

Aus der Klinik für Zahn-, Mund-, Kieferkrankheiten
Abteilung für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde
der Universität Würzburg
Leitung: Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Groll

**Etablierung von Stammzell-Sphäroiden
mit inkorporierten Biokeramik-Partikeln
zur Förderung der
osteogenen Differenzierung**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Jasamin Morabbian
aus Frankfurt am Main
Würzburg, September 2023



Referent: Prof. Dr. rer. nat. Uwe Gbureck

Korreferent: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Alexander Kübler

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 10.06.2024

Die Promovendin ist Zahnärztin

In Liebe und unendlicher Dankbarkeit meiner
Mutter Zahra
gewidmet

–

dafür, dass du mir all das ermöglicht hast

»Perfektion ist nicht dann erreicht, wenn man nichts mehr
hinzufügen, sondern wenn man nichts mehr weglassen kann.«
Antoine de Saint-Exupéry

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Knochenaufbau und Knochenstoffwechsel	1
1.2	Biologische Knochenersatzmaterialien	1
1.3	Synthetische Knochenersatzmaterialien	2
1.4	Tissue Engineering und Dreidimensionale Zellkultivierung	3
1.5	Stammzellen	6
1.6	Zielsetzung	8
2	MATERIAL	10
2.1	Technische Geräte	10
2.2	Verwendete Materialien	12
2.3	Chemikalien und Medien	14
2.4	Verwendete Kits	15
2.5	Software	15
2.6	Zellen	15
3	METHODEN	16
3.1	Ethikvotum	16
3.2	Zellkultivierung	16
3.2.1	Auftauen der Zellen	16
3.2.2	Passage der Zellen und Zellzählung	17
3.3	Herstellung der Micromolds	17
3.4	Herstellung von Sphäroiden	18
3.5	Durchmesserbestimmung der Sphäroide	21
3.6	Analyse der Vitalität	21
3.7	Analyse der metabolischen Aktivität	22
3.8	Histologie	23
3.8.1	Anfertigung von Gewebeschnitten	23
3.8.2	Hämatoxylin & Eosin Färbung	23
3.8.3	Alizarin Färbung	24
3.8.4	Von Kossa Färbung	24

3.9	Charakterisierung der Biokeramik-Partikel.....	24
3.9.1	Bestimmung der Partikelgröße.....	24
3.9.2	Rasterelektronenmikroskop	25
3.9.3	Energiedispersive Röntgenspektroskopie	25
3.9.4	Röntgendiffraktometrie.....	26
3.9.5	Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma.....	26
3.10	pH-Wert Messung	27
3.11	Molekularbiologische Methoden.....	27
3.11.1	RNA-Isolation.....	28
3.11.2	cDNA Synthese.....	29
3.11.3	Quantitative Real-Time PCR.....	30
4	ERGEBNISSE	32
4.1	Teil I: Charakterisierung der Biokeramik-Partikel	32
4.1.1	Pulverpartikelgröße	32
4.1.2	Rasterelektronenmikroskop	33
4.1.3	Energiedispersive Röntgenspektroskopie	34
4.1.4	Röntgendiffraktometrie.....	35
4.1.5	Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma.....	36
4.2	Teil II: Vorversuche der adipöse mesenchymale Stammzellsphäroide.....	37
4.2.1	Sphäroide mit variabler Zellzahl.....	37
4.2.2	Sphäroide mit variablen Partikelanteilen	41
4.2.3	Histologische Färbungen	44
4.2.3.1	Hämatoxylin & Eosin Aufnahmen.....	44
4.2.3.2	Alizarin Aufnahmen	45
4.2.3.3	Von Kossa Aufnahmen.....	46
4.3	Teil III: Hauptversuche der adipöse mesenchymale Stammzellsphäroide.....	47
4.3.1	Durchmesser der Sphäroide	47

4.3.2	Analyse der metabolischen Aktivität.....	49
4.3.3	Lebend-tot Analyse der adipösen mesenchymalen Stammzellsphäroide	51
4.3.4	Rasterelektronenmikroskop und Energiedispersive Röntgenspektroskopie Aufnahmen der adipösen mesenchymalen Stammzellsphäroide	56
4.4	Teil IV: Mesenchymale Stammzellsphäroide aus dem Knochenmark	61
4.4.1	Optische Mikroskop Aufnahmen	61
4.4.2	Lebend-tot Aufnahmen der mesenchymalen Stammzellsphäroide aus dem Knochenmark	62
4.4.3	pH-Wert-Analyse.....	66
4.4.4	Quantitative Real-Time PCR.....	67
5	DISKUSSION	71
5.1	Biokeramik-Partikelanalyse	71
5.2	Herstellung der Sphäroide.....	73
5.3	Optimalisierung der Sphäroide.....	74
5.4	Hauptversuche mit den Sphäroiden.....	77
5.4.1	Sphäroiddurchmesser	78
5.4.2	Lebend-tot Aufnahmen.....	79
5.4.3	Rasterelektronenmikroskop und Energiedispersive Röntgenspektroskopie Aufnahmen	80
5.4.4	Gründe für nicht erfolgreiche Hydroxylapatit Sphäroidbildung.....	81
5.4.5	Metabolische Aktivität	82
5.4.6	Quantitative Real-Time PCR.....	83
5.5	Vergleichbare und Alternative Studien	85
6	FAZIT UND AUSBLICK.....	87
7	ZUSAMMENFASSUNG	89
8	LITERATURVERZEICHNIS.....	91

APPENDIX

- I ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**
- II ABBILDUNGSVERZEICHNIS**
- III TABELLENVERZEICHNIS**
- IV DANKSAGUNG**
- V LEBENSLAUF**
- VI EIDESSTAATLICHE ERKLÄRUNG**

1 EINLEITUNG

1.1 Knochenaufbau und Knochenstoffwechsel

Das menschliche Skelett besteht aus 206 Knochen, die etwa 15% des Gesamtgewichts des Körpers ausmachen¹. Als lebendiges Gewebe bilden diese Knochen die strukturelle Grundlage des Körpers und erfüllen lebenswichtige Funktionen wie Bewegung, Schutz von Organen und die Produktion von Blutzellen^{1,2}. Die Knochenmineralmatrix besteht aus verschiedenen Salzen, hauptsächlich aus Hydroxylapatit (HA), aber auch aus Calciumphosphat, Calciumcarbonat und weiteren anorganischen Verbindungen wie Kalium, Natrium, Chlor und Fluor². Diese anorganischen Substanzen verleihen dem Knochen seine Härte und Festigkeit². Die im Knochen vorkommenden mesenchymale pluripotenten Stammzellen besitzen die Fähigkeit sich in verschiedene Zelltypen zu differenzieren, darunter Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten^{3, 4}. Diese Umwandlung bei der mesenchymale Stammzellen in reife Osteoblasten umgewandelt werden, nennt man Osteogene Differenzierung³. Osteoblasten tragen zur Bildung und dem Aufbau von neuem Knochengewebe bei^{4,5}. Sobald Osteoblasten die Knochenmatrix umgeben haben und in diese eingebettet sind, differenzieren sie sich zu Osteozyten^{4,5}. Osteozyten sind ruhende, reife Knochenzellen, die innerhalb der Knochenmatrix leben^{4,5}. Sie sind für die Wartung der Knochengewebe-Integrität verantwortlich und spielen eine Rolle bei der Signalübertragung und dem Erkennen mechanischer Belastungen^{4, 5}. Osteoklasten sind die für die Knochenresorption zuständig⁵. Insgesamt sorgt die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten für die Aufrechterhaltung der Knochenhomöostase und ermöglicht die ständige Anpassung des Knochengewebes an die sich ändernden Anforderungen des Körpers^{4,5}.

Die Osteokonduktion bezieht sich auf den Prozess, bei dem das Knochengewebe auf einer strukturierten Oberfläche wächst, die als "Gerüst" fungiert⁶. Die Osteoinduktion beschreibt die Fähigkeit bestimmter Moleküle, die Differenzierung und Vermehrung von Mesenchymalzellen zu stimulieren und somit die Knochenregeneration zu fördern⁷. Die Osteotransduktion bezeichnet die Umwandlung mechanischer Kräfte und Belastungen in biochemische Signale, die die Knochenzellfunktion beeinflussen^{8,9}.

1.2 Biologische Knochenersatzmaterialien

Der Knochen besitzt eine natürliche Selbstheilungsfähigkeit bis zu einer bestimmten Defektgröße^{9,10}. Wenn diese Defektgröße überschritten wird, kann es zu Komplikationen wie einer ausbleibenden Regeneration, einer bindegewebigen Defektheilung oder gar

1 EINLEITUNG

pathologischen Frakturen kommen^{9, 11, 12}. Daher ist die Erforschung und der Einsatz von Knochenersatzmaterialien (KEM) heutzutage unverzichtbar. Im Allgemeinen gibt es zwei verschiedene Ansätze, um Knochendefekte zu beheben. Dazu zählen zum einen das *Tissue Engineering*, das darauf abzielt, lebendiges Gewebe im Labor herzustellen. Andererseits besteht die Möglichkeit des Einsatzes von biologischen oder synthetischen KEM, die gezielt in den betroffenen Bereich implantiert werden, um die natürliche Knochenregeneration zu unterstützen und das Gewebe wiederherzustellen. Grundsätzlich dienen KEM mit ihrer porösen Struktur als Grundgerüst, das nach der Einheilung vom körpereigenen Gewebe (wie Blutgefäßen, Nerven, Osteozyten etc.) des Empfängers durchwachsen werden soll¹³.

Biologische KEM umfassen allogenes, autogenes und xenogenes KEM¹⁴. Allogenes KEM wird von einem Spender derselben Spezies gewonnen, während autogenes KEM aus körpereigenem Gewebe des Patienten stammt, wie zum Beispiel aus dem Beckenkamm oder der Fibula^{9, 15, 16}. Xenogenes KEM hat tierischen Ursprung, beispielsweise vom Schwein oder Rind¹⁶. Innerhalb der biologischen KEM gilt autogenes KEM als Goldstandard^{9, 16, 17}. Im Gegensatz zu allogenen und xenogenen KEM bietet es Vorteile wie ein geringeres Risiko für Immunreaktionen und Übertragungen von Keimen sowie keine religiösen oder ethischen Bedenken^{9, 16, 18}. Dennoch stoßen auch autogene KEM an ihre Grenzen, beispielsweise bei umfangreichen Knochendefekten nach einer Tumorresektion des Unterkiefers^{9, 16}. Daher könnten hier synthetische KEM Abhilfe schaffen.

1.3 Synthetische Knochenersatzmaterialien

Zu den synthetischen KEM gehören die mineralische Knochenzemente. Diese können bei Frakturen oder Osteoporose zur Fixierung von Knochen dienen. Dabei weisen Synthetische KEM zahlreiche Vorteile auf. Mit ihrer knochenähnlichen Struktur besitzen sie eine ausgezeichnete Biokompatibilität und Resorbierbarkeit^{9, 19}. Zusätzlich können sie sich optimal an die jeweilige Defektgröße anpassen und sind stets verfügbar, bei gleichbleibender Qualität^{9, 19}. Darüber hinaus weisen sie eine gute mechanische Festigkeit auf und können Belastungen standhalten⁹. Der Hauptbestandteil mineralischer Knochenzemente ist in der Regel ein Pulver, das aus Kalziumphosphatverbindungen besteht⁹. Zur Verbesserung bestimmter Eigenschaften können auch mineralische Bestandteile wie Magnesiumphosphat hinzugefügt werden⁹.

Der Calcium-Phosphat-Zement, insbesondere in Form von Hydroxylapatit (HA, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$), gehört zu dem am häufigsten verwendeten mineralischen KEM^{9, 20}. Hydroxylapatit kommt zu 95 % im Zahnschmelz und zu 65 % im Knochen vor und verleiht

1 EINLEITUNG

diesem seine charakteristische Härte²¹. Auf Grund seiner ähnlichen chemischen Struktur mit natürlichem Knochen ist Hydroxylapatit ein biokompatibles Material, weshalb es sich gut in das umgebende Gewebe integrieren kann (osteokonduktiv), ohne eine starke Immunreaktion auszulösen²²⁻²⁴. Ferner wird die Integration im Knochengewebe durch seine osteotransduktive Eigenschaft gefördert und es kommt zu einer schrittweisen Auflösung des Ersatzmaterials durch die Osteoklasten und Ersetzung durch natürliches Knochengewebe durch die Osteoblasten^{9, 22-28}. Dennoch bringt HA auch Nachteile mit sich wie bspw. seine langsame Resorptionsrate²⁹.

Der Calcium-Magnesium-Phosphat-Zement (Stanfieldite, SF, $\text{Ca}_4\text{Mg}_5(\text{PO}_4)_6$) zeichnet sich durch seine hohe Biokompatibilität^{30, 31} aus und zeigt im Vergleich zu Calcium-Phosphat-Zement eine schnellere Degradation^{30, 31}. Darüber hinaus fördern die vorhandenen Magnesiumionen die Zellproliferation, indem sie die Aktivität der Osteoblasten und Osteoklasten erhöhen³⁰⁻³⁴. Dadurch wird auch die Osteokonduktivität gesteigert und eine schnellere Osteogenese begünstigt³⁰⁻³⁴. Diese einzigartige Kombination aus Osteokonduktivität und der Förderung der Zellproliferation durch Magnesiumionen macht Stanfieldite zu einer vielversprechenden Option sowohl für die Knochenregeneration als auch als synthetisches KEM.

In dieser Doktorarbeit werden sowohl Hydroxylapatit- als auch Stanfieldite-Pulver verwendet. Beide Pulver werden mit einem Medium verdünnt und den Zellen zugegeben. Einerseits wird der Effekt der Partikel auf die Zellen überprüft, andererseits wird untersucht, ob das im Stanfieldite enthaltene Magnesium im Vergleich zu Hydroxylapatit einen vorteilhafteren bzw. bemerkbaren Einfluss auf die Zellen ausübt.

1.4 Tissue Engineering und Dreidimensionale Zellkultivierung

Jedes Jahr benötigen weltweit etwa 4 Millionen Menschen eine Knochen transplantation oder eine Operation, in der KEM zum Einsatz kommt^{18, 35}. Durch den demografischen Wandel und der weiterhin steigenden Lebenserwartung wird in den Vereinigten Staaten ein Anstieg der Anzahl an altersbedingten Knochenerkrankungen (wie bspw. Osteoporose) von 2,1 Millionen im Jahr 2005 auf 3 Millionen im Jahr 2025 erwartet^{18, 35}. In Europa wird auf Grund der stark wachsenden Bevölkerung ein Anstieg von Frakturfällen zwischen 2010 und 2025 von etwa 28% erwartet^{18, 36}. Aber auch die steigende Prävalenz von Volkskrankheiten wie Adipositas trägt zum Anstieg der Häufigkeit von Knochenfehlbildungen und -erkrankungen bei und führt so zu einer erhöhten Nachfrage nach KEM³⁷. Gleichzeitig steigt durch die höhere Lebenserwartung die Anzahl der Tumorerkrankungen, was wiederum zu einer Zunahme von Knochendefekten führt³⁸.

1 EINLEITUNG

Darüber hinaus sind Knochentransplantate, die am häufigsten angewendete Methode zur Rekonstruktion von Knochendefekten und machen etwa ein Viertel aller chirurgischen Behandlungen von Knochendefekten aus¹⁸. Folglich gewinnen die Erforschung und kontinuierliche Weiterentwicklung von wirksamen Behandlungsmethoden für Knochenerkrankungen eine herausragende Bedeutung im klinischen Bereich¹⁸. Dabei ist das *Tissue Engineering* ein interdisziplinäres Forschungsgebiet, das sich mit der Herstellung künstlicher, organischer Gewebestrukturen *in vitro* befasst^{39, 40}. Ziel ist es, beschädigtes Gewebe wie Knochen, Knorpel, Haut oder Muskel zu rekonstruieren und zu heilen³⁹⁻⁴¹. Bei diesen Bemühungen kommen in der Regel vor allem lebendige Zellen, strukturelle Gerüste (sogenannte Scaffolds, die häufig aus Kollagen⁴² bestehen) und Wachstumsfaktoren zum Einsatz¹⁹.

Die dreidimensionale (3D) -Zellkultivierung ist ein Ansatz des *Tissue Engineering* zur Herstellung von Knochenersatzgewebe. Dabei kann die 3D-Zellkultivierung im Gegensatz zur zweidimensionalen (2D) -Zellkultivierung die physiologische Umgebung von *in-vivo*-Gewebe im menschlichen Körper mit seinen mechanischen und biochemischen Signalwegen, realistisch imitieren⁴³. Ferner ist die 2D-Zellkultivierung insoweit im Nachteil, als dass die Zellen eine starke Wechselwirkung mit dem Plastik der Zellkulturflasche eingehen und so eine Veränderung der Zellmorphologie stattfindet und mit ihr Beeinträchtigungen in der Zellfunktion auftreten können, wie bspw. bei der Zelldifferenzierung, Signaltransduktion oder auch beim Zelltod⁴⁴⁻⁴⁷. Dabei sind gerade diese Zell-Zell-Interaktionen von entscheidender Bedeutung und grundlegend für eine natürliche Zellfunktion, zudem sorgen sie für eine höhere Stabilität im Sphäroid^{48, 49}. Sphäroide sind eine Möglichkeit der 3D-Zellkultivierung. Sie bestehen aus Zellansammlungen, welche sich zu einer engen 3D-Kugel formatieren⁵⁰. Bei dieser Art der 3D-Zellkultur überwiegt der Zell-Zell-Kontakt und der Zell-Extrazellulärmatrix-Kontakt, sodass sich hier einige wesentliche Vorteile in der 3D-Zellkultur ergeben⁴³. So zeigen die Zellen im Sphäroidverband eine erhöhte Zellviabilität, eine verbesserte Regenerationsfähigkeit, ein steigendes Differenzierungspotenzial⁵¹, eine anti-inflammatorische Wirkung⁵² und manche Zelllinien besitzen sogar die Fähigkeit der physiologische Genexpression und Proteinsynthese⁵³⁻⁵⁵, welche in einer 2D-Zellkultur so nicht möglich wäre. Ein weiterer Vorteil der 3D-Kultivierung ist, dass Tierversuche umgangen werden können⁵⁶. Dem gegenüber stehen nur wenige Nachteile. So ist die 3D-Zellkultivierung mit höheren Kosten und einem höheren Zeitaufwand verbunden, während sie weniger effizient und nur schlecht reproduzierbar ist im Vergleich zur 2D-Zellkultivierung⁵⁷. Ein weiterer Nachteil des Sphäroids selbst ist, dass er nicht beliebig groß

1 EINLEITUNG

sein kann⁵⁸⁻⁶¹. Mit zunehmender Größe des Sphäroids verlängert sich die Diffusionsstrecke zwischen Kern und Peripherie, was zu einer schlechteren Versorgung des Zentrums mit Sauerstoff und Nährstoffen führt⁵⁸⁻⁶¹. Dies erhöht wiederum das Risiko eines nekrotischen Kerns⁵⁸⁻⁶¹. Dennoch bietet ein Sphäroid auf Grund seiner kleineren Größe im Vergleich zu einem größeren konstruierten Gewebe eine deutlich bessere Nährstoffversorgung der Zellen im Inneren, sodass ein gesundes Wachstum gefördert werden kann.

Die Sphäroidformatierung selbst entsteht durch die erhöhte Zellinteraktion, die bspw. durch Zellansammlungen in den Vertiefungen der *Micromolds* entstehen (siehe Kapitel 3.4), welche wiederum zu einer erhöhten Cadherinausschüttung führt^{52, 62}. Dabei ummantelt das homophile Cadherin die Oberfläche des Zellaggregates und verdichtet diese, was letztendlich zur Sphäroidbildung führt^{52, 62}. Für die Sphäroidherstellung in dieser Arbeit wurde mittels *Micropillars* sogenannte *Micromolds* (Mikrovertiefungen) aus Agarose Gel hergestellt, diese besaßen im Schnitt 159 Mikrovertiefungen, in denen sich die Zellen ansammeln und zu einer Kugel formatieren konnten. Des Weiteren gibt es zahlreiche weitere, unterschiedliche Methoden zur Sphäroidherstellung, wie bspw. die Tropfenkulturmethode (engl. *hanging drop method*)⁶³ oder die Sphäroidherstellung mittels zellabweisenden Zellkulturflaschen (engl. *low-adhesion methode*)⁶⁴. Wichtig ist bei allen Sphäroidherstellungsmethoden der Grundsatz, dass eine nicht zelladhäsive Oberfläche (bspw. Agarose) eingesetzt wird, sodass die Adhäsion nur unter den Zellen selbst stattfindet⁶⁵. Dies fördert die Bildung eines kompakten Zellaggregats und ermöglicht eine dreidimensionale Anordnung der Zellen⁶⁵.

Im Allgemeinen besteht ein Sphäroid aus drei Zonen (Abbildung 1)^{66, 67}. Die innerste Zone ist der sog. „nekrotische Kern“, welcher durch den langen Diffusionsweg am schlechtesten mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt wird und aufgrund dessen nach einiger Zeit nekrotisch werden kann^{66, 67}. Daran schließt sich die „Ruhezone“ an, dieser wird so genannt, da hier die Zellen nicht proliferieren^{66, 67}. Die äußerste Zone nennt man „Proliferationszone“, da hier die Zellen wegen der reichhaltigen Sauerstoffversorgung gut proliferieren können^{66, 67}.

Angesichts ihrer zahlreichen Vorteile sind Sphäroide eine vielversprechende Methode im Tissue Engineering, um auch komplexe Gewebe und Organe zu rekonstruieren. Vorangegangene Studien haben bereits gezeigt, dass die räumliche Anordnung und das Zusammenspiel der Zellen innerhalb des Sphäroids die Umwandlung von

1 EINLEITUNG

osteoblastenähnlichen Zellen in Osteozyten fördern kann⁶⁸. Basierend auf diesen Erkenntnissen verfolgt diese wissenschaftliche Arbeit nun einen neuen Ansatz bei der Sphäroidherstellung. Hierbei werden den Zellen während der Sphäroidentstehung Biokeramik-Partikel (Hydroxylapatit oder Stanfieldite) zugesetzt. Diese Zugabe zielt darauf ab, dass sich die Partikel während der ersten 24 Stunden innerhalb des Sphäroids einlagern, was potenziell die Differenzierung und Proliferation der Zellen fördern soll. Durch diese innovative Methode soll untersucht werden, ob die Kombination von Sphäroiden mit Partikeln einen noch effektiveren Weg darstellt, die Bildung von Osteozyten zu unterstützen.

Das langfristige Ziel ist, durch die Infiltration von Sphäroiden mit Partikeln ein hochwertiges KEM herzustellen, das über einen langen Zeitraum hinweg die mechanischen Eigenschaften, die Biokompatibilität und das Verhalten des natürlichen Knochens imitiert. Letztendlich soll dieses Material durch Osteointegration mit dem umgebenden Knochengewebe verschmelzen und zu einem funktionalen und stabilen Knochen umgewandelt werden. Dieser Prozess soll eine langfristige Integration und verbesserte Funktionalität des rekonstruierten Knochens ermöglichen. Die Kombination aus Sphäroiden und Partikeln könnte somit eine vielversprechende Möglichkeit für die Entwicklung effektiverer Knochenrekonstruktionstechnologien in der regenerativen Medizin eröffnen.

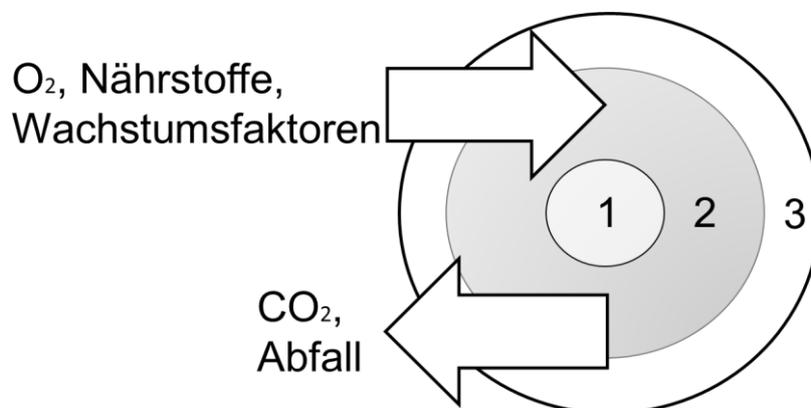


Abbildung 1: Zonen des Sphäroids. Schema eines Sphäroids^{67, 69}. Zone 1: nekrotischer Kern, Zone 2: Ruhezone, Zone 3: Proliferationszone. Diffusionsgradient für O₂, Nährstoffe und Wachstumsfaktoren nimmt von außen nach innen ab^{66, 67, 69}. Der Diffusionsgradient von CO₂ und vom metabolischen Abfall nimmt von innen nach außen hin zu^{66, 67, 69}.

1.5 Stammzellen

Durch ihre einzigartige Fähigkeit zur asymmetrischen Teilung vermögen Stammzellen, sich auf besondere Weise zu vermehren^{70, 71}. Bei diesem Prozess entstehen zwei unterschiedliche Zelltypen^{70, 71}. Einerseits entsteht eine neue Stammzelle, welche eine exakte Kopie der ursprünglichen Mutterzelle darstellt und somit über dieselben

1 EINLEITUNG

Eigenschaften verfügt^{70, 71}. Andererseits differenziert sich die zweite Zelle zu einem spezialisierten Zelltyp, der seine einzigartigen Funktionen und Merkmale erhält^{70, 71}. Diese differenzierten Zellen besitzen daraufhin die erstaunliche Fähigkeit, sich weiterzuentwickeln und eine Vielfalt von unterschiedlichen Zelltypen zu formen^{70, 71}.

Generell ermöglicht die asymmetrische Zellteilung die Erhaltung des Bestands an Stammzellen und gleichzeitig die Generierung neuer Zellen, die sich differenzieren können⁷⁰. Es gibt verschiedene Arten von Stammzellen, die sich in ihrem Potenzial unterscheiden⁷⁰. Unter anderem gibt es die embryonalen Stammzellen, welche nicht mehr im erwachsenen Körper zu finden sind⁷². Unter kontrollierten Bedingungen haben diese Stammzellen das bemerkenswerte Potenzial, in sämtliche Zelltypen des menschlichen Körpers zu differenzieren⁷³. Es ist von Bedeutung zu beachten, dass embryonale Stammzellen jedoch nicht die Fähigkeit besitzen, einen vollständigen Organismus zu bilden⁷³. Sie weisen eine Pluripotenz auf, was bedeutet, dass sie noch nicht endgültig auf einen spezifischen Gewebetyp spezialisiert sind⁷³. Zudem ist es durch das Embryonenschutzgesetz vom 13. Dezember 1990 verboten, menschliche embryonale Stammzellen herzustellen⁷⁴. So dürfen nur mit embryonalen Stammzelllinien gearbeitet werden, die vor dem 01. Mai 2007 im Ausland hergestellt worden sind und bestimmte Voraussetzungen erfüllen⁷⁴. Aus diesem Grund sind ethisch unbedenkliche adulte Stammzellen von besonderer Bedeutung⁷⁴. Sie weisen eine Multipotenz auf und haben die Fähigkeit, sich nur noch in spezifische Zelltypen des Körpers zu differenzieren⁷⁵. Das bedeutet, dass beispielsweise Knochenstammzellen sich ausschließlich in verschiedene Zelltypen des Knochens entwickeln können, jedoch nicht in Haut- oder Muskelzellen⁷⁵.

Adipöse mesenchymale Stammzellen (ASCs) sind multipotente Stammzellen, die die Fähigkeit besitzen sich zu verschiedene Zelllinien differenzieren können⁷⁶. Durch eine chirurgische Fettabsaugung und nachfolgender Isolierung können Stammzellen aus dem Fettgewebe gewonnen werden⁷⁶. Dabei bringen ASCs zahlreiche Vorteile mit sich, da sie im Vergleich zu Stammzellen aus dem Knochenmark (MSCs) sowohl leichter als auch in größerem Umfang gewonnen werden können⁷⁷. Zudem weisen sie eine niedrige Immunogenität auf, da sie eine geringe Expression von Proteinen des Haupt-Histokompatibilitätskomplexes (MHC, englisch Major Histocompatibility Complex) aufweisen, somit eignen sie sich besonders gut für therapeutische Transplantationen, da sie so weniger wahrscheinlich vom Immunsystem des Empfängers erkannt und abgestoßen werden können⁷⁸.

1 EINLEITUNG

Wie auch ASCs sind MSCs multipotent und können sich selbst erneuern und einen undifferenzierten Zustand beibehalten⁷⁹. Knochenmark, das zur Isolierung von MSCs verwendet wird, kann aus vielen verschiedenen Knochenarten wie bspw. dem Wirbelkörper oder dem Oberschenkelknochen gewonnen werden⁸⁰. MSCs weisen zahlreiche Vorteile auf wie Selbstvermehrung, eine schnelle in vitro Proliferation, ihre gute Verfügbarkeit aus reichlich vorhandenen Quellen und einer hohen Differenzierungsfähigkeit⁸¹. Darüber hinaus eignen sie sich besonders für allogene Transplantationen, da sie anti-inflammatorische und immunregulierende Eigenschaften mit sich bringen⁸¹⁻⁸³. Auf Grund dieser positiven Eigenschaften eignen sich MSCs allogene Transplantationen^{82, 83}.

In dieser wissenschaftlichen Arbeit werden die adulten, multipotenten Stammzellen aus dem Fett- und Knochengewebe herangezogen.

1.6 Zielsetzung

Im Vergleich zu biologischen KEM (autogen, allogene, xenogene) bietet die Herstellung von körpereigenem KEM mittels *Tissue Engineering* zahlreiche, attraktive Vorteile. Dazu zählen eine verbesserte Biokompatibilität, optimierter Regenerationsfähigkeit, langfristige Stabilität sowie ein reduziertes Infektionsrisiko. Vor diesem Hintergrund stellt sich die Frage, ob die 3D-Zellkultivierung mittels ASC- und MSC-Sphäroiden, sowohl mit als auch ohne Zugabe von Partikeln, eine vielversprechende und geeignete Option zur Herstellung von körpereigenem KEM darstellt. Die zu vergleichenden Biokeramiken sollten Hydroxylapatit und Stanfieldite umfassen. Dabei ist Hydroxylapatit Bestandteil des physiologischen Knochens wohingegen beim Stanfieldite die ionischen Bestandteile im Knochen vorhanden sind. Ein besonderes Merkmal von Stanfieldite im Vergleich zu Hydroxylapatit ist der Gehalt an Magnesium, das eine Schlüsselfunktion bei der Knochenregeneration besitzt. Es wird vermutet, dass beide Biokeramiken möglicherweise einen stimulatorischen Effekt auf die Knochenbildung (Osteogenese) haben könnten.

In dieser Doktorarbeit sollten im ersten Schritt zunächst, die verwendeten Biokeramiken Hydroxylapatit und Stanfieldite charakterisiert werden, um Partikelgröße, Morphologie und chemische Zusammensetzung zu definieren und sicherzustellen, dass die Partikel für die Sphäroidproduktion geeignet sind. Im zweiten Schritt sollte die optimale Zellzahl für die Sphäroide untersucht werden, bei der sie vital, rund und stabil bleiben. Im dritten Schritt sollte der optimale Partikelgehalt bestimmt werden, um sicherzustellen, dass die partikelbeladenen Sphäroide ihre runde Form, Stabilität und Vitalität beibehalten. Im letzten Schritt sollte erforscht werden, ob die Partikel die osteogene Differenzierung der Sphäroide gefördert haben.

1 EINLEITUNG

Zusammenfassend besteht das Ziel dieser Doktorarbeit darin, zwei wesentliche Fragen zu beantworten. Erstens, ob die Zugabe von Partikeln zu Sphäroiden die osteogene Differenzierung fördert und somit zur weiteren Entwicklung von körpereigenem KEM in der regenerativen Medizin beiträgt. Zweitens, ob einer der beiden Biokeramiken sich als überlegen gegenüber dem anderen erweist in Bezug auf die osteogene Differenzierung. Diese Forschungsfragen sind von hoher Relevanz sowohl für die Grundlagenforschung als auch für die klinische Patientenversorgung, da sie potenziell neue Erkenntnisse und Möglichkeiten für die Behandlung von Knochendefekten liefern.

2 MATERIAL

2.1 Technische Geräte

Tabelle 1: Technische Geräte

Gerät	Markenname	Hersteller
Analysewaage	Analytical balance SBA 32	Scaltec Instruments GmbH, Heiligenstadt, Deutschland
Analysewaage	Precision balance PLS	KERN & SOHN GmbH, Balingen-Frommern, Deutschland
Autoklav	Varioklav steam steriliser	HP-Labortechnik GmbH, Oberschleissheim, Deutschland
Eismaschine	Scotsman AF 103 ice maker	Scotsman Ice Systems, Milano, Italien
Elektronenmikroskop	TM3030Plus Tabletop Microscope	Hitachi, Chiyoda, Japan
Fluoreszenzmikroskop	AxioCam 506, Axio Observer, Colibri 7	Carl Zeiss Microscopy Deutschland GmbH, Oberkochen, Deutschland
Gefrierschrank (-20°C)	LGUex 15meMediLine	Liebherr-Hausgeräte GmbH, Ochsenhausen, Deutschland
Gefrierschrank (-80°C)	Telestar Igloo ultra-low temperature freezer	AZBIL TELSTAR, Barcelona, Spanien
Inkubator	HERAcell 150i CO2	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Kipp-/Rollenmischer	Karl Hecht RM5 rotating mixer	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Kryostat	Leica CM3050 S Cryostat	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Kühlschrank	KT 1830-25	Liebherr-Hausgeräte GmbH, Ochsenhausen, Deutschland
Laborabzugshaube	Vinitex fume cupboards	Vinitex Laboratoriuminrichtungen BV, Sint-Oedenrode, Niederlande
Laminarströmungs-Abzug	HERAsafe HS12/2	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Laser-Streulichtspektrometer	HORIBA LA-350 von Retsch Technology	Retsch GmbH, Haan Deutschland
Massenspektrometer	ICP-MS, Thermo Scientific™ iCAP™ RQ	,Thermo Fisher, Darmstadt, Deutschland
Mehrkanalpipette	RAININ multipipette pipet lite XLS 20-300µl LTS	Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland
Mikrowelle	Samsung MS 23 K 3515 AS/EG Mikrowelle	Herstellungsland China
Multimode-Mikroplatten-Lesegerät	Tecan Spark 20M multimode reader	Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz

2 MATERIAL

Multipette	Eppendorf Xplorer® 5-100 µl	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Optisches Mikroskop	VWR VisiScope IT404 Inverted Phasenkontrast Mikroskop	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
PCR Thermozykler	MiniAmp™ Thermal Cycler	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
pH-Messgerät	pH-Meter inoLab Multi Level 1	WTW GmbH & Co. KG, Tuttingen, Deutschland
Pipette	Pipetman 2-20 µl, 20-200 µl, 100-1,000 µl	Gilson, Middleton, USA
Pipette	Eppendorf Research® plus 0.1 -2.5 µl, 0.5-10 µl	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe	Pipette controller accu-jet pro	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
qPCR cycler	StepOnePlus™ Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Röntgendiffraktometer	XRD D5005 Siemens	Bruker Corporations, Karlsruhe, Germany
Sputter coater	Sputter Coater Leica EM ACE600	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Stereomikroskop	ZEISS SteREO Discovery.V20	Carl Zeiss Microscopy Deutschland GmbH, Oberkochen, Deutschland
Tischzentrifuge	Mikrozentrifuge, MiniStar silverline	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ultraschall Wasserbad	Sonorex sonicwave water bath	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
UV-Lampe	UV-Lampe VL-4.LC	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Vakuumpumpe	Vakuumpumpe LABOPORT® N 816.3 KN.18	KNF group, Freiburg, Deutschland
Vakuumpumpe	Vacuum pump LABOPORT® N 86KN.18	KNF group, Freiburg, Deutschland
Vortex Schüttler	Vortex-Genie 2	Scientific Industries Inc., Bohemia, USA
Wasserbad	Wasserbad VWB18	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Zählkammer	Neubauer-Zählkammer	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim vor der Röhn, Germany
Zellzähler	Cell Counter & Analyzer CASY	OMNI Life Science GmbH & Co. KG, Bremen, Deutschland
Zentrifuge	Heraeus Multifuge X3R	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland

2 MATERIAL

2.2 Verwendete Materialien

Tabelle 2: Verwendete Materialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Adhäsionsobjektträger SuperFrost Plus	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland
Aluminiumfolie	Cofresco Frischhalteprodukte GmbH & Co. KG, Minden, Deutschland
BD Luer-Lok™ Syringe sterile, single use, 5 ml	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Becherglas	Schott AG, Mainz, Deutschland
BioClean Pipettenspitzen 300 µl	Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland
Biosphere® Filter Spitzen 200 µl, 100 µl, 20 µl	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
CELLSTAR® serological Pipetten 2, 5, 10, 25, 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
CELLSTAR® Zellkulturflaschen 175 cm ² ; 75 cm ²	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
Deckglas	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Doppelspatel aus Edelstahl, flexible Klinge 180x48x10 mm	Fisherbrand™ Edelstahlspatel, Chattaway, Deutschland
Einweg-Pasteurpipette aus Glas	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Eppendorf™ Röhrchen 5 ml	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Erlenmeyerkolben	DURAN® Enghals, 150 ml von DWK Life Sciences-Deutschland
Frischhaltefolie	Lidl Stiftung & Co. KG, Würzburg, Deutschland
Glasbehälter 500 ml, 1000 ml	Schott AG, Mainz, Deutschland
Injektionsnadel 24G	Unimed GmbH, Lausanne, Schweiz
KIMTECH SCIENCE Präzisionstücher	Kimberly-Clark Worldwide Inc., Dallas, USA
Küchenrolle CLEAN and CLEVER SMART SMA 68	IGEFA Handelsgesellschaft mbH & Co. KG, Ahrensfelde, Deutschland
Labor- und Hygienetücher zetBox®	Zellstoff Vertrieb GesmbH - International Branch, Leopoldsdorf, Österreich
Marker	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
MicroAmp™ Fast 96-Well-Reaktionsplatte (0,1 ml)	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
MicroAmp™ optische Klebefolie	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
CELLSTAR® 12 Well Zellkultur Multiwell Platte	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen Deutschland
Micropillar	Zur Verfügung gestellt von Herrn Dr. Taufiq Ahmad
Microplate 96 well PP, F-Bottom (chimney Well) schwarz	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich

2 MATERIAL

Mikroskopische Deckgläser 24 x 60 mm	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland
Mikroskopische Objektträger	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland
Nagellack Transparent	cosnova GmbH, Sulzbach, Deutschland
Nunclon Delta Surface	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Nunc™ Zellkulturflasche, behandelt 6, 24, 96 wells	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Oberflächendekontaminationsmittel	Thermo Scientific™ RNase AWAY™, Deutschland
Parafilm "M"	Bemis Company, Neenah, USA
Petrischale	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
Pinzette	A. Hartenstein GmbH, Würzburg (D)
Pipettenspitzen 10, 200, 1000 µl	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen TR LTS 20 µl S 960A/10	Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland
Polystyrol-Röhrchen mit konischem Boden 15 ml; 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
SafeSeal Reagiergefäß 1,5 ml; 2 ml	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Schere	Uni Klinikum Würzburg
Skalpell, Größe 11	B. Braun Aesculap Deutschland
Sterican® Standardkanülen Gr. 1, G 20 x 1 1/2" / ø 0.90 x 40 mm	B. Braun SE, Melsungen, Deutschland
Stericlin® Sterilisationsklebeband	Vereinigte Papierwarenfabriken GmbH, Feuchtwangen, Deutschland
Sterilin™ Wägeschiffchen klein 43x58x13 mm	Thermo Scientific™
Ultra-nitrile examination Handschuhe	Heliomed Handelsgesmbh, Wien, Österreich
Wägebapier 76x76 mm	Wäge-Papier, Pergament, Science Services Deutschland
Well plates unbeschichtet	Corning Inc., Kennebunk, USA
Zellsieb	EASYstrainer™, 70 µm, blau von Greiner Bio-One
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich

2.3 Chemikalien und Medien

Tabelle 3: Chemikalien und Medien

Chemikalien and verwendete Medien	Hersteller
2-Propanol	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Acutase solution	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Agarose, universal	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Alizarinrot S (C.I. 58005) rein	Carl Roth GmbH + Co. KG Schoemperlenstraße 3-5 76185 Karlsruhe, Deutschland
Ambion Trizol Reagent	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
bFGF	Basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor
Bovine serum albumin	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Cell Counting Kit-8 (WST-8)	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Dichlormethane, >= 99.8%	Fisher Scientific UK Ltd, Loughborough, Großbritannien
Diethyl pyrocarbonate (DEPC)	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
DMEM High Glucose (4,5 g/l)	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
DMEM/F-12 (1:1) (1x) +GlutamaxTM-I	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol > 99.8% vergällt	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Fetal Calf Serum (FCS)	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Glutardialdehyd 26%	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Hexamethyldisilizane (HMDS)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Horse serum	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Hydroxylapatit Pulver	Gestellt von Dr. Elke Vorndran
LIVE/DEADTM Viabilitäts-/Zytoxizitäts-Kit: Calcein-Acetoxy-methylester (Calcein-AM), Ethidium-Homodimer-1 (EthD-1)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
PBS-Puffer, Dulbecco's Phosphore Buffered Saline 10x	Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Pen Strep Penicillin und Streptomycin	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
PLANO Leit-C Kohlenstoff Kleber	Plano GmbH, D-35578 Wetzlar, Deutschland
ROTI Histofix 4.5%	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Silbernitrat 99%, Ph.Eur.	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Stanfieldite Pulver	Gestellt von Dr. Elke Vorndran

2 MATERIAL

Tissue-Tek O.C.T Compound	Sakura Finetek Europe HQ, Alphen aan den Rijn, Niederlande
---------------------------	--

2.4 Verwendete Kits

Tabelle 4: Verwendete Kits

Verwendete Kits	Hersteller
NucleoSpin RNA Kit	MACHEREY-NAGEL
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Life Technologies: Cat. No. 4368813

2.5 Software

Tabelle 5: Software

Software	Version
ImageJ	1.53e
GraphPad Prism by Dotmatics	Version 9 (2020)
Microsoft Office (Excel, Word, PowerPoint)	2204
Sparkcontrol Magellan	1.2
StepOne™ Software	2.3
ZEN	2.3 lite; 2.6 pro; pro-2012
DIFFRAC.EVA	V5.1

2.6 Zellen

Tabelle 6: Zellen

Zellen	Herkunft
ASC	Gespendet von Prof. Blunk, Lonza Group AG, Basel, Schweiz
MSC	Gespendet, Orthopädische Klinik König-Ludwig-Haus Würzburg

3 METHODEN

3.1 Ethikvotum

Die MSCs wurden großzügigerweise von der Orthopädischen Klinik König-Ludwig-Haus in Würzburg zur Verfügung gestellt (Ethikvotum 241/17) und unterstützen damit den Sonderforschungsbereich SFB/TRR 225 "Von den Grundlagen der Biofabrikation zu funktionalen Gewebemodellen". Die ASC wurden von Prof. Blunk kommerziell von der Lonza Group Schweiz erworben und anschließend für diese Doktorarbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

3.2 Zellkultivierung

Alle verwendeten Zellen (ASCs und MSCs) wurden unter Standardkulturbedingungen in einem Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Hierbei wurde die Aussaatdichte von beiden Zellarten auf 8,5x10³ Zellen pro cm² festgelegt. Beide Zellarten wurden bis zur Passagennummer 8 verwendet und bei einer Konfluenz von 80-90% ausgesät. In Tabelle 7 sind hierbei die jeweiligen verwendeten Medien aufgeführt. Es wurde alle zwei bis drei Tage ein Mediumwechsel durchgeführt.

