zu fördern respektive zu kontrollieren. Darüber hinaus wird im Bereich der kardiovaskulären Stentforschung diesbezüglich bereits die Anwendung von mRNA erprobt [112].

4.1 Schlussfolgerung

Zusammenfassend konnte die Biokompatibilität der Nukleusimplantate der Firma Buck und Co. GmbH *in vitro* sowohl quantitativ als auch qualitativ nachgewiesen werden. Neben einer ausgeprägten Proliferation weisen die Testobjekte eine moderate randständige Differenzierung auf. Weitere Anforderungen, die an die potenziellen Implantate gestellt werden, wie eine sichere Verankerung, welche durch ausgeprägte Proliferation und Differenzierung augmentiert wird, könnten die Implantate erfüllen, ohne dass eine zu starke Mineralisierung die mechanischen Eigenschaften des

Implantates kompromittieren würde [#]. Das biologische Verhalten *in vivo* kann nur sehr eingeschränkt eingeschätzt werden, da mechanische Alterationen sowie das realistische Wachstumsumfeld nicht simuliert wurden. In vergleichender Zusammenschau der Daten, erzeugen nicht alle Dichten ein optimales Wachstumsmilieu. Das Implantat mit der Dichte $0,5 \text{ mg/cm}^3$ scheint insbesondere für eine weitere Anwendung *in vivo* geeignet, weil es eine moderate Differenzierung bei mittlerer Proliferation aufweist. Es könnte damit den besten Kompromiss zwischen matrixvermittelter Stabilität bei geringer, biologisch bedingter, mechanischer Beeinflussung darstellen.

4.2 Ausblick

Durch die mechanischen und biologischen Eigenschaften der neuartigen Nukleusprothese erscheint die Prothese der Firma Buck und Co. GmbH als sehr geeignetes Produkt für Patienten mit Bandscheibenprolaps bei weitgehend intakten knöchernen Begleitstrukturen. Bevor es zu einer Anwendung der Implantate *in vivo* kommen kann, sollten *in vitro* die Immuntoleranz sowie die Interaktion der Implantate mit primären Chondrozyten untersucht werden, um eine bessere prädiktive Aussage über den biologischen Effekt der Implantate *in vivo* treffen zu können. Angeregt durch weitere Arbeiten stellt sich die Frage, in wie weit die Matrixbildung durch eine zusätzliche mechanische Stimulation [113] sowie dynamische Umgebung verändert wird [96]. Die Erkenntnis, dass Drahtgestelle, ähnlich unserer Präparate das Zellwachstum und die Differenzierung fördern, ist ebenfalls ein wichtiger Gegenstand auf dem Gebiet des Tissue engineering [111]. Perspektivisch könnten die Drahtgestelle Funktionen in der allogenen Knochen transplantation oder auch als heilungsfördernder Platzhalter bei größeren Knochendefekten übernehmen, beispielsweise als lokales Reservoir für Wachstumsfaktoren wie BMP-2 [109].

5. Zusammenfassung

Die epidemiologische und sozioökonomische Bedeutung von Rückenschmerzen hat den Rang einer Volkskrankheit. Der demographische Wandel mit einer zunehmenden Anhäufung an Risikofaktoren, führt zu einem steigenden Bedarf an fortschrittlichen Lösungen für die Therapie der Lumbalgie. Nach Versagen aller konservativen Behandlungsansätze hoffen die Betroffenen auf eine zuverlässige chirurgische Alternative. Das Gebiet der Nukleusprothetik ist ein vielversprechender neuer Ansatz zum Ersatz der Standardtherapie des Bandscheibenprolapses. Durch eine dynamische Wiederherstellung der Beweglichkeit bei kleinem Operationstrauma, sollen die Schmerzen genommen und eine Anschlussdegeneration vermieden werden. Die klinische Anwendung der derzeit etablierten Nukleusprothesen ist trotz der zufriedenstellenden biomechanischen Eigenschaften durch die Implantatmigration und fehlende Langzeitstudien limitiert. Die gestrickte Titannukleusprothese der Firma Buck und Co GmbH, hat sich biomechanisch profilieren können und zeigt zudem eine vielversprechend geringe Implantatmigration. Die Aufgabe dieser Arbeit war es, auf dem Weg zur Anwendung dieser Prothese, die Biokompatibilität *in vitro* zu überprüfen. Dazu wurde die Proliferation, die Zelldifferenzierung sowie das Wachstumsmuster an den vier verschiedenen Dichten 0,4; 0,45; 0,5 und 0,75 mg/cm³ mit Hilfe multipotenter (SCP-1-)Zellen über 5 Wochen untersucht. Die Proliferation wurde wöchentlich quantitativ indirekt über den Resazurinumsatz sowie am Ende des Versuches qualitativ-morphologisch mittels Fluoreszenzfärbung untersucht. Es zeigte sich in allen Implantaten ein ausgeprägtes Zellwachstum, welches tendenziell höher als in der zweidimensionalen Kontrolle war und nach 14 Tagen sein erstes Maximum erreichte. Dies konnte anhand der Fluoreszenzfärbung mit Calcein AM/Ethidium homodimer bestätigt werden. Am stärksten proliferierten die Zellen im Implantat mit der Dichte 0,45mg/cm³ während 0,75 mg/cm³ nach drei Wochen nur knapp über der 2D-Kontrolle lag. Zwei Wochen nach der Einleitung der Differenzierung wurde mittels Messung der alkalischen Phosphatase, Alizarinrot-Bestimmung und Fluoreszenzfärbungen mit Calcein/Ethidiumbromid sowie