Tabelle 7: alle verwendeten Medien für ASC und MSC

Wachstumsmedium (GM)	Differenzierungsmedium (DM)	Kontrollmedium (CM)
DMEM/F-12 (1:1) (1x) +GlutamaxTM-I	DMEM High Glucose (4,5 g/l)	DMEM High Glucose (4,5 g/l)
10 % inactivated FCS	10 % inactivated FCS	10 % inactivated FCS
100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin	100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin	100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin
5 ng/μl bFGF	50 μg/ml L-Ascorbic acid-2- phosphat	
	10 mM β-GlyceroPhosphor	
	100 nM Dexamethason	

3.2.1 Auftauen der Zellen

Nach dem Auftauen der ASCs und MSCs bei 37 °C im Wasserbad wurden diese umgehend in 5 ml Zellkulturmedium für 5 min bei 4000 rpm abzentrifugiert, bevor der

3 METHODEN

Überstand abgesaugt und die Zellen in 1 ml Zellkulturmedium resuspendiert wurden. Anschließend wurden die Zellen in T175-Zellkulturflaschen in einer Aussaatdichte von $8,5 \times 10^3$ Zellen pro cm^2 mit 20 ml Wachstumsmedium gegeben und bis zu einer Konfluenz von 80-90 % kultiviert.

3.2.2 Passage der Zellen und Zellzählung

Nach Erreichen der gewünschten Konfluenz wurden die Zellen auf neue Zellkulturflaschen transferiert und weitergeführt oder direkt in einem Versuch verwendet. Dabei wurde zuerst das Medium abgesaugt und 10 ml PBS hinzugegeben, um alle Medienrückstände zu beseitigen. Danach wurde das PBS abgesaugt und 5 ml Trypsin auf die Zellen gegeben. Um die Reaktion des Trypsins zu aktivieren, wurden die Zellen für maximal 4 min bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert. Um das Ablösen der Zellen vom Flaschenboden zu unterstützen, wurde zusätzlich mehrfach gegen die Flasche geklopft. Um die Reaktion des Trypsins zu stoppen, wurde 10 ml GM hinzugefügt und mehrfach resuspendiert. Die Zellsuspension wurde anschließend durch ein Zellsieb in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. 10 μl dieser Suspension wurden in ein Röhrchen mit 10 ml einer isotonischen Lösung gegeben um die Zellzahl und Vitalität mit dem Casy Zellzählgerät automatisch zu bestimmen. Danach wurde das 50 ml Zentrifugenröhrchen mit der restlichen Zellsuspension bei 1000 rpm 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet in 4 ml GM vorsichtig resuspendiert. Anhand der erhaltenen Zellzahl nach Zellzählung wurde anschließend berechnet, wie viel Zellsuspension zur Weiterkultivierung beziehungsweise in dem folgenden Versuch eingesetzt wurde.

3.3 Herstellung der Micromolds

Die *Micromolds*, die die Form von Bienenwaben hatten (Abbildung 2), und für die Herstellung der Sphäroide benötigt wurden, wurden aus *Micropillars* hergestellt. Sie bestanden aus Agarose Gel und besaßen viele Microvertiefungen, genannt Wells, in denen die Sphäroide mit einem Durchmesser von 200-300 μm kultiviert wurden. Abbildung 2 zeigte sowohl das Design der *Micropillars* als auch der *Micromolds*. Jedes *Micromold* umfasste ein Volumen von 1000 μl .

Für die Herstellung der *Micromolds* wurden 12-Well Zellkulturplatten benötigt. In jedes Well wurde ein *Micropillar* gelegt. Die *Micropillars* wurden von Herrn Dr. Taufiq Ahmad mit einem 3D-Drucker produziert und für diese Doktorarbeit zur Verfügung gestellt. Für die Herstellung eines 2 %-igen Agarose Gels wurden 2 g Agarose mit 100 ml destilliertem

3 METHODEN

Wasser in einem Erlenmeyerkolben gegeben und die Kolbenöffnung wurde mit einem Stück perforierter Plastikfolie verschlossen. Anschließend wurde die Suspension in einer Mikrowelle auf höchster Stufe gekocht und das Glas vorsichtig geschwenkt. Dieser Vorgang wurde so lange wiederholt, bis sich die Agarose vollständig gelöst hat und keine Schlieren mehr aufwies. Anschließend wurde das noch flüssige Gel vorsichtig auf die *Micropillars* gegeben, bis das Well einer 12-Well Zellkulturplatte vollständig gefüllt war. Entstehende Bläschen auf den *Micropillars* wurden mit einer Pipette entfernt. Nach 2 h wurde das *Micromold* mit einem schmalen Spatel durch vorsichtiges Heraushebeln und Klopfen aus dem Well gelöst. Im Anschluss wurden die *Micromolds* sterilisiert. Hierbei wurden diese in ein steriles 300 ml Becherglas mit 70 %-igem Ethanol für eine Stunde eingelegt, bevor die *Micromolds* 5 mal für jeweils 30 min in PBS gewaschen wurden. Währenddessen wurden sie zusätzlich mit einer UV-Lampe bei 254 nm bestrahlt.

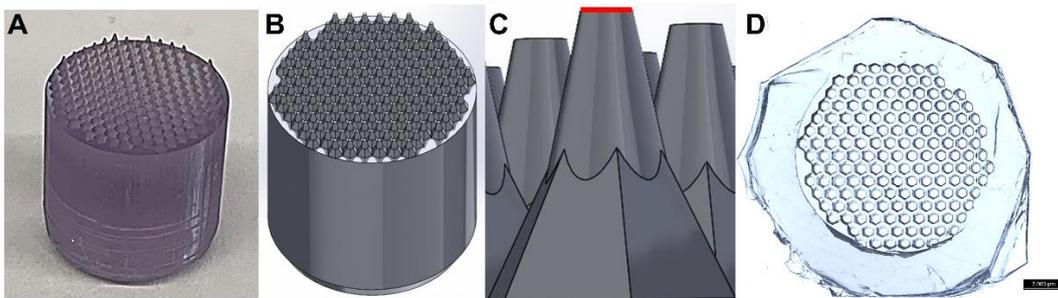


Abbildung 2: Design des Micropillars. (A) Verwendetes Micropillar zur Herstellung von Agarose Micromolds (B) Ein 3D-Bild eines Micropillars, Durchmesser: 10 mm, Höhe: 11,60 mm (C) Eine 3D-Nahaufnahme eines wabenförmigen Wells, Well Höhe: 1 mm, Wellboden (rot): 170 µm (D) Querschnitt eines Agarose Micromolds, Maßstabsbalken: 2000 µm.

Da es beim Zurücksetzen der *Micromolds* in die Wells der Zellkulturplatte zu einem Lufteneinschluss kommen konnte und diese somit nicht plan auf dem Boden der Well-Platte aufliegen würden, wurden mit einem Skalpell vorsichtig drei Einsparungen seitlich eingeschnitten. Somit wurde gewährleistet, dass die Luft seitlich der Einsparungen entweichen konnte und das *Micromold* auf dem Boden der Platte auflag.

Um Kontaminationen zu vermeiden, war es wichtig beim Zurücksetzen der *Micromolds* in die Wells eine breite Pinzette zu verwenden und jeglichen Kontakt mit den Handschuhen zu vermeiden. Hinzufügend ist zu erwähnen, dass die Zellen nicht an der Agarose haften.

3.4 Herstellung von Sphäroiden

Ein Sphäroid besteht entweder nur aus Zellen oder er besteht aus Zellen mit Anteilen an Hydroxylapatit- oder Stanfieldite-Partikeln (Abbildung 3).

3 METHODEN

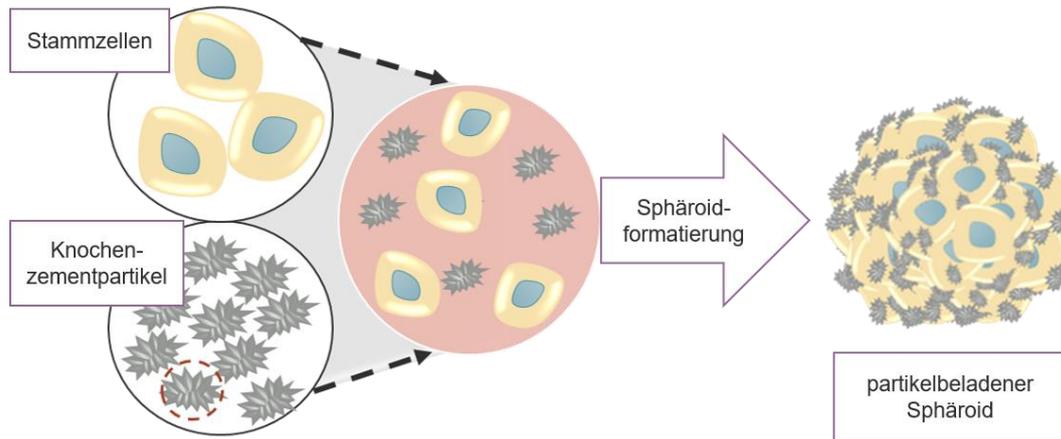


Abbildung 3: Schema Sphäroid mit Biokeramik-Partikel. In der Abbildung ist zu sehen, wie sich Stammzellen mit Biokeramik-Partikeln zu einem partikelbeladenen Sphäroid formieren. Die Stammzellen verschmelzen dabei zu einem Sphäroid, der von Partikeln infiltriert wird. (Mit freundlicher Genehmigung von Herrn Dr. Taufiq Ahmad).

Im allgemeinen Versuchsablauf wurden zunächst Sphäroide mit variablen Zellzahlen hergestellt (Tabelle 8). Nach der Festlegung der geeignetsten Zellzahl, wurden Sphäroide hergestellt bestehend aus Zellen und einer variablen Pulverkonzentration (Tabelle 9).

Tabelle 8: Sphäroide bestehend aus variablen Zellzahlen

Gruppe	A	B	C	D	E	F
Zellen pro Sphäroid	100	300	500	1000	3000	6000

Tabelle 9: Sphäroide bestehend aus variabler Pulverkonzentration

Gruppe	A	B	C	D
Zellen pro Sphäroid	3000	3000	3000	3000
Hydroxylapatit Pulver	1,5 µg	3 µg	6 µg	12 µg
Gruppe	E	F	G	H
Zellen pro Sphäroid	3000	3000	3000	3000
Stanfieldite Pulver	1,5 µg	3 µg	6 µg	12 µg

Für die Herstellung der Sphäroide, welche nur aus Zellen bestanden, wurden Zellen und Medium benötigt. Hierbei wurden die Zellen zunächst passagiert und gezählt, wie im Kapitel 3.2 Zellkultivierung beschrieben. Nach der Zellauszählung wurde die entsprechende Menge an Zellsuspension und Medium in ein Zentrifugenröhrchen gegeben. Das Zell-Medium-Gemisch wurde vorsichtig resuspendiert und 1000 µl davon wurden jeweils in ein *Micromold* pipettiert, bevor die Zellkulturplatte bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert und anschließend im Inkubator kultiviert wurde. Nach einem Tag wurde mit Hilfe eines optischen Mikroskops geprüft, ob sich Sphäroide gebildet hatten.

3 METHODEN

Um die passende Sphäroidgröße zu bestimmen, mit welcher weitere Experimente durchgeführt werden konnten, wurden zunächst Sphäroide aus ASCs mit unterschiedlichen Zellzahlen pro Sphäroid hergestellt, bestehend aus 100, 300, 500, 1000, 3000, 6000 Zellen pro Sphäroid (Tabelle 8). Dabei galt der Grundsatz, aus je mehr Zellen die Sphäroide bestanden, desto mehr Zellsuspension wurde benötigt. Schlussendlich stellte sich die Gruppe mit 3000 Zellen pro Sphäroid für am geeignetsten heraus, deshalb wurde in den folgenden Experimenten mit dieser Größe weiterexperimentiert.

Die *Micromolds* mit denen gearbeitet wurde, wiesen jeweils 159 Wells auf. Für 159 Wells und Sphäroide mit einer Zellzahl von 3000 Zellen wurden insgesamt 477000 Zellen für ein *Micromold* benötigt. Für die Sphäroidherstellung wurde zunächst die Gesamtzahl der aus der Zellkulturflasche gewonnenen Zellen ermittelt. Anschließend erfolgte die Division der gesamten Zellen durch das Gesamtvolumen des frisch hinzugefügten Mediums, um die Zellanzahl pro μl zu bestimmen. Schließlich musste die insgesamt benötigte Zellzahl (hier: 477000 Zellen) dividiert werden durch die zuvor berechnete Zellanzahl pro μl um die benötigte Zellsuspension pro Well in μl zu ermitteln.

Bei der weiteren Optimierung musste erforscht werden, mit welchem Anteil an SF und HA sich runde, formstabile, vitale Sphäroide herstellen ließen. Dafür wurden Sphäroide mit unterschiedlichen Mengen an HA und SF produziert, in Tabelle 9 sind alle hergestellten Gruppen aufgeführt.

Die HA- und SF-Pulver wurden von Frau Dr. Elke Vorndran hergestellt und nach dem Mahlen gamma-sterilisiert. Kurz vor der Anwendung wurden die Pulver nochmals für 30 min unter einer UV-Lampe bei 254 nm sterilisiert.

Das Pulver-Medium-Gemisch wurde in einem Verhältnis von 10:1 hergestellt, dabei wurden 100 mg des SF- oder HA-Pulvers mit 10 ml Medium in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen gegeben und resuspendiert. Für die richtige Menge an Pulver musste die Anzahl an Wells (hier: 159) mit 1,5/ 3/ 6/ 12 μg des Pulvers multipliziert und anschließend in μl umgerechnet werden. So wird die entsprechende Menge an Pulver-Medium-Gemisch zusammen mit der Zellsuspension und dem Medium in ein Zentrifugenröhrchen gegeben und anschließend, wie bereits weiter oben beschrieben, in die *Micromolds* pipettiert.

Schlussendlich setzte sich, um formstabile, vitale, runde Sphäroide herzustellen eine Konzentration von 3 μg Biokeramik-Partikeln pro Sphäroid durch, sodass die Experimente

3 METHODEN

der Hauptphase mit Sphäroiden mit einer Zellzahl von 3000 Zellen und 3 µg Biokeramik-Partikeln durchgeführt wurden.

Der Mediumwechsel der Sphäroide wurde alle zwei Tage durchgeführt. Dafür wurden von 1000 µl Medium 900 µl behutsam abgesaugt. Das frische Medium wurde langsam entlang der *Micromold*-Innenwand hinzupipettiert, damit die Sphäroide nicht aus den Wells herausgeschwemmt werden konnten.

3.5 Durchmesserbestimmung der Sphäroide

Folgende Gruppen von Sphäroiden wurden für 21 Tage in den Micromolds mit GM kultiviert: Kontrollgruppe, HA und SF.

Um die Durchmesser der Sphäroide bestimmen zu können, wurden von den Sphäroiden an den Tagen 1, 7, 14, 21 von vier verschiedenen Arealen der *Micromolds* mindestens 16 Fotos mit einem optischen Mikroskop aufgenommen.

Mit dem Software Programm *ImageJ* wurde ihr Durchmesser bestimmt und per Excel ein Diagramm erstellt. Für die Durchmesserbestimmung der Sphäroide wurde dafür bei *ImageJ*, der Maßstabsbalken abgemessen und kalibriert (*Analyze > Tools > Scale Bar*), daraufhin konnten die Sphäroiddurchmesser ausgemessen werden. Für jede Gruppe wurde der Querdurchmesser von mindestens 30 Sphäroiden bestimmt. Aus diesen Werten wurde der Mittelwert gebildet, aus welchem ein Diagramm erstellt wurde.

3.6 Analyse der Vitalität

Durch eine lebend-tot Färbung wurde die Vitalität der Sphäroide an Tag 1, 7, 14 und 21 untersucht. Hierfür wurden die Sphäroide durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren aus ihren Agarose *Micromolds* in 96-Well Zellkulturplatten überführt und dort zweimal mit unsterilem PBS gewaschen. Die Färbelösung wurde mit 1000 µl PBS, 2 µl Calcein-AM (Stammlösung 1 mg/ml) und 1 µl Ethidium Homodimer-1 (Stammlösung 2 mM) angesetzt und anschließend jeweils 300 µl auf die Proben pipettiert und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurden mehrere Aufnahmen von jeder Gruppe mit dem Fluoreszenzmikroskop gemacht. Dabei erscheinen abgestorbene Zellen rot, da diese mit dem Farbstoff Ethidium Homodimer-1 gefärbt wurden, welches an den Nukleinsäuren bindet, wenn die Plasmamembran geschädigt ist. Esterasen hingegen metabolisieren Calcein-AM zu Calcein, welches an Calcium-Ionen bindet, was bei lebenden Zellen zu einer grünen Färbung führt.

3.7 Analyse der metabolischen Aktivität

Zur Erfassung der metabolischen Aktivität der Zellen wurde das *Cell Counting Kit-8* verwendet und an Tag 1, 3, 5, 7, 14 und 21 analysiert. Das hierbei enthaltene WST-8 ist ein sehr gut wasserlösliches Salz, welches von den mitochondrialen Dehydrogenasen der aktiven Zellen zu einem gelblich gefärbten Produkt, das Formazan, reduziert wird. Dabei ist die Menge des Formazan-Farbstoffs, welches hierbei photometrisch nachgewiesen werden kann, direkt proportional zur Anzahl der lebenden Zellen. Die folgende hier beschriebene Methode wurde erstmals in dieser Weise durchgeführt.

Die metabolische Aktivität der Zellen wurde direkt in den Agarose *Micromolds* der jeweiligen drei Gruppen gemessen:

- ASC-Sphäroide mit 3000 Zellen ohne Zugabe von Biokeramik-Partikel (Kontrollgruppe)
- ASC-Sphäroide mit 3000 Zellen und 3 µg Hydroxylapatit
- ASC-Sphäroide mit 3000 Zellen und 3 µg Stanfieldite
- Leeres *Micromold* als Blank (auf einer separaten 12-Well Zellkulturplatte).

Pro *Micromold* werden 500 µl WST-8 Lösung benötigt. Das WST-8 Reagenz wurde in einem Verhältnis von 1:100 in Medium angesetzt. Somit setzte sich die 500 µl WST-8 Lösung wie folgt zusammen: 5 µl WST-8 und 495 µl Medium (GM).

Insgesamt wurde für 13 *Micromolds* die WST-8 Lösung angesetzt. Dafür wurden 65 µl des lichtempfindlichen WST-8 mit 6435 µl Wachstumsmedium in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben und resuspendiert. Im Anschluss wurde das Medium vorsichtig von den *Micromolds* abgesaugt und 500 µl der WST-8 Lösung in jedes *Micromold* pipettiert. Die 12-Well Zellkulturplatte wurde für 3 h zurück in den Inkubator gestellt. Nach 3 h wurde die Lösung vorsichtig mit einer Pipette entnommen und auf eine neue, sterile 12-Well Zellkulturplatte übertragen. Um ein Sterben der Sphäroide zu verhindern, wurde unverzüglich frisches GM in die *Mircomolds* gegeben. Dann wurde 100 µl der WST-8 Lösung auf eine 96-Well Zellkulturplatte transferiert. Jegliche Luftblasen wurden mit einer schmalen Kanüle beseitigt. Anschließend wurde mit Hilfe des TECAN Readers die metabolische Aktivität der Zellkulturplatte bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen und die Mittelwerte der Messungen ermittelt. Der Inhalt eines *Micromolds* wurde auf zwei Wells übertragen. In jedem Well sind 100 µl WST-8 Lösung enthalten.

3.8 Histologie

3.8.1 Anfertigung von Gewebeschnitten

Um histologische Färbungen der Sphäroide durchführen zu können, wurden Cryoschnitte der Sphäroide angefertigt. Hierzu wurden zuerst die Sphäroide aus den *Micromolds* durch auf und ab pipettieren aus den Wells gelöst, in ein Zentrifugenröhrchen gegeben und dreimal mit PBS gewaschen. Die Sphäroide wurden anschließend für 1 h bei Raumtemperatur in 4,5 % Formaldehyd fixiert. Damit man die Sphäroide in dem Cryo-Einbettmedium (*Tissue-Tek*) später erkennen konnte, wurden sie für 20 min in Eosin eingelegt und anschließend fünfmal gewaschen, um alle Eosin-Rückstände zu entfernen. Die gefärbten Sphäroide wurden in eine Cryoeinbettform (10 mm x 10 mm x 5 mm) gegeben, mit *Tissue-Tek* bedeckt und bei -20 °C eingefroren, bis sich das *Tissue-Tek* verfestigt hat. Nun konnten 10 µm dünne Cryoschnitte mit dem Cryotom angefertigt werden, die auf Objektträger aufgezogen und bis zur histologischen Färbung im Kühlschrank gelagert wurden. Dabei wurden auf jedem Objektträger mindestens vier Sphäroid-Schnitte platziert. Die Schnitte wurden für die histologischen Färbungen Hämatoxylin-Eosin-Färbung, Alizarin und Von Kossa verwendet.

3.8.2 Hämatoxylin & Eosin Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H & E) ist eine der am häufigsten verwendeten Färbemethoden.

Sie ist einfach und schnell und bietet eine Übersicht über die Zellstrukturen wie bspw. Zellkern und -matrix. Das basische Hämatoxylin färbt alle sauren bzw. basophilen Strukturen (Ribosomen im rauen endoplasmatischen Retikulum und die Zellkerne) blau bis violett an. Das Eosin hingegen ist sauer und färbt alle basischen bzw. acidophilen Anteile (Zellplasmaproteine) rosa bis rot an.

Zunächst wurden die Objektträger mit den Schnitten für 10 min in 4 %-igem Paraformaldehyd eingelegt. Um die Objektträger von *Tissue-Tek* Rückständen zu befreien, wurden diese für 5 min vorsichtig in Wasser gespült. Anschließend wurden die Schnitte jeweils für 1 min mit Hämatoxylin angefärbt und zum Bläuen der Zellkerne für 5 min mit fließendem Leitungswasser gespült. Danach erfolgte eine Gegenfärbung mit Eosin für 15 min und eine erneute Spülung für 5 min bei fließendem Wasser. Zum Entwässern wurden die Präparate in einer aufsteigender Ethanol-Reihe entwässert: In 80 %-igem Ethanol für 1 min und zweimal in 96 %-igem Ethanol für jeweils 2 min. Dann wurden sie in 2-Propanol für 2 min und zweimal in Xylol für jeweils 5 min gelegt. Zum Schluss wurde auf die Objektträger das Einschlußmittel aufgetragen, worüber ein

Deckglas luftblasenfrei gelegt wurde. Zur Fixierung des Deckgläschens wurde Klarlack verwendet. Die gefärbten Proben mussten 24 stundenlang trocknen, bis sie zum Mikroskopieren verwendet werden konnten.

3.8.3 Alizarin Färbung

Um eine osteogene Differenzierung in den Sphäroiden nachzuweisen, wurde Alizarinrot S verwendet. Der optische Nachweis der osteogenen Differenzierung entsteht durch das Anthrachinon-Derivat Alizarinrot S, indem es durch eine Chelatbildung mit Calcium-Ionen einen rötlichen Alizarin-Rot-S-Calcium-Komplex bildet.

Auch hier wurden die Objektträger zunächst für 10 min in 4 %-igem Paraformaldehyd eingelegt. Daraufhin wurden die Objektträger in Wasser eingelegt und leicht auf- und abbewegt, sodass das *Tissue-Tek* vollständig abgewaschen wurde. Dann wurde der Objektträger mit Alizarin-Rot-Färbelösung bedeckt. Nach 5 min Einwirkzeit wurde der Objektträger in Wasser hin und her geschwenkt, bis die restliche Alizarin-Rot-Färbelösung vollständig abgewaschen wurde. Die Schnitte wurden, wie bei der H & E-Färbung bereits beschrieben, eingedeckt.

3.8.4 Von Kossa Färbung

Die Von Kossa Färbung ist eine indirekte Methode, um Calcium-Ionen zu visualisieren. Dabei führt die Reaktion von Calcium-Ionen mit dem Silbernitrat der Von Kossa Färbelösung, dazu, dass eine Reduktion von Hydrochinon entsteht und sich so schwarzbraunes Silber bildet. So kann eine osteogene Differenzierung in den Sphäroiden nachgewiesen werden.

Die Cryoschnitte wurden auch hier zunächst fixiert und gewaschen. Im Anschluss wurden die Schnitte mit 2,5 %-iger Silbernitratlösung bedeckt und 15 min unter einer 60 Watt Lampe inkubiert. Nach dem Färben wurden die Präparate für 3 min mit destilliertem Wasser gewaschen, bevor sie eingedeckt wurden.

3.9 Charakterisierung der Biokeramik-Partikel

3.9.1 Bestimmung der Partikelgröße

Zur Darstellung der Partikelgröße der HA- und SF-Pulver mittels des optischen Mikroskops wurden die jeweiligen Pulver in einem Verhältnis von 1:100 mit PBS verdünnt. Dann wurden jeweils 10 µl der Lösung auf eine Neubauer-Zählerkammer appliziert und Aufnahmen mit einem optischen Mikroskop bei 4-Facher Vergrößerung angefertigt.

Zudem wurde die Partikelgrößenbestimmung des Pulvers mittels eines Laser-Streulichtspektrometers durchgeführt. Beide Pulver wurden mindestens zweimal gemessen um Standardabweichungen bei der Messung miteinkalkulieren zu können.

3.9.2 Rasterelektronenmikroskop

Beim Rasterelektronenmikroskop (REM) rastert ein Elektronenstrahl das Objekt ab. Dabei entsteht durch die Wechselwirkung der Elektronen mit dem Objekt das Bild. In dieser Arbeit wurden mit dem REM, Aufnahmen von Sphäroiden und Pulverpartikeln angefertigt, sodass Rückschlüsse auf ihre Morphologie gezogen werden konnte.

Für die Probenpräparation wurden die Sphäroide viermal mit PBS gewaschen, bevor sie in 6 % Glutaraldehyd auf Eis für 15 min fixiert wurden. Danach wurden die Sphäroide zweimal mit PBS auf Eis für 10 min gewaschen. Zur Dehydratisierung der Sphäroide wurde eine Ethanol-Reihe bei Raumtemperatur durchgeführt, wobei die Sphäroide jeweils nacheinander zweimal für 10 min in 70 %, 90 % und 100 % Ethanol inkubiert wurden. Anschließend wurden diese zweimal für 15 min in Hexamethyldisilazan (HMDS) inkubiert, bevor sie in 100 % Ethanol überführt wurden. Auf ein *Tabletop* wurde ein Klebestreifen platziert, auf welchem ein Deckglas aufgeklebt wurde. Auf dieses Deckglas wurden die Sphäroide gegeben. Damit die Oberseite des Deckglases geerdet wird, wurde die Unterseite der Proben mit PLANO Leit-C Kohlenstoff Kleber beschmiert.

Anschließend wurden die Sphäroide im *Sputter-Coater* mit einer 4 nm dünnen Platinschicht besprüht, damit eine leitfähige Oberfläche geschaffen wird.

Für die REM-Aufnahmen der Biokeramik-Partikel wurde dem Pulver Ethanol hinzugefügt. Das Ethanol-Pulver-Gemisch wurde auf die reine Metalloberfläche des *Tabletops* pipettiert. Nachdem das Ethanol sich verflüchtigt hat, entstand hierbei zwischen dem *Tabletop* und dem Pulver eine adhäsive Bindung. Anschließend kamen die Proben in den *Sputter-Coater*.

3.9.3 Energiedispersive Röntgenspektroskopie

Mit der Energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX) wurde von den Sphäroiden und Pulverpartikeln die Elementzusammensetzungen bestimmt.

Die Oberfläche der Probe, welche im REM ist, wird mit Elektronen beschossen, deren Energie reicht aus, um die inneren Schalen der Atome des Materials zu ionisieren. Die Energieniveaus dieser Schalen sind spezifisch für bestimmte Elemente, ähnlich wie ein Fingerabdruck. Findet nun eine Ionisation in einer tiefen Schale statt, bleibt dort ein freier Elektronenzustand, der von Elektronen einer höheren Schale wieder besetzt werden kann. Um von einer höheren Schale in eine niedrigere Schale zu gelangen, muss das

betreffende Schalelektron die entsprechende Energie vorher abgeben. Die Energie kann in Form eines Photons abgegeben werden. Die Energie des Photons wiederum entspricht dann genau der Energiedifferenz zwischen den beiden beteiligten Schalen. Wie oben erwähnt, sind die Energieniveaus dieser Schalen elementspezifisch. Ein EDX-Detektor kann die Energie eines eintreffenden Photons aber messen, wodurch zurückgeschlossen werden kann, aus welchem Element das Photon gekommen ist. Da aber auch die Position des Elektronenstrahls und damit den Ort der Anregung bekannt ist, weiß man auch, von welchem Punkt der Probenoberfläche das Photon gekommen ist.

Auf Basis der Elementzusammensetzung konnte so nachgewiesen werden, welches Pulver und welche Sphäroide der HA- und welche der SF-Gruppe angehören. Dafür wurden folgende Elemente identifiziert: Kohlenstoff (gelb), Calcium (blau), Magnesium (grün) und Phosphor (rot).

3.9.4 Röntgendiffraktometrie

Die Röntgendiffraktometrie (XRD) ist eine Analysemethode, mit welcher Feststoffe und Pulver charakterisiert werden können. Hierbei hat jedes Mineral sein charakteristisches, individuelles Beugungsmuster, welches ein Zuordnen des Stoffes über die Datenbank "*International Center for Diffraction Data*" (ICDD) ermöglicht. Weiterhin wurde die EVA-Datenbank mit den PDF2- und PDF 4 ergänzt. In dieser Arbeit wurde das XRD für die Charakterisierung des Hydroxylapatit- und Stanfieldite-Pulvers angewendet. Zur Probenvorbereitung wurde das Pulver in den Probenteller gegeben und mit einer Glasplatte glattgestrichen. Zur Identifizierung der Biokeramik-Pulver wurde mit Hilfe des XRDs D5005 ein Diffraktogramm erstellt.

3.9.5 Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma

Die Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP) dient der qualitativen und quantitativen Bestimmung von Spurenelementen.

Über einen Zeitraum von 21 Tagen wurden das HA- und SF- Pulver auf die Freisetzung von Calcium-, Phosphor- und Magnesium-Ionen analysiert. Hierfür wurden drei Proben vorbereitet: In dem ersten Zentrifugenröhrchen befand sich 10 mg SF mit 10 ml destilliertem Wasser und in dem zweiten 10 mg HA mit 10 ml destilliertem Wasser. Das dritte Röhrchen, bestehend aus destilliertem Wasser, diente als Blank. Die Zentrifugenröhrchens wurden auf einem Kipp- Laborrührer bei 37 °C inkubiert. Nach jeweils 1 Stunde, 6 Stunden, 24 Stunden, 3 Tagen, 5 Tagen, 7 Tagen, 14 Tagen und 21 Tagen wurden die Zentrifugenröhrchens bei 4000 rpm für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurden die überstehenden Flüssigkeiten in neue Zentrifugenröhrchen

3 METHODEN

überführt, welche vorerst im Gefrierfach bei -20 °C gelagert wurde. Den alten Zentrifugenröhrchen wurden erneut 10 ml destilliertes Wasser hinzugefügt und sie wurden zurück in den Inkubator gelegt. Schlussendlich wurden alle 16 Gruppen und der Blank mit dem ICP ausgewertet (Tabelle 10). Dafür wurde jede Probe zweifach analysiert und ein Mittelwert berechnet, aus welchem wiederum ein Diagramm der Ionen-Freisetzung erstellt wurde.

Tabelle 10: ICP ausgewertete Gruppen

	Gruppe HA	Gruppe SF
1 h	A1	B1
6 h	A2	B2
24 h	A3	B3
3 d	A4	B4
5 d	A5	B5
7 d	A6	B6
14 d	A7	B7
21 d	A8	B8

3.10 pH-Wert Messung

Um zu überprüfen, ob die Biokeramik-Partikel einen negativen Einfluss auf den pH-Wert des Mediums hatten, wurde der pH-Wert des Mediums gemessen. Denn sowohl ein zu basischer, als auch zu saurer pH-Wert hätte einen negativen Einfluss auf die Vitalität der Zellen gehabt, dies sollte damit ausgeschlossen werden.

Zur pH-Wert Messung des Mediums (bei 21 Tage alten MSC-Sphäroiden) mit Hilfe eines pH-Meters musste zunächst die Elektrode geeicht werden, indem sie in zwei Puffer-Lösungen mit einem pH-Wert von 7,0 und 10 gegeben wurde. Anschließend wurde aus 12 *Micromolds* das Medium entnommen, in ein Zentrifugenröhrchen gegeben und der jeweilige pH-Wert bestimmt.

3.11 Molekularbiologische Methoden

Um eine mögliche osteogene Differenzierung in den Sphäroiden nachzuweisen, wurde eine qPCR mit den osteogenen Markern alkalische Phosphatase (ALPL), Osteopontin (SPP1) und Dickkopf-1 (DKK1) durchgeführt. Die Proben wurden über einen Zeitraum von 21 Tagen sowohl in CM als auch DM kultiviert und zu den Zeitpunkten 1, 7, 14, 21 Tagen untersucht. Gruppe eins war die Kontrollgruppe (Sphäroide ohne Biokeramik-Partikel) und Gruppe zwei waren Sphäroide mit Stanfieldite. An Tag 1 wurden beide Gruppen nur mit CM kultiviert. Diese beiden Proben von Tag 1 dienten als Referenz, auf die die

Genexpression normiert wurde, damit die verschiedenen Proben miteinander verglichen werden konnten.

3.11.1 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation erfolgte mit Hilfe des *NucleoSpin-RNA-Kits* von MACHEREY-NAGEL. Zuerst wurden die Sphäroide durch auf- und ab- pipettieren aus den *Micromolds* entnommen und in ein Eppendorf Röhrchen überführt. Nachdem die Sphäroide dreimal mit PBS gewaschen wurden, wurden sie für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert und das PBS wurde entfernt. Alsdann wurde der Lysepuffer aus 350 µl Buffer RA1 und 3,5 µl β-mercaptoethanol pro Probe hergestellt und der Probe hinzugefügt. Dieser Puffer lysierte die Zellen in den Sphäroiden und inaktivierte umgehend die RNasen, sodass eine Isolation intakter RNA sichergestellt wurde. Die Pufferlösung wurde so lange resuspendiert, bis sich die Sphäroide auflösten und die Lösung keine Schlieren mehr aufwies. Im Anschluss wurden die Lysate bei -80 °C gelagert.

Für die RNA-Isolation wurden die Proben auf Eis aufgetaut. Dann wurde ein *NucleoSpin* Filter mit violetterem Ring auf ein Sammelröhrchen (2 ml) aufgesteckt, die Lyse wurde resuspendiert und möglichst mittig auf den Filter gegeben. Nach Zentrifugation für 1 min bei 11000 rpm wurde der Filter entfernt und dem Lysat 350 µl 70 %-iges Ethanol hinzugefügt. Die Lysat-Ethanol-Mischung wurde so lange resuspendiert, bis eine klare Flüssigkeit entstand. Daraufhin wurde die Flüssigkeit auf eine *NucleoSpin* RNA Säule mit blauem Ring übertragen, welche zuvor in ein Sammelröhrchen gesteckt wurde. Nach Zentrifugieren für 30 sek bei 11000 rpm war die RNA auf dem blauen Filter gebunden. Um die RNA von Rückständen des Puffers zu befreien, musste die Membran entsalzen werden. Zudem hatte die Entsalzung eine um vielfach effektivere rDNase-Verdauung zur Folge. Dafür wurde dem Lysat 350 µl MDP (*Membrane Desalting Buffer*) hinzugegeben und für 1 min bei 11000 rpm zentrifugiert. Damit die DNA auf der Membran restlos entfernt wurde, musste eine rDNase hergestellt werden aus 90 µl Reaction Buffer für rDNase und 10 µl *reconstituted* rDNase. Anschließend wurde 95 µl dieses rDNase-Gemisches mittig auf den blauen Filter aufgetragen. Nach 15 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur folgten drei Waschschriffe, bei denen die Membran gereinigt wurde. Beim ersten Waschschriff wurde 200 µl RAW2 Puffer, welches die rDNase inaktivierte, auf die Säule pipettiert und für 30 sek bei 11000 rpm zentrifugiert. Nachdem der Durchfluss verworfen wurde, wurden für den zweiten Waschschriff 600 µl RA3 Puffer auf die Säule gegeben und es wurde erneut für 30 sek bei 11000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde wieder verworfen. Für den letzten Waschschriff wurden 250 µl RA3 Puffer auf die Säule pipettiert. Um die Membran zu trocknen, wurde erneut für 2 min bei 11000 rpm zentrifugiert.

3 METHODEN

Anschließend wurde das Sammelröhrchen verworfen und die Säule wurde in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß platziert. Die folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Zur Eluierung der RNA wurden 20 µl RNase-freies Wasser mittig auf die Membran pipettiert und für 2 min inkubiert. Im Anschluss wurde für eine Minute bei 11000 rpm zentrifugiert und die Proben bis zur Messung des RNA-Gehalts auf Eis gelagert.

Die Konzentration und Reinheit der RNA wurde mit einem TECAN Spark 20M-Plattenlesegerät gemessen. Um Ungenauigkeiten durch Verunreinigungen zu vermeiden, musste die NanoQuant-Plate vorab mit Wasser gereinigt werden. Für ein individuelles Blanking wurden 2 µl Nuklease-freies Wasser pro Probe auf die dafür vorhergesehenen Stellen pipettiert. Nachdem Blanking wurde die Platte gereinigt, getrocknet und 2 µl der jeweiligen RNA-Probe auf die Stellen pipettiert und gemessen. Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA bei -80 °C gelagert.

3.11.2 cDNA Synthese

Die komplementäre DNA (cDNA) wurde aus 500 ng RNA synthetisiert. Dafür wurde das *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* verwendet und die RNA Synthese erfolgte gemäß den Vorgaben des Herstellers. Dafür mussten alle benötigten Komponenten des Kits auf Eis aufgetaut, miteinander vermischt und kurz runterzentrifugiert werden, um anschließend auf Eis gelagert zu werden. Die cDNA-Proben mussten auf Eis angesetzt werden. 500 ng der RNA wurden in eine neues *Tube* überführt und auf 10 µl mit Wasser aufgefüllt.

Der *Mastermix* (Tabelle 11) wurde 17 mal angesetzt für 14 Proben, 2 Überschuss und eine Negativkontrolle bestehend nur aus Wasser ohne RNA. Dabei mussten 10 µl des *Mastermix* pro *Tube* mit 10 µl der 500 ng RNA bzw. 2000 ng RNA pipettiert werden, sodass ein Gesamtvolumen von 20 µl pro Probe rauskommt. Daraufhin wurde es gevortext und abzentrifugiert.

Tabelle 11: Mastermix

Substanz	Menge [µl]
10x RT Buffer	2,0 µl
25x dNTP Mix (100mM)	0,8 µl
10x RT Random Primers	2,0 µl
MultiScribe Reverse Transcriptase	1,0 µl
DEPC-H2O	4,2 µl
Total Volume	10 µl

3 METHODEN

Im Anschluss wurde die cDNA-Reaktion mit dem Thermozykler (Programm: cDNA) mit dem Temperaturverlauf Tabelle 12 durchgeführt.

Tabelle 12: Temperaturverlauf der cDNA-Synthese

Einstellung	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3	Schritt 4
Temperatur	25 °C	37 °C	85 °C	4 °C
Laufzeit	10 min	120 min	5 min	∞

Am Ende wurde die Konzentration im Vial auf eine Endkonzentration von 5 ng/µl cDNA durch Zugabe von der entsprechenden Menge DEPC-H₂O verdünnt. Anschließend wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

3.11.3 Quantitative Real-Time PCR

Mit der qPCR wurde die Genexpression von Markern für die osteogene Differenzierung der MSC nach dem ersten, siebten, vierzehnten und einundzwanzigsten Tag bestimmt. Die geeigneten Primer-Sequenzen, Konzentrationen und *Annealing*-Temperaturen wurden zuvor von Frau Dr. Carina Blum etabliert. Alle Angaben können Tabelle 13 entnommen werden. Als *Housekeeping*-Gen wurde EF1a verwendet. Für den Nachweis einer Osteogenese wurden folgende osteogene Primer verwendet: ALPL, SPP1 und DKK1.

Tabelle 13: Housekeeping- und osteogene Marker spezifische Primer Sequenzen mit den verwendeten Konzentrationen und Temperaturen

Marker-Typ	Primer	Sequenz 5'-3'	Konzentration [nM]	Temp [°C]
House-keeping	EF1a	For: AACCCCGACACAGTAGCATT Rev: GGTGACTTTCCATCCCTTGA	For: 100nM Rev: 100nM	61
Osteogenese	ALPL (KLH)	For: GTACGAGCTGAACAGGAAC AACG Rev: CTTGGCTTTTCCTTCATGGT G	For: 200nM Rev: 200nM	61
	SPP1 (KLH)	For: TATGATGGCCGAGGTGATA G Rev: CATTCAACTCCTCGCTTTCC	For: 200nM Rev: 200nM	62
	DKK1_for (KLH)	-Keine Sequenz verfügbar-	For: 200nM Rev: 200nM	62

Jeweils 9 µl der Mastermischung vom *Housekeeping* Gen (Tabelle 14) und jeweils 9 µl der Mastermischung von ALPL-, SPP1-, DKK1-Gen (Tabelle 15) wurden in eine 96-

3 METHODEN

Well Zellkulturplatten pipettiert und es wurde jeweils 1 µl cDNA (5 ng) hinzugefügt. Die Proben wurden in Duplikaten gemessen.

Tabelle 14: Mastermix für EF1a (Housekeeping Gen)

Substanz	Menge [µl]
Master mix (2,0X)	5
Forward primer (100 nM)	0,10
Reverse Primer(100 nM)	0,10
cDNA (5 ng/µl)	1,00
H ₂ O	3,80
Total Volume	10,00

Tabelle 15: Mastermix für ALPL, SPP1, DKK1

Substanz	Menge [µl]
Master mix (2,0X)	5
Forward primer (200 nM)	0,20
Reverse Primer(200 nM)	0,20
cDNA (5 ng/µl)	1,00
H ₂ O	3,60
Total Volume	10,00

Für eine gründliche Durchmischung und der Beseitigung jeglicher Luftblasen wurde vor dem Beginn der qPCR die Platte zunächst auf dem Vortexer gemischt und anschließend bei 4000 U/min zentrifugiert. Die qPCR wurde mit dem Programm aus Tabelle 16 durchgeführt.

Tabelle 16: qPCR-Temperaturverlauf

	Holding	stage	Cycling	stage	Melt	curve	stage
°C	50	95	95	*	95	60	95
Time	2 min	2 min	15 sek	1 min	15 sek	1 min	15 sek
Cycle	1	1	40	40	1	1	1

Die Analyse der Schwellenwerte und die Auswertung der Genexpression erfolgte mit der *StepOne* Software.

4 ERGEBNISSE

4.1 Teil I: Charakterisierung der Biokeramik-Partikel

4.1.1 Pulverpartikelgröße

Für eine konkrete Pulverpartikelgrößenbestimmung der HA- und SF-Pulver, wurden Messungen des Pulvers mittels eines Laser-Streulichtspektrometers durchgeführt. Das dargestellte Diagramm (Abbildung 4) repräsentiert den Pulverpartikeldurchmesser der jeweiligen verwendeten Pulver. Dabei wies HA im Durchschnitt eine Pulverpartikelgröße von 5,88 μm auf und SF eine Partikelgröße von 3,23 μm .

Um optisch einen besseren Eindruck über die Pulverpartikel der HA- und SF-Pulver zu erhalten, wurden zusätzlich lichtmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Abbildung 5 zeigt eine exemplarische Aufnahme der HA-Partikel (Abbildung 5, A) und der SF-Partikel (Abbildung 5, B). Auf den abgebildeten mikroskopischen Aufnahmen des HA-Pulvers (Abbildung 5, A) erkennt man sowohl größere als auch kleinere Partikel. Somit zeigt sich insgesamt eine sehr inhomogene Verteilung der Pulverpartikelgröße. Beim SF-Pulver (Abbildung 5, B) hingegen zeigt sich ein homogenes Bild mit kleineren Pulverpartikeln.

Zusammenfassend bestätigen die optischen Mikroskop-Aufnahmen die Ergebnisse der Laser-Streulichtspektrometer-Messungen und zeigen, dass die HA-Partikel im Durchschnitt größer und inhomogener sind als die SF-Partikel. Die Ausreißer bei den Laser-Streulichtmessungen des Hydroxylapatits sind in den optischen Mikroskop-Aufnahmen nachvollziehbar durch deutlich größere Partikel oder Partikelakkumulationen (Abbildung 5, A, siehe weiße Pfeile).

4 ERGEBNISSE

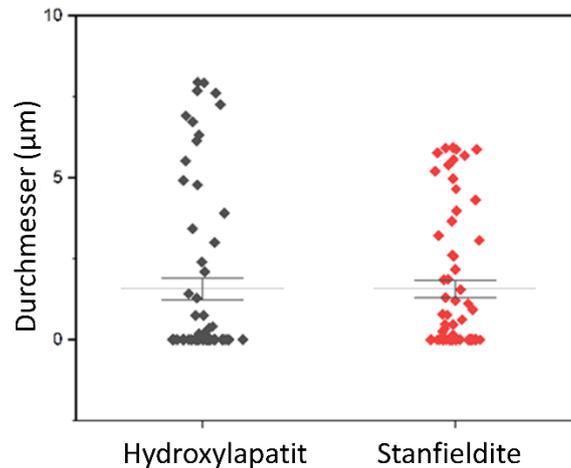


Abbildung 4: Gemessene Partikeldurchmesser. Die Hydroxylapatit-Partikel (links, schwarz) betragen im Schnitt 5,88 µm und die Stanfieldite-Partikel (rechts, rot) 3,23 µm.

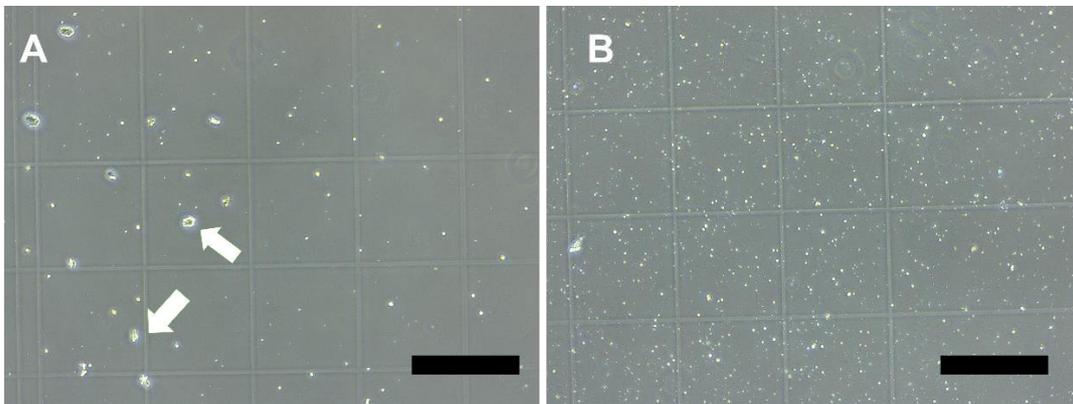


Abbildung 5: optische Mikroskop Bilder von Biokeramik-Partikel. Mit PBS verdünntes Pulver im Verhältnis 100:1 auf einer Neubauer-Zählkammer (A) Hydroxylapatit-Partikel weiße Pfeile: größere Partikel oder Partikelakkumulationen, (B) Stanfieldite-Partikel. Maßstabsbalken: 1000 µm.

4.1.2 Rasterelektronenmikroskop

Durch das Laser-Streulichtspektrometer wurde zuvor die genaue Partikelgröße der Pulver bestimmt. Um die Partikelmorphologie zu visualisieren, wurden Aufnahmen des Pulvers mittels eines Rasterelektronenmikroskops angefertigt. Dabei konnte man deutlich die Morphologie der verwendeten Pulver erkennen. Beim Hydroxylapatit Pulver (Abbildung 6, A) zeigten sich Verklumpungen, welche eine kugelförmige Gestalt aufwiesen. Zwischendrin waren viele unterschiedlich große Agglutinationen zu erkennen. Generell zeigte sich, deckend mit den lichtmikroskopischen Aufnahmen, ein eher inhomogenes Bild der Pulverstruktur. Das Stanfieldite Pulver (Abbildung 6, B) wies hingegen eine feinere, homogene Struktur auf und es zeigten sich keine großen Verklumpungen.

4 ERGEBNISSE

Alles in allem spiegelten sich die Ergebnisse der optischen Mikroskop Aufnahmen (Abbildung 5) der Pulver in den REM Bildern (Abbildung 6) wieder.

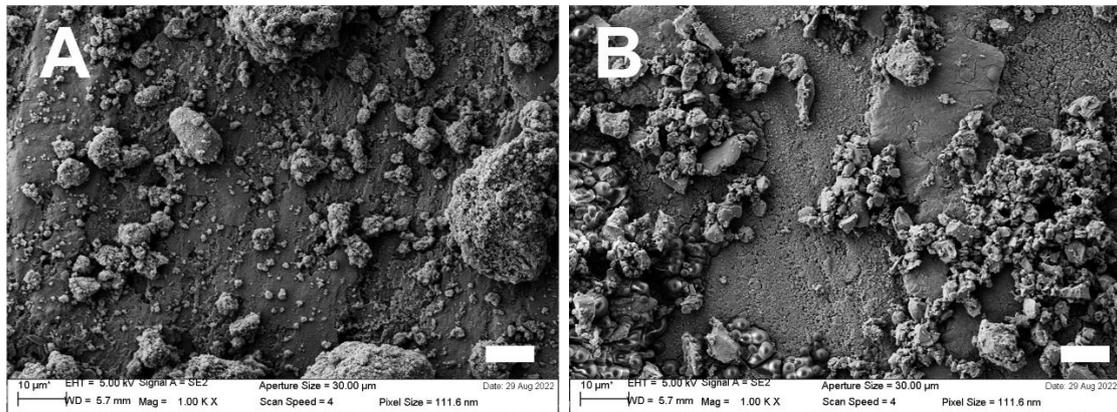


Abbildung 6: REM-Aufnahmen der Biokeramik-Partikel. 1000-Fache Vergrößerung der (A) Hydroxylapatit-Partikel und (B) Stanfieldite-Partikel. Maßstabsbalken: 10 µm.

4.1.3 Energiedispersive Röntgenspektroskopie

Für die Analyse der ionischen Zusammensetzung der beiden Pulver HA und SF wurden diese mittels EDX untersucht. Hierbei zeigten EDX-Aufnahmen die Verteilung von Magnesium (grün), Calcium (blau) und Phosphor (rot).

Auf der EDX-Aufnahme vom HA (Abbildung 7, A und B) ließen sich rote und blaue Signale erkennen, was auf ein Vorkommen der Elemente Phosphor und Calcium hinwies. Bei SF (Abbildung 7, C und D) zeigte sich vor allem ein grünes Signal, was auf ein hohes Vorkommen von Magnesium schließen ließ. Aber auch die Signale rot und blau ließen sich, wenn auch schwach, erkennen und deuteten somit auf ein zusätzliches Vorkommen von Calcium und Phosphor in diesem Pulver hin.

4 ERGEBNISSE

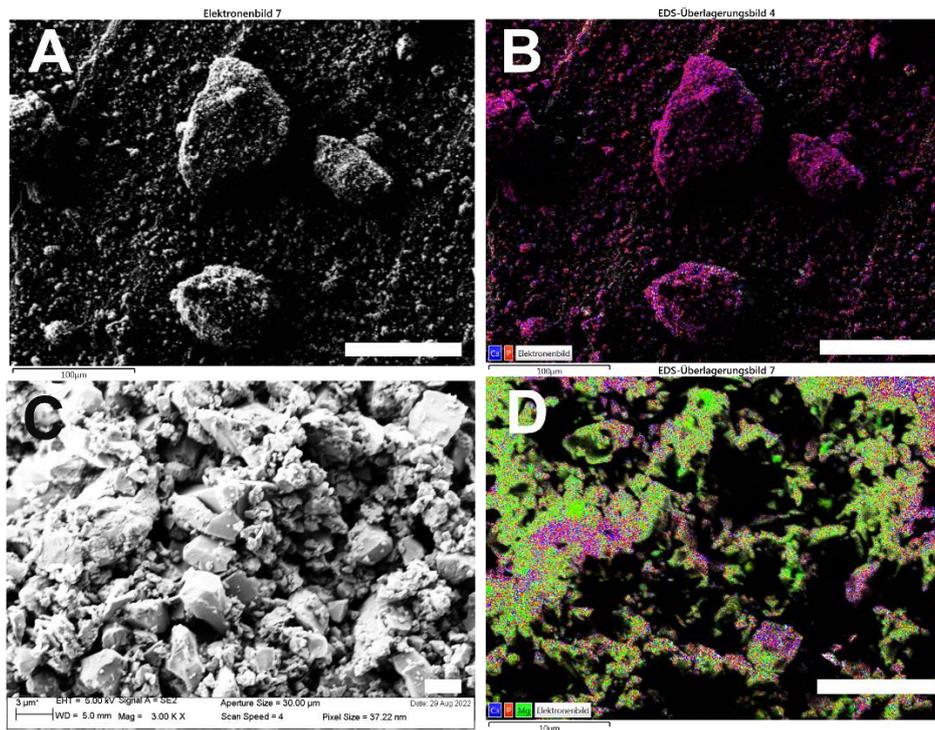


Abbildung 7: EDX-Aufnahmen der Biokeramik-Partikel. (A) Hydroxylapatit-Partikel, Maßstabsbalken: 100 µm. (B) Hydroxylapatit-Partikel, Calcium=blau, Phosphor=rot, Maßstabsbalken: 100 µm. (C) Stanfieldite-Partikel, Maßstabsbalken: 3 µm. (D) Stanfieldite-Partikel, Calcium=blau, Phosphor=rot, Magnesium=grün, Maßstabsbalken: 10 µm.

4.1.4 Röntgendiffraktometrie

Über die Messmethode des XRDs wurden das SF- und HA-Pulver analysiert und identifiziert. Für die quantitative Phasenzusammensetzung wurde in einem Winkelbereich von 5°-40° gemessen. Anschließend fand eine Auswertung der beiden Beugungsmuster (Abbildung 8) mittels der EVA Software (ICDD-Datenbank) statt, so dass nachvollzogen werden konnte, mit welchen Mineralien gearbeitet wurde.

Die Phasenzusammensetzung des SF (Abbildung 8, Diffraktogramm A) variierte, so setzte sich das SF-Pulver aus zwei Phasen zusammen, zum einen aus 96 % Stanfieldite (PDF-Nr. 00-011-0231) und zum anderen aus 4 % Whitlockit (PDF-Nr. 04-009-2106, blaue Pfeile). Das Diffraktogramm von Hydroxylapatit (Abbildung 8, Diffraktogramm B) stellte ein charakteristisches Diffraktogramm von phasenreinem, synthetischem Hydroxylapatit (PDF-Nr. 04-008-4759) dar. Somit konnte bewiesen werden, dass es sich bei den in der Arbeit verwendeten Pulver um HA und SF handelte.

4 ERGEBNISSE

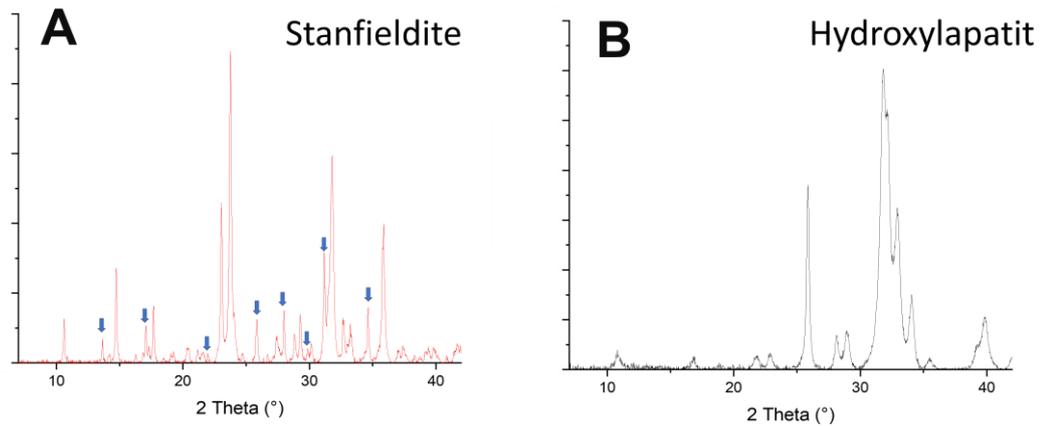


Abbildung 8: XRD der Biokeramik-Pulver. XRD mit Intensitäten über einem Winkelbereich von 5 bis 40°. (A) Phasenzusammensetzung aus Stanfieldite (alle Peaks außer blau markierte) und Whitlockit (blaue Pfeile), (B) Hydroxylapatit.

4.1.5 Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma

Die Freisetzung von Calcium-, Magnesium- und Phosphat-Ionen in die extrazelluläre Matrix könnten die Aktivität von osteogenen Signalwegen beeinflussen, was zu einer verstärkten Differenzierung von Mesenchymalzellen in Osteoblasten führen könnte^{84, 85}. Aus diesem Grund sollte mittels Massenspektrometrie (ICP-MS) untersucht werden, ob HA und SF über 21 Tage hinweg diese Stoffe sezernieren und ob dadurch ein positiver Einfluss auf die osteogene Differenzierung der Sphäroide genommen werden könnte. Es wurden ICP-Diagramme (Abbildung 9) angefertigt, welche die Ionen-Freisetzung der HA- und SF-Pulver über einen Zeitraum von 21 Tagen darstellten.

Das Diagramm A zeigt sowohl bei SF als auch bei HA einen gleichmäßigen Anstieg der Phosphor-Ionen über den Zeitraum von 21 Tagen. Auch Diagramm C wies einen gleichmäßigen Anstieg an Calcium-Ionen bei beiden Pulvern auf. Bei Diagramm B gab es bei HA kein Magnesiumsignal, hingegen gab es einen deutlichen Anstieg an Magnesium-Ionen bei SF. Somit konnte nachgewiesen werden, dass HA Calcium- und Phosphat-Ionen und SF Calcium-, Phosphat- und Magnesium-Ionen konstant über 21 Tage hinweg freigaben.

4 ERGEBNISSE

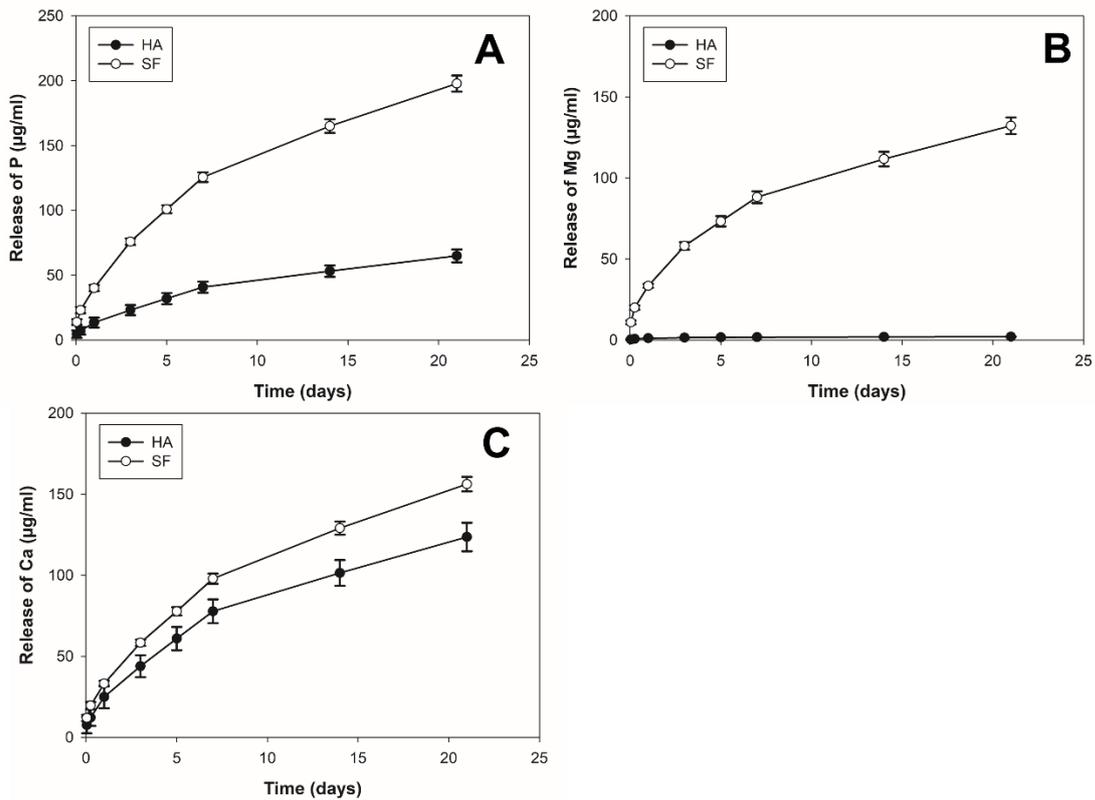


Abbildung 9: ICP-Diagramm der Biokeramik-Partikel. Die Diagramme zeigen die Ionen-Freisetzung der Stanfieldite- und Hydroxylapatit-Pulver über einen Zeitraum von 21 Tagen an, dabei stellt die untere Kurve Hydroxylapatit dar und die obere Kurve steht für Stanfieldite. Ionen-Freisetzung: (A) Phosphor (B) Magnesium (C) Calcium.

4.2 Teil II: Vorversuche der adipöse mesenchymale Stammzellsphäroide

4.2.1 Sphäroide mit variabler Zellzahl

Um in einem ersten Schritt die optimale Zellzahl für die Sphäroidherstellung und -bildung zu ermitteln, wurden die Sphäroide zunächst mit variablen Zellzahlen hergestellt und mit Hilfe von lichtmikroskopischen Bildern analysiert.

Zur Beurteilung wurde dabei auf folgende Eigenschaften eingegangen: Größe, Form (gleichmäßig rund / oval / unförmig), Dichte (kompakt / viele Lufteinschlüsse), Kontur (verschwommen / klar und deutlich).

Die Aufnahmen von Abbildung 10 wurden mit einem optischen Mikroskop bei 4-Facher Vergrößerung angefertigt. Sie zeigen die Sphäroid Formatierung nach einem Tag.

Es ließ sich ein deutlicher Größenunterschied zwischen den Sphäroiden der einzelnen Gruppen erkennen. Bei zunehmender Zellzahl nahm zum einen der Sphäroid Durchmesser zu und zum anderen wiesen die Sphäroide eine kompaktere Struktur auf.

4 ERGEBNISSE

Hierbei zeigten sich nach 24 h bei den Gruppen mit 3000 (Abbildung 10, E) und 6000 (Abbildung 10, F) Zellen gleichmäßig runde, kompakte Strukturen mit einem glatten Rand. Bei den Gruppen mit 100 (Abbildung 10, A), 300 (Abbildung 10, B), 500 (Abbildung 10, C) und 1000 (Abbildung 10, D) Zellen zeigten die Sphäroide keine kompakte Struktur und ihre Kontur war nicht gleichmäßig glatt, sodass man annehmen konnte, dass sich keine Sphäroide, sondern Aggregate aus einzelnen Zellen gebildet hatten.

Da die Sphäroide mit einer Zellzahl von 3000 und 6000 Zellen stabile und runde Sphäroide gebildet hatten, wurden diese an Tag 2 genauer untersucht. Hierfür wurde von den Sphäroiden der Gruppen E und F optische Mikroskop Aufnahmen bei 10-Facher Vergrößerung zuerst in den Wells gemacht. Anschließend wurden die Sphäroide in Petrischalen transferiert und erneut fotografiert (Abbildung 11). Es ließen sich bei beiden Gruppen kompakte Sphäroide erkennen. Die Gruppe E mit den 3000 Zellen (Abbildung 11 A, B) bildete stabile, kompakte, runde Sphäroide mit nur wenigen losen Zellen in der Peripherie. Die Sphäroide der Gruppe F mit 6000 Zellen (Abbildung 11 C, D) hingegen wiesen eine ovale Struktur auf mit vielen freien Zellen in der Peripherie. Da alles in allem sich bei Gruppe E die meisten runden Sphäroide gebildet hatten mit wenig freien Zellen in der Umgebung, wurde für die weiteren Experimente mit dieser Gruppe weitergearbeitet.

Auch kam es vor, dass sich die ASCs nach 24 Stunden nicht zu Sphäroiden formatierten (Abbildung 12, A). Dabei war zu beobachten, dass sehr viele freie Zellen zirkulär des Sphäroids waren und weder eine klare Kontur noch eine kompakte Struktur zu erkennen war. Auch Aufnahmen der Sphäroide an Tag 9 (Abbildung 12, B) ließen bezüglich der Formation keine Unterschiede erkennen. So ließ sich belegen, dass, wenn sich innerhalb von einem Tag keine Sphäroide ausbilden, dies über die 24 Stunden hinaus auch nicht mehr passieren wird.

4 ERGEBNISSE

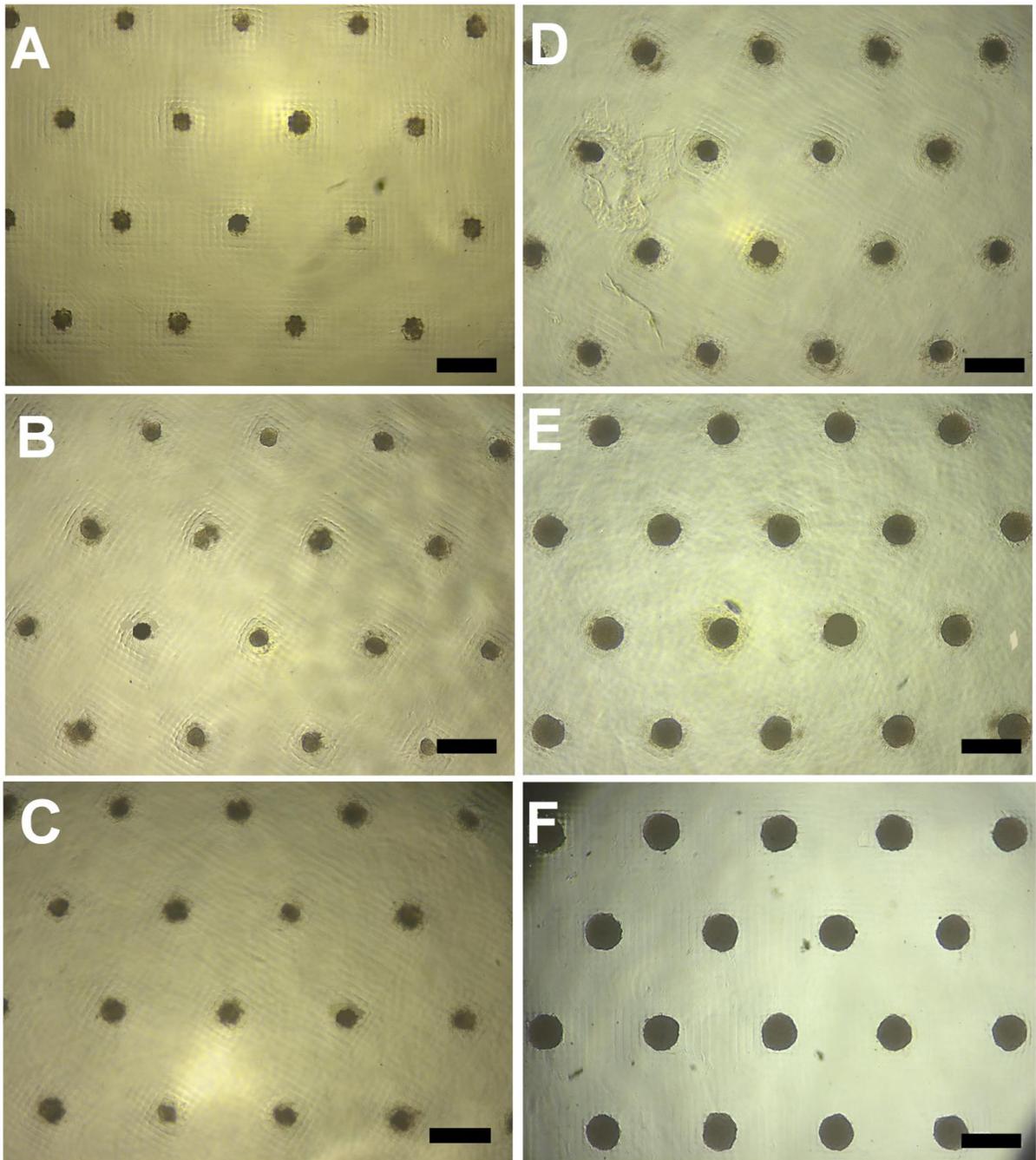


Abbildung 10: ASC-Sphäroide mit variabler Zellzahl. Optische Mikroskop Aufnahmen der ASC-Sphäroide an Tag 1. Sphäroide bestehend aus (A) 100 (B) 300 (C) 500 (D) 1000 (E) 3000 (F) 6000 ASCs. Maßstabsbalken: 100 μm .

4 ERGEBNISSE

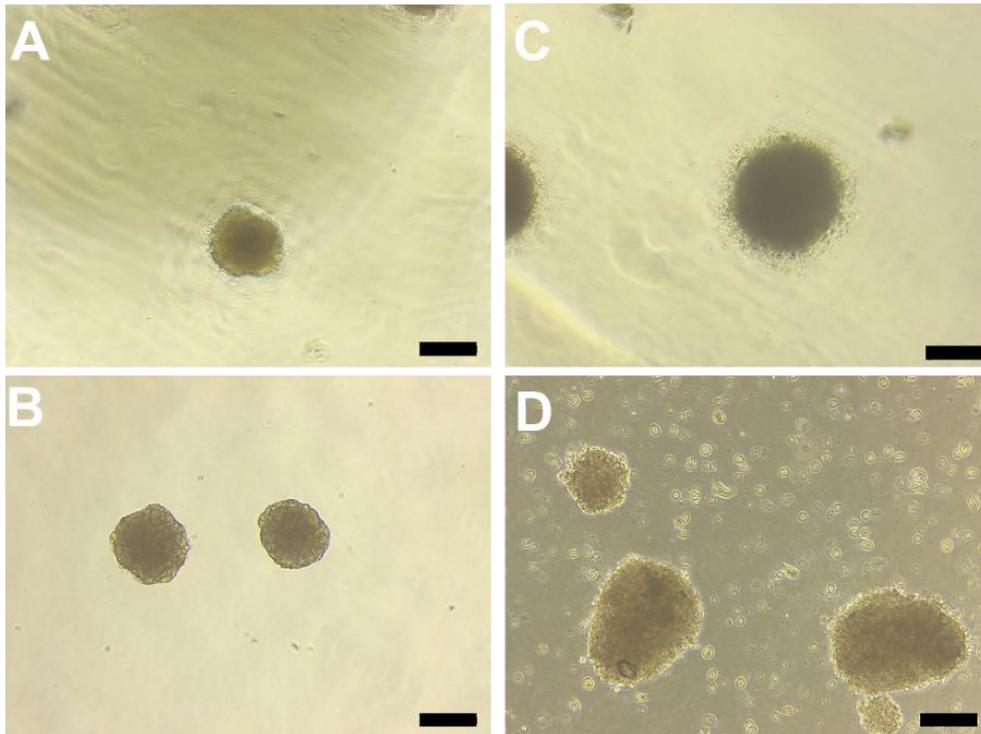


Abbildung 11: Sphäroide mit einer Zellzahl: 3000 und 6000. Optische Mikroskop Aufnahmen mit 10-Facher Vergrößerung der Sphäroide an Tag 2. (A) eines Sphäroids mit 3000 Zellen und (C) 6000 Zellen. Freischwimmende Sphäroide in Petrischale: (B) Sphäroide mit 3000 Zellen und (D) 6000 Zellen. Maßstabsbalken: (A), (C) 500 μm , (B), (D) 100 μm .

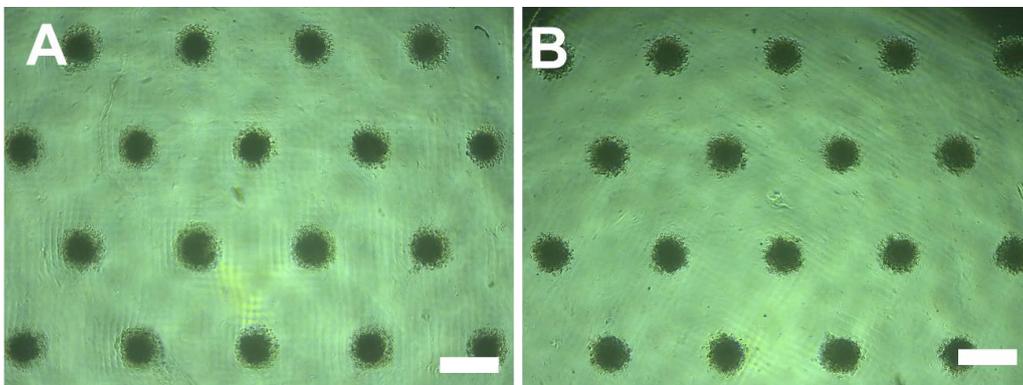


Abbildung 12: Fehlgeschlagene Sphäroidbildung. Optische Mikroskop Aufnahmen der Sphäroide mit 3000 Zellen: (A) Tag 1 und (B) Tag 9. Die nicht erfolgreiche Sphäroidbildung an Tag 1 und Tag 9 lässt sich darauf zurückführen, dass die Sphäroide keine klare, runde Kontur aufweisen und zahlreiche einzelne Zellen in der Peripherie erkennbar sind. Maßstabsbalken: 500 μm .

4.2.2 Sphäroide mit variablen Partikelanteilen

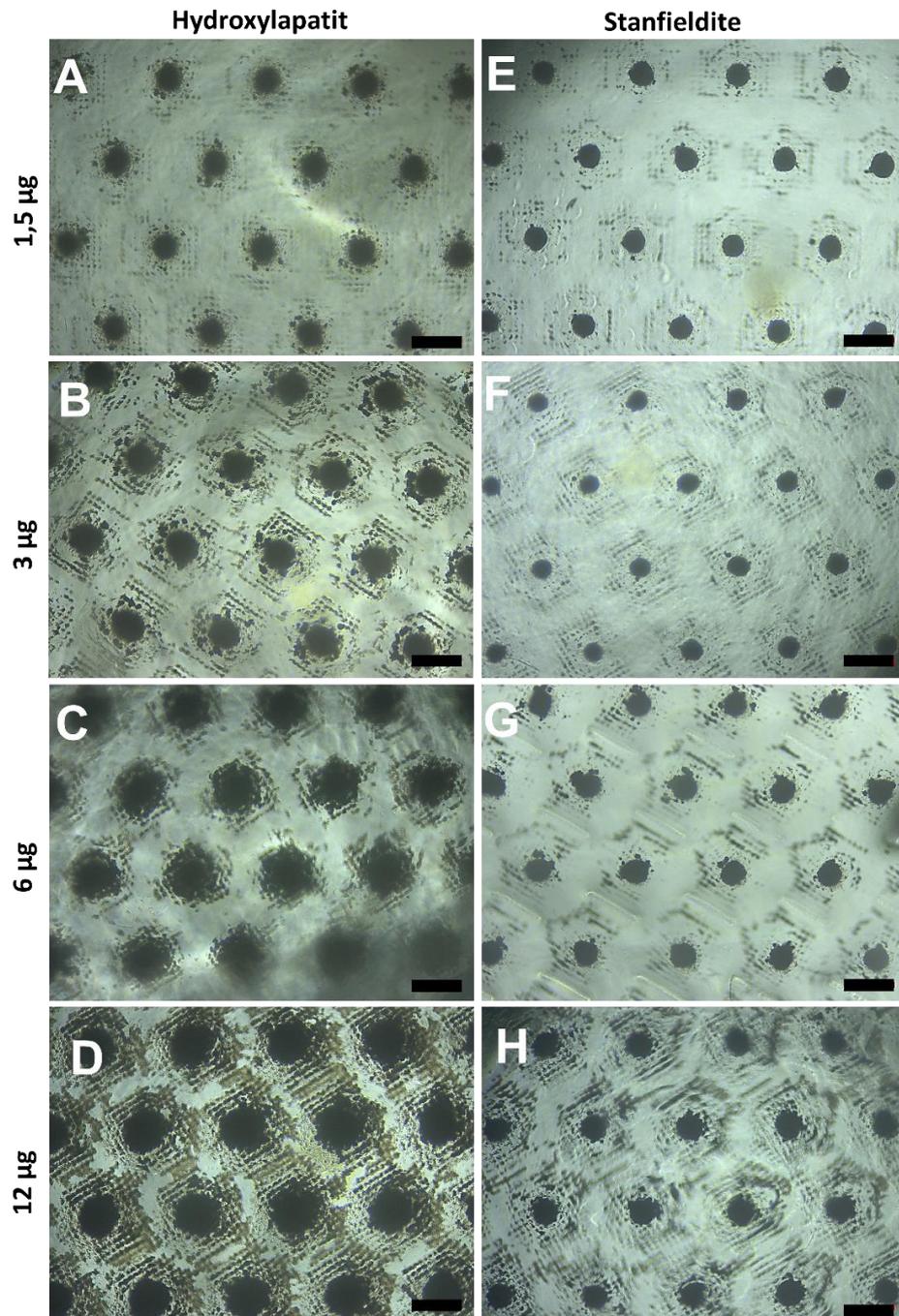


Abbildung 13: Sphäroide mit variablen Biokeramik-Partikelanteilen. Optische Mikroskop Aufnahmen der Sphäroide an Tag 1. Sphäroide mit 3000 Zellen und einem Biokeramik-Partikelanteil von: (A) Hydroxylapatit 1,5 µg, (B) Hydroxylapatit 3 µg, (C) Hydroxylapatit 6 µg, (D) Hydroxylapatit 12 µg, (E) Stanfieldite 1,5 µg, (F) Stanfieldite 3 µg, (G) Stanfieldite 6 µg, (H) Stanfieldite 12 µg. Maßstabsbalken: 100 µm.