Alizarin-rot/Hoechst die Zellreife bestimmt. Die Ergebnisse zeigen, dass eine Differenzierung in allen Implantaten stattgefunden hat. Anhand der alkalischen Phosphatase und Alizarin-rot konnte festgestellt werden, dass die Differenzierung in den Drahtgestellen mit der höchsten Drahtdichte ($0,75 \text{ mg/cm}^3$) sowie der höchsten Zelldichte ($0,45 \text{ mg/cm}^3$) am weitesten fortgeschritten war. Die zweidimensionale Kontrolle blieb dabei in einem frühen Stadium der Differenzierung zurück und zeigt passend dazu die stärkste Proliferationsaktivität. Auch die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen unterstreichen die Differenzierung der Zellen durch den Nachweis von mineralisierter Matrix in beiden Färbungen. Als weiterer Parameter für die Biokompatibilität galt die Beurteilung des Wachstumsmusters. Dazu wurden zum einen die Drahtgestelle fluoreszenzmikroskopisch in ihrer Mikrotiterplatte mit Hilfe von Calcein AM und der Autofluoreszenz von Kollagen in einer Übersichtsvergrößerung untersucht. Aufgrund der Intransparenz der Präparate mussten diese zusätzlich mit Hilfe einer Diamantsäge in lichtmikroskopische Schnitte prozessiert werden, um das Wachstum im Implantatkern durch Fluoreszenzfärbungen (Calcein/Ethidiumbromid) beurteilen zu können. Es wurde eine vorwiegend randständige Besiedlung der Implantate beobachtet, mit nach zentral abnehmender Mineralisierung. Dadurch kann die Verankerung der Implantate gefördert werden, ohne die biomechanische Funktion zu beeinträchtigen. Die technische Überprüfung der Implantate auf mikroskopischer Ebene zeigte, dass die Dichte als reliabler Unterscheidungsparameter für die jeweiligen Umgebungsbedingungen herangezogen werden kann und die Zwischenräume ausreichend Raum für die Ausbreitung der Zellen bieten. Es lässt sich Schlussfolgern, dass der gestrickte Nukleus sich als biokompatibel erweist und durch sein Wachstumsmuster eine Integration des Implantates ohne umgebungsbedingte Funktionseinschränkungen anzunehmen ist. Als nächster Schritt gilt es die Immuntoleranz sowie die Interaktion mit primären Chondrozyten zu überprüfen. Des Weiteren sollte die Anwendung modifizierter Drahtgestelle im Bereich Tissue engineering oder Frakturheilung in Erwägung gezogen werden.

6. Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Geschlechtsspezifische Schmerzprävalenz nach Körperregionen aus Daten des Bundesgesundheitsurvey 1998 nach Bellach et al.[7]..... | 10 |
| Abbildung 2: Aufbau der Bandscheibe modifiziert nach Käfer, W. et al. und Ulfig, N. [9, 13]..... | 10 |
| Abbildung 3: Prosthetic Disc Nucleus (aus Goins et al. [36])..... | 17 |
| Abbildung 4: Newcucleus spiral implant (aus Goins et al [36])..... | 17 |
| Abbildung 5: Die gestrickte Titannucleusprothese (aus Kettler, 2007 [45])..... | 18 |
| Abbildung 6: Versuchsaufbau (eigene Abbildung) | 28 |
| Abbildung 7: Versuchsablauf (eigene Abbildung)..... | 30 |
| Abbildung 8: Substratexpression während der Osteoblastendifferenzierung modifiziert nach Lian und GS , JB Stein, 1995 | 33 |
| Abbildung 9: Standardkurve AP-Aktivität..... | 34 |
| Abbildung 10: Standardkurve Alizarin-rot | 36 |
| Abbildung 11: Lebend/Tod-Färbung, Calcein AM = grün, Ethidium homodimer = rot..... | 38 |
| Abbildung 12: Calcein/Ethidiumbromid-Färbung, Calcein = grün, Ethidiumbromid = rot..... | 39 |
| Abbildung 13: Alizarin-rot/Hoechst 33342-Färbung, Alizarin-rot = rot, Hoechst 33342 = blau ... | 41 |
| Abbildung 14: Calcein/Ethidiumbromid-Schnittfärbung, Calcein = grün, Ethidiumbromid = rot.. | 47 |
| Abbildung 15: Kollagenautofluoreszenz, Kollagen (grün), Titanfäden (schwarz) | 48 |
| Abbildung 16: systematische Aufnahme des Schnittes (eigene Abbildung) | 49 |
| Abbildung 17: Abstandsmessung | 50 |
| Abbildung 18: Flächenberechnung..... | 51 |
| Abbildung 19: Übersicht Resazurinumsatz aller Dichten über 5 Wochen, Mittelwerte und erster Standardfehler, N=7, n=4 | 53 |
| Abbildung 20: Resazurinumsatz an Tag 14 alle Dichten, Mittelwerte und erster Standardfehler, N=7, n=4..... | 54 |
| Abbildung 21: Resazurinumsatz an Tag 21 alle Dichten, Mittelwert und erster Standardfehler, N=7, n=4 (*: p<0,05)..... | 55 |
| Abbildung 22: Differenz des Resazurinumsatzes von Tag 14 auf Tag 21, Mittelwerte und erster Standardfehler N=7, n=4 | 56 |