Nachdem für die weiteren Experimente die geeignete Zellzahl der Sphäroide festgelegt wurde, wurde getestet, ob sich Sphäroide mit einem variablen Anteil an Biokeramik-Partikeln herstellen lassen. Dafür musste zunächst der Pulverpartikelanteil in µg pro

4 ERGEBNISSE

Sphäroid festgestellt werden. Ziel war es hier, einen möglichst hohen Anteil an Biokeramik-Partikel pro Sphäroid zu erhalten, damit sich bei den weiteren Experimenten ein möglichst großer Effekt bei der osteogenen Differenzierung nachweisen ließ. Dafür wurden den Sphäroiden mit einer Zellzahl von 3000 aus der HA- und SF-Gruppe jeweils ein Partikelanteil von 1,5 µg, 3 µg, 6 µg, 12 µg hinzugefügt und nach 24 h optische Mikroskop Aufnahmen erstellt.

Abbildung 13 zeigt die Sphäroide mit den variablen Biokeramik-Partikelanteilen. Sowohl bei der HA- als auch bei der SF-Gruppe ließen sich bei den Biokeramik-Partikelanteilen von 1,5 µg (Abbildung 13, A, E) und 3 µg (Abbildung 13, B, F) weniger freie Partikel in der Peripherie erkennen. Hingegen waren bei den Gruppen mit 6 µg (Abbildung 13, C, G) und 12 µg (Abbildung 13, D, H) viele freie Partikel in der Peripherie zu sehen.

Da der Anteil an freien Biokeramik-Partikeln bei den Gruppen D und H (12 µg) zu hoch war, wurde auf weitere Experimente mit diesen beiden Gruppen verzichtet.

Um sich nun endgültig auf einen Partikelanteil festlegen zu können, wurden Sphäroide mit einem Biokeramik-Partikelanteil von 1,5 µg, 3 µg und 6 µg hergestellt und nach 24 h von diesen lebend-tot Aufnahmen erstellt.

Abbildung 14 zeigt alle Sphäroide mit variablen Biokeramik-Partikelanteilen und zusätzlich die Kontrollgruppe ohne Biokeramik-Partikelanteil. Die lebend-tot Aufnahmen geben Aufschluss über die Vitalität und Morphologie der Sphäroide.

Dabei wiesen alle Gruppen (Abbildung 14, A-G) eine durchweg hohe Vitalität auf. Es zeigten sich bei keiner Gruppe tote Zellen. Zwischen den Sphäroiden aller Gruppen ließen sich deutliche Größenunterschiede feststellen. So waren die Sphäroide der Kontrollgruppe A im Schnitt wesentlich kleiner als die Sphäroide mit Biokeramik-Partikelanteilen. Auch zwischen den Sphäroiden der HA- und der SF-Gruppen waren deutliche Unterschiede bezüglich der Größe zu erkennen, so wiesen die Sphäroide der HA-Gruppe (Abbildung 14, B, C, D) einen größeren Durchmesser auf. Vom Gesamtbild waren die Sphäroide der HA-Gruppe unterschiedlich groß und teils unförmig, da insbesondere Gruppe D eine ovale Form der Sphäroide aufwies. Hingegen erschienen die Sphäroide der SF-Gruppe homogen, da alle Gruppen (Abbildung 14, E, F, G) eine gleichgroße, runde Form aufwiesen.

Letztendlich setzte sich die Gruppe mit 3 µg durch, da sich hier die meisten runden und gleichförmigen Sphäroide nachweisen ließen.

4 ERGEBNISSE

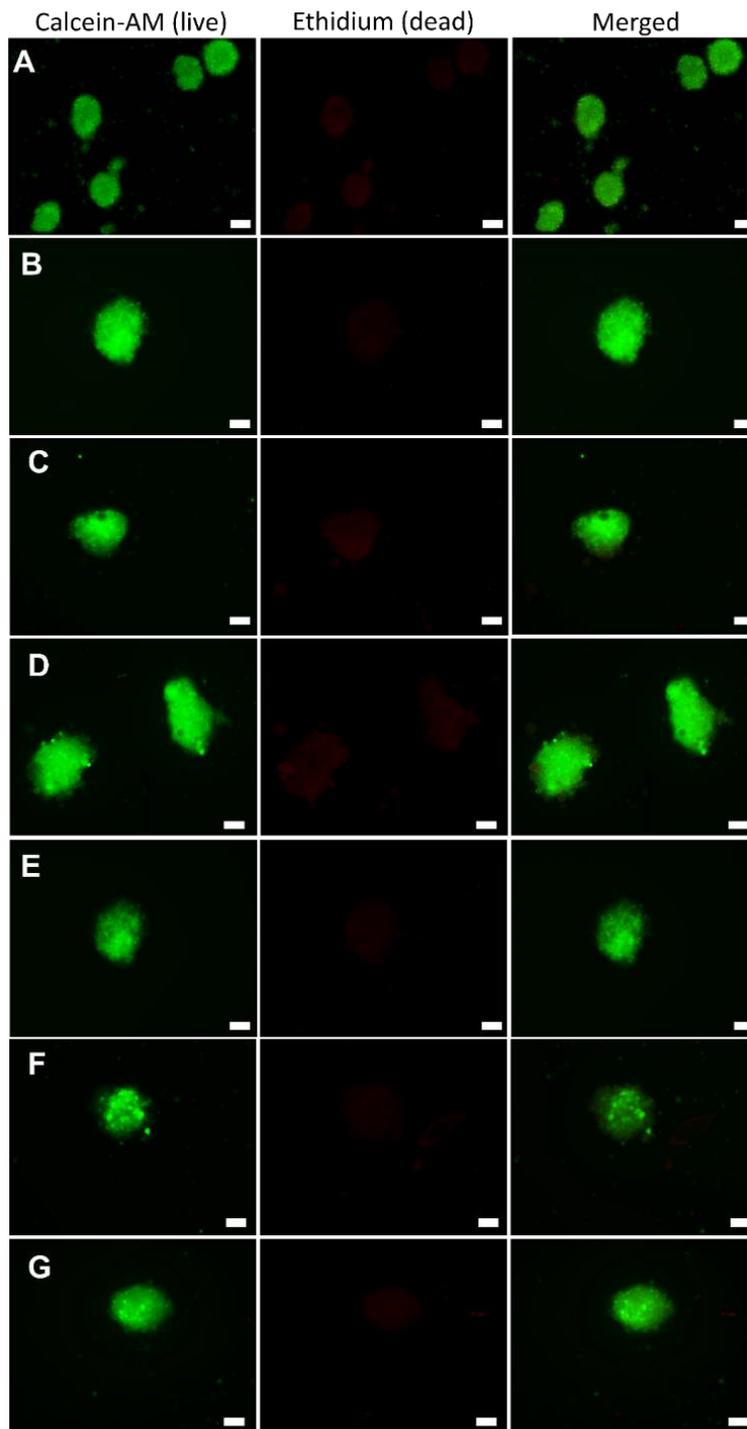


Abbildung 14: Lebend-tot Aufnahmen der ASC-Sphäroide mit variablen Biokeramik-Partikelanteilen. Fluoreszenzbilder der ASC-Sphäroide mit einer Zellanzahl von 3000 an Tag 1. Lebende Zellen wurden mit Calcein-AM grün angefärbt und tote Zellen mit Ethidium rot. (A) Kontrollgruppe ohne Biokeramik-Partikel (B) Hydroxylapatit 1,5 µg (C) Hydroxylapatit 3 µg (D) Hydroxylapatit 6 µg (E) Stanfieldite 1,5 µg (F) Stanfieldite 3 µg (G) Stanfieldite 6 µg. Maßstabsbalken: 100 µm.

4.2.3 Histologische Färbungen

Um die Morphologie darzustellen und einen Nachweis über mögliche osteogene Differenzierung in den Sphäroiden zu erlangen, wurden diese nach 24 h mit und ohne variablen Biokeramik-Partikelanteilen histologische Färbungen angefertigt.

4.2.3.1 Hämatoxylin & Eosin Aufnahmen

Um eine grobe Übersicht des Sphäroidaufbaus der unterschiedlichen Gruppen zu erhalten, wurde eine schnelle Übersichtsfärbung mittels Hämatoxylin & Eosin (H&E) durchgeführt (Abbildung 15). Dabei stellten sich die Biokeramik-Partikel in der Färbung dunkelblau dar.

Sowohl die HA- als auch die SF-Gruppe zeigten eine stärkere dunkelblaue Färbung, je höher der Partikelanteil war (Abbildung 15, weiße Pfeile). Dies wiederum ließ auf eine höhere Anwesenheit von Biokeramik-Partikelanteilen schließen. Obwohl es aufgrund der Unsicherheit darüber, an welcher Stelle der Sphäroid angeschnitten wurde, schwierig war, genaue Aussagen über den Sphäroiddurchmesser bei den histologischen Schnitten zu treffen, war dennoch auffällig, dass die Sphäroide der Kontrollgruppe (Abbildung 15, H) im Vergleich zu den Sphäroiden mit Biokeramik-Partikelanteil einen wesentlich geringeren Durchmesser zeigten.

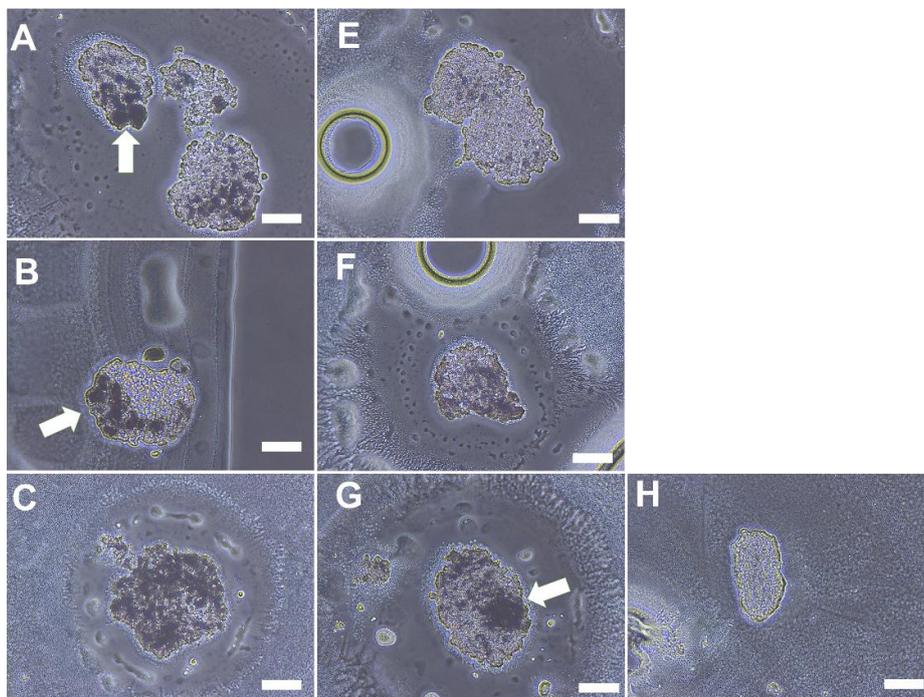


Abbildung 15: Hämatoxylin & Eosin Aufnahmen der ASC-Sphäroide. (A) Hydroxylapatit 1,5 µg (B) Hydroxylapatit 3 µg (C) Hydroxylapatit 6 µg (D) Stanfieldite 1,5 µg (E) Stanfieldite 3 µg (F) Stanfieldite 6 µg (H) Kontrollgruppe ohne Biokeramik-Partikel. Weiße Pfeile: dunkelblaue Färbungen. Maßstabsbalken: 50 µm.

4.2.3.2 Alizarin Aufnahmen

Durch die Alizarin Färbung sollte nachgewiesen werden, inwiefern sich die Partikel in dem Sphäroid integriert haben und ob eine osteogene Differenzierung zu erkennen war. Im Gegenteil zur H & E Färbung waren bei der Alizarin Färbung (Abbildung 16) keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Größe und Färbung der Sphäroide der Gruppen A-F zu erkennen. Die Sphäroide mit geringem Partikelanteil zeigten den gleichen Anteil an rotgefärbten Alizarin-Rot-Komplexen auf, wie die Sphäroide mit hohem Partikelanteil. Somit konnte keine klare Aussage über den Erfolg der osteogenen Differenzierung bei dieser Färbemethode getroffen werden.

Da es nur wenige Kryoschnitte der Kontrollgruppe gab, konnten keine Färbungen von dieser Gruppe angefertigt werden.

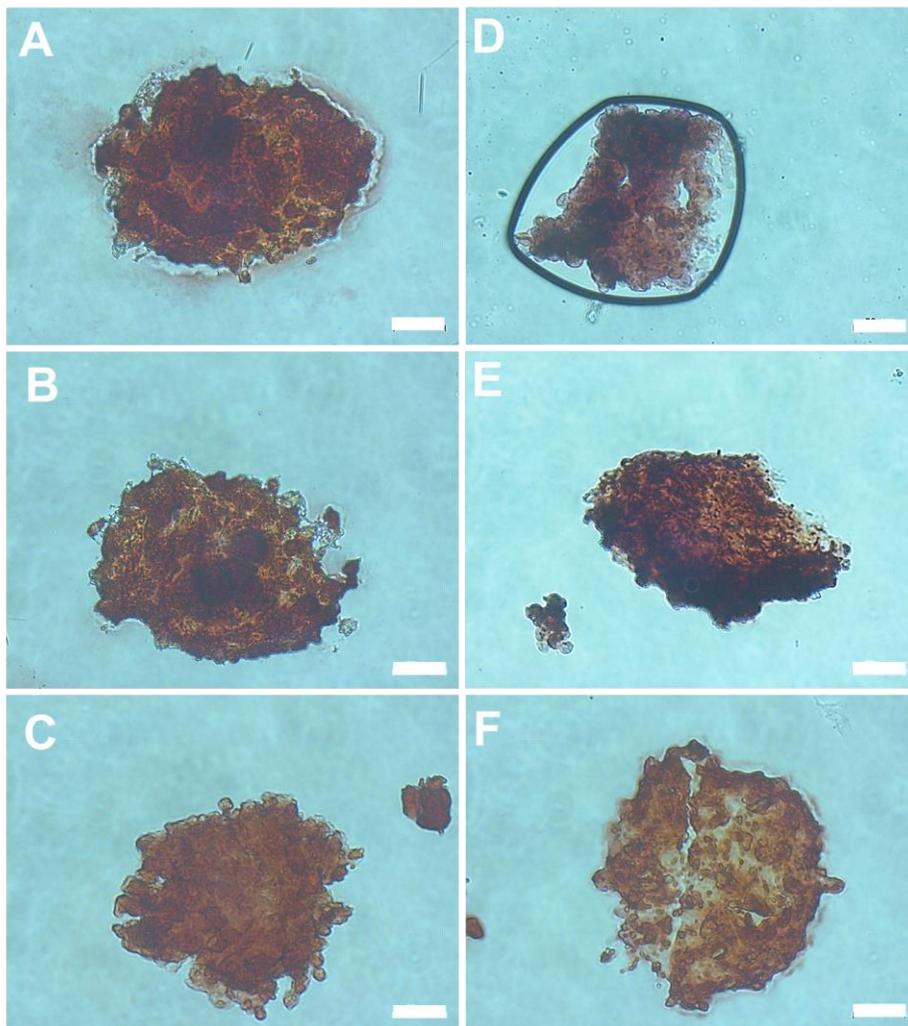


Abbildung 16: Alizarin Aufnahmen der ASC-Sphäroide. (A) Hydroxylapatit 1,5 µg, (B) Hydroxylapatit 3 µg (C) Hydroxylapatit 6 µg (D) Stanfieldite 1,5 µg (E) Stanfieldite 3 µg (F) Stanfieldite 6 µg. Alle Maßstäbe 50 µm.

4.2.3.3 Von Kossa Aufnahmen

Durch die Von Kossa Färbung sollte, wie auch schon bei der Alizarin Färbung zuvor, der Einbau der Biokeramik-Partikel und die Osteogenese erkennbar gemacht werden. Bei der Von Kossa Färbung (Abbildung 17) waren bei den Sphäroiden der HA-Gruppe (A-C) deutlich schwarz gefärbte Silbernitratkristalle zu erkennen (Abbildung 17, weiße Pfeile). Insbesondere bei der Gruppe C mit 6 μg war die Schwarzfärbung wesentlich ausgeprägter im Vergleich zu den Gruppen A und B, die einen niedrigeren Anteil an HA hatten. Bei den Sphäroiden der SF-Gruppe (D-F) zeigten sich ähnliche Anteile an schwarz gefärbtem Silbernitrat und damit keine wesentlichen Unterschiede.

Wie bereits in Kapitel 4.2.3.2 erwähnt, konnten auf Grund von zu wenigen Kryoschnitten der Kontrollgruppe keine Färbungen von dieser Gruppe angefertigt werden.

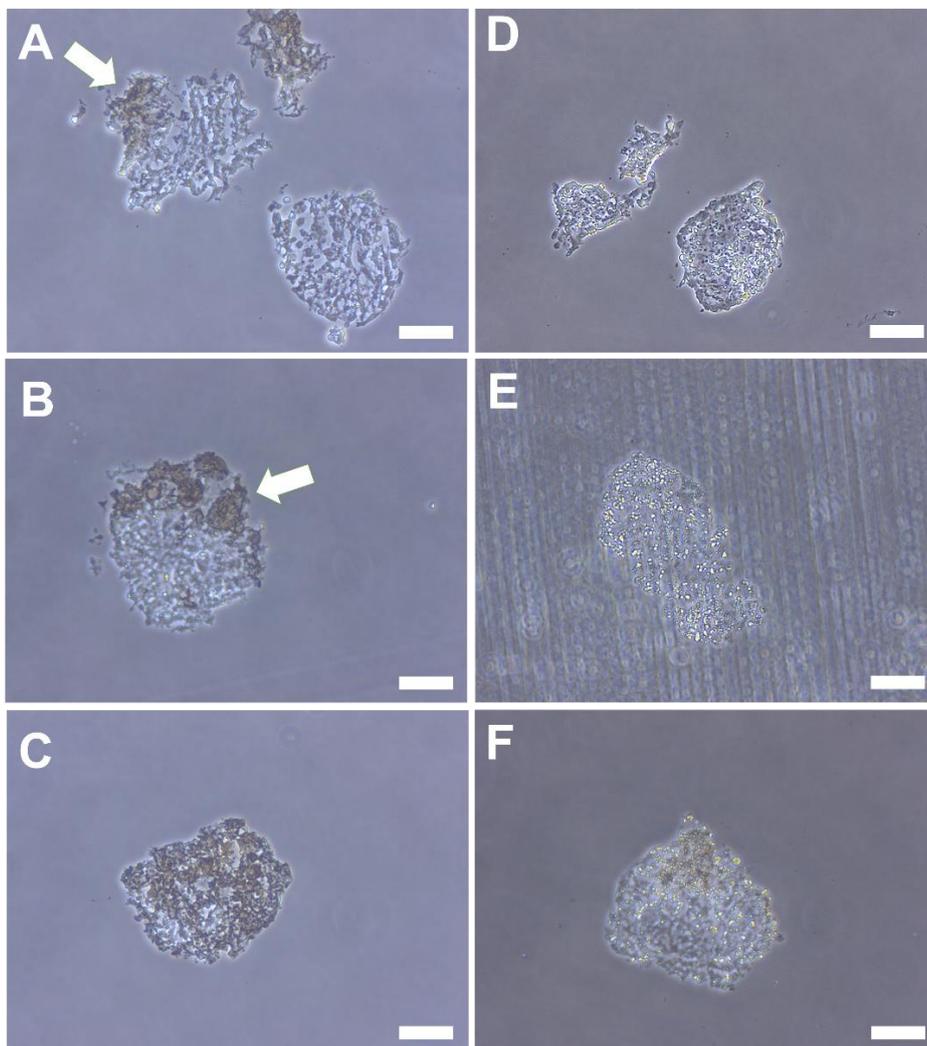


Abbildung 17: Von Kossa Färbung der ASC-Sphäroide. (A) Hydroxylapatit 1,5 μg (B) Hydroxylapatit 3 μg (C) Hydroxylapatit 6 μg (D) Stanfieldite 1,5 μg (E) Stanfieldite 3 μg mit Luftporen (F) Stanfieldite 6 μg . weiße Pfeile: schwarz gefärbte Silbernitratkristalle. Maßstabsbalken: 50 μm .

4.3 Teil III: Hauptversuche der adipöse mesenchymale Stammzellsphäroide

4.3.1 Durchmesser der Sphäroide

An den Tagen 1, 7, 14, 21 wurden optische Mikroskop Aufnahmen der Sphäroide gemacht (Abbildung 18), und der durchschnittliche Sphäroiddurchmesser analysiert (Abbildung 19). In Abbildung 18 lässt sich sowohl bei der Kontrollgruppe (Abbildung 18, A-D) als auch bei der SF-Gruppe (Abbildung 18, I-L) eine deutliche Abnahme der Sphäroiddurchmesser über die 21 Tage erkennen. Zudem wiesen die Sphäroide dieser beiden Gruppen eine runde, kompakte Struktur mit einer scharfen Kontur auf. Die Größe der HA-Sphäroide (Abbildung 18, E-H) hingegen wiesen über die 21 Tage keine wesentliche Änderung in ihrem Durchmesser auf. Außerdem erschienen ihre Konturen unscharf begrenzt und ihre Struktur nicht kompakt.

Abbildung 19 zeigt die Durchmesseränderung der Sphäroide der drei Gruppen über einen Zeitraum von 21 Tagen. Die Sphäroide der SF- und Kontrollgruppe zeigten hierbei eine deutliche Abnahme im Durchmesser. Bei der Kontrollgruppe schrumpften die Sphäroide von anfänglichen $255 \pm 14 \mu\text{m}$ auf $170 \pm 17 \mu\text{m}$ an Tag 21, sodass sich eine Durchmesserreduktion von ca. $85 \mu\text{m}$ bzw. ca. 33 % ergab. Bei der SF-Gruppe betrug der Sphäroiddurchmesser an Tag 1 noch $275 \pm 19 \mu\text{m}$ und $200 \pm 24 \mu\text{m}$ an Tag 21, das ergab eine Reduktion von ca. 27 %. Dagegen ließen sich keine messbaren Veränderungen im Durchmesser bei der HA-Gruppe erkennen. Alles in allem waren die Ergebnisse aus den optischen Mikroskop Aufnahmen (Abbildung 18) und aus dem Diagramm (Abbildung 19) bei der Kontrollgruppe und der SF-Gruppe bzgl. ihrer Durchmesserreduktion identisch. Bei der HA-Gruppe war keinerlei Veränderung bzgl. des Durchmessers erkennbar.

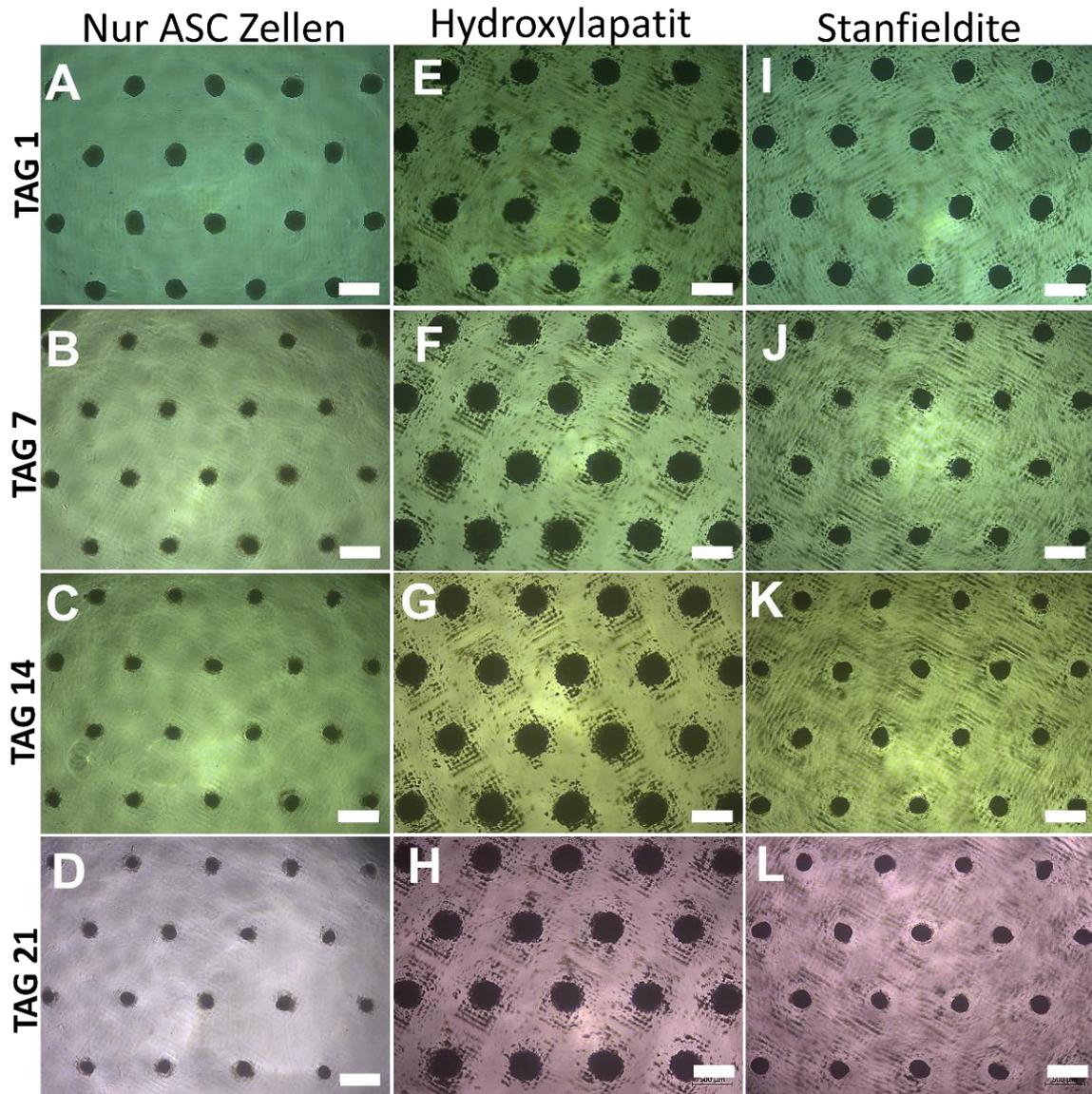


Abbildung 18: ASC-Sphäroid Aufnahmen über einen Zeitraum von 21 Tagen. ASC-Sphäroide der Kontrollgruppe: (A) Tag 1 (B) Tag 7 (C) Tag 14 (D) Tag 21, Sphäroide mit Hydroxylapatit: (E) Tag 1 (F) Tag 7 (G) Tag 14 (H) Tag 21, Sphäroide mit Stanfieldite: (I) Tag 1 (J) Tag 7 (K) Tag 14 (L) Tag 21. Maßstabsbalken: 500 µm.

4 ERGEBNISSE

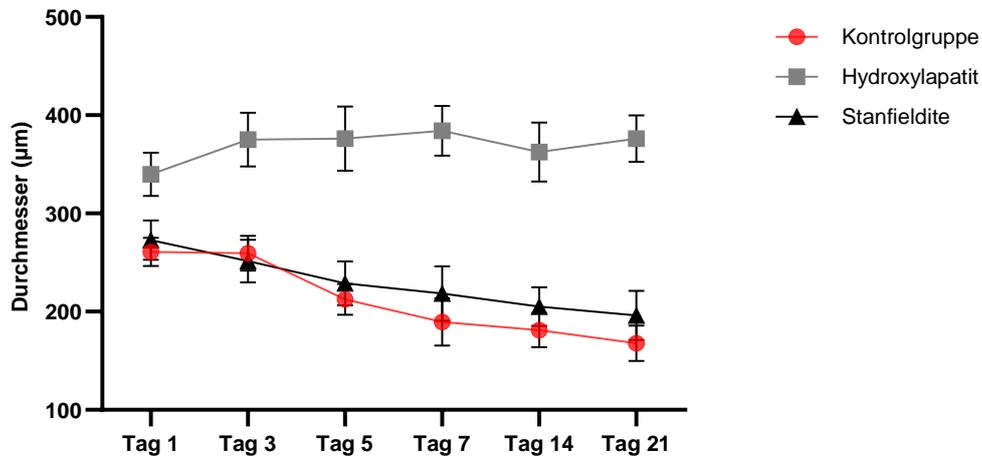


Abbildung 19: Diagramm der ASC-Sphäroid Durchmesser. Das Diagramm zeigt die Durchmesseränderung der ASC-Sphäroide über einen Zeitraum von 21 Tagen. Dabei stellt der rote Balken die Kontrollgruppe, der graue Hydroxylapatit und der schwarze Stanfieldite dar. n=1.

4.3.2 Analyse der metabolischen Aktivität

Die Messung mittels des WST-8-Kits sollte Aufschluss über die Höhe der metabolischen Aktivität der Sphäroide geben.

Die Diagramme A (Kontrollgruppe), B (HA) und C (SF) zeigen die metabolische Aktivität der Gruppe über einen Zeitraum von 21 Tagen (Abbildung 20). Dabei ließen sich weder innerhalb einer Gruppe noch beim Vergleich der drei Gruppen zueinander signifikante Gleichmäßigkeiten bezüglich der metabolischen Aktivität feststellen. Bei Diagramm A sinkt die metabolische Aktivität an den Tagen 3, 5 und 7 im Vergleich zu Tag 1. Zusätzlich war die metabolische Aktivität an Tag 14 auffällig niedrig und an Tag 21 auffällig hoch. Bei Diagramm B sind die Werte der metabolischen Aktivität an den Tagen 3, 5, 7, 14 besonders niedrig im Vergleich zu Tag 1. An Tag 21 hingegen zeigt sich eine besonders hohe Aktivität. Bei Diagramm C lassen sich an den Tagen 3, 5, 7, 14 im Vergleich zu Tag 1 eine niedrige Aktivität feststellen. An Tag 21 zeigt sich eine besonders hohe Aktivität. Schlussendlich ließen sich keine Gleichmäßigkeit der metabolischen Aktivität innerhalb der 21 Tage erkennen, weder innerhalb einer Gruppe noch beim Vergleich der drei Gruppe miteinander. Dennoch zeigten alle Gruppen eine leichte bis hohe metabolische Aktivität über die 21 Tage hinweg.

4 ERGEBNISSE

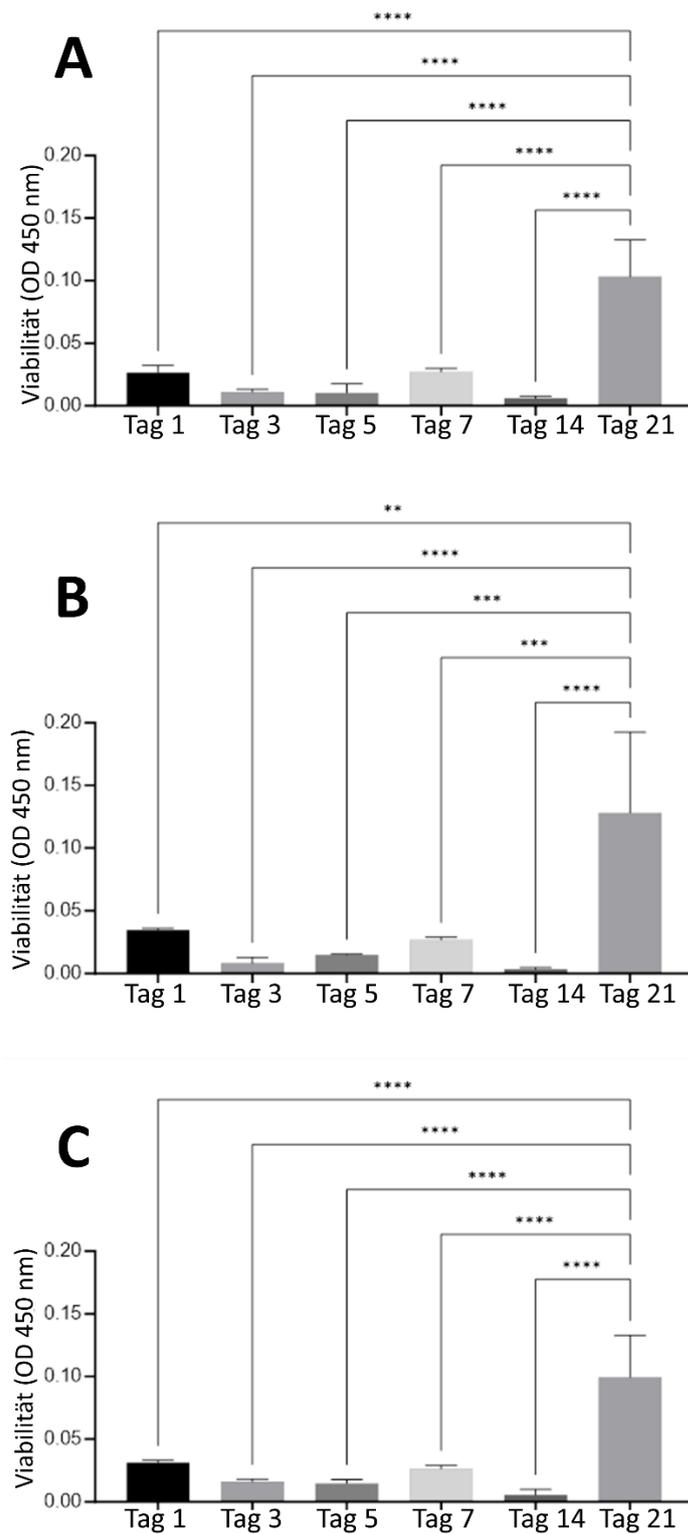


Abbildung 20: Diagramm der metabolischen Aktivität der ASC-Sphäroide. Die metabolische Aktivität der ASC-Sphäroide aller drei Gruppen: (A) Kontrollgruppe (B) Hydroxylapatit und (C) Stanfieldite wird mit dem WST-8 an den Tagen 1, 3, 5, 7, 14, 21 analysiert (bei einer Absorption von 450 nm). Die Standardabweichung wird mittels Excel berechnet. $n=1$, **** = $p < 0,0001$, *** = $p < 0,001$, ** = $p < 0,01$, * = $0,05$.

4.3.3 Lebend-tot Analyse der adipösen mesenchymalen Stammzellsphäroide

Die lebend-tot Analyse der Sphäroide gab Aufschluss über die Vitalität und Morphologie der Sphäroide der drei verschiedenen Gruppen: Kontrollgruppe, HA und SF. Dabei erschienen abgestorbene Zellen rot und lebende Zellen grün.

Abbildung 21 zeigt lebend-tot Aufnahmen von Sphäroiden der Kontrollgruppe. An den Tagen 1 und 7 gab es ein sehr stark ausgeprägtes grünes Signal, welches eine hohe Vitalität der Zellen nachwies. An Tag 1 zeigte sich kein rotes Signal, somit gab es eine nahezu vollständige Vitalität. An Tag 7 zeigte sich ein nur leicht rotes Signal mit nur sehr wenigen roten Zellen in der Peripherie. Das grüne Signal der Tage 14 und 21 war im Vergleich zu den Tagen 1 und 7 etwas schwächer, sodass die Vitalität der Zellen gesunken war. An Tag 14 mehr tote Zellen sowohl in der Peripherie, als auch im Sphäroidzentrum. Das rote Signal an Tag 21 war ähnlich wie an Tag 14, so gab es einige tote Zellen sowohl im Zentrum als auch in der Peripherie. Alles in allem erschienen die Sphäroide in ihrer Form homogen und rund bis leicht oval.

Abbildung 22 zeigt die lebend-tot Aufnahmen der Sphäroide der HA-Gruppe. An Tag 1 waren ausschließlich vitale Zellen. Darüber hinaus ließen sich auf den Bildern sehr deutlich größere HA-Partikel erkennen. An Tag 7 konnte man nur noch inhomogene Aggregate erkennen, die in ihrer Größe unterschiedlich waren. Zudem gab es nur noch wenig lebende Zellen und multiple toten Zellen. An den Tagen 14 und 21 ließ sich nur noch ein sehr schwach grünes Signal erkennen und kaum ein rotes Signal. Ferner waren die Sphäroide bzw. Aggregate vollständig zerfallen und es waren nur noch vereinzelt Zellen zu erkennen.

Abbildung 23 zeigt die Sphäroide mit SF-Partikeln, diese waren über 21 Tage hinweg vital. Die Anzahl der toten Zellen nahm stetig bis zum 21. Tag zu. Dabei waren an Tag 21 im ganzen Sphäroid (Zentrum und Peripherie) viele tote Zellen zu erkennen. Alles in allem war die Morphologie der Sphäroide, wie bei der Kontrollgruppe auch, homogen und rund bis leicht oval. Und auch bei der SF-Gruppe war eine deutliche Durchmesserreduktion der Sphäroide nach 21 Tagen deutlich sichtbar.

Zusammengefasst ließen sich sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der SF-Gruppe gleichmäßig runde Sphäroide nachweisen, die auch noch nach 21 Tagen eine relativ hohe Vitalität und Formstabilität aufwiesen, bei gleichzeitiger Reduktion ihres Durchmessers nach 21 Tagen. Hingegen konnten in der HA-Gruppe über den Tag 1 hinaus keine Sphäroide nachgewiesen werden.

4 ERGEBNISSE

Da die Bildung von Sphäroiden der HA-Gruppe mit der Pulverpartikelgröße 5,88 µm zuvor scheiterte, sollte ausgeschlossen werden, dass die Ursache des Scheiterns in der Partikelgröße lag. Deshalb wurden erneut Sphäroide hergestellt mit einem feiner gemahlenem HA-Pulver mit der Pulverpartikelgröße 3,74 µm.

Abbildung 24 zeigt Sphäroide der HA-Gruppe bei welchem nass gemahlenes HA-Pulver mit einer durchschnittlichen Pulverkorngröße von 3,74 µm verwendet wurde (im Vergleich zu vorherigen Korngröße von 5,88 µm). Abbildung (A) und (C) zeigen lebend-tot Aufnahmen von Sphäroiden der HA-Gruppe. Die lebend-tot Aufnahme (A) von Tag 1 zeigt ein kleines, unförmiges Sphäroid mit einer geringen Vitalität und vielen freien Zellen in der Peripherie. Aufnahme (B) zeigt die lebend-tot Aufnahme des HA-Sphäroids an Tag 9, dabei waren die Sphäroide in freie einzelne Zellen zerfallen, die eine nur geringe Vitalität aufwiesen. Die Abbildungen (B) und (D) zeigen die Sphäroide der HA-Gruppe in einem Eppendorf Röhrchen unmittelbar vor den lebend-tot Aufnahmen (A) und (C). Dabei war zu erkennen, dass sich nur wenige Sphäroide gebildet hatten, welche eine inhomogene Größe und unförmige Morphologie aufwiesen. Zudem waren hauptsächlich lose Pulverpartikel zu erkennen (Abbildung 24 B, D weiße Pfeile). Abbildung (E) zeigt das reine, fein gemahlene HA-Pulver in einer Neubauer-Zählkammer. Trotz der feineren Partikelgröße waren vermehrte Partikelagglutinationen zu erkennen, und die Größenverteilung der Partikel war inhomogen.