| | |
|---|----|
| Abbildung 23: Resazurinumsatz an Tag 35 aller Dichten, Mittelwerte und erster Standardfehler, N=7, n=4 (*: $p < 0,05$)..... | 57 |
| Abbildung 24: Differenz des Resazurinumsatzes von Tag 21 auf Tag 35, Mittelwerte und erster Standardfehler, N=7, n=4 (**: $p < 0,01$) | 58 |
| Abbildung 25: Lebend/Tot-Färbung (Calcein AM/Ethidium homodimer), lebende Zellen (Calcein AM) = grün, tote Zellen (Ethidium homodimer) = rot, Maßstabsbalken entspricht 1000 μm | 59 |
| Abbildung 26: Gesamt AP-Aktivität nach 2 Wochen Differenzierung, Mittelwerte und erster Standardfehler, N=4 n=3 (**: $p < 0,01$) | 60 |
| Abbildung 27: AP-Aktivität pro Zelle, Mittelwerte und erster Standardfehler, N=4 n=3 | 61 |
| Abbildung 28: Alizarin-rot-Bestimmung, Mittelwerte und erster Standardfehler, n=4 N=2 (*: $p < 0,05$) | 62 |
| Abbildung 29: Calcein/Ethidiumbromid-Färbung bei 0,4 mg/cm^3 Drahtgestell, mineralisierte (Calcein) = grün, Zellkerne (Ethidiumbromid) = rot, 10x Vergrößerung, Maßstabsbalken entspricht 400 μm | 64 |
| Abbildung 30: Alizarin-rot/Hoechst-Färbung, Zellen (Hoechst 33342) = blau, mineralisierte Matrix (Alizarin-rot) = rot, 5x Vergrößerung, Maßstabsbalken entspricht 1000 μm | 65 |
| Abbildung 31: Calcein AM-Färbung, 2x Vergrößerung, Maßstabsbalken entspricht 2000 μm viable Zellen (grün), Kollagen (grün) | 66 |
| Abbildung 32: Calcein AM-Färbung, viable Zellen (grün) in aufsteigenden Vergrößerungen, die linke Seite weist zur Oberfläche | 67 |
| Abbildung 33: Alizarin-rot/Hoechst-Färbung: Zellkerne (blau, Pfeil 1), mineralisierte Matrix (rot, Pfeil 2) in aufsteigenden Vergrößerungen..... | 67 |
| Abbildung 34: Calcein/Ethidiumbromid-Färbung, Zellkerne (rot), mineralisierte Matrix (grün), in aufsteigenden Vergrößerungen..... | 68 |
| Abbildung 35: Hämatoxylin/Eosin-Färbung, Verschiedene Vergrößerungen, Zellkerne (blau), Matrix (rot), Titandrähte (schwarz) | 69 |
| Abbildung 36: Calcein/Ethidiumbromid Färbung: mineralisierte Matrix (grün, Pfeil 1), Zellkerne (rot, Pfeil 2), Kollagen (grün, Pfeil 3), 10x Vergrößerung, Maßstabsbalken: 400 μm | 70 |
| Abbildung 37: Calcein/Ethidiumbromid-Färbung, Übersicht alle Dichten, Zellkerne (rot), extrazelluläre Matrix (grün)..... | 71 |
| Abbildung 38: Dichte 0,75 mg/cm^3 , 2x Vergrößerung, Maßstabsbalken: 2000 μm , Zellkerne (rot), extrazelluläre Matrix (grün)..... | 72 |
| Abbildung 39: Abstände zwischen den Drähten jeder Dichten, N=10, n=3 (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$) | 74 |
| Abbildung 40: Fläche jeder Dichte, N=10, n=3 (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$) | 75 |

7. Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tab. 1: Chemikalienliste | 21 |
| Tab. 2: Geräteliste | 22 |
| Tab. 3: Verbrauchsmaterialiste | 23 |
| Tab. 4: Softwareliste | 23 |
| Tab. 5: Kulturmedien | 26 |
| Tab. 6: Trypan-Färbelösung | 29 |
| Tab. 7: Resazurin-Färbelösung | 31 |
| Tab. 8: AP-Lösung | 33 |
| Tab. 9: Alizarin-rot-Lösungen..... | 35 |
| Tab. 10: Lebend/Tod-Färbelösung..... | 37 |
| Tab. 11: Calcein/Ethidiumbromid-Färbelösung | 39 |
| Tab. 12: Alizarin-rot Färbelösung..... | 40 |
| Tab. 13: Präinfiltrationslösung | 42 |
| Tab. 14: Hämatoxylin/Eosin-Färbung | 46 |
| Tab. 15: Calcein/Eithidiumbromid-Färbelösung | 47 |

8. Literaturverzeichnis

1. Neuhauser, H., U. Ellert, and T. Ziese, *Chronische Rückenschmerzen in der Allgemeinbevölkerung in Deutschland 2002/2003: Prävalenz und besonders betroffene Bevölkerungsgruppen*. Gesundheitswesen, 2005. **67**(10): p. 685-693.
2. Schmidt, C.O. and T. Kohlmann, *Was wissen wir über das Symptom Rückenschmerz?* Z Orthop Ihre Grenzgeb, 2005. **143**(03): p. 292-298.
3. Maetzel, A. and L. Li, *The economic burden of low back pain: a review of studies published between 1996 and 2001*. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2002. **16**: p. 23-30.
4. Elfering, A., et al., *Young Investigator Award 2001 Winner: Risk Factors for Lumbar Disc Degeneration: A 5-Year Prospective MRI Study in Asymptomatic Individuals*. Spine, 2002. **27**(2): p. 125-134.
5. Von Korff, M., et al., *Grading the severity of chronic pain*. Pain, 1992. **50**(2): p. 133-49.
6. Glocker, F.X., *AWMF Leitlinie lumbale Radikulopathie*. Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie, 2012. **S2k**: p. 1-14.
7. Bellach, B.M., U. Ellert, and M. Radoschewski, *Epidemiologie des Schmerzes – Ergebnisse des Bundes-Gesundheitssurveys 1998*. Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz, 2000. **43**(6): p. 424-431.
8. Aumüller, G., *Anatomie*, G. Aumüller, et al., Editors. 2010, Georg Thieme Verlag: Stuttgart, New York.
9. Ulfing, N., *Histologie*. 2011, Georg Thieme Verlag: Stuttgart, New York.
10. Revell, P.A., et al., *Tissue engineered intervertebral disc repair in the pig using injectable polymers*. J Mater Sci Mater Med, 2007. **18**(2): p. 303-8.
11. Roberts, S., et al., *Histology and pathology of the human intervertebral disc*. J Bone Joint Surg Am, 2006. **88 Suppl 2**: p. 10-4.
12. Krämer, R.e.a., *Allgemeine Anatomie, Physiologie und Biomechanik*, in *Bandscheibenbedingte Erkrankungen*, R. Krämer, J. Matussek, and T. Theodoridis, Editors. 2014, Georg Thieme Verlag: Stuttgart.
13. Käfer, W., B. Cakir, and H.J. Wilke, *Bandscheibenendoprothetik und andere bewegungserhaltende Stabilisierungsverfahren der Lendenwirbelsäule – klinische Aspekte*. Orthopädie und Unfallchirurgie up2date, 2012. **7**(02): p. 83-95.
14. Boos, N., et al., *Classification of age-related changes in lumbar intervertebral discs: 2002 Volvo Award in basic science*. Spine (Phila Pa 1976), 2002. **27**(23): p. 2631-44.
15. Iatridis, J.C., et al., *Is the nucleus pulposus a solid or a fluid? Mechanical behaviors of the nucleus pulposus of the human intervertebral disc*. Spine (Phila Pa 1976), 1996. **21**(10): p. 1174-84.
16. Haefeli, M., et al., *The course of macroscopic degeneration in the human lumbar intervertebral disc*. Spine (Phila Pa 1976), 2006. **31**(14): p. 1522-31.
17. Nerlich, A.G., E.D. Schleicher, and N. Boos, *1997 Volvo Award winner in basic science studies. Immunohistologic markers for age-related changes of human lumbar intervertebral discs*. Spine (Phila Pa 1976), 1997. **22**(24): p. 2781-95.
18. Faustmann, P.M., *[Neuroanatomic basis for discogenic pain]*. Z Orthop Ihre Grenzgeb, 2004. **142**(6): p. 706-8.
19. Podichetty, V.K., *The aging spine: the role of inflammatory mediators in intervertebral disc degeneration*. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2007. **53**(5): p. 4-18.
20. Olmarker, K. and B. Rydevik, *Selective inhibition of tumor necrosis factor-alpha prevents nucleus pulposus-induced thrombus formation, intraneural edema, and reduction of nerve conduction velocity: possible implications for future pharmacologic treatment strategies of sciatica*. Spine (Phila Pa 1976), 2001. **26**(8): p. 863-9.
21. Olmarker, K., B. Rydevik, and C. Nordborg, *Autologous nucleus pulposus induces neurophysiologic and histologic changes in porcine cauda equina nerve roots*. Spine (Phila Pa 1976), 1993. **18**(11): p. 1425-32.
22. Cavanaugh, J.M., *Neural mechanisms of lumbar pain*. Spine (Phila Pa 1976), 1995. **20**: p. 1804-1809.