Alles in allem bildeten sich trotz des fein gemahlene Pulvers keine Sphäroide. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass das vorherige Scheitern der Sphäroidbildung an der zu groben Partikelgröße lag. Das HA-Pulver scheint auf Grund seiner Beschaffenheit (Pulveragglutinationsbildung, inhomogene Körnerstruktur) nicht für die Sphäroidherstellung geeignet zu sein, da die Sphäroide beim Einbau der HA-Partikel instabil werden, die Zellen so ihre Adhäsion untereinander verlieren und der Sphäroid in einzelne Zellen zerfällt.

4 ERGEBNISSE

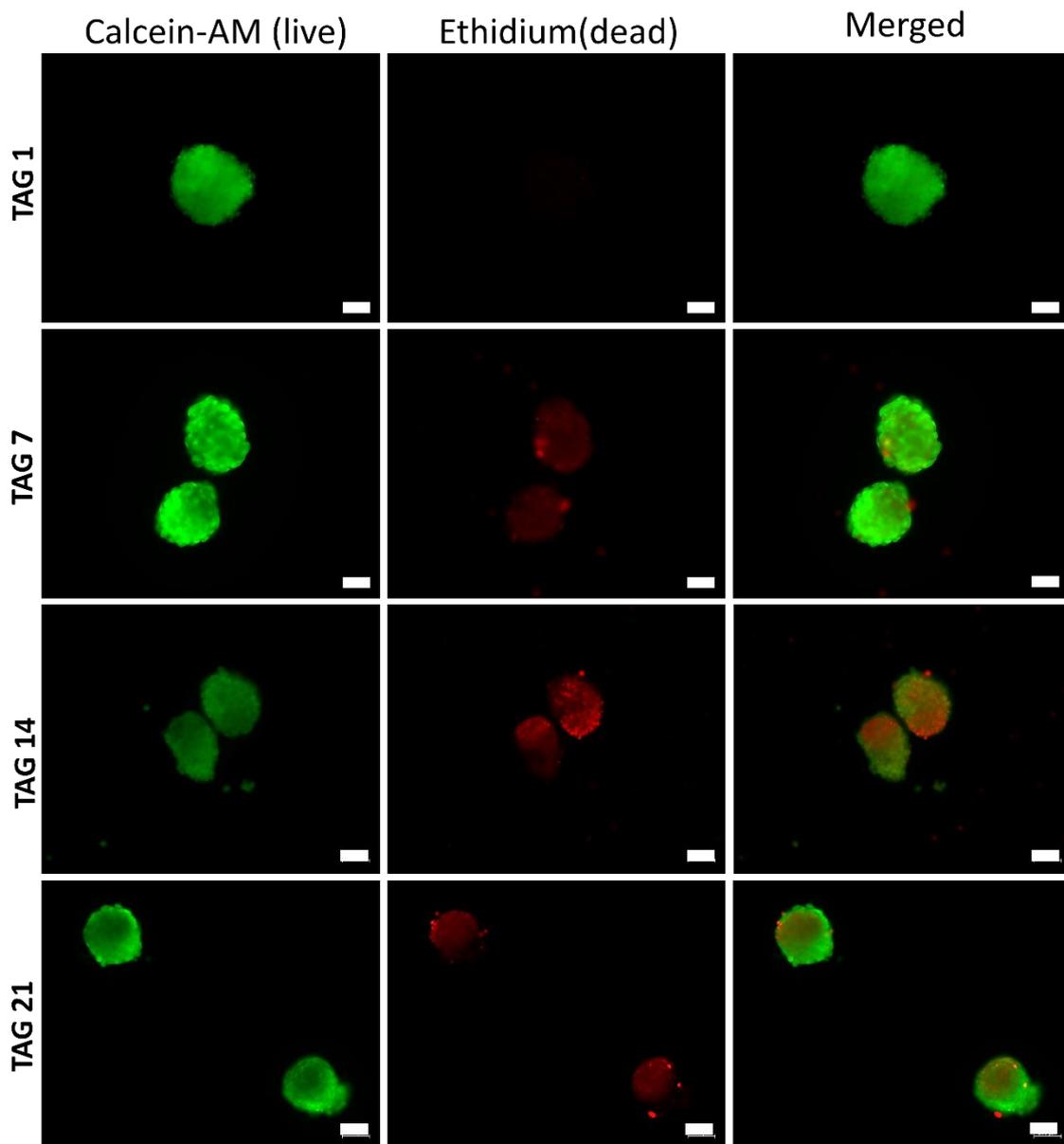


Abbildung 21: Lebend-tot Aufnahmen der ASC-Sphäroide über einen Zeitraum von 21 Tagen. Fluoreszenzbilder der ASC-Sphäroide mit einer Zellanzahl von 3000 an Tagen 1, 7, 14, 21. Lebende Zellen wurden mit Calcein-AM grün angefärbt und tote Zellen mit Ethidium rot. Maßstabsbalken: 100 μ m.

4 ERGEBNISSE

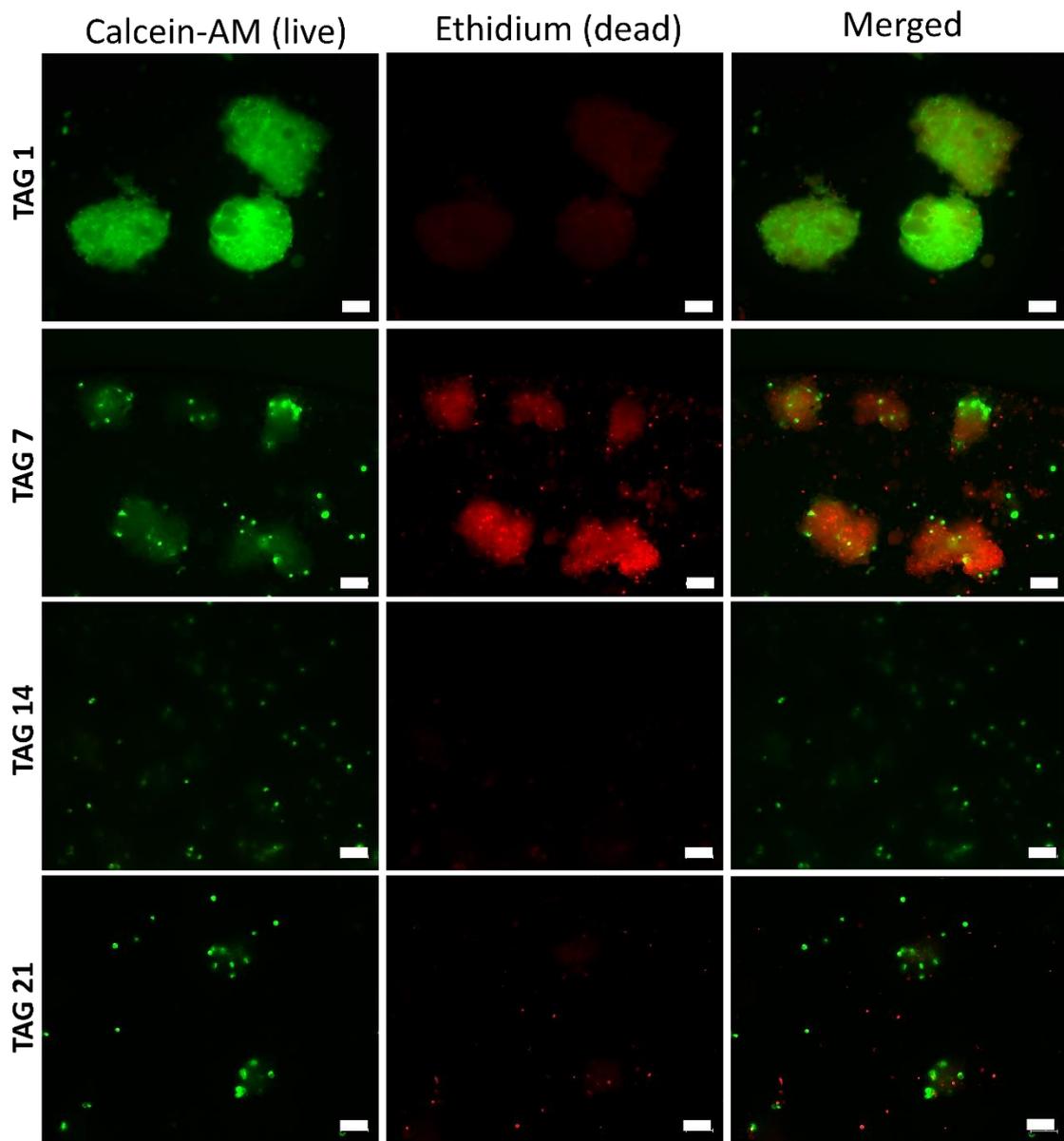


Abbildung 22: Lebend-tot Aufnahmen der ASC-Sphäroide mit Hydroxylapatit über einen Zeitraum von 21 Tagen. Fluoreszenzbilder der ASC-Sphäroide mit Hydroxylapatit mit einer Zellanzahl von 3000 an Tagen 1, 7, 14, 21. Lebende Zellen wurden mit Calcein-AM grün angefärbt und tote Zellen mit Ethidium rot. Maßstabsbalken: 100 μm .

4 ERGEBNISSE

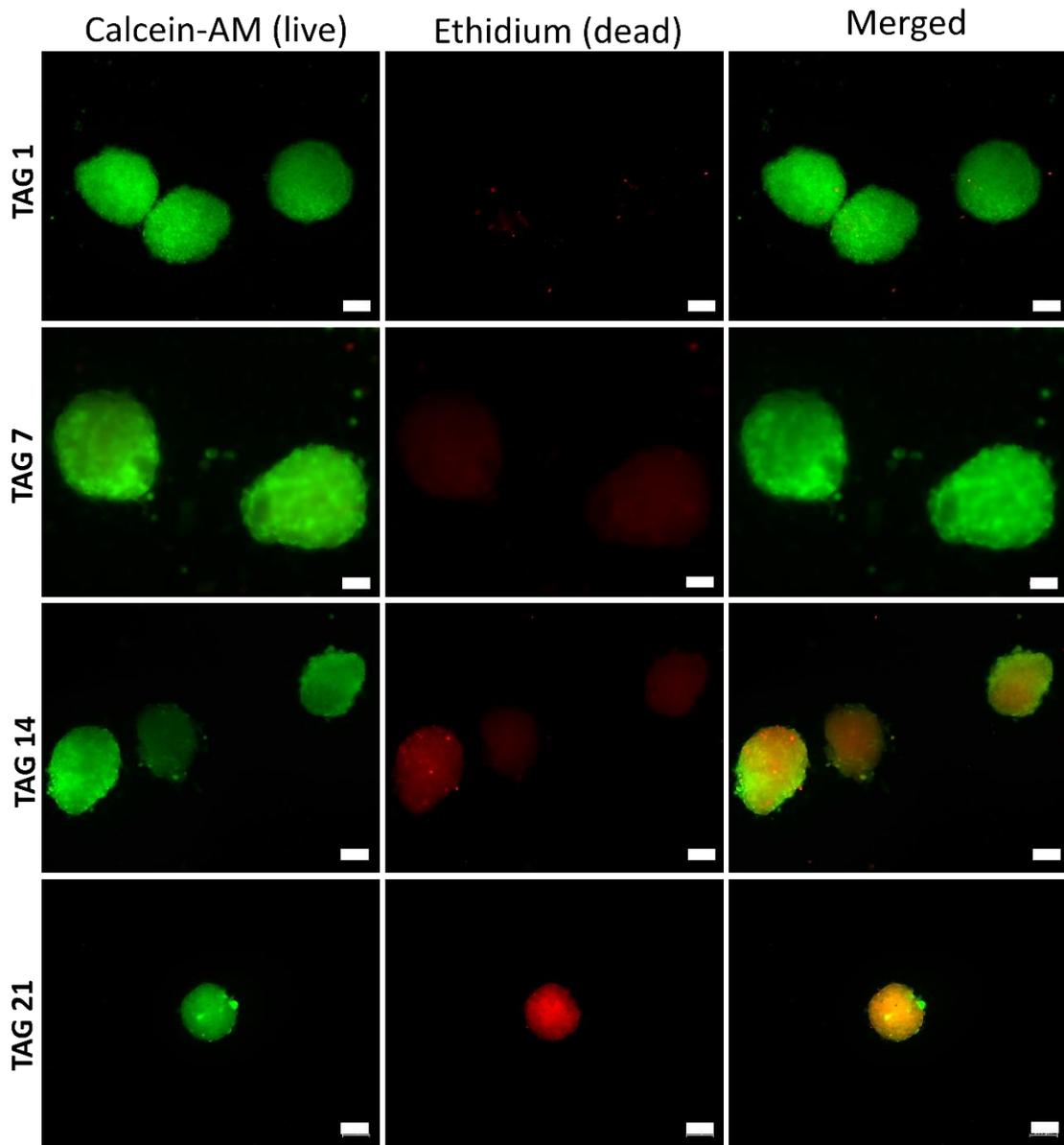


Abbildung 23: Lebend-tot Aufnahmen der ASC-Sphäroide mit Stanfieldite über einen Zeitraum von 21 Tagen. Fluoreszenzbilder der ASC-Sphäroide mit Stanfieldite mit einer Zellanzahl von 3000 an Tagen 1, 7, 14, 21. Lebende Zellen wurden mit Calcein-AM grün angefärbt und tote Zellen mit Ethidium rot. Tag 7 Maßstabsbalken: 50 μm . Tage 1, 14, 21 Maßstabsbalken: 100 μm .

4 ERGEBNISSE

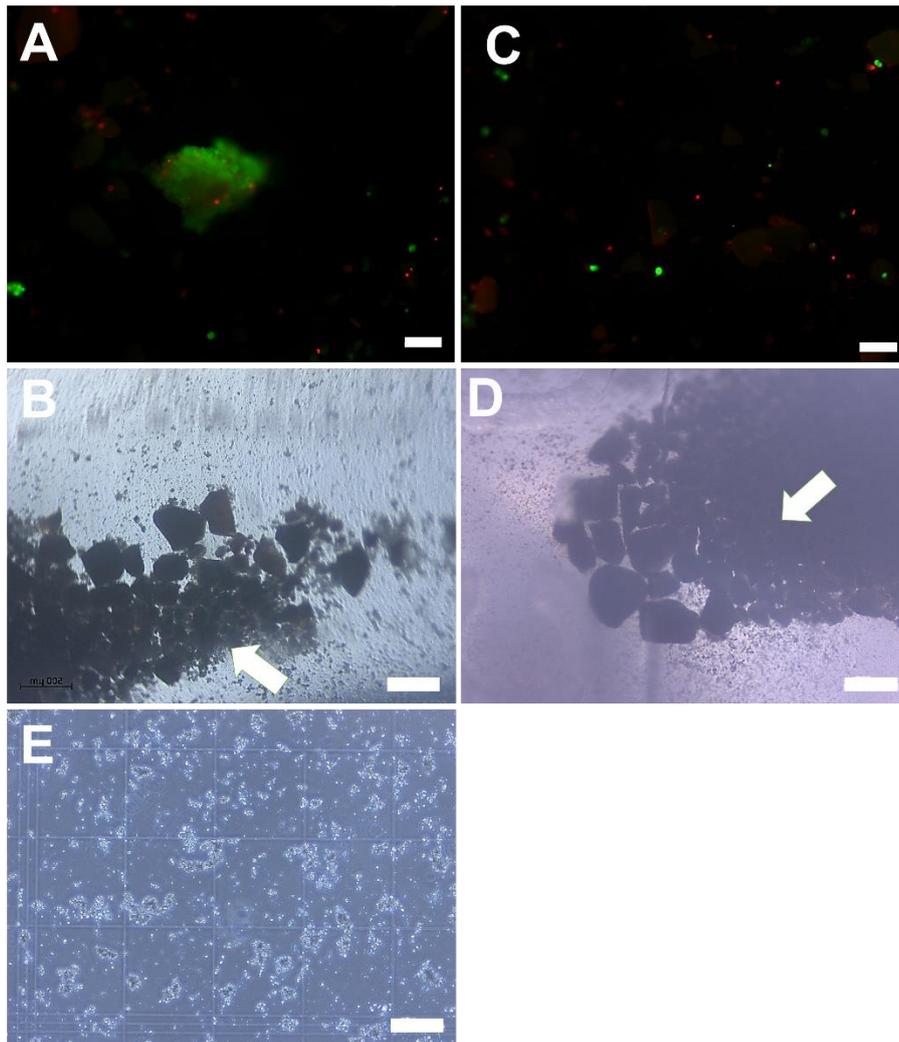


Abbildung 24: ASC-Sphäroide mit feinerem Hydroxylapatit-Pulver. A und C zeigen Fluoreszenzbilder der ASC-Sphäroide mit einer Zellanzahl von 3000. Lebende Zellen wurden mit Calcein-AM grün angefärbt und tote Zellen mit Ethidium rot. (A) lebend-tot Aufnahme von Hydroxylapatit-Sphäroiden an Tag 1. (B) Hydroxylapatit-Sphäroide im Eppendorfröhrchen an Tag 1, weiße Pfeile deuten auf lose Pulverpartikel. (C) lebend-tot Aufnahme von Hydroxylapatit-Sphäroiden nach Tag 9. (D) Hydroxylapatit-Sphäroide im Eppendorfröhrchen an Tag 9, weiße Pfeile deuten auf lose Pulverpartikel. (E) Mit PBS verdünntes HA-Pulver im Verhältnis 100:1 auf eine Neubauer-Zählkammer. (A) und (C) Maßstabsbalken: 100 μm ; (B), (D) und (E) Maßstabsbalken: 500 μm .

4.3.4 Rasterelektronenmikroskop und Energiedispersive Röntgenspektroskopie Aufnahmen der adipösen mesenchymalen Stammzellsphäroide

Um einen detaillierteren Einblick über die Morphologie, die Oberflächenbeschaffenheit und der chemischen Zusammensetzung der Sphäroide zu erhalten, wurden REM- und EDX-Aufnahmen angefertigt.

4 ERGEBNISSE

Abbildung 25 zeigt Sphäroide aller drei Gruppen (Kontrollgruppe, HA und SF) an Tag 21, welche sich freischwimmend in einem Eppendorf Röhrchen befanden. In Aufnahme A erkennt man die runde Morphologie der Sphäroide der Kontrollgruppe. Auch Abbildung C zeigt sehr deutliche und runde Sphäroide der SF-Gruppe. Hingegen ließen sich in der HA-Gruppe (B) keinerlei intakte Sphäroide finden, stattdessen war eine pulverförmige Substanz zu erkennen.

Abbildung 26 zeigt REM-Aufnahmen von Sphäroiden der drei Gruppen, wofür Proben aus Abbildung 25 aufbereitet und verwendet wurden. Die Abbildungen A-C aus Abbildung 26 stellen Sphäroide aus der Kontrollgruppe dar. Sie wiesen eine kompakte runde Morphologie auf. Bei der 10000-Fachen Vergrößerung konnte die Oberflächenbeschaffenheit genauer beurteilt werden. Dabei fiel auf, dass die Oberfläche rau und uneben war. Auch konnte man deutlich die Adhäsion der Zellen untereinander (Abbildung 26, C und I, weiße Pfeile) sehen. Des Weiteren wies die Oberfläche Mikroporen auf, welche sich sehr wahrscheinlich bis ins Sphäroidinnere zogen und so eine kanalartige Struktur innerhalb des Sphäroids bildeten. Die Aufnahmen der HA-Gruppe (Abbildung 26, D-F) zeigen keinerlei Sphäroide, sondern hauptsächlich Pulverpartikelaggregate mit wenigen, vereinzelt Zellen. Mit den Aufnahmen D, E, F (Abbildung 26) bestätigte sich die Annahme, dass sich keine Sphäroide gebildet hatten, sondern hauptsächlich Pulverpartikelaggregate, wie schon in Aufnahme B (Abbildung 25) gezeigt wurde. Die REM-Aufnahmen der SF-Gruppe (Abbildung 26, G-I) weisen runde Sphäroide mit einer kompakten Struktur auf. Die 10000-Fache Vergrößerung ließ einen genauen Eindruck der Oberflächenbeschaffenheit erkennen. So zeigte sich, ähnlich wie in der Kontrollgruppe, eine raue und unebene Oberfläche. Die Poren auf der Oberfläche und ihr Durchmesser erschienen lediglich geringfügig größer als bei der Kontrollgruppe.

Schlussendlich zeigten die REM-Aufnahmen, dass sich bei der Kontrollgruppe und SF-Gruppe formstabile, runde Sphäroide gebildet hatten, hingegen bei der HA-Gruppe die Sphäroidbildung gescheitert war. So waren die Ergebnisse der REM-Aufnahmen deckungsgleich mit den Ergebnissen der lebend-tot und optischen Mikroskop Aufnahmen. Abbildung 27 zeigt die EDX-Aufnahmen der drei verschiedenen Gruppen der ASC-Sphäroide an Tag 21. Das Element Kohlenstoff ist in gelb dargestellt und stellt somit die Zellen dar, Calcium ist blau dargestellt, Magnesium grün und Phosphor rot.

Die Aufnahmen A-E zeigen die Sphäroide der Kontrollgruppe, die ausschließlich gelbes Signal lieferten und somit frei von Partikeln sind. Die Aufnahmen F-J zeigen die Hydroxylapatit Gruppe. Bei diesen Aufnahmen gab es nur ein sehr schwaches gelbes Signal, was auf das Vorhandensein von nur wenigen Zellen hinwies, welche wiederum an

4 ERGEBNISSE

größeren Hydroxylapatit-Partikeln hafteten, die durch ein ausgeprägtes blaues und rotes Signal identifiziert werden konnten, was der Beweis für das Vorhandensein von Calcium und Phosphat ist. Hingegen gab es keinerlei grünes Signal, womit die Abwesenheit von Magnesium bewiesen wurde. Die Aufnahmen K-O zeigen die Stanfieldite Gruppe. Hier sah man bei allen vier Elementen ein stark ausgeprägtes Signal, welches sowohl die Anwesenheit von vielen Zellen bewies als auch die von Calcium, Magnesium und Phosphat. Somit ließ sich anhand der EDX-Aufnahme der Sphäroidoberfläche der Stanfieldite Gruppe sehr gut der Verbund zwischen dem Magnesium-Calcium-Phosphat (SF) und den Zellen erkennen.

Folglich ließen sich durch die EDX-Aufnahmen beweisen, welche Sphäroide welcher Gruppe (Kontrollgruppe, HA oder SF) angehören. Auch konnte wieder bewiesen werden, dass sich bei der Kontrollgruppe und der SF-Gruppe erfolgreiche Sphäroide gebildet hatten. Hingegen bei der HA-Gruppe keine Sphäroidbildung erfolgte, stattdessen hauptsächlich Pulverpartikelagglutinationen mit nur wenigen Zellen.

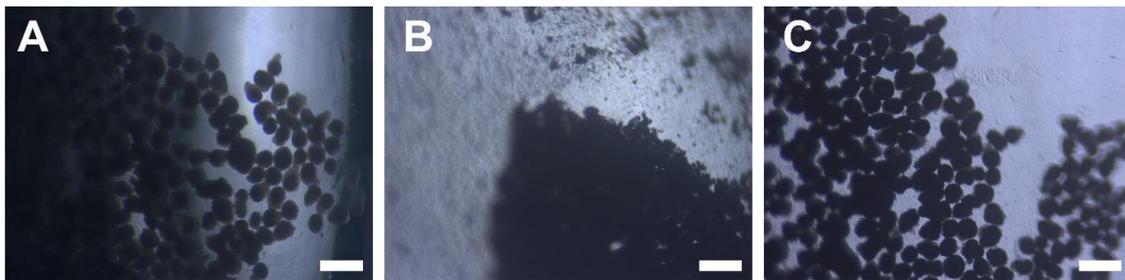


Abbildung 25: ASC-Sphäroide im Eppendorf Röhrchen. Diese ASC-Sphäroide wurden für REM-Aufnahmen präpariert und verwendet: (A) Sphäroide der Kontrollgruppe (B) Sphäroide mit Hydroxylapatit (C) Sphäroide mit Stanfieldite. Maßstabsbalken: 500 μm .

4 ERGEBNISSE

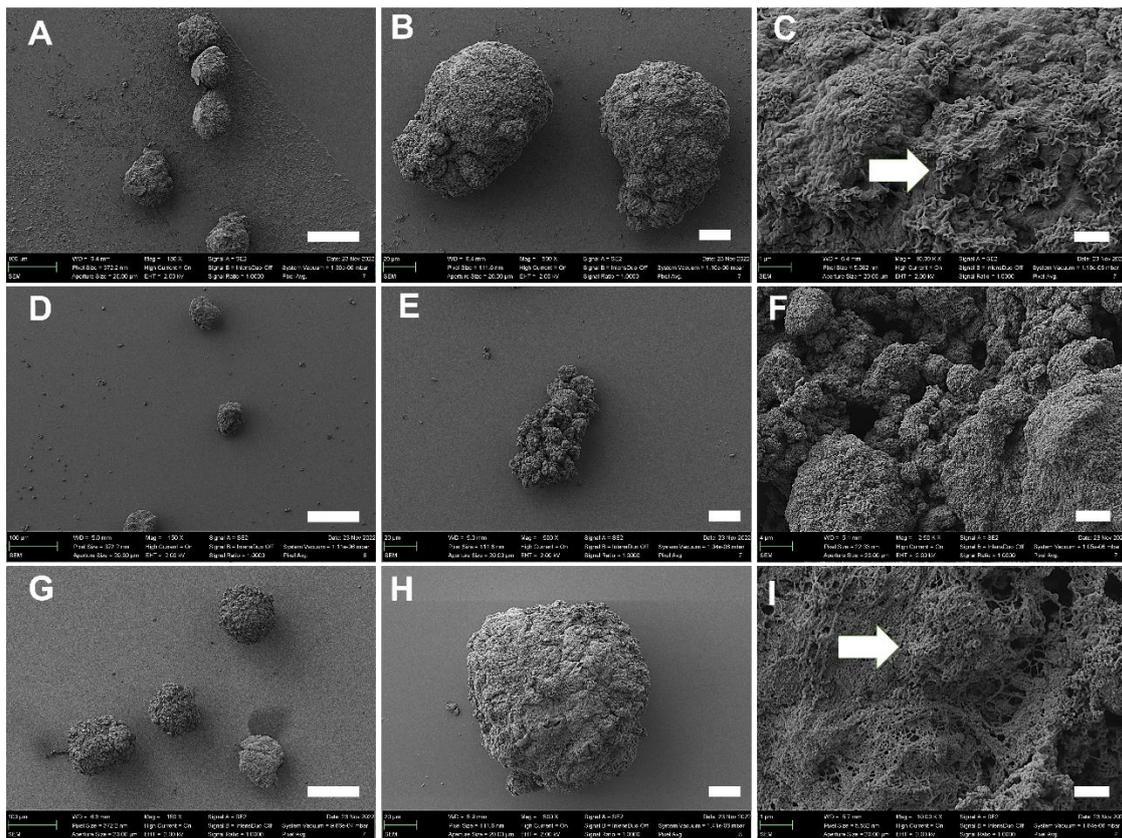


Abbildung 26: REM-Aufnahmen der ASC-Sphäroide. REM-Aufnahmen von 21 Tage alten ASC-Sphäroiden. Sphäroide ohne Biokeramik-Partikel: (A) 150-Fache Vergrößerung, Maßstabsbalken: 100 µm. (B) 500-Fach Vergrößerung, Maßstabsbalken: 20 µm. (C) 1000-Fache Vergrößerung, Pfeil zeigt Adhäsion der Zellen, Maßstabsbalken: 1 µm. Sphäroide mit Hydroxylapatit: (D) 150-Fache Vergrößerung, Maßstabsbalken: 100 µm. (E) 500-Fach Vergrößerung, Maßstabsbalken: 20 µm. (F) 2500-Fach Vergrößerung, Maßstabsbalken: 4 µm. Sphäroide mit Stanfieldite: (G) 150-Fache Vergrößerung, Maßstabsbalken: 100 µm. (H) 500-Fach Vergrößerung, Maßstabsbalken: 20 µm. (I) 1000-Fach Vergrößerung, Pfeil zeigt Adhäsion der Zellen, Maßstabsbalken: 1 µm.

4 ERGEBNISSE

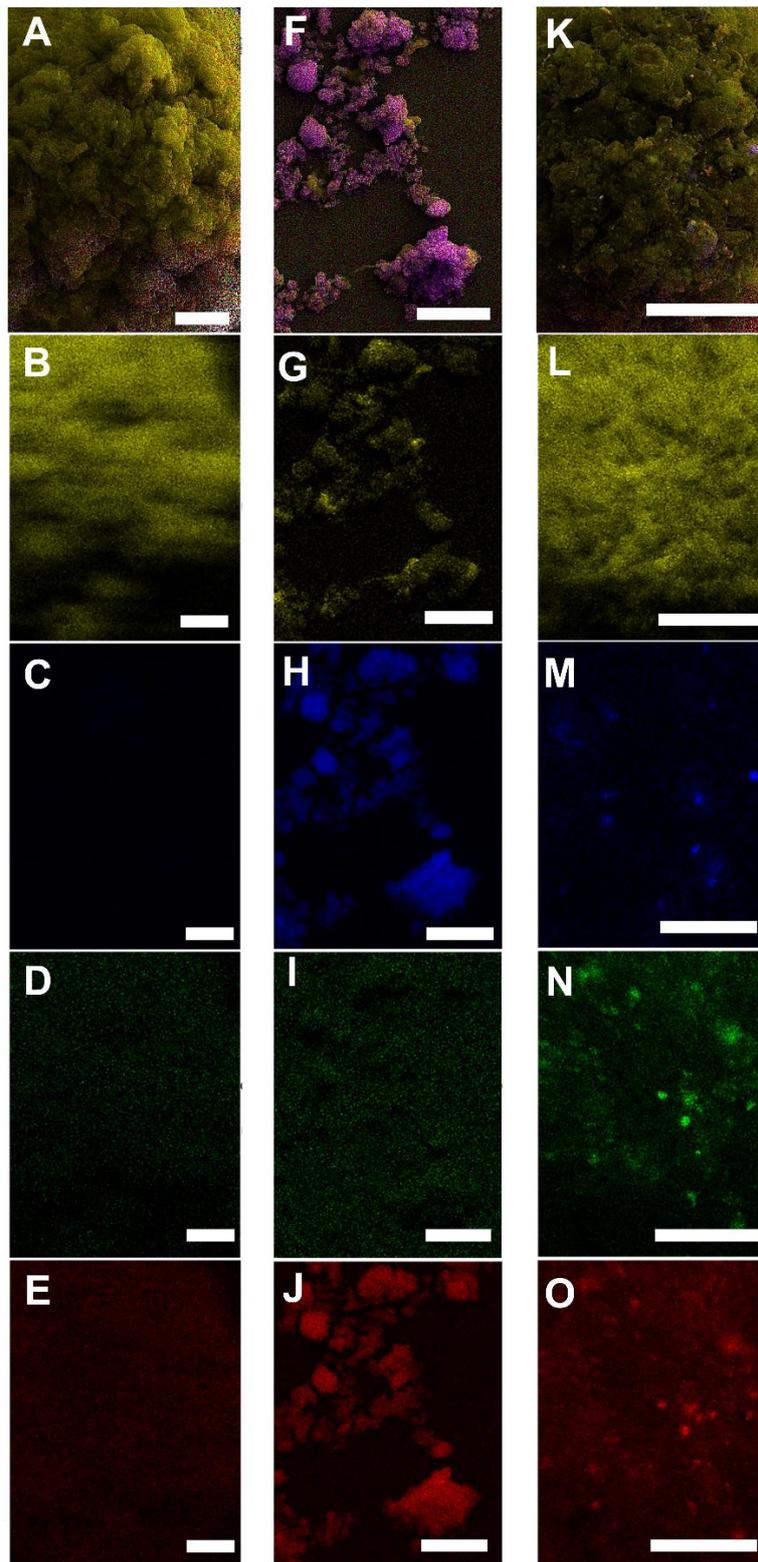


Abbildung 27: EDX-Aufnahmen der ASC-Sphäroide. EDX-Aufnahmen von 21 Tage alten ASC-Sphäroiden. Sphäroide ohne Biokeramik-Partikel: (A)-(E), Maßstabsbalken: 10 µm. Sphäroide mit Hydroxylapatit: (F)-(J) Maßstabsbalken: 25 µm. Sphäroide mit Stanfieldite: (K)-(O) Maßstabsbalken: 25 µm. Gelb=Kohlenstoff, Blau=Calcium, Grün=Magnesium, Rot=Phosphor.

4.4 Teil IV: Mesenchymale Stammzellsphäroide aus dem Knochenmark

4.4.1 Optische Mikroskop Aufnahmen

Um zu überprüfen, ob auch mit MSCs eine erfolgreiche Sphäroidbildung möglich war, wurden auch mit diesen Sphäroide, ohne Biokeramik-Partikeln, mit SF und HA hergestellt. Dafür wurden von den MSCs an Tag 7 Aufnahmen erstellt mit einem optischen Mikroskop (Abbildung 28) und anschließend wurden lebend-tot Aufnahmen angefertigt (Abbildung 29, Abbildung 30, Abbildung 31).

Die Abbildung 28 A und D zeigen Sphäroide der Kontrollgruppe. Sie hatten eine kompakte und runde Morphologie ohne freie Zellen in der Peripherie und mit deutlich erkennbaren Konturen. Auch die Sphäroide der SF-Gruppe (Abbildung 28, B und E) zeigen eine runde und kompakte Struktur auf, mit nur wenigen freien Biokeramik-Partikel in der Umgebung und ihre Konturen waren klar. Abbildung C (Abbildung 28) zeigt Sphäroide der HA-Gruppe, allerdings wiesen die Sphäroide dieser Gruppe keine ebene, runde Form auf und sie hatten eine verschwommene Kontur. Zudem waren sehr viele freie Zellen und Biokeramik-Partikel in der Umgebung, was ein Hinweis darauf war, dass sich keine bis wenige Sphäroide gebildet hatten.

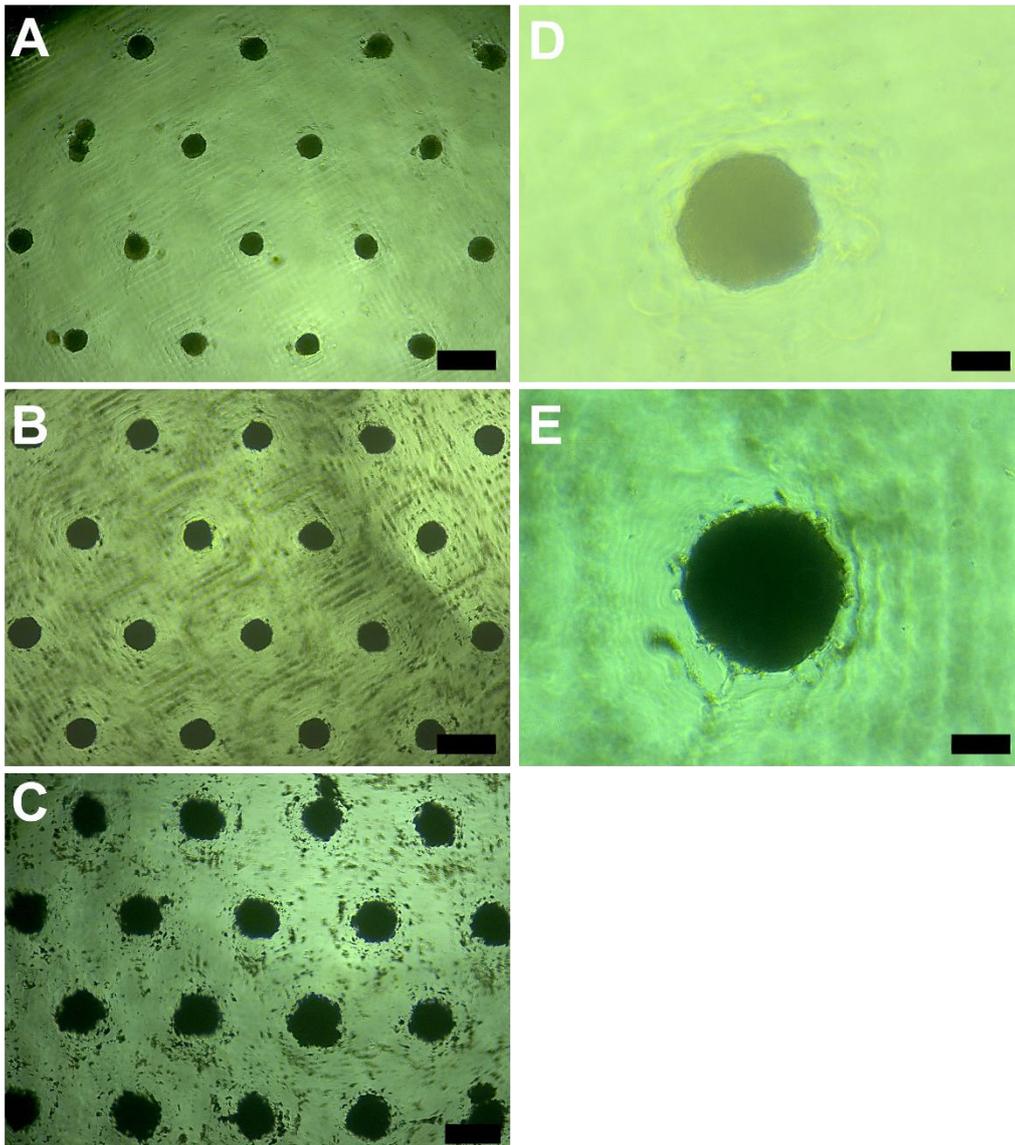


Abbildung 28: optische Mikroskop Aufnahmen von MSC-Sphäroiden. Aufnahmen von MSC-Sphäroiden an Tag 7. Sphäroide ohne Biokeramik-Partikel: (A), (D). Sphäroide mit Stanfieldite: (B), (E). Sphäroide mit Hydroxylapatit: (C). (A), (B), (C) Maßstabsbalken: 500 μm , (D), (E) Maßstabsbalken: 100 μm .

4.4.2 Lebend-tot Aufnahmen der mesenchymalen Stammzellsphäroide aus dem Knochenmark

Auch für die Sphäroide der MSC wurden lebend-tot Aufnahmen von der Kontrollgruppe, HA-Gruppe und SF-Gruppe über einen Zeitraum von 21 Tagen angefertigt. Diese sollten Aufschluss über Form und Vitalität der Sphäroide geben. Ferner konnte so ein Vergleich zu den ASC-Sphäroiden gezogen werden.

4 ERGEBNISSE

Abbildung 29 zeigt Sphäroide der Kontrollgruppe. Dabei wiesen die Sphäroide über 21 Tage hinweg eine hohe Vitalität auf. An den Tagen 14 und 21 ließen sich nur sehr wenige tote Zellen erkennen. Im Allgemeinen zeigte die Kontrollgruppe ein homogenes Bild mit runden und formstabilen Sphäroiden.

Abbildung 30 stellt die HA-Gruppe dar. Dabei zeigten sich an Tag 1 unförmige Sphäroide mit unscharfer Begrenzung, bei denen man die HA-Partikel deutlich erkennen konnte. Die Vitalität war noch recht hoch. An Tag 7 waren die Sphäroide zu Aggregaten zerfallen, die gleichviele lebende wie tote Zellen aufwiesen. An Tag 14 waren die Aggregate jedoch zu einzelnen Zellen und Partikelkörnern zerfallen. Es zeigten sich nur noch wenige vitale, aber viele tote Zellen. An Tag 21 ließen sich kaum noch vitale Zellen finden. Die Ergebnisse der lebend-tot Aufnahmen der MSCs zeigten eine Übereinstimmung mit den lebend-tot Aufnahmen der ASC-Sphäroide mit HA (Abbildung 22). In beiden Fällen zerfielen die Sphäroide der HA-Gruppe nach 21 Tagen in einzelne Zellen.