23. Hangai, M., et al., *Factors associated with lumbar intervertebral disc degeneration in the elderly*. Spine J, 2008. **8**(5): p. 732-40.
24. Kauppila, L.I., *Atherosclerosis and disc degeneration/low-back pain--a systematic review*. Eur J Vasc Endovasc Surg, 2009. **37**(6): p. 661-70.
25. Alpantaki, K., et al., *Herpes virus infection can cause intervertebral disc degeneration: a causal relationship?* J Bone Joint Surg Br, 2011. **93**(9): p. 1253-8.
26. Gravius, S., et al., *Die lumbale Bandscheibenprothese: Eine narrative Übersicht*. Dtsch Arztebl International, 2007. **104**(38): p. 2592-98.
27. Käfer, W., H.J. Wilke, and B. Cakir, *Bandscheibenendoprothetik und andere bewegungserhaltende Stabilisierungsverfahren der Lendenwirbelsäule – klinische Aspekte*. Orthopädie und Unfallchirurgie up2date, 2012. **7**(02): p. 99-125.
28. Park, P., et al., *Adjacent segment disease after lumbar or lumbosacral fusion: review of the literature*. Spine (Phila Pa 1976), 2004. **29**(17): p. 1938-44.
29. Zhang, Z.M., et al., *Artificial nucleus replacement: surgical and clinical experience*. Orthop Surg, 2009. **1**(1): p. 52-7.
30. Bao, Q.B. and H.A. Yuan, *Prosthetic disc replacement: the future?* Clin Orthop Relat Res, 2002(394): p. 139-45.
31. Dahl, M.C., et al., *The restoration of lumbar intervertebral disc load distribution: a comparison of three nucleus replacement technologies*. Spine (Phila Pa 1976), 2010. **35**(15): p. 1445-53.
32. Errico, T.J., *Why a mechanical disc?* Spine J, 2004. **4**(6 Suppl): p. 151s-157s.
33. Carl, A., et al., *New developments in nucleus pulposus replacement technology*. Spine J, 2004. **4**(6 Suppl): p. 325s-329s.
34. Lee, C.K. and V.K. Goel, *Artificial disc prosthesis: design concepts and criteria*. The Spine Journal, 2004. **4**(6, Supplement): p. S209-S218.
35. Phillips, F.M.L., *Carl Nucleus Augmentation*, in *The Lumbar Intervertebral Disc*. 2010, Phillips, Frank M.; Laurysen, Carl Verlagsgruppe Georg Thieme, Stuttgart, New York, Delhi, Rio p. 185-187.
36. Goins, M.L., et al., *Nucleus pulposus replacement: an emerging technology*. Spine J, 2005. **5**(6 Suppl): p. 317s-324s.
37. Sieber, A.N. and J.P. Kostuik, *Concepts in nuclear replacement*. The Spine Journal, 2004. **4**(6, Supplement): p. S322-S324.
38. Gamradt, S.C. and J.C. Wang, *Lumbar disc arthroplasty*. Spine J, 2005. **5**(1): p. 95-103.
39. Hou, T.S., et al., *Lumbar intervertebral disc prosthesis. An experimental study*. Chin Med J (Engl), 1991. **104**(5): p. 381-6.
40. Reitmaier, S., et al., *In vivo biofunctional evaluation of hydrogels for disc regeneration*. Eur Spine J, 2014. **23**(1): p. 19-26.
41. Ambrosio, L., R. De Santis, and L. Nicolais, *Composite hydrogels for implants*. Proc Inst Mech Eng H, 1998. **212**(2): p. 93-9.
42. Jin, D., et al., *Prosthetic disc nucleus (PDN) replacement for lumbar disc herniation: preliminary report with six months' follow-up*. J Spinal Disord Tech, 2003. **16**(4): p. 331-7.
43. Balsano, M., et al., *Nucleus disc arthroplasty with the NUBAC device: 2-year clinical experience*. Eur Spine J, 2011. **20 Suppl 1**: p. S36-40.
44. Krämer, J., et al., *Bandscheibenprothesen: Rückblick, Augenblick, Ausblick*. Z Orthop Ihre Grenzgeb, 2005. **143**(03): p. 281-286.
45. Kettler, A., et al., *Biomechanical Behavior of a New Nucleus Prosthesis Made of Knitted Titanium Filaments*. SAS Journal, 2007. **1**(4): p. 125-130.
46. Taksali, S., J.N. Grauer, and A.R. Vaccaro, *Material considerations for intervertebral disc replacement implants*. The Spine Journal, 2004. **4**(6, Supplement): p. S231-S238.
47. Jung, H.D., et al., *Reinforcement of polyetheretherketone polymer with titanium for improved mechanical properties and in vitro biocompatibility*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2015p.1-8.
48. Zhang, H.X., et al., *Biocompatibility and osteogenesis of calcium phosphate composite scaffolds containing simvastatin-loaded PLGA microspheres for bone tissue engineering*. J Biomed Mater Res A, 2015. p. 1-34, 'Accepted Article', doi: 10.1002/jbm.a.35463