Abbildung 31 sind die Sphäroide der Stanfieldite Gruppe. Sowie schon bei Abbildung 23 der ASC-Sphäroide, zeigte sich auch hier ein stark ausgeprägtes grünes Signal über einen Zeitraum von 21 Tagen. Die Anzahl der toten Zellen blieb an allen Tagen durchgehend niedrig. Zusammenfassend erschien die Morphologie der SF-Sphäroide (Abbildung 31), wie schon bei der Kontrollgruppe (Abbildung 29) zuvor, homogen und rund bis leicht oval. Die Ergebnisse der lebend-tot Aufnahmen der MSC waren im Allgemeinen ähnlich wie die der ASC-Sphäroide. In beiden Gruppen ließen sich sowohl in der Kontrollgruppe (Abbildung 21 vgl. Abbildung 29) als auch in der SF-Gruppe (Abbildung 23 vgl. Abbildung 31) homogene, runde und formstabile Sphäroide mit einer hohen Vitalität beobachten. Hingegen zerfielen die Sphäroide der HA-Gruppen bei beiden Zellarten über den ersten Tag hinaus zu Aggregaten bis hin zu einzelnen Zellen (Abbildung 22 vgl. Abbildung 30).

4 ERGEBNISSE

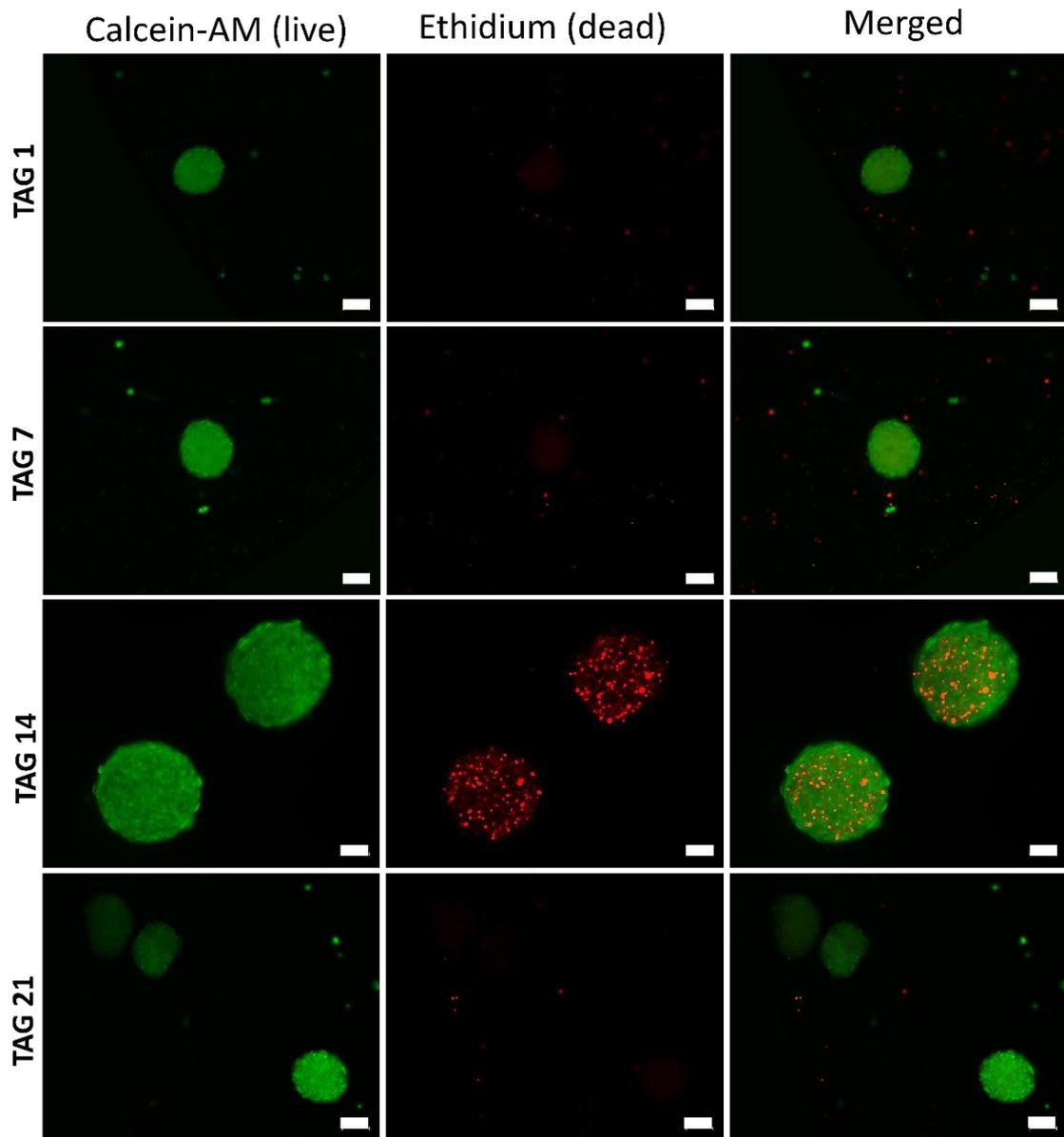


Abbildung 29: Lebend-tot Aufnahmen der MSC-Sphäroide über einen Zeitraum von 21 Tagen. Fluoreszenzbilder der MSC-Sphäroide mit einer Zellanzahl von 3000 an den Tagen 1, 7, 14, 21. Lebende Zellen wurden mit Calcein-AM grün angefärbt und tote Zellen mit Ethidium rot. Tag 14 Maßstabsbalken: 50 μm . Tage 1, 7, 21 Maßstabsbalken: 100 μm .

4 ERGEBNISSE

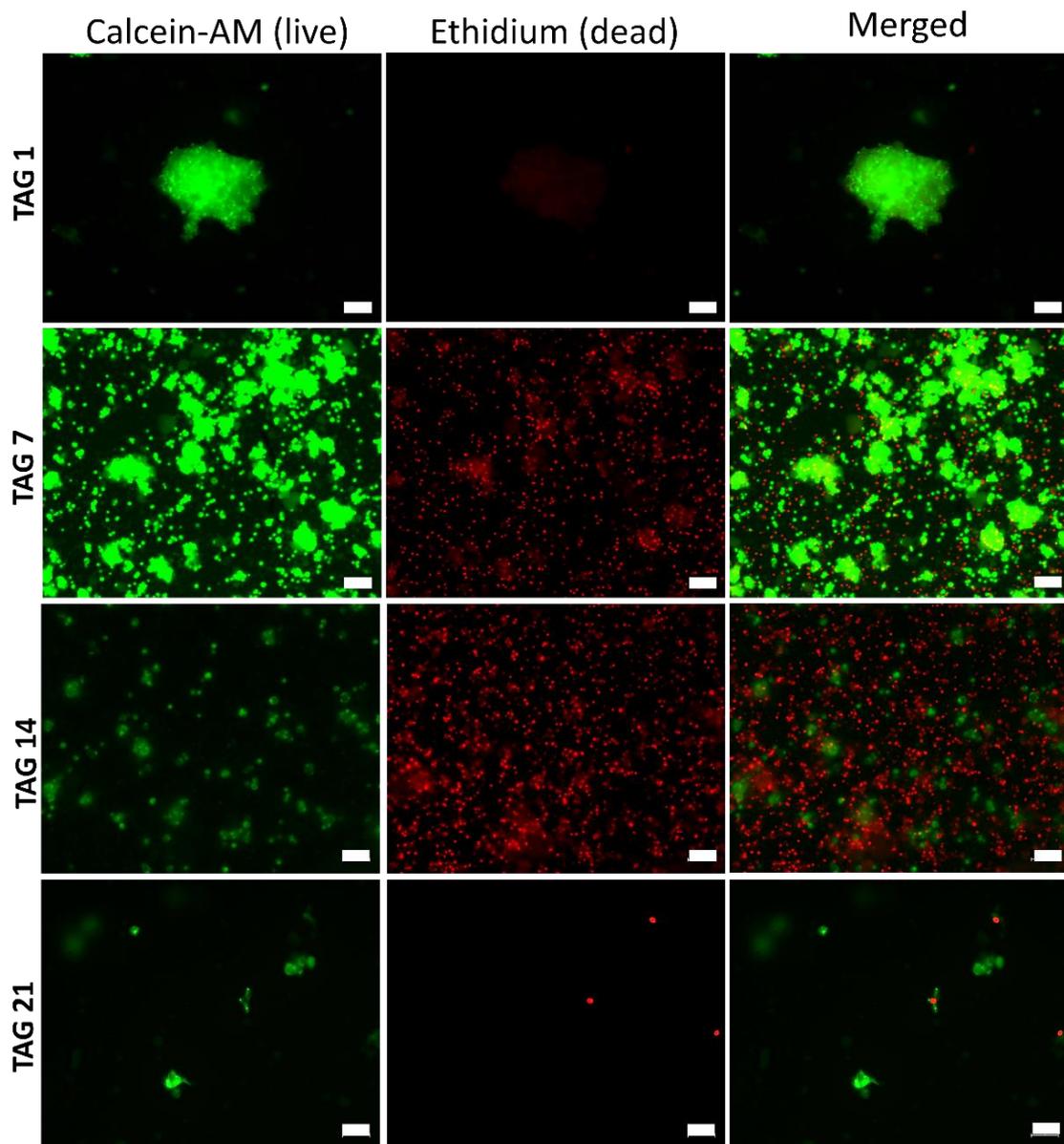


Abbildung 30: Lebend-tot Aufnahmen der MSC-Sphäroide mit Hydroxylapatit über einen Zeitraum von 21 Tagen. Fluoreszenzbilder der MSC-Sphäroide mit einer Zellanzahl von 3000 an den Tagen 1, 7, 14, 21. Lebende Zellen wurden mit Calcein-AM grün angefärbt und tote Zellen mit Ethidium rot. Tage 1, 7, 14 Maßstabsbalken: 100 μm , Tag 21 Maßstabsbalken: 50 μm .

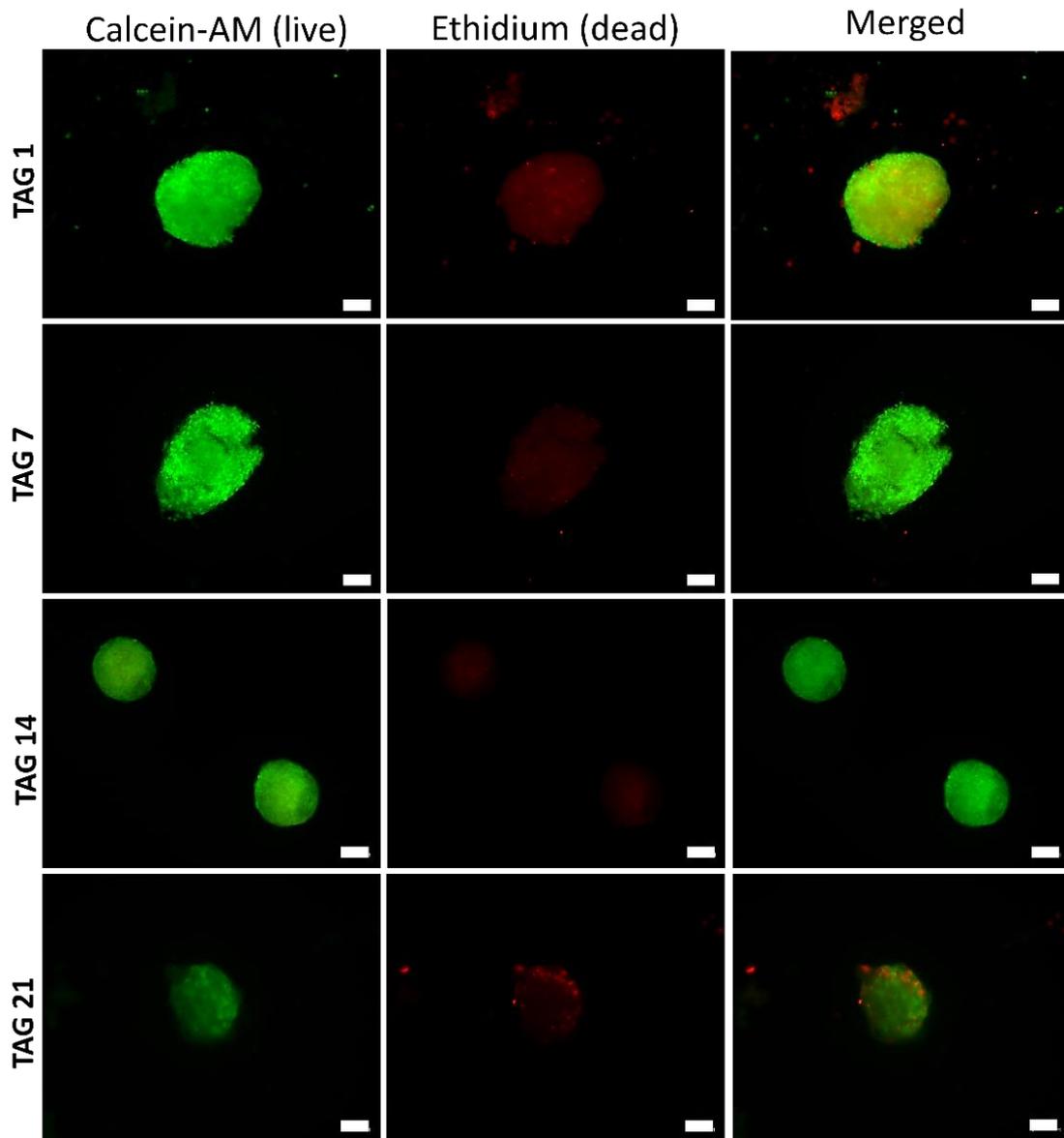


Abbildung 31: Lebend-tot Aufnahmen der MSC-Sphäroide mit Stanfieldite über einen Zeitraum von 21 Tagen. Fluoreszenzbilder der MSC-Sphäroide mit einer Zellanzahl von 3000 an den Tagen 1, 7, 14, 21. Lebende Zellen wurden mit Calcein-AM grün angefärbt und tote Zellen mit Ethidium rot. Tage 1, 7, 14 Maßstabsbalken: 100 μm , Tag 21 Maßstabsbalken: 50 μm .

4.4.3 pH-Wert-Analyse

Um den Einfluss von HA und SF auf den pH-Wert zu charakterisieren, wurde einmalig von 21 Tage alten MSC-Sphäroide das Medium entnommen und der pH-Wert gemessen. Dies sollte ausschließen, dass ein zu saurer oder zu basischer pH eine mögliche Avitalität bei den Sphäroiden verursachte.

Folgende pH-Werte wurden einmalig gemessen: bei der Kontrollgruppe 7,997, HA 8,031 und SF 8,019. Alle pH-Werte waren in einem neutralen pH-Wert-Bereich zwischen 7,0 und

10,0. Somit kann ein negativer Einfluss der Biokeramik-Partikel auf die Vitalität der Sphäroide ausgeschlossen werden.

4.4.4 Quantitative Real-Time PCR

Im nachfolgenden Experiment wurde eine qPCR der MSC-Sphäroide durchgeführt, um eine mögliche osteogene Differenzierung durch die SF-Partikel nachweisen zu können. Dabei wurden osteogene Marker wie ALPL, SPP1 und DKK1 untersucht, welche wichtige Proteine im Knochenstoffwechsel sind⁸⁶. Zusätzlich wurde das Housekeeping-Gen untersucht, das in allen Zellen konstant exprimiert wird und als Referenzgen dient, um die anderen Gene zu normieren.

ALPL ist ein enzymatisches Protein, das im Knochenstoffwechsel eine wesentliche Funktion erfüllt⁸⁶. Es ist ein früher osteogener Marker. Es spielt eine entscheidende Rolle bei der Mineralisierung des Knochens, indem es anorganisches Phosphat aus organischen Verbindungen im Knochen freisetzt. Dieser Prozess ist von grundlegender Bedeutung für die Bildung und Festigkeit des Knochens⁸⁶.

SPP1 ist ein saures Glykoprotein, das in verschiedenen Geweben, einschließlich Knochen, exprimiert wird⁸⁶. Es spielt eine bedeutende Rolle in der Knochenhomöostase, das heißt, es ist entscheidend für das Gleichgewicht der Knochenbildung und -resorption⁸⁶.

DKK1, auch als Protein Dickkopf-1 bezeichnet, ist ein bedeutender Regulator des Wnt-Signalwegs, einem zellulären Signalweg, der die Zelldifferenzierung und -proliferation reguliert. DKK1 fungiert als Inhibitor dieses Signalwegs und hemmt somit die Aktivierung des Wnt-Signalwegs⁸⁶. Dadurch können komplexe Prozesse in der Zelldifferenzierung und Knochenhomöostase beeinflusst werden⁸⁶.

Vorweg sei angemerkt, dass die Werte der SF-Gruppe, die im Differenzierungsmedium kultiviert wurde, am Tag 21 fehlen, da es nicht möglich war, RNA zu isolieren.

Die Expression des ALPL (Abbildung 32, A) war an Tag 21 im Vergleich zu den Tagen 7 und 14 sowohl bei der Kontrollgruppe als auch bei der SF-Gruppe kultiviert in CM hoch. Dabei lag die Expression der SF-Gruppe im Allgemeinen unterhalb der von der Kontrollgruppe.

Die ALPL Aktivität war bei der SF-Gruppe kultiviert in DM an Tag 21 besonders hoch im Vergleich zu den Tagen 7 und 14. Die Kontrollgruppe kultiviert in DM war an Tag 14 höher als an Tag 7.

Vergleicht man die ALPL-Aktivität der Gruppen, die in CM kultiviert wurden, mit jenen, die in DM kultiviert wurden, so zeigte sich an Tag 7 eine höhere Aktivität in der CM-Gruppe. Hingegen war die Aktivität an den Tagen 14 und 21 in der DM-Gruppe höher.

4 ERGEBNISSE

Die Expression des SPP1 (Abbildung 32, B) war bei der SF-Gruppe kultiviert in CM an Tag 7 sehr niedrig und ist an den Tagen 14 und 21 besonders hoch gewesen. Hingegen war die Aktivität bei der Kontrollgruppe kultiviert in CM an allen Tagen sehr niedrig.

Die SPP1 Aktivität war bei der SF-Gruppe kultiviert in DM an Tag 7 hoch im Vergleich zu den Tagen 14 und 21. Die Kontrollgruppe kultiviert in DM zeigte an allen Tagen eine ähnlich niedrige Aktivität.

Vergleicht man die SPP1 Aktivität der Gruppen, die in CM kultiviert wurden, mit jenen, die in DM kultiviert wurden, so zeigte sich lediglich an Tag 7 eine höhere Aktivität in der DM-Gruppe. Hingegen zeigten sich an den Tagen 14 und 21 eine erhöhte Aktivität in den CM-Gruppen. Im Allgemeinen zeigen die Sphäroide der SF-Gruppe eine erhöhte SPP1 Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Die Expression von DKK1 (Abbildung 32, C) war sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der SF-Gruppe, die in CM kultiviert wurden, an allen Tagen sehr gering.

In den Gruppen, die in DM kultiviert wurden, war die DKK1-Aktivität an Tag 7 nahezu nicht nachweisbar. Hingegen war sie an den Tagen 14 und 21 auffällig hoch. Dabei war die DKK1-Aktivität in der Kontrollgruppe, die in DM kultiviert wurde, an Tag 14 höher als die in der SF-Gruppe, die ebenfalls in DM kultiviert wurde.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass nur in den Gruppen, die in DM kultiviert wurden, eine erkennbare DKK1-Aktivität messbar war.

Alles in allem ließen sich osteogene Marker (ALPL, SPP1, DKK1) in allen Gruppen nachweisen. Allerdings konnten keine eindeutigen Gleichmäßigkeiten in Bezug auf den Nachweis von osteogenen Markern in einer der Gruppen beobachtet werden.

4 ERGEBNISSE

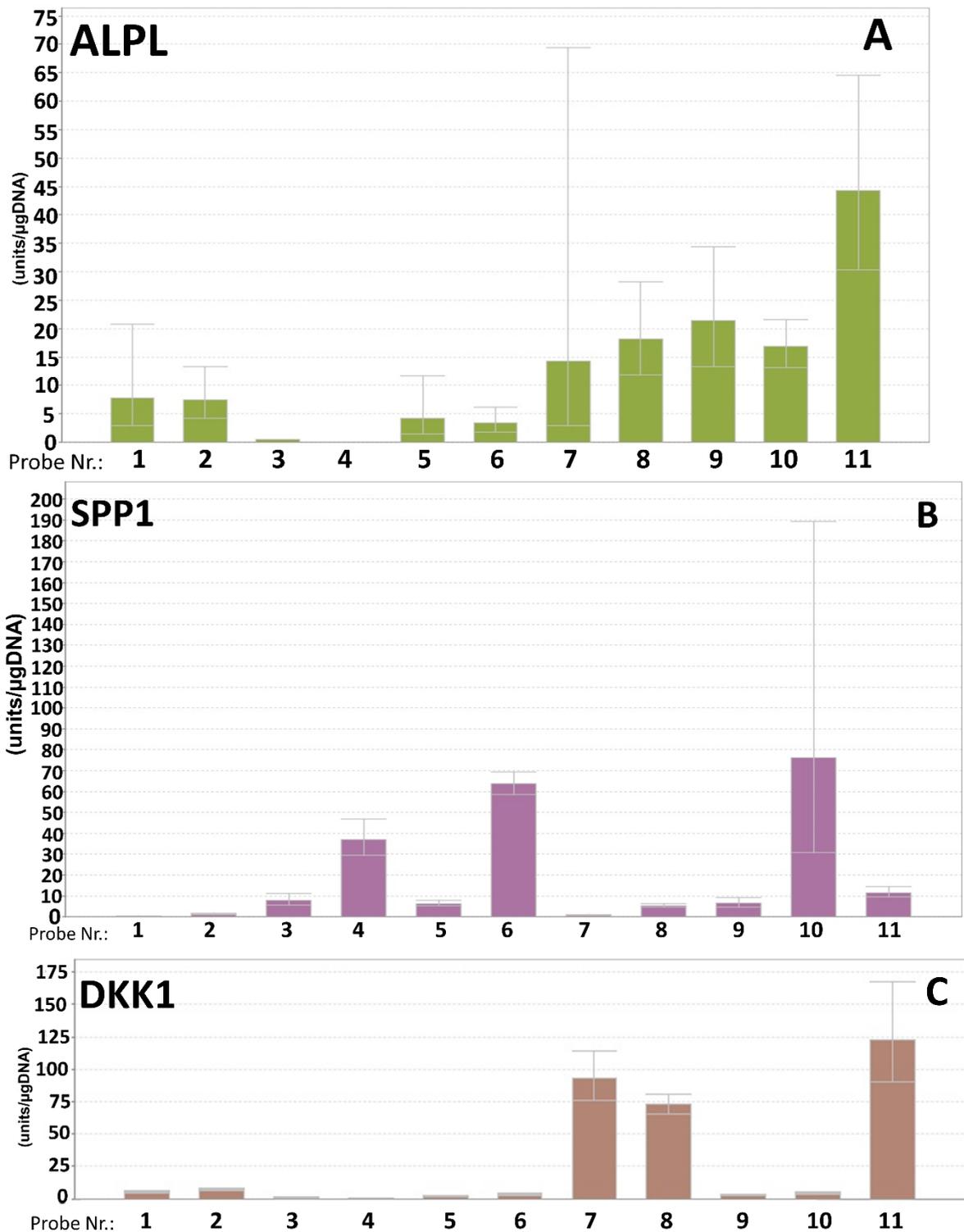


Abbildung 32: qPCR MSC-Sphäroide. Die Diagramme stellen die Aktivität (Einheit: units/µgDNA) der osteogenen Marker (A) ALPL, (B) SPP1, (C) DKK1 der MSC-Sphäroide (ohne Stanfieldite und mit Stanfieldite-Partikel) über einen Zeitraum von 21 Tagen dar. Dabei wurden die osteogenen Marker in den folgenden Gruppen untersucht, Probe Nr.: (1) Kontrollgruppe (Ktr.) in Kontrollmedium (CM) an Tag 7, (2) Stanfieldite in CM an Tag 7, (3)

4 ERGEBNISSE

Ktr. in Differenzierungsmedium (DM) an Tag 7, (4) Stanfieldite in DM an Tag 7, (5) Ktr. in CM an Tag 14, (6) Stanfieldite in CM an Tag 14, (7) Ktr. in DM an Tag 14, (8) Stanfieldite in DM an Tag 14, (9) Ktr. in CM an Tag 21, (10) Stanfieldite in CM an Tag 21, (11) Stanfieldite in DM an Tag 21. Die Werte der Stanfieldite-Gruppe in Differenzierungsmedium an Tag 21 fehlen. Die Messwerte wurden auf das Housekeeping-Gen normiert. n=1.

5 DISKUSSION

Gegenstand dieser wissenschaftlichen Arbeit war es, Sphäroide zu entwickeln und zu etablieren, die Hydroxylapatit- und Stanfieldite-Partikel enthalten und die Eigenschaften und das Verhalten des natürlichen Knochens imitieren sollten. Dabei waren Erkenntnisse aus in vitro Versuchen von großer Bedeutung, da sie Informationen über die Vitalität, Morphologie sowie die Zellproliferation und -differenzierung der Sphäroide lieferten. Zudem wurde zuvor die Eignung der verwendeten Biokeramik-Partikel untersucht. Das Hauptziel bestand in der biologischen Evaluation der Sphäroide, um ihre potenzielle Verwendbarkeit als vielversprechende Alternative zu herkömmlichen biologischen und synthetischen KEM für die regenerative Medizin und das *Tissue Engineering* zu untersuchen.

5.1 Biokeramik-Partikelanalyse

Zunächst wurden die verwendeten Pulver untersucht, um ihre Eignung für die Sphäroidherstellung zu überprüfen. Hierfür wurden optische Mikroskop-, REM- und EDX-Aufnahmen angefertigt sowie XRD- und ICP-Analysen der Pulver durchgeführt.

Die XRD-Methode ist eine zuverlässige und weit verbreitete Technik zur Charakterisierung von Pulvern in zahlreichen Forschungsarbeiten^{87, 88}. Die XRD-Analyse der Pulver ermöglichte eine eindeutige Zuordnung der Mineralien Hydroxyapatit und Stanfieldite. Die optischen Mikroskop- und REM-Aufnahmen lieferten einen umfassenden Eindruck von der Morphologie und Beschaffenheit der Pulver. Zwar sollten ursprünglich detaillierte REM-Aufnahmen der einzelnen Partikelkörner gemacht werden, doch aufgrund der Feinheit der Pulver war dies nicht möglich. Nichtsdestotrotz wurden durch die REM-Aufnahmen beim HA-Pulver deutlich unterschiedliche Partikelgrößen und größere Pulveragglutinationen festgestellt, während das SF-Pulver gleichgroße Korngrößen aufwies.

Kim und Adachi (2019) konnten belegen, dass die räumliche Anordnung und das Zusammenspiel der Zellen innerhalb eines Sphäroids die Umwandlung von osteoblastenähnlichen Zellen in Osteozyten fördern kann, was einen wichtigen Schritt in der Knochenbildung und -erhaltung darstellt⁶⁸. Darüber hinaus wurde in einer Vielzahl von wissenschaftlichen Veröffentlichungen, wie beispielsweise den Arbeiten von Park et al. (2019), Hohenbild et al. (2021), Hussain et al. (2014) und Yuan et al. (2019), belegt, dass die kontrollierte Freisetzung von Calcium-, Magnesium- und Phosphat-Ionen eine bedeutende Förderung der Knochenregeneration bei MSCs bewirken können⁸⁹⁻⁹². In diesem Zusammenhang erwies sich die Analyse der Ionenfreisetzung mittels ICP als besonders bedeutsam. Die Ergebnisse verdeutlichten, dass das HA-Pulver eine

5 DISKUSSION

kontinuierliche Freisetzung von Calcium- und Phosphat-Ionen ermöglichte, während das SF-Pulver sowohl Calcium-, Magnesium- als auch Phosphat-Ionen in die Umgebung abgab. Es wurde angenommen, dass die enge Zell-Partikel-Interaktion im Sphäroid zu einer verbesserten Aufnahme der Ionen durch die Zellen führte. Diese gesteigerte Aufnahme wiederum sollte die Signalübertragung intensivieren und die Differenzierung der Zellen zu osteogenen Zellen fördern. Dadurch sollte die Bildung von neuem Knochengewebe nachhaltig unterstützt werden.

An dieser Stelle ist wichtig zu erwähnen, dass die Resultate der ICP-Messungen bezüglich der Ionenfreisetzung in dieser wissenschaftlichen Arbeit signifikant erhöht waren. Diese Beobachtung ließ sich darauf zurückführen, dass bei der Probenentnahme mittels Pipette einige Pulverpartikel mit aufgenommen wurden, die vom ICP erfasst wurden und somit zu einer Verfälschung der Ergebnisse geführt haben könnten. Aus diesem Grund wird dringend empfohlen, die Flüssigkeit vor der Messung durch den Einsatz von Ultrafiltration zu klären.

Eine weitere Publikation im Zusammenhang mit ICP und Sphäroiden wurde von Theiner et al. veröffentlicht⁹³. In dieser Studie wurden Sphäroide mithilfe der Laserablation-induktiv gekoppelten Plasma-Massenspektrometrie (LA-ICP-MS) analysiert⁹³. Diese fortschrittliche Technik ermöglicht die Analyse von Festproben und die Untersuchung der Spurenelement- oder Metallisotopenverteilung in Geweben⁹³. Folglich wäre in dieser Arbeit eine LA-ICP-MS-Analyse der Sphäroide aufschlussreich gewesen, um ggf. weitere Erkenntnisse über die räumliche Verteilung von Magnesium-, Calcium- und Phosphat-Ionen in den Sphäroiden zu erhalten. Durch die Analyse dieser Elemente könnte man besser verstehen, wie sich diese wichtigen Mineralien in den verschiedenen Bereichen der Sphäroide anreichern und welche Auswirkungen dies auf die Zellaktivität und -funktion haben könnten.

Ferner konnten die EDX-Aufnahmen die Annahme bestätigen, dass HA aus den Elementen Calcium und Phosphat und SF aus Calcium, Magnesium und Phosphat zusammengesetzt waren. Somit wurden die Ergebnisse des ICP durch den Vergleich mit den Ergebnissen der EDX-Aufnahmen verifiziert.

Alles in allem ließ sich aufgrund der Ergebnisse der unterschiedlichen Analyseverfahren kritisch auf die Eignung des HA-Pulvers schließen. Die inhomogene Pulverstruktur erwies sich im Nachhinein als hinderlich für die Sphäroidherstellung und führte vermutlich aufgrund größerer Partikel zu Problemen bei der Zelladhäsion. Diese Problematik wird im späteren Verlauf detaillierter erläutert (Kapitel 5.4.4). Im Gegensatz dazu erwies sich die

Pulverbeschaffenheit des SF-Pulvers als durchaus geeignet für die Sphäroidherstellung, da es feine, homogene Partikel aufwies, die der Sphäroidentstehung förderlich waren.

5.2 Herstellung der Sphäroide

Um eine stets gleichbleibende Menge an Biokeramik-Partikeln für die Herstellung der Sphäroide zu gewährleisten, war es entscheidend, eine zuverlässige und reproduzierbare Methode zu finden. Im Verlauf dieser Prozessoptimierung wurden verschiedene Ansätze getestet, darunter die Zellzählung mittels Casy (OMNI Life Science GmbH), der Neubauer-Zählkammer und des T4-Cellcounters. Allerdings erwies sich die Zellzählung mittels Casy als unzureichend, da das Gerät nicht in der Lage war, anorganische Partikel zu erfassen. Die optische Zellzählung mittels Neubauer-Zählkammer und T4-Cellcounter gestaltete sich selbst nach starken Verdünnungen des Pulvers (1:100) praktisch unmöglich, da die Partikelmenge zu hoch war, um sie optisch zu zählen. Einen optischen Eindruck über die massiv unübersichtliche Partikelanzahl ist in Abbildung 5 zu sehen. Aus diesem Grund erwies sich die zuverlässigste und reproduzierbarste Methode darin, die Biokeramik-Partikel nach Gewicht zu dosieren. Dieser Ansatz ermöglichte es, den Anteil der Biokeramik-Partikel immer konstant zu halten. Ebenso verwendeten Wang et al. (2016) in ihrer Studie das Verfahren der gewichtsbasierten Zugabe von HA-Partikeln zu den Zellaggregaten.⁹⁴

In dieser wissenschaftlichen Arbeit wurde die Sphäroidherstellung mithilfe von *Micromolds* durchgeführt. Im nachfolgenden Absatz soll nachvollzogen werden können, weshalb diese Methode ausgewählt wurde und welche Alternativen es gegeben hätte. Durch diese umfassende Analyse soll ein besseres Verständnis für die optimale Auswahl und Anwendung der Sphäroidherstellungsmethoden gewonnen werden.

Grundsätzlich wurden für diese experimentelle Arbeit große Mengen an Sphäroiden benötigt, die möglichst homogen sein sollten, d.h. sie sollten dieselbe Zellzahl, Form und denselben Partikelanteil aufweisen, um einen Vergleich zwischen den Gruppen zu ermöglichen. Aus diesem Grund musste eine Methode gewählt werden, die einerseits eine hohe Reproduzierbarkeit der Sphäroide gewährleisten konnte und gleichzeitig möglichst kostengünstig war. Metzger et al. (2021) verglich und erläuterte mehrere Sphäroidherstellungstechniken⁹⁵.

Die Tropfenkulturmethode (engl. *hanging drop method*) ist eine einfache, kostengünstige Methode der Sphäroidherstellung, die keine spezielle Ausrüstung erfordert. Allerdings ist die Kontrolle über Größe und Form der Sphäroide schwierig, da Zellen potenziell an der Gefäßoberfläche verloren gehen können⁹⁵. Aus diesem Grund schied diese Methode

aus⁹⁵. Ähnlich sehen auch die Vor- und Nachteile bei der Methode mittels zellabweisenden Zellkulturflaschen (engl. low-adhesion methode) aus⁹⁵. Diese bietet zwar eine kontrollierte Umgebung für die Sphäroidbildung, hohe Durchsatzrate und gleichmäßige Zellverteilung⁹⁵. Jedoch ist auch hier die Kontrolle über Größe und Form der Sphäroide schwierig, da auch hier durch Zelladhäsion an der Plattenoberfläche es zu Zellverlust kommen kann⁹⁵. Zudem ist die Sphäroidentnahme für weitere Experimente schwierig, was auch diese Methode als ungeeignet darstellte⁹⁵, da mit den Sphäroiden diverse Experimente durchgeführt werden sollten. Die Sphäroidherstellung via *bioprinting* ermöglicht zwar eine hohe Produktion in kurzer Zeit, ist jedoch kostenintensiv und technisch komplex⁹⁶.

Die in dieser Arbeit verwendete Methode mittels *Micromolds* bot präzise Kontrolle über Größe, Form und Anordnung der Sphäroide⁹⁵ und über den Biokeramik-Partikelanteil. Zudem war sie kostengünstig und einfach in der Sphäroidentnahme⁹⁵. Der Nachteil dieser Methode bestand in dem hohen zeitlichen Aufwand, der durch die Herstellung und Sterilisation der *Micromolds* entstand und es kam gelegentlich zu Kontaminationen, daher müssen die Sterilisationsschritte strikt eingehalten werden und *Micromolds* sollten mit sterilen Pinzetten direkt in die Wellplatten eingesetzt werden (Kapitel 3.3). Auch bestand das Risiko, dass die Agarose *Micromolds* beim Entnehmen der *Micropillars* rissen, deshalb waren bei der Herstellung Fingerspitzengefühl und Geduld wichtig.

5.3 Optimierung der Sphäroide

Im nächsten Schritt wurde sowohl die optimale Zellzahl als auch der geeignete Partikelanteil für die Sphäroide bestimmt. Das Ziel bestand darin, runde und stabile Sphäroide zu erzeugen, die trotz Zugabe von Partikeln ihre Form behielten und lebensfähig blieben. Zur Beurteilung der Sphäroide wurden optische Mikroskop Aufnahmen, histologische Präparate und lebend-tot Aufnahmen nach 24 Stunden angefertigt.

Mit den optischen Mikroskop Aufnahmen konnte einfach und schnell ermittelt werden, ob sich Sphäroide gebildet hatten. Sowie bei Metzger et al (2011) konnte auch in dieser Arbeit eine Sphäroidformation innerhalb von 24 Stunden nachgewiesen werden (Abbildung 13: Sphäroide mit variablen Biokeramik-Partikelanteilen). Wenn dies nicht der Fall war, bildeten sie sich auch nach diesem Zeitpunkt nicht mehr aus (siehe Abbildung 12: Fehlgeschlagene Sphäroidbildung). Daher erwies sich die Bestimmung einer erfolgreichen Sphäroidbildung mittels optischem Mikroskop als durchaus zuverlässig. In wissenschaftlichen Arbeiten wurde behauptet, dass die Sphäroidentstehung zwar innerhalb von 24 Stunden erfolgt, ihre vollständige Stabilität hingegen erst nach weiteren

5 DISKUSSION

24 bis 48 Stunden erreicht werden soll^{95, 97}. In dieser Arbeit konnte die letztere Aussage widerlegt werden, da die ASC- und MSC-Sphäroide nach 24 Stunden erfolgreich aus den *Micromolds* für weitere Experimente entnommen werden konnten und dabei ihre Form und Vitalität beibehielten.

Ferner lag der Verdacht nahe das Rückstände von Trypsin oder Ethanol die Sphäroidformatierung verhindert haben könnten wie bei den Sphäroiden aus der Abbildung 12 zu sehen. Hier ließ sich keine definierte Kontur und kompakte Struktur erkennen und beim Versuch der Entnahme zerfielen die Aggregate in einzelne Zellen. Es könnte jedoch auch sein, dass die Zellvitalität durch Pipettierstress beeinflusst und dadurch die Fähigkeit der Zellen zur Adhäsion beeinträchtigt wurde⁹⁸.

Die optischen Mikroskop-Aufnahmen (Abbildung 10) zeigten bei einer Zellzahl von 3000 Zellen pro Sphäroid die besten Ergebnisse, da hier eine zufriedenstellende, runde und kompakte Struktur beobachtet werden konnte. Die Auswahl dieser Zellzahl erwies sich als vorteilhaft für die weiteren Experimente, da im Vergleich zu einer Zellzahl von 6000 pro Sphäroid deutlich weniger Zellen kultiviert und benötigt wurden. Zusätzlich konnte davon ausgegangen werden, dass die Sphäroidgröße ausreichend für die Aufnahme der ca. 3-5 µm großen Partikel sein konnte.

Bei den Sphäroiden mit verschiedenen Biokeramik-Partikelanteilen (Abbildung 13) erwies sich ein Partikelanteil von 3 µg pro Sphäroid als geeignet. Dadurch reduzierte sich die Anzahl freier Partikel in der Peripherie, während dennoch ausreichend Partikel vorhanden waren, ohne die Adhäsion der Zellen negativ zu beeinflussen.

Die Histologie sollte wichtige Informationen über den Sphäroidaufbau und den Einbau der Biokeramik-Partikel liefern.

Während der histologischen Untersuchung stellte sich die Handhabung der Sphäroide als äußerst komplex und herausfordernd dar. Die nur geringe Größe erschwerte, insbesondere bei der Kontrollgruppe mit geringem Volumen, die Herstellung von Schnittpräparaten. Das leichte Gewicht der Sphäroide führte während der Zwischenschritte (Fixierung und Färbung) zu unbeabsichtigter Aspiration und zum Sphäroidverlust, insbesondere bei den leichten Sphäroiden der Kontrollgruppe. Bei Sphäroiden mit Biokeramik-Partikeln trat dieses Problem weniger auf, da sie größer und schwerer waren. Zudem führte die Vielzahl an Gruppen und unterschiedlichen histologischen Färbungen zu einem hohen Aufwand, da eine große Anzahl von Schnittpräparaten benötigt wurde. Zusätzlich erschwerte die runde Sphäroidstruktur die Analyse, da die Schnitte unvorhersehbar im Zentrum oder in der Peripherie gemacht wurden, was die Vergleichbarkeit der Sphäroiddurchmesser zwischen den Gruppen

5 DISKUSSION

nahezu unmöglich machte. Ferner stellte sich die individuelle Anpassung des Färbeprotokolls an die Sphäroide als Herausforderung dar, da die Einwirkzeit der Färbemittel für die feinen, kleinen Sphäroidschnitte sonst zu lang gewesen wäre.

Von allen drei Färbungen lieferte die H & E Färbung einen guten Überblick über den Sphäroidaufbau und zeigte eine erfolgreiche Partikeleinlagerung (Abbildung 15, weiße Pfeile).

Die von Kossa Färbung (Abbildung 17) zeigte nur bei der HA-Gruppe eine deutlich erkennbare Partikeleinlagerung. Die Aufnahmen der SF-Gruppe waren nicht verwertbar. Die Alizarin Färbung (Abbildung 16) erwies sich als gänzlich unbrauchbar, da trotz einer stark verkürzten Einwirkzeit keine zufriedenstellenden Ergebnisse in den drei Gruppen erzielt werden konnten. Folglich sollten die von Kossa- und Alizarin-Färbungsmethoden weiterhin für die Sphäroide optimiert werden, um die Partikeleinlagerung im Sphäroid detailliert darstellen und visualisieren zu können.

Das ursprüngliche Ziel der Histologie war es, den ansteigenden Partikelanteil in den Sphäroiden mittels der Färbungen der histologischen Schnitte sichtbar zu machen. Aber die Ergebnisse der histologischen Aufnahmen konnten nur unzureichende Regelmäßigkeiten hinsichtlich des Partikelanteils liefern.

Andere wissenschaftliche Arbeiten wie von Baraniak et al. konnten auch mittels der H & E-Färbung die Einlagerung von Mineralpartikeln in den Sphäroiden veranschaulichen⁹⁹. Hingegen konnten Bratt-Leal et al. (2011) in ihrer H & E Färbung die Einlagerung von Mikropartikeln in den Sphäroiden nicht nachweisen¹⁰⁰. In der Studie von Wang et al. (2016) wurde mittels der histologischen Färbungen Alizarin und von Kossa der Einbau der Partikel und die durch sie herbeigeführte osteogene Differenzierung an Tag 14 nachgewiesen⁹⁴. Hierbei wurden partikelbeladene Sphäroide miteinander verglichen, die entweder in Kontroll- oder Differenzierungsmedium kultiviert wurden⁹⁴. Die Sphäroide, die mit Differenzierungsmedium kultiviert wurden, zeigten dabei eine deutliche Ablagerung von Calcium und Phosphat innerhalb des Sphäroids⁹⁴.

Darüber hinaus konnten Bratt-Leal et al. (2011) mit Hilfe von immunhistologischen Färbungen zeigen, dass selbst bei Zellaggregaten mit nur einem geringen Anteil an Mikropartikeln die Gen- und Proteinexpression von phänotypischen Markern signifikant beeinflusst wurde¹⁰⁰. Dies deutet darauf hin, dass die Differenzierung von pluripotenten Stammzellen zu spezifischen Zelllinien gezielt beeinflusst wurde, wie durch die Veränderungen in der Expression dieser spezifischen Marker deutlich wurde¹⁰⁰.

Eine immunhistologische Untersuchung der Sphäroide mit und ohne Partikel, unter Verwendung verschiedener Marker wie Runx2, Osteocalcin, Osteopontin und Alkalische

5 DISKUSSION

Phosphatase, wäre daher aufschlussreich gewesen. Durch solche Untersuchungen könnten Erkenntnisse gewonnen werden, wie und ob die Mikropartikel die Ausrichtung der Stammzellen zu osteogenen Zelllinien beeinflussen.

Schlussfolgernd wäre eine umfassende Analyse der Partikeleinlagerung und der osteogenen Differenzierung durch die Histologie mittels der von Kossa-Färbung über einen Zeitraum von mindestens drei Wochen hinaus empfehlenswert gewesen. Durch diese längere Zeitspanne hätte man die osteogene Differenzierung in einem fortgeschritteneren Stadium beobachten und mit der Anfangsphase vergleichen können, um einen detaillierten Eindruck über die osteogene Differenzierung innerhalb des Sphäroids zu erlangen.

Die kugelförmige Morphologie von Sphäroiden wirft stets Fragen zur Zellvitalität auf, da sie oft einen nekrotischen und schlecht versorgten Zellkern im Vergleich zu den Zellen in der Peripherie aufweisen⁵⁸. Aus diesem Grund ist die lebend-tot Aufnahmetechnik in der Sphäroidforschung beliebt und findet häufig Anwendung.

Zudem ist der Einsatz dieser Technik von besonderem Interesse in Hinblick auf das Hinzufügen von Partikeln zu den Sphäroiden, da dadurch deren Einfluss auf die Zellvitalität untersucht werden kann.

Die lebend-tot Aufnahmen (Abbildung 14) der ASC-Sphäroide zeigten insgesamt runde, formstabile und vitale ASC-Sphäroide in allen Gruppen nach 24 Stunden. Besonders erwähnenswert ist der auffällig kleine Durchmesser der Sphäroide in der Kontrollgruppen im Vergleich zu den Sphäroiden mit Biokeramik-Partikelanteilen, welche einen größeren Durchmesser aufwiesen. Das größere Zellvolumen der Sphäroide mit Biokeramik-Partikelanteilen wiederum ließ sich durchaus auf den Einbau der Partikel im Sphäroid zurückführen.

Zusammenfassend ließ sich nach 24 Stunden keinen Unterschied in Bezug auf die Zellmorphologie und -vitalität zwischen den Gruppen feststellen, was belegte, dass die Partikel keinen negativen Einfluss auf die Sphäroide hatten.

Es wäre sicherlich sinnvoll gewesen, die Laufzeit für den lebend-tot Versuch auf einen Zeitraum von drei Wochen auszuweiten. Allerdings wäre der damit verbundene materielle und zeitliche Aufwand relativ hoch gewesen.

5.4 Hauptversuche mit den Sphäroiden

Um im weiteren Verlauf einen Vergleich zwischen den ASC-/ MSC-Sphäroiden mit einer Zellzahl von 3000 in den verschiedenen Gruppen (Kontroll-, HA-, SF-Gruppe) zu ermöglichen, wurden verschiedene Untersuchungsmethoden angewandt. Die Durchmesser wurden mithilfe von optischen Mikroskop-Aufnahmen bestimmt, während

die Zellvitalität mittels lebend-tot Aufnahmen und der Zellstoffwechsel mittels WST-8 analysiert wurden. Zusätzlich wurden REM- und EDX-Aufnahmen verwendet, um die Sphäroid-Zusammensetzung und Morphologie zu untersuchen. Abschließend wurde eine qPCR mit den MSC-Sphäroiden durchgeführt. Diese umfassenden Analysen trugen dazu bei, ein detailliertes Verständnis der Sphäroideigenschaften in den jeweiligen Gruppen zu erlangen und deren Eignung für spezifische Anwendungen im *Tissue Engineering* zu bewerten.

5.4.1 Sphäroiddurchmesser

Im Verlauf von 21 Tagen wurden optische Mikroskop-Aufnahmen gemacht (Abbildung 19), die eine umfassende Analyse möglicher Durchmesseränderungen ermöglichten. Zur Vermessung wurde die *ImageJ*-Software verwendet, die bereits in zahlreichen wissenschaftlichen Arbeiten zur Sphäroidmessung eingesetzt wurde¹⁰¹⁻¹⁰³. Alternativ gäbe es noch eine Erweiterung von *ImageJ* namens *SpheroidJ*, entwickelt von Lacalle et al.¹⁰¹. Bezüglich des Durchmessers konnte in der HA-Gruppe keinerlei Veränderung festgestellt werden, was darauf hindeutete, dass sich keine Sphäroide gebildet hatten. Diese Vermutung wird unter anderem bei der Diskussion der lebend-tot Aufnahmen erläutert und bestätigt. Bei den ASC-Sphäroiden der Kontroll- und SF-Gruppen wurden hingegen Durchmesserreduktionen von bis zu 30 % beobachtet (Abbildung 19). Die Größe der Sphäroide mit eingebetteten Mikropartikeln war dabei größer als die ohne, was auch in einer anderen Studie beobachtet werden konnte¹⁰⁴.

Die Schrumpfungen ließen sich auf unterschiedliche Hypothesen zurückführen. Zum einen könnte eine verstärkte Zelladhäsion während des Kultivierungsprozesses zu einer Verdichtung innerhalb des Sphäroids führen und so zu einer Verringerung des Durchmessers beitragen. Zum anderen könnte der Zelltod im Sphäroid, der durch Nährstoffmangel oder ungünstige Umweltbedingungen verursacht wurde, zu der Schrumpfung beigetragen haben. Allerdings wurde diese letztere Hypothese mittels der lebend-tot Aufnahmen widerlegt, da kaum tote Zellen erkennbar waren. Somit deutet alles darauf hin, dass sich die Sphäroidkomprimierung aufgrund der verstärkten Zelladhäsion und möglicherweise schwindender Lufteinschlüsse erklären ließe.

In der Publikation von Kim et al. (2018) wurde ebenfalls eine Abnahme der Sphäroidgröße im Laufe der Zeit festgestellt¹⁰⁵. Diese Abnahme wurde auf zwei Faktoren zurückgeführt¹⁰⁵. Zum einen auf eine verstärkte Zell-Zell-Interaktion, die im Verlauf der Zeit zunimmt und eine Komprimierung des Sphäroids verursacht^{105, 106}. Zum anderen wurde nachgewiesen, dass die Zellproliferation während der osteogenen Differenzierung im Sphäroid gestoppt wurde, was ein weiteres Wachstum des Sphäroids verhinderte¹⁰⁵. Deynoux et al. (2020)

konnte auch eine Schrumpfung der MSC-Sphäroide beobachten und führte dies auf Autophagie und Apoptose in den MSCs zurück^{106, 107}. Luo et al. (2021) konnten ebenfalls eine Verbindung zwischen zunehmendem Zelltod und dem Schrumpfen des Sphäroids feststellen¹⁰⁸. Darüber hinaus konnte Koudan et al. (2020) nachweisen, dass das Ausmaß der Durchmesseränderung stark von der Zellart und der Reifungszeit der Zellen abhängt. Das bedeutet, dass je nach Zelltyp einige Sphäroide stärker schrumpfen als andere¹⁰⁹.

5.4.2 Lebend-tot Aufnahmen

Die lebend-tot Aufnahmen der ASC- und MSC-Sphäroide in den verschiedenen Gruppen (Kontroll-, HA-, SF-Gruppe) gaben einen Überblick über die Vitalität und Morphologie der Sphäroide. Zusätzlich konnte ein Eindruck darüber gewonnen werden, ob die Biokeramik-Partikel die Vitalität negativ beeinflussen. Bezüglich der Form und Vitalität zeigen die ASC- und MSC-Sphäroide der Kontroll- und SF-Gruppen bis Tag 21 eine runde, stabile Form und eine durchgehende Vitalität. Eine auffällige Durchmesserreduktion, wie bei den optischen Mikroskop Aufnahmen, ließ sich nicht belegen.

Erwähnenswert sind an dieser Stelle die lebend-tot Aufnahmen der HA-Gruppe beider Zelllinien. An Tag 1 waren bei beiden Zelllinien unförmige Sphäroide zu erkennen und bei genauerer Betrachtung waren dunkel erscheinende größere Pulverpartikel sichtbar. An den Tagen 7, 14 und 21 waren nur noch vereinzelt, vitale Zellen zu sehen, und es waren keine Sphäroide mehr vorhanden. In Kapitel 5.4.4 werden die Gründe für die misslungene Sphäroidbildung der HA-Gruppe thematisiert.

Auch in anderen Studien wurden lebend-tot Aufnahmen von Sphäroiden mit Partikeln angefertigt. In den Studien Wang et al. (2016), Bratt-Leal et al. (2011) und Baraniak et al. (2012) haben die lebend-tot Aufnahmen bestätigt, dass die eingebauten Mineralpartikel in den Sphäroiden keinen Einfluss auf die Zellviabilität hatten^{94, 99, 100}. Ferner empfahlen Koudan et al., einen maximalen Sphäroiddurchmesser von 200 µm, da darüber hinaus das Risiko eines nekrotischen Kerns steigen würde¹⁰⁹⁻¹¹¹. Diese These wurde in diversen Studien bestätigt^{109, 112}. Allerdings widerlegten die lebend-toten Aufnahmen (Abbildung 21, Abbildung 22, Abbildung 23, Abbildung 29, Abbildung 30, Abbildung 31) in dieser Arbeit diese Behauptungen, da die Sphäroide trotz eines Durchmessers von über 200 µm keinen nekrotischen Kern aufwiesen. Stattdessen zeigten sich entweder kaum tote Zellen oder lediglich tote Zellen, die gleichmäßig im gesamten Sphäroid verteilt waren, bzw. tote Zellen in der Peripherie. Diese Ergebnisse legen nahe, dass es sinnvoll wäre, die optimale Sphäroidgröße erneut zu überprüfen und die genauen Auswirkungen verschiedener Durchmesser auf die Zellvitalität zu verstehen.

5.4.3 Rasterelektronenmikroskop und Energiedispersive Röntgenspektroskopie Aufnahmen

Um einen umfassenden Einblick in die Morphologie und chemische Zusammensetzung der ASC-Sphäroide zu erhalten, wurden REM- und EDX-Aufnahmen (Abbildung 26, Abbildung 27) durchgeführt. Die Sphäroide wurden zuvor in Eppendorf-Röhrchen überführt (Abbildung 25). In den Kontroll- und SF-Gruppen (Abbildung 25 A, C) wurden gut strukturierte und stabile Sphäroide beobachtet, während in der HA-Gruppe nur lose Partikel und Zellen zu erkennen waren (Abbildung 25, B). Diese Beobachtungen wurden durch die REM-Aufnahmen bestätigt. In den Kontroll- und SF-Gruppen wurden gut geformte, runde Sphäroide mit einer rauen, porösen Oberfläche und sichtbarer Zelladhäsion identifiziert (Abbildung 26 C, I, weiße Pfeile). In den REM-Aufnahmen der HA-Gruppe zeigte sich hingegen lediglich ein Pulveraggregat mit nur wenigen anhaftenden Zellen (Abbildung 26 D, E, F).

Aufgrund eines längeren Fixierungsprozesses konnte in dieser wissenschaftlichen Arbeit keine genaue Aussage über den Durchmesser der Sphäroide getroffen werden und das Fehlen von Proben zu verschiedenen Zeitpunkten verhinderte einen Vergleich. Im Gegensatz dazu konnten Deynoux et al. (2020) eine Schrumpfung der MSC-Sphäroide über einen Zeitraum von 14 Tagen mittels von REM-Aufnahmen nachweisen¹⁰⁶. Wie bereits zuvor beschrieben, führten sie dies hauptsächlich auf Autophagie in den Zellen zurück¹⁰⁶.

Baraniak et al. (2012) konnten auch anhand ihrer REM-Aufnahmen keinen Unterschied zwischen den Sphäroiden mit und ohne Partikel feststellen⁹⁹. Dadurch konnten sie eine problemlose Partikelintegration im Sphäroid belegen, ohne eine Beeinträchtigung der Zell-Zell-Interaktion⁹⁹.

Die EDX-Aufnahmen der Sphäroide zeigten, dass die Sphäroide der Kontrollgruppe tatsächlich nur aus Zellen bestanden, während die Sphäroide der SF-Gruppe deutliche Spuren von Calcium, Magnesium und Phosphat aufwiesen, was einen erfolgreichen Einbau von SF belegte. In den EDX-Aufnahmen der HA-Gruppe wurden hauptsächlich Calcium und Phosphat nachgewiesen, zusammen mit nur wenigen anhaftenden Zellen.

Zusammenfassend bestätigten die REM- und EDX-Aufnahmen die Ergebnisse der anderen Versuche, einschließlich lebend-tot Aufnahmen, optischer Mikroskop Aufnahmen und Durchmesser-Diagramme, die zeigten, dass in der Kontroll- und SF-Gruppe erfolgreich Sphäroide gebildet wurden, während es in der HA-Gruppe keine Sphäroide

gab (siehe Kapitel 5.4.4). Die übereinstimmenden Ergebnisse bezüglich der Sphäroidstruktur und -beschaffenheit sowohl in der Kontroll- als auch in der SF-Gruppe legen nahe, dass das SF-Pulver keinerlei negativen Auswirkungen auf die Zelladhäsion der Sphäroide hatte und auch generell keinen Einfluss auf die Zellmorphologie und -anordnung⁹⁹. Es wurde ausschließlich ein Unterschied in der Sphäroidgröße festgestellt. So ließ sich bei den SF-Sphäroide ein größeres Volumen im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachten.

Ferner wäre es aufschlussreich gewesen, Querschnitte von Sphäroiden zu machen und REM-Aufnahmen vom Innenleben der Sphäroide zu verschiedenen Zeitpunkten, z. B. Tag 1, 14 und 21, anzufertigen, um mehr Einblick in die Zellstruktur und die Einlagerung der Biokeramik-Partikel zu erhalten und deren Auswirkung auf den Aufbau der Sphäroide zu verstehen.

Aufgrund ihrer geringen Größe gestaltete es sich als herausfordernd, geeignete und brauchbare Querschnittsbilder der Sphäroide anzufertigen. Da durch ihre kleine Größe die Fixierung und das Anschneiden erschwert wurden, was dazu führte, dass sich die Sphäroide während des Prozesses lösten. So konnten keine Querschnittsbilder der ASC-Sphäroide der SF-Gruppe angefertigt werden und die Querschnittsbilder der Kontrollgruppe wiesen nur eine schlechte Qualität auf und waren so nicht beispielhaft. Hingegen konnten *Baraniak et al.* (2012) REM-Querschnittsaufnahmen von Sphäroiden mit und ohne Partikel vorzeigen⁹⁹. Beide zeigten keine Unterschiede bzgl. ihrer Zellform, -organisation oder Zell-Zell-Interaktion⁹⁹.

5.4.4 Gründe für nicht erfolgreiche Hydroxylapatit Sphäroidbildung

Bei einer ganzheitlichen Betrachtung aller Ergebnisse wird offensichtlich, dass sämtliche Versuchsergebnisse – sei es durch optische Mikroskop Aufnahmen, lebend-tot Aufnahmen, Durchmesserdiagramm oder REM-Aufnahmen – einheitlich zeigten, dass die Sphäroide über den ersten Tag hinaus zu kleinen Zellaggregaten zerfielen.

Der ausbleibende Erfolg in der HA-Gruppe ließ sich bereits während der Partikelanalyse des Hydroxylapatits erahnen, da sich hier variierenden Partikelgrößen und größerer Pulveraggregationen zeigten, die die Bildung stabiler Sphäroide stören könnten. Auch nach erneuter Nassmahlung des HA-Pulvers zeigten die lebend-tot Aufnahmen mit dem feiner gemahlen HA-Pulver zerfallene Sphäroide (Abbildung 24).

Möglicherweise könnten die größeren Pulveragglomerate Sollbruchstellen dargestellt haben, die beim Pipettieren der Sphäroide zerfielen und somit die gesamte Stabilität des Sphäroids beeinträchtigten. Um festzustellen, ob der Zerfall der Pulveragglomerate die Bildung der Sphäroide beeinträchtigt hat, könnte alternativ die Herstellung der Sphäroide

5 DISKUSSION

unter Verwendung von gesintertem HA-Pulver erfolgen. Bei diesem Pulver bleiben die Agglomerate stabil und zerfallen nicht während des Pipettierens. Ein erfolgreicher Einbau der gesinterten HA-Partikel würde darauf hinweisen, dass die Zelladhäsion in den Sphäroiden nicht durch größere Partikel behindert wird und dass der Zerfall der instabilen HA-Pulveragglomerate den Zerfall der Sphäroide verursacht haben könnte.

Eine andere mögliche Ursache neben der mechanischen könnte biologischer Natur sein. Das HA-Pulver ist dafür bekannt, aufgrund seiner Kristallgitterstruktur besonders viele Ionen aus seiner Umgebung zu adsorbieren¹¹³. Diese Eigenschaft führt dazu, dass es Ionen aus dem Medium aufnehmen kann und somit ein biologisches Ungleichgewicht verursachen könnte¹¹⁴.

Zusätzlich wurde der pH-Wert des Mediums der HA-Sphäroide einmalig überprüft. Die pH-Ergebnisse des Mediums lagen im Normbereich bei etwa 8, sodass eine Beeinträchtigung der Sphäroide aufgrund eines zu sauren oder basischen pH-Werts ausgeschlossen werden konnte.

Des Weiteren könnte das Scheitern auf die geringe Löslichkeit von HA zurückzuführen sein²⁹. In diesem Zusammenhang könnte β -Tetracalciumphosphat als potenziell bessere Alternative dienen, da es eine höhere Löslichkeit aufweist²⁹.

Zusammenfassend kann das Scheitern der Sphäroidbildung auf die Beschaffenheit des Pulvers mit seinen zahlreichen Pulveraggregationen und seiner schlechten Löslichkeit zurückgeführt werden.

5.4.5 Metabolische Aktivität

Im weiteren Verlauf wurde die metabolische Aktivität der ASC-Sphäroide in den Kontroll-, HA- und SF-Gruppen mittels eines *WST-8-Kits* untersucht. Die Ergebnisse waren uneinheitlich, und es zeigten sich hohe Standardabweichungen, wodurch keine klare Aussage bezüglich der metabolischen Aktivität getroffen werden konnte, weder im Vergleich der Gruppen miteinander noch im Vergleich innerhalb der einzelnen Gruppen über die 21 Tage hinweg. Es konnte lediglich ausgesagt werden, dass eine metabolische Aktivität in den Gruppen stattfand.

Ursprünglich wurde erwartet, dass ein Trend in Bezug auf einen Abfall oder Anstieg der Zellstoffwechselaktivität erkennbar wäre, um möglicherweise auf eine erhöhte Zellproliferation/-differenzierung schließen zu können. Allerdings lässt sich eine gesteigerte metabolische Aktivität, die mittels des *WST-8-Assays* gemessen wird, nicht zwangsläufig auf eine erhöhte Zellproliferation oder -differenzierung zurückführen¹¹⁵. Stattdessen könnte sie einfach auf eine gesteigerte metabolische Aktivität der bereits

5 DISKUSSION

vorhandenen Zellen hinweisen¹¹⁵. Letztendlich können keine eindeutigen Rückschlüsse auf die genauen Ursachen einer gesteigerten metabolische Aktivität getroffen werden.

An dieser Stelle ist zu bemerken, dass die angewandte Methode, wie zuvor beschrieben, keine wissenschaftlich fundierte Aussage ermöglicht. Dies liegt daran, dass durch das mehrfache Aspirieren und Zugabe des Mediums und der WST-8-Flüssigkeit die Sphäroide zwangsläufig, wenn auch in geringem Maße, aspiriert und aus den Wells herausgespült wurden. Dadurch veränderte sich die Anzahl der Sphäroide während der Messungen, was einen Vergleich unmöglich machte. Das Herausnehmen der Sphäroide vor Tag 5 für die Messungen hätte andererseits das Risiko von Sphäroidfusionen mit sich gebracht, weshalb die Sphäroide in den Wells belassen wurden.

Ein alternativer Ansatz wäre es gewesen, ähnlich wie Luo et al. (2021), das gemessene reduzierte Formazan-Produkt durch die ausgezählten Zellen zu teilen, um festzustellen, ob beispielsweise bei gesteigerter metabolischer Aktivität auf eine erhöhte Zellzahl oder auf eine erhöhte Stoffwechselrate der bereits vorhandenen Zellen geschlossen werden kann¹⁰⁸. Allerdings wäre dieser Ansatz in dieser wissenschaftlichen Arbeit mit einem sehr hohen Zellverbrauch verbunden gewesen, da durch die Zellauszählung die Sphäroide für weiteren Versuchstage unbrauchbar gewesen wären.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass das *Cell Counting Kit-8* in Bezug auf die Thematik dieser Publikation keine wegweisenden zusätzlichen Erkenntnisse erbracht hat.

5.4.6 Quantitative Real-Time PCR

Abschließend erfolgte eine qPCR-Untersuchung der osteogenen Differenzierung der MSC-Sphäroide anhand der Marker ALPL, SPP1 und DKK1 an den Tagen 1, 7, 14 und 21. Die qPCR-Analyse wurde sowohl an den MSC-Sphäroiden der Kontrollgruppe als auch der SF-Gruppe durchgeführt, um genaue Erkenntnisse über die Wirkung und den Einfluss von Stanfieldite auf die Sphäroide zu gewinnen. Da die vorausgegangen Experimente gezeigt hatten, dass eine erfolgreiche Sphäroidbildung in der HA-Gruppe nicht möglich war, wurde bei dieser Gruppe auf eine qPCR verzichtet.

Das Hauptziel bestand darin, herauszufinden, ob eine osteogene Differenzierung stattgefunden hat und ob diese durch die Partikel spontan ausgelöst oder ausschließlich durch Wachstumsfaktoren im Differenzierungsmedium (DM) induziert und stimuliert wurde.

Die erwartete Expression des frühen osteogenen Markers ALPL war primär für die Tage 7 und 14 prognostiziert. Hingegen zeigte sich eine unerwartet deutlich erhöhte Expression an Tag 21. Die Expression des Markers SPP1, der zu einem späteren Zeitpunkt erwartet wurde, nämlich an den Tagen 14 und 21, manifestierte sich bereits am 7. Tag. Die

5 DISKUSSION

erwartete Aktivität von DKK1 war erwartungsgemäß erst an den Tagen 14 und 21 nachweisbar. Es ließen sich bei den SF-Sphäroiden weder eine erhöhte ALPL noch eine DKK1 Aktivität beobachten. Im Kontrast dazu wies der osteogene Marker SPP1 in der SF-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe eine erhöhte Expression auf.

Das Fehlen einer Kontrollgruppe, die am 21. Tag in einem Differenzierungsmedium kultiviert wurde, erschwerte den Vergleich der Ergebnisse.

Es konnte in dieser Arbeit keine eindeutige Evidenz erbracht werden, die die Hypothese stützte, dass die Verwendung des Differenzierungsmediums zwangsläufig zu einer gesteigerten Expression im Vergleich zum Kontrollmedium führte. In der Tat zeigte sich eine erhöhte Expression der mit Differenzierungsmedium kultivierten Sphäroide nur an den Tagen 14 und 21 für ALPL, am Tag 7 für SPP1 und an den Tagen 14 und 21 für DKK1. Zusammenfassend konnte nur beim osteogenen Marker SPP1 eine erhöhte Aktivität der SF-Sphäroide im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden. Somit ließen sich bei der PCR Analyse keine eindeutigen Trends bei der osteogenen Differenzierung beobachten. Demnach konnte weder eine nachweisbare positive noch negative Wirkung im Hinblick auf die osteogene Differenzierung aufgrund der Anwesenheit von SF-Partikeln belegt werden.

Die erzielten fluktuierende Resultate mit teilweise sehr hohen Standardabweichungen könnten möglicherweise auf Ungenauigkeiten bei der Pipettierung oder auf Beeinträchtigungen während des Isolationsprozesses zurückzuführen sein.

Um aussagekräftige Ergebnisse mittels der qPCR zu erzielen, wäre es erforderlich, diese mindestens dreimal, wenn nicht sogar fünfmal, zu wiederholen. Dies sollte unter Einbeziehung der Kontroll- und SF-Gruppen kultiviert in den beiden unterschiedlichen Medien (CM, DM) geschehen. Allerdings wäre dieser Ansatz zeitlich und materiell sehr umfangreich gewesen und konnte daher in der Form in dieser wissenschaftlichen Arbeit nicht umgesetzt werden.

Für den allgemeinen Ablauf dieser experimentellen Arbeit wäre es von vorteilhaftem Nutzen gewesen, zuerst eine qPCR durchzuführen, um mögliche Veränderungen in der Genexpression zu erkennen. Um anschließend mit der Histologie die tatsächlichen Veränderungen auf zellulärer Ebene bestätigen zu können.

In anderen wissenschaftlichen Publikationen konnte ein stimulierender Effekt von Mikropartikeln auf die Sphäroide belegt werden. Beispielsweise konnten Zarkesh et al. (2019) zeigen, dass Sphäroide, die Calcium-Phosphat-Mikropartikel inkorporierten und in einem Kontrollmedium kultiviert wurden, nach 14 Tagen eine um den Faktor 10 höhere Aktivität des SPP1-Gens aufwiesen im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Mikropartikel¹¹⁶.

Ebenso konnten Sato et al. (2019) nachweisen, dass Octacalciumphosphat eine gesteigerte Aktivität der Enzyme ALPL und SPP1 in den Sphäroiden induzierte¹¹⁷.

5.5 Vergleichbare und Alternative Studien

Eine gründliche Recherche hat gezeigt, dass es verschiedene Studien zu Sphäroiden mit eingelagerten Partikeln gibt^{94, 117-119}. Einige dieser Studien befassen sich insbesondere mit Calcium-Phosphat-Partikeln¹¹⁷⁻¹¹⁹. Allerdings sind zum aktuellen Zeitpunkt (August 2023) keine Studien bekannt, die einen Calcium-Magnesium-Phosphat wie SF verwendet haben. Im folgenden Abschnitt werden Studien vorgestellt, die ähnliche Forschungsfragen mit vergleichbaren Ansätzen und Methoden untersucht haben.

In mehreren Studien wurden Calcium-Phosphat-Partikel den Stammzellaggregaten oder Sphäroiden hinzugefügt, um die Knochenregeneration zu fördern^{94, 117-119}. Eine dieser Studien ist die von Sato et al. (2019). In dieser Arbeit wurden den Sphäroiden Calcium-Phosphat, β -Tetracalciumphosphat oder Octacalciumphosphat als Zusätze beigefügt. Zusätzlich wurde die Sauerstoffversorgung der Sphäroide durch einen sogenannten *Oxy-Chip* sichergestellt¹¹⁷, sodass einer potenziellen Nekrose im Sphäroid entgegengesteuert werden konnte. Resultierend konnten sie einen positiven Effekt der Partikel auf die osteogene Differenzierung der MSCs nachweisen¹¹⁷.

Die Studie von Bratt-Leal (2011) untersuchte die Zugabe von Biomaterialien wie Agarose, Polylactide-co-glycolide (PLGA) und Gelatine zu Stammzellsphäroiden¹⁰⁰. Es konnten nur geringfügige Unterschiede in der Genexpression zwischen Sphäroiden mit inkorporierenden Mikropartikeln im Vergleich zu den Sphäroiden ohne Partikel festgestellt werden¹⁰⁰. Folglich verursachte die Anwesenheit von Mikropartikeln keine drastischen Veränderungen in der Genexpression¹⁰⁰.

Die Studienergebnisse von Kim et al. (2018) zeigten, dass wenn Sphäroide mit Gelatine Mikropartikel kombiniert wurden, sie im Vergleich zu Sphäroiden, die nur aus Zellen bestanden, ein höheres Potenzial zur Zellproliferation aufwiesen¹⁰⁴. Dies könnte ein vielversprechender Ansatz sein, um die Effizienz von Zellkulturen zu verbessern.

In der Studie von Kang et al. (2014) verfolgten die Forscher einen alternativen Ansatz, um die osteogene Differenzierung embryonaler Stammzellen zu erreichen¹²⁰. Dazu wurden die Zellen auf mineralisierten synthetischen Matrizen kultiviert, die eine calciumphosphatreiche Knochenumgebung nachahmten¹²⁰. Auf diese Weise gelang die Differenzierung der Stammzellen zu Osteoblasten ohne jegliche osteogen-induzierende Zusätze¹²⁰. Dieses Resultat legt nahe, dass die osteogene Differenzierung möglicherweise auf indirekte Weise durch die Zugabe von Partikeln gefördert werden kann, ohne dass

5 DISKUSSION

eine direkte Zugabe von Mikropartikeln in das Zellaggregat erforderlich wäre¹²⁰. Infolgedessen könnte ein wissenschaftlich vielversprechender Ansatz sein, Stammzell-sphäroide auf einer calciumphosphatreichen Matrize zu kultivieren und zu untersuchen, ob auf diese Weise die osteogene Differenzierung begünstigt werden kann.

Alles in allem ergab die unterschiedliche Studienlage bezüglich Sphäroide bzw. Zellaggregate mit eingebetteten Mikropartikeln, dass keine negativen Auswirkungen auf die Zellstruktur und Zellviabilität festgestellt werden konnten^{94, 117-119}. Es konnten sogar stimulierende Wirkungen auf die osteogene Differenzierung beobachtet werden¹¹⁷. Daraus lässt sich schließen, dass es vielversprechend wäre, das Potenzial von Mikropartikeln in Sphäroiden weiter zu erforschen, um ihre Wirkung auf die osteogene Differenzierung besser zu verstehen und zu optimieren.

6 FAZIT UND AUSBLICK

In dieser wissenschaftlichen Arbeit konnten mittels selbst hergestellten Agarose *Micromolds* homogene, runde und langzeitvitale Sphäroide sowohl mit als auch ohne Stanfieldite, hergestellt werden. Die gesammelten Ergebnisse belegten eine erfolgreiche Etablierung von Sphäroiden mit SF-Partikeln, bei welchen eine erhöhte SPP1-Aktivität über einen Zeitraum von 21 Tagen beobachtet werden. Somit könnte der Einsatz von Stanfieldite in Verbindung mit Stammzellsphäroiden vielversprechend sein. Um jedoch das volle Potenzial dieser Kombination zu verstehen und zu nutzen, müssten weitere Forschungen durchgeführt werden, darunter erneute qPCRs und eine anschließende Verifizierung der Ergebnisse mittels Histologie.

Die Etablierung von hydroxylapatitbeladenen Sphäroiden konnte nicht erfolgreich umgesetzt werden. Daher war es nicht möglich, einen Vergleich zwischen dem Calcium-Phosphat und dem Calcium-Magnesium-Phosphat anzustellen, um eine potenziell vorteilhafte Wirkung des Magnesiums auf die osteogene Differenzierung nachzuweisen. Angesichts dessen wäre eine erfolgreiche Etablierung von hydroxylapatitbeladenen Sphäroiden zweifellos von erheblichem wissenschaftlichem Interesse. Dies würde es ermöglichen, die potenziell positive Auswirkung des im SF enthaltenen Magnesiums genauer zu erforschen.

Im Hinblick auf den weiteren Nutzen dieser Arbeit ist die Publikation von Vorwald et al. (2018) erwähnenswert. Diese besagt, dass die meisten bisherigen Studien zur Transplantation von MSC-Sphäroiden in Gewebedefekte ohne zusätzliche Träger (Scaffolds, Vehikel etc.) durchgeführt wurden¹²¹. Was den Nachteil hätte, dass ein Kontrollverlust der Sphäroidfunktion entstünde und die Vorteile ihrer Bildung beeinträchtigt werden würden. Zudem würde die direkte Transplantation von Sphäroiden möglicherweise zu großem Zellverlust führen, was auf Mikromilieu-Veränderungen oder Zellmigration zurückzuführen sein könnte.¹²¹ Daher könnte ein Biomaterial-Träger nützlich sein, um die Funktion der Sphäroide zu verbessern und ihr volles Potenzial auszuschöpfen¹²¹. Solch ein Träger ermögliche die gezielte Platzierung der Sphäroide und eine verbesserte Wechselwirkung mit dem umgebenden Gewebe, sodass die Effizienz und Wirksamkeit des Verfahrens verbessert werden könnte¹²¹. Folglich wäre der nächste sinnvolle Schritt, einen geeigneten Träger für die partikelbeladenen Sphäroide zu entwickeln und deren Nutzen und Vorteile zu erforschen. Tatsächlich haben bereits diverse Studien darunter Chae et al. (2021)¹²² und Togo et al. (2023)¹²³ diesen Ansatz verfolgt, bei dem Scaffolds in Kombination mit Sphäroiden eingesetzt wurden.

6 FAZIT UND AUSBLICK

Angesichts der vielfältigen Studienlage (Kapitel 5.5), in denen bereits erfolgreich andere Mikropartikel zur Anregung der osteogenen Differenzierung eingesetzt wurden, wäre es von wissenschaftlichem Interesse, nach weiteren Mikropartikeln zu forschen, die möglicherweise ähnliche oder sogar verbesserte Effekte auf die Sphäroide haben könnten. Durch die Identifizierung und Untersuchung solcher Partikel könnten wir unser Verständnis der osteogenen Differenzierung vertiefen und potenziell neue Ansätze für regenerative Therapien und Tissue Engineering entwickeln.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel und Gegenstand zahlreicher Studien ist die Entwicklung von künstlichem, knochenähnlichem und dreidimensionalem (3D-) Gewebe im Bereich des *Tissue Engineering*. Da ein umfangreicher Verlust an Knochen vom menschlichen Körper nicht kompensiert werden kann, könnte die Transplantation von *in vitro* erzeugtem Knochen eine Alternative zu autologen Transplantationen sein, bei denen bereits folgenschwere Nebenwirkungen beim Patienten aufgrund von z.B. Abstoßungsreaktionen nachgewiesen werden konnten. *In vitro* gezüchtetes Gewebe eignet sich zudem auch für Arzneimitteltests, sodass eine gründlichere und effektivere Untersuchung der Auswirkungen von Medikamenten auf menschliches Gewebe möglich wäre.

In dieser Doktorarbeit wurde die Herstellung von Sphäroiden mit Biokeramik-Partikeln (HA und SF) etabliert und untersucht. Dafür wurden Stammzellen aus dem humanen Fett- oder Knochengewebe verwendet. Den Stammzellen wurde dann entweder HA oder SF in Pulverform hinzugefügt, welche dann als partikelbeladene 3D-Gewebekonstrukte, den Sphäroiden, kultiviert wurden.

Damit der Einfluss der Biokeramik-Partikel auf die Stammzellen untersucht und eine Mineralisation nachgewiesen werden konnte, wurden verschiedene Versuche ausgeführt. Es wurden sowohl Viabilitäts- und Proliferationsanalysen, Analysen zur Morphologie und chemischen Zusammensetzung der Sphäroide mit dem Rasterelektronenmikroskop, sowie Genexpressionsanalysen spezifischer osteogener Marker zu verschiedenen Analysezeitpunkten durchgeführt.

Die erzielten Ergebnisse belegen eine erfolgreiche Kultivierung von ASC- und MSC-Sphäroiden ohne Biokeramik-Partikeln und mit SF, jedoch keine mit HA. Die Sphäroide der HA-Gruppe zerfielen über den ersten Tag hinaus zu Zellaggregate, weshalb der Fokus für die weiteren Experimente auf den Sphäroiden der SF-Gruppe lag. Erwähnenswert ist die signifikante Durchmesserreduktion der Sphäroide der Kontroll- und SF-Gruppe bei beiden Zelllinien. Darüber hinaus hatten diese beiden Gruppen formstabile, runde Sphäroide gebildet, welche über 21 Tage hinweg vital geblieben waren. Auch konnte bei der SF-Gruppe eine erhöhte osteogene Aktivität nachgewiesen werden im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Zusammenfassend deuteten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass Sphäroide aus ASCs und MSCs, frei von Biokeramik-Partikeln und mit SF-Partikeln, vielversprechende, potenzielle, körpereigene KEM darstellen könnten. Diese könnten in Zukunft

7 ZUSAMMENFASSUNG

beispielsweise in Scaffold-Strukturen für das *Tissue Engineering* von Knochengewebe oder direkt in größere Knochendefekte transplantiert werden.