49. Yang, H.W., et al., *Osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells on strontium-substituted nano-hydroxyapatite coated roughened titanium surfaces*. Int J Clin Exp Med, 2015. **8**(1): p. 257-64.
50. Arens, C., *Die Bedeutung der Autofluoreszenz in der Frühdiagnose des Larynxkarzinoms*, in *Universitätsklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie des Universitätsklinikums Gießen*. 2005, Medizinische Habilitationsschrift, Universität Gießen. p. 15,16,30-33.
51. Kiefer, J., Bense, J., Kiefer, J. Editor, *Ultraviolette Strahlen*. 1977: Walter de Gruyter., Berlin
52. Hermann, B., *Fluorescence Microscopy*. Royal Microscopical Society Microscopy Handbooks 40. Vol. 2. 1998: BIOS Scientific Publishers Ltd, Oxford, UK.
53. Wang, Y., Lansing-Taylor, D., *Fluorescence Microscopy of Living Cells in Culture. Part A: Fluorescent Analogs, Labeling Cells, and Basic Microscopy. Methods in Cell Biology*, Vol. 29. 1989: Academic Press, Inc., San Diego.
54. Lakowicz, J.R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Vol. 3. 2010: Springer-Verlag, Berlin.
55. Böcker, W., et al., *Introducing a single-cell-derived human mesenchymal stem cell line expressing hTERT after lentiviral gene transfer*. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2008. **12**(4): p. 1347-1359.
56. Volkmer, E., et al., *Hypoxic preconditioning of human mesenchymal stem cells overcomes hypoxia-induced inhibition of osteogenic differentiation*. Tissue Eng Part A, 2010. **16**(1): p. 153-64.
57. Strober, W., *Trypan blue exclusion test of cell viability*. Curr Protoc Immunol, 2001. **Appendix 3**: p. 21:3B:A.3B.1–A.3B.2, DOI: 10.1002/0471142735.ima03bs21.
58. O'Brien, J., et al., *Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity*. Eur J Biochem, 2000. **267**(17): p. 5421-6.
59. de Fries, R. and M. Mitsuhashi, *Quantification of mitogen induced human lymphocyte proliferation: comparison of alamarBlue assay to 3H-thymidine incorporation assay*. J Clin Lab Anal, 1995. **9**(2): p. 89-95.
60. McMillian, M.K., et al., *An improved resazurin-based cytotoxicity assay for hepatic cells*. Cell Biol Toxicol, 2002. **18**(3): p. 157-73.
61. Voytik-Harbin, S.L., et al., *Application and evaluation of the alamarBlue assay for cell growth and survival of fibroblasts*. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 1998. **34**(3): p. 239-46.
62. Harris, H., *The human alkaline phosphatases: what we know and what we don't know*. Clin Chim Acta, 1990. **186**(2): p. 133-50.
63. Lian, J.B. and G.S. Stein, *Development of the osteoblast phenotype: molecular mechanisms mediating osteoblast growth and differentiation*. Iowa Orthop J, 1995. **15**: p. 118-40.
64. Bowers, G.N., Jr., R.B. McComb, and A. Upreti, *4-nitrophenyl phosphate--characterization of high-purity materials for measuring alkaline phosphatase activity in human serum*. Clin Chem, 1981. **27**(1): p. 135-43.
65. Paul, H., A.J. Reginato, and H.R. Schumacher, *Alizarin red S staining as a screening test to detect calcium compounds in synovial fluid*. Arthritis Rheum, 1983. **26**(2): p. 191-200.
66. Sheehan, D.C. and B.B. Hrapchak, *Theory and Practice of Histotechnology*. 1987: Battelle Press, Columbia.
67. Wang, Y.H., et al., *Examination of mineralized nodule formation in living osteoblastic cultures using fluorescent dyes*. Biotechnol Prog, 2006. **22**(6): p. 1697-701.
68. Yan, X., *Verbesserte hepatische und osteogene Differenzierung humaner Ad-MSCs älterer Spender durch epigenetische Modifikation mit 5-Azacytidin und BIX 01294*, in *Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie am Klinikum rechts der Isar*. 2012, Medizinische Dissertationsschrift Technische Universität München.
69. Liminga, G., et al., *On the mechanism underlying calcein-induced cytotoxicity*. Eur J Pharmacol, 1999. **383**(3): p. 321-9.
70. Seo, H.Y., et al., *Cellular attachment and differentiation on titania nanotubes exposed to air- or nitrogen-based non-thermal atmospheric pressure plasma*. PLoS One, 2014. **9**(11): p. e113477.

71. Hale, L.V., Y.F. Ma, and R.F. Santerre, *Semi-quantitative fluorescence analysis of calcein binding as a measurement of in vitro mineralization*. *Calcif Tissue Int*, 2000. **67**(1): p. 80-4.
72. Lund, K.C., L.L. Peterson, and K.B. Wallace, *Absence of a universal mechanism of mitochondrial toxicity by nucleoside analogs*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007. **51**(7): p. 2531-9.
73. Glazer, A.N., K. Peck, and R.A. Mathies, *A stable double-stranded DNA-ethidium homodimer complex: application to picogram fluorescence detection of DNA in agarose gels*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. **87**(10): p. 3851-5.
74. Kim, J.H., et al., *Necrotic cell death caused by exposure to graphitic carbon-coated magnetic nanoparticles*. *J Biomed Mater Res A*, 2015, p.1-12.
75. Ozluer, C. and H.E. Kara, *In vitro DNA binding studies of anticancer drug idarubicin using spectroscopic techniques*. *J Photochem Photobiol B*, 2014. **138**: p. 36-42.
76. Decker, E.M., *The ability of direct fluorescence-based, two-colour assays to detect different physiological states of oral streptococci*. *Lett Appl Microbiol*, 2001. **33**(3): p. 188-92.
77. Gregory, C.A., et al., *An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction*. *Anal Biochem*, 2004. **329**(1): p. 77-84.
78. Amat, A., et al., *DFT/TDDFT investigation on the UV-vis absorption and fluorescence properties of alizarin dye*. *Phys Chem Chem Phys*, 2015. **17**(9): p. 6374-82.
79. Chen, X., et al., *Acoustic-Frequency Vibratory Stimulation Regulates the Balance between Osteogenesis and Adipogenesis of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells*. *Biomed Res Int*, 2015. **2015**: p. 540731.
80. Shapiro, H.M., *Flow cytometric estimation of DNA and RNA content in intact cells stained with Hoechst 33342 and pyronin Y*. *Cytometry*, 1981. **2**(3): p. 143-50.
81. Lalande, M.E., V. Ling, and R.G. Miller, *Hoechst 33342 dye uptake as a probe of membrane permeability changes in mammalian cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1981. **78**(1): p. 363-7.
82. Donath, K., *Die Trenn-Dünnschliff-Technik zur Herstellung histologischer Präparate von nicht schneidbaren Geweben und Materialien*. *Der Präparator*, 1987(Bd. 34): p. 197–206.
83. Heraeus Kulzer, G., *Gebrauchsinformationen Technovit 7200/7210/7230VLC*. 2007: p. 1-2. (http://kulzer-technik.de/de_kt/kt/maerkte/metallographie/metallographie_downloads_1/produktinformationen_metallographie/metallographie_produktdinformationen.aspx, letzter Zugriff: 10.11.2015)
84. pM: Ilka Degenkolbe: Exakt Apparatebau GmbH & Co KG, *EXAKT Trennschleif-Technologie*, 2015 p. 7-9.
85. Avwioro, G., *Histochemical uses of haematoxylin - A review*. *Journal of Pharmacy and clinical Sciences*, 2011. **1**: p. 24-34.
86. Hohla, A., *UV-angeregte Autofluoreszenz: Spektroskopische und fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zur Tumorselektivität endogener Gewebefarbstoffe, in Laser-Forschungslabor der Urologischen Klinik und Poliklinik*. 2003, Medizinische Dissertationsschrift, Ludwig-Maximilians-Universität München. p. 9-11.
87. Richards-Kortum, R. and E. Sevick-Muraca, *Quantitative optical spectroscopy for tissue diagnosis*. *Annu Rev Phys Chem*, 1996. **47**: p. 555-606.
88. Kollias, N., et al., *Endogenous skin fluorescence includes bands that may serve as quantitative markers of aging and photoaging*. *J Invest Dermatol*, 1998. **111**(5): p. 776-80.
89. Albrechtova, J., et al., *Image analysis: basic procedures for description of plant structures*. *Methods Mol Biol*, 2014. **1080**: p. 67-76.
90. Banzegi, O., et al., *New method for automatic body length measurement of the collembolan, Folsomia candida Willem 1902 (Insecta: Collembola)*. *PLoS One*, 2014. **9**(6): p. e98230.
91. Jabbour, N., et al., *A new approach to geometrical measurements in an animal model of vocal fold scar*. *J Voice*, 2009. **23**(1): p. 88-94.