8 LITERATURVERZEICHNIS

1. Han, Y., You, X., Xing, W., Zhang, Z., und Zou, W., Paracrine and endocrine actions of bone-the functions of secretory proteins from osteoblasts, osteocytes, and osteoclasts. *Bone Research*, **2018**. 6: p. 16.
2. Platzer, W. und Spitzer, G., Bewegungsapparat : noch mehr Klinikbezüge. Vol. XII. **2005**: Thieme Stuttgart. 256-259.
3. Kreja, L., Brenner, R.E., Tautzenberger, A., Liedert, A., Friemert, B., Ehrnthaller, C., Huber-Lang, M., und Ignatius, A., Non-resorbing osteoclasts induce migration and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Journal Cell Biochemistry*, **2010**. 109(2): p. 347-55.
4. Lüllmann-Rauch, R., Histologie: Verstehen, Lernen, Nachschlagen. Vol. XIII. **2003**: Thieme Stuttgart. 332-334.
5. D., F., Struktur und Funktion des Knochens: Stützwerk aus Kollagen und Hydroxylapatit. *PHARMAZIE IN UNSERER ZEIT*, **2001**. 30(6): p. 488-494.
6. Putlyayev, V. und Safronova, T., A new generation of calcium phosphate biomaterials: The role of phase and chemical compositions. *Glass and Ceramics*, **2006**. 63: p. 99-102.
7. Urist, M.R., Bone: formation by autoinduction. *Science*, **1965**. 150(3698): p. 893-9.
8. Bonewald, L.F., Mechanosensation and Transduction in Osteocytes. *Bonekey Osteovision*, **2006**. 3(10): p. 7-15.
9. Götz, L.-M., Dreidimensionaler Druck reaktiver Calciummagnesiumphosphatzementpasten und deren Charakterisierung, Disseration Medizinische Fakultät. **2015**, Julius-Maximilians-Universität Würzburg: Würzburg. p. 112.
10. Rioja, A.Y., Daley, E.L.H., Habif, J.C., Putnam, A.J., und Stegemann, J.P., Distributed vasculogenesis from modular agarose-hydroxyapatite-fibrinogen microbeads. *Acta Biomater*, **2017**. 55: p. 144-152.
11. Keating, J.F., Simpson, A.H. und Robinson, C.M., The management of fractures with bone loss. *Journal of Bone and Joint Surgery*, **2005**. 87(2): p. 142-50.
12. Annamalai, R.T., Hong, X., Schott, N.G., Tiruchinapally, G., Levi, B., und Stegemann, J.P., Injectable osteogenic microtissues containing mesenchymal stromal cells conformally fill and repair critical-size defects. *Biomaterials*, **2019**. 208: p. 32-44.
13. Fretwurst, T., Gad, L.M., Nelson, K. und Schmelzeisen, R., Dentoalveolar reconstruction: modern approaches. *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery*, **2015**. 23(4): p. 316-22.
14. Pryor, L.S., Gage, E., Langevin, C.J., Herrera, F., Breithaupt, A.D., Gordon, C.R., Afifi, A.M., Zins, J.E., Meltzer, H., Gosman, A., Cohen, S.R., und Holmes, R., Review of bone substitutes. *Craniofacial Trauma Reconstruction*, **2009**. 2(3): p. 151-60.
15. Freier, K., Mertens, C., Engel, M. und Hoffmann, J., Therapeutic strategies for the reconstruction of extensive mandibular defects. *HNO - Die Zeitschrift für Hals-, Nasen, Ohren-Heilkunde*, **2013**. 61(7): p. 551-8.
16. Nishida, J. und Shimamura, T., Methods of reconstruction for bone defect after tumor excision: a review of alternatives. *Medical Science Monitor*, **2008**. 14(8): p. Ra107-13.
17. Salamanca, E., Hsu, C.-C., Huang, H.-M., Teng, N.-C., Lin, C.-T., Pan, Y.-H., und Chang, W.-J., Bone regeneration using a porcine bone substitute collagen composite in vitro and in vivo. *Scientific Reports*, **2018**. 8(1): p. 984.

8 LITERATURVERZEICHNIS

18. Xue, N., Ding, X., Huang, R., Jiang, R., Huang, H., Pan, X., Min, W., Chen, J., Duan, J.-A., Liu, P., und Wang, Y., Bone Tissue Engineering in the Treatment of Bone Defects. *Pharmaceuticals*, **2022**. 15(7): p. 879.
19. Oryan, A., Alidadi, S., Moshiri, A. und Maffulli, N., Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, **2014**. 9(1): p. 18.
20. Holmes, R., Mooney, V., Bucholz, R. und Tencer, A., A coralline hydroxyapatite bone graft substitute. Preliminary report. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, **1984**(188): p. 252-62.
21. Aumüller G., A.G., Conrad A., Engele J., Kirsch J., Maio G., Mayerhofer A., Mense S., Reißig D. et al., Duale Reihe Anatomie. Vol. 5. **2020**, Stuttgart: Thieme. 1336.
22. Janicki, P. und Schmidmaier, G., What should be the characteristics of the ideal bone graft substitute? Combining scaffolds with growth factors and/or stem cells. *Injury*, **2011**. 42 Suppl 2: p. S77-81.
23. Sen, M.K. und Miclau, T., Autologous iliac crest bone graft: should it still be the gold standard for treating nonunions? *Injury*, **2007**. 38 Suppl 1: p. S75-80.
24. Finkemeier, C.G., Bone-grafting and bone-graft substitutes. *Journal of Bone and Joint Surgery*, **2002**. 84(3): p. 454-64.
25. Detsch, R., Mayr, H. und Ziegler, G., Formation of osteoclast-like cells on HA and TCP ceramics. *Acta Biomater*, **2008**. 4(1): p. 139-48.
26. Schmitz, J.P., Hollinger, J.O. und Milam, S.B., Reconstruction of bone using calcium phosphate bone cements: a critical review. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, **1999**. 57(9): p. 1122-6.
27. Wenisch, S., Stahl, J.P., Horas, U., Heiss, C., Kilian, O., Trinkaus, K., Hild, A., und Schnettler, R., In vivo mechanisms of hydroxyapatite ceramic degradation by osteoclasts: fine structural microscopy. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **2003**. 67(3): p. 713-8.
28. Grossardt, C., Ewald, A., Grover, L.M., Barralet, J.E., und Gbureck, U., Passive and active in vitro resorption of calcium and magnesium phosphate cements by osteoclastic cells. *Tissue Engineering Part A*, **2010**. 16(12): p. 3687-95.
29. Dorozhkin, S.V. und Epple, M., Biological and medical significance of calcium phosphates. *Angewandte Chemie International Edition*, **2002**. 41(17): p. 3130-46.
30. Wu, F., Wei, J., Guo, H., Chen, F., Hong, H., und Liu, C., Self-setting bioactive calcium-magnesium phosphate cement with high strength and degradability for bone regeneration. *Acta Biomater*, **2008**. 4(6): p. 1873-84.
31. Jia, J., Zhou, H., Wei, J., Jiang, X., Hua, H., Chen, F., Wei, S., Shin, J.W., und Liu, C., Development of magnesium calcium phosphate biocement for bone regeneration. *Journal of The Royal Society Interface*, **2010**. 7(49): p. 1171-80.
32. Wei, J., Jia, J., Wu, F., Wei, S., Zhou, H., Zhang, H., Shin, J.W., und Liu, C., Hierarchically microporous/macroporous scaffold of magnesium-calcium phosphate for bone tissue regeneration. *Biomaterials*, **2010**. 31(6): p. 1260-9.
33. Zeng, D., Xia, L., Zhang, W., Huang, H., Wei, B., Huang, Q., Wei, J., Liu, C., und Jiang, X., Maxillary sinus floor elevation using a tissue-engineered bone with calcium-magnesium phosphate cement and bone marrow stromal cells in rabbits. *Tissue Engineering Part A*, **2012**. 18(7-8): p. 870-81.
34. Lu, J., Wei, J., Yan, Y., Li, H., Jia, J., Wei, S., Guo, H., Xiao, T., und Liu, C., Preparation and preliminary cytocompatibility of magnesium doped apatite cement with degradability for bone regeneration. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **2011**. 22(3): p. 607-15.
35. Quarto, R., Giannoni, P., Bone Tissue Engineering: Past-Present-Future. *Methods Molecular Biology*, **2016**. 1416: p. 21-33.
36. Hernlund, E., Svedbom, A., Ivergård, M., Compston, J., Cooper, C., Stenmark, J., McCloskey, E.V., Jönsson, B., und Kanis, J.A., Osteoporosis in the European

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Union: medical management, epidemiology and economic burden. A report prepared in collaboration with the International Osteoporosis Foundation (IOF) and the European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA). *Arch Osteoporos*, **2013**. 8(1): p. 136.
37. Amini, A.R., Laurencin, C.T. und Nukavarapu, S.P., Bone tissue engineering: recent advances and challenges. *Critical Reviews in Biomedical Engineering*, **2012**. 40(5): p. 363-408.
38. Weiland, S.K.R., Kilian; Klenk, Jochen; Keil, Ulrich, Zunahme der Lebenserwartung: Größenordnung, Determinanten und Perspektiven Increase of life expectancy in Germany: magnitude, determinants and perspectives. *Deutsches Ärzteblatt*, **2006**. 103: p. 235-252.
39. Atala, A., Tissue engineering and regenerative medicine: concepts for clinical application. *Rejuvenation Research*, **2004**. 7(1): p. 15-31.
40. Borges, J., Lang, E.M. und Stark, G.B., Tissue engineering und regenerative Medizin in der rekonstruktiven Chirurgie, in *Tissue Engineering: Neues zum Gewebeersatz im Muskel-Skelett-System*, J. Bruns, Editor. **2003**, Steinkopff: Heidelberg. p. 3-10.
41. Nadolinski, A., Einfluss des extrusionsbasierten 3D-Drucks von Einzelzellen und Sphäroiden in Alginat-Gelatine-Hydrogelen auf die chondrogene Differenzierung humaner mesenchymaler Stromazellen, Disseration Medizinische Fakultät. **2022**, Julius-Maximilians-Universität Würzburg: Würzburg. p. 87.
42. Badylak, S.F., The extracellular matrix as a biologic scaffold material. *Biomaterials*, **2007**. 28(25): p. 3587-93.
43. Laschke, M.W. und Menger, M.D., Life is 3D: Boosting Spheroid Function for Tissue Engineering. *Trends Biotechnology*, **2017**. 35(2): p. 133-144.
44. Kilian, K.A., Bugarija, B., Lahn, B.T. und Mrksich, M., Geometric cues for directing the differentiation of mesenchymal stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2010**. 107(11): p. 4872-7.
45. Meyers, J., Craig, J. und Odde, D.J., Potential for control of signaling pathways via cell size and shape. *Current Biology*, **2006**. 16(17): p. 1685-93.
46. Chen, C.S., Mrksich, M., Huang, S., Whitesides, G.M., und Ingber, D.E., Geometric control of cell life and death. *Science*, **1997**. 276(5317): p. 1425-8.
47. Mayne, R., Vail, M.S., Mayne, P.M. und Miller, E.J., Changes in type of collagen synthesized as clones of chick chondrocytes grow and eventually lose division capacity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **1976**. 73(5): p. 1674-8.
48. Kleinman, H.K., Philp, D. und Hoffman, M.P., Role of the extracellular matrix in morphogenesis. *Current Opinion in Biotechnology*, **2003**. 14(5): p. 526-32.
49. Korff, T. und Augustin, H.G., Integration of endothelial cells in multicellular spheroids prevents apoptosis and induces differentiation. *Journal Cell Biology*, **1998**. 143(5): p. 1341-52.
50. Ryu, N.E., Lee, S.H. und Park, H., Spheroid Culture System Methods and Applications for Mesenchymal Stem Cells. *Cells*, **2019**. 8(12): p. 13.
51. Antoni, D., Burckel, H., Josset, E. und Noel, G., Three-dimensional cell culture: a breakthrough in vivo. *International Journal of Molecular Sciences*, **2015**. 16(3): p. 5517-27.
52. Ylöstalo, J.H., Bartosh, T.J., Coble, K. und Prockop, D.J., Human mesenchymal stem/stromal cells cultured as spheroids are self-activated to produce prostaglandin E2 that directs stimulated macrophages into an anti-inflammatory phenotype. *Stem Cells*, **2012**. 30(10): p. 2283-96.
53. Semino, C.E., Merok, J.R., Crane, G.G., Panagiotakos, G., und Zhang, S., Functional differentiation of hepatocyte-like spheroid structures from putative liver

8 LITERATURVERZEICHNIS

- progenitor cells in three-dimensional peptide scaffolds. *Differentiation*, **2003**. 71(4-5): p. 262-70.
54. Ghosh, S., Spagnoli, G.C., Martin, I., Ploegert, S., Demougin, P., Heberer, M., und Reschner, A., Three-dimensional culture of melanoma cells profoundly affects gene expression profile: a high density oligonucleotide array study. *Journal of Cellular Physiology*, **2005**. 204(2): p. 522-31.
55. Barbone, D., Van Dam, L., Follo, C., Jithesh, P.V., Zhang, S.D., Richards, W.G., Bueno, R., Fennell, D.A., und Broaddus, V.C., Analysis of Gene Expression in 3D Spheroids Highlights a Survival Role for ASS1 in Mesothelioma. *PLOS ONE*, **2016**. 11(3): p. e0150044.
56. Löwa, A., Jevtić, M., Gorreja, F. und Hedtrich, S., Alternatives to animal testing in basic and preclinical research of atopic dermatitis. *Experimental Dermatology*, **2018**. 27(5): p. 476-483.
57. Kapałczyńska, M., Kolenda, T., Przybyła, W., Zajączkowska, M., Teresiak, A., Filas, V., Ibbs, M., Bliźniak, R., Łuczewski, Ł., und Lamperska, K., 2D and 3D cell cultures - a comparison of different types of cancer cell cultures. *Archives of Medical Science*, **2018**. 14(4): p. 910-919.
58. Mueller-Klieser, W., Multicellular spheroids. A review on cellular aggregates in cancer research. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, **1987**. 113(2): p. 101-22.
59. Mueller-Klieser, W., Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications. *American Journal of Physiology*, **1997**. 273(4): p. C1109-23.
60. Tsai, A.C., Liu, Y., Yuan, X. und Ma, T., Compaction, fusion, and functional activation of three-dimensional human mesenchymal stem cell aggregate. *Tissue Engineering Part A*, **2015**. 21(9-10): p. 1705-19.
61. Achilli, T.M., Meyer, J. und Morgan, J.R., Advances in the formation, use and understanding of multi-cellular spheroids. *Expert Opinion on Biological Therapy*, **2012**. 12(10): p. 1347-60.
62. Cui, X., Hartanto, Y. und Zhang, H., Advances in multicellular spheroids formation. *Journal of the Royal Society Interface*, **2017**. 14(127).
63. Tung, Y.C., Hsiao, A.Y., Allen, S.G., Torisawa, Y.S., Ho, M., und Takayama, S., High-throughput 3D spheroid culture and drug testing using a 384 hanging drop array. *Analyst*, **2011**. 136(3): p. 473-8.
64. Vinci, M., Gowan, S., Boxall, F., Patterson, L., Zimmermann, M., Court, W., Lomas, C., Mendiola, M., Hardisson, D., und Eccles, S.A., Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation. *BMC Biol*, **2012**. 10: p. 29.
65. Holtfreter, J., A study of the mechanics of gastrulation. *Journal of Experimental Zoology*, **1944**. 95(2): p. 171-212.
66. Lin, R.Z. und Chang, H.Y., Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnology Journal*, **2008**. 3(9-10): p. 1172-84.
67. Alvarez-Pérez, J., Ballesteros, P. und Cerdán, S., Microscopic images of intraspheroidal pH by ¹H magnetic resonance chemical shift imaging of pH sensitive indicators. *Magma*, **2005**. 18(6): p. 293-301.
68. Kim, J. und Adachi, T., Cell Condensation Triggers the Differentiation of Osteoblast Precursor Cells to Osteocyte-Like Cells. *Frontiers in Bioeng Biotechnol*, **2019**. 7: p. 288.
69. Curcio, E., Salerno, S., Barbieri, G., De Bartolo, L., Drioli, E., und Bader, A., Mass transfer and metabolic reactions in hepatocyte spheroids cultured in rotating wall gas-permeable membrane system. *Biomaterials*, **2007**. 28(36): p. 5487-97.

8 LITERATURVERZEICHNIS

70. Hall, P.A. und Watt, F.M., Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. *Development*, **1989**. 106(4): p. 619-33.
71. Rose, F.R. und Oreffo, R.O., Bone tissue engineering: hope vs hype. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **2002**. 292(1): p. 1-7.
72. Beddington, R.S. und Robertson, E.J., An assessment of the developmental potential of embryonic stem cells in the midgestation mouse embryo. *Development*, **1989**. 105(4): p. 733-7.
73. Passier, R. und Mummery, C., Origin and use of embryonic and adult stem cells in differentiation and tissue repair. *Cardiovascular Research*, **2003**. 58(2): p. 324-335.
74. Kersten-Thiele, P.V., Osteogene Differenzierung von humanen Nabelschnurblutstammzellen (USSC) in der adhärennten Zellkultur sowie auf boviner, kollagener Knochenmatrix. **2011**: VVB Laufersweiler.
75. Watt, F.M. und Hogan, B.L., Out of Eden: stem cells and their niches. *Science*, **2000**. 287(5457): p. 1427-30.
76. Zuk, P.A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J.W., Katz, A.J., Benhaim, P., Lorenz, H.P., und Hedrick, M.H., Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering*, **2001**. 7(2): p. 211-28.
77. Aust, L., Devlin, B., Foster, S.J., Halvorsen, Y.D., Hicok, K., du Laney, T., Sen, A., Willingmyre, G.D., und Gimble, J.M., Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates. *Cytotherapy*, **2004**. 6(1): p. 7-14.
78. Lin, C.S., Lin, G. und Lue, T.F., Allogeneic and xenogeneic transplantation of adipose-derived stem cells in immunocompetent recipients without immunosuppressants. *Stem Cells and Development*, **2012**. 21(15): p. 2770-8.
79. Mushtaq, M., Kovalevska, L., Darekar, S., Abramsson, A., Zetterberg, H., Kashuba, V., Klein, G., Arsenian-Henriksson, M., und Kashuba, E., Cell stemness is maintained upon concurrent expression of RB and the mitochondrial ribosomal protein S18-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2020**. 117(27): p. 15673-15683.
80. Drela, K., Stanaszek, L., Snioch, K., Kuczynska, Z., Wrobel, M., Sarzynska, S., Legosz, P., Maldyk, P., und Lukomska, B., Bone marrow-derived from the human femoral shaft as a new source of mesenchymal stem/stromal cells: an alternative cell material for banking and clinical transplantation. *Stem Cell Res Ther*, **2020**. 11(1): p. 262.
81. Purwaningrum, M., Jamilah, N.S., Purbantoro, S.D., Sawangmake, C., und Nantavisai, S., Comparative characteristic study from bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Journal of Veterinary Science*, **2021**. 22(6): p. 0.
82. Roseti, L., Parisi, V., Petretta, M., Cavallo, C., Desando, G., Bartolotti, I., und Grigolo, B., Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives. *Materials Science and Engineering: C*, **2017**. 78: p. 1246-1262.
83. Baghaban Eslaminejad, M. und Malakooty Poor, E., Mesenchymal stem cells as a potent cell source for articular cartilage regeneration. *World Journal of Stem Cells*, **2014**. 6(3): p. 344-54.
84. Qi, T., Weng, J., Yu, F., Zhang, W., Li, G., Qin, H., Tan, Z., und Zeng, H., Insights into the Role of Magnesium Ions in Affecting Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Biological Trace Element Research*, **2021**. 199(2): p. 559-567.
85. Lee, S.J., Lee, I.K. und Jeon, J.H., Vascular Calcification-New Insights Into Its Mechanism. *International Journal of Molecular Sciences*, **2020**. 21(8).
86. Qiang, Y.W., Barlogie, B., Rudikoff, S. und Shaughnessy, J.D., Jr., Dkk1-induced inhibition of Wnt signaling in osteoblast differentiation is an underlying mechanism of bone loss in multiple myeloma. *Bone*, **2008**. 42(4): p. 669-80.

8 LITERATURVERZEICHNIS

87. Bunaciu, A.A., Udriștioiu, E.G. und Aboul-Enein, H.Y., X-ray diffraction: instrumentation and applications. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, **2015**. 45(4): p. 289-99.
88. Abbona, F. und Baronnet, A., A XRD and TEM study on the transformation of amorphous calcium phosphate in the presence of magnesium. *Journal of Crystal Growth*, **1996**. 165(1): p. 98-105.
89. Yuan, Z., Wei, P., Huang, Y., Zhang, W., Chen, F., Zhang, X., Mao, J., Chen, D., Cai, Q., und Yang, X., Injectable PLGA microspheres with tunable magnesium ion release for promoting bone regeneration. *Acta Biomater*, **2019**. 85: p. 294-309.
90. Park, J.W., Hanawa, T. und Chung, J.H., The relative effects of Ca and Mg ions on MSC osteogenesis in the surface modification of microrough Ti implants. *International Journal of Nanomedicine*, **2019**. 14: p. 5697-5711.
91. Hohenbild, F., Arango Ospina, M., Schmitz, S.I., Moghaddam, A., Boccaccini, A.R., und Westhauser, F., An In Vitro Evaluation of the Biological and Osteogenic Properties of Magnesium-Doped Bioactive Glasses for Application in Bone Tissue Engineering. *International Journal of Molecular Sciences*, **2021**. 22(23).
92. Hussain, A., Bessho, K., Takahashi, K. und Tabata, Y., Magnesium calcium phosphate/ β -tricalcium phosphate incorporation into gelatin scaffold: an in vitro comparative study. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, **2014**. 8(11): p. 919-24.
93. Theiner, S., Schreiber-Brynzak, E., Jakupec, M.A., Galanski, M., Koellensperger, G., und Keppler, B.K., LA-ICP-MS imaging in multicellular tumor spheroids - a novel tool in the preclinical development of metal-based anticancer drugs. *Metallomics*, **2016**. 8(4): p. 398-402.
94. Wang, Y., Yu, X., Baker, C., Murphy, W.L., und McDevitt, T.C., Mineral particles modulate osteo-chondrogenic differentiation of embryonic stem cell aggregates. *Acta Biomater*, **2016**. 29: p. 42-51.
95. Metzger, W., Sossong, D., Bächle, A., Pütz, N., Wennemuth, G., Pohlemann, T., und Oberringer, M., The liquid overlay technique is the key to formation of co-culture spheroids consisting of primary osteoblasts, fibroblasts and endothelial cells. *Cytotherapy*, **2011**. 13(8): p. 1000-12.
96. Banerjee, D., Singh, Y.P., Datta, P., Ozbolat, V., O'Donnell, A., Yeo, M., und Ozbolat, I.T., Strategies for 3D bioprinting of spheroids: A comprehensive review. *Biomaterials*, **2022**. 291: p. 121881.
97. Eberhardt, K., Die Retinogenese im dreidimensionalen Zellkultursystem des Huhns: Eine zell- und molekularbiologische Studie neurotropher Funktionen der Zytokine GDNF, BDNF und PEDF, in *Technischen Universität Darmstadt*. **2007**, Technischen Universität Darmstadt: Darmstadt. p. 182.
98. Takahashi, K., Okubo, C., Nakamura, M., Iwasaki, M., Kawahara, Y., Tabata, T., Miyamoto, Y., Woltjen, K., und Yamanaka, S., A stress-reduced passaging technique improves the viability of human pluripotent cells. *Cell Reports Methods*, **2022**. 2(2): p. 100155.
99. Baraniak, P.R., Cooke, M.T., Saeed, R., Kinney, M.A., Fridley, K.M., und McDevitt, T.C., Stiffening of human mesenchymal stem cell spheroid microenvironments induced by incorporation of gelatin microparticles. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, **2012**. 11: p. 63-71.
100. Bratt-Leal, A.M., Carpenedo, R.L., Ungrin, M.D., Zandstra, P.W., und McDevitt, T.C., Incorporation of biomaterials in multicellular aggregates modulates pluripotent stem cell differentiation. *Biomaterials*, **2011**. 32(1): p. 48-56.
101. Lacalle, D., Castro-Abril, H.A., Randelovic, T., Domínguez, C., Heras, J., Mata, E., Mata, G., Méndez, Y., Pascual, V., und Ochoa, I., SpheroidJ: An Open-Source Set of Tools for Spheroid Segmentation. *Comput Methods Programs Biomed*, **2021**. 200: p. 105837.

8 LITERATURVERZEICHNIS

102. Ivanov, D.P., Parker, T.L., Walker, D.A., Alexander, C., Ashford, M.B., Gellert, P.R., und Garnett, M.C., Multiplexing Spheroid Volume, Resazurin and Acid Phosphatase Viability Assays for High-Throughput Screening of Tumour Spheroids and Stem Cell Neurospheres. *PLOS ONE*, **2014**. 9(8): p. e103817.
103. Moriconi, C., Palmieri, V., Di Santo, R., Tornillo, G., Papi, M., Pilkington, G., De Spirito, M., und Gumbleton, M., INSIDIA: A FIJI Macro Delivering High-Throughput and High-Content Spheroid Invasion Analysis. *Biotechnology Journal*, **2017**. 12(10).
104. Kim, Y., Baipaywad, P., Jeong, Y. und Park, H., Incorporation of gelatin microparticles on the formation of adipose-derived stem cell spheroids. *International Journal of Biological Macromolecules*, **2018**. 110: p. 472-478.
105. Kim, J., Kigami, H. und Adachi, T., Characterization of self-organized osteocytic spheroids using mouse osteoblast-like cells. *Journal of Biomechanical Science and Engineering*, **2020**. 15(3): p. 20-00227-20-00227.
106. Deynoux, M., Sunter, N., Ducrocq, E., Dakik, H., Guibon, R., Burlaud-Gaillard, J., Brisson, L., Rouleux-Bonnin, F., le Nail, L.R., Hérault, O., Domenech, J., Roingeard, P., Fromont, G., und Mazurier, F., A comparative study of the capacity of mesenchymal stromal cell lines to form spheroids. *PLoS One*, **2020**. 15(6): p. e0225485.
107. Pennock, R., Bray, E., Pryor, P., James, S., McKeegan, P., Sturmey, R., und Genever, P., Human cell dedifferentiation in mesenchymal condensates through controlled autophagy. *Scientific Reports*, **2015**. 5: p. 13113.
108. Luo, L., Zhang, W., Wang, J., Zhao, M., Shen, K., Jia, Y., Li, Y., Zhang, J., Cai, W., Xiao, D., Bai, X., Liu, K., Wang, K., Zhang, Y., Zhu, H., Zhou, Q., und Hu, D., A Novel 3D Culture Model of Human ASCs Reduces Cell Death in Spheroid Cores and Maintains Inner Cell Proliferation Compared With a Nonadherent 3D Culture. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, **2021**. 9.
109. Koudan, E.V., Gryadunova, A.A., Karalkin, P.A., Korneva, J.V., Meteleva, N.Y., Babichenko, I.I., Volkov, A.V., Rodionov, S.A., Parfenov, V.A., Pereira, F., Khesuani, Y.D., Mironov, V.A., und Bulanova, E.A., Multiparametric Analysis of Tissue Spheroids Fabricated from Different Types of Cells. *Biotechnology Journal*, **2020**. 15(5): p. e1900217.
110. Kinney, M.A., Hookway, T.A., Wang, Y. und McDevitt, T.C., Engineering three-dimensional stem cell morphogenesis for the development of tissue models and scalable regenerative therapeutics. *Annals of Biomedical Engineering*, **2014**. 42(2): p. 352-67.
111. Rouwkema, J., Rivron, N.C. und van Blitterswijk, C.A., Vascularization in tissue engineering. *Trends Biotechnology*, **2008**. 26(8): p. 434-41.
112. Kessel, S., Cribbes, S., Déry, O., Kuksin, D., Sincoff, E., Qiu, J., und Chan, L.L., High-Throughput 3D Tumor Spheroid Screening Method for Cancer Drug Discovery Using Celigo Image Cytometry. *SLAS Technology*, **2017**. 22(4): p. 454-465.
113. Stötzel, C., Müller, F.A., Reinert, F., Niederdraenk, F., Barralet, J.E., und Gbureck, U., Ion adsorption behaviour of hydroxyapatite with different crystallinities. *Colloids Surf B Biointerfaces*, **2009**. 74(1): p. 91-5.
114. Gustavsson, J., Ginebra, M.P., Planell, J. und Engel, E., Osteoblast-like cellular response to dynamic changes in the ionic extracellular environment produced by calcium-deficient hydroxyapatite. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **2012**. 23(10): p. 2509-20.
115. Chamchoy, K., Pakotiprapha, D., Pumirat, P., Leartsakulpanich, U., und Boonyuen, U., Application of WST-8 based colorimetric NAD(P)H detection for quantitative dehydrogenase assays. *BMC Biochemistry*, **2019**. 20(1): p. 4.

8 LITERATURVERZEICHNIS

116. Zarkesh, I., Halvaei, M., Ghanian, M.H., Bagheri, F., Sayahpour, F.A., Azami, M., Mohammadi, J., Baharvand, H., und Baghaban Eslaminejad, M., Scalable and cost-effective generation of osteogenic micro-tissues through the incorporation of inorganic microparticles within mesenchymal stem cell spheroids. *Biofabrication*, **2019**. 12(1): p. 015021.
117. Sato, T., Anada, T., Hamai, R., Shiwaku, Y., Tsuchiya, K., Sakai, S., Baba, K., Sasaki, K., und Suzuki, O., Culture of hybrid spheroids composed of calcium phosphate materials and mesenchymal stem cells on an oxygen-permeable culture device to predict in vivo bone forming capability. *Acta Biomater*, **2019**. 88: p. 477-490.
118. Anada, T., Sato, T., Kamoya, T., Shiwaku, Y., Tsuchiya, K., Takano-Yamamoto, T., Sasaki, K., und Suzuki, O., Evaluation of bioactivity of octacalcium phosphate using osteoblastic cell aggregates on a spheroid culture device. *Regenerative Therapy*, **2016**. 3: p. 58-62.
119. Dang, P.N., Dwivedi, N., Phillips, L.M., Yu, X., Herberg, S., Bowerman, C., Solorio, L.D., Murphy, W.L., und Alsberg, E., Controlled Dual Growth Factor Delivery From Microparticles Incorporated Within Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell Aggregates for Enhanced Bone Tissue Engineering via Endochondral Ossification. *Stem Cells Translational Medicine*, **2016**. 5(2): p. 206-217.
120. Kang, H., Wen, C., Hwang, Y., Shih, Y.R., Kar, M., Seo, S.W., und Varghese, S., Biomineralized matrix-assisted osteogenic differentiation of human embryonic stem cells. *Journal of Materials Chemistry B*, **2014**. 2(34): p. 5676-5688.
121. Vorwald, C., Ho, S., Woods, J. und Leach, J., High-Throughput Formation of Mesenchymal Stem Cell Spheroids and Entrapment in Alginate Hydrogels, in *Methods in Molecular Biology*. **2018**. p. 139-149.
122. Chae, S., Hong, J., Hwangbo, H. und Kim, G., The utility of biomedical scaffolds laden with spheroids in various tissue engineering applications. *Theranostics*, **2021**. 11(14): p. 6818-6832.
123. Togo, H., Terada, K., Ujitsugu, A., Hirose, Y., Takeuchi, H., und Kusunoki, M., Fabrication Scaffold with High Dimensional Control for Spheroids with Undifferentiated iPS Cell Properties. *Cells*, **2023**. 12(2): p. 278.

APPENDIX

I ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
ALPL	Alkaline Phosphatase
ASC	Adipose-derived stem cells, dt. Adipöse mesenchymale Stammzellen
MSC	Bone marrow-derived mesenchymal stem cells, dt. Mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark
BSA	Bovines serum albumin, dt. Rinderserumalbumin
Calcein-AM	Calcein Acetoxymethylester
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid, dt. komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
DKK1	Dickkopf-related protein 1
DM	Differenzierungsmedium
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
DNA	Deoxyribonucleic acid, dt. Desoxyribonukleinsäure
EDX	Energiedispersive Röntgenspektroskopie
EF1a	Elongation factor 1-alpha 1, dt. Elongationsfaktor 1-alpha 1
FCS	Fetal calf serum, dt. fetales Kälberserum
FGF	Fibroblast growth factor, dt. Fibroblasten-Wachstumsfaktor
FMZ	Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde Universität Würzburg
GM	Growing medium, dt. Wachstumsmedium
HMDS	Hexamethyldisilazane
Hydroxylapatit	HA

H&E	Hämatoxylin & Eosin
KEM	Knochenersatzmaterial
mg	Milligram
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar
PBS	Phosphore buffered solution, dt. Phosphorpufferlösung
PCR	Polymer chain reaction, dt. Polymerase-Kettenreaktion
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
qPCR	Quantitative polymer chain reaction, dt. Quantitative Polymerkettenreaktion
REM	Rasterelektronenmikroskop
RNA	Ribonucleic acid, dt. Ribonukleinsäure
rpm	Rounds per minute, dt. Runden pro Minute
SD	Standard deviation, dt. Standardabweichung
sek	Sekunde
SPP1	Sekreted Phosphoprotein 1, dt. sekretiertes Phosphoprotein 1
Stanfieldite	SF
Std	h
d	Tag
UV	Ultraviolett
WST	Water soluble tetrazolium, dt. wasserlösliches Tetrazolium
XRD	X-ray diffraction, dt. Röntgen-Diffraktometrie

II **ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

Abbildung 1: Zonen des Sphäroids.....	6
Abbildung 2: Design des Micropillars.....	18
Abbildung 3: Schema Sphäroid mit Biokeramik-Partikel.....	19
Abbildung 4: Gemessene Partikeldurchmesser.....	33
Abbildung 5: optische Mikroskop Bilder von Biokeramik-Partikel.....	33
Abbildung 6: REM-Aufnahmen der Biokeramik-Partikel.....	34
Abbildung 7: EDX-Aufnahmen der Biokeramik-Partikel.....	35
Abbildung 8: XRD der Biokeramik-Pulver.....	36
Abbildung 9: ICP-Diagramm der Biokeramik-Partikel.....	37
Abbildung 10: ASC-Sphäroide mit variabler Zellzahl.....	39
Abbildung 11: Sphäroide mit einer Zellzahl: 3000 und 6000.....	40
Abbildung 12: Fehlgeschlagene Sphäroidbildung.....	40
Abbildung 13: Sphäroide mit variablen Biokeramik-Partikelanteilen.....	41
Abbildung 14: Lebend-tot Aufnahmen der ASC-Sphäroide mit variablen Biokeramik- Partikelanteilen.....	43
Abbildung 15: Hämatoxylin & Eosin Aufnahmen der ASC-Sphäroide.....	44
Abbildung 16: Alizarin Aufnahmen der ASC-Sphäroide.....	45
Abbildung 17: Von Kossa Färbung der ASC-Sphäroide.....	46
Abbildung 18: ASC-Sphäroid Aufnahmen über einen Zeitraum von 21 Tagen.....	48
Abbildung 19: Diagramm der ASC-Sphäroid Durchmesser.....	49
Abbildung 20: Diagramm der metabolischen Aktivität der ASC-Sphäroide.....	50
Abbildung 21: Lebend-tot Aufnahmen der ASC-Sphäroide über einen Zeitraum von 21 Tagen.....	53
Abbildung 22: Lebend-tot Aufnahmen der ASC-Sphäroide mit Hydroxylapatit über einen Zeitraum von 21 Tagen.....	54
Abbildung 23: Lebend-tot Aufnahmen der ASC-Sphäroide mit Stanfieldite über einen Zeitraum von 21 Tagen.....	55
Abbildung 24: ASC-Sphäroide mit feinerem Hydroxylapatit-Pulver.....	56
Abbildung 25: ASC-Sphäroide im Eppendorf Röhrchen.....	58
Abbildung 26: REM-Aufnahmen der ASC-Sphäroide.....	59
Abbildung 27: EDX-Aufnahmen der ASC-Sphäroide.....	60
Abbildung 28: optische Mikroskop Aufnahmen von MSC-Sphäroiden.....	62
Abbildung 29: Lebend-tot Aufnahmen der MSC-Sphäroide über einen Zeitraum von 21 Tagen.....	64
Abbildung 30: Lebend-tot Aufnahmen der MSC-Sphäroide mit Hydroxylapatit über einen Zeitraum von 21 Tagen.....	65

Abbildung 31: Lebend-tot Aufnahmen der MSC-Sphäroide mit Stanfieldite	
über einen Zeitraum von 21 Tagen.....	66
Abbildung 32: qPCR MSC-Sphäroide.....	69

III TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Technische Geräte	10
Tabelle 2: Verwendete Materialien	12
Tabelle 3: Chemikalien und Medien.....	14
Tabelle 4: Verwendete Kits	15
Tabelle 5: Software	15
Tabelle 6: Zellen	15
Tabelle 7: alle verwendeten Medien für ASC und MSC	16
Tabelle 8: Sphäroide bestehend aus variablen Zellzahlen.....	19
Tabelle 9: Sphäroide bestehend aus variabler Pulverkonzentration.....	19
Tabelle 10: ICP ausgewertete Gruppen.....	27
Tabelle 11: Mastermix.....	29
Tabelle 12: Temperaturverlauf der cDNA-Synthese.....	30
Tabelle 13: Housekeeping- und osteogene Marker spezifische Primer Sequenzen mit den verwendeten Konzentrationen und Temperaturen	30
Tabelle 14: Mastermix für EF1a (Housekeeping Gen).....	31
Tabelle 15: Mastermix für ALPL, SPP1, DKK1	31
Tabelle 16: qPCR-Temperaturverlauf	31

IV DANKSAGUNG

Herzlichen Dank an Prof. Jürgen Groll, Dr. Kristina Andelovic und Dr. Taufiq Ahmad für die Bereitstellung dieser wissenschaftlichen Arbeit.

Ein besonderer, aufrichtiger Dank gebührt Kiki, deren unermüdliche Unterstützung und Engagement maßgeblich dazu beigetragen haben, dass diese Promotion erfolgreich zustande gekommen ist. Danke, dass du dich meiner angenommen hast und jede noch so dumme Frage zu jeder noch so späten Stunde beantwortet hast. Für deine Zeit und dein Engagement bin ich unendlich dankbar.

Ebenso möchte ich Dr. Carina Blum, Franziska Fella, Corina Heinze, Isabell Biermann, Dr. Philipp Stahlhut, Dr. Elke Vorndran, Dr. Matthias Ryma, Dr. Tatjana Schilling, Dr. Andrea Ewald, Michael Bartolf-Kopp, Camilla Mussoni, Judith Friedlein, Alevtina Rosenthal und Friederike Kaiser danken. Vielen Dank für eure Geduld und die Zeit, die ihr investiert habt, um mich bei der Durchführung dieser Dissertation zu unterstützen. Ohne dieses kollektive Engagement wären die Ergebnisse niemals zustande gekommen.

Herrn Prof. Gbureck danke ich herzlich für die Bereitstellung als Referent, und Prof. Kübler möchte ich für die Übernahme des Korreferats meinen Dank aussprechen.

Außerdem möchte ich meiner Mutter Zahra meinen Dank aussprechen. Danke dafür, dass du bei all meinen Vorhaben immer hinter mir stehst und mich unterstützt. Du bist einfach die Beste. Ich möchte mich auch von Herzen bei meiner Familie bedanken – Maryam, Celine, Ari, Ruth, Kian und Levin. Ihr seid mir sehr wichtig.

Zuletzt möchte ich meinen aufrichtigen Dank an meinen Freundeskreis aussprechen, insbesondere an Basti, Lena, Robin und Resi. In den vergangenen Monaten haben sie mir mit ihrer Unterstützung und ihrem offenen Ohr beigestanden. Vielen Dank dafür!

V LEBENSLAUF

[REDACTED]
[REDACTED]

[REDACTED]
[REDACTED]

[REDACTED]
[REDACTED]

[REDACTED]
[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]
[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]
[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]
[REDACTED]

[REDACTED]

VI EIDESSTAATLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, Jasamin Morabian, an Eides statt, dass die Dissertation mit dem Titel "Etablierung von Stammzell-Sphäroiden mit inkorporierten Biokeramik-Partikeln zur Förderung der osteogenen Differenzierung" eigenständig verfasst wurde. Insbesondere habe ich sie ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters angefertigt und ausschließlich die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet.

Während der Durchführung der PCR, der REM- und EDX-Bildaufnahme sowie der ICP- und XRD-Analyse habe ich praktische Unterstützung von folgenden Personen erhalten: Dr. Kristina Andelovic, Dr. Philipp Stahlhut, Franziska Feller, Isabell Biermann und Friederike Kaiser. Weitere Personen waren nicht an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit beteiligt.

Ich versichere außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Würzburg, den 15.09.2023

Jasamin Morabian