92. Dos Reis, F.J., et al., *Measuring the Pain Area: An Intra- and Inter-Rater Reliability Study Using Image Analysis Software*. Pain Pract, 2014, p. 1-6, doi: 10.1111/papr.12262.
93. Persson, A.L., S. Garametsos, and J. Pedersen, *Computer-aided surface estimation of pain drawings - intra- and inter-rater reliability*. J Pain Res, 2011. **4**: p. 135-41.
94. Reinking, L., *ImageJ Basics*, M.U. Department of Biology, Editor. 2007: imagej.nih.gov. (letzter Zugriff: 09. November 2015)
95. Reinking, L., *Examples of Image Analysis Using ImageJ - Area Measurements of a Complex Object*, in *Tutorials and Examples*, M.U. Department of Biology, Editor. 2007: imagej.nih.gov. p. 2. (letzter Zugriff: 09. November 2015)
96. Mygind, T., et al., *Mesenchymal stem cell ingrowth and differentiation on coralline hydroxyapatite scaffolds*. Biomaterials, 2007. **28**(6): p. 1036-47.
97. Karageorgiou, V. and D. Kaplan, *Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis*. Biomaterials, 2005. **26**(27): p. 5474-91.
98. Gerhard Gstraunthaler, T.L., *Wachstumskurven*, in *Zell- und Gewebekultur: Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen*. 2013, Springer Spektrum. p. 314-316, Berlin, Heidelberg.
99. Bose, S., M. Roy, and A. Bandyopadhyay, *Recent advances in bone tissue engineering scaffolds*. Trends Biotechnol, 2012. **30**(10): p. 546-54.
100. Haugen, H.J., et al., *Porous ceramic titanium dioxide scaffolds promote bone formation in rabbit peri-implant cortical defect model*. Acta Biomaterialia, 2013. **9**(2): p. 5390-5399.
101. Schafer, K.A., *The cell cycle: a review*. Vet Pathol, 1998. **35**(6): p. 461-78.
102. Marycz, K., et al., *The osteogenic properties of multipotent mesenchymal stromal cells in cultures on TiO(2) sol-gel-derived biomaterial*. Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 651097.
103. Hirota, M., et al., *High porous titanium scaffolds showed higher compatibility than lower porous beta-tricalcium phosphate scaffolds for regulating human osteoblast and osteoclast differentiation*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2015. **49**: p. 623-31.
104. Hutmacher, D.W., et al., *State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective*. J Tissue Eng Regen Med, 2007. **1**(4): p. 245-60.
105. Kasten, P., et al., *Porosity and pore size of beta-tricalcium phosphate scaffold can influence protein production and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells: an in vitro and in vivo study*. Acta Biomater, 2008. **4**(6): p. 1904-15.
106. Pautke, C., *Charakterisierung von humanen mesenchymalen Stammzellen und Zellen der osteoblastären Differenzierungskaskade*, in *Medizinische Fakultät*. 2004, Medizinische Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität zu München: München. p.9-10.
107. Nasim, A., et al., *Engineering Biomimetic Scaffolds*, in *Scaffolds for Tissue Engineering*. Migliaresi, C, Motta, A. 2014, Pan Stanford Publishing. p. 223-262, doi:10.1201/b15649-8 10.1201/b15649-8
108. Zou, X., et al., *Engineering of bone tissue with porcine bone marrow stem cells in three-dimensional trabecular metal: in vitro and in vivo studies*. APMIS Suppl, 2003(109): p. 127-32.
109. Sundelacruz, S. and D.L. Kaplan, *Stem cell- and scaffold-based tissue engineering approaches to osteochondral regenerative medicine*. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2009. **20**(6): p. 646-655.
110. Yang, X.B., et al., *Biomimetic collagen scaffolds for human bone cell growth and differentiation*. Tissue Eng, 2004. **10**(7-8): p. 1148-59.
111. Alvarez, K. and H. Nakajima, *Metallic Scaffolds for Bone Regeneration*. Materials, 2009. **2**(3): p. 790-832.
112. Abraham, M.K., et al., *In vitro Study of a Novel Stent Coating Using Modified CD39 Messenger RNA to Potentially Reduce Stent Angioplasty-Associated Complications*. PLoS One, 2015. **10**(9): p. e0138375.
113. Kang, K.S., et al., *Effects of combined mechanical stimulation on the proliferation and differentiation of pre-osteoblasts*. Exp Mol Med, 2011. **43**: p. 367-373.

9. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Klinik für Unfallchirurgie der berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik im Siegfried Weller Institut für Unfallmedizinische Forschung unter der Betreuung von Prof. Dr. A. K. Nüssler durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. H. P. Kaps (ehemaliger ärztlicher Leiter der Abteilung für Querschnittgelähmte, Technische Orthopädie und Wirbelsäulenchirurgie), Dr. Sabrina Ehnert (Gruppenleiterin) sowie Prof. Dr. A.K. Nüssler (Institutsdirektor). Das Manuskript wurde von Prof. Dr. A. K. Nüssler und Dr. S. Ehnert korrigiert.

Bis auf die Versuche zum Schneiden der Drahtgestelle (2.9) wurden sämtliche Experimente nach Einarbeitung durch die Labormitglieder Jessica Gräser, Bianca Braun, Dr. Sabrina Ehnert, Mario Hausmann sowie Ilka Degenkolbe (Forschungslabor der Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie der Universitätsklinik Tübingen) von mir eigenständig durchgeführt. Die Methode Schneiden der Drahtgestelle (2.9) wurde von Ilka Degenkolbe durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig in Beratung mit Dr. Sabrina Ehnert durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Teile der Dissertationsschrift wurden im Rahmen der 19. Chirurgischen Forschungstage in Form eines Vortrags präsentiert. Das Abstract wurde im Journal: *European Surgical Research*, unter dem Titel „The knitted Titan prosthesis, the future of Nucleus implants?“ 2015, Ausgabe 55(3), Seite 275 veröffentlicht. Dieses wurde von mir eigenständig unter Beratung und Korrektur von Dr. Sabrina Ehnert, Prof. Dr. A. K. Nüssler A. Buck, A. Buck jun., I. Degenkolbe, Prof. Dr. H.P. Wendel, PD Dr. A. Badke und Prof. Dr. H.P. Kaps verfasst.

10. Veröffentlichungen

The knitted Titan prosthesis, the future of Nucleus implants?

Autor: P. Grau^a, Co-Autoren: S. Ehnert^a, A. Buck^b, A. Buck jun.^b, I. Degenkolbe^c, H.P. Wendel^c, A. Badke¹, H.P. Kaps^a, A.K. Nüssler^a

^a Siegfried Weller Institute, BG Trauma Center, University of Tübingen, Germany

^b Buck GmbH & Co. KG, Bondorf, Germany

^c Dept. of Thoracic and Cardiovascular Surgery, University Hospital Tübingen, Germany

19th Surgical Research Days. Section of Surgical Research of the German Society of Surgery. October 8-10, 2015, Würzburg, Germany: Abstracts. Eur Surg Res, 2015. 55(3): p. 198-289.

Vorstellung am 08.10.2015 auf den 19. Chirurgischen Forschungstagen 2015 in Würzburg

Anmerkung: inhaltliche Auszüge sind in dieser Arbeit mit # gekennzeichnet.

11. Danksagung

Ich möchte besonders Herrn Prof. Dr. Nüssler danken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, mich in seinem Institut diesem interessanten Thema zu widmen und mir dabei stets seine animierende und sehr konstruktive Unterstützung zukommen ließ. Des Weiteren danke ich Frau Dr. Ehnert für ihre außerordentlich zuverlässige und motivierte Betreuung sowie Hilfestellung mit einer Vielzahl inspirierender und voranbringender Hinweise. Mein großer Dank geht ebenfalls an Herrn Prof. Kaps für die engagierte Initiation dieses Projektes sowie seine produktive und kritische Unterstützung.

Ich danke dem gesamten Laborteam, insbesondere Bianca Braun, Mario Hausmann und Luc Koster, dass sie mich so geduldig bei der Arbeit unterstützt haben und mit viel Verständnis meine ersten Schritte im Labor begleiteten. Darüber hinaus danke ich Karsten Büringer und Martin Radermacher, die mir bei der Arbeit im Labor stets mit ihrer fachlichen und moralischen Unterstützung beiseite standen.

Ich bin ebenfalls den Mitgliedern des klinischen Forschungslabors der Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Wendel sehr dankbar dafür, dass sie meine Arbeit durch ihr sehr freundliches Entgegenkommen und die außerordentlich unkomplizierte Zusammenarbeit förderten, allen voran Herr Prof. Dr. Wendel und Ilka Degenkolbe.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner geliebten Familie. Ihre bedingungslose und liebevolle Unterstützung in allen Lebenslagen hat mir erst die Möglichkeit gegeben, mich meiner Leidenschaft der Medizin zu zuwenden und ermöglichte damit diese Arbeit. Das Wissen sie und ihr Vertrauen an meiner Seite zu haben, gibt mir stets die Zuversicht diesen Weg zu wagen.

Ich bin meiner Freundin Yvonne Schumacher und ihrer Familie für ihre Warmherzigkeit, ihr Verständnis, Vertrauen und Optimismus sehr dankbar. Mit ihrer so liebenswerten Art bleibt das Glas immer halbvoll